



Thèse

« Synthèse et activité biologique de dérivés et analogues de l'acide pulvinique pour une application en protection contre les rayonnements ionisants »

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité : Chimie Organique

Par

Antoine LE ROUX

Ingénieur ENSCM-Montpellier

Soutenance effectuée le 6 décembre 2010 devant la commission d'examen :

Prof. Marcel HIBERT (Université de Strasbourg)

Examineur interne

Prof. Jean-Luc PIRAT (Université de Montpellier II)

Rapporteur externe

Prof. Jacques BORG (Université de St Etienne)

Rapporteur externe

Dr Thierry LE GALL (CEA Saclay)

Membre invité

Dr Pierre BISCHOFF (Université de Strasbourg)

Directeur de thèse

Dr Alain WAGNER (Université de Strasbourg)

Co-directeur de thèse-Membre invité



Thèse

« Synthèse et activité biologique de dérivés et analogues de l'acide pulvinique pour une application en protection contre les rayonnements ionisants »

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité : Chimie Organique

Par

Antoine LE ROUX

Ingénieur ENSCM-Montpellier

Soutenance effectuée le 6 décembre 2010 devant la commission d'examen :

Prof. Marcel HIBERT (Université de Strasbourg)

Examineur interne

Prof. Jean-Luc PIRAT (Université de Montpellier II)

Rapporteur externe

Prof. Jacques BORG (Université de St Etienne)

Rapporteur externe

Dr Thierry LE GALL (CEA Saclay)

Membre invité

Dr Pierre BISCHOFF (Université de Strasbourg)

Directeur de thèse

Dr Alain WAGNER (Université de Strasbourg)

Co-directeur de thèse-Membre invité

A mes parents, à ma famille,

A Dorothee et Julien...

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Laboratoire des Systèmes Chimiques Fonctionnels pour la partie chimie et au Laboratoire de Radiobiologie Expérimentale et de Cancérologie pour la partie biologie, sous les directions des Drs Pierre Bischoff et Alain Wagner. Je tiens à rendre hommage au Dr Charles Mioskowski, qui fut à l'initiative de ce projet, et que je n'aurai malheureusement pas eu la chance de connaître. Je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse, Pierre Bischoff et Alain Wagner, pour m'avoir accueilli dans leurs équipes respectives et m'avoir transmis leur savoir dans les deux disciplines. Je les remercie également pour leur bonne humeur et les discussions *extra-professionnelles* que nous avons eues, notamment lors de nos voyages en Belgique pour les tests *in vitro*. Je tiens également à féliciter le courage de Pierre, encadrer et apprendre la biologie à un chimiste organicien n'est pas toujours chose facile...

Je remercie la Délégation Générale de l'Armement pour le support financier au cours de ces trois années, ainsi que les membres de chaque équipe du projet PROPERGAL, les Drs Christine Amourette, Thierry Le Gall, Ghassoub Rima, Jean-Michel El-Hage-Chahine et Michel Diserbo, ainsi que les thésards Brice Nadal, Alexandre Korovitch et Damien Cressier. Je remercie également le Pr John Gueulette et le Dr Jean-Marc Denis pour nous avoir permis d'effectuer les irradiations sur les infrastructures de l'Université Catholique de Louvain-La-Neuve et nous avoir accueilli avec toute leur bonne humeur. J'adresse également mes remerciements aux Drs Marjana Novic et Frank Hoonakker pour toutes les discussions sur la chemo-informatique.

Je tiens également à adresser ma plus profonde gratitude aux membres du jury qui m'auront fait l'honneur de juger mes travaux de thèse : les professeurs Marcel Hibert, Jean-Luc Pirat et Jacques Borg.

Je remercie les membres des services d'analyses, Cyril Antheaume du service RMN, et Patrick Wehrung et Pascale Buisine-Duval pour les analyses de spectrométrie de masse. J'ai une pensée particulière pour Pascale, qui m'aura apporté énormément de soutien au cours de ces années, et surtout dans les moments difficiles. Je ne saurai jamais assez la remercier, et je lui souhaite beaucoup de bonheur à elle et Benoit avec le petit Romain. J'adresse également un grand merci à Marianne et Nathalie pour leur aide précieuse dans les démarches administratives, ainsi qu'à Liliane pour son aide précieuse dans la dernière ligne droite. Je lui souhaite tout le bonheur possible pour sa retraite. Je remercie aussi

chaleureusement le Dr Rachid Baati pour tous ses précieux conseils dans mes recherches de post-docs et les discussions que nous avons eues.

Je remercie enfin tous mes collègues, à commencer par Anaïs pour sa bonne humeur et les excellents moments que nous avons passés tout au long de ces trois années. Merci également à mes collègues et leurs conjoint(e)s : Claire et Ghyslain, Hélène et Julien, Audrey et Geoffray, Cynthia et Olivier, Mathieu et Martin... Merci aussi à Géraldine, Pascuale, Phanélie, Manue, Coraline, Mariia, Mathias, Alexandre, Cédric, Michel, ainsi que Louise et Sacha que je n'aurai pas assez connu, et Clément mon partenaire de squash, Stéphanie, Amélie, Carole et Christophe, Aminatou, la Suffert's team, et Patrick Gizzi (ça c'est pour la fac de pharma...), Alain, Sonia, Lulu, Sylvie, Christine, Danièle, Michel, Claire, et en particulier Inès et Sarah, pour toutes les discussions que nous avons eues (et ça c'est pour le Strauss). J'ai également une profonde gratitude pour tous les Photograffs et notamment Pierre leur président pour leur accueil et m'avoir permis de découvrir une nouvelle passion qu'est la photographie. Je finis en remerciant sincèrement mes parents spirituels Sylvie et Manu, Marine, Lise et Emilie pour leur présence et leur soutien immense dans les moments les plus difficiles et qui auront su (avec Pascale...) me mettre le coup de pied bien placé au bon moment.

J'adresse un immense merci à mes amis de partout en France, Benoît, Dolly et Christophe, Laëti et Mika, Keren, Amandine, Marianne, Nancy, mais avant tout aux charentais Chacha et Fanfan, Camille et Pierre, Mattei et Olivier, ces deux dernières années auront été des plus difficiles mais nous avons su nous aider et nous supporter malgré la distance et les épreuves. A vous particulièrement, ainsi qu'aux familles de Dorothée et Julien, je vous adresse ma plus profonde gratitude et mon soutien...

Je remercie enfin les personnes qui me sont les plus chères, à commencer par mes parents pour leur soutien tout au long de mes années d'études et pour m'avoir donné la possibilité et la chance d'en arriver jusque là, je sais que je n'y serais jamais arrivé sans eux. Je remercie également toute ma famille. J'adresse enfin un immense merci à Oriane pour le bonheur sans limite qu'elle m'apporte au quotidien, pour la motivation qu'elle me donne, pour ce qu'elle est et l'espoir qu'elle m'apporte.

Je termine enfin avec une pensée particulière pour Dorothée et Julien. Depuis deux ans maintenant il n'y a plus une journée sans que je pense à vous. Malgré vous vous ne m'aurez pas rendu la tâche facile, à l'origine de quelques dépressions et crises de nerfs. A vous particulièrement je vous dédie ce manuscrit et l'ensemble des travaux et efforts que j'aurais entrepris pour le réaliser, vous êtes la force qui me fait tenir et aller le plus loin possible.

Sommaire

Abréviations.....	13
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Les rayonnements ionisants : présentation, effets biologiques, radioprotection.....	23
I. Les rayonnements : présentation et généralités.....	23
I. 1. Désintégration α	23
I. 2. Désintégrations β	26
I. 3. Emission γ et rayons X.....	27
I. 4. Neutrons.....	28
I. 5. Unités mises en jeu.....	28
II. Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	29
II. 1. La radiolyse de l'eau.....	30
II. 2. Effets directs des radiations et des espèces activées de l'oxygène.....	32
II. 2. i. Lésions de l'ADN et mécanismes de réparation.....	32
II. 2. i. a. Lésions de l'ADN.....	32
II. 2. i. b. Les différents mécanismes de réparation de l'ADN.....	35
II. 2. ii. La peroxydation lipidique.....	37
II. 2. iii. La dégradation de protéines.....	38
II. 3. Conséquences des dégradations induites par les radiations.....	39
II. 3. i. Mécanismes de mort cellulaire.....	39
II. 3. ii. Pathologies induites par une irradiation.....	40
III. Moyens de protection contre les radiations.....	42
III. 1. Les moyens de défense endogènes.....	42
III. 1. i. La protection enzymatique.....	42
III. 1. i. a. Les superoxydes dismutases (SOD).....	42
III. 1. i. b. Les catalases.....	43
III. 1. i. c. La glutathione peroxydase.....	44
III. 1. ii. Le piégeage par les ions métalliques.....	45
III. 1. iii. La protection par des petites molécules organiques.....	45

III. 2	Les moyens de défense exogènes.....	46
III. 2. i.	<i>Les antioxydants.....</i>	47
III. 2. ii.	<i>Les inhibiteurs de mort cellulaire.....</i>	49
III. 2. iii.	<i>Modulateurs du cycle cellulaire.....</i>	50
III. 2. iv.	<i>Activateurs des facteurs de croissance.....</i>	50
III. 2. v.	<i>Conclusion.....</i>	51
IV.	Découvertes des acides pulviniques comme radioprotecteurs potentiels.....	51
V.	Conclusions.....	55
	Références bibliographiques du chapitre 1.....	57
	Chapitre 2 : Synthèse de pulvinamides.....	59
I.	Généralités sur les acides pulviniques.....	61
II.	Synthèse des acides pulviniques : état de l'art.....	63
II. 1.	Stratégie basée sur la construction du cycle buténolide.....	64
II. 1. i.	<i>Passage par une 1,2-dicétone acyclique.....</i>	64
II. 1. ii.	<i>Construction du cycle par une condensation de Dieckmann.....</i>	68
II. 1. iii.	<i>Méthode de Langer.....</i>	68
II. 2.	Stratégies basées sur la dérivatisation d'un cycle déjà formé.....	71
II. 2. i.	<i>Travaux de Pattenden : synthèse au départ d'un anhydride maléique.....</i>	71
II. 2. ii.	<i>Travaux de Mioskowski et Le Gall : synthèse par l'intermédiaire d'un acide tétronique.....</i>	73
II. 3.	Conclusions sur les voies de synthèse présentes dans la littérature.....	76
II. 4.	Voies de synthèse étudiées au laboratoire pour la synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques.....	78
II. 4. i.	<i>Passage par une réaction de Reformatsky.....</i>	78
II. 4. ii.	<i>Passage par un acide tétronique.....</i>	79

II. 5.	Conclusion sur la synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques.....	80
III.	Réactivité de la bis-lactone 71 avec des amines.....	81
IV.	Optimisation de la synthèse de la bis-lactone 71.....	84
IV. 1.	Etude de nouvelles voies de synthèse.....	85
	IV. 1. i. A partir d'une 1,2-dilactone.....	85
	IV. 1. ii. Utilisation d'une réaction de Wittig.....	87
IV. 2.	Optimisation de la voie utilisant un acide tétronique.....	91
V.	Synthèse de pulvinamides.....	94
V. 1.	Synthèse de dérivés hydrophiles.....	94
V. 2.	Mesure de la solubilité.....	103
V. 3.	Synthèse de molécules antioxydantes hybrides.....	105
VI.	Conclusions.....	109
	<i>Références bibliographiques du chapitre 2.....</i>	<i>111</i>
	Chapitre 3 : Recherche de nouveaux antioxydants par criblage	
	<i>in silico</i> selon la méthode QSPR.....	115
I.	Introduction.....	117
II.	Principe du modèle de prédiction.....	118
III.	Synthèse des 3-aryl-4-hydroxycoumarines : étude bibliographique...	125
IV.	Synthèse des composés 130 et 131.....	128
V.	Synthèse de nouveaux dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarines.....	130

V. 1.	Modifications du cycle A.....	130
V. 2.	Modifications du cycle B.....	135
V. 3.	Modifications du cycle C.....	136
V. 4.	Conclusion.....	139
VI.	Synthèse de composés combinant les substituants donnant la meilleure activité sur le test au DPPH.....	139
VII.	Conclusions.....	143
	<i>Références bibliographiques du chapitre 3.....</i>	<i>145</i>
	Chapitre 4 : Evaluation biologique des activités antioxydantes et radioprotectrices.....	147
I.	Tests antioxydants et radioprotecteurs employés.....	149
I. 1.	Test de capture du radical DPPH.....	149
I. 2.	Test à l'ABTS.....	151
I. 3.	Test de protection de la thymidine.....	152
I. 4.	Test de radioprotection cellulaire.....	155
	<i>I. 4. i. Lignée cellulaire utilisée.....</i>	<i>155</i>
	<i>I. 4. ii. Suivi de la prolifération cellulaire.....</i>	<i>156</i>
	<i>I. 4. iii. Protocole.....</i>	<i>156</i>
II.	Activités antioxydantes et radioprotectrices des dérivés d'acides pulviniques synthétisés.....	157
II. 1.	Résultats obtenus sur les tests antioxydants.....	157
	<i>II. 1. i. Test de capture du radical DPPH.....</i>	<i>157</i>
	<i>II. 1. ii. Test à l'ABTS.....</i>	<i>159</i>
	<i>II. 1. iii. Test de protection de la thymidine.....</i>	<i>161</i>
	<i>II. 1. iii. a. Protection de la thymidine sous radiolyse.....</i>	<i>161</i>
	<i>II. 1. iii. b. Protection de la thymidine sous dégradation en condition de Fenton.....</i>	<i>164</i>

II. 1. iii. c.	Protection de la thymidine sous dégradation par irradiation UV	166
II. 1. iv.	<i>Conclusion sur l'activité des composés testés</i>	168
II. 2.	Résultats de radioprotection sur culture cellulaire.....	169
II. 3.	Conclusions sur les tests réalisés sur les dérivés d'acides pulviniques....	180
III.	Activités antioxydantes et radioprotectrices des 3-aryl-4-hydroxycoumarines	181
III. 1.	Résultats sur le test de protection de la thymidine avec les composés 130 et 131	182
III. 2.	Mesure de l'activité coumarines synthétisés sur le test de capture du radical DPPH.....	184
III. 2. i.	<i>Influence du cycle A</i>	184
III. 2. ii.	<i>Influence du cycle B</i>	185
III. 2. iii.	<i>Influence du cycle C</i>	186
III. 2. iv.	<i>Etude des structures améliorées</i>	187
III. 3.	Résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine.....	189
III. 3. i.	<i>Effets des modifications sur le cycle A</i>	189
III. 3. ii.	<i>Effets des modifications sur le cycle B</i>	191
III. 3. iii.	<i>Effets des modifications sur le cycle C</i>	192
III. 3. iv.	<i>Comparaison avec les scores issus du modèle de prédiction</i>	193
III. 4.	Conclusions sur les tests antioxydants réalisés avec les coumarines.....	194
III. 5.	Résultats obtenus sur le test de radioprotection cellulaire.....	196
IV.	Conclusion générale sur les tests biologiques de l'activité antioxydante et radioprotectrice des dérivés d'acide pulvinique et de coumarines synthétisées	200
	Références bibliographiques du chapitre 4	205
	Chapitre 5 : Synthèse de molécules complexantes du ¹³⁷Cs	207
I.	Introduction	209

II. Synthèse de premières structures complexantes.....	210
III. Evaluation du pouvoir complexant des composés 207, 209 et 212	213
IV. Synthèse de dérivés mixtes acide pulvinique/éther-couronne.....	216
V. Conclusions.....	219
<i>Références bibliographiques du chapitre 5.....</i>	221
Conclusion et perspectives.....	223
Partie expérimentale.....	231

Abréviations

A

ABTS : acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Ac : acétyle

Ac : anticorps

AChE : acétylcholinestérase

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

AIBN : azobis(isobutyronitrile)

AO : antioxydant

APTS : acide *para*-toluène sulfonique

aq : aqueux

Ar : aryle

ARP : pouvoir antiradicalaire

B

Bn : benzyle

Boc : *tert*butyloxy-carbamate

Bu : butyle

C

CAN : cérium ammonium nitrate

cat : catalyseur

CCM : chromatographie sur couche mince

CDI : carbonyldimidazole

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

CPANN : Counter-Propagation Artificial Neural Network

D

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DCC : *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DEAD : diéthylazodicarboxylate

DGA : Délégation Générale pour l'Armement

DIPC : *N, N'*-diisopropylcarbodiimide

DIPEA : *N, N*-di-*iso*-propyléthylamine

DMAP : 4-(diméthylamino)pyridine

DME : éther diméthylque

DMF : *N, N*-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

DTNB : 5,5'-dithiobis(acide 2-nitrobenzoïque)

E

EAO : espèces activées de l'oxygène
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
éq. : équivalent
ESI : ionisation par électrospray
Et : éthyle
EtOAc : acétate d'éthyle
EtOH : éthanol

G

Gy : Gray

H

h : heure(s)
HPLC : chromatographie liquide haute performance
HRMS : spectrométrie de masse haute résolution
HWE : Horner-Wadsworth-Emmons
HAT : Hydrogen Atom Transfer

I

Ig : immunoglobuline
iPr : *iso*-propyle
IR : infrarouge

J

j : jour(s)

L

LDA : di-*iso*-propylamidure de lithium
LICA : *N*-cyclohexyl-*N*-*iso*-propylamidure de lithium
LiHMDS : bis(triméthylsilyl)amidure de lithium

M

Me : méthyle
MeOH : méthanol
MOM : méthoxyméthyle
MS : spectrométrie de masse

N

NBS : *N*-bromosuccinimide
NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

P

PBS : phosphate buffered saline
Pd/C : palladium sur charbon
PEA : Projet d'Etudes Amont
Pf : point de fusion

Ph : phényl

ppm : parties par million

PROPERGAL : PROtection du PERsonnel – Nouvelle formulation GALénique

Py : pyridine

Q

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship

QSPR : Quantitative Structure-Property Relationship

R

Rf : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

S

SOD : superoxyde dismutase

SPLET : Sequential Proton Loss-Electron Transfert

T

ta : température ambiante

TBAF : fluorure de tétrabutylammonium

t-Bu : *tert*-butyl

TFA : acide trifluoroacétique

TFAA : anhydride trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TMS : triméthylsilyle

tp. : tampon

Ts : tosyle

U

UAF : unité arbitraire de fluorescence

UV : ultraviolet

Introduction

Générale

Introduction générale

« L'Homme et sa sécurité doivent constituer la première préoccupation de toute aventure technologique ». Par cette phrase, Albert Einstein a voulu nous sensibiliser sur la nécessité de développer, en parallèle de toute nouvelle technologie, des moyens de protection des populations. Parmi toutes ces nouvelles technologies, celles faisant intervenir l'énergie nucléaire sont sans conteste parmi les plus dangereuses, et ce à plusieurs titres :

- la radioactivité est connue depuis 1896 par sa découverte par Becquerel, mais ses effets et leurs mécanismes ne sont pas encore tous connus ou maîtrisés,
- en cas d'accident, les effets peuvent être ressentis aussi bien à l'échelle d'un individu qu'à l'échelle de populations entières.

Pour autant, l'énergie nucléaire a de telles applications industrielles de nos jours que nous serions désormais incapables de nous en passer. En effet, 78 % de l'électricité produite en France est produite par des centrales nucléaires, et représente 14 % de l'électricité produite dans le monde. La radioactivité est également utilisée dans le domaine médical pour traiter certains cancers notamment, et également dans le domaine maritime avec le développement de navires militaires à propulsion nucléaire. Cependant, l'énergie nucléaire est également impliquée dans la fabrication d'armes, comme l'illustrent les deux bombes larguées sur Hiroshima et Nagasaki les 6 et 9 août 1945, faisant des centaines de milliers de victimes. Ces deux bombes sont les seules à ce jour à avoir été utilisées à des fins militaires, les suivantes n'ayant fait que l'objet d'essais, dans l'atmosphère ou souterrains. Pendant la Guerre Froide, des *doctrines de dissuasion* ont vu le jour afin de réguler l'emploi des armes nucléaires à des fins de prévention. Cependant, en dépit de ces doctrines, une nouvelle forme de menace a vu le jour, à savoir le terrorisme nucléaire par le détournement de matières radioactives.

Avec l'essor de l'utilisation massive de l'énergie nucléaire est apparu le risque associé à une exposition accidentelle aux radiations qu'elles produisent, et il convient donc de disposer de moyens **préventifs** de protection contre ces menaces. Les trois exemples suivants, d'origines diverses, illustrent les dégâts que peuvent avoir une exposition accidentelle à des rayonnements, et ce à plusieurs échelles :

- le 4 juillet 1961, au large des côtes de Norvège : une défaillance du système de refroidissement provoque un accident majeur dans un sous-marin soviétique de

classe K-19. L'équipage est contaminé, plusieurs marins décèdent, et le cœur du réacteur atteint la température de 800°C. L'équipage réussit à reprendre le contrôle grâce à des procédures d'urgence ;

- le 26 avril 1986, la fusion du cœur du réacteur n°4 de la centrale de Tchernobyl (Ukraine) suivie de son explosion libère une quantité énorme d'éléments radioactifs dans l'atmosphère. 250 000 personnes sont évacuées, et des centaines de milliers d'autres personnes seront contaminées par le passage du nuage radioactif, et ce jusqu'en Europe de l'Ouest ;
- en 2005, des patients traités à l'hôpital Jean Monnet d'Epinal par radiothérapie présentent différents troubles. Il apparaît que ces patients ont subi une sur-irradiation de 20 à 30 %. En 2008, la Ministre de la Santé reconnaît que 5 500 personnes traitées par radiothérapie dans cet établissement ont été victimes de surdosages, dont 5 sont décédées.

Ces exemples ont chacun eu lieu à des échelles humaines différentes : locale (irradiation de tissus sains), individuelle (quelques personnes), et exposition de masse (des milliers d'individus). Si des protections physiques individuelles existent (par exemple l'emploi de vêtements de protection ou d'écrans en béton ou en plomb), il est difficile en revanche de disposer aussi bien d'une protection à l'échelle cellulaire que d'un moyen de protection de populations entières. Dans ce dernier cas, la seule prévention encore utilisée à ce jour reste l'absorption de pastilles d'iode afin de saturer la glande thyroïde en iode et limitant ainsi la fixation d'iode radioactif, mais ce traitement ne va protéger le corps humain que d'une partie des agressions. Il est donc nécessaire de trouver des moyens de protection préventifs contre les rayonnements.

Les radiations ionisantes, au contact avec le corps humain, vont générer dans les cellules des radicaux libres, particulièrement réactifs et toxiques. Ils vont attaquer le matériel biologique contenu dans les cellules et le dégrader, conduisant à terme à la mort de la cellule. Au sein d'organes ou de tissus sensibles, une destruction cellulaire massive va provoquer des lésions graves pouvant entraîner la mort. Afin de lutter contre les effets néfastes des radiations, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées. L'une d'elle consiste à administrer une molécule qui va capter les radicaux libres avant qu'ils n'altèrent le contenu cellulaire. Cette stratégie constitue un traitement préventif, il s'agit là de l'approche radioprotectrice « classique » dont les applications sont principalement limitées à la radiothérapie (protection des tissus sains), et à l'intervention en zone contaminée. Elle justifie cependant de nouvelles recherches, car les molécules utilisées dans ce but, même les plus récentes, restent à ce jour soit d'une efficacité insuffisante, soit douées d'effets secondaires sévères.

Dans le but de trouver de nouvelles molécules utilisables dans le cadre d'un traitement préventif, nous nous sommes tournés vers les **polyphénols**. En effet, plusieurs de ces molécules sont connues pour avoir d'excellentes activités antioxydantes et antiradicalaires. En 2004, un laboratoire du CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) de Saclay a mis en évidence l'activité radioprotectrice particulièrement intéressante de la **norbadiione A** (1, figure 1), un polyphénol présent dans de nombreux champignons. Cependant, la toxicité ainsi que la faible solubilité en milieu aqueux de la norbadiione A ont limité ses études biologiques *in vitro* et *in vivo*. L'étude structurale de cette molécule a montré qu'elle était composée de deux motifs identiques dérivés de l'acide pulvinique. Ces motifs seuls se sont révélés aussi actifs que la norbadiione A, nous avons en conséquence cherché à développer de nouveaux agents de radioprotection dérivés des acides pulviniques.

Le **chapitre 1** de cette thèse présentera dans un premier temps quelques généralités sur les rayonnements ionisants auxquels l'homme peut potentiellement être soumis en cas d'irradiation accidentelle, ainsi que leurs effets sur l'organisme. Nous présenterons ensuite les moyens de défense développés par l'organisme afin de se protéger naturellement contre ces rayonnements ionisants. Enfin nous terminerons ce chapitre par les différentes classes d'agents radioprotecteurs étudiés et développés à ce jour.

Dans le **chapitre 2** nous ferons un rappel bibliographique des différentes voies de synthèse existant pour la synthèse des acides pulviniques. Nous présenterons ensuite les voies de synthèses étudiées au laboratoire pour accéder à un intermédiaire commun de type bis-lactone. Ce composé permettra par la suite une dérivatisation aisée pour obtenir des dérivés d'acides pulviniques solubles dans l'eau et possédant une meilleure biodisponibilité d'une part, et des dérivés hybrides contenant un second motif antioxydant d'autre part.

Le **chapitre 3** traitera de la recherche de nouveaux composés actifs par une approche QSPR (Quantitative Structure-Property Relationship). Cette étude a permis de mettre en évidence des dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarines (figure 1). Dans ce chapitre nous présenterons le principe du modèle QSPR, puis nous présenterons les approches synthétiques utilisées au laboratoire pour accéder rapidement à de nombreux dérivés afin d'effectuer une étude de relation structure-activité.

Dans le **chapitre 4** seront présentés les différents tests biologiques effectués sur les composés synthétisés, puis les résultats obtenus. Nous tenterons d'effectuer une corrélation entre les différents tests afin de mieux comprendre les mécanismes de radioprotection mis en jeu.

Enfin, nous présenterons dans le **chapitre 5** une étude basée sur l'exploitation d'une autre propriété de la norbadione A, à savoir affinité pour les ions alcalins, et en particulier le césium. Cette étude a été menée dans le but de développer des agents de détoxification d'éléments contaminés au ^{137}Cs radioactif.

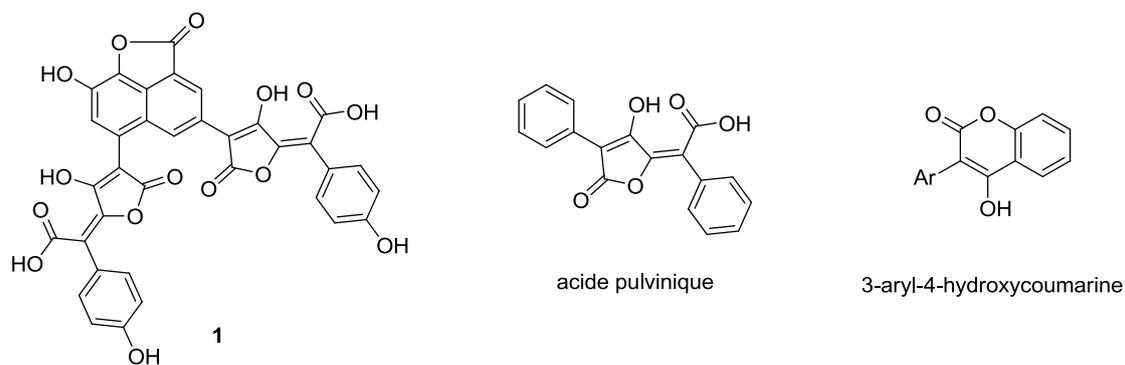


Figure 1 : structure de la Norbadione A **1** et de l'acide pulvinique, structure générale des 3-aryl-4-hydroxycoumarines

Chapitre 1

Les rayonnements ionisants :

présentation, effets biologiques, radioprotection

Chapitre 1 : Les rayonnements ionisants : présentation, effets biologiques, radioprotection

I. Les rayonnements : présentation et généralités¹

Les radiations ionisantes sont des rayonnements qui vont provoquer sur leur passage des ruptures de liaisons chimiques dans la matière qu'ils traversent. Ils sont de nature particulaire (particules α et β , neutrons, protons, ions lourds) ou électromagnétique (rayons γ , X). Ils peuvent être issus de la désintégration spontanée des noyaux des isotopes instables de certains éléments, ou produits par des accélérateurs. Nous allons dans cette première partie présenter les principaux types de rayonnements ionisants pouvant intervenir lors d'une irradiation accidentelle.

I. 1. Désintégration α

Les désintégrations α ne s'observent que pour les atomes très lourds (numéro atomique $Z > 82$) et dont le noyau contient un excès de neutrons. Lors de sa désintégration, le noyau va émettre une particule appelée α , constituée de 2 protons et 2 neutrons, soit un noyau d'hélium. Par exemple, la désintégration de l'uranium 238 produira du thorium 234 et un noyau d'hélium (figure 2).

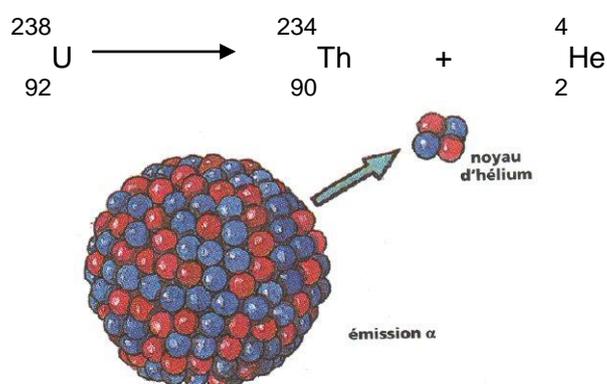


Figure 2 : désintégration α : exemple de désintégration de l'uranium 238

Cette particule α est émise avec une énergie cinétique caractéristique du radionucléide émetteur. Cette énergie est généralement très élevée (1 MeV à 10 MeV), et sera rapidement absorbée par la matière. Ainsi, dans un tissu biologique, la profondeur de pénétration sera de quelques dizaines de μm , la particule délivrant son énergie dans les couches les plus superficielles de l'épiderme. Une feuille de papier peut suffire pour arrêter ces particules.

I. 2. Désintégrations β

Il existe deux types de désintégrations β , nommées β^- et β^+ . La désintégration β^- correspond à la transformation d'un neutron en proton, éjectant ainsi un électron. Elle s'observe pour des noyaux possédant un excès de neutron. Par exemple le cobalt 60 se désintègre par émission β^- en nickel 60 (figure 3).

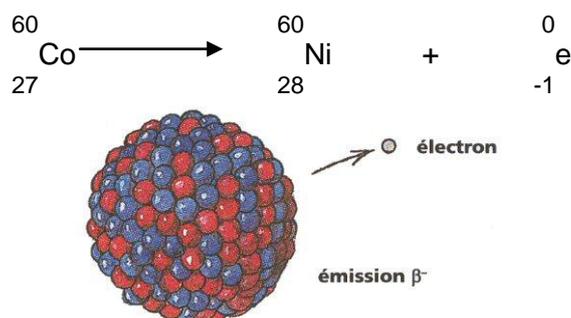


Figure 3 : désintégration β^- : exemple de désintégration du cobalt 60

Inversement, la désintégration β^+ s'observera pour des noyaux ayant un excédent de protons. Le processus est alors l'inverse du précédent, libérant dans ce cas un électron positif, nommé positon. C'est par exemple le cas du carbone 11 qui libère un positon en formant du bore 11 (figure 4).

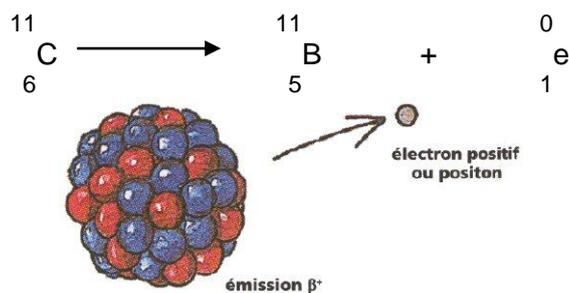


Figure 4 : désintégration β^+ : exemple de désintégration du carbone 11

Les énergies mises en jeu sont généralement plus faibles que pour les désintégrations α , elles seront par contre plus difficilement absorbées par la matière, pénétrant ainsi plus profondément dans les tissus. La profondeur de pénétration va dépendre de son énergie et peut varier d'une fraction de micromètres à quelques millimètres. Des couches protectrices d'aluminium de quelques millimètres peuvent être nécessaires pour les arrêter.

I. 3. Emission γ et rayons X

Suite à une désintégration α ou β , le noyau peut se retrouver à un niveau d'énergie instable. Le noyau est alors dit excité. Il va alors se désexciter et retomber à un niveau d'énergie inférieur. Lors de cette stabilisation, un photon peut être émis, on a alors une transition γ , dont l'énergie associée est $E = h \cdot \nu = E_i - E_f$. Les niveaux d'énergie étant bien définis pour chaque noyau, la mesure de l'énergie associée permet donc avec beaucoup de précision de remonter à la nature du radionucléide émetteur. Les énergies mises en jeu peuvent varier de quelques dizaines de KeV à plus de 1 MeV, et sont suffisantes pour ioniser des atomes. A titre d'exemple, nous avons vu précédemment que, par désintégration β^- , le cobalt 60 génère du nickel 60. Ce noyau est à un niveau d'énergie instable et se stabilise par émission d'un rayonnement γ (figure 5).

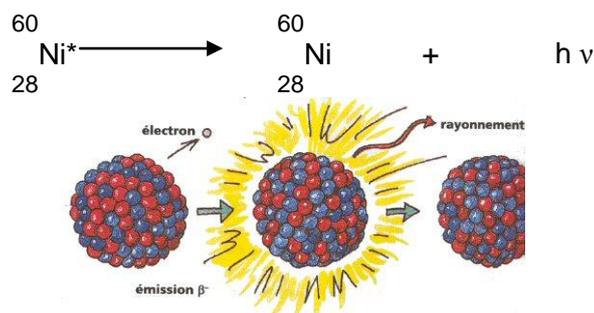


Figure 5 : désintégration γ : exemple de désintégration du nickel 60 excité, issu de la désintégration β^- du cobalt 60

Les rayons X sont de même nature que les rayons γ mais diffèrent dans leur mode d'émission. En effet, les rayons X seront produits suite au bombardement d'atomes par un faisceau de particules d'énergie suffisante, généralement des électrons. Ces rayonnements pénètrent facilement dans la peau et traversent le corps humain, il faut des épaisseurs de plomb de plusieurs centimètres pour les arrêter.

I. 4. Neutrons

Les neutrons n'étant pas chargés, ils seront insensibles aux champs électriques régnant au sein des atomes. Ils perdront donc leur énergie essentiellement par collision avec les noyaux des atomes rencontrés. Ils traverseront ainsi les métaux les plus lourds, mais seront facilement arrêtés par des atomes légers et donc par le corps humain.

I. 5. Unités mises en jeu

Les rayonnements ionisants sont produits par désintégration d'un noyau. Une première grandeur est l'**activité** d'une source radioactive. Elle se définit par le nombre de transformations nucléaires spontanées par unité de temps et s'exprime en **Becquerel** (Bq). On utilise également le **Curie** (Ci) : $1 \text{ Ci} = 37 \cdot 10^9 \text{ Bq}$. L'unité d'énergie couramment utilisée en physique nucléaire est l'**électron-volt** (eV, $1 \text{ eV} = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$), elle correspond à l'énergie d'un électron accéléré par un potentiel de 1 volt.

Enfin le terme de **dose absorbée** est couramment employé en radiobiologie et correspond à l'énergie globale absorbée par unité de masse de matière. Elle est exprimée en **Gray (Gy)**, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$. Cependant les effets biologiques d'une irradiation ne vont pas dépendre seulement de la valeur de la dose administrée mais également des facteurs suivants :

- la nature du rayonnement,
- la sensibilité du tissu irradié,
- le débit de dose et son fractionnement,
- la distribution spatiale de la dose absorbée.

Les rayonnements ionisants vont avoir plusieurs effets sur les organismes vivants. Si des faibles doses pourront facilement être prises en charge par des moyens de défense naturels, de fortes doses de rayonnements pourront avoir des conséquences bien plus importantes. Ainsi, la connaissance des principaux effets de ces rayonnements sur les organismes vivants s'avère importante afin de développer des agents radioprotecteurs. Nous allons donc à présent aborder les principaux effets biologiques causés par une exposition à des radiations.

II. Effets biologiques des rayonnements ionisants

Lors du contact entre les rayonnements ionisants et une molécule, une partie de l'énergie est transférée à l'édifice moléculaire, compromettant ainsi sa stabilité et pouvant entraîner des ruptures de liaisons chimiques. Lorsque ces lésions concernent des molécules biologiques (ADN, protéines etc), les effets peuvent avoir de lourdes conséquences. Les radiations pourront tout d'abord dégrader directement le matériel cellulaire, nous aurons dans ce cas des effets dits *directs*. Mais, le corps humain étant principalement constitué d'eau, c'est donc cette première molécule qui subira les effets des radiations, créant des radicaux libres très réactifs (ou espèces activées de l'oxygène, **EAO**) qui vont à leur tour dégrader le matériel biologique. Les rayonnements ionisants auront alors des effets dits *indirects* sur l'organisme. Ces deux effets auront cependant les mêmes conséquences sur le matériel biologique.

II. 1. La radiolyse de l'eau²

Sous l'effet des radiations, les molécules d'eau peuvent subir soit un processus d'excitation, soit un processus d'ionisation (figure 6). Ces phénomènes ont lieu en des temps de l'ordre de 10^{-12} secondes et aboutissent à la formation du radical H^\bullet et du radical hydroxyle HO^\bullet . Lors de l'ionisation, un électron est éjecté. Celui-ci va alors s'entourer d'une cage de molécules d'eau, formant un électron dit aqueux et noté e^-_{aq} .

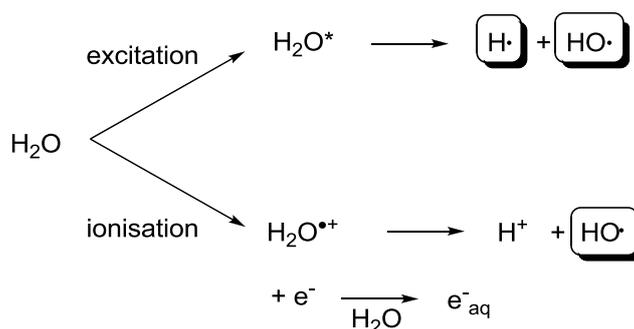


Figure 6 : radiolyse de l'eau, première étape (10^{-12} - 10^{-10} s)

Dans un second temps (10^{-6} secondes), une partie de ces espèces va subir des recombinaisons (figure 7). Au cours de ce processus, les produits de radiolyse générés sont les suivants : HO^- , H^\bullet , H_2O_2 , H_2 .

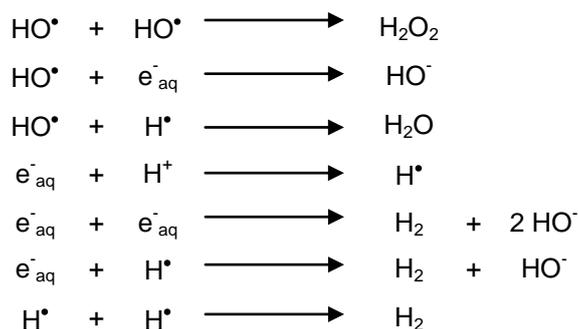


Figure 7 : recombinaisons des produits de radiolyse (10^{-6} s)

La présence d'oxygène dans les cellules va conduire à l'apparition de nouvelles espèces par réaction avec les produits de radiolyse (figure 8).

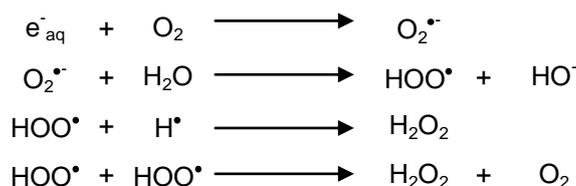


Figure 8 : produits de réaction entre l'oxygène et les produits de radiolyse

Enfin, la présence d'ions ferreux Fe^{2+} dans l'organisme va catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène, générant ainsi le radical hydroxyle HO^\bullet selon la réaction de Fenton (figure 9).³ L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$ présent dans le milieu peut alors être oxydé par les ions ferriques Fe^{3+} , régénérant les ions ferreux et mettant ainsi en place un cycle catalytique appelé cycle de Haber-Weiss (figure 9)⁴.

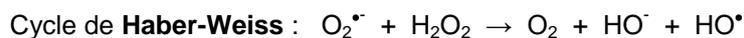
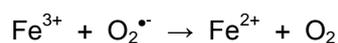
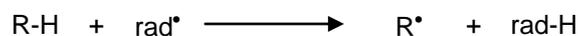


Figure 9 : réactions de Fenton et de Haber-Weiss

Les principales espèces générées au cours de ces processus et intervenant dans des réactions de dégradation sont les radicaux hydroxyles HO^\bullet et hydroperoxydes HOO^\bullet , l'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$, et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ceux-ci vont ensuite pouvoir transférer leur radical aux molécules présentes dans les cellules selon le mécanisme de transfert suivant⁵ :



Une fois le radical transposé, celui-ci va se recombinaison avec une molécule présente dans son voisinage, pouvant ainsi conduire à des dénaturations de protéines, des dégradations de l'ADN etc. Nous allons maintenant nous intéresser aux effets sur le matériel biologique des rayonnements ionisants et des EAO générés par la radiolyse de l'eau.

II. 2. Effets directs des radiations et des espèces activées de l'oxygène

II. 2. i. Lésions de l'ADN et mécanismes de réparation

II. 2. i. a. Lésions de l'ADN

Sous l'effet des rayonnements ou des EAO, l'ADN peut subir plusieurs types de lésions. Nous représenterons l'ADN sous la forme suivante (figure 10), où P représente un lien phosphate, S un sucre ribose, et A, T, C et G les quatre bases de l'ADN, respectivement l'adénine, thymine, cytosine et guanine :

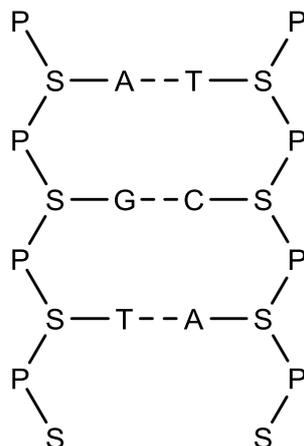


Figure 10 : représentation schématique de l'ADN

Les premières lésions qui peuvent être générées concernent les ruptures de brins et résultent de la coupure d'une ou plusieurs liaisons P-S. Lorsqu'il n'y a qu'une seule rupture, on parle de **rupture simple brin**. Lorsque deux ruptures sur deux brins conjugués et situées au même niveau auront lieu, il s'agira alors de **rupture double brin** (figure 11). Ces ruptures peuvent avoir lieu, par exemple, lorsque l'atome d'hydrogène en position C₄ du cycle désoxyribose est arraché par un radical hydroxyle.² Les ruptures simple brin seront plus efficacement réparées car le brin d'ADN reste entier, tandis que les ruptures double brin seront bien plus dangereuses car elles conduisent à la formation de deux brins d'ADN distincts, dont la réparation sera beaucoup plus difficile, risquant de conduire à des défauts de recombinaison.

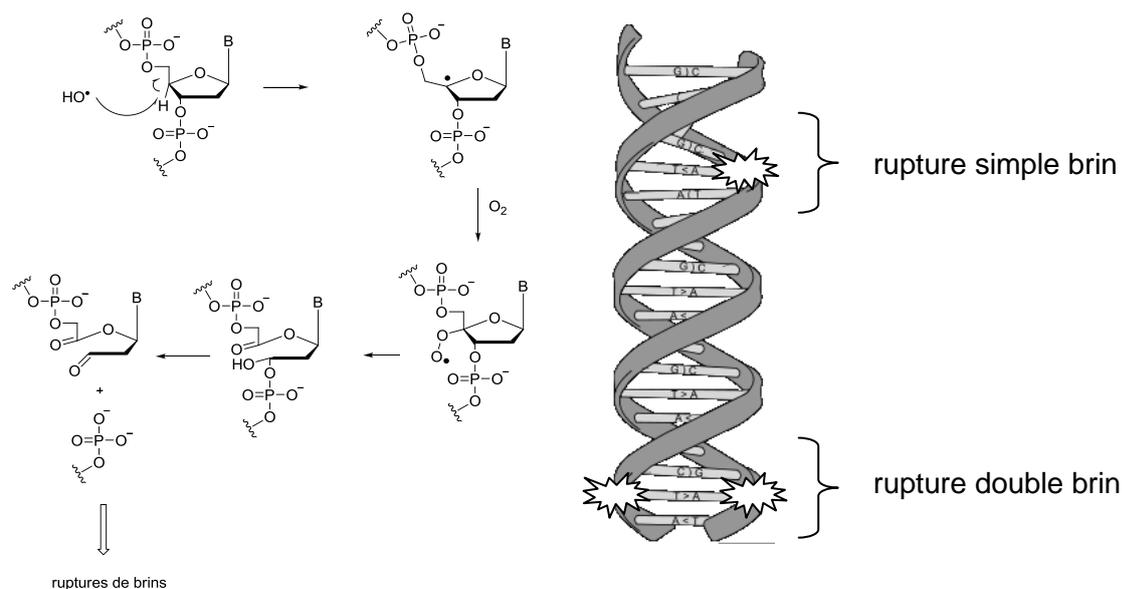


Figure 11 : ruptures simple et double brin de l'ADN

Le deuxième type de lésions observées est la dégradation des bases : nous distinguerons les **lésions de bases** (modification chimique d'une base de l'ADN rendant impossible la mise en place des liaisons hydrogènes avec la base conjuguée), les **pertes de bases** correspondant à la rupture d'une liaison S-base, et les **lésions de sucres** résultant d'une modification chimique de S.

Parmi les différentes lésions pouvant avoir lieu, on distingue finalement les pontages provenant de la combinaison par liaison covalente des radicaux formés sur l'ADN avec toute entité située dans son voisinage. Ainsi il est possible d'avoir des pontages **intra-brins** (par exemple entre deux bases voisines situées sur le même brin), des pontages **inter-brins** (par exemple entre deux bases situées sur deux brins différents), et enfin des pontages entre l'ADN et d'autres molécules (par exemple des pontages **ADN-protéines**).

Les fréquences de ces différentes lésions sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : fréquences des dégradations de l'ADN lors d'une irradiation

lésions	nombre par Gy et par noyau cellulaire
ruptures doubles brins	40
ruptures simples brins	500 - 1 000
lésions de bases	800 - 2 000
lésions de sucres	800 – 1 600
pontage ADN-ADN	30
pontage ADN-protéine	150

Afin de lutter contre ces dégradations, différents mécanismes de réparation de l'ADN dépendant de la nature de la dégradation ont été développés par les organismes vivants. Certaines assureront une réparation parfaite, tandis que d'autres pourront être fautives et à l'origine de mutations par exemple.

II. 2. i. b. Les différents mécanismes de réparation de l'ADN

Le premier de ces mécanismes de réparation est l'**excision resynthèse**. Il agira sur les dommages se produisant sur un seul brin de la double hélice d'ADN (tel que la rupture simple brin, lésion ou perte de base, lésion de sucre). Une endonucléase reconnaît la lésion, et va inciser une chaîne entière comportant cette dégradation. Une exonucléase va ensuite exciser ce fragment (figure 12). L'ADN polymérase va ensuite apparier une à une les bases conjuguées au fragment non apparié, puis une ligase va polymériser ces bases entre elles pour reformer le nouveau brin.

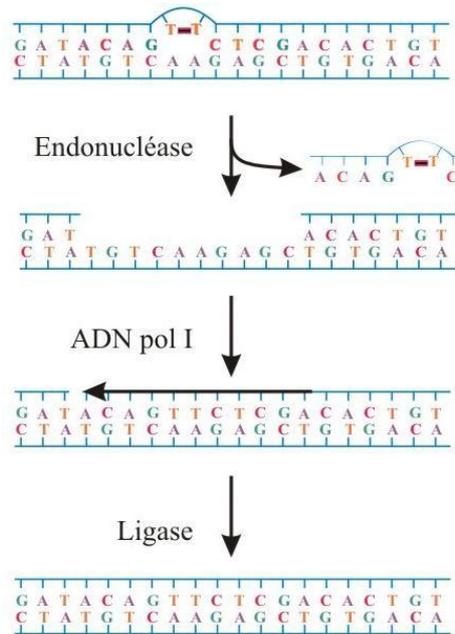


Figure 12 : mécanisme de réparation de l'ADN par excision resynthèse

Les ruptures double-brin peuvent également être réparées mais selon des mécanismes plus complexes. Deux mécanismes principaux existent, nommés **NHEJ** (non-homologous end joining) et **HR** (homologous recombination).⁶ Le mécanisme NHEJ commence avec la reconnaissance de la cassure double-brin par la protéine Ku (hétérodimère de deux sous-unités, notées Ku70 et Ku80, figure 13a) dont les deux sous-unités vont se fixer aux extrémités de la rupture. Sur ce site va ensuite se fixer la sous-unité DNA-PKcs (DNA-dependant protein kinase catalytic subunit, figure 13b). L'ensemble ainsi formé va « nettoyer » les extrémités des brins endommagés, de manière à obtenir des extrémités permettant l'ajout des bases manquantes. Finalement interviennent l'enzyme Ligase IV et la protéine XRCC4 pour la recombinaison des deux extrémités (figure 13c). Bien que permettant des réparations de ruptures double brin, ce mécanisme peut aisément être à l'origine de réparations fautes.

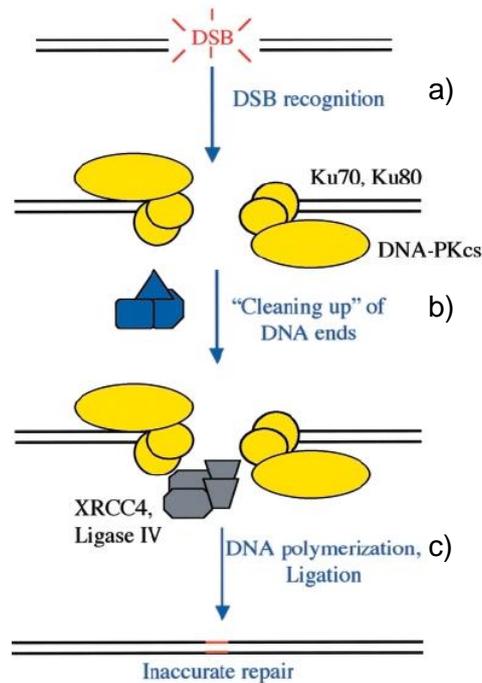


Figure 13 : schéma simplifié du mécanisme de réparation des ruptures double brin NHEJ

Le second mécanisme de réparation des ruptures double brin est la recombinaison homologue HR. Plusieurs modèles existent, nous allons en détailler un (figure 14). Un complexe de protéines va reconnaître la lésion, puis la protéine RAD52 va se fixer à l'extrémité 3' du brin endommagé (figure 14a). Ce brin va ensuite être apparié à un brin intact, et lorsqu'une région homologue est reconnue, le brin intact va s'ouvrir par l'action de Rad51p et échanger le brin conjugué intact par le brin endommagé (figure 14b). L'extrémité 3' du brin endommagé est alors recopiée selon le brin intact par une ADN polymérase (figure 14c), puis les extrémités sont reliées par l'action de la DNA ligase I (figure 14d). Finalement une migration restitue les deux brins d'ADN intacts.

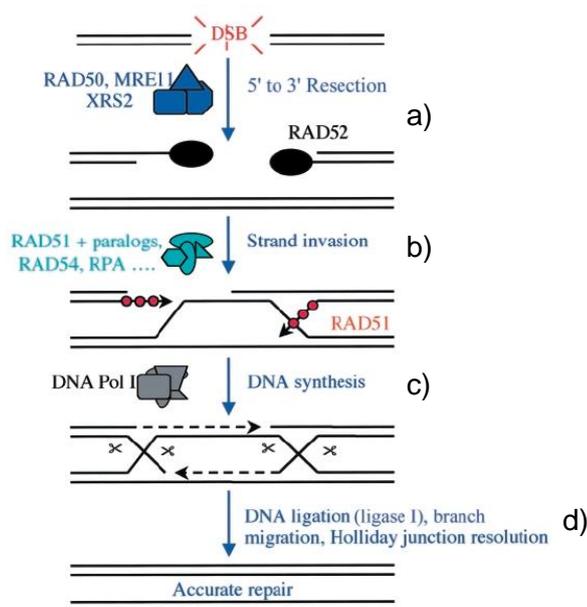


Figure 14 : schéma simplifié du mécanisme de réparation des ruptures double brin par recombinaison homologue

En dépit de l'existence de mécanismes de réparation, ceux-ci peuvent être rapidement pris en défaut en cas d'irradiation massive, le nombre de dégradations devenant trop importantes entraînant une saturation de ces mécanismes. Il apparaît ainsi la notion de seuil de dose et de seuil de débit de dose, au-delà desquels les enzymes de réparation deviennent inefficaces.

II. 2. ii. La peroxydation lipidique⁷

Autre cible importante des rayonnements ionisants et des EAO, les acides gras des membranes cellulaires peuvent eux aussi subir des dégradations, et principalement par réaction avec le radical hydroxyle HO[•]. Les acides gras polyinsaturés seront particulièrement visés car ils peuvent facilement former des radicaux libres en position allylique. Nous donnons ci-dessous l'exemple de la dégradation de l'acide arachidonique (schéma 1).

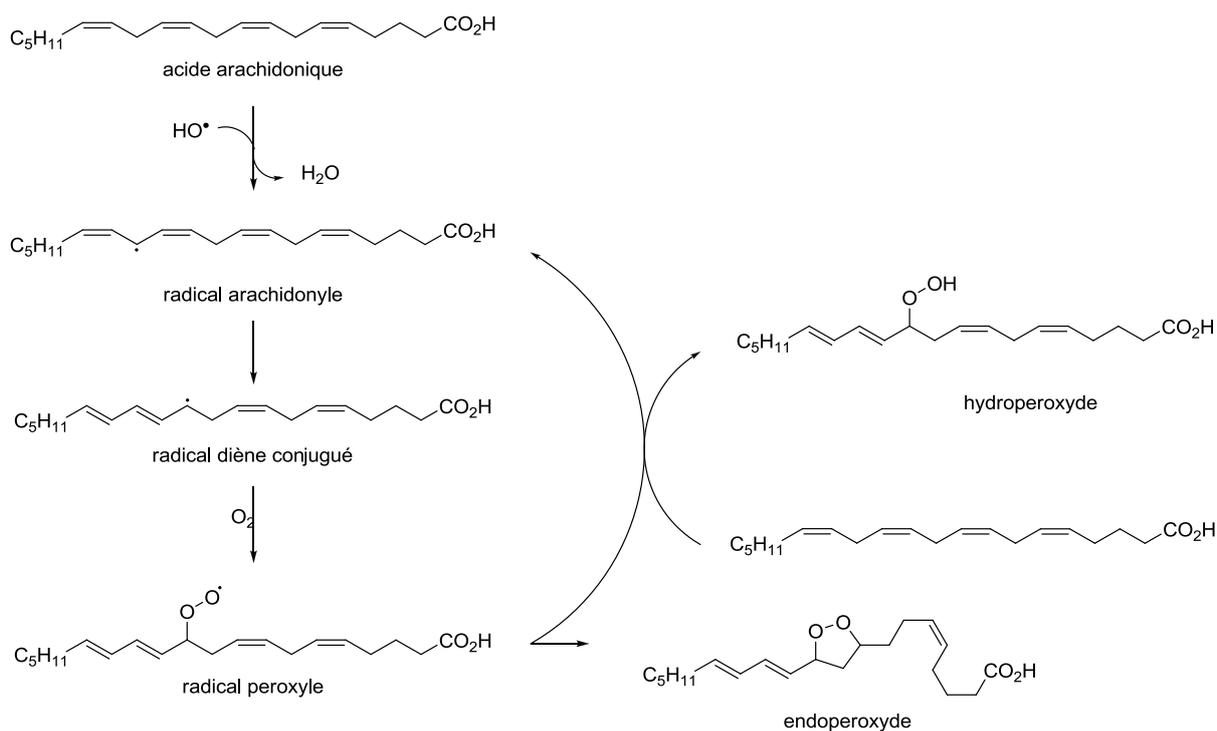


Schéma 1 : exemple de peroxydation lipidique de l'acide arachidonique

Dans un premier temps, le radical hydroxyle réagit avec une des liaisons C-H en position allylique, pour former de l'eau et transférer le radical à la chaîne lipidique pour former le radical arachidonyle. Ce radical peut se délocaliser pour former un radical diène conjugué. Dans un second temps, celui-ci va réagir avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde. Ce dernier peut soit subir une réaction de cyclisation intramoléculaire avec une double liaison voisine et former ainsi un endoperoxyde, soit réagir avec une liaison C-H allylique d'une autre molécule d'acide arachidonique, conduisant ainsi à la formation d'un hydroperoxyde et d'un nouveau radical arachidonyle, rendant catalytique cette cascade de réactions. Les différentes espèces formées peuvent induire une destruction de la membrane cellulaire. Un moyen de stopper ce processus est d'inclure dans la membrane un antioxydant lipophile, comme la vitamine E.⁸

II. 2. iii. La dégradation de protéines⁷

Une troisième cible des rayonnements et des EAO, les protéines seront principalement touchées au niveau des acides aminés dont les chaînes latérales peuvent par exemple facilement être oxydées, comme la cystéine ou la méthionine (schéma 2). Ainsi, des ponts disulfures entre deux cystéines pourront par exemple être générés, ou encore l'atome de

soufre de la méthionine sera oxydé en sulfone. Une fois ces lésions formées, la protéine est alors dénaturée et perd toute activité biologique.

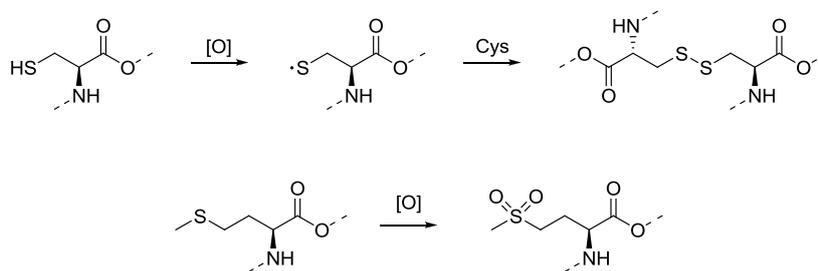


Schéma 2 : exemples de dégradation de la cystéine et de la méthionine

Nous avons vu les effets *directs* et *indirects* des radiations sur les constituants cellulaires. Ces dégradations vont avoir des conséquences au niveau cellulaire et entraîner l'apparition de pathologies, que nous allons maintenant présenter.

II. 3. Conséquences des dégradations induites par les radiations⁹

II. 3. i. Mécanismes de mort cellulaire

Les dégradations du matériel cellulaire présentées précédemment vont avoir pour conséquence le déclenchement de différentes voies de signalisation, entraînant à terme la mort cellulaire par apoptose.^{10, 11} La figure 15 ci-dessous présente de manière simplifiée les principales voies de signalisation de mort cellulaire radio-induite. Toutes ces voies convergent vers la mitochondrie, causant la production de cytochrome C induisant l'apoptose. Deux voies sont prépondérantes, celle passant par l'activation de la protéine p53 et celle passant par l'activation de céramide. La première est une conséquence des dégradations subies par l'ADN. La protéine p53 va alors être phosphorylée par l'action de kinases, comme Chk2, c-Abl et GSK3, puis induire la production de protéines pro-apoptotiques, comme PUMA. La protéine p53 va directement ou indirectement conduire à une perméabilisation de la mitochondrie. La seconde voie d'apoptose radio-induite prédominante est la voie céramide, qui résulte de la dégradation des membranes. Ces altérations vont activer la protéine ASMAse qui va libérer dans la cellule le céramide, qui va agir en tant que messenger pro-apoptotique. Ce messenger va lui aussi induire directement ou

indirectement la perméabilisation de la mitochondrie, entraînant la mort cellulaire par apoptose.

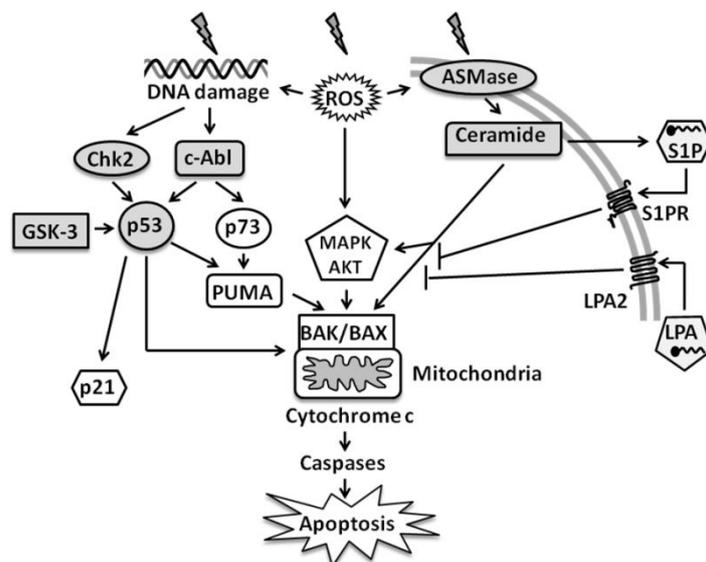


Figure 15 : schéma simplifié des voies de signalisation de l'apoptose radio-induite

L'importance des différentes voies de signalisation de mort cellulaire radio-induite va dépendre du type de cellule touchée, à titre d'exemple le mécanisme passant par l'activation de p53 sera prépondérant dans les thymocytes et les cellules hématopoïétiques, tandis que la voie céramide sera prépondérante dans les cellules endothéliales.

II. 3. ii. Pathologies induites par une irradiation

Il existe différents types de syndromes qui vont apparaître suite à une irradiation. Ces syndromes vont dépendre de la dose de radiations reçues. Le tableau 2 présente les principales pathologies résultant d'une irradiation corps entier en fonction de la dose de rayonnements reçue.

Tableau 2 : pathologies liées aux rayonnements en fonction de la dose

Syndrome	Dose	Pathogénèse	Symptômes	Létalité – délai d'intervention
Hématopoïétique	> 1 Gy	inhibition de progéniteurs hématopoïétiques de la phase active de la mitose ; hypoplasie ou aplasie de la moelle osseuse et des tissus lymphoïdes : leucopénie, érythropénie, thrombocytopénie	Immunosuppression, anémie, hémorragies, faiblesse, fatigue	état septique et chocs conduisant à la destruction d'organes hématopoïétiques Délai d'intervention : de 30 à 60 jours
Gastro-intestinal	> 8 Gy	destruction du tractus gastro-intestinal, des cryptes intestinales et des cellules endothéliales, mort massive de cellules souches de l'épithélium intestinal	douleurs abdominales, nausées sévères prolongées, vomissements, diarrhées, infections systémiques, déshydratations	la mort peut survenir en moins de 10 jours
Cardiovasculaire/Système nerveux central	> 20 Gy	dommages aigus du système cardiovasculaire et de la circulation, surpressions dans le cerveau, vascularites, méningites	signes et symptômes d'œdèmes cérébraux, nausées, vomissements, migraines, transpiration, tachycardies, fièvres, hypotension, déficiences majeures des fonctions cognitives	la mort peut intervenir quelques heures à plusieurs jours après l'irradiation
Pulmonaire	> 20 Gy	dommages alvéolaires	pneumonies caractérisées par une toux sèche et des difficultés respiratoires	/
Cutané	> 20 Gy	dommages aux cellules du derme et de l'épiderme	inflammations, érythème, nécrose des tissus exposés, alopecie	/

Selon la dose, différents symptômes vont apparaître en fonction de la sensibilité des tissus. Les délais d'intervention pour guérir une personne irradiée seront de quelques heures à plusieurs semaines pour des doses inférieures à 8 Gy, en revanche au-delà la mort est quasi-certaine. Pour contrer les effets délétères des rayonnements ionisants et des EAO, plusieurs systèmes de défense, naturels ou artificiels, ont été développés. Nous allons dans la suite de ce chapitre présenter les principaux moyens de défenses endogènes développés par les organismes vivants pour lutter contre ces agressions, puis nous parlerons des moyens de défenses exogènes élaborés dans le cadre de recherche en radioprotection.

III. Moyens de protection contre les radiations

Pour lutter contre les effets biologiques des radiations, des méthodes de protection naturelles et artificielles existent. Nous allons dans la suite de ce chapitre présenter les principales méthodes de défense endogène développées par les organismes vivants, puis les avancées en matière de radioprotection artificielle.

III. 1. Les moyens de défense endogènes

Trois classes de défenses développées par les organismes vivants existent :

- les systèmes enzymatiques,
- la régulation des ions métalliques activateurs des peroxydes
- la régulation des EAO par la production de petites molécules.

III. 1. i. La protection enzymatique

III. 1. i. a. Les superoxydes dismutases (SOD)

Ces enzymes catalysent la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en oxygène et peroxyde d'hydrogène (schéma 3),¹³ permettant ainsi d'éviter les réactions de type Haber-Weiss.

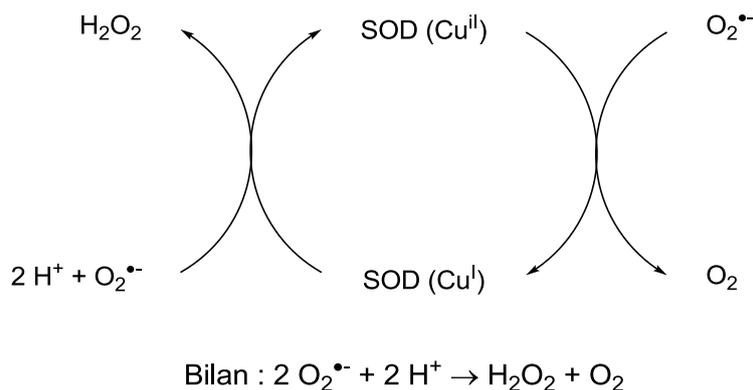


Schéma 3 : action de la SOD sur la dismutation du radical superoxyde

Il existe deux formes de SOD, dépendant du métal impliqué :

- une enzyme à cuivre et zinc (Zn, Cu-SPD), située dans le cytosol, dont le rôle catalytique est assuré par l'ion Cu^{2+} , l'ion Zn^{2+} ayant un rôle de stabilisateur ;
- une enzyme à manganèse (Mn-SOD), située dans les mitochondries et dont le rôle catalytique est assuré par l'ion Mn^{2+}

Cette enzyme étant présente dans tous les compartiments subcellulaires générant l'ion superoxyde, on peut dès lors supposer qu'elle joue un rôle central dans les systèmes de défense contre le stress oxydant.¹³

III. 1. i. b. Les catalases

Ces enzymes catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Elles agissent donc en synergie avec les SOD, lesquelles produisent du peroxyde d'hydrogène. Ce sont des enzymes hémiques (noté Porph – M, schéma 4), dans lesquelles la réaction de dismutation se produit dans l'hème. Elles permettent d'éviter la formation du radical hydroxyle en présence de Fe^{2+} .

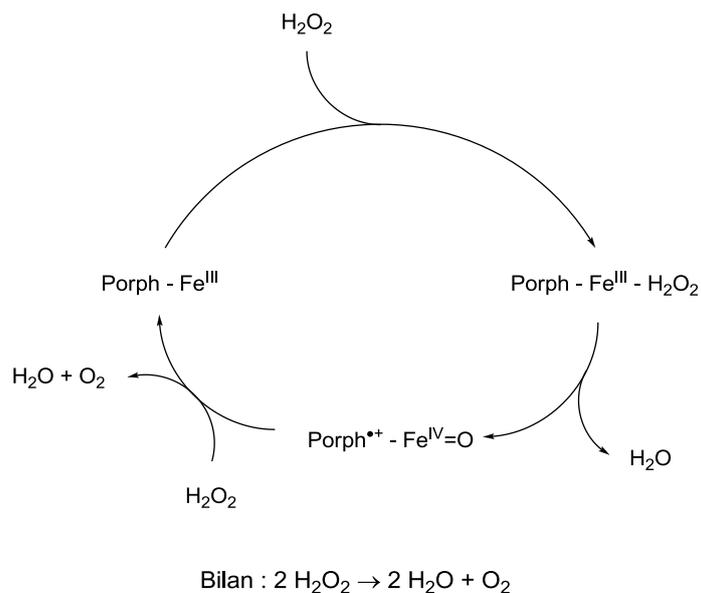


Schéma 4 : mécanisme d'action des catalases

III. 1. i. c. La glutathion peroxydase

Cette enzyme assure la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau, en utilisant le glutathion réduit (noté G-SH, schéma 5) comme donneur d'hydrogène. Elle est constituée de 4 sous-unités contenant chacune un résidu sélénocystéine et se situe principalement dans le cytosol.

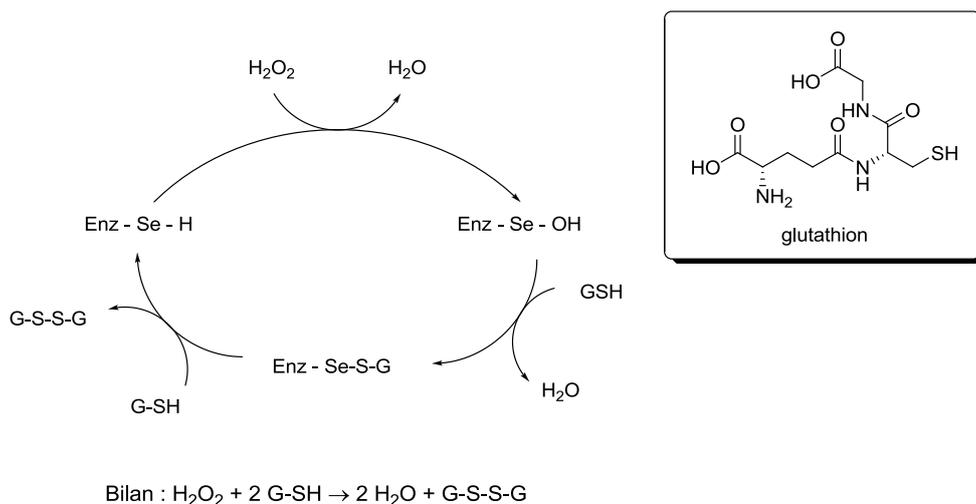


Schéma 5 : mécanisme d'action de la glutathion peroxydase

A noter l'existence d'une seconde enzyme, la glutathion réductase, qui va réduire le glutathion oxydé G-S-S-G en glutathion G-SH, permettant ainsi de garder le rapport ——— constant.¹⁴ La glutathion peroxydase peut également réduire les hydroperoxydes organiques R-O-O•.¹⁵

III. 1. ii. Le piégeage par les ions métalliques

Les ions métalliques sont connus pour avoir un rôle activateur dans la production d'EAO, comme nous l'avons précédemment présenté par exemple avec l'implication du fer dans la réaction de Fenton.⁵ De cette manière toute molécule capable de complexer un ion métallique va conduire à une protection. Cette complexation sera assurée par des protéines de transport, comme la céruloplasmine ou la transferrine.

III. 1. iii. La protection par des petites molécules organiques

En plus des systèmes de défense enzymatique, la nature a développé un système de défense utilisant des petites molécules organiques. Leurs propriétés antioxydantes sont liées à leur aptitude à intercepter ou désactiver des états radicalaires. Elles peuvent inhiber des réactions en chaîne déclenchées par les EAO, en générant des radicaux plus stables et donc moins réactifs. Certaines de ces molécules sont des vitamines (figure 16).

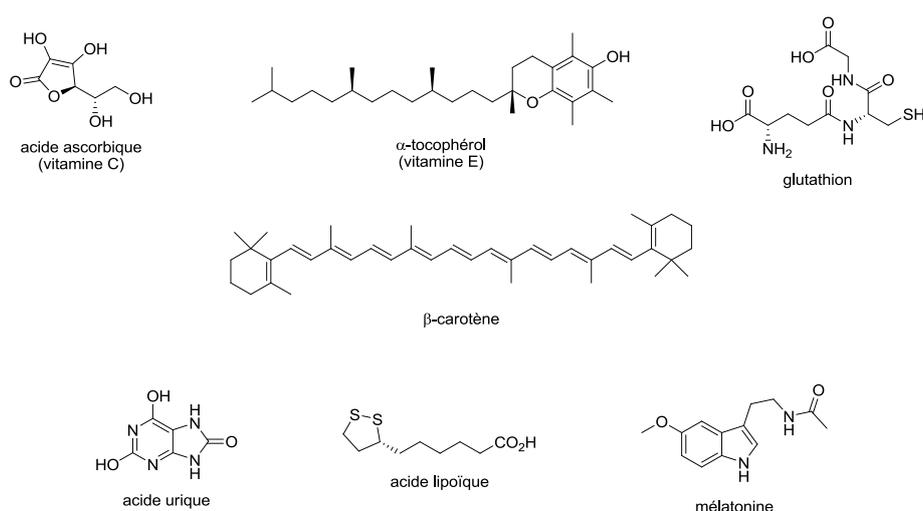


Figure 16 : exemples d'antioxydants naturels pour la radioprotection endogène

Ces molécules diffèrent beaucoup par leur nature, leur structure et leurs fonctions chimiques impliquées dans les mécanismes de capture des radicaux libres. Elles auront en conséquence des mécanismes d'action différents. Ainsi le β -carotène va contribuer à la désactivation et à l'inhibition de réactions radicalaires situées dans des environnements très hydrophobes,¹⁶ tout comme l' α -tocophérol. Le rôle principal de ce dernier réside dans l'interruption des chaînes de propagation radicalaires dans les membranes de part sa nature hydrophobe.¹⁷ Le radical tocophéryle formé est très peu réactif car il est stabilisé par des effets stériques et électroniques. L'acide ascorbique quant à lui va avoir plusieurs actions. Il va réagir avec les radicaux superoxyde et hydroxyle afin de les désactiver, mais il va aussi surtout réagir avec le radical tocophéryle, régénérant la vitamine E.¹⁷ En revanche, l'acide ascorbique va participer à la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , contribuant ainsi à la production de radicaux par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, induisant alors un effet contraire à celui attendu.¹⁸ L'acide urique, hydrophile, va capter les radicaux hydroxyle et superoxyde, et également former des complexes avec les ions Fe^{3+} , diminuant le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ et inhibant ainsi la réaction de Fenton.¹⁹ Le glutathion et l'acide lipoïque vont agir en tant que cofacteurs associés à un système enzymatique, comme par exemple avec la glutathion peroxydase.

III. 2 Les moyens de défense exogènes

La compréhension des différentes modes d'action des EAO et des mécanismes induits va permettre de développer différentes classes d'agents radioprotecteurs. Ainsi des **capteurs de radicaux**, tels les antioxydants, vont être employés pour réguler le taux de radicaux libres dans les cellules lors d'une irradiation (figure 17).²¹ Une seconde classe d'agents radioprotecteurs est constituée de **d'inhibiteurs de mort cellulaire**. Ils vont principalement agir au niveau des voies de signalisation passant par l'activation de la protéine p53 ou du céramide. Nous trouverons ensuite des **inhibiteurs de cytokines** impliquées dans les mécanismes de dégradation des tissus. Des **modulateurs du cycle cellulaire** vont ensuite être étudiés. Ils auront pour but de temporairement bloquer les cellules dans leur phase la moins sensible aux EAO. Enfin une dernière classe étudiée est constituée de **facteurs de croissance**, qui vont augmenter la radiorésistance des cellules. Dans la suite de cette partie nous allons donner quelques exemples de molécules développées dans chacune de ces catégories.

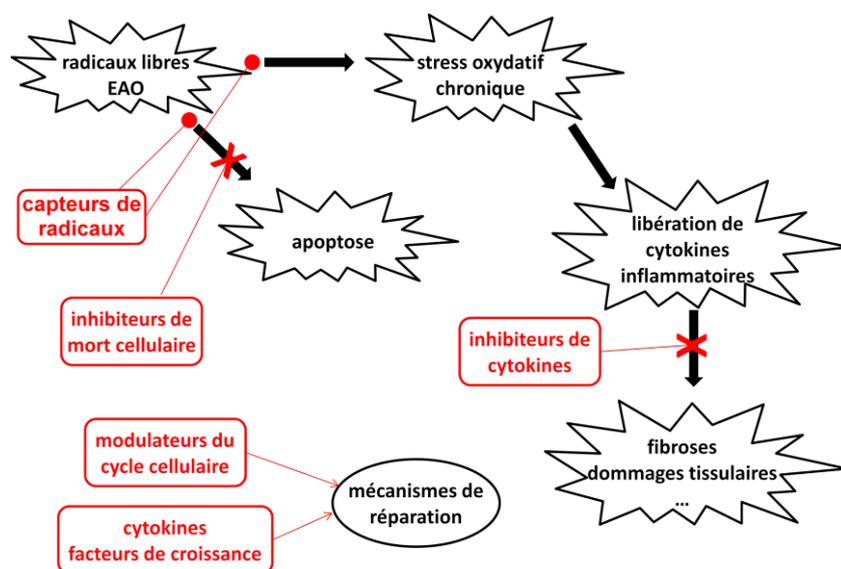


Figure 17 : différentes cibles possibles pour la recherche de radioprotecteurs

III. 2. i. Les antioxydants

Les antioxydants sont utilisés comme système de défense pour capter et stabiliser les EAO avant qu'elles n'altèrent le matériel cellulaire. Plusieurs classes d'antioxydants existent, à commencer par les **thiols**. Outre la capture des radicaux libres, ils vont également induire des réparations chimiques de radicaux de l'ADN.²² Le plus connu des thiols utilisés en radioprotection est l'Amifostine ou WR-2721, qui est un thiophosphonate et une prodrogue du WR-1065 qui constitue le principe actif de ce radioprotecteur (figure 18).²³ Malheureusement ce composé souffre de nombreux effets secondaires (nausées, vomissements, hypotensions transitoires) et son utilisation est très limitée. Des composés bifonctionnels à base de thiols sont également apparus, avec par exemple le PrC-210²⁴ qui est un aminothiols pouvant se lier à l'ADN, ou encore des composés chélatant les ions métalliques.²⁵

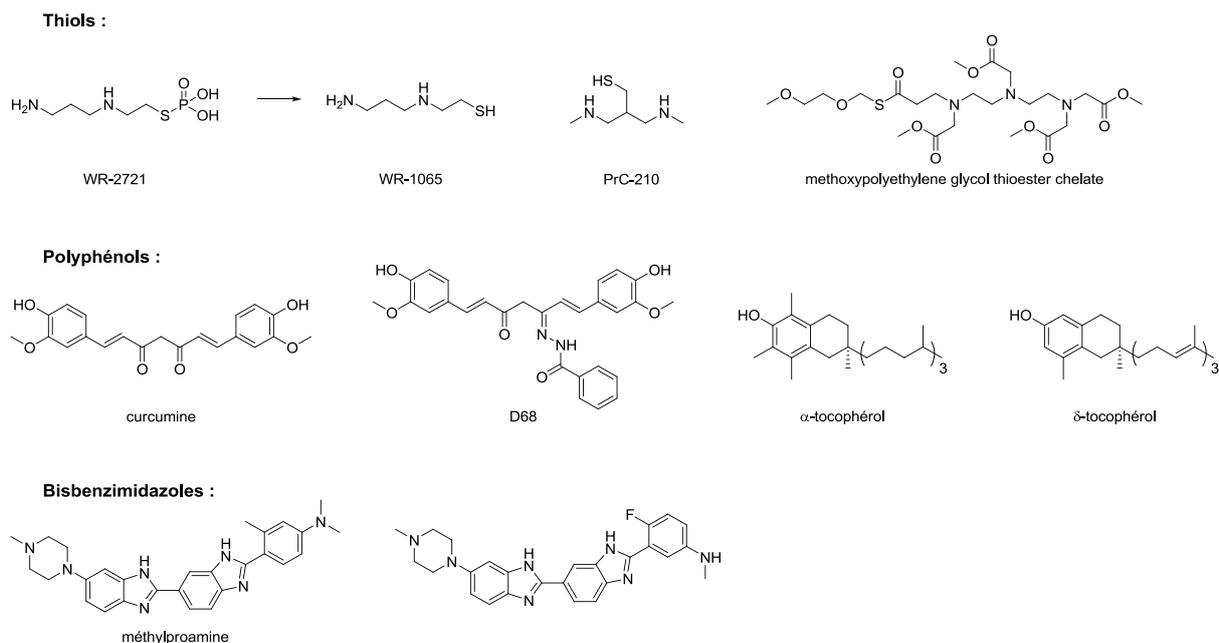


Figure 18 : exemples de radioprotecteurs synthétiques

Une seconde famille de radioprotecteurs est constituée des **polyphénols**, principalement les dérivés de la curcumine et de l' α -tocophérol (ou vitamine E).²⁶⁻²⁸ Ainsi le D68, dérivé de la curcumine, procure 43% de survie après 3 mois chez des souris irradiées à 12 Gy, tandis que le lot de souris non-traitées meurt de syndrome gastro-intestinal après seulement une semaine. Le δ -tocotriénol a été rapporté comme permettant un accroissement de la survie de souris irradiées à 8.75 Gy, traitées par voie sous-cutanée 24 heures avant irradiation ou 6 heures après.

Une troisième classe d'agents de radioprotection est constituée d'agents se liant à l'ADN afin de capter les radicaux libres formés sur l'ADN, ce sont les **bisbenzimidazoles**.²⁹ Cependant, bien qu'intéressants peu de tests *in vivo* ont été réalisées à ce jour. Des travaux ont également été menés sur des **dérivés mimétiques d'antioxydants catalytiques endogènes**, comme par exemple des dérivés de la Mn-SOD, ou encore des dérivés à base de porphyrines ou de ligands de type Salen (figure 19).³⁰⁻³³ Ainsi les composés AEOL-10113 et AEOL-10150 ont réduit des dommages pulmonaires chez des rats après injection 1 à 10 semaines suivant une irradiation à 28 Gy. De même le composé EUK-189 augmente la survie à 30 jours de souris irradiées à une dose sublétales.³⁴

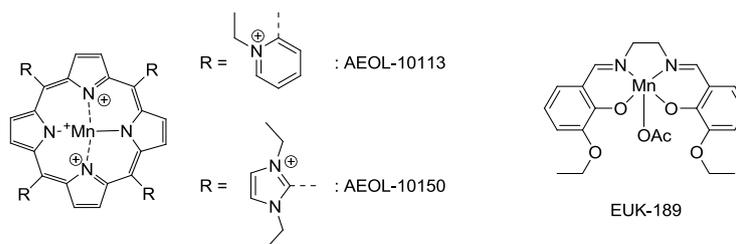
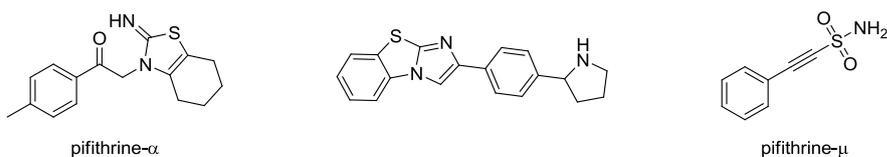


Figure 19 : exemples de mimétiques d'antioxydants endogènes

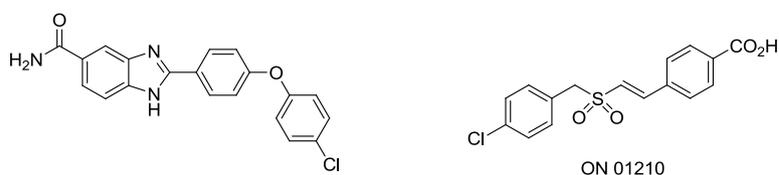
III. 2. ii. Les inhibiteurs de mort cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, l'apoptose radio-induite fait intervenir un nombre important de protéines au travers de deux voies principales : la voie entraînant la formation de la protéine p53 et la voie céramide. Des inhibiteurs de ces différents partenaires ont été développés, à commencer par les **inhibiteurs de p53**. Ainsi les dérivés de la famille des pifithrines ont été développés (figure 20).³⁵⁻³⁹ Toutefois leur utilisation reste limitée car ils ne protègent que du syndrome hématopoïétique, mais n'ont aucune action sur le syndrome gastro-intestinal. Une seconde famille d'inhibiteurs de la mort cellulaire est constituée d'**inhibiteurs de kinases** (Chk2, GSK3, c-Abl), avec par exemple des dérivés du benzimidazole⁴⁰ ou encore des sulfones du type ON 01210.⁴¹ Des **inhibiteurs de la voie céramide** ont également été développés, avec par exemple l'octadécyl thiophosphate, qui a permis la protection de souris exposées à une dose de 9 Gy et traitées par injection intrapéritonéale 30 minutes avant irradiation.⁴²

Pifithrines :



Inhibiteurs de cytokines :



Inhibiteur de la voie céramide :

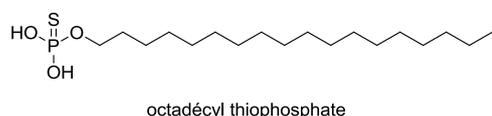


Figure 20 : exemples d'inhibiteurs des voies de signalisation de l'apoptose radio-induite

III. 2. iii. Modulateurs du cycle cellulaire

La sensibilité des cellules aux rayonnements ionisants dépend de la phase du cycle cellulaire. Ainsi elles seront moins radiosensibles en phase G₀/G₁ et en phase S.⁴³ Dès lors, en bloquant les cellules en phase G₁/S, on peut augmenter la protection cellulaire des effets létaux des radiations. C'est le cas de la β -lapachone,⁴⁴ de la génistéine, qui augmente la survie à 30 jours de souris irradiées à 9.5 Gy injectées 24 heures avant irradiation,⁴⁵ et des inhibiteurs de HDAC⁴⁶ comme l'acide valproïque (figure 21).

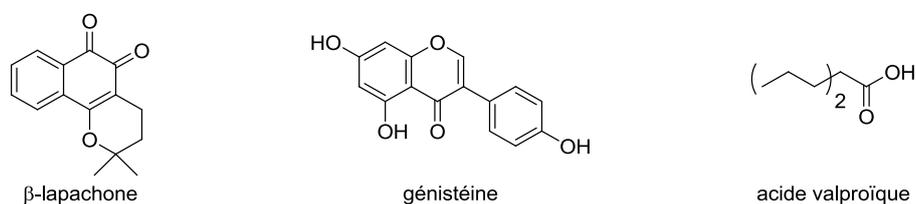


Figure 21 : exemples de modulateurs du cycle cellulaire

III. 2. iv. Activateurs des facteurs de croissance

Le facteur nucléaire NF- κ B est un facteur de transcription qui joue un rôle important dans l'immunité et la survie cellulaire. Il régule la mort cellulaire programmée en induisant

l'expression de protéines anti-apoptotiques et de molécules antioxydantes, de telle manière que son activation augmente la radiorésistance.⁴⁷ Ces activateurs seront généralement des protéines, comme par exemple CBLB502,⁴⁸ une cytokine qui permet la survie de plus de 87 % de souris lorsqu'elle est administrée 30 min avant une irradiation à 13 Gy.

III. 2. v. Conclusion

Nous venons de voir les principales classes d'agents radioprotecteurs étudiées par différents groupes de recherche, dont certaines ont été évaluées *in vivo* et présentent des résultats encourageants car protègent des souris irradiées à des doses élevées. L'observation de la survie à 30 jours témoigne d'une efficacité envers les syndromes hématopoïétiques et gastro-intestinaux. Certains de ces agents ont une cible particulière, comme les inhibiteurs de la protéine p53, tandis que d'autres, comme les antioxydants, ne sont pas spécifiques et dispenseront une protection globale dans la cellule. Lors d'une irradiation accidentelle, toutes les cellules de l'organisme seront touchées, et différentes voies apoptotiques peuvent être déclenchées. Il convient alors de lutter efficacement contre tous ces mécanismes divers de manière simultanée. Les molécules agissant comme régulateurs du taux de radicaux libres dans les cellules paraissent alors comme la solution la plus appropriée.

IV. Découvertes des acides pulviniques comme radioprotecteurs potentiels

Parmi toutes les classes de radioprotecteurs présentées précédemment, les antioxydants sont particulièrement intéressants, car ils agissent en tant que moyen de protection et non de réparation. Les polyphénols s'avèrent très intéressants car ils possèdent des propriétés antioxydantes avérées. De plus ils sont très présents dans la nature, aussi l'étude d'extraits naturels semble être une voie prometteuse pour la découverte de nouvelles molécules potentiellement radioprotectrices. En 2004 a été mis au point dans un laboratoire du CEA-Saclay un test de criblage à haut-débit de l'activité antioxydante d'extraits naturels.^{49, 50} Ce test est basé sur l'oxydation d'une base de l'ADN, la thymidine, en présence du composé ou de l'extrait naturel à tester. L'oxydation est réalisée sous trois conditions oxydantes différentes (irradiation γ , irradiation UV en présence d'eau oxygénée, et conditions de type Fenton), puis est suivie du dosage de la quantité intacte de thymidine restant après réaction.

24 extraits naturels et 120 antioxydants naturels ou synthétiques ont ainsi été étudiés, et l'extrait correspondant à la pisolithe des sables (*Pisolithus tinctorius*) s'est avéré particulièrement actif (figure 22).

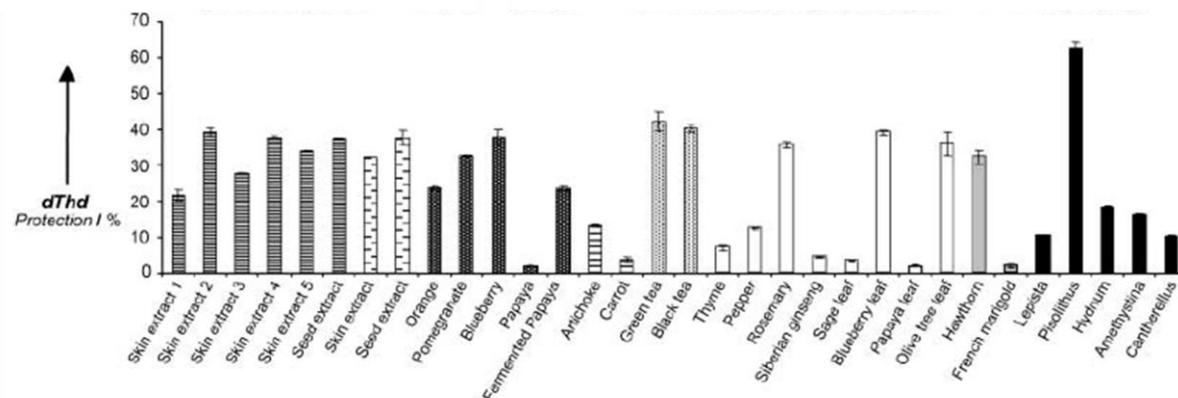


Figure 22 : résultat d'un criblage d'extraits naturels sur la protection de la thymidine par irradiation y

Après séparation des principaux constituants de cet extrait par HPLC puis test de chacune des fractions obtenues, la norbadione A **1** a ainsi été identifiée (figure 23). La norbadione A a été découverte en 1984 par Stieglich.⁵¹ Elle fait partie de la famille des acides pulviniques dont le représentant le plus simple est l'acide pulvinique **2**.

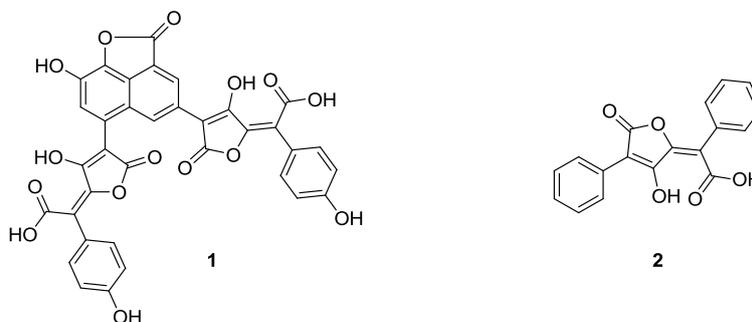


Figure 23 : structure de la norbadione A **1** et de l'acide pulvinique **2**

A l'aide de ce test, la norbadione A et l'acide pulvinique **2** ont été comparés à des antioxydants de référence, comme le trolox, l'acide ascorbique et l'amifostine (figure 24).

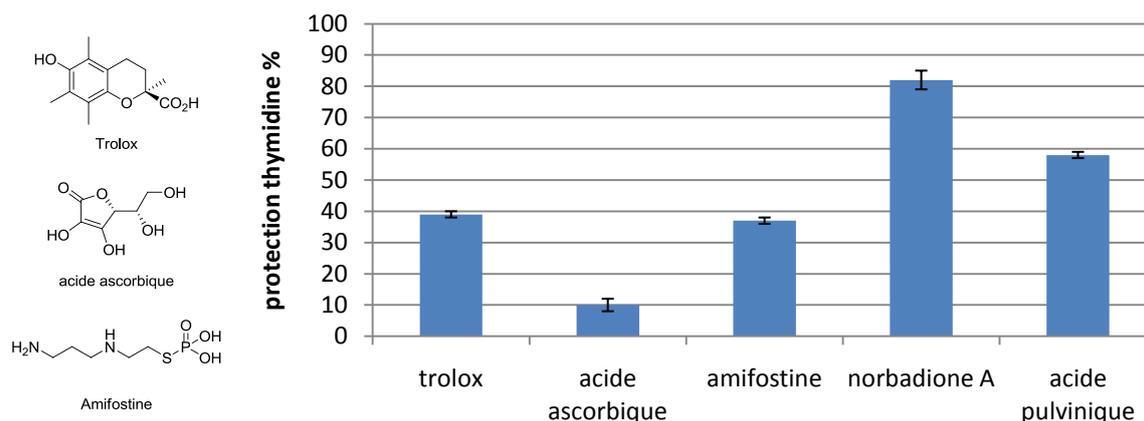


Figure 24 : Comparaison de la norbadione A avec des antioxydants de référence. Test de protection de la thymidine oxydée par irradiation γ

Sur le test de protection de la thymidine elle s'est avérée bien plus active que les produits de référence avec 82 % de protection, contre 39 % de protection pour le meilleur des produits de référence, le trolox. L'acide pulvinique confère à la thymidine une protection moins importante que la norbadione A avec 58 % de thymidine intacte, mais il reste malgré tout meilleur que les produits de référence.

Des essais de radioprotection *in vitro* et *in vivo* ont ensuite été réalisés. Le test *in vitro* consiste en une étude de la protection de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy suivi de la mesure du nombre de cellules vivantes à 1, 3, 6 et 8 jours après irradiation (figure 25a).⁵² Le test *in vivo* consiste quant à lui à irradier des souris C57BL/6 par des rayons X à 8 Gy puis à regarder la survie au bout de 30 jours (figure 25b).

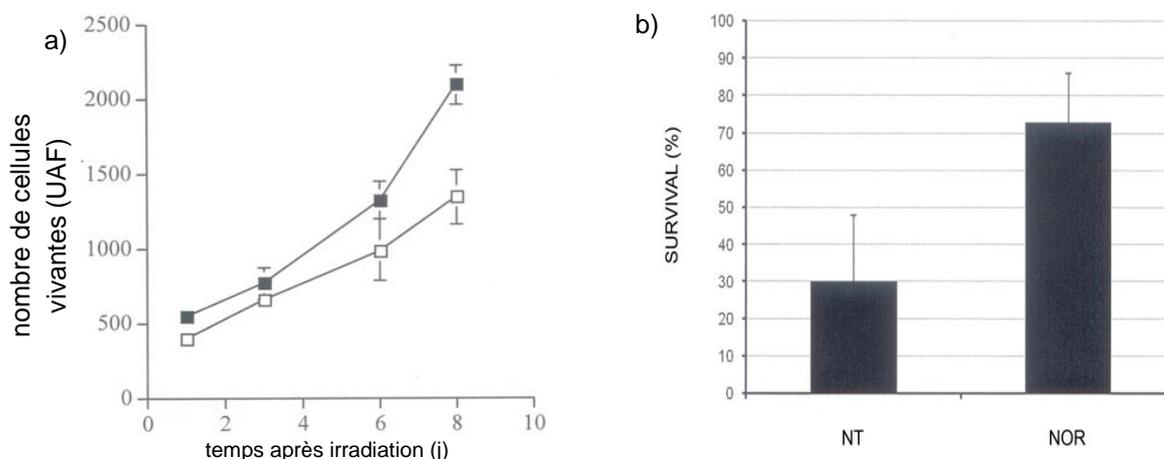


Figure 25 : études *in vitro* et *in vivo* de la norbadione A ; a) irradiation de cellules lymphoïdes TK6 par des rayons X à 8 Gy, traitées par la norbadione A dans du DMSO à 10 $\mu\text{g/mL}$, nombre de cellules vivantes exprimé en unités arbitraires de fluorescence (UAF) ; b) irradiation totale de souris C57BL/6 par des rayons X à 8 Gy ; NT : lot de souris non traitées par la Norbadione A ; NOR : lot de souris ayant reçu une injection de norbadione A à 50 $\mu\text{g/mL}$, étude de la survie à 30 jours

La norbadione A, insoluble dans l'eau, a été mise en solution dans du DMSO à 10 µg/mL. Des cellules irradiées en présence de DMSO pur à la même concentration ont servi de lot contrôle. Dans les deux cas une augmentation du nombre de cellules dès le 1^{er} jour après l'irradiation, ce qui est dû à une activité radioprotectrice du DMSO seul. Cependant, les cellules traitées par la norbadione A ont une croissance plus rapide qu'en l'absence de traitement. Une expérience *in vivo* a ensuite été réalisée en irradiant des souris C57BL/6 par des rayons X à 8 Gy et ayant reçu une injection de norbadione A en suspension dans du PBS (phosphate buffered saline) à 50 mg/kg. Un lot de souris non traitées a été irradié dans les mêmes conditions, et la survie à 30 jours a été déterminée (figure 25b). Une survie de 30 % des souris non traitées a été constatée, tandis que 72 % des souris ayant reçu une injection de norbadione A ont survécu.

Ces deux expériences ont confirmé l'effet radioprotecteur de la norbadione A, malheureusement, ce polyphénol s'est avéré très toxique (LD₅₀ = 59 mg/kg chez des souris C57BL/6) et peu soluble en milieu aqueux tamponné à pH physiologique. La norbadione A étant un dimère d'acides pulviniques, des travaux ont été menés sur l'étude de dérivés de cette famille en tant qu'antioxydants. Ainsi il a été démontré que le noyau 4-méthoxyphényle était le groupe aromatique apportant le plus d'activité (composé **3**, figure 26). De plus, il a été démontré que le groupement aromatique sur la double-liaison exocyclique pouvait être remplacé par un groupe méthyle sans perte notable de l'activité antioxydante (composé **4**).⁵³ Ces résultats ayant confirmé l'activité des acides pulviniques simples, nous avons souhaité poursuivre les recherches par l'évaluation de l'effet *in vitro* sur culture cellulaire irradiée. Le DMSO possédant une activité intrinsèque, nous nous sommes intéressés à la synthèse de composés solubles en milieu aqueux afin de s'affranchir de l'utilisation de ce solvant.

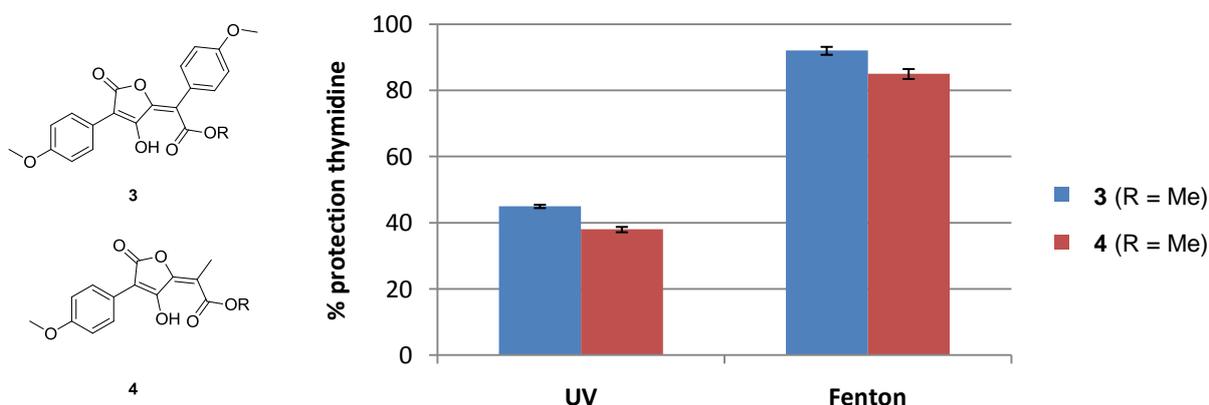


Figure 26 : structures des acides pulviniques **3** et **4**, et résultat de protection de la thymidine soumise à deux stress oxydants différents : irradiation UV (concentration testée 100 µM) et condition de Fenton (concentration testée : 500 µM)

L'hypothèse selon laquelle les acides pulviniques sont antioxydants est la suivante : la présence d'une fonction acide carboxylique proche de la fonction énole a pour conséquence la formation d'une liaison hydrogène très forte. Cette interaction se caractérise par une baisse importante du pKa de la fonction énole,⁵⁴ lequel est inférieur à 4 dans le cas de l'ester méthylique de **3** (R = OMe), alors qu'il est de l'ordre de 9-10 pour un énole classique. En conséquence la fonction énole aura tendance à être sous forme ionique à pH physiologique. Le doublet non-liant de cet énolate pourra alors facilement réagir avec les EAO par transfert mono-électronique et ainsi former un radical, lequel sera ensuite stabilisé par délocalisation sur la structure de l'acide pulvinique (schéma 6).

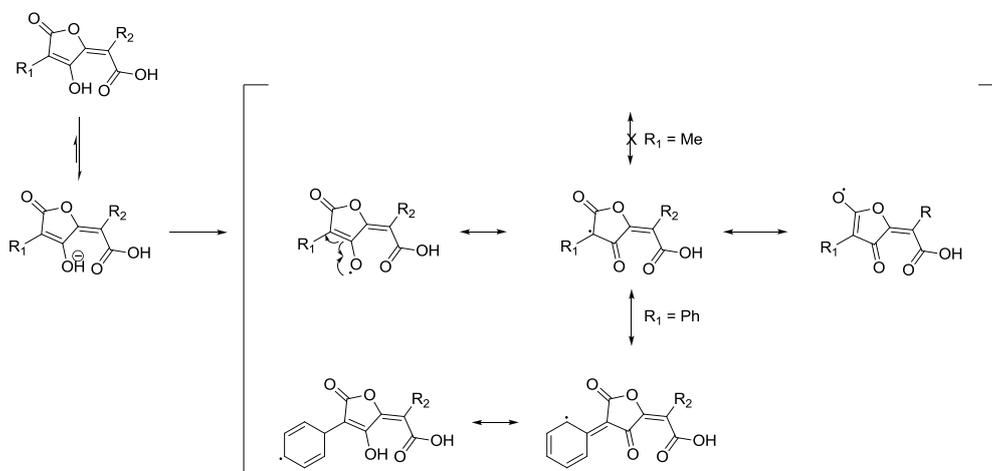


Schéma 6 : délocalisation du radical formé sur l'énole d'un acide pulvinique

V. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons décrit succinctement les différents types de radiations auxquels les organismes vivants peuvent être exposés lors d'une irradiation, accidentelle ou intentionnelle, ainsi que leurs effets sur l'organisme. Les moyens de défense développés par la nature sont multiples, mais ils peuvent être très rapidement dépassés lors d'une exposition à une forte dose, c'est pourquoi de nombreux projets de recherche portant sur l'étude de radioprotecteurs synthétiques ont vu le jour et ont abouti à la synthèse de nouveaux dérivés possédant des modes d'action différents. Les EAO, massivement produits par radiolyse de l'eau, vont causer des dommages importants dans la cellule, pouvant conduire à la mort cellulaire par apoptose. Le développement d'antioxydants capables de capturer ces radicaux libres constitue donc un axe de recherche majeur en radioprotection. Un test de criblage à haut-débit, mis au point en 2004 au CEA-Saclay, a permis l'identification de la norbadione A

comme étant un antioxydant particulièrement intéressant. Dans le but d'identifier de nouveaux radioprotecteurs, la DGA (Délégation Générale de l'Armement) a mis en place en 2006 un projet d'études amont (PEA) de trois ans (projet PROPERGAL, PROtection du PERsonnel et nouvelle formulation GALénique) ayant pour but l'étude de nouveaux agents de radioprotection, dont font partie les dérivés de l'acide pulvinique issus de la norbadione A. Ce projet a fait l'objet d'une collaboration entre plusieurs équipes :

- **CEA Saclay**, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (iBiTec-S), CEA Saclay (Dr T. Le Gall)
- **Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée**, UMR-5069 CNRS/UPS, Université Paul Sabatier, Toulouse (Dr G. Rima)
- **CRSSA (Centre de Recherche du Service de Santé des Armées)** La Tronche (Dr M. Diserbo et Dr C. Amourette)
- **Laboratoire ITODYS**, UMR-7086 CNRS, Université Paris Diderot (Dr J. M. El Hage Chahine)

L'étude des acides pulviniques en tant que radioprotecteurs sera dans un premier temps réalisée par la synthèse de dérivés hydrophiles dans le but d'être testés sur culture cellulaire. Ces dérivés seront synthétisés par introduction, sur la fonction acide carboxylique, d'amines portant des groupes permettant d'obtenir une meilleure solubilité dans l'eau. Par la suite, les amides obtenus seront appelés **pulvinamides**. Plusieurs fonctions hydrophiles seront utilisées afin d'étudier l'influence de cette fonctionnalité sur l'activité. Nous étudierons également l'influence que pourrait avoir la combinaison dans un seul composé, dit *hybride*, d'un motif pulvinique couplé à un second motif possédant une activité antioxydante. En parallèle de l'étude des acides pulviniques, les résultats expérimentaux obtenus lors de différents criblages de molécules sur la thymidine ont été compilés et, en collaboration avec le Dr Marjana Novic (Laboratory of Chemometrics, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovénie) un modèle de prédiction *in silico* a été créé. Ce modèle pourrait permettre de prédire l'activité radioprotectrice d'une liste de composés inconnus. Il sera utilisé afin d'identifier de nouvelles familles de composés potentiellement radioprotecteurs et de comprendre les mécanismes par lesquels passent l'activité de nos composés. Les activités antioxydantes et radioprotectrices des molécules seront ensuite évaluées sur différents tests afin d'élucider les mécanismes d'action. Enfin dans une dernière partie une étude sera menée sur les propriétés complexantes des dérivés de l'acide pulvinique envers le césium 137, dans le but de développer des agents de détoxification de tissus contaminés.

Références bibliographiques du chapitre 1 :

- ¹ P. Galle, R. Paulin, *Biophysique : 1. Radiobiologie, Radiopathologie*, Masson, **1992**
- ² A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *18*, 1033-1077
- ³ H. J. Fenton, *J. Chem. Soc.* **1894**, *65*, 899
- ⁴ F. Haber, J. J. Weiss, *Proc. Roy. Soc. London Ser.* **1934**, *147*, 332
- ⁵ M. Fontecave, J.-L. Pierre, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1991**, *128*, 505-520
- ⁶ S. P. Jackson, *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 687-696
- ⁷ B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third edition, Oxford University Press, **1985**
- ⁸ T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Boloor, K. S. Sane, S. S. Ghaskadbi, R. D. Lele, *J. Assoc. Physicians India* **2004**, *52*, 794-804
- ⁹ F. Dumont, A. Le Roux, P. Bischoff, *Expert Opin. Ther. Patents* **2010**, *20*, 73-101
- ¹⁰ S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg, *J. Cell. Sci.* **2003**, *116*, 4077-4085
- ¹¹ R. Kolesnick, Z. Fuks, *Oncogene* **2003**, *22*, 5897-5906
- ¹² J. A. Tailer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nature* **1983**, *306*, 284-287
- ¹³ C. Bowler, L. Slooten, S. Vandenbranden, R. De Rycke, J. Botterman, C. Sybesma, M. Van Montagu, D. Inzé, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1723-1732
- ¹⁴ M. Comporti, *Chem. Phys. Lipids* **1987**, *45*, 143-169
- ¹⁵ M. Maiorino, F. F. Chu, F. Ursini, K. J. A. Davies, J. H. Doroshow, R. S. Esworthy, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7728-7732
- ¹⁶ H. Sies, N. I. Krinsky, *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1299-1300
- ¹⁷ E. Niki, *Chem. Phys. Lipids* **1987**, *44*, 227-253
- ¹⁸ D. C. Borg, K. M. Schaich, *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine Vol. II*, (CRC Press), 29-44
- ¹⁹ S. R. J. Maxwell, H. Thomason, D. Sandler, C. Leugen, M. A. Baxter, G. H. G. Thorpe, A. F. Jones, A. H. Barnett, *Eur. J. Clin. Invest.* **1997**, *27*, 484-490
- ²⁰ R. B. Mikkelsen, P. Wardman, *Oncogene* **2003**, *22*, 5734-5754
- ²¹ J. F. Weiss, M. R. Landauer, *Toxicology* **2003**, *189*, 1-20
- ²² P. Okunieff, S. Swarts, P. Keng, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *614*, 165-178
- ²³ J. R. Kouvaris, V. E. Kouloulis, L. J. Vlahos, *Oncologist* **2007**, *12*, 738-747
- ²⁴ Wisconsin Alumni Res Foundation, WO2005014524, **2005**
- ²⁵ K. A. Schellenberg, WO2007095178, **2007**
- ²⁶ G. C. Jagetia, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *595*, 301-320
- ²⁷ Y. Yoshida, Y. Saito, L. S. Jones, *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *104*, 439-445
- ²⁸ M. Henry, Yasoo Health, WO2009126866, **2009**

- ²⁹ R. F. Martin, S. Broadhurst, M. E. Reum, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1067-1070
- ³⁰ B. J. Day, *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 557-566
- ³¹ I. Batinic-Haberle, WO2005077269, **2005**
- ³² Duke University, Cancer Therapy, US2007149498, **2007**
- ³³ Eukarion Inc, EP1688425, **2006**
- ³⁴ V. Srinivasan, S. Doctrow, V. K. Singh, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2008**, *30*, 271-290
- ³⁵ E. C. Pietsch, S. M. Sykes, S. B. McMahon, *Oncogene* **2008**, *27*, 6507-6521
- ³⁶ A. V. Gudkov, E. A. Komarova, *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 67-72
- ³⁷ University of Illinois, US2005222224, **2005**
- ³⁸ D. Sohn, V. Graupner, D. Neise, *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 869-878
- ³⁹ W. Davidson, Q. Ren, G. Kari, *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1224-1230
- ⁴⁰ Janssen Pharmaceutica NV, EP1613313, **2006**
- ⁴¹ Temple University, WO2005065074, **2005**
- ⁴² W. Deng, E. Shuyu, R. Tsukahara, *Gastroenterology* **2007**, *132*, 1834-1851
- ⁴³ T. M. Pawlik, K. Keyomarsi, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *59*, 928-942
- ⁴⁴ Y. Li, X. Sun, J. T. LaMont, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2674-2678
- ⁴⁵ US Secretary Department of Health and Human Services, Uniformed Services University of Health Sciences. EP1767215, **2007**
- ⁴⁶ Henry Ford Health Systems, WO2009017948, **2009**
- ⁴⁷ K. M. Ahmed, J. J. Li, *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 1-13
- ⁴⁸ Cleveland Clinic Foundation, WO2006069198, **2006**
- ⁴⁹ S. Meunier, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault, D. Boquet, C. Créminon, E. Saint-Aman, A. Valleix, F. Taran, C. Mioskowski, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 832-840
- ⁵⁰ S. Meunier, M. Hanédanian, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault, D. Boquet, C. Créminon, C. Mioskowski, F. Taran, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1234-1241
- ⁵¹ B. Steffan, W. Stieglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 445-447
- ⁵² A. Le Roux, S. Benzina, B. Nadal, M. Desage-El Murr, B. Heurtaux, F. Taran, J.-M. Denis, T. Le Gall, S. Meunier, P. Bischoff, *article soumis*
- ⁵³ D. Habrant, S. Poigny, M. Ségur-Derai, Y. Brunel, B. Heurtaux, T. Le Gall, A. Strehle, R. Saladin, S. Meunier, C. Mioskowski, A. Wagner, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2454-2464
- ⁵⁴ P. Kuad, M. Borkovec, M. Desage-El Murr, T. Le Gall, C. Mioskowski, B. Spiess, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1323-1333

Chapitre 2

Synthèse de pulvinamides

Chapitre 2 : Synthèse de pulvinamides

Notre objectif dans l'étude des acides pulviniques comme radioprotecteurs est d'évaluer la capacité de ces composés à protéger des cellules en culture soumises à une irradiation. Pour cela, nous avons souhaité synthétiser des acides pulviniques possédant des fonctions permettant d'augmenter la solubilité aqueuse. Cette fonctionnalité sera portée par des amines introduites sur la fonction acide carboxylique. Cette stratégie repose sur une étape-clé consistant à ouvrir un composé de type bis-lactone par des amines (schéma 7). Nous utiliserons la même stratégie pour produire des composés possédant un second motif antioxydant, afin d'étudier un éventuel effet coopératif entre deux motifs antioxydants possédant des modes d'action différents. Nous allons dans un premier temps effectuer un rappel des méthodes de synthèse des acides pulviniques di-aromatiques existant dans la littérature, puis leur adaptation à la synthèse de structures mono-aromatiques. Puis nous étudierons la synthèse de pulvinamides possédant une fonction hydrophile dans un premier temps, puis un motif antioxydant dans un second temps.

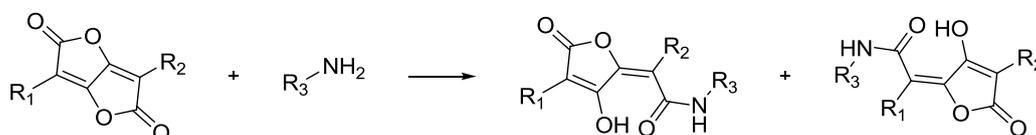


Schéma 7 : stratégie de synthèse de pulvinamides

I. Généralités sur les acides pulviniques

Les acides pulviniques sont des membres de la famille des 5-arylidènes-buténolides, et plus généralement de la famille des γ -buténolides. La molécule la plus simple est l'acide pulvinique lui-même (**2**, figure 27). Ils sont présents dans de nombreux champignons, en particulier la famille des bolets, ainsi que dans certains lichens.^{1,2} Ils sont responsables de la couleur jaune-orange intense à brune des lichens et des chapeaux des bolets. Ils ont été isolés pour la première fois en 1831,³ et leur structure a été élucidée par Spiegel en 1883.⁴ La structure des acides pulviniques est caractérisée par le motif général des γ -buténolides, possédant un cycle aromatique en position C3, une fonction hydroxyle en position 4, et une

double liaison exocyclique en position 5. Sur cette double liaison se trouve un second cycle aromatique et une fonction acide carboxylique, tous les deux sur le carbone C6. La fonction acide carboxylique est en position *syn* par rapport à la fonction hydroxyle (stéréochimie *E* de la double liaison exocyclique), .

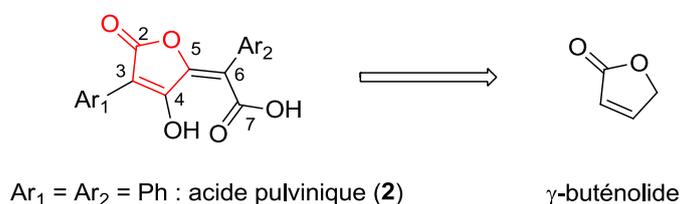


Figure 27 : structure des acides pulviniques et du motif γ-buténolide

Les acides pulviniques sont la forme ouverte d'une bis-lactone (figure 28), qui peut être facilement obtenue par déshydratation de l'acide pulvinique correspondant. Inversement les acides pulviniques peuvent être aisément obtenus à partir d'une bis-lactone par hydrolyse (obtention de l'acide carboxylique) ou par méthanolyse (obtention de l'ester méthylique). Nous pouvons noter que lorsque Ar₁=Ar₂, nous avons alors un composé présentant un centre de symétrie C₂. Nous parlerons dans ce cas de **bis-lactones symétriques**, et par analogie d'acides pulviniques symétriques. Inversement, lorsque Ar₁≠Ar₂, nous perdons cette symétrie, nous parlerons alors de **bis-lactones dissymétriques** ou d'acides pulviniques dissymétriques. Par ailleurs, nous avons vu dans le premier chapitre que nous pouvions remplacer le groupe Ar₂ par un méthyle sans perte d'activité notable. Nous parlerons ainsi de composés **mono-aromatiques** lorsqu'un des deux groupes aryles sera remplacé par un groupe non-aromatique, et **di-aromatiques** en présence de deux groupes aromatiques. Par analogie, nous utiliserons la même nomenclature pour les acides pulviniques et leurs dérivés.

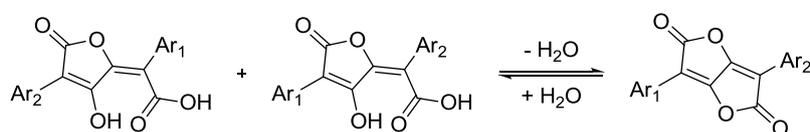


Figure 28 : obtention des bis-lactones à partir d'acides pulviniques

Dans la figure 29 sont représentés quelques uns des acides pulviniques naturels les plus courants avec leur nom usuel. Le composé **5** est appelé acide vulpinique et correspond à l'ester méthylique de l'acide pulvinique. Par analogie le terme d'**acide vulpinique** a depuis été utilisé pour désigner tout composé dont la fonction acide est estérifiée. Parmi les autres

acides pulviniques naturels figure l'acide xérocomique **6**, qui est un précurseur dans la biosynthèse de la norbadione A **1** (obtenue par dimérisation de l'acide xérocomique), ainsi que l'acide gomphidique **7**.

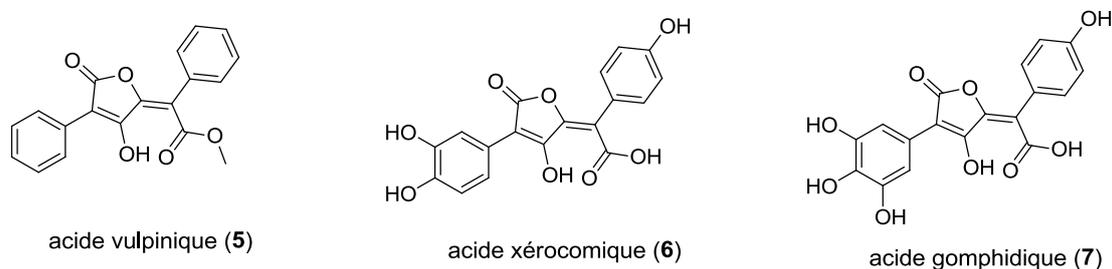


Figure 29 : exemples d'acides pulviniques naturels

Une dernière nomenclature est utilisée lorsque la fonction énole est alkylée, nous remplacerons le suffixe –ique par le suffixe –ate. Ainsi, lorsque la fonction énole d'un acide vulpinique sera alkylée, nous parlerons dans ce cas de **vulpinate**. La figure 30 rappelle les différents noms associés aux différentes structures que nous pourrions rencontrer dans ce manuscrit. Nous allons dans la suite de ce chapitre faire un état de l'art concernant la synthèse d'acides pulviniques et de leurs dérivés.

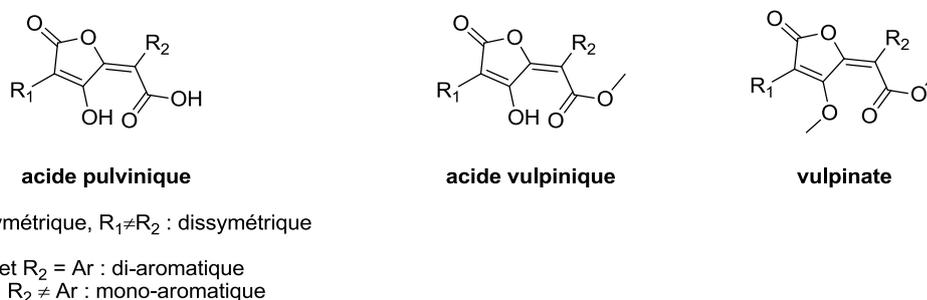


Figure 30 : rappel de la nomenclature employée avec les acides pulviniques

II. Synthèse des acides pulviniques : état de l'art

La première synthèse d'acides pulviniques a été décrite en 1894 par Volhard.⁵ Depuis, de nombreuses voies de synthèse ont été décrites et ont fait l'objet d'une revue.⁶ Deux stratégies de synthèse des acides pulviniques sont apparues. La première d'entre elles est principalement axée sur des méthodes originales de construction du cycle buténolide (figure 31). L'introduction des groupements en C3 et C6 peut se faire dès le début de la synthèse,

ou après la formation du cycle. La seconde stratégie consiste quant à elle à dériver un cycle buténolide déjà formé, à partir d'un produit commercial ou provenant d'une famille de composés similaires connue. A partir de ce cycle les différents groupes en C3, C5 et/ou C6 sont ensuite introduits.

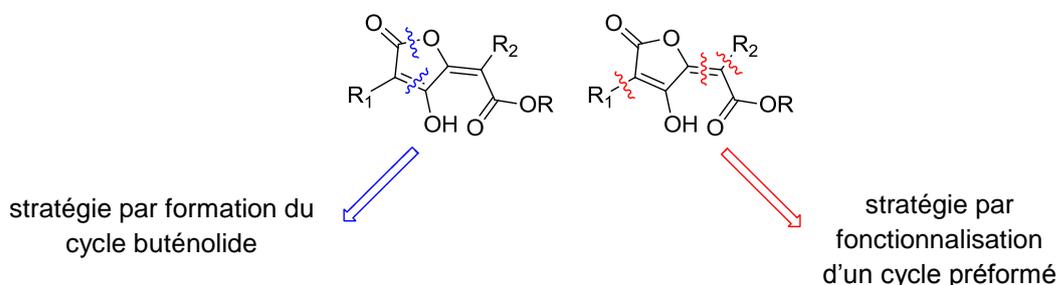


Figure 31 : présentation des deux stratégies de synthèse des acides pulviniques

Nous allons par la suite présenter les différentes méthodes mises au point selon l'une ou l'autre stratégie. Comme il est aisé de passer d'un acide vulpinique à un acide pulvinique puis à la bis-lactone correspondante (figure 32), les synthèses seront axées sur l'obtention de l'une ou l'autre des deux molécules.

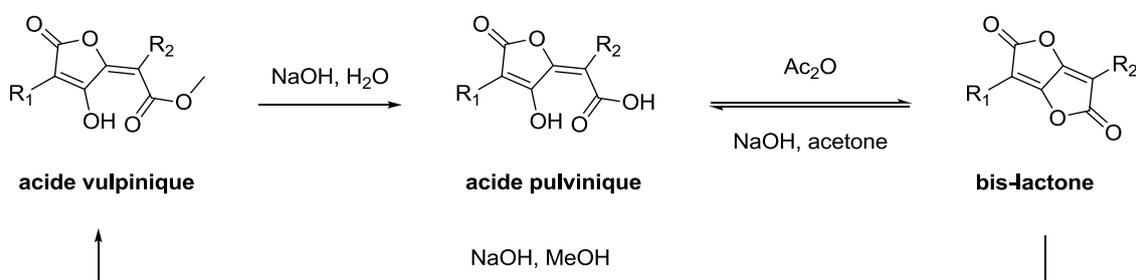


Figure 32 : méthodes permettant de passer de l'acide vulpinique à l'acide pulvinique puis à la bis-lactone

II. 1. Stratégie basée sur la construction du cycle buténolide

II. 1. i. Passage par une 1,2-dicétone acyclique

La première stratégie étudiée est basée sur la synthèse d'une 1,2-dicétone acyclique, suivie de la cyclisation de cette dernière (schéma 8). Dans cette stratégie, les deux fonctionnalités en C3 et C6 sont introduites dès le début de la synthèse.

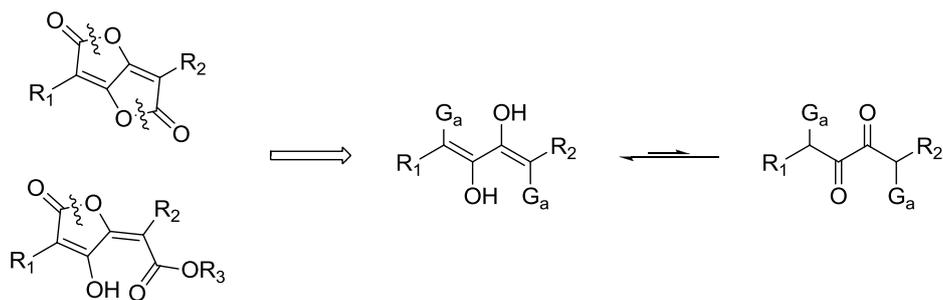


Schéma 8 : stratégie de synthèse passant par une 1,2-dicétone acyclique

La première méthode développée est celle de Volhard en 1894.⁵ Elle consiste dans une première étape à condenser deux molécules de phénylacétonitrile sur l'oxalate de diéthyle en présence d'éthylate de sodium (schéma 9). Il se forme alors la dicétone acyclique **8** avec un rendement de 66 %. Celle-ci est en équilibre avec sa forme cyclisée **9**. Après hydrolyse acide puis déshydratation, on obtient la bis-lactone **10** avec un rendement global de 71 %.

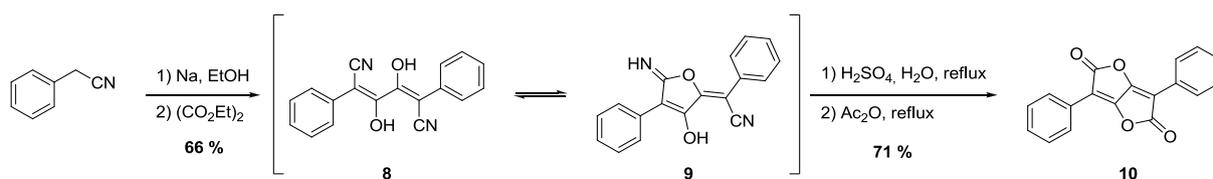


Schéma 9 : synthèse d'acides pulviniques symétriques par Volhard

Asano⁷ puis Akermark⁸ ont adapté cette méthode afin d'avoir accès à des bis-lactones di-aromatiques dissymétriques (schéma 10). Ainsi, Akermark a condensé 1 équivalent de 2-méthoxyphénylacétonitrile sur l'oxalate de diéthyle en présence d'hydruure de sodium dans un mélange DME/dioxane à température ambiante et fournit le composé **11** avec un rendement de 78 %. Il a ensuite fait réagir le phénylacétonitrile sur **11**, toujours en présence d'hydruure de sodium dans le DME à -10°C pour fournir la dicétone **12** avec 82 % de rendement. Comme dans le cas de **8**, cette dicétone existe sous ses deux formes cyclisées **13** et **14**. Le mélange des deux isomères est ensuite hydrolysé en milieu acide, puis déshydraté par l'anhydride acétique pour fournir la bis-lactone **15** avec un rendement de 88 %.

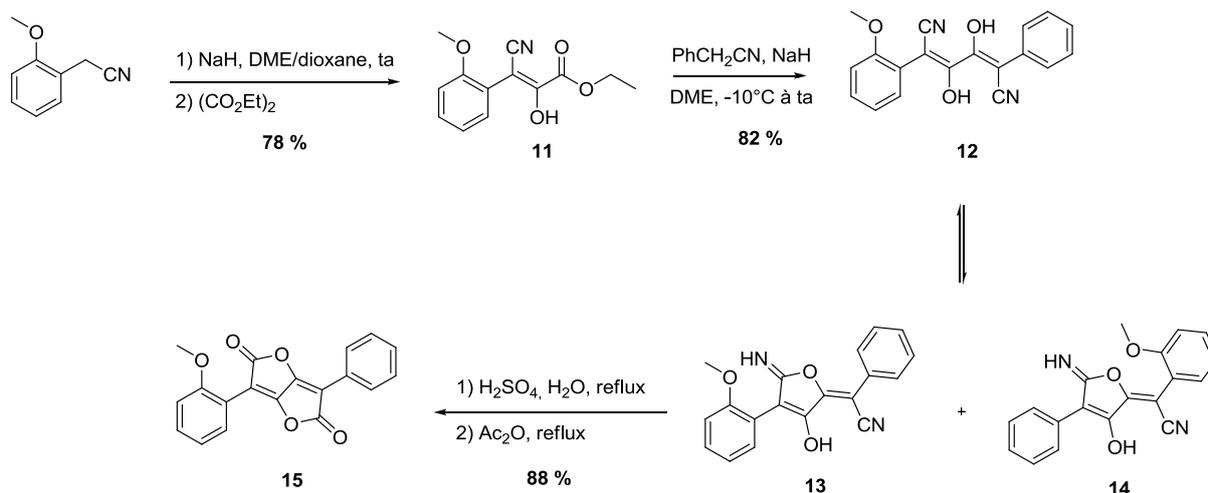


Schéma 10 : modification d'Akermark pour la synthèse de bis-lactones dissymétriques

Le traitement par méthanolyse de bis-lactones dissymétriques conduit à deux dérivés isomères. L'absence d'un axe de symétrie C₂ sur des composés comme **15** implique une différenciation des deux lactones et ainsi l'attaque par l'ion méthylate de l'un ou l'autre des cycles conduira à deux composés différents **16** et **17** sans contrôle rapporté dans la littérature de la régiosélectivité de l'attaque nucléophile (schéma 11). Toutefois ceci a été mis à profit par O'Mant pour préparer de nombreux analogues dissymétriques afin d'étudier les propriétés anti-inflammatoires des acides pulviniques.⁹

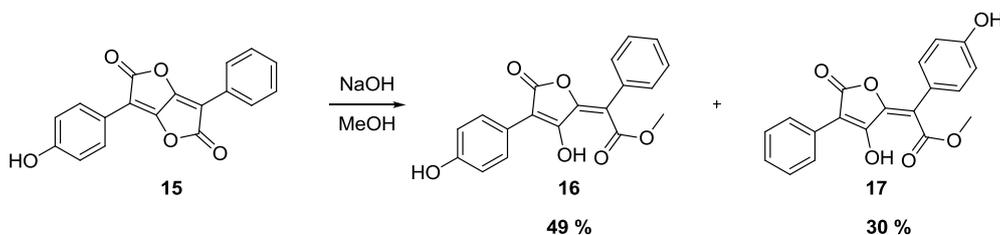


Schéma 11 : méthanolyse de **15** et obtention de deux isomères par O'Mant

Une seconde méthode passant par une 1,2-dicétone acyclique fut développée par Ramage en 1984.¹⁰ Cette dicétone est obtenue par oléfination de l'ylure de phosphonium **18** en présence d'un α -cétocarbonate pour conduire à l'intermédiaire **19**, puis par condensation de l'anion d'un α -arylacétate de *tert*-butyle pour fournir la 1,2-dicétone **20**, laquelle se cyclise pour fournir l'ester *tert*-butylique **21** (schéma 12). La régiosélectivité de la cyclisation est dirigée par la différenciation des deux fonctions ester, celle-ci se faisant uniquement du côté de l'ester méthylique, moins encombré. L'ester *tert*-butylique peut ensuite être facilement déprotégé pour conduire à des acides pulviniques dissymétriques.

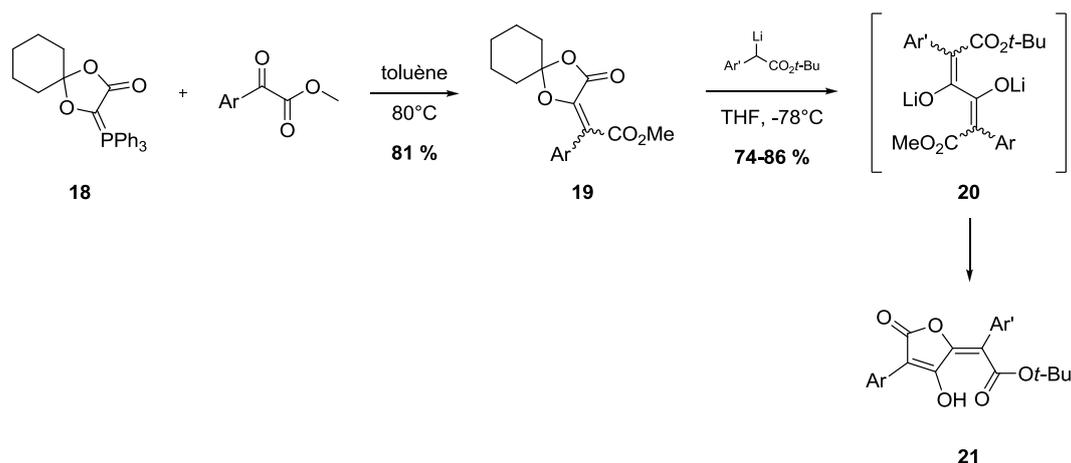


Schéma 12 : synthèse d'acides vulpiniques dissymétriques à partir d'une dioxolanone

Enfin une dernière méthode de synthèse d'acides pulviniques passant par une 1,2-dicétone acyclique fut développée par Le Gall et Mioskowski.¹¹ Elle consiste à condenser deux équivalents de l'acétal de cétène silylé **22** sur un équivalent de chlorure d'oxalyle dans le DCM à -78°C pour fournir la dicétone **23** (schéma 13). La cyclisation en acide vulpinique **24** est ensuite réalisée en présence de DBU dans du méthanol suivi d'une hydrolyse acide.

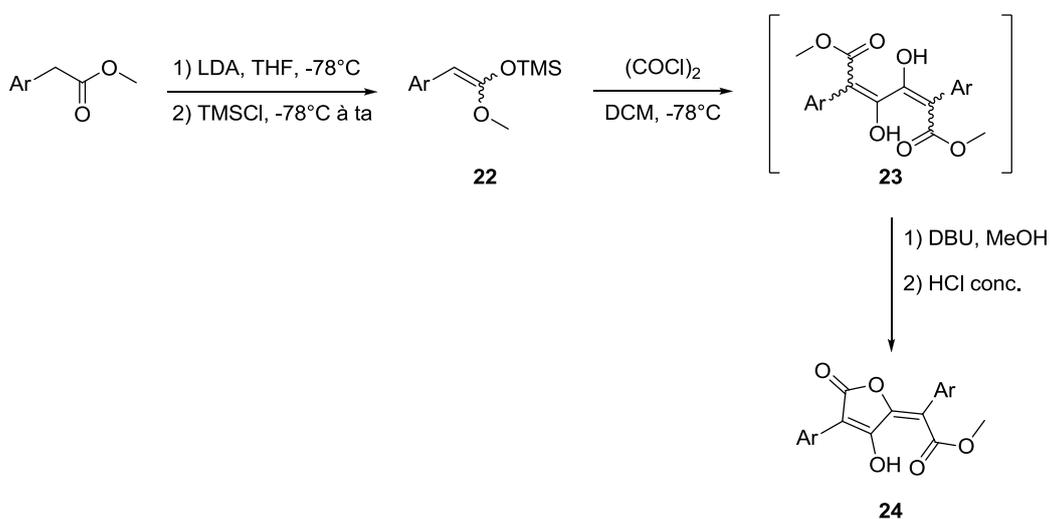


Schéma 13 : synthèse d'acides vulpiniques symétriques par Le Gall et Mioskowski

Cette méthode très efficace permet la synthèse d'acides vulpiniques avec des rendements globaux compris entre 60 et 70 %, cependant elle n'est applicable qu'à la synthèse d'acides pulviniques symétriques.

II. 1. ii. Construction du cycle par une condensation de Dieckmann

En 1979, Weinstock a décrit une méthode permettant d'accéder à des motifs pulviniques dissymétriques *via* une condensation de type Dieckmann (schéma 14).¹² Ici encore les deux groupes en C3 et C6 sont introduits avant la cyclisation.

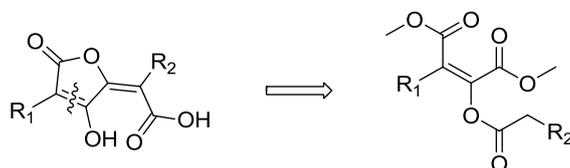


Schéma 14 : rétrosynthèse de la stratégie de Weinstock

Dans une première étape, le composé **25** est obtenu par condensation de l'anion d'un 2-arylacétate de méthyle sur l'oxalate de diméthyle (schéma 15). Le composé **25** obtenu est présent sous la forme d'un mélange de cétone et d'énol **26**. Cet énol est ensuite acylé par réaction avec un chlorure d'acyle en présence d'un équivalent de triéthylamine pour fournir l'ester d'énol **27**. Au cours de cette réaction, l'ajout d'un équivalent supplémentaire de triéthylamine suivi du chauffage à 60°C permet d'effectuer la cyclisation de l'ester d'énol, aboutissant ainsi aux acides vulpiniques dissymétriques **28** avec de faibles rendements (5 à 25 %).

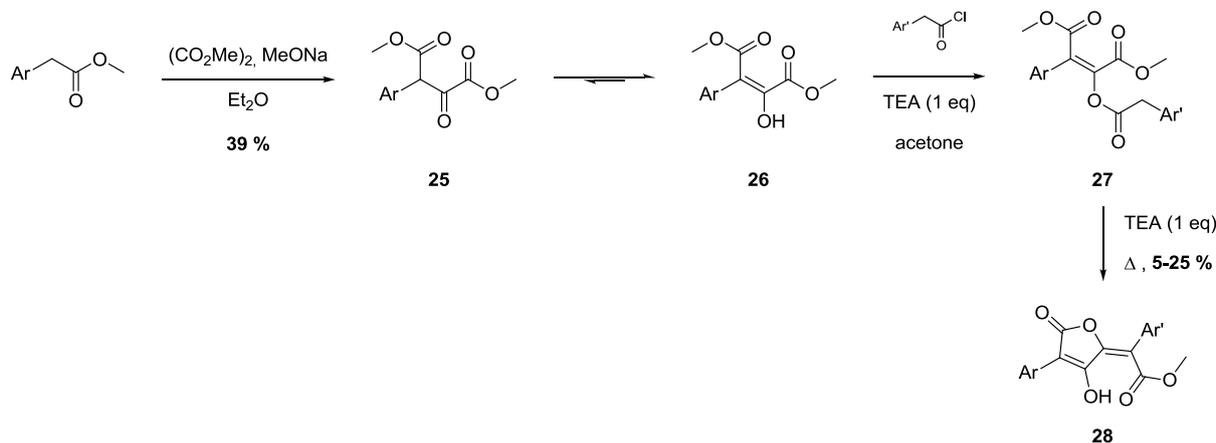


Schéma 15 : synthèse d'acides vulpiniques **28** par une condensation de type Dieckmann

II. 1. iii. Méthode de Langer

En 1999, Langer a mis au point une méthode de synthèse passant par une construction originale du cycle buténolide mais, contrairement aux méthodes précédentes, seule la

fonctionnalité en C6 est introduite avant la cyclisation (schéma 16).¹³⁻¹⁴ Le cycle obtenu contient une fonction hydroxy en C3, laquelle permet, par couplage de Suzuki, d'aboutir à un acide pulvinique.

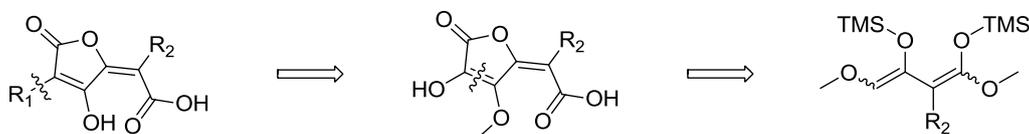


Schéma 16 : stratégie de synthèse de la voie développée par Langer

Il a ainsi mis au point une synthèse du buténolide **31** par réaction de cyclisation [3+2] entre le chlorure d'oxalyle et le 1,3-bis(triméthylsilyloxy)-1,3-diène **30** catalysée par le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf, schéma 17).¹⁵⁻¹⁷ Il a ainsi obtenu le composé **31** avec un rendement de 54 %. La conversion de la fonction hydroxy en C3 sous forme de triflate puis le couplage de Suzuki avec l'acide phénylboronique suivie de la déprotection de l'énol permet d'aboutir à l'acide vulpinique **5** avec un rendement de 33 % à partir de **31**.

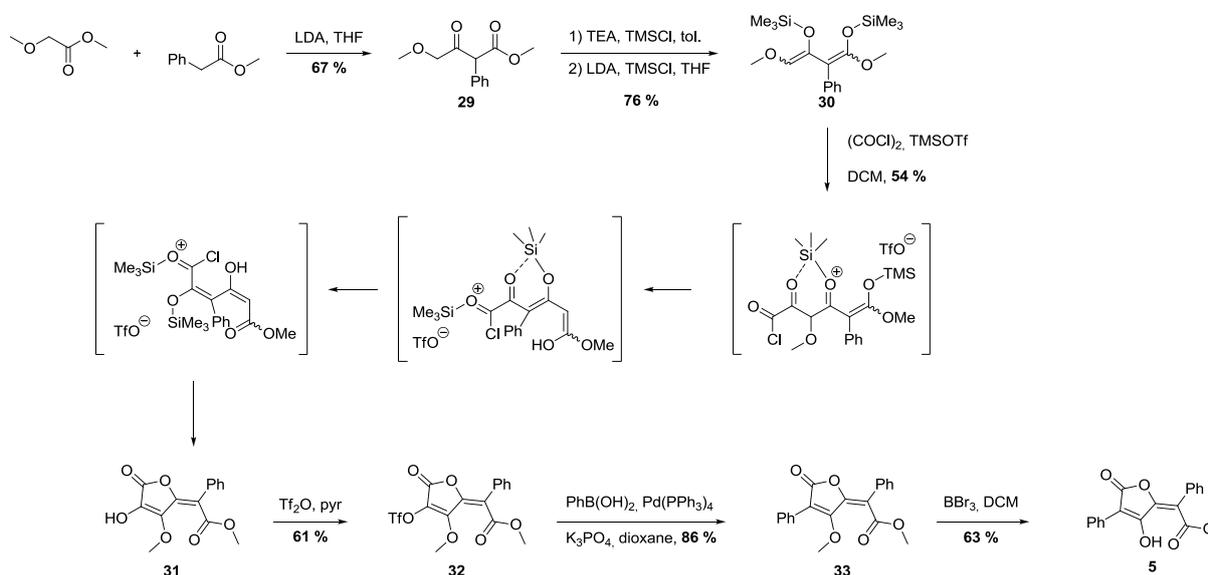


Schéma 17 : synthèse de l'acide vulpinique **5** par la méthode de Langer

Cette méthode est applicable à la synthèse d'acides pulviniques dissymétriques. Toutefois, le nombre d'étapes est plus important et les intermédiaires silylés sont instables et nécessitent une manipulation dans des conditions très strictes. Il est à noter que Le Gall et

Mioskowski ont appliqué cette méthode avec succès pour la synthèse totale de la norbadione A (schéma 18).¹⁸⁻²⁰ Ainsi le triflate **37** a été synthétisé en 5 étapes à partir du 4-benzyloxyphénylacétate de méthyle avec un rendement global de 27 %. En parallèle, l'ester boronique **38** a été synthétisé en 7 étapes à partir de la 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone. Le couplage de Suzuki a été réalisé avec succès avec un rendement de 58 % sur les deux étapes. Enfin **39** est déprotégée pour fournir la norbadione A **1**, avec un rendement de 21 % pour les deux dernières étapes.

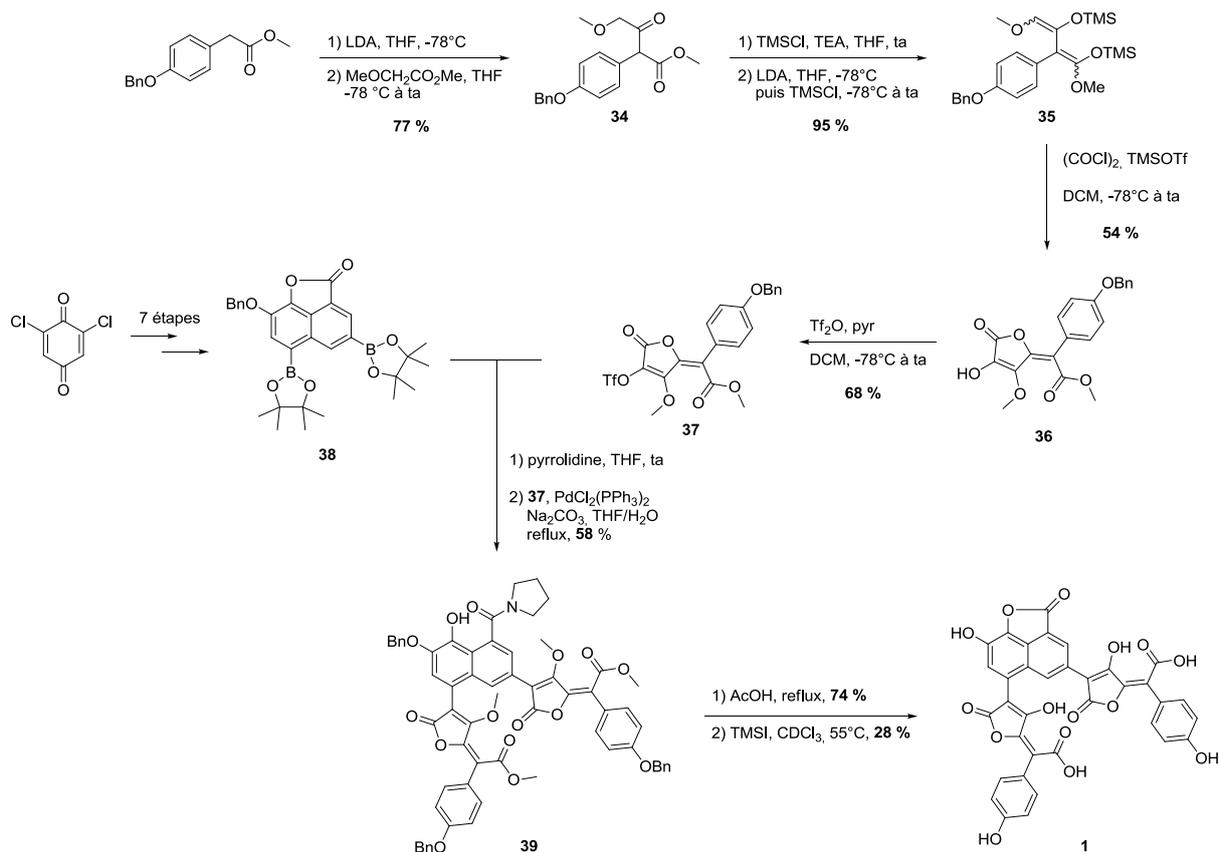


Schéma 18 : synthèse totale de la norbadione A **1** par Le Gall et Mioskowski via la stratégie de Langer

Nous venons de voir différentes stratégies de synthèse d'acides pulviniques par des méthodes de construction du cycle buténolide. Nous allons maintenant voir des méthodes de synthèse basées sur la dérivatisation et la fonctionnalisation de cycles apparentés.

II. 2. Stratégies basées sur la dérivation d'un cycle déjà formé

Les méthodes de synthèse que nous allons aborder à présent ont toutes pour principe de dériver un cycle buténolide déjà formé. Deux familles de composés ont été principalement étudiées, dérivées de l'anhydride maléique ou de l'acide tétronique (figure 33). La synthèse d'acides pulviniques au départ d'anhydrides maléiques a été largement étudiée par Pattenden et Kayser,²¹⁻²⁸ tandis que l'utilisation des acides tétroniques a été développée par Mioskowski et Le Gall.²⁹⁻³²

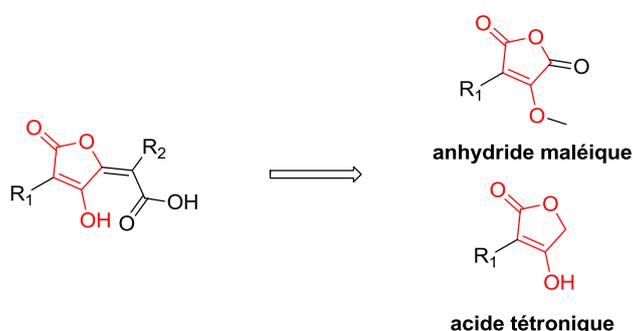


Figure 33 : structures de l'anhydride maléique et de l'acide tétronique

II. 2. i. Travaux de Pattenden : synthèse au départ d'un anhydride maléique

Cette méthode consiste à exploiter la réactivité particulière des anhydrides maléiques vis-à-vis de nucléophiles. Ce comportement a été principalement étudié par Pattenden.²¹⁻²² Il a en effet constaté que la réduction de l'anhydride maléique **35** par l'hydrure de lithium aluminium (LiAlH₄) s'effectue de manière régiosélective sur le carbonyle en α de la fonction méthoxy, conduisant à un mélange du tétronate **36** et du composé **37** (schéma 19). Cette régiosélectivité s'explique par une chélation de l'atome d'aluminium entre l'atome d'oxygène du groupe méthoxy et le carbonyle adjacent. Ceci a été confirmé par les travaux de Kayser.²³⁻²⁴ Il a ensuite converti le tétronate **36** en vulpinate **39** en deux étapes,²⁵ par déprotonation en C5 par le *N*-cyclohexyl-*N*-iso-propylamidure de lithium (LICA) puis condensation sur le 2-oxo-2-phénylacétate de méthyle suivie d'une déshydratation en présence de P₂O₅, avec un rendement global de 3.5 % sur les trois étapes.

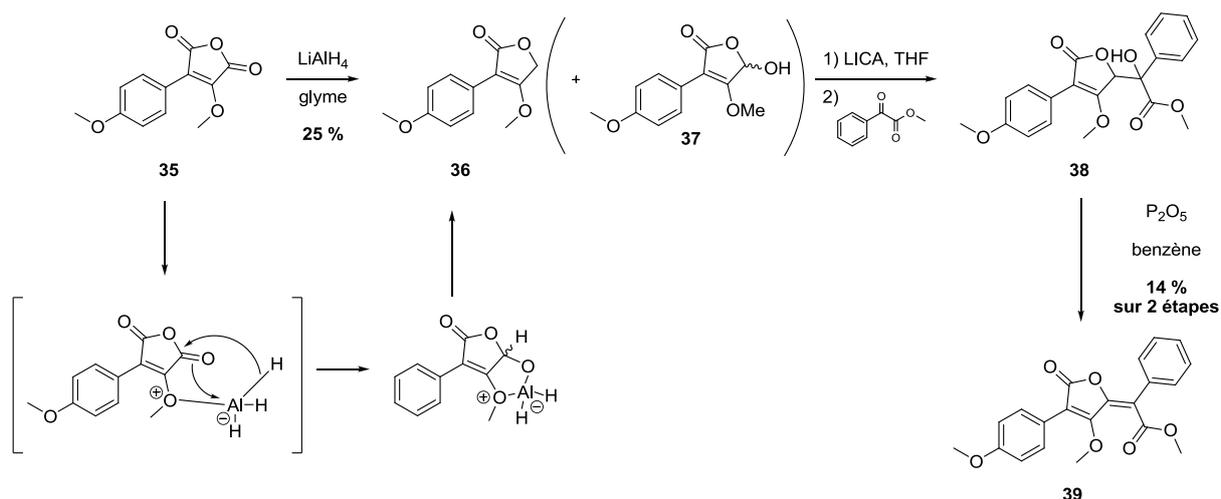


Schéma 19 : synthèse du vulpinate **39** par réduction régiosélective d'un anhydride maléique

Cette même régiosélectivité a été observée avec de nombreux nucléophiles et ainsi Pattenden a condensé un énolate de zinc d'un acétate d'aryle **40** sur divers anhydrides maléiques pour aboutir aux alcools tertiaires **42** (schéma 20).²⁶⁻²⁷

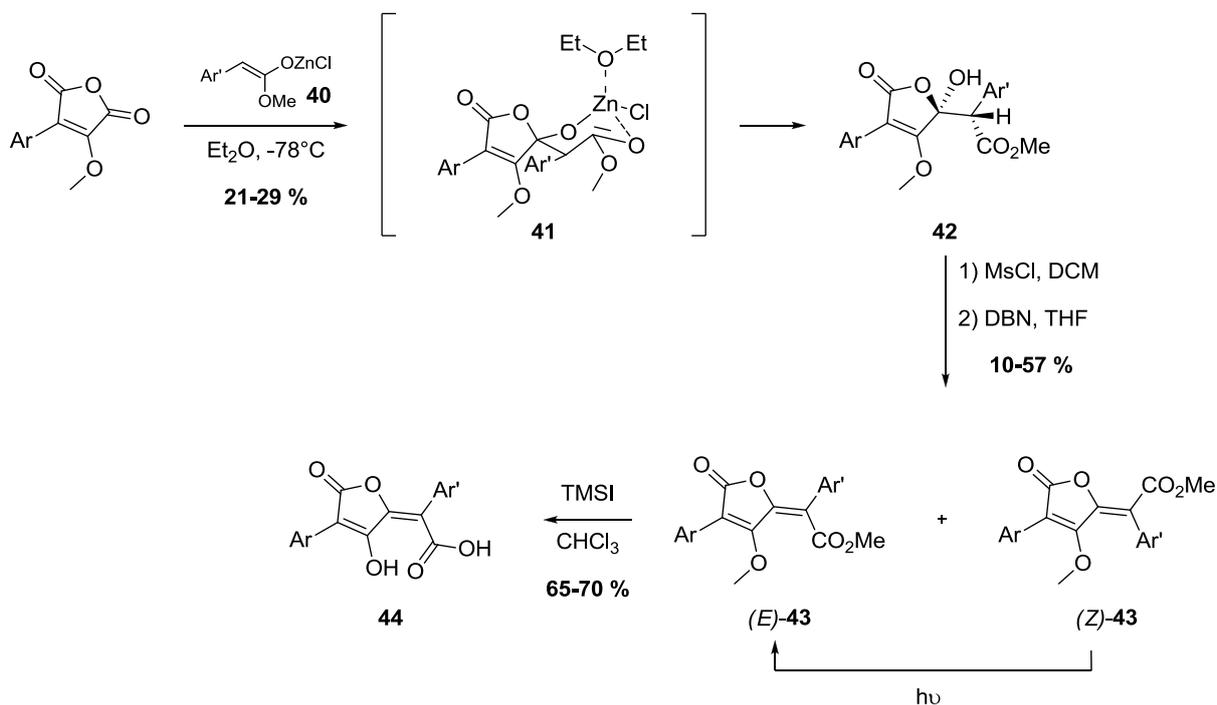


Schéma 20 : synthèse d'acides pulviniques par une réaction de type Reformatsky

Cette addition régiosélective de type Reformatsky s'effectue par un état de transition supposé **41** de type chaise, où les substituants encombrés se positionnent en équatorial,

fournissant ainsi l'alcool **42** sous forme d'un seul diastéréoisomère ou d'un mélange très fortement enrichi suivant la nature des groupements aromatiques. La déshydratation de cet alcool se fait par activation sous forme de mésyle et élimination en présence de DBN. On obtient alors un mélange *Z/E* du vulpinate correspondant **43**. L'isomérisation de l'isomère *Z* en isomère *E* se réalise spontanément en quelques jours sous l'effet de la lumière naturelle. Enfin la déprotection de l'énol, de l'ester méthylique et des éventuels groupes méthoxy portés par les différents groupes aromatiques s'effectue en présence d'iodure de triméthylsilyle pour donner les acides pulviniques correspondants **44**. Cette méthode souffre cependant de rendements faibles à moyens.

Enfin un dernier nucléophile étudié par Pattenden est l'anion sodé du phosphite de méthyle.²⁸ Dans le but d'effectuer une réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) il a ainsi synthétisé les phosphoesters **45**, puis réalisé l'oléfination sur divers dérivés de 2-oxo-2-arylacétates de méthyles pour obtenir les vulpinates **43** (schéma 21).

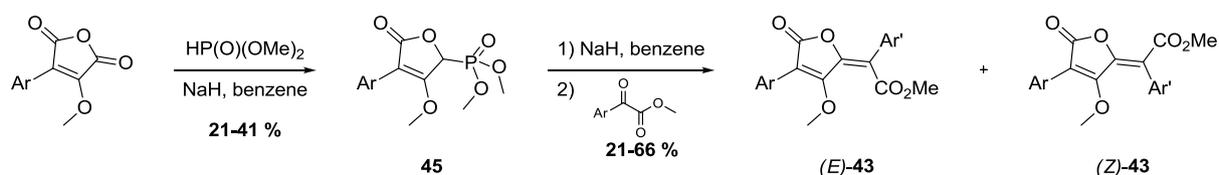


Schéma 21 : synthèse de vulpinates par réaction de Horner-Wadsworth-Emmons

II. 2. ii. Travaux de Mioskowski et Le Gall : synthèse par l'intermédiaire d'un acide tétronique

Cette méthode s'inspire de la voie de synthèse de Pattenden présentée précédemment (schéma 22). La stratégie repose sur une synthèse au départ de l'acide tétronique commercial, consistant à créer la double-liaison C5-C6 par un intermédiaire possédant la fonctionnalité en C6 puis à fonctionnaliser en C3.²⁹

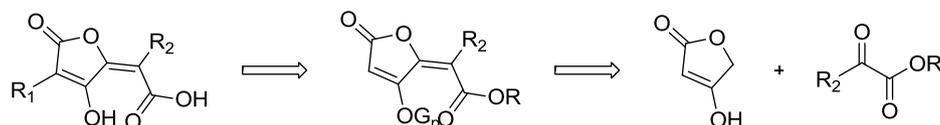


Schéma 22 : stratégie de synthèse de Le Gall et Mioskowski au départ de l'acide tétronique

La synthèse débute avec la protection de la fonction énol de l'acide tétronique sous forme d'un éther benzylique, puis se poursuit par la déprotonation en C5 par le *n*BuLi (schéma 23).

L'anion formé est condensé sur le 2-oxo-2-phénylacétate de méthyle pour former l'alcool **47**, lequel est ensuite déshydraté pour fournir le vulpinate **48**. A noter lors de cette étape la formation d'un mélange d'isomères *E/Z* dans un ratio de 90/10. Une iodation en présence d'iode et de nitrate de cérium ammonium (CAN) en position 3 suivie d'un couplage de Suzuki permet de fournir le vulpinate **50** avec un rendement de 55 à 93 %, accompagné du produit déprotégé **51** (0-31 %). L'hydrogénation catalytique du mélange permet finalement d'aboutir aux acides vulpiniques **51**.

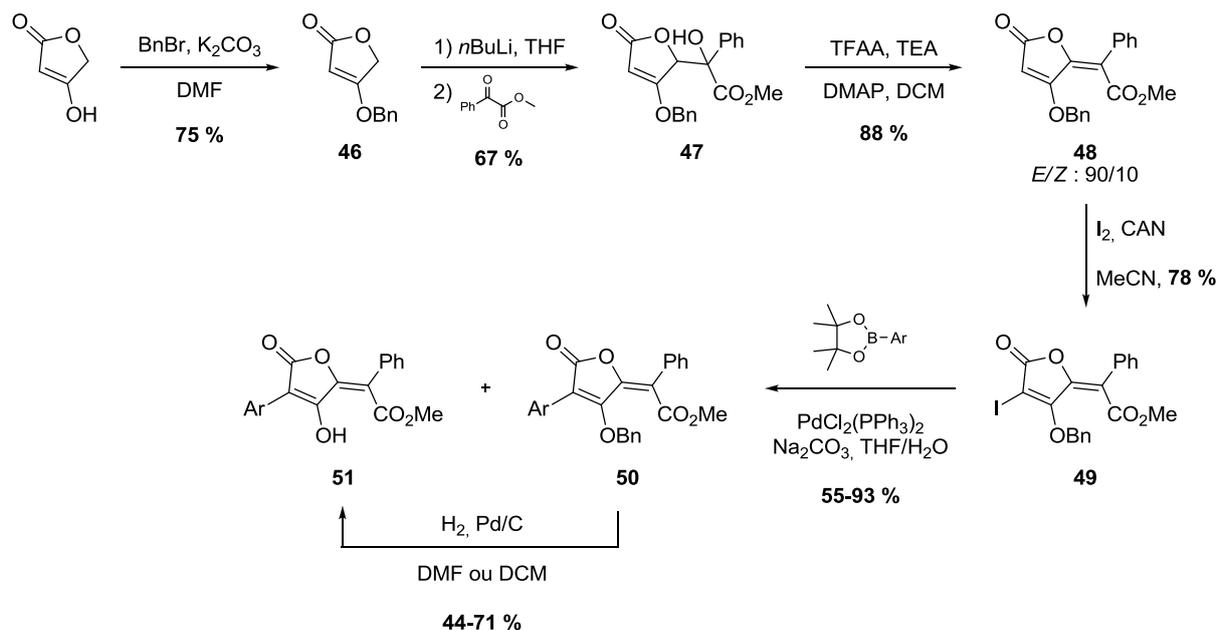


Schéma 23 : synthèse d'acides vulpiniques au départ de l'acide tétronique

Cette méthode est très intéressante car elle permet d'introduire efficacement de nombreux groupements en position 3 et 6. En 2008 Le Gall *et al.* ont publié une méthode de synthèse en une seule étape d'acides tétroniques fonctionnalisés en C3, à partir de dérivés d'acétates de méthyle et de glycolate d'éthyle en présence de *tert*-butoxyde de potassium (schéma 24). Ainsi l'acide tétronique **52** a été synthétisé avec un rendement de 72 %.³⁰⁻³¹ Cette méthode est plus intéressante que la voie de synthèse d'acides tétroniques de Pattenden par réduction de l'anhydride maléique car plus facile à mettre en œuvre et possédant de meilleurs rendements. La méthode de synthèse a alors été adaptée à ces nouveaux substrats afin d'introduire la fonctionnalité en C6.

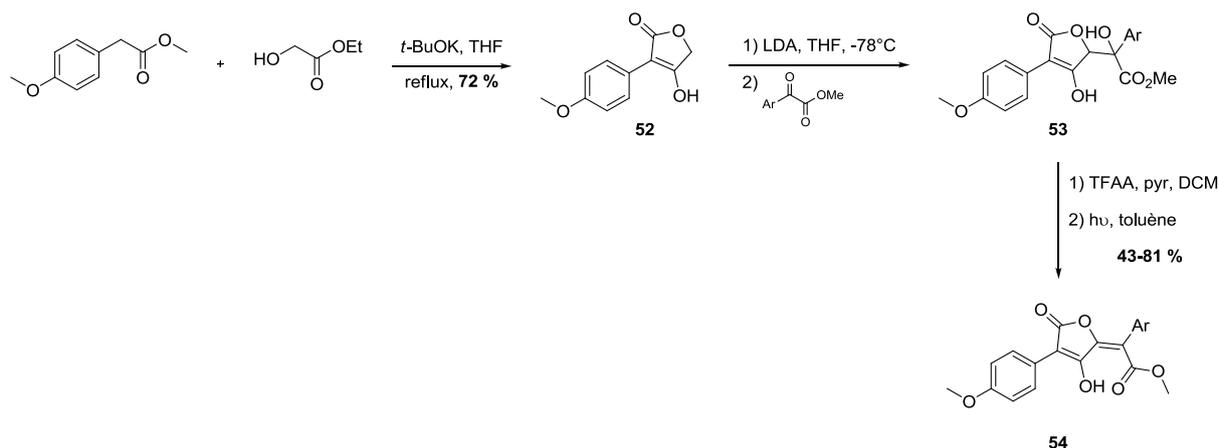


Schéma 24 : synthèse en one-pot d'acides 3-aryltétroniques et application à la synthèse d'acides vulpiniques

Cette seconde méthode présente l'avantage sur la précédente d'introduire le groupe en C3 en une seule étape, contre deux étapes lorsque l'on part de l'acide tétronique **48**, et avec de meilleurs rendements.

Enfin, toujours à partir d'acides tétriques, Nadal et Le Gall ont mis au point une voie de synthèse au départ du L-tartrate de diméthyle (schéma 25).³² L'acylation de ce dernier par un équivalent d'acide 2-arylacétique a fourni l'intermédiaire **55**, lequel est ensuite cyclisé en présence de LiHMDS pour fournir l'acide tétronique **56**. Une étape de déshydratation est enfin réalisée dans des conditions usuelles pour fournir l'acide vulpinique **57** sous forme d'un mélange d'isomères *Z/E*, allant jusqu'à 25 % d'isomère *E*. Le groupe en C6 est ensuite introduit par iodation puis couplage de Suzuki.

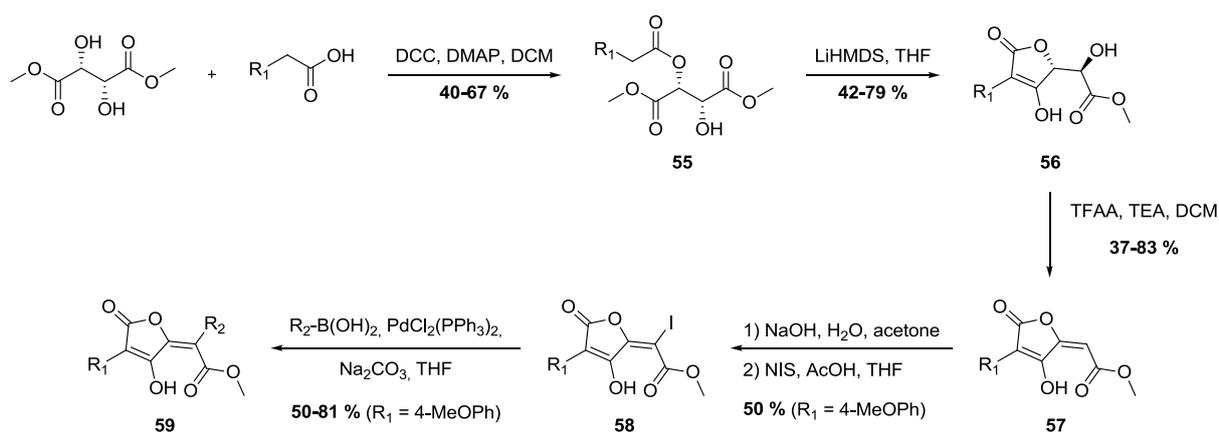


Schéma 25 : synthèse d'acides vulpiniques par Nadal et Le Gall

II. 3. Conclusions sur les voies de synthèse présentes dans la littérature

Depuis leur découverte, les acides pulviniques ont été largement étudiés et de nombreuses voies de synthèse ont vu le jour. Le tableau 3 suivant récapitule les différentes voies présentées, les stratégies correspondantes, et les avantages et inconvénients de chacune. A l'exception de la méthode de Volhard et de la stratégie employant des acétals de cétène silylés, ces voies de synthèse permettent toutes d'accéder à des acides pulviniques symétriques et dissymétriques, ces stratégies ayant en général des étapes difficiles à mettre en œuvre et/ou ayant de faibles rendements. Les méthodes récentes à partir d'un acide tétronique étudiées au CEA de Saclay par Mioskowski et Le Gall semblent cependant intéressantes car elles permettent de dériver aisément les groupes en C3 et C6, et ce avec un nombre d'étapes limité. Nous allons dans la suite de ce chapitre présenter les précédents travaux réalisés au laboratoire sur la synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques.

Tableau 3 : récapitulatif des différentes voies de synthèse présentées

méthode	stratégie	avantages	inconvénients
Volhard ⁵ Asano ⁷ Akermark ⁸	- fonctionnalisation en C3 et C6 - cyclisation	- peu d'étapes - bons rendements	- après ouverture de la bis-lactone, deux isomères difficiles à séparer
dioxolanone ¹⁰		- bons rendements	- utilisation d'esters <i>tert</i> -butyliques - synthèse de l'ylure de phosphonium
acétals de cétène silylés ¹¹		- peu d'étapes - bons rendements	- acides pulviniques symétriques uniquement
Dieckmann ¹²		- peu d'étapes	- faibles rendements
Langer ¹³⁻¹⁷	- fonctionnalisation en C6 - cyclisation - fonctionnalisation en C3	- dérivatisation en C3 aisée et deux étapes avant la fin de la synthèse ^a	- nombre d'étapes - rendements moyens - intermédiaires instables
réduction anhydride maléique ²¹⁻²⁵	- cycle déjà formé - groupe en C3 présent au départ - fonctionnalisation en C6	- nombre d'étapes - dérivatisation en C6 aisée	- faibles rendements - trois étapes après introduction du groupe en C6 ^a
Reformatsky sur anhydride maléique ²⁶⁻²⁷		- nombre d'étapes	- faibles rendements - quatre étapes après introduction du groupe en C6 ^a
Horner-Wadsworth-Emmons ²⁸		- nombre d'étapes	- rendements moyens - trois étapes après introduction du groupe en C6 ^a
à partir de l'acide tétronique ²⁹	- cycle déjà formé - fonctionnalisation en C6 - fonctionnalisation en C3	- modulation en C6 puis en C3 aisées - bons rendements	- nombre d'étapes - rendements des deux dernières étapes
à partir d'un acide 3-aryltétronique ³⁰⁻³¹	- fonctionnalisation en C3 et cyclisation en une étape - fonctionnalisation en C6	- dérivatisation aisée en C6 - nombre d'étapes - bons rendements	- trois étapes après introduction du groupe en C6 ^a

^a : nombre d'étapes nécessaires pour aboutir à l'acide pulvinique correspondant

II. 4. Voies de synthèse étudiées au laboratoire pour la synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques

Les méthodes présentées précédemment n'ont été appliquées qu'à la synthèse d'acides pulviniques di-aromatiques, les dérivés mono-aromatiques étant alors inconnus. Au cours de ses travaux de thèse, Damien Habrant a étudié la synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques possédant un méthyle en C6. Parmi les voies étudiées, deux méthodes dérivées de la littérature se sont avérées intéressantes, la première faisant intervenir une réaction de Reformatsky sur un anhydride maléique, la seconde faisant intervenir un acide tétronique.

II. 4. i. Passage par une réaction de Reformatsky

Inspiré par les travaux de Pattenden, une réaction de type Reformatsky a été réalisée sur l'anhydride maléique **60** en présence de propionate de méthyle et de $ZnCl_2$ (schéma 26).^{33, 34} L'alcool **61** obtenu est ensuite déshydraté, puis la position 3 du cycle buténolide de **62** est iodée en présence d'iode et de CAN pour fournir l'intermédiaire iodé **63**. Un couplage de Suzuki est ensuite réalisé à partir d'acides arylboroniques et en présence d'un catalyseur supporté sur une résine développé au laboratoire pour fournir les vulpinates correspondants **64** dans des rendements allant de 58 % à 92 %. La déprotection de l'énol est ensuite réalisée en présence de tribromure de bore pour fournir les acides vulpiniques **65** correspondants en présence d'une faible proportion d'acide pulvinique **66**.

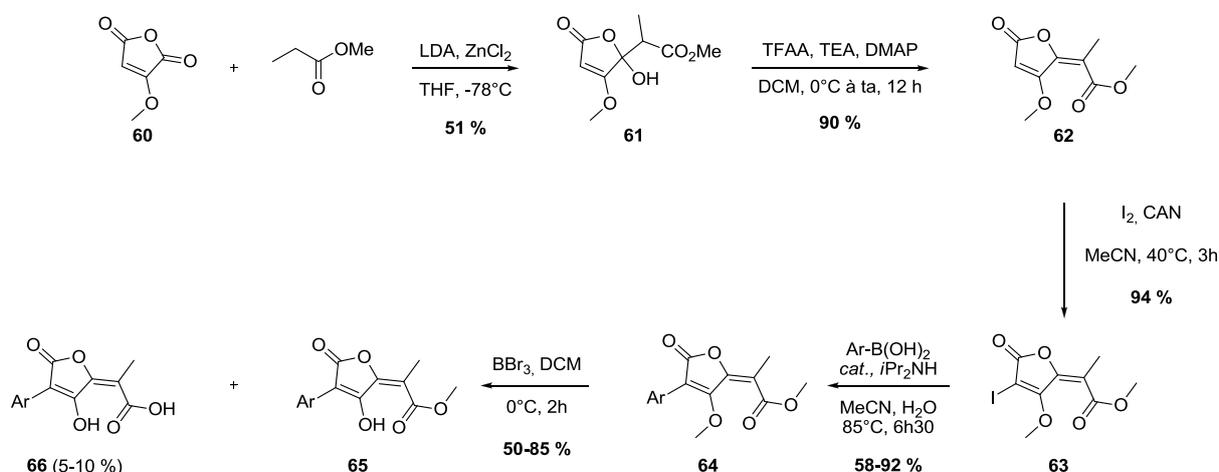


Schéma 26 : synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques par une réaction de Reformatsky

Lorsque le groupe aryle en C3 est un groupe *para*-méthoxyphényle (composé **67**), nous observons une bonne sélectivité lors de l'étape de déprotection au tribromure de bore. Celle-ci peut s'expliquer par une chélation de l'atome de bore entre l'énol et la fonction ester voisine (schéma 27), permettant ainsi de déméthyle cet énol sélectivement, laissant intact le méthoxy porté par le cycle aromatique.

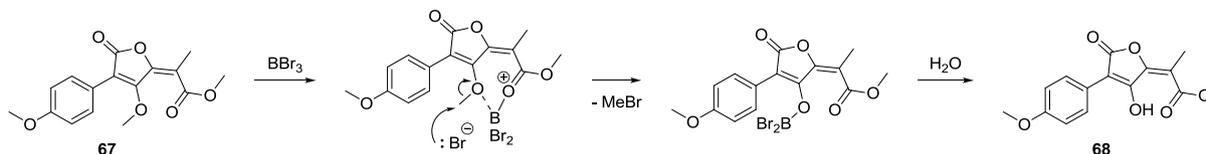


Schéma 27 : proposition de mécanisme pour la déprotection régiosélective de **67**

II. 4. ii. Passage par un acide tétronique

La stratégie développée ici s'inspire de la méthode de synthèse d'acides pulviniques di-aromatiques mise au point par Le Gall au CEA de Saclay.²⁹ Pour cela l'acide tétronique **52** a été préparé dans les mêmes conditions, puis après protection de l'énol puis déprotonation en présence de LDA, l'anion ainsi créé a été condensé sur le pyruvate de méthyle pour fournir l'alcool **69** (schéma 28). Celui-ci est ensuite déshydraté en présence de TFAA, de triéthylamine et de DMAP catalytique, pour aboutir au vulpinate **67** sous forme d'un mélange de deux isomères *E* et *Z* dans un ratio $E/Z = 70/30$, avec un excellent rendement de 88% sur les deux étapes. Une déprotection de l'énol est ensuite réalisée en présence de tribromure de bore pour fournir l'acide vulpinique **68** avec un rendement de 65% et sous forme d'un unique isomère *E*. L'acide pulvinique **70** est ensuite obtenu après reflux dans une solution aqueuse de soude à 0.5 M avec un rendement quantitatif. Cet acide est ensuite déshydraté pour aboutir à la bis-lactone **71** avec un rendement de cyclisation de 94 %.

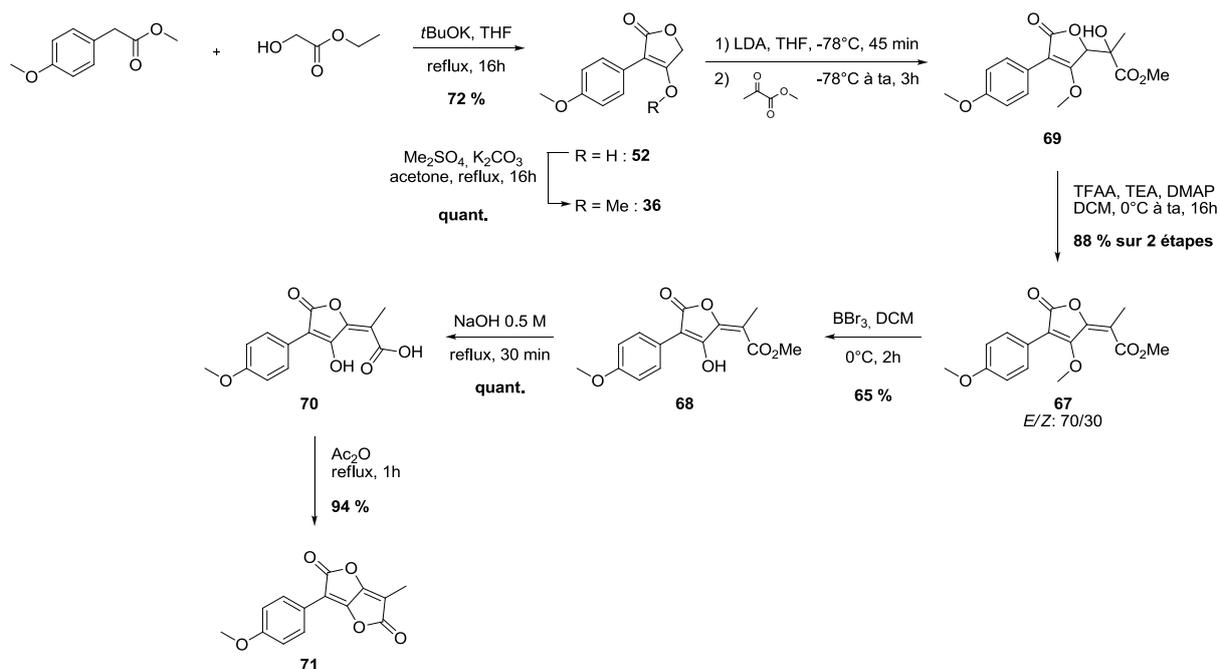


Schéma 28 : synthèse de la bis-lactone **71** par une méthode passant par un acide tétronique

Cette nouvelle voie de synthèse s'est avérée plus efficace que la précédente car elle a permis d'obtenir la bis-lactone **71** avec d'excellents rendements (39 % sur 7 étapes à partir du 4-méthoxyphénylacétate de méthyle commercial). Cependant l'étape de déprotection sélective du méthoxy du cycle buténolide s'est avérée peu reproductible, et notamment à grande échelle où de faibles rendements (de l'ordre de 20 %) ont été obtenus.

II. 5. Conclusion sur la synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques

Au cours de ses travaux de thèse, Damien Habrant a étudié différentes méthodes de synthèses d'acides pulviniques et bis-lactones mono-aromatiques inspirées des travaux menés sur la synthèse d'acides pulviniques di-aromatiques présents dans la littérature. Il a ainsi mis au point deux méthodes de synthèse, la première basée sur une réaction de type Reformatsky sur un anhydride maléique, la seconde passant par un intermédiaire acide tétronique. La première souffre de faibles rendements, alors que la seconde voie s'avère plus intéressante puisqu'elle a permis de synthétiser la bis-lactone **71** en 7 étapes avec un rendement global de 39 % au départ du 4-méthoxyphénylacétate de méthyle commercial.

Cependant cette méthode devra être adaptée à une synthèse à l'échelle de plusieurs grammes en laboratoire, et notamment par optimisation de l'étape de déprotection. Par la suite, la réactivité de cette bis-lactone vis-à-vis de différents nucléophiles et notamment des amines a été étudiée.

III. Réactivité de la bis-lactone **71** avec des amines

Les bis-lactones sont des structures tendues qui peuvent facilement réagir avec divers nucléophiles et notamment des amines pour fournir des pulvinamides.³⁵⁻³⁹ Cette stratégie peut s'avérer intéressante pour introduire de la diversité ou une fonctionnalité spécifique. Mais si la réaction d'une bis-lactone symétrique avec une amine fournit un seul dérivé, l'ouverture d'une bis-lactone dissymétrique conduira quant à elle à un mélange d'isomères (figure 34).

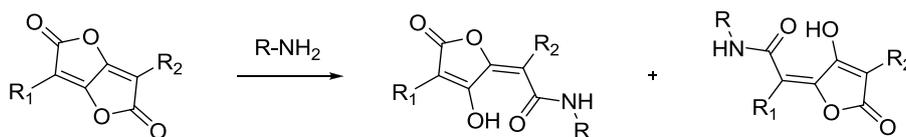


Figure 34 : ouverture d'une bis-lactone dissymétrique par une amine

Lorsque la bis-lactone **71** est mise en réaction avec diverses amines, un mélange d'isomères est toujours récupéré, et malgré l'encombrement plus important de la lactone portant le cycle aromatique, le ratio des deux dérivés est souvent proche de 50/50. Heureusement, si les deux régio-isomères issus de l'ouverture d'une bis-lactone dissymétrique di-aromatique (R_1 et $R_2 = \text{Ar}$) sont très proches structurellement et donc difficilement séparables par chromatographie sur gel de silice, l'utilisation de **71** ($R_1 = \text{Ar}$, $R_2 = \text{Me}$) conduit à deux régio-isomères très facilement séparables par chromatographie sur gel de silice.

De manière à effectuer cette ouverture de manière régiosélective, plusieurs conditions et additifs ont été employés. Ainsi, il est ressorti que l'addition de 2 équivalents de fluorure de *n*-tétrabutylammonium à -35°C suivi de l'ajout de dibutylamine à -78°C a conduit à la formation des deux pulvinamides **72** et **73** dans un ratio de 98/2 (schéma 29).⁴⁰

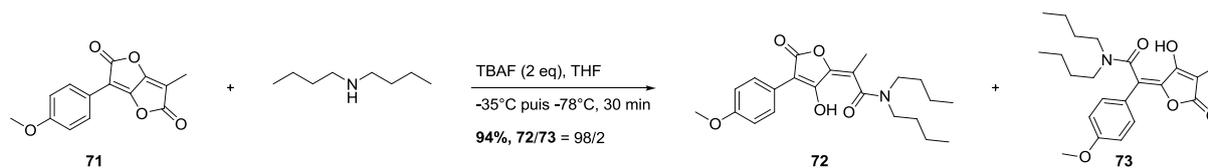


Schéma 29 : conditions optimisées pour l'ouverture régiosélective de la bis-lactone **71**

Les deux isomères obtenus se différencient facilement grâce à leur spectre RMN ^1H . En effet, le proton aromatique en méta du méthoxy sera très déblindé sur **72**, tandis qu'il sera moins déblindé sur **73** (figure 35). Cette caractéristique permet de différencier les isomères obtenus et également de déterminer rapidement le ratio directement par analyse en RMN ^1H du brut réactionnel.

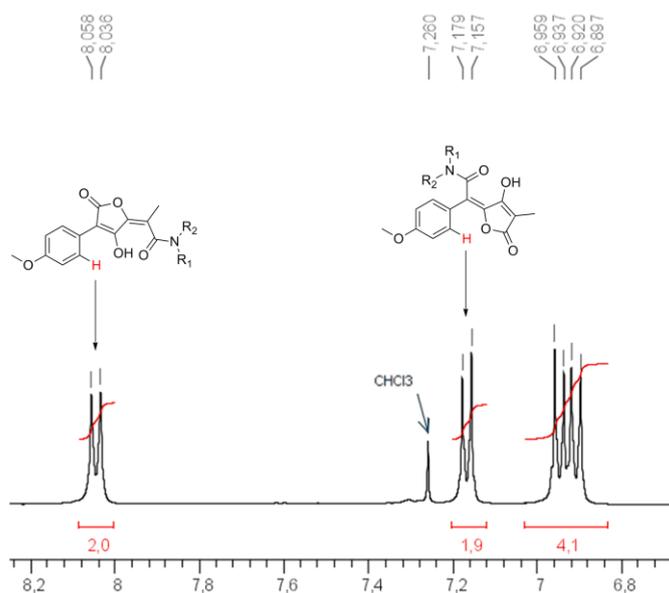
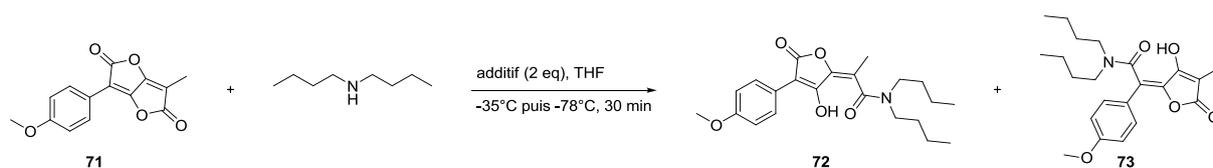


Figure 35 : différence des déplacements chimiques des protons aromatiques des pulvinamides **72** et **73**

Afin de mieux comprendre le mécanisme, divers réactifs ont été employés pour voir l'influence du cation et de l'anion sur la régiosélectivité de l'ouverture. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : influence de différents additifs sur l'ouverture de **71** par la dibutylamine

entrée	additif	ratio 72/73 ^a
1	$n\text{Bu}_4\text{N}^+$, F^-	98/2
2	$n\text{Bu}_4\text{N}^+$, Cl^-	76/24
3	$n\text{Bu}_4\text{N}^+$, CN^-	75/25
4	$n\text{Bu}_4\text{N}^+$, I^-	70/30
5	$n\text{Me}_4\text{N}^+$, F^-	68/32
6	KF	68/32
7	CsF	64/36

a : ratio déterminé par RMN ^1H sur le brut réactionnel

D'après cette étude, il apparaît que la combinaison du cation $n\text{Bu}_4^+$ et de l'anion fluorure est nécessaire pour obtenir une régio-sélectivité quasi-totale. Ainsi lorsque nous changeons la nature de l'anion la sélectivité diminue, et ce au fur et à mesure que la taille de l'anion augmente (entrées 1 à 4). De même lorsque nous changeons la nature du cation nous observons également une baisse de la sélectivité. Celle-ci diminue lorsque le cation devient plus petit (entrées 1 et 5 à 7). Nous avons pensé que le mécanisme de la réaction pourrait passer d'abord par un intermédiaire fluorure d'acyle. Afin de tenter de vérifier cela nous avons effectué des analyses par RMN du fluor 19. Deux équivalents d'une solution de TBAF à 2M dans du THF ont alors été ajoutés à une suspension de **71** dans du THF- d_8 refroidie à -35°C , puis analysée dans un spectromètre Brücker 200 MHz. Malheureusement, nous n'avons pas pu observer d'intermédiaire de type fluorure d'acyle, mais uniquement le signal du TBAF de départ. Cette observation n'infirme pas notre hypothèse car il est possible qu'il existe dans le milieu un équilibre entre une forme ouverte fluorure d'acyle et la forme fermée **71** (schéma 30), dont les cinétiques seraient trop rapides pour pouvoir être observées avec le spectromètre utilisé.

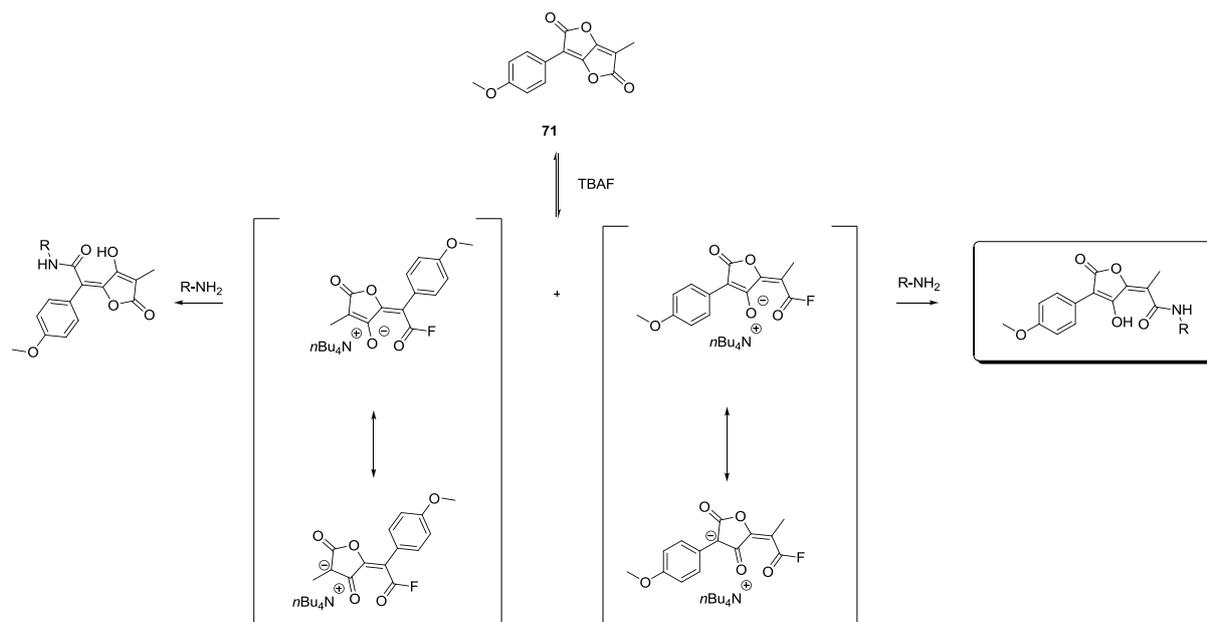


Schéma 30 : proposition de mécanisme pour l'ouverture régiosélective de **71** par TBAF

Cette ouverture régiosélective de la bis-lactone **71** est un outil qui va désormais nous servir pour la synthèse de dérivés hydrophiles d'acides pulviques par introduction d'amines portant divers groupes solubilisants. Nous allons à présent aborder les résultats obtenus sur l'optimisation de la synthèse de la bis-lactone **71**.

IV. Optimisation de la synthèse de la bis-lactone **71**

Au cours de ses travaux de thèse, Damien Habrant a mis au point une méthode de synthèse d'acides pulviques mono-aromatiques à partir d'un acide tétronique. Cependant cette méthode comporte une étape limitante, à savoir la déprotection de l'énol du cycle furanone. En effet, la déprotection du méthoxy en présence de tribromure de bore ne donne pas des rendements reproductibles, limitant son utilisation à plus grande échelle. Suite à ces précédents travaux, nous avons alors étudié de nouvelles voies de synthèse adaptées de celles existant dans la littérature. Nous avons également cherché à optimiser l'étape de déprotection sélective de l'énol.

IV. 1. Etude de nouvelles voies de synthèse

IV. 1. i. A partir d'une 1,2-dilactone

La première voie de synthèse étudiée est adaptée des travaux d'Akermark sur la synthèse de bis-lactones dissymétriques di-aromatiques. Ainsi **71** résulterait de l'hydrolyse et de la cyclisation de **74** (schéma 31), lequel serait obtenu par condensations séquentielles du 4-méthoxyphénylacétonitrile sur l'oxalate de diéthyle dans un premier temps, puis du propionitrile dans un second temps.

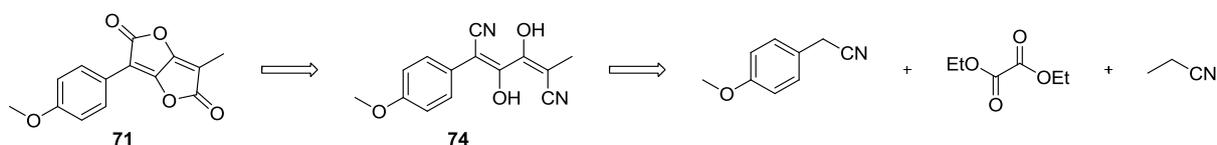


Schéma 31 : rétrosynthèse envisagée de **71** selon les travaux d'Akermark

La condensation du 4-méthoxyphénylacétonitrile sur l'oxalate de diéthyle a été réalisée d'après les conditions décrites par Compton.⁴¹ Le 4-méthoxyphénylacétonitrile a ainsi été porté à reflux en présence de 1.1 équivalents d'oxalate de diéthyle et de NaH dans le THF pendant 24h et le composé **75** a pu être récupéré avec un rendement de 22 % (schéma 32). Afin d'améliorer ce dernier, nous avons augmenté la quantité d'oxalate de diéthyle, et en utilisant un large excès de réactif (10 équivalents) et après 5h de réaction le produit **75** a pu être isolé avec un rendement de 80 %.

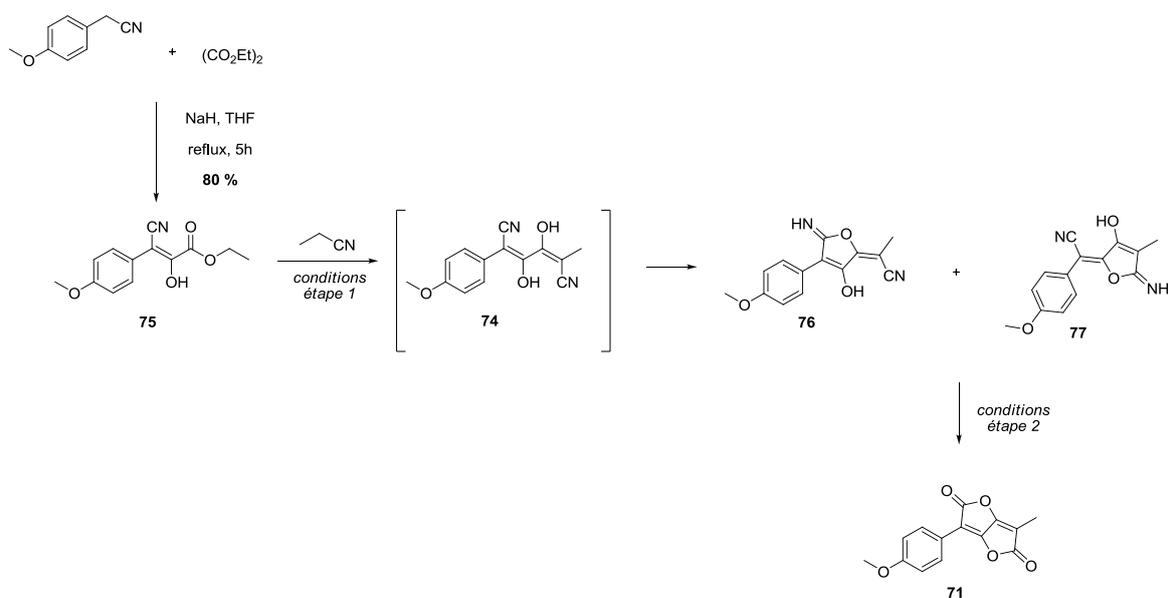


Schéma 32 : schéma de synthèse de **71** selon la voie d'Akermark

En nous inspirant des conditions décrites par Akermark pour l'introduction du second groupe, nous avons réalisé un premier essai en présence de NaH en chauffant **75** et le propionitrile à 55°C dans le THF, mais aucune conversion n'a été observée (tableau 5, entrée 1). Un essai en présence de LDA à -78°C dans le THF a permis d'isoler un mélange de deux composés, qui ont pu être isolés et identifiés comme étant les deux formes cyclisées attendues **76** et **77**, et ce avec un rendement en mélange **76/77** de 91% (entrée 2).

Tableau 5 : conditions de condensation et essais d'hydrolyse de **74**

étape	entrée	conditions	Rdt
1 condensation	1	NaH (3 eq), THF, 55°C, 2h	0 %
	2	LDA (2.5 eq), THF, -78°C, 30 min, puis 75 , -78°C, 5h	91 %
2 hydrolyse- cyclisation	3	H ₂ SO ₄ , H ₂ O, AcOH, reflux, 1h puis Ac ₂ O, reflux, 30 min	dégradation
	4	H ₂ SO ₄ , H ₂ O, AcOH, ta, 10 min puis Ac ₂ O, reflux, 30 min	
	5	NaOH 1M, DME/H ₂ O, reflux, 1h	

Comme dans le cas de dérivés di-aromatiques, le composé **74** est récupéré sous forme des deux isomères **76** et **77** résultant de la cyclisation entre une des fonctions énol et la fonction nitrile adjacente dans un ratio 53/47 déterminé par intégration des signaux en RMN ¹H. Ces deux isomères ont pu être séparés par chromatographie sur gel de silice et caractérisés. Chaque isomère présente par ailleurs des signaux caractéristiques en RMN ¹H, à savoir un signal très déblindé (vers 7.7 ppm) pour les protons aromatiques voisins du cycle buténolide sur **76**, et un signal moins déblindé (vers 7.1 ppm) pour le même proton aromatique sur **77** (figure 36).

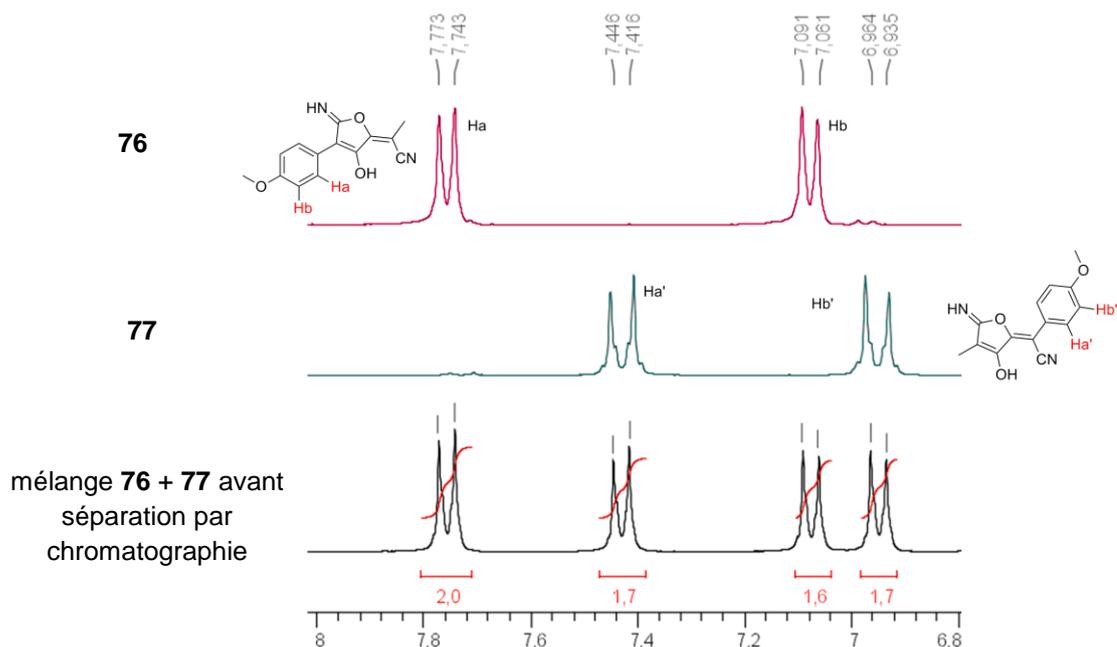


Figure 36 : déplacements chimiques en RMN ^1H des protons aromatiques de **76** et **77**

Le mélange d'isomères **76** et **77** a ensuite été engagé dans la réaction d'hydrolyse des fonctions nitriles. Pour cela, les conditions décrites dans la littérature ont été appliquées,⁵⁻⁸ à savoir le chauffage à reflux dans un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (tableau 5, entrée 3). Le brut réactionnel a ensuite été directement engagé dans la réaction de cyclisation dans l'anhydride acétique, mais aucun produit n'a été récupéré. Une analyse par RMN ^1H du brut réactionnel de la réaction d'hydrolyse indique une dégradation importante du produit de départ. Un nouvel essai a été réalisé à température ambiante, mais sans plus de succès, là encore une importante dégradation est observée (entrée 4). Le produit de départ semblant sensible à des conditions acides, un essai d'hydrolyse en milieu basique a été effectué, mais là aussi le produit de départ est très vite dégradé (entrée 5).

Malgré l'intérêt potentiel de cette voie de synthèse (seulement 3 étapes à partir de produits commerciaux), l'instabilité en conditions acides ou basiques du mélange des composés **76** et **77** ne nous a pas permis d'aboutir à la bis-lactone **71**. Nous nous sommes alors tournés vers une seconde voie de synthèse basée sur une réaction de Wittig.

IV. 1. ii. Utilisation d'une réaction de Wittig

En 1985, Campbell a décrit une synthèse de pulvinones⁴² basée sur une réaction de Wittig pour construire la double liaison exocyclique (schéma 33). Initialement employée avec

des aldéhydes aromatiques, cette stratégie pourrait être réalisée avec le pyruvate de méthyle pour conduire à la bis-lactone **71**.

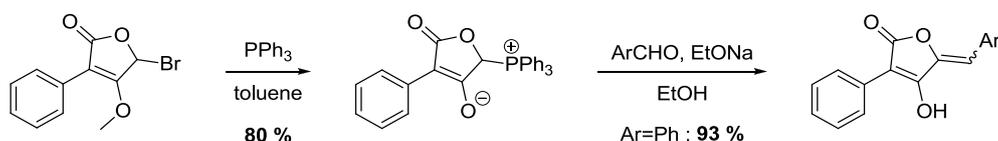


Schéma 33 : synthèse de pulvinones par l'intermédiaire d'une réaction de Wittig, selon Campbell

Cette méthode diffère de la stratégie de Pattenden²⁸ présentée précédemment (paragraphe II. 2. i.) dans la mesure où Campbell a employé ici un ylure de phosphonium à la place d'un phosphonate de diméthyle. L'intérêt de cet ylure de phosphonium réside dans le fait qu'il existe sous forme d'un zwitterion dans lequel la fonction énole du cycle buténolide est sous forme d'énolate. Celui-ci se forme lors de la synthèse de l'ylure par substitution d'un atome de brome par la triphénylphosphine. En effet, les ions bromure libérés vont réagir sur le méthyle porté par la fonction énole, permettant d'obtenir une structure stabilisée par la proximité des deux charges (schéma 34). Cette déméthylation a pour conséquence de nous affranchir d'une étape supplémentaire de déprotection de la fonction énole.

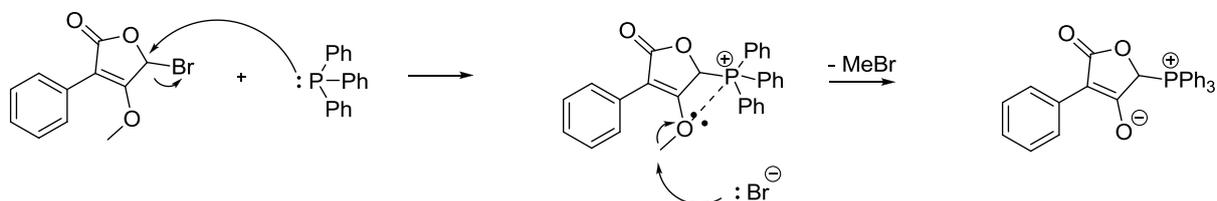


Schéma 34 : mécanisme supposé de la déméthylation observé lors de la formation de l'ylure de phosphonium

Nous avons donc dans un premier temps synthétisé l'ylure de phosphonium **79** en 3 étapes au départ de l'acide 3-(4-méthoxyphényl)tétronique **52**. Après protection de l'énol de l'acide tétronique sous forme d'éther méthylique, la position 5 du buténolide est bromée par action de *N*-bromosuccinimide (NBS) en présence d'une quantité catalytique d'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN, schéma 35) pour fournir **78** avec un rendement de 61 %.

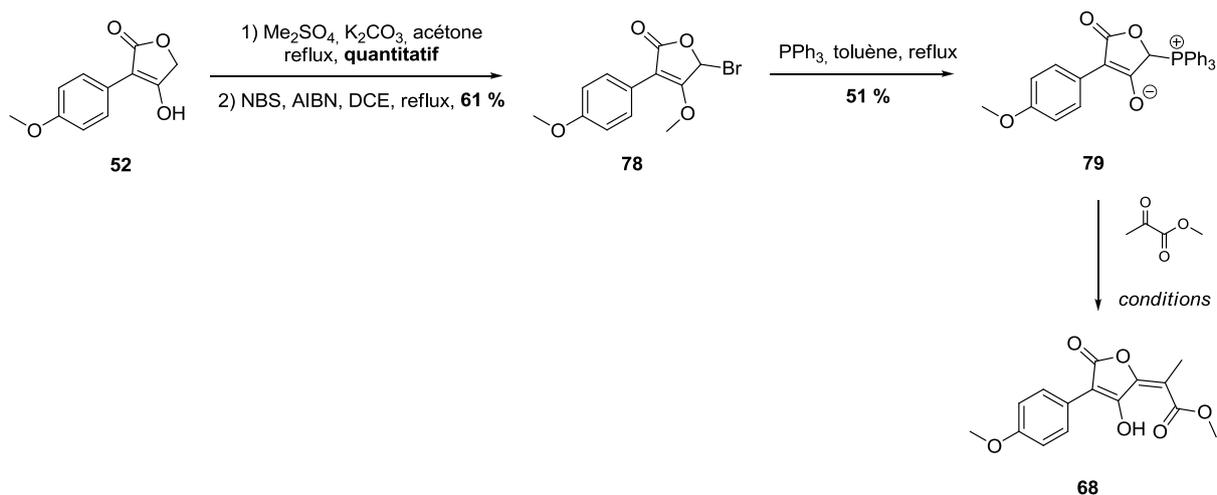
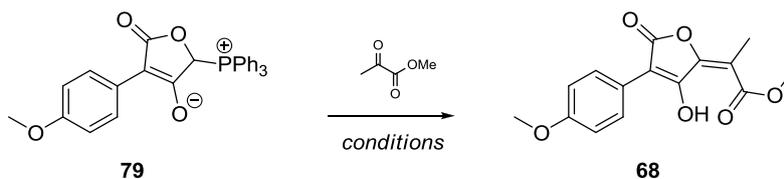


Schéma 35 : essais de synthèse de l'acide vulpinique **68** utilisant une réaction de Wittig

Le dérivé bromé a ensuite été engagé dans la substitution par la triphénylphosphine. Au cours de cette réaction, le sel de phosphonium peut prendre en masse, et former un précipité extrêmement compact, qui devient en conséquence difficile à triturer. Si cette prise en masse n'a pas toujours lieu, elle est très difficile à maîtriser, car même une agitation très vive ou un ajout de la triphénylphosphine en solution dans le toluène au goutte à goutte n'a pas d'influence sur ce phénomène. Dans le meilleur des cas, 51 % d'ylure de phosphonium **79** ont été récupérés.

Différents essais ont ensuite été réalisés pour la réaction de Wittig. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : essais réalisés pour la réaction de Wittig entre **79** et le pyruvate de méthyle

entrée	base (éq.)	éq. pyruvate de méthyle	conditions	Rdt
1	MeONa (1.1 éq.)	1.5	MeOH, ta, 24h	0 %
2	<i>n</i> BuLi (1.5 éq.)	1.5	THF, -20°C, 3h	38 %
3	<i>n</i> BuLi (1.5 éq.)	3	THF, -20°C, 3h	53 %
4	<i>n</i> BuLi (1.5 éq.)	3	THF, -20°C, 5h	39 %
5	<i>t</i> BuOK (1.1 éq.)	3	THF, -20°C, 1-5h	8 %

Un premier essai en présence de méthylate de sodium dans le méthanol n'a pas permis, après 24 h à température ambiante, d'observer le produit **68** (entrée 1). Un second essai en présence de *n*BuLi et avec 1.5 équivalents de pyruvate de méthyle dans du THF anhydre à -20°C a permis, après 3h de réaction, de récupérer 38 % de l'acide vulpinique **68** (entrée 2). Lorsque 3 équivalents de pyruvate de méthyle sont utilisés, le rendement passe à 53 % (entrée 3), mais une augmentation du temps de réaction ne permet pas de l'améliorer (entrée 4). Enfin le changement de base ne donne pas de meilleur résultat, puisque **68** est récupéré avec seulement 8 % de rendement lorsque le *tert*-butylate de potassium est employé (entrée 5).

Les conditions testées ne nous ont pas permis d'obtenir de rendement supérieur à 53 %. De plus les difficultés rencontrées lors des étapes de bromation et de formation de l'ylure de phosphonium ne sont pas compatibles avec une synthèse à grande échelle au laboratoire, aussi cette voie de synthèse a été abandonnée.

Ces deux méthodes n'ayant pas fourni de résultats satisfaisants, nous nous sommes alors tournés vers une optimisation de la voie de synthèse abordée par Damien Habrant à la fin de ses travaux de thèse.

IV. 2. Optimisation de la voie utilisant un acide tétronique

Comme nous l'avons présenté dans le paragraphe II. 4. ii., l'étape limitante dans la voie de synthèse utilisant un acide tétronique est l'étape de déprotection par BBr_3 , laquelle est peu reproductible et donne de moins bons résultats lorsqu'elle est réalisée à grande échelle. Le mécanisme de cette déprotection passe par la chélation de l'atome de bore entre les fonctions ester et méthoxy voisine, permettant ainsi de différencier les deux fonctions méthoxy présentes sur la molécule et donc d'avoir une déprotection sélective. Nous avons donc cherché un réactif fonctionnant par le même mécanisme mais permettant d'obtenir un intermédiaire chélate plus stable (figure 37).

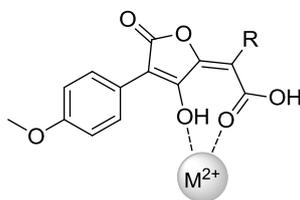
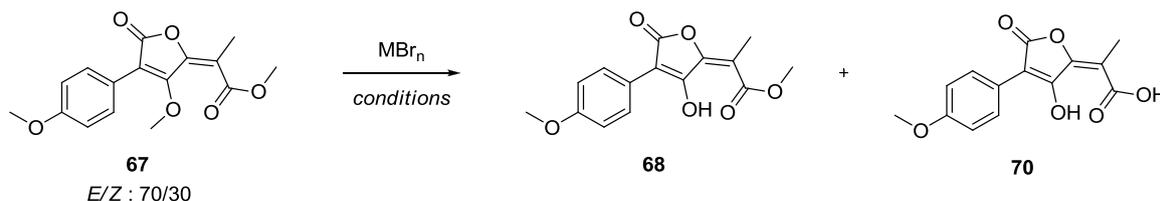


Figure 37 : complexation potentielle d'un ion alcalino-terreux avec un acide pulvinique simple

Les acides pulviniques ayant de bonnes affinités avec les métaux alcalins et alcalino-terreux, nous avons dans un premier temps réalisé des essais en présence de bromure de magnésium et de bromure de sodium (tableau 7) :

Tableau 7 : essais de déprotection de **67** par MgBr₂ et NaBr

entrée	MBr _n	conditions	Rdt/observations
1	MgBr ₂	MeCN, reflux, 3h	peu de conversion, acide 70 observé
2	MgBr ₂	DMF, 100°C, 3h	pas de réaction
3	MgBr ₂	DMF, 120°C, 3h	conversion rapide, acide 70 récupéré, 78 %
4	NaBr	DMF, 120°C, 3h	pas de réaction

Un premier essai à reflux dans l'acétonitrile a fourni un résultat surprenant. Malgré une conversion très lente, le produit formé n'est pas l'acide vulpinique **68** attendu, mais l'acide pulvinique **70** (entrée 1). Cette seconde déméthylation peut s'expliquer par le fait que nous formons bien la pince attendue (figure 37), et que cette pince, en plus d'activer le méthoxy du buténolide, active également l'ester, rendant ainsi possible une attaque d'un second ion bromure sur cette position (schéma 36). Afin d'optimiser la réaction, nous avons réalisé un essai dans le DMF à 100°C, mais aucune conversion n'a eu lieu après 3h de réaction (entrée 2), en revanche lorsque nous chauffons à 120°C une conversion complète a lieu, et l'acide pulvinique **70** est récupéré avec un rendement de 78 % (entrée 3). De plus nous récupérons exclusivement l'isomère *E* alors que nous partions d'un mélange d'isomères *Z* et *E*, montrant que l'isomérisation se produit également dans ces conditions. De plus cet essai nous montre que la température a une influence sur la réaction. Afin de vérifier que la réaction a bien lieu grâce à un effet de complexation entre l'acide pulvinique et le magnésium, un essai a été réalisé en présence d'un contre-ion alcalin, mais aucune réaction n'a lieu (entrée 4).

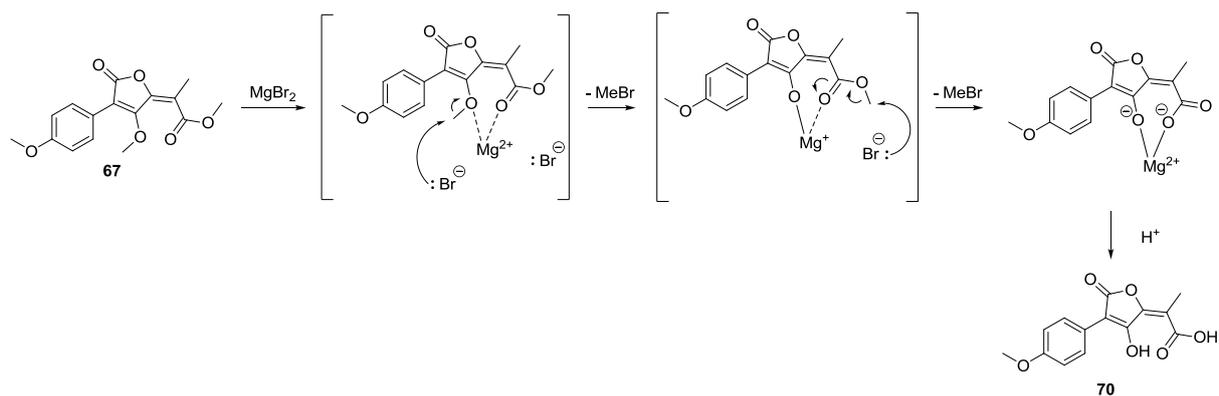


Schéma 36 : mécanisme supposé de formation de **70** à partir de **67** en présence de $MgBr_2$

Ce résultat est très intéressant car il nous permet de réduire la voie de synthèse d'une étape, le rendement global de la synthèse étant alors de 46 %. De plus cette méthode présente le grand avantage d'être très reproductible et adaptable à une synthèse à grande échelle. Nous avons ainsi pu préparer 10 g de bis-lactone **71** au laboratoire. Nous rappelons dans le schéma 37 ci-dessous la voie de synthèse après optimisation des conditions :

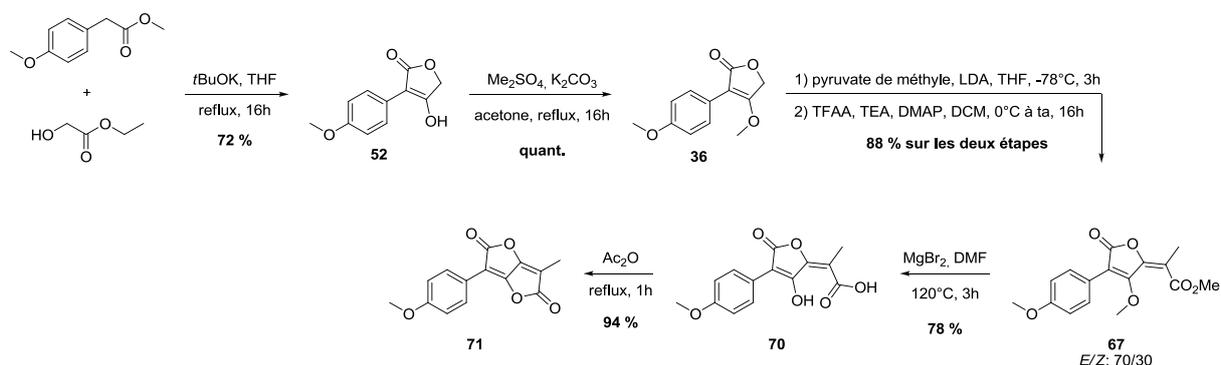


Schéma 37 : voie de synthèse de la bis-lactone **71** après optimisation

Maintenant que nous disposons d'une voie de synthèse permettant de synthétiser aisément des quantités importantes de bis-lactone **71**, nous allons nous intéresser à l'introduction de groupements hydrophiles par ouverture sélective en présence de TBAF.

V. Synthèse de pulvinamides

Nous allons à présent exploiter la réaction d'ouverture régiosélective de la bis-lactone **71** par différentes amines pour la synthèse de deux familles de composés. La première sera constituée de pulvinamides dans lesquels nous aurons introduit des amines dans le but d'augmenter la solubilité aqueuse. La seconde famille de composés sera constituée de dérivés issus de la réaction de **71** avec des amines portant un motif antioxydant, dans le but d'obtenir des composés hybrides.

V. 1. Synthèse de dérivés hydrophiles

La stratégie pour obtenir des dérivés hydrophiles d'acides pulviniques est d'ouvrir la bis-lactone **71** par diverses amines portant des groupements solubilisants de natures diverses : amines, alcools, éthers, acides carboxyliques, sucres... Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'insertion de poly-amines. Un premier essai en présence d'éthylènediamine a ainsi été réalisé (schéma 38).

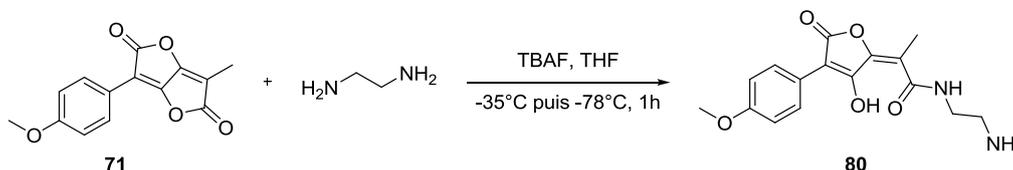


Schéma 38 : synthèse d'un premier pulvinamide hydrophile **80**

Si le produit attendu s'est bien formé, des problèmes de purification sont apparus. En effet, la molécule **80** est très polaire, et sa séparation des ions *n*-tétrabutylammonium devient difficile. En effet, une quantité importante de ce cation est retrouvée en RMN ¹H. Pour contourner ce problème, deux possibilités s'offrent à nous :

- la première est d'effectuer la réaction sans TBAF, impliquant ainsi une importante baisse du rendement,
- la seconde est de bloquer la basicité des autres fonctions amines, par protection sous forme d'un Boc par exemple.

Ces deux méthodes seront utilisées au cas par cas. Lorsque cela sera possible, une protection préalable par un Boc sera réalisée, mais lorsque cette protection deviendra

complexe (comme dans le cas de polyamines), nous préférons alors une réaction sur la bis-lactone sans additif.

De cette manière, le composé **82** a donc pu être obtenu par réaction de la N-Boc-éthylènediamine **81** sur la bis-lactone **71** en présence de TBAF avec un rendement de 96 % (schéma 39). Le composé obtenu nous a permis d'effectuer des lavages par une solution aqueuse de HCl à 1M pour éliminer le TBAF suivies d'une purification par chromatographie sur gel de silice. Une déprotection en présence de TFA a par la suite fourni le composé **80** sous forme de sel de trifluoroacétate, avec un rendement de déprotection quantitatif.

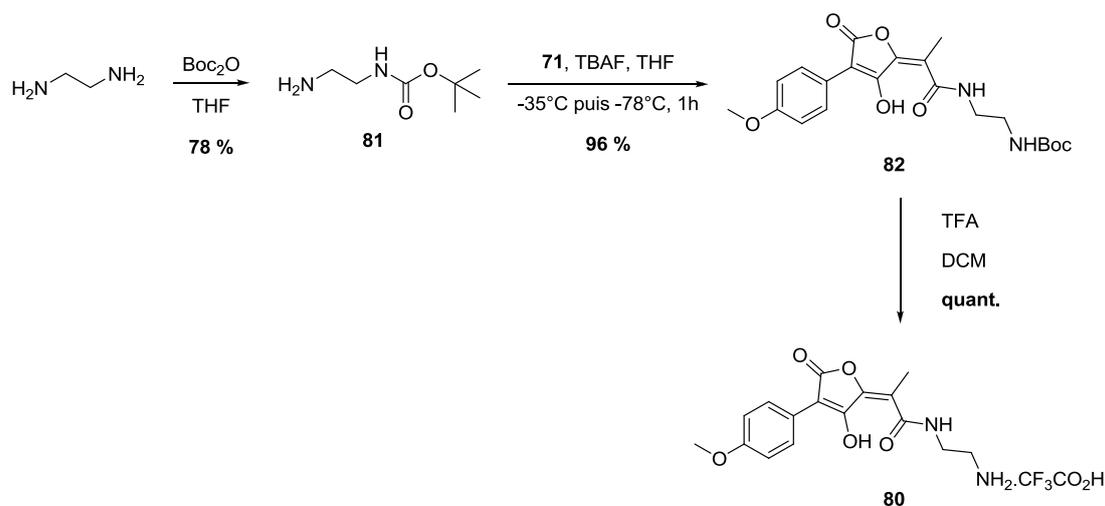
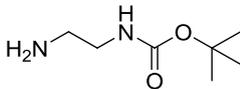
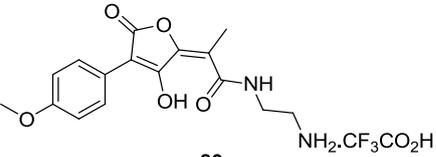
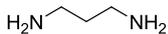
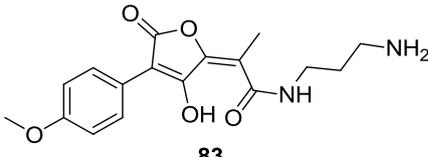
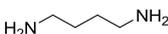
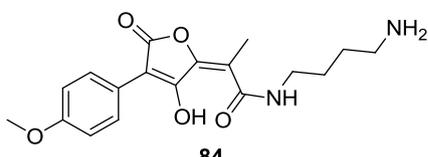
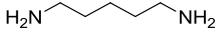
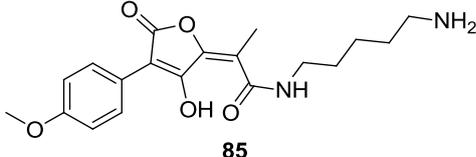
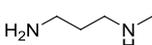
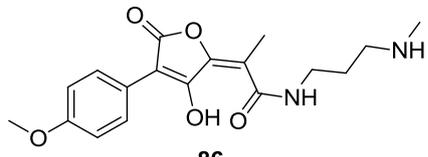
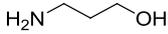
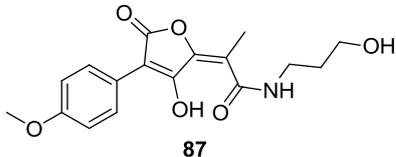
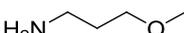
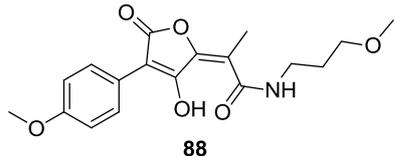
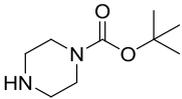
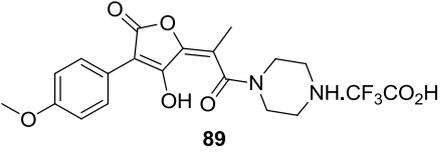
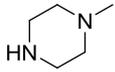
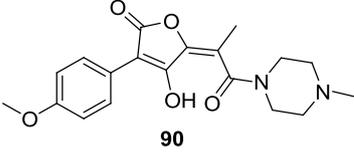
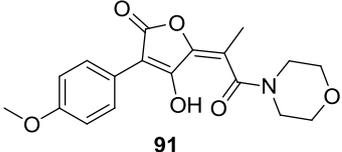
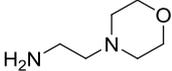
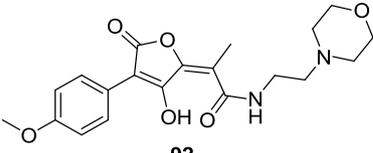
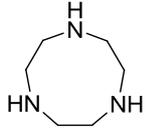
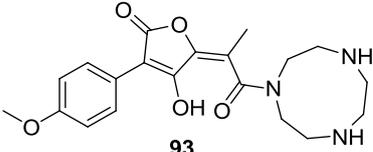
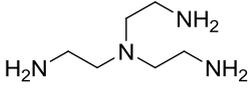
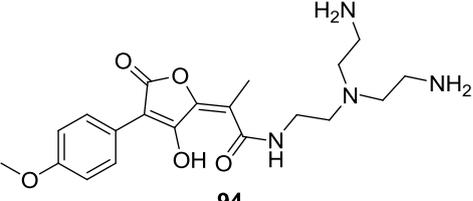
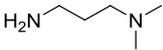
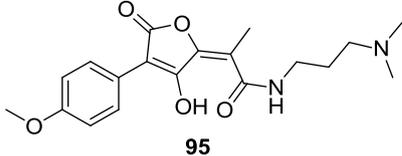


Schéma 39 : synthèse de **80** par l'intermédiaire d'une amine protégée

Le tableau 8 présente les différents essais qui ont été réalisés à partir de la bis-lactone **71**, ainsi que les méthodes utilisées : utilisation de TBAF avec une amine ne possédant pas de groupe protecteur (méthode A), utilisation de TBAF avec une amine possédant un groupe protecteur suivi d'une étape de déprotection (méthode B), réaction de la bis-lactone **71** avec une amine sans ajout d'additif (méthode C).

Tableau 8 : différents pulvinamides mono-aromatiques hydrophiles synthétisés à partir de 71

entrée	amine	méthode ^a	produit	Rdt
1	 81	B	 80	93 % ^b
2		C	 83	42 %
3		C	 84	8 %
4		C	 85	37 %
5		C	 86	0 %
6		A	 87	42 %
7		A	 88	63 %

8		B		95 % ^b
9		C		36 %
10		A		96 %
11		A		82 %
12		C		0 %
13		C		0 %
14		C		35 %

a) **méthode A** : TBAF (2 eq), THF, -35°C puis **71**, -78°C ; **méthode B** : 1) TBAF (2 eq), THF, -35°C puis **71**, -78°C ; 2) TFA, DCM, ta ; **méthode C** : **71**, DCM, ta ; b) rendement après déprotection

Nous avons tout d'abord introduit des diamines possédant différentes longueurs de chaîne, entre deux et cinq méthylènes (entrées 1 à 4). Ensuite nous avons voulu faire varier

les différentes fonctions à longueur de chaîne constante. Ainsi avec une chaîne de trois méthylènes nous avons voulu introduire, en plus d'une amine primaire (entrée 2), un groupe *N*-méthylamine, un alcool, un éther méthylique et une diméthylamine (entrées 5, 6, 7 et 14). Seul le composé **86** n'a pas pu être obtenu. En effet les deux isomères résultant de l'ouverture de **71** par la fonction amine primaire et amine secondaire ont été obtenus mais n'ont pas pu être séparés par chromatographie sur gel de silice. Enfin nous avons introduit différentes amines possédant une chaîne de deux méthylènes différemment fonctionnalisées. Deux pipérazines, méthylées ou non, ainsi qu'une morpholine ont été introduites (entrées 8 à 10), ainsi que la *N*-(2-aminoéthyl)morpholine (entrée 11). Enfin nous avons tenté d'introduire des triamines, mais la présence de produits résultant d'ouvertures successives ne nous a pas permis de purifier les composés attendus (entrées 12 et 13).

Nous avons également voulu utiliser un motif glucose comme groupement solubilisant. Pour cela, nous avons synthétisé l'amine **98** en adaptant les travaux de Hayes (schéma 40).⁴³ Une réaction de glycosylation entre le β -D-glucose pentaacétate et le 2-bromoéthanol fournit le dérivé bromé **96** avec un rendement de 51 %. Une substitution de l'atome de brome par de l'azoture de sodium dans le DMF permet d'obtenir le dérivé azoturé **97**.

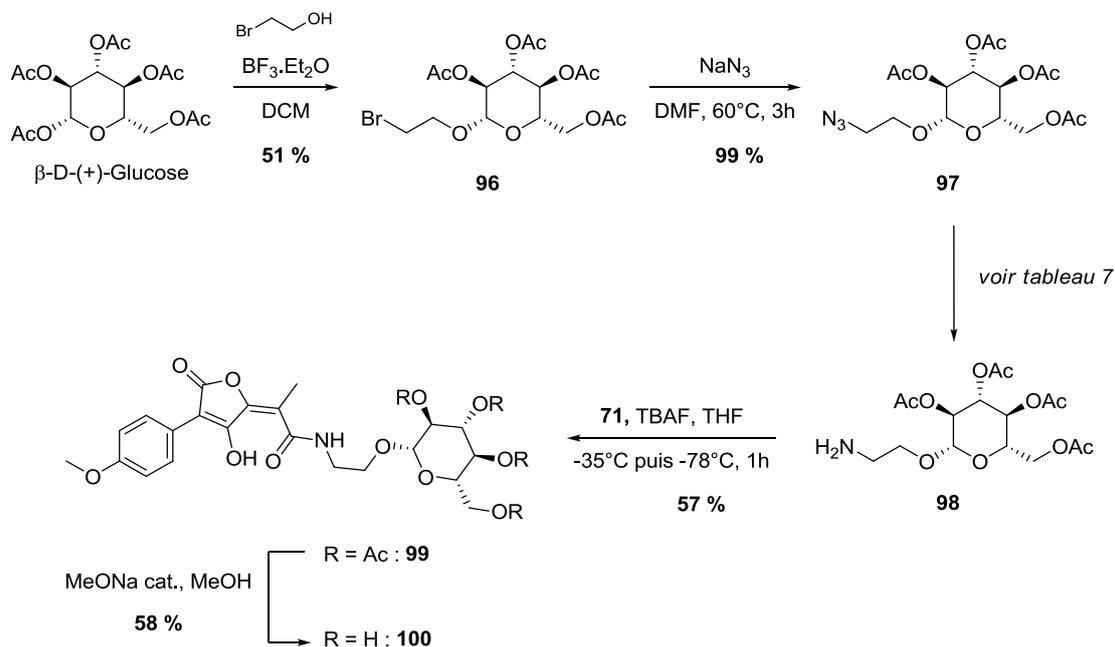
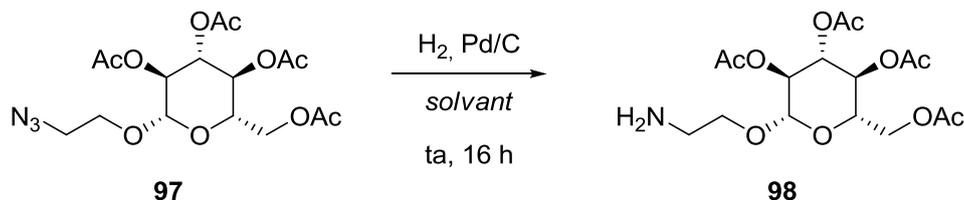


Schéma 40 : synthèse de l'amine **98** et couplage sur la bis-lactone **71**

Une réduction par hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon donne accès à l'amine **98** avec un rendement quantitatif. Pour cette dernière étape, le meilleur solvant s'est avéré être le THF (tableau 9, entrée 3). En effet, lorsque la réaction est effectuée dans le

méthanol comme décrit dans la littérature, nous récupérons en fin de réaction un mélange des différents produits ayant perdu un ou plusieurs groupes acétyle, et lorsque l'acétate d'éthyle est employé, le produit résultant est l'amine N-acétylée.

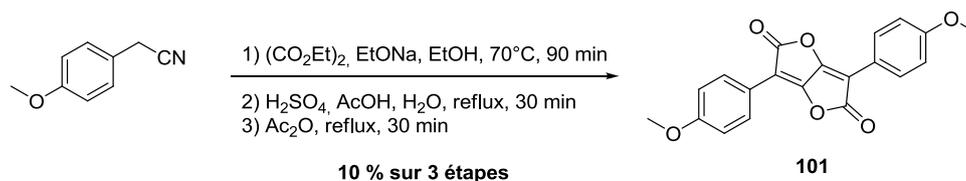
Tableau 9 : essais d'hydrogénation de **97** dans différents solvants



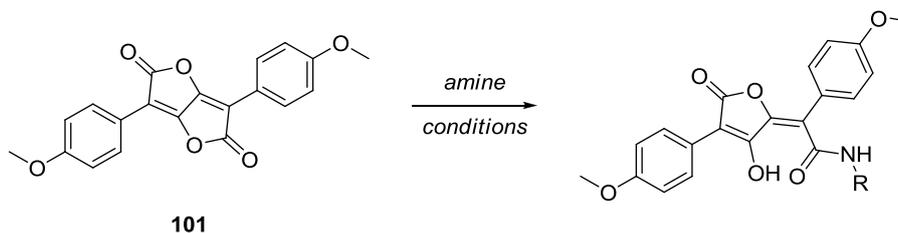
entrée	solvant	observation
1	MeOH	
2	AcOEt	
3	THF	98 , quant.

Ayant l'amine **98** en main, nous avons ensuite réalisé l'ouverture régiosélective de la bis-lactone **71** en présence de TBAF, fournissant le composé **99** avec un rendement de 57 %. La déprotection des fonctions acétate présentes sur le sucre est réalisée dans le méthanol en présence d'une quantité catalytique de méthanolate de sodium pour aboutir au composé **100** avec un rendement de 58 %.

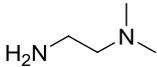
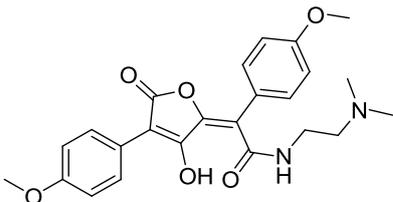
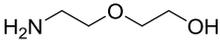
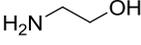
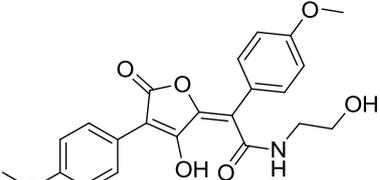
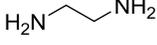
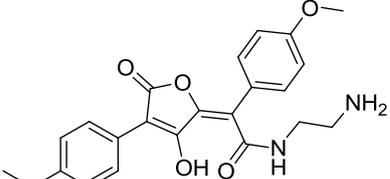
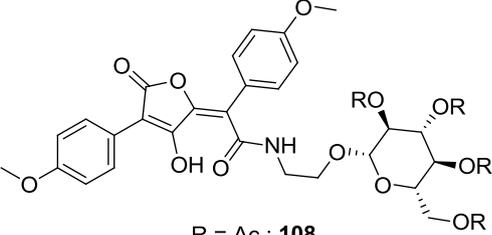
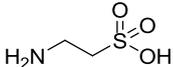
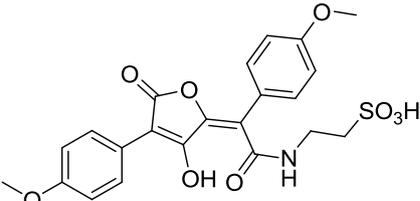
Nous nous sommes également intéressés à la synthèse de dérivés hydrophiles à partir de la bis-lactone symétrique **101**. Celle-ci est synthétisée en 3 étapes par Brice Nadal au Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, situé au CEA de Saclay et dirigé par le Dr Thierry Le Gall (schéma 41). Pour cela, la méthode de Volhard a été appliquée au départ du 4-méthoxyphénylacétonitrile. Le rendement global de la synthèse est de 10 %.

Schéma 41 : synthèse de la bis-lactone **101**

A partir de **101** nous avons, comme précédemment, synthétisé divers dérivés hydrophiles par réaction avec 1 équivalent d'amine à température ambiante dans le dichlorométhane ou le DMF selon la solubilité de l'amine de départ. La réaction est généralement très rapide (10 minutes) mais dans certains cas nous avons dû laisser la réaction pendant une nuit. Le tableau 10 présente les différents essais réalisés. Nous avons cherché, ici, à garder une longueur de chaîne fixe de deux méthylènes pour étudier l'influence des différentes fonctionnalités.

Tableau 10 : différents pulvinamides di-aromatiques hydrophiles synthétisés à partir de **101**

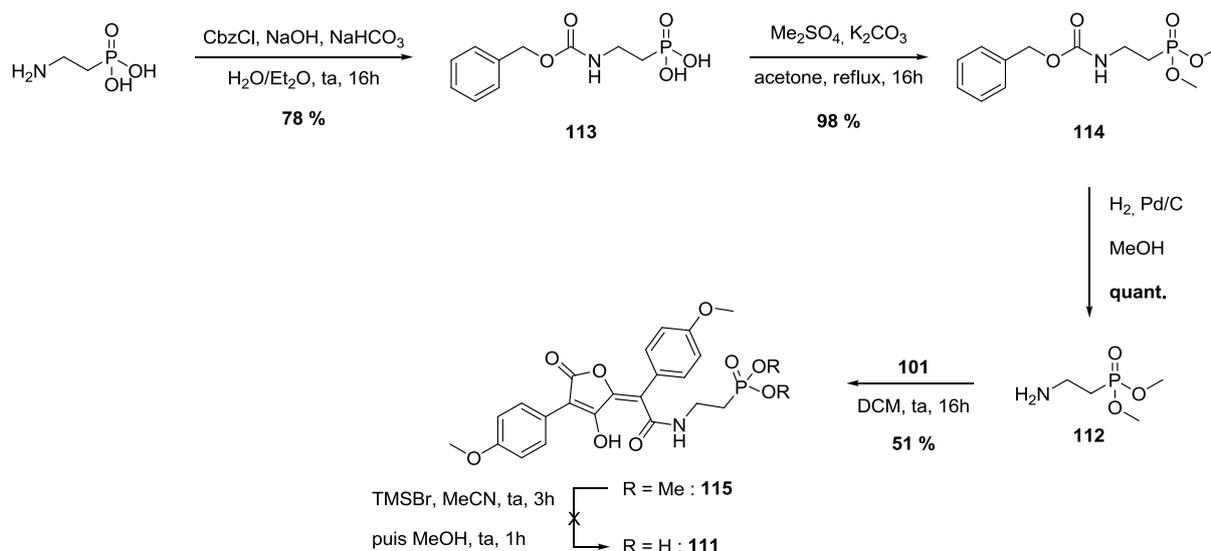
entrée	amine	conditions	produit	Rdt
1		DCM, ta, 15 min		65 %
2		DMF, ta, 16h		74 %

3		DCM, ta, 15 min	 104	92 %
4		DCM, ta, 15 min	 105	99 %
5		DCM, ta, 15 min	 106	61 %
6		DCM, ta, 15 min	 107	74 %
7	98	1) DCM, ta, 16h ; 2) MeONa, MeOH, ta, 16h	 R = Ac : 108 R = H : 109	92 % ^a
8		DMF, TEA, 60°C, 16h	 110	0 %

9		TEA, DMF/H ₂ O, ta, 16h		0 %
10		1) DCM, ta, 16h ; 2) TMSBr, MeCN, ta, 3h puis MeOH, 1h		1) 51 % 2) 0 %

a) rendement sur 2 étapes

Des essais de réaction avec l'acide 2-aminosulfonique et l'acide 2-aminoéthylphosphonique ont été réalisés, mais des problèmes de purification sont apparus et les produits **110** et **111** n'ont pas pu être isolés (entrées 8 à 10). L'amine **112** a alors été synthétisée en 3 étapes à partir de l'acide 2-aminoéthylphosphonique (schéma 42). Pour cela, une protection de la fonction amine a été réalisée dans un premier temps par introduction d'un groupe benzyloxycarbamate pour donner **113** avec un rendement de 78 %.⁴⁴ Une diméthylation de l'acide phosphonique est ensuite réalisée en présence de sulfate de diméthyle pour donner **114** avec un rendement de 98 %. L'amine est enfin déprotégée par hydrogénation catalytique, et l'amine **112** est obtenue avec un rendement global de 76 % à partir de l'acide commercial. La bis-lactone **101** a ensuite été mise en réaction avec cette amine pour fournir le phosphonate **115** avec un rendement moyen de 51 %, mais la déméthylation en présence de bromure de triméthylsilyle s'est avérée infructueuse et **111** n'a pas pu être synthétisé par cette méthode.

Schéma 42 : synthèse de l'amine **112** et essai de synthèse de **111**

Nous avons donc synthétisé 18 dérivés hydrophiles différents, mono-aromatiques dissymétriques et di-aromatiques symétriques. Ils portent des groupements hydrophiles de natures différentes (amines, alcools, éthers, acides carboxyliques, glucose). Nous allons maintenant mesurer leur solubilité dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline).

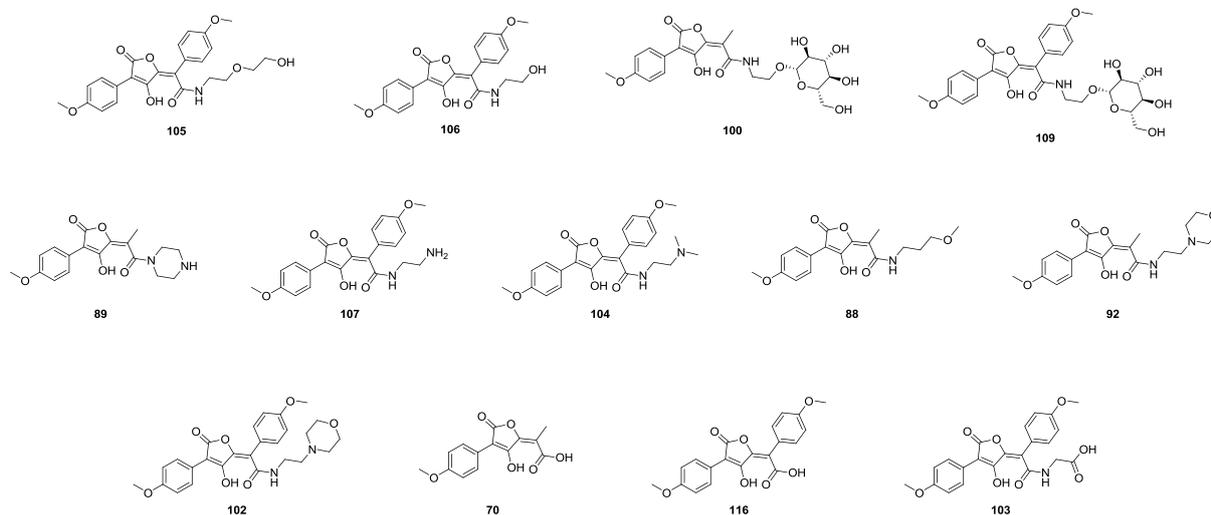
V. 2. Mesure de la solubilité

Les mesures de solubilité ont été réalisées par Patrick Gizzi (PCBIS – TechMedILL, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg)

Une solution-mère du composé à mesurer est réalisée dans du DMSO à 10 mM, puis une courbe d'étalonnage est réalisée par HPLC. Dans un second temps, une solution saturée du même composé est réalisée par agitation pendant 24h à 25°C d'une suspension du produit dans du PBS, puis le milieu est centrifugé et le surnageant est dosé par HPLC à l'aide de la courbe d'étalonnage réalisée précédemment. Les mesures de la solubilité ont été réalisées sur 11 des molécules synthétisées ainsi que sur les deux acides pulviques **70** et **116**, afin d'étudier l'influence de la fonction solubilisatrice insérée (alcool : **105**, **106** ; sucre : **100**, **109** ; amine : **89**, **104**, **107** ; éther : **88**, **92**, **102** ; acide : **70**, **103**, **116**) ainsi que l'influence du groupe aryle sur la double-liaison exocyclique (**70/116**, **100/109**, **92/102**,

tableau 11). Nous avons également mesuré la solubilité des deux acides pulviniques correspondant **70** et **116**.

Tableau 11 : valeurs de solubilités dans du PBS des différents composés hydrophiles synthétisés



entrée	fonction	produit	solubilité (mM)	entrée	fonction	produit	solubilité (mM)
1	alcool	105	4.5 ± 0.2	8	éther	88	0.43 ± 0.01
2		106	0.42 ± 0.01	9		92	0.292 ± 0.002
3		100	6.6 ± 0.1	10		102	0.003 ± 0.001
4	sucre	109	4.05 ± 0.03	11	acide	70	15.1 ± 0.4
5		89	0.67 ± 0.001	12		103	4.02 ± 0.07
6		104	0.02 ± 0.001	13		116	7.2 ± 0.05
7	amine	107	0.03 ± 0.003				

De manière générale, les dérivés comportant une fonction acide carboxylique et un sucre sont les plus solubles, avec des valeurs de solubilité allant de 4.02 mM (**103**) à 15.1 mM (**70**). Le composé **105** est également intéressant avec une solubilité de 4.5 mM, en revanche

le composé **106**, comportant un motif éthylène glycol en moins, est bien moins soluble (0.42 mM). Enfin les dérivés portant une amine ou un éther sont les moins solubles, avec des valeurs allant de 0.003 mM (**102**) à 0.67 mM (**89**).

En plus d'insérer des groupements hydrophiles, nous avons voulu mettre à profit la dérivatisation aisée de la bis-lactone pour introduire d'autres motifs antioxydants. En effet nous pourrions ainsi obtenir des molécules hybrides entre un motif acide pulvinique et un autre antioxydant possédant un mécanisme de capture de radicaux libres différents, dans le but d'améliorer le pouvoir antiradicalaire et donc radioprotecteur.

V. 3. Synthèse de molécules antioxydantes hybrides

La synthèse de molécules duales, c'est-à-dire possédant deux modes d'action ou plus, font de plus en plus leur apparition dans le milieu de la recherche de nouveaux médicaments et traitements.⁴⁵⁻⁵⁰ Le principe est de combiner, dans une même molécule, deux motifs possédant deux activités différentes et de les lier par un bras espaceur. On obtient alors une seule molécule possédant deux activités synergiques, espérant ainsi renforcer l'activité globale. Nous avons souhaité synthétiser des molécules hybrides possédant un motif d'acide pulvinique et un second motif antioxydant de différentes natures. Pour cela, nous avons sélectionné différents antioxydants connus : l'acide ascorbique, le trolox (partie active de la vitamine E), ainsi que 3 acides aminés naturels antioxydants (cystéine, méthionine, tyrosine) et un acide aminé non naturel (L-sélénométhionine). Les quatre acides aminés possédant une fonction amine seront utilisés directement pour ouvrir la bis-lactone. L'acide ascorbique et le Trolox nécessitent quant à eux une modification afin d'insérer une fonction amine pour une insertion ultérieure sur une bis-lactone.

En 2001, Koufaki a décrit la synthèse de **117**, par couplage peptidique entre le trolox et l'1,3-diaminopropane. Nous avons donc reproduit la même procédure, et obtenu l'amine attendue avec un rendement de 83 % (schéma 43).⁵¹

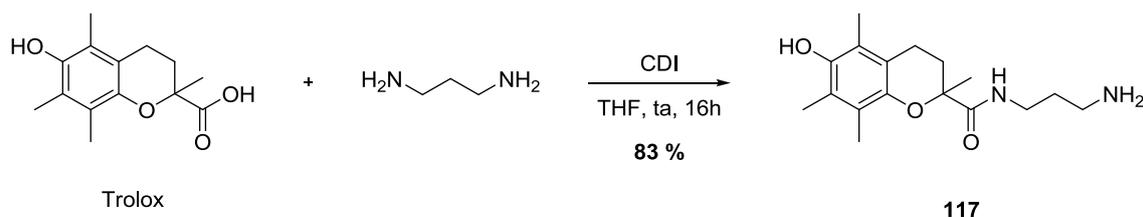
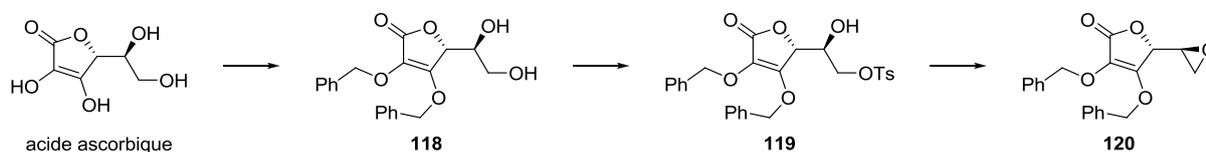
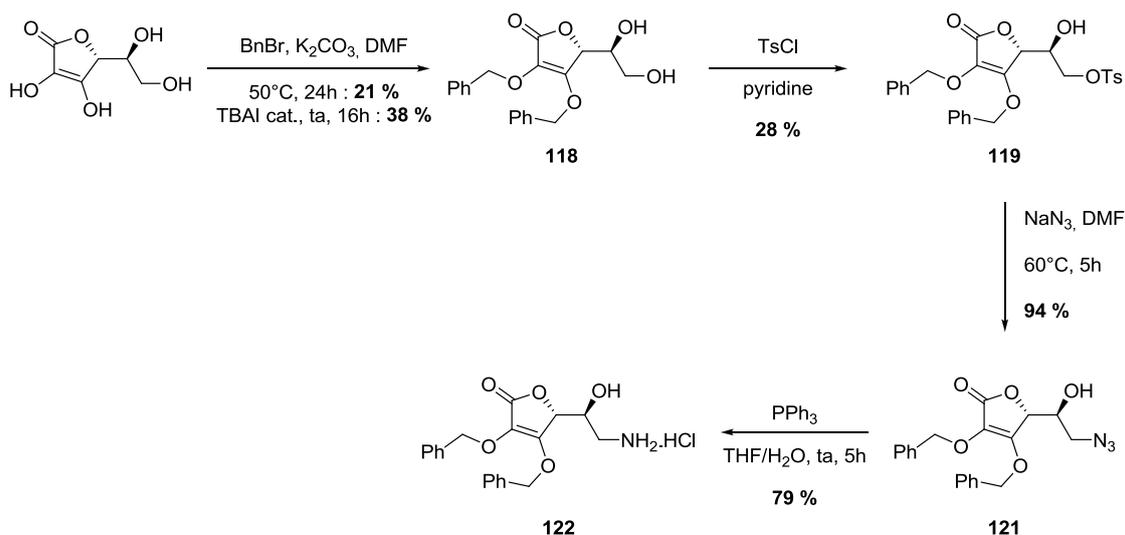


Schéma 43 : insertion d'une amine sur le trolox

Pour substituer l'alcool primaire de l'acide ascorbique par diverses amines, Chen a préparé l'époxyde **120** en 3 étapes (schéma 44).⁵² Cet époxyde pourrait nous servir pour introduire une fonction amine.

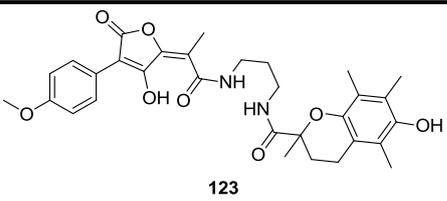
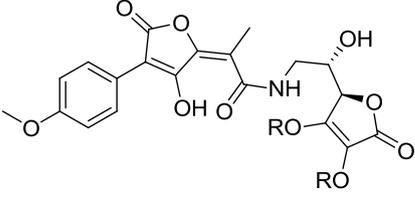
Schéma 44 : synthèse de l'époxyde **120** à partir de l'acide ascorbique par Chen

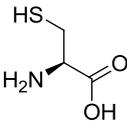
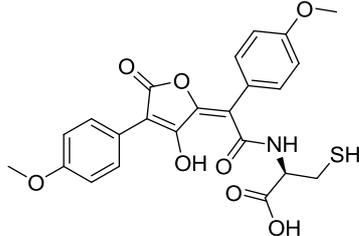
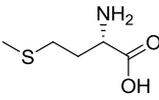
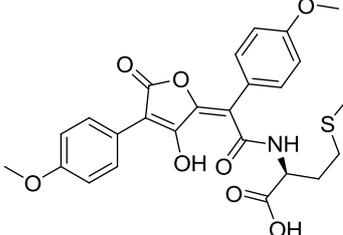
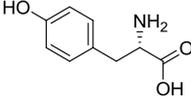
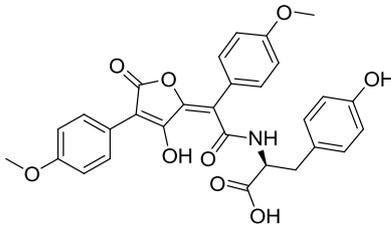
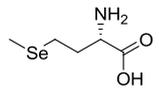
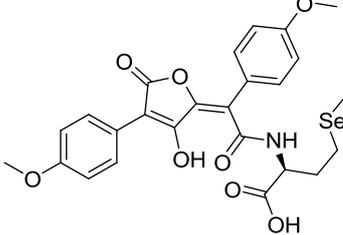
Nous avons donc cherché à adapter cette stratégie. En effet, l'ouverture de l'époxyde par de l'azide de sodium suivi d'une réduction nous fournirait rapidement un dérivé de l'acide ascorbique possédant une amine. La réaction de l'acide ascorbique en présence de 2 équivalents de bromure de benzyle dans les conditions décrites n'a fourni le produit **118** qu'avec 21 % de rendement après 24h à 50°C. Un second essai en présence d'une quantité catalytique d'iodure de tétra-*n*-butylammonium (TBAI, 10 %) n'a pas permis d'obtenir **118** avec un meilleur rendement (38 % après une nuit à température ambiante, schéma 45). La tosylation de l'alcool primaire en présence de chlorure de tosyloxy dans la pyridine a fourni **119** avec un rendement de 28 %. Avant de préparer l'époxyde **120**, nous avons tout d'abord fait réagir **119** directement avec l'azoture de sodium. Ainsi nous avons pu obtenir l'azoture **121** avec un excellent rendement de 94 %, nous affranchissant ainsi d'une étape. La fonction azoture a ensuite été réduite par une réaction de Staudinger, et le chlorhydrate **122** a été obtenu avec un rendement de 79 %.

Schéma 45 : synthèse d'un dérivé de l'acide ascorbique possédant une amine **122**

Ayant les amines **117** et **122** en main, nous avons ensuite préparé les dérivés hybrides par ouverture des bis-lactones **71** et **101**. Les dérivés du Trolox et de l'acide ascorbique seront introduits sur la bis-lactone **71**, tandis que les acides aminés seront plutôt introduits sur la bis-lactone **101**. En effet, disposant déjà de **103** qui résulte de l'ouverture de **101** par la glycine, cette molécule servira de contrôle négatif en tant qu'hybride acide pulvinique-acide aminé non-antioxydant lors des tests biologiques. Le tableau 12 présente les molécules synthétisées et les rendements d'ouverture obtenus.

Tableau 12 : synthèse des molécules hybrides acide pulvinique-antioxydant

entrée	amine	conditions	produit	Rdt
1	117	71 , TBAF, THF, -35°C puis -78°C	 123	88 %
2	122	1) 71 , TBAF, DIPEA, THF, -35°C puis -78°C ; 2) H ₂ , Pd/C, DMF, 90 min	 R = Bn : 124 R = H : 125	1) 83 % 2) 54 %

3		101 , DIPEA, DMF, ta, 24h		73 %
4		101 , DMF, ta, 24h		93 %
5		101 , DMF, ta, 24h		99 %
6		101 , DMF, ta, 24h		92 %

Les ouvertures de **71** avec les dérivés aminés du Trolox et de l'acide ascorbique n'ont pas posé de problème et ont fourni **123** et **124** avec des rendements de 88 % et 83 % respectivement (entrées 1 et 2). La déprotection des deux benzyles s'est ensuite effectuée par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C. Le composé **125** est ainsi récupéré avec un rendement de 54 % (entrée 2). Les réactions des quatre acides aminés avec **101** n'ont posé aucun souci, et les dérivés hybrides **126** à **129** ont été synthétisés avec d'excellents rendements allant de 73 % à 99 %.

Les solubilités des composés **123** et **125** ont été mesurées dans les conditions décrites précédemment, et ont présenté respectivement des solubilités de $120 \pm 1 \mu\text{M}$ et $10.0 \pm 1 \text{ mM}$.

VI. Conclusions

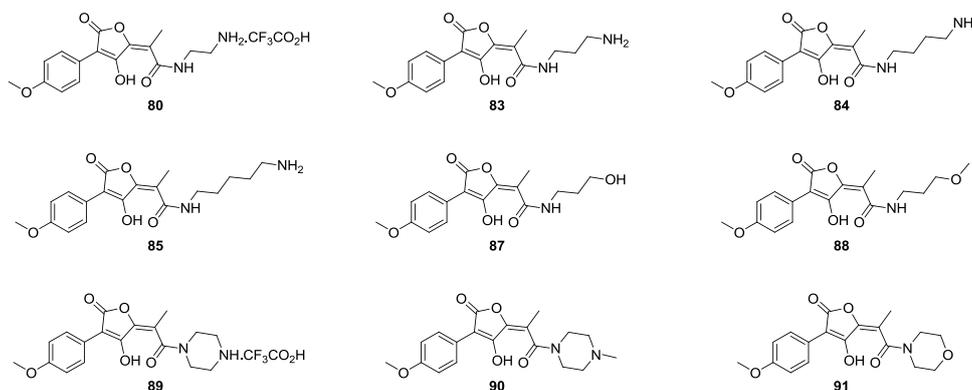
Nous avons présenté dans ce chapitre les principales méthodes de synthèse d'acides pulviniques di-aromatiques développées dans la littérature et l'application de certaines d'entre elles à la synthèse de dérivés mono-aromatiques. Deux nouvelles voies de synthèse pour application à une synthèse à grande échelle ont été étudiées, mais malheureusement sans résultats. La mise au point des précédents travaux réalisés au laboratoire a permis cependant de disposer d'une synthèse rapide et efficace, ayant permis la synthèse en laboratoire de 10 g de bis-lactone **71** en six étapes.

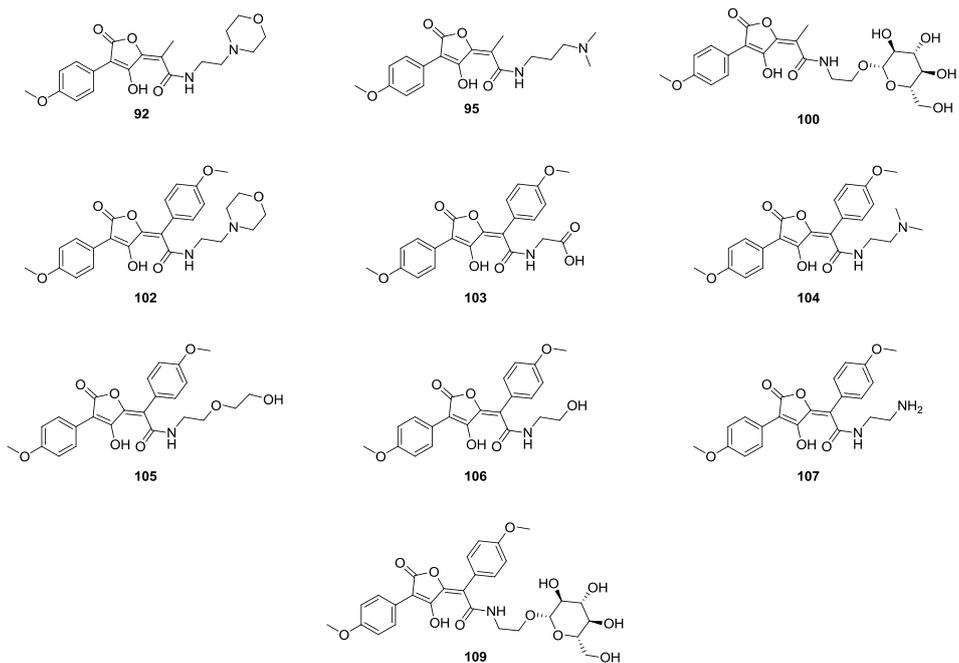
Des études pour comprendre le mécanisme d'ouverture régiosélective de la bis-lactone **71** ont été menées, mais n'ont pas encore permis de mettre à jour avec exactitude le mécanisme réel. Cette réaction d'ouverture régiosélective a néanmoins permis l'obtention de plusieurs dérivés d'acides pulviniques par insertion d'amines hydrophiles. La bis-lactone **101** a également été utilisée pour synthétiser de nouveaux dérivés hydrophiles di-aromatiques symétriques.

Ces deux bis-lactones ont également été mises à profit pour synthétiser des molécules hybrides possédant, en plus du motif pulvinique initial, un second motif antioxydant, dans le but d'étudier un éventuel effet synergique entre ces deux motifs.

L'activité biologique de ces composés sera évaluée à l'aide de différents tests antioxydants et radioprotecteurs. Ces tests ainsi que les résultats seront présentés dans le chapitre 4 de ce manuscrit. L'ensemble des produits finaux synthétisés est résumé dans la figure 38 ci-dessous :

Molécules hydrophiles :





Molécules hybrides :

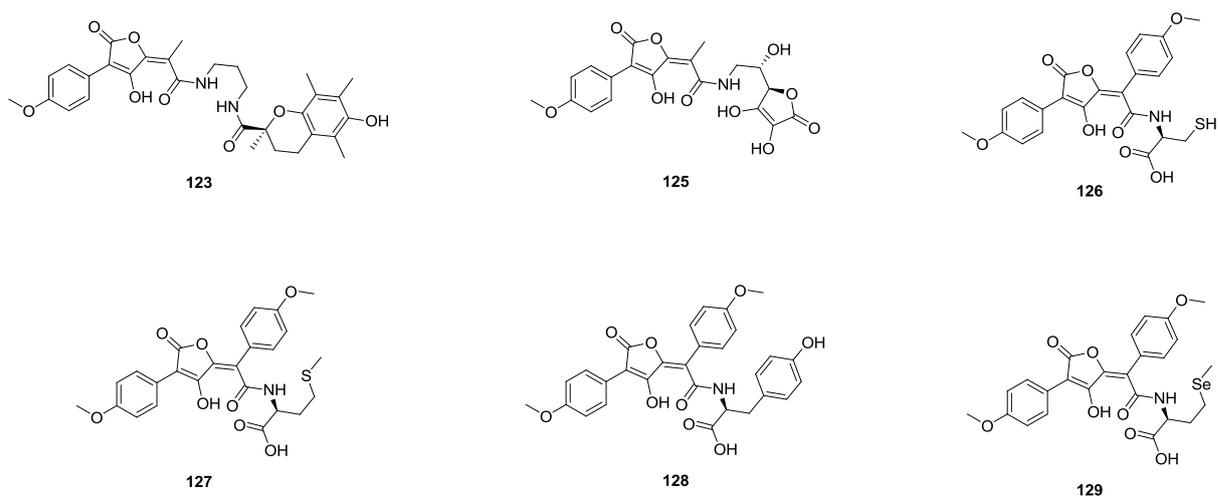


Figure 38 : structures des pulvinamides synthétisés

Références bibliographiques du chapitre 2 :

- ¹ M. Gill, W. Steglich, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**, *51*, 1-317
- ² S. Huneck, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* **2001**, *81*, 1-276
- ³ J. Bebert, *Journal de Pharmacie et des Sciences Accessoires*, **1831**, *17*, 696-700
- ⁴ A. Spiegel, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1883**, *219*, 1-56
- ⁵ J. Volhard, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1894**, *282*, 1-21
- ⁶ A. L. Zografos, D. Georgadis, *Synthesis*, **2006**, *19*, 3157-3188
- ⁷ M. Asano, Y. Kameda, *J. Pharm.Soc. Jpn.* **1933**, *53*, 67
- ⁸ B. Akermark, *Acta Chem. Scand.* **1961**, *15*, 1695
- ⁹ F. R. Foden, J. Mc Cormick, D. M. O'Mant, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 199-203
- ¹⁰ R. Ramage, G. J. Griffiths, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1984**, 1547-1553
- ¹¹ B. Heurtaux, C. Lion, T. Le Gall, C. Mioskowski, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1474-1477
- ¹² J. Weinstock, J. E. Blank, H. J. Oh, B. M. Sutton, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 673-676
- ¹³ P. Langer, M. Stoll, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 1803-1805
- ¹⁴ P. Langer, T. Schneider, M. Stoll, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3204-3214
- ¹⁵ Z. Ahmed, P. Langer, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3753-3757
- ¹⁶ Z. Ahmed, P. Langer, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 2055-2063
- ¹⁷ Z. Ahmed, U. Albrecht, P. Langer, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3469-3474
- ¹⁸ M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, C. Mioskowski, B. Amekraz, C. Moulin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1289-1293
- ¹⁹ M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, C. Mioskowski, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1489-1498
- ²⁰ Y. Bourdreux, S. Nowaczyk, C. Billaud, A. Mallinger, C. Willis, M. Desage-El Murr, L. Toupet, C. Lion, T. Le Gall, C. Mioskowski, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 22-26
- ²¹ J. M. Begley, D. W. Knight, G. Pattenden, *Tet. Lett.* **1975**, *48*, 4279-4282
- ²² D. W. Knight, G. Pattenden, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1979**, 62-69
- ²³ M. M. Kayser, L. Breau, *Tet. Lett.* **1988**, *48*, 6203-6206
- ²⁴ M. M. Kayser, L. Breau, S. Eliev, P. Morand, H. S. Ip, *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 104-109

- ²⁵ D. W. Knight, G. Pattenden, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1979**, 84-88
- ²⁶ G. Pattenden, N. Peig, A. G. Smith, *Tet. Lett.* **1986**, 27, 403-406
- ²⁷ D. R. Gegde, G. Pattenden, A. G. Smith, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1986**, 2127-2131
- ²⁸ G. Pattenden, M. W. Turvill, A. P. Chorlton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1991**, 2357-2361
- ²⁹ C. Willis, E. Bodio, Y. Bourdreux, C. Billaud, T. Le Gall, C. Mioskowski, *Tet. Lett.* **2007**, 48, 6421-6424
- ³⁰ A. Mallinger, T. Le Gall, C. Mioskowski, *Synlett*, **2008**, 386-388
- ³¹ A. Mallinger, T. Le Gall, C. Mioskowski, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 1124-1129
- ³² B. Nadal, S. A.-L. Thetiot-Laurent, S. Pin, J.-P. Renault, D. Cressier, G. Rima, A. Le Roux, S. Meunier, A. Wagner, T. Le Gall, *manuscrit soumis*
- ³³ D. Habrant, thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, **2008**
- ³⁴ D. Habrant, S. Poigny, M. Ségur-Derai, Y. Brunel, B. Heurtaux, T. Le Gall, A. Strehle, R. Saladin, S. Meunier, C. Mioskowski, A. Wagner, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2454-2464
- ³⁵ S. C. Agarwal, T. R. Seshadri, *Tetrahedron*, **1964**, 20, 17-24
- ³⁶ T. Maass, *Phytochemistry*, **1970**, 2477-2481
- ³⁷ K. R. Raju, P. S. Rao, *Indian J. Chem. Sect. B*, **1986**, 25, 97-99
- ³⁸ G. Venkateshwar Rao, P. S. Rao, *J. Indian Chem. Soc.* **1983**, 60, 94-96
- ³⁹ R. L. Franck, J. Cohen, P. Coker, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4455-4457
- ⁴⁰ D. Habrant, A. Le Roux, S. Poigny, S. Meunier, A. Wagner, C. Mioskowski, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 9490-9493
- ⁴¹ D. R. Compton, S. Sheng, K. E. Carlson, N. A. Rebacz, I. Y. Lee, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **2004**, 47(24), 5872-5893
- ⁴² A. C. Campbell, M. S. Maidment, J. H. Pick, D. F. M. Stevenson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1985**, 1567-1576
- ⁴³ W. Hayes, H. M. I. Osborn, S. D. Osborne, R. A. Rastall, B. Romagnoli, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7983-7996
- ⁴⁴ L. Han, J. Hiratake, A. Kamiyama, K. Sakata, *Biochem.* **2007**, 46, 1432-1447
- ⁴⁵ B. Meunier, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 69-77
- ⁴⁶ F. Coslédan, L. Fraisse, A. Pellet, F. Guillou, B. Mordmüller, P. G. Kremsner, A. Moreno, D. Mazier, J.-P. Maffrand, B. Meunier, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 17579-17584

- ⁴⁷ D. Griffith, M. P. Morgan, C. J. Marmion, *Chem. Comm.* **2009**, 6735-6737
- ⁴⁸ V. Pokrovskaya, V. Belakhov, M. Hainrichson, S. Yaron, T. Baasov, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2243-2254
- ⁴⁹ U. Tawar, S. Bansal, S. Shrimal, M. Singh, V. Tandon, *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *305*, 221-233
- ⁵⁰ B. B. Hasinoff, X. Wu, Y. Yang, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 616-624
- ⁵¹ M. Koufaki, T. Calogeropoulou, A. Detsi, A. Roditis, A. P. Kourounakis, P. Papazafiri, K. Tsiakitzis, C. Gaitanaki, I. Beis, P. N. Kourounakis, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4300-4303
- ⁵² W. Chen, D. A. Kuntz, T. Hamlet, L. Sim, D. R. Rose, B. M. Pinto, *Biorg. and Med. Chem.* **2006**, *14*, 8332-8340

Chapitre 3

*Recherche de nouveaux antioxydants
par criblage in silico selon la méthode QSPR*

Chapitre 3 : Recherche de nouveaux antioxydants par criblage *in silico* selon la méthode QSPR

I. Introduction

La recherche de nouveaux agents de radioprotection passe par l'étude de nombreux composés sur de nombreux tests différents, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, ce qui demande beaucoup de temps et d'argent et peut poser des problèmes d'éthique lorsque beaucoup d'animaux sont utilisés pour les tests *in vivo*. De plus les mécanismes impliqués pour obtenir un bon effet radioprotecteur ne sont pas tous connus. Il serait alors intéressant de pouvoir développer des outils d'aide à la prédiction de propriétés antioxydantes et radioprotectrices de substances naturelles et synthétiques. Des méthodes alternatives à l'expérimentation ont alors vues le jour, avec notamment l'analyse des relations entre la structure d'un composé et une propriété (méthode **QSPR** (Quantitative Structure-Property Relationship)) ou une activité (méthode **QSAR** (Quantitative Structure-Activity Relationship)). Ces méthodes sont devenues d'un grand intérêt et ont aujourd'hui de nombreuses applications, notamment en chimie, avec par exemple la prédiction de propriétés telles que les points d'ébullitions¹ ou la toxicité de composés tels que les nitroaromatiques,² ainsi qu'en biologie avec par exemple la prédiction des coefficients de partage mais également l'analyse des interactions d'une famille de molécules avec une protéine ou une enzyme. La relation quantitative structure-propriété est une méthodologie qui consiste à mettre en évidence une relation quantitative entre une grandeur macroscopique telle qu'une activité biologique et la structure moléculaire des composés étudiés. Ainsi en combinant des données obtenues sur un test biologique sur un grand nombre de molécules, il serait possible de déterminer tout d'abord les facteurs influençant l'activité, et ensuite de prédire l'activité de nouvelles structures. L'étude des différents facteurs importants pour obtenir une bonne activité peut également être utilisée pour comprendre les différents mécanismes mis en jeu dans l'activité ou la propriété étudiée.

Le test de protection de la thymidine mis au point au CEA de Saclay^{3, 4} nous a permis de disposer d'un grand nombre de données expérimentales sur des dérivés d'acides pulviniques. Nous avons alors entrepris une étude d'aide à l'identification d'antioxydants par criblage *in silico* grâce à ces résultats. Le principe de cette étude repose sur la création d'un

modèle QSPR à partir de ces données expérimentales (dans la suite de ce chapitre cette liste de composés avec leur activité protectrice envers la thymidine sera appelée **liste d'entraînement**). A partir de ce modèle, nous soumettons au programme une **liste de structures nouvelles**, afin d'en prédire l'activité. Les composés les plus intéressants sont ensuite synthétisés et testés, puis les nouvelles données expérimentales sont réinjectées dans le modèle afin d'affiner la prédiction. Afin d'être valide, chaque modèle doit être alimenté en données obtenues dans les mêmes conditions expérimentales.

Un premier modèle a été réalisé à partir de données obtenues sur le test de protection de la thymidine soumise à deux types de stress oxydant : irradiation sous **UV** en présence d' H_2O_2 , ou oxydation en conditions de **Fenton** par un mélange Fe(II)/EDTA/ H_2O_2 . Suite à la création de deux premiers modèles (un modèle pour chaque condition d'oxydation), une première liste de nouvelles structures a été soumise à un criblage *in silico*. Une famille de composés s'est avérée particulièrement intéressante, les dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine (figure 39). Dans la suite de ce chapitre, nous allons présenter le principe et le développement du modèle de prédiction, puis les résultats issus du premier criblage effectué. Ensuite nous présenterons les principales méthodes de synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines décrites dans la littérature avant d'aborder les résultats obtenus au laboratoire sur la synthèse de dérivés dans le but de réaliser une étude de relation structure-activité sur cette famille de composés.

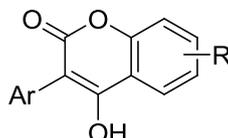


Figure 39 : structure générale des 3-aryl-4-hydroxycoumarines

II. Principe du modèle de prédiction

Le modèle informatique de prédiction de l'activité antioxydante a été réalisé en collaboration avec les Dr Marjana Novic et Igor Kuzmanovski (Laboratory of Chemometrics, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovénie)

Le modèle QSPR a été créé et optimisé selon le procédé **CPANN** (Counter-Propagation Artificial Neural Network).⁷ Le principe est de créer un réseau de neurones artificiels à partir de différents critères ou descripteurs (en général des propriétés du composé (nature des atomes, des liaisons, nombre d'insaturations, log(P), polarisabilité, volume des atomes etc)), puis d'optimiser ultérieurement ce réseau par entraînement lors d'une **phase d'apprentissage**, que nous détaillerons plus loin. Pour chaque composé, un descripteur aura plus ou moins d'importance pour l'activité, aussi il faut lui attribuer un coefficient de pondération, déterminé lors de la phase d'apprentissage. Un neurone sera donc un couple descripteur-coefficient, et un composé correspondra donc à un ensemble de neurones. Les résultats sont présentés sous forme de cartes, appelées **cartes de Kohonen** (figure 40). Sur ces cartes, les données d'entrée (*input data*) représentent un ensemble de descripteurs, et les données de sortie (*output data*) la ou les propriétés recherchées, ici l'activité protectrice envers la thymidine. Les neurones sont représentés sur ces cartes sous forme d'hexagones, et une molécule sera caractérisée par un empilement de ces neurones.

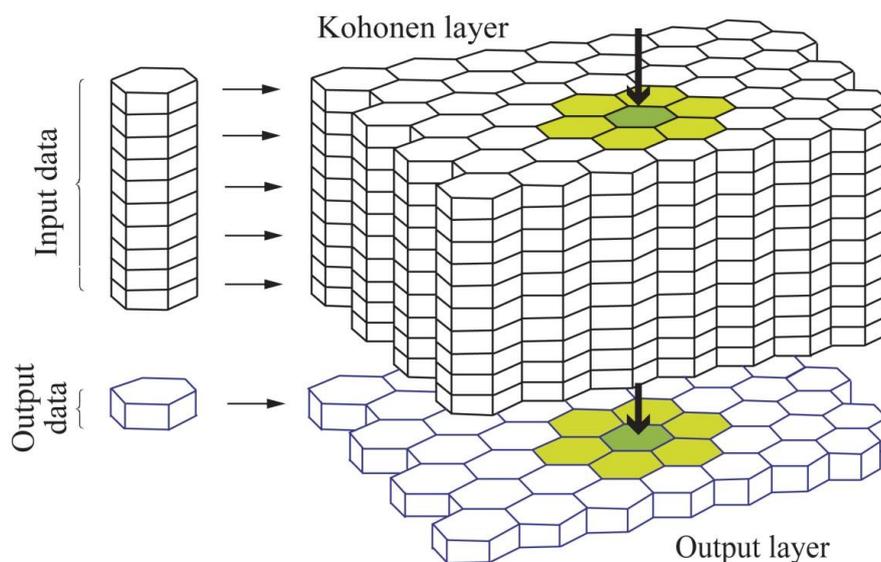


Figure 40 : représentation graphique des cartes de Kohonen

Vient ensuite la phase d'apprentissage, pour laquelle sera utilisée la liste d'entraînement, constituée des structures et des données expérimentales de chaque composé utilisé. Pour cela la liste est divisée en deux parties : soient N composés dans cette liste, on va utiliser (N-x) molécules pour entraîner le modèle, et x molécules pour tester le modèle, qui seront alors considérées comme inconnues (figure 41). Cette méthode est appelée cross-validation : l'algorithme va optimiser les valeurs des descripteurs des (N-x) composés jusqu'à obtenir un résultat le plus proche de la réalité, puis tester le modèle avec les x molécules restantes.

Concrètement, un premier passage est réalisé avec les molécules numérotées 1, 2, ... N-x pour l'entraînement, et les molécules N-x+1, N-x+2, ... N pour le test. Pour chaque composé 1 à N le modèle va regarder dans quel empilement de neurones les molécules peuvent être classées, puis optimiser les coefficients de pondération pour obtenir la bonne valeur en sortie. Pour chaque coefficient trouvé pour un neurone, l'information est transmise aux neurones voisins de manière à renforcer la précision de la modélisation. Le modèle est ensuite testé avec les molécules N-x+1 à N. Une fois ce premier passage réalisé, l'opération est répétée avec cette fois-ci les molécules 2, 3, ..., N-x+1 pour l'entraînement, et les molécules N-x+2, N-x+3, ..., N, 1 pour la phase de test. La méthode est ensuite répétée jusqu'à la fin de la liste.

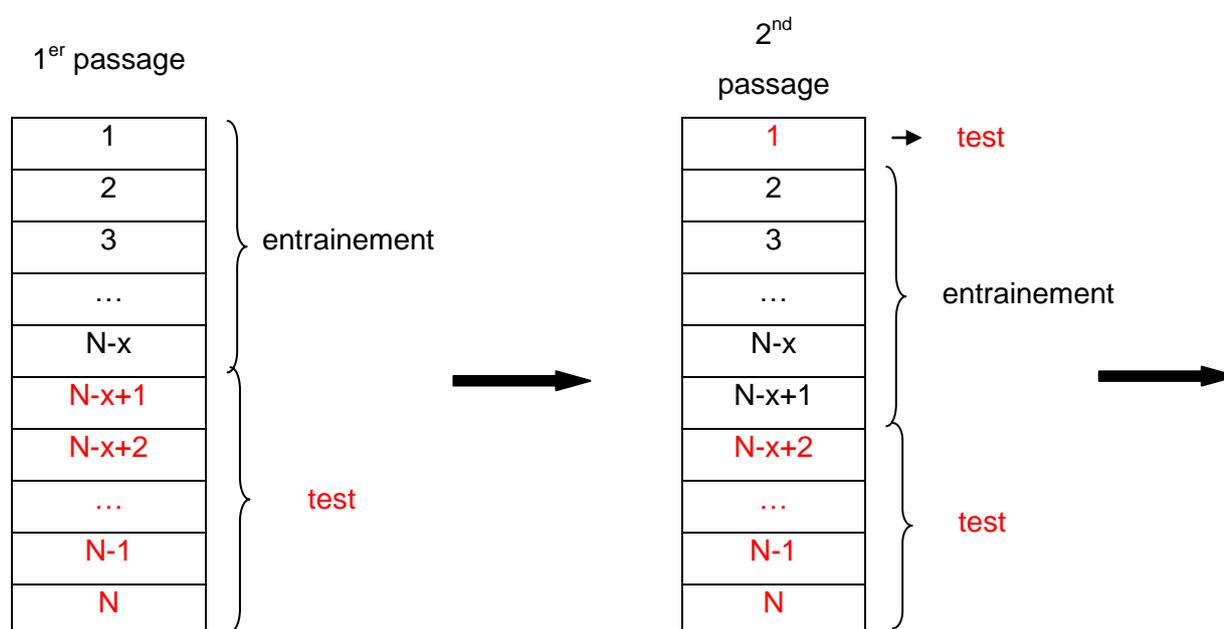


Figure 41: principe de la méthode d'entraînement

Une fois l'algorithme terminé et les coefficients optimisés, nous obtenons une représentation graphique des cartes de Kohonen comme illustré dans la figure 42, dans lesquelles les zones où les molécules auront peu d'activité seront représentées en bleu et où les zones où les molécules auront une bonne activité seront représentées en rouge.

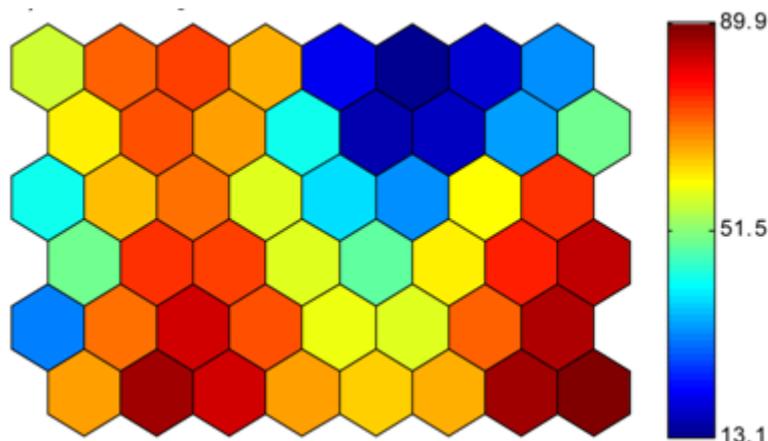
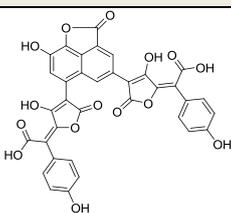
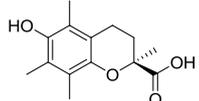
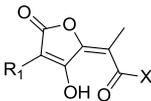
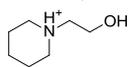
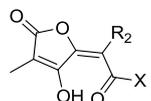
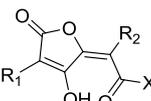
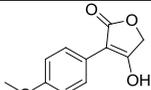


Figure 42 : exemple de carte de Kohonen, obtenue avec le modèle créé à partir des résultats de protection de la thymidine en condition de Fenton. L'échelle de scores représente le pourcentage de thymidine protégée calculé.

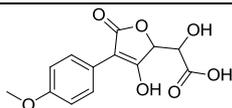
Ensuite, nous soumettons une liste de structures nouvelles au modèle précédemment créé. Le modèle établi, en fonction des descripteurs et des coefficients établis lors de la phase d'entraînement, à quel ensemble de neurones correspond le mieux chaque composé, puis calcule l'activité théorique de ces molécules. Le modèle QSPR peut en permanence être alimenté par des nouvelles données, ainsi toute nouvelle donnée expérimentale peut être réinjectée dans le modèle pour affiner l'algorithme de prédiction.

Le premier modèle a été entraîné à partir de données expérimentales obtenues sur le test de dégradation de la thymidine en condition de Fenton et par irradiation UV et avec des dérivés d'acides pulviniques synthétisés lors de précédents travaux. Dans cette liste se trouvent des acides pulviniques dissymétriques mono-aromatiques dont la position 3 du buténolide est substituée par un cycle aromatique (tableau 13, entrées 3 à 18) ou par un méthyle (entrées 19 à 23). Ces différents dérivés ont été testés sous la forme d'acide pulvinique, d'acide vulpinique ou de pulvinamide. Un dérivé mono-aromatique dont la position 6 a été substituée par une fonction ester méthylique a été incorporée à la liste (entrée 24). On retrouve également des acides vulpiniques symétriques mono-aromatiques (entrées 25 à 28). Enfin un acide tétronique ainsi qu'un alcool précurseur des acides pulviniques ont été testés (entrées 29 et 30). Ces structures ainsi que les données expérimentales obtenues sur le test de protection de la thymidine sous les deux conditions oxydantes sont présentées dans le tableau 13 ci-dessous :

Tableau 13 : structure des composés utilisés pour la création du modèle informatique et valeurs de protection

entrée	structure	R1	R2	X	% protection Fenton (500 μ M)	% protection UV (100 μ M)
1		/	/	/	13	52
2		/	/	/	81	10
3		Ph	-	OMe	91	34
4		4-F-Ph	-	OMe	84	29
5		4-Br-Ph	-	OMe	68	26
6		4-MeO-Ph	-	OMe	89	38
7		4- <i>i</i> Pr-Ph	-	OMe	59	29
8		(<i>E</i>)-Ph-CH=CH-	-	OMe	36	31
9		4-MeO-Ph	-	OH	69	28
10		4-MeO-Ph	-	Me	62	25
11		4-MeO-Ph	-		77	35
12		4-MeO-Ph	-	OH	72	30
13		4-MeO-Ph	-		83	39
14		4-MeO-Ph	-		74	31
15		4-MeO-Ph	-	NH-(CH ₂) ₃ -NH ₂	37	39
16		4-MeO-Ph	-	N(Me)OMe	84	47
17		4-MeO-Ph	-	N-(CH ₂) ₃ -CH ₃	100	47
18		4-MeO-Ph	-	<i>Oi</i> Pr	36	27
19		-	Ph	OMe	19	23
20		-	4-Br-Ph	OMe	11	21
21		-	4-MeO-Ph	OMe	7	19
22		-	4-MeO-Ph	<i>Oi</i> Pr	11	19
23		-	4-MeO-Ph	N-(CH ₂) ₃ -CH ₃	57	25
24		4-MeO-Ph	CO ₂ Et	OEt	68	18
25		4-Br-Ph	4-Br-Ph	OMe	100	50
26		4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	OMe	92	45
27		Ph	Ph	OMe	93	42
28		4-F-Ph	4-F-Ph	OMe	90	40
29		-	-	-	45	18

30



-

-

-

53

23

Une fois un premier modèle créé à partir des données présentes dans le tableau 1, nous avons soumis une liste de structures nouvelles. Dans cette liste se trouvaient des dérivés d'acides pulviques dans lesquels nous avons fait varier la nature des groupes en C3 et C6 ou la nature du cycle buténolide central, ainsi que de nouvelles structures analogues aux acides pulviques (figure 43).

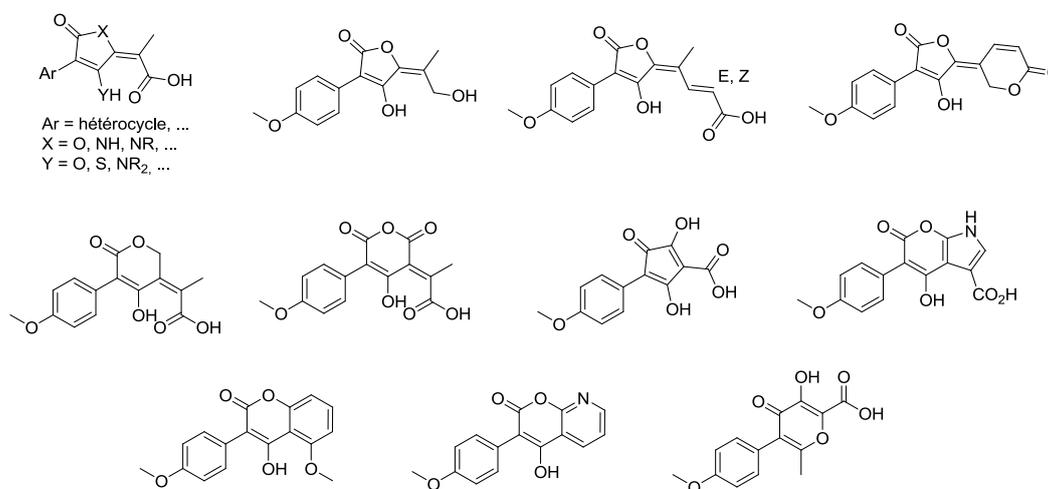
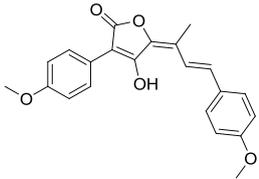
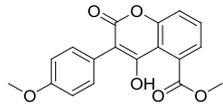
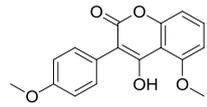
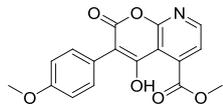


Figure 43 : exemple de structures soumises au modèle de prédiction

Parmi ces composés, cinq ont obtenu un excellent score pour les deux conditions Fenton et irradiation UV (tableau 14). Parmi ces composés, deux sont des pulvinoxones (entrées 1 et 2), et trois sont des dérivés de coumarines (entrées 3 et 4) et d'aza-coumarines (entrée 5).

Tableau 14 : structures des cinq composés ayant obtenus les meilleurs scores de prédiction de la protection de la thymidine, en conditions Fenton et UV

entrée	structure	score Fenton	score UV
1		87 %	44 %

2		87 %	49 %
3		83 %	43 %
4		83 %	43 %
5		83 %	40 %

De cette liste, les molécules de la famille des 3-aryl-4-hydroxycoumarines (figure 44) nous sont apparues particulièrement intéressantes car elles ont une structure différente mais voisine des acides pulviniques. En effet elles possèdent un motif β -cétolactone sous forme d'énol, motif responsable de l'activité antioxydante chez les acides pulviniques. Cependant contrairement à ces derniers ce motif est inclus dans un cycle à 6 atomes (cycle à 5 atomes dans le cas des acides pulviniques). De plus, ils possèdent un noyau aromatique accolé au cycle porteur de l'activité.



Figure 44 : comparaison acide pulvinique / 3-aryl-4-hydroxycoumarine

Notre étude des 3-aryl-4-hydroxycoumarines débutera avec la synthèse d'un premier dérivé présent dans liste de composés modélisés, la 4-hydroxy-5-méthoxy-3-(4-méthoxyphényl)coumarine **130** (figure 45). Tout comme les acides pulviniques, ce composé peut présenter une liaison hydrogène intramoléculaire qui peut influencer l'activité antiradicalaire, aussi nous synthétiserons également le composé **131**, analogue à **130** mais ne possédant pas cette liaison hydrogène. Ces deux composés seront ensuite testés afin de vérifier le pouvoir antioxydant et la corrélation avec la valeur prédite *in silico*. Ensuite nous réaliserons une étude de relation structure-activité, en modifiant les substituants sur chacun des 3 cycles A, B et C des 3-aryl-4-hydroxycoumarines (figure 45). Enfin à partir des

résultats des tests réalisés nous combinerons dans une même molécule les substituants ayant permis d'obtenir le maximum d'activité afin d'obtenir une molécule « améliorée ».

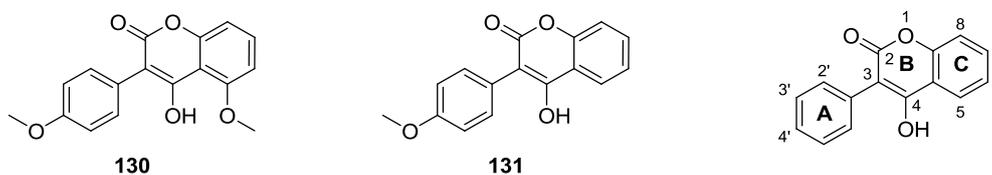


Figure 45 : nomenclature des 3 cycles présents sur le motif 3-aryl-4-hydroxycoumarine et des atomes des cycles B et C

III. Synthèse des 3-aryl-4-hydroxycoumarines : étude bibliographique

Dans la littérature la stratégie principale pour la synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines consiste en une arylation en C3 d'un intermédiaire sur lequel les cycles B et C sont déjà construits et fonctionnalisés. Cette méthode est étudiée depuis les années 1960, avec la réaction entre des dérivés de 4-hydroxycoumarines et des sels de diazoniums,⁸ cependant les produits formés sont obtenus avec de faibles rendements sur cette étape (12-22 %). En 1988 puis en 1989, Barton et Finet ont développé des méthodes de synthèse de ces composés à partir de 4-hydroxycoumarines, tout d'abord à partir d'organobismuth pentavalents Ar_3BiX_2 ($X = Cl^-, AcO^-, TsO^-, NO_3^- \dots$),⁹ puis de triacétates d'arylpbom¹⁰ $ArPb(OAc)_3$, ces derniers étant plus faciles d'accès que les organobismuths (schéma 46).

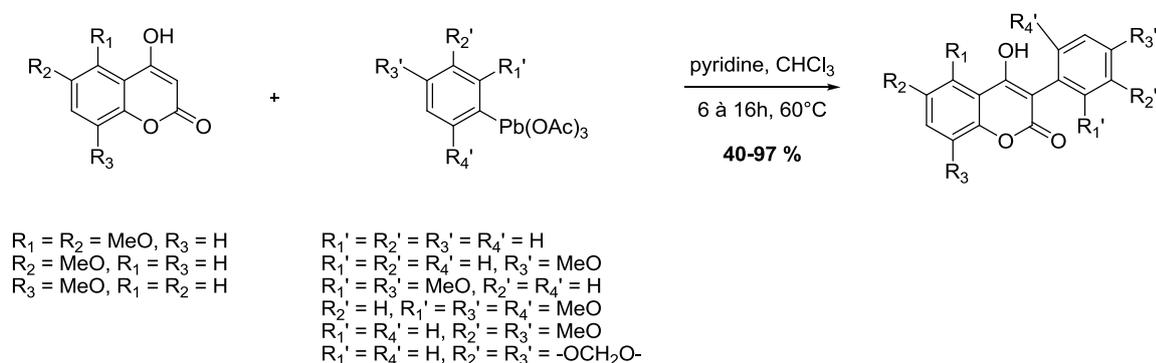


Schéma 46 : synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines par arylation avec $ArPb(OAc)_3$

Bien que donnant d'excellents rendements, les organoplombs sont délicats à obtenir. Ils sont obtenus par réaction entre le dérivé stannylé désiré et le tétraacétate de plomb en présence d'une quantité catalytique d'acétate de mercure.¹¹

Par la suite, des méthodes d'arylation en position 3 par couplage catalysé par des métaux de transition sont apparues. En 2002, Zhu et Yang ont publié une méthode d'arylation en position 3 par couplage de Suzuki au départ d'un sel d'iodonium et d'un acide boronique.¹² Le zwitterion **132** est facilement synthétisé à partir de la 4-hydroxycoumarine correspondante, puis est couplé à des acides boroniques en présence de diacétate de palladium, de tri-*tert*-butylphosphine et d'hydroxyde de lithium (schéma 47). Ils ont ainsi pu faire varier la nature du cycle A en introduisant des groupes aromatiques riches en électrons (ex. furane) et pauvres en électrons (ex. 4-trifluorométhylphényl), avec des rendements moyens à excellents. Cette méthodologie a également été appliquée avec succès à la synthèse de dérivés portant divers substituants sur le cycle C.

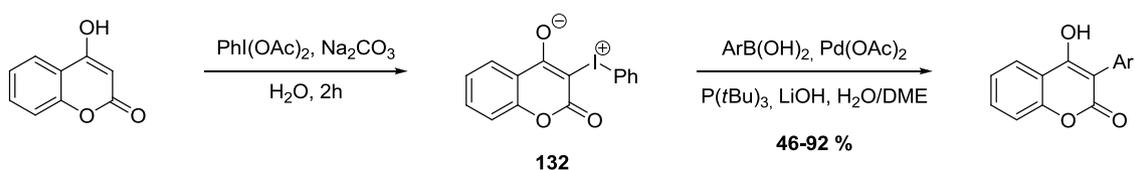


Schéma 47 : synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines par couplage de Suzuki sur un yluire d'iodonium

En 2005, Palmisano a publié une méthode d'arylation à partir de diazocoumarines et de dérivés aromatiques par activation de liaison C-H catalysée par des sels de rhodium Rh(II) dans le but d'effectuer la synthèse totale de la derrusnine (schéma 48).¹³ Cette méthode passe par la synthèse au préalable de la diazocoumarine **134** à partir de la coumarine **133** en présence d'azide de *para*-acetamidobenzenesulfonyle (p-ABSA).¹⁴ Le choix du ligand s'avère important pour la sélectivité de la réaction, et le perfluorobutanoate s'est avéré fournir une excellente sélectivité pour la réaction de couplage entre **134** et 1,3-benzodioxole, donnant la coumarine **135** avec un rendement de 70 %.

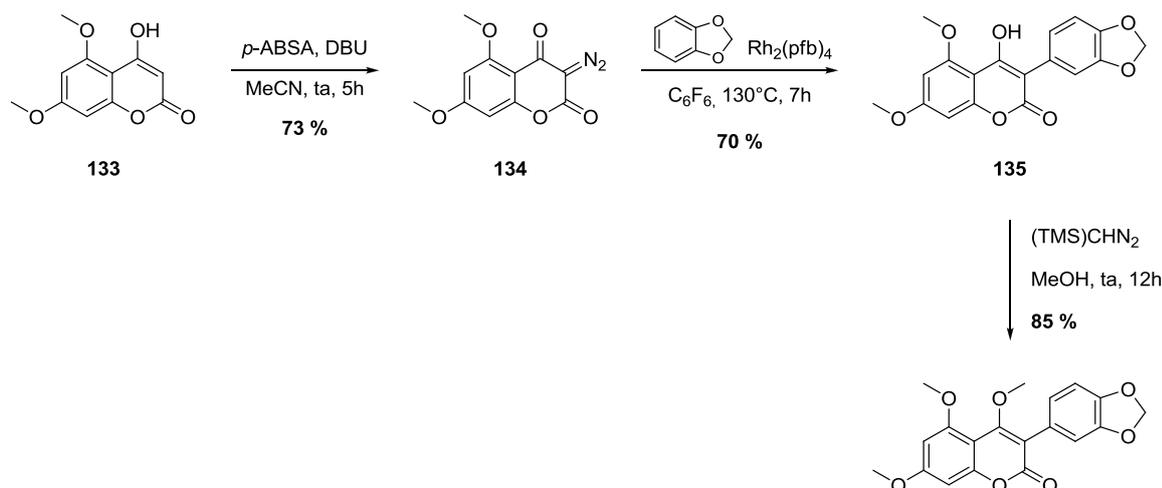


Schéma 48 : synthèse de la derrussine utilisant un couplage au Rh(II) à partir d'une diazocoumarine

Ces trois méthodes utilisent toutes une 4-hydroxycoumarine comme précurseur. La méthode la plus courante pour préparer ces composés consiste à construire le cycle B à partir d'un phénol possédant un groupement acétate en position *ortho* et de carbonate de diéthyle en présence de NaH. Ainsi Palmisano a préparé le composé **133**, précurseur dans la synthèse de la derrussine, en portant à reflux le composé **136** avec un rendement de 83 % (schéma 49).¹³

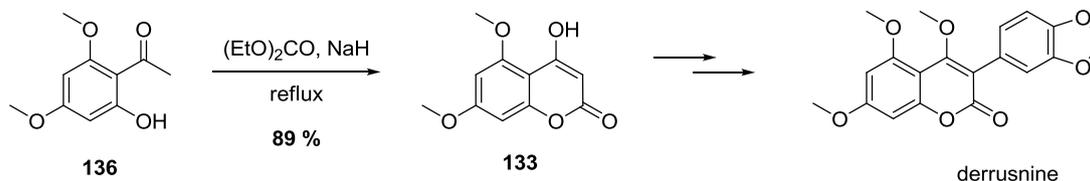


Schéma 49 : synthèse d'une 4-hydroxycoumarine en présence de carbonate de diéthyle

La synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines possédant des fonctionnalisations sur les cycles A et C passe par la construction dans un premier temps du cycle B, puis par l'arylation en C3 par couplage catalysé par des métaux de transition dans un second temps. La méthode employée par Palmisano pour synthétiser la derrussine illustre la stratégie requise pour synthétiser des composés comportant diverses fonctionnalités sur les différents cycles de la molécule.

IV. Synthèse des composés 130 et 131

Les synthèses décrites précédemment pourraient s'appliquer aux synthèses des deux composés **130** et **131**, mais une stratégie de synthèse passant par une cyclisation de Dieckmann nous a paru intéressante car elle nous permettrait d'accéder en un nombre limité d'étapes à nos deux cibles. Elle consiste à introduire le cycle aromatique dans une première étape sur un dérivé de l'acide salicylique correctement fonctionnalisé, puis de réaliser la cyclisation de Dieckmann pour former le motif coumarine (schéma 50). Cette méthode est d'autant plus intéressante qu'il existe de nombreux dérivés d'acide salicylique commerciaux, nous permettant ainsi d'envisager la synthèse de nombreux composés.

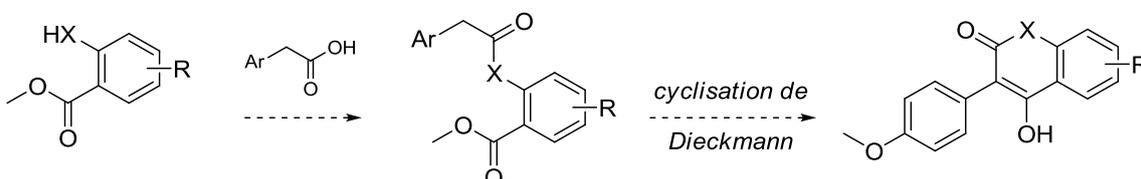


Schéma 50 : nouvelle synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines envisagée

Le précurseur de la cyclisation permettant d'aboutir à **131** a dans un premier temps été préparé par estérification entre le salicylate de méthyle et l'acide 4-méthoxyphénylacétique en utilisant des conditions classiques de couplage (diisopropylcarbodiimide (DIPC) et DMAP en quantité catalytique, schéma 51).¹⁵ L'ester **137** a ainsi été obtenu avec un rendement de 62 %.

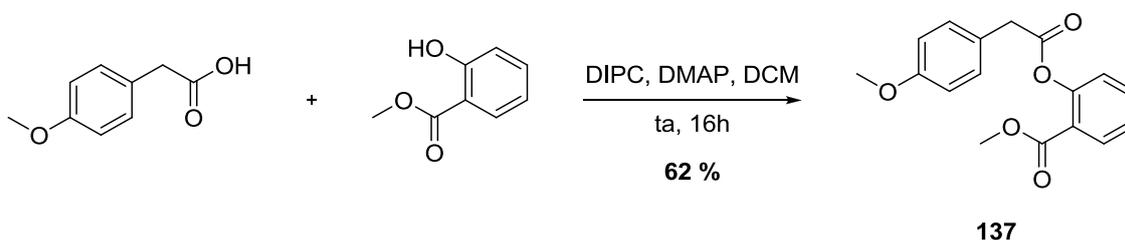


Schéma 51 : synthèse du précurseur de la cyclisation **137**

Un premier essai de cyclisation a été réalisé en présence de LiHMDS à -78°C puis à température ambiante, mais aucune réaction n'a été observée (schéma 52). Un second

essai en présence d'hydruure de sodium à reflux dans le THF a permis, après 5h de réaction, de synthétiser **131** avec un rendement de 17 %.

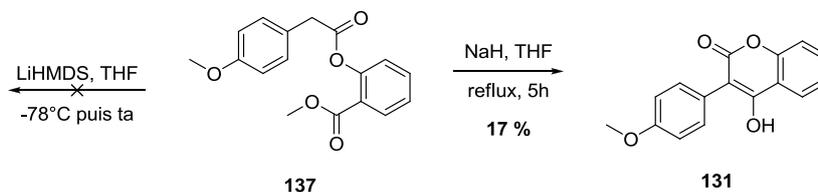


Schéma 52 : synthèse de **131** par condensation de Dieckmann

Le faible rendement de la réaction s'explique en partie par l'existence d'une réaction secondaire qui conduit à la formation d'une cétène (schéma 53). En effet des quantités importantes de salicylate de méthyle ainsi que de l'acide 4-méthoxyphénylacétique et de l'ester méthylique correspondant ont été observées.

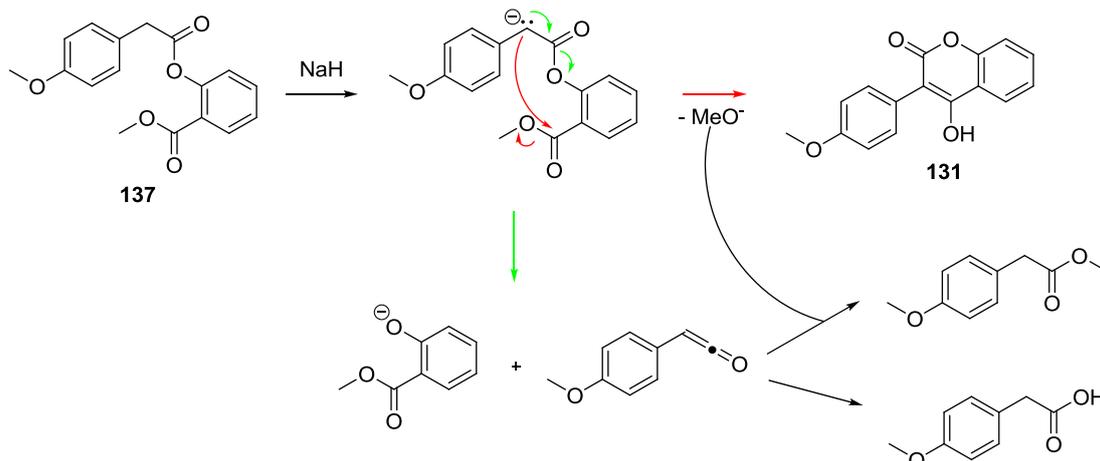


Schéma 53 : réactions secondaires lors de la cyclisation de Dieckmann

La méthode a ensuite été appliquée à la synthèse de la coumarine **130**. Nous avons, dans une première étape, préparé le 6-méthoxysalicylate de méthyle **138** à partir de l'acide 6-méthoxysalicylique par méthylation en présence d'iodure de méthyle et de DBU avec un rendement de 73 % (schéma 54).¹⁶ Le précurseur de la cyclisation **139** a ensuite été préparé dans les conditions décrites précédemment, avec un bon rendement de 72 %. La cyclisation a enfin été réalisée avec un rendement de 19 %.

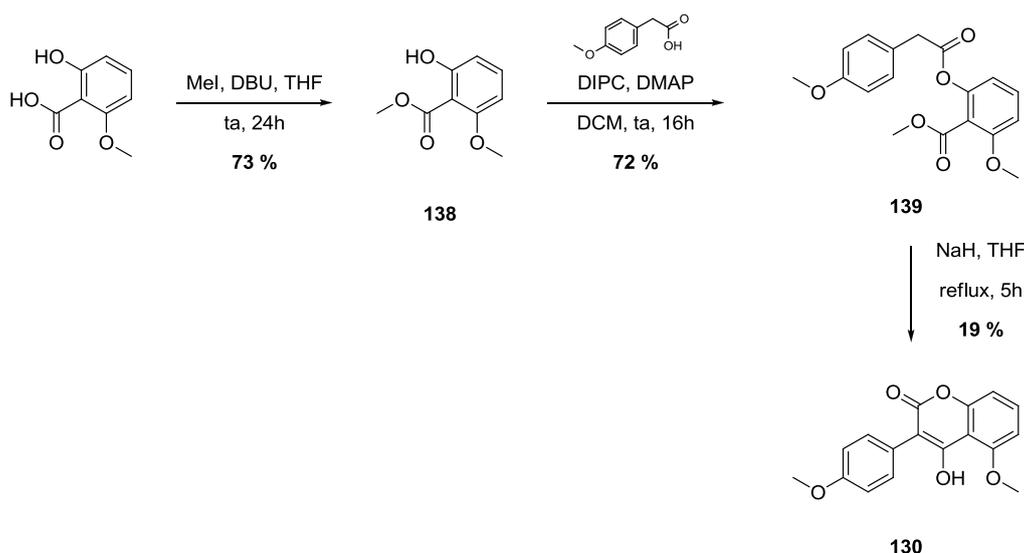


Schéma 54 : synthèse de **130** par la méthode précédemment utilisée

Ces deux composés ayant été synthétisés, nous les avons ensuite testés sur le test de protection de la thymidine oxydée par irradiation UV ou en conditions de Fenton. Les résultats seront présentés et discutés dans le chapitre 4 de ce manuscrit. Ces deux composés ayant présenté des résultats intéressants, nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de nouveaux dérivés possédant différentes fonctionnalités sur les trois cycles des 3-aryl-4-hydroxycoumarines. Nous allons ainsi pouvoir étudier l'influence de la nature et de la position de différents substituants afin de tenter de comprendre les mécanismes de capture et de stabilisation des radicaux.

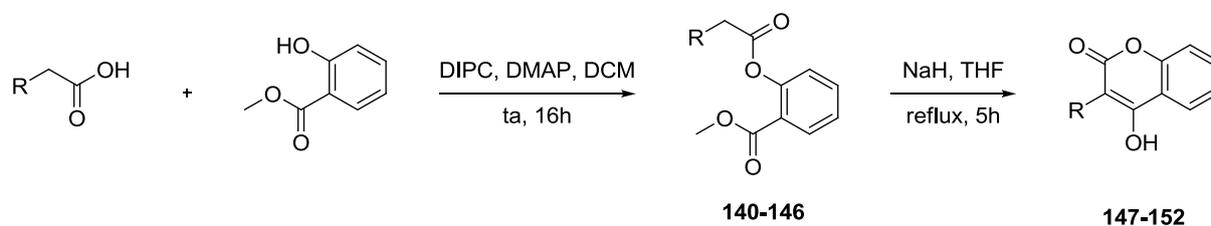
V. Synthèse de nouveaux dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarines

V. 1. Modifications du cycle A

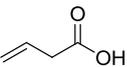
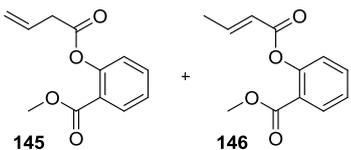
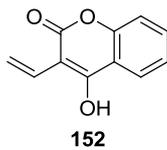
Pour modifier le cycle A, nous avons tout d'abord utilisé la méthodologie développée précédemment. La méthode de synthèse passant par un couplage de Suzuki à partir de sels d'iodonium sera utilisée dans un second temps. Nous sommes ainsi partis de divers dérivés

d'acides arylacétiques, que nous avons couplé sur le salicylate de méthyle, puis nous avons réalisé la cyclisation de Dieckmann dans les conditions précédemment établies (tableau 15).

Tableau 15 : modification du cycle A par une cyclisation de Dieckmann



		estérification		cyclisation	
entrée		ester	Rdt	coumarine	Rdt
1			73 %		30 %
2			49 %		7 %
3			97 %		5 %
4			38 %		11 %
5			0 %		/

6			45 % ^a		0 %
---	---	---	----------------------	---	-----

^a : mélange inséparable de **145** et du produit d'isomérisation de la double liaison **146** (ratio **145/146** = 1/4)

A l'exception du produit **147** qui a été obtenu avec un rendement de 30 % pour l'étape de cyclisation (entrée 1), les rendements sont très faibles dans l'ensemble. Les coumarines **148** à **150** ont été obtenues dans des rendements allant de 5 à 11 % (entrée 2 à 4), toutefois les quantités isolées sont suffisantes pour réaliser l'ensemble des tests biologiques prévus. Nous avons tenté d'introduire un groupement attracteur par l'intermédiaire d'un nitro en position 4', malheureusement l'ester formé **144** est instable et n'a pas pu être isolé (entrée 5). Au départ de l'acide but-3-énoïque, l'ester **145** attendu est isolé en mélange avec le produit de migration de la double liaison en position 2, **146**, dans un ratio 20/80. La structure de **146** a été confirmée par RMN ¹H, avec la présence d'un système caractéristique d'un groupe *trans*-crotyl (figure 46), avec notamment une constante de couplage de 15.6 Hz, caractéristique d'une double-liaison *trans*-disubstituée. Le mélange a toutefois été engagé dans la cyclisation, mais cette réaction a conduit à une dégradation du milieu réactionnel (entrée 6).

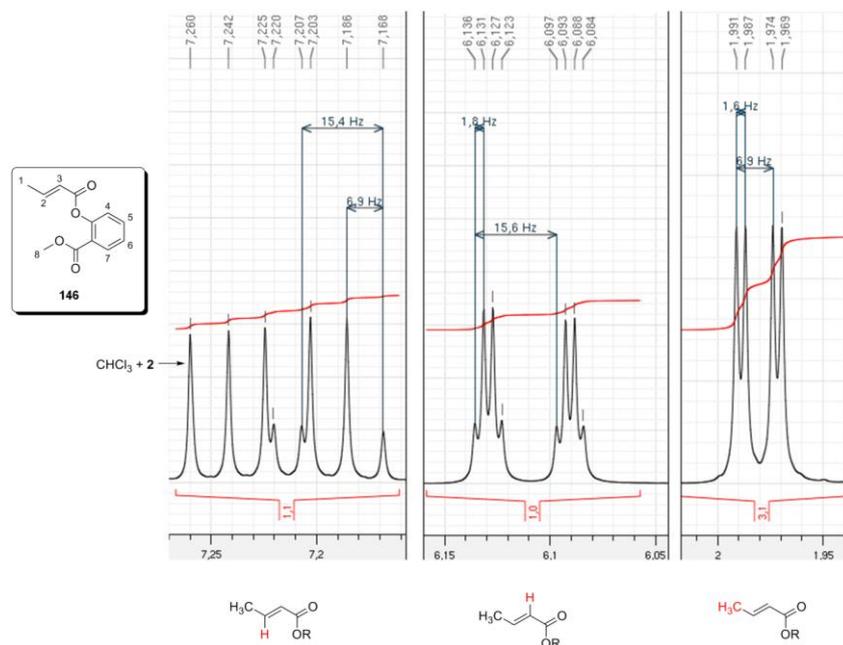
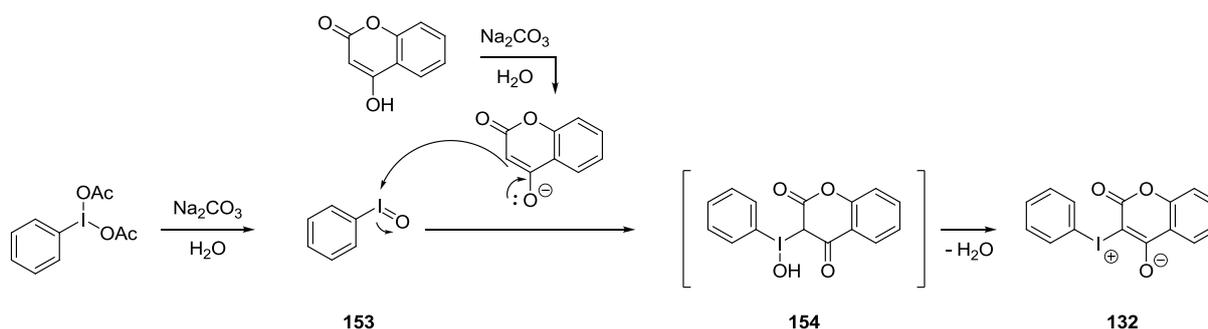
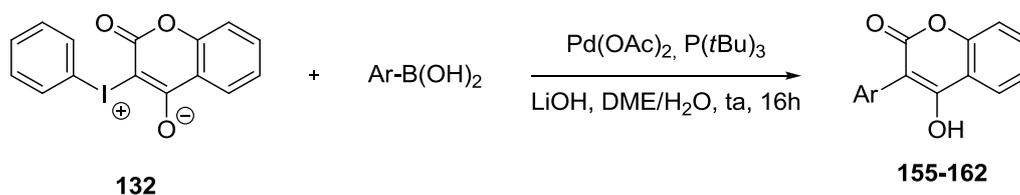


Figure 46 : RMN ¹H du motif crotyl de **146**

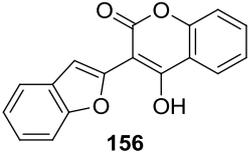
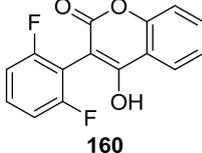
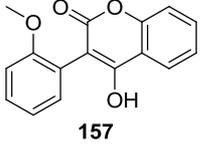
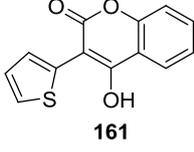
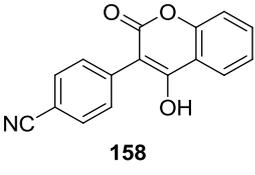
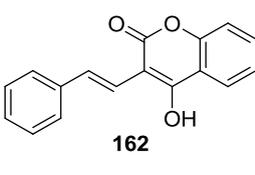
Nous avons ensuite voulu utiliser une réaction de couplage de Suzuki pour introduire de nouveaux groupes aromatiques en position 3 du cycle coumarine. Pour cela, nous avons appliqué la méthode de Zhu et Yang, et synthétisé dans un premier temps le sel d'iodonium **132** à partir de la 4-hydroxycoumarine selon la méthode décrite avec un rendement de 91 %. Le mécanisme de cette réaction passe tout d'abord par l'hydrolyse du diacétoxyiodobenzène en iodosobenzène **153**, puis l'attaque nucléophile de l'anion de la 4-hydroxycoumarine conduit à l'intermédiaire **154** (schéma 55).¹⁷ Celui-ci, par déshydratation, conduit au zwitterion **132**.

Schéma 55 : mécanisme de formation du sel d'iodonium **132**

Le précurseur **132** a ensuite été mis en réaction avec différents acides boroniques commerciaux. Le tableau 16 résume les essais réalisés et les dérivés obtenus.

Tableau 16 : essais de couplage de Suzuki au départ du sel d'iodonium **132**

entrée	coumarine	Rdt	entrée	coumarine	Rdt
1	 155	35 %	5	 159	0 %

2		47 %	6		0 %
3		37 %	7		0 %
4		0 %	8		0 %

L'analogue **155** possédant un groupe méthylthio à la place du méthoxy a été obtenu avec un rendement de 35 % (entrée 1). Les composés **156** et **157** (entrées 2 et 3), décrits dans la littérature,¹² ont été obtenus avec des rendements inférieurs à ceux décrits (respectivement 47 % et 37 % contre 80 % et 82 % dans la littérature). Le composé **159** a également été décrit dans les travaux de Zhu et Yang, mais après une nuit à température ambiante aucune conversion n'a été observée (entrée 5). Le sel d'iodonium étant thermo-instable, une augmentation de la température n'a pas été tentée. Les autres acides boroniques employés n'ont jamais conduit au produit attendu, mais dans chaque cas la 4-hydroxycoumarine a été observée (entrées 4, 6, 7 et 8).

En conclusion, nous avons synthétisé différents dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarine possédant divers substituants sur le cycle aromatique en position 3. Nous pourrions ainsi voir l'influence de la position d'un groupe méthoxy (**131**, **149**, **157**, figure 47), l'ajout d'un méthoxy supplémentaire (**147**), l'influence du groupe en para du cycle coumarine (**131**, **148**, **150**, **155**) et l'influence d'un hétérocycle (**156**).

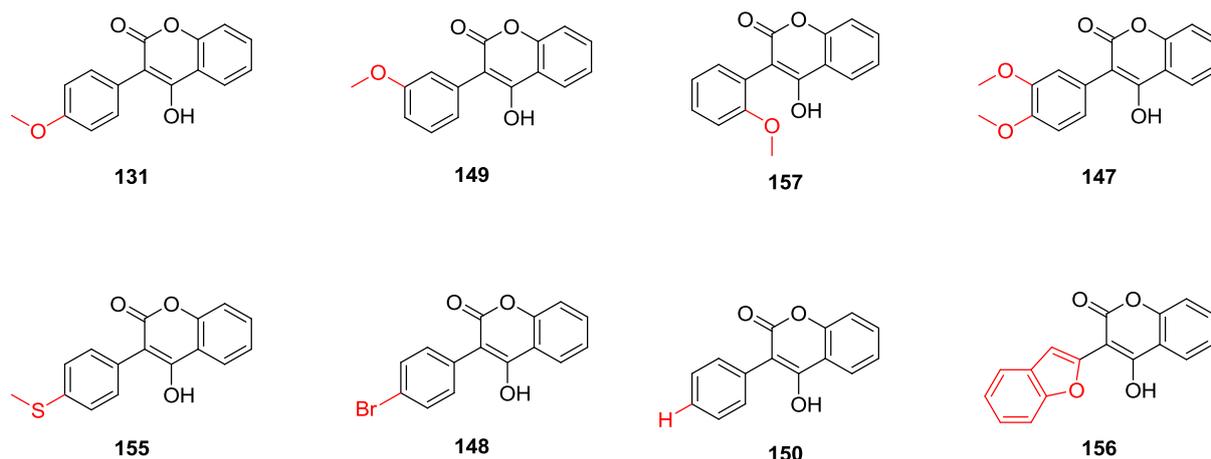


Figure 47 : coumarines synthétisées possédant différentes modifications sur le cycle A

V. 2. Modifications du cycle B

Notre hypothèse selon laquelle les 4-hydroxycoumarines captent les radicaux libres sur l'énol du cycle B est basée sur les similarités structurales avec les acides pulviques. Pour vérifier que cette capture se fait bien par rupture homolytique de la liaison O-H de cet énol, nous avons bloqué cette liaison en méthylant la fonction 4-hydroxy en présence de sulfate de diméthyle (schéma 56). **163** a ainsi été obtenu avec un rendement de 78 %.

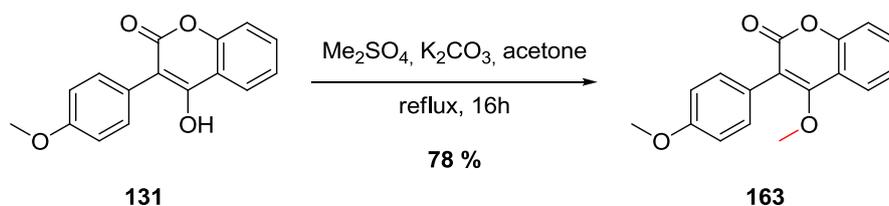


Schéma 56 : synthèse de la 4-méthoxycoumarine **163**

Nous avons ensuite souhaité remplacer la lactone par une lactame. Pour cela, l'amide **164** a été préparé au départ de l'antranilate de méthyle et du chlorure de 4-méthoxyphénylacétyl avec un rendement de 80 % (schéma 57). La cyclisation a ensuite été effectuée comme décrite précédemment, et le composé **165** a été obtenu avec un rendement de 22 %.

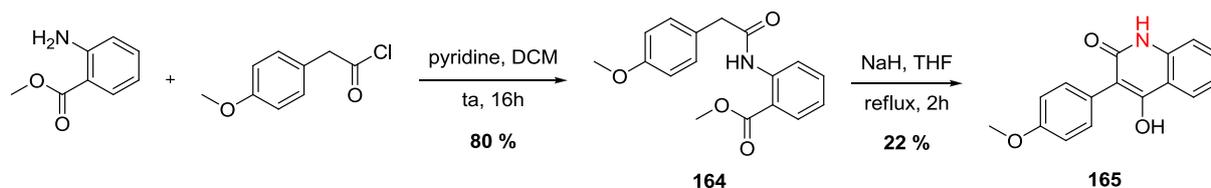


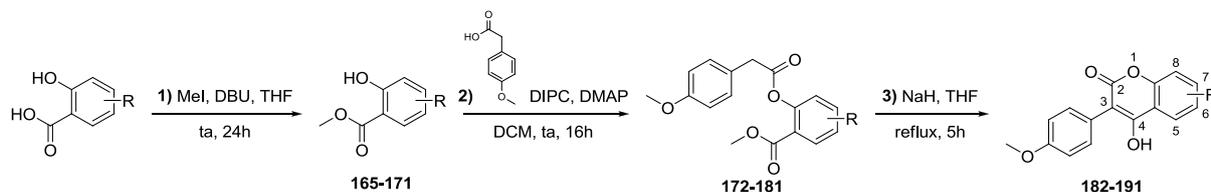
Schéma 57 : synthèse de la lactame 165

Ces deux nouveaux dérivés vont nous permettre de confirmer ou non l'hypothèse selon laquelle la capture et la stabilisation du radical se déroule sur le cycle B, comme dans le cas des acides pulviques.

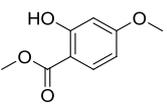
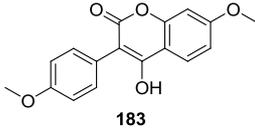
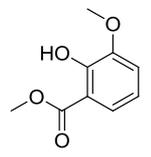
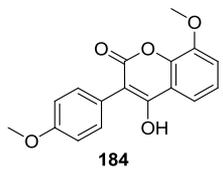
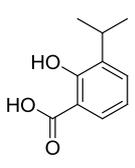
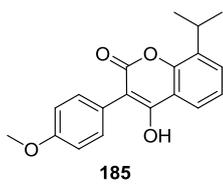
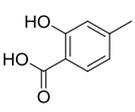
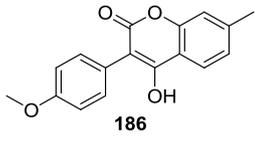
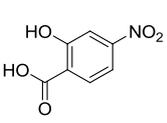
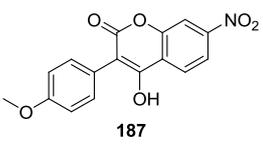
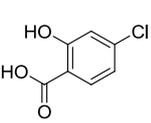
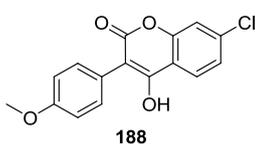
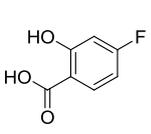
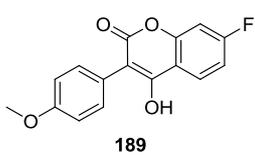
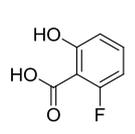
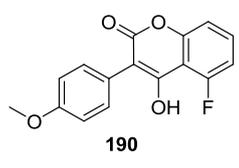
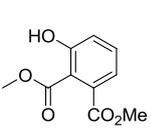
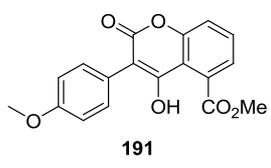
V. 3. Modifications du cycle C

La diversité fonctionnelle sur le cycle C a été introduite par la méthode passant par une cyclisation de Dieckmann. Ceci a été fait au départ de dérivés du salicylate de méthyle ou de l'acide salicylique commerciaux. Lorsque l'ester méthylique n'était pas disponible, celui-ci était synthétisé à partir de l'acide correspondant par méthylation avec de l'iodure de méthyle.¹⁶ Le tableau 17 présente les molécules et essais réalisés.

Tableau 17 : synthèse de coumarines dérivatisées sur le cycle C



entrée	acide/ester de départ	produit final	Rdt 1)	Rdt 2)	Rdt 3)
1			/	87 %	38 %

2		 183	/	83 %	14 %
3		 184	/	99 %	0 %
4		 185	99 %	18 %	29 %
5		 186	99 %	57 %	23 %
6		 187	99 %	45 %	7 %
7		 188	94 %	27 %	20 %
8		 189	60 %	69 %	14 %
9		 190	48 %	61 %	25 %
10		 191	/	87 %	0 %

Nous avons en premier lieu fait varier la position du groupe méthoxy. Le composé **130** avec le méthoxy en position 5 ayant déjà été synthétisé précédemment, nous avons ensuite introduit le méthoxy en position 6 et obtenu **182** avec un bon rendement de cyclisation (38 %, entrée 1). L'introduction du méthoxy en position 7 n'a pas posé de problème malgré un rendement plus faible pour la dernière étape (14 %, entrée 2), cependant nous n'avons pas réussi à synthétiser le composé **184**, la cyclisation n'ayant pas eu lieu (entrée 3). Un groupement isopropyl a en revanche pu être introduit, et **185** a été synthétisé avec un bon rendement de cyclisation mais avec un mauvais rendement d'estérification (respectivement 29 % et 18 %, entrée 4). Ensuite nous avons cherché à faire varier les substituants sur une même position. Ainsi un méthyle a été introduit, et **186** a été obtenu avec de modestes rendements d'estérification et de cyclisation (57 % et 23 % respectivement, entrée 5). Une fonction nitro a ensuite été introduite pour conduire à **187**, avec un rendement de cyclisation moins bon que précédemment observé (7 %, entrée 6). Des atomes d'halogène ont enfin été introduits, ainsi **188** possédant un atome de chlore et **189** possédant un atome de fluor ont été synthétisés (entrées 7 et 8). Enfin un dernier dérivé possédant un atome de fluor en position 4, **190**, a été synthétisé (entrée 9). Une tentative pour introduire une fonction ester en position 4 a été réalisée, mais la cyclisation a conduit à une dégradation du milieu réactionnel et **191** n'a pas pu être obtenu (entrée 10). Nous rappelons dans la figure 48 ci-dessous les composés préparés possédant une diversité sur le cycle C :

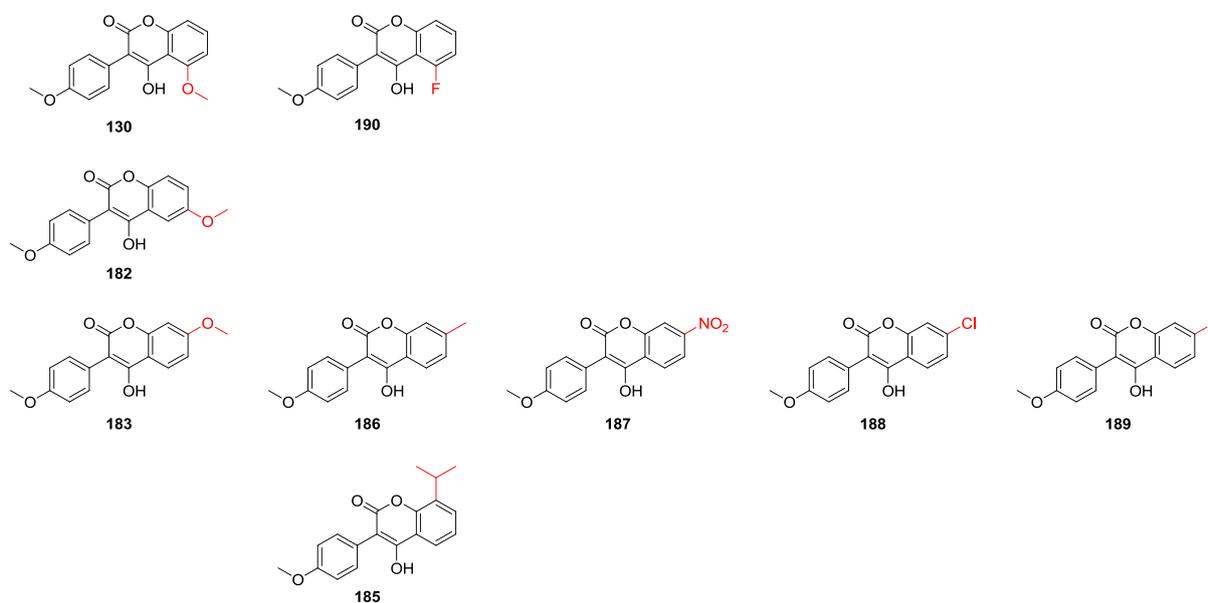


Figure 48 : composés préparés possédant une diversité sur le cycle C

V. 4. Conclusion

En conclusion de cette partie, nous avons synthétisé plusieurs dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarines, possédant des variations sur chacun des 3 cycles. Nous pourrions ainsi étudier l'influence sur l'activité antioxydante de différents substituants sur chacun des cycles A et C, ainsi que la position de certains de ces groupes. Nous pourrions également confirmer ou non l'hypothèse selon laquelle la capture du radical se fait bien sur le cycle B à l'aide des composés **163** et **165**.

Nous avons dans cette partie utilisé une stratégie de synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines mettant en jeu une cyclisation de Dieckmann dans des conditions non optimisées. Très récemment en 2010, Lokhande et al. ont publié une stratégie identique,¹⁸ dont la cyclisation se fait en présence d'hydroxyde de potassium dans la pyridine (schéma 58). Par cette méthode le composé **150** a été préparé avec un rendement de 90 %.

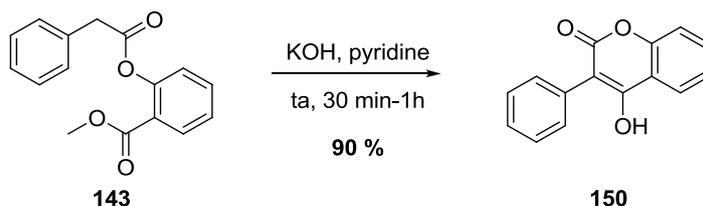


Schéma 58 : synthèse du composé **150** utilisant une cyclisation de Dieckmann par Lokhande

VI. Synthèse de composés combinant les substituants donnant la meilleure activité sur le test au DPPH

L'ensemble des composés précédemment synthétisés a été testé sur un test antioxydant courant, le test d'inhibition du radical DPPH (radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, ce test sera décrit dans le chapitre IV de ce manuscrit). Les résultats de ce test et les discussions seront présentées dans le chapitre 4 de ce manuscrit. Ce test a permis de mettre en évidence les substituants conduisant à une meilleure activité sur ce test :

- cycle A : cycle 3,4-diméthoxyphényle **147**,
- cycle B : composé **131**,

- modification du cycle C : groupes 7-méthoxy et 7-méthyle (**183** et **186**) (substituant en position 7) et 5-fluoro (**190**)

Pour le meilleur substituant en position 7 sur le cycle C, nous retiendrons le composé **183**. En effet, **183** et **186** ont des activités très voisines, mais la fonction méthoxy pouvant être aisément fonctionnalisée dans l'éventualité d'une nouvelle dérivatisation de ces structures, **183** sera préféré. Les meilleures structures et les structures envisagées seront alors les suivantes (figure 49) :

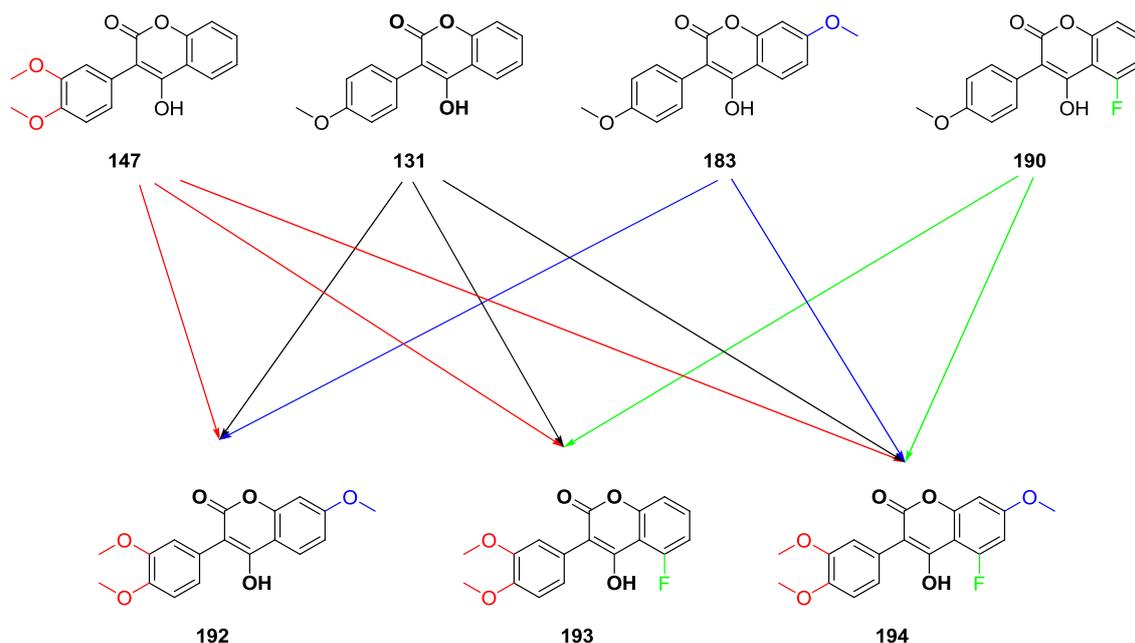


Figure 49 : nouvelles structures améliorées envisagées

Les composés **192** et **193** seront synthétisés en deux étapes au départ respectivement du 4-méthoxysalicylate de méthyle et de l'acide 6-fluorosalicylique commerciaux (schéma 59). La synthèse du composé **194** se fera quant à elle au départ du 6-fluoro-4-méthoxysalicylate de méthyle **195**. Ce composé, ainsi que l'acide correspondant, n'étant pas commerciaux, il sera préparé en quatre étapes au départ du 1-fluoro-3,5-diméthoxybenzène.

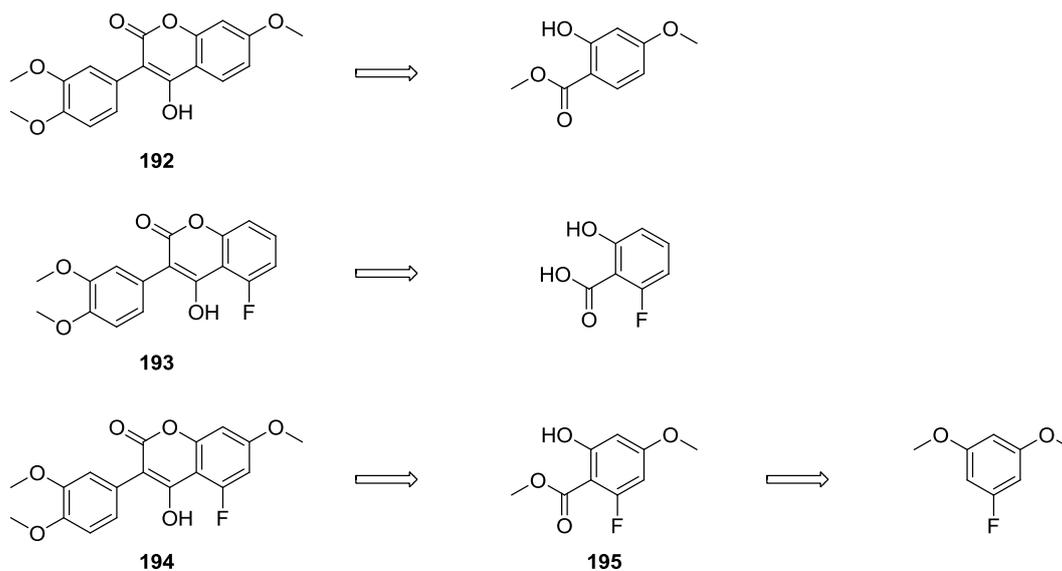
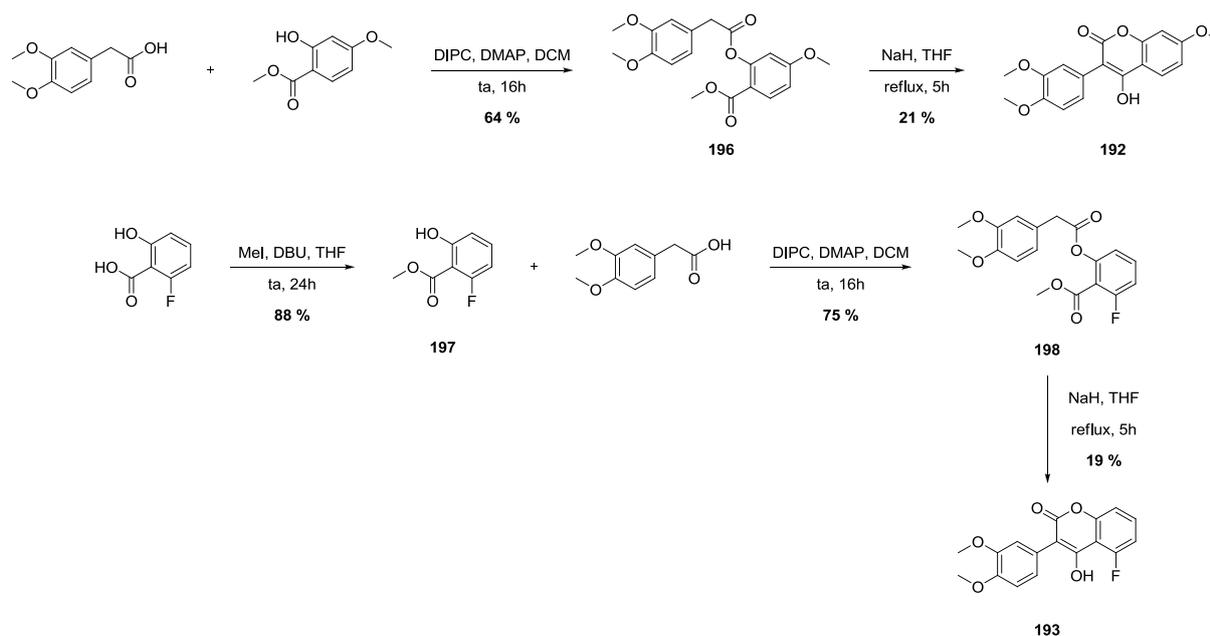


Schéma 59 : rétrosynthèses envisagées des trois structures améliorées **192**, **193** et **194**

Le composé **192** a été synthétisé en deux étapes à partir de l'acide 4-méthoxyphénylacétique et le 4-méthoxysalicylate de méthyle par estérification avec un rendement de 64 %, puis la cyclisation a été réalisée avec un rendement de 21 % (schéma 60). Le composé **193** a quant à lui été synthétisé en trois étapes à partir de l'acide 6-fluorosalicylique par méthylation suivie d'une estérification avec l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique avec un rendement de 75 %. La cyclisation a finalement conduit à la coumarine **193** avec un rendement de 19 %.

Schéma 60 : synthèses des coumarines améliorées **192** et **193**

La synthèse de **194** débute avec la formylation du 3,5-diméthoxy-1-fluorobenzène selon une réaction de Vilsmeier-Hack décrite par Stanjek et Boland (schéma 61).¹⁹ Un mélange inséparable des deux isomères **199** et **200** a été récupéré avec un rendement de 79 %. Les deux produits sont présents dans un ratio 8/2 en faveur de l'isomère désiré **199**, déterminé par intégration des signaux des fonctions aldéhyde en RMN ¹H. Le mélange a ensuite été oxydé pour fournir un mélange des deux acides correspondants **201** et **202**. Le brut réactionnel a ensuite été méthylié en présence de sulfate de diméthyle pour fournir les esters **203** et **204**. Ceux-ci sont séparables par chromatographie sur gel de silice, et **203** a pu être isolé avec un rendement de 63 %. La déprotection sélective du méthoxy en *ortho* de l'ester a pu être réalisée en présence d'un équivalent de trichlorure de bore à -78°C,²⁰ ainsi **195** a été synthétisé avec un rendement de 87 %. La structure de **195** a été confirmée par RMN NOESY. La suite de la synthèse a été réalisée comme précédemment, avec une estérification avec l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique pour fournir l'ester **205** avec un rendement de 53 %. La cyclisation donne finalement accès à la coumarine **194** avec un rendement de 8 %.

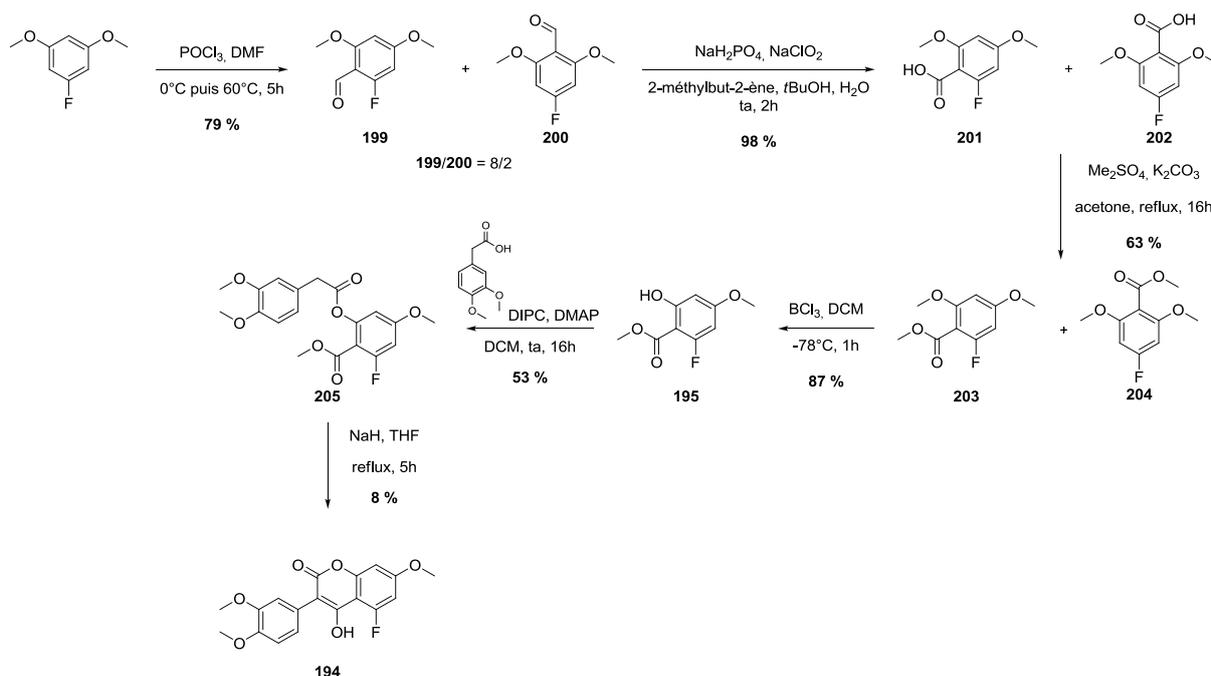


Schéma 61 : synthèse de la coumarine 194

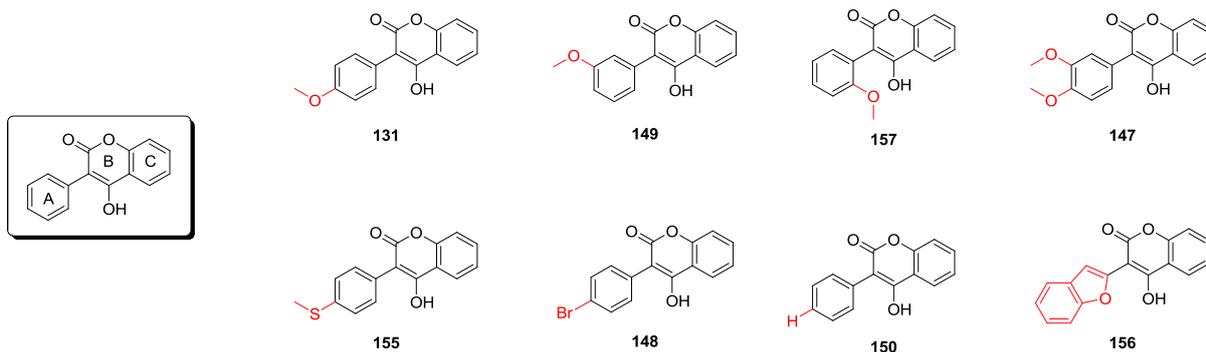
VII. Conclusions

Le modèle de prédiction nous a permis de mettre en évidence la famille des 3-aryl-4-hydroxycoumarines. Une première évaluation de l'activité de 2 composés, **130** et **131**, a confirmé la validité du modèle. Nous avons alors entrepris d'étudier plus profondément ces composés. Pour cela, la structure a été divisée en trois parties, correspondant aux trois cycles présents sur le motif 3-aryl-4-hydroxycoumarine, et plusieurs dérivés ont ainsi été synthétisés afin de réaliser une étude de relation structure-activité. Une étude préliminaire sur un test antioxydant courant, le test de capture du radical DPPH, nous a permis de déterminer les substituants les plus intéressants et de synthétiser trois molécules améliorées, prenant en compte les meilleurs groupements de chacun des trois cycles.

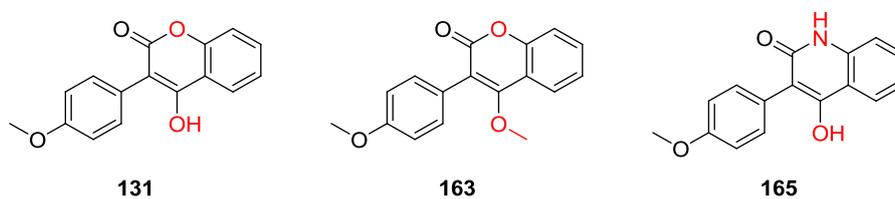
Ces molécules seront évaluées *in vitro* sur différents tests antioxydants et radioprotecteurs. Les résultats seront présentés dans le chapitre 4 de cette thèse.

L'ensemble des dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarines synthétisés est présenté dans la figure 50.

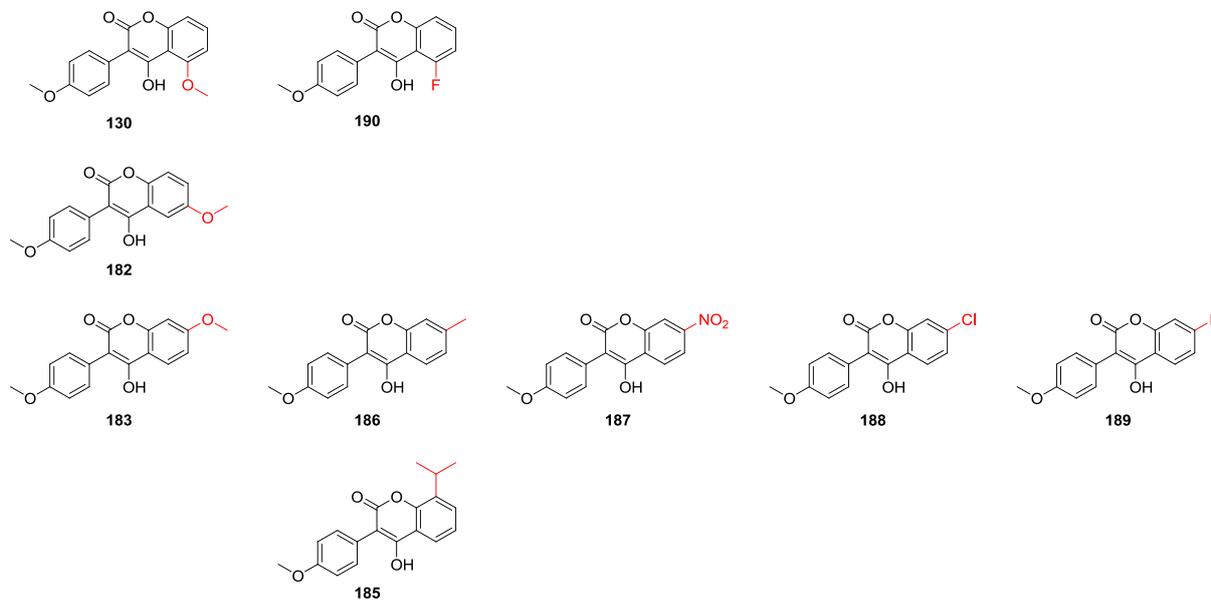
Dérivatisation sur le cycle A :



Dérivatisation sur le cycle B :



Dérivatisation sur le cycle C :



Structures améliorées :

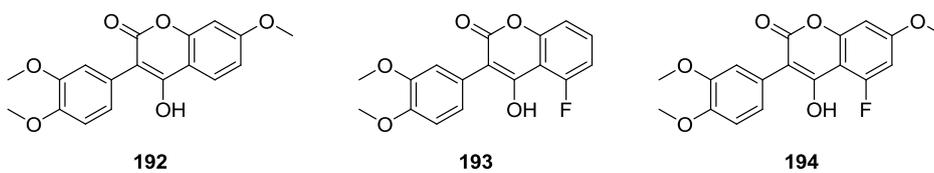


Figure 50 : différents dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarines synthétisés

Références bibliographiques du chapitre 3 :

- ¹ D. H. Rouvray, D. Bonchev, *Chemical graph theory : introduction and fundamentals*. Tunbridge Walls, Kent, England (1991)
- ² V. K. Agrawal, P. V. Khadikar, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3035-3040
- ³ S. Meunier, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault, D. Boquet, C. Créminon, E. Saint-Aman, A. Valleix, F. Taran, C. Mioskowski, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 832-840
- ⁴ S. Meunier, M. Hanédanian, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault, D. Boquet, C. Créminon, C. Mioskowski, F. Taran, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1234-1241
- ⁵ R. Bosque, J. Sales, *J. Comb. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 637-642
- ⁶ B. F. Rasulev, N. D. Abdullaev, V. N. Syrov, J. Leszczynski, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 1056-1065
- ⁷ J. Zupan, J. Gasteiger, *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*, Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 1999
- ⁸ B. Van Zanten, W. T. Nauta, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1960**, *79*, 1211
- ⁹ D. H. R. Barton, D. M. X. Donnelly, J.-P. Finet, P. H. Stenson, *Tet.* **1988**, *44*, 6387-6396
- ¹⁰ D. H. R. Barton, D. M. X. Donnelly, J.-P. Finet, P. J. Guiry, *Tet. Lett.* **1989**, *30*, 1539-1542
- ¹¹ L. C. Willemsens, D. de Vos, J. Spierenburg, J. Wolters, *J. Organomet. Chem.* **1972**, *39*, C61-C62
- ¹² Q. Zhu, J. Wu, R. Fathi, Z. Yang, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3333-3336
- ¹³ L. Goldoni, G. Cravotto, A. Penoni, S. Tollari, G. Palmisano, *Synlett* **2005**, *6*, 927-930
- ¹⁴ D. F. Taber, K. You, J. Song, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1093
- ¹⁵ R. Shen, C. T. Lin, E. J. Bowman, B. J. Bowman, J. A. Porco, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7889-7901
- ¹⁶ M. Li, G. A. O'Doherty, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6087-6090
- ¹⁷ R. M. Moriarty, B. R. Bailey, O. Prakash, I. Prakash, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1375-1378
- ¹⁸ K. Taksande, D. S. Borse, P. Lokhande, *Synth. Comm.* **2010**, *40*, 2284-2290
- ¹⁹ V. Stanjek, W. Boland, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 1596-1607
- ²⁰ H. Wehlan, E. Jezek, N. Lebrasseur, G. Pavé, E. Roulland, A. J. P. White, J. N. Burrows, A. G. M. Barret, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8151-8158

Chapitre 4

*Evaluation biologique des activités
antioxydantes et radioprotectrices*

Chapitre 4 : Evaluation biologique des activités antioxydantes et radioprotectrices

Dans ce chapitre sont présentés les résultats obtenus à l'aide des différents tests utilisés au cours de ces travaux de thèse. La plupart des tests antioxydant consistent à étudier la disparition ou la formation d'un produit spécifique dans un milieu soumis à un stress oxydant, cependant chaque test permet d'étudier l'évolution d'une seule espèce oxydante à la fois. Aussi les résultats issus de chaque test ne peuvent donner que des informations partielles. Il est donc utile de réaliser différents tests antioxydants afin d'apprécier au mieux la capacité réelle de protection d'un composé. Les synthèses présentées précédemment nous ont permis d'aboutir à plusieurs dérivés de deux familles différentes, des dérivés d'acides pulviniques d'un côté et des dérivés de 3-aryl-4-hydroxycoumarines de l'autre. Dans une première partie nous allons présenter les différents tests d'activité antioxydante qui ont été utilisés, à savoir les tests de capture des radicaux stables DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), le test de peroxydation lipidique, le test de la protection de la thymidine sous les trois conditions de stress oxydant (UV, Fenton et radiolyse), et enfin un test de radioprotection sur culture cellulaire soumise à une irradiation par des rayons X. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus avec certains dérivés d'acide pulvinique synthétisés sur les tests antioxydants avant d'étudier l'activité radioprotectrice sur culture cellulaire. Les résultats obtenus avec les coumarines seront présentés dans une dernière partie. Ces données seront ensuite utilisées pour une comparaison avec les activités prédites par QSPR.

I. Tests antioxydants et radioprotecteurs employés¹

I. 1. Test de capture du radical DPPH^{2, 3}

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (noté DPPH) est un radical azoté stable disponible commercialement sous la forme d'un solide. Lorsqu'il est mis en solution dans l'éthanol, le radical DPPH est caractérisé par son spectre UV avec un maximum d'absorbance à 517 nm.

Le DPPH réagit avec un antioxydant par arrachement d'un hydrogène, il se forme alors la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine DPPH₂ (schéma 62), qui ne possède plus d'absorbance à 517 nm. Ce test consiste donc à suivre la variation de l'absorbance à 517 nm en présence du composé à étudier.

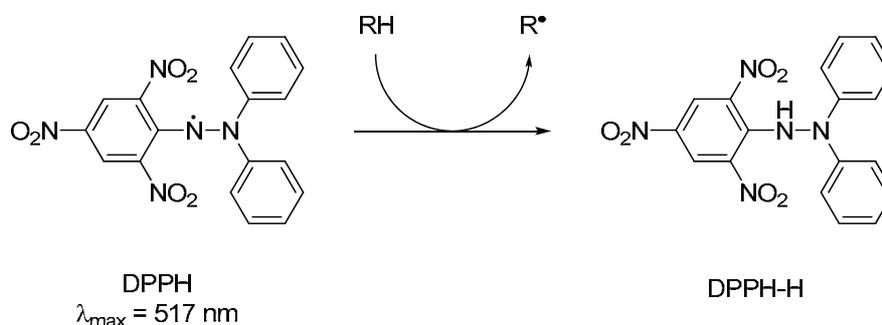


Schéma 62 : test de capture du radical DPPH

Dans le cas de composés de type phénoliques, deux mécanismes peuvent intervenir : un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (ou hydrogen atom transfer, HAT) et un mécanisme séquentiel déprotonation-transfert d'électron (ou sequential proton loss-electron transfer, SPLET) (figure 51).⁴ Dans le premier cas, le proton de l'antioxydant est directement transféré au DPPH, tandis que dans le second cas, le proton phénolique est perdu par échange acido-basique avec le milieu, puis le radical DPPH va ensuite capturer un électron de la charge négative portée par le phénolate. Ce second mécanisme sera très dépendant du solvant utilisé. De par ce mécanisme l'état de protonation de la fonction énol responsable de l'activité antiradicalaire aura une influence sur la capture du radical DPPH.

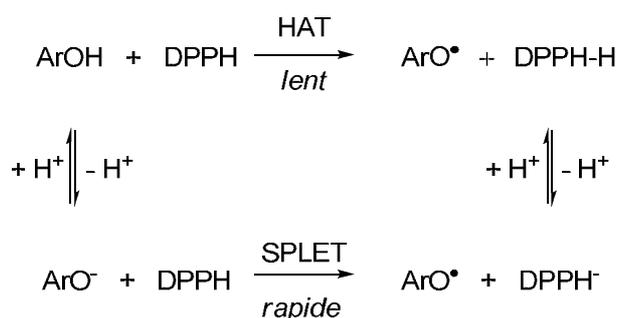


Figure 51 : mécanismes HAT et SPLET dans le cas de dérivés phénoliques

I. 2. Test à l'ABTS

Le dianion 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (noté ABTS^{2-}) est un sel incolore, de sodium ou d'ammonium, qui par oxydation par du persulfate de potassium va former un radical cation stable (schéma 63).^{5, 6} Ce radical coloré possède un maximum d'absorption à 734 nm.

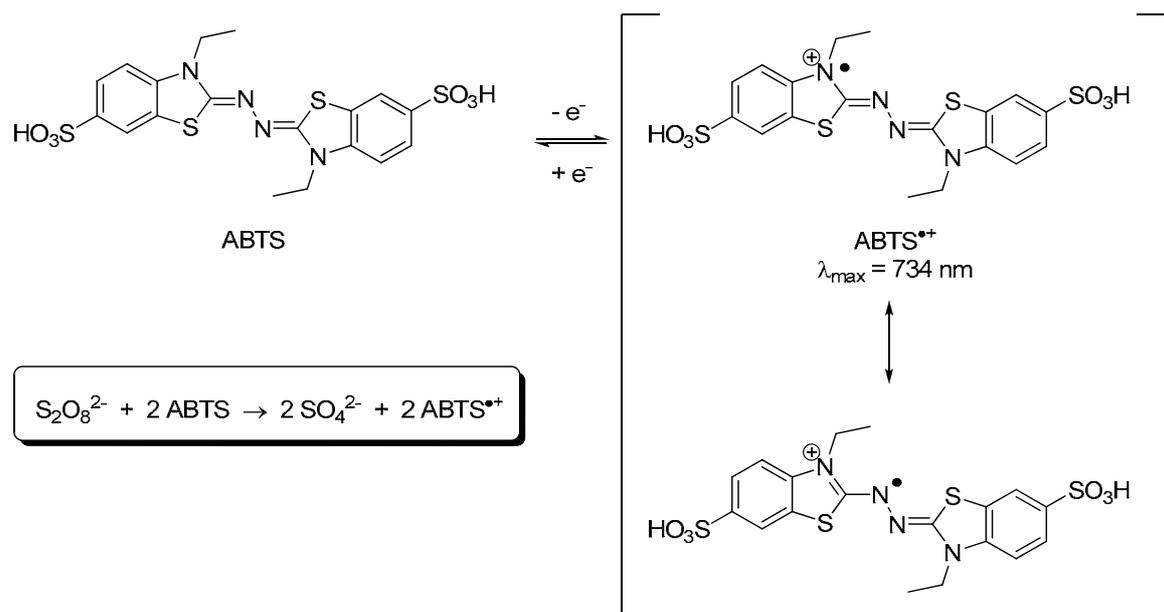


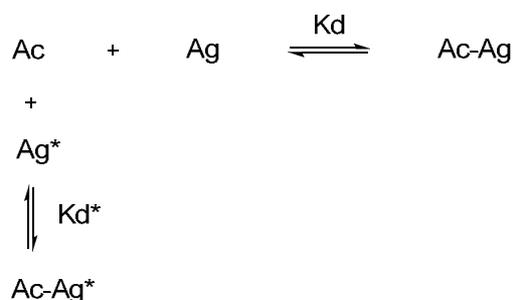
Schéma 63 : test à l'ABTS

L'inhibition du radical stable dépend de l'activité de l'antioxydant, mais également du temps et de la concentration. En pratique, à une solution d'ABTS à 7 mM dans l'eau est ajoutée une solution de persulfate de potassium à 140 mM pour obtenir une concentration finale de 3.5 mM. Le mélange est agité une nuit dans le noir à température ambiante pour former le radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Avant utilisation, la solution est diluée pour obtenir une absorbance de 0.70 (± 0.02) à 740 nm et à 30°C, pour un volume final de 300 μL . La solution obtenue est stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante. La solution diluée de radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est ajoutée à des solutions du composé à tester à des concentrations variables. Pour chaque concentration, l'absorbance est mesurée jusqu'à obtention d'un plateau. Le pourcentage de réduction du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est calculé selon la formule suivante : $Q = 100 * (A_0 - A_c) / A_0$, avec A_0 l'absorbance initiale en absence de composé à tester, et A_c l'absorbance mesurée au temps t. Une courbe représentant la variation de la valeur de Q en fonction de la concentration du composé testé est alors tracée.

Cela permet de déterminer l'EC₅₀, concentration pour laquelle l'absorbance à 740 nm a diminué de 50%.

I. 3. Test de protection de la thymidine

Ce test consiste à évaluer la protection d'une cible biologique, la thymidine, un des quatre nucléotides de l'ADN, soumise à un stress oxydant.^{8, 9} Dans ce test nous mesurons la quantité intacte de thymidine restant après oxydation. Il convient alors de disposer d'une méthode de mesure très sélective envers la thymidine. Les techniques d'immunoanalyses étant tout à fait adaptées pour réaliser la quantification d'un produit au sein de milieux complexes, ce test sera donc basé sur un **dosage immunoenzymatique par compétition**. Ce dosage consiste à déterminer la concentration en antigène (noté Ag, ici la thymidine) dans un milieu complexe grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique de Ag (noté Ac) et d'un antigène marqué (Ag*), dont on peut mesurer la concentration, ici il s'agira d'une thymidine sur laquelle a été greffée un fluorophore. Considérons maintenant un mélange Ac/Ag/Ag*. Si la concentration en 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 constantes les concentrations en Ac et Ag*, l'augmentation de la concentration en antigène Ag entrainera l'augmentation de la concentration en complexe Ac-Ag, au détriment du complexe Ac-Ag*. La concentration [Ac-Ag*] sera donc inversement proportionnelle à la concentration [Ag] dans le milieu.

L'antigène marqué est un analogue de la thymidine, auquel on a greffé l'enzyme acétylcholinestérase, notée AChE. La méthode utilisée pour déterminer la concentration [Ac-Ag*] est la méthode colorimétrique d'Ellman.¹⁰ L'enzyme AChE va être utilisée pour dégrader l'acétylthiocholine, dont le produit de dégradation va réagir avec le DTNB (ou acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque), schéma 64). Le produit de réaction du DTNB est un thiol

aromatique est un chromophore qui absorbe dans le visible ($\lambda_{\text{max}} = 414 \text{ nm}$). Le suivi par colorimétrie de la concentration en thiol permet donc de déduire la concentration $[\text{Ac-Ag}^*]$ et donc d'en déduire la quantité intacte de thymidine restant dans le milieu et donc le pourcentage de protection du composé testé.

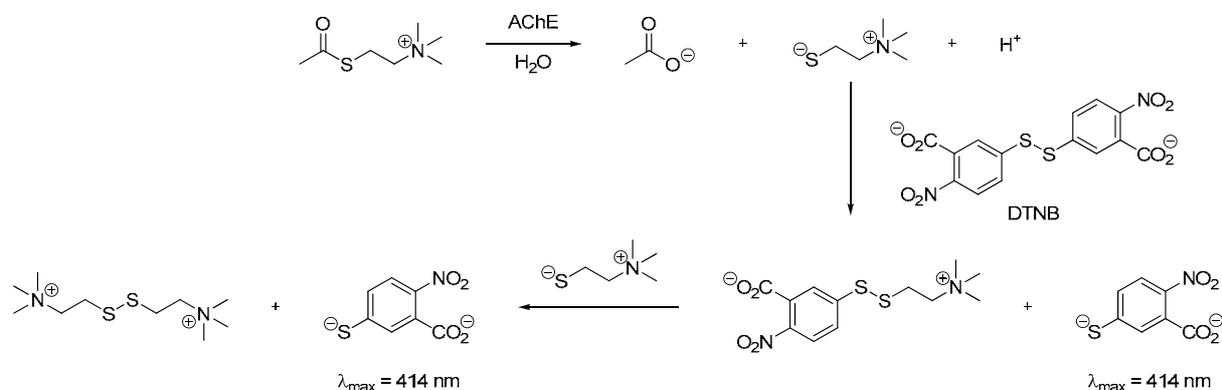


Schéma 64 : méthode colorimétrique d'Ellman

Le test est réalisé en deux étapes successives, effectuées dans deux plaques différentes (figure 52) :

- dans un premier temps, une solution de thymidine et une solution du composé à étudier sont introduites dans les puits de la plaque I, puis ce mélange est soumis à l'un des trois stress oxydants.
- dans un second temps, une quantité bien définie de solution de chacun des puits est transférée dans la plaque II. Celle-ci a été préalablement recouverte d'un anticorps de chèvre capable de reconnaître les immunoglobulines de souris. Dans chaque puits on introduit l'anticorps de souris Ac et l'antigène marqué Ag^* . L'anticorps Ac va alors se fixer sur la phase solide, et la compétition vis-à-vis des sites de liaison entre Ag et Ag^* va alors avoir lieu. Au bout de deux heures à température ambiante, l'équilibre est atteint, et une phase de lavage permet d'éliminer toutes les espèces non fixées sur la phase solide. Enfin le réactif d'Ellman est ajouté pour réaliser la réaction enzymatique et permettre de mesurer la concentration $[\text{Ac-Ag}^*]$ et ainsi déterminer la quantité de thymidine intacte.

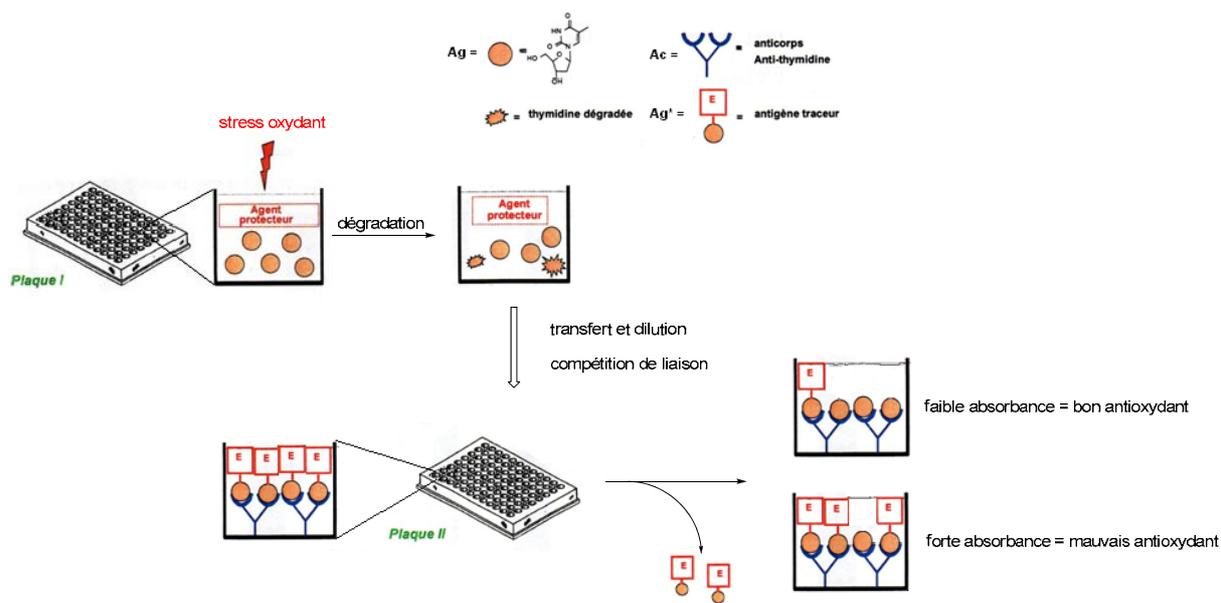


Figure 52 : principe du test de protection de la thymidine

Il est alors possible d'en déduire le pourcentage de protection par la formule suivante :

$$\%_{\text{prot}} = \frac{[\text{Thy}]_{A0} - [\text{Thy}]_{\text{ox}}}{[\text{Thy}]_{\text{ini}} - [\text{Thy}]_{\text{ox}}} * 100$$

avec : $[\text{Thy}]_{A0}$ = concentration de thymidine mesurée en présence du composé à tester

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

$[\text{Thy}]_{\text{ox}}$ = concentration en thymidine mesurée en l'absence du composé à tester

Ce test a été développé en utilisant trois sources de dégradation oxydante :

- irradiation en solution aqueuse par des rayons γ émis par une source au ^{137}Cs à 180 Gy,
- irradiation en présence d' H_2O_2 par des UV à 254 nm et $1.75 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$,
- oxydation par un système métallique en conditions de type Fenton, en présence de Fe^{2+} et d' H_2O_2 .

Les irradiations γ et UV vont générer, respectivement par radiolyse de l'eau et par dégradation d' H_2O_2 , des radicaux hydroxyles HO^\bullet , qui vont à leur tour pouvoir évoluer en radicaux HOO^\bullet ou $\text{O}_2^{\bullet-}$. La dégradation dans les conditions de Fenton va, en plus de générer des EAO, former plusieurs espèces de haute valence dont la réactivité n'est pas identique aux EAO. 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.

I. 4. Test de radioprotection cellulaire

Les tests présentés précédemment permettent de caractériser le pouvoir antioxydant d'une molécule donnée, mais la corrélation entre pouvoir antioxydant et effet radioprotecteur n'est pas systématique. Nous avons alors cherché à mettre au point un test de radioprotection basé sur l'irradiation de cellules et le suivi dans le temps de la prolifération cellulaire, ceci afin d'évaluer la capacité d'un composé à protéger des cellules en culture soumises à une irradiation. L'intérêt d'un tel test est de pouvoir évaluer l'activité d'un composé dans des conditions plus proches d'une irradiation réelle, contrairement aux tests antioxydants classiques qui n'étudie qu'une partie des phénomènes qui se produisent lors d'une irradiation (capture de radicaux libres, stables ou non).

I. 4. i. Lignée cellulaire utilisée

Les cellules choisies pour le test de radioprotection cellulaire sont des TK6. Il s'agit d'une lignée lymphoïde humaine sauvage, possédant une protéine p53 fonctionnelle : lorsque la cellule est soumise à un stress oxydant, cette protéine s'active et provoque la transcription de nombreux gènes. Cette activation conduit soit à l'arrêt du cycle cellulaire, soit à l'apoptose. De plus, cette lignée cellulaire est très radiosensible : en effet, la fraction survivante 24h après une irradiation à 2 Gy de rayons X (notée SF2) n'est que de 6.2 %, et à 8 Gy (SF8) elle n'est plus que de 8.3×10^{-4} %.¹¹ A titre de comparaison, des cellules radorésistantes HT29 présentes dans le colon et n'exprimant pas la protéine p53 ont une SF2 de 74 % et une SF8 de 33 %. La culture cellulaire est réalisée dans du milieu RPMI 1640-Glutamax, supplémenté avec 10 % de sérum fœtal de bœuf préalablement désactivé par chauffage à 56°C, 1mM de pyruvate de sodium, 1 mM d'acides aminés non-essentiels,

et 50 µg/mL de gentamycine. Les cultures cellulaires sont maintenues sous atmosphère humide à 5 % de CO₂ et à 37°C dans un incubateur.

I. 4. ii. Suivi de la prolifération cellulaire

Le suivi de la prolifération cellulaire sera effectué à l'aide du réactif Alamar Blue[®]. Il s'agit d'un réactif pro-fluorescent qui permet une mesure quantitative de la prolifération de nombreuses lignées cellulaires.^{12, 13} Ce réactif est un indicateur de croissance basé sur la détection de l'activité métabolique par réduction de la Résazurine, bleue et non fluorescente, en Résorufine, rose et fluorescente (figure 53). Après incubation des cellules pendant 4h en présence de ce réactif, une mesure de l'intensité du signal de fluorescence à 590 nm est réalisée à l'aide d'un lecteur de plaques à une longueur d'onde d'excitation de 530 à 560 nm. L'intensité du signal de fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu. Ce test est facile et rapide à mettre en œuvre, il s'avère donc bien adapté à notre étude.

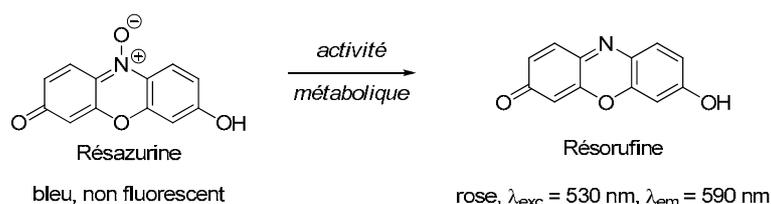


Figure 53 : test à l'Alamar Blue[®]

I. 4. iii. Protocole

En pratique, 5.4 mL de suspension cellulaire sont introduits dans des flacons de culture dont le volume final est de 5 mL. Le nombre de cellules est ajusté de manière à avoir une concentration finale de 2x10⁵ cellules/mL. Ensuite 0.6 mL de la solution du composé à tester, dissous dans du PBS et filtrée stérilement sur filtre Millipore 0.22 µm, sont introduits. Une plaque 96 puits est ensuite réalisée pour étudier la toxicité des composés : pour chaque flacon, on remplit cinq puits avec 200 µL de son contenu. La plaque est ensuite incubée pendant 24 h.

Les flacons sont ensuite irradiés par des rayons X à 8 Gy. Les irradiations ont été réalisées au Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss à Strasbourg ou alors à l'Hôpital St Pierre-Ottignies en Belgique. 36 h après l'irradiation, le contenu de chaque flacon est centrifugé puis le surnageant est éliminé. Le culot est ensuite remis en suspension dans du

milieu de culture frais, puis des plaques 96 puits sont ensemencées. Comme pour la plaque de toxicité, pour chaque flacon on remplit cinq puits avec 200 μ L du contenu de chaque flacon. Les plaques sont ensuite laissées à l'incubateur jusqu'à la lecture.

La lecture se fait par injection, dans chaque puits, de 20 μ L d'une solution d'Alamar Blue obtenue en diluant deux fois la solution commerciale. Les plaques sont ensuite remises à l'incubateur pendant 4 h, puis la mesure de l'intensité de fluorescence est réalisée avec un lecteur de plaque Perkin Elmer VictorX2 2030-0200 (excitation à 560 nm, émission à 590 nm).

II. Activités antioxydantes et radioprotectrices des dérivés d'acides pulviniques synthétisés

Les activités antioxydantes d'une première série de composés ont été mesurées à l'aide des tests au DPPH, à l'ABTS, de peroxydation lipidique et enfin sur le test de protection de la thymidine sous les trois conditions oxydantes. Le but de cette première série de tests est d'une part de déterminer l'influence de la chaîne introduite sur la fonction amide, puis d'étudier la corrélation entre ces quatre tests d'autre part. Les molécules hybrides seront également évaluées sur le test de protection de la thymidine. Ensuite les dérivés ayant la meilleure solubilité aqueuse ont été testés sur culture cellulaire afin cette fois d'étudier le pouvoir radioprotecteur de cette famille de composés.

II. 1. Résultats obtenus sur les tests antioxydants

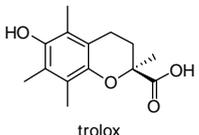
II. 1. i. Test de capture du radical DPPH

Le test de capture du radical DPPH a été réalisé au CEA Saclay par le Dr Thierry Le Gall et Brice Nadal.

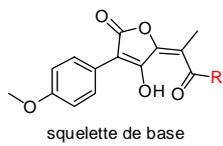
Pour ce test l' EC_{50} des composés, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour diminuer de 50 % la concentration en DPPH, a été mesurée. Chaque composé a été testé à différentes concentrations, et un suivi cinétique a été effectué pendant une heure, à raison

d'une mesure toutes les 5 minutes. Lorsqu'un plateau pour chaque concentration en antioxydant est atteint, le pourcentage de DPPH restant est relevé. On représente ensuite sur un graphique le pourcentage de DPPH restant en fonction du rapport des concentrations finales $[\text{antioxydant}]_f/[\text{DPPH}]_f$. Afin de nous affranchir de la concentration initiale en DPPH utilisée et ainsi pouvoir comparer le pouvoir antioxydant des composés d'une expérience à l'autre, on étudie le rapport $EC_{50}/[\text{DPPH}]$ obtenu pour chacune des molécules testées, avec une concentration en DPPH déposée dans le milieu de 100 μM . Ainsi plus la valeur de ce rapport sera faible, plus le composé testé sera actif. Le trolox, partie active de la vitamine E, a été utilisé comme composé de référence. Les résultats sont présentés dans le tableau 18 ci-dessous :

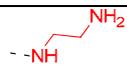
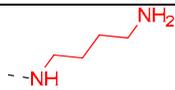
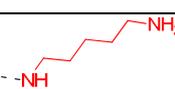
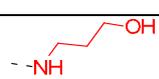
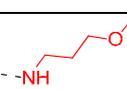
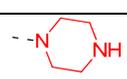
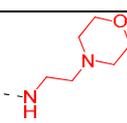
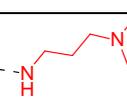
Tableau 18 : résultats obtenus sur le test de capture du radical DPPH. $[\text{DPPH}] = 100 \mu\text{M}$, composé de référence : trolox



trolox



squelette de base

référence produit	R =	$EC_{50}/[\text{DPPH}]$
Trolox	/	0.23 ± 0.02
68		0.74 ± 0.01
70		3.20 ± 0.2
80		> 10
83		0.87 ± 0.04
84		1.04 ± 0.04
85		> 10
87		0.79 ± 0.04
88		0.77 ± 0.02
89		1.88 ± 0.35
92		0.92 ± 0.01
95		5.43 ± 1.39

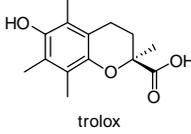
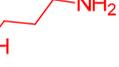
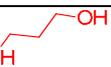
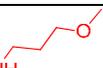
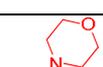
Les résultats obtenus avec ce test de capture du radical DPPH nous a permis d'observer que six composés ont une valeur du rapport $EC_{50}/[DPPH]$ inférieure ou égale à 1 (**68**, **83**, **84**, **87**, **88**, **92**), trois ont des valeurs comprises entre 1.88 et 5.43 (**70**, **89**, **95**) et deux sont inactifs (**80** et **85**). Nous pouvons constater une variabilité significative entre des composés très proches structurellement. Le premier exemple correspond à l'acide **70** et l'ester **68**, qui ne diffèrent que par la méthylation de la fonction acide, qui présentent respectivement des valeurs du rapport $EC_{50}/[DPPH]$ de 3.20 et 0.74. De grandes différences sont également observées entre les composés **80**, **83**, **84** et **85**, qui ne diffèrent que par l'ajout d'une fonction méthylène, et pour lesquels les composés possédant deux et cinq de ces fonctions sont inactifs, tandis qu'avec trois et quatre méthylènes les rapports sont respectivement de 0.84 et 1.04. En revanche, à longueur de chaîne égale la fonction présente à l'extrémité de cette chaîne aura peu d'influence, puisque les composés **83**, **87** et **88**, possédant respectivement une fonction amine primaire, alcool et éther méthylique, ont des rapports respectifs de 1.04, 0.79 et 0.77. Le composé **95** cependant, à longueur de chaîne égale, a été très peu actif, mais la valeur importante de l'écart-type observé peut indiquer que ce composé pose des problèmes de reproductibilité des résultats. Les composés **89** et **92** nous montrent qu'une fonction amine tertiaire en bout de chaîne ou que l'engagement de la chaîne latérale dans un cycle augmente l'activité, puisque du composé **80** inactif nous obtenons une valeur du rapport $EC_{50}/[DPPH]$ de 1.88 lorsque la chaîne latérale est engagée dans une pipérazine, et de 0.92 lorsque l'amine est engagée dans un cycle morpholine.

II. 1. ii. Test à l'ABTS

Les tests à l'ABTS ont été réalisés au Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée de l'Université Paul Sabatier Toulouse 3, par les Dr Ghassoub Rima et Damien Cressier.

Le test d'inhibition du radical cation ABTS a ensuite été réalisé, toujours avec le trolox comme référence. Les EC_{50} des composés testés sont présentées dans le tableau 19 ci-dessous :

Tableau 19 : résultats obtenus sur le test de capture du radical cation ABTS^{•+}. Composé de référence : trolox ; la concentration initiale en ABTS est ajustée de manière à avoir une absorbance initiale de 0.7

	référence produit	R =	EC ₅₀ (μM)
	Trolox	/	17.9 ± 0.3
	68		94.6 ± 0.5
	80		314.2 ± 1.0
	83		76.6 ± 0.7
	85		47.2 ± 0.3
	87		369.4 ± 0.9
	88		304.3 ± 1.0
	89		15.3 ± 0.2
	92		14.7 ± 0.3
	95		52.5 ± 0.5

Dans ce test, deux composés ont une activité équivalente au trolox, les composés **89** et **92**, quatre composés ont des EC₅₀ compris entre 47.2 μM et 94.6 μM (**68**, **83**, **85**, **95**) et trois composés ont des valeurs supérieures à 300 μM (**80**, **87** et **88**). Comme lors du test précédent la longueur de la chaîne a une importance, cependant le composé **85**, inactif sur le test au DPPH, possède ici une activité de 47.2 μM. La nature de la fonction introduite en bout de chaîne a ici une influence plus importante, puisque les composés **83** et **85**, possédant respectivement une amine primaire et une amine tertiaire, ont des activités de 76.6 μM et 52.5 μM, tandis que les composés **87** et **88**, possédant respectivement une fonction alcool et éther méthylique, ont des activités de 369.4 et 304.3 μM. Les composés **89** et **92** nous montrent, tout comme lors du test DPPH, que l'insertion de la chaîne latérale dans un cycle pipérazine ou de l'amine terminale dans un cycle morpholine augmente l'activité.

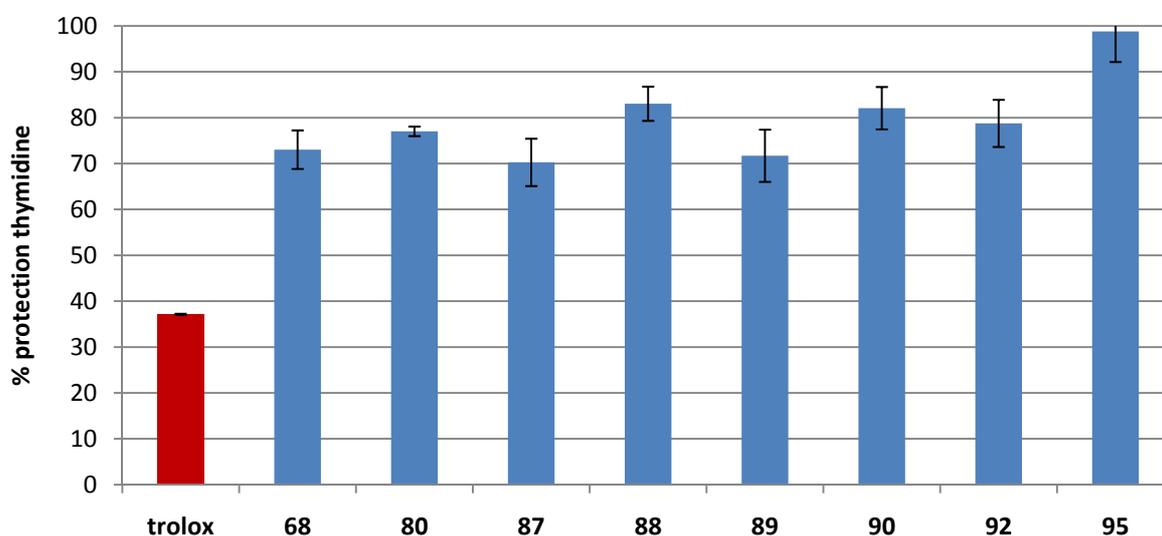
II. 1. iii. Test de protection de la thymidine

Les tests de protection de la thymidine ont été réalisés au CEA Saclay par le Dr Thierry Le Gall, Brice Nadal et le Dr Sophie Laurent.

Les tests de protection de la thymidine ont enfin été réalisés sous les trois conditions oxydantes : radiolyse, réaction de Fenton et irradiation UV. Le trolox a été utilisé comme composé de référence. Pour ce test, nous avons également testé les acides pulviniques hybrides. Pour chaque type de stress nous présenterons d'abord les résultats obtenus sur les dérivés hydrophiles, puis ceux obtenus sur les dérivés hybrides.

II. 1. iii. a. Protection de la thymidine sous radiolyse

Dans un premier temps nous avons testé quelques dérivés d'acide pulvinique sous un stress oxydant produit par radiolyse. Cette dégradation est obtenue par irradiation γ avec une source de ^{137}Cs . En pratique, une solution de thymidine à 15 μM dans un tampon phosphate à 25 mM est irradiée à 180 Gy en présence du composé à tester à la concentration de 50 μM . Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 54 ci-dessous :



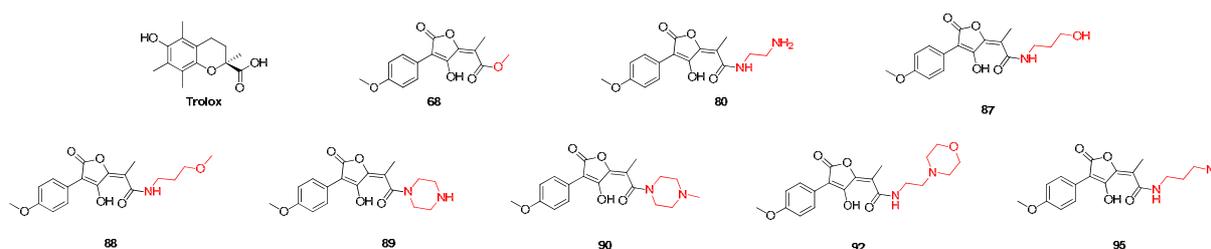


Figure 54 : résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine sous radiolyse avec les dérivés hydrophiles. [Thy] = 15 μ M, [antioxydant] = 50 μ M, tampon pH 7.4, 180 Gy. Composé de référence : trolox (en rouge sur le graphique)

Les dérivés d'acides pulviques testés sont tous plus actifs que le composé de référence, le moins actif protégeant la thymidine à 70 % pour le composé **87** contre 37 % pour le trolox. Les composés **68** à **92** ont tous une activité similaire avec entre 70 % et 83 % de protection. Le composé **95** protège quant à lui près de 99 % de la thymidine. Les composés **88** et **90** sont les analogues méthyles sur la chaîne latérale de **87** et **89**. Dans les deux cas, ceci a pour conséquence une augmentation de la proportion de thymidine intacte de près de 10 %. La même tendance est observée avec le composé **95**, dans lequel l'amine est engagée dans un cycle morpholine. Enfin nous pouvons constater qu'entre **87** et **89**, le fait d'engager la chaîne latérale dans une pipérazine n'a ici aucun effet.

Nous avons ensuite soumis les dérivés hybrides au cours d'une expérience indépendante de la précédente au test de protection de la thymidine irradiée par radiolyse. Pour ce test le trolox est toujours notre composé de référence. Les données sont présentées dans la figure 55 ci-dessous. Le composé **70** servira d'acide pulvique de référence pour les composés dissymétriques, et les composés **116** et **103** serviront de référence pour les composés symétriques, **116** servant à voir l'influence de l'ajout d'une fonction acide carboxylique et **103** servant à voir l'influence de la chaîne latérale portée par l'acide aminé introduit.

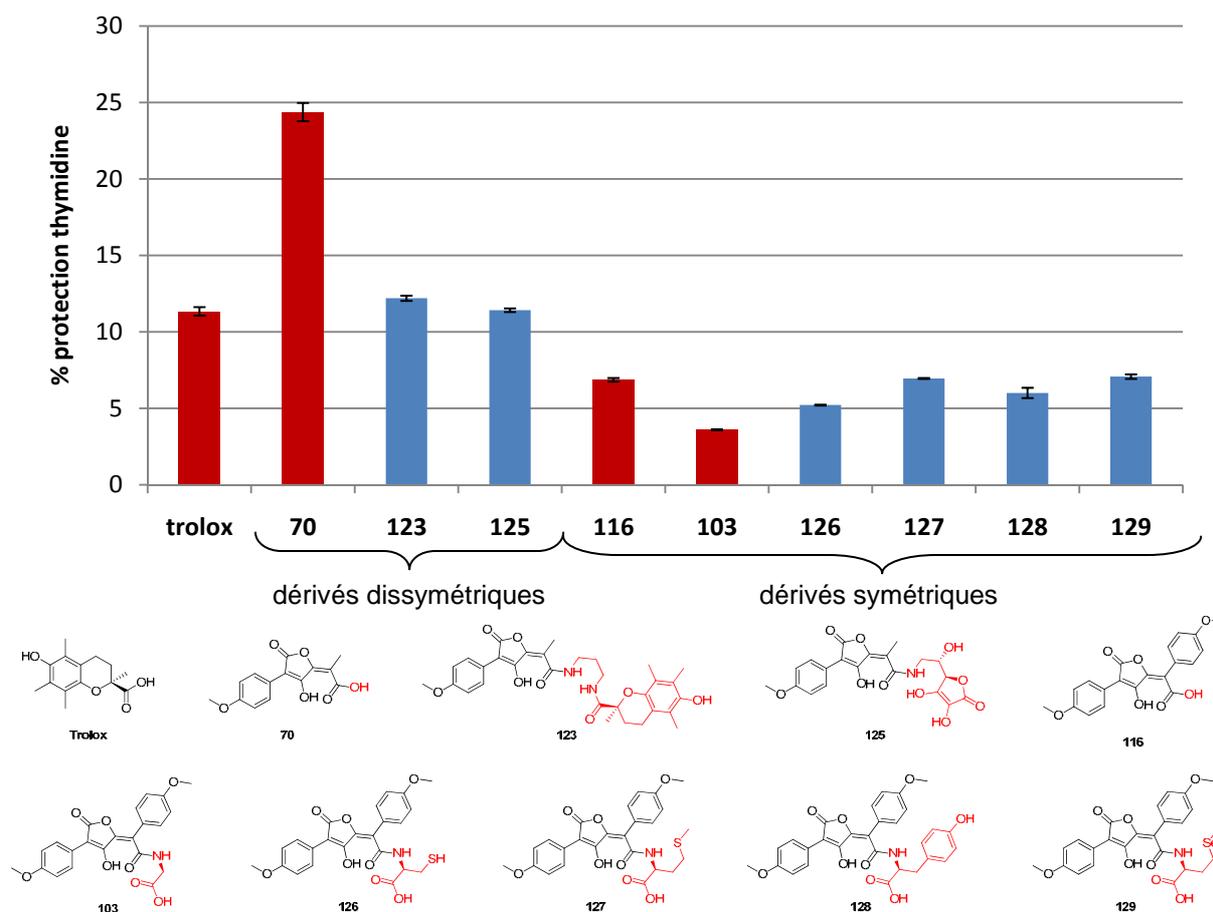


Figure 55 : résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine sous radiolyse avec les dérivés hybrides. [Thy] = 15 μ M, [antioxydant] = 50 μ M, tampon pH 7.4, 180 Gy. Les colonnes en rouge indiquent les composés de référence.

Dans cette série d'expériences, le trolox possède une activité trois fois moins importante que celle observée précédemment (37 % de protection de la thymidine dans la première série, 11 % dans la seconde). Ceci met en avant certains problèmes de reproductibilité rencontrés avec ce test. Dans le cas des acides pulviniques dissymétriques, l'ajout d'un motif antioxydant, qu'il soit dérivé du trolox (**123**) ou de l'acide ascorbique (**125**), diminue l'activité par rapport à l'acide **70**, avec respectivement 12 % et 11 % de protection obtenues avec les composés **123** et **125**, contre 24 % pour le composé **70**. En ce qui concerne les dérivés symétriques, l'activité observée pour le composé **103** indique que l'ajout d'une fonction acide carboxylique a pour effet de diminuer l'activité. L'introduction ensuite d'une chaîne latérale à caractère antioxydant a bien pour effet d'augmenter l'activité en comparaison avec celle du composé **103**, mais les valeurs de protection obtenues sont comparables à celle de l'acide pulvinique **116**.

II. 1. iii. b. Protection de la thymidine sous dégradation en condition de Fenton

Le test de protection de la thymidine dégradée en conditions de Fenton a ensuite été réalisé sur les mêmes séries de composés hydrophiles et hybrides testés précédemment. En pratique une solution de thymidine à 70 μM est oxydée par un mélange $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$ 1/1/100 à 700 μM en présence de l'antioxydant à tester. Dans le cas des acides pulviniques hydrophiles les composés ont été testés à 500 μM , et dans le cas des composés hybrides ils ont été testés à 100 μM . Les résultats obtenus sur les composés hydrophiles sont présentés dans la figure 56 ci-dessous :

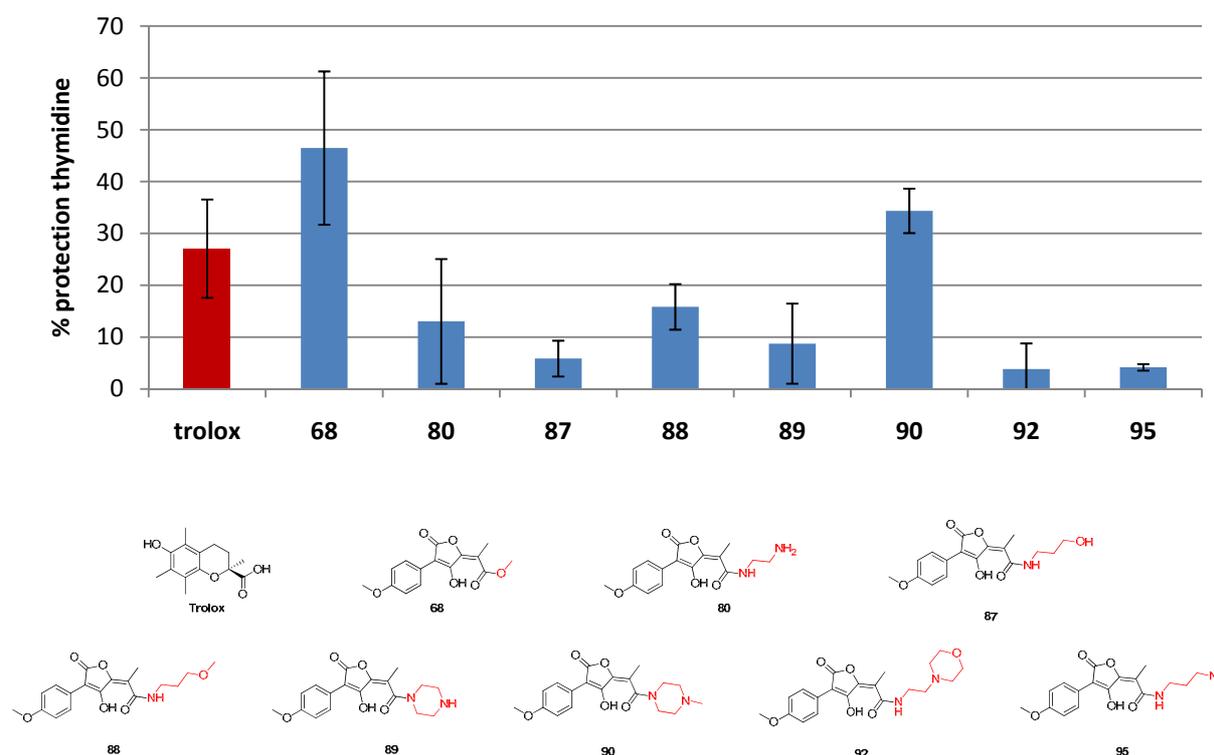


Figure 56 : résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine en condition de Fenton avec les dérivés hydrophiles. $[\text{Thy}] = 70 \mu\text{M}$, $[\text{antioxydant}] = 500 \mu\text{M}$, $[\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2] = 1/1/100 : 700 \mu\text{M}$, tampon pH 7.4, 30 minutes. Composé de référence : trolox (en rouge sur le graphique)

Contrairement au test de dégradation par radiolyse, les pourcentages de protection observés sont en moyenne plus faibles que ceux obtenus lors de la dégradation par radiolyse. Seuls l'ester **68** et le composé **90** ont une meilleure protection que le trolox (respectivement 46.5 % et 34.4 % pour **68** et **90**, 27.1 % pour le trolox). Les autres pulvinamides protègent entre 3.8 % et 15.8 % de la thymidine. L'effet d'une méthylation de la fonction alcool de **87** et de la pipérazine de **89** est le même qu'en radiolyse, avec une amélioration de l'activité de 10 % entre **87** et **88**, et de 25 % entre **89** et **90**. Nous ne pouvons cependant pas généraliser ici l'effet d'une alkylation, puisque le composé **92** n'a quasiment

aucun effet, tandis que le composé **80** protège 13 % de la thymidine. Le composé **95** est lui aussi presque inactif.

Les dérivés hybrides ont ensuite été testés en condition de Fenton lors d'une seconde expérience. Les résultats sont présentés dans la figure 57 ci-dessous :

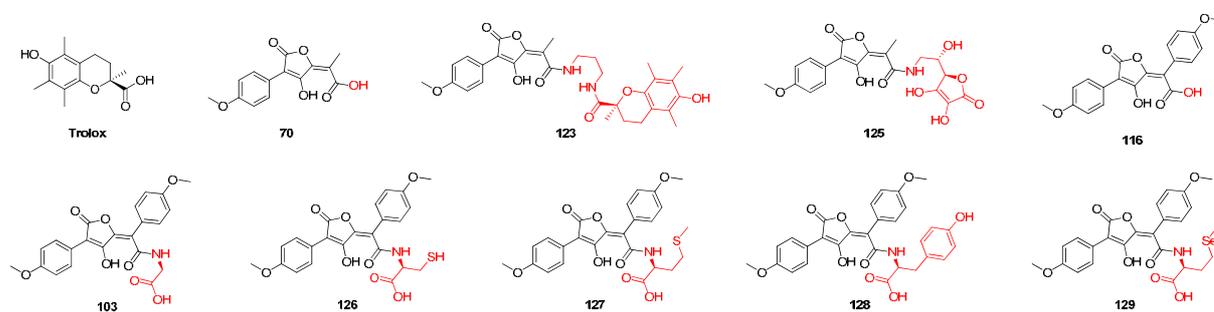
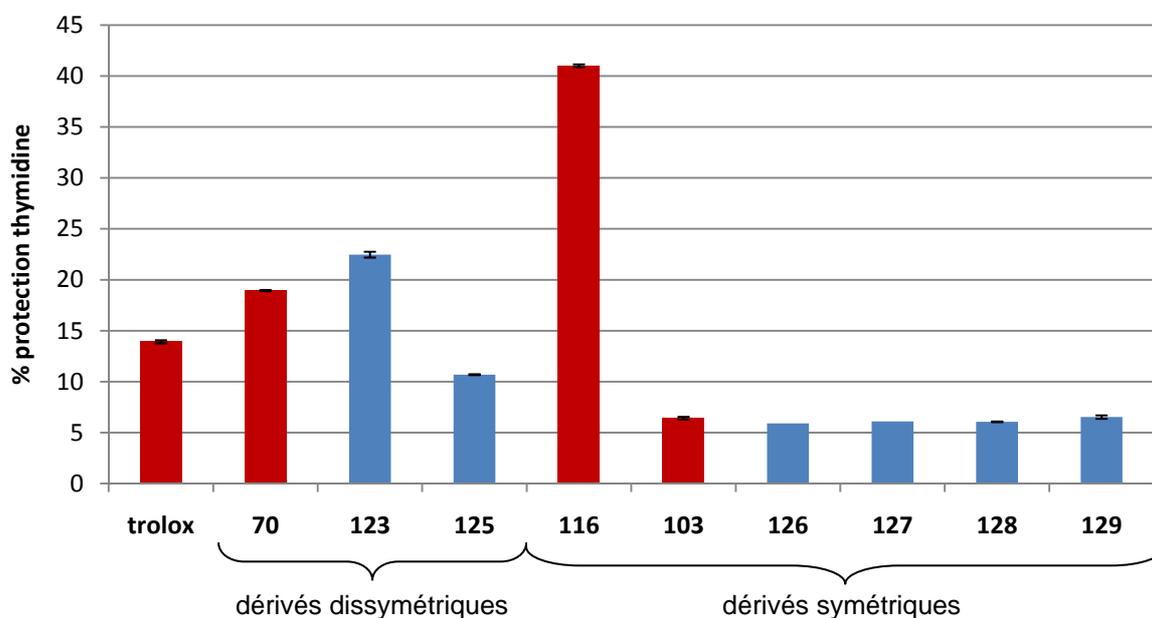


Figure 57 : résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine en condition de Fenton avec les dérivés hydrophiles. [Thy] = 70 μ M, [antioxydant] = 100 μ M, [Fe²⁺/EDTA/H₂O₂] 1/1/100 : 700 μ M, tampon pH 7.4, 30 minutes. Les colonnes en rouge indiquent les composés de référence.

Le composé hybride **123**, combinant un acide pulvinique **70** et le trolox, est le seul à avoir une meilleure activité que l'acide pulvinique simple, cependant le gain en protection n'est pas conséquent puisqu'on passe de 18.9 % de protection pour le composé **70** à 22.5 % pour le composé **123**. L'ajout d'un motif dérivé de l'acide ascorbique diminue en revanche l'effet protecteur sur la thymidine. En ce qui concerne les composés symétriques, nous constatons qu'introduire une glycine (**103**) diminue dramatiquement l'activité, et que l'introduction de

chaines latérales sur l'acide aminé (**126** à **129**) n'a aucun effet, ce qui confirme que l'ajout d'une fonction acide carboxylique a un effet pro-oxydant.

II. 1. iii. c. Protection de la thymidine sous dégradation par irradiation UV

Le test de dégradation de la thymidine a ensuite été réalisé en conditions d'oxydation sous UV en présence de H₂O₂. Pour cela, une plaque remplie avec une solution de thymidine à 70 µM, du peroxyde d'hydrogène à 5 mM et de l'antioxydant à 100 µM est irradiée sous UV à 254 nm à 1.75 J.cm⁻². La figure 58 ci-dessous présente les résultats obtenus avec les dérivés hydrophiles :

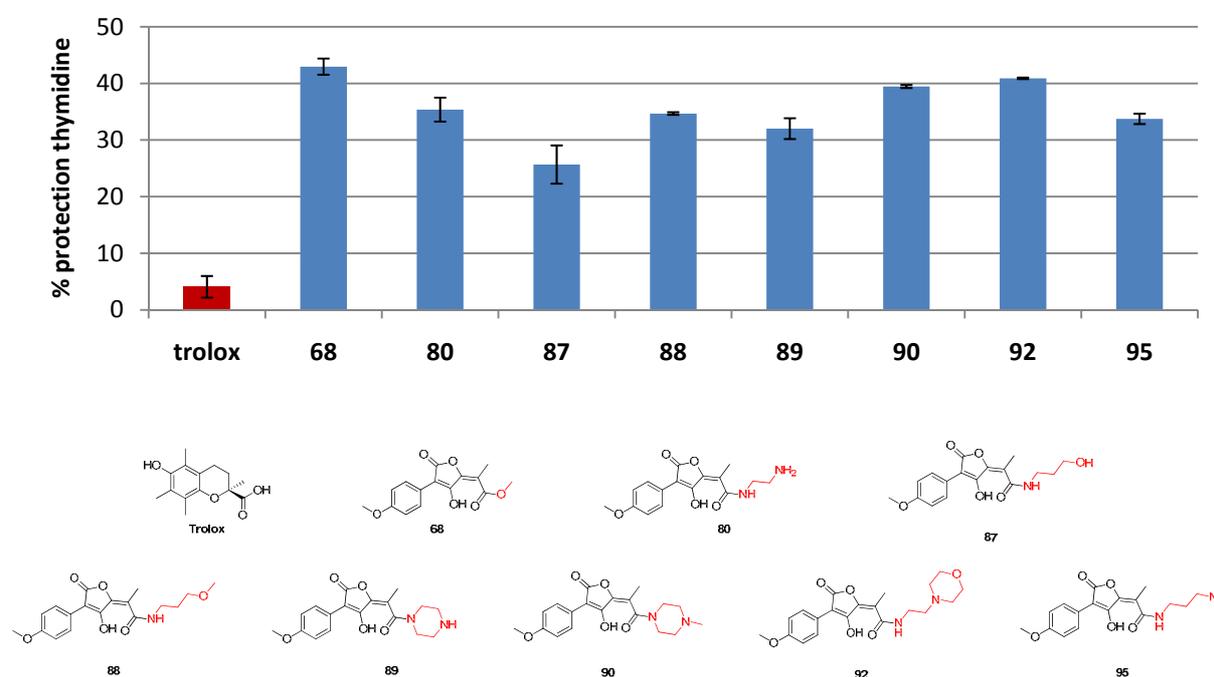


Figure 58 : résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine en condition de Fenton avec les dérivés hydrophiles. [Thy] = 70 µM, [antioxydant] = 100 µM, [H₂O₂] = 5 mM, irradiation UV à 254 nm, 1.75 J.cm⁻², tampon pH 7.4. Composé de référence : trolox (en rouge sur le graphique)

L'ester **68** est le dérivé le plus actif parmi les composés testés, avec une protection de 43 % de la thymidine. Il est significativement plus actif que le trolox qui ne protège que 4 % de la thymidine. L'insertion d'une amine a en revanche pour effet de toujours diminuer l'activité. La tendance observée en condition de radiolyse et sous l'effet de la réaction de Fenton concernant la méthylation de la fonction alcool de **87** et de la pipérazine de **90** est à nouveau observée ici, dans les deux cas cette alkylation conduit à une amélioration de la quantité de thymidine intacte, avec une amélioration de 9 % pour la méthylation de **87** et de 7 % pour

l'alkylation de **89**. De même l'insertion de l'amine primaire de **80** dans un cycle morpholine a également pour effet d'augmenter l'activité.

Toujours dans une seconde série d'expériences, les dérivés hybrides ont également été soumis au test de dégradation de la thymidine par irradiation UV (figure 59) :

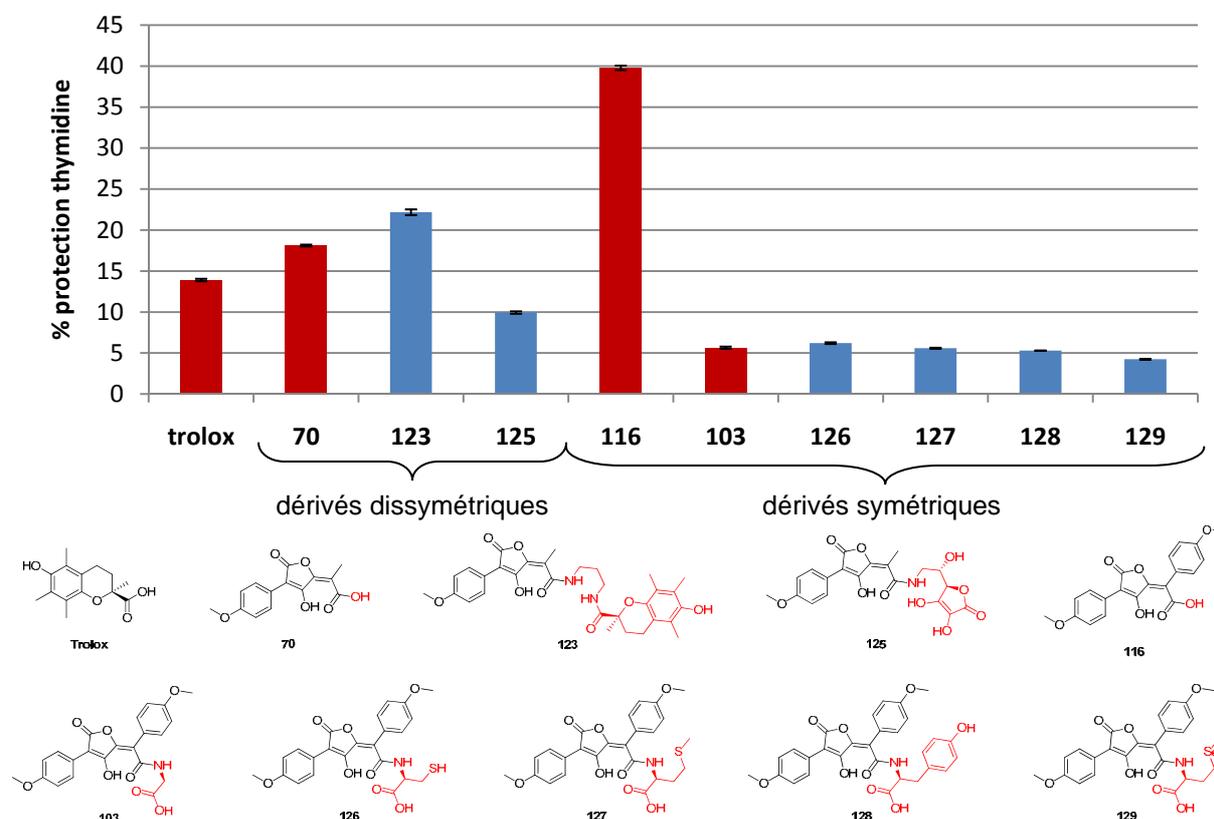


Figure 59 : résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine sous irradiation UV avec les dérivés hydrophiles. [Thy] = 70 μ M, [antioxydant] = 100 μ M, [H₂O₂] = 5 mM, irradiation UV à 254 nm, 1.75 J.cm⁻², tampon pH 7.4. Les colonnes en rouge indiquent les composés de référence)

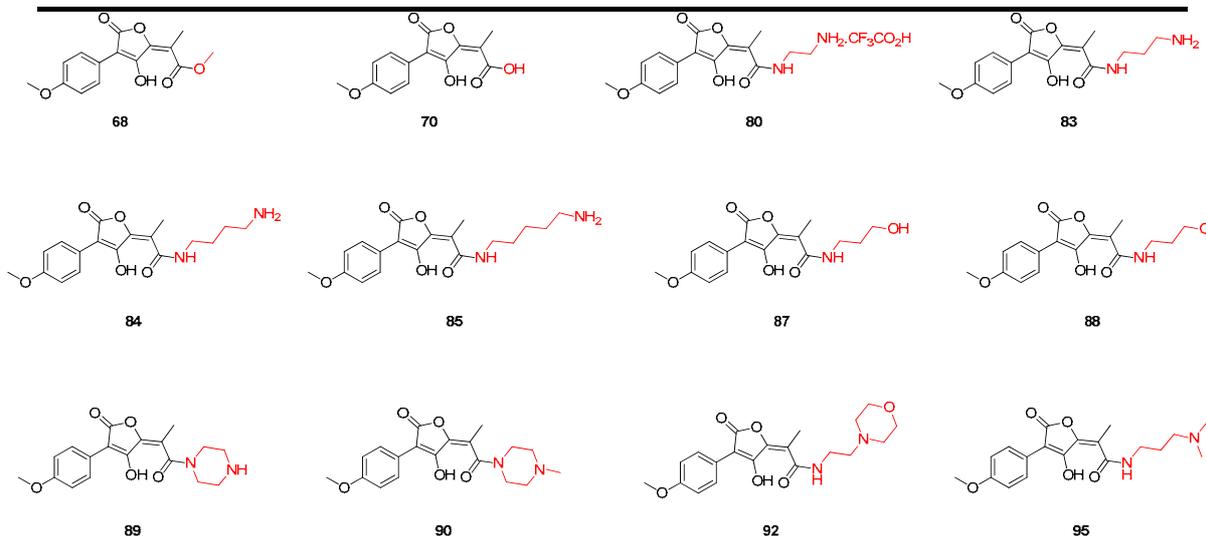
Les valeurs de protection obtenues lors de ce test sont tout à fait comparables à celles obtenues sur les mêmes composés lors de la dégradation en condition de Fenton. Nous observons donc là aussi un effet légèrement positif de l'insertion d'un dérivé du trolox, et les effets négatifs de l'introduction d'un dérivé de l'acide ascorbique et de fonctions acide carboxylique.

II. 1. iv. Conclusion sur l'activité des composés testés

Afin de pouvoir comparer les produits hydrophiles entre eux et en fonction des tests effectués, nous présentons dans le tableau 20 ci-dessous les effets de chacun d'entre eux sur l'activité antioxydante.

Tableau 20 : rappel des différentes activités de chacun des composés hydrophiles testés sur les différents tests antioxydants. Grandeurs et unités reportées : DPPH : rapport $EC_{50}/[DPPH]$; ABTS : EC_{50} (μM), thymidine : pourcentage de protection de la thymidine observé. En vert : bonne activité ; en noir : activité moyenne ; en rouge : mauvaise activité

entrée	composé	DPPH	ABTS	thymidine - radiolyse	thymidine - Fenton	thymidine - UV
1	trolox	0.23	17.9	37.13	27.06	4.07
2	68	0.74	94.6	73.03	46.47	42.96
3	70	3.20	/	/	/	/
4	80	<i>inactif</i>	314.2	77.03	13.04	35.37
5	83	0.87	76.6	/	/	/
6	84	1.04	/	/	/	/
7	85	<i>inactif</i>	47.2	/	/	/
8	87	0.79	369.4	70.27	5.87	25.67
9	88	0.77	304.3	83.06	15.84	34.67
10	89	1.88	15.3	71.70	8.75	32.01
11	90	/	/	82.08	34.36	39.46
12	92	0.92	14.7	78.77	3.84	40.89
13	95	5.43	52.5	98.80	4.17	33.74



Parmi les composés testés, ceux ayant une longueur de chaîne de trois méthylènes ont obtenus les meilleurs résultats (entrées 5, 8, 9, 13). Lorsqu'une chaîne de deux méthylènes est employée, la nature des fonctionnalités portées aura une influence importante. En effet si la chaîne est engagée dans un cycle pipérazine l'activité sera améliorée. De même, alors

qu'une amine primaire ne donnera que de très faibles activités antioxydantes (entrée 4), dans le cas d'une amine tertiaire, comme ici avec le composé **92** (entrée 12), l'activité sera nettement améliorée. Globalement des fonctions amine tertiaire et éther (entrées 9, 11, 12, 13) donneront de meilleures activités antioxydantes qu'une fonction amine primaire ou alcool (entrées 4, 5, 6, 7, 8).

Parmi les composés synthétisés, sept ont été soumis à tous les tests présentés précédemment (entrées 1, 3, 7, 8, 9, 11, 12). Ces composés ont tous montré des comportements différents d'un test à l'autre. Ainsi les composés **88** et **95** ont montré des activités similaires sur les tests de dégradation de la thymidine, mais des comportements différents sur les tests au DPPH et à l'ABTS. Inversement les composés **87** et **88** ont montré des activités comparables sur les tests au DPPH et à l'ABTS tandis que sur le test de protection de la thymidine, le composé **87** a toujours été moins actif que **88**. Nous pouvons remarquer que les tendances observées sur le test de protection de la thymidine en condition de radiolyse et d'irradiation UV sont en général les mêmes. A partir de ces données, aucune corrélation entre les tests effectués n'a pu être observée.

Dans le cas des acides pulviniques hybrides, non reportés dans ce tableau, à l'exception du composé **123** l'ajout d'un motif antioxydant entraîne l'apparition d'activité pro-oxydante. Cependant dans le cas des composés **103**, **126**, **127**, **128** et **129**, résultant de l'ouverture d'une bis-lactone par des acides aminés portant une chaîne à caractère antioxydant, la perte d'activité n'est pas due au motif antioxydant mais à la fonction acide carboxylique portée par la chaîne amide, comme en témoigne les résultats obtenus sur le composé **103**. L'introduction d'une fonction acide carboxylique sera donc à proscrire dans le cas de la recherche d'un effet anti-radicalaire.

II. 2. Résultats de radioprotection sur culture cellulaire

Les études de protection cellulaire ont été réalisées au Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss (CPS) de Strasbourg. Les irradiations par des rayons X ont été effectuées dans le service de radiothérapie du CPS dirigé par le Pr Georges Noël et à l'hôpital St Pierre-Ottignies (Belgique) par M. Jean-Marc Denis.

Pour ce test, l'emploi de solutions stériles du composé à tester est nécessaire. Pour cela, nous filtrons chacune de nos solutions-mères de chaque composé à tester sur des filtres millipore de 0.22 μm . Afin de connaître la concentration exacte de nos solutions, une

solubilité parfaite du composé dans le solvant employé. Il est nécessaire que ce dernier n'ait pas d'activité propre, afin de ne pas perturber les analyses. Nous avons alors testé quatre solvants organiques, à savoir l'éthanol, le méthanol, le DMSO et l'acétonitrile, chacun à cinq concentrations volumiques différentes : 2 %, 1 %, 0.5 %, 0.2 % et 0.1 %. La toxicité de ces solvants à ces différentes concentrations est représentée dans la figure 60 :

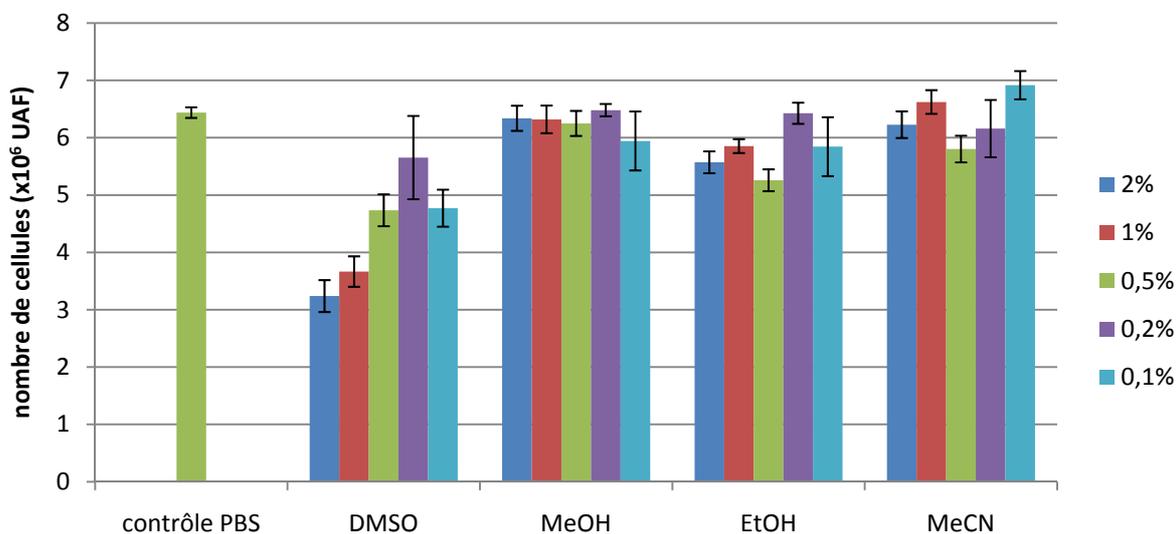


Figure 60 : toxicité sur TK6 de divers solvants. Les cellules sont incubées pendant 24h avec cinq concentrations volumiques différentes de chaque solvant (2 %, 1 %, 0.5 %, 0.2 % et 0.1 %), et comparées avec un lot n'ayant reçu aucun solvant. Les mesures sont effectuées par fluorescence en quintuplicate et exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF), proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu.

Dans les conditions de notre test le DMSO. Effectivement nous voyons une diminution de la croissance cellulaire en présence de ce solvant., il ne sera donc pas retenu pour la suite du test. Les trois autres solvants testés n'ont qu'une très faible influence sur la prolifération cellulaire après 24 h d'incubation.

Suite à ce test de toxicité, nous avons poursuivi notre étude en irradiant les cellules par des rayons X à 8 Gy et en présence de méthanol, d'éthanol et d'acétonitrile aux concentrations testées précédemment. Nous présentons tout d'abord l'évolution du nombre de cellules vivantes à 2, 4, 7 et 9 jours après une irradiation en présence de méthanol (figure 61) :

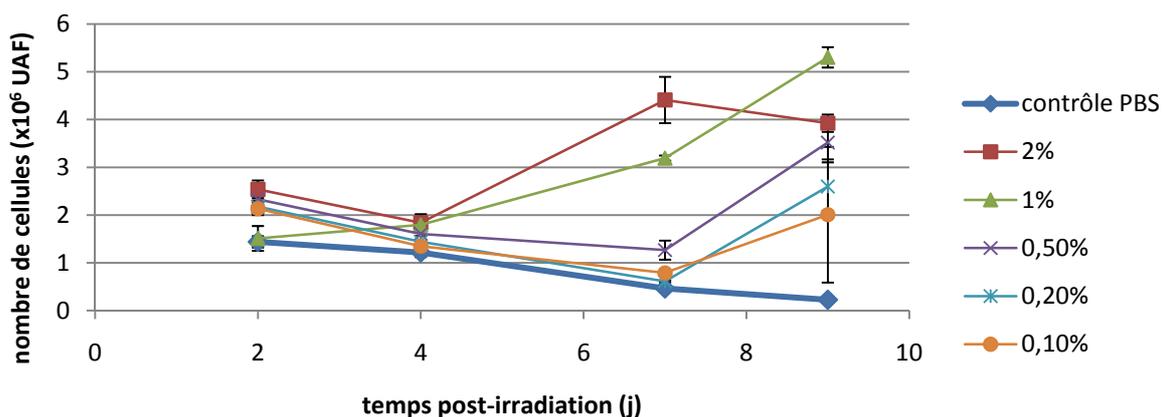


Figure 61 : évolution du nombre de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy en présence de concentrations variables en méthanol (2%, 1%, 0,5%, 0,2% et 0,1%). Suivi à 2, 4, 7 et 9 jours. Les mesures sont effectuées par fluorescence en quintuplicate et exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF), proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu.

Nous pouvons tout d'abord constater sur ce graphique qu'en l'absence de tout traitement (contrôle PBS), le nombre de cellules vivantes décroît en continue, et ce même 9 jours après l'irradiation, ce qui est dû à une perte de viabilité cellulaire à une telle dose de radiations. Dans les lots traités à 0,1%, 0,2%, 0,5% et 1%, nous observons la même décroissance jusqu'au 7^{ème} jour, puis au 9^{ème} jour les cellules recommencent à proliférer. Lorsque 2% de méthanol sont présents dans le milieu, la reprise de la prolifération s'observe dès le 7^{ème} jour, cependant au 9^{ème} jour nous observons à nouveau une diminution du nombre de cellules vivantes. Ce phénomène est la conséquence d'un appauvrissement en nutriments du milieu de culture, aboutissant à l'entrée des cellules en apoptose. Le méthanol a donc un effet radioprotecteur car il a un effet positif sur la prolifération cellulaire, il ne sera donc pas retenu dans la suite des expériences.

La même expérience a été réalisée en présence d'éthanol (figure 62) :

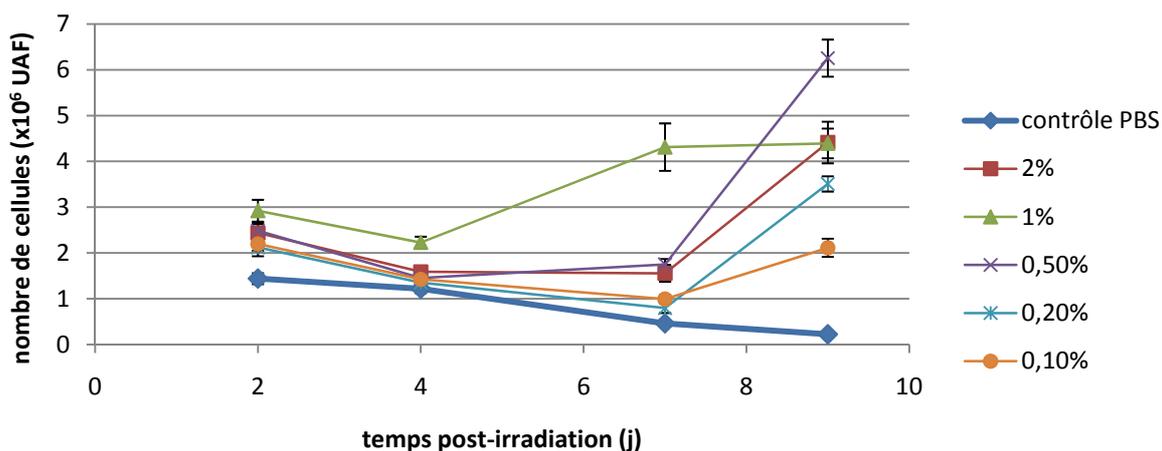


Figure 62 : évolution du nombre de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy en présence de concentrations variables en éthanol (2%, 1%, 0,5%, 0,2% et 0,1%). Suivi à 2, 4, 7 et 9 jours. Les mesures sont effectuées par fluorescence en quintuplicate et exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF), proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu.

Ici encore, nous observons une reprise de la prolifération des cellules traitées au 9^{ème} jour lorsque les cellules sont traitées avec 0,1%, 0,2%, 0,5% et 2% d'éthanol. Il est surprenant d'observer qu'à 1% en éthanol cette reprise a lieu dès le 7^{ème} jour, contrairement aux lots traités à 0,5% et 2%. Dans tous les cas les cellules recommencent à proliférer en présence d'éthanol, ce qui traduit également un effet protecteur. Ce solvant ne sera donc pas retenu pour la suite des expériences.

Enfin l'étude a été réalisée avec l'acétonitrile dans les mêmes conditions (figure 63) :

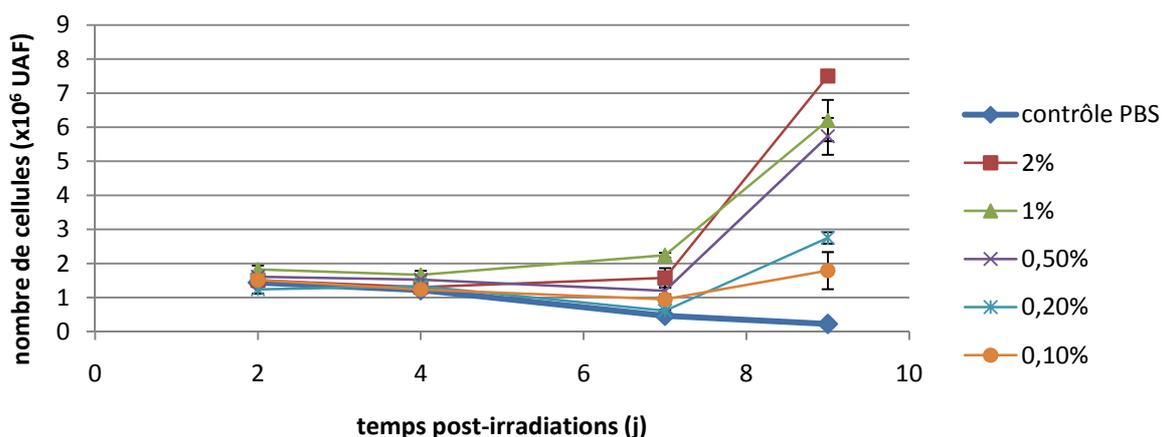


Figure 63 : évolution du nombre de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy en présence de concentrations variables en acétonitrile (2%, 1%, 0,5%, 0,2% et 0,1%). Suivi à 2, 4, 7 et 9 jours. Les mesures sont effectuées par fluorescence en quintuplicate et exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF), proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu.

Tout comme dans le cas du méthanol et de l'éthanol, nous observons une reprise de la prolifération au 9^{ème} jour en présence d'acétonitrile, et ce même à la plus faible concentration testée (0.1%). Nous n'utiliserons donc pas l'acétonitrile pour les tests de radioprotection cellulaire.

Les trois solvants testés en présence de rayonnements ayant tous présenté un caractère radioprotecteur, nous devons donc utiliser du tampon PBS pour solubiliser nos composés. En conséquence nous devons au préalable sélectionner les composés les plus solubles dans l'eau. La figure 64 rappelle les valeurs de solubilité des dérivés d'acide pulvinique synthétisés :

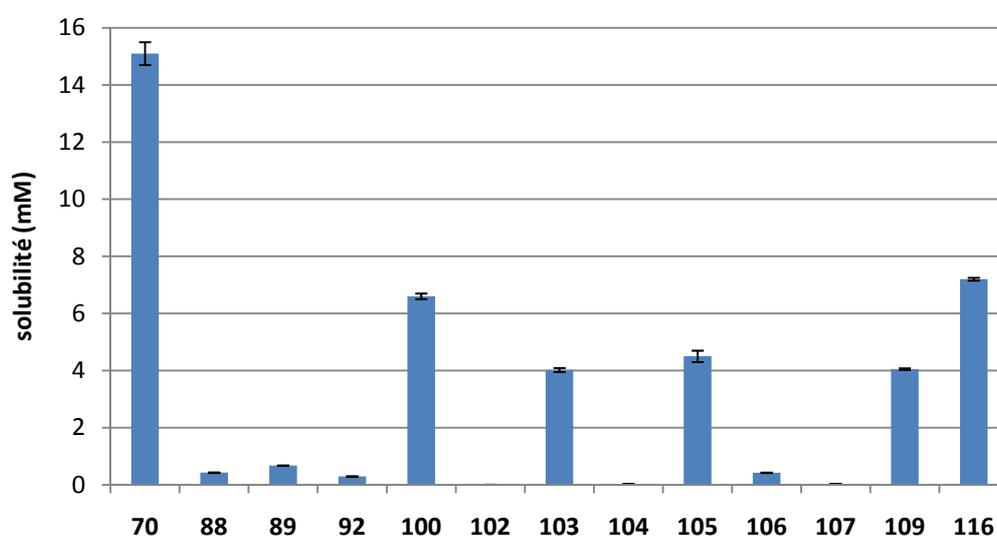


Figure 64 : solubilité des dérivés d'acide pulvinique synthétisés

Parmi cette liste, six composés s'avèrent particulièrement solubles, à savoir **70**, **100**, **103**, **105**, **109** et **116**, dont les structures sont rappelées dans la figure 65. Nous allons donc effectuer les tests de radioprotection sur ces composés.

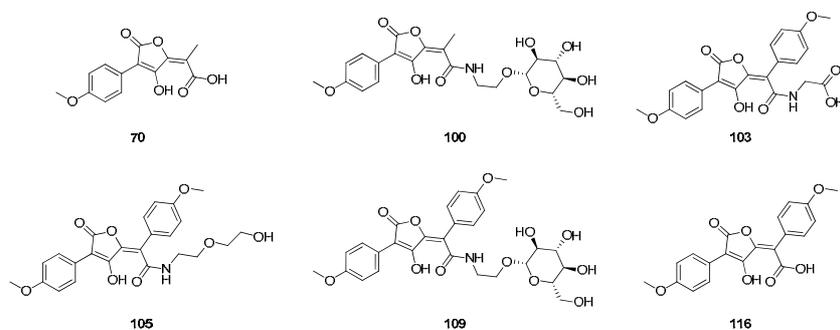


Figure 65 : structures des acides pulviniques choisis pour le test de radioprotection cellulaire

Une étude préalable a été menée sur l'amifostine (WR2721) en tant que composé de référence. Ce composé a donc été testé à 500 μM sur des cellules irradiées par des rayons X à 8 Gy, et la prolifération cellulaire a été observée pendant 9 jours après irradiation selon le protocole présenté précédemment. La courbe de prolifération cellulaire est présentée dans la figure 66 :

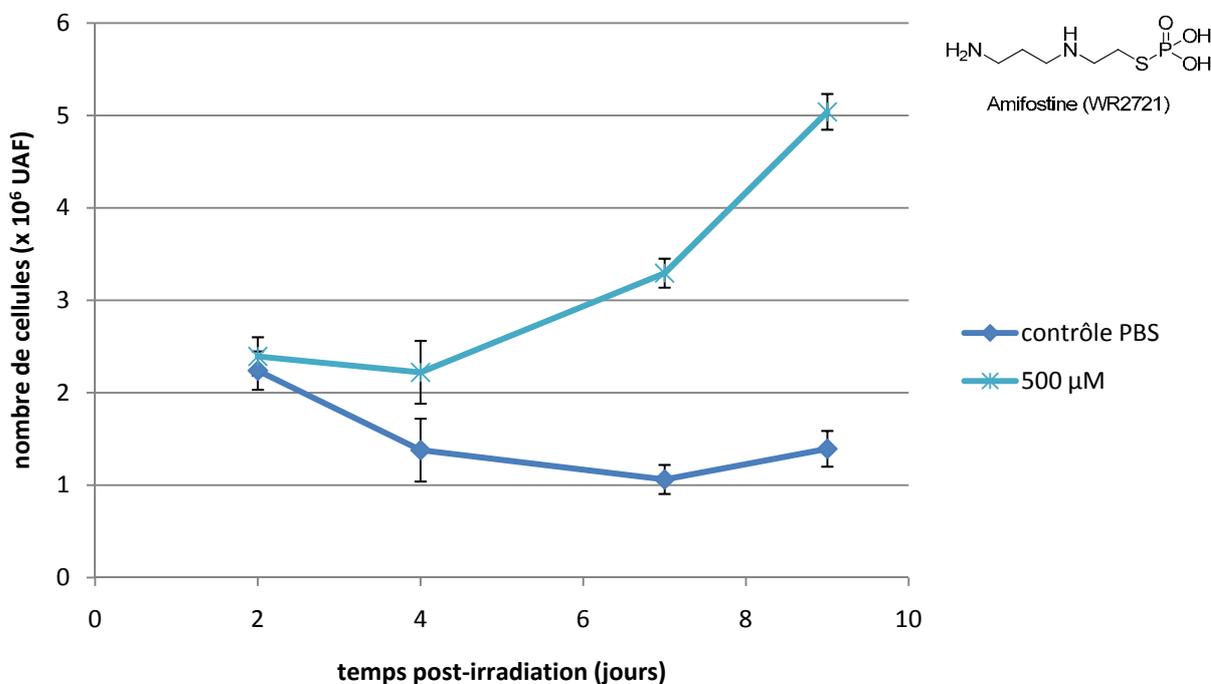


Figure 66 : évolution du nombre de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy en présence d'amifostine à 500 μM . Suivi à 2, 4, 7 et 9 jours. Les mesures sont effectuées par fluorescence en quintuplicate et exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF), proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu

Nous observons à nouveau dans le lot témoin une perte de viabilité importante des cellules jusqu'au 7^{ème} jour après irradiation, en revanche au 9^{ème} jour la prolifération a repris. A partir de ces données nous pouvons déterminer deux paramètres : le **rapport** $\frac{\text{nombre de cellules vivantes-lot traité}}{\text{nombre de cellules vivantes-lot contrôle}}$ **au 9^{ème} jour**, ainsi que la valeur de la **pente entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour**. Le premier paramètre va nous permettre d'évaluer l'efficacité d'un composé 9 jours après l'irradiation, et le second nous permettra d'évaluer l'effet d'un composé sur la reprise de la prolifération cellulaire lorsque l'effet retard des rayonnements a disparu. Ainsi pour l'amifostine cela nous donne :

	rapport à 9 jours	pente du 7 ^{ème} au 9 ^{ème} jour (x10 ⁶ UAF.j ⁻¹)
WR2721	3.6 ± 0.3	0.97

Ces valeurs nous serviront de référence pour comparer les dérivés d'acide pulvinique testés. Avant de tester nos composés, nous avons dans un premier temps regardé leur toxicité au bout de 24 h sur la lignée cellulaire à deux concentrations différentes, 50 μM et 100 μM (figure 67) :

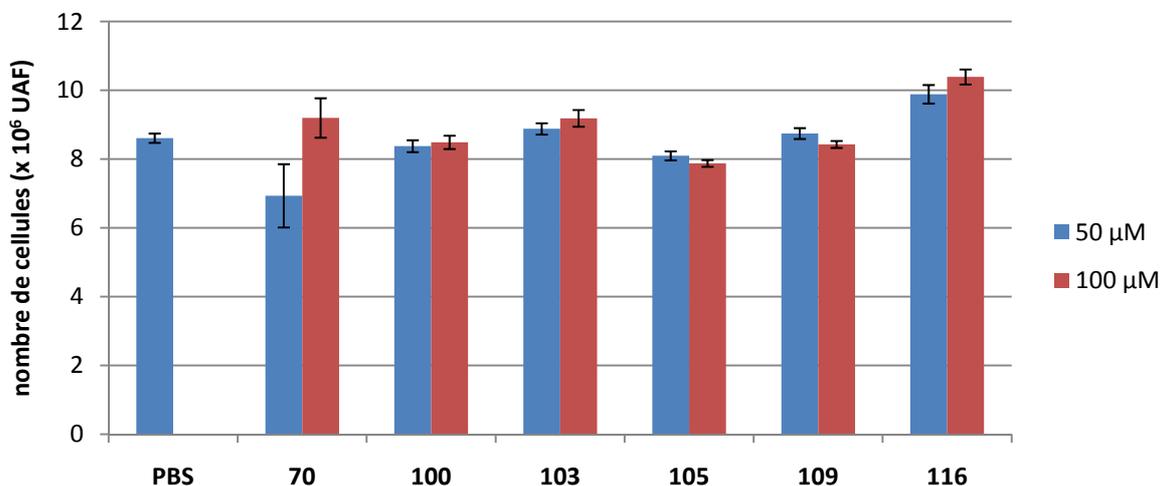
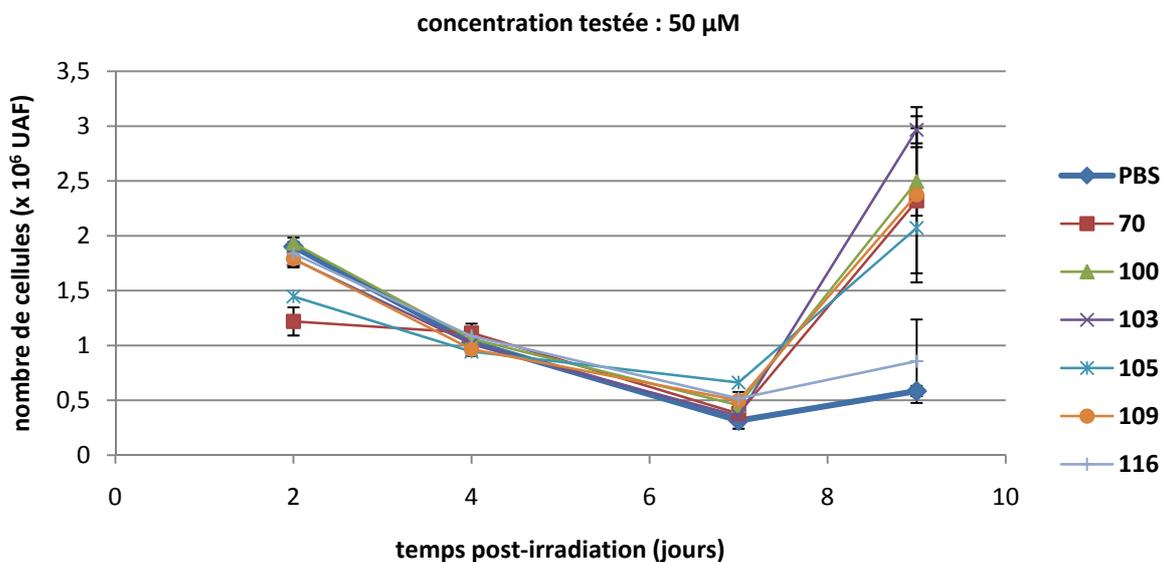


Figure 67 : évaluation de la toxicité des composés sélectionnés sur TK6. Mesure du nombre de cellules 24h après incubation en présence de 50 μM et 100 μM de composé à tester

Les composés n'ont que peu d'influence sur la prolifération cellulaire. N'étant pas toxique à ces concentrations, nous allons donc pouvoir les soumettre au test de radioprotection cellulaire. Ils ont donc été testés dans les mêmes conditions que précédemment, à 50 μM et 100 μM . Les courbes représentant l'évolution du nombre de cellules vivantes sont représentées dans la figure 68 :

a)



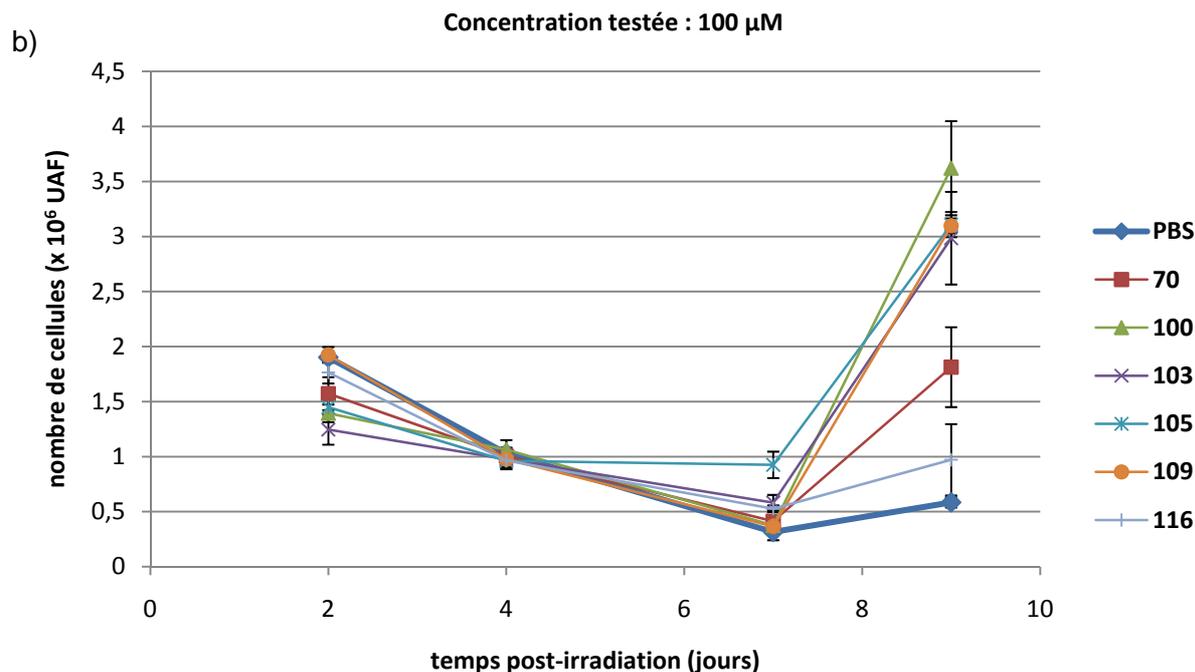


Figure 68 : évolution du nombre de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy traitées par des dérivés d'acide pulvinique à : a) 50 μ M ; b) : 100 μ M. Suivi à 2, 4, 7 et 9 jours. Les mesures sont effectuées par fluorescence en quintuplicate et exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF), proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu

Ces courbes peuvent être divisées en deux parties : la première jusqu'au 7^{ème} jour, période au cours de laquelle la perte de viabilité des cellules due aux rayonnements est toujours présente et dont la décroissance cellulaire est quasi-linéaire, et la seconde entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jours, période au cours de laquelle les cellules reprennent une prolifération normale. Nous allons étudier ces deux parties par l'étude des pentes des régressions linéaires, ainsi qu'en étudiant le nombre de cellules vivantes au 9^{ème} jour par le calcul du rapport $\frac{\text{nombre de cellules vivantes-lot traité}}{\text{nombre de cellules vivantes-lot contrôle}}$. Ainsi pour un composé donné une valeur de pente entre les 2^{ème} et 7^{ème} jours inférieure à celle du lot contrôle témoignera d'un effet positif sur la protection des cellules, tandis qu'entre les 7^{ème} et 9^{ème} jours une valeur de pente supérieure à celle du lot contrôle indiquera un effet protecteur du composé testé. Dans la figure 69 ci-dessous sont présentées les valeurs des pentes entre le 2^{ème} et le 7^{ème} jours d'abord (figure 69 a), puis entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour (figure 69 b) :

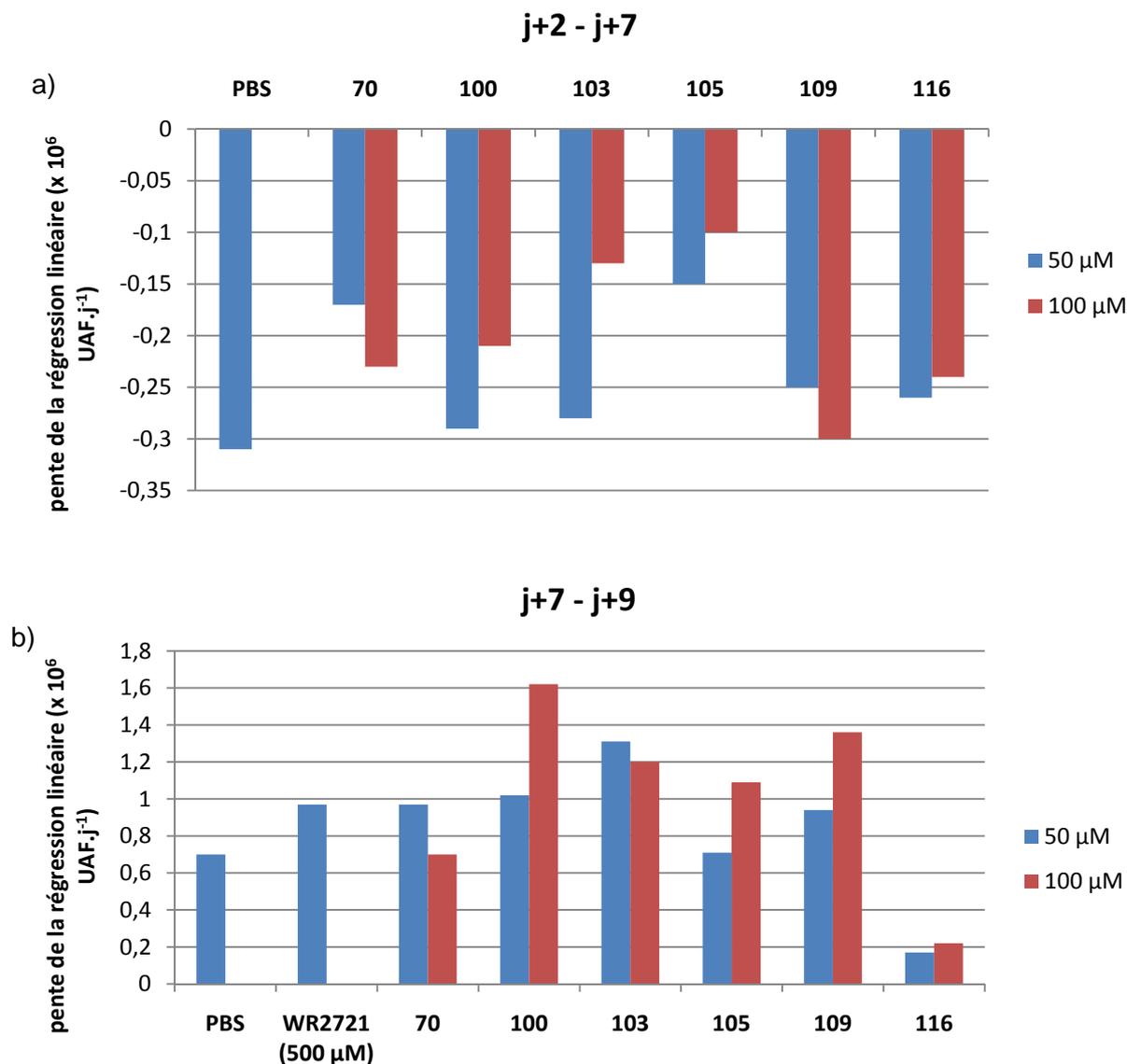


Figure 69 : pentes des régressions linéaires des courbes de prolifération cellulaire de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy entre les : a) 2^{ème} et 7^{ème} jour ; b) 7^{ème} et 9^{ème} jour

Entre les 2^{ème} et 7^{ème} jours, le produit **70** permet un ralentissement des effets des rayonnements, cependant l'effet est moins efficace à 100 μM qu'à 50 μM . Les composés **100** et **103** n'ont que très peu d'effet à 50 μM mais permettent en revanche une bonne protection contre l'effet retard des rayonnements à 100 μM . Le composé **105** est actif dès 50 μM mais l'augmentation de la concentration à 100 μM n'apporte pas d'amélioration conséquente. Enfin les composés **109** et **116** n'ont que très peu d'effet, le composé **109** étant même moins actif à 100 μM qu'à 50 μM . Entre les 7^{ème} et 9^{ème} jours, le WR2721 à 500 μM permet d'améliorer la prolifération cellulaire. Le composé **70** a la même activité à 50 μM , mais là encore il est moins actif à 100 μM . Les composés **100** et **109** ont également une activité

similaire à celle de **70** à la concentration de 50 μM , mais deviennent encore plus efficace à 100 μM , le composé **100** permettant une croissance des cellules deux fois plus rapide qu'en l'absence de traitement. Le composé **103** est très actif à 50 μM , mais l'effet diminue lorsque l'on augmente la concentration à 100 μM . Le composé **105** n'a pas d'effet à 50 μM mais devient actif à 100 μM . Enfin seul le composé **116** présente un effet inverse, ralentissant la croissance des cellules aux deux concentrations.

Nous avons ensuite calculé le rapport $\frac{\text{nombre de cellules vivantes-lot traité}}{\text{nombre de cellules vivantes-lot contrôle}}$ au 9^{ème} jour pour chacun des composés (figure 70) :

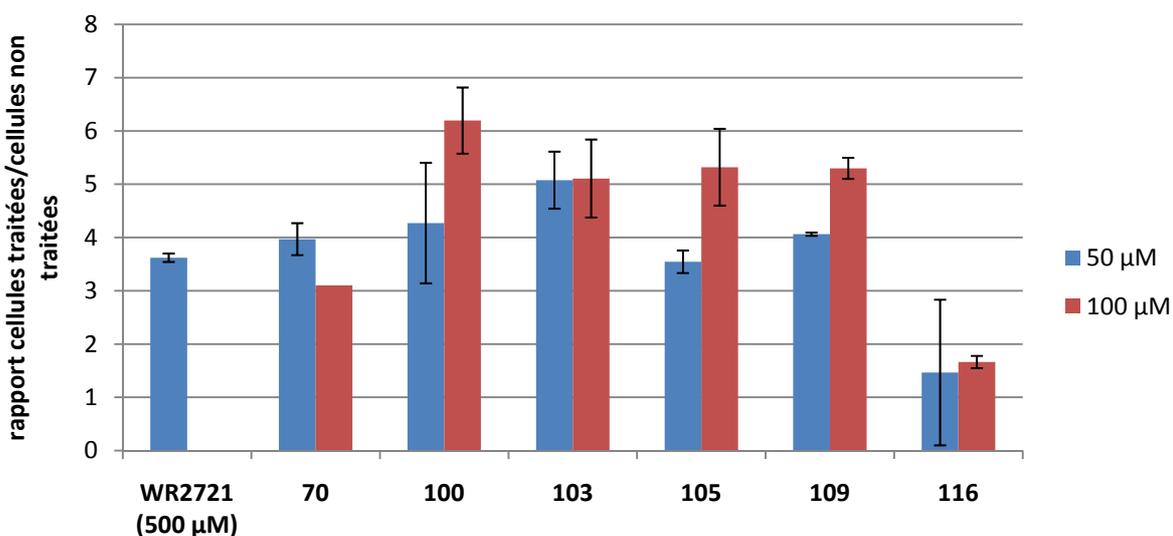


Figure 70 : rapport entre le nombre de cellules vivantes chez les lots traités et le lot non traité au 9^{ème} jour après une irradiation par des rayons X à 8 Gy

Sur cette figure nous constatons que les produits **70**, **100**, **105** et **109** ont des activités similaires à 50 μM et comparables à celle du WR2721 à 500 μM . Le composé **103** possède une meilleure activité, tandis que le composé **116** n'a aucun effet. A 100 μM , seul le composé **70** présente un taux plus faible de cellules vivantes, et le composé **103** a la même activité qu'à 50 μM . Les produits **100**, **105** et **109** en revanche sont plus actifs, le composé **100** permettant d'obtenir six fois plus de cellules vivantes qu'en l'absence de traitement. Le composé **116** reste inactif.

De ces trois figures, nous pouvons apporter certaines conclusions : tout d'abord le composé **70** devient pro-oxydant lorsque l'on augmente trop la concentration, et le composé **116** n'a aucun effet radioprotecteur. Le composé **103** permet une protection efficace des cellules entre les 2^{ème} et 7^{ème} jours, mais l'analyse des données entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jours

montre que l'effet décroît. Enfin les composés **100**, **105** et **109** ont des effets bénéfiques sur la croissance cellulaire aussi bien entre les 2^{ème} et 7^{ème} jours qu'entre les 7^{ème} et 9^{ème} jours après l'irradiation. En comparant les couples **70/116** et **100/109**, ne différant que par leur structure symétrique (**116** et **109**) ou dissymétrique (**70** et **100**), nous constatons que les composés dissymétriques ont des meilleurs effets sur la protection des cellules. En comparaison avec le WR2721, des activités comparables ou meilleures ont été observées et ce à plus faible concentration.

Nous avons ensuite voulu regarder l'effet de la concentration en dérivé d'acide pulvinique. Ayant à ce moment de l'étude le composé **105** en quantités suffisantes, nous avons sélectionné ce produit pour l'étude de l'effet de la concentration. Pour cela, nous avons irradié des cellules TK6 en présence de concentrations croissantes (12.5, 25, 50, 100, 200 et 400 μM). Dans un premier temps nous avons vérifié que le composé n'avait pas de toxicité envers les cellules à ces concentrations (figure 71) :

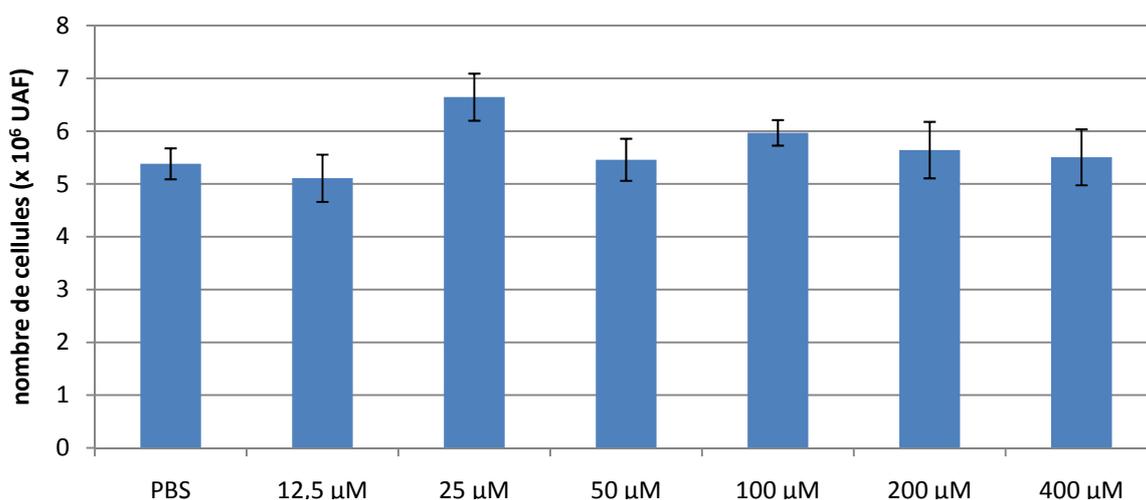


Figure 71 : évaluation de la toxicité du composé **105** à 24 h sur des cellules traitées avec des concentrations variables de produit

Quelle que soit la concentration, le nombre de cellules vivantes est toujours comparable, nous pouvons donc tester l'effet de ce composé en présence de rayonnements. Dans la figure 72 ci-dessous nous présentons l'évolution du nombre de cellules en fonction de la concentration du composé **105** 9 jours après l'irradiation :

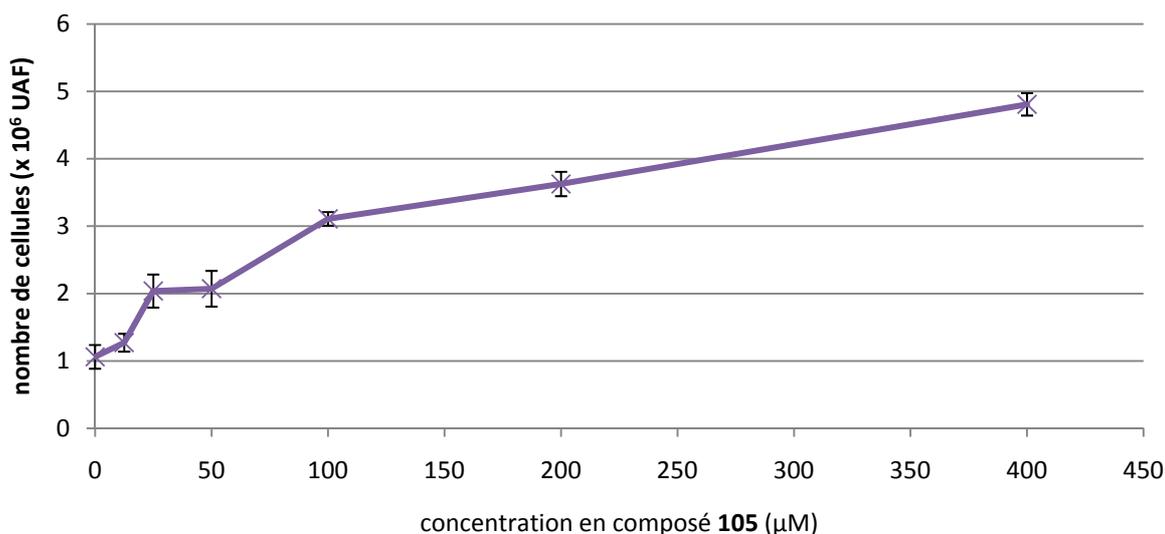


Figure 72 : effet de la concentration en produit **105** sur la prolifération de cellules TK6, 9 jours après irradiation par des rayons X à 8 Gy

Nous constatons un effet croissant de l'activité du composé **105** en fonction de la concentration, ce qui montre que ce dérivé ne devient pas pro-oxydant dans la gamme étudiée lorsque l'on augmente la concentration. Ce résultat est intéressant car il indique que les acides pulviniques simples permettent de supprimer l'effet pro-oxydant présenté par la norbadione A.¹⁴ Ces résultats nous montrent cependant que le taux de croissance cellulaire est plus marqué aux faibles concentrations. Ainsi, passer de 25 µM à 100 µM et de 100 µM à 400 µM permet d'accroître le nombre de cellules vivantes d'un facteur identique (1.5). Il ne semble donc pas nécessaire de recourir à des concentrations plus importantes pour obtenir un effet radioprotecteur.¹⁵

II. 3. Conclusions sur les tests réalisés sur les dérivés d'acides pulviniques

Les tests réalisés ont confirmé le caractère antioxydant des dérivés d'acide pulvinique. Nous avons montré que nous pouvions insérer des chaînes hydrophiles sur la fonction acide carboxylique de ces composés tout en conservant l'activité, cependant des fonctionnalités possédant une activité antiradicalaire intrinsèque peuvent amener à une perte d'activité, aussi il conviendra d'être prudent quant à la nature des groupements que nous souhaiterons introduire à l'avenir. Les dérivés d'acides pulviniques synthétisés ont également montré leur

efficacité sur culture cellulaire, où la plupart des dérivés testés ont présenté une bonne protection de cellules radiosensibles TK6, et ce même à forte concentration. Des dérivés portant une fonction acide carboxylique ont cependant montré une plus faible activité, pouvant laisser prévoir un caractère pro-oxydant ce qui pourrait limiter l'utilisation de cette fonctionnalité. Cet effet pro-oxydant avait déjà été constaté lors des tests de protection de la thymidine avec le composé **103** dans les trois conditions de dégradation et avec le composé **116** lors d'une dégradation par radiolyse.

Des tests *in vivo* sur souris ont été effectués avec les composés **100** et **105**, mais les suspensions préparées (20 mg/mL dans du sérum physiologique) se sont révélées peu homogènes et ayant tendance à former des agglomérats, rendant ainsi difficile l'injection aux souris. Des efforts devront donc être entrepris pour améliorer la formulation galénique des dérivés d'acides pulviniques.

III. Activités antioxydantes et radioprotectrices des 3-aryl-4-hydroxycoumarines

Après avoir étudié les dérivés d'acides pulviniques, nous nous sommes ensuite intéressés aux dérivés de la famille des 3-aryl-4-hydroxycoumarines. L'étude de ces molécules a été réalisée en plusieurs étapes : dans un premier temps nous avons testé les composés **130** et **131** sur le test de protection de la thymidine sous UV et en condition de Fenton, et comparé les données du composé **130** avec le score issu de la prédiction. Ensuite nous avons testé les composés pour lesquels nous avons fait varier les substituants sur chacun des 3 cycles A, B et C lors d'un criblage primaire sur le test au DPPH, puis les composés ont été soumis au test de protection de la thymidine, ceci dans le but de voir l'influence des différentes fonctionnalités introduites et de leur position. Enfin les composés ont été soumis au test de radioprotection cellulaire. Nous rappelons dans la figure 73 ci-dessous les différents composés testés dans cette partie :

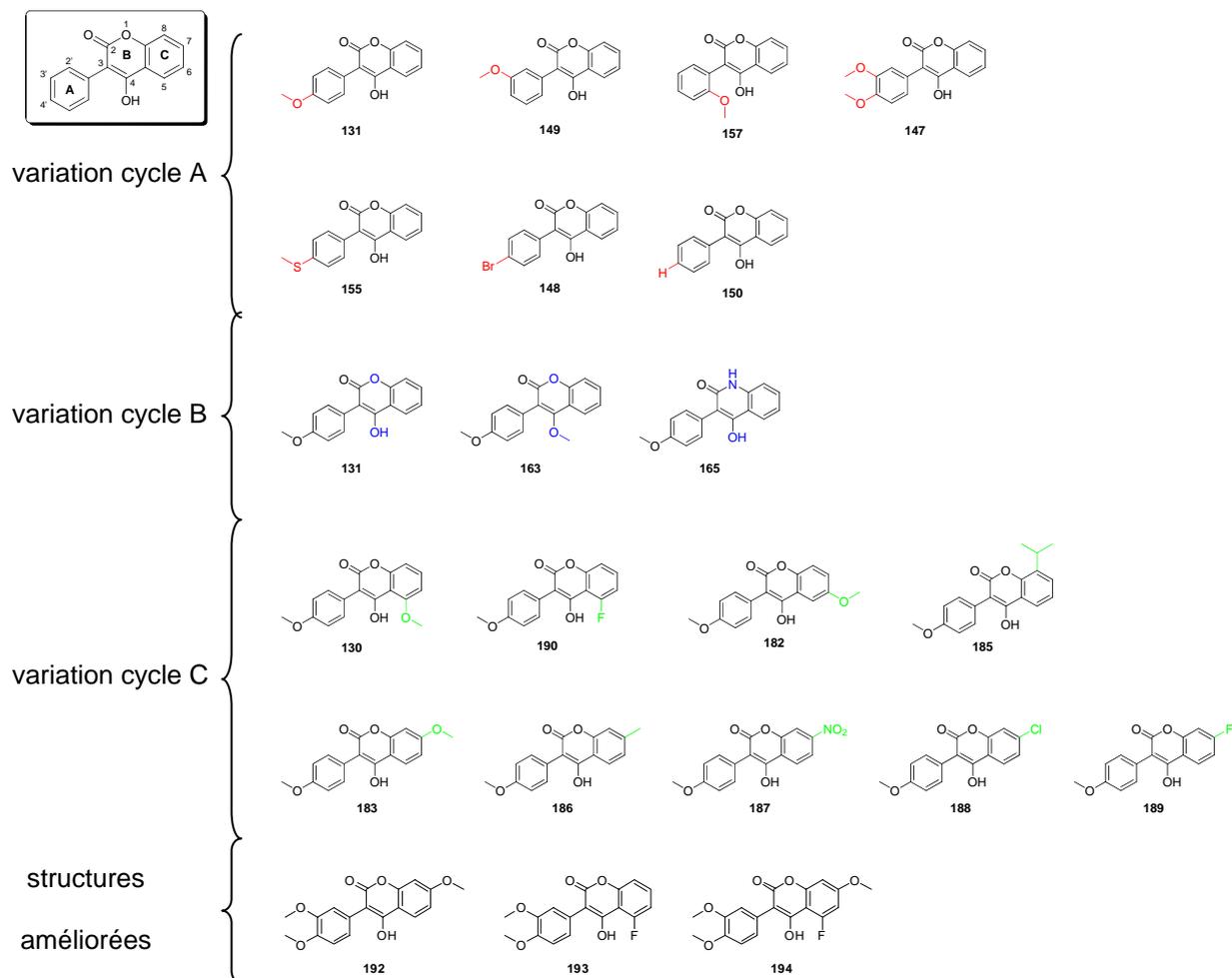


Figure 73 : rappel des 3-aryl-4-hydroxycoumarines synthétisées

III. 1. Résultats sur le test de protection de la thymidine avec les composés 130 et 131

Les deux coumarines **130** et **131** ont tout d'abord été testées sur le test de protection de la thymidine en condition de Fenton (concentration testée : 500 μM) et sous irradiation UV (concentration testée : 100 μM). Le trolox a été pris comme composé de référence. Les résultats sont présentés dans la figure 74 ci-dessous :

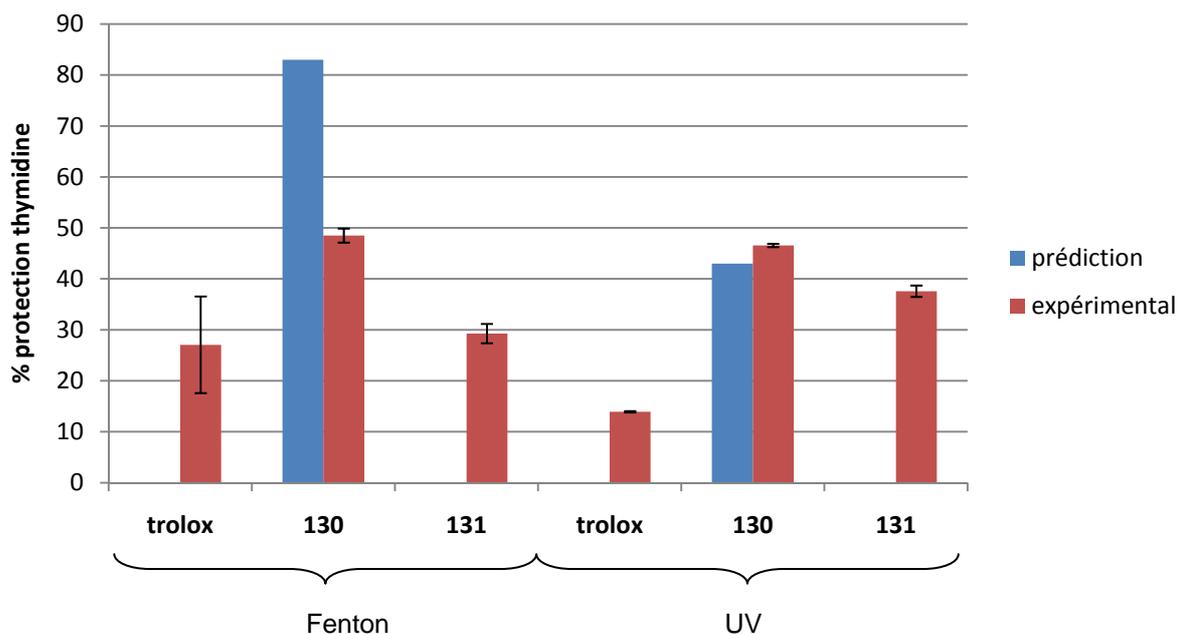


Figure 74 : mesure de la quantité de thymidine intacte restant après une oxydation en condition de Fenton et par irradiation UV, avec les composés **130** et **131**. Comparaison avec les valeurs de prédiction du composé **130**. [Thy] = 70 μ M, tampon pH 7.4, Fenton : [antioxydant] = 500 μ M, [Fe²⁺/EDTA/H₂O₂] 1/1/100 : 700 μ M, 30 minutes ; UV : [antioxydant] = 100 μ M, [H₂O₂] = 5 mM, irradiation UV à 254 nm, 1.75 J.cm⁻². Composé de référence : trolox

La comparaison entre la valeur de protection prédite par le modèle et l'activité réelle du composé **130** observée en conditions de Fenton indique un écart important entre les deux données. Alors que 83 % de protection étaient attendus, seuls 48 % ont été observés. Sous UV en revanche la corrélation est bien meilleure, puisqu'une protection de 43 % était attendue, et nous avons mesuré 47 % de protection de la thymidine. De plus ce composé a montré une activité comparable au meilleur de nos dérivés d'acide pulvinique, l'ester **68**, qui avait fourni une protection de 43 % de la thymidine. Le composé **131** s'est montré moins actif que le composé **130** dans les deux conditions, mais est néanmoins plus actif que le trolox. Il semble donc que, comme dans le cas des acides pulviques, une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'énol et le méthoxy voisin améliore la capture des EAO.

Les activités antioxydantes et radioprotectrices des composés synthétisés, possédant des variations sur chacun des trois cycles, ont ensuite été étudiées. Nous allons par la suite présenter les résultats obtenus sur trois tests, le test de capture du radical DPPH, le test de protection de la thymidine et le test de radioprotection cellulaire.

III. 2. Mesure de l'activité coumarines synthétisés sur le test de capture du radical DPPH

Ce test de capture du radical DPPH a été réalisé au Laboratoire de Pharmacognosie dirigé par le Pr Annelise Lobstein avec l'aide d'Amélie Leick.

III. 2. i. Influence du cycle A

A ce moment de l'étude nous avons été confrontés à des problèmes survenus avec le test de protection de la thymidine. Ne pouvant pas utiliser ce test mais souhaitant tout de même étudier l'influence des substituants sur chacun des cycles de nos composés, nous nous sommes tourné vers le test de capture du radical DPPH. Nous n'avons pas calculé ici d'EC₅₀ mais mesuré le pourcentage d'inhibition du DPPH à deux concentrations différentes, 250 µM et 500 µM, et ce après 20 minutes d'incubation.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence des substituants portés par le cycle A (figure 75) :

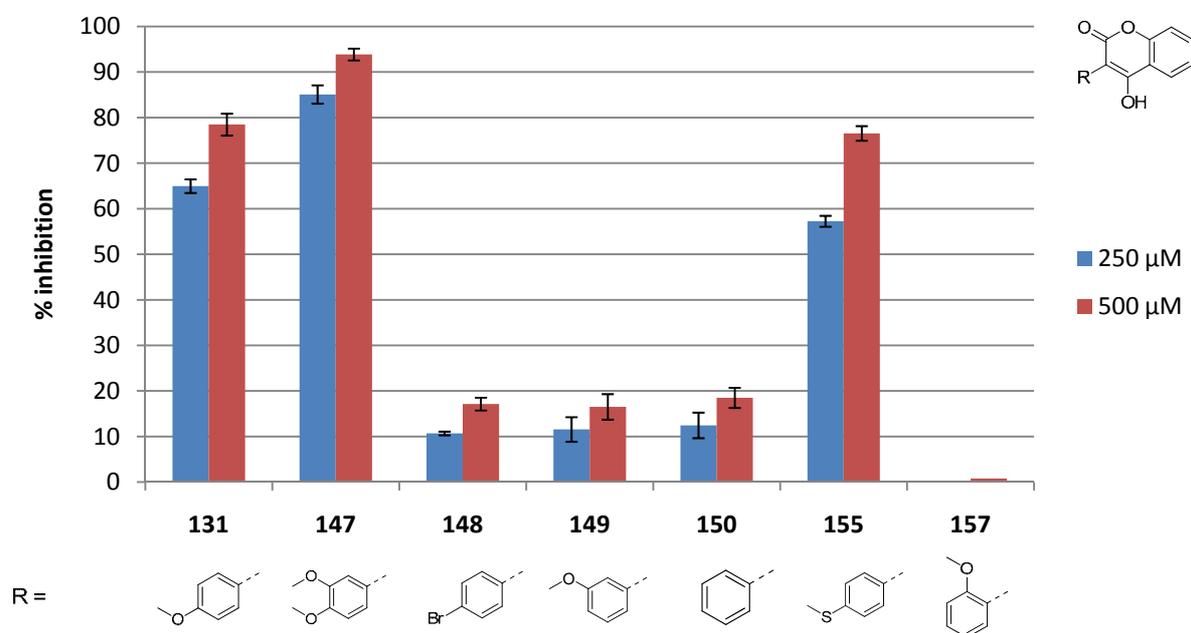


Figure 75 : influence du cycle A sur l'inhibition du radical DPPH. [DPPH] = 34 µM, incubation pendant 20 minutes

Les trois composés **131**, **147** et **155** ont montré de bonnes activités aux deux concentrations, tandis que les composés **148**, **149**, **150** et **157** n'ont en revanche que peu ou pas du tout inhibé le radical DPPH. L'influence de la position d'un substituant méthoxy a donc ici une grande importance, de même que la nature du substituant en position ortho, un groupement méthoxy et méthylthio donnant de meilleurs résultats qu'un atome de brome ou qu'en l'absence de substituant. L'inactivité du composé **157** peut s'expliquer par sa proximité avec la fonction énonol et l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire, modifiant ainsi le pKa de cet énonol et influençant ainsi le mécanisme de capture du radical.

III. 2. ii. Influence du cycle B

L'influence du cycle B a ensuite été étudiée. Pour cela, le cycle aromatique en position 3 est le 4-méthoxyphényle, et le cycle C ne porte aucun substituant. Les trois composés **131**, **163** et **165** ont été testés. Les résultats sont présentés dans la figure 76 :

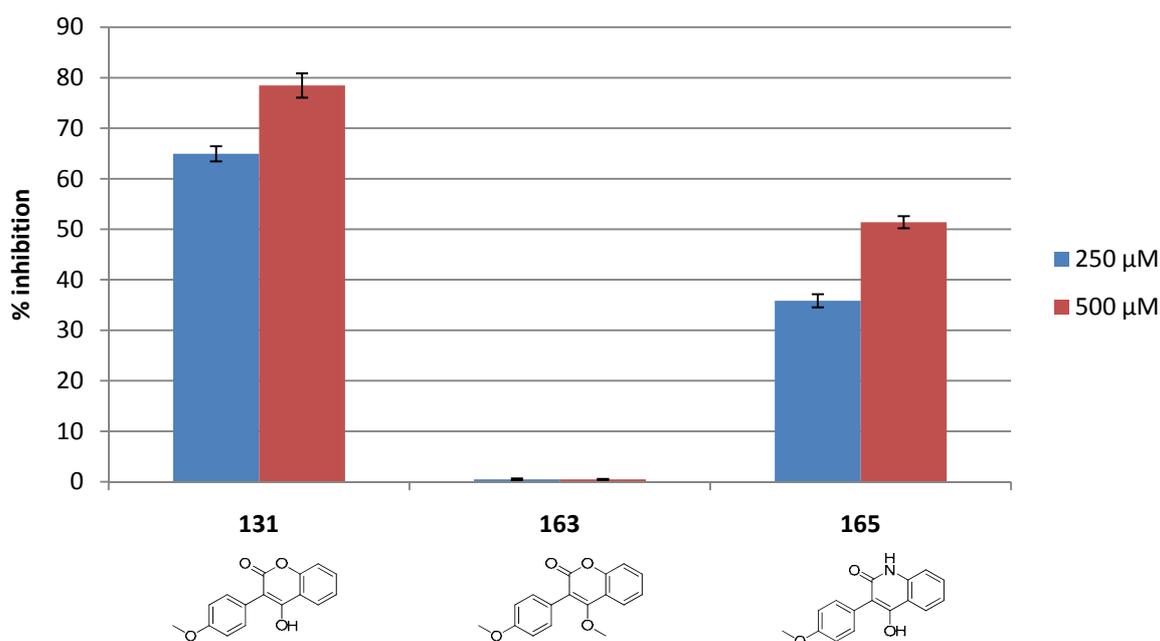


Figure 76 : influence du cycle B sur l'inhibition du radical DPPH. [DPPH] = 34 μM , incubation pendant 20 minutes

Comme attendu, le blocage de la fonction énonol par une fonction méthoxy (**163**) a pour effet de totalement inhiber le pouvoir antiradicalaire de la molécule, ce qui montre que la capture du radical se fait par cette fonction. Le remplacement de la fonction lactone par une lactame (**165**) conduit à une baisse du pouvoir antiradicalaire. L'atome d'azote étant moins électro-négatif que l'atome d'oxygène, la fonction lactame est de ce fait moins attractrice que

la lactone et stabilisera donc moins bien le radical délocalisé en position 3, ce qui explique la baisse d'activité de **165** comparé à **131**.

III. 2. iii. Influence du cycle C

Nous avons enfin étudié l'influence des substituants sur le cycle C des 3-aryl-4-hydroxycoumarines. Nous avons utilisé comme cycle aromatique en position 3 un 4-méthoxyphényle. Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH à 250 μM et 500 μM sont présentés dans la figure 77 :

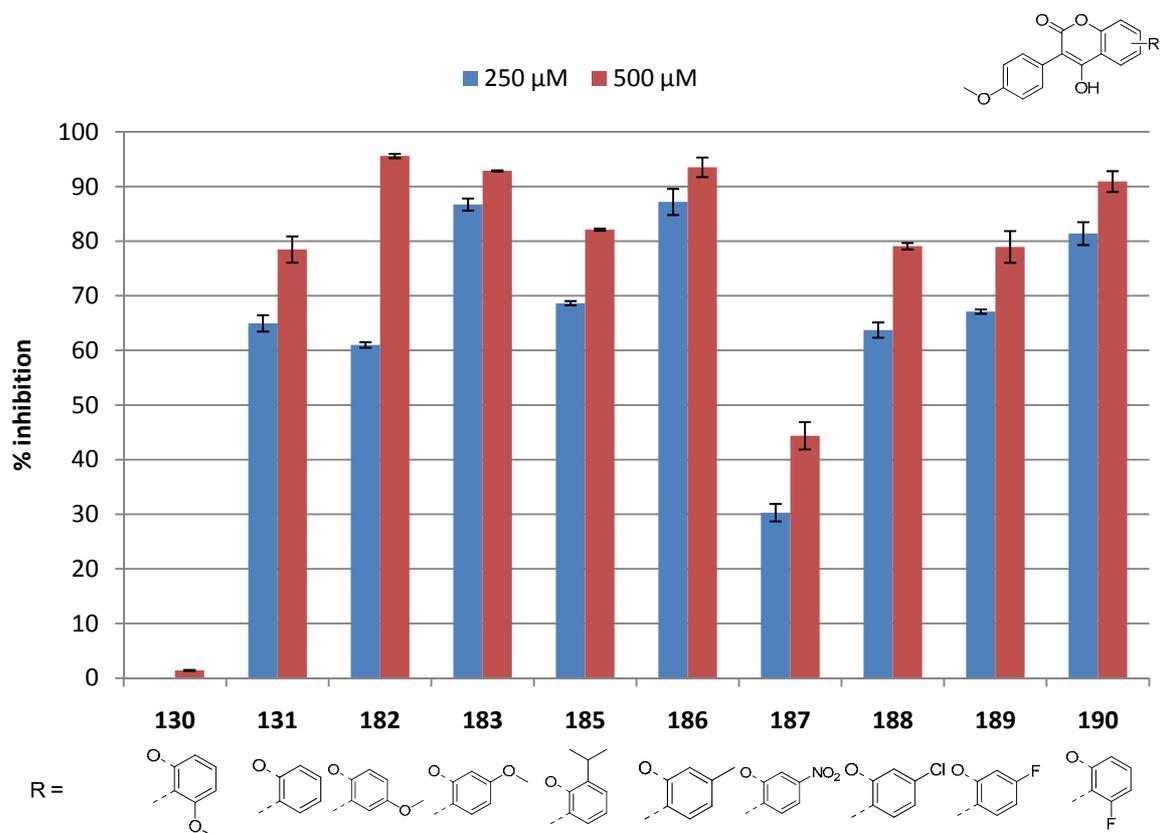


Figure 77 : influence du cycle C sur l'inhibition du radical DPPH. [DPPH] = 34 μM , incubation pendant 20 minutes

Alors que le composé **130** avait montré une très bonne protection de la thymidine irradiée sous UV, il est ici totalement inactif, ainsi même à 100 μM le radical DPPH n'est pas stabilisé. Cependant, ce résultat peut, tout comme dans le cas du composé **157**, s'expliquer par l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction méthoxy et l'énol du cycle B, modifiant ainsi le pKa de ce dernier et influant alors sur l'aptitude à capturer le radical DPPH. Les composés **131**, **185**, **188** et **189** ont présenté des activités similaires aux deux concentrations, avec des valeurs de protection voisines de 65 % d'inhibition à 250 μM

et 80 % à 500 μM . Le composé **182** a montré une activité similaire aux produits précédents à 250 μM mais s'est avéré plus actif à 500 μM , avec un pourcentage d'inhibition de 95 %. Enfin les composés **183**, **186** et **190** ont donné de très bons résultats dès 250 μM , avec entre 81 % et 87 % d'inhibition à cette concentration. Une fonction nitro en position 7 est en revanche bien moins efficace.

III. 2. iv. Etude des structures améliorées

Suite au précédent test nous avons préparé trois structures améliorées combinant les substituants apportant la meilleure activité sur le test de capture du DPPH. Ces structures sont rappelées dans la figure 78 ci-dessous :

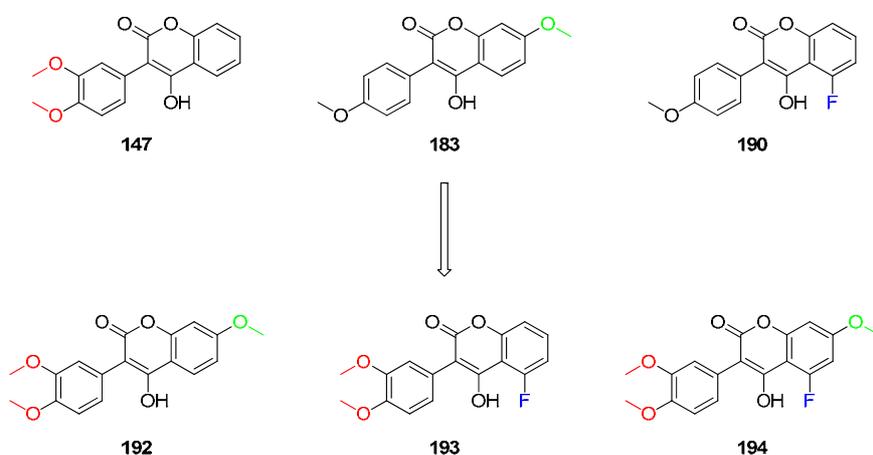
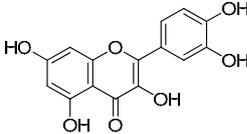
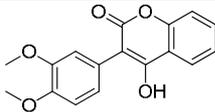
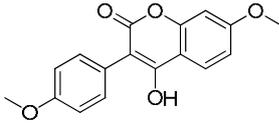
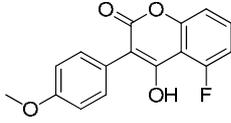
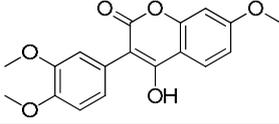
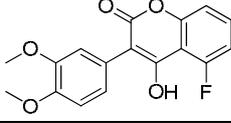
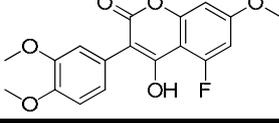


Figure 78 : structures optimisées d'après la précédente étude de capture du radical DPPH

Sur ces six composés nous avons, lors d'une nouvelle expérience, mesuré les IC_{50} à 20 minutes, c'est-à-dire les concentrations des composés permettant d'inhiber 50 % du radical DPPH au bout de 20 minutes d'incubation. Les valeurs sont reportées dans le tableau 21 ci-dessous. Pour ce test la quercétine a été prise comme composé de référence.

Tableau 21 : IC₅₀ des trois coumarines améliorées ainsi que les trois coumarines initiales. [DPPH] = 34 μM, incubation pendant 20 minutes. Le test a été réalisé en triplicate.

référence produit	structure	IC ₅₀ (μM)
quercétine		26.5 ± 2.0
147		68.4 ± 0.5
183		50.6 ± 0.8
190		75.1 ± 1.1
192		41.1 ± 0.6
193		46.4 ± 1.0
194		40.8 ± 1.3

L'introduction d'une fonction méthoxy en position 3' du cycle A sur les composés **183** et **190** pour donner respectivement **192** et **193** a bien eu pour effet d'améliorer l'activité antiradicalaire, cependant l'effet est moins marqué dans le cas du composé **192**. La combinaison d'un atome de fluor en position 5 et d'une fonction méthoxy en position 7 n'améliore sensiblement pas l'activité par rapport aux composés **192** et **193**, lesquels ne présentent qu'une seule de ces fonctionnalités. Les trois structures améliorées présentent donc des valeurs d'IC₅₀ meilleures que les trois structures initiales, cependant le gain en activité n'est pas conséquent. En outre elles sont moins actives que le composé de référence, la quercétine.

Les résultats obtenus sur le test de capture du radical DPPH avec les dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine nous ont apporté des renseignements intéressants sur la nature des substituants à introduire ou à proscrire sur chacun des trois cycles. Ainsi sur le cycle A des groupes méthoxy et méthylthio en position 2' et/ou 4' et sur le cycle C un atome de fluor en

position 5 et un groupe méthoxy en position 7 auront un effet positif sur l'activité antioxydante. La création d'un nouveau modèle QSPR à partir de ces données sera effectuée dans le but de prédire l'activité potentielle de nouvelles molécules, mais également de déterminer quels sont, avec ce test, les facteurs importants pour l'activité. La comparaison de ces facteurs avec ceux déterminés sur d'autres modèles QSPR obtenus à partir d'autres tests antioxydants devraient nous permettre d'en savoir plus sur les modes d'action des antioxydants étudiés.

III. 3. Résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine

III. 3. i. Effets des modifications sur le cycle A

Lorsque les problèmes survenus précédemment sur le test de protection de la thymidine ont été résolus, nous avons alors pu étudier les dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine. Les tests ont été réalisés selon les trois conditions oxydantes précédemment décrites, aux concentrations suivantes : radiolyse : 50 μM , Fenton et UV : 100 μM . Nous présentons tout d'abord les résultats obtenus sur les composés possédant des variations de substituants sur le cycle A variant (figure 79) :

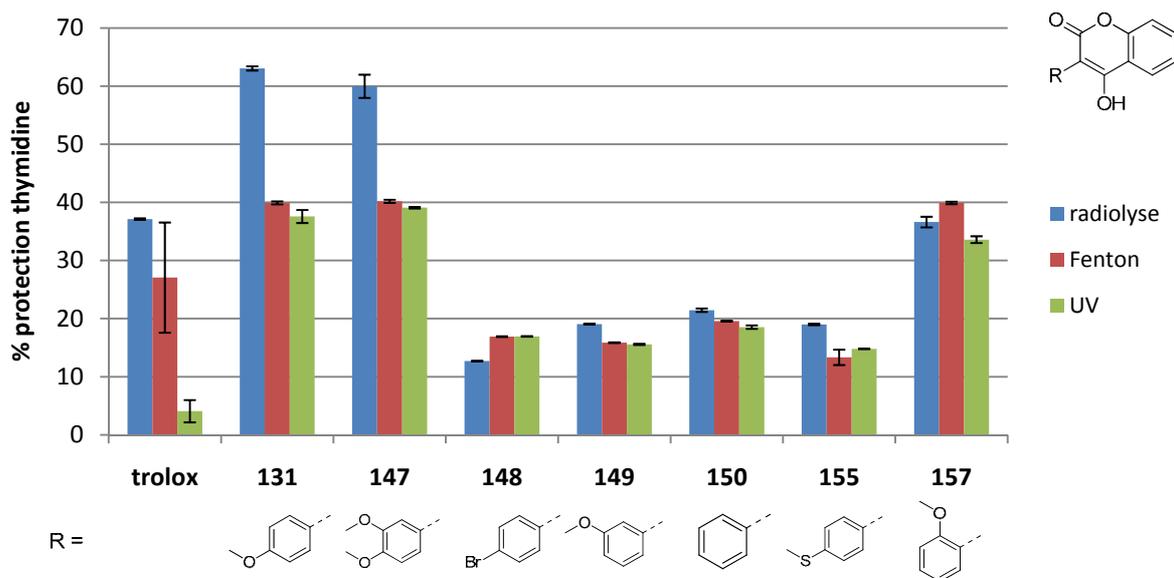


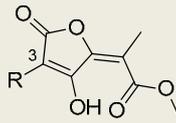
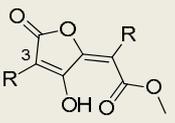
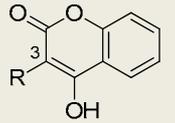
Figure 79 : influence du cycle A sur la protection de la thymidine. [Thy] = 70 μ M, tampon 7.4, radiolyse : [antioxydant] = 50 μ M, 180 Gy ; Fenton : [Fe²⁺/EDTA/H₂O₂] 1/1/100 : 700 μ M, [antioxydant] = 100 μ M, 30 minutes ; UV : 254 nm, 1.75 J.cm⁻², [H₂O₂] = 5 mM

A l'exception des composés **131** et **147** en radiolyse, les valeurs de protection sur les trois tests sont similaires pour chacune des coumarines testées. Les composés **131** et **147** sont, tout comme lors du test au DPPH, les plus actifs tandis que les autres composés le sont moins. Nous retrouvons donc ici une bonne corrélation entre le test DPPH et le test de protection de la thymidine. Le composé **155**, actif en DPPH, apporte ici peu de protection. En revanche, le composé **157**, totalement inactif en DPPH, confère une très bonne protection à la thymidine. Le fait que ce composé ait ici une bonne activité peut être dû au fait que dans ce test, le pKa de la fonction énonol n'a pas d'importance. En comparaison avec la référence, les résultats sont mitigés d'une condition à l'autre. Ainsi en radiolyse et en condition de Fenton, **131** et **147** sont plus actifs, **157** a autant d'effet, et les autres molécules sont moins actives, tandis qu'en UV tous les composés apportent une meilleure protection.

Précédemment au laboratoire six dérivés d'acides pulviques (trois symétriques et trois dissymétriques) possédant des cycles phényl, 4-méthoxyphényl et 4-bromophényl, ont été préparés et testés sur le test de protection de la thymidine, sous UV et en condition de Fenton.¹⁶ Dans le tableau 22 ci-dessous sont présentées les structures des acides pulviques et des coumarines possédant ces mêmes cycles, et les valeurs de protection de la thymidine obtenus en condition de Fenton et sous irradiation UV. Il avait alors été constaté que sur les dérivés d'acide pulvique ces trois cycles n'avaient pas une forte influence sur l'activité car des valeurs de protection similaires avaient toujours été obtenues. Dans le cas des coumarines, l'effet ici est inversé, puisque ces trois mêmes cycles induisent de fortes

variations dans les quantités de thymidine intacte mesurées. Il y a donc d'autres mécanismes qui interviennent dans l'activité antioxydante des acides pulviques et des coumarines qui restent méconnus, et que la modélisation par QSPR pourrait nous aider à élucider.

Tableau 22 : comparaison des activités entre des acides pulviques et des coumarines ayant les mêmes cycles aromatiques en position 3. En rouge : mauvaise activité ; en noir : activité moyenne ; en vert : bonne activité

R						
	% prot. Thy Fenton (500 μM)	% prot. Thy UV (100 μM)	% prot. Thy Fenton (500 μM)	% prot. Thy UV (100 μM)	% prot. Thy Fenton (100 μM)	% prot. Thy UV (100 μM)
Ph-	91	34	93	42	20	19
4-MeO-C ₆ H ₄ -	89	38	92	45	40	38
4-Br-C ₆ H ₄ -	68	26	100	50	17	17

III. 3. ii. Effets des modifications sur le cycle B

Nous avons ensuite testé les trois composés **131**, **163** et **165**, possédant des variations sur le cycle B. Les résultats sont présentés dans la figure 80 ci-dessous :

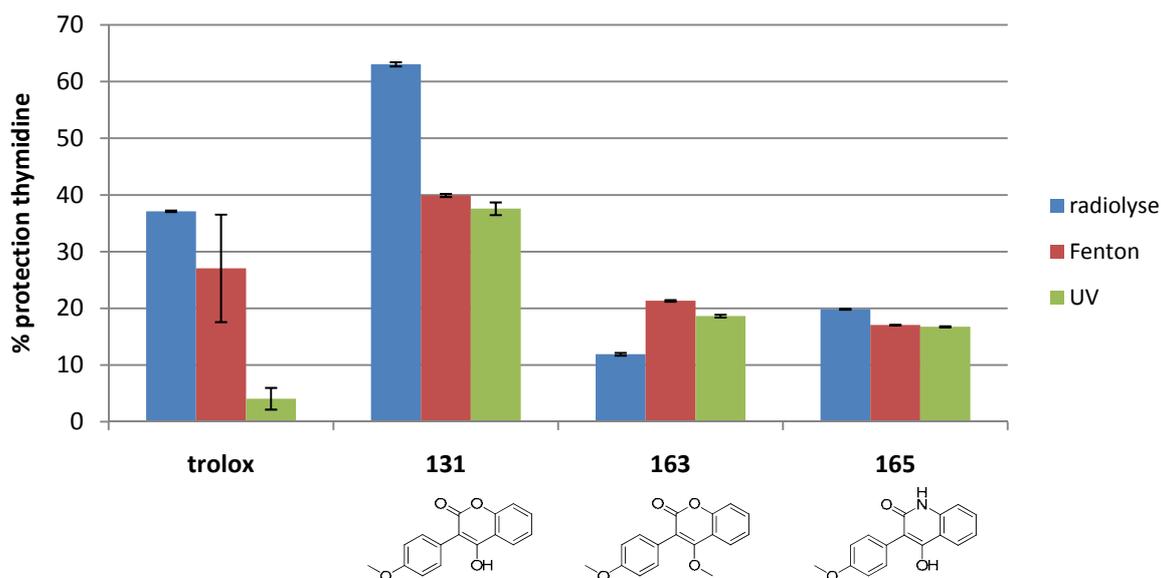


Figure 80 : influence du cycle B sur la protection de la thymidine. [Thy] = 70 μM, tampon 7.4, radiolyse : [antioxydant] = 50 μM, 180 Gy ; Fenton : [Fe²⁺/EDTA/H₂O₂] 1/1/100 : 700 μM, [antioxydant] = 100 μM, 30 minutes ; UV : 254 nm, 1.75 J.cm⁻², [H₂O₂] = 5 mM

Ces résultats sont à nouveau en accord à partir des observations faites sur le test au DPPH, à savoir une meilleure activité du composé **131** comparé aux dérivés **163** et **165**. Cependant, alors que **163** était totalement inactif lors du test au DPPH, il présente ici des activités comparables au composé **165**. Ici encore les valeurs de protection obtenues en condition de Fenton et sous irradiation UV sont très proches, et les observations faites sont les mêmes d'une condition d'oxydation à l'autre.

III. 3. iii. Effets des modifications sur le cycle C

Nous avons enfin examiné l'influence des substituants sur le cycle C des coumarines. Les résultats de protection de la thymidine sont présentés dans la figure 81 ci-dessous :

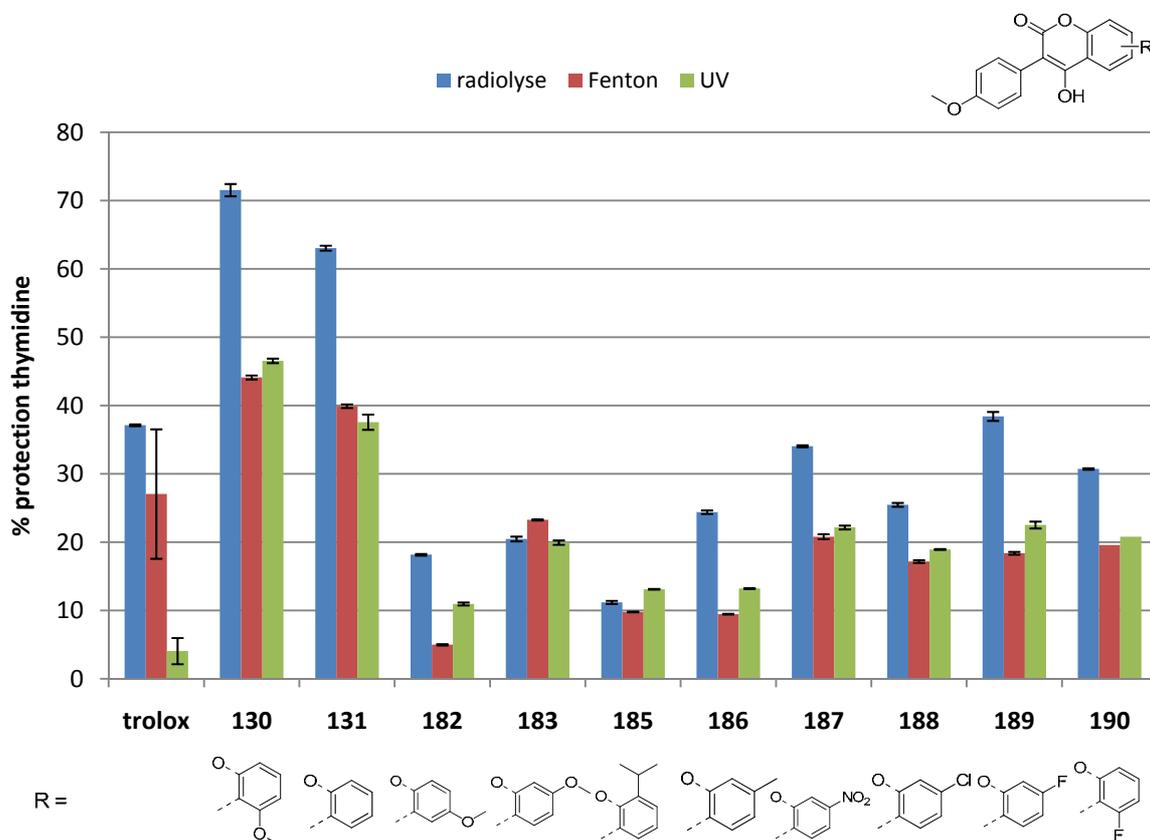


Figure 81 : influence du cycle C sur la protection de la thymidine. [Thy] = 70 μ M, tampon 7.4, radiolyse : [antioxydant] = 50 μ M, 180 Gy ; Fenton : [Fe²⁺/EDTA/H₂O₂] 1/1/100 : 700 μ M, [antioxydant] = 100 μ M, 30 minutes ; UV : 254 nm, 1.75 J.cm⁻², [H₂O₂] = 5 mM

Les composés **130** et **131** donnent ici les meilleures valeurs de protection dans les trois conditions testées, tandis que les autres dérivés sont nettement moins actifs. Nous observons ici des tendances très différentes de celles obtenues avec le test au DPPH, lors

duquel les substituants sur le cycle C avaient bien plus d'importance. A l'exception du composé **130**, tout substituant introduit sur ce cycle diminuent l'activité des coumarines, et dans le cas du composé **130** le méthoxy en position 5 n'améliore pas sensiblement l'activité. Lorsqu'un atome de fluor est mis sur cette position, nous obtenons l'effet inverse de ce que nous avons observé lors du test au DPPH. L'influence de cette partie de la molécule sur l'activité radioprotectrice est ici plus complexe à déterminer que dans les cas des cycles A et B, et au regard des deux tests DPPH et protection de la thymidine nous ne pouvons pas conclure quant aux meilleurs substituants à utiliser.

III. 3. iv. Comparaison avec les scores issus du modèle de prédiction

Suite au premier test réalisé précédemment sur la protection de la thymidine avec les composés **130** et **131**, une nouvelle série de données expérimentales a servi à affiner le modèle, et une nouvelle prédiction a été réalisée cette fois sur les dérivés de coumarine synthétisés. Le modèle de prédiction en condition de Fenton ayant été entraîné à partir de données sur des composés testés à 500 μM , nous ne pourrions ici pas comparer les scores de prédiction avec les activités que nous venons de voir puisqu'ici les nouveaux dérivés ont été testés à 100 μM , aussi nous allons comparer uniquement les données obtenues en condition d'irradiation par UV (figure 82) :

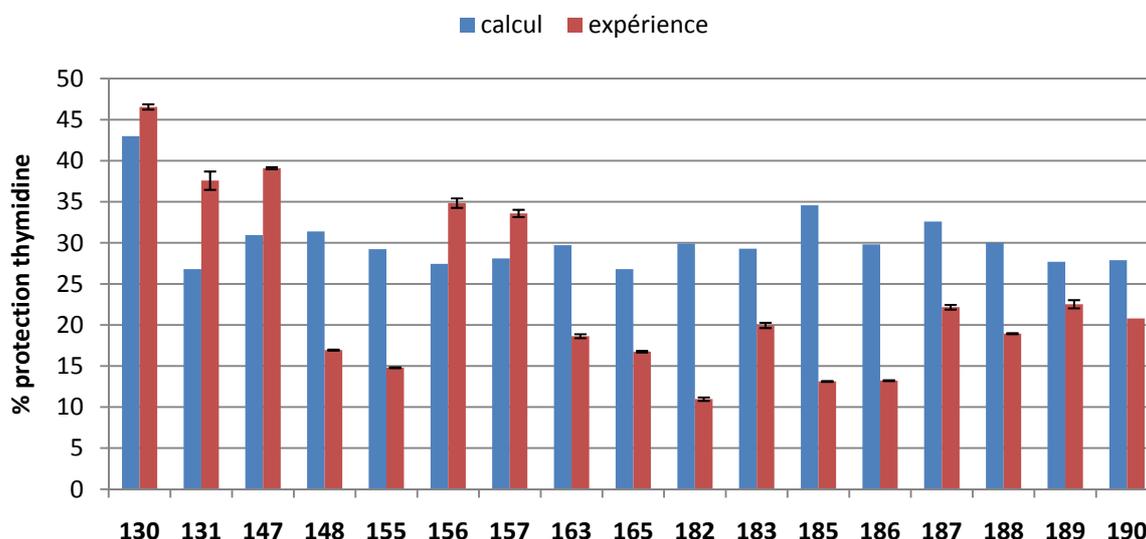


Figure 82 : comparaison entre les scores de prédiction de l'activité protectrice de la thymidine dégradée sous irradiation UV avec les données expérimentales

Globalement les scores de protection issus du modèle sont assez différents des valeurs expérimentales obtenues. Parmi les composés possédant des variations sur le cycle A, les composés **131**, **147** et **157** sont les composés ayant donné des valeurs expérimentales les plus proches de la prédiction. Ils possèdent tous les trois des substituants méthoxy. Les composés **148** et **155** ont en revanche donné des écarts bien plus importants. En ce qui concerne les composés possédant des variations sur le cycle C, seuls les composés **189** et **190**, possédant tous les deux un atome de fluor, ont donné des faibles écarts entre la prédiction et l'expérience. Nous rappelons que le modèle a été créé initialement à partir de données ne portant que sur des dérivés d'acides pulviniques. Précédemment nous avons remarqué que les trois mêmes cycles aromatiques en position 3 sur des coumarines et des acides pulviniques symétriques et dissymétriques avaient donné des comportements différents d'une famille à l'autre, il n'est donc pas anormal que le modèle QSPR créé à partir de données sur des acides pulviniques soit encore très peu précis. L'entraînement avec des données portant sur des nouvelles familles de composés pourra permettre d'affiner le modèle et de prendre en compte de nouveaux facteurs qui ne sont pas forcément présent dans toutes les familles étudiées. Ce résultat montre que la compréhension des mécanismes d'action est compliquée et que sur ce modèle, les facteurs ayant le plus d'importance pour obtenir un bon effet antioxydant n'ont pas encore été déterminés. Cependant ces nouvelles données vont nous permettre d'affiner le modèle de prédiction.

III. 4. Conclusions sur les tests antioxydants réalisés avec les coumarines

Pour conclure sur les tests réalisés avec les dérivés de coumarines sur le test au DPPH et de protection de la thymidine, nous avons observé, lors des études des groupes A et B, des comportements similaires des composés entre les deux tests, exception faite du composé **157** pour lequel l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire pourrait avoir perturbé le test au DPPH. Sur le cycle A les meilleurs substituants sont ceux possédant un méthoxy en position 2' et 4' (composés **131**, **147** et **157**), car ce sont ceux qui permettent une délocalisation du radical sur l'atome d'oxygène (schéma 65). Le composé **155** a montré un comportement similaire en DPPH mais qui n'a pas été confirmé sur le test de protection de la thymidine. Inversement le composé **157** a été totalement inactif sur le test au DPPH mais a cependant montré une bonne activité protectrice de la thymidine. Les deux tests

DPPH et thymidine nous ont donc donné ici des informations similaires relatives à la capture du radical et à sa stabilisation par mésomérie.

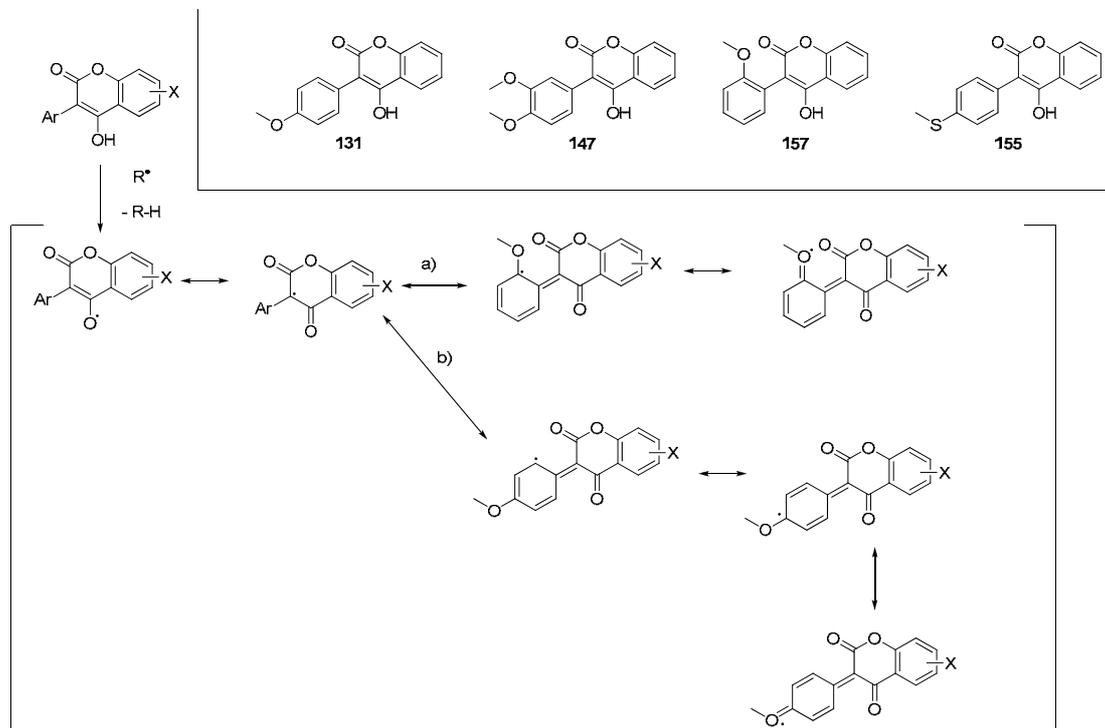


Schéma 65 : délocalisation du radical sur le cycle A en présence d'un groupe 2-méthoxy (voie a) ou d'un groupe 4-méthoxy (voie b)

En revanche l'étude des variations sur le cycle C n'a donné que peu de corrélation, ce qui ne nous permet pas de connaître avec précision l'implication de cette partie de la molécule dans l'activité radioprotectrice. Le composé **130** a montré un comportement similaire au composé **157**, à savoir aucune activité sur le test au DPPH mais une bonne activité protectrice envers la thymidine. Le groupement méthoxy en position 5 est le seul substituant sur le cycle C qui a permis d'observer une activité. Sur les coumarines, lorsque le radical est formé sur l'énol il va se délocaliser sur les cycles A et B, mais pas sur le cycle C (schéma 65), celui-ci ne va alors intervenir que pour stabiliser le nuage électronique par des effets autres que mésomères. Le groupe méthoxy en position 5 pourrait intervenir en créant une liaison hydrogène avec l'énol en position 4 qui faciliterait la capture du radical. Les deux tests nous ont donné des informations similaires en ce qui concerne les variations sur les cycles A et B et donc sur la délocalisation du radical, mais des informations différentes sur l'influence du cycle C, ce qui ne nous permet pas de savoir comment ce dernier intervient dans l'activité.

Le modèle QSPR en conditions de dégradation UV a donné des valeurs de prédiction éloignées de celles observées expérimentalement. La comparaison des données sur trois coumarines, trois acides pulviniques symétriques et trois acides pulviniques dissymétriques possédant les mêmes cycles aromatiques en position 3 a montré des différences de comportement. Ceci montre les différences de comportement d'une famille de composés à l'autre et révèle la difficulté à prédire l'activité d'un composé. Le modèle ayant été entraîné avec des acides pulviniques principalement, il n'est alors pas anormal de constater de telles différences entre la prédiction et la réalité à ce stade de l'étude. Il sera alors nécessaire de disposer de données supplémentaires et sur des structures différentes. Les nouvelles données seront à nouveau utilisées pour entraîner le modèle et ainsi permettre un affinage supplémentaire, afin de tenter de comprendre l'influence du cycle C.

III. 5. Résultats obtenus sur le test de radioprotection cellulaire

Les coumarines ont ensuite été testées sur le test de protection cellulaire. Les dérivés **163** et **165** n'ont pas pu être testés car ils n'étaient pas assez solubles. Les structures optimisées **192**, **193** et **194** ont été incorporées à ce test. Les composés ont été testés dans les mêmes conditions que celles utilisées avec les dérivés d'acide pulvinique, à savoir aux deux concentrations 50 μM et 100 μM , et sous irradiation de rayons X à 8 Gy. L'étude de la toxicité des composés à cette concentration a tout d'abord été réalisée (figure 83) :

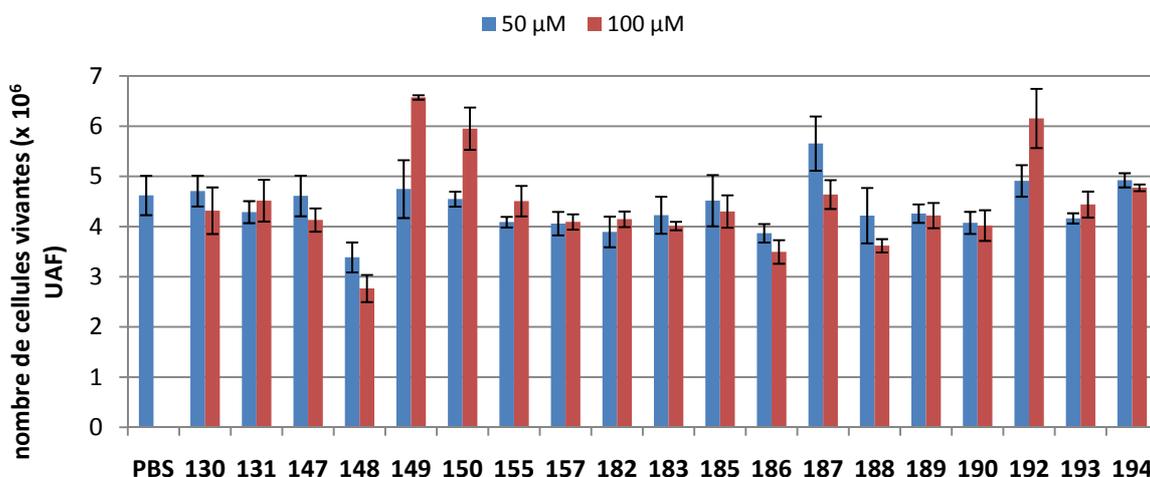


Figure 83 : évaluation de la toxicité des composés sélectionnés sur TK6. Mesure du nombre de cellules 24h après incubation en présence de 50 μM et 100 μM de composé à tester

A l'exception du composé **148**, l'ensemble des coumarines ne présente pas de toxicité particulière. L'ensemble des composés a ensuite été soumis au test d'irradiation cellulaire par des rayons X à 8 Gy. Les allures des courbes sont présentées dans la figure 84 ci-dessous :

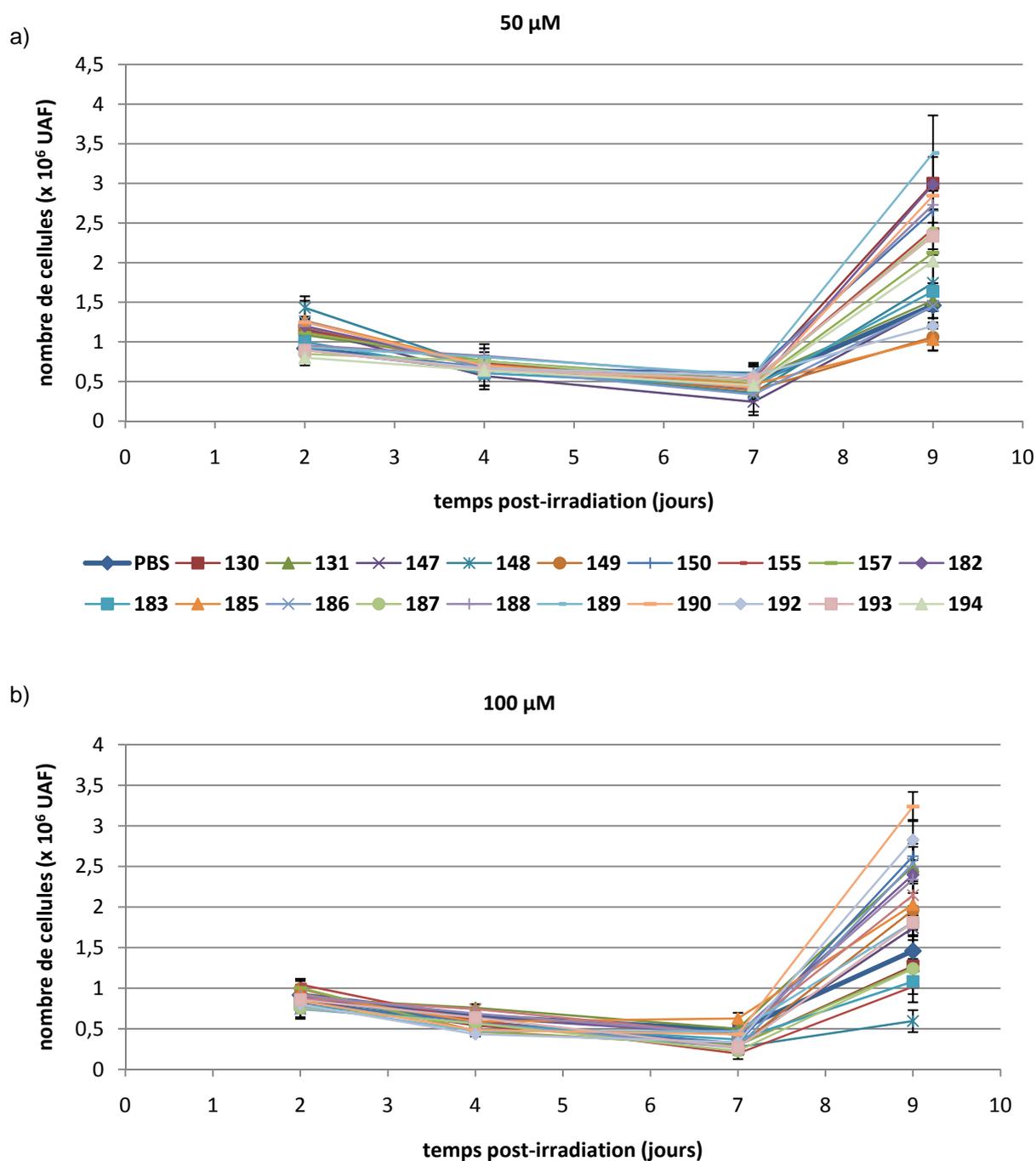


Figure 84 : évolution du nombre de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy traitées par des dérivés de coumarine à : a) **50 μM** ; b) : **100 μM** . Suivi à 2, 4, 7 et 9 jours. Les mesures sont effectuées par fluorescence en quintuplicate et exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF), proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu

L'allure générale des courbes est la même que celle observée avec les dérivés d'acide pulvinique. En effet nous observons une décroissance du nombre de cellules jusqu'au 7^{ème} jour, et une reprise de la prolifération entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour. Cependant que ce soit à 50 μ M ou 100 μ M très peu de différence est observée entre les 2^{ème} et 7^{ème} jours, et le nombre de cellules au 7^{ème} jour est sensiblement le même quelque soit le composé testé. Il y a en revanche plus de disparités entre les 7^{ème} et 9^{ème} jours, c'est pourquoi nous allons uniquement nous intéresser au rapport $\frac{\text{nombre de cellules vivantes-lot traité}}{\text{nombre de cellules vivantes-lot contrôle}}$ au 9^{ème} jour, en regardant tout d'abord l'influence des substituants sur le cycle A (figure 85) :

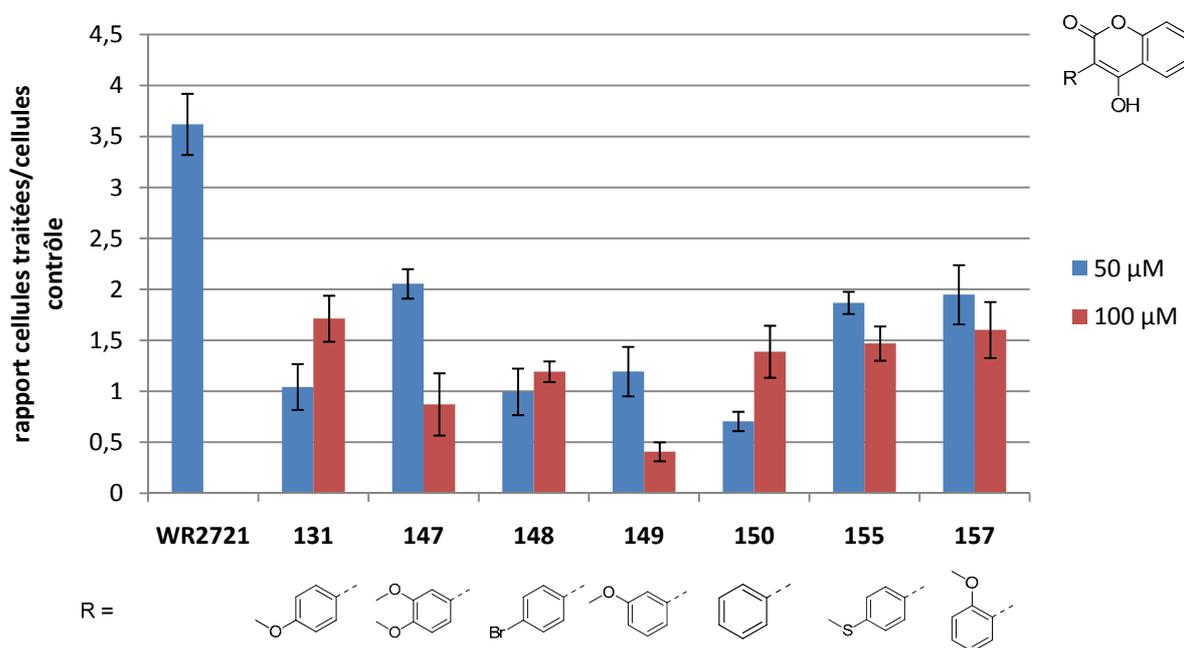


Figure 85 : influence du cycle A sur la prolifération de cellules TK6 irradiées par des rayons X à 8 Gy. Rapport entre le nombre de cellules vivantes chez les lots traités et le lot non traité au 9^{ème} jour après irradiation.

L'ensemble des composés testés est moins actif que le WR2721, et n'ont qu'un effet très limité sur la protection des cellules. Les composés **131**, **147**, **155** et **157**, qui avaient donné les meilleurs résultats lors des tests DPPH et de protection de la thymidine, sont ici encore les meilleurs composés de cette série, confirmant l'intérêt d'une fonction méthoxy ou méthylthio en position 2' et/ou 4', cependant ils deviennent pro-oxydant dès 100 μ M.

Les activités des composés possédant divers substituants sur le cycle C et des structures améliorées ont ensuite été étudiées. Les résultats sont rapportés dans la figure 86 :

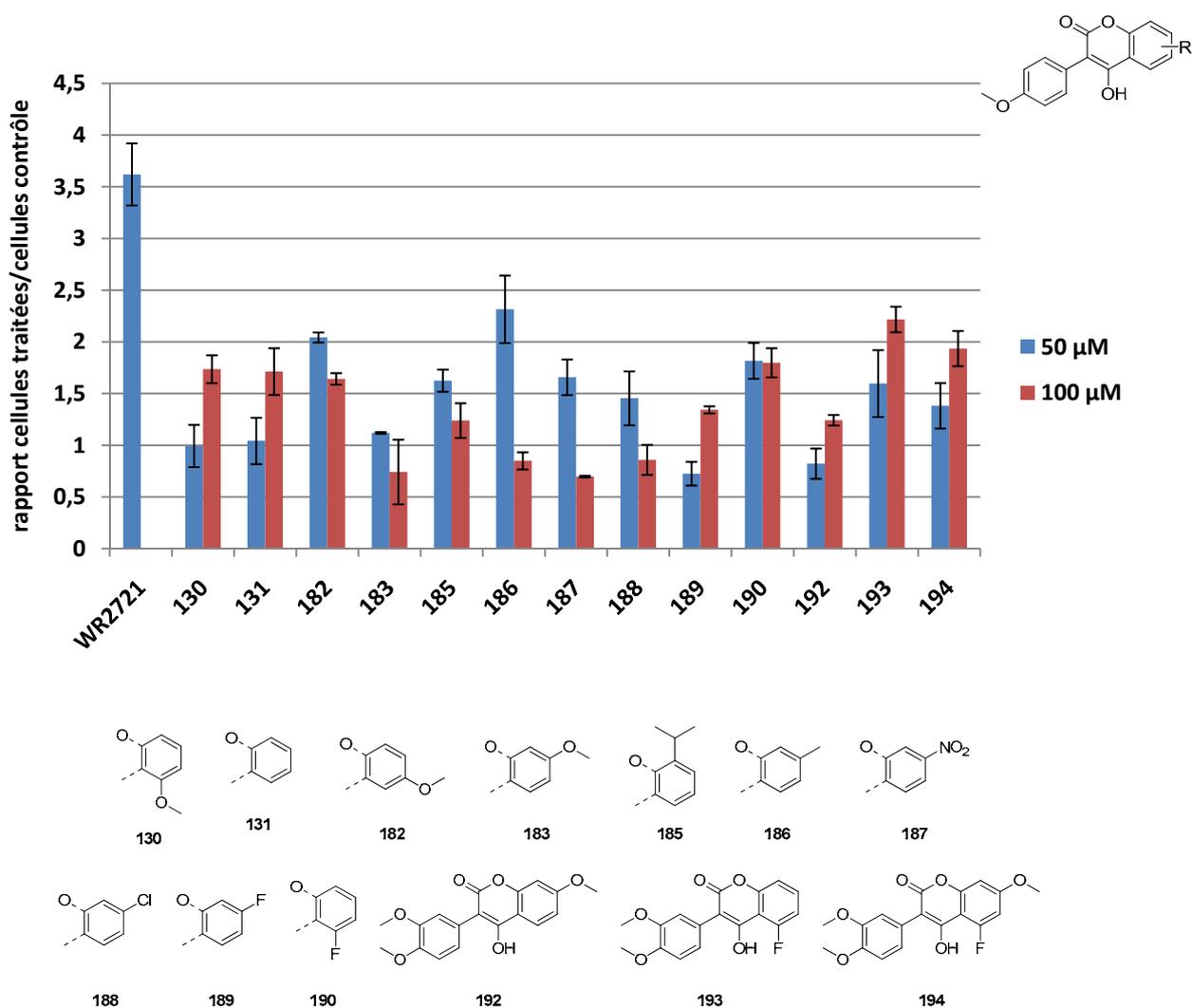


Figure 86 : influence des substituents sur le cycle C et des structures optimisées sur la prolifération de cellules irradiées par des rayons X à 8 Gy

De même que précédemment, toutes les coumarines testées sont moins actives que le WR2721, et ont globalement peu d'activité radioprotectrice. Les composés ayant les meilleures activités à 50 μM sont les composés **182**, **186**, **190** et **193**, et à 100 μM ce sont les composés **130**, **131**, **182**, **190**, **192** et **193**. Dans cette série, sept composés sont pro-oxydants (**182**, **183**, **185**, **186**, **187**, **188**, **190**). Ces dérivés ont tous des substituents en position 7 et 8, ce qui semble indiquer que ces positions ne doivent pas être fonctionnalisées. Une preuve supplémentaire de l'effet négatif d'une fonctionnalisation en position 7 est donnée par les composés **192** et **194**, possédant un atome de fluor en position 7, qui sont moins actifs que leurs analogues non fonctionnalisés dans cette position, respectivement **131** et **193**. Un atome de fluor en position 5 apporte ici de meilleurs taux de protection, comme nous pouvons le voir avec les composés **190**, **193** et **194**. Ce test montre

que les dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine sont dépourvus d'effet radioprotecteur intéressant.

IV. Conclusion générale sur les tests biologiques de l'activité antioxydante et radioprotectrice des dérivés d'acide pulvinique et de coumarines synthétisées

Les tests effectués sur les dérivés d'acides pulviniques et les coumarines nous ont fourni plusieurs renseignements intéressants pour la suite de ces recherches. Ainsi nous avons pu voir sur les pulvinamides que de nombreuses chaînes et fonctionnalités introduites par ouverture d'une bis-lactone permettaient de conserver une activité antioxydante importante. Toutefois certaines fonctions ont un effet négatif, comme par exemple les fonctions acide carboxylique qui rendent les composés pro-oxydants. Lors des tests sur culture cellulaire, les dérivés hydrophiles d'acides pulviniques se sont révélés très intéressants, puisqu'ils ont permis d'obtenir une importante reprise de la prolifération cellulaire de cellules radiosensibles irradiées par des rayons X à 8 Gy. Ils se sont également avérés plus actifs que le WR2721, qui est actuellement le seul composé utilisé en clinique comme radioprotecteur, et ce à des concentrations plus faibles. Le composé **100** (figure 87) a donné d'excellents résultats et permis une reprise rapide de la prolifération cellulaire une fois l'effet des rayonnements disparu. Les composés **105** et **109** ont également montré une bonne protection des cellules. Une étude de l'effet de la concentration menée avec le composé **105** a montré qu'il n'était pas nécessaire de travailler à des concentrations trop élevées, le gain en effet radioprotecteur devenant moins important au fur et à mesure que la quantité de produit augmente.

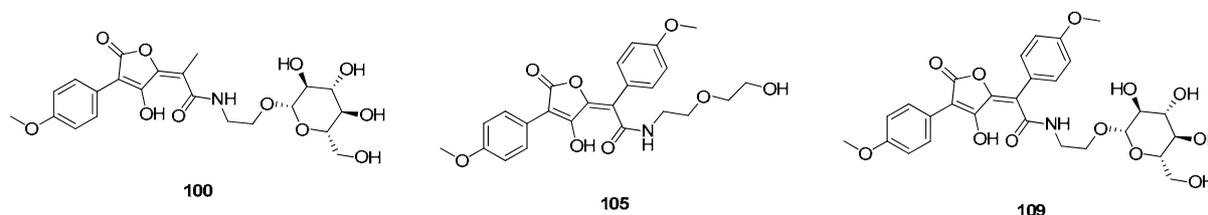


Figure 87 : structures des dérivés d'acides pulviniques ayant montré les meilleures activités sur le test de protection de cellules irradiées

Les dérivés de la famille des 3-aryl-4-hydroxycoumarines ont fait l'objet de plusieurs études de relation structure-activité. Ainsi nous avons montré que le mécanisme de l'activité antiradicalaire est similaire à celui des acides pulviniques, à savoir la rupture homolytique de la liaison O-H de l'énol en position 4, conduisant à un radical stabilisé entre deux fonctions carbonyles et délocalisé sur un cycle aromatique. Les fonctionnalités pouvant être portées par les trois cycles présents sur le squelette 3-aryl-4-hydroxycoumarine ont été étudiées. Ainsi trois nouveaux composés améliorés selon les résultats obtenus sur le test au DPPH ont été synthétisés, cependant le gain en activité n'a pas été conséquent. L'étude menée sur le test de protection de la thymidine a fait apparaître les limites des différentes fonctionnalités, ainsi sur le cycle A des groupes sur lesquels le radical peut se délocaliser et placés en position 2' et/ou 4' semblent devoir être privilégiés (composés **131**, **147**, **155** et **157**, figure 88). En revanche aucune conclusion n'a pu être apportée quant à l'implication du cycle C dans les activités antiradicalaires et radioprotectrices, les tests DPPH et thymidine ayant donné des informations différentes et parfois contradictoires. Les meilleurs substituants semblent être les 5-fluoro, 7-méthyl et 7-méthoxy (**183**, **186** et **190**, actifs sur le test DPPH), le 5-méthoxy (**130**, actif sur le test thymidine) et le cycle nu (**131**, actif dans les deux tests). Sur le test de dégradation de la thymidine en condition de radiolyse et sous irradiation UV, les coumarines ont généralement donné des valeurs de protection moins bonnes que les acides pulviniques. Seuls les composés **130** et **131** ont eu une activité comparable aux pulvinamides testés. L'étude des pKa des composés synthétisés pourrait aider à la compréhension des mécanismes de capture du radical. En effet les différences observées entre les tests au DPPH et de protection de la thymidine peuvent être dues à l'existence des deux mécanismes de capture de radicaux HAT et SPLET.

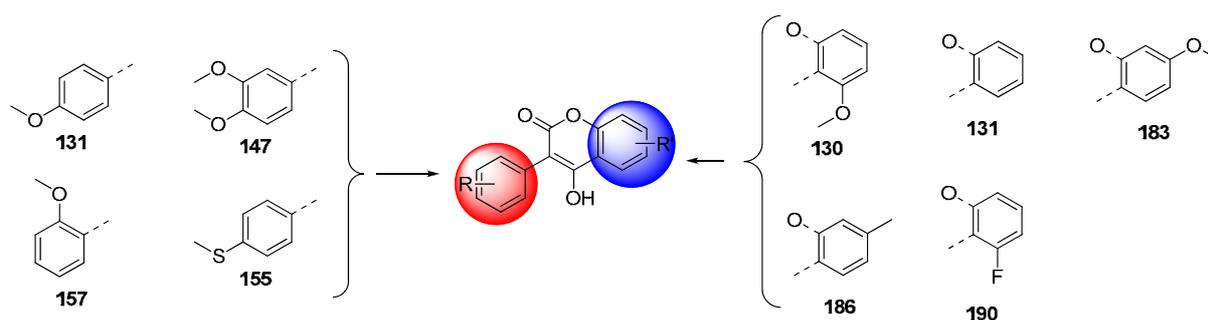


Figure 88 : structures des coumarines possédant les substituants sur les cycles A et C apportant la meilleure activité antiradicalaire, d'après les tests DPPH et thymidine

Les coumarines n'ont par contre pas montré d'activité radioprotectrice notable sur le test d'irradiation cellulaire, des activités pro-oxydantes ayant été obtenues avec de nombreux dérivés, et n'auront donc pas d'intérêt en tant que radioprotecteur. Ce test nous montre

qu'une fonctionnalisation en position 7 a un effet bénéfique sur l'activité à 50 μM (figure 89), mais qu'une activité pro-oxydante est également plus marquée lorsque l'on augmente les concentrations. Un atome de fluor en position 5 augmente l'activité aussi bien à 50 μM qu'à 100 μM . Aucun effet pro-oxydant n'est alors observé.

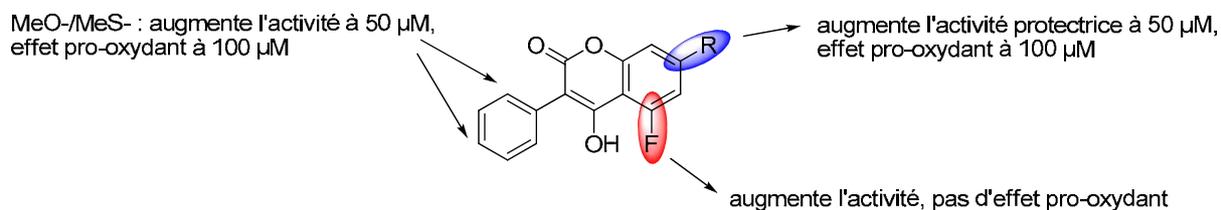


Figure 89 : effets des différentes substitutions étudiées sur le test de radioprotection cellulaire

Les résultats obtenus sur le test de protection de la thymidine sous irradiation UV ont été comparés avec les valeurs de prédiction issues du modèle QSPR, mais peu de corrélations ont été observées. Cependant ce modèle a été élaboré et entraîné à partir de données obtenues sur des acides pulviniques uniquement, et nous avons montré que les coumarines et les acides pulviniques symétriques et dissymétriques pouvaient avoir des comportements différents alors qu'ils étaient fonctionnalisés par les mêmes cycles aromatiques en position 3 (figure 90). Cette différence entre activité prédite et activité observée n'a donc rien de surprenant. Les nouvelles données expérimentales seront utilisées pour un nouvel entraînement du modèle.

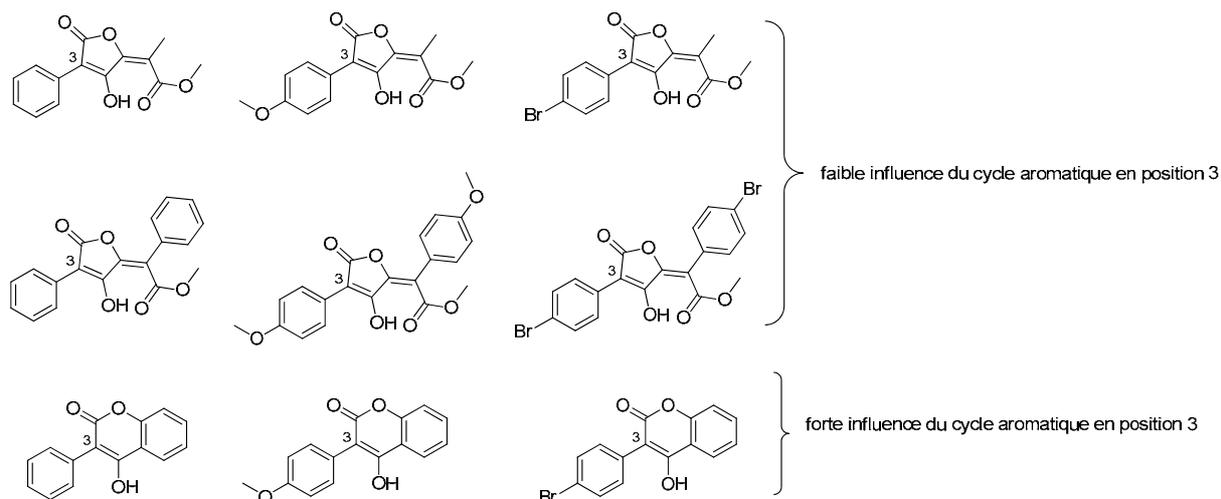


Figure 90 : comparaison des influences de trois cycles aromatiques sur des acides pulviniques et des coumarines

Les différents tests réalisés sur des mêmes composés ont apporté des résultats parfois contradictoires, apportant ainsi peu de corrélation entre les différents tests réalisés. Il est donc nécessaire, à ce jour, de disposer de résultats sur plusieurs tests différents. Dans le tableau 23 ci-dessous sont résumés les avantages et inconvénients des différents tests étudiés au cours de ces travaux de thèse pour l'identification de nouveaux radioprotecteurs. Le test *in vivo* est également inclus dans ce tableau pour le comparer aux autres tests réalisés. Les tests antioxydants permettent d'obtenir rapidement des informations sur les capacités des composés étudiés à capter les radicaux libres, cependant tous ne se focalisent pas sur les mêmes espèces radicalaires. En effet les tests ABTS et DPPH étudient la capacité d'un composé à capter un radical stable, tandis que le test de protection de la thymidine étudie la capacité qu'a un composé à capter des EAO, bien plus réactifs et plus représentatifs de ce qu'il se passe lors d'une irradiation d'un organisme vivant. De plus ce test permet d'apprécier la capacité d'un composé à protéger une cible présente naturellement dans un organisme vivant, aussi le test de protection de la thymidine donnera des informations plus adaptées à l'étude d'agents radioprotecteurs. Cependant les phénomènes moléculaires et biologiques se produisant lors d'une irradiation d'un organisme sont multiples et complexes, et ne sauraient être correctement rendus par la simple protection d'une base de l'ADN. Aussi les tests *in vitro* sur culture cellulaire soumise à des rayonnements et *in vivo* sur souris restent à ce jour les plus adaptés à l'étude d'agents de radioprotection malgré les inconvénients liés aux protocoles expérimentaux, généralement plus lourds que ceux des tests antioxydants. Des études comparatives entre tous ces tests sur une plus large gamme de molécules, couplée à l'élaboration de modèles QSPR, pourrait permettre de dévoiler les facteurs importants pour obtenir un bon effet radioprotecteur et qui pourraient être évalués à l'aide de tests faciles à mettre en œuvre comme les tests antioxydants présentés dans ce manuscrit.

Tableau 23 : avantages et inconvénients des différents tests réalisés pour l'identification de radioprotecteurs

test	avantages	inconvénients
DPPH	<ul style="list-style-type: none"> - adapté au screening de composés - permet l'emploi de solvants organiques - résultat immédiat 	<ul style="list-style-type: none"> - informations au niveau moléculaire seulement - dépend du pKa de la fonction concernée - utilise un radical stable, peu représentatif des EAO - problèmes de corrélation avec les autres tests antioxydant - pas représentatif du vivant - nécessite d'être combiné à d'autres tests pour avoir des informations complètes - pas de relation obligatoire entre les activités antioxydante et radioprotectrices
ABTS	<ul style="list-style-type: none"> - adapté au screening de composés - permet l'emploi de solvants organiques - résultat immédiat 	<ul style="list-style-type: none"> - informations au niveau moléculaire - utilise un radical stable, peu représentatif des EAO - problèmes de corrélation avec les autres tests antioxydant - pas représentatif du vivant - nécessite d'être combiné à d'autres tests pour avoir des informations complètes - pas de relation obligatoire entre les activités antioxydante et radioprotectrices
Thymidine	<ul style="list-style-type: none"> - adapté au screening de composés - résultat immédiat - étudie l'effet des composés sur une cible biologique - effet des composés sur les EAO 	<ul style="list-style-type: none"> - informations au niveau moléculaire - en radiolyse, les doses d'irradiation ne sont pas représentatives d'une irradiation accidentelle - problèmes de corrélation avec les autres tests antioxydant - peu représentatif du vivant - les trois tests donnent des informations complémentaires
Cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> - adapté au screening de composés radioprotecteurs - informations au niveau cellulaire - résultat rapide, après 9 jours 	<ul style="list-style-type: none"> - peu de tolérance avec des solvants organiques - nécessite un suivi régulier pour s'assurer que les cellules n'appauvrissent pas le milieu de culture en nutriments
<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - informations au niveau d'un organisme vivant - est le plus proche de ce qu'il se passe chez l'Homme 	<ul style="list-style-type: none"> - nombre de composés limités - sacrifice d'animaux (problèmes d'éthique) - requiert des quantités importantes de produit - résultat après un mois

Références bibliographiques du chapitre 4 :

- ¹ Z.-Q. Liu, *Chem. Rev.*, **2010**, article en ligne
- ² W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, *28*, 25-30
- ³ H. Hotta, S. Nagano, M. Ueda, Y. Tsujino, J. Koyama, T. Osakai, *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *1572*, 123
- ⁴ G. Litwinienko, K. U. Ingold, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5888
- ⁵ R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231
- ⁶ S. L. Scott, W.-J. Chen, A. Babac, J. H. Espenson, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6710
- ⁷ C. Privat, J. P. Telo, V. Bernardes-Genisson, A. Vieira, J.-P. Souchard, F. Nepveu, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1213-1217
- ⁸ S. Meunier, M. Desage-El Murr, Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault, D. Boquet, C. Créminon, E. Saint-Aman, A. Valleix, F. Taran, C. Mioskowski, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 832-840
- ⁹ S. Meunier, M. Hanédanian, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault, D. Boquet, C. Créminon, C. Mioskowski, F. Taran, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1234-1241
- ¹⁰ G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95
- ¹¹ S. A. Amundson, K. T. Do, L. C. Vinikoor, R. A. Lee, C. A. Koch-Paiz, J. Ahn, M. Reimers, Y. Chen, D.A. Scudiero, J. N. Weinstein, J. M. Trent, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, A. J. Fornace Jr, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 415-424
- ¹² B. Pagé, M. Pagé, C. Noël, *Int. J. Oncol.* **1993**, *3*, 473-476
- ¹³ J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426
- ¹⁴ A. Le Roux, S. Benzina, B. Nadal, M. Desage-El Murr, B. Heurtaux, F. Taran, J.-M. Denis, T. Le Gall, S. Meunier, P. Bischoff, *article soumis*
- ¹⁵ A. Le Roux, S. Meunier, T. Le Gall, J.-M. Denis, P. Bischoff, A. Wagner, *ChemMedChem*, **2010**, article accepté
- ¹⁶ D. Habrant, S. Poigny, M. Ségur-Derai, Y. Brunel, B. Heurtaux, T. Le Gall, A. Strehle, R. Saladin, S. Meunier, C. Mioskowski, A. Wagner, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2454-2464

Chapitre 5

*Synthèse de molécules
complexantes du ^{137}Cs*

Chapitre 5 : Synthèse de molécules complexantes du ^{137}Cs

I. Introduction

Un autre aspect du projet a porté sur la recherche de dérivés complexants du ^{137}Cs . La norbadione A a été découverte en 1984 par Stieglich.¹ Si nous avons exploité jusqu'à présent ses propriétés radioprotectrices, découvertes en 2004,² elle a tout d'abord été connue pour ses propriétés chélatantes vis-à-vis des métaux alcalins, et en particulier le césium. En effet, suite à l'accident survenu à Tchernobyl en 1986, de fortes quantités de radioactivité ont été retrouvées sur le passage du nuage dans de nombreuses espèces de champignons, radioactivité attribuée au radioisotope ^{137}Cs .³ Parmi ces champignons, le bolet bay (*Xerocomius badius*) s'est avéré particulièrement radioactif. La présence élevée de radioactivité a été attribuée à une forte concentration en ^{137}Cs , lequel était complexé par la norbadione A.⁴ Des études afin d'exploiter cette propriété au développement d'agents de décontamination de déchets nucléaires ou d'organismes vivants ont alors vu le jour. De nombreux articles sur la structure des complexes entre la norbadione A et le césium ont été publiés,^{5, 6, 7, 8} ceux-ci ont montré qu'il existait plusieurs complexes possibles et qu'ils étaient fortement reliés au pH du milieu. En effet, en-dessous de pH=8, aucun complexe ne se forme, ceci a été attribué à la protonation de la fonction énonol qui engendre une liaison hydrogène très forte entre cet énonol et la fonction carboxylate voisine, empêchant la chélation à un cation Cs^+ . En revanche, au-dessus de pH=8, plusieurs complexes peuvent alors apparaître (figure 91). Comme nous l'avons présenté dans le premier chapitre, lorsque les deux fonctions énonol et acide carboxylique de chaque motif pulvinique sont déprotonées, des phénomènes d'isomérisation de la double liaison peuvent intervenir. Cette isomérisation n'empêche en rien la complexation, et de nouveaux complexes peuvent apparaître.

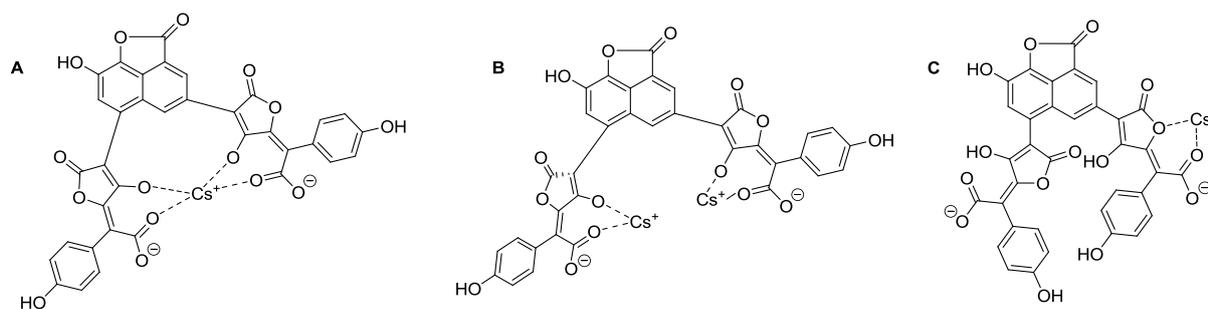


Figure 91 : exemples de complexes entre la norbadiene A et le césium

Si des complexes bimétalliques entre la norbadiene A et le césium peuvent exister (forme B), laissant supposer qu'un seul des motifs pulvinique est nécessaire pour la chélation, les acides pulviniques simples en revanche n'ont aucun pouvoir complexant.^{9, 10} La synthèse de dimères d'acides pulviniques apparaît donc comme une condition nécessaire pour obtenir des molécules complexantes du césium. L'ouverture d'une bis-lactone par des diamines nous permettrait ainsi de disposer de structures dimères afin de vérifier cette condition (figure 92).

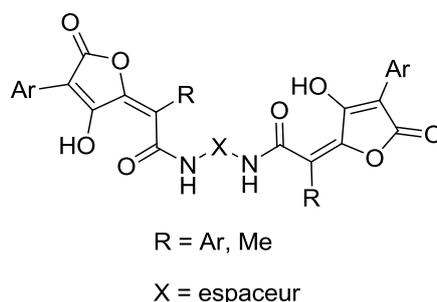


Figure 92 : structures des motifs dimères envisagés

II. Synthèse de premières structures complexantes

Des précédents essais pour synthétiser des structures dimères par ouverture d'une bis-lactone avaient déjà été tentés au laboratoire avec la 1,3-propanediamine sur la bis-lactone **71** dans le DCM sans ajout d'additif, mais le composé **83** avait toujours été récupéré (schéma 66).¹¹ Le mélange d'isomères **83** et **206** avait alors précipité dans le milieu et l'attaque sur un second équivalent de **71**, également insoluble dans le DCM, n'avait pas pu avoir lieu. La réaction de **83** avec un équivalent supplémentaire de bis-lactone dans le

DMSO avait permis de former le dimère attendu **207**, observé par LCMS, mais la présence de régioisomères n'avait pas permis de récupérer le produit attendu.

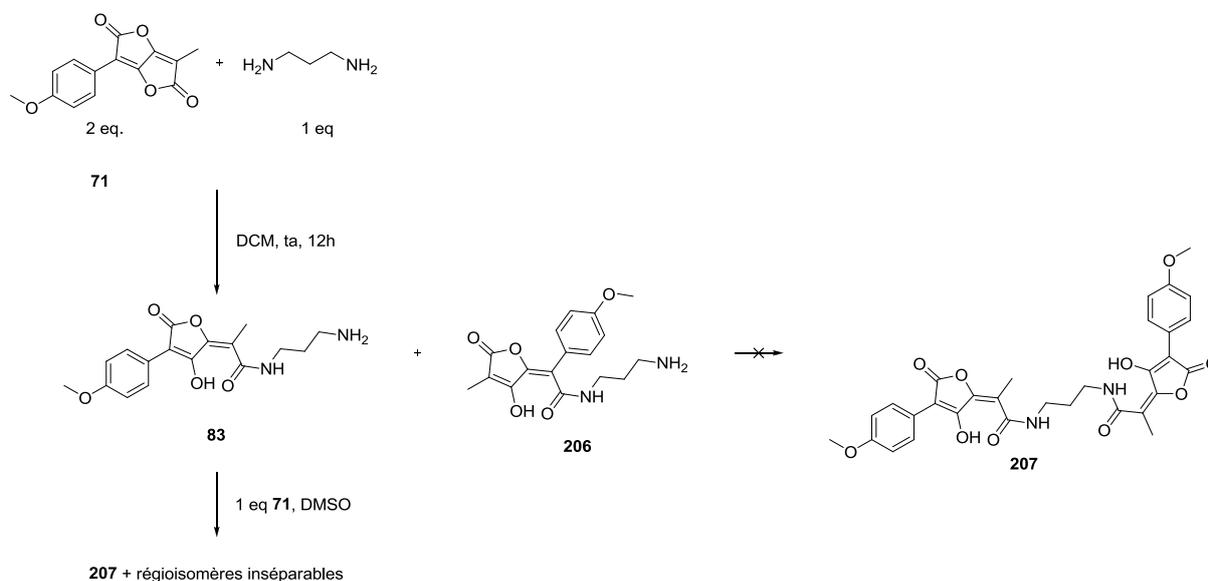


Schéma 66 : précédents essais de synthèse du dimère **207**

Cependant cette réaction n'avait pas été tentée en présence de TBAF afin d'obtenir sélectivement le régioisomère **207**. De plus, le TBAF augmentant la nucléophilie des amines, nous pouvions espérer la formation directe de **207** à partir de deux équivalents de **71** et d'un équivalent de 1,3-diaminopropane. La réaction a été tentée et après traitement un produit a précipité. La filtration et le lavage à l'éther de ce solide fournit un solide jaune avec un rendement de 57 % dont l'analyse par LCMS a indiqué la présence d'un unique produit de masse attendue. Les analyses par RMN ¹H et ¹³C ont confirmé la structure du produit **207** (schéma 67).

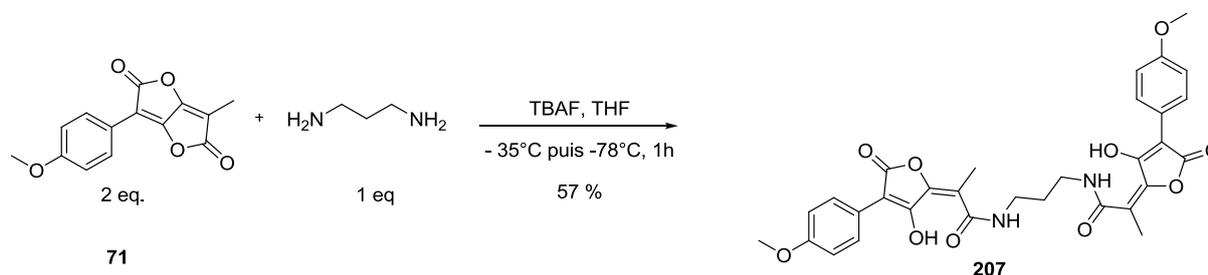


Schéma 67 : obtention du composé dimère **207**

Nous avons ensuite tenté la synthèse avec la 2,2'-(éthylènedioxy)diéthylamine et la bis-lactone **71** en présence de TBAF, mais dans ce cas le produit **208** attendu n'a pas pu être séparé des traces des différents isomères par chromatographie sur gel de silice (schéma 68). Un essai a été tenté avec la bis-lactone symétrique **101**, et dans ce cas le dimère **209** a été obtenu avec un rendement de 73 %.

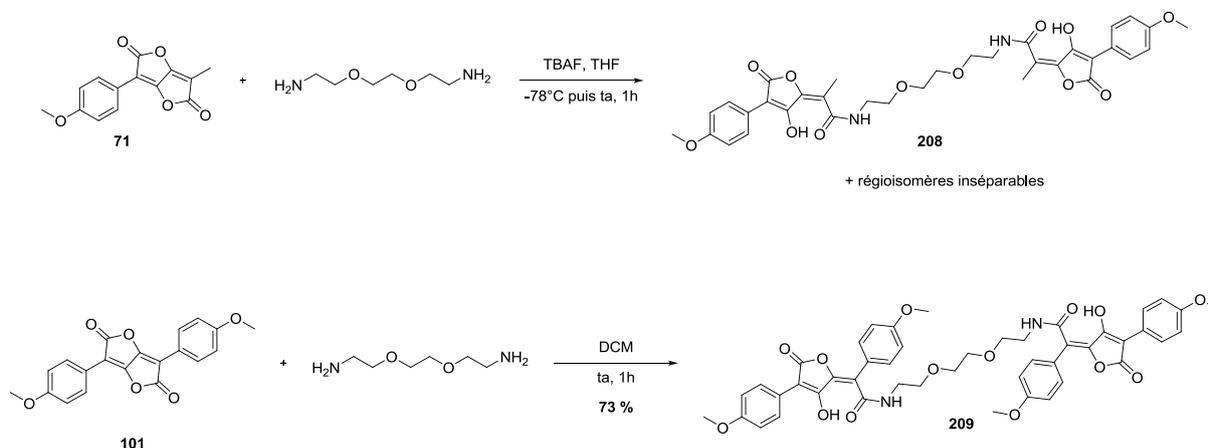


Schéma 68 : essais de synthèse à partir de la 2,2'-(éthylènedioxy)diéthylamine

Nous disposons maintenant de deux dimères d'acides pulviniques avec deux espaceurs différents et deux structures différentes (mono-aromatique et di-aromatique), ils devraient nous permettre de vérifier si la présence de deux unités pulviniques est une condition nécessaire pour complexer le césium. Nous allons désormais nous intéresser à la synthèse d'hybrides à base d'éther-couronnes.

Ces structures dimères sont la combinaison de deux motifs potentiellement complexant du césium. L'amine **210** étant commerciale nous avons voulu voir l'effet de la combinaison d'un acide pulvinique et d'un éther-couronne, connu pour être un bon complexant du césium,¹² sur la complexation du césium. Nous avons tout d'abord réalisé un essai avec la bis-lactone **71** en présence de TBAF, mais comme précédemment le composé **211** n'a pas pu être séparé des traces de régioisomère par chromatographie sur colonne de silice (schéma 69). Nous avons alors réalisé la réaction avec la bis-lactone **101** dans le DCM, et dans ce cas le composé **212** a pu être obtenu avec un rendement de 93 %.

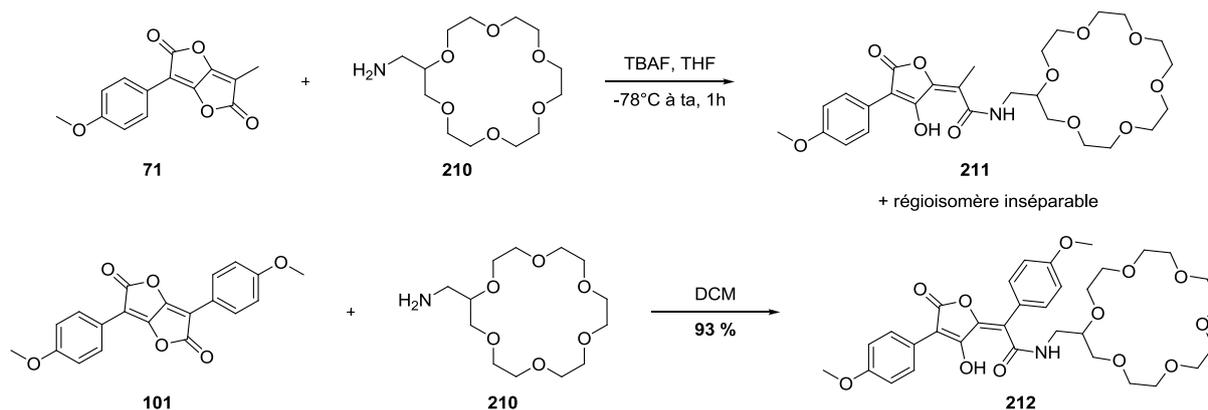


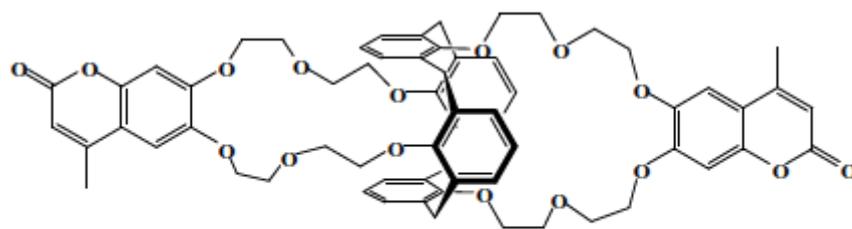
Schéma 69 : insertion d'un éther-couronne sur les bis-lactones **71** et **101**

Le pouvoir complexant des trois composés **207**, **209** et **212** a ensuite été testé.

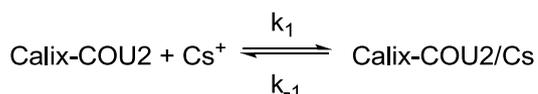
III. Evaluation du pouvoir complexant des composés **207**, **209** et **212**

Les mesures des constantes de complexation ont été réalisées par Alexandre Korovitch et le Dr Jean-Michel El Hage Chahine du laboratoire ITODYS (UMR-7086, université Paris Diderot)

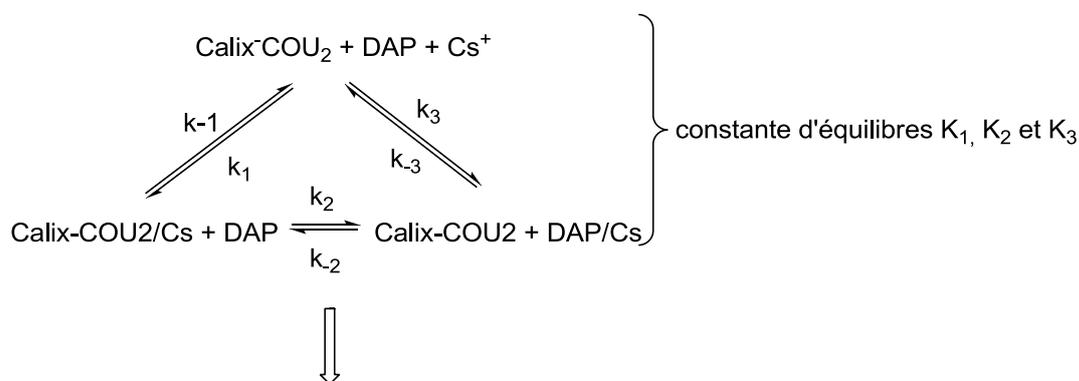
L'étude de la complexation de dérivés d'acides pulviniques avec le césium est effectuée par fluorescence. Les acides pulviniques n'étant pas fluorescents, l'étude est réalisée en présence d'un calixarène fluorescent, noté Calix-COU2, et qui est également connu pour être un bon complexant du césium (figure 93). Les spectres d'émission du Calix-COU2 étant différents selon qu'il est complexé ou non au césium, l'ajout d'un dérivé pulvinique va entraîner une compétition et ainsi modifier le spectre d'absorption de la sonde. Nous mesurons ainsi indirectement l'affinité du dérivé pulvinique avec le césium. Les mesures sont effectuées en milieu éthanolique pur et en milieu éthanol/eau 9/1.



Calix-COU2



constante d'équilibre K_1 avec :
 - milieu éthanol pur : $\log(K_1) = 6.87$
 - milieu EtOH/H₂O 9/1 : $\log(K_1) = 3.98$

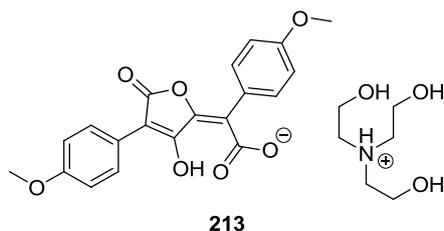


constante d'équilibres K_1, K_2 et K_3

modification du spectre d'émission de fluorescence \implies détermination de K_2

Figure 93 : structure du calixarène utilisé pour l'étude de complexation du césium. Réactions mises en jeu lors de l'étude de la complexation des dérivés d'acide pulvinique (notés ici DAP)

Le composé **209** n'étant pas suffisamment soluble dans l'éthanol, il n'a pas pu être testé. Le tableau 24 présente les valeurs des constantes obtenues avec la norbadione A et les composés **209** et **212**, ainsi qu'avec le composé **213** (figure 94), qui est un acide pulvinique simple préparé au CEA de Saclay par Brice Nadal dans l'équipe du Dr Thierry Le Gall. Dans le cas de la norbadione A et des composés **209** et **212**, le calcul de la constante K_2 a été effectué tandis que dans le cas du composé **213** la mesure a porté sur la mesure de la constante K_1 .



213

Figure 94 : structure de **213**

Tableau 24 : valeurs des $\log(K_1)$ (pour le Calix-COU2 et **213**) et $\log(K_2)$ (pour la norbadione A, **209** et **212**) mesurées en milieu EtOH pur et EtOH/H₂O 9/1

produit	$\log(K)$ (EtOH)	$\log(K)$ (EtOH/eau 9/1)
Calix-COU2	$\log(K_1) = 6.87$	$\log(K_1) = 3.98$
norbadione A	$\log(K_2) = 4.95 \pm 0.2$	$\log(K_2) = 4.95 \pm 0.3$
213	$\log(K_1) = 6.8$	$\log(K_1) = 3.8$
209	$\log(K_2) = 4.65 \pm 0.05$	$\log(K_2) = 3.1 \pm 0.1$
212	$\log(K_2) = 6.2 \pm 0.2$	/

L'acide pulvinique simple **213** ne modifie en rien la complexation du césium par le calixarène Calix-COU2, cela confirme que les acides pulviniques simples ne complexent pas le césium. La norbadione A possède une constante d'affinité de 4.95 dans les deux milieux, éthanolique pur et éthanol/eau 9/1 ce qui en fait un très bon complexant du césium. Le dimère **209** possède quant à lui une constante d'affinité de 4.65 ± 0.05 dans l'éthanol pur, valeur très proche de celle obtenue par la norbadione A, ce qui tend à prouver qu'une structure dimère est nécessaire pour avoir une bonne complexation. Dans le milieu éthanol/eau 9/1, cette valeur de complexation diminue à 3.1 ± 0.1 , le rendant moins efficace que la norbadione A. Le composé hybride **212** possède quant à lui une constante de complexation de 6.2 ± 0.2 en milieu éthanolique, il possède donc une affinité pour le césium bien plus importante que la norbadione A elle-même.

Ces résultats ont confirmé l'excellente affinité de la norbadione A envers le césium. L'acide pulvinique simple **213** n'a aucun pouvoir complexant, tandis que le dimère **209** possède une affinité avec le cation comparable à la norbadione A en milieu éthanol pur, il est cependant moins bon en milieu EtOH/H₂O 9/1. Le composé **212** s'est avéré encore plus efficace que la norbadione A en milieu éthanol pur, avec un $\log(K_2)$ de 6.2 contre 4.95 pour la norbadione A. L'ajout d'un éther-couronne sur un dérivé d'acide pulvinique a donc pour effet de considérablement augmenter l'affinité avec le césium. Nous avons donc entrepris la synthèse de nouveaux composés combinant ces deux motifs.

IV. Synthèse de dérivés mixtes acide pulvinique/éther-couronne

Cette nouvelle étude de dérivés hybrides possédant un éther-couronne sera basée autour des azaéthers-couronnes **214** et **215** commerciaux (figure 95).

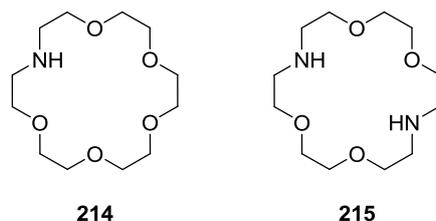


Figure 95 : structures des azaéthers-couronnes **214** et **215**

Nous avons dans un premier temps tenté l'ouverture directe de la bis-lactone **101** avec **400**, mais un mélange de composés inséparables a été obtenu. Nous avons alors envisagé l'insertion d'un linker entre l'éther-couronne et la bis-lactone, afin de disposer d'une amine primaire, donc plus réactive, pour ouvrir **101**. Nous avons alors envisagé les synthèses des composés **216** et **217** (figure 96).

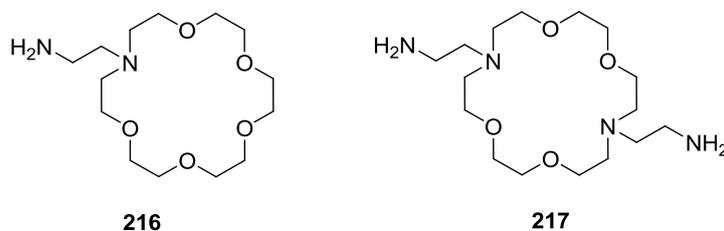
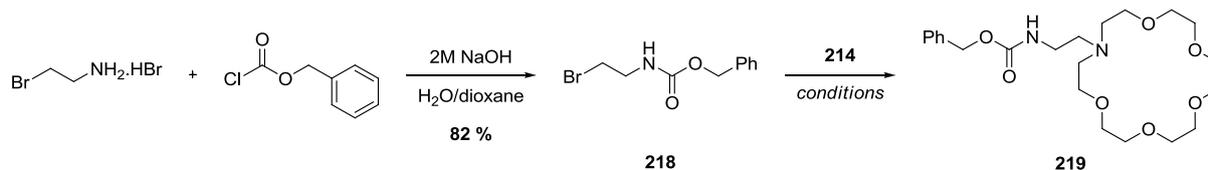


Figure 96 : structure des amines **216** et **217**

Dans un premier temps nous avons protégé la fonction amine de la 2-bromoéthylamine par un groupe benzyloxycarbone, et le dérivé bromé **218** a été obtenu avec un rendement de 82 % (schéma 70). L'éther-couronne **214** a ensuite été alkylé par **218**. Un premier essai en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile à reflux pendant 5 jours n'a pas fourni le composé attendu. Le chauffage à reflux dans l'acétone pendant une nuit en présence de carbonate de sodium a fourni l'amine protégée **219** avec un rendement de 77 %.



entrée	base	solvant	conditions	Rdt
1	K ₂ CO ₃	MeCN	reflux, 5 jours	0%
2	Na ₂ CO ₃	acétone	reflux, 16 h	77 %

Schéma 70 : synthèse de 219

Le composé **219** a ensuite été hydrogéné dans du méthanol en présence d'une quantité catalytique de palladium sur charbon et l'amine **216** a été obtenue avec un rendement quantitatif (schéma 71). La bis-lactone **101** a enfin été mise en réaction avec **216**. Après une nuit à température ambiante un faible avancement de la réaction a été observé par CCM. On a alors ajouté du THF et porté le milieu à reflux pendant 24h. Après purification sur colonne de silice puis par HPLC préparative, la molécule hybride **220** a été obtenue avec un rendement de 34 %. Un second essai dans du THF pur et après 48h à reflux a permis d'augmenter le rendement à 64 %.

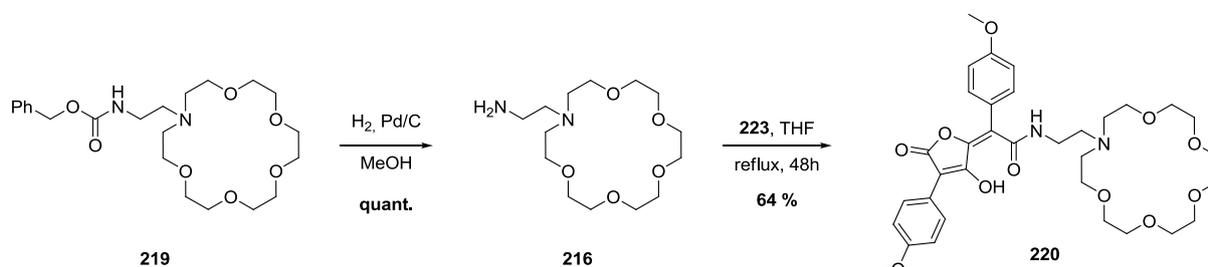


Schéma 71 : synthèse de 220

La molécule **220** ayant été synthétisée avec succès, nous nous sommes ensuite tournés vers la synthèse de **217** et de sa réaction avec **101**. De la même manière que précédemment nous avons alkylé l'azaéther-couronne **215** avec **218**, et obtenu le composé **221** avec un rendement de 28 % (schéma 72). Celui-ci a ensuite été mis sous atmosphère d'hydrogène en présence de palladium sur charbon dans les mêmes conditions que précédemment, mais dans ce cas celles-ci ont conduit à une dégradation du milieu.

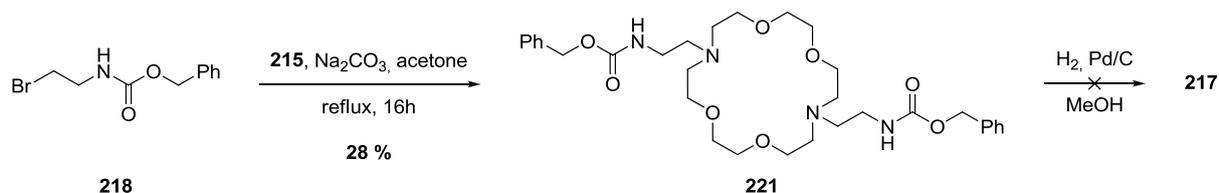


Schéma 72 : essai de synthèse de 217

Ayant la *N*-Boc-3-bromopropylamine à disposition, nous nous sommes alors tournés vers la synthèse du composé **222**, dans lequel le bras espaceur entre l'éther-couronne et les amines primaires est de trois méthylènes, qui serait obtenu selon la même stratégie que précédemment (figure 97).

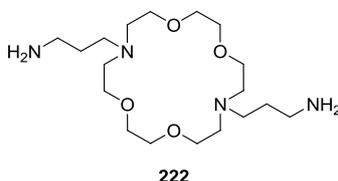


Figure 97 : structure de 222

L'alkylation de **215** a été réalisée avec la *N*-Boc-3-bromopropylamine commerciale, et le composé **223** a été synthétisé avec un rendement de 73 % (schéma 73). Une déprotection en présence d'acide trifluoroacétique a donné la diamine **222** sous forme d'un sel de trifluoroacétate avec un rendement quantitatif. Cette diamine a enfin été mise en réaction avec la bis-lactone **101** en présence de DIPEA pour fournir le composé **224** avec un faible rendement de 16 %.

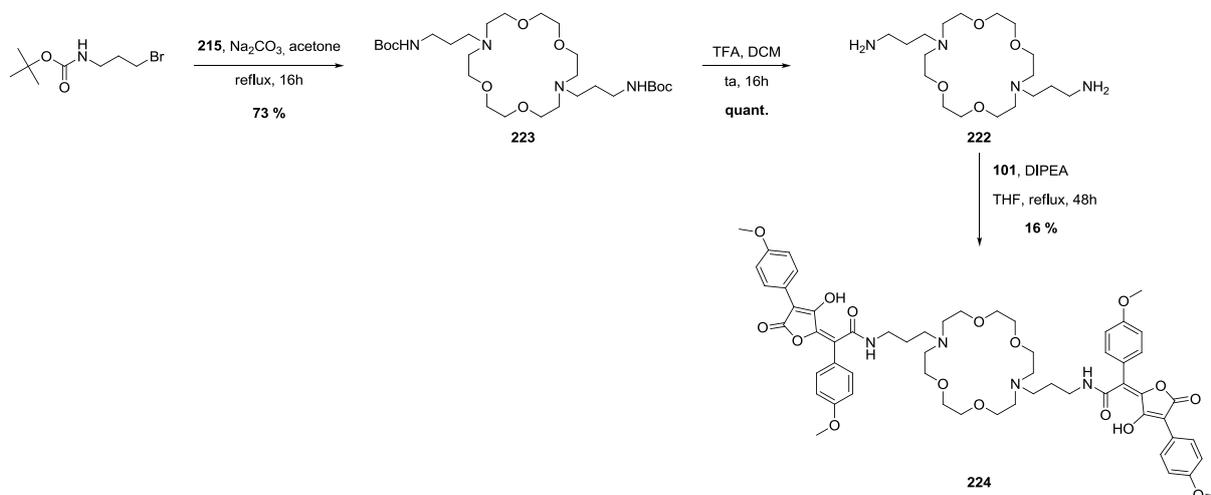


Schéma 73 : synthèse de 224

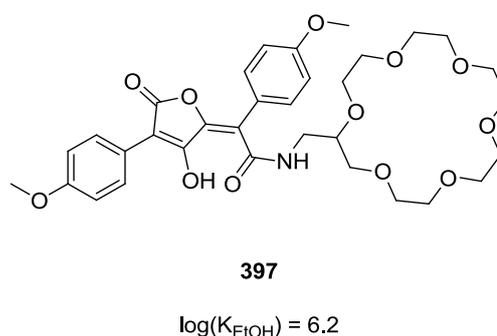
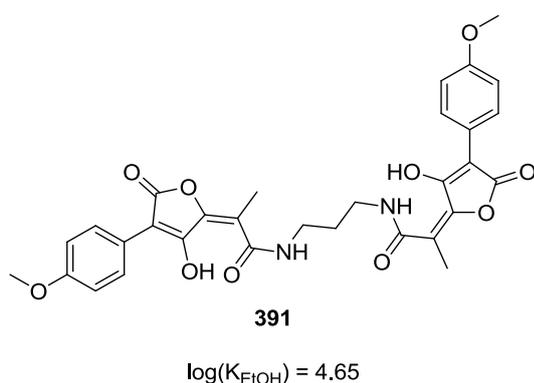
Nous disposons désormais de deux composés hybrides acide pulvinique/éther-couronne supplémentaires, dont l'un possède deux motifs pulviniques. Nous espérons ainsi pouvoir obtenir une meilleure complexation du cation Cs^+ par emprisonnement de celui-ci au sein du motif en forme de pince ainsi créé. Ces deux composés ont été envoyés au laboratoire ITODYS et seront très prochainement testés.

V. Conclusions

Cette étude de structures complexantes nous ont permis de montrer qu'il était nécessaire de disposer d'au moins deux motifs complexants, que ce soit sous forme de dimère d'acides pulviniques ou sous forme d'une molécule hybride entre un acide pulvinique et un éther-couronne. Le dimère **391** possède une constante de complexation avec le césium très proche de celle de la norbadione A, tandis que la molécule hybride **397**, possédant un éther-couronne, possède une affinité avec le césium encore plus forte. Les mesures des constantes des composés **405** et **410** devraient nous permettre d'en savoir plus sur la formation des complexes avec le césium. Des études seront également faites quant à la sélectivité de ces structures envers ce cation.

La figure 98 rappelle les structures complexantes synthétisées et testées avec les constantes de complexation des dérivés déjà testés.

Molécules testées :



Molécules en attente de tests :

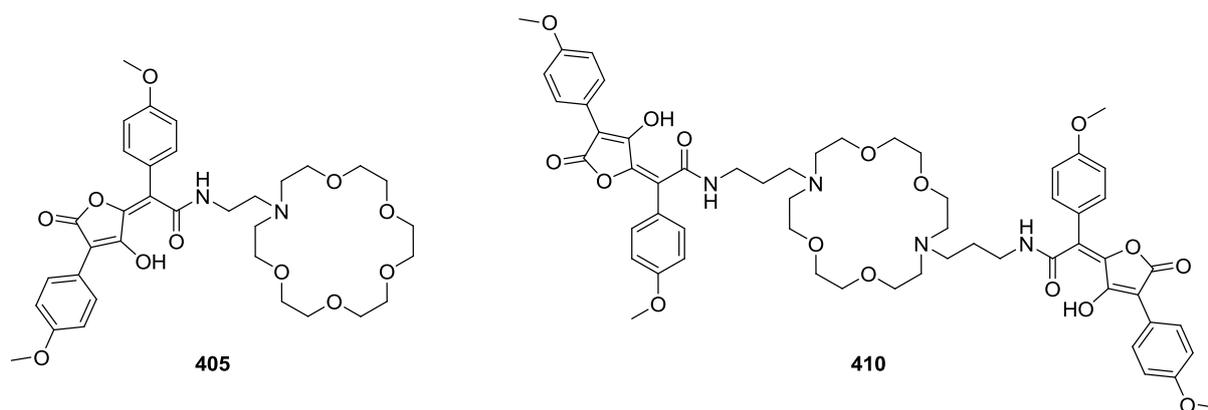


Figure 98 : rappel des molécules synthétisées et des valeurs des constantes de complexation

Références bibliographiques du chapitre 5 :

- ¹ B. Steffan, W. Stieglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, *23*, 445-447
- ² S. Meunier, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault, D. Boquet, C. Créminon, E. Saint-Aman, A. Valleix, F. Taran, C. Mioskowski, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 832-840
- ³ P. Kalač, *Food Chem.* **2001**, *75*, 29-35
- ⁴ D. C. Aumann, G. Clooth, B. Steffan, W. Stieglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 453-454
- ⁵ S. Garaudée, M. Elhabiri, D. Kalny, C. Robiollé, J.-M. Trendel, R. Hueber, A. van Dorsselaer, A. Albrecht, A.-M. Albrecht-Gary, *Chem. Comm.* **2002**, 944-945
- ⁶ M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, C. Mioskowski, B. Amekraz, C. Moulin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1289-1293
- ⁷ R. Schurhammer, R. Diss, B. Spiess, G. Wipff, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 495-505
- ⁸ P. Kuad, R. Schurhammer, C. Maechling, C. Antheaume, C. Mioskowski, G. Wipff, B. Spiess, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 10299-10310
- ⁹ P. Kuad, thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, **2006**
- ¹⁰ A. Korovitch, thèse de doctorat, Université Paris Diderot, Paris, **2010**
- ¹¹ D. Habrant, thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, **2008**
- ¹² K. Ariga, T. Kunitake, **Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications Advanced Textbook**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2003**

Conclusion et

perspectives

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a été consacré aux études synthétiques et biologiques de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants, dérivés d'acides pulviniques et de coumarines. Pour cela, des dérivés d'acides pulviniques possédant un groupe hydrophile ou un second motif antioxydant ont été synthétisés et leur activité biologique a été évaluée à l'aide de différents tests antioxydants et radioprotecteur. En parallèle de cette étude un modèle QSPR a été développé afin de prédire l'activité protectrice envers la thymidine de nouvelles structures, qui nous a permis de nous focaliser sur des dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine.

La synthèse de dérivés pulviniques hydrophiles et hybrides a été réalisée par l'insertion d'amines diversement fonctionnalisées sur un intermédiaire commun de type bis-lactone, laquelle a été obtenue en cinq étapes à partir d'un acide tétronique. De nouvelles conditions de déprotection ont notamment été mises au point afin de réaliser en une étape une déprotection sélective d'une fonction méthoxy et le clivage d'un ester méthylique (schéma 74). Cette voie méthode a été appliquée à la synthèse de plusieurs grammes de bis-lactone.

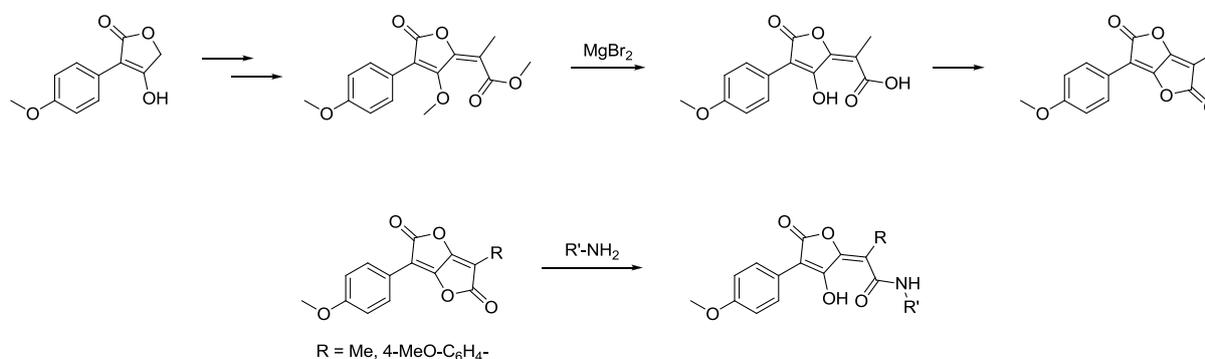


Schéma 74 : synthèse de la bis-lactone et dérivatisation par ouverture avec des amines

Les dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine, mis en évidence par le modèle QSPR, ont été synthétisés par une méthode en deux étapes permettant une diversification aisée sur les trois cycles qui constituent cette structure (schéma 75). De cette manière, nous avons préparé 22 dérivés qui nous ont permis de réaliser une étude de relation structure-activité sur différents tests antioxydants, afin d'étudier l'influence de la position et de la nature de différents substituants.

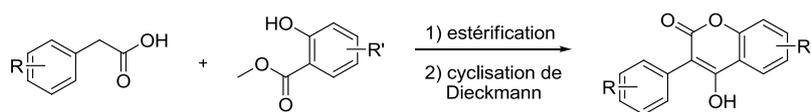


Schéma 75 : voie de synthèse de 3-aryl-4-hydroxycoumarines

Les dérivés d'acide pulvinique et de coumarines ont été évalués à l'aide de différents tests antioxydants afin d'étudier les effets des différents groupes et substituants introduits. Concernant les acides pulviques, il est apparu que la longueur de la chaîne introduite ainsi que les fonctionnalités portées ont une importance sur l'activité antiradicalaire. Ainsi des chaînes possédant deux ou trois groupes méthylène seront préférées, et dans le premier cas une fonction amine primaire sera à éviter. Lors du test d'irradiation de cellules en culture, trois dérivés d'acide pulvinique (figure 99) ont exprimé une activité radioprotectrice, permettant aux cellules TK6, très radiosensibles, de reprendre une prolifération plus rapide qu'en l'absence de traitement. Ils se sont également montrés plus actifs que le WR2721, le seul composé utilisé actuellement en clinique comme radioprotecteur, et ce à des concentrations plus faibles. Ces résultats probants ont été et seront accompagnés de résultats *in vivo*, cependant la formulation des composés devra être au préalable améliorée.

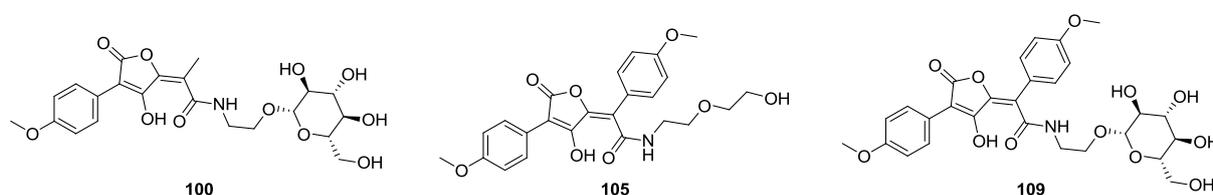


Figure 99 : structures des pulvinamides ayant montré les meilleures activités lors du test d'irradiation cellulaire

Les dérivés d'acide pulvinique comportant un second motif antioxydant (trolox, acide ascorbique, acide aminé possédant une chaîne latérale à caractère antioxydant) se sont tous montrés pro-oxydants. Dans le cas des composés résultant de l'ouverture d'une bis-lactone par des acides aminés, ce caractère peut être attribué à la présence d'une fonction acide carboxylique car le dérivé contenant cette fonction sans motif antioxydant (ouverture par la glycine) possède également un caractère pro-oxydant. Aucune des chaînes latérales n'a alors permis d'améliorer l'activité.

L'étude des dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine nous a montré que nous pouvions diviser la structure en deux parties, ayant chacune un rôle différent dans l'activité. Ainsi les cycles A et B seront impliqués dans la délocalisation du radical par mésomérie, tandis que le cycle C sera impliqué dans d'autres phénomènes que nous n'avons pas pu définir, les tests

DPPH et de protection de la thymidine ayant donné des résultats différents lorsque nous faisons varier les substituants sur cette partie de la molécule. Sur le cycle A nous avons pu montrer que les substituants permettant d'obtenir la meilleure activité étaient ceux sur lesquels un radical peut se délocaliser (méthoxy, méthylthio), et situés en position 2' et/ou 4' (figure 100). Sur le cycle B, l'alkylation de l'énol et le remplacement de la lactone par une lactame ont conduit à une perte significative d'activité, montrant que la capture du radical se fait bien sur ce cycle et que celui-ci intervient dans la stabilisation. Les différents substituants introduits sur le cycle C n'ont en revanche pas permis de déterminer avec précision l'influence de chacun d'eux. Sur le test de protection cellulaire, les composés testés n'ont fait preuve que d'une très faible protection, et ont été bien moins efficaces que l'amifostine. Un caractère pro-oxydant a été observé avec de nombreux composés.

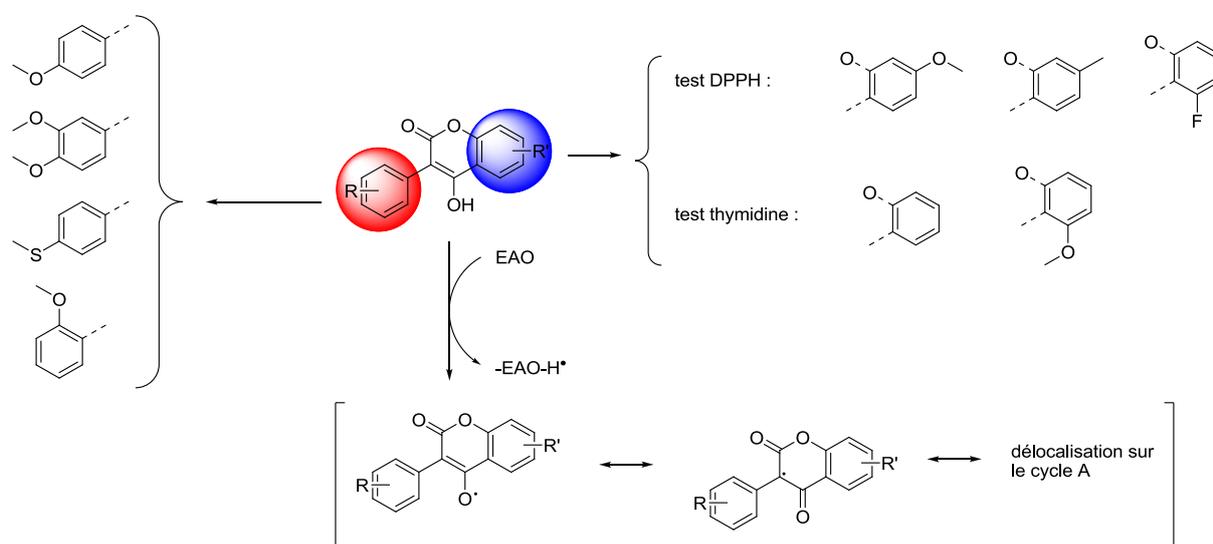


Figure 100 : implication des différentes parties des 3-aryl-4-hydroxycoumarines dans l'activité antioxydante

Les données expérimentales obtenues avec le test de protection de la thymidine soumise à une irradiation UV ont été comparées aux valeurs de protection déterminées *in silico*. Cette comparaison a montré de grandes différences, indiquant que le modèle est encore imprécis et doit encore être entraîné avec des données supplémentaires.

Les différents tests réalisés sur les dérivés d'acide pulvinique et les coumarines ont été comparés, afin de tenter d'établir un parallèle entre les informations issues de chacun d'eux. Une corrélation a pu être observée entre les données recueillies lors de l'étude de l'influence des substituants sur les cycles A et B entre les tests DPPH et de protection de la thymidine, en revanche l'étude des substituants du cycle C a donné des informations différentes d'un test à l'autre. Dans le cas des acides pulviniques nous n'avons pas pu faire état

d'informations similaires fournies par les différents tests. Enfin la comparaison entre des coumarines et des acides pulviniques symétriques et dissymétriques portant les mêmes fonctionnalités a montré des influences différentes de chaque fonctionnalité entre les deux familles de composés étudiées, indiquant des comportements différents entre les acides pulviniques et les coumarines. L'étude visant à élucider les mécanismes impliqués pour obtenir une activité radioprotectrice n'a été menée ici que sur deux familles de composés différentes. Les mêmes travaux devraient donc être menés sur de nouvelles familles de composés. Le développement de nouveaux modèles QSPR à partir de données expérimentales sur de nouveaux tests antioxydant et radioprotecteur (DPPH, thymidine sous radiolyse, ABTS, test cellulaire ...) devrait permettre d'élucider les mécanismes impliqués pour obtenir un bon effet radioprotecteur d'une part, et de découvrir de nouveaux composés potentiellement intéressants d'autre part.

Enfin l'étude de composés complexant le césium dans le but d'effectuer de la décontamination de tissus contaminés a permis de mettre en évidence la nécessité de disposer de structures dimères combinant deux motifs d'acide pulvinique ou un motif d'acide pulvinique avec un autre motif complexant tel que des éthers-couronne. Ainsi le dimère **207** et le composé **212** (figure 101) ont montré un pouvoir complexant envers le césium équivalent voir meilleur que la norbadione A. Deux nouveaux composés, **220** et **224**, ont également été synthétisés et leur pouvoir complexant envers le césium sera bientôt mesuré.

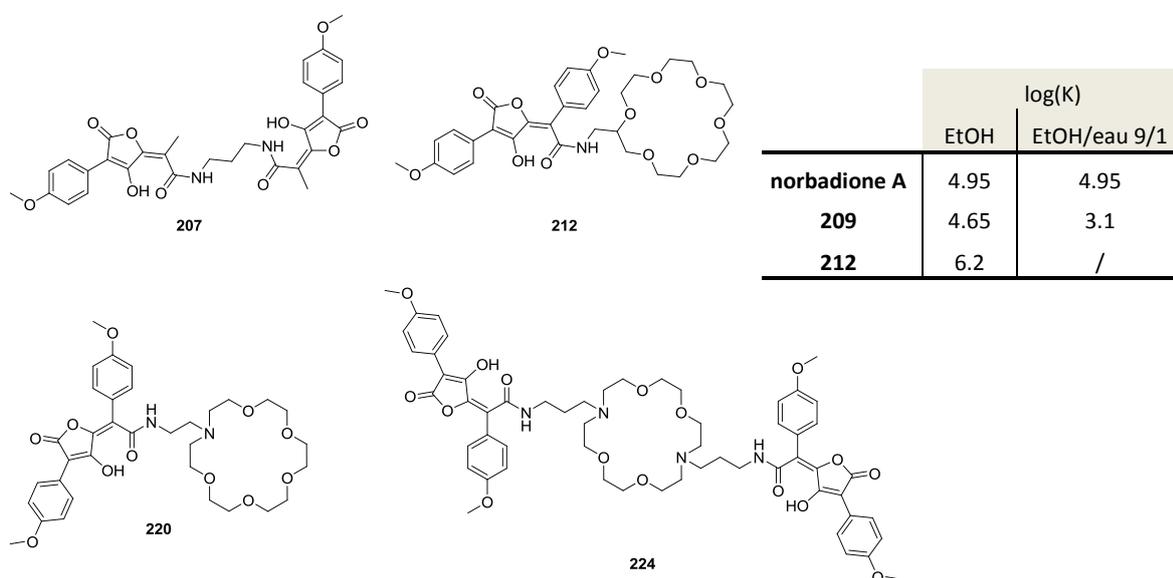


Figure 101 : structures des composés étudiés pour la complexation du césium

Pour conclure, rappelons que les enjeux de la radioprotection par des moyens pharmacologiques sont à la fois très importants et multiples, car les applications vont de la

protection de tissus sains lors du traitement par radiothérapie d'une tumeur cancéreuse à la protection d'une population lors d'un accident nucléaire ou d'une attaque terroriste. Cependant, la recherche et l'étude de nouveaux agents radioprotecteurs est un exercice délicat, car de nombreux phénomènes physiques et biologiques ont lieu conjointement lorsqu'un organisme est irradié. De plus, les symptômes et pathologies radio-induites peuvent apparaître plusieurs semaines après une exposition aux radiations ionisantes. Dans ce contexte, l'identification d'antioxydants à visée radioprotectrice est une piste prometteuse, car il existe certainement dans la nature de nombreux composés doués d'une telle propriété. Pour ceux déjà répertoriés, les mécanismes d'action mis en jeu sont souvent encore mal connus et ne se limitent pas à la simple capture de radicaux libres. Des effets pro-oxydants peuvent aussi apparaître, et la nature ainsi que les effets des sous-produits d'oxydation de ces composés sont parfois méconnus. Nous avons consacré l'essentiel de ces travaux de thèse à l'étude d'une nouvelle famille d'agents radioprotecteurs potentiels, les dérivés d'acides pulviniques, et à la compréhension des facteurs influençant l'effet radioprotecteur par une étude de relation structure-activité sur des dérivés de coumarines. Certains de ces dérivés d'acide pulvinique sont à l'origine de résultats intéressants obtenus sur culture cellulaire et, pour certains d'entre eux préparés au CEA de Saclay, lors de tests *in vivo*. Cependant, les études menées conjointement avec des dérivés de coumarines sur différents tests antioxydants n'ont pas encore permis d'établir une corrélation entre le pouvoir antioxydant et le pouvoir radioprotecteur. L'étude approfondie de nouvelles familles de molécules, couplée au développement d'outils informatiques avec des modèles QSPR sur différents tests antioxydants et de radioprotection, est une piste particulièrement prometteuse, qui devrait nous permettre d'élucider certains mécanismes sous-tendant la radioprotection, et ce faisant, d'orienter les recherches à venir vers la détermination de molécules douées d'une activité optimale.

Partie

expérimentale

Partie expérimentale

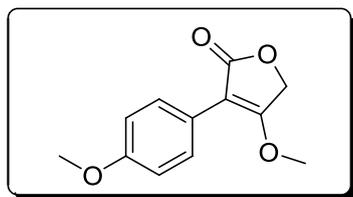
Chimie :

Généralités :

Toutes les manipulations nécessitant des conditions anhydres ont été réalisées sous atmosphère d'argon avec des solvants préalablement séchés sur une station pour séchage de solvant GT S100, sur des cartouches d'alumine. L'avancement des réactions est contrôlé par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice ou d'oxyde d'alumine neutre Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄ ou aluminium oxide neutral 60 F₂₅₄), puis visualisé par UV (256 et 365 nm) puis par révélation chimique (révélateurs utilisés : cérium ammonium molybdate, ninhydrine, permanganate de potassium). Les purifications par chromatographie flash sont réalisées sur gel de silice Merck Kieselgel (40-60 µm, 230-400 mesh ASTM) ou oxyde d'alumine neutre (0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). Les purifications par HPLC préparative ont été réalisées sur un appareil Waters Delta 600 et sur une colonne de silice greffée Si-C18. Les produits chimiques commerciaux ont été achetés auprès d'Aldrich, Avocado, Lancaster, Acros ou Fluka et utilisés sans aucune purification supplémentaire.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur les spectromètres suivants : Bruker Advance 400 (RMN ¹H : 400 MHz, RMN ¹³C : 100 MHz), Bruker DPX300 (RMN ¹H : 300 MHz, RMN ¹³C : 75 MHz), Bruker DPX200 (RMN ¹H : 200 MHz, RMN ¹³C : 50 MHz). Les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme deutéré (CDCl₃), le méthanol deutéré (MeOH-*d*₄), le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-*d*₆) et la pyridine deutérée (pyridine-*d*₅). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au solvant résiduel présent, avec les références suivantes : RMN ¹H : δ(CDCl₃) = 7.26 ppm, δ(MeOH-*d*₄) = 3.31 ppm, δ(DMSO-*d*₆) = 2.50 ppm ; RMN ¹³C : δ(CDCl₃) = 77.16 ppm, δ(MeOH-*d*₄) = 49.00 ppm, δ(DMSO-*d*₆) = 39.52 ppm. Les spectres RMN ¹H sont décrits comme suit : δ (multiplicité du signal, nombre de protons obtenus par intégration du signal, constantes de couplage *J* en Hertz). La multiplicité du signal est indiquée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quint. (quintuplet), hept. (heptuplet), m (multiplet), sl (singulet large), dd (doublet dédoublé), td (triplet dédoublé), qd (quadruplet dédoublé).

Les points de fusion sont mesurés avec un appareil Stuart Scientific SMP3. Les analyses infra-rouges sont réalisées sur un appareil Nicolet 380 FT-IR. Les expériences de spectrométrie de masse basse résolution ont été effectuées avec un appareil Agilent CMS-QP5050A en mode électrospray positive ou négative (ESI+ ou ESI-) ou un appareil Agilent GC MSD 5975i équipé d'une source à impact électronique (IE). Les expériences de spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées avec un appareil Agilent Q-tof 6520 en mode électrospray positif ou négatif.

36 : 4-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)furan-2(5H)-one

formule : C₁₂H₁₂O₄
M = 220,22 g.mol⁻¹
aspect : solide beige

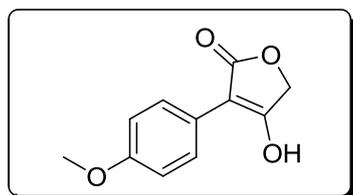
L'acide tétronique **52** (4.11 g, 19.9 mmol) est mis en solution dans l'acétone (85 mL), le sulfate de diméthyle (2.5 g, 19.9 mmol, 1 équ.) et K₂CO₃ sont ajoutés (2.75 g, 19.9 mmol, 1 équ.) et le milieu est porté à reflux pendant une nuit. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré sur célite et le filtrat est concentré sous vide. Le produit est engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire. Rendement : 4.39 g, 19.9 mmol, quantitatif

Rf : 0.36 (Cy/AcOEt : 80/20)

RMN ¹H (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 ¹³C (CDCl₃) : δ = 55.3, 58.0, 64.6, 102.1, 113.7, 121.9, 128.9, 158.9, 172.3, 173.1

MS (ESI+) : 221,1 [M + H]⁺

52 : 4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)furan-2(5H)-one

formule : C₁₁H₁₀O₄
M = 206,19 g.mol⁻¹
aspect : solide beige

Le 4-méthoxyphénylacétate de méthyle (5 g, 27.7 mmol) et le glycolate d'éthyle (2.89 g, 27.7 mmol, 1 équ.) sont mis en solution dans du THF (180 mL). Le *tert*-butoxyde de potassium (6.23 g, 55.5 mmol, 2 équ.) est ajouté par portions, puis le milieu est porté à reflux pendant une nuit. Après retour à température ambiante, le milieu est acidifié par ajout de HCl concentré, puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées à la saumure, puis séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Les cristaux qui apparaissent lors de la concentration sont récupérés par filtration et lavés à l'éther diéthylique. Le filtrat est remis à évaporer, et l'opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de cristaux qui apparaissent. Rendement : 4.11 g, 19.9 mmol, 72 %

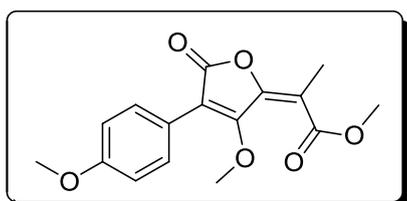
Rf : 0.3 (DCM/MeOH : 90/10)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.75 (s, 3H), 4.74 (s, 2H), 6.94 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.84 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 12.58 (s, 1H)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 55.0, 66.0, 97.3, 113.5, 122.9, 127.6, 157.6, 173.1, 173.3$

MS (ESI+) : 207,1 [M+H] $^+$

67 : methyl 2-(3-methoxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanoate



formule : $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$

M = 304,29 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

Une solution de diisopropylamine (4.22 mL, 29.9 mmol, 1.5 éq.) dans du THF anhydre (125 mL) est refroidie à -20°C , puis une solution de *n*BuLi (1.6 M, 18.7 mL, 29.9 mmol, 1.5 éq.) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité 30 min à -20°C , puis refroidit à -78°C , et une solution du tétronate **36** (4.40 g, 19.9 mmol) dans 65 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité pendant 30 min, puis le pyruvate de méthyle (6.1 g, 59.8 mmol, 3 éq.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité pendant 30 min, puis laissée revenir à température ambiante, et l'agitation est poursuivie pendant 3 h. Une solution de NH_4Cl est ensuite ajoutée, les phases sont séparées et la phase aqueuse est lavée avec EtOAc. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées sous vide. Le brut est dissous dans du DCM (200 mL), puis refroidit à 0°C . La DMAP (200 mg, 10 % w/w) et NEt_3 (16.6 mL, 120 mmol, 6 éq.) sont ajoutées, suivie du TFAA (12.56 g, 59.8 mmol, 3 éq.) qui est ajouté goutte à goutte. Le milieu est laissé revenir à température ambiante puis agité une nuit. La solution est ensuite hydrolysée avec une solution saturée en NaHCO_3 , les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont ensuite séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 90/10 à 85/15). Rendement : 5.33 g, 17.5 mmol, 88 %, *E/Z* = 70/30

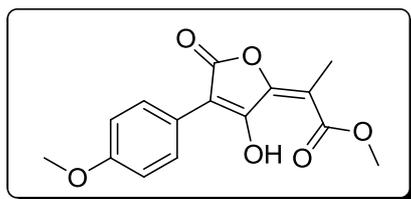
isomère 1 : **Rf** : 0.61 (Cy/AcOEt : 50/50)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 2.14$ (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 (CDCl_3) : $\delta = 15.0, 52.6, 55.4, 60.9, 108.8, 113.2, 114.0, 120.6, 131.2, 143.1, 160.1, 161.1, 168.0, 168.5$

isomère 2 : **Rf** : 0.58 (Cy/AcOEt : 50/50)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 2.27$ (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)

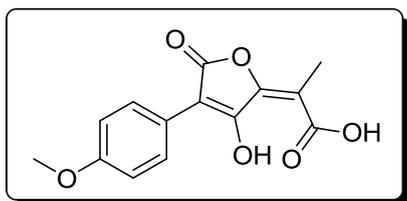
68 : (E)-methyl 2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanoate**formule** : C₁₅H₁₄O₆**M** = 290,27 g.mol⁻¹**aspect** : solide jaune**A partir de 67 :**

Une solution de **67** (3.82 g, 12.5 mmol) dans du DCM anhydre (230 mL) est refroidie à 0°C. Une solution de BBr₃ (1.0 M, 12.5 mL, 12.5 mmol, 1 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis la solution est agitée 2 h à 0°C. Après retour à température ambiante, le milieu est hydrolysée par ajout d'une solution de HCl 1M, puis la phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, puis séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM). Rendement : 2.37 g, 8.1 mmol, 65 %

A partir de 79 :

Le sel de phosphonium **79** (100 mg, 0.2 mmol) est mis en suspension dans du THF anhydre (5 mL) et refroidit à -20°C, puis une solution de *n*BuLi (1.4 M, 230 µL, 0.3 mmol, 1.5 éq.) est ajoutée goutte à goutte. Après agitation pendant 30 min à -20°C, le pyruvate de méthyle (29.1 µL, 0.3 mmol, 1.5 éq.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est laissé à -20°C pendant 3h puis laissé revenir à température ambiante. Après dilution avec EtOAc et neutralisation avec HCl 1M, la phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (DCM 100 %). Rendement : 22 mg, 0.07 mmol, 53 %

Rf : 0.72 (Cy/AcOEt : 50/50)**RMN ¹H (CDCl₃)** : 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 ¹³C (CDCl₃)** : 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**MS (ESI-)** : 289.2 [M-H]⁻

70 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanoic acid

formule : C₁₄H₁₂O₆

M = 276,24 g.mol⁻¹

aspect : solide orange

A partir de 67 :

A une solution de **67** (300 mg, 1 mmol) dans 10 mL de DMF est ajouté MgBr₂ (181 mg, 1 mmol, 1 éq.) et le milieu est chauffé à 120°C pendant 3 h. Après retour à température ambiante, le DMF est évaporé à l'évaporateur rotatif, et le brut est repris dans de l'eau. La phase aqueuse est lavée au DCM, puis acidifiée avec HCl concentré. Le précipité orange est récupéré par extraction avec EtOAc, les phases organiques combinées sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Rendement : 215 mg, 0.78 mmol, 78 %

A partir de 68 :

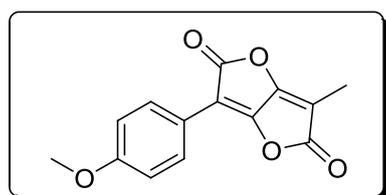
68 (1.25 g, 4.3 mmol) est mis en suspension dans une solution aqueuse de soude à 0.5 M (100 mL) et le milieu est porté à reflux pendant 30 min. Après retour à température ambiante, la phase aqueuse est lavée avec EtOAc, puis acidifiée avec HCl concentré. Le précipité orange est récupéré par extraction avec EtOAc, et les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Rendement : 1.18 g, 4.3 mmol, quantitatif

Rf : 0.2 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (MeOD-*d*₄) : 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 (MeOD-*d*₄) : 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 (ESI-) : 231.0 [M-CO₂]⁻

71 : 3-(4-methoxyphenyl)-6-methylfuro[3,2-b]furan-2,5-dione

formule : C₁₄H₁₀O₅

M = 258,23 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune

L'acide **70** (1g, 3.6 mmol) est mis en suspension dans 17 mL d'anhydride acétique et porté à reflux pendant 30 min. Pendant le retour à température ambiante, des cristaux jaunes de bis-lactone apparaissent. Ceux-ci sont collectés par filtration et lavage au pentane puis séchés sous vide. Rendement : 870 mg, 3.4 mmol, 94 %.

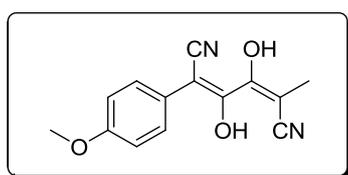
Rf : 0.7 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (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 (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 (ESI+) : 258.0 [M]⁺

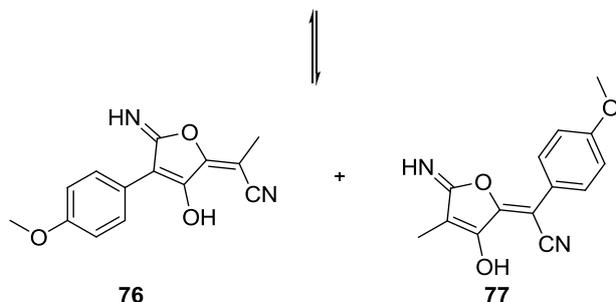
74 : (2E,4E)-3,4-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-5-methylhexa-2,4-dienedinitrile



formule : C₁₄H₁₂N₂O₃

M = 256,26 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune



Une solution de DIPEA (143 μ L, 1.01 mmol, 2.5 eq.) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -20°C, puis une solution de *n*BuLi (1.6 M, 632 μ L, 1.01 mmol, 2.5 eq.) est ajoutée. Le milieu est agité 15 min puis refroidit à -78°C. Une solution de propionitrile (31.4 μ L, 0.44 mmol, 1.1 eq.) dans du THF anhydre (2mL) est alors ajoutée goutte à goutte, puis la solution est agitée pendant 30 min. Une solution de **75** (100 mg, 0.4 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est ensuite ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité pendant 4h30 à -78°C, puis laissé revenir à température ambiante. Le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution saturée de NH₄Cl, puis la phase aqueuse est extraite à EtOAc. Les phases organiques sont combinées, lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le brut contient uniquement les deux isomères **76** (53 %) et **77** (47 %, déterminé par RMN ¹H) et peuvent être séparés par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Rendement brut : 94 mg, 0.37 mmol, 91 %

isomère 1 : **Rf** : 0.51 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 2.04 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 6.95 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.43 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.92 (sl, 2H)

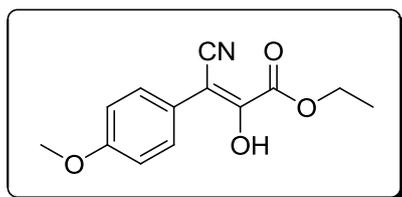
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 4.7, 55.4, 62.3, 90.6, 114.5, 115.7, 122.1, 130.4, 154.2, 160.1, 172.4, 177.1

isomère 2 : Rf : 0.42 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1.63 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 7.07 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.75 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 8.73 (sl, 2H)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 14.2, 55.1, 87.4, 93.2, 113.8, 117.1, 121.8, 128.8, 156.3, 157.8, 170.6, 174.4

75 : (E)-ethyl 3-cyano-2-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)acrylate



formule : C₁₃H₁₃NO₄

M = 247,25 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune

Le 4-méthoxyphénylacétonitrile (500 mg, 3.4 mmol) et l'oxalate de diéthyle (4.6 mL, 34 mmol, 10 éq.) sont mis en solution dans du THF anhydre (20 mL), puis le NaH est ajouté (huile 60%, 272 mg, 6.8 mmol, 2 éq.). Le milieu est porté à reflux pendant 5h puis refroidit à température ambiante. Le milieu réactionnel est hydrolysé par ajout d'eau, puis la phase aqueuse est lavée au DCM. Après acidification avec HCl 1M, le précipité formé est récupéré par extraction au DCM. Les phases organiques sont ensuite combinées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 95/5). Rendement : 672 mg, 2.7 mmol, 80 %

Rf : 0.4 (cyclohexane/EtOAc 1/1)

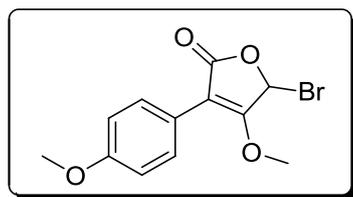
RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1.49 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz), 3.84 (s, 3H), 4.52 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz), 6.95 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz), 7.39 (s, 1H), 7.85 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 13.9, 55.3, 64.5, 96.7, 113.9, 117.3, 123.2, 130.6, 147.5, 160.1, 163.3

HRMS (ES) : calculée pour C₁₃H₁₃LiNO₄ : 254.0999

Trouvée : 254.0997

IR : ν (cm⁻¹) 420, 476, 501, 636, 779, 841, 873, 1008, 1061, 1188, 1249, 1294, 1351, 1384, 1405, 1470, 1507, 1597, 1674, 2218, 2340, 2357, 2839, 2966, 3362

78 : 5-bromo-4-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)furan-2(5H)-one

formule : $C_{12}H_{11}BrO_4$

M = 299,12 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune pâle

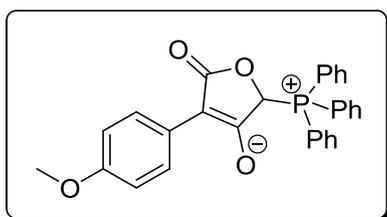
Le tétronate **36** (2.14 g, 9.7 mmol) est mis en solution dans DCE anhydre (10 mL), puis l'AIBN (164 mg, 1 mmol, 10 % w/w) est ajouté. Le milieu est porté à reflux, puis le NBS (1.76 g, 9.9 mmol, 1.02 éq.) est ajouté par portions. Lorsqu'il n'y a plus de produit de départ par CCM, le milieu est refroidi à température ambiante et dilué avec DCM. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/EtOAc 1/1). Rendement : 1.76 g, 5.9 mmol, 61 %

Rf : 0.73 (cyclohexane/EtOAc 1/1)

RMN ¹H (CDCl₃) : 3.83 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 6.83 (s, 1H), 6.93 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.73 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : 55.7, 59.3, 71.4, 104.4, 114.2, 120.7, 130.2, 160.1, 169.3, 170.7

HRMS (ES) : calculée pour $C_{12}H_{12}BrO_4$: 298.9913
trouvée : 298.9918

79 : 4-(4-methoxyphenyl)-5-oxo-2-(triphenylphosphonio)-2,5-dihydrofuran-3-olate

formule : $C_{29}H_{23}O_4P$

M = 466,46 g.mol⁻¹

aspect : solide beige

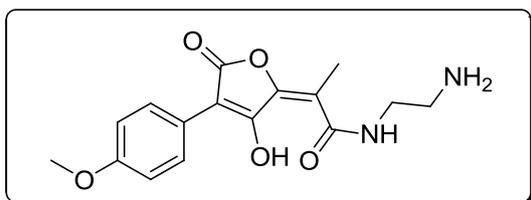
Le tétronate **78** (3.66 g, 12.2 mmol) est mis en solution dans du toluène (25 mL) puis porté à reflux. Une solution de PPh₃ (3.85 g, 14.6 mmol, 1.2 éq.) dans 13 mL de toluène est ensuite ajoutée goutte à goutte sous vive agitation pour éviter une prise en masse. Le reflux est maintenu pendant 2 h, puis le milieu est refroidi à température ambiante et le solide est filtré et lavé au toluène et séché sous vide. Le solide est ensuite agité pendant 1 h dans un mélange DCM/hexane (20 mL/10 mL), puis filtré et séché. Rendement : 2.9 g, 6.2 mmol, 51 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.66 (s, 3H), 6.70 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.81 (s, 1H), 7.68-7.87 (m, 17H)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 54.8, 71.6 (d), 112.7, 117 (d), 124.1, 127.4, 128-133 (m), 155.2, 181.0

HRMS (ES) : calculée pour $C_{29}H_{24}PO_4$: 467.1407
trouvée : 467.1421

80 : (E)-N-(2-aminoethyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamide



formule : $C_{16}H_{18}N_2O_5$
M = 318,32 g.mol⁻¹
aspect : solide jaune

A partir de 71 :

A une suspension de **71** (150 mg, 0.58 mmol) dans 15 mL de DCM est ajoutée l'éthylènediamine (43 µL, 0.64 mmol, 1.1 éq.). Le milieu est ensuite laissé agiter pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 90/10 puis DCM/MeOH/NEt₃ 90/10/1). Rendement : 61 mg, 0.19 mmol, 33 %

A partir de 82 :

82 (85 mg, 0.2 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DCM et 3 mL de TFA sont ajoutés. Le milieu est agité 1 h à température ambiante, puis est concentré sous vide. Le solide jaune obtenu est ensuite trituré à l'éther diéthylique pour fournir **80** sous forme du sel de trifluoroacétate. Rendement : 88 mg, 0.2 mmol, quantitatif

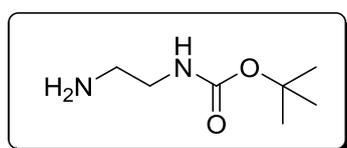
Rf : 0.12 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ = 1.89 (s, 3H), 2.96 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.39 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.71 (s, 3H), 6.80 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.16 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 10.46 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ = 14.4, 36.5, 39.3, 54.8, 91.4, 110.0, 112.9, 125.3, 127.7, 148.7, 155.4, 168.5, 170.2, 173.9

HRMS (ES) : calculée pour $C_{16}H_{19}N_2O_5$: 319.1288
trouvée : 319.1296

81 : *tert*-butyl 2-aminoethylcarbamate

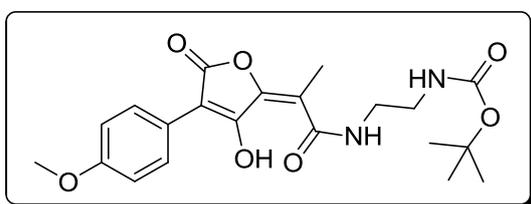


formule : $C_7H_{16}N_2O_2$
M = 160,21 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

Une solution d'éthylènediamine (2 g, 33 mmol) est mise en solution dans 30 mL de THF et refroidit à 0°C. Une solution de Boc₂O (2.18 g, 10 mmol, 0.3 éq.) dans 15 mL de THF est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après concentration à l'évaporateur rotatif, le brut est repris dans EtOAc, lavé à la saumure, la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Rendement : 1.25 g, 7.8 mmol, 78 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1.35 (s, 9H), 2.50 (m, 2H), 2.87 (m, 2H), 6.72 (sl, 1H)

82 : (E)-tert-butyl 2-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamido)ethylcarbamate



formule : C₂₁H₂₆N₂O₇

M = 418,44 g.mol⁻¹

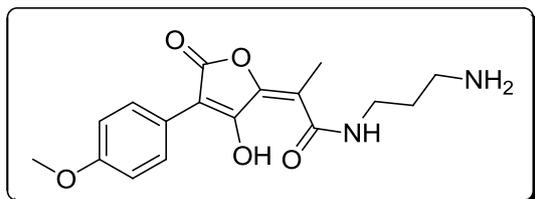
aspect : solide jaune

Une suspension de bis-lactone **71** (50 mg, 0.2 mmol) dans du THF anhydre (2.5 mL) est refroidie à -35°C, puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 387 µL, 0.39 mmol, 2 éq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C, une solution de **81** (31 mg, 0.2 mmol, 1 éq.) dans 2.5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Rendement : 78 mg, 0.18 mmol, 96 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1.37 (s, 9H) ; 2.11 (s, 3H) ; 3.14 (q, 2H, *J* = 5.6 Hz) ; 3.34 (q, 3H, *J* = 5.6 Hz) ; 3.77 (s, 3H) ; 5.02 (sl, 1H), 6.95 (sl, 1H) ; 6.99 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz) ; 7.97 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz) ; 8.25 (sl, 1H) ; 15.98 (s, 1H)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 13.5, 28.2, 38.7, 40.9, 77.8, 113.8, 125.4, 127.9, 150.8, 155.9, 158.2, 166.7, 168.6

HRMS (ES) : calculée pour C₂₁H₂₆N₂O₇Li : 425.1895
trouvée : 425.1881

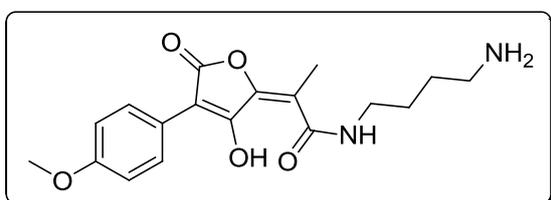
83 : (E)-N-(3-aminopropyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamide**formule :** $C_{17}H_{20}N_2O_5$ **M =** 332,35 g.mol⁻¹**aspect :** solide jaune

A une suspension de **71** (100 mg, 0.39 mmol) dans 10 mL de DCM est ajoutée le 1,3-diaminopropane (36 μ L, 0.42 mmol, 1.1 eq.). Le milieu est ensuite laissé agiter pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 90/10 puis DCM/MeOH/NEt₃ 80/20/2). Rendement : 55 mg, 0.16 mmol, 42 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 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)

HRMS (ES) : calculée pour $C_{17}H_{21}N_2O_5$: 333.1440

trouvée : 333.1445

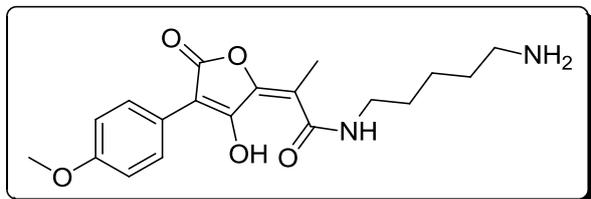
84 : (E)-N-(4-aminobutyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamide**formule :** $C_{18}H_{22}N_2O_5$ **M =** 346,38 g.mol⁻¹**aspect :** solide jaune

A une suspension de **71** (150 mg, 0.58 mmol) dans 15 mL de DCM est ajoutée le 1,4-diaminobutane (64 μ L, 0.64 mmol, 1.1 eq.). Le milieu est ensuite laissé agiter pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 90/10 puis DCM/MeOH/NEt₃ 80/20/2). Rendement : 17 mg, 0.05 mmol, 8 %

RMN ¹H (MeOD-*d*₄) : δ = 1.72 (m, 4H), 2.10 (s, 3H), 2.97 (t, 2H, J = 6.9 Hz), 3.38 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 3.79 (s, 3H), 6.88 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.96 (d, 2H, J = 8.7 Hz)

HRMS (ES) : calculée pour $C_{18}H_{23}N_2O_5$: 347.1601

trouvée : 347.1604

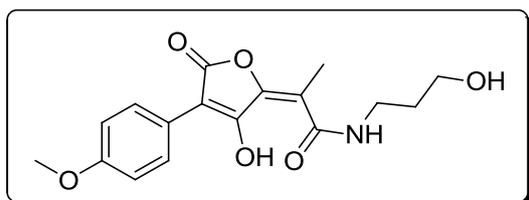
85 : (E)-N-(5-aminopentyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamide**formule :** $C_{19}H_{24}N_2O_5$ **M =** 360,40 g.mol⁻¹**aspect :** solide jaune

A une suspension de **71** (150 mg, 0.58 mmol) dans 15 mL de DCM est ajoutée le 1,5-diaminopentane (75 μ L, 0.64 mmol, 1.1 eq.). Le milieu est ensuite laissé agiter pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 90/10 puis DCM/MeOH/NEt₃ 80/20/2). Rendement : 77 mg, 0.2 mmol, 37 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1.5 (m, 6H), 1.92 (s, 3H), 2.80 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 3.18 (sl, 2H), 3.72 (s, 3H), 6.82 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 8.15 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 12.64 (s, 1H)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 15.4, 24.2, 27.5, 29.3, 32.6, 39.6, 55.7, 112.8, 113.8, 126.2, 128.6, 156.3, 166.4

HRMS (ES) : calculée pour $C_{19}H_{25}N_2O_5$: 361.1758
trouvée : 361.1761

87 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-N-(3-hydroxypropyl)propanamide**formule :** $C_{17}H_{19}NO_6$ **M =** 333,34 g.mol⁻¹**aspect :** solide jaune

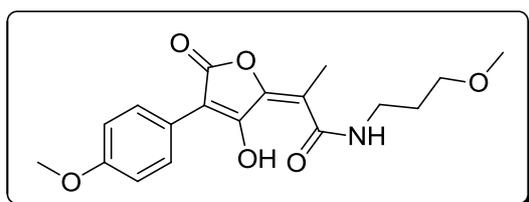
Une suspension de bis-lactone **71** (100 mg, 0.39 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -35°C, puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 774 μ L, 0.77 mmol, 2 eq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C, une solution de 3-aminopropanol (74 μ L, 1 mmol, 2.5 eq.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Rendement : 55 mg, 0.16 mmol, 42 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1.71 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 3.35 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 6.99 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.97 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 9.08 (sl, 1H)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 13.5, 31.4, 38.2, 55.1, 58.5, 100.4, 113.6, 113.8, 122.3, 128.0, 150.8, 158.6, 161.2, 166.7, 168.3

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_6$: 334.1285
trouvée : 334.1290

88 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-N-(3-methoxypropyl)propanamide



formule : $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_6$
M = 347,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide jaune

Une suspension de bis-lactone **71** (100 mg, 0.39 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -35°C , puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 774 μL , 0.77 mmol, 2 éq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C , une solution de 3-aminopropylméthyléther (99 μL , 1 mmol, 2.5 éq.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Rendement : 85 mg, 0.24 mmol, 63 %

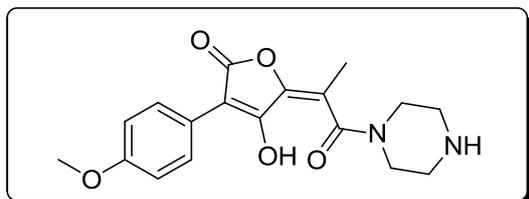
Rf : 0.56 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 1.8 (m, 2H), 2.10 (s, 3H) 3.38 (s, 3H), 3.49 (m, 2H), 3.58 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 6.93 (d, 2H, J = 9.3 Hz), 8.11 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 16.22 (s, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 13.3, 27.7, 40.8, 55.3, 59.1, 73.0, 102.2, 111.9, 113.7, 122.7, 128.7, 152.4, 158.8, 161.2, 167.6, 168.4

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_6$: 348.1442
trouvée : 348.1443

IR : ν (cm^{-1}) 418, 464, 498, 514, 558, 585, 634, 670, 715, 739, 754, 831, 844, 973, 1027, 1088, 1107, 1121, 1154, 1180, 1221, 1248, 1289, 1328, 1381, 1419, 1449, 1511, 1552, 1605, 1746, 2819, 2841, 2879, 2930, 3343

89 : (E)-4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-5-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-ylidene)furan-2(5H)-oneformule : $C_{18}H_{20}N_2O_5$ M = 344,36 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune

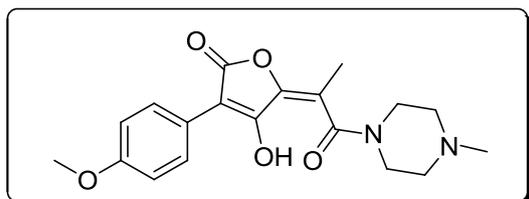
Une suspension de bis-lactone **71** (75 mg, 0.29 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -35°C, puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 581 μ L, 0.58 mmol, 2 eq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C, une solution de *N*-Boc-pipérazine (135 mg, 0.73 mmol, 2.5 eq.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10) pour fournir 123 mg de pulvinamide (95 %). 75 mg de ce produit sont ensuite mis en suspension dans 5 mL de DCM et 3 mL de TFA sont ajoutés. Le milieu est agité 1 h à température ambiante puis concentré sous vide. Le solide obtenu est ensuite trituré dans Et_2O pour fournir **89** sous forme du sel de trifluoroacétate. Rendement : 77 mg, 0.17 mmol, quantitatif

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1.91 (s, 3H), 3.13 (sl, 4H), 3.60 (sl, 4H), 3.73 (s, 3H), 6.86 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.83 (d, 2H, J = 9.0 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 14.7, 40.1, 42.4, 113.4, 114.7, 117.7, 124.2, 127.6, 143.0, 157.1, 167.6, 169.3

HRMS (ES) : calculée pour $C_{18}H_{21}N_2O_5$: 345.1445
trouvée : 345.1439

IR : ν (cm⁻¹) 416, 575, 722, 792, 832, 1016, 1131, 1172, 1249, 1290, 1433, 1605, 1666, 1764, 2340, 2361, 2484, 2725, 2970

90 : (E)-4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-5-(1-(4-methylpiperazin-1-yl)-1-oxopropan-2-ylidene)furan-2(5H)-oneformule : $C_{19}H_{22}N_2O_5$ M = 358,39 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune

A une suspension de **71** (100 mg, 0.39 mmol) dans 10 mL de DCM est ajoutée *N*-

méthylpipérazine (43 μL , 0.39 mmol, 1 éq.). Le milieu est ensuite laissé agiter pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 90/10 à 70/30). Rendement : 52 mg, 0.14 mmol, 36 %

Rf : 0.22 (DCM/MeOH 70/30)

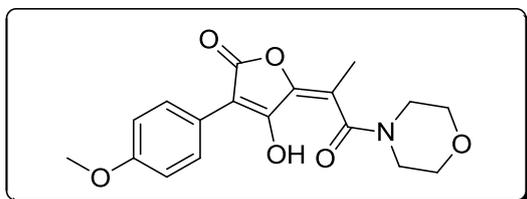
RMN ^1H (MeOD- d_4) : δ = 1.92 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.51 (sl, 4H), 3.50 (sl, 2H), 3.71 (sl, 5H), 6.79 (sl, 2H), 7.96 (sl, 2H)

RMN ^{13}C (CDCl $_3$) : δ = 14.7, 42.3, 45.9, 47.2, 54.9, 55.5, 55.6, 94.6, 108.5, 114.1, 127.7, 147.7, 157.9, 171.8, 175.6, 176.8

HRMS (ES) : calculée pour C $_{19}$ H $_{23}$ N $_2$ O $_5$: 359.1601
trouvée : 359.1599

IR : ν (cm $^{-1}$) 591, 648, 763, 918, 1074, 1237, 1282, 1441, 1515, 1568, 1597, 2336, 2361, 2802, 2907, 3252, 3444

91 : (E)-4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-5-(1-morpholino-1-oxopropan-2-ylidene)furan-2(5H)-one



formule : C $_{18}$ H $_{19}$ NO $_6$
M = 345,35 g.mol $^{-1}$
aspect : solide jaune

Une suspension de bis-lactone **71** (100 mg, 0.39 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -35°C , puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 774 μL , 0.77 mmol, 2 éq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C , une solution de morpholine (88 μL , 1 mmol, 2.5 éq.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO $_4$, filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Rendement : 129 mg, 0.37 mmol, 96 %

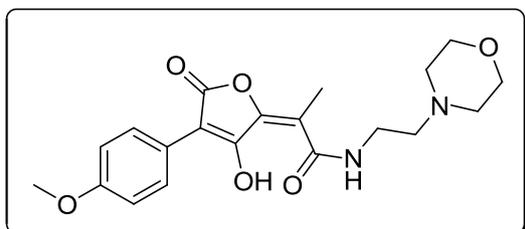
RMN ^1H (CDCl $_3$) : δ = 2.16 (s, 3H), 3.63-3.67 (m, 4H), 3.74-3.77 (m, 4H), 3.83 (s, 3H), 6.94 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 9,1 Hz, 2H)

RMN ^{13}C (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

HRMS (ES) : calculée pour C $_{18}$ H $_{20}$ NO $_6$: 346,1285
trouvée : 346,1291

IR : ν (cm^{-1}) 835, 1026, 1105, 1246, 1436, 1558, 1634, 1757, 2851, 2919

92 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-N-(2-morpholinoethyl)propanamide



formule : $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$

M = 388,41 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

Une suspension de bis-lactone **71** (100 mg, 0.39 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -35°C , puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 774 μL , 0.77 mmol, 2 équ.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C , une solution de N-(2-aminoéthyl)morpholine (51 μL , 0.39 mmol, 1 équ.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Rendement : 120 mg, 0.31 mmol, 82 %

Rf : 0.19 (DCM/MeOH 95/5)

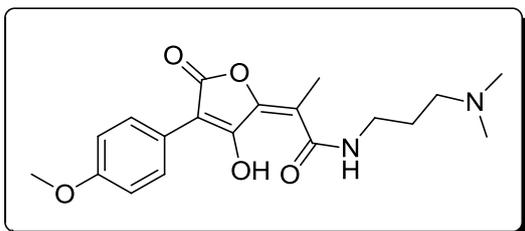
RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 2.07 (s, 3H) ; 2.64 (t, 4H, J = 4.2 Hz) ; 2.72 (t, 2H, J = 5.7 Hz) ; 3.47 (q, 2H, J = 5.4 Hz) ; 3.76 (t, 4H, J = 4.5 Hz) ; 3.80 (s, 3H) ; 6.88 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.18 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 8.04 (d, 2H, J = 8.7 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 13.7, 36.48, 53.2, 55.4, 55.9, 66.6, 66.9, 111.2, 113.9, 122.9, 128.8, 158.9, 161.6, 167.8, 168.3, 169.0

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$: 389.1707
trouvée : 389.1692

IR : ν (cm^{-1}) 534, 587, 661, 841, 910, 1074, 1102, 1237, 1294, 1441, 1511, 1548, 1658, 2340, 2361, 3268

95 : (E)-N-(3-(diméthylamino)propyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanamide



formule : C₁₉H₂₄N₂O₅

M = 360,40 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune

A une suspension de **71** (150 mg, 0.58 mmol) dans 15 mL de DCM est ajoutée le *N,N*-diméthyl-1,3-diaminopropane (81 µL, 0.64 mmol, 1.1 éq.). Le milieu est ensuite laissé agiter pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 90/10 à 70/30). Rendement : 73 mg, 0.2 mmol, 35 %

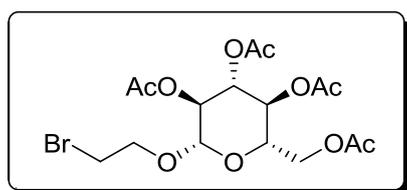
RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1.85 (sl, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.72 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz), 3.50 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz), 3.81 (s, 3H), 6.91 (d, 2H, *J* = 9.3 Hz), 8.11 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 13.4, 23.6, 41.8, 45.0, 55.4, 59.2, 112.2, 113.8, 123.3, 128.6, 151.0, 158.7, 162.5, 169.0, 185.0

HRMS (ES) : calculée pour C₁₉H₂₅N₂O₅ : 361.1758

trouvée : 361.1764

96 : (2S,3S,4R,5S,6S)-2-(acetoxyméthyl)-6-(2-bromoéthoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



formule : C₁₆H₂₃BrO₁₀

M = 455,25 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

Le β-D-(+)-glucose (500 mg, 1.3 mmol) et le 2-bromoéthanol (91 µL, 1.3 mmol, 1 éq.) sont mis en solution dans 10 mL de DCM anhydre, et refroidis à 0°C. Le BF₃.Et₂O (552 µL, 4.3 mmol, 3.4 éq.) est ajouté goutte à goutte, et le milieu est laissé sous agitation pendant une nuit. Après hydrolyse avec une solution saturée en NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 80/20 à 70/30). Rendement : 300 mg, 0.6 mmol, 51 %

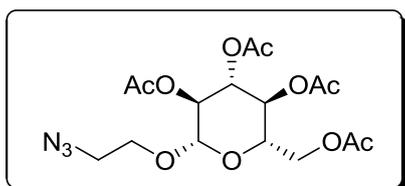
Rf : 0.54 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 2.00 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.44-3.48 (m, 2H), 3.69-3.73 (m, 1H), 3.79-3.85 (m, 1H), 4.12-4.16 (m, 2H), 4.23-4.27 (dd, 1H, *J* = 4.8 Hz, *J* =

12.3 Hz), 4.57 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 4.98-5.10 (m, 2H), 5.21 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 20.7, 21.0, 30.3, 61.7, 62.1, 68.6, 70.0, 71.3, 72.1, 72.8, 89.3, 101.2, 169.1, 169.2, 169.9, 170.4$

97 : (2S,3S,4R,5S,6S)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-azidoethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



formule : $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$
M = $417,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

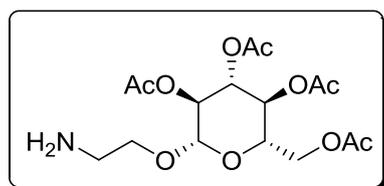
96 (1g, 2.2 mmol) et NaN_3 (860 mg, 13 mmol, 6 éq.) sont mis en solution dans le DMF (15 mL) et le milieu est chauffé à 60°C pendant 5 h. Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé sous vide, le brut réactionnel est repris dans de l'eau et extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées avec HCl 1M et à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Rendement : 915 mg, 2.2 mmol, 99 %

Rf : 0.53 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 1.98$ (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 3.24-3.29 (ddd, 1H, $J = 3.5$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 13.4 Hz), 3.44-3.50 (ddd, 1H, $J = 3.4$ Hz, $J = 8.3$ Hz, 13.3 Hz), 3.64-3.72 (m, 2H), 3.98-4.03 (ddd, 1H, $J = 3.5$ Hz, $J = 4.9$ Hz, $J = 10.7$ Hz), 4.12-4.15 (dd, 1H, $J = 2.5$ Hz, $J = 12.3$ Hz), 4.21-4.25 (dd, 1H, $J = 4.6$ Hz, $J = 12.3$ Hz), 4.58 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 4.97-5.02 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $J = 9.7$ Hz), 5.07 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz), 5.19 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 20.3, 20.4, 50.3, 61.6, 68.1, 68.3, 70.9, 71.6, 72.5, 100.4, 169.0, 169.1, 169.8, 170.2$

98 : (2S,3S,4R,5S,6S)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-aminoethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



formule : $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_{10}$
M = $391,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : huile incolore

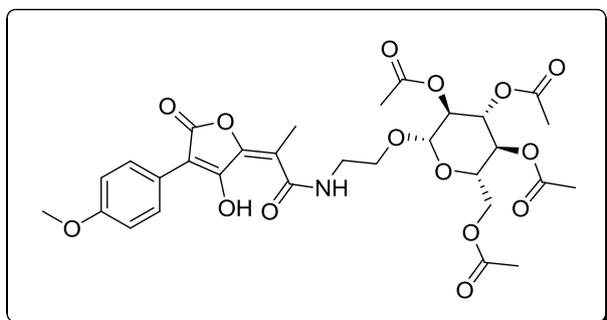
L'azide **97** (2 g, 4.8 mmol) est mis en solution dans 70 mL de THF, et le Pd/C est ajouté (200 mg, 10 % w/w). Le milieu est mis sous atmosphère d'hydrogène à pression atmosphérique et agité pendant une nuit à température ambiante. Après filtration sur célite, le filtrat est

concentré sous vide. Rendement : 1.87 g, 4.8 mmol, quantitatif

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 1.98 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 3.56-3.62 (m, 1H), 3.67-3.72 (m, 1H), 3.84-3.89 (m, 1H), 4.12-4.16 (dd, 1H, J = 2.5 Hz, J = 12.3 Hz), 4.20-4.25 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, J = 12.3 Hz), 4.52 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 4.95-4.99 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, J = 9.7 Hz), 5.06 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 5.19 (t, 1H, J = 9.5 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 20.5, 20.6, 20.7, 20.8, 41.6, 61.9, 68.4, 71.3, 71.8, 72.3, 72.7, 100.9, 169.3, 169.4, 170.6

99 : (2S,3S,4R,5S,6S)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-((E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamido)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



formule : $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{NO}_{15}$

M = $649,60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

Une suspension de bis-lactone **71** (100 mg, 0.39 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -35°C , puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 774 μL , 0.77 mmol, 2 éq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C , une solution de **98** (155 mg, 0.4 mmol, 1.03 éq.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Rendement : 145 mg, 0.22 mmol, 57 %

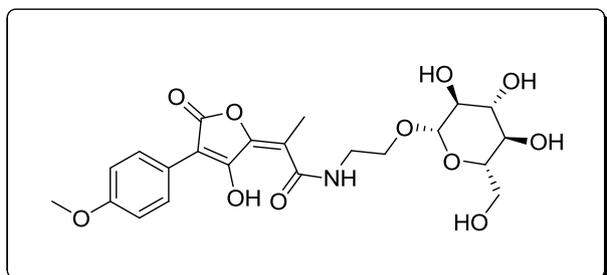
RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 1.98 (s, 3H); 2.00 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 3.5-3.8 (m, 9H), 4.0-4.2 (m, 3H), 4.51 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 4.9-5.3 (m, 3H), 6.91 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 8.06 (d, 2H, J = 9.0 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 13.4, 20.6, 20.7, 40.5, 55.3, 61.8, 67.5, 68.2, 71.3, 72.2, 72.5, 100.8, 102.8, 111.5, 113.8, 122.5, 128.8, 152.8, 159.0, 160.5, 169.1, 169.5, 170.1, 170.6

HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{LiNO}_{15}$: 656.2162

trouvée : 656.2153

100 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-N-(2-((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl)propanamide



formule : $C_{22}H_{27}NO_{11}$
M = 481,45 g.mol⁻¹
 aspect : solide orange

Le pulvinamide **99** (145 mg, 0.22 mmol) est mis en solution dans 5 mL de méthanol anhydre, puis MeONa (14 mg, 0.24 mmol, 1.1 éq.) est ajouté. Le milieu est agité une nuit à température ambiante, puis est neutralisé par l'ajout de résine DOWEX 50WX8-200. Après filtration sur célite, le filtrat est concentré sous vide, puis le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 85/15). Rendement : 63 mg, 0.13 mmol, 58 %

Rf : 0.23 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (MeOD-*d*₄) : δ = 2.18 (s, 3H), 3.19-3.24 (dd, 1H, J = 7.8 Hz, J = 9.0 Hz), 3.28-3.33 (m, 3H), 3.37 (t, 1H, J = 9.0 Hz), 3.52-3.59 (ddd, 1H, J = 4.5 Hz, J = 6.9 Hz, J = 13.9 Hz), 3.64-3.71 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.86-3.89 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 11.7 Hz), 4.00-4.04 (m, 1H), 4.32 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.93 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 8.04 (d, 2H, J = 9.0 Hz)

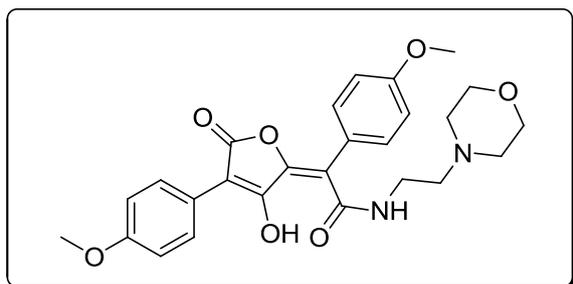
RMN ¹³C (MeOD-*d*₄) : δ = 13.6, 41.8, 55.7, 62.7, 69.0, 71.6, 75.1, 78.1, 103.1, 104.5, 114.6, 114.5, 123.8, 129.7, 152.7, 160.4, 162.1, 169.0, 170.4

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{22}H_{28}NO_{11}$: 482.1670
 trouvée : 482.1657

IR : ν (cm⁻¹) 458, 512, 581, 633, 699, 746, 833, 919, 1025, 1160, 1180, 1247, 1298, 1417, 1511, 1552, 1602, 1744, 2930, 3334

Pf : 135°C

102 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)-N-(2-morpholinoethyl)acetamide



formule : $C_{26}H_{28}N_2O_7$
M = 480,51 g.mol⁻¹
 aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis la *N*-(2-aminoéthyl)morpholine (75 μ L, 0.57 mmol, 1 eq.) est ajoutée. Après 10 min, le milieu est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 95/5). Rendement : 180 mg, 0.37 mmol, 65 %

Rf : 0.4 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 3.32 (m, 6H), 3.60 (m, 6H), 3.73 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 4.01 (sl, 4H), 6.85 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 6.98 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.57 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.07 (d, 2H, J = 9.2 Hz)

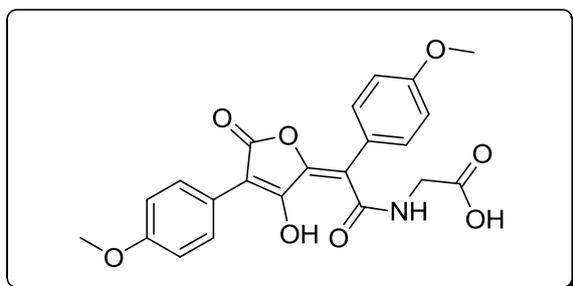
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 32.7, 51.6, 54.9, 55.2, 56.7, 63.2, 91.5, 112.1, 113.0, 113.8, 125.6, 125.9, 127.1, 129.8, 144.1, 155.7, 158.6, 168.4, 170.8, 174.3

HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_7$: 481.1976
trouvée : 481.1969

IR : ν (cm^{-1}) 431, 592, 630, 659, 829, 925, 950, 1035, 1103, 1148, 1179, 1249, 1293, 1509, 1552, 1603, 1659, 1698, 2358, 2832, 2946, 3279

Pf : 255°C (décomposition)

103 : (E)-2-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamido)acetic acid



formule : $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_8$
M = 425,39 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis la glycine (43 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) est ajoutée. Après 10 min, le milieu est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 90/0 puis ajout de 1 % volumique d'acide acétique). Rendement : 180 mg, 0.42 mmol, 74 %

Rf : 0.38 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 3.77 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.90 (d, 2H, J = 6.0 Hz), 7.00 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.06 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.36 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.98 (d, 2H, J = 9.2 Hz)

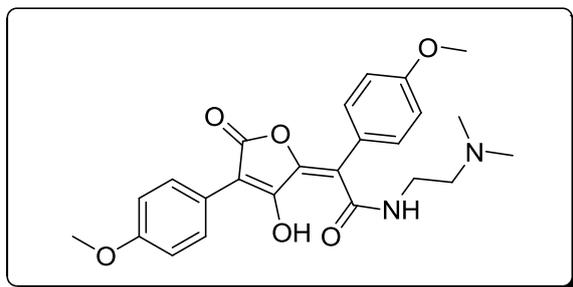
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 42.4, 55.1, 55.2, 113.8, 114.2, 116.9, 122.5, 123.8, 128.0, 131.2, 150.3, 158.3, 159.6, 167.1, 168.7, 169.8

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{22}H_{20}NO_8$: 426.1178
trouvée : 426.1183

IR : ν (cm^{-1}) 541, 583, 651, 836, 953, 993, 1033, 1108, 1168, 1178, 1250, 1291, 1303, 1341, 1417, 1454, 1484, 1505, 1547, 1589, 1658, 1715, 1750, 2839, 2934, 3290, 3397

Pf : 200°C (décomposition)

104 : (E)-N-(2-(diméthylamino)éthyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-méthoxyphényl)acetamide



formule : $C_{24}H_{26}N_2O_6$

M = 438,47 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

La bis-lactone **71** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis la *N,N*-diméthyléthylènediamine (63 μL , 0.57 mmol, 1 éq.) est ajoutée. Après 10 min, le milieu est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 95/5). Rendement : 229 mg, 0.52 mmol, 92 %

Rf : 0.38 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 2.97 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 3.29 (t, 2H, J = 4.8 Hz), 3.58 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.85 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.57 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.19 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.70 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 10.87 (sl, 1H)

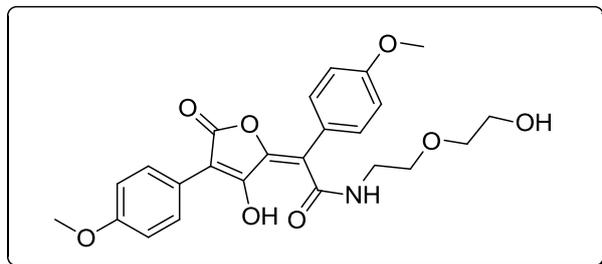
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 33.9, 42.8, 54.8, 55.1, 57.1, 91.1, 112.1, 113.0, 113.8, 125.2, 126.1, 127.4, 129.8, 144.1, 155.5, 158.5, 168.3, 170.8, 174.7

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{24}H_{27}N_2O_6$: 439.1866
trouvée : 439.1864

IR : ν (cm^{-1}) 428, 518, 592, 666, 768, 809, 833, 901.3, 978, 1031, 1102, 1146, 1181, 1245, 1271, 1289, 1508, 1562, 1603, 1632, 1719, 2710, 2836, 3040, 3217

Pf : 240°C (décomposition)

105 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-N-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-2-(4-methoxyphenyl)acetamide



formule : $C_{24}H_{26}NO_8$
M = 455,46 g.mol⁻¹
aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis la 2-(2-aminoéthoxy)éthanol (58 μ L, 0.57 mmol, 1 éq.) est ajoutée. Après 10 min, le milieu est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 97/3). Rendement : 259 mg, 0.57 mmol, 99 %

Rf : 0.29 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.39-3.51 (m, 8H), 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 7.01 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.05 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.32 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.96 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.04 (t, 1H, J = 5.6 Hz)

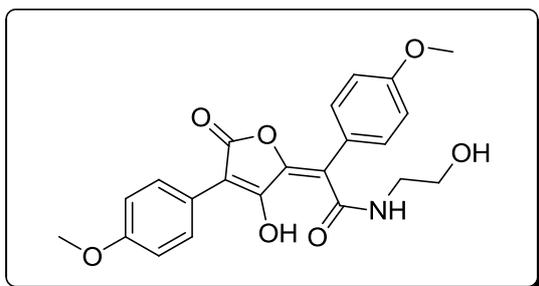
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 40.2, 55.1, 55.2, 60.2, 67.8, 72.0, 113.9, 114.1, 117.9, 122.1, 123.6, 128.2, 131.6, 150.4, 158.4, 159.6, 166.8, 168.4

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{24}H_{26}NO_8$: 456.1659
trouvée : 456.1653

IR : ν (cm⁻¹) 457, 483, 524, 580, 697, 832, 915, 957, 1025, 1062, 1116, 1176, 1242, 1290, 1506, 1548, 1594, 1659, 1747, 2838, 2933, 3354

Pf : 135.6°C

106 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-N-(2-hydroxyethyl)-2-(4-methoxyphenyl)acetamide



formule : $C_{22}H_{21}NO_7$
M = 411,40 g.mol⁻¹
aspect : solide jaune

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis la 2-(2-

aminoéthoxy)éthanol (58 μL , 0.57 mmol, 1 éq.) est ajoutée. Après 10 min, le milieu est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 97/3). Rendement : 259 mg, 0.57 mmol, 99 %

Rf : 0.29 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 3.31 (q, 2H, J = 6.0 Hz), 3.46 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 7.01 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.05 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.32 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.95-7.98 (m, 3H)

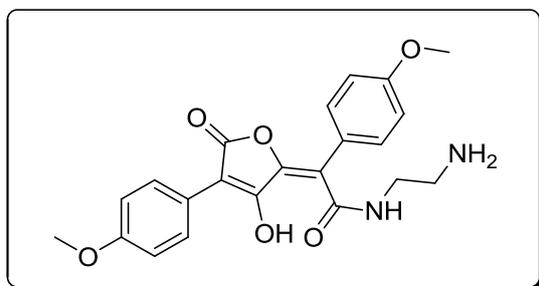
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 43.1, 55.1, 55.2, 58.7, 113.8, 114.1, 117.8, 122.2, 123.6, 128.1, 131.6, 150.5, 158.4, 159.6, 166.9, 168.4

HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$: 412.1394
trouvée : 412.1391

IR : ν (cm^{-1}) 420, 443, 457, 496, 539, 581, 700, 750, 797, 831, 840, 959, 993, 1027, 1055, 1160, 1178, 1218, 1237, 1289, 1301, 1320, 1421, 1462, 1486, 1509, 1552, 1575, 1594, 1656, 1731, 2949, 3258, 3488

Pf : 202.4°C

107 : (E)-N-(2-aminoethyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamide



formule : $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$

M = 410,42 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis l'éthylènediamine (191 μL , 2.85 mmol, 5 éq.) est ajoutée. A la fin de la réaction le produit n'est pas soluble, il est récupéré par filtration et lavage au DCM et à Et_2O puis séché sous vide. Rendement : 173 mg, 0.4 mmol, 74 %

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 3.01 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.81 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 6.98 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.58 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.10 (sl, 2H), 8.19 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.62 (t, 1H, J = 6.0 Hz)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 36.2, 54.8, 55.1, 90.1, 112.0, 112.9, 113.7, 125.2, 126.3, 127.8, 129.8, 144.3, 155.4, 158.4, 168.4, 171.1, 175.1

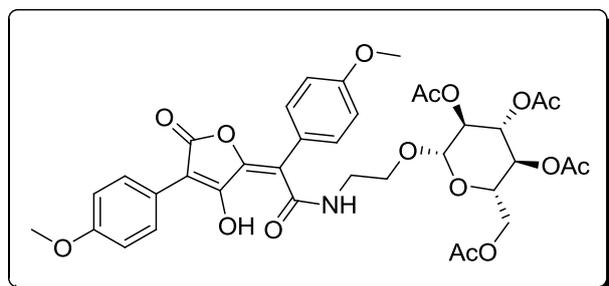
HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6$: 411.1557

trouvée : 411.1551

IR : ν (cm⁻¹) 434, 522, 667, 682, 832, 929, 988, 1030, 1092, 1152, 1179, 1259, 1298, 1411, 1509, 1547, 1604, 1639, 1712, 2836, 2934, 3065, 3227, 3371, 3501

Pf : 248°C (décomposition)

108 : (2S,3S,4R,5S,6S)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-((E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamido)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



formule : C₃₆H₃₉NO₁₆

M = 741,69 g.mol⁻¹

aspect : solide orange

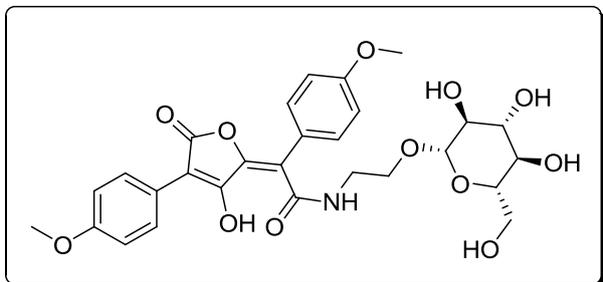
La bis-lactone **101** (500 mg, 1.4 mmol) est suspendue dans 20 mL de DCM, puis **98** (840 mg, 2.1 mmol, 1.5 éq.) est ajoutée. Le milieu est agité une nuit à température ambiante puis est concentré. Le brut est purifié par chromatographie (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 95/5). Rendement : 1.04 g, 1.4 mmol, 99 %.

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1.99 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 3.48-3.78 (m, 5H), 3.83 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.03-4.14 (m, 2H), 4.46 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 4.84 (dd, 1H, J = 7.6 Hz, J = 9.6 Hz), 4.99 (t, 1H, J = 9.6 Hz), 5.16 (t, 1H, J = 9.6 Hz), 6.46 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 6.94 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.03 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.24 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 8.11 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 15.70 (s, 1H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 20.6, 20.7, 20.8, 40.6, 55.4, 55.5, 62.1, 67.2, 68.4, 71.3, 72.1, 72.8, 100.5, 103.5, 113.9, 114.9, 116.8, 122.5, 123.8, 129.1, 131.6, 152.9, 159.2, 160.5, 160.6, 167.3, 169.2, 169.3, 169.5, 170.2, 170.5

MS (ESI) : 742.2 ([M+]⁺)

109 : (E)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)-N-(2-((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl)acetamide



formule : $C_{28}H_{31}NO_{12}$
M = 573,55 g.mol⁻¹
aspect : solide orange

Le produit **109** (1.04 g, 1.4 mmol) est mis en solution dans 50 mL de méthanol et MeONa (250 mg, 4.5 mmol, 3.1 éq.) est ajouté. Le milieu est agité une nuit à température ambiante, puis est neutralisé par l'ajout de résine DOWEX 50WX8-200. Après filtration sur célite, le filtrat est concentré sous vide, puis le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH/AcOH 100/0/0 à 90/10/1). Rendement : 608 mg, 1.06 mmol, 71 %

Rf : 0.26 (DCM/MeOH 90/10)

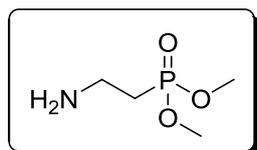
RMN ¹H (MeOD-*d*₄) : δ = 3.11 (dd, 1H, J = 7.8 Hz, J = 9.3 Hz), 3.19-3.26 (m, 3H), 3.33 (t, 2H, J = 8.8 Hz), 3.50-3.63 (m, 3H), 3.68-3.76 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.89-3.95 (m, 1H), 4.24 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.95 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.04 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.31 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 8.05 (d, 2H, J = 9.0 Hz)

RMN ¹³C (MeOD-*d*₄) : δ = 41.2, 55.6, 55.7, 62.7, 69.4, 71.6, 75.2, 77.9, 94.6, 104.5, 114.2, 114.7, 115.4, 127.8, 127.9, 131.8, 147.3, 158.0, 160.7, 171.1, 175.7, 177.7

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{28}H_{32}NO_{12}$: 574.919
trouvée : 574.1920

IR : ν (cm⁻¹) 458, 524, 580, 698, 833, 915, 957, 1024, 1072, 1161, 1178, 1244, 1294, 1338, 1507, 1548, 1595, 1748, 2838, 3363

Pf : 80°C (décomposition)

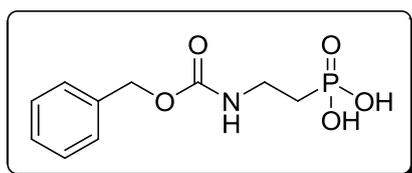
112 : dimethyl 2-aminoethylphosphonate**formule** : $C_4H_{12}NO_3P$ **M** = $153,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **aspect** : solide blanc

114 (340 mg, 1.2 mmol) est mis en solution dans 10 mL de MeOH, puis Pd/C (30 mg, 10 % w/w) est ajouté, et le milieu est placé sous atmosphère d'hydrogène et agité à température ambiante pendant 2 h. Après filtration sur célite le filtrat est concentré sous vide. Rendement : 180 mg, 1.2 mmol, quantitatif

RMN ^1H (MeOD- d_4) : $\delta = 2.07\text{-}2.15$ (m, 2H), $2.96\text{-}3.03$ (m, 2H), 3.77 (d, 6H, $J = 10.8$ Hz)

RMN ^{13}C (MeOD- d_4) : $\delta = 26.0\text{-}27.4$ (d, $J = 138$ Hz), 36.1 (d, $J = 3$ Hz), 53.4 (d, $J = 6$ Hz)

RMN ^{31}P (MeOD- d_4) : $\delta = 32.01$

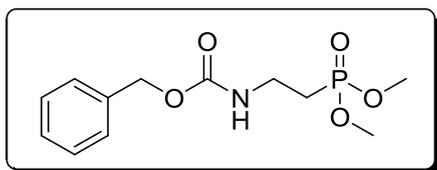
113 : 2-(benzyloxycarbonylamino)ethylphosphonic acid**formule** : $C_{10}H_{14}NO_5P$ **M** = $259,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **aspect** : solide blanc

L'acide 2-aminoéthylphosphonique (200 mg, 1.6 mmol) et NaOH (192 mg, 4.8 mmol, 3 éq.) sont mis en solution dans un mélange Et_2O /eau (2+2 mL), puis le chloroformate de benzyle (341 μL , 2.4 mmol, 1.5 éq.) et NaHCO_3 (201 mg, 2.4 mmol, 1.5 éq.) sont ajoutés par portions. Le milieu est agité une nuit à température ambiante. Les phases sont ensuite séparées, la phase aqueuse est lavée à Et_2O puis acidifiée avec HCl concentré et concentrée. Le résidu est repris dans l'acétone, le précipité est lavé et le filtrat est concentré. Rendement : 353 mg, 1.25 mmol, 78 %

RMN ^1H (DMSO- d_6) : $\delta = 1.70\text{-}1.79$ (m, 2H), $3.17\text{-}3.20$ (m, 2H), 5.00 (s, 2H), 7.24 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz), $7.30\text{-}7.38$ (m, 5H)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 28.0, 29.3, 35.6, 65.3, 127.8, 128.4, 137.2, 155.8$

RMN ^{31}P (CDCl_3) : $\delta = 22.87$

114 : benzyl 2-(dimethoxyphosphoryl)ethylcarbamate

formule : C₁₂H₁₈NO₅P

M = 287,25 g.mol⁻¹

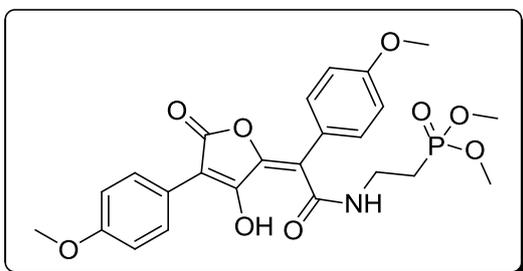
aspect : huile incolore

113 (350 mg, 1.2 mmol) est mis en solution dans 10 mL d'acétone, puis K₂CO₃ (516 mg, 3.7 mmol, 3 éq.) et Me₂SO₄ (236 µL, 2.5 mmol, 2 éq.) sont ajoutés. Le milieu est porté à reflux une nuit, puis après retour à température ambiante est filtré sur célite, puis le filtrat est concentré. Rendement : 340 mg, 1.2 mmol, 98 %

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 2.00 (td, 2H, *J* = 6.8 Hz, *J* = 11.2 Hz), 3.46 (qd, 2H, *J* = 6.4 Hz, *J* = 18.4 Hz), 3.71 (d, 6H, *J* = 10.8 Hz), 5.08 (s, 2H), 5.47 (sl, 1H), 7.29-7.34 (m, 5H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 24.5-25.9 (d, *J* = 139 Hz), 35.2 (d, *J* = 3.6 Hz), 52.4 (d, *J* = 6.5 Hz), 66.7, 128.1, 128.5, 136.5, 156.2

RMN ³¹P (CDCl₃) : δ = 32.02

115 : (E)-dimethyl 2-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamido)ethylphosphonate

formule : C₂₄H₂₆NO₉P

M = 503,44 g.mol⁻¹

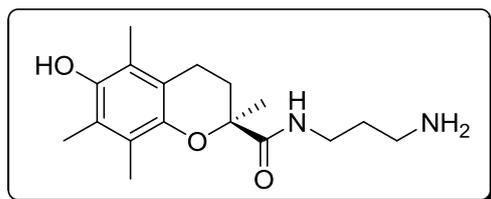
aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (190 mg, 0.54 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis **112** (100 mg, 0.65 mmol, 1.2 éq.) est ajoutée. Le milieu est porté à reflux une nuit, puis est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 97/3). Rendement : 140 mg, 0.3 mmol, 51 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 2.01-2.09 (td, 2H, *J* = 7.6 Hz, *J* = 17.6 Hz), 3.38-3.46 (m, 2H), 3.62 (d, 6H, *J* = 10.8 Hz), 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 7.02 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.06 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.32 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.96 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.15 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 22.6-23.9 (d, *J* = 135 Hz), 34.7, 52.1 (d, *J* = 6 Hz), 55.2 (d, *J* = 7 Hz), 101.3, 113.9, 114.1, 117.9, 121.9, 123.4, 128.3, 131.7, 150.6, 158.5, 159.6, 161.0, 166.8, 168.3

RMN ³¹P (DMSO-*d*₆) : δ = 30.61

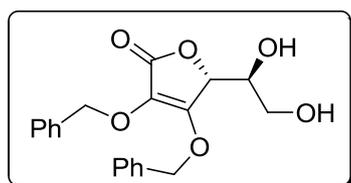
117 : (S)-N-(3-aminopropyl)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxamide**formule :** C₁₇H₂₆N₂O₃**M =** 306,40 g.mol⁻¹**aspect :** solide blanc

Le trolox (100 mg, 0.4 mmol) est mis en solution dans 5 mL de THF anhydre et le CDI (71.3 mg, 0.44 mmol, 1.1 équ.) est ajouté. Le milieu est agité pendant 1 h à température ambiante, puis la 1,3-diaminopropane (67.3 µL, 0.8 mmol, 2 équ.) est ajoutée. Le milieu est agité une nuit à température ambiante, puis est hydrolysé par ajout d'eau. La phase aqueuse est extraite avec EtOAc, les phases organiques combinées sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Rendement : 102 mg, 0.33 mmol, 83 %

RMN ¹H (MeOD-d₄) : δ = 1.16 (s, 3H), 1.20 (m, 2H), 1.47 (m, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 2.01 (m, 1H), 2.10 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 2.26 (m, 2H), 2.86 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 6.74 (s, 2H), 7.36 (s, 1H)

RMN ¹³C (MeOD-d₄) : δ = 11.9, 12.2, 12.8, 21.6, 25.0, 31.0, 33.3, 37.4, 39.3, 79.2, 118.7, 122.3, 122.9, 124.8, 145.7, 147.2, 176.9

MS (ESI+) : 307.2 ([M+H]⁺)

118 : (R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-((S)-1,2-dihydroxyethyl)furan-2(5H)-one**formule :** C₂₀H₂₀O₆**M =** 356,37 g.mol⁻¹**aspect :** solide blanc

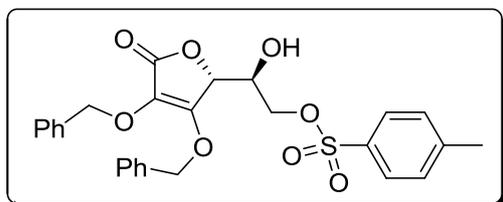
L'acide ascorbique (5 g, 28.4 mmol), le bromure de benzyle (6.8 mL, 56.8 mmol, 2 équ.), K₂CO₃ (7.85 g, 56.8 mmol, 2 équ.) et TBAI (500 mg, 10 % w/w) sont mis en solution dans 100 mL de DMF et agités à température ambiante pendant une nuit. Le solvant est ensuite éliminé sous vide et le brut est repris dans un mélange eau/EtOAc. La phase aqueuse est acidifiée et extraite avec EtOAc, les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 95/5). Rendement : 3.89 g, 10.9 mmol, 38 %

R_f : 0.55 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ = 3.43-3.48 (m, 2H), 3.72 (m, 1H), 4.87 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 4.91 (sl, 1H), 4.96 (m, 2H), 5.14 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 5.24 (m, 2H), 7.31-7.43 (m, 10H)

RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ = 61.6, 68.7, 72.6, 73.6, 74.6, 120.7, 128.3, 128.4, 128.6, 135.7,

136.2, 158.1, 169.3

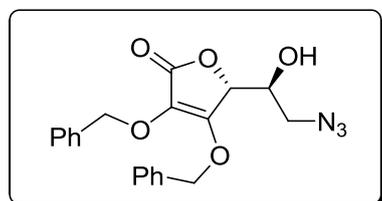
119 : (S)-2-((R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyethyl 4-methylbenzenesulfonate**formule :** C₂₇H₂₆O₈S**M =** 510,56 g.mol⁻¹**aspect :** solide blanc

Le produit **118** (200 mg, 0.56 mmol) est mis en solution dans 5 mL de pyridine anhydre et refroidit à 0°C. Le chlorure de tosylo (107 mg, 0.56 mmol, 1 éq.) dans 5 mL de DCM est ensuite ajouté goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Le solvant est ensuite évaporé, et le brut est repris dans EtOAc et lavé avec HCl 1M. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 99/1). Rendement : 80 mg, 0.16 mmol, 28 %

R_f : 0.72 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 2.43 (s, 3H), 4.12-4.15 (m, 3H), 4.65 (d, 1H, J = 1.6 Hz), 5.06 (s, 2H), 5.16 (m, 2H), 5.29 (s, 1H), 7.20-7.23 (m, 2H), 7.32-7.37 (m, 10H), 7.77 (dd, 2H, J = 2.0 Hz, J = 6.4 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 21.7, 67.5, 69.4, 73.8, 74.1, 74.8, 121.3, 128.1, 128.7, 128.8, 129.2, 130.1, 132.4, 135.3, 135.9, 145.4, 156.6, 169.4

121 : (R)-5-((S)-2-azido-1-hydroxyethyl)-3,4-bis(benzyloxy)furan-2(5H)-one**formule :** C₂₀H₁₉N₃O₅**M =** 381,38 g.mol⁻¹**aspect :** solide blanc

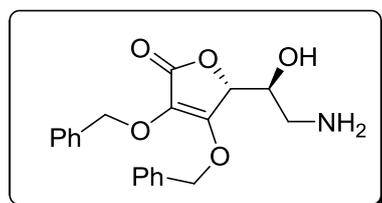
Le composé **119** (250 mg, 0.49 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF et NaN₃ (191 mg, 2.9 mmol, 6 éq.) est ajouté. Le milieu est chauffé pendant 5 h à 50°C. Après évaporation du solvant, le brut est repris dans EtOAc et lavé avec HCl 1M puis à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Rendement : 183 mg, 0.48 mmol, 98 %

Rf : 0.75 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.41-3.58 (m, 2H), 3.96 (sl, 1H), 4.66 (d, 1H, J = 2.8 Hz), 5.07-5.23 (m, 4H), 7.21-7.24 (m, 2H), 7.34-7.39 (m, 8H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 52.9, 69.1, 73.8, 74.0, 75.7, 121.3, 128.0, 128.8, 128.9, 129.3, 135.3, 135.9 ; 156.9, 169.4

122 : (R)-5-((S)-2-amino-1-hydroxyethyl)-3,4-bis(benzyloxy)furan-2(5H)-one



formule : $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_5$

$M = 355,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide blanc

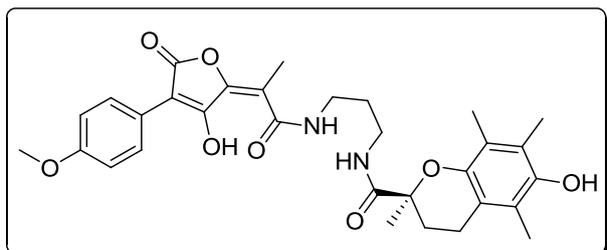
L'azide **121** (1.22 g, 3.2 mmol) est mis en solution dans un mélange eau/THF (50 mL/50 mL) et refroidit à 0°C , puis PPh_3 (1.26 g, 4.8 mmol, 1.5 éq.) est ajouté par portions. Le milieu est agité 5 h à 0°C puis laissé revenir à température ambiante. Après ajout de HCl 1M, la phase aqueuse est lavée avec EtOAc. Les phases organiques sont extraites avec HCl 1M, puis les phases aqueuses combinées sont concentrées sous vide. Le produit est récupéré sous forme du sel de chlorhydrate. Rendement : 990 mg, 2.5 mmol, 79 %

RMN ^1H ($\text{MeOD-}d_4$) : δ = 3.07-3.25 (m, 2H), 4.12-4.16 (m, 1H), 4.84 (sl, 1H), 5.01-5.08 (m, 2H), 5.22-5.29 (m, 2H), 7.27-7.41 (m, 10H)

RMN ^{13}C ($\text{MeOD-}d_4$) : δ = 43.3, 66.6, 74.8, 75.2, 77.9, 122.7, 128.9, 129.6, 129.7, 130.1, 137.0, 137.5, 158.4, 171.3

MS (ESI+) : 356.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

123 : (S,E)-6-hydroxy-N-(3-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamido)propyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxamide



formule : $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$

$M = 564,63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

Une suspension de bis-lactone **71** (77 mg, 0.30 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est refroidie à -35°C , puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 600 μL , 0.60 mmol, 2 éq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C , une solution de **117** (125 mg, 0.33 mmol, 1.1 éq.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 99/1). Rendement : 150 mg, 0.26 mmol, 88 %

Rf : 0.39 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 1.54 (s, 3H) ; 1.56-1.73 (m, 2H) ; 1.88-1.96 (m, 1H) ; 2.09 (s, 3H) ; 2.18 (s, 3H) ; 2.19 (s, 3H) ; 2.28 (s, 3H) ; 2.32-2.38 (m, 1H) ; 2.49-2.70 (m, 2H) ; 3.14-3.41 (m, 4H) ; 3.83 (s, 3H) ; 6.77 (t, 1H, J = 6.8 Hz) ; 6.94 (d, 2H, J = 9.2 Hz) ; 8.10 (d, 2H, J = 9.2 Hz) ; 8.26 (t, 1H, J = 6.0 Hz) ; 16.11 (s, 1H)

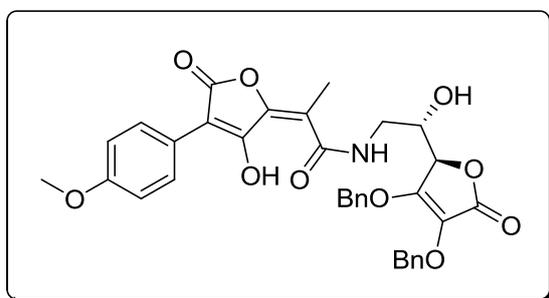
RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 11.5, 12.2, 12.4, 13.7, 20.7, 24.6, 29.3, 29.7, 35.6, 36.1, 55.4, 78.4, 102.5, 112.6, 113.8, 117.9, 119.2, 121.8, 122.1, 122.8, 128.8, 144.2, 145.9, 152.6, 158.9, 161.1, 167.7, 169.0, 176.8

HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_8$: 565.2544
trouvée : 565.2557

IR : ν (cm^{-1}) 460, 515, 557, 582, 620, 648, 697, 729, 792, 834, 859, 908, 962, 1028, 1058, 1087, 1151, 1179, 1249, 1298, 1417, 1441, 1511, 1539, 1557, 1603, 1620, 1651, 1658, 1747, 2930, 3350

Pf : 108.6°C

124 : (E)-N-(2-(3,4-bis(benzyloxy)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyethyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamide



formule : $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{NO}_{10}$

M = 613,61 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide orange

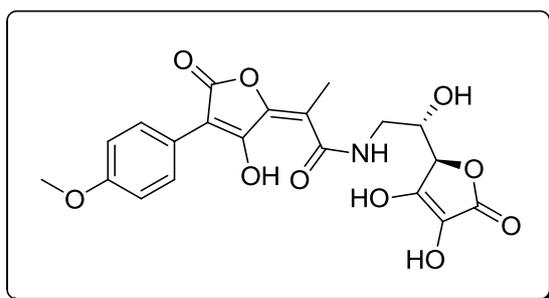
Une suspension de bis-lactone **71** (102 mg, 0.39 mmol) dans du THF anhydre (7 mL) est refroidie à -35°C , puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, 600 μL , 0.60 mmol, 2 éq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C , une solution de **122** (170 mg, 0.4 mmol, 1.1 éq.) et de DIPEA (72 μL , 0.4 mmol, 1.1 éq.) dans 3 mL de THF anhydre est

ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 98/2). Rendement : 200 mg, 0.32 mmol, 83 %

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 2.15 (s, 3H), 3.18 (sl, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.7-3.8 (m, 1H), 4.10-4.12 (m, 1H), 4.67 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 5.02 (m, 2H), 5.16 (m, 2H), 6.91 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.20-7.55 (m, 10H), 8.07 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 15.71 (s, 1H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 13.5, 43.9, 55.3, 68.1, 73.9, 74.3, 77.0, 102.7, 112.2, 113.8, 121.3, 122.4, 127.9, 128.8, 128.9, 129.0, 129.1, 135.1, 135.7, 152.7, 157.6, 159.0, 160.7, 167.6, 169.6, 170.3

125 : (E)-N-(2-(3,4-dihydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyethyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamide



formule : C₂₀H₁₉NO₁₀

M = 433,37 g.mol⁻¹

aspect : solide rouge

Le produit **124** est mis en solution dans un mélange EtOH/DMF (5 mL/5 mL) avec Pd/C (20 mg, 10 % w/w) et mis sous atmosphère d'argon. Après 1h30 à température ambiante il n'y a plus de trace de produit de départ par LCMS, le brut est filtré sur célite puis concentré et purifié par chromatographie flash RP18 (éluant : gradient eau/MeOH 95/5 à 5/95). Rendement : 75 mg, 0.17 mmol, 54 %

Rf : 0.13 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (MeOD-d₄) : δ = 2.20 (s, 3H), 3.56 (dd, 1H, J = 7.6 Hz, J = 13.6 Hz), 3.70 (dd, 1H, J = 5.2 Hz, J = 13.6 Hz), 4.19 (m, 1H), 4.74 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 6.94 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.04 (d, 2H, J = 9.2 Hz)

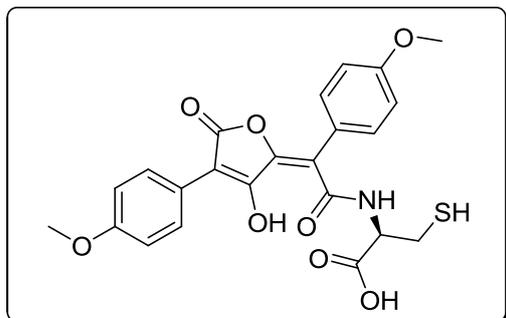
RMN ¹³C (MeOD-d₄) : δ = 13.6, 44.7, 55.7, 67.9, 78.0, 103.1, 114.6, 114.8, 120.1, 123.8, 129.7, 152.8, 154.2, 160.4, 162.1, 169.9, 170.8, 173.2

HRMS (ESI) : calculée pour C₂₀H₂₀NO₁₀ : 434.1082
trouvée : 434.1090

IR : ν (cm⁻¹) 456, 514, 556, 583, 634, 656, 747, 790, 836, 969, 1019, 1110, 1179, 1246, 1306, 1417, 1455, 1486, 1506, 1556, 1603, 1621, 1682, 1746, 2847, 2920, 3306

Pf : 150.7°C

126 : (R,E)-2-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamido)-3-mercaptopropanoic acid



formule : C₂₃H₂₁NO₈S

M = 471,48 g.mol⁻¹

aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DMF, puis la glycine (chlorhydrate monohydrate, 150 mg, 0.86 mmol, 1.5 éq.) et la DIPEA (141 µL, 0.86 mmol, 1.5 éq.) sont ajoutées. Après 2 h à température ambiante, HCl 1M est ajouté et le milieu est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées avec HCl 1M, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Rendement : 196 mg, 0.4 mmol, 73 %

Rf : 0.26 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 2.86-3.08 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.63 (td, 1H, *J* = 4.0 Hz, *J* = 7.5 Hz), 7.01 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.43 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.94 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.14 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz)

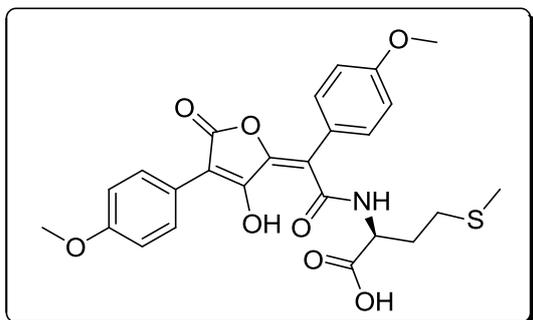
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 24.6, 55.1, 55.2, 55.6, 113.9, 114.1, 117.4, 122.0, 123.6, 128.3, 131.7, 150.0, 158.5, 159.7, 166.9, 168.3, 170.3

HRMS (ESI) : calculée pour C₂₃H₂₈NO₈S : 472.10606
trouvée : 472.10762

IR : ν (cm⁻¹) 521, 542, 582, 612, 633, 649, 703, 748, 761, 795, 835, 911, 953, 1022, 1129, 1161, 1178, 1247, 1298, 1355, 1417, 1455, 1486, 1506, 1538, 1595, 1660, 1716, 1744, 2570, 2839, 2936, 3365

Pf : 138.5°C

127 : (S,E)-2-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamido)-4-(methylthio)butanoic acid



formule : $C_{25}H_{25}NO_8S$

M = 499,53 g.mol⁻¹

aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DMF, puis la méthionine (128 mg, 0.86 mmol, 1.5 éq.) est ajoutée. Après 2 h à température ambiante, HCl 1M est ajouté et le milieu est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées avec HCl 1M, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Rendement : 265 mg, 0.53 mmol, 93 %

Rf : 0.26 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 2.00-2.09 (m, 5H), 2.40-2.53 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.55-4.60 (m, 1H), 7.02 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.06 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.40 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.93 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.37 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 14.5, 29.3, 29.9, 52.5, 55.1, 55.2, 101.4, 113.9, 114.1, 117.6, 122.0, 123.7, 128.3, 131.7, 149.6, 158.5, 159.6, 161.2, 166.9, 168.4, 171.8

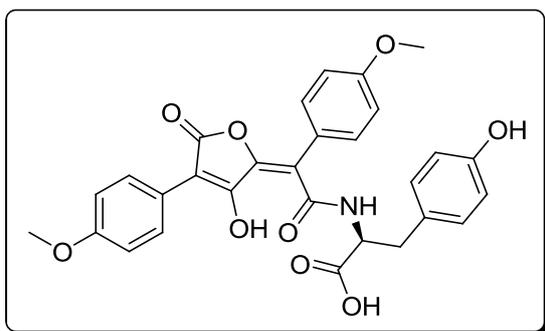
HRMS (ESI) : calculée pour $C_{25}H_{26}NO_8S$: 500.13736

trouvée : 500.13854

IR : ν (cm⁻¹) 524, 543, 581, 633, 650, 699, 750, 765, 793, 832, 914, 955, 1027, 1105, 1177, 1244, 1294, 1354, 1417, 1506, 1538, 1594, 1660, 1747, 2837, 2915

Pf : 85.2°C

128 : (S,E)-2-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamido)-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid



formule : $C_{29}H_{25}NO_9$

M = 531,51 g.mol⁻¹

aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DMF, puis la méthionine (155 mg, 0.86 mmol, 1.5 éq.) est ajoutée. Après 2' h à température ambiante, le milieu est chauffé 5 h à 70°C, HCl 1M est ajouté et le milieu est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées avec HCl 1M, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Rendement : 300 mg, 0.56 mmol, 99 %

Rf : 0.19 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 2.93-3.08 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.63-4.68 (m, 1H), 6.67 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.92 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.99 (m, 4H), 7.12 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.81 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.94 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz)

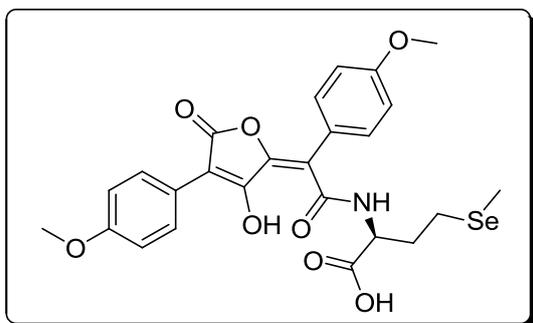
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 34.6, 54.7, 55.1, 55.2, 101.2, 113.9, 114.0, 115.1, 117.2, 122.1, 123.3, 126.7, 128.2, 130.1, 131.6, 150.3, 156.1, 158.4, 159.6, 161.3, 166.8, 168.0, 171.3

HRMS (ESI) : calculée pour C₂₉H₂₆NO₉ : 532.16021
trouvée : 532.16122

IR : ν (cm⁻¹) 453, 525, 581, 632, 699, 751, 765, 796, 832, 915, 962, 1026, 1106, 1176, 1244, 1294, 1357, 1417, 1455, 1510, 1538, 1595, 1660, 1732, 2838, 2935, 3372

Pf : 108°C (décomposition)

129 : (S,E)-2-(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamido)-4-(methylselanyl)butanoic acid



formule : C₂₅H₂₅NO₈Se
M = 546,43 g.mol⁻¹
aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DMF, puis la sélénométhionine (134 mg, 0.68 mmol, 1.2 éq.) est ajoutée. Après 24 h à température ambiante, HCl 1M est ajouté et le milieu est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées avec HCl 1M, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Rendement : 288 mg, 0.5 mmol, 92 %

Rf : 0.26 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1.94 (s, 3H), 2.1 (m, 2H), 2.42-2.57 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.54-4.59 (m, 1H), 7.01 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.06 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.41 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.93 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.38 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 3.5, 20.9, 30.4, 53.3, 55.1, 55.2, 101.2, 113.8, 114.1, 117.5, 122.1, 123.8, 128.3, 131.7, 149.4, 158.4, 159.6, 167.0, 168.4, 171.7$

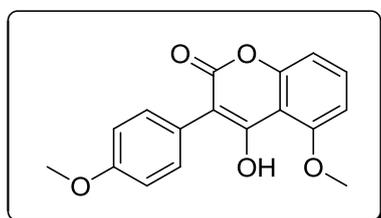
HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{NO}_8\text{Se}$: 546.08323

trouvée : 546.08416

IR : ν (cm^{-1}) 456, 524, 543, 581, 632, 650, 698, 749, 765, 795, 832, 910, 956, 1027, 1105, 1177, 1244, 1295, 1354, 1417, 1486, 1506, 1538, 1594, 1660, 1747, 2837, 2929

Pf : 93.3°C

130 : 4-hydroxy-5-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



formule : $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$

M = 298,29 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide blanc

L'ester **139** (1 g, 3 mmol) est mis en solution dans 20 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 145 mg, 3.6 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidi à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 175 mg, 0.6 mmol, 19 %

Rf : 0.91 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : $\delta = 3.78$ (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 6.96 (m, 4H), 7.38 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.55 (t, 1H, $J = 8.6$ Hz)

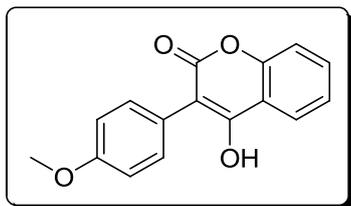
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 55.0, 57.0, 104.3, 104.4, 106.4, 109.6, 113.0, 123.8, 131.9, 132.6, 153.0, 156.3, 158.3, 160.6, 161.4$

HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5$: 299.0914

trouvée : 299.09062

IR : ν (cm^{-1}) 421, 459, 498, 530, 545, 574, 609, 625, 696, 720, 765, 778, 798, 829, 850, 866, 897, 931, 950, 1030, 1064, 1075, 1112, 1144, 1176, 1221, 1243, 1272, 1308, 1423, 1434, 1442, 1454, 1476, 1512, 1587, 1610, 1727, 1744, 2839, 2914, 2936, 2954, 2978, 2993, 3034, 3104, 3256

Pf : 98.1°C

131 : 4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one

formule : $C_{16}H_{12}O_4$

M = 268,26 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

L'ester **137** (500 mg, 1.7 mmol) est mis en solution dans 10 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 100 mg, 2.5 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidi à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 80 mg, 0.3 mmol, 17 %

Rf : 0.66 (DCM/MeOH 95/5)

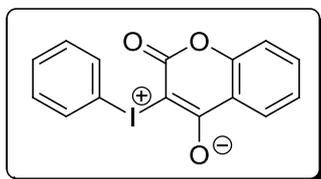
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.80 (s, 3H), 6.99 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.36-7.41 (m, 2H), 7.64 (td, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.3 Hz), 7.98 (dd, 1H, J = 1.5 Hz, J = 7.9 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 55.1, 105.8, 113.5, 116.1, 116.4, 123.6, 123.8, 123.9, 132.1, 132.2, 152.2, 158.7, 159.9, 162.1

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{16}H_{13}O_4$: 269.08084
trouvée : 269.08181

IR : ν (cm⁻¹) 463, 480, 525, 542, 631, 640, 660, 677, 724, 752, 788, 821, 862, 898, 940, 953, 992, 1013, 1033, 1100, 1126, 1156, 1181, 1225, 1252, 1291, 1306, 1320, 1333, 1411, 1435, 1453, 1493, 1510, 1557, 1564, 1595, 1667, 2829, 2929, 2958, 2985, 3035

Pf : 240.5°C

132 : 2-oxo-3-(phenyliodonio)-2H-chromen-4-olate

formule : $C_{15}H_9IO_3$

M = 364,13 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

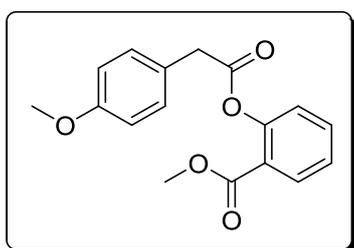
Le diacétoxyiodobenzène (3.97 g, 12.3 mmol, 1 éq.) et Na₂CO₃ (1.3 g, 12.3 mmol, 1 éq.) sont mis en solution dans 125 mL d'eau, puis le milieu est agité pendant 30 minutes à température ambiante. Une solution de 4-hydroxycoumarine (2 g, 12.3 mmol) et de Na₂CO₃ (1.3 g, 12.3 mmol, 1 éq.) est ajoutée et le milieu est agité pendant 2 h à température ambiante. Le Solide blanc est récupéré par filtration, lavage à l'eau et séchage. Rendement : 3.7 g, 10.2 mmol, 83 %

RMN ^1H (DMSO- d_6) : $\delta = 7.23\text{-}7.29$ (m, 2H), 7.4067.45 (m, 2H), 7.52 (td, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 7.57 (td, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 7.86 (dd, 2H, $J = 0.8$ Hz, $J = 9.6$ Hz), 7.90 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.6$ Hz)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 82.0, 115.0, 116.2, 119.8, 123.4, 125.7, 130.7, 131.1, 132.8, 133.1, 153.9, 160.9, 172.5$

MS (ES $^+$) : 364.9 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

137 : methyl 2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate



formule : $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$
M = $300,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

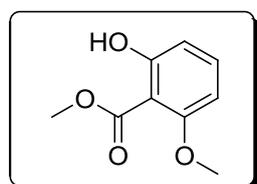
Le salicylate de méthyle (2 mL, 15.5 mmol) et l'acide 4-méthoxyphénylacétique (3.1 g, 18.6 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 300 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/v), et le milieu est refroidi à 0°C . La DIC (12.2 mL, 77.5 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO_3 , la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 2.8 g, 9.3 mmol, 62 %

Rf : 0.57 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 3.79$ (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.90 (s, 2H), 6.91 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.06 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.32 (m, 3H), 7.53 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 8.01 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 40.3, 52.2, 55.4, 114.1, 123.4, 123.8, 125.5, 126.1, 130.7, 131.8, 133.9, 150.7, 158.9$

138 : methyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate

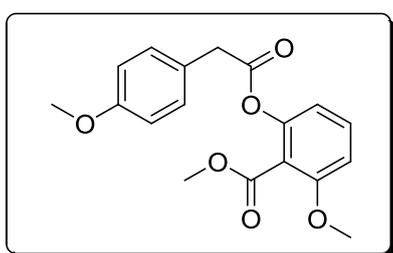


formule : $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$
M = $182,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : huile incolore

L'acide 6-méthoxysalicylique (8 g, 47 mmol) est mis en solution dans 250 mL de THF puis DBU (7.1 mL, 47 mmol, 1 éq.) et MeI (2.96 mL, 47 mmol, 1 éq.) sont ajoutés. Le milieu est agité une nuit à température ambiante, puis est filtré et lavé avec EtOAc. Le filtrat est ensuite lavé avec une solution saturée en NaHCO₃, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous vide. Rendement : 6.3 g, 34 mmol, 73 %

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.84 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.40 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.58 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 7.31 (t, 1H, J = 8.4 Hz), 11.47 (s, 1H)

139 : methyl 2-methoxy-6-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate



formule : C₁₈H₁₈O₆
M = 330,33 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

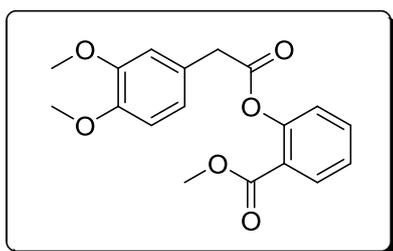
L'ester **138** (6.3 g, 34 mmol) et l'acide 4-méthoxyphénylacétique (6.9 g, 41 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 500 mL de DCM en présence de DMAP (600 mg, 10 % w/w), et le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (27 mL, 173 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 8.2 g, 24 mmol, 72 %

Rf : 0.59 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.70 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.75 (m, 2H), 6.89 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.3 (m, 3H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.3, 52.2, 55.4, 56.0, 114.1, 115.5, 117.4, 117.9, 127.9, 129.0, 130.8, 151.6, 156.8, 159.8, 164.5, 169.9

140 : methyl 2-(2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetoxy)benzoate



formule : C₁₈H₁₈O₆
M = 330,33 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

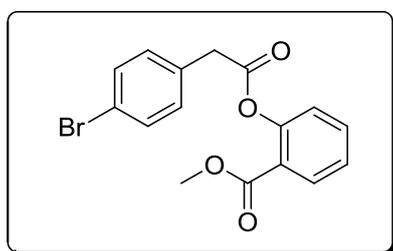
Le salicylate de méthyle (1.1 mL, 8.5 mmol) et l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique (2 g, 10 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 200 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/v), et le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (7.8 mL, 77.5 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 2.1 g, 6.2 mmol, 73 %

Rf : 0.54 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.78 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.88 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 6.85 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.93 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz), 6.97 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.05 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.0 Hz), 7.29 (td, 1H, J = 1.2 Hz, J = 7.6 Hz), 7.52 (td, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz), 7.99 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.7, 42.1, 52.2, 56.0, 111.4, 112.9, 121.9, 123.3, 123.8, 126.0, 126.1, 131.8, 133.9, 148.4, 149.1, 150.7, 165.0, 170.5

141 : méthyl 2-(2-(4-bromophényl)acetoxy)benzoate



formule : C₁₆H₁₃BrO₄

M = 349,18 g.mol⁻¹

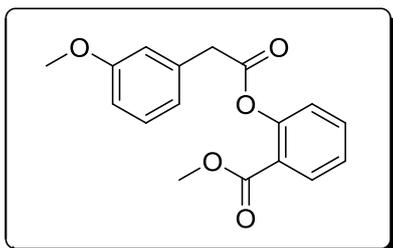
aspect : solide jaune pâle

Le salicylate de méthyle (1 mL, 7.7 mmol) et l'acide 4-bromophénylacétique (2 g, 9.3 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 200 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/v), et le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (7.8 mL, 77.5 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.34 g, 3.8 mmol, 49 %

Rf : 0.54 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.80 (s, 3H), 3.91 (s, 2H), 7.06 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.0 Hz), 7.31 (m, 3H), 7.49 (d, 2H, J = 6.4 Hz), 7.54 (td, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz), 8.01 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.5, 52.2, 121.4, 123.2, 123.7, 126.3, 131.3, 131.5, 131.8, 131.9, 132.5, 134.0, 150.7, 164.9, 169.8

142 : methyl 2-(2-(3-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate

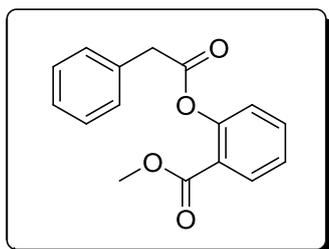
formule : $C_{17}H_{16}O_5$
M = 300,31 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

Le salicylate de méthyle (2 g, 13.1 mmol) et l'acide 3-méthoxyphénylacétique (3.28 g, 19.7 mmol, 1.5 éq.) sont mis en solution dans 150 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/v), et le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (10.2 mL, 66 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 3.8 g, 12.7 mmol, 97 %

Rf : 0.56 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.81 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.95 (s, 2H), 6.86-6.89 (m, 1H), 7.01-7.03 (m, 2H), 7.09 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.0 Hz), 7.28-7.35 (m, 2H), 7.56 (td, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz), 8.03 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 41.3, 52.2, 55.4, 113.1, 115.5, 122.1, 123.4, 123.8, 126.2, 129.7, 131.9, 133.9, 134.9, 150.7, 159.9, 165.1, 170.2

143 : methyl 2-(2-phenylacetoxy)benzoate

formule : $C_{16}H_{14}O_4$
M = 270,28 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

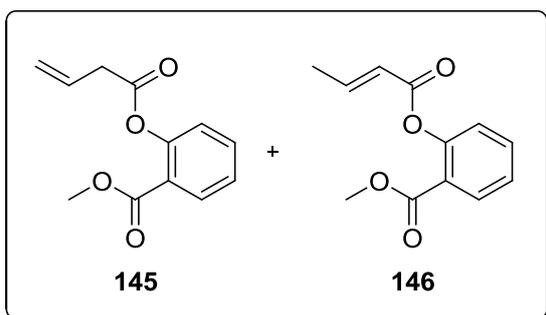
Le salicylate de méthyle (2 g, 13.1 mmol) et l'acide phénylacétique (2.68 g, 19.7 mmol, 1.5 éq.) sont mis en solution dans 150 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/w), et le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (10.2 mL, 66 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.3 g, 4.9 mmol, 38 %

Rf : 0.59 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.77 (s, 3H), 3.96 (s, 2H), 7.06 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.0 Hz), 7.28-7.44 (m, 6H), 7.53 (td, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz), 8.01 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 41.3, 52.2, 123.4, 123.8, 126.2, 127.4, 128.7, 129.7, 131.9, 133.5, 133.9, 150.7, 165.1, 170.3

145 : methyl 2-(but-3-enyloxy)benzoate



formule : $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$
M = 220,22 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

Le salicylate de méthyle (2 mL, 15.5 mmol) et l'acide 3-buténoïque (1.6 mL, 18.6 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 250 mL de DCM en présence de DMAP (250 mg, 10 % w/v), et le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (12.1 mL, 77.5 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO_3 , la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20)

- **produit 145** : **Rf** : 0.57 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

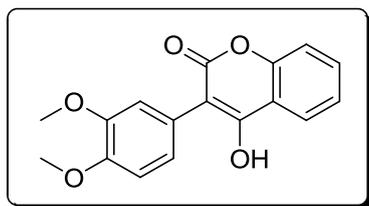
RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.42 (td, 2H, J = 1.6 Hz, J = 7.2 Hz), 3.86 (s, 3H), 5.25-5.32 (qd, 1H, J = 1.5 Hz, J = 27.4 Hz), 5.27 (q, 1H, J = 1.5 Hz), 6.04 (m, 1H), 7.10 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.0 Hz), 7.31 (td, 1H, J = 1.2 Hz, J = 7.6 Hz), 7.54 (td, 1H, J = 2.0 Hz, J = 7.6 Hz), 8.02 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 8.0 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 39.1, 52.3, 119.2, 123.4, 123.9, 126.2, 129.9, 131.9, 134.0, 150.7, 165.0, 170.2

- **produit 146** : **Rf** : 0.50 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 2.07 (dd, 3H, J = 1.6 Hz, J = 7.2 Hz), 3.92 (s, 3H), 6.20 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 15.6 Hz), 7.20-7.41 (m, 3H), 7.64 (td, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz), 8.10 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 8.0 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 18.4, 52.3, 122.0, 123.6, 124.0, 126.0, 131.8, 133.8, 147.3, 150.7, 164.9, 165.2

147 : 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one

formule : $C_{17}H_{14}O_5$

M = 298,29 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

L'ester **140** (2 g, 6 mmol) est mis en solution dans 40 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 291 mg, 7.3 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidi à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 536 mg, 1.8 mmol, 30 %

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95/5)

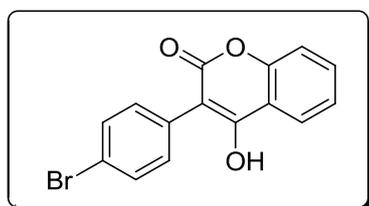
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.75 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 6.93 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.4 Hz), 6.98 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.02 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.35-7.41 (m, 2H), 7.64 (td, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 6.8 Hz), 7.97 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, *J* = 8.0 Hz), 11.15 (sl, 1H)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 55.4, 55.5, 105.9, 111.6, 114.8, 116.1, 116.4, 123.5, 123.6, 123.9, 124.0, 132.1, 148.3, 148.4, 152.2, 159.9, 161.9

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{17}H_{15}O_5$: 299.0914
trouvée : 299.0939

IR : ν (cm⁻¹) 451, 464, 555, 606, 643, 669, 676, 745, 759, 768, 788, 799, 815, 847, 880, 897, 915, 987, 1025, 1099, 1116, 1138, 1153, 1169, 1215, 1244, 1311, 1332, 1409, 1423, 1455, 1495, 1509, 1573, 1586, 1607, 1618, 1690, 2833, 2929, 2962, 2999, 3334

Pf : 251.7°C

148 : 3-(4-bromophenyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one

formule : $C_{15}H_9BrO_3$

M = 317,13 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune pâle

L'ester **141** (1.34 g, 3.8 mmol) est mis en solution dans 35 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 184 mg, 4.6 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidi à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées

sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 80 mg, 0.25 mmol, 7 %

Rf : 0.51 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : $\delta = 7.36\text{-}7.47$ (m, 4H), 7.60-7.69 (m, 3H), 8.01 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz)

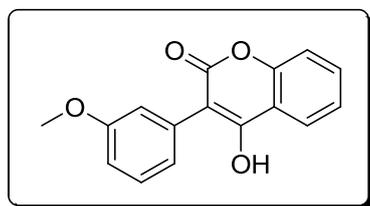
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 104.9, 116.2, 116.3, 120.7, 123.7, 123.9, 130.9, 131.4, 132.4, 133.2, 152.3, 160.5, 161.6$

HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrO}_3$: 316.9808
trouvée : 316.9820

IR : ν (cm^{-1}) 466, 507, 529, 536, 580, 627, 654, 664, 676, 692, 716, 730, 749, 757, 798, 815, 856, 897, 955, 993, 1010, 1030, 1065, 1098, 1129, 1153, 1187, 1226, 1254, 1295, 1319, 1390, 1428, 1455, 1485, 1494, 1557, 1603, 1661, 3062

Pf : 250°C (décomposition)

149 : 4-hydroxy-3-(3-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



formule : $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$
M = 268,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

L'ester **142** (3.8 g, 12.6 mmol) est mis en solution dans 100 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 760 mg, 19.0 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 176 mg, 0.6 mmol, 5 %

Rf : 0.63 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : $\delta = 3.77$ (s, 3H), 6.92-6.97 (m, 3H), 7.32-7.42 (m, 3H), 7.66 (td, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 7.6$ Hz), 8.00 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 55.0, 106.0, 113.2, 116.1, 116.3, 116.6, 123.3, 123.7, 123.9, 129.0, 132.3, 133.1, 152.3, 158.9, 160.1, 161.7$

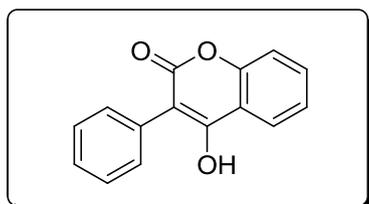
HRMS (ESI) : calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_4$: 269.08084
trouvée : 269.08242

IR : ν (cm^{-1}) 413, 448, 476, 538, 558, 592, 637, 661, 682, 698, 754, 777, 794, 865, 898, 909,

951, 996, 1014, 1034, 1105, 1129, 1155, 1129, 1155, 1219, 1264, 1281, 1329, 1380, 1430, 1448, 1465, 1493, 1565, 1600, 1629, 1656, 2838, 2946, 2984, 3001, 3076

Pf : 178.6°C

150 : 4-hydroxy-3-phenyl-2H-chromen-2-one



formule : $C_{15}H_{10}O_3$
M = 238,24 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

L'ester **143** (1.3 g, 4.9 mmol) est mis en solution dans 50 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 296 mg, 7.4 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 130 mg, 0.5 mmol, 11 %

Rf : 0.57 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 7.33-7.45 (m, 7H), 7.66 (td, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz), 8.01 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 8.0 Hz)

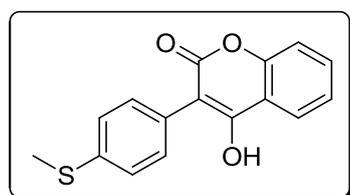
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 106.1, 116.2, 116.4, 123.7, 123.9, 127.4, 127.9, 130.9, 132.0, 132.3, 152.3, 160.1, 161.8

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{15}H_{11}O_3$: 239.07027
trouvée : 239.07096

IR : ν (cm⁻¹) 462, 505, 527, 541, 554, 617, 654, 675, 690, 700, 741, 755, 853, 895, 975, 990, 1002, 1076, 1101, 1127, 1146, 1163, 1190, 1228, 1257, 1312, 1424, 1445, 1494, 1566, 1598, 1608, 1618, 1669, 3057

Pf : 234.6°C

155 : 4-hydroxy-3-(4-(methylthio)phenyl)-2H-chromen-2-one



formule : $C_{16}H_{12}O_3S$
M = 284,33 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

L'acide 4-(méthylthio)phénylboronique (304 mg, 1.81 mmol, 2.2 éq.) et une solution aqueuse de LiOH (0.66 M, 3.75 mL) sont introduits dans 15 mL de DME puis cette solution est dégazée et mise sous argon. **136** (300 mg, 0.82 mmol), P(*t*Bu)₃ (40.6 µL, 0.16 mmol, 20 % mol.) et Pd(OAc)₂ (9.2 mg, 0.04 mmol, 5 % mol) sont ensuite ajoutés et le milieu est agité une nuit à température ambiante. Une solution de HCl 1M est ensuite ajoutée puis le milieu est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 70/30). Rendement : 82 mg, 0.29 mmol, 35 %

Rf : 0.60 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 2.51 (s, 3H), 7.30-7.41 (m, 6H), 7.65 (td, 1H, *J* = 1.6 Hz, *J* = 7.2 Hz), 7.99 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, *J* = 8.0 Hz)

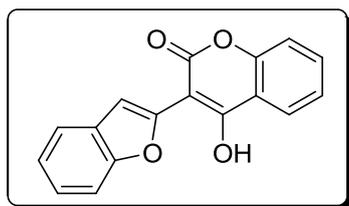
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 14.6, 105.5, 116.2, 116.4, 123.7, 123.9, 125.4, 128.4, 131.5, 132.3, 137.3, 152.2, 160.2, 161.9

HRMS (ES) : calculée pour C₁₆H₁₃O₃S : 285.0580
trouvée : 285.0596

IR : ν (cm⁻¹) 407, 442, 466, 510, 530, 543, 592, 630, 655, 677, 692, 719, 750, 810, 856, 898, 950, 972, 992, 1031, 1088, 1102, 1131, 1151, 1189, 1230, 1257, 1297, 1317, 1394, 1434, 1455, 1494, 1539, 1564, 1606, 1666, 2914, 2980, 3055

Pf : 228.4°C

156 : 3-(benzofuran-2-yl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one



formule : C₁₇H₁₀O₄

M = 278,26 g.mol⁻¹

aspect : solide vert pâle

L'acide benzofuran-2-ylboronique (293 mg, 1.81 mmol, 2.2 éq.) et une solution aqueuse de LiOH (0.66 M, 3.75 mL) sont introduits dans 15 mL de DME puis cette solution est dégazée et mise sous argon. **136** (300 mg, 0.82 mmol), P(*t*Bu)₃ (40.6 µL, 0.16 mmol, 20 % mol.) et Pd(OAc)₂ (9.2 mg, 0.04 mmol, 5 % mol) sont ensuite ajoutés et le milieu est agité une nuit à température ambiante. Une solution de HCl 1M est ensuite ajoutée puis le milieu est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 70/30). Rendement : 107 mg, 0.38 mmol, 47 %

Rf : 0.63 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 7.24 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz), 7.27 (td, 1H, *J* = 0.8 Hz, *J* = 7.6 Hz), 7.33

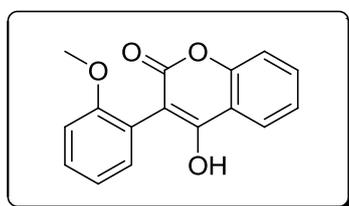
(td, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 7.41-7.45 (m, 2H), 7.61 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.67-7.73 (m, 2H), 8.05 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 96.4, 107.8, 111.2, 116.1, 116.4, 121.0, 122.9, 124.1, 124.2, 124.3, 128.3, 133.2, 148.5, 152.4, 153.8, 160.0, 162.5$

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_4$: 279.0652
trouvée : 279.0663

Pf : 222.2°C

157 : 4-hydroxy-3-(2-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



formule : $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$
M = 268,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

L'acide 2-méthoxyphénylboronique (275 mg, 1.81 mmol, 2.2 éq.) et une solution aqueuse de LiOH (0.66 M, 3.75 mL) sont introduits dans 15 mL de DME puis cette solution est dégazée et mise sous argon. **136** (300 mg, 0.82 mmol), $\text{P}(t\text{Bu})_3$ (40.6 μL , 0.16 mmol, 20 % mol.) et $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (9.2 mg, 0.04 mmol, 5 % mol) sont ensuite ajoutés et le milieu est agité une nuit à température ambiante. Une solution de HCl 1M est ensuite ajoutée puis le milieu est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 70/30). Rendement : 82 mg, 0.3 mmol, 37 %

Rf : 0.63 (DCM/MeOH 95/5)

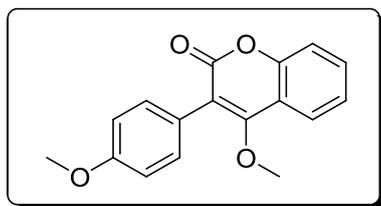
RMN ^1H (DMSO- d_6) : $\delta = 3.72$ (s, 3H), 7.00 (td, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz), 7.08 (dd, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 7.20 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 7.6$ Hz), 7.36-7.41 (m, 3H), 7.65 (td, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 7.94 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : $\delta = 55.3, 102.7, 111.3, 116.1, 116.3, 120.1, 120.3, 123.6, 123.9, 129.6, 132.1, 132.4, 152.4, 157.8, 160.2, 161.5$

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_4$: 269.0808
trouvée : 269.0832

IR : ν (cm^{-1}) 454, 471, 516, 535, 583, 654, 667, 733, 742, 767, 783, 836, 858, 897, 991, 1028, 1049, 1097, 1134, 1149, 1185, 1249, 1314, 1433, 1458, 1493, 1557, 1563, 1603, 1660, 2837, 2930, 2968, 3006, 3069

Pf : 175.6°C

163 : 4-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one

formule : C₁₇H₁₄O₄

M = 282,29 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

La coumarine **131** (200 mg, 0.7 mmol) est portée à reflux dans 10 mL d'acétone en présence de K₂CO₃ (103 mg, 0.7 mmol, 1 éq.) et de MeI (71 µL, 0.7 mmol, 1 éq.) pendant une nuit. Après retour à température ambiante le milieu est filtré sur célite, puis le brut est concentré sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 85/15). Rendement : 154 mg, 0.5 mmol, 78 %

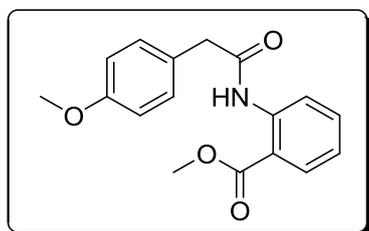
Rf : 0.91 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.58 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.98 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz), 7.29 (td, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.4 Hz), 7.34 (dd, 1H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.0 Hz), 7.40 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.54 (td, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.2 Hz), 7.86 (dd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.0 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 55.4, 61.2, 111.1, 114.0, 116.6, 118.0, 123.9, 124.1, 124.4, 131.9, 132.2, 152.5, 159.7, 162.8, 163.8

IR : ν (cm⁻¹) 424, 445, 476, 530, 542, 627, 638, 669, 680, 725, 758, 787, 827, 862, 889, 943, 956, 973, 985, 1014, 1034, 1093, 1111, 1124, 1146, 1165, 1182, 1198, 1237, 1289, 1305, 1326, 1342, 1416, 1450, 1461, 1484, 1512, 1567, 1606, 1704, 2837, 2847, 2941, 2961, 2991, 3041, 3058, 3072

Pf : 141 °C

164 : methyl 2-(2-(4-methoxyphenyl)acetamido)benzoate

formule : C₁₇H₁₇NO₄

M = 299,32 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

Le chlorure de 4-méthoxyphénylacétyle (4.23 mL, 23.2 mmol, 1.5 éq.) et la pyridine (1.87 mL, 23.2 mL, 1.5 éq.) sont mis en solution dans 100 mL de DCM, puis la solution est refroidie à 0°C. L'antranilate de méthyle (2 mL, 15.4 mmol) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. La solution est hydrolysée par ajout d'une solution saturée en NaHCO₃, puis la phase organique est lavée avec une solution saturée en NaHCO₃ puis à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le

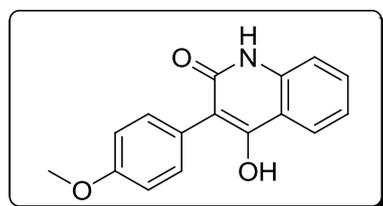
brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 90/10).
Rendement : 3.7 g, 12.4 mmol, 80 %

Rf : 0.61 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.70 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.91 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.05 (td, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.4 Hz), 7.30 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.51 (td, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz), 7.98 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz), 8.70 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.8 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 45.1, 52.4, 55.4, 114.4, 115.3, 120.5, 122.6, 126.7, 130.7, 130.9, 134.6, 141.6, 159.1, 168.6, 170.5

165 : 4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)quinolin-2(1H)-one



formule : $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$
M = 267,28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

L'amide **164** (1 g, 3.3 mmol) est mis en solution dans 40 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 334 mg, 8.2 mmol, 2.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidi à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 200 mg, 0.8 mmol, 22 %

Rf : 0.09 (DCM/MeOH 95/5)

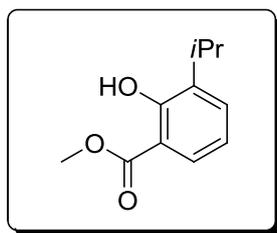
RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) : δ = 3.78 (s, 3H), 6.95 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.15 (td, 1H, J = 0.8 Hz, J = 8.0 Hz), 7.29 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.32 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.48 (td, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.4 Hz), 7.95 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.0 Hz)

RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) : δ = 55.0, 112.0, 113.2, 114.8, 115.8, 121.0, 123.2, 125.5, 130.2, 132.3, 137.9, 157.6, 158.1, 162.9

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_3$: 268.0968
trouvée : 268.0961

IR : ν (cm^{-1}) 472, 524, 538, 633, 650, 666, 675, 724, 757, 789, 799, 820, 863, 1034, 1049, 1103, 1112, 1144, 1169, 1209, 1246, 1288, 1363, 1400, 1415, 1435, 1473, 1500, 1512, 1557, 1589, 1605, 1633, 2828, 2914, 2952, 2996

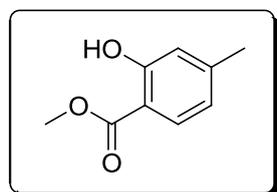
Pf : > 310°C

166 : methyl 2-hydroxy-3-isopropylbenzoate**formule** : $C_{11}H_{14}O_3$ **M** = $194,23 \text{ g.mol}^{-1}$ **aspect** : huile incolore

L'acide 3-isopropylsalicylique (3 g, 16.6 mmol), MeI (1.04 mL, 16.6 mmol, 1 éq.) et la DBU (2.49 mL, 16.6 mmol, 1 éq.) sont mélangés dans 100 mL de THF et agités pendant 24 h à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré, puis le filtrat est dilué avec EtOAc et lavé avec une solution saturée en NaHCO_3 , séchée sur MgSO_4 , filtrée et séchée. Rendement : 3.2 g, 16.6 mmol, 99 %

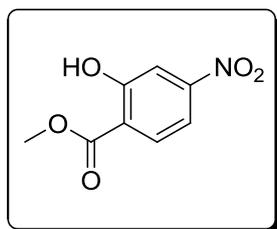
RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 1.14$ (d, 6H, $J = 6.8$ Hz), 3.28 (h, 1H, $J = 6.8$ Hz), 3.84 (s, 3H), 6.74 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.29 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 11.01 (s, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 22.5, 26.7, 52.4, 111.9, 118.8, 127.4, 132.3, 137.0, 159.4, 171.4$

167 : methyl 2-hydroxy-4-methylbenzoate**formule** : $C_9H_{10}O_3$ **M** = $166,17 \text{ g.mol}^{-1}$ **aspect** : huile incolore

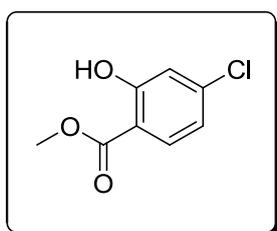
L'acide 4-méthylsalicylique (2 g, 13.1 mmol), MeI (818 μL , 13.1 mmol, 1 éq.) et la DBU (1.96 mL, 13.1 mmol, 1 éq.) sont mélangés dans 65 mL de THF et agités pendant 24 h à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré, puis le filtrat est dilué avec EtOAc et lavé avec une solution saturée en NaHCO_3 , séchée sur MgSO_4 , filtrée et séchée. Rendement : 2.1 g, 13.0 mmol, 99 %

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 2.27$ (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.52 (dd, 1H, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.0$ Hz), 6.72 (sl, 1H), 7.72 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz)

168 : methyl 2-hydroxy-4-nitrobenzoate**formule** : $C_8H_7NO_5$ **M** = 197,14 g.mol⁻¹**aspect** : huile incolore

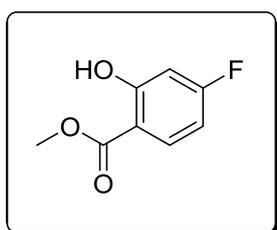
L'acide 4-nitrosalicylique (2 g, 10.9 mmol), Me₂SO₄ (1.04 mL, 10.9 mmol, 1 éq.) et la DBU (1.63 mL, 10.9 mmol, 1 éq.) sont mélangés dans 65 mL de THF et agités pendant 24 h à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré, puis le filtrat est dilué avec EtOAc et lavé avec une solution saturée en NaHCO₃, séchée sur MgSO₄, filtrée et séchée. Rendement : 2.1 g, 10.8 mmol, 99 %

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 4.02 (s, 3H), 7.70 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.8 Hz), 7.81 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 10.97 (s, 1H)

169 : methyl 4-chloro-2-hydroxybenzoate**formule** : $C_8H_7ClO_3$ **M** = 186,59 g.mol⁻¹**aspect** : huile incolore

L'acide 4-chlorosalicylique (3 g, 17.4 mmol), MeI (1.08 mL, 17.4 mmol, 1 éq.) et la DBU (2.6 mL, 17.4 mmol, 1 éq.) sont mélangés dans 100 mL de THF et agités pendant 24 h à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré, puis le filtrat est dilué avec EtOAc et lavé avec une solution saturée en NaHCO₃, séchée sur MgSO₄, filtrée et séchée. Rendement : 3.05 g, 16.3 mmol, 94 %

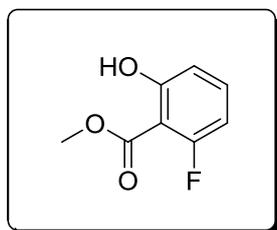
RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.94 (s, 3H), 6.85 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.8 Hz), 6.99 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz)

170 : methyl 4-fluoro-2-hydroxybenzoate**formule** : $C_8H_7FO_3$ **M** = 170,14 g.mol⁻¹**aspect** : huile incolore

L'acide 4-fluorosalicilyque (2 g, 12.8 mmol), Mel (797 μL , 12.8 mmol, 1 éq.) et la DBU (1.91 mL, 12.8 mmol, 1 éq.) sont mélangés dans 70 mL de THF et agités pendant 24 h à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré, puis le filtrat est dilué avec EtOAc et lavé avec une solution saturée en NaHCO_3 , séchée sur MgSO_4 , filtrée et séchée. Rendement : 1.3 g, 7.6 mmol, 60 %

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.93 (s, 3H), 6.58 (td, 1H, J = 2.5 Hz, J = 8.0 Hz), 6.65 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 10.4 Hz), 7.81 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 8.8 Hz), 10.98 (s, 1H)

171 : methyl 2-fluoro-6-hydroxybenzoate



formule : $\text{C}_8\text{H}_7\text{FO}_3$

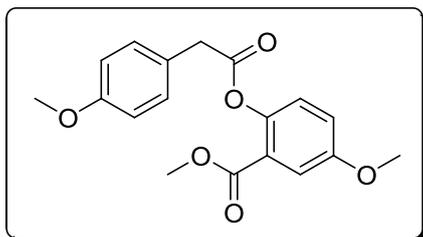
M = 170,14 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : huile incolore

L'acide 6-fluorosalicilyque (1 g, 6.8 mmol), Mel (427 μL , 6.8 mmol, 1 éq.) et la DBU (1.02 mL, 6.8 mmol, 1 éq.) sont mélangés dans 35 mL de THF et agités pendant 24 h à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré, puis le filtrat est dilué avec EtOAc et lavé avec une solution saturée en NaHCO_3 , séchée sur MgSO_4 , filtrée et séchée. Rendement : 517 mg, 3.3 mmol, 48 %

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.99 (s, 3H), 6.58-6.63 (m, 1H), 6.77-6.80 (m, 1H), 7.34-7.40 (m, 1H)

172 : methyl 5-methoxy-2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate



formule : $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$

M = 330,33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide blanc

Le 5-méthoxysalicylate de méthyle (2 mL, 13.4 mmol, 1.2 éq.) et l'acide 4-méthoxyphénylacétique (1.86 g, 11.2 mmol) sont mis en solution dans 200 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/v), et le milieu est refroidi à 0°C . La DIC (10.4 mL, 67 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO_3 , la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 3.85 g, 11.6 mmol,

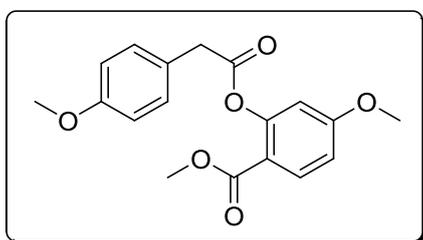
87 %

Rf : 0.56 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.77 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.86 (s, 2H), 6.92 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.96 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.05 (dd, 1H, J = 3.2 Hz, J = 8.8 Hz), 7.32 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.48 (d, 1H, J = 2.8 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 40.3, 52.3, 55.4, 55.9, 114.2, 115.8, 120.0, 123.9, 124.7, 125.7, 130.8, 144.2, 157.2, 159.0, 165.0, 170.9

173 : methyl 4-methoxy-2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate



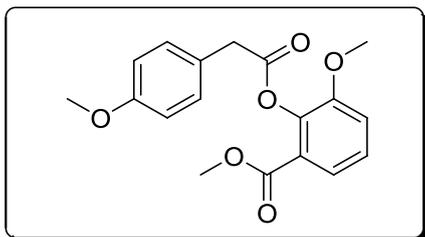
formule : $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$
M = 330,33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

Le 4-méthoxysalicylate de méthyle (1 g, 5.5 mmol) et l'acide 4-méthoxyphénylacétique (1.37 g, 8.2 mmol, 1.5 éq.) sont mis en solution dans 80 mL de DCM en présence de DMAP (100 mg, 10 % w/w), et le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (4.28 mL, 27.4 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO_3 , la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.51 g, 4.6 mmol, 83 %

Rf : 0.57 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.77 (s, 3H), 3.81 (s+s, 6H), 3.90 (s, 2H), 6.55 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 6.80 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 8.8 Hz), 6.90 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.98 (d, 1H, J = 8.8 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 40.3, 51.9, 55.4, 55.8, 109.2, 112.0, 114.1, 115.5, 125.6, 130.8, 133.4, 152.7, 158.9, 164.0, 164.7, 170.5

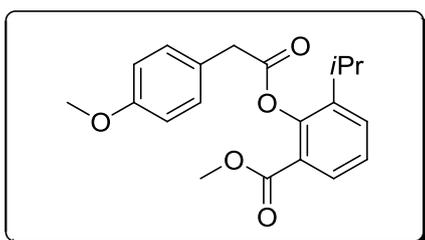
174 : methyl 3-methoxy-2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate**formule** : $C_{18}H_{18}O_6$ **M** = 330,33 $g \cdot mol^{-1}$ **aspect** : solide blanc

Le 3-méthoxysalicylate de méthyle (2 g, 11.0 mmol) et l'acide 4-méthoxyphénylacétique (2.74 g, 16.5 mmol, 1.5 éq.) sont mis en solution dans 150 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/w), et le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (8.55 mL, 55 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de $NaHCO_3$, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 3.6 g, 10.9 mmol, 99 %

Rf : 0.56 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ = 3.75 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.90 (s, 2H), 6.90 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.11 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 8.4 Hz), 7.23 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 7.35 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.53 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 8.0 Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ = 40.0, 52.2, 55.4, 56.4, 114.1, 116.4, 122.8, 124.7, 125.8, 126.3, 130.8, 140.3, 152.2, 158.9, 165.2, 169.9

175 : methyl 3-isopropyl-2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate**formule** : $C_{20}H_{22}O_5$ **M** = 342,39 $g \cdot mol^{-1}$ **aspect** : solide blanc

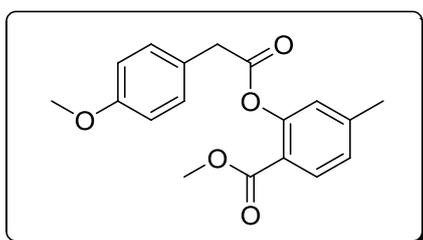
Le produit **166** est mis en solution dans 200 mL de DCM avec l'acide 4-méthoxyphénylacétique (4.1 g, 24.7 mmol, 1.5 éq.) et la DMAP (300 mg, 10 % w/w) puis le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (12.8 mL, 82 mmol, 5 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de $NaHCO_3$, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.03 g, 3 mmol, 18 %

Rf : 0.58 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 1.08 (d, 6H, J = 7.2 Hz), 2.86 (h, 1H, J = 7.2 Hz), 3.8 (s+s, 6H), 3.91 (s, 2H), 6.91 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.25 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 7.34 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.46 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz), 7.83 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 22.9, 27.2, 40.7, 52.2, 55.5, 114.2, 123.2, 125.8, 126.0, 129.3, 130.8, 131.2, 142.3, 148.1, 159.0, 165.5, 170.5

176 : methyl 2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)-4-methylbenzoate



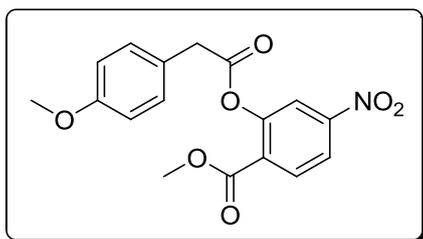
formule : $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$
M = 314,33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

L'ester obtenu (1 g, 6.1 mmol) est ensuite mis en solution dans 100 mL de DCM avec l'acide 4-méthoxyphénylacétique (1.2 g, 7.2 mmol, 1.2 éq.) et la DMAP (300 mg, 10 % w/w) puis le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (4.7 mL, 30 mmol, 5 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO_3 , la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.09 g, 3.5 mmol, 57 %

Rf : 0.56 (cyclohexane/EtOAc, 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 2.37 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.88 (s, 2H), 6.86 (sl, 1H), 6.90 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.09 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.90 (d, 1H, J = 8.0 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 21.4, 40.3, 51.9, 55.3, 114.1, 120.3, 124.2, 125.6, 126.8, 130.7, 131.7, 145.1, 150.7, 158.8, 165.0, 170.6

177 : methyl 2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)-4-nitrobenzoate

formule : C₁₇H₁₅NO₇

M = 345,30 g.mol⁻¹

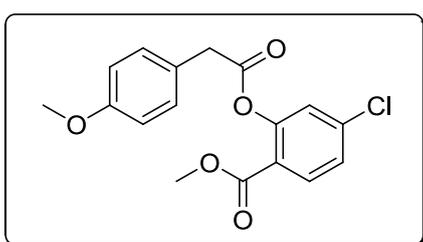
aspect : solide blanc

L'ester **168** est mis en solution dans 150 mL de DCM avec l'acide 4-méthoxyphénylacétique (2.72 g, 16.4 mmol, 1.5 éq.) et la DMAP (200 mg, 10 % w/w) puis le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (8.5 mL, 54 mmol, 5 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.71 g, 4.9 mmol, 45 %

Rf : 0.59 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.81 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.91 (s, 2H), 6.91 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.31 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.94 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 8.14 (m, 2H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.2, 52.9, 55.4, 114.3, 119.6, 120.8, 124.8, 129.2, 130.8, 132.7, 150.6, 151.1, 159.2, 163.6, 170.0

178 : methyl 4-chloro-2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate

formule : C₁₇H₁₅ClO₅

M = 334,75 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

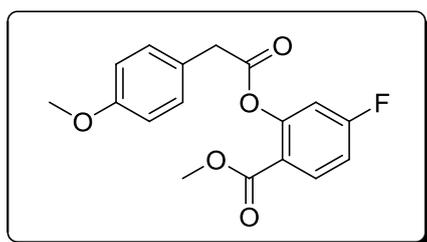
L'ester obtenu est ensuite mis en solution dans 150 mL de DCM avec l'acide 4-méthoxyphénylacétique (3.26 g, 19.6 mmol, 1.2 éq.) et la DMAP (300 mg, 10 % w/w) puis le milieu est refroidit à 0°C. La DIC (12.8 mL, 82 mmol, 5 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.48 g, 4.4 mmol, 27 %

Rf : 0.56 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 3.78$ (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.88 (s, 2H), 6.90 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.08 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.27 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz), 7.31 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz) 7.95 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 40.3, 52.4, 55.4, 114.3, 122.0, 124.5, 125.3, 126.6, 130.8, 132.8, 139.6, 151.4, 159.1, 164.3, 170.3$

179 : methyl 4-fluoro-2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate



formule : $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FO}_5$

M = 318,30 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide blanc

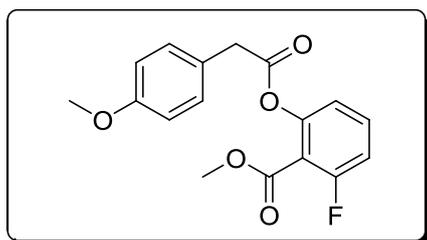
L'ester obtenu est ensuite mis en solution dans 150 mL de DCM avec l'acide 4-méthoxyphénylacétique (1.9 g, 11.5 mmol, 1.5 éq.) et la DMAP (130 mg, 10 % w/w) puis le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (5.9 mL, 38 mmol, 5 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO_3 , la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.66 g, 5.2 mmol, 69 %

Rf : 0.58 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 3.78$ (s, 3H), 3.81 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 6.80 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz), 6.91 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.00 (ddd, 1H, $J = 2.8$ Hz, $J = 7.6$ Hz, $J = 10.4$ Hz), 7.32 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 8.03 (dd, 1H, $J = 6.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 40.2, 52.3, 55.4, 111.8$ (d, $J = 96.4$ Hz), 113.5 (d, $J = 84.4$ Hz), 114.2, 119.8 (d, $J = 14.4$ Hz), 125.2, 130.8, 133.7 (d, $J = 40.8$ Hz), 152.4 (d, $J = 45.2$ Hz), 159.0, 164.2 (d, $J = 10.4$ Hz), 166.7, 170.2

180 : methyl 6-fluoro-2-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)benzoate



formule : $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FO}_5$

M = 318,30 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide blanc

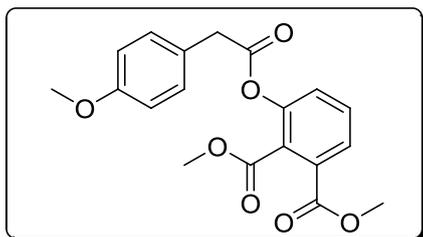
L'ester obtenu est ensuite mis en solution dans 100 mL de DCM avec l'acide 4-méthoxyphénylacétique (606 mg, 3.6 mmol, 1.2 éq.) et la DMAP (50 mg, 10 % w/w) puis le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (2.4 mL, 15 mmol, 5 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 580 mg, 1.8 mmol, 61 %

Rf : 0.59 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.77 (s, 3H), 3.81 (sl, 5H), 6.89-6.92 (m, 3H), 7.02 (td, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.8 Hz), 7.29 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.42 (td, 1H, *J* = 6.0 Hz, *J* = 8.0 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.3, 52.7, 55.4, 114.1 (d, *J* = 22.4 Hz), 114.3, 119.0 (d, *J* = 3.7 Hz), 125.1, 130.7, 132.4 (d, *J* = 10.3 Hz), 150.0 (d, *J* = 4.8 Hz), 159.4 (d, *J* = 53.9 Hz), 162.2, 163.0 (d, *J* = 1.5 Hz), 169.9

181 : dimethyl 3-(2-(4-methoxyphenyl)acetoxy)phthalate



formule : C₁₉H₁₈O₇

M = 358,34 g.mol⁻¹

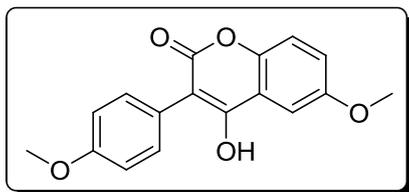
aspect : solide blanc

Le 3-hydroxyphthalate de diméthyle (2.3 g, 10.8 mmol) est mis en solution dans 200 mL de DCM avec l'acide 4-méthoxyphénylacétique (2.16 g, 13.0 mmol, 1.2 éq.) et la DMAP (200 mg, 10 % w/w) puis le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (8.4 mL, 54 mmol, 5 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 3.37 g, 9.4 mmol, 87 %

Rf : 0.54 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.78 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.92 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.50 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.87 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.3, 52.7, 55.4, 114.3, 124.9, 127.2, 127.5, 128.5, 129.7, 130.2, 130.6, 147.9, 159.1, 165.4, 166.3, 169.6

182 : 4-hydroxy-6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one

formule : $C_{17}H_{14}O_5$
M = 298,29 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

L'ester **172** (3.85 g, 11.6 mmol) est mis en solution dans 100 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 700 mg, 17.5 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 1.3 g, 4.4 mmol, 38 %

Rf : 0.57 (DCM/MeOH 95/5)

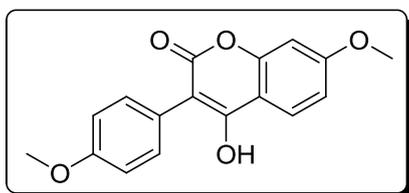
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.80 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.98 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.20 (dd, 1H, J = 2.8 Hz, J = 8.8 Hz), 7.32 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.46 (d, 1H, J = 2.8 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 55.1, 55.7, 105.7, 106.0, 113.5, 116.8, 117.3, 119.6, 124.1, 132.2, 146.5, 155.3, 158.6, 159.7, 162.2

HRMS (ES) : calculée pour $C_{17}H_{15}O_5$: 299.0914
trouvée : 299.0934

IR : ν (cm⁻¹) 458, 479, 519, 537, 554, 575, 620, 651, 670, 716, 762, 799, 815, 827, 861, 885, 951, 1001, 1015, 1033, 1092, 1109, 1124, 1172, 1197, 1244, 1271, 1289, 1305, 1347, 1429, 1462, 1494, 1512, 1556, 1567, 1610, 1661, 2833, 2908, 2933, 2957, 2999, 3031

Pf : 231.1°C

183 : 4-hydroxy-7-methoxy-3-(4-methoxyphényl)-2H-chromen-2-one

formule : $C_{17}H_{14}O_5$
M = 298,29 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

L'ester **173** (1.5 g, 4.6 mmol) est mis en solution dans 50 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 193 mg, 0.6 mmol, 1.5 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther

diéthylique puis filtration. Rendement : 193 mg, 0.6 mmol, 14 %

Rf : 0.77 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 3.79 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.94-6.98 (m, 4H), 7.31 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.89 (d, 1H, J = 9.2 Hz)

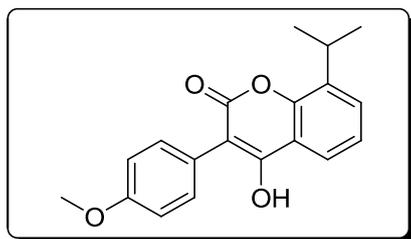
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 55.1, 55.9, 100.3, 103.0, 109.7, 111.7, 113.4, 124.3, 124.8, 132.2, 154.0, 158.3, 158.3, 160.7, 162.4

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5$: 299.0914
trouvée : 299.0932

IR : ν (cm^{-1}) 469, 484, 516, 531, 609, 635, 667, 680, 737, 771, 793, 820, 830, 861, 940, 969, 1001, 1011, 1028, 1042, 1093, 1108, 1131, 1160, 1178, 1193, 1239, 1289, 1303, 1355, 1408, 1427, 1447, 1471, 1506, 1567, 1600, 1614, 1674, 2831, 2901, 2950, 3013, 3047, 3078, 3107

Pf : 220°C (décomposition)

185 : 4-hydroxy-8-isopropyl-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



formule : $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$
M = 310,34 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

L'ester **175** (1.03 g, 3 mmol) est mis en solution dans 20 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 144 mg, 3.6 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 276 mg, 0.88 mmol, 29 %

Rf : 0.77 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 1.27 (d, 6H, J = 6.8 Hz), 3.48 (h, 1H, J = 6.8 Hz), 3.80 (s, 3H), 6.98 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.33 (t, 1H, J = 7.6 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.57 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz), 7.83 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz)

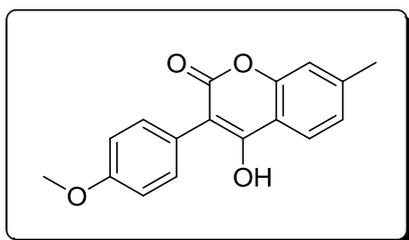
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 22.4, 26.3, 55.1, 105.5, 113.5, 116.2, 121.2, 123.6, 128.8, 132.1, 135.1, 149.4, 158.6, 160.3, 161.9

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_4$: 311.1278
trouvée : 311.1303

IR : ν (cm^{-1}) 436, 466, 488, 515, 531, 567, 614, 646, 673, 723, 746, 764, 775, 794, 811, 831, 865, 891, 936, 1004, 1016, 1032, 1053, 1094, 1129, 1153, 1170, 1181, 1193, 1241, 1289, 1303, 1326, 1366, 1405, 1440, 1455, 1463, 1481, 1511, 1574, 1598, 1668, 2838, 2871, 2936, 2963, 2990, 3050

Pf : 171 °C

186 : 4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-7-methyl-2H-chromen-2-one



formule : $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4$

M = 282,29 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide blanc

L'ester **176** (1.09 g, 3.5 mmol) est mis en solution dans 40 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 166 mg, 4.2 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 230 mg, 0.8 mmol, 23 %

Rf : 0.77 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ = 2.42 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 6.96 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.18 (dd, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.8 Hz), 7.20 (sl, 1H), 7.32 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.86 (d, 1H, J = 8.4 Hz)

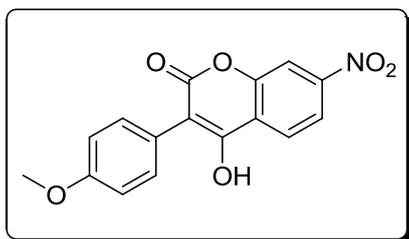
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 21.0, 55.0, 104.5, 113.4, 114.2, 116.1, 123.4, 124.3, 124.8, 132.1, 142.6, 152.3, 158.4, 160.6, 162.3

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_4$: 283.0965

trouvée : 283.0985

IR : ν (cm^{-1}) 451, 472, 513, 527, 541, 582, 609, 634, 661, 689, 720, 744, 772, 792, 819, 861, 941, 955, 993, 1024, 1038, 1103, 1141, 1173, 1183, 1194, 1242, 1259, 1287, 1304, 1338, 1416, 1454, 1469, 1504, 1511, 1557, 1563, 1595, 1668, 2825, 2908, 2958, 3000

Pf : 203 °C

187 : 4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-7-nitro-2H-chromen-2-one

formule : $C_{16}H_{11}NO_6$

M = $313,26 \text{ g.mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

L'ester **177** (1.71 g, 4.9 mmol) est mis en solution dans 50 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 297 mg, 7.4 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 105 mg, 0.33 mmol, 7 %

Rf : 0.26 (DCM/MeOH 95/5)

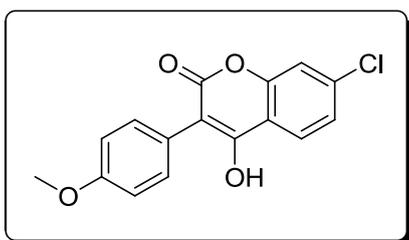
RMN 1H (DMSO- d_6) : δ = 3.80 (s, 3H), 6.99 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.37 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 8.16-8.18 (m, 3H)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 55.1, 107.7, 111.4, 113.5, 118.2, 122.6, 123.7, 125.4, 132.0, 148.7, 151.8, 158.7, 159.3, 161.6

HRMS (ES) : calculée pour $C_{16}H_{12}NO_6$: 314.0659
trouvée : 314.0657

IR : ν (cm^{-1}) 427, 461, 488, 529, 577, 630, 674, 714, 729, 745, 775, 789, 815, 834, 862, 885, 938, 970, 1001, 1013, 1034, 1075, 1103, 1137, 1173, 1187, 1228, 1249, 1289, 1347, 1409, 1429, 1455, 1463, 1510, 1530, 1574, 1610, 1677, 2831, 2901, 2949, 3012, 3093

Pf : 268°C (décomposition)

188 : 7-chloro-4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one

formule : $C_{16}H_{11}ClO_4$

M = $302,71 \text{ g.mol}^{-1}$

aspect : solide jaune pâle

L'ester **178** (1.48 g, 4.4 mmol) est mis en solution dans 30 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 212 mg, 5.3 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est

refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 267 mg, 0.88 mmol, 20 %

Rf : 0.51 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.80 (s, 3H), 6.98 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.42 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.4 Hz), 7.56 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz)

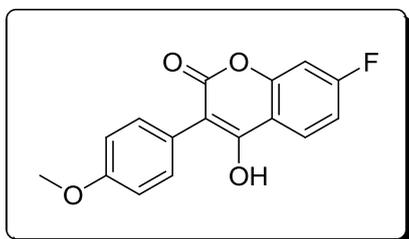
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 55.1, 105.9, 113.6, 115.6, 116.2, 123.6, 124.2, 125.2, 132.1, 136.2, 152.6, 158.7, 159.4, 161.6

HRMS (ES) : calculée pour C₁₆H₁₂ClO₄ : 303.0419
trouvée : 303.0437

IR : ν (cm⁻¹) 435, 459, 528, 579, 588, 631, 647, 691, 732, 769, 819, 857, 925, 946, 967, 995, 1110, 1034, 1074, 1102, 1137, 1172, 1220, 1241, 1289, 1407, 1434, 1454, 1463, 1491, 1506, 1564, 1597, 1673, 2830, 2927, 3000, 3075

Pf : 244.4°C

189 : 7-fluoro-4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



formule : C₁₆H₁₁FO₄
M = 286,25 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

L'ester **179** (1.66 g, 5.2 mmol) est mis en solution dans 50 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 313 mg, 7.8 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 215 mg, 0.75 mmol, 14 %

Rf : 0.43 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.79 (s, 3H), 6.97 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.24 (td, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.8 Hz), 7.32 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.35 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 9.6 Hz), 8.01 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 9.2 Hz)

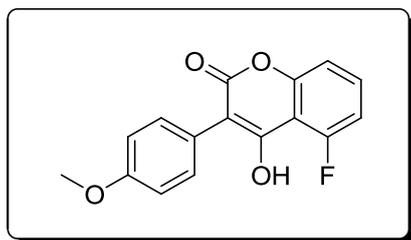
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 54.6, 103.0 (d, *J* = 102 Hz), 111.1 (d, *J* = 89 Hz), 112.9, 113.3, 123.4, 125.4, (d, *J* = 42 Hz), 131.6, 152.8, (d, *J* = 54 Hz), 158.0, 159.6, 161.5, 162.0, 164.5

HRMS (ES) : calculée pour $C_{16}H_{12}FO_4$: 287.0714
trouvée : 287.0732

IR : ν (cm^{-1}) 417, 476, 511, 530, 611, 633, 658, 691, 721, 769, 781, 797, 828, 853, 949, 965, 1003, 1016, 1036, 1095, 1126, 1148, 1181, 1232, 1285, 1305, 1410, 1431, 1453, 1464, 1504, 1564, 1607, 1673, 2831, 2889, 2908, 2927, 2955, 2989

Pf : 246.8°C

190 : 5-fluoro-4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



formule : $C_{16}H_{11}FO_4$

M = 286,25 $g \cdot mol^{-1}$

aspect : solide blanc

L'ester **180** (580 g, 1.8 mmol) est mis en solution dans 15 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 109 mg, 2.7 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 130 mg, 0.45 mmol, 25 %

Rf : 0.63 (DCM/MeOH 95/5)

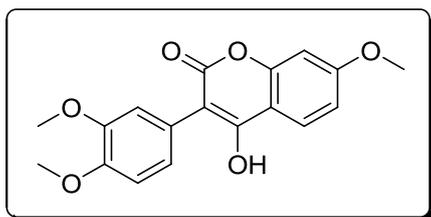
RMN 1H (DMSO- d_6) : δ = 3.79 (s, 3H), 6.98 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.14 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 11.6 Hz), 7.22 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.31 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.60 (td, 1H, J = 6.0 Hz, J = 8.4 Hz)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ = 55.1, 105.8, 107.1, 111.2 (d, J = 21.6 Hz), 112.4 (d, J = 4.5 Hz), 113.6, 123.7, 132.0 (d, J = 23.8 Hz), 132.2, 153.3 (d, J = 4.8 Hz), 157.2, 158.6, 159.8, 161.3

HRMS (ES) : calculée pour $C_{16}H_{12}FO_4$: 287.0714
trouvée : 287.0735

IR : ν (cm^{-1}) 407, 422, 461, 486, 507, 532, 595, 641, 673, 723, 735, 770, 794, 821, 868, 951, 988, 1013, 1036, 1048, 1072, 1107, 1122, 1157, 1181, 1198, 1228, 1277, 1290, 1407, 1438, 1463, 1487, 1510, 1563, 1597, 1670, 2833, 2933, 2968, 2990

Pf : 210°C

192 : 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-7-methoxy-2H-chromen-2-one**formule** : C₁₈H₁₆O₆**M** = 328,32 g.mol⁻¹**aspect** : solide blanc

L'ester **196** (3.82 g, 10.6 mmol) est mis en solution dans 100 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 640 mg, 15.9 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidi à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 731 mg, 2.2 mmol, 21 %

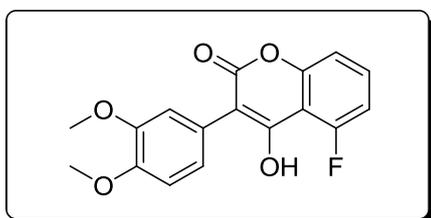
R_f : 0.37 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.74 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.90 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.4 Hz), 6.95-7.01 (m, 4H), 7.87 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 55.4, 55.5, 55.9, 100.3, 103.4, 109.5, 111.6, 111.8, 114.9, 123.6, 124.3, 124.8, 148.2, 154.0, 160.4, 162.2, 162.5

HRMS (ESI) : calculée pour C₁₈H₁₇O₆ : 329.10196
trouvée : 329.10351

IR : ν (cm⁻¹) 466, 522, 539, 564, 604, 634, 664, 702, 756, 769, 807, 827, 848, 872, 916, 929, 957, 1025, 1099, 1142, 1164, 1226, 1246, 1308, 1346, 1381, 1441, 1455, 1470, 1512, 1539, 1557, 1606, 1661, 2839, 2942, 2996, 3075

P_f : 213.6°C**193 : 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluoro-4-hydroxy-2H-chromen-2-one****formule** : C₁₇H₁₃FO₅**M** = 316,28 g.mol⁻¹**aspect** : solide blanc

L'ester **198** (3.12 g, 8.9 mmol) est mis en solution dans 100 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 537 mg, 13.4 mmol, 1.5 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidi à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées

sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 540 mg, 1.7 mmol, 19 %

Rf : 0.43 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.75 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 6.91 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.4 Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.03 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.17 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 12.0 Hz), 7.24 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.62 (td, 1H, *J* = 5.6 Hz, *J* = 8.4 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 55.4, 55.4, 106.4 (d, *J* = 11.3 Hz), 106.7 (d, *J* = 1.5 Hz), 111.5 (d, *J* = 21.8 Hz), 111.8, 112.5 (d, *J* = 3.7 Hz), 114.8, 123.2, 123.7, 132.3 (d, *J* = 11 Hz), 148.5 (d, *J* = 10.9 Hz), 153.2 (d, *J* = 4.3 Hz), 157.1, 159.5 (d, *J* = 3.3 Hz), 159.7, 161.1

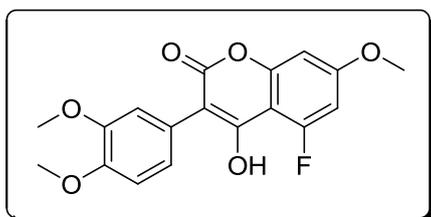
RMN ¹⁹F (DMSO-*d*₆) : -111.3

HRMS (ESI) : calculée pour C₁₇H₁₄FO₅ : 317.08198
trouvée : 317.08335

IR : ν (cm⁻¹) 429, 482, 517, 539, 614, 643, 680, 738, 756, 775, 795, 815, 851, 886, 913, 932, 1004, 1028, 1047, 1072, 1117, 1137, 1158, 1171, 1184, 1196, 1219, 1250, 1285, 1309, 1341, 1404, 1439, 1447, 1464, 1489, 1513, 1558, 1599, 1621, 1668, 2828, 2911, 2938, 2996, 3050, 3078, 3104

Pf : 209.7°C

194 : 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluoro-4-hydroxy-7-methoxy-2H-chromen-2-one



formule : C₁₈H₁₅FO₆
M = 346,31 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

L'ester **205** (1.5 g, 4 mmol) est mis en solution dans 50 mL de THF anhydre, puis NaH (60 %, 238 mg, 6 mmol, 1.5 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 5 h, puis est refroidit à température ambiante, hydrolysée avec HCl 1M. La phase aqueuse est séparée et extraite avec EtOAc, les phases organiques sont combinées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit est obtenu par précipitation du brut dans l'éther diéthylique puis filtration. Rendement : 110 mg, 0.3 mmol, 8 %

Rf : 0.20 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 3.74 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.82-6.89 (m, 3H), 6.92 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.01 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ = 55.4, 55.5, 56.3, 97.4 (d, *J* = 2.9 Hz), 99.6 (d, *J* = 25.7 Hz), 111.8,

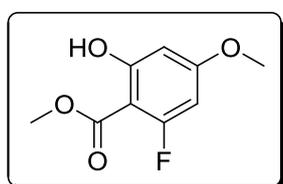
114.9, 123.4, 123.7, 148.5, 154.5 (d, $J = 7.3$ Hz), 158.0, 160.3 (d, $J = 60.9$ Hz), 161.4, 162.2 (d, $J = 14.3$ Hz), 166.0

HRMS (ESI) : calculée pour $C_{18}H_{16}FO_6$: 347.09254
trouvée : 347.0936

IR : ν (cm^{-1}) 431, 444, 478, 505, 524, 539, 618, 666, 727, 739, 761, 778, 813, 824, 855, 873, 909, 954, 990, 1022, 1043, 1072, 1104, 1132, 1149, 1205, 1251, 1314, 1368, 1397, 1414, 1445, 1467, 1515, 1539, 1557, 1598, 1633, 1699, 2847, 2945, 3011, 3083, 3307

Pf : 239°C (décomposition)

195 : methyl 6-fluoro-4-methoxysalicylate



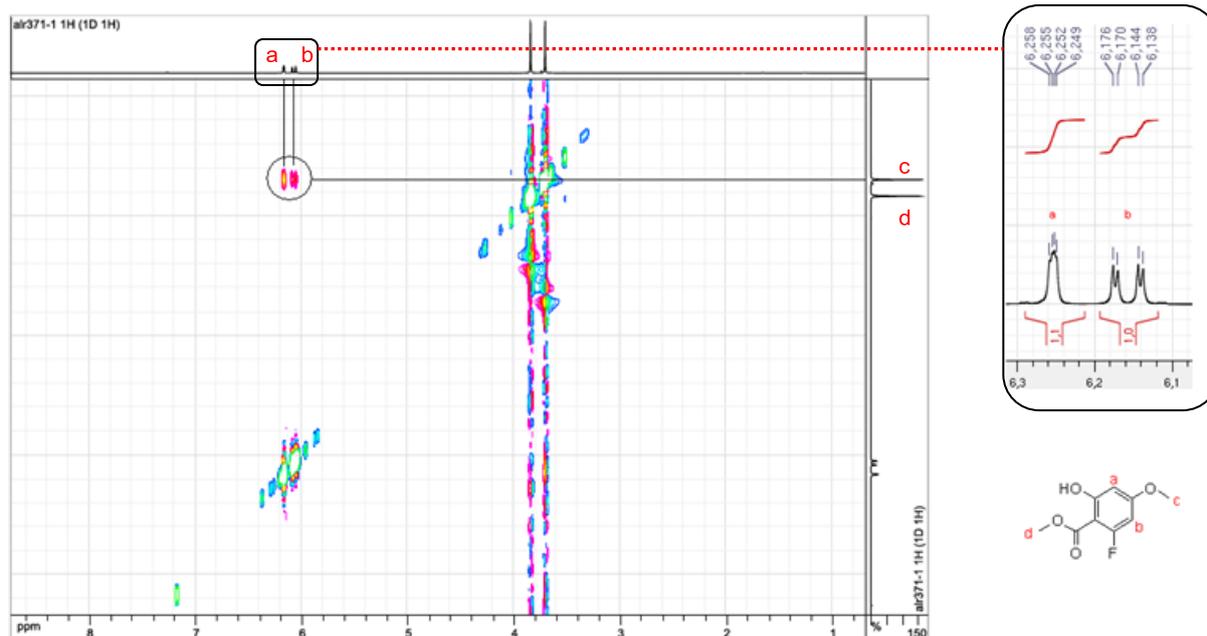
formule : $C_9H_9FO_4$
M = 200,16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : huile incolore

Le composé **203** (148 mg, 0.7 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DCM anhydre puis est refroidit à -78°C . Une solution de BCl_3 (1M, 725 mL, 0.71 mmol, 1.05 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est agité 1h à -78°C . Après retour à température ambiante, la réaction est quenchée avec HCl 1M, puis la phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM). Rendement : 120 mg, 0.6 mL, 87 %

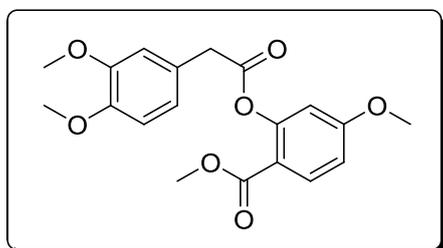
Rf : 0.65 (DCM)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 3.79$ (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.16 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 12.0$ Hz), 6.25 (dd, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 11.6 Hz (s, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 52.4$, 55.8, 95.6 (d, $J = 27$ Hz), 97.3 (d, $J = 3$ Hz), 162.4, 164.7 (d, $J = 6$ Hz), 165.0, 165.4 (d, $J = 16$ Hz), 170.0 (d, $J = 4$ Hz)

RMN NOESY (CDCl₃) :

196 : methyl 2-(2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetoxy)-4-methoxybenzoate



formule : C₁₉H₂₀O₇
M = 360,36 g.mol⁻¹
aspect : solide blanc

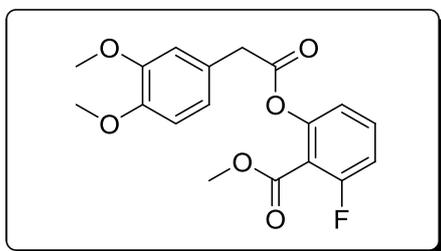
Le 4-méthoxysalicylate de méthyle (3 g, 16.5 mmol) et l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique (3.88 g, 19.8 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 150 mL de DCM en présence de DMAP (300 mg, 10 % w/w), et le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (12.8 mL, 82 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 3.82 g, 10.6 mmol, 64 %

Rf : 0.56 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.77 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.90 (sl, 5H), 6.55 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 6.80 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 8.8 Hz), 6.85 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.94 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz), 6.99 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.98 (d, 1H, J = 8.8 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.8, 51.9, 55.8, 56.0, 109.2, 111.4, 112.0, 113.0, 115.4, 122.0, 126.0,

133.4, 148.4, 149.1, 152.7, 164.1, 164.7, 170.5

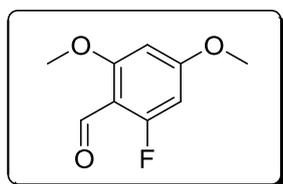
198 : methyl 2-(2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetoxy)-6-fluorobenzoate**formule** : C₁₈H₁₇FO₆**M** = 348,32 g.mol⁻¹**aspect** : solide blanc

Le 6-fluorosalicylate de méthyle (2 g, 12 mmol) et l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique (2.83 g, 14.4 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 100 mL de DCM en présence de DMAP (200 mg, 10 % w/w), et le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (9.4 mL, 60 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 3.12 g, 8.9 mmol, 75 %

Rf : 0.58 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.77 (s, 3H), 3.81 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.85 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.89-6.92 (m, 3H), 7.03 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.42 (td, 1H, *J* = 6.0 Hz, *J* = 8.4 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.5, 52.5, 55.9, 56.0, 111.3-112.7 (d, *J* = 138 Hz), 114.0 (d, *J* = 22.4 Hz), 118.9 (d, *J* = 3.7 Hz), 121.7, 125.4, 132.3 (d, *J* = 10.3 Hz), 148.5-149.1 (d, *J* = 62.7 Hz), 149.8 (d, *J* = 5 Hz), 159.5-162.1 (d, *J* = 256 Hz), 162.9

199 : 2-fluoro-4,6-dimethoxybenzaldehyde**formule** : C₉H₉FO₃**M** = 184,16 g.mol⁻¹**aspect** : huile incolore

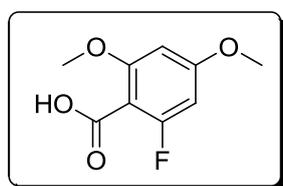
Le 1-fluoro-3,5-diméthoxybenzène (4 g, 26 mmol) est mis en solution dans 8 mL de DMF puis est refroidi à -5°C. Le POCl₃ (2.5 mL, 27 mmol, 1.05 éq.) est ensuite ajouté goutte à goutte, puis le milieu est agité pendant 20 min à 0°C, puis 1h30 à température ambiante. Le milieu est ensuite chauffé pendant 3h à 60°C, puis après retour à température ambiante est ajouté dans de la glace puis neutralisé avec une solution de NaOH 0.5 M. La phase aqueuse est extraite

avec EtOAc, les phases organiques combinées sont lavées avec une solution saturée en NaHCO_3 puis à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est engagé directement dans l'étape suivante sans purification supplémentaire. Rendement : 3.77 g, 20 mmol, 79 %, rapport **199/200** = 82/18

Rf : 0.70 (DCM)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.86 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.23-6.27 (m, 2H), 10.27 (d, 1H, J = 1.6 Hz)

201 : 2-fluoro-4,6-dimethoxybenzoic acid



formule : $\text{C}_9\text{H}_9\text{FO}_4$

M = 200,16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

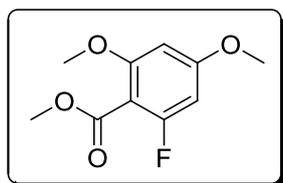
aspect : solide blanc

Le mélange d'aldéhydes **199** et **200** (200 mg, 1.1 mmol) est mis en solution dans un mélange THF/*t*BuOH (10 mL/15 mL), puis une solution de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (225 mg, 1.6 mmol, 1.5 éq.) et NaClO_2 (80 %, 490 mg, 4.3 mmol, 4 éq.) dans 3 mL d'eau est ajoutée goutte à goutte, suivie du 2-méthylbut-2-ène (690 μL , 6.5 mmol, 6 éq.). Le milieu est agité à température ambiante pendant 3 h, puis est concentré. Le résidu est repris dans du DCM, puis est lavé avec une solution de HCl 1M. La phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Rendement : 214 mg, 1.1 mmol, 98 %

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.82 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.28-6.29 (m, 2H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 55.9, 56.8, 94.5 (d, J = 27.1 Hz), 95.1 (d, J = 8.3 Hz), 102.3 (d, J = 13.9 Hz), 160.1 (d, J = 7.7 Hz), 162.7-165.2 (d, J = 256 Hz), 164.0 (d, J = 18 Hz), 170.4

203 : methyl 2-fluoro-4,6-dimethoxybenzoate



formule : $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{FO}_4$

M = 214,19 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : huile incolore

Le mélange d'acide **201** et d'isomère **202** (214 mg, 1.1 mmol) est mis en solution dans 5 mL d'acétone, puis K_2CO_3 (148 mg, 1.1 mmol, 1 éq.) et Me_2SO_4 (101 μL , 1.1 mmol, 1 éq.) sont ajoutés et le milieu est porté à reflux pendant une nuit. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré sur célite, puis le filtrat est concentré. Le brut est purifié par chromatographie

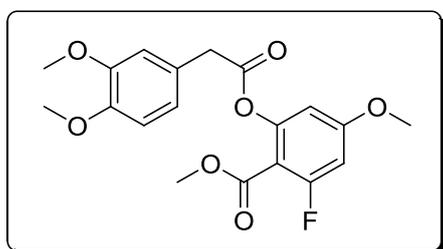
sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 85/15). Rendement : 148 mg, 0.7 mmol, 63 %

Rf : 0.69 (DCM)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.75 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.18-6.22 (m, 2H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 52.3, 55.7, 56.2, 93.4 (d, J = 26.3 Hz), 94.7 (d, J = 2.2 Hz), 104.4 (d, J = 18.2 Hz), 159.5 (d, J = 9.5 Hz), 162.0 (d, J = 248 Hz), 162.9 (d, J = 13.8 Hz), 164.3

205 : methyl 2-(2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetoxy)-6-fluoro-4-methoxybenzoate



formule : $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{FO}_7$

$M = 378,35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide blanc

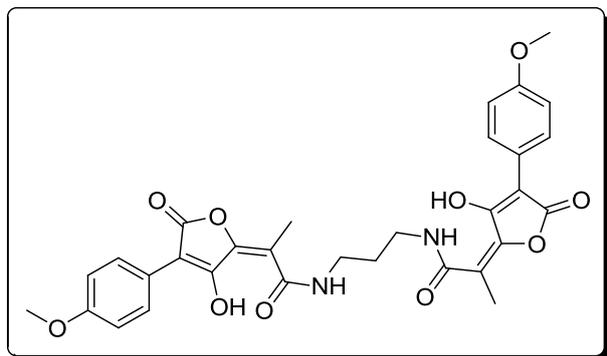
Le composé **367** (1.5 g, 7.5 mmol) et l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique (1.76 g, 9.0 mmol, 1.2 éq.) sont mis en solution dans 75 mL de DCM en présence de DMAP (150 mg, 10 % w/w), et le milieu est refroidi à 0°C. La DIC (5.8 mL, 37 mmol, 5 éq.) est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante et agité une nuit. Après neutralisation avec une solution saturée de NaHCO_3 , la phase aqueuse est extraite au DCM, puis les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 100/0 à 80/20). Rendement : 1.5 g, 4 mmol, 75 %

Rf : 0.57 (cyclohexane/EtOAc 70/30)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.76 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.82 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.42 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, J = 2.4 Hz), 6.55 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 12 Hz), 6.85 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.90 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, J = 8.4 Hz), 6.94 (d, 1H, J = 2.0 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 40.6, 52.3, 56.0, 100.5 (d, J = 27 Hz), 105.6 (d, J = 3.3 Hz), 111.4, 112.9, 121.9, 125.6, 148.7 (d, J = 63 Hz), 151.9 (d, J = 8 Hz), 161.4, 163.1 (d, J = 14 Hz), 164.0, 170.0

207 : (2E,2'E)-N,N'-(propane-1,3-diyl)bis(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)propanamide)



formule : $C_{31}H_{30}N_2O_{10}$

M = $590,58 \text{ g.mol}^{-1}$

aspect : solide jaune

Une suspension de bis-lactone **71** (200 mg, 0.77 mmol) dans du THF anhydre (15 mL) est refroidie à -35°C , puis une solution de TBAF est ajoutée (1 M, $1.55 \mu\text{L}$, 1.55 mmol, 2 éq.), et le milieu est laissé pendant 15 min. Après refroidissement à -78°C , une solution de 1,3-diaminopropane ($33 \mu\text{L}$, 0.39 mmol, 0.5 éq.) dans 5 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte, puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min et est laissé revenir à température ambiante. Après dilution par ajout d'EtOAc, la phase organique est lavée avec une solution de HCl 1M puis à la saumure, séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Le solide qui apparaît pendant la concentration est récupéré par filtration et lavage à l'éther diéthylique. Rendement : 130 mg, 0.22 mmol, 57 %

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ^1H (pyridine- d_5) : δ = 1.97 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 2.20 (s, 6H), 3.56 (t, 4H, J = 6.8 Hz), 3.67 (s, 6H), 7.10 (d, 4H, J = 8.9 Hz), 8.57 (d, 4H, J = 8.9 Hz)

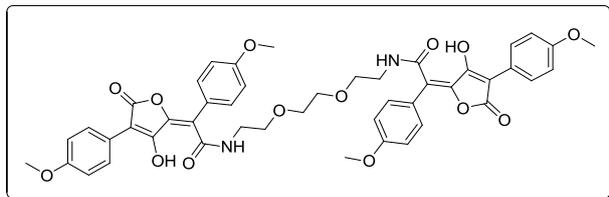
RMN ^{13}C (pyridine- d_5) : δ = 14.4, 29.5, 38.8, 55.6, 101.9, 113.6, 114.7, 124.6, 129.4, 153.1, 159.6, 163.6, 168.3, 170.2

HRMS (ES) : calculée pour $C_{31}H_{31}N_2O_{10}$: 591.19732
trouvée : 591.1991

IR : ν (cm^{-1}) 464, 499, 515, 555, 582, 634, 655, 698, 743, 792, 811, 833, 912, 1027, 1088, 1117, 1151, 1177, 1247, 1295, 1417, 1455, 1485, 1507, 1557, 1602, 1619, 1660, 1739, 2836, 2932, 3340

Pf : 247°C

209 : (2E,2'E)-N,N'-(2,2'-(ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamide)



formule : C₄₆H₄₄N₂O₁₄

M = 848,85 g.mol⁻¹

aspect : solide jaune

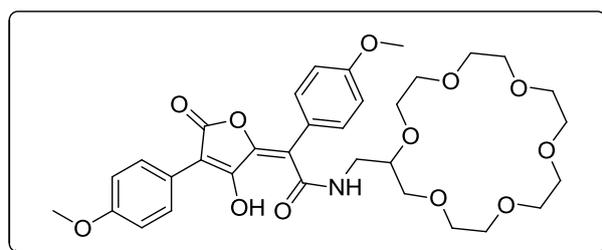
La bis-lactone **101** (200 mg, 0.57 mmol) est suspendue dans 10 mL de DCM, puis le bis-(2-aminoéthyl)éthylèneglycol (40 µL, 0.27 mmol, 0.5 éq.) est ajoutée. Le milieu est agité 1 h à température ambiante, puis est concentré. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 98/2). Rendement : 167 mg, 0.2 mmol, 73 %

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.40 (s, 4H), 3.46 (m, 8H), 3.81 (s, 6H), 3.82 (s, 6H), 6.42 (sl, 2H), 6.93-6.96 (m, 8H), 7.19 (d, 4H, J = 8.8 Hz), 8.11 (d, 4H, J = 8.8 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 40.5, 55.4, 55.5, 68.9, 70.4, 103.4, 113.9, 114.8, 116.7, 122.4, 124.0, 129.1, 131.6, 152.9, 159.2, 160.4, 160.6, 167.2, 169.1

MS (ESI+) : 849.3 ([M+H]⁺)

212 : (E)-N((1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecan-2-yl)méthyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl)acétamide



formule : C₃₃H₄₁NO₁₂

M = 643,68 g.mol⁻¹

aspect : huile orange

La bis-lactone **101** (270 mg, 0.77 mmol) est suspendue dans 15 mL de DCM, puis l'amine **210** (250 mg, 0.85 mmol, 1.1 éq.) est ajoutée. Le milieu est agité 1 h à température ambiante, puis est concentré. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 98/2). Rendement : 463 mg, 0.72 mmol, 93 %

Rf : 0.50 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 3.48-3.72 (m, 25H), 3.82 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.76 (sl, 1H), 6.94 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 6.97 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.22 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 8.12 (d, 2H, J = 8.8 Hz)

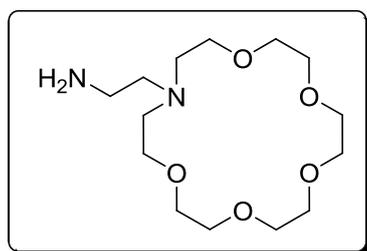
RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 42.4, 55.4, 55.4, 69.5, 70.7-71.0 (m), 72.2, 103.1, 113.9, 114.7, 117.1, 122.6, 124.1, 129.0, 131.6, 152.7, 159.1, 160.3, 160.9, 167.4, 168.9

HRMS (ES) : calculée pour $C_{33}H_{42}NO_{12}$: 644.27015
trouvée : 644.27263

IR : ν (cm^{-1}) 463, 486, 522, 549, 582, 634, 650, 699, 752, 765, 828, 880, 912, 956, 1024, 1110, 1182, 1247, 1292, 1417, 1444, 1463, 1506, 1556, 1601, 1766, 1860, 2863, 2895, 2942, 3373, 3398

Pf : 129.4°C

216 : 2-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)ethanamine



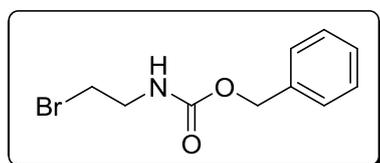
formule : $C_{14}H_{30}N_2O_5$
M = 306,40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : huile incolore

Le composé **219** (400 mg, 0.9 mmol) est mis en solution dans 10 mL de méthanol en présence de Pd/C (40 mg, 10 % w/w) puis est placé sous atmosphère d'hydrogène et agité pendant une nuit. Le milieu est ensuite filtré sur célite, puis le filtrat est concentré. Rendement : 278 mg, 0.9 mmol, quantitatif

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 2.57 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 2.70-2.75 (m, 6H), 3.58-3.68 (m, 22H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 39.9, 54.8, 58.5, 70.2, 70.5, 70.8, 70.9, 71.0

218 : benzyl 2-bromoethylcarbamate



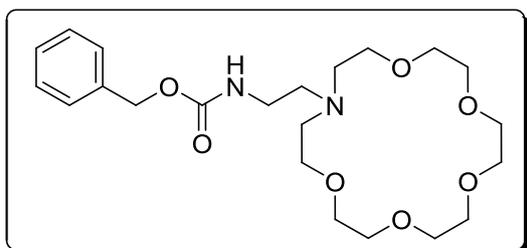
formule : $C_{10}H_{12}BrNO_2$
M = 258,11 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : huile incolore

La 2-bromoéthylamine bromhydrate (2 g, 10 mmol) est mise en solution dans un mélange NaOH 2M/dioxane (10 mL/10 mL) puis la solution est refroidie à 0°C. Le chloroformiate de benzyle (1.4 mL, 10 mmol, 1 éq.) est ensuite ajouté goutte à goutte, puis le milieu est agité pendant 24 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, puis le résidu est repris dans une solution aqueuse de KHSO_4 1M (20 mL), puis est extrait avec EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/EtOAc 90/10). Rendement : 2.1 g, 8.2 mmol, 82 %

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 3.47$ (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.61 (q, 2H, $J = 5.6$ Hz), 5.12 (s, 2H), 5.20 (sl, 1H), 7.32 - 7.37 (m, 5H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 32.6, 42.9, 67.1, 128.3, 128.4, 128.7, 136.4, 156.3$

219 : benzyl 2-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)ethylcarbamate



formule : $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7$

M = $440,53 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : huile incolore

L'éther 1-aza-18,6-couronne (200 mg, 0.7 mmol) est mis en solution dans 5 mL d'acétone en présence de Na_2CO_3 (113 mg, 1.06 mmol, 1.4 éq.) puis est porté à reflux. Le composé **214** (294 mg, 1.1 mmol, 1.5 éq.) dans 5 mL d'acétone est ensuite ajouté goutte à goutte, puis le milieu est laissé à reflux pendant 48 h. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré sur célite puis est concentré. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine neutre (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 97/3). Rendement : 259 mg, 0.6 mmol, 77 %

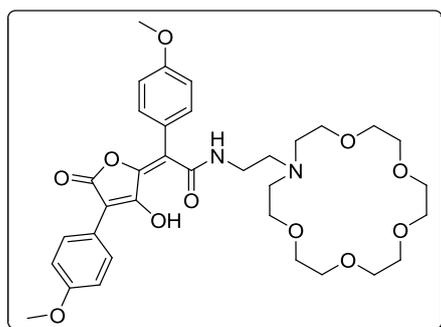
Rf : 0.6 (DCM/MeOH 97/3)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta = 2.63$ - 2.68 (m, 4H), 3.52 - 3.75 (m, 24 H), 5.08 (s, 2H), 7.27 - 7.37 (m, 5H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta = 54.7, 61.6, 66.6, 69.7$ - 69.9 (m), $70.1, 70.2, 70.6, 73.0, 128.1, 128.2, 128.5$)

MS (ESI+) : 441.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

220 : N-(2-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)ethyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamide



formule : $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{11}$

M = $656,72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (270 mg, 0.8 mmol) est mise en suspension dans 10 mL de THF, puis le composé **216** (280 mg, 0.9 mmol, 1.2 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 48 h, puis est laissé revenir à température ambiante et est concentré. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 95/5). Rendement : 335 mg, 0.5 mmol, 64 %

Rf : 0.29 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 3.37 (sl, 4H), 3.59 (sl, 18 H), 3.80-3.86 (m, 12H), 6.96-6.99 (m, 4H), 7.20 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.61 (sl, 1H), 8.12 (d, 2H, J = 8.8 Hz)

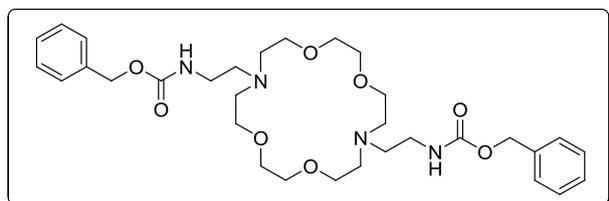
RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 35.3, 48.9, 54.8, 55.4, 64.8, 70.0, 70.1, 70.3, 70.6, 103.5, 113.9, 114.7, 117.2, 122.5, 123.2, 129.1, 131.6, 153.0, 159.2, 160.5, 167.2, 170.1

HRMS (ES) : calculée pour $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_{11}$: 657.30179
trouvée : 657.30233

IR : ν (cm^{-1}) 430, 517, 591, 665, 718, 775, 797, 833, 907, 951, 1028, 1102, 1180, 1242, 1291, 1352, 1414, 1455, 1463, 1509, 1557, 1601, 1651, 1660, 1694, 2873

Pf : 85°C

221 : benzyl 2,2'-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(ethane-2,1-diyl)dicarbamate



formule : $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8$
M = 616,75 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
aspect : solide blanc

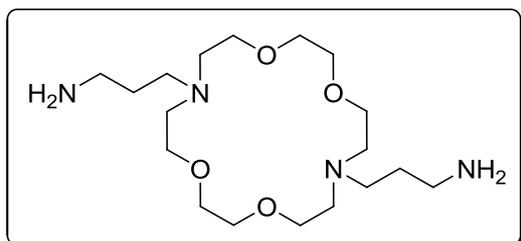
L'éther 1,12-diaza-18,6-couronne (100 mg, 0.4 mmol) est mis en solution dans 5 mL d'acétone en présence de Na_2CO_3 (105 mg, 1 mmol, 2.6 éq.) puis est porté à reflux. Le composé **218** (295 mg, 1.12 mmol, 3 éq.) dans 5 mL d'acétone est ensuite ajouté goutte à goutte, puis le milieu est laissé à reflux pendant 48 h. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré sur célite puis est concentré. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine neutre (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 97/3). Rendement : 150 mg, 0.24 mmol, 64 %

Rf : 0.55 (DCM/MeOH 97/3)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 2.56 (sl, 4H), 2.64 (sl, 8H), 3.20 (sl, 4H), 3.55-3.57 (m, 16H), 5.08 (s, 4H), 5.86 (sl, 2H), 7.27-7.36 (m, 10H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 39.4, 54.4, 54.7, 66.6, 70.0, 70.7, 128.1, 128.4, 128.6, 137.0, 156.7

MS (ESI+) : 617.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

222 : 3,3'-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)dipropan-1-amine

formule : $C_{18}H_{40}N_4O_4$

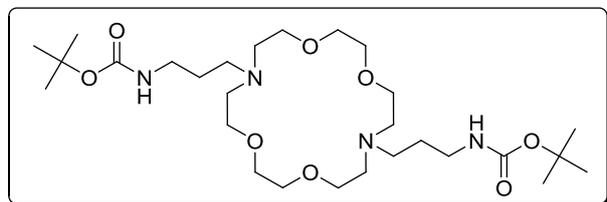
M = 376,53 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

Le composé **223** (300 mg, 0.5 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DCM, puis le TFA (5 mL) est ajouté et le milieu est agité une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous vide, puis le brut est trituré dans Et₂O. Rendement : 529 mg, 0.5 mmol, quantitatif

RMN ¹H (MeOD-*d*₄) : δ = 2.10-2.18 (m, 4H), 3.06 (t, 4H, J = 7.6 Hz), 3.34-3.38 (m, 4H), 3.54 (t, 8H, J = 6.4 Hz), 3.72 (s, 8H), 3.88 (sl, 8H)

RMN ¹³C (MeOD-*d*₄) : δ = 22.9, 37.8, 52.2, 54.4, 65.6, 71.4

223 : *tert*-butyl 3,3'-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(propane-3,1-diyl)dicarbamate

formule : $C_{28}H_{56}N_4O_8$

M = 576,77 g.mol⁻¹

aspect : solide blanc

L'éther 1,12-diaza-18,6-couronne (200 mg, 0.8 mmol) est mis en solution dans 10 mL d'acétone en présence de Na₂CO₃ (242 mg, 2.3 mmol, 3 équ.) puis est porté à reflux. Le 2-bromoéthyl *tert*-butylcarbamate (295 mg, 1.12 mmol, 3 équ.) dans 5 mL d'acétone est ensuite ajouté goutte à goutte, puis le milieu est laissé à reflux pendant 48 h. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré sur célite puis est concentré. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine neutre (éluant : DCM/MeOH 100/0 à 97/3). Rendement : 335 mg, 0.6 mmol, 73 %

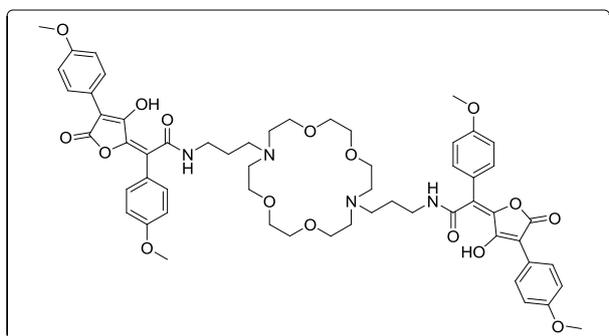
R_f : 0.57 (DCM/MeOH 97/3)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1.44 (s, 18H), 1.61 (t, 4H, J = 5.6 Hz), 2.53 (sl, 4H), 2.71 (sl, 8H), 3.18 (d, 4H, J = 6.0 Hz), 3.60 (t, 8H, J = 5.6 Hz), 3.62 (s, 8H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 27.1, 28.7, 39.5, 53.7, 54.2, 70.0, 70.9, 78.8, 156.3

MS (ESI⁺) : 577.4 ([M+H]⁺)

224 : *N,N'*-(3,3'-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(propane-3,1-diyl))bis(2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)acetamide)



formule : $C_{58}H_{68}N_4O_{16}$

M = $1077,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

aspect : solide orange

La bis-lactone **101** (456 mg, 1.3 mmol) est mise en suspension dans 20 mL de THF avec 2 mL de DIPEA, puis le composé **222** (194 mg, 0.5 mmol, 0.4 éq.) est ajouté. Le milieu est porté à reflux pendant 48 h, puis est laissé revenir à température ambiante et est concentré. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/MeOH 95/5) puis sur colonne d'alumine neutre (éluant : DCM/MeOH 97/3). Rendement : 108 mg, 0.1 mmol, 16 %

Rf : 0.29 (DCM/MeOH 90/10)

RMN ^1H (pyridine- d_5) : δ = 1.99 (t, 4H, J = 5.6 Hz), 3.22 (sl, 8H), 3.29 (sl, 4H), 3.48 (s, 8H), 3.59 (s, 3H), 3.59-3.63 (m, 4H), 3.66 (s, 3H), 3.73 (sl, 8H), 6.89 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.12 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.71 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 8.79 (d, 2H, J = 8.8 Hz)

RMN ^{13}C (pyridine- d_5) : δ = 27.7, 40.3, 54.7, 55.4, 56.7, 69.1, 72.0, 97.9, 115.7, 115.9, 117.0, 128.5, 128.7, 129.3, 133.1, 152.0, 159.4, 161.3, 171.8, 172.2

HRMS (ES) : calculée pour $C_{58}H_{69}N_4O_{16}$: 1077.47031

trouvée : 1077.47312

IR : ν (cm^{-1}) 431, 519, 557, 589, 625, 661, 768, 835, 881, 957, 1029, 1105, 1143, 1184, 1237, 1292, 11357, 1463, 1510, 1556, 1605, 1660, 1722, 2831, 2905, 2930, 3231

Pf : 139°C (décomposition)

Tests biologiques :

- **Etude de protection de la thymidine**

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 : $[\text{tween20}] = 0,05\%$ (v/v) ; tampon phosphate 10 mM pH 7,4. Le tween20 (polyoxyéthylènesorbitan) est un tensioactif.

Réactif d'Ellman : $[DTNB] = 250 \mu\text{M}$; $[\text{acétylthiocholine}] = 76 \text{ mM}$; $[NaCl] = 1,45 \text{ M}$; 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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.

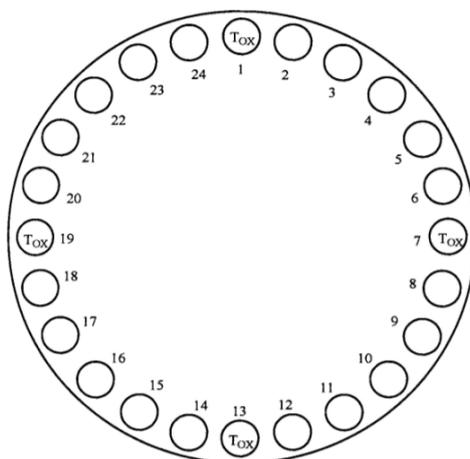
Protocole général du test par irradiation γ :*Plaque I : plaque en quartz***Plaque 96 puits de 300 μ L (irradiation Institut Curie d'Orsay)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		Tox				Tox	Tox				Tox		
B		Tox				Tox	Tox				Tox		
C		Tox	antioxydants			Tox	Tox	antioxydants			Tox		
D		Tox				Tox	Tox				Tox	Tox	Tox
E		Tox				Tox	Tox				Tox	Tox	Tox
F		Tox				Tox	Tox				Tox	Tox	Tox
G		Tox				Tox	Tox				Tox		
H		Tox				Tox	Tox				Tox		

Témoins Tox : expérience en l'absence d'agent protecteur (calibrage du test) ; **Colonnes 3 à 5 et 8 à 10** : étude des agents protecteurs (2 puits par molécule testée)

Colonnes 1 et 12 : vide ; **Colonnes 2, 6, 7 et 11** : Tox : 75 μ L de thymidine à 30 μ M dans le tampon phosphate pH 7.4 à 50 mM, 75 μ L d'eau. **Colonnes 3 à 5 et 8 à 10** : 75 μ L de thymidine à 30 μ M dans le tampon phosphate pH 7.4 à 50 mM, 3.75 μ L d'agent protecteur à 2 mM dans l'eau, 71.25 μ L d'eau

Irradiation γ pendant 135 minutes (340 Gy) avec deux ouvertures de l'irradiateur après 45 et 90 minutes, à l'aide d'un irradiateur IBL-637 (^{137}Cs), Institut Curie d'Orsay.

Plaque cylindrique (irradiation CEA/SIS2M)

Puits 1, 7, 13 et 19 : Tox : 75 μ L de thymidine à 30 μ M dans le tampon phosphate pH 7.4 à 50 mM, 75 μ L d'eau. **Autres puits** : 75 μ L de thymidine à 30 μ M dans le tampon phosphate pH 7.4 à 50 mM, 3.75 μ L d'agent protecteur à 2 mM dans l'eau, 71.25 μ L d'eau.

Irradiation γ pendant 30 minutes (180 Gy) à l'aide d'un irradiateur GammaCell 3000 Elan (^{137}Cs , CEA/SIS2M).

Plaque II : plaque CAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A		LNS	28	28	Tox							Tox			
B		LNS	14	14	Tox							Tox			
C		LNS	7	7	Tox		antioxydants					Tox			
D		LNS	3.5	3.5	Tox										Tox
E		B ₀	1.75	1.75	Tox										Tox
F		B ₀	0.87	0.87	Tox										Tox
G		B ₀	0.44	0.44	Tox							Tox			
H		B ₀	0.22	0.22	Tox							Tox			

Témoins LNS, B₀ et colonnes 3 et 4 : dosage par compétition de la thymidine (calibrage du test, concentration en μM), **Témoins Tox** : expérience en l'absence d'agent protecteur (calibrage du test), **Colonnes 5 et 12** : étude des agents protecteurs (2 puits par molécule testée).

Colonne 1 : vide. **Colonne 2** : 50 μL de tampon EIA dilué 2 fois. **Colonnes 3 et 4** : 50 μL de thymidine (à concentration variable) dans le tampon EIA dilué 2 fois. **Colonnes 5 à 12** : 25 μL de tampon EIA, addition de 25 μL des solutions des puits de la plaque I.

Colonnes 2 à 12 : 50 μL de mAc72 à 9.6 ng/mL dans tampon EIA (sauf LNS, 50 μL de tampon EIA), 50 μL d'AMT-AChE à 2 UEll/mL dans le tampon EIA.

Agitation pendant 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 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 300 μL .

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 ; 50 μL 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 300 μL .

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 , H₂O₂ 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 UEII/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 capture du radical DPPH

- protocole utilisé au CEA Saclay

Ce test antioxydant a été réalisé à l'aide du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH, Sigma-Aldrich). Les mesures ont été réalisées dans de l'éthanol pur sur des plaques 96 puits à l'aide d'un spectrophotomètre SpectraMax Plus³⁸⁴ (Molecular Devices). Pour chaque composé, une gamme de concentrations a été préparée directement sur la plaque, allant de 10⁻³ M à 1.95*10⁻⁵ M et avec un volume de 100 μL . Des témoins d'éthanol pur et de DPPH à 100 μM sont disposés respectivement dans les colonnes 1 et 12. Ensuite 100 μL

d'une solution de DPPH à 200 μM est ajoutée dans chaque puits (sauf colonnes 1 et 12). L'absorbance est alors mesurée à 515 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	EtOH	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	DPPH			
B	EtOH											DPPH			
C	EtOH				Antioxydants de concentration C1 à C10							DPPH			
D	EtOH														DPPH
E	EtOH														DPPH
F	EtOH														DPPH
G	EtOH											DPPH			
H	EtOH											DPPH			

EtOH : éthanol pur. **DPPH** : témoin en l'absence d'antioxydant. **Colonnes 2 à 11** : étude des agents antioxydants. Quatre antioxydants étudiés par plaque.

Préparation de la plaque :

Ligne A-B : Antioxydant 1. **Ligne C-D** : Antioxydant 2. **Ligne E-F** : Antioxydant 3. **Ligne G-H** : Antioxydant 4.

Colonne 1 : EtOH : 200 μL . **Colonne 2** : 100 μL d'EtOH + 100 μL d'antioxydant à 2 mM dans EtOH. **Colonnes 3 à 11** : 100 μL d'EtOH, 100 μL du mélange de la colonne précédente. **Colonne 12** : DPPH : 100 μL dans EtOH

Retirer 100 μL du mélange de la colonne 11 puis ajouter, dans les colonnes 2 à 12, 100 μL d'une solution de DPPH à 200 μM dans EtOH. Lecture immédiate de l'absorbance à 515 nm avec un spectrophotomètre, puis toutes les 5 minutes pendant 1 heure.

- protocole utilisé au Laboratoire de Pharmacognosie

Préparation des solutions :

- *Préparation de la solution de DPPH à 20 mg/l :*

Dissoudre 5 mg de DPPH dans 250 ml de méthanol. Conserver cette solution à l'abri de la lumière et à 0-5°C. Elle doit être préparée régulièrement.

- *Préparation des solutions mères :*

Les extraits peuvent être préparés dans du méthanol, de l'éthanol ou de l'eau.

- *Préparation des solutions finales à doser :*

Solutions (μL)	Contrôle	Blanc contrôle	Blanc Echantillon	Echantillon
Solvant de dilution de l'échantillon	50	50	/	/
Echantillon	/	/	50	50
MeOH	/	100	100	/
DPPH	100	/	/	100
Volume final	150	150	150	150

Pour chaque concentration d'échantillon on prépare 3 puits de « solution échantillon » à tester pour pouvoir faire la moyenne des DO.

Attention : Prendre en compte le facteur de dilution de 3 de la solution d'échantillon à doser dans le puit de la plaque (50µl d'échantillon dans un volume final de 150µl).

Par exemple, pour mesurer l'échantillon à une concentration de 50µg/ml, on préparera une solution mère à 150µg/ml.

Procédure :

Après homogénéisation, incuber les plaques de lecture à 20°C (température ambiante de la salle de criblage climatisée) pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière (emballer la plaque dans de l'aluminium). La lecture de DO (densité optique) se fait à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule :

$$\% I = \frac{\text{Absorbance du témoin} - \text{Absorbance de l'échantillon}}{\text{Absorbance du témoin}} \times 100$$

La CI_{50} des extraits actifs à moins de 100µg/ml est déterminée graphiquement avec la courbe : $\% I = f(\text{concentration échantillon testée})$.

Exemple :

Le témoin est le **Quercétol**. Un flacon de solution mère est préparé à 1 mg/ml dans de l'éthanol, et sert à préparer toutes les concentrations suivantes.

Ce témoin est testé à 5 concentrations (de 6.25 à 0.39 µg/ml). Pour chaque concentration testée on triple l'essai.

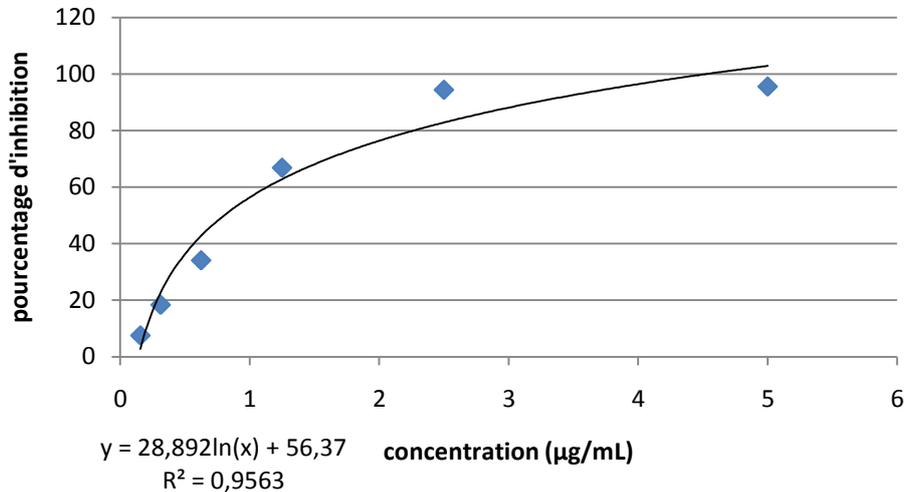
Absorbance des puits à 540 nm :

Concentration testée (µg/ml)	1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai	Blanc échantillon
10	0.0434	0.0430	0.0434	0.0394
5	0.0431	0.0442	0.0434	0.0393
2.5	0.0440	0.0450	0.0447	0.0376
1.25	0.0796	0.0798	0.0784	0.0381
0.625	0.1190	0.1208	0.1188	0.0377
0.3125	0.1391	0.1407	0.1410	0.0389
0.1563	0.1515	0.1519	0.1530	0.0373
Contrôle	0.1601	0.1615	0.1629	0.0373

Pour chaque concentration de l'échantillon, on calcul son pourcentage d'inhibition, puis on trace la courbe de régression logarithmique % I = f (concentration échantillon testée) :

Concentration (µg/ml)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563
% I	96.89	95.56	94.39	66.85	34.11	18.38	7.54

Témoin Quercétol



graphique 1 : Courbe de régression logarithmique du quercétol % I = f (concentration)

Cette équation nous permet de déterminer la CI_{50} , c'est-à-dire la concentration de quercétol nécessaire pour avoir un pourcentage d'inhibition de 50% :

Pour $Y = 50$, on a : $X = CI_{50} = \exp \left(\frac{50-56.37}{28.892} \right) = 0.8 \mu\text{g/ml}$

Exemple de plan de plaque :

- plaque de mesure d'un IC_{50} (exemple d'une gamme de concentration de 500 µM à 3.9 µM) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			10				500				500	
B			5				250				250	
C			2,5				125				125	
D	témoin		1,25	blanc	Composé 1		62,5	blanc	Composé 2		62,5	blanc
E	Quercétol		0,625				31,25				31,25	
F			0,3125				15,625				15,625	
G			0,1563				7,8125				7,8125	
H	contrôle MeOH						3,9063				3,9063	

- plaque de mesure du pourcentage d'inhibition à concentration donnée (exemple à 500 et 250 μM) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			10	blanc	composé 1		500	blanc	composé 5		500	blanc
B			5				250				250	
C	témoin Quercétol		2,5		composé 2		500		composé 6		500	
D			1,25				250				250	
E			0,625		composé 3		500		composé 7		500	
F			0,3125				250				250	
G		0,1563	composé 4			500	composé 8			500		
H	contrôle MeOH					250				250		

Lorsqu'il y a plusieurs plaques de mesure au cours d'une même expérience, les colonnes 1 à 4 de la première plaque sont consacrées au témoin Quercétol, tandis que les colonnes 1 à 4 des plaques suivantes sont utilisées pour des échantillons. Pour chaque plaque, les puits H1 à H4 sont utilisés pour le contrôle méthanol.

- **Test de capture du radical cation ABTS**

- Activation de l'ABTS :

A une solution d'ABTS (Sigma Aldrich) à 7 mM dans l'eau, est ajoutée une solution de persulfate de potassium (Sigma Aldrich) à 140 mM pour obtenir une concentration finale de 3,5 mM. Le mélange est agité une nuit à l'abri de la lumière et à température ambiante pour former le radical ABTS^{•+}. Le mélange est ensuite dilué avec de l'éthanol absolu pour obtenir une absorbance voisine de 0,7 à 734 nm et à 30°C pour un volume final de 300 mL. Le rendement de la réaction d'oxydation peut être calculé à partir du coefficient d'extinction molaire connu de $1,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ car la réaction est toujours incomplète : elle commence immédiatement, mais ne se stabilise qu'après plus de 6 heures.

- Protocole de test

Les mesures ont été réalisées dans de l'éthanol absolu sur des microplaques 96 puits à l'aide d'un lecteur de plaques Multiskan FC incubator (Thermo Fisher). Pour chaque composé, une gamme de concentration est préparée allant de 10^{-3} M à $1,95 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ directement sur la plaque pour un volume final de 200 mL dans les colonnes 2 à 11. Pour chaque concentration, quatre mesures sont effectuées. Des témoins d'éthanol absolu (300 mL) et de radical ABTS^{•+} (A = 0,7 ; 100 mL de solution d'ABTS^{•+} préalablement étalonnée et 200 mL d'éthanol absolu) sont disposés respectivement dans les colonnes 1 et 12. Ensuite, 100 mL de la solution d'ABTS préalablement étalonnée sont ajoutés aux colonnes 2 à 11. L'absorbance est alors mesurée à 740 nm,

toutes les 30 secondes, pendant une heure à 30°C. Les IC₅₀ des composés sont déterminées lorsque la courbe de mesures atteint un plateau.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	EtOH	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	DPPH			
B	EtOH											DPPH			
C	EtOH				Antioxydants de concentration C1 à C10							DPPH			
D	EtOH														DPPH
E	EtOH														DPPH
F	EtOH														DPPH
G	EtOH											DPPH			
H	EtOH											DPPH			

EtOH : éthanol pur. **DPPH** : témoin en l'absence d'antioxydant. **Colonnes 2 à 11** : étude des agents antioxydants. Deux antioxydants étudiés par plaque (1^{er} AO : lignes A à D, 2^{ème} AO : lignes E à G).

• Etude de protection cellulaire

Lignée cellulaire et culture : la lignée lymphoïde humaine TK6 est cultivée en routine dans du milieu RPMI-1640 Glutamax supplémenté avec du sérum fœtal de veau à 10 % désactivé par la chaleur, 1 mM de pyruvate de sodium, 1 mM d'acides aminés non essentiels, et 50 µg :mL de gentamycine. Les cultures sont maintenues en atmosphère humide à 5 % de CO₂ et à 37°C.

Protocole d'irradiation et de mesure de la prolifération cellulaire : Les irradiations aux rayons X étant réalisées soit au Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss à Strasbourg, soit à l'hôpital St Pierre-Ottignies en Belgique, le protocole suivant, prenant en compte les temps de trajet, a été utilisé : les irradiations sont réalisées en fin d'après-midi. Le matin du test, des flacons de culture cellulaire ventilés de 5 mL de volume final sont préparés de la manière suivante : 5.4 mL de suspension cellulaire à 2.2*10⁵ cellules/mL sont introduites, suivi par 0.6 mL de solution d'antioxydant à la concentration désirée. Une plaque 96 puits est ensuite ensemencée pour les études de toxicité, avec 200 µL de suspension cellulaire de chaque flacon par puits, et à raison de 5 puits par flacon, de manière à réaliser des quintuplicates. Ces plaques sont mises à incuber pendant 24 à 48 h. Les irradiations sont ensuite réalisées à température ambiante par des rayons X à 6 MV produits par un accélérateur linéaire, à une dose de 0.8 Gy.min⁻¹ pendant 10 minutes.

36 h après l'irradiation, le contenu de chaque flacon est transféré dans un tube conique de 10 mL, puis est centrifugé pendant 10 min à 2 000 tr.min⁻¹. Le culot est ensuite remis en suspension dans 5 mL de milieu de culture frais, puis est réparti dans des plaques 96 puits avec le plan ci-dessous. Pour chaque flacon, nous préparons une plaque par jour de mesure.

Le jour de la mesure de la prolifération cellulaire, 20 µL du réactif Alamar Blue (préparé par dilution 1/2 du produit commercial UptiBlue) est introduit dans chaque puits, puis la plaque est laissée à l'incubateur pendant 4 heures. La lecture est ensuite réalisée par fluorescence,

à l'aide d'un lecteur de plaque Perkin Elmer VictorX2 2030-0200 (excitation à 560 nm, émission à 590 nm).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		flacon 1					flacon 6					
C		flacon 2					flacon 7					
D		flacon 3					flacon 8					
E		flacon 4					flacon 9					
F		flacon 5					flacon 10					
G							background					
H												

Puits B2 à B6 : 200 μ L du contenu du flacon 1, après centrifugation et resuspension dans du milieu de culture frais. **Puits C2 à C6** : idem avec flacon 2. **Puits D2 à D6** : idem avec flacon 3. **Puits E2 à E6** : idem avec flacon 4. **Puits F2 à F6** : idem avec flacon 5. **Puits B7 à B11** : idem avec flacon 6. **Puits C7 à C11** : idem avec flacon 7. **Puits D7 à D11** : idem avec flacon 8. **Puits E7 à E11** : idem avec flacon 9. **Puits F7 à F11** : idem avec flacon 10. **Puits G7 à G11** : 200 μ L de milieu de culture

Synthèse et activité biologique de dérivés et analogues de l'acide pulvinique pour une application en protection contre les rayonnements ionisants

Résumé :

Ces travaux de thèse ont eu pour objectif la synthèse et l'évaluation de l'activité biologique de dérivés hydrosolubles et d'analogues structuraux de dérivés de l'acide pulvinique, issu de la norbadione A, un antioxydant naturel présent dans de nombreux champignons. Cette étude a été menée dans le but de développer de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants.

Dans un premier temps une voie de synthèse applicable à une échelle de plusieurs grammes d'un intermédiaire de type bis-lactone a été mise au point. Elle est basée notamment sur la condensation puis déshydratation de l'anion d'un acide tétronique protégé sur le pyruvate de méthyle suivie d'une étape de déméthylation sélective en présence de bromure de magnésium. Cet intermédiaire a ensuite été utilisé pour préparer divers analogues hydrophiles par ouverture régiosélective d'une des fonctions lactones par des amines comportant un groupe solubilisant. Une seconde étude menée en parallèle et basée sur la création, à partir de précédents résultats expérimentaux, d'un modèle de prédiction *in silico* de l'activité d'une structure donnée, a permis de découvrir le pouvoir antioxydant potentiel de dérivés de la 3-aryl-4-hydroxycoumarine. Une voie de synthèse en deux étapes permettant la synthèse de nombreux dérivés a été utilisée afin de réaliser une étude de relation structure-activité sur cette famille de molécules. L'ensemble des molécules synthétisées a été testé *in vitro* sur un test cellulaire basé sur l'irradiation de cellules radiosensibles puis du suivi de leur prolifération durant les jours suivants l'exposition aux radiations. Enfin une troisième étude a été réalisée afin d'étudier le pouvoir complexant des acides pulviniques envers le ^{137}Cs dans le but de développer de nouveaux agents de détoxification.

Synthesis and biological activity of derivatives and analogues of pulvinic acid for an application in protection against ionizing radiations

Summary:

The objective of this thesis was to synthesize and to evaluate the biological activity of hydrophilic derivatives and structural analogues of pulvinic acid, derived from norbadione A, a naturally occurring antioxidant found in mushrooms. This study aimed to develop new protective agents against ionizing radiations.

First a scalable synthesis of a bis-lactone as a common intermediate was developed. It is based on the condensation and dehydration of the anion of a protected tetronic acid on methyl pyruvate and subsequent selective demethylation in presence of magnesium bromide. This intermediate was then employed to prepare several hydrophilic derivatives by regioselective ring-opening of one lactone by functionalized amines. The second study was based on the creation of an *in silico* activity-predicting model allowed to highlight derivatives of 3-aryl-4-hydroxycoumarines as potential antioxidants. A synthesis pathway was used to prepare several derivatives to perform a structure-activity relationship study. All synthesized compounds were then tested in an *in vitro* assay, to investigate their radioprotective properties. Radiosensitive cells were exposed to the different compounds and irradiated, after several days their viability was assessed. Finally a third study was conducted to investigate the chelating activity of pulvinic acids towards ^{137}Cs in order to develop new detoxifying agents.