

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES (ED 222)

Laboratoire d'Innovation Thérapeutique

(UMR 7200 CNRS/Unistra)

THÈSE

présentée par :

Nicolas WASSER

soutenue le : **19 octobre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie organique, phytochimie

**Synthèse et évaluation de l'activité anti-
Leishmania d'anthranoïdes issus du
genre *Psorospermum* (Hypericaceae)
utilisé en médecine traditionnelle
camerounaise**

THÈSE dirigée par :

Mme VONTHRON-SÉNÉCHEAU Catherine

M. GIRARD Nicolas

Maître de conférences (HDR), Université de Strasbourg

Maître de conférences (HDR), Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. POUPON Erwan

M. HADDAD Mohammed

Professeur, Université de Paris Sud

Chargé de recherche IRD (HDR), Université de Toulouse III

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme DAVIOUD-CHARVET Elisabeth

M. DÉSAUBRY Laurent

Directeur de recherches CNRS, Université de Strasbourg

Directeur de recherches CNRS, Université de Paris-VI

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie Monsieur le Docteur Erwan POUPON, de BioCIS, Université Paris Sud, et Monsieur le docteur Mohamed HADDAD, de l'IRD PharmaDEV, d'avoir accepté la charge de rapporteurs de ce travail. Je tiens à remercier Madame le Docteur Elisabeth Davioud-Charvet, de l'ECPM, à Strasbourg, et Monsieur le docteur Laurent Désaubry, du laboratoire des biomolécules, à Paris, pour l'attention, l'intérêt et le temps qu'ils ont consacrés à la lecture de ce travail.

Je remercie tout d'abord les directeurs du laboratoire, Pr Marcel Hibert et Dr Didier Rognan, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de cet établissement.

Je remercie le Dr Jean Suffert et le Dr Michaela Gulea de m'avoir accueilli dans l'équipe SOMP devenue SOMHet, ainsi que le Pr Marcel Hibert et le Dr Dominique Bonnet pour m'avoir accueilli dans leur équipe également.

J'ai eu la chance d'avoir deux directeurs de thèse, le Dr Catherine Vonthron-Sénécheau et le Dr Nicolas Girard, aux caractères différents mais complémentaires, et je les remercie chaleureusement. Merci Nicolas pour ton optimisme, ta motivation communicative dès l'aurore, et ta disponibilité sans faille. J'ai adoré être à la paillasse, à tel point que j'ai eu un peu trop de mal à la quitter pour mon bureau où la rédaction de ce manuscrit m'attendait.

Merci Catherine pour le sourire et la cool-attitude qui te caractérisent. Dans les moments difficiles, on attendait toujours ton retour de cours à l'heure du goûter, les bras pleins de pâtisseries. Merci pour la latitude et la confiance que tu m'as accordées durant ma thèse, et que je n'ai peut-être pas toujours mérité.

Merci au Dr Axel Marchal de m'avoir à nouveau accueilli dans son laboratoire pendant ma thèse, c'est toujours avec grand plaisir que je reviens à l'ISVV. Et merci à Delphine, d'avoir sauvé mon expérience de la catastrophe !

Merci à Quentin pour avoir réalisé les expériences qui ont donné lieu à un chapitre de ma thèse.

Merci aux piliers du LIT, les anciens et les nouveaux, pour les discussions, les restos, et toutes les petites choses qui ont égayé ma thèse : Yann, Pat, Malik, Mélanie, Stephou la Poulette en Chef, Séverine, Alex...

Merci à l'équipe de foot : Nico, Lucie, Guilhem, Fab, Seb, Mickael, on a fait vibrer le stade !

Un grand merci à Gaëlle pour m'avoir fait prendre de la hauteur, bien calé dans mon baudrier, et permis de faire de belles rencontres (une petite pensée pour Carole et son genoux).

Merci à toi Priscilla pour t'être occupée de ma culture cinématographique, qui était jusqu'à présent aussi développée que le bierbuch d'Usain Bolt.

Merci à Tic et Tac, une soirée sans vous est une soirée bien trop calme.

Une grosse pensée pour mes potes qui sont également en fin de thèse partout en France : Marianne, Val, et Claire. Courage, on y est presque, plus que quelques semaines de dénivélé avant le col de la Soutenance !

Merci également à tous ceux que je n'aime pas de ne pas avoir été là quand je n'avais pas envie de les voir. Ca m'a fait plaisir.

On a commencé de manière un peu houleuse dans un bac à vaisselle plein, pour continuer sur une belle amitié qui durera longtemps (et tu sais comment je le sais ?...) Merci à toi Laura, tu as souvent été de bon conseil dans la vie pour me faire avancer, même si parfois c'était « pan dans les dents » à ta manière de cowboy. L'odeur des tartines de raclettes du matin me manquera.

Merci à ma « sistafromanathamotha » Laure, dite Mimi Cracra, sans qui ces trois ans n'auraient pas été ce qu'ils ont été. Notre amitié a été la plus belle découverte de ma carrière de chercheur, et il y a du prix nobel dans l'air. Je ne sais même pas quoi dire de plus ni comment l'écrire, mais de toute façon tu sais déjà tout, et ce qui manque on se le dira la prochaine fois qu'on se verra autour d'une gueuze. Jah bless !

Merci à ma famille de m'avoir permis d'utiliser la machine à laver le weekend.

Enfin, une immense pensée pour celle qui fut mon plus grand soutien, ma plus fidèle alliée de tous les instants. Tu étais déjà là quand j'arrivais aux aurores au labo pour me lancer avec fougue dans les manip, tu étais là à partager chaque pause dans la journée, et tu étais encore là durant mes dures nuits sans sommeil pendant la rédaction de ce manuscrit, pour me permettre de tenir jusqu'au matin sans sourciller. Ma cafetière, je t'aime.

Production scientifique

Posters:

N. Wasser, J-B. Gallé, N. Girard, C. Vonthron-Sénécheau; **Conception, synthesis and bioactivity evaluation of structural analogues of anti- *Leishmania* anthranoïds from *Psorospermum* genus (*Hypericaceae*) used in traditional medicine**, Journées du Campus d'Illkirch, 2016, Illkirch, France.

N. Wasser, J-B. Gallé, N. Girard, C. Vonthron-Sénécheau; **Isolation, synthesis and bioactivity evaluation of anti-*Leishmania* anthranoïds from *Psorospermum* genus (*Hypericaceae*) used in traditional medicine**, 36ème Regio-Symposium Congress of Organic and Bioorganic Chemistry, 2016, Mittelwihr, France.

N. Wasser, J-B Gallé, B. Lenta, J-H. Renault, K. Milagros Carrillo Torres, D. Castillo Pareja, M. Kaiser, P. Loiseau, E. Deharo, L.Paloque, M. Sauvain, N. Girard, C. Vonthron-Sénécheau; **Antileishmanial activity of anthranoids from *Psorospermum* genus (*Hypericaceae*) used in traditional medicine and their analogues**, 5^{èmes} Journées Internationales de l'AFERP 2017, Angers, France.

Présentations orales:

N. Wasser, J-B. Gallé, N. Girard, C. Vonthron-Sénécheau; **Isolation, synthesis and bioactivity evaluation of anti-*Leishmania* anthranoïds from *Psorospermum* genus (*Hypericaceae*) used in traditional medicine**, 36^{ème} Regio-Symposium Congress of Organic and Bioorganic Chemistry, 2016, Mittelwihr, France (en anglais).

N. Wasser, J-B. Gallé, N. Girard, C. Vonthron-Sénécheau; **Isolation, synthesis and bioactivity evaluation of anti-*Leishmania* anthranoïds from *Psorospermum* genus (*Hypericaceae*) used in traditional medicine**, Journées du Campus d'Illkirch, 2017, Illkirch, France (en anglais).

N.Wasser, J.-B. Gallé, B. Lenta, J-H. Renault, K. Milagros Carrillo Torres, D. Castillo Pareja, M. Kaiser, P. Loiseau, E. Deharo, L. Paloque, M. Sauvain, N. Girard, C. Vonthron-Sénécheau; **Isolation, synthesis and bioactivity evaluation of anti-*Leishmania* anthranoïds from *Psorospermum* sp. (*Hypericaceae*) used in traditional medicine**, 7èmes Journées du Consortium Anti-Parasitaire et Fongique 2017, Illkirch, France (en français).

N. Wasser, J-B. Gallé, B. Lenta, Marcel Kaiser, P. Loiseau, E. Deharo, L. Paloque, N. Girard, C. Vonthron-Sénécheau ; **Antileishmanial activity of anthranoïds from *Psorospermum* genus (*Hypericaceae*) used in traditional medicine and their structural analogues**, PSE Youngs' Scientists Meeting 2017, Lille, France (en anglais).

Manuscrits en préparation :

- Gallé, J.-B. *et al.*, Identification of key structural characteristics of *Psorospermum glaberrimum* prenylated anthranoids involved in antileishmanial activity. *J.nat.prod.* (submitted).
- Synthesis of dihydroanthracenones with anti-*leishmania* activities (en préparation).
- Visualisation of natural anthranoïds and related quinones in living plant cells using spectral imaging (en préparation).

Table des matières

Remerciements	i
Production scientifique	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des schémas	xiii
Liste des tableaux	xvii
Liste des abréviations	xix
Introduction	1
I. Contexte et objectifs de la thèse	3
Chapitre I	9
Données bibliographiques	9
I. Leishmanioses, traitements actuels et cibles moléculaires d'intérêt	11
I.1. Cycle parasitaire (Figure 2)	11
I.2. Aspects cliniques ⁹	12
I.3. Traitements actuels	13
I.3.1 Traitements de première ligne ¹²	14
I.3.2 Traitements de seconde ligne	14
I.4. Cibles moléculaires actuelles ²⁷	17
II. Vismiones et dihydroanthracénones	21
II.1. Vismiones et activité anti- <i>Leishmania</i>	23
II.1.1 Activité sur amastigotes axéniques de <i>L. donovani</i>	23
II.1.2 Activité sur amastigotes axéniques de <i>L. infantum</i>	26
II.1.3 Activité sur amastigotes intramacrophagiques de <i>L. donovani</i>	26
II.2. Utilisation des vismiones comme outils pharmacologiques	28
II.3. Hypothèses sur le mécanisme d'action des vismiones	30
II.4. Synthèse totale de dihydroanthracénones naturelles	32
Chapitre II	41
Dosage des vismiones dans les extraits de <i>Psorospermum</i>	41
I. Introduction	43
II. Répartition des vismiones en fonction des organes	46
II.1. Profils des extraits de tiges, écorces et troncs	48
II.2. Profils des extraits de fruits	49
III. Relation entre teneur en vismiones et activité des extraits	50
IV. Conclusion	52
Chapitre III	55

Synthèse organique 55

I. Introduction	57
I.1. Synthèse d'anthrones à partir d'antraquinones	60
I.2. Synthèse de dihydroanthracénones	63
I.2.1 Réaction d'annélation de Hauser	64
I.2.2 Réaction d'annélation de Staunton-Weinreb	66
II. Synthèse de dihydroanthracénones	71
II.1. Introduction	71
II.2. Synthèse de l'ester	72
II.2.1 A partir de l'acétoacétate d'éthyle	72
II.2.2 Alkylation du 2,4-hydroxy-6-méthylbenzoate d'éthyle	74
II.2.3 Récapitulatif des esters synthétisés (Schéma 43)	78
II.3. Synthèse de la cyclohexénone	79
II.3.1 Introduction	79
II.3.2 A partir de dicétones	80
II.3.3 A partir du phloroglucinol	81
II.3.3.1 5-hydroxycyclohexénone	81
II.3.3.2 5-hydroxy-5-méthylcyclohexénone	84
II.3.4 A partir du cyclohexanetriol	89
II.3.4.1 Protection du cyclohexanetriol par un benzylidène cétal.	89
II.3.4.2 Protection du cyclohexanetriol par le tributylsilane	92
II.4. Synthèse de cyclohexénones sans groupe partant	98
II.4.1 Fermeture par aldolisation à partir du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane	98
II.4.1.1 Par hydroformylation du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane	99
II.4.1.2 Par formation de l'organomagnésien	103
II.4.2 Fermeture par métathèse	104
II.4.2.1 A partir du but-3-énoate d'isobutyle	107
II.4.2.2 A partir du cyanoacétate d'éthyle	109
II.4.2.3 A partir de l'acétoacétate d'éthyle	112
II.5. Synthèse des dihydroanthracénones par réaction d'annélation de Staunton-Weinreb	115
II.5.1 Dihydroanthracénones C-alkylées en position 6	116
II.5.2 Dihydroanthracénones hydroxylées en position 6	123
II.5.3 Dihydroanthracénones hydroxylées et méthylées en position 6	127
II.5.3.1 A partir de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone	128
II.5.3.2 Synthèse alternative	129
III. Détermination de la configuration absolue des vismiones naturelles par dichroïsme circulaire vibrationnel.	134
III.1. Introduction	134
III.2. Résultats	135
III.3. Discussion	137
IV. Conclusion	139

Chapitre IV 143

Activités anti-*Leishmania* extra- et intra-cellulaires *in vitro* et *in vivo* des analogues synthétiques de vismiones, effet des vismiones sur la prénylation et étude de leurs propriétés de fluorescence intrinsèques 143

I. Introduction	145
II. Activités sur les espèces à tropisme viscéral	146

II.1.	Activités sur amastigotes axéniques de <i>L. donovani</i> .	146
II.2.	Activité sur amastigotes axéniques de <i>L. infantum</i> .	149
III.	Cytotoxicité	150
IV.	Activité sur amastigotes intramacrophagiques de <i>L. donovani</i>.	151
V.	Activité <i>in vivo</i> sur un modèle murin de leishmaniose viscérale	152
VI.	Activité sur des espèces à tropisme cutané	153
VII.	Activités antifongiques	156
VIII.	Conclusion	161
IX.	Etude de la stabilité des dihydroanthracénones en solution.	164
IX.1.	Etude de stabilité de deux vismiones naturelles et deux dihydroanthracénones de synthèse par HPLC dans le DMSO en atmosphère contrôlée.	165
IX.2.	Etude de stabilité de dihydroanthracénones par RMN ¹ H	170
IX.2.1	Etude de stabilité du composé (226) dans le DMSO par RMN ¹ H	171
IX.2.2	Etude de stabilité de la vismione D et de l'acétylvismione D dans le dichlorométhane par RMN ¹ H sous atmosphère contrôlée	173
IX.3.	Conclusion	175
X.	Etude de l'effet des vismiones sur la prénylation des protéines	176
X.1.	Introduction	176
X.2.	Etude de l'effet des vismiones sur la prénylation des protéines dans un modèle végétal	180
X.3.	Conclusion	187
XI.	Etude des propriétés de fluorescence des vismiones	188
XI.1.	Introduction	188
XI.2.	Test de viabilité cellulaire en présence de vismione H	188
XI.3.	Spectrofluorimétrie	191
XI.4.	Visualisation de la fluorescence des vismiones et analogue synthétique par imagerie spectrale	192
XI.5.	Conclusion	198
	Conclusion générale	201
	Experimental section	211
I.	General experimental procedure	213
II.	HPLC analysis conditions	214
III.	LC-FTMS Quantification of vismiones	214
III.1.	Standard solutions	214
III.2.	LC analysis conditions	214
III.3.	MS analysis conditions	216
III.4.	Calibration curves	216
III.5.	Accuracy and repeatability	218
III.6.	Vismiones quantification	218
IV.	Vismione stability assays in organic solvents	219
IV.1.	¹ H NMR experiments	219
IV.2.	HPLC experiments	219
V.	Biological assays	219
V.1.	<i>In vitro</i> antiprotozoal assays	219
V.1.1	<i>In vitro</i> activity against <i>L. donovani</i> axenic amastigotes	219
V.1.2	Activity against <i>L. donovani</i> intracellular amastigotes assay	220

V.1.3	<i>In vitro</i> activities against <i>L. infantum</i>	221
V.1.4	<i>In vitro</i> activity against <i>L. infantum</i> promastigotes	221
V.1.5	<i>In vitro</i> activity against <i>Leishmania infantum</i> axenic amastigotes	221
V.1.6	<i>In vitro</i> activity against cutaneous species of <i>Leishmania</i> .	222
V.2.	<i>In vivo</i> antileishmanial evaluation	223
V.3.	<i>In vitro</i> cytotoxicity evaluation	224
V.3.1	Cytotoxicity against L6 Cells	224
V.3.2	Cytotoxicity against macrophage cells	224
V.3.3	Cytotoxicity against Hepa-1.6, ThP1 and NHDF cells	225
VI.	Investigations on isoprenoids pathway inhibition in a vegetal model	226
VII.	Investigations on vismiones fluorescence properties	226
VIII.	Determination of absolute configuration of vismione H by VCD experiment	227
VIII.1.	VCD:	227
VIII.2.	Molecular modeling:	228
VIII.2.1	Conformational study.	228
VIII.2.2	Calculation of averaged IR and VCD spectra.	228
IX.	Organic synthesis	229
IX.1.	General procedure for <i>p</i> - monoalkylated esters synthesis	230
IX.2.	General procedure for EOM protection of <i>p</i> - monoalkylated esters	233
IX.3.	General procedure for dihydroanthracenones synthesis by Staunton-Weinreb annulation.	259
IX.4.	General procedure for the deprotection of dihydroanthracenones	266
	Références bibliographiques	277
	Annexes	298
I.	Liste des composés synthétisés-partie 1	300
II.	Liste des composés syntyhétisés-partie 2	301

Liste des figures

Figure 1. Positions de substitution des vismiones naturelles et leur effet sur l'activité anti- <i>Leishmania in vitro</i>	4
Figure 2. Cycle parasitaire de <i>Leishmania sp</i>	12
Figure 3. Structure des dérivés antimoniés.	14
Figure 4. Structure des traitements de seconde ligne.	16
Figure 5. Cibles moléculaires pour le traitement de la leishmaniose.....	17
Figure 6. Structure de base des dihydroanthracénones.	21
Figure 7. Structure de l'atrichryson.	21
Figure 8. Voie de biosynthèse des dihydroanthracénones issues de <i>Senna bicapsularis</i> ⁵⁰	22
Figure 9. Structures de la vismione H et de l'acétylvismione D et activité anti- <i>Plasmodium</i>	23
Figure 10. Structure de la vismione D et activité anti- <i>Leishmania</i> sur amastigotes axéniques de <i>L. donovani</i>	23
Figure 11. Structure du RB-2	28
Figure 12. Structures de l'hypericine et de la marmycine A, utilisées comme traceurs.	29
Figure 13. Structure générale des dihydroanthracénones présentant un motif hydroxyle-carbonyle conjugué.	30
Figure 14. Structure de l'anthroquinolol.	31
Figure 15. Structures de la tecomaquinone et du tecol.	31
Figure 16. Structure de l'olivomycine A.....	39
Figure 17. Provenance des échantillons de <i>Psorospermum</i>	44
Figure 18. Teneur globale en vismione dans les extraits.	46
Figure 19. Répartition des vismiones dans les extraits.	47
Figure 20. Répartition des vismiones dans les extraits dichlorométhaniques de tiges, écorces et troncs.	48
Figure 21. Répartition des vismiones dans les extraits dichlorométhaniques de fruits.....	49
Figure 22. Droite de régression linéaire pour les vismiones totales.....	50
Figure 23. Droites de régression linéaire pour chacune des vismiones.	51
Figure 24. Structure tridimensionnelle du composé de synthèse NW012401	123
Figure 25. Formes mésomères de la vismione H (2).....	136
Figure 26. Spectres IR et VCD moyens calculés et mesurés de la vismione H.	136
Figure 27. Superposition des spectres IR et VCD calculés et mesurés de la vismione H.....	137
Figure 28. Vismiones de configuration (S) isolées du genre <i>Vismia</i> et dihydroanthracénones ayant permis de déterminer la configuration absolue par dichroïsme circulaire.....	138
Figure 29. Structure de la plombagine.	153
Figure 30. La natamycine et la nystatine, deux antifongiques présentant des propriétés anti- <i>Leishmania</i>	156
Figure 31. Structure de la diosgénine isolée des racines de <i>P. corymbiferum</i>	159
Figure 32. Structure de l'alpha -amyrine isolée des feuilles de <i>P. androsaemifolium</i>	159
Figure 33. Structures de la fébrifugine et de l'adamabianthrone, extraites respectivement de <i>P. febrifugum</i> (racines) et <i>P. adamaense</i> , (écorce).....	160
Figure 34. Structures des composés isolés de <i>P. aurantiacum</i> et <i>Hypericum lanceolatum</i> . ..	160
Figure 35. Positions de substitution clés des vismiones pour l'activité anti- <i>Leishmania</i> sur amastigotes axéniques de <i>L. donovani</i>	162
Figure 36. Dégradation des vismiones en solution.	164
Figure 37. Composés naturels et synthétiques faisant l'objet de l'étude de stabilité des vismiones.....	166

Figure 38. Chromatogramme du suivi HPLC de la dégradation de l'acétylvismione D sous atmosphère contrôlée.....	166
Figure 39. Suivi de la dégradation de la vismione H dans le DMSO sous atmosphère contrôlée	167
Figure 40. Suivi de la dégradation de l'acétylvismione D dans le DMSO sous atmosphère contrôlée	168
Figure 41. Modification de la couleur de la solution de vismione H lors de la dégradation..	168
Figure 42. Suivi de la dégradation du composé (226)1 dans le DMSO en atmosphère contrôlée	169
Figure 43. Suivi de la dégradation du composé (113) dans le DMSO en atmosphère contrôlée	170
Figure 44. Spectres RMN ¹ H de la solution de vismione H dans le DMSO-d ₆ à t = 0,5 et t= 43 h.	171
Figure 45. Suivi de la dégradation du composé NW018401 par RMN ¹ H dans le DMSO sous atmosphère contrôlée.....	172
Figure 46. Suivi de la dégradation du composé (226) par RMN ¹ H dans le DMSO sous atmosphère normale.	173
Figure 47. Suivi de la dégradation de la vismione D par RMN ¹ H dans le dichlorométhane en atmosphère contrôlée.....	174
Figure 48. Suivi de la dégradation de l'acétylvismione D par RMN ¹ H dans le dichlorométhane en atmosphère contrôlée.....	174
Figure 49 : métabolisme des isoprénoïdes et prénylation des protéines CAAX ⁶⁶	177
Figure 50. acylphloroglucinols issus de <i>Elaphoglossum lindbergii</i>	178
Figure 51. Isoflavane prénylé isolé de <i>Smirnowia iranica</i>	178
Figure 52. Benzophénones de synthèse et issue de <i>Platonia insignis</i> présentant une activité <i>anti-Leishmania</i>	179
Figure 53. Structure des chalcones prénylées de synthèse.....	179
Figure 54. Structure de la tecomaquinone I.	180
Figure 55. Protocole du test d'inhibition de la prénylation des protéines sur cellules BY-2::CVIL.	181
Figure 56. Contrôles BY-2::CVIL en absence et en présence de 100 µM de Fosmydomycine, un inhibiteur de la DXP réductoisomérase.....	181
Figure 57. Phénotypes observés dans le test d'inhibition de prénylation des cellules BY-2::CVIL traités avec des vismiones naturelles à 33, 50 et 100 µM.....	183
Figure 58. Observation au microscope confocal de cellules BY-2::CVIL après incubation avec les dihydroanthracénones de synthèse.....	184
Figure 59. Observation de cellules BY-2 WT transformées transitoirement pour exprimer des protéines senseur des plastes et du Golgi.....	185
Figure 60. Vue en mosaïque entre 499 et 668 nm d'une observation par imagerie spectrale de cellules BY-2::CVIL non induites et marquées au FDA.....	189
Figure 61. Vue en mosaïque entre 499 et 668 nm d'une observation par imagerie spectrale de cellules BY-2::CVIL non induites traitées avec 30 µM de VH.	189
Figure 62. λ _{Ex} /λ _{Em} à 488/499-668 nm	190
Figure 63. Spectres (Em/intensité) des vismiones et dihydroanthracénones de synthèse testées à 200 µM dans le DMSO.....	192
Figure 64. λ _{Ex} /λ _{Em} à 488/499-668 nm	194
Figure 65. λ _{Ex} /λ _{Em} à 405/410-668 nm	196
Figure 66. Vue lambda d'une cinétique de cellules BY-2::CVIL non induites traitées avec, au-dessus AVD 50 µM, en dessous (226) 50 µM. Observation λ _{Ex} /λ _{Em} à 405/410-668 nm, laser 0,2 % à t ₀ , t ₁₀ , t ₃₀ min et t ₂₄ h.	197

Figure 67. Résumé des résultats importants des travaux menés sur la fluorescence et les effets des vismiones et dihydroanthracénones de synthèse dans des cellules BY-2 de Tabac. 199

Figure 68. Structures de la desacétylvismione H et des composés synthétiques 226 et 228. . 206

Liste des schémas

Schéma 1. Rétrosynthèse de l'okicénone et de l'aloésaponol III.	32
Schéma 2. Cyclisation oxydative pour former le squelette tricyclique.	33
Schéma 3. Schéma de rétrosynthèse ayant conduit à l'obtention de l'atrichryson (1) et de la torosachryson (18).	33
Schéma 4. Synthèse énantiosélective de la cyclohexénone (21).	34
Schéma 5. Etape permettant d'apporter l'énantiosélectivité de la voie de synthèse du composé ((R)-21).	35
Schéma 6. Cyclisation de Staunton-Weinreb.	35
Schéma 7. Annulation de Staunton-Weinreb pour former le squelette de l'olivine.	35
Schéma 8. Synthèse de la cyclohexénone (24).	36
Schéma 9. Etape diastéréosélective de la voie de synthèse de l'olivine.	37
Schéma 10. Synthèse énantiosélective de l'olivine.	38
Schéma 11. Structures des anthranoïdes isolés de <i>Psorospermum glaberrimum</i> par B. Lenta et leur activité anti- <i>Leishmania</i> (CI ₅₀ mesurées sur amastigotes axéniques de <i>L. donovani</i> par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine, ref. miltéfosine : CI ₅₀ = 0,47 µM).	58
Schéma 12. Dégradation successive des vismiones en anthrones puis en anthraquinones.	59
Schéma 13. Rétrosynthèse des anthrones <i>O</i> -alkylées à partir du noyau émodine.	59
Schéma 14. Obtention des anthrones à partir des vismiones par élimination.	60
Schéma 15. Synthèse des anthraquinones et anthrones correspondantes.	60
Schéma 16. Rétrosynthèse de l'émodine par double réaction de Diels-Alder sur une benzoquinone.	61
Schéma 17. Rétrosynthèse de l'émodine par réaction d'ortholithiation.	61
Schéma 18. Réaction d'alkylation de l'émodine.	62
Schéma 19. Anthraquinones obtenues par alkylation de l'émodine.	62
Schéma 20. Principe des réactions d'annélation de Hauser et de Staunton-Weinreb.	63
Schéma 21. Mécanisme de l'annélation de Hauser.	64
Schéma 22. Annélation de Hauser en utilisant un dérivé phtalide sulfone.	65
Schéma 23. Annélation de Hauser en utilisant un dérivé phtalide nitrile.	65
Schéma 24. Annélation de Hauser en utilisant le LHMDs comme base.	65
Schéma 25. Annélation de Hauser en utilisant un thiophénol.	65
Schéma 26. Annélation de Hauser entre un thiophtalide et une cyclohexénone.	66
Schéma 27. Annélation de Staunton-Weinreb.	66
Schéma 28. Approche de Staunton-Weinreb aboutissant à la synthèse des dihydroanthracénones.	67
Schéma 29. Polymérisation de la cyclohexénone en présence de diisopropylamine.	68
Schéma 30. Variante de la réaction de Staunton-Weinreb passant par un dérivé stannylé.	68
Schéma 31. Synthèse du 2-tributylstannyl-4,6-diméthoxybenzoate d'éthyle.	69
Schéma 32. Synthèse de la dihydroanthracénone à partir du composé stannylé.	70
Schéma 33. Synthèse de la dihydroanthracénone via une β-alkoxycyclohexénone.	70
Schéma 34. Numérotation des positions d'intérêt sur le squelette des dihydroanthracénones.	71
Schéma 35. Schéma général de synthèse des dihydroanthracénones.	72
Schéma 36. Synthèse du 2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoate d'éthyle à partir de l'acétoacétate d'éthyle.	73
Schéma 37. Formation des alcènes intermédiaires (<i>Z</i>) et (<i>E</i>).	74
Schéma 38. Synthèse de l'ester benzoïque diméthylé (84).	75
Schéma 39. Synthèse de l'ester benzoïque diprénylé (91a).	75

Schéma 40. Synthèse de l'ester benzoïque prénylé (93).....	75
Schéma 41. Tentatives de protection du groupement hydroxyle en position 2.....	76
Schéma 42. Synthèse des esters substitués en position 4.....	77
Schéma 43. Récapitulatif des esters alkylés synthétisés.....	78
Schéma 44. Rétrosynthèse des cyclohexénones O-alkylées à partir de différents substrats....	79
Schéma 45. Synthèse de cyclohexénones et d'une cyclopenténone alkylées et composés obtenus.....	80
Schéma 46. Voie de synthèse de cyclohexénones hydroxylées en position 3 selon Xu <i>et al.</i> ⁹¹	81
Schéma 47. Voie de synthèse de la 5-hydroxycyclohexénone acétylée.....	81
Schéma 48 Synthèse de la 3-ethoxy-5-hydroxycyclohex-2-én-1-one en partant du phloroglucinol.....	82
Schéma 49. Protection de l'hydroxyle en position 5.....	84
Schéma 50. Synthèse permettant potentiellement d'accéder à la 5-hydroxy-5-méthylcyclohexénone.....	85
Schéma 51. Aromatisation du cycle en milieu acide.....	85
Schéma 52. Aromatisation du composé obtenu après oxydation.....	86
Schéma 53. Méthylation de la cyclohexénone par une réaction de Grignard.....	86
Schéma 54. Tentative de méthylation sur la cyclohexénone.....	87
Schéma 55. Addition 1,4 en passant ou non par la formation d'un organocuprate.....	87
Schéma 56. Addition 1,2 sur une cyclohepténone.....	88
Schéma 57. Elimination de l'éthanol lors de l'étape de méthylation.....	88
Schéma 58. Voies de synthèses possibles des cyclohexénones à partir du cyclohexanetriol.....	89
Schéma 59. Synthèse de la cyclohexanone intermédiaire.....	90
Schéma 60. Voies de synthèse proposées pour l'obtention de la 5-hydroxy et de la 5-hydroxy-5-méthylcyclohexénone.....	91
Schéma 61. Double oxydation simultanée par le trioxyde de chrome.....	91
Schéma 62. Rétrosynthèse des 5-hydroxy- et de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone à partir du cyclohexanetriol.....	93
Schéma 63. Protection de la 3,5-dihydroxycyclohexanone par des groupements TBS.....	93
Schéma 64. Monoprotection du cyclohexanetriol par un groupement TBS.....	94
Schéma 65. Tentative de monoprotection du cyclohexanetriol d'après la littérature.....	94
Schéma 66. Mono- et di-protection des hydroxyles du cyclohexane triol par le TBS.....	95
Schéma 67. Voie de synthèse de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone en partant du cyclohexanetriol.....	96
Schéma 68. Schéma général de la synthèse des cyclohexénones sans groupe partant en position 3.....	98
Schéma 69. Cyclisation d'un cétoaldéhyde par aldolisation.....	99
Schéma 70. Schéma de rétrosynthèse des cyclohexénones sans groupe partant à partir du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane.....	99
Schéma 71. Régiosélectivité de l'hydroformylation de différentes oléfines.....	100
Schéma 72. Stabilisation du rhodium par l'oxygène conduisant à l'aldéhyde.....	100
Schéma 73. Proposition de synthèse de la cyclohexénone en partant du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane.....	101
Schéma 74. Réaction supposée de type SN2 entre le tBuOK et le substrat bromé.....	102
Schéma 75. Tentative de réaction « one pot » pour l'obtention de l'aldéhyde.....	102
Schéma 76. Proposition de synthèse de la cyclohexénone passant par la formation d'un organomagnésien.....	103
Schéma 77. Proposition de synthèse de la cyclohexénone en partant de l'acétylacétone mono-protégée par sous forme cétal.....	104

Schéma 78. Métathèse cyclisante en utilisant le catalyseur de Grubbs de première génération.	105
Schéma 79. Métathèse cyclisante en utilisant le réactif de Grubbs de seconde génération. ..	105
Schéma 80. Métathèse cyclisante en utilisant le réactif de Grubbs de seconde génération. ..	105
Schéma 81. Obtention d'une cyclohexénone et d'un macrocycle par métathèse.	106
Schéma 82. Voies d'obtention des cyclohexénones substituées en position 5 passant par une cyclisation par métathèse.	106
Schéma 83. Schéma de rétrosynthèse de la cyclohexénone à partir du but-3-énoate d'isobutyle.	107
Schéma 84. Proposition de synthèse de la cyclohexénone en partant du 2-methylpropyl but-3-énoate.	107
Schéma 85. Rétrosynthèse de la cyclohexénone hydroxylée en position 5 à partir du cyanoacétate d'éthyle.	109
Schéma 86. Synthèse de la cyclohexénone en partant du cyanoacétate d'éthyle.	110
Schéma 87. Protection puis tentative de saponification de l'ester.	110
Schéma 88. Obtention du diène à partir de l'ester.	111
Schéma 89. Obtention de la cyclohexénone hydroxylée en position 5 par métathèse à partir du diène.	112
Schéma 90. Synthèse de la cyclohexénone méthylée et hydroxylée sur la position 5 à partir de l'acétoacétate d'éthyle.	112
Schéma 91. Synthèse de l'amide de Weinreb en partant de l'acétoacétate d'éthyle.	113
Schéma 92. Synthèse de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone à partir de l'amide de Weinreb.	113
Schéma 93. Synthèse énantiosélective du β -hydroxyle ester.	114
Schéma 94. Alkylation énantiosélective d'une cétone.	115
Schéma 95. Synthèse de dihydroanthracénones C-alkylées en position 6.	116
Schéma 96. Essais de monodéprotection de l'hydroxyle en position 1.	117
Schéma 97. Stabilisation du tribromure de bore par une liaison hydrogène.	117
Schéma 98. Déprotection de l'hydroxyle sur la position 3 par l'acide bromhydrique.	118
Schéma 99. Synthèse de dihydroanthracénones alkylées en position 3.	120
Schéma 100. Synthèse du composé comportant un cycle non aromatique à 5 carbones.	120
Schéma 101. Déprotection de l'hydroxyle en position 1.	121
Schéma 102. Synthèse des dihydroanthracénones hydroxylées en position 6.	124
Schéma 103. Déprotection des dihydroanthracénones hydroxylées en position 6.	125
Schéma 104. Annélation de Staunton-Weinreb avec la cyclohexénone nue.	126
Schéma 105. Synthèse de la dihydroanthracénone hydroxylée en position 6 en partant d'une cyclohexénone ne possédant pas de groupe partant.	126
Schéma 106. Oxydation douce pour l'obtention des dihydroanthracénones à partir des composés intermédiaires.	127
Schéma 107. Rétrosynthèse des dihydroanthracénones méthylées et hydroxylées en position 6.	127
Schéma 108. Synthèse de la dihydroanthracénone hydroxylée et méthylée en position 6 en partant d'une cyclohexénone ne possédant pas de groupe partant.	128
Schéma 109. Oxydation douce pour l'obtention des dihydroanthracénones à partir des composés intermédiaires.	128
Schéma 110. Oxydation du composé déprotégé sur la position 6.	129
Schéma 111. Voie de synthèse s'affranchissant du couplage avec une cyclohexénone.	130
Schéma 112. Synthèse du composé (d) possédant un seul cycle aromatique.	130
Schéma 113. Synthèse de la 1-(4-bromophenyl)-butane-1,3-par Zhang <i>et al.</i>	131
Schéma 114. Synthèse de la dicétone (x).	131

Schéma 115. Synthèse de 1-aryl-1,3-butane-1,3-diones.	132
Schéma 116. Synthèse de la 1-aryl-1,3-butane-1,3-dione.	132
Schéma 117. Déprotection de la cétone par l'acide chlorhydrique.	133
Schéma 118. Essai de couplage direct.	133
Schéma 119. Récapitulatif des dihydroanthracénones synthétisées.	141
Schéma 120. Obtention de l'ester β -hydroxylé de manière classique et énantiosélective.	207
Schéma 121. Mesomeric forms of vismione H.	228

Liste des tableaux

Tableau 1. Activités anti- <i>Leishmania in vitro</i> des vismiones isolées de <i>P. glaberrimum</i> , décrites par J.-B. Gallé <i>et al.</i>	24
Tableau 2. Activités des vismiones isolées de <i>P. glaberrimum</i> sur amastigotes intramacrophagiques de <i>L. donovani</i>	27
Tableau 3. Teneur en vismiones et activité anti- <i>Leishmania</i> des extraits de <i>Psorospermum</i> ..	43
Tableau 4. Liste des extraits dichlorométhaniques et aqueux de <i>Psorospermum</i> dont la teneur en vismiones a été évaluée.	45
Tableau 5. Coefficients de corrélation des vismiones et activités sur amastigotes axéniques de <i>L. donovani</i>	52
Tableau 6. Essais d'obtention de la cyclohexénone hydroxylée à partir du phloroglucinol. ...	83
Tableau 7. Essais de protection du cyclohexanetriol par le benzylidène cétal.	92
Tableau 8. Etude de la réaction d'oxydation simultanée de deux hydroxyles.	97
Tableau 9. Conditions de réaction de substitution sur l'époxyde.....	108
Tableau 10. optimisation des conditions de réaction de la métathèse.	111
Tableau 12. Essais d'alkylation de la dihydroanthracénone	119
Tableau 12. Essais d'optimisation des conditions de couplage.....	122
Tableau 14. Activité anti- <i>Leishmania</i> des dihydroanthracénones synthétisées sur <i>L. donovani</i> – partie 1.	146
Tableau 15. Activité anti- <i>Leishmania</i> des dihydroanthracénones synthétisées sur <i>L. donovani</i> – partie 2.	149
Tableau 16. Activités anti- <i>Leishmania</i> comparées de la vismione H et du composé synthétique (226) sur <i>L. infantum</i>	149
Tableau 17. Evaluation de la cytotoxicité du composé (226) sur les cellules Hepa1.6, ThP1 et pNHDF.	150
Tableau 18. Activités anti- <i>Leishmania</i> des vismiones naturelles sur amastigotes intramacrophagiques de <i>L. donovani</i> . (Thèse J.-B. Gallé)	152
Tableau 19. Activité anti- <i>Leishmania</i> de l'extrait PGE2E sur des espèces à tropisme cutané.	154
Tableau 20. Activité de la vismione H sur des espèces à tropisme cutané.	155
Tableau 21. Activité d'extraits de <i>Psorospermum</i> et d'anthranoides naturels et de synthèse sur <i>C. albicans</i> et <i>A. fumigatus</i>	157
Tableau 22. Liste des composés testés dans le modèle végétal BY-2.....	182

Liste des abréviations

ACN :	Acétonitrile
APTS :	Acide Paratoluène Sulphonique
BALB/C :	<i>Albino Laboratory-Bred Strain Mouse</i>
BOM :	Benzyloxyméthyl Acétal
CCM :	Chromatographie Sur Couche Mince
CSA :	<i>Camphorsulfonic Acid</i>
DBU :	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]Undec-7-Ene
DCM :	Dichlorométhane
DDQ :	2,3-Dichloro-5,6-Dicyano-1,4-Benzoquinone
DFT :	<i>Density Functionnal Theory</i>
DIPA :	Diisopropylamine
DIPEA :	Diisopropyléthylamine
DMAP :	4-Diméthylaminopyridine
DMF :	Diméthyl Formamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DNA :	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DXP- REDUCTOISOMERASE :	1-Désoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Réductoisomerase
EOM :	Ethoxyméthyle
FBS :	<i>Fætal Bovine Serum</i>
FDA :	Di-Acétate De Fluoresceine
FPP :	Farnésyl Diphosphate
FTMS :	<i>Fourier Transform Mass Spectrometry</i>
GFP :	<i>Green Fluorecent Protein</i>
GGPP :	<i>Geranylgeranyl Diphosphate</i>
GMP :	Guanosine Monophosphate
GSK :	Glycogène Synthase Kinase 3
HPLC :	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRMS :	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
IFN :	Interféron
IS :	Indice De Sélectivité
LDA :	Diisopropylamidure de Lithium
LHMDS :	Lithium Bis(Trimethylsilyl)Amide
LM :	Leishmaniose Muco-Cutaneé
LRMS :	<i>Low Resolution Mass Spectrometry</i>
LV :	Leishmaniose Viscérale
M-CPBA :	Acide Métachloroperbenzoïque
MEP :	Méthylérythritol Phosphate
MIC :	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MMC :	<i>Minimum Microbicidal Concentration</i>
MTT :	Bromure De 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl Tétrazolium
NADPH :	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NE :	Non Evalué

NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i>
NMP :	<i>N-Méthyl-2-Pyrrolidone</i>
NMR :	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NO :	<i>Nitric Oxide</i>
ODC :	<i>Ornithine Décarboxylase</i>
PCC :	<i>Pyridinium Chlorochromate</i>
PEM :	<i>Photoelastic Modulator</i>
PI :	<i>Iodure De Propydidium</i>
PMM :	<i>Murine Peritoneal Macrophage</i>
P-TSA :	<i>Para-Toluenesulfonic Acid</i>
RFP :	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RMN :	<i>Résonance Magnétique Nucléaire</i>
ROS :	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RSA :	<i>Relation Structure-Activité</i>
SD :	<i>Standard Deviation</i>
SEP :	<i>Potential Energy Surface</i>
TA :	<i>Température Ambiante</i>
TBS :	<i>Terbutyldiméthylsylane</i>
TEA :	<i>Triéthylamine</i>
TES :	<i>Triéthylsilane</i>
TFA :	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
THF :	<i>Tétrahydrofurane</i>
TLC :	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TMEDA :	<i>Tetraméthylethylènediamine</i>
TNF :	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOF :	<i>Time Of Flight</i>
UV :	<i>Ultraviolet</i>
VCD :	<i>Dichroïsme Circulaire Vibrationnel</i>
VIH :	<i>Virus D'immunodéficience Humaine</i>
WHO :	<i>World Health Organization</i>
WT :	<i>Wild Type</i>

Introduction

I. Contexte et objectifs de la thèse

Des travaux entrepris au laboratoire par Bruno Lenta en 2007, basés sur une approche ethnopharmacologique, ont suggéré l'intérêt d'une Hypericacée tropicale pour ses propriétés antiprotozoaires, *Psorospermum glaberrimum*. En effet, celle-ci est traditionnellement employée au Cameroun dans le traitement de maladies parasitaires¹, précisément pour son activité antiprotozoaire vis-à-vis de parasites comme *Plasmodium* et *Leishmania*². Une première tentative d'isolement bio-guidé des principes actifs antiprotozoaires à partir de l'écorce de *P. glaberrimum* suggérait que des composés de nature anthranoïde (anthraquinones, anthrones, vismiones diversement substituées) puissent être responsables de l'activité anti-protozoaire mise en évidence dans l'extrait d'écorce étudié.

Parmi ces composés, la seule vismione isolée, l'acétylvismione D (AVD) présentait une activité anti-*Leishmania* inédite, sans cytotoxicité marquée associée ($CI_{50} = 90$ nM, IS = 6)³.

Dans la continuité de ces résultats préliminaires, les travaux de thèse J.-B. Gallé ont permis d'étendre cet intérêt à différentes espèces du genre *Psorospermum*. En effet, une activité anti-*Leishmania in vitro* a été mise en évidence dans dix espèces du genre (CI_{50} 0,14-0,69 μ g/mL) permettant d'isoler pour la première fois, grâce à une méthode d'extraction adaptée, plusieurs analogues de vismiones à partir d'un même extrait étudié (Gallé *et al.*, J Nat Prod, soumis)⁴.

En effet, l'extrait dichlorométhanique d'écorce de *P. glaberrimum* (PGE2E), à la fois disponible à l'échelle du gramme et ayant présenté une activité anti-*Leishmania in vitro* submicromolaire sans cytotoxicité associée importante (IS = 13), a fait l'objet d'un fractionnement adapté qui a abouti à l'isolement de 8 vismiones qui ont été testées sur amastigotes axéniques de *L. donovani* et également sur les stades sanguins de *P. falciparum*⁵ (Thèse J.-B. Gallé, 2015, Université de Strasbourg). Ces travaux ont montré pour la première fois que les vismiones isolées présentaient une sélectivité d'activité marquée vis-à-vis de *L. donovani in vitro* ($CI_{50} = 0,031-0,827$ μ M), l'activité antiplasmodiale étant moins marquée ($CI_{50} = 0,71-2,65$ μ M)³ (Gallé *et al.*, J. Nat. Prod, soumis).

Celles-ci diffèrent par leurs substitutions sur trois positions (**Figure 1**). Elles peuvent être *O*-prénylées ou *O*-géranylées sur la position 3, et/ou *C*-prénylées ou *C*-géranylées sur la position 2. La position 6, en plus de porter un méthyle, peut comporter un groupement hydroxyle libre ou être *O*-acétylée. Globalement, les composés *O*-alkylés en positions 3 semblent plus actifs que ceux *C*-alkylés en position 2. De plus, le groupement prényle semble favoriser l'activité par rapport au groupement géranyle. A ce stade, il restait difficile de tirer une conclusion sur l'influence de l'acétyle en position 6.

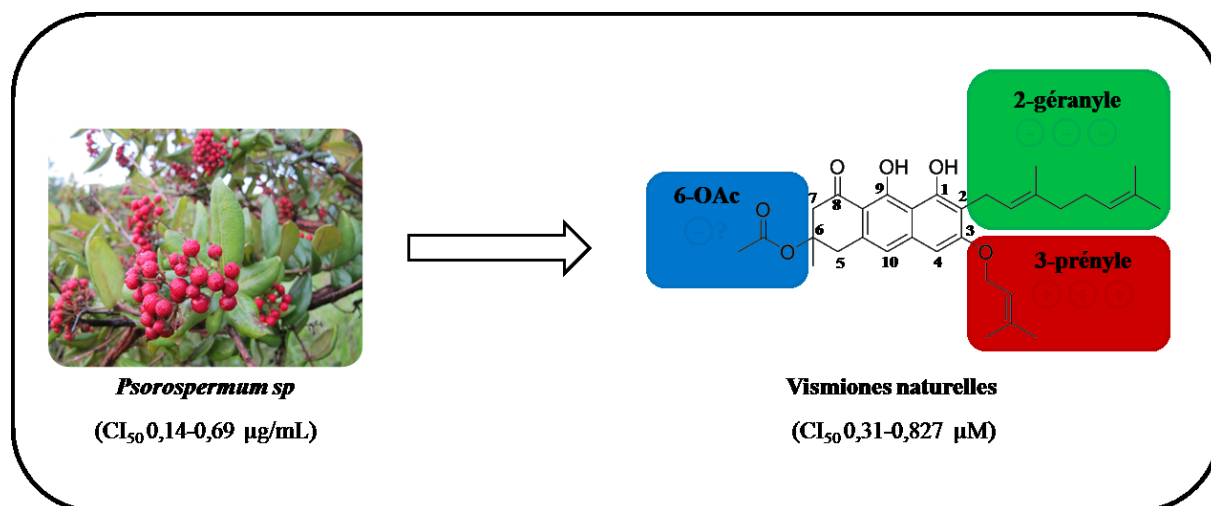


Figure 1. Positions de substitution des vismiones naturelles et leur effet sur l'activité anti-*Leishmania in vitro*.

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. donovani* ($n = 2$) par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat L6 par test à la résazurine.

Références : activité anti-*leishmania* : miltéfosine $CI_{50} = 0,144 \mu\text{M}$; cytotoxicité : podophyllotoxine $CI_{50} = 0,019 \mu\text{M}$.

+/- : Effet du substituant sur l'activité anti-*Leishmania*.

Par ailleurs, aucune des anthraquinones (35) et anthrones (10) commerciales, sélectionnées dans la Chimiothèque Nationale¹ ou obtenues par synthèse au laboratoire, n'a montré d'activité anti-*Leishmania* inférieure au μM . De plus, leur sélectivité est en moyenne très faible (<10).

¹ La Chimiothèque Nationale (CN) est un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) entre le CNRS et 41 établissements d'enseignement supérieur et de recherche. Elle a pour mission principale de regrouper les collections de produits de synthèse, de composés naturels et d'extraits naturels existants dans les laboratoires publics français et d'en promouvoir la valorisation scientifique et industrielle. Site internet : <http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr/index.php>

Enfin, une instabilité des vismiones en dehors de la matrice végétale a été mise en évidence, suggérant que les autres anthranoides précédemment isolés à partir du genre *Psorospermum* par différents auteurs puissent en réalité être des produits de dégradation des vismiones.

L'ensemble de ces résultats antérieurs à ce travail de thèse a permis de proposer l'hypothèse suivante : l'activité anti-*Leishmania* mise en évidence dans le genre *Psorospermum* pourrait être majoritairement portée par les formes vismiones.

Dans ce contexte, les objectifs de mes travaux de thèse sont les suivants :

- confirmer l'intérêt des vismiones isolées du genre *Psorospermum* pour leur activité anti-*Leishmania* ;
- approfondir l'activité mise en évidence en l'étudiant dans d'autres modèles *in vitro* et *in vivo* ;
- approfondir la relation structure-activité par la synthèse de vismiones diversement substituées ;
- développer un outil pharmacologique permettant d'approcher le site d'action des vismiones chez *Leishmania*.

Pour atteindre ces objectifs, la stratégie suivante a été définie et prend appuie sur un réseau de collaborateurs approprié :

- Quantifier les vismiones dans les différentes drogues (tronc, écorce, tige, fruits) des espèces de *Psorospermum* antérieurement identifiées comme anti-*Leishmania* par spectrométrie de masse (collaboration avec l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin à Bordeaux) ;
- Évaluer l'activité des extraits de ces drogues et des vismiones dans différents modèles :
 - activités anti-*Leishmania* sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* et cytotoxiques sur myoblastes de muscles squelettiques de rat L6 (déterminées par l'équipe de Marcel Kaiser au *Swiss Tropical and Public Health Institute* de Bâle au sein de la plateforme de criblage de référence mondiale sur les maladies parasitaires) ;
 - activités cytotoxiques sur cellules L6, Hepa1.6, ThP1 et nHDF (déterminées respectivement par l'équipe de Marcel Kaiser au *Swiss Tropical and Public Health Institute* de Bâle et par Flore Nardella à l'Institut de Parasitologie et de

- Pathologie Tropicale de Strasbourg, lors d'une collaboration avec le Pr Ermano Candolfi) ;
- activités anti-*Leishmania* sur promastigotes et amastigotes axéniques de *L. infantum* (déterminées par Yenny Lozano, Lucie Paloque et Sandra Bourgeade-Delmas au sein de l'UMR 152 IRD-UPS PHARMA-DEV dans l'équipe BIOCID à Toulouse, en collaboration avec le Dr Éric Deharo) ;
 - activités anti-*Leishmania* sur promastigotes et amastigotes axéniques de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyannensis* et *L. infantum* (déterminées par Katherine Milagros Carrillo Torres, Denis Castillo Pareja et Michel Sauvain, au sein du laboratoire mixte international LAVI UMR 152 IRD-UPS, Université Cateyano Heredia, Lima) ;
 - activités *in vivo* sur modèle murin de leishmaniose viscérale (déterminées par Sebastien Pomel dans l'équipe Biocis de l'UMR 8076 CNRS (collaboration avec le Pr Philippe Loiseau).
- Réaliser la synthèse :
 - De dihydroanthracénones diversement substituées, en se basant sur les travaux déjà initiés par J.-B. Gallé, afin de poursuivre l'étude de type Relation Structure-Activité entamée ;
 - D'un outil pharmacologique présentant une activité anti-*Leishmania* optimisée ;
 - De vismiones naturelles (synthèse totale) ;
 - Étudier les propriétés de fluorescence intrinsèque des vismiones naturelles dans un modèle végétal (collaboration avec Andréa Hemmerlin dans le cadre de la thèse de Quentin Chevalier, à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg).

Ainsi, le **premier chapitre** présente succinctement les données épidémiologiques existantes sur la leishmaniose, les traitements actuels et leurs limites, ainsi que les cibles moléculaires actuellement étudiées chez *Leishmania*. Il s'intéresse également aux dihydroanthracénones et aux vismiones. Les sources végétales de vismiones y sont citées, suivies d'un état de l'art sur leurs propriétés anti-*Leishmania*, leur utilisation en tant qu'outils pharmacologiques et les hypothèses sur le mécanisme d'action impliqué dans leur activité anti-*Leishmania*. Enfin, l'état de l'art sur la synthèse totale de vismiones naturelles est présenté.

Le **deuxième chapitre** présente les résultats de la quantification des vismiones et leur répartition dans les organes de différentes espèces de *Psorospermum*, et étudie la relation entre les teneurs en vismiones et l'activité anti-*Leishmania* des extraits.

Un **troisième chapitre** est consacré à la synthèse d'analogues structuraux des vismiones naturelles, dans le but de réaliser une étude de type relation structure activité, mais également d'obtenir un outil pharmacologique permettant d'approcher le mécanisme d'action intracellulaire des vismiones. Les essais de synthèse totale de vismiones naturelles y sont également décrits. Pour finir, dans l'optique de réaliser la synthèse énantiosélective de vismiones, la détermination de la configuration absolue de la vismione H, élucidée pour la première fois par dichroïsme circulaire vibrationnel, est relatée.

Le **quatrième chapitre** s'intéresse à l'activité biologique comparée des vismiones naturelles et de leurs analogues synthétisés. L'activité anti-*Leishmania* a été principalement étudiée sur différentes souches à tropisme cutané ou viscéral. L'activité antifongique de certains extraits de *Psorospermum* ainsi que de dihydroanthracénones a également été évaluée, sur la base de données bibliographiques également présentées. D'autre part, ce chapitre présente également l'évaluation de la stabilité de dihydroanthracénones de synthèse en comparaison de celle des vismiones naturelles. Ce chapitre décrit également les investigations relatives au mécanisme d'action des vismiones i) sur un modèle végétal exprimant une voie de biosynthèse exprimée chez *Leishmania*, ii) par l'étude des propriétés de fluorescence des vismiones.

Enfin, le **chapitre 5** est consacré à la discussion des résultats obtenus durant cette thèse et aux perspectives ouvertes.

Une partie expérimentale précède la bibliographie qui clot ce manuscrit. Comme il est d'usage au laboratoire, cette partie est rédigée en anglais.

Chapitre I

Données bibliographiques

I. Leishmanioses, traitements actuels et cibles moléculaires d'intérêt

Les parasites du genre *Leishmania* sont des protozoaires de l'ordre des Kinetoplastidés, de la famille des Trypanosomatidae, responsable d'une parasitose, la leishmaniose. Elle fait encore partie des maladies négligées, malgré le fait qu'elle représente la neuvième maladie infectieuse la plus importante et la deuxième cause de mortalité par une parasitose, après le paludisme⁶.

En effet, d'après l'OMS, 700 000 à un million de nouveaux cas sont déclarés chaque année, causant entre 20 000 et 30 000 décès⁷. Une vingtaine d'espèces sont impliquées dans ces parasitoses⁸.

I.1. Cycle parasitaire (Figure 2)

La leishmaniose est transmise par la piqûre du phlébotome femelle, qui injecte la forme promastigotes du parasite au cours d'un repas sanguin (1). Les promastigotes sont ensuite pris en charge par les macrophages de l'individu (2) à l'intérieur desquels les promastigotes se transforment en formes amastigotes (3). Les amastigotes, intracellulaires, font éclater les cellules infectées en se multipliant puis atteignent les tissus (4). Lors d'un nouveau repas sanguin sur un individu infecté, le phlébotome réabsorbe le parasite sous forme amastigote (5, 6). Les parasites se différencient à nouveau en promastigotes dans l'intestin du phlébotome (7), se multiplient et migrent dans la trompe, prêts à infecter un autre hôte (8).

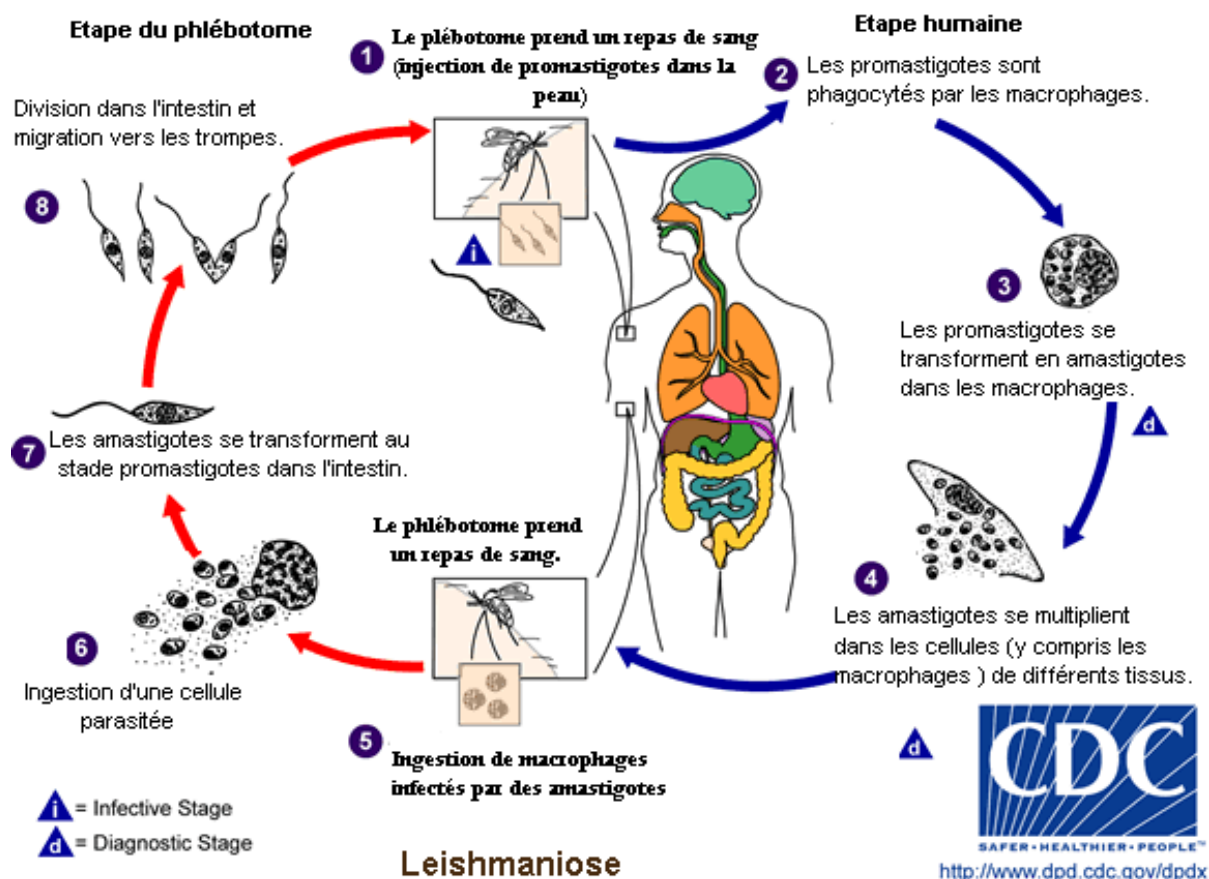


Figure 2. Cycle parasitaire de *Leishmania* sp.

I.2. Aspects cliniques⁹

Il existe trois formes de la pathologie chez l'homme, pouvant être bénignes mais pouvant également causer la mort de l'individu en l'absence de traitement¹⁰.

- **La leishmaniose cutanée (LC)** est la forme la plus fréquente. Elle provoque des lésions non-ulcératives disséminées, ressemblant à la lèpre. Les lésions apparaissent sur le site de la pique et peuvent guérir spontanément en quelques mois, en laissant toutefois des cicatrices. Les lésions s'élargissent graduellement, provoquant des rougeurs et devenant douloureuses. La résolution de ces lésions nécessite l'intervention des leucocytes, qui isolent la zone des tissus infectés et entraînent leur nécrose en formant un granulome. La leishmaniose cutanée est généralement causée par *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, dans le nouveau monde et par *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* et *L. peruviana* dans l'ancien monde.

- **La leishmaniose cutanéomuqueuse (LM)** cause une destruction des cavités bucconasale et oro-pharyngée, provoquant des lésions défigurantes, des mutilations de la face lourdement invalidantes. Cette forme de la pathologie est généralement causée par *L. braziliensis*, mais d'autres espèces peuvent également en être la cause : *L. aethiopica*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* et *L. panamensis*.

- **La leishmaniose viscérale (LV)** également appelée kala-azar est la forme la plus sévère et est mortelle en l'absence de traitement. L'infection peut dans certains cas être asymptomatique avant d'évoluer en une forme fatale de LV. Elle est caractérisée par des poussées irrégulières de fièvre, une perte de poids, une hépatosplénomégalie et une anémie. Des maladies opportunistes viennent souvent compliquer l'infection, notamment le VIH-sida, résultant de la faiblesse immunologique causée par le parasite. Celui-ci envahit les macrophages où il se multiplie, avant d'aller se disséminer dans le système réticuloendothélial, incluant le foie, la rate, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes. *L. donovani* est la principale espèce incriminée sur le continent indien et en Afrique de l'Est, tandis que *L. infantum* est situé dans le bassin méditerranéen et *L. chagasi* est responsable de la maladie en Amérique centrale et du Sud.

Dans notre étude, nous nous focaliserons essentiellement sur deux espèces viscérales (*L. donovani* et *L. infantum*) et dans une moindre mesure sur des espèces à tropisme cutané (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*).

La dermatose post-kala-azar est une lésion cutanée non ulcérateuse qui peut être contractée après guérison de la leishmaniose viscérale.

I.3. Traitements actuels

L'arsenal thérapeutique actuel permettant de combattre la maladie est limité. D'une part ces médicaments présentent de nombreux effets secondaires qui peuvent être sévères, en plus d'une durée de traitement longue et de prix élevés. D'autre part, de plus en plus de résistances du parasite apparaissent vis-à-vis de ces traitements¹¹.

I.3.1 Traitements de première ligne¹²

Les dérivés pentavalents de l'antimoine (Sb(V)) (Figure 3) sont le traitement de première intention dans de nombreux pays, mais sont progressivement remplacés en raison de taux de résistance allant jusqu'à 60%, en Inde et au Népal, notamment. Les seuls composés actuellement disponibles commercialement sont le stibogluconate de sodium (Pentosan[®]) et l'antimoniote de méglumine (Glucantime[®])¹¹. Leur toxicité les rend responsables d'effets secondaires hépatiques et cardio-vasculaires, ainsi que de myalgies et de douleurs abdominales, les contre-indiquant chez les femmes enceintes et les patients présentant des pathologies cardiaques, rénales ou hépatiques. Leur mécanisme d'action exact reste actuellement inconnu. Cependant des études ont montré que ces composés étaient capables d'interférer avec le système trypanothione/trypanothione réductase du parasite, le rendant vulnérable contre le stress oxydatif. D'autres études ont également montré que ce stress pouvait être induit par le cycle d'oxydo-réduction de l'antimoine Sb(V) en Sb(III)¹³. Enfin, il a été reporté que ces composés pouvaient également agir sur la topoisomérase I du parasite¹⁴.

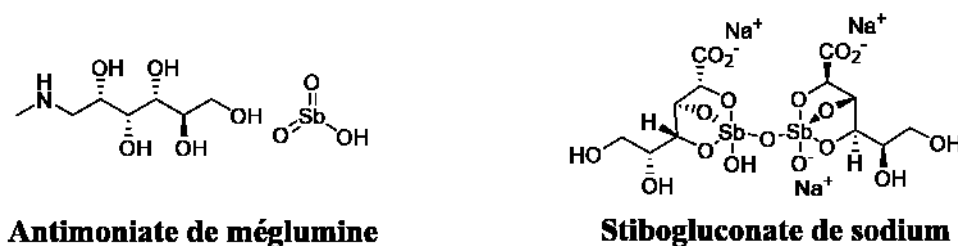


Figure 3. Structure des dérivés antimoniés.

I.3.2 Traitements de seconde ligne

Parmi ces traitements figurent la pentamidine, l'amphotéricine B, la miltéfosine et la paromomyine (Figure 4).

La pentamidine interfère avec la mitochondrie du parasite et l'activité de la topoisomérase I¹⁵. Administrée par voie parentérale, elle entraîne des nausées, une douleur abdominale, des maux de tête, des diarrhées, ainsi qu'une tachycardie, une baisse de la glycémie et une néphrotoxicité. Des analogues moins toxiques ont cependant été développés¹⁶.

L'amphotéricine B est également utilisée. Capable de se lier à l'ergostérol, elle perturbe la perméabilité membranaire et entraîne la mort cellulaire. Elle est utilisée dans les cas de LV résistante à la pentamidine ou lorsqu'il n'y a pas de réponse significative au traitement par les dérivés de l'antimoine. Elle est en outre active contre la LC et la LM¹⁷. Son administration par voie intra-veineuse provoquant des effets secondaires aux niveaux cardiaque, rénal et hépatique, une formulation liposomale a été développée (AmBizome[®]). Celle-ci permet de réduire significativement la néphrotoxicité¹⁸.

La miltéfosine (Impavido[®]), seul médicament disponible par voie orale, est également utilisée dans le traitement de la LV et est relativement bien tolérée par voie orale. Les effets secondaires principaux sont des maux de tête, des désordres gastro-intestinaux et un potentiel tératogène¹⁹. La miltéfosine est un analogue de phospholipide actif contre plusieurs espèces de *Leishmania*, dont des espèces responsables de la LC. La miltéfosine aurait plusieurs cibles moléculaires, agissant sur la signalisation cellulaire lipidique, induisant l'expression de l'oxyde nitrique synthase 2 ce qui produit du NO et des radicaux libres, ceci conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Elle est également capable d'induire la production de cytokines Th1 par les macrophages infectés, entraînant la production d'IFN- γ , permettant d'éliminer le parasite²⁰. La miltéfosine est stable par voie orale, mais sa longue demi-vie facilite l'apparition de résistances²¹.

La paromomycine, un aminoside, est administrée par voie intramusculaire, causant une douleur au point d'injection. D'autres effets secondaires comme une ototoxicité réversible, une néphrotoxicité ou une hépatotoxicité sont plus rares aux doses thérapeutiques employées pour le traitement des leishmanioses²². Une formulation pour un usage topique existe pour le traitement de la leishmaniose cutanée²³, facilitant l'administration du traitement et réduisant les effets secondaires²⁴. Elle provoque la dépolarisation de la membrane mitochondriale du parasite et un dysfonctionnement des ribosomes et de la respiration cellulaire ce qui contribuerait à l'activité antiparasitaire de la molécule²⁵.

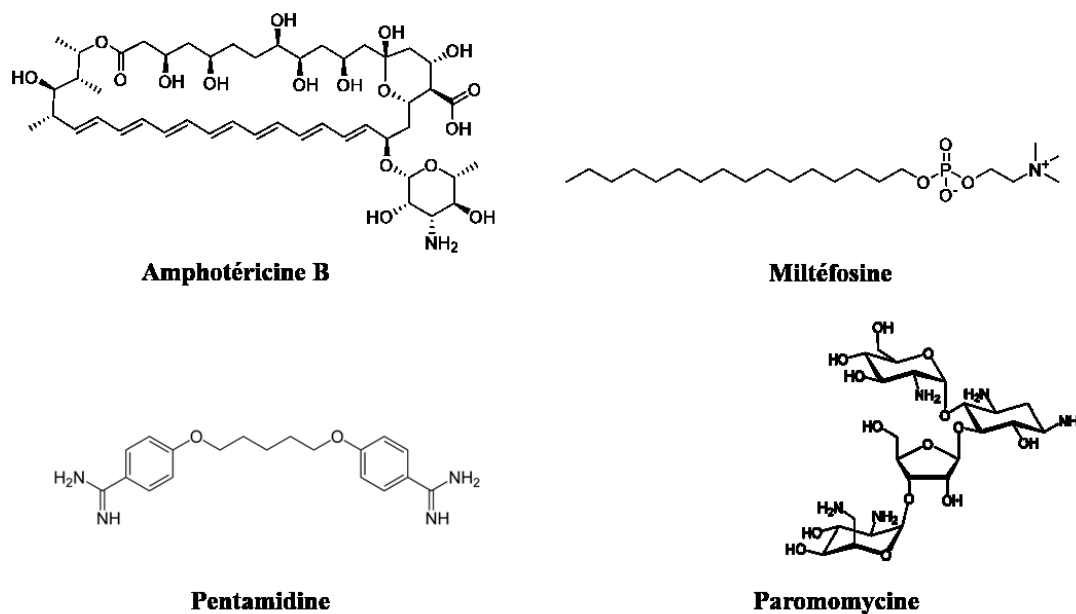


Figure 4. Structure des traitements de seconde ligne.

Enfin, **des dérivés azolés** comme le fluconazole sont utilisés par voie orale ou topique dans le traitement des LM et LC. Ils inhibent la synthèse de l'ergostérol, perturbant les membranes cellulaires du parasite.

Ces composés sont utilisés en association dans les schémas de thérapies actuelles. Le stibogluconate de sodium associé à la paromomycine offre par exemple un taux de guérison supérieur à 95%²⁶.

Enfin, des traitements locaux existent comme la cryothérapie ou la thermothérapie, dans le soins de la LC¹⁰.

I.4. Cibles moléculaires actuelles²⁷

Viser des cibles moléculaires spécifiques du parasite permettrait de réduire significativement les effets secondaires des traitements existants. Les principales voies métaboliques étudiées sont indiquées dans la **Figure 5**.

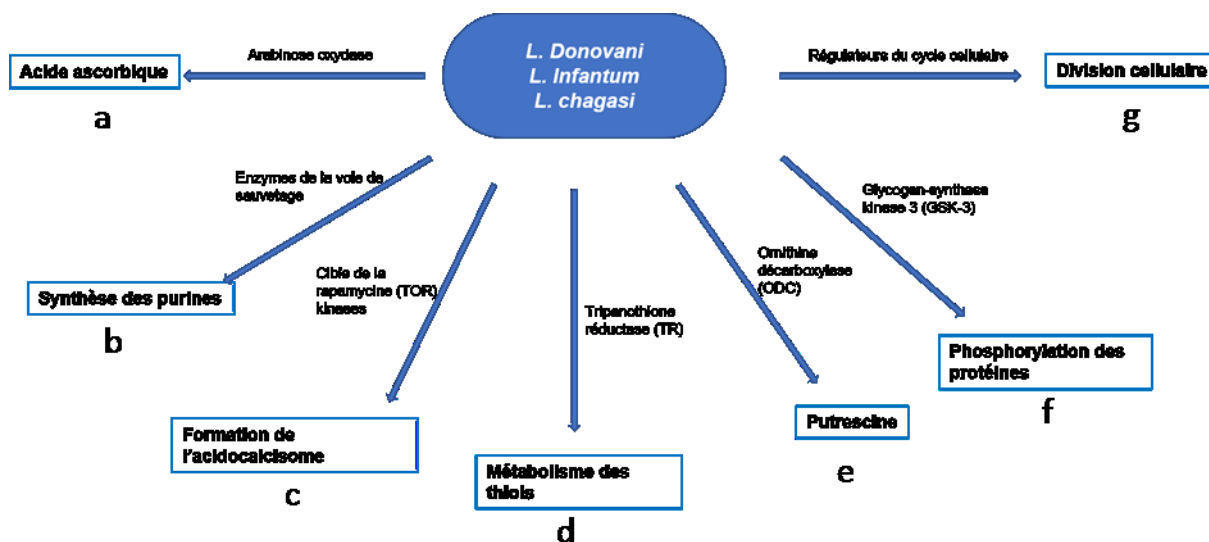


Figure 5. Cibles moléculaires pour le traitement de la leishmaniose

Voie de synthèse de l'acide ascorbique (a)

L'arabinose oxydase est une enzyme de la voie de biosynthèse de l'acide ascorbique chez *Leishmania*. Les mutants présentant une absence de cette enzyme ont montré une virulence atténuée et une baisse de la survie dans les macrophages. Ces mutants ont également montré une induction d'IFN- γ , IL-2 et de (TNF)- α , augmentant leur sensibilité au stress oxydatif²⁸. Une autre étude a démontré que les parasites génétiquement déficients en acide ascorbiques induisaient une immunité chez les souris Balb/c²⁸.

Voie de sauvetage des purines (b)

Le glycosome est une organelle spécifique aux kinétoplastidés, renfermant des voies métaboliques essentielles à la survie du parasite dont la voie de sauvetage des purines, la glycolyse et l'oxydation des acides gras. Les parasites du genre *Leishmania* sont incapables de réaliser la synthèse de purines *de novo*, et sont donc dépendants de celles de l'hôte et des enzymes spécifiques permettant leur recyclage. Une étude récente utilisant des mutants

présentant une déplétion de ces enzymes étaient incapables de se développer, même en présence de xanthine ou de guanine²⁹.

Régulation des kinases (c), (f)

Les kinases jouent également un rôle important dans la croissance, la survie et la virulence du parasite. La glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) a été étudiée comme cible potentielle. Des analogues bis-indoliques de synthèse de l'indirubine se sont révélés être des inhibiteurs sélectifs de la GSK-3 présente chez *Leishmania*, avec des CI_{50} de l'ordre du μM ³⁰.

Métabolisme des thiols (d)

La tripanothione est synthétisée par *Leishmania* afin de combattre le stress oxydatif et permet sa survie dans les macrophages. La trypanothione réductase (TR) parasitaire, sensiblement différente de celle présente chez les mammifères, est une cible de choix dans le traitement de la LV³¹.

Zahir *et al.* ont synthétisé des nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane, qui ont montré des activités de l'ordre du $\mu g/mL$ sur *L. donovani*³². Ces nanoparticules inhibent le complexe trypanothione/TR chez le parasite (d), et constitue une alternative sécuritaire et prometteuse dans le traitement de la LV.

Par ailleurs, plusieurs inhibiteurs de la TR ont été développés et certains se sont révélés plus actifs que la miltéfosine^{33,34}.

Biosynthèse des polyamines (e)

Les polyamines jouent un rôle important dans la croissance, le développement, la virulence et la survie du parasite. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des polyamines et de la spermidine, arginase, ODC et spermidine synthase, ont été étudiées comme potentielles nouvelles cibles dans le traitement de la LV³⁵⁻³⁷.

L'arginase est nécessaire à la synthèse des polyamines, et son absence entraîne la mort du parasite. Des études ont montré que certains flavonoïdes permettaient d'inhiber cette enzyme, entraînant une réduction de la croissance de *Leishmania*³⁸.

L'ornithine décarboxylase (ODC) permet la biosynthèse de la putrescine et joue un rôle dans la pathogénicité du parasite ainsi que dans la régulation de la tripanothione. Il existe une différence significative entre l'ODC humaine et celle de *Leishmania*, ce qui rend cette

cible particulièrement intéressante. La structure tridimensionnelle de l'ODC a été modélisée, conduisant à la création d'un inhibiteur, le ZINC67909154, qui s'est révélé être un potentiel candidat dans le traitement de la LV³⁹.

Régulation du cycle cellulaire (g)

Cibler la réplication et les mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi que les régulateurs clés du cycle est une autre voie d'approche intéressante pour développer de nouveaux traitements. La topoisomérase permet de relâcher les forces de torsion durant la réplication et la transcription de l'ADN, et maintient la stabilité du génome. Une altération de celle-ci conduit à la mort cellulaire. Les topoisomérases présentes chez *Leishmania* sont significativement différentes des topoisomérases humaines, en faisant des cibles de choix. Une étude sur des indéno-1,5-naphtyridines de synthèse a montré que ces dernières étaient capables d'inhiber sélectivement les topoisomérases chez *L. infantum* vis-à-vis des topoisomérases humaines⁴⁰.

Outre la recherche de nouvelles cibles, l'étude de nouveaux modes de délivrance des drogues actuelles est toujours d'actualité. Les nanotechnologies offrent de nouvelles possibilités pour augmenter leur efficacité et réduire leurs effets secondaires en permettant notamment un meilleur adressage des principes actifs vers leurs cibles^{41,42}.

Voie de prénylation des protéines

La prénylation des protéines est un processus vital chez *Leishmania*. Les protéines prénylées interviennent notamment dans la prolifération cellulaire, la différenciation et le trafic vers la membrane. La prénylation est effectuée par des prényl protéases. Une étude réalisée par Singhet *et al.* a mis en évidence la très faible similarité entre la CAAX prényl protéase II humaine et celle présente chez *L. donovani*, avec des différences importantes au niveau des sites actifs⁴³. De plus il a été montré que l'inhibition de cette enzyme entraînait une diminution significative de la croissance et de l'infectiosité du parasite⁴⁴. Les vismiones possédant toutes un groupement prényle ou géranyle, il est possible qu'elles interfèrent avec la voie de prénylation des protéines. L'effet des vismiones sur la prénylation a donc fait l'objet d'une étude dont les résultats sont décrits dans le quatrième chapitre.

En conclusion, de nombreuses nouvelles voies métaboliques sont étudiées, et de nombreuses enzymes impliquées dans ces voies sont significativement différentes de celles

présentes chez l'humain. Ceci permet d'espérer l'arrivée de nouveaux traitements, ainsi qu'une connaissance accrue du métabolisme chez *Leishmania*.

II. Vismiones et dihydroanthracénones

Les dihydroanthracénones, parfois appelées pré-anthraquinones^{45,46} sont des précurseurs des anthrones et anthraquinones retrouvées dans certains macro et micromycètes et végétaux supérieurs. Elles sont caractérisées par une structure tricyclique de base 3,4-dihydroanthracèn-1(2H)-one (**Figure 6**) sur laquelle sont présents différents substituants.

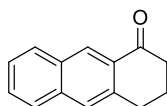


Figure 6. Structure de base des dihydroanthracénones.

Les vismiones se distinguent des dihydroanthracénones par la présence d'un ou plusieurs groupements dérivés de l'isoprène sur leur squelette.

Les dihydroanthracénones monomériques sont retrouvées dans plusieurs familles botaniques, principalement chez les Xanthorrhoeaceae, les Fabaceae et les Hypericaceae. Elles sont également retrouvées dans une moindre mesure chez les Rubiaceae, les Orchidaceae, les Ochnaceae et les Rhamnaceae. Des dihydroanthracénones dimériques sont retrouvées dans les genres *Senna* (Fabaceae) et *Karwinskia* (Rhamnaceae). Seule la fébruquinone a été isolée du genre *Psorospermum* (Hypericaceae).

Les vismiones quant à elles sont essentiellement été isolées d'Hypericaceae, en particulier des genres *Psorospermum*, *Vismia* et *Cratoxylum*^{5,47-49}.

Les dihydroanthracénones et les vismiones dérivent d'un noyau atrochrysonne (**1**) commun (**Figure 7**) :

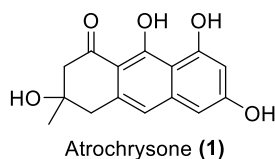


Figure 7. Structure de l'atrochrysonne.

Les voies de biosynthèse des vismiones sont encore peu connues. Abdel-Rahman *et al.* ont cependant proposé un schéma de biosynthèse à partir de travaux réalisés sur *Senna bicapsularis*⁵⁰ (**Figure 8**).

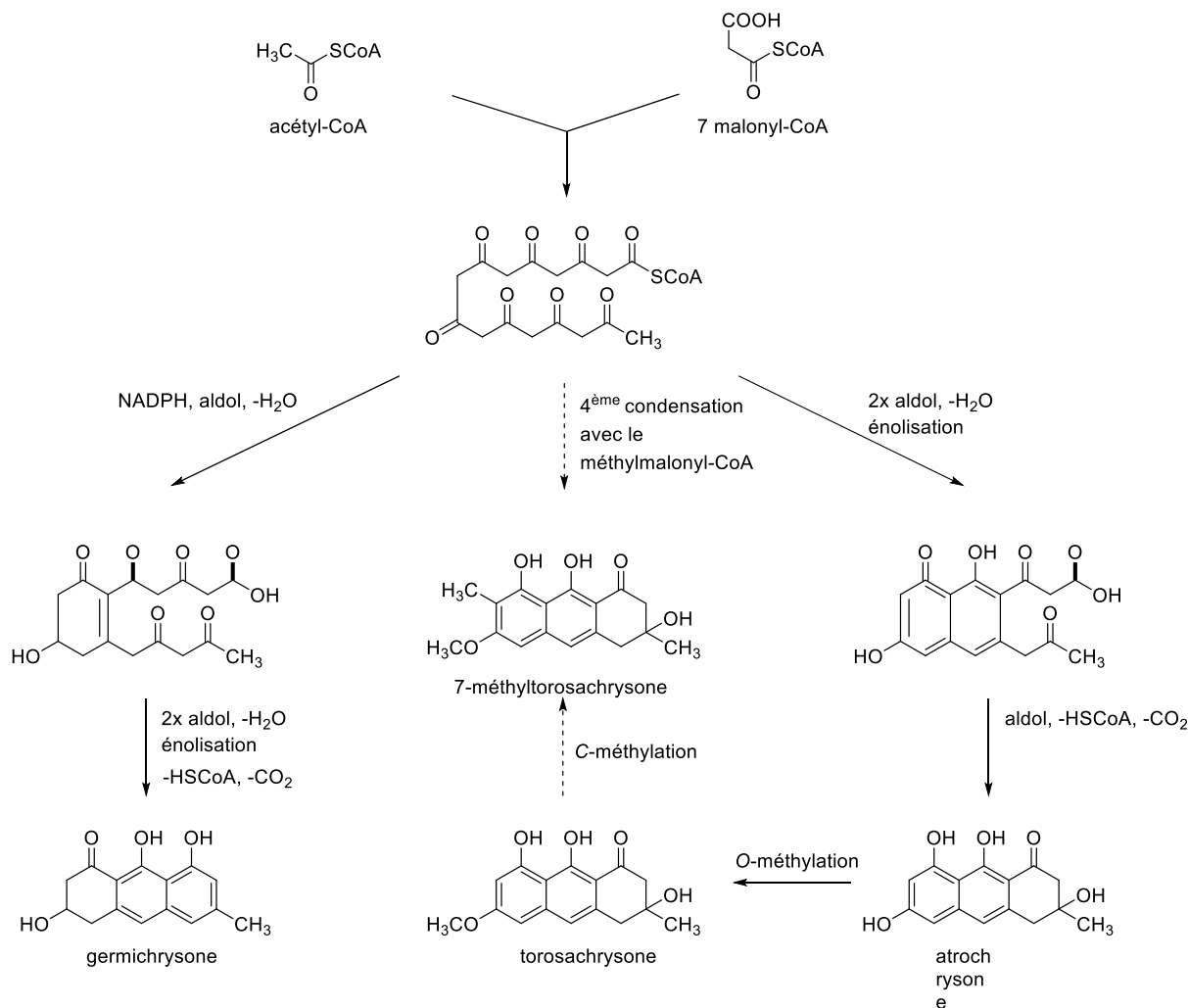


Figure 8. Voie de biosynthèse des dihydroanthracénones issues de *Senna bicapsularis*⁵⁰.

L'acétyl-CoA est condensé avec 7 unités de malonyl-CoA pour former une chaîne linéaire qui subit par la suite deux cyclisations successives pour aboutir à l'atrochryson (1). Les vismiones sont ensuite C- ou O-prénylées/géranylées par des enzymes de la famille des prényltransférases. A notre connaissance aucune prényltransférase spécifique des dihydroanthracénones n'a cependant été mise en évidence.

Sur le plan des activités biologiques, nombre de dihydroanthracénones décrites, ainsi que la plupart des vismiones, ont montré une certaine cytotoxicité vis-à-vis de plusieurs

lignées cellulaires^{47,51-55}. L'activité anti-plasmodiale des vismiones est bien décrite, et révèlent des activités de l'ordre du micromolaire, voire du submicromolaire dans le cas de la vismione H (**2**) et de l'acétylvismione D (**3**)^{3,5,47,53,56} (**Figure 9**).

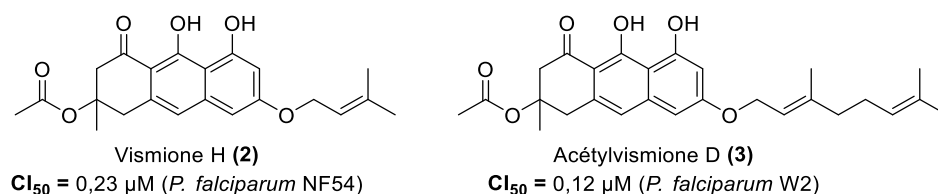


Figure 9. Structures de la vismione H et de l'acétylvismione D et activité anti-*Plasmodium*.

II.1. Vismiones et activité anti-*Leishmania*

Les activités anti-*Leishmania* ont en revanche été moins étudiées.

II.1.1 Activité sur amastigotes axéniques de *L. donovani*

La seule activité anti-*Leishmania* de vismiones a été reportée pour la première fois en 2004 par Mbwambo *et al.*⁵³. La vismione D (**4**) ainsi que plusieurs anthraquinones ont été isolées à partir d'extraits éthanoliques à 80% d'écorce de *Vismia orientalis* Engl. (**Figure 10**). La vismione D seule a présenté une activité intéressante sur amastigotes axéniques de *L. donovani* avec une valeur de $CI_{50} = 0,90 \mu M$. La cytotoxicité sur cellules L6 a été évaluée à $10 \mu M$, la vismione D a donc présenté un indice de sélectivité *L. donovani*/L6 de 11.

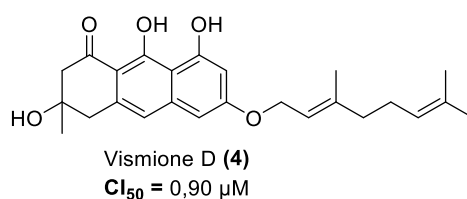


Figure 10. Structure de la vismione D et activité anti-*Leishmania* sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Décrite par Mbwambo *et al.*⁵³.

Une étude phytochimique basée sur une approche ethnopharmacologique a par la suite permis d'isoler l'acétylvismione D (**3**) à partir de l'écorce de *P. glaberrimum*³. Son activité a de nouveau été évaluée sur amastigotes axéniques de *L. donovani* et une valeur de $CI_{50} = 0,09 \mu M$ a été mesurée. La cytotoxicité a été évaluée sur des cellules myoblastiques de rat L6 ($CI_{50} = 12 \mu M$), et l'indice de sélectivité *L. donovani*/L6 a été évalué : IS = 133.

Ces travaux ont été poursuivis par J.-B. Gallé lors de sa thèse⁵. Jusque là, les différentes études phytochimiques de *Psorospermum* entreprises avaient abouti à l'isolement d'une majorité d'anthraquinones. L'usage de méthodes de purification alternatives lui ont cette fois-ci permis d'isoler 9 vismiones à partir de l'écorce de *P. glaberrimum*. L'activité de ces vismiones a également été évaluée sur amastigotes axéniques de *L. donovani* (**Tableau 1**). La cytotoxicité sur cellules L6 ainsi que sur macrophages a été évaluée.

Tableau 1. Activités anti-*Leishmania in vitro* des vismiones isolées de *P. glaberrimum*, décrites par J.-B. Gallé et al.^{4,5}.

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> CI_{50} (μM)	IS <i>L. donovani</i> /L6	IS <i>L. donovani</i> /PMM
Désacétylvismione H (5)		0,031	112	598
Vismione H (2)		0,057	15	268
Vismione D (4)		0,084	10	65
Vismione C (6)		0,098	55	266
Acétylvismione D (3)		0,149	6	478
Acétylvismione F (7)		0,320	5	59
Vismione M (8)		0,552	4	39
Vismione F (9)		0,827	10	31

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. donovani* (n = 2) par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat L6 par test à la résazurine.

Références : activité antileishmanienne : miltéfosine $CI_{50} = 114 \text{ nM}$; cytotoxicité : podophyllotoxine CI_{50} (L6) = 19 nM.

Les vismiones isolées de l'écorce de *P. glaberrimum* ont toutes présenté de bonnes activités anti-*Leishmania* vis-à-vis des amastigotes axéniques de *L.donovani* avec des CI_{50} submicromolaires. Les résultats confirment notamment l'activité de l'acétylvismione D ($CI_{50} = 0,149 \mu M$) avec cependant une variabilité au niveau de l'IS mesuré (IS = 6), et celle de la vismione D ($CI_{50} = 0,084 \mu M$, IS = 10).

La vismione H (**2**) et la désacétylvismione H (**5**) se sont révélées être les vismiones les plus actives avec des CI_{50} respectivement de 0,057 et 0,031 μM , et des indices de sélectivité *L.donovani*/L6 de 15 et 112 respectivement.

Ces résultats ont permis à J.-B. Gallé de tirer des premières informations présentées en introduction à ce travail sur la relation structure-activité des vismiones vis-à-vis d'amastigotes axéniques de *L.donovani*. Les composés *O*-prénylés ou géranylés sur la position 3 (**2, 3, 4, 5**) semblent posséder une meilleure activité que les composés *C*-prénylés ou géranylés sur la position 2 (**6, 7, 8, 9**). La longueur de la chaîne alkylée semble également avoir une influence : les composés prénylés (**2, 5, 6**) présentent de meilleures activités que les composés géranylés (**3, 4, 7, 8, 9**).

Certaines vismiones sont acétylées sur la position 6 (**2, 3, 6,7**), tandis que d'autres non (**4, 5, 8, 9**). Aucune conclusion n'a cependant pu être tirée par l'auteur à propos de l'influence de ce groupement acétyle sur l'activité.

II.1.2 **Activité sur amastigotes axéniques de *L. infantum***

Afin d'approfondir les recherches, J.-B. Gallé a également testé l'activité des composés les plus prometteurs, la vismione H et la désacétylvismione H sur une autre souche de *Leishmania* à tropisme viscéral, *L. infantum*. Les composés ont cette fois été testés sur les formes promastigotes et amastigotes du parasite, et la cytotoxicité a été évaluée sur les macrophages murins J774A.1. La vismione H et la désacétylvismione H ont à nouveau présenté de très bonnes activités sur les amastigotes axéniques de *L. infantum*, avec des CI_{50} respectivement de 0,077 et 0,03 μM . Ces valeurs sont comparables à celles obtenues sur les amastigotes axéniques de *L. donovani*, confirmant l'intérêt de ces deux vismiones. La cytotoxicité de ces composés sur les macrophages murins s'est révélée relativement faible avec des CI_{50} supérieures à 0,3 μM , ce qui confirme la sélectivité de ces composés pour le parasite. En revanche les activités sur les formes promastigotes sont beaucoup plus faibles, supérieures à 0,3 μM . L'auteur souligne la logique de ce résultat : la forme promastigote, retrouvée chez le vecteur, diffère morphologiquement et métaboliquement de la forme amastigote, retrouvée chez l'hôte^{11,57}.

Les activités convergentes des vismiones testées sur deux espèces de *Leishmania* à tropisme viscéral, mesurées dans des conditions expérimentales différentes et par des expérimentateurs différents sont à souligner tant elles viennent donner du poids aux résultats obtenus.

II.1.3 **Activité sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani***

Les vismiones isolées ont également été testées sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*, afin de se rapprocher du modèle réel (**Tableau 2**).

Tableau 2. Activités des vismiones isolées de *P. glaberrimum* sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*.

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> intraç (µM)	Cytotoxicité PMM (µM)	IS <i>L. donovani</i> /PMM
Désacétylvismione H		32	18	0,6
Vismione H		44	15	0,4
Vismione D		> 2	6	< 0,2
Vismione C		35	26	0,7
Acétylvismione D		> 66	71	< 1
Acétylvismione F		> 66	19	< 0,2
Vismione M		13	21	1,7
Vismione F		> 24	26	< 1

Les molécules ont été testées sur des cultures d'amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* (n = 1) par examen microscopique. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur macrophages murins par test à la résazurine.

Références : activité antileishmanienne intracellulaire : miltéfosine $CI_{50} = 3 \mu M$; cytotoxicité : podophyllotoxine CI_{50} (L6) = 19 nM ; CI_{50} (macrophage) = 75 nM.

Les activités sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* se sont montrées beaucoup plus faibles que sur amastigotes axéniques, avec des activités supérieures au micromolaire. Les indices de sélectivité sont également beaucoup plus faibles et sont quasiment tous inférieurs à 1. L'auteur indique cependant un biais possible dans l'étude : les tests ont été réalisés à partir de solutions stock anciennes, et les molécules ont pu être dégradées partiellement durant le laps de temps écoulé jusqu'aux tests. En effet, une étude préliminaire de stabilité a pu montrer lors de cette thèse que les vismiones sont très réactives et promptes à se dégrader en leur forme anthrone puis anthraquinone lorsqu'elles sont en solution dans le DMSO. La vismione H présenterait par exemple une demi-vie de 72 h.

Le niveau d'activité anti-*Leishmania*, leurs propriétés cytotoxiques vis-à-vis des macrophages et le caractère peu « drug-like » de ces molécules nous ont orienté vers leur évaluation en tant qu'outils pharmacologiques dans l'optique de mieux comprendre la biologie de ces parasites.

II.2. Utilisation des vismiones comme outils pharmacologiques

En effet, le profil physico-chimique et cytotoxique, ainsi que l'instabilité des vismiones ne rend pas ces composés propices pour en faire des candidats médicaments. En revanche, ils pourraient servir d'outils pharmacologiques afin d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le traitement de la leishmaniose.

Les vismiones et les dihydroanthracénones en général présentent une forte fluorescence dans le bleu-vert lorsqu'elles sont excitées à 366 nm^{5,58}. Cette caractéristique pourrait être mise à profit afin de les utiliser comme traceurs, permettant de les suivre au niveau intracellulaire par microscopie.

Aucune utilisation des vismiones comme sonde moléculaire n'a à ce jour été décrite. Cependant, les anthraquinones, structurellement proches, émettent également une forte fluorescence dans le rouge lorsqu'on les excite à 366 nm⁵⁹. Leur utilisation comme sondes fluorescentes a en revanche été décrite.

Malik *et al.* décrivent notamment l'utilisation du Reactive Blue 2 (RB-2), une anthraquinone substituée par un groupement chloro-triazinyle. Ce dernier apporte une affinité avec de nombreuses protéines et a largement été utilisé en biochimie et pharmacologie⁶⁰ (**Figure 11**). Dans cet exemple, l'anthraquinone sert uniquement de fluorophore.

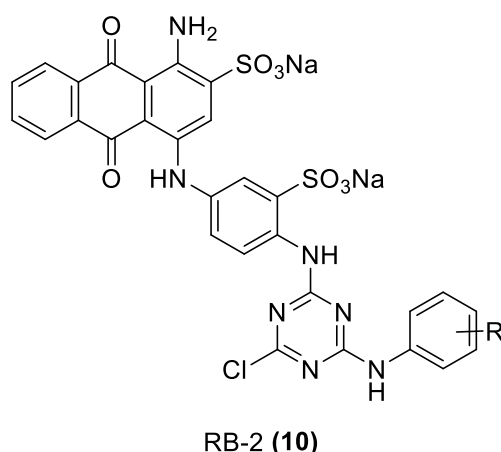


Figure 11. Structure du RB-2

Dans une review récente, Duval et Duplais décrivent l'utilisation des naphthoquinones et des anthraquinones comme traceurs naturels⁶¹(**Figure 12**). Le motif hydroxyle directement conjugué à un carbonyle favorise l'effet ESICT et entraîne une forte fluorescence. Les hydroxyles présents sur le squelette entraînent la formation de liaisons hydrogène, entraînant l'existence de différentes formes tautomères lors du transfert de proton. Ceci permet d'obtenir un spectre d'émission caractéristique à deux bandes. Cette fluorescence est fortement pH dépendante.

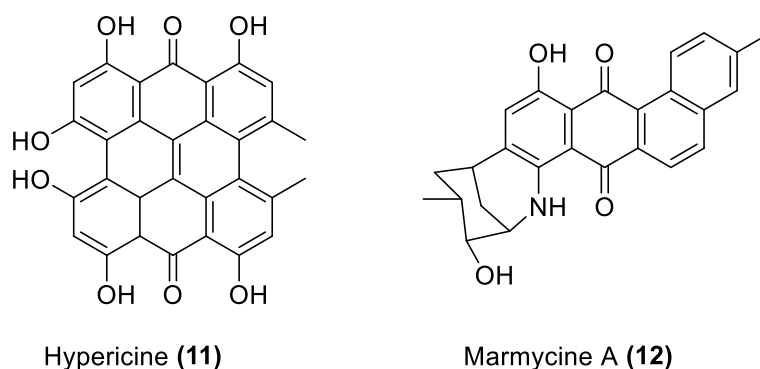


Figure 12. Structures de l'hypericine et de la marmycine A, utilisées comme traceurs.

L'hypericine (**11**), émettant dans le rouge (600-650 nm) lorsqu'elle est excitée à 570-590 nm, est utilisée dans le diagnostic de nombreux cancers. Elle s'accumule préférentiellement dans les tissus néoplasiques, permettant de les distinguer des tissus sains⁶². La fluorescence de ce composé a permis de comprendre le mécanisme conduisant à l'affinité accrue de l'hypericine pour les tumeurs en réalisant un suivi par microscopie confocale⁶³.

La marmycine (**12**) est un agent cytotoxique utilisé dans le traitement du cancer. Ses propriétés de fluorescence ont conduit à mettre en évidence que, contrairement aux autres agents cytotoxiques interagissant avec l'ADN, il n'était pas adressé au noyau mais subissait un adressage vers le cytosol via un système de vésicules⁶¹.

Les vismiones et dihydroanthracénones présentant également ce motif hydroxyle-carbonyle conjugués ainsi que plusieurs hydroxyles formant des liaisons hydrogène (**Figure 13**), leur usage comme traceurs dans le suivi intracellulaire de *Leishmania* est tout à fait pertinent et pourrait conduire à identifier la cible du parasite. De plus, la dépendance au pH de la fluorescence permettrait en théorie de distinguer la localisation dans des compartiments cellulaires présentant des pH différents.

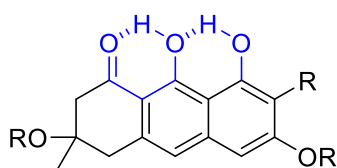


Figure 13. Structure générale des dihydroanthracénones présentant un motif hydroxyle-carbonyle conjugué.

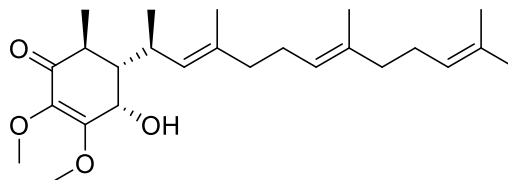
II.3. Hypothèses sur le mécanisme d'action des vismiones

Aucune étude sur le mécanisme d'action anti-*Leishmania* des vismiones n'a à ce jour été réalisée. Les quinones en revanche sont connues pour leur activité anti-*Plasmodium*⁶⁴, à travers un mécanisme d'oxydation-réduction⁶⁵. La proximité structurale avec les vismiones pourrait laisser présager un mécanisme similaire sur *Leishmania*. Cependant l'activité sélective sur *Leishmania*, par rapport aux anthraquinones,⁵ tend à conclure qu'un autre mécanisme entre en jeux.

Or toutes les vismiones isolées à partir du genre *Psorospermum* et actives sur amastigotes axéniques de *L. donovani* (**Tableau 1**) possèdent un groupement prényle ou géranyle. De plus, il est démontré que la voie de prénylation des protéines est primordiale à la survie de *Leishmania*^{66,67}. On peut donc supposer que les vismiones agissent par un mécanisme impliquant la voie de prénylation des protéines.

En effet certains dérivés quinoniques prénylés sont connus pour interagir avec cette voie métabolique. L'anthroquinolol ((**13**), **Figure 14**), une quinone prénylée, inhibe l'activité de l'isoprényltransférase, bloquant le signal Ras dans des cellules cancéreuses. Une étude de docking a montré que le motif isoprénoïde de l'anthroquinolol se liait dans la poche hydrophobe de la farnésyltransférase de la même manière que son substrat naturel. La

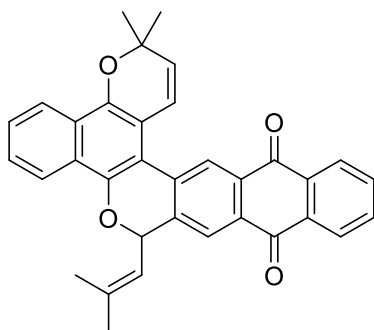
structure cyclique de l'anthroquinolol quant à elle se lie près du motif Ras-CAAX du site de liaison de l'enzyme.



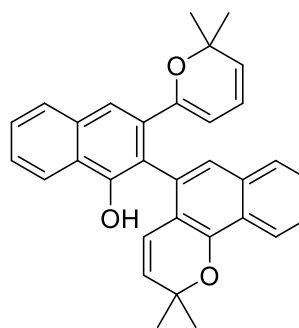
Anthroquinolol (13)

Figure 14. Structure de l'anthroquinolol.

La tecomaquinone (14) et le tecol (15), deux autres dérivés quinoniques, ont également montré une activité d'inhibition de la farnésyltransférase chez *Plasmodium*, pouvant servir de base pour une étude de RSA se basant sur le squelette de la tecomaquinone (Figure 15).



tecomaquinone (14)



tecol (15)

Figure 15. Structures de la tecomaquinone et du tecol.

Cette piste sera explorée lors de ce travail, en nous appuyant sur un modèle végétal exprimant les voies de biosynthèse des isoprénoïdes, développé par A. Hemmerlin à l'IBMP à Strasbourg.

II.4. Synthèse totale de dihydroanthracénones naturelles

Très peu de recherches ont été effectuées sur la synthèse totale de dihydroanthracénones d'origine naturelle, et à ce jour aucune synthèse totale de vismione n'est décrite.

Snider et Zhang ont synthétisé l'okicénone (**16**), initialement isolée à partir de *Streptomyces sp.*, et l'aloésaponol III (**17**), isolé à partir de plusieurs espèces du genre *Aloe*⁶⁸ (Schéma 1). Après déprotection de l'hydroxyle, le squelette tricyclique (**II**) est obtenu par cyclisation oxydative d'un composé intermédiaire (**III**) formé par alkylation de l'acétate de benzoyle. Celle-ci est formée soit par réaction de l'acétone sur un chlorure de benzoyle (**VI**), soit par condensation de Claisen entre l'acétone et une acétophénone (**V**).

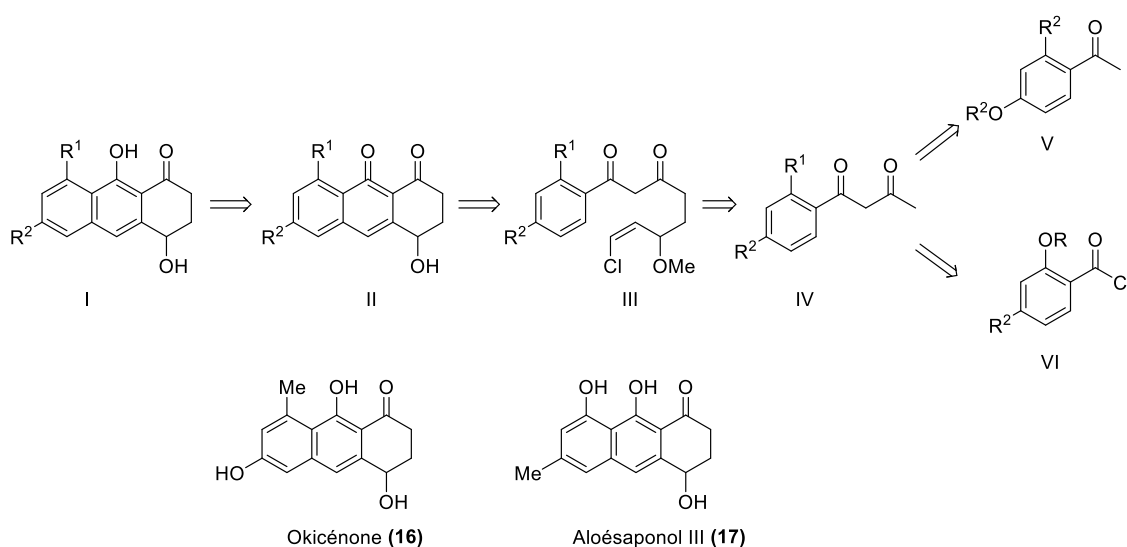


Schéma 1. Rétrosynthèse de l'okicénone et de l'aloésaponol III.

La cyclisation oxydative s'est révélée être l'étape limitante (Schéma 2). En effet plusieurs produits de polymérisation non caractérisés se sont formés, malgré la très courte durée de réaction. Malgré tout, l'okicénone et l'aloésaponol III ont été synthétisés avec des rendements globaux de 9,6% et 8,6%, respectivement.

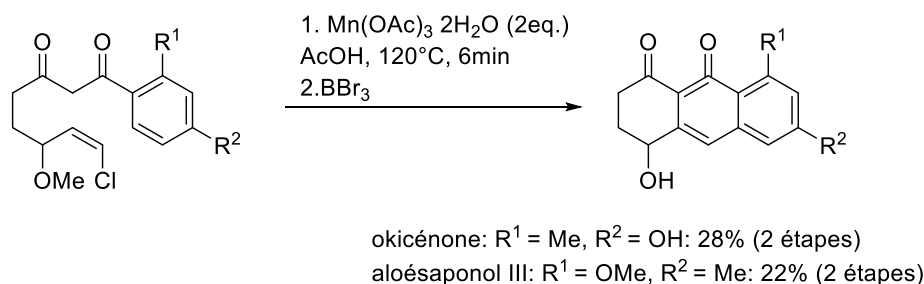


Schéma 2. Cyclisation oxydative pour former le squelette tricyclique.

Müller *et al.* quant à eux décrivent la synthèse de l'atrochrysonne (**1**), le noyau commun à toutes les vismiones naturelles, et de la torosachrysonne (**18**), notamment isolée à partir de *Cassia torosa*⁶⁹. Les deux énantiomères de chaque composé ont été synthétisés.

Le squelette tricyclique (**I**) est obtenu en réalisant une annélation de Staunton-Weinreb entre un dérivé de l'acide orsellinique (**III**) et une cyclohexénone (**II**)⁷⁰ (Schéma 3). La cyclohexénone est obtenue par cyclisation d'un dérivé d'acide carboxylique portant un éther d'énol (**IV**), lui-même formé à partir d'un diester (**V**).

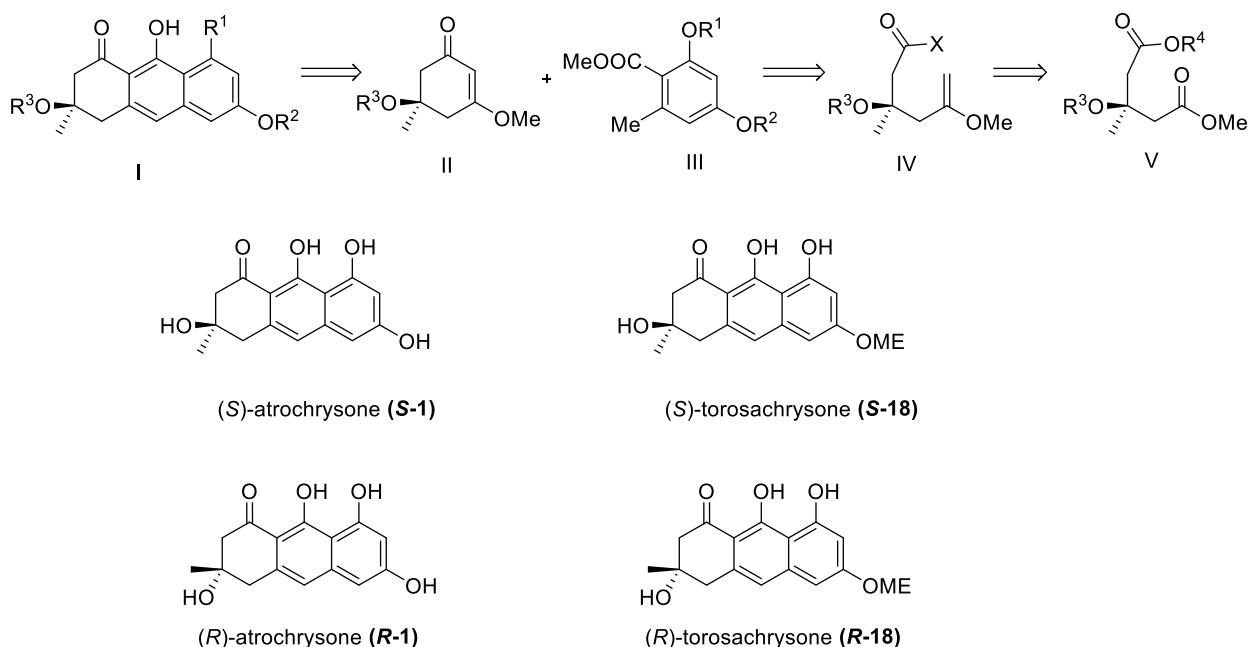


Schéma 3. Schéma de rétrosynthèse ayant conduit à l'obtention de l'atrochrysonne (**1**) et de la torosachrysonne (**18**).

L'annélation de Staunton-Weinreb est la réaction la plus fréquemment utilisée pour former le squelette dihydroanthraénone. Il s'agit d'une variante de l'annélation de Hauser. Cette dernière nécessite l'usage d'un phtalide stabilisé, conduisant à la formation d'un cycle *para*-hydroxylé, contrairement à l'annélation de Staunton-Weinreb qui utilise un orthotoluate. Ce dernier présentant un degré d'oxydation plus bas, il permet d'arriver à des composés tricycliques à un niveau d'oxydation plus bas également⁷⁰.

Les vismiones sont basées sur un noyau dihydroanthracénone comportant un carbone asymétrique en position 6. L'atrochrysonne naturelle est de configuration (*S*). Lors de la synthèse de dihydroanthracénones, cette énantiosélectivité est apportée lors de la synthèse de la cyclohexénone.

Dans le cas de l'énantiomère (*S*)- (**21**), l'ouverture désymétrisante de l'hétérocycle (**19**) est réalisée en utilisant le (*R*)-naphtyléthanol en présence de DMAP dans le dichlorométhane (**Schéma 4**). La réaction a été maintenue à 60 °C pendant plusieurs jours pour arriver à un rendement de 75%. La cyclohexénone a été obtenue avec un rendement global de 16%.

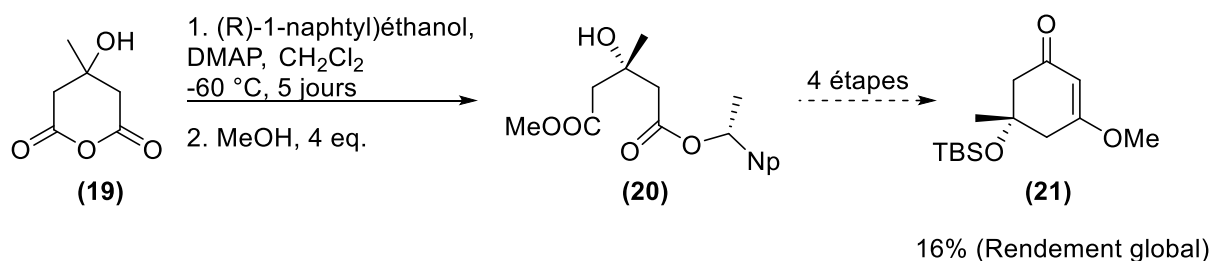


Schéma 4. Synthèse énantiosélective de la cyclohexénone (**21**).

L'énantiomère (*R*)- (**21**) est lui obtenu au départ d'un diester symétrique (**22**), qui réagit avec une estérase de porc à pH 8 pour donner un monoacide (**23**) avec 92% de rendement (**Schéma 5**). La cyclohexénone (*R*) est obtenue avec un rendement global de 53%.

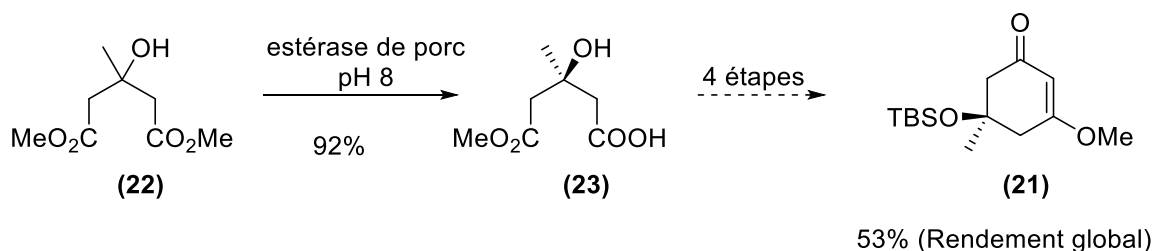


Schéma 5. Etape permettant d'apporter l'énantiosélectivité de la voie de synthèse du composé ((R)-21).

La cyclisation de Staunton Weinreb s'effectue dans le THF à -78°C en présence de LDA avant d'ajouter la cyclohexénone. Les dihydroanthracénones ont été obtenues avec des rendements ne dépassant pas 25% (Schéma 6). La déprotection du groupement TBS s'est ensuite effectuée à l'aide d'acide fluorhydrique dans l'acétonitrile.

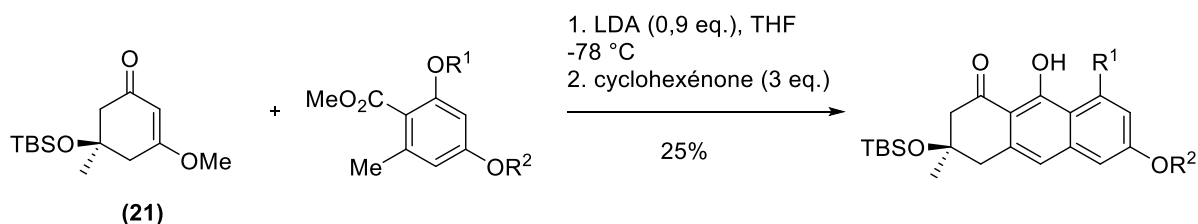


Schéma 6. Cyclisation de Staunton-Weinreb.

Deux synthèses totales de l'olivine sont également décrites. La première a été décrite par Dodd et Weinreb⁷¹, et met bien évidemment en jeu un couplage de Staunton-Weinreb entre une cyclohexénone (25) et un dérivé de l'acide orsellinique (24) (Schéma 7). L'olivine protégée par un groupement TBS (26) a été obtenue avec un rendement de 40%.

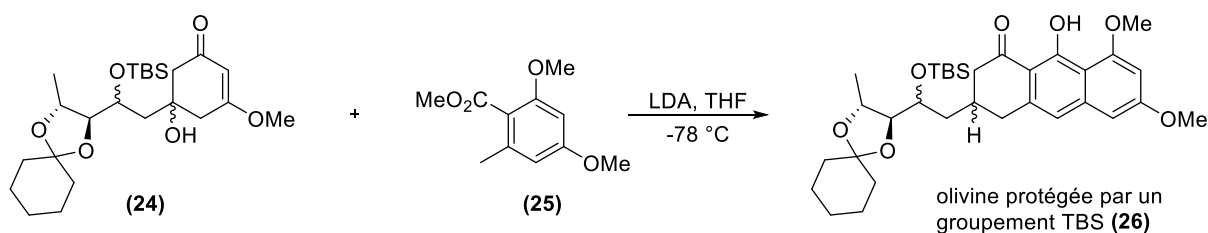


Schéma 7. Annulation de Staunton-Weinreb pour former le squelette de l'olivine.

La synthèse de la cyclohexénone racémique a été réalisée (**Schéma 8**). Le dithiolane (**27**) est acylé par l'ester benzoïque (**28**) en présence de *n*-BuLi pour donner le composé (**29**). La cétone est réduite quantitativement par le tétrahydroborate de sodium pour donner l'alcool (**30**) sous la forme de deux diastéréoisomères utilisés en mélange. La réduction de Birch entraîne la formation du composé (**31**) qui est rapidement hydrolysé en une dicétone qui est immédiatement méthylée par le diazométhane pour donner la cyclohexénone (**32**) dont l'hydroxyle secondaire libre est protégé par un groupement TBS pour obtenir la cyclohexénone finale (**24**). En revanche la publication ne décrit pas la déprotection de l'hydroxyle après cyclisation.

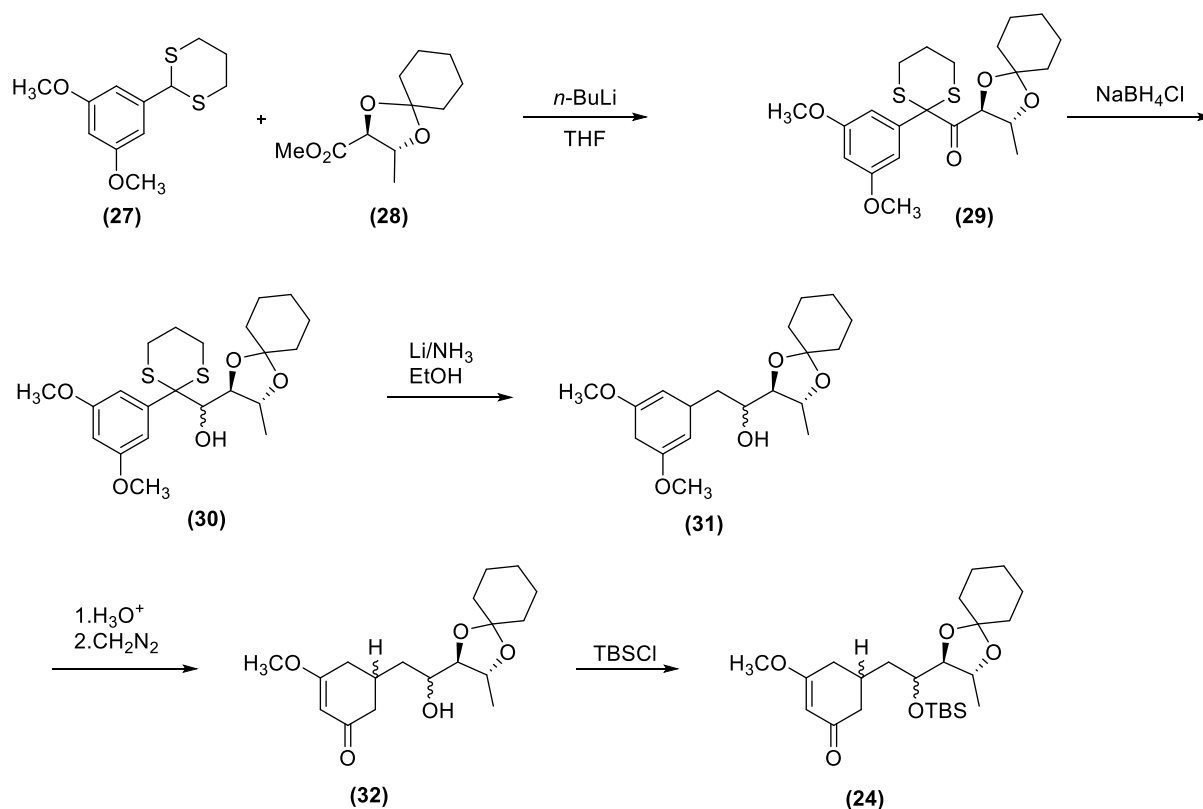


Schéma 8. Synthèse de la cyclohexénone (24).

La deuxième synthèse est proposée par Roush *et al.* et décrit la synthèse totale de l'énantiomère naturel de l'olivine (**Schéma 10**). Elle ne passe pas par la cyclisation de Staunton-Weinreb.

Le traitement de l'aldéhyde (**33**) par le réactif de Gilman dans un mélange éther/THF contenant du TMSCl a permis d'obtenir (**34**) avec 91% de rendement (Schéma 9).

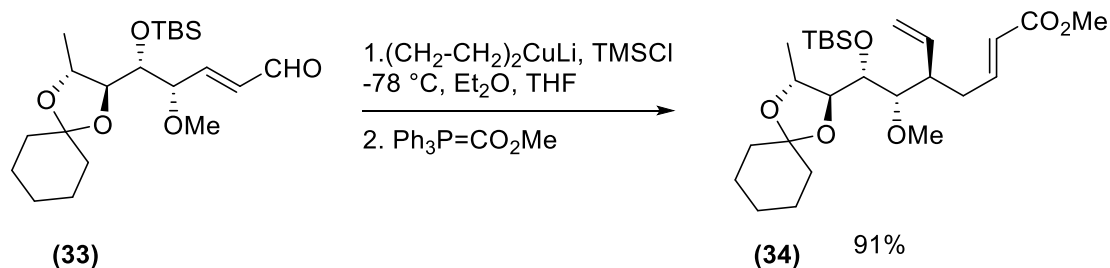


Schéma 9. Etape diastéréosélective de la voie de synthèse de l'olivine.

(**36**) est obtenu par annélation de Hauser avec un phtalide à partir de (**35**) avec un rendement de 40%. L'hydroxyle libre est ensuite protégé par un groupement BOM. Le groupement vinyle est oxydé en aldéhyde (**37**) puis en ester (**38**) avec un rendement de 85%. Le troisième cycle est formé en réalisant la condensation de Dieckmann sur (**38**) avec un excès de *t*-BuOK dans le benzène, puis en effectuant une saponification suivie d'une décarboxylation avec de l'hydroxyde de sodium au reflux de l'éthanol, et la dihydroanthracénone (**39**) est ainsi obtenue avec 60% de rendement. Après clivage du TBS, l'oxydation de Swern engendre la formation de la cétone acyclique (**40**) avec 90% de rendement. Le carbonyle présent sur la structure tricyclique est ensuite transformé sélectivement en éther d'énol silylé qui par oxydation conduit à la formation de l'hydroxycétone (**40**) avec 76% de rendement. Les groupements protecteurs ont ensuite été clivés pour donner l'olivine (**41**).

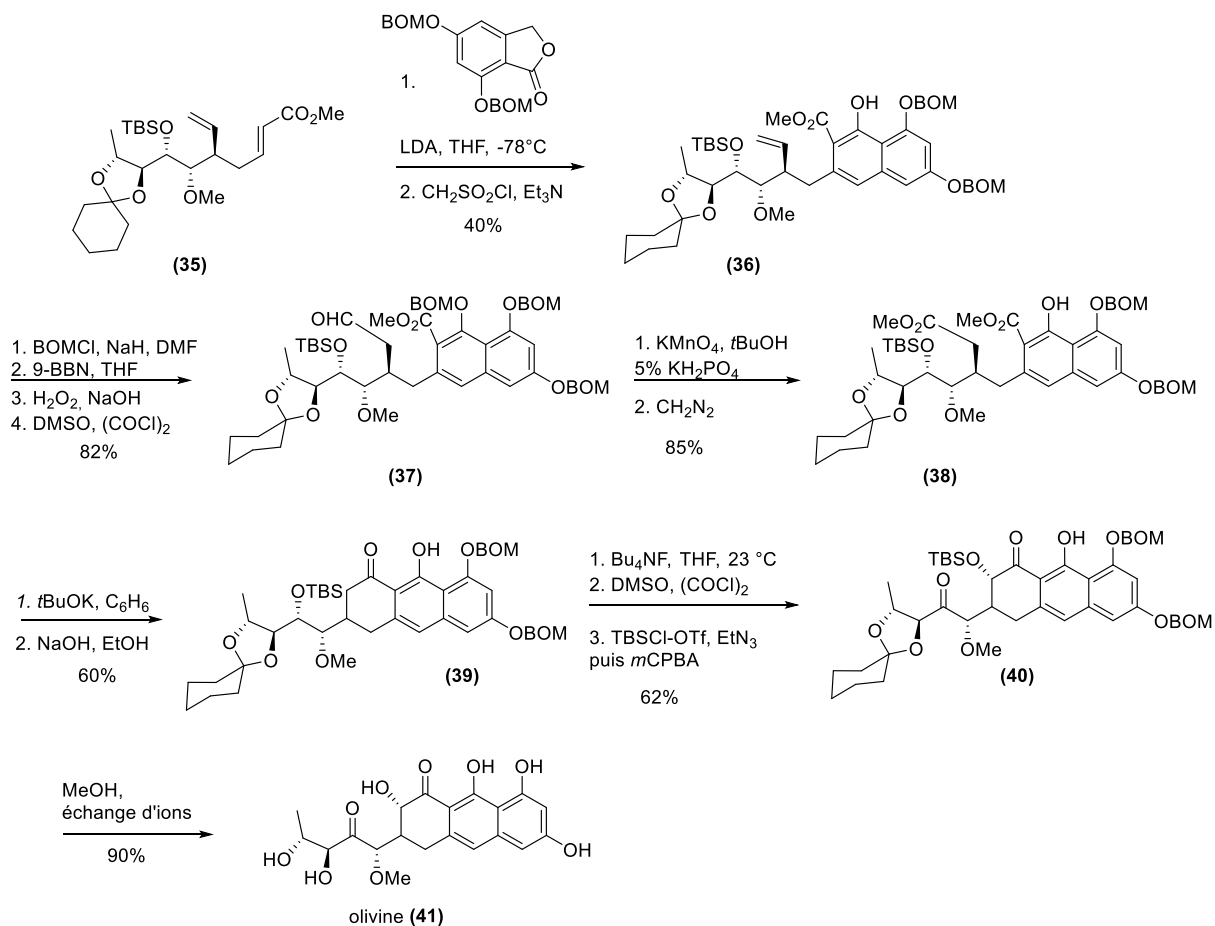


Schéma 10. Synthèse énantiosélective de l'olivine.

Roush *et al.* ont ensuite réalisé la synthèse totale de olivomycine A, qui correspond à l'olivomycine glycosylée. Pour ce faire, ils sont partis de l'olivine, sur laquelle ils ont successivement greffé les différents oses⁷² (Figure 16).

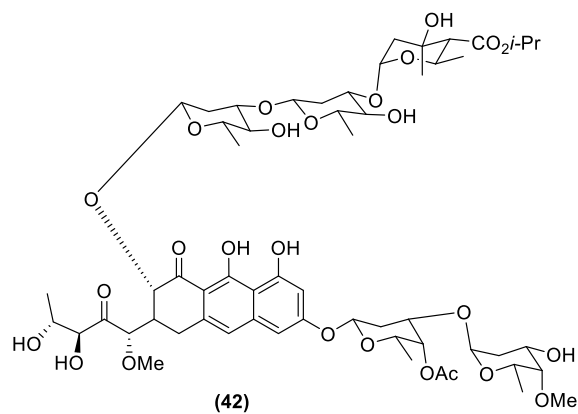


Figure 16. Structure de l'olivomycine A.

Chapitre II

Dosage des vismiones dans les extraits de *Psorospermum*

I. Introduction

Afin de mesurer la teneur en vismiones des différents extraits, un dosage par LC-FT/MS des différentes vismiones isolées de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* PGE2E a été réalisé en collaboration avec Axel Marchal à l'Institut de Sciences de la Vigne et du Vin de Bordeaux (Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA). Leur unité possède en effet une U-HPLC couplée à un détecteur Orbitrap permettant une quantification précise de nos composés dans les extraits.

C'est à partir de l'extrait dichlorométhanique de l'écorce de *P. glaberrimum* que les vismiones présentant une activité anti-*Leishmania* (Tableau 1) ont été antérieurement isolées. Des extraits dichlorométhaniques et aqueux, reproduisant le mode de préparation traditionnel, obtenus au laboratoire à partir de différentes espèces du genre et de leur différents organes ont également montré une activité anti-*Leishmania*, à des degrés divers (Tableau 3).

Tableau 3. Teneur en vismiones et activité anti-*Leishmania* des extraits de *Psorospermum*.

Extrait	Teneur en vismiones (% dans l'extrait)	<i>L. donovani</i> amastigotes axéniques CI ₅₀ (µg/mL)
APFT	0,1	>100
APCE2Tc	0,4	>100
APGE2T	0,5	>100
APGE2E	0,4	67,6
PGE2E	57,2	0,69
POE	37,3	0,26
PFLOTc	50,4	0,18
PCET	55,4	0,18
PFFR	5,3	0,17
PCE2FR	6,3	0,17
PCE2Tc	46,4	0,17
PKTc	53,1	0,15
PGE2Tc	57,2	0,14

PF = *P. febrifugum*; PGE = *P. glaberrimum*; PA = *P. adamauense*; PCE = *P. corymbiferum*; PFLO = *P. floribundum*; PGLO = *P. glaucum*; PGU = *P. guinense*; PK = *P. kerstingii*; PO = *P. aurantiacum*.

Un panel d'extraits dichlorométhane de plusieurs organes des différentes espèces de *Psorospermum* ainsi que quatre extraits aqueux ont été sélectionnés (**Tableau 4**). Ces extraits ont été réalisés en 2013 à partir d'échantillons de plantes récoltés au Cameroun dans quatre localités : Balatchi, Bangoua, Boneck, Ekombitié, indiquées sur la carte ci-dessous (**Figure 17**). Ces extraits ont été conservés à 4°C, et leurs profils HPLC ont démontré de leur stabilité dans le temps.



Figure 17. Provenance des échantillons de *Psorospermum*.

La première étape de notre travail a été de déterminer si l'activité anti-*Leishmania* ainsi mise en évidence dans le genre *Psorospermum* était bien positivement corrélée à la teneur en vismiones. A cette fin, un dosage par LC-FTMS des différentes vismiones isolées de l'écorce de *P. glaberrimum* a été réalisé dans ces extraits.

Tableau 4. Liste des extraits dichlorométhaniques et aqueux de *Psorospermum* dont la teneur en vismiones a été évaluée.

Espèce	Localité	Organe	Code
<i>P. adamauense</i>	Boneck	Fruit	PAFr
		Tige	PAT
<i>P. corymbiferum</i>	Boneck	Fruit	PCEFr
		Tige	PCET
	Ekombitie	Fruit	PCE2Fr
		Tronc	PCE2Tc
			APCE2Tc
<i>P. febrifugum</i>	Bangoua	Fruit	PFFr
		Tige	PFT
			APFT
<i>P. floribundum</i>	Boneck	Fruit	PFLOFr
		Tronc	PFLOTc
<i>P. glaberrimum</i>	Ekombitie	Fruit	PGEFr
	Boneck	Ecorce	PGE2E
			APGE2E
		Fruit	PGE2Fr
		Tige	PGE2T
			APGE2T
	Tronc	PGE2Tc	
<i>P. glaucum</i>	Ekombitie	Fruit	PGLOFr
		Tige	PGLOT
<i>P. guineense</i>	Balatchi	Ecorce	PGUE
		Fruit	PGUFr
		Tige	PGUT
		Tronc	PGUTc
<i>P. kerstingii</i>	Boneck	Fruit	PKFr
		Tige	PKT
		Tronc	PKTc
<i>P. aurantiacum</i>	Balatchi	Ecorce	POE
		Fruit	POFr
		Tige	POT

Extraits dichlorométhane

Extraits aqueux

Troncs, écorces, tiges et fruits de différentes espèces de *Psorospermum* récoltés par J.-B. Gallé dans quatre localités situées au Cameroun. Extraits obtenus en 2013 et conservés à sec à 4°C jusqu'à utilisation

II. Répartition des vismiones en fonction des organes

Les extraits dichlorométhaniques, toutes espèces et organes confondus, présentent des teneurs en vismiones totales comprises entre 22,1 et 572,3 mg/g d'extrait, soit 2,2-57%. En revanche, les extraits aqueux étudiés, comme attendu, présentent des teneurs en vismiones bien plus faibles, voire nulle pour l'extrait de tronc de *P. febrifugum* (**Figure 18**).

La répartition en vismiones totales est différenciée en fonction des organes considérés, indépendamment de l'espèce, à l'exception de la tige de *P. guineense*. En effet, les vismiones sont présentes en forte proportion dans les écorces, tronc et tiges des espèces étudiées avec des teneurs allant de 96 à 572 mg/g d'extrait, soit entre 9,6 et 57,2% de l'extrait (**Figure 18**). Les teneurs les plus importantes se concentrent dans les écorces et les troncs. Les fruits présentent des teneurs plus faibles en vismiones largement inférieures aux autres organes, soit entre 2,2 et 7,6% de l'extrait. Les extraits aqueux contiennent des quantités très faibles de vismiones, entre 0,11 et 0,48% de l'extrait.

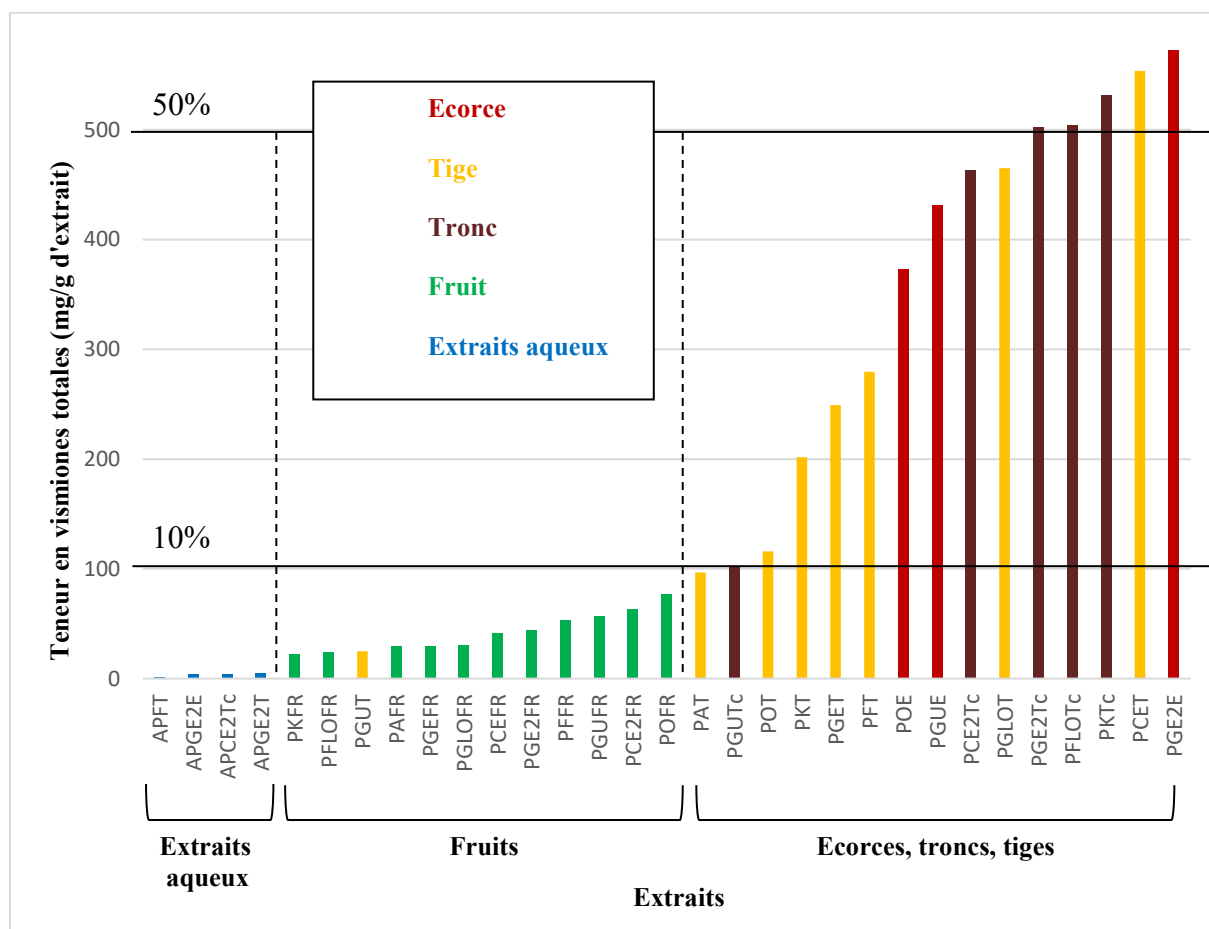


Figure 18. Teneur globale en vismione dans les extraits.

PF = *P. febrifugum*; PGE = *P. glaberrimum*; PA = *P. adamauense*; PCE = *P. corymbiferum*; PFLO = *P. floribundum*; PGLO = *P. glaucum*; PGU = *P. guineense*; PK = *P. kerstingii*; PO = *P. aurantiacum*.

L'acétylvismione D (0,05-30,4% de l'extrait), la vismione H (0-13,%) et la vismione D (0,026-9,9%) sont les trois vismiones majoritaire dans la plupart des extraits. L'acétylvismione F (0,01-5,%) et la désacétylvismione H (0-3,0%) sont présentes dans les extraits de troncs, d'écorces et de tiges, tandis que la vismione E (0,008-3,2%) est plutôt présente dans les extraits de fruits. Enfin la vismione F (0,005-1,6%) et la vismione M (0,006-1,9%) sont présentes en quantités très faibles dans les différents extraits quelque soit l'organe considéré (Figure 17).

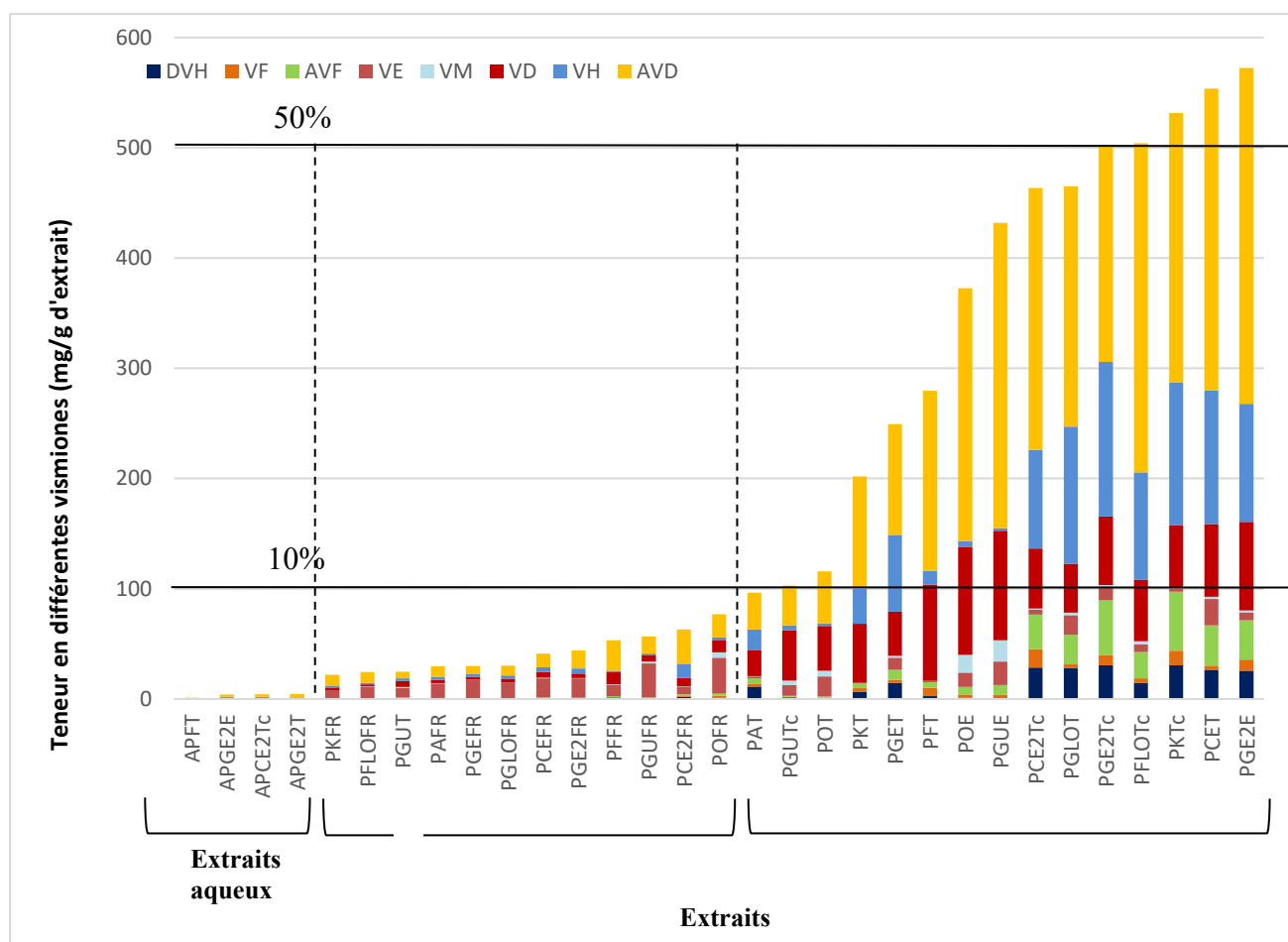


Figure 19. Répartition des vismiones dans les extraits.

PF = *P. febrifugum*; PGE = *P. glaberrimum*; PA = *P. adamauense*; PCE = *P. corymbiferum*; PFLO = *P. floribundum*; PGLO = *P. glaucum*; PGU = *P. guinense*; PK = *P. kerstingii*; PO = *P. aurantiacum*. DVH = désacétylvismione H ; VF = vismione F ; AVF = acétylvismione F ; VE = vismione E ; VM = vismione M ; VD = vismione D ; VH = vismione H ; AVD = acétylvismione D.

II.1. Profils des extraits de tiges, écorces et troncs

On observe globalement deux profils différents (**Figure 20**). Les espèces *P. glaberrimum*, *P. corymbiferum*, *P. kerstingii*, *P. floribundum*, *P. glaucum* et *P. adamauense* présentent un profil dominé par la présence de l'acétylvismione D (34,7-59,2% des vismiones totales) et de la vismione H (15,7-27,9%), suivie par la vismione D (9,6-26,2%) puis la désacétylvismione H (2,9-11,7%) et l'acétylvismione F (2,2-10,1%). Les autres vismiones sont minoritaires. Les espèces *P. guineense*, *P. aurantiacum* et *P. febrifugum* présentent une teneur importante en acétylvismione D (25,2-64,1%) suivie par la vismione D (22,2-44,2%). La vismione H est pratiquement absente de ces extraits. Les autres vismiones sont minoritaires.

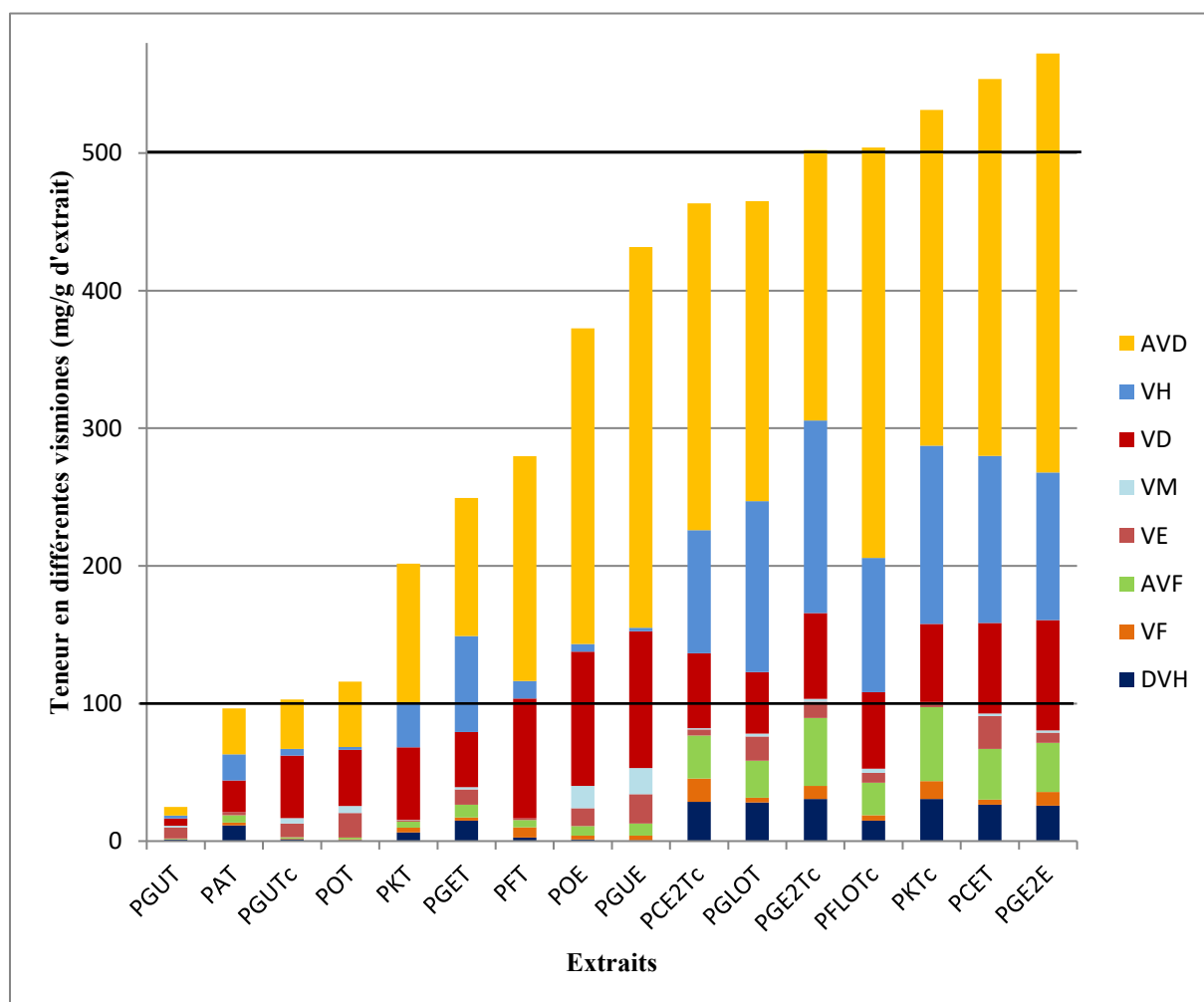


Figure 20. Répartition des vismiones dans les extraits dichlorométhaniques de tiges, écorces et troncs.

PF = *P. febrifugum*; PGE = *P. glaberrimum*; PA = *P. adamauense*; PCE = *P. corymbiferum*; PFLO = *P. floribundum*; PGL0 = *P. glaucum*; PGU = *P. guineense*; PK = *P. kerstingii*; PO = *P. aurantiacum*. DVH = désacétylvismione H; VF = vismione F; AVF = acétylvismione F; VE = vismione E; VM = vismione M; VD = vismione D; VH = vismione H; AVD = acétylvismione D.

II.2. Profils des extraits de fruits

La répartition des vismiones dans les extraits de fruits semble relativement homogène (**Figure 21**). L'acétylvismione D (24,8-44,4%) et la vismione E (11,3-56,4%) dominent, suivies par la vismione D (6,8-21,6%) et la vismione H (1,4-21,6%). L'extrait *P. corymbiferum* issu d'Ekombitie présente à l'inverse un pourcentage de vismione d'acétylvismione D plus important (49,1%), suivie par la vismione H (20,8%), par rapport à la vismione D (11,6%) et la vismione E (11,3%). L'extrait de *P. febrifugum* présente une majorité d'acétylvismione D (51,1%) par rapport à la vismione E (18,9%) et la vismione D (21,6%).

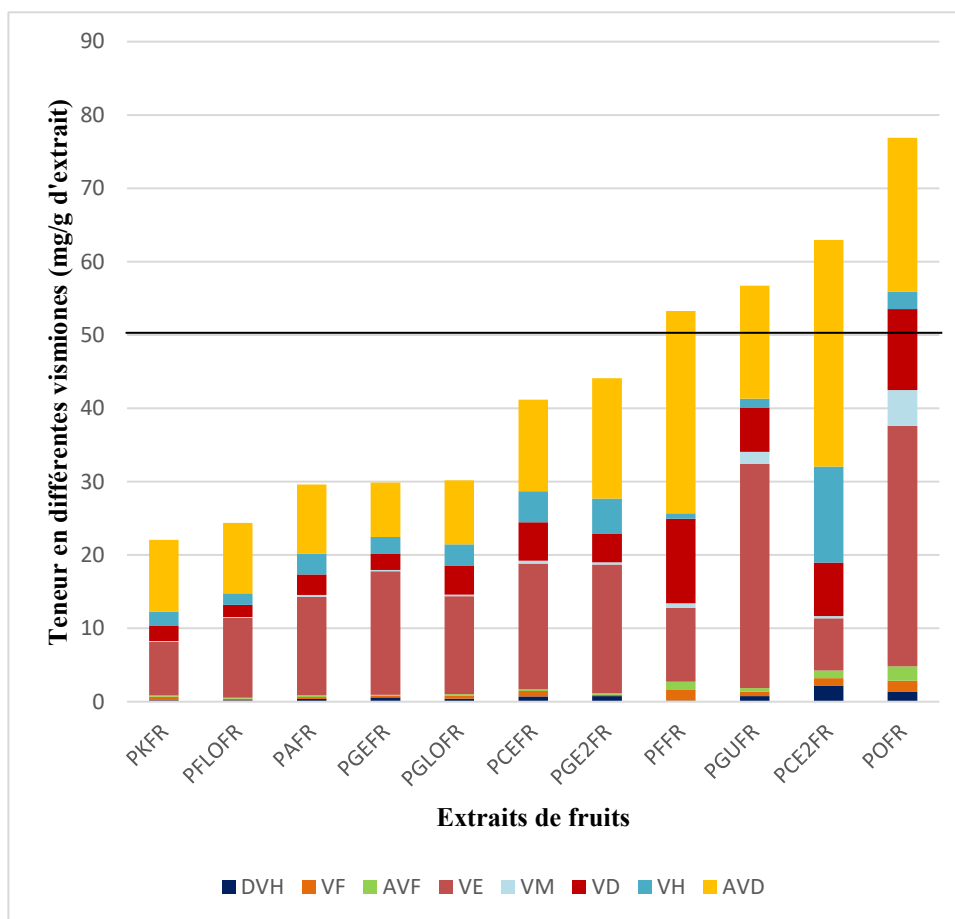


Figure 21. Répartition des vismiones dans les extraits dichlorométhaniques de fruits.

PF = *P. febrifugum*; PGE = *P. glaberrimum*; PA = *P. adamauense*; PCE = *P. corymbiferum*; PFLO = *P. floribundum*; PGLO = *P. glaucum*; PGU = *P. guinense*; PK = *P. kerstingii*; PO = *P. aurantiacum*. DVH = désacétylvismione H; VF = vismione F; AVF = acétylvismione F; VE = vismione E; VM = vismione M; VD = vismione D; VH = vismione H; AVD = acétylvismione D.

III. Relation entre teneur en vismiones et activité des extraits

Une tentative de corrélation entre la teneur en vismiones totales et l'activité anti-*Leishmania* a été réalisée pour les extraits dichlorométhaniques de tronc, tiges et écorces, les extraits aqueux présentant des activités très faibles ($CI_{50} > 100$). Les extraits dichlorométhaniques issus de fruits ont également été écartés car ils contiennent des teneurs en vismiones largement inférieures aux extraits dichlorométhaniques de tiges, écorces et troncs (Figure 22).

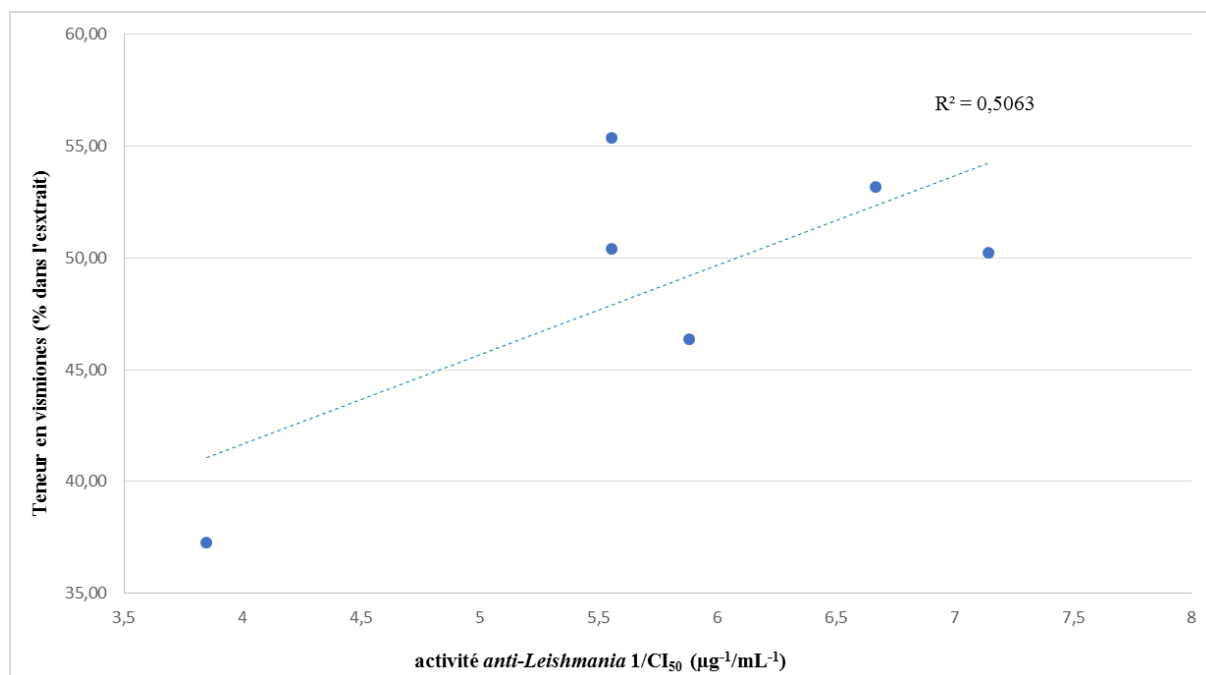


Figure 22. Droite de régression linéaire pour les vismiones totales.

Teneur en vismiones totales en fonction de l'activité sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Activité = 1/ CI₅₀

Le coefficient de corrélation calculé $r = 0,71$ est largement supérieur à 0,2, indiquant une corrélation entre la teneur en vismiones et l'inverse de la CI₅₀. L'activité des extraits dichlorométhaniques est donc liée à la teneur en vismiones totales.

Nous avons également voulu étudier la corrélation entre la teneur en chaque vismione individuellement avec l'activité anti-*leishmania* des extraits. Les droites de régression linéaires ont été calculées pour chacune des vismiones (Figure 23). Les coefficients de corrélations calculés sont présentés dans le Tableau 5.

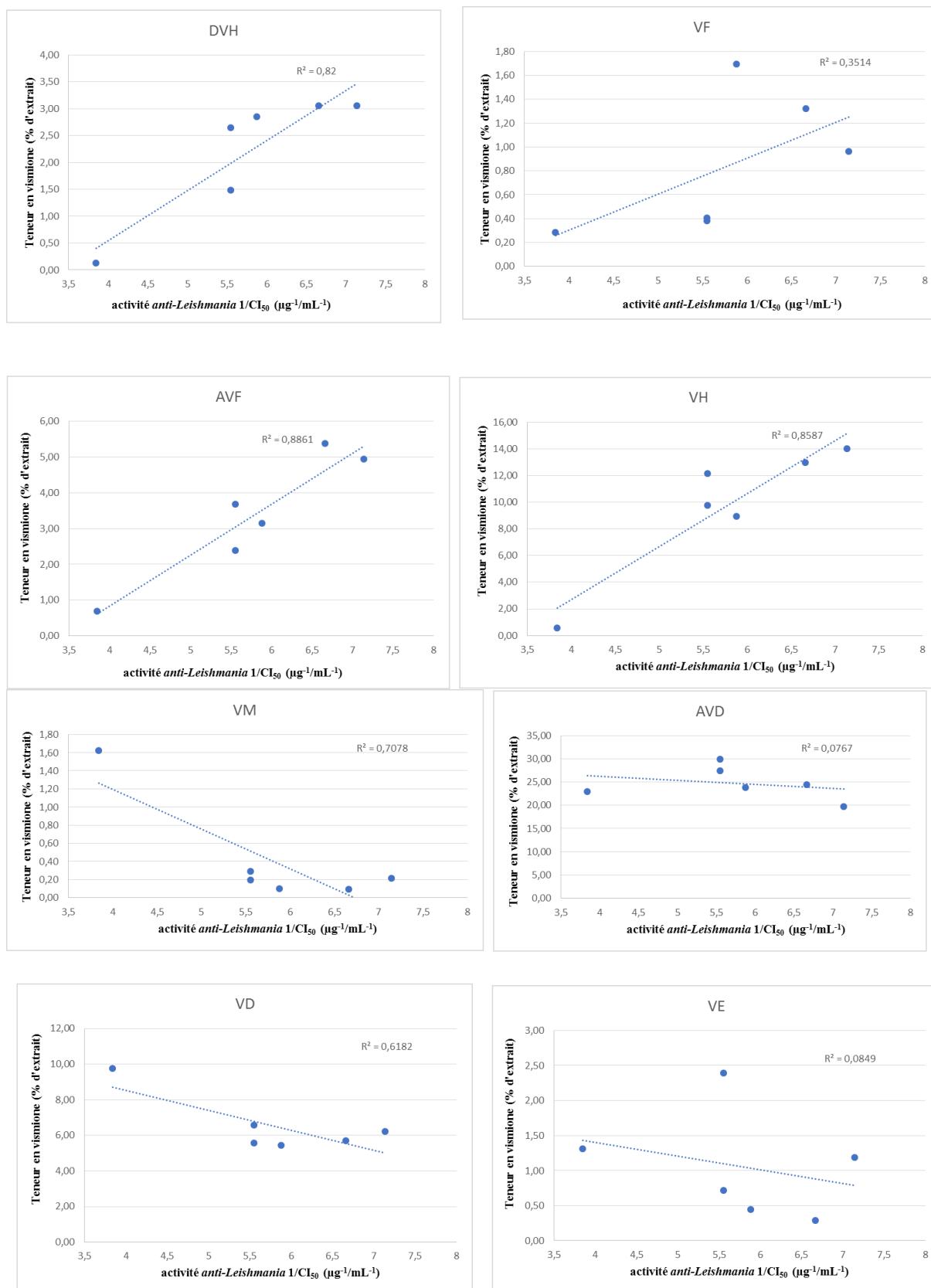


Figure 23. Droites de régression linéaire pour chacune des vismiones.

Teneur en chacune des vismiones dans les extraits en fonction de l'activité sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Activité = $1/CI_{50}$

Tableau 5. Coefficients de corrélation des vismiones et activités sur amastigotes axéniques de *L. donovani*.

Vismione	Coefficient de corrélation	CI ₅₀ (µM) <i>L. donovani</i>
VH	0,93	0,057
DVH	0,91	0,031
AVF	0,94	0,32
VF	0,59	0,827
AVD	-0,28	0,149
VE	-0,29	-
VD	-0,79	0,084
VM	-0,84	0,552

On observe de très bons coefficients de corrélation pour la vismione H (0.93), la désacétylvismione H (0,91), l'acétylvismione F (0,94) et la vismione F (0,59). La vismione H et la désacétylvismione H sont d'autre part les vismiones les plus actives sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. La vismione D et la vismione M en revanche présentent des coefficients de corrélation négatifs (-0,79 et -0,84 respectivement). L'acétylvismione D et la vismione E présentent des coefficients de corrélation faibles (-0,28 et -0,29 respectivement).

IV. Conclusion

Les organes qui contiennent les plus fortes teneurs en vismiones sont le tronc, la tige et l'écorce, comme cela était présumé d'après les travaux de thèse de J.-B. Gallé. Dans ces organes les taux de vismiones sont très élevés : certains extraits contiennent jusqu'à 57% de vismiones. L'acétylvismione D représente à elle seule jusqu'à 34% de l'extrait. Les fruits contiennent des teneurs plus faibles en vismiones, entre 2,0 et 8,0% d'extrait. La proportion de vismione E y est cependant plus importante (jusqu'à 3,0%g d'extrait), ce qui peut s'avérer intéressant pour son isolement. Les extraits aqueux contiennent des teneurs extrêmement faibles en vismiones, ce qui était attendu au vu des propriétés de solubilité des vismiones dans les solvants plus apolaires.

Comme nous l'avions supposé, une corrélation entre la teneur globale en vismiones et l'activité des extraits sur amastigotes axéniques de *L. donovani* a pu être mise en évidence : les extraits les plus riches en vismiones totales présentent de meilleures activités. D'autre part l'activité des extraits est également corrélée avec la teneur en vismiones les plus actives, la

vismione H ($CI_{50} = 57$ nM) et la desacétylvismione H ($CI_{50} = 31$ nM), ce qui laisse penser qu'elles jouent un rôle prépondérant dans l'activité globale des extraits. La vismione D ($CI_{50} = 84$ nM), également très active, n'a pas montré ce genre de corrélation.

Chapitre III

Synthèse organique

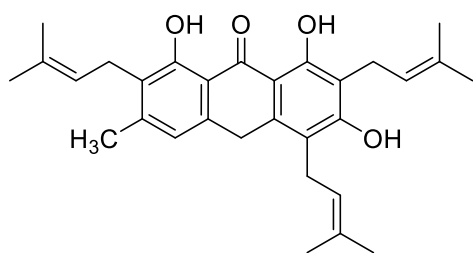
I. Introduction

L'approche par synthèse organique a été entreprise afin d'accéder à des analogues synthétiques des composés naturels, qui permettraient d'améliorer leur activité et leur sélectivité vis-à-vis de *Leishmania*, ainsi que leur stabilité, et ceci avec deux buts principaux :

- premièrement, mettre en évidence les déterminants structuraux nécessaires à l'activité anti-*Leishmania* (sur amastigotes axéniques de *L. donovani*) des composés de nature anthranoïde.

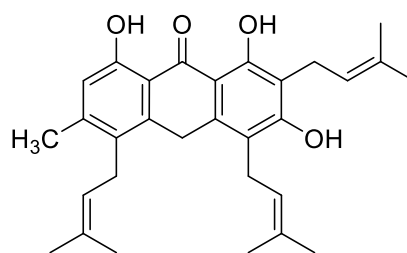
- deuxièmement, disposer d'un outil pharmacologique puissant permettant d'investiguer le mécanisme d'action intracellulaire chez le parasite de manière fiable.

Lors de l'étude phytochimique à l'origine du projet³, plusieurs anthranoïdes ont été isolés à partir de *P. glaberrimum* (**Schéma 11**). Parmi les structures de ces composés sont retrouvées plusieurs anthraquinones et anthrones, ainsi qu'une seule vismione.



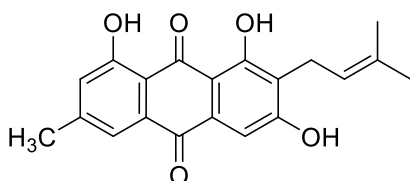
(43)

$CI_{50} = 12,15 \mu M$



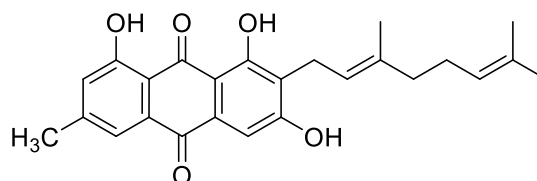
Harungine anthrone (44)

$CI_{50} = 11,89 \mu M$



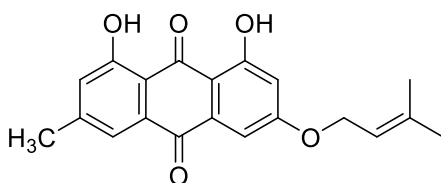
2-prénylémodine (45)

$CI_{50} = \text{nd}$



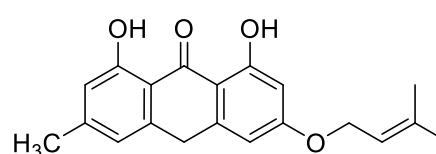
2-géranylémodine (46)

$CI_{50} > 2 \mu M$



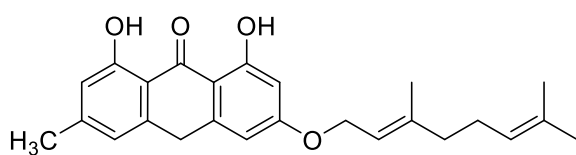
Madagascine (47)

$CI_{50} = 2,90 \mu M$



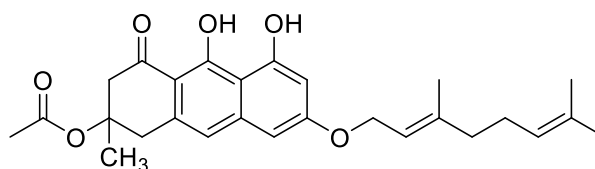
Madagascine anthrone (48)

$CI_{50} = 0,6 \mu M$



3-géranyloxy-émordine anthrone (49)

$CI_{50} = 0,18 \mu M$



Acétylvismione D (3)

$CI_{50} = 0,09 \mu M$

Schéma 11. Structures des anthranoïdes isolés de *Psorospermum glaberrimum* par B. Lenta et leur activité anti-*Leishmania* (CI_{50} mesurées sur amastigotes axéniques de *L. donovani* par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine, ref. miltéfosine : $CI_{50} = 0,47 \mu M$).

L'acétylvismione D présentait une activité anti-*Leishmania* de l'ordre de la dizaine de nanomolaires, supérieure d'un log ou plus par rapport aux autres composés isolés. La 1,3-géranylxy-émordine anthrone et la madagascine anthrone présentait néanmoins des activités submicromolaires intéressantes. La madagascine elle-même présentant une CI_{50} de l'ordre du micromolaire tout à fait intéressante.

En raison de leur abondance dans les extraits de *Psorospermum* ainsi que de leur activité intéressante, l'approche de synthèse d'analogue a donc dans un premier temps été orientée vers l'obtention d'antrones et d'antraquinones *O*-alkylées. En effet, les résultats des premiers tests d'activités suggèrent que les composés *O*-alkylés possèdent une activité supérieure aux composés *C*-alkylés.

D'autre part, des études de stabilité ultérieures ont mis en évidence la promptitude des vismiones à se dégrader en leur forme anthrone correspondante, elle-même rapidement dégradées en antraquinones (**Schéma 12**).

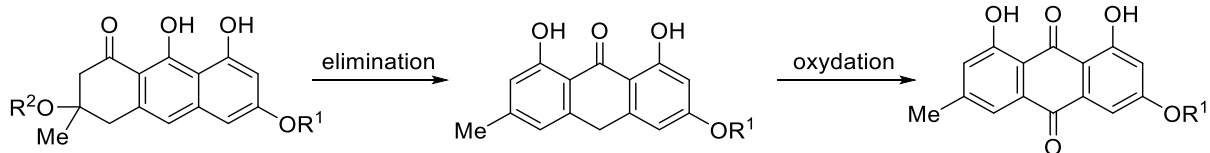


Schéma 12. Dégradation successive des vismiones en anthrones puis en antraquinones.

La synthèse des formes vismiones s'avérait donc délicate, ce qui confortait le choix initial. D'autant plus que la synthèse d'antraquinones est relativement bien décrite dans la littérature. En outre, l'obtention des anthrones dérivées de l'émodine anthrone était envisageable par une étape de réduction des antraquinones correspondantes, obtenues elles-mêmes à partir du noyau émodine (**Schéma 13**). Plusieurs références décrivent les conditions de réduction d'antraquinones alkylées en anthrones⁷³⁻⁷⁷.

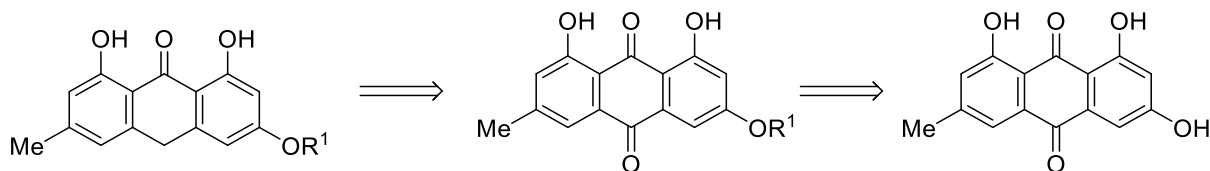


Schéma 13. Rétrosynthèse des anthrones *O*-alkylées à partir du noyau émodine.

La synthèse de nombreuses anthraquinones a été possible. En revanche, les anthrones correspondantes n'ont pas pu être synthétisées par la voie souhaitée. Cependant, grâce à l'utilisation de méthodes de fractionnement alternatives, les nombreuses vismiones isolées par la suite lors de la thèse de Jean Baptiste Gallé⁷⁸ ont révélé des activités largement supérieures à celles des formes dégradées. Malgré les conditions délicates, la synthèse d'analogues des vismiones a alors été envisagée, la synthèse des anthrones correspondantes étant en plus rendue possible à partir des vismiones par une étape d'élimination (**Schéma 14**).

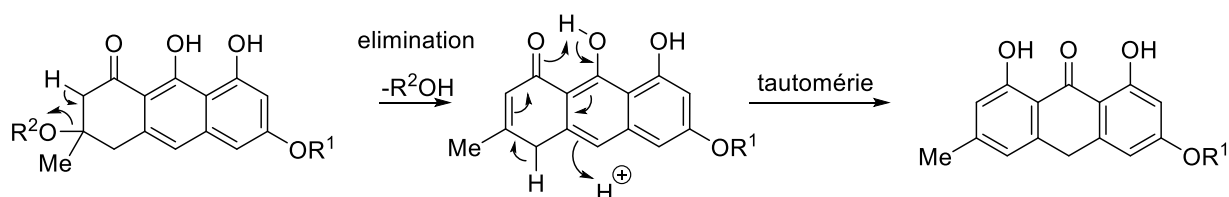


Schéma 14. Obtention des anthrones à partir des vismiones par élimination.

I.1. Synthèse d'anthrones à partir d'anthraquinones

Les anthrones peuvent potentiellement être obtenues par réduction des anthraquinones alkylées correspondantes^{73,74,77}. La synthèse de ces dernières étant relativement accessible, c'est cette approche qui a été initialement envisagée au laboratoire (**Schéma 15**).

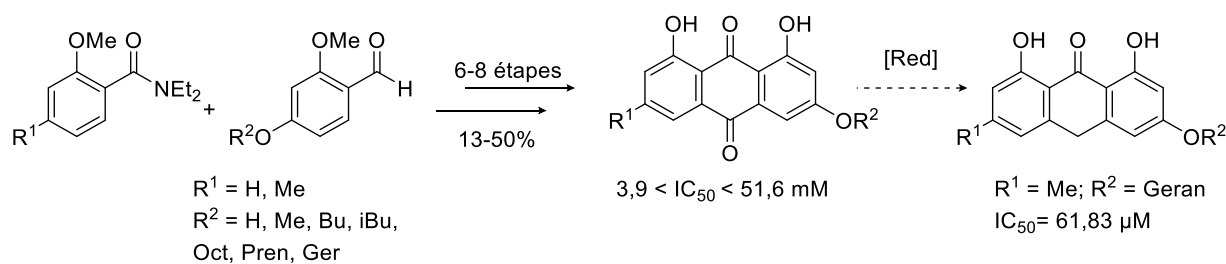


Schéma 15. Synthèse des anthraquinones et anthrones correspondantes.

Les résultats des premières études structure-activité sur les composés naturels ont suggéré l'importance d'une *O*-alkylation sur la position 3 pour l'activité anti-*Leishmania*⁷⁸. Le noyau émodine avait été synthétisé afin de servir de base à une alkylation en position 3. Plusieurs synthèses d'anthraquinones, dont l'émodine, sont décrites dans la littérature. La première voie de synthèse qui avait été envisagée, décrite par Savard et Brassard⁷⁹, est basée sur deux réactions de Diels-Alder successives sur une 1,4-benzoquinone (**Schéma 16**).

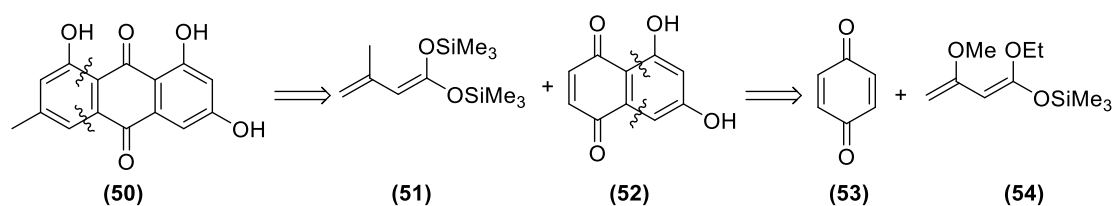


Schéma 16. Rétrosynthèse de l'émodine par double réaction de Diels-Alder sur une benzoquinone.

Celle-ci n'a cependant pas donné de résultats probants, les intermédiaires réactionnels se sont révélés instables. Une deuxième stratégie avait été entreprise au laboratoire, basée sur une réaction d'ortholithiation entre un benzamide et un benzaldéhyde, suivie d'une étape d'acylation tel que décrit par Snieckus⁸⁰ (**Schéma 17**).

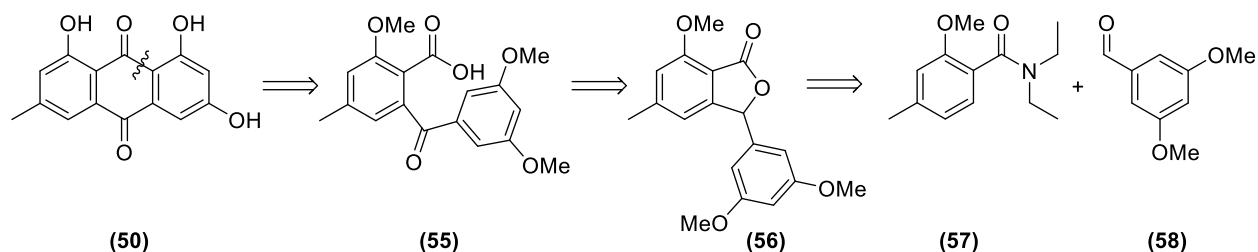


Schéma 17. Rétrosynthèse de l'émodine par réaction d'ortholithiation.

Cette stratégie avait permis d'obtenir le noyau émodine en 8 étapes, avec des rendements de 15 à 30%. L'émodine ainsi obtenue a fait l'objet d'essais d'alkylation en position 3 (**Schéma 18**).

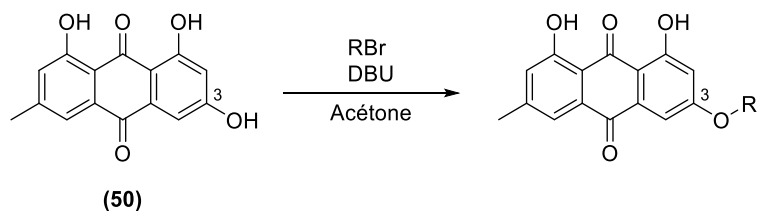


Schéma 18. Réaction d'alkylation de l'émodyne.

Plusieurs anthraquinones alkylées ont été synthétisées de cette manière (Schéma 19). Les groupements prényles et géranyles, retrouvés sur les composés naturels, ainsi que différentes chaînes alkylées saturées ont été insérées sur cette position afin d'évaluer l'influence sur l'activité.

Un composé PEGylé a également été synthétisé en vue d'obtenir une sonde fluorescente permettant d'investiguer le mécanisme d'action intracellulaire. Selon le même schéma de synthèse, le composé 3-prénylé et 6-déméthylé a également été synthétisé.

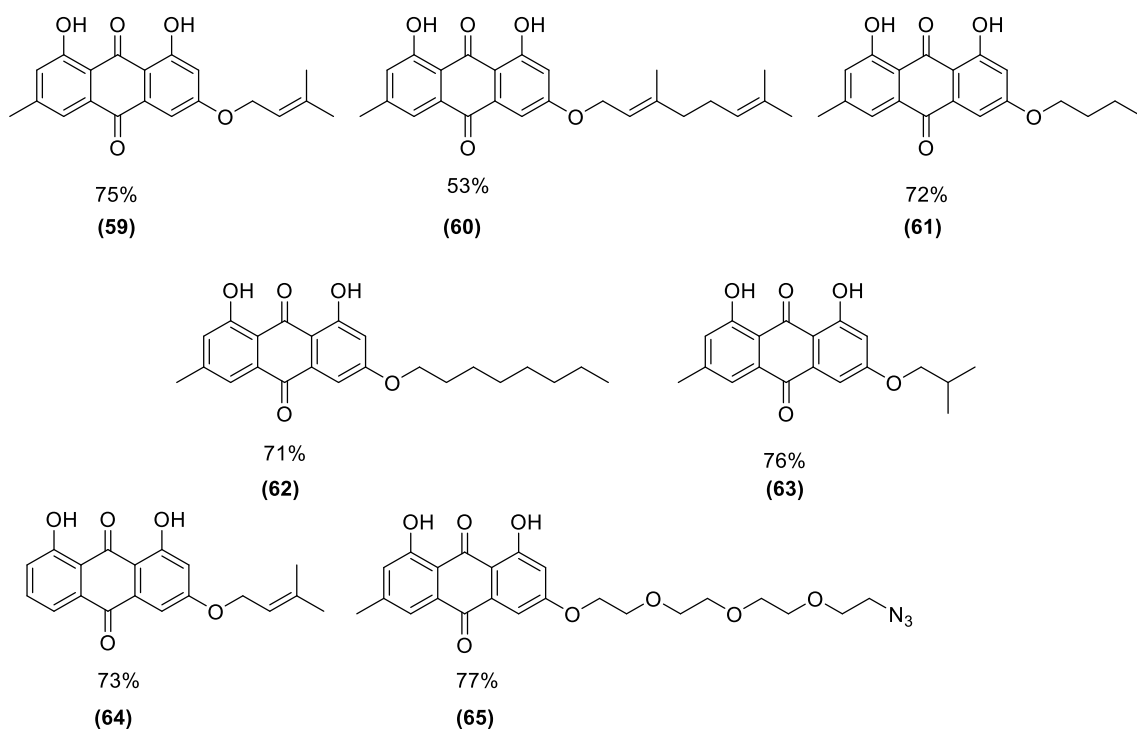


Schéma 19. Anthraquinones obtenues par alkylation de l'émodyne.

La stratégie envisagée devait permettre d'obtenir les anthrones correspondantes à ces anthraquinones par une étape de réduction. Plusieurs conditions décrites dans la littérature ont été tentées^{73-77,81}, mais aucune n'a donné lieu à la formation de l'anthrone. Cette stratégie, même si elle n'a pas abouti aux anthrones désirées, à tout de même permis la synthèse d'anthraquinones dont l'activité anti-*Leishmania* a pu être évaluée *in vitro*.

Les anthrones se sont donc montrées difficiles à synthétiser de cette manière. De plus, du fait de la tendance des vismiones naturelles à se dégrader rapidement en anthrones puis en anthraquinones, une nouvelle stratégie reposant sur la synthèse de dihydroanthracénones avait été envisagée. Celles-ci, outre le fait qu'elles se sont révélées être les composés les plus actifs présents dans la plante, permettraient également d'arriver aux anthrones et anthraquinones correspondantes. En effet, une étude de stabilité des vismiones avait montré que celles-ci, dans une solution de DMSO, étaient rapidement dégradées en anthrones puis en anthraquinones⁷⁸.

I.2. Synthèse de dihydroanthracénones

La synthèse des dihydroanthracénones est relativement peu décrite dans la littérature. La plupart sont synthétisées par réactions d'annélation de Hauser et de Staunton-Weinreb⁷⁰. Celles-ci sont basées sur le couplage entre une cyclohexénone et un composé aromatique comportant un substituant nucléophile en C1 et un électrophile en C3 (**Schéma 20**).

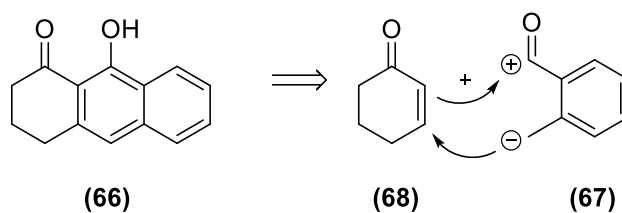


Schéma 20. Principe des réactions d'annélation de Hauser et de Staunton-Weinreb.

I.2.1 Réaction d'annélation de Hauser

La réaction de Hauser est une variante de l'annélation de Robinson. Elle fait intervenir un dérivé phtalide réagissant sur un accepteur de Michael en présence d'une base. Le mécanisme est basé sur une addition de Michael suivie d'une condensation de Dieckmann, puis une élimination⁷⁰. Cette réaction conduit à des dérivés hydroquinones.

Une addition 1,4 de Michael est effectuée par le moyen d'un phtalide désactivé sur une cyclohexénone en présence d'une base⁸². S'en suit une condensation de Dieckmann, puis l'élimination du groupement électroattracteur aboutissant à l'obtention d'une dicétone. Celle-ci se réarrange pour donner une dihydroanthracénone après aromatisation du cycle central (Schéma 21).

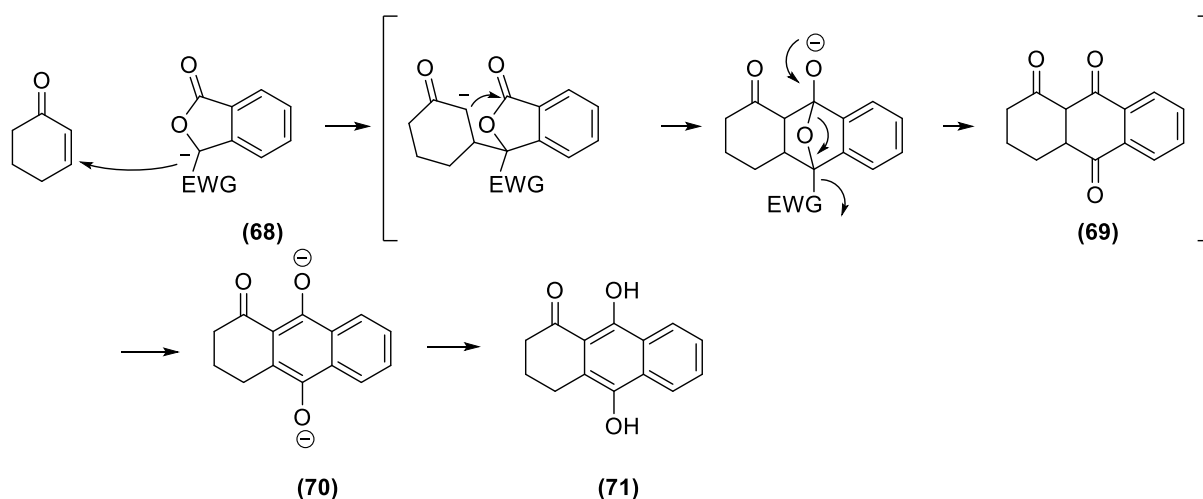


Schéma 21. Mécanisme de l'annélation de Hauser.

Différents dérivés phtalides sont décrits dans la littérature. Le phtalide sulfone est utilisé en présence de LDA par Li et Walsgrove⁸³ (Schéma 22).

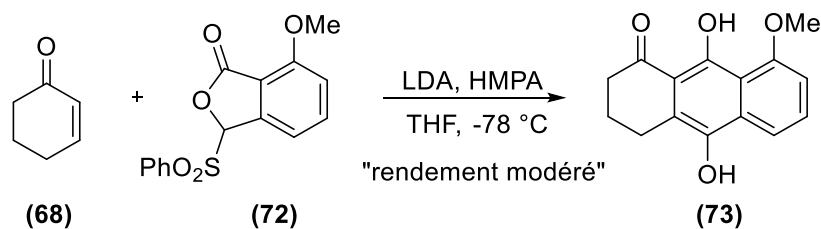


Schéma 22. Annélation de Hauser en utilisant un dérivé phthalide sulfone.

Ceux-ci décrivent également l'utilisation d'un phthalide nitrile avec un rendement plus élevé (Schéma 23).

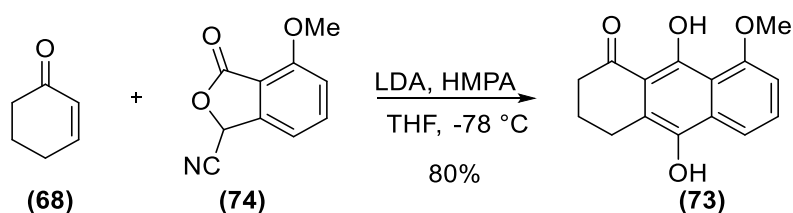


Schéma 23. Annélation de Hauser en utilisant un dérivé phthalide nitrile.

Il est également utilisé par Nicolaou *et al.*⁸⁴ avec comme base le LHMDS à la place du LDA, avec un excellent rendement (Schéma 24).

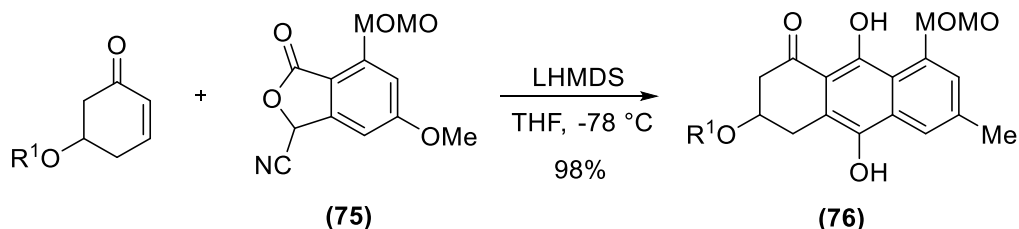


Schéma 24. Annélation de Hauser en utilisant le LHMDS comme base.

Kraus *et al.* quant à eux utilisent un phthalide thiophénol avec un rendement correct⁸⁵ (Schéma 25)

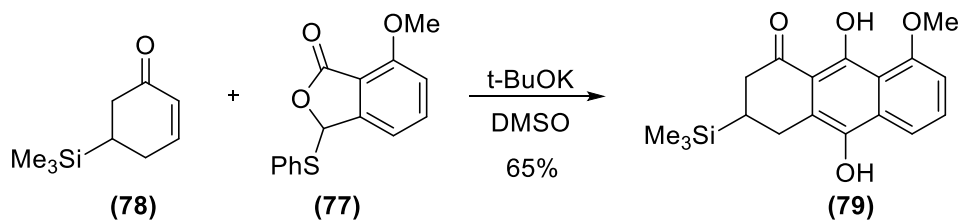


Schéma 25. Annélation de Hauser en utilisant un thiophénol.

L'utilisation de thiophthalides est également décrite⁸⁶, mais les rendements obtenus sont nettement inférieurs (**Schéma 26**).

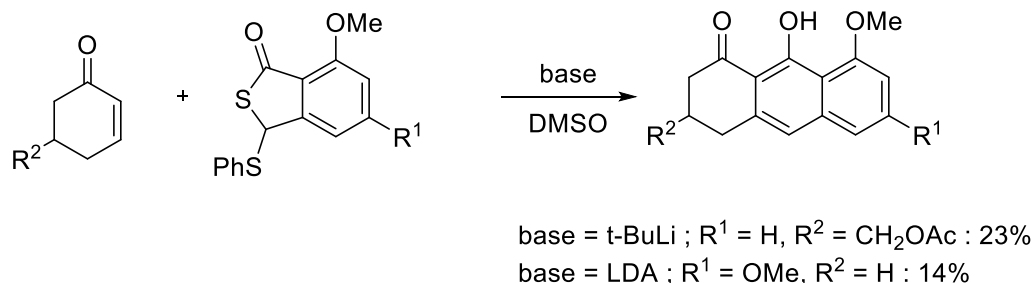


Schéma 26. Annélation de Hauser entre un thiophthalide et une cyclohexénone.

1.2.2 Réaction d'annélation de Staunton-Weinreb

Contrairement à la réaction de Hauser, cette réaction d'annélation conduit à des dérivés naphhtols, et donc permet d'obtenir des composés plus proches des vismiones naturelles qui ne possèdent en générale qu'un seul groupement hydroxyle sur le cycle aromatique central.

La réaction d'annélation de Staunton-Weinreb correspond à la condensation d'un ester *ortho*-toluidique qui joue le rôle de nucléophile sur l'accepteur de Michael (**Schéma 27**). La réaction est basée sur une réaction tandem d'addition de Michael suivie d'une cyclisation de Dieckmann/Claisen⁷⁰.

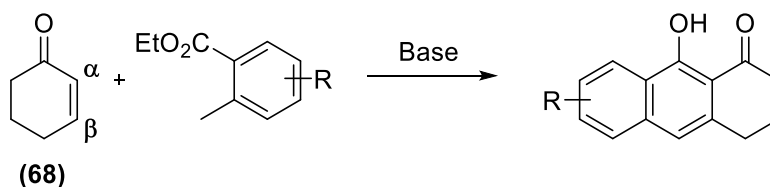


Schéma 27. Annélation de Stanton-Weinreb.

Lorsque la cyclohexénone comporte un groupe partant en position β , la réaction conduit directement à la dihydroanthracénone. Lorsque ce n'est pas le cas, la réaction conduit

à un composé de nature tétralone qui devra être oxydé dans un second temps pour accéder à la dihydroanthracénone (Schéma 28).

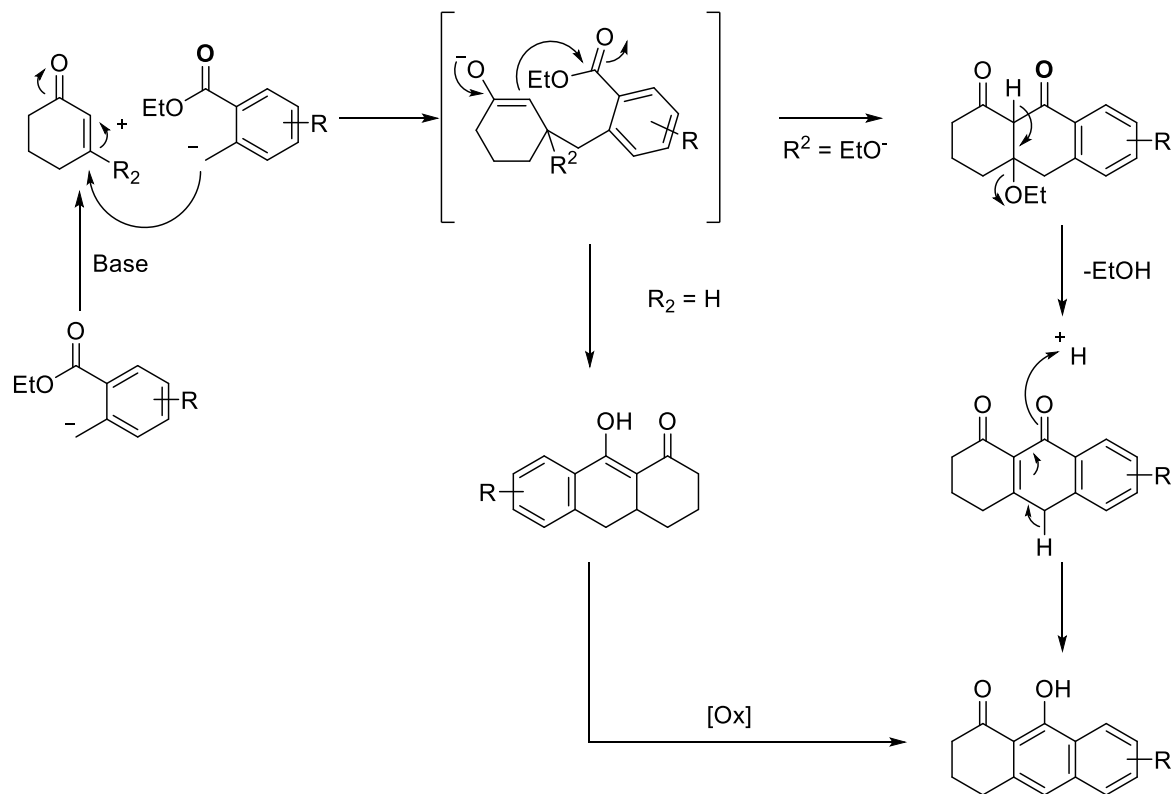


Schéma 28. Approche de Staunton-Weinreb aboutissant à la synthèse des dihydroanthracénones.

L'utilisation de cyclohexénone ne possédant pas de groupe partant de type β -alkoxy présente l'inconvénient de polymériser dans les conditions classiques de la réaction d'annélation de Staunton-Weinreb au contact de la diisopropylamine (Schéma 29). Le doublet libre de l'azote de la diisopropylamine réagit par attaque nucléophile sur le carbonyle de la cétone, qui par une élimination d'eau conduit à une diénamine. La réactivité de cette dernière lui permet de réaliser une addition 1,4 de Michael avec la cyclohexénone de départ pour obtenir un composé bicyclique. L'addition d'un hydroxyde suivie de l'élimination de la diisopropylamine conduit à l'obtention d'une dicétone α - β insaturée. Celle-ci peut à nouveau réagir avec la diisopropylamine pour former un polymère plus long. Cette polymérisation n'est pas observée lorsque la cyclohexénone comporte un groupement éthoxy.

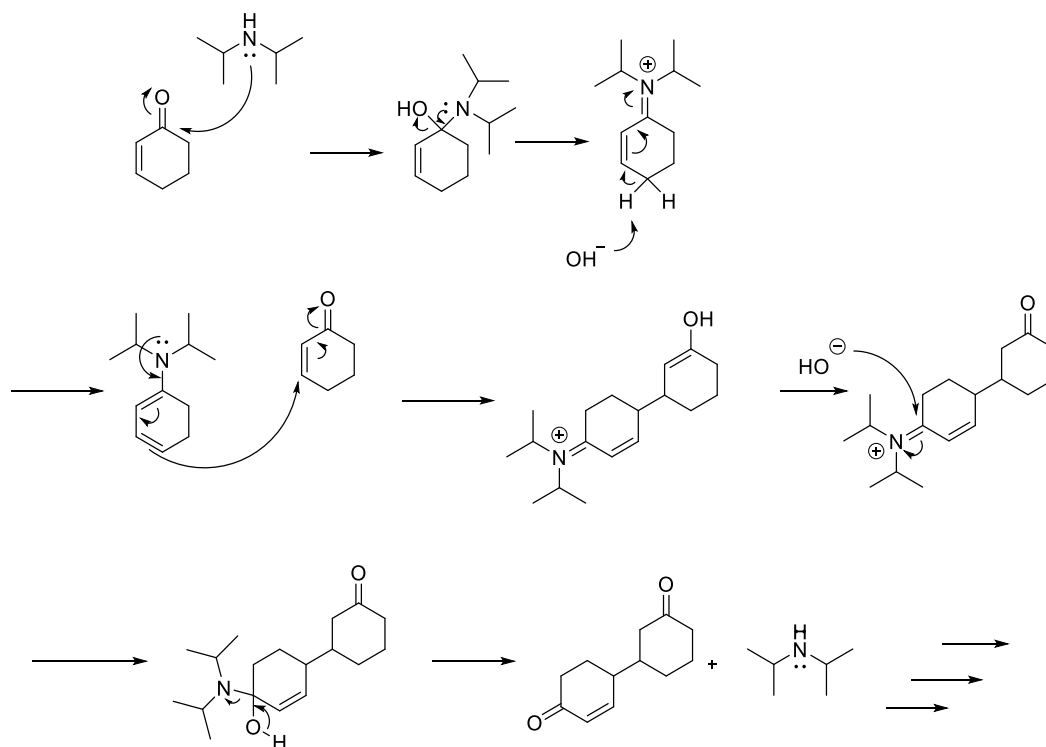


Schéma 29. Polymérisation de la cyclohexénone en présence de diisopropylamine.

Une variante de cette réaction a été décrite par Hill *et al.*⁸⁷ Celle-ci passe un dérivé stannylé de l'acide orsellinique (Schéma 30). La réaction de transmétallation lithium-étain permet de générer l'anion *o*-toluidique qui peut réagir avec la cyclohexénone.

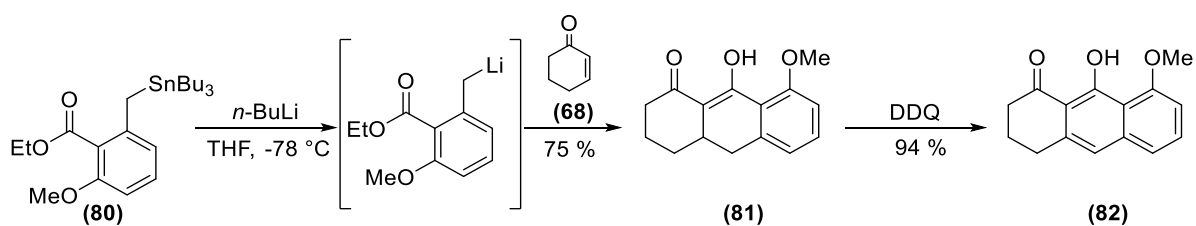


Schéma 30. Variante de la réaction de Staunton-Weinreb passant par un dérivé stannylé.

Le passage par ce dérivé stannylé permet d'éviter la polymérisation de la cyclohexénone en s'affranchissant de la base organique et donc d'améliorer le rendement global de la réaction.

Cette voie de synthèse a été utilisée au laboratoire lors des premières tentatives de synthèse de dihydroanthracénones. Le 2-tributylstannyl-4,6-diméthoxybenzoate d'éthyle a été synthétisé à partir de l'acide 2-méthyl-4,6-diméthoxybenzoïque, après protection de la fonction acide par formation de l'ester éthyle correspondant (**Schéma 31**). L'ester ainsi obtenu réagit avec le chlorure de tributylétain en présence de LDA dans le THF pour former le 2-tributylstannyl-4,6-diméthoxybenzoate d'éthyle.

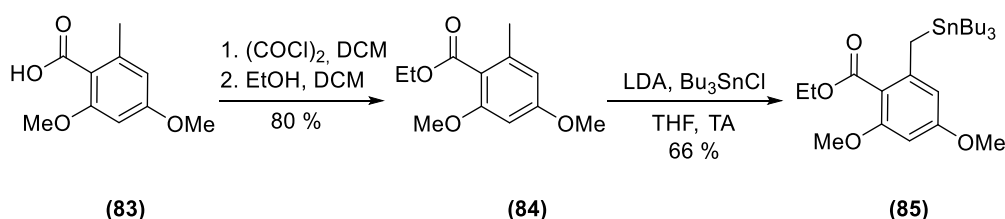


Schéma 31. Synthèse du 2-tributylstannyl-4,6-diméthoxybenzoate d'éthyle.

Le chlorure de tributylétain, ajouté en excès, ayant tendance à coéluer avec le dérivé stannylé final, la purification sur colonne de silice classique s'est montrée problématique. Une purification par CCM préparative a permis de séparer efficacement le dérivé stannylé des sels d'étain résiduels, permettant d'obtenir le composé en deux étapes avec 53% de rendement global. Cette méthode de purification, bien qu'efficace présente cependant comme principal inconvénient de limiter les quantités pouvant être purifiées à une centaine de milligrammes par dépôt.

L'ester stannylé réagit avec le *n*-BuLi pour réaliser la transmétallation puis avec la cyclohexénone pour former la tétralone (**Schéma 32**). Une oxydation douce au DDQ de celle-ci doit permettre d'obtenir la dihydroanthracénone.

L'utilisation d'une cyclohexénone possédant un groupe partant sous la forme d'un éthoxy en position 3 permet de s'affranchir de cette étape d'oxydation. En effet, l'élimination d'éthanol conduit à l'aromatisation du cycle central (**Schéma 33**).

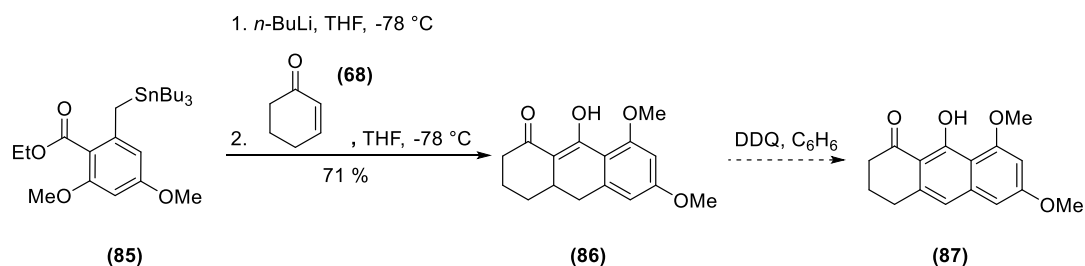


Schéma 32. Synthèse de la dihydroanthracénone à partir du composé stannylé.

Ainsi, l'utilisation de β -alkoxycyclohexénones permet premièrement de s'affranchir de la synthèse du dérivé stannylé et deuxièmement sont beaucoup moins sensibles à la polymérisation (Schéma 33).

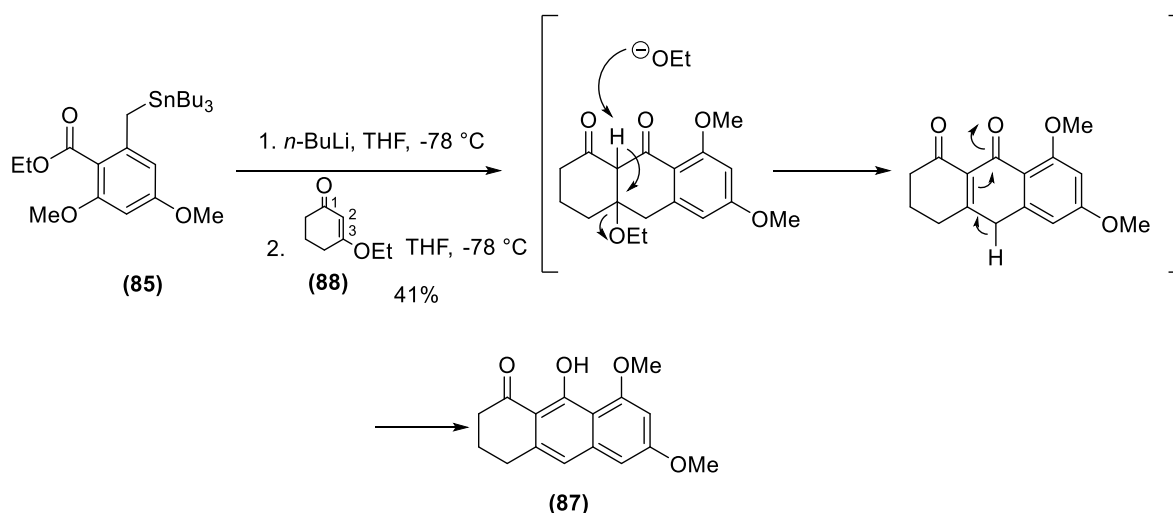


Schéma 33. Synthèse de la dihydroanthracénone via une β -alkoxycyclohexénone.

Le rendement de 41% obtenu ici est certes inférieur à ceux obtenus précédemment. Cependant, en considérant le rendement de 66% de l'étape de stannylation de l'ester et l'étape ultérieure d'oxydation qui n'ont plus lieu d'être, ainsi que l'absence de polymérisation, ce rendement est tout à fait satisfaisant et le rendement global n'est probablement pas diminué.

La synthèse des dihydroanthracénones s'est donc appuyée par la suite sur le couplage entre un ester dérivé de l'acide orsellinique et une β -alkoxycyclohexénone.

II. Synthèse de dihydroanthracénones

II.1. Introduction

Ces travaux antérieurs ont donc permis de définir la direction des recherches effectuées lors de cette thèse. Nous avons cherché donc à synthétiser un panel d'analogues des vismiones naturelles diversement substitués sur des positions d'intérêt (1, 3, 6) définies par l'observation des résultats des tests d'activité précédemment réalisés (**Schéma 34**).

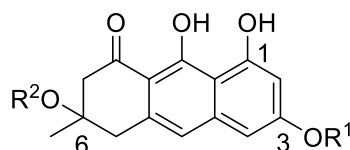


Schéma 34. Numérotation des positions d'intérêt sur le squelette des dihydroanthracénones.

Deux approches ont été tentées pour obtenir le squelette dihydroanthracénone (**Schéma 35**). L'annélation de Staunton-Weinreb entre un ester dérivé de l'acide orsellinique et une cyclohexénone a été la plus étudiée, car elle permet une large diversité de substituants sur les trois positions clés définies. La synthèse des esters alkylés s'est révélée relativement aisée, de même que les cyclohexénones *C*-alkylées sur la position 5. En revanche, la synthèse des cyclohexénones *O*-alkylées sur la position 5 s'est montrée beaucoup plus délicate, et de nombreuses voies de synthèse ont été explorées avant d'y parvenir. Afin de s'affranchir de cette cyclohexénone, un couplage de type Staunton-Weinreb entre un ester dérivé de l'acide orsellinique et le 3-méthoxybut-2-énoate d'éthyle a été étudié, permettant d'obtenir des dihydroanthracénones méthylées et *O*-alkylées en position 6.

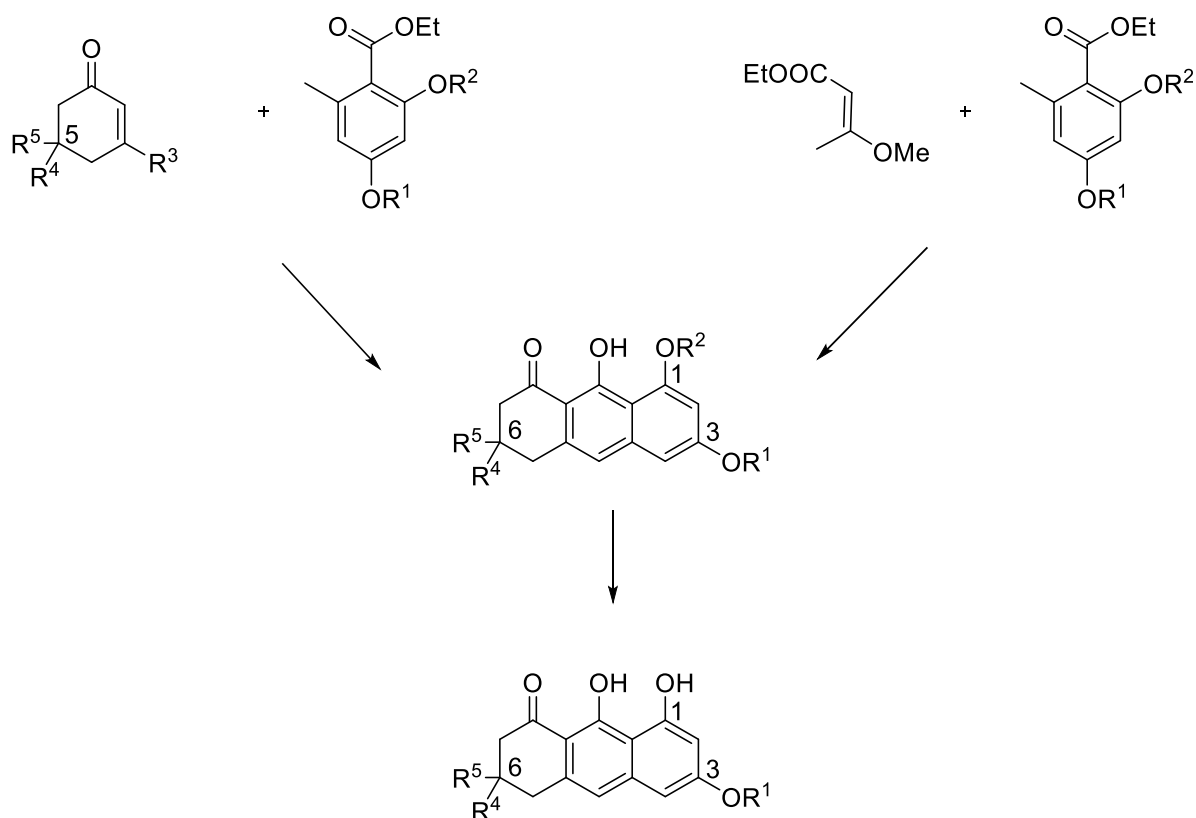


Schéma 35. Schéma général de synthèse des dihydroanthracénones.

II.2. Synthèse de l'ester

II.2.1 A partir de l'acétoacétate d'éthyle

En plus de l'utilisation du dérivé (90) disponible commercialement, nous avons également souhaité en effectuer la synthèse pour ne pas être dépendants de l'approvisionnement et réduire le coût. La synthèse du 2,4-hydroxy-6-méthylbenzoate d'éthyle à partir de l'acétoacétate d'éthyle a été décrite par Dachavaram *et al.*⁸⁸ (Schéma 36).

L'hydrure de sodium arrache le proton acide sur l'acétoacétate, qui réagit sur lui-même selon une réaction de Claisen mixte. De la même façon le *n*-butyllithium arrache un proton sur le méthyle en position α de la cétone. Milieu réactionnel est alors chauffé au reflux, permettant une deuxième réaction de Claisen mixte, cette fois-ci intramoléculaire, pour donner une dicétone cyclique à 6 chaînons. Cette dernière subit alors une élimination et une double tautomérie en milieu acide pour conduire au composé final avec un rendement global de 15%.

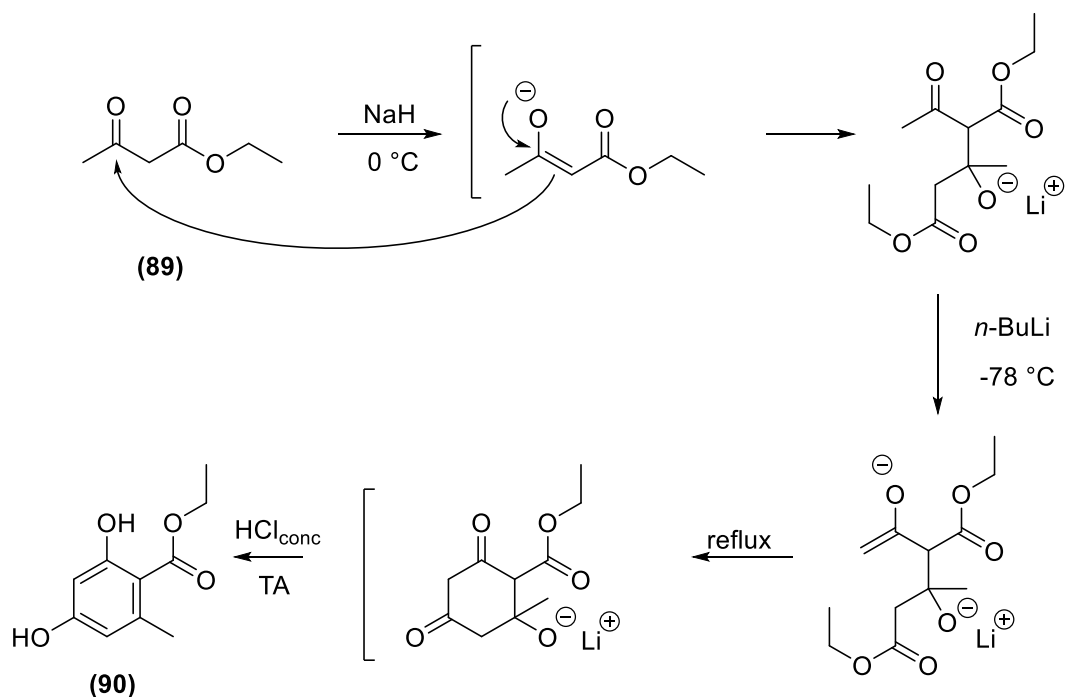


Schéma 36. Synthèse du 2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoate d'éthyle à partir de l'acétoacétate d'éthyle.

Ce faible rendement peut s'expliquer par la régiosélectivité de la réaction de Claisen intramoléculaire. Si c'est le proton cinétique qui est arraché, comme présenté sur le schéma 26, la totalité de l'intermédiaire formé peut réagir pour former la dicétone cyclique. En revanche si le proton thermodynamique est arraché en premier (**Schéma 37**), on obtient un alcène qui peut être (*Z*) ou (*E*). Seul l'alcène (*Z*) peut ensuite réagir sur lui-même pour engendrer la dicétone cyclique.

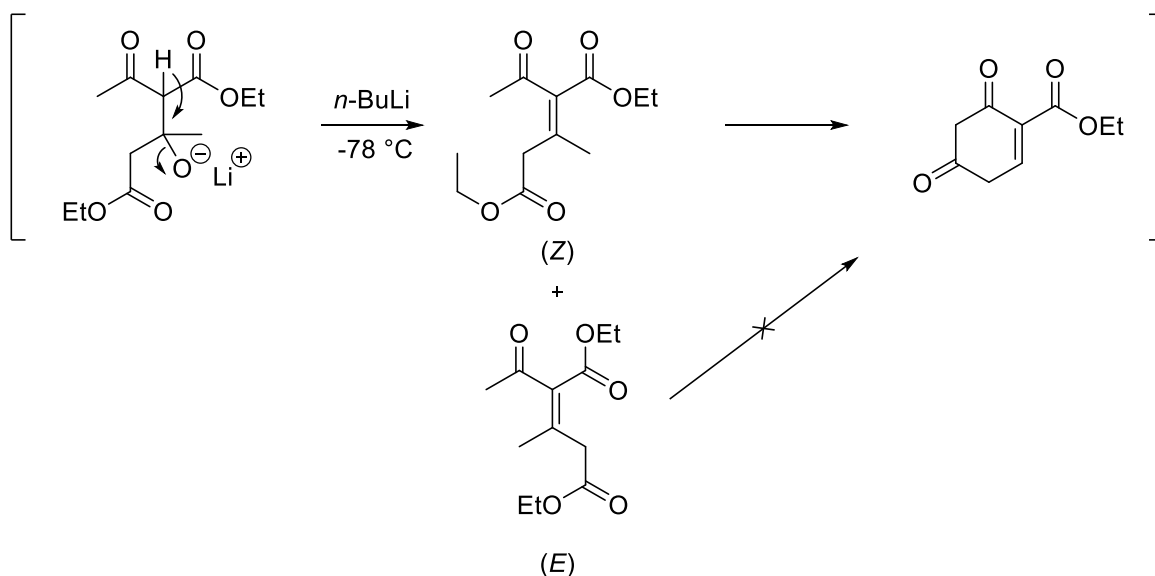


Schéma 37. Formation des alcènes intermédiaires (Z) et (E).

L'utilisation d'une base encombrée et la température basse orientent vers le contrôle cinétique de la réaction, permettant en théorie de convertir la totalité de l'intermédiaire formé. Dachavaram *et al.* décrivent d'ailleurs un rendement de 72%, penchant en faveur de cette alternative. Dans notre cas, le rendement peut potentiellement être expliqué par le mauvais état du *n*-BuLi. Quoiqu'il en soit, cette synthèse reste intéressante puisqu'en dépit du rendement de 15% l'acétoacétate d'éthyle est disponible commercialement à un prix qui permet d'engager des quantités importantes, ceci permettant d'obtenir malgré tout une quantité de l'ordre du gramme d'ester (**90**).

II.2.2 Alkylation du 2,4-hydroxy-6-méthylbenzoate d'éthyle

Afin d'obtenir une grande diversité de dihydroanthracénones substituées sur les positions clés, différentes combinaisons d'alkylation de l'ester ont été synthétisées.

L'ester diméthylé a facilement été obtenu en faisant réagir l'ester éthylique (**90**) dans un excès de MeI et K₂CO₃. L'ester diméthylé (**84**) a ainsi été synthétisé avec un rendement quantitatif (Schéma 38).

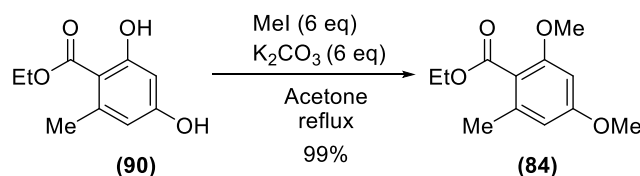


Schéma 38. Synthèse de l'ester benzoïque diméthylé (84).

Les vismiones naturelles possédant des substituants dérivés de l'isoprène (prényle ou géranyle), nous avons donc tenté d'obtenir l'ester diprénylé. Pour ce faire, même si le bromure de prényle est plus réactif que l'iodométhane, les conditions de méthylation ont été reproduites, ce qui a permis d'obtenir l'ester diprénylé (91a) avec un rendement de 94% (Schéma 39).

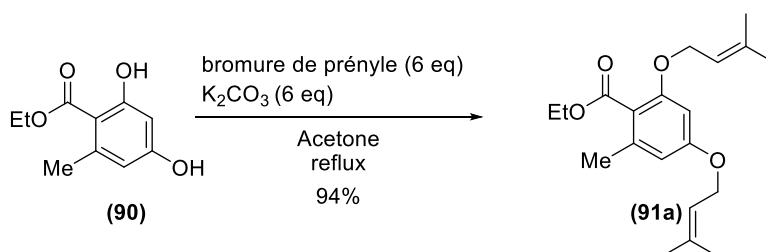


Schéma 39. Synthèse de l'ester benzoïque diprénylé (91a).

Il a ensuite suffi de réaliser la même réaction en réduisant le nombre d'équivalents de bromure de 3,3-diméthylallyle pour obtenir l'alkylation sélective de l'hydroxyle en position 4 (Schéma 40). La déprotection des éthers est facilement réalisée en milieu acide. Le chlorométhoxyéthane est moins toxique que le chlorométhoxyéthane, c'est pourquoi il a été employé pour la protection de l'hydroxyle en position 2. L'ester alkylé et protégé (93) a ainsi été obtenu avec un rendement de 75%.

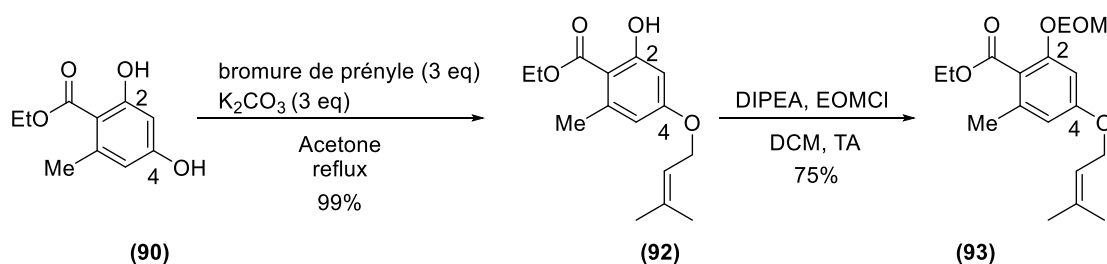


Schéma 40. Synthèse de l'ester benzoïque prénylé (93).

La synthèse d'esters possédant différents groupements protecteurs a ensuite été tentée afin d'évaluer l'influence de celui-ci sur le rendement lors de l'étape de cyclisation. Le dihydropyrane et le triéthylchlorosilane ont ainsi été testés, sans succès (**Schéma 41**). Les produits de départ ont été retrouvés dans les deux cas. Cela peut éventuellement s'expliquer par l'encombrement stérique, ces deux groupements étant plus volumineux que l'EOM.

Abdolreza et Somayeh décrivent pourtant la protection du 2-méthoxy-6-méthylbenzoate d'éthyle par le chlorure de triéthylsilyle avec 95% de rendement⁸⁹ tandis que McMurry et Erion⁹⁰ ont protégé le 3-hydroxy-5-méthoxyphthalate de diéthyle par le dihydropyrane avec un rendement de 82%.

Nous avons donc continué à utiliser l'EOM pour la protection de l'hydroxyle en ortho de l'ester.

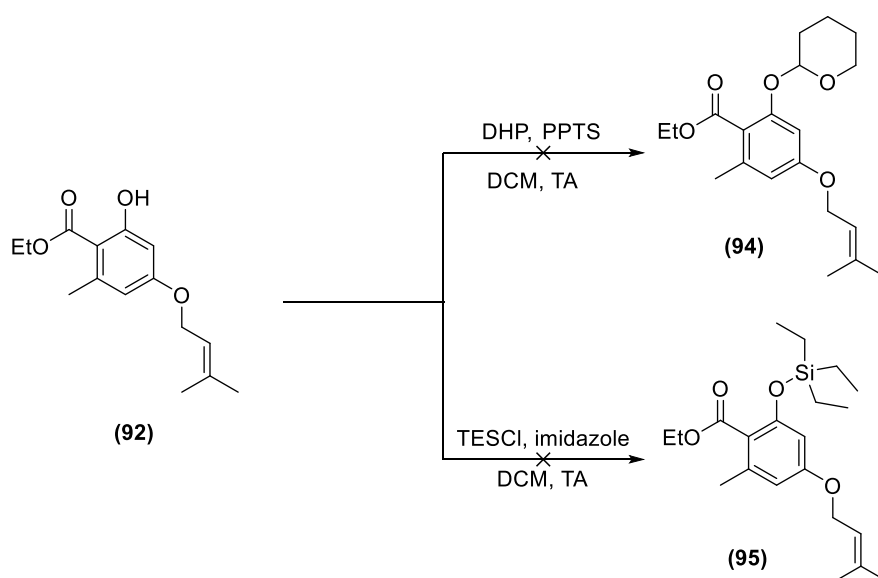


Schéma 41. Tentatives de protection du groupement hydroxyle en position 2.

L'hydroxyle situé sur la position 3 des vismiones naturelles les plus actives est alkylé par un groupement prénylé de taille variable. Afin d'étudier l'effet de la taille et la nature du substituant sur l'activité anti-*Leishmania*, une série d'esters a été synthétisée selon le même schéma réactionnel (**Schéma 42**). L'étape d'alkylation s'est déroulée sans encombre dans tous les cas. En revanche le rendement de l'étape de protection a fortement été influencé par la nature du substituant.

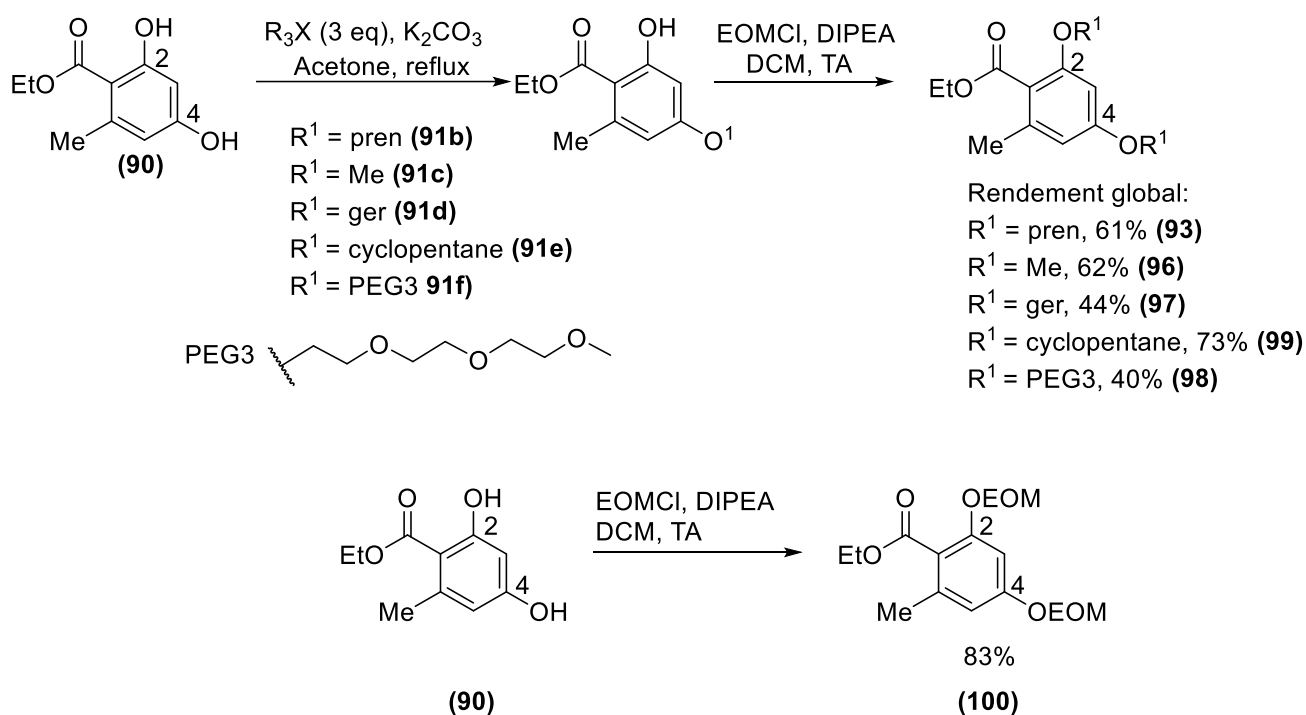


Schéma 42. Synthèse des esters substitués en position 4.

Les esters prénylés et géranylés ont été synthétisés afin d'obtenir des dihydroanthracénones proches des vismiones naturelles. Le cyclopentane a été greffé afin d'étudier l'effet de l'encombrement stérique sur cette position.

Une sonde fluorescente permettrait de visualiser le mécanisme d'action intracellulaire des vismiones par microscopie. Une telle sonde pourrait être greffée sur une dihydroanthracénone via un espaceur tel une chaîne polyéthylène glycol. L'éther PEGylé permettrait d'obtenir une dihydroanthracénone sur laquelle cette sonde fluorescente pourrait être greffée, en s'assurant que la présence d'une telle chaîne n'altère pas significativement l'activité.

II.2.3 Récapitulatif des esters synthétisés (Schéma 43)

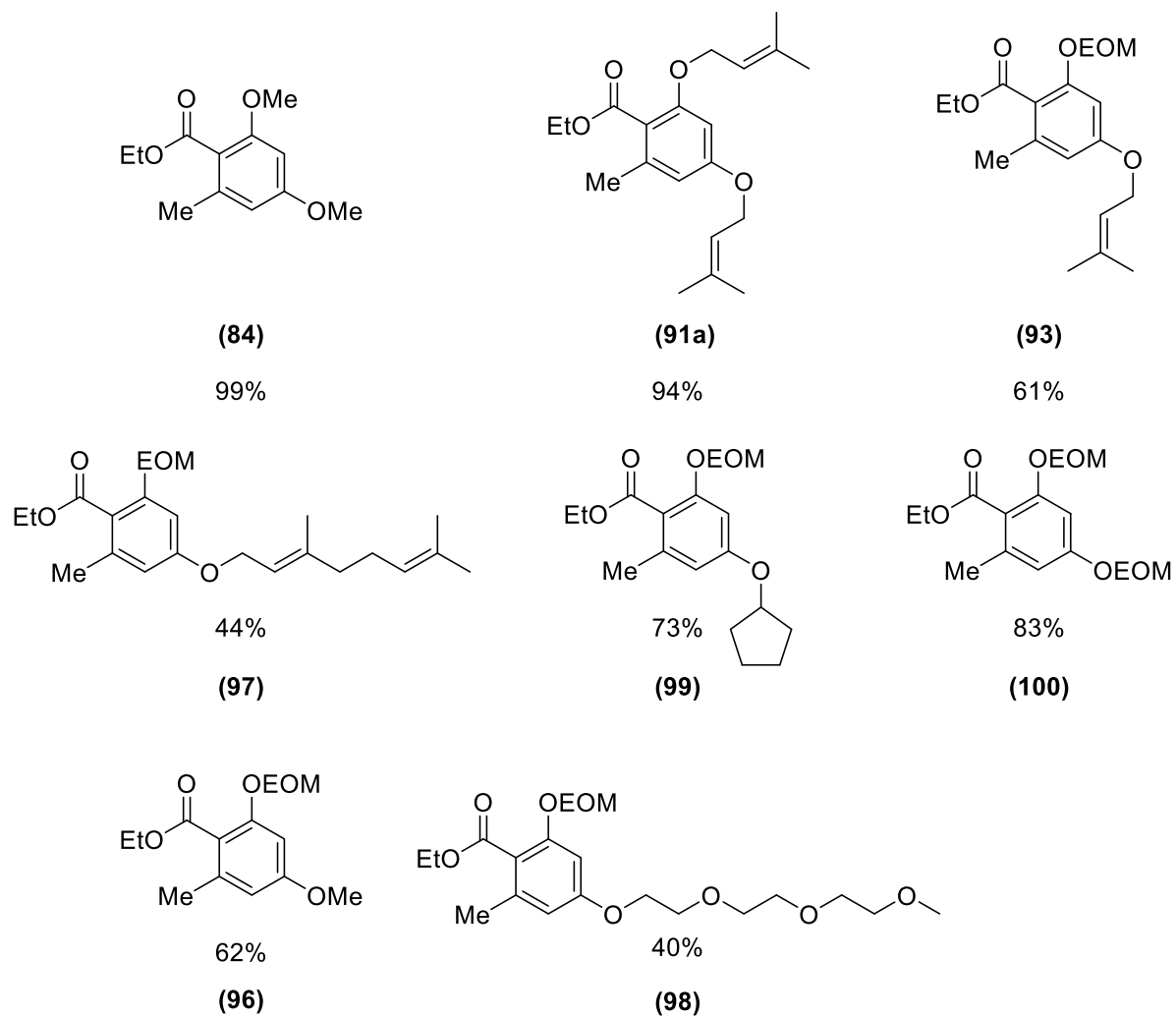


Schéma 43. Récapitulatif des esters alkylés synthétisés.

II.3. Synthèse de la cyclohexénone

II.3.1 Introduction

Nous avons envisagé la synthèse de cyclohexénones substituées en position 5, que l'on peut séparer en deux catégories. Les 3-éthoxycyclohexénones *C*-alkylées sur cette position peuvent être facilement obtenues à partir des dicétones correspondantes via un traitement acide dans l'éthanol. La cyclohexénone nue est quant à elle commercialement disponible.

En revanche, les cyclohexénones *O*-alkylées sont beaucoup plus délicates à obtenir, et de nombreuses voies de synthèse ont été explorées afin d'y parvenir (**Schéma 44**).

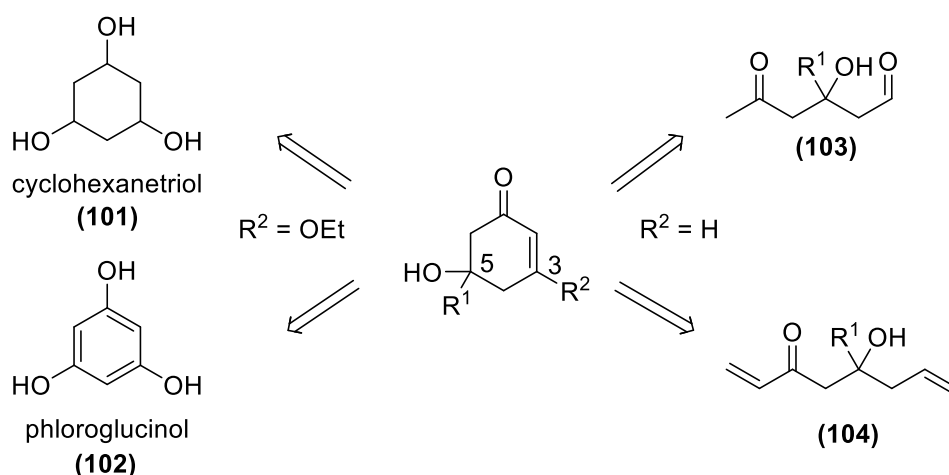


Schéma 44. Rétrosynthèse des cyclohexénones *O*-alkylées à partir de différents substrats.

Dans un premier temps la cyclohexénone hydroxylée ($R^1 = \text{H}$) possédant un groupe partant sur la position 3 ($R^2 = \text{EtO}$) a été ciblée en partant du phloroglucinol. Afin de nous rapprocher des vismiones naturelles, nous avons ensuite voulu introduire un méthyle sur cette position ($R^1 = \text{Me}$). Nous avons pour cela étudié différentes approches utilisant le cyclohexanetriol comme produit de départ. Par la suite, la synthèse de ces mêmes cyclohexénones mais ne possédant pas de groupe partant a été envisagée ($R^2 = \text{H}$). L'obtention de ces composés par aldolisation-crotonisation de l'aldol (**103**) en milieu acide, ou encore par réaction de métathèse sur l'hydroxycétone (**104**), a été étudiée.

II.3.2 A partir de dicétones

Les 3-éthoxycyclohexénones nues ou méthylées en position 5 ont facilement pu être obtenues à partir des dicétones correspondantes via un traitement acide dans l'éthanol (**Schéma 45**). De cette manière ont été obtenues les composés présentés sur le **Schéma 45**. La 3-éthoxycyclohex-2-èn-1-one (**108**) est disponible commercialement et a pu directement être engagée dans la réaction de Staunton-Weinreb.

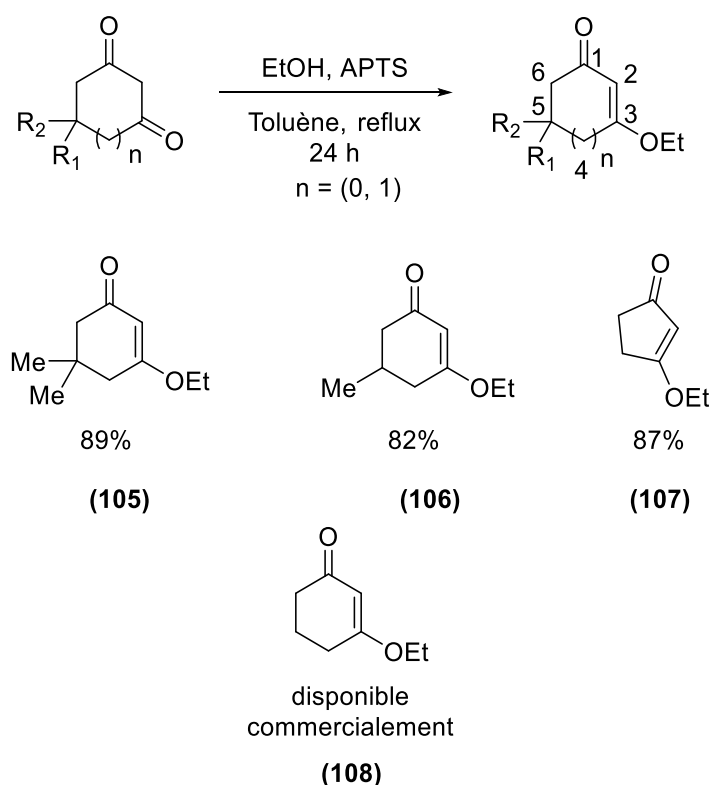


Schéma 45 . Synthèse de cyclohexénones et d'une cyclopenténone alkylées et composés obtenus.

Cependant le squelette des dihydroanthracénones naturelles comporte sur la position 6 un groupement méthyle ainsi qu'un groupement hydroxyle acétylé ou non. Afin d'étudier l'importance de la substitution sur cette position, nous avons envisagé la synthèse d'une cyclohexénone comportant une fonction hydroxyle en position 5.

II.3.3 A partir du phloroglucinol

II.3.3.1 5-hydroxycyclohexénone

La seule méthode de synthèse de la 3-éthoxy-5-hydroxycyclohexénone a été décrite par Xu *et al.*⁹¹. Celle-ci utilise le phloroglucinol comme produit de départ (**Schéma 46**).

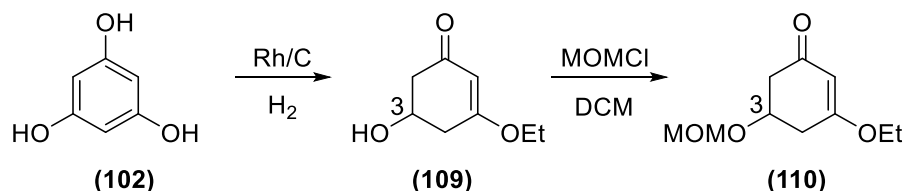


Schéma 46. Voie de synthèse de cyclohexénones hydroxylées en position 3 selon Xu *et al.*⁹¹.

La suite de la séquence réactionnelle décrit l'obtention de la 5-hydroxycyclohexénone acétylée sur la position 3 (**Schéma 47**), ce qui est intéressant car certaines vismiones naturelles très actives possèdent ce groupement acétyle. Aucune voie d'acétylation directement sur la cyclohexénone n'est décrite.

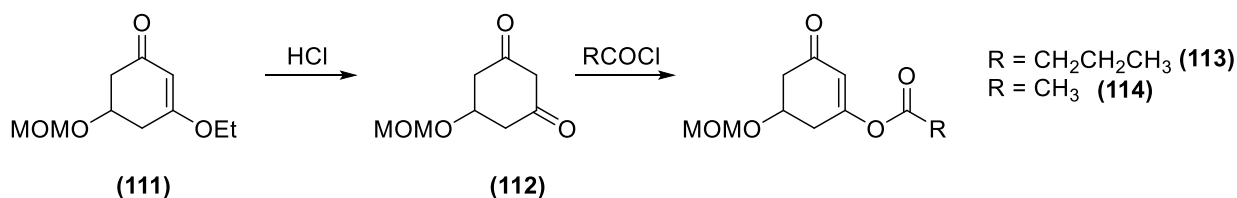


Schéma 47. Voie de synthèse de la 5-hydroxycyclohexénone acétylée.

Cette publication étant en réalité un brevet rédigé en caractères chinois, il a été difficile de comprendre toutes les réactions décrites dans cette voie de synthèse. Cependant la plupart des passages concernant la synthèse de la cyclohexénone hydroxylée ont pu être traduits et la réaction a été reproduite. L'étape de réduction du phloroglucinol catalysée au rhodium a également été décrite par Smisssman *et al.*⁹² dans des conditions similaires, ce qui nous a permis de valider les informations tirées du brevet.

Le phloroglucinol est réduit en présence de rhodium sur charbon en milieu basique sous pression d'hydrogène pour donner une dicétone intermédiaire sous forme de sel. Celui-ci est mis à réagir dans l'éthanol en milieu acide pour obtenir la cyclohexénone hydroxylée (**Schéma 48**).

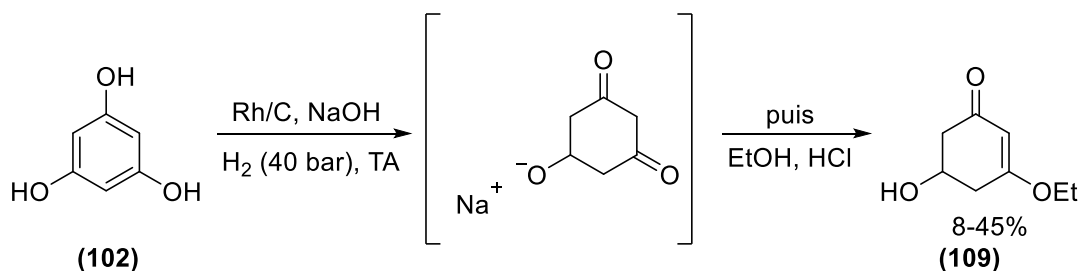


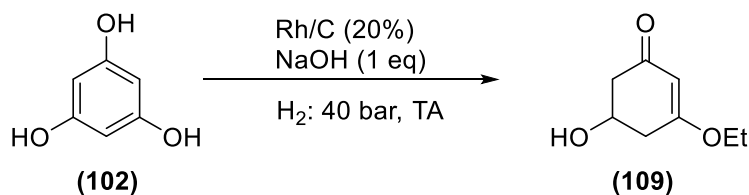
Schéma 48 Synthèse de la 3-ethoxy-5-hydroxycyclohex-2-én-1-one en partant du phloroglucinol.

Cette voie de synthèse s'est montrée problématique. En effet aucun mode opératoire reproductible et efficace de la réduction du phloroglucinol en hydroxycyclohexanedione n'a pu être mis au point (**Tableau 6**). Le suivi par CCM a montré que quel que soit le rendement final, il reste une forte proportion de phloroglucinol après la réduction. Le brevet mentionne une purification sur colonne échangeuse de cations, mais n'ayant pu comprendre parfaitement ce passage nous avons décidé de réaliser la purification sur colonne de silice classique. Lors des premiers essais, la formation d'une pâte était souvent observée lorsque le produit était repris dans l'acétate d'éthyle avant la purification. C'est pour ces essais que les plus faibles rendements ont été observés.

Smisman *et al.* décrivent un problème de polymérisation de la dicétone sous forme de sel de sodium, les empêchant d'isoler le dihydrophloroglucinol après neutralisation. Pour résoudre ce problème, après avoir filtré le rhodium et ajouté de l'eau au mélange réactionnel, celui-ci a été lyophilisé. Le résidu a été repris dans un mélange acétate d'éthyle-eau 40 : 60, filtré à nouveau puis séché. Ce protocole de purification leur aurait permis d'obtenir le sel de sodium du dihydrophloroglucinol avec un rendement de 98%, en se basant sur la quantité de phloroglucinol récupérée et n'ayant pas réagi.

Ce processus de lyophilisation a été reproduit mais les rendements obtenus sont restés aléatoires.

Tableau 6. Essais d'obtention de la cyclohexénone hydroxylée à partir du phloroglucinol.



Entrée	Conditions	Rendement (%)
1	H ₂ : 4bar ; Rh/C : 7,5%	8
2 (n = 2)	Reprise dans AcOEt avant colonne	0
3 (n = 7)	Variation du pH de traitement	7 - 29
4	pH acide lors du traitement ; dépôt EtOH + AcOEt sur colonne	31
5 (n = 4)	pH acide lors du traitement ; dépôt EtOH + AcOEt sur colonne	41 - 45

Le premier essai a été réalisé en conditions plus douces que les suivantes (**entrée 1**), soit 4 bar de H₂ avec Rh/C = 7,5% massique, et a permis d'obtenir la cyclohexénone avec un rendement de 8%. Deux essais ont mené à un rendement nul (**entrée 2**), la totalité du milieu réactionnel ayant polymérisé lors de la reprise dans l'acétate d'éthyle avant purification sur colonne. Lors des essais suivants nous avons tenté de trouver des conditions de traitement post-réactionnel permettant d'éviter cette polymérisation, en jouant sur le pH en fin de réaction ainsi que le mélange de solvant permettant de déposer le produit sur colonne (**entrée 3**). Des rendements entre 7 et 29% ont été obtenus. Le maintien d'un pH légèrement acide du milieu après réaction, ainsi que la reprise du produit sec dans l'éthanol avec un minimum d'acétate d'éthyle lors du dépôt sur colonne ont permis d'obtenir un rendement de 31% (**entrée 4**), puis de stabiliser le rendement entre 41% à 45% pour les essais suivants (**entrée 5**). L'usage d'une forte proportion d'éthanol lors du dépôt sur colonne présentant

l'inconvénient d'accélérer l'élution, et deux purifications successives se sont montrées nécessaires pour obtenir le produit final avec une pureté satisfaisante.

Malgré les conditions délicates la 5-hydroxycyclohexénone a donc pu être synthétisée et a été engagée dans une réaction de protection de l'hydroxyle en vue du couplage de Staunton-Weinreb avec un ester.

Plusieurs groupements protecteurs ont été testés (**Schéma 49**). Ce groupement devra pouvoir être retiré dans des conditions n'entraînant pas la dégradation de la dihydroanthracénone, tout en étant assez résistant pour ne pas être retiré lors du couplage. L'éthoxyméthane, le triéthylsilane et le tert-butyldiméthylsilylène ont été engagés dans cette réaction de protection. Les trois réactions de protection ont permis d'obtenir les composés désirés avec des rendements similaires compris entre 84% et 87%.

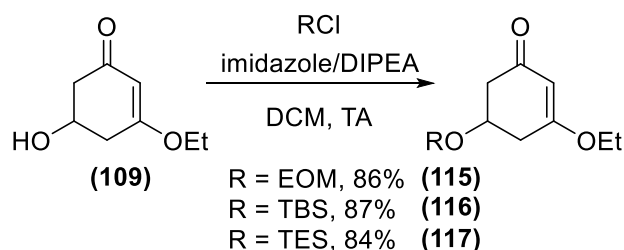


Schéma 49. Protection de l'hydroxyle en position 5.

II.3.3.2 5-hydroxy5-méthylcyclohexénone.

La 5-hydroxycyclohexénone permet potentiellement d'accéder à la cyclohexénone hydroxylée et méthylée sur la position 5 (**118**), rendant possible la synthèse totale de certaines vismiones naturelles (**Schéma 50**).

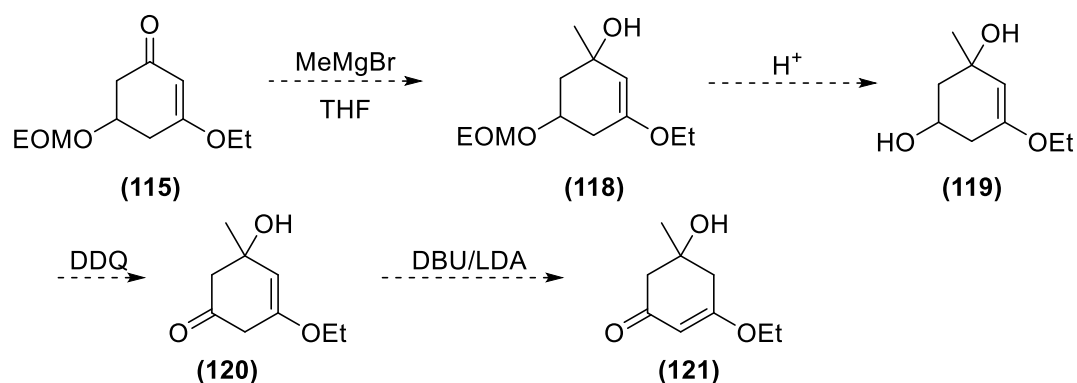


Schéma 50. Synthèse permettant potentiellement d'accéder à la 5-hydroxy-5-méthylcyclohexénone.

L'addition nucléophile du bromure de méthylmagnésium sur le carbonyle suivie de la déprotection du groupement éthoxyméthyle puis de l'oxydation de l'alcool donnerait la cyclohex-3-énone. L'isomérisation de celle-ci en milieu basique, en utilisant une base organique, conduirait au produit désiré.

Cette voie de synthèse présente l'intérêt de permettre l'obtention de la cyclohexénone hydroxylée et méthylée à partir de la cyclohexénone hydroxylée en peu d'étapes. Elle est cependant audacieuse et plusieurs réactions secondaires peuvent se produire.

Lors de l'étape de déprotection en milieu acide, il est possible que les hydroxyles soient protonés et entraînent l'aromatisation du cycle après une double déshydratation (Schéma 51).

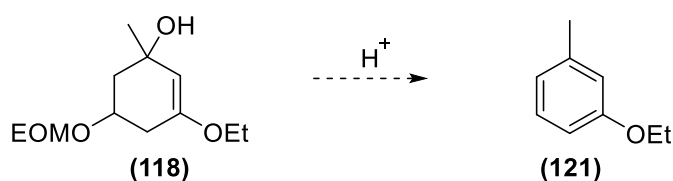


Schéma 51. Aromatisation du cycle en milieu acide.

De la même façon le composé formé après oxydation peut s'aromatiser (**Schéma 52**).

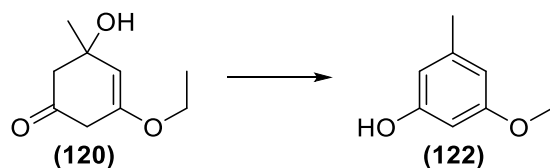


Schéma 52. Aromatisation du composé obtenu après oxydation.

La première étape de méthylation, une classique addition 1,2 de Michael, a été décrite sur une cyclohexénone non substituée par Coote *et al.*⁹³ avec 69% de rendement (**Schéma 53**).

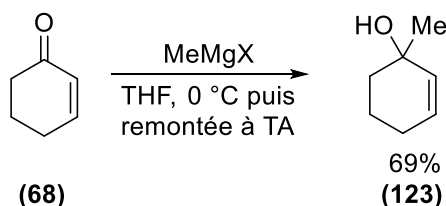


Schéma 53. Méthylation de la cyclohexénone par une réaction de Grignard.

Cependant lors de cette étape c'est l'addition 1,4 de Michael qui est survenue (**Schéma 54**), et c'est la 5-(éthoxyméthyl)-3-méthylcyclohex-2-ène qui a ainsi été obtenue avec un rendement de 89%. Dans un premier temps, ce résultat nous a semblé surprenant. En effet les organomagnésiens sont des électrophiles durs réagissant en principe avec des centres nucléophiles durs comme le carbonyle de la cétone. L'addition 1,4 sur le site mou, est normalement réalisée avec un électrophile mou tel qu'un cuprate.

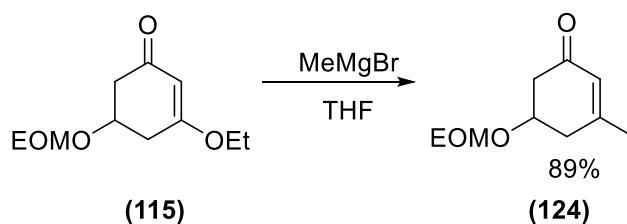


Schéma 54. Tentative de méthylation sur la cyclohexénone.

Ce résultat a néanmoins été retrouvé par Kehrlí *et al.*⁹⁴. Plusieurs cyclohexanones β -alkylées ont été obtenues de manière classique par une addition 1,4 à partir de la 3-méthylcyclohexénone (Schéma 55), en passant par la formation d'un cuprate. En revanche, la même réaction partant de la 3-éthoxycyclohexénone a été réalisée avec le bromure de magnésium sans former de cuprate, et l'addition 1,4 est à nouveau survenue pour former la cyclohexanone alkylée en position 3, grâce à l'élimination de l'éthanol.

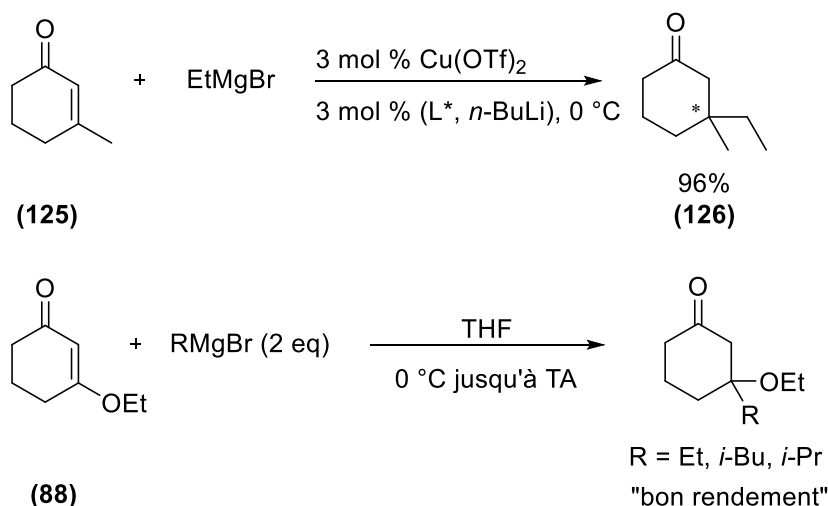


Schéma 55. Addition 1,4 en passant ou non par la formation d'un organocuprate.

En revanche, l'addition 1,2 est réalisée sur une cyclohepténone au moyen de méthyllithium dans l'éther (Schéma 56). Cependant aucun essai n'a été réalisé sur une 3-éthoxycyclohepténone.

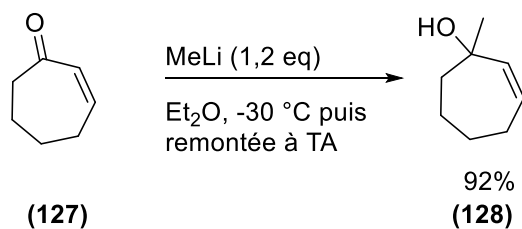


Schéma 56. Addition 1,2 sur une cyclohepténone.

Lors de l'étape de méthylation, un doublet libre de l'éthanol peut se délocaliser pour former un anion stabilisé par le bromure de magnésium (Schéma 57). Une réaction d'addition-élimination entraînerait l'obtention de la cyclohexénone méthyliée.

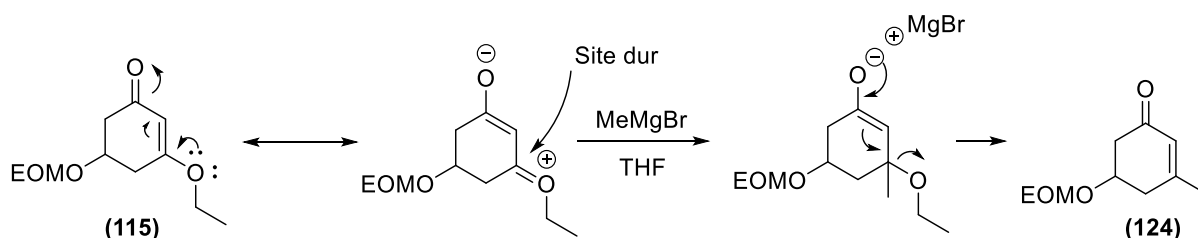


Schéma 57. Élimination de l'éthanol lors de l'étape de méthylation.

Au vu des rendements aléatoires, du coût non négligeable du rhodium nécessaire dans cette voie de synthèse de la cyclohexénone hydroxylée et de la difficulté à mettre au point une synthèse de la 5-hydroxy-5-méthylcyclohexénone, d'autres voies ont été envisagées afin de permettre de disposer des grandes quantités de cette cyclohexénone nécessaires pour réaliser les couplages avec différents esters, de manière plus reproductible et abordable.

II.3.4 A partir du cyclohexanetriol

Plusieurs voies de synthèse permettant d'accéder aux cyclohexénones hydroxylée ou hydroxylée et méthylée en position 5 ont été imaginées à partir du cyclohexanetriol (**Schéma 58**).

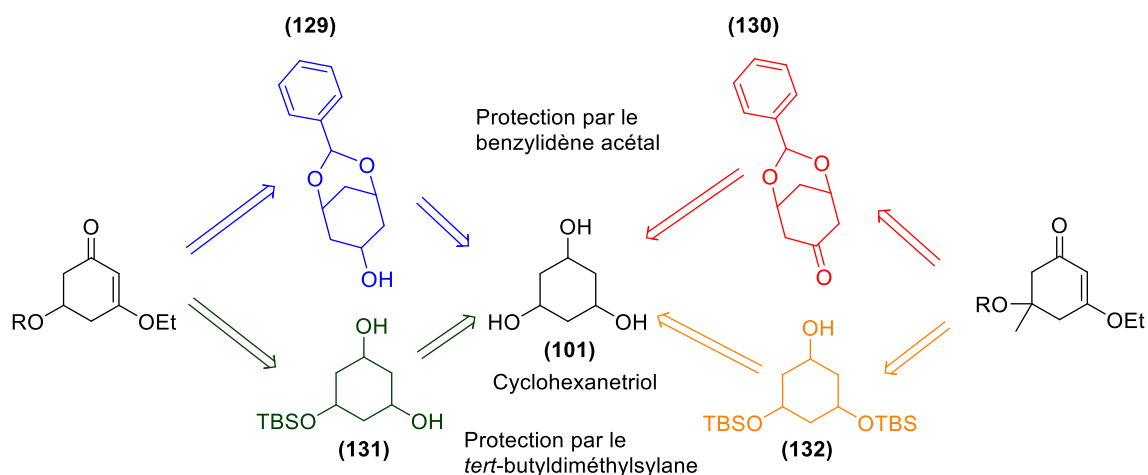


Schéma 58. Voies de synthèses possibles des cyclohexénones à partir du cyclohexanetriol.

L'objectif est de protéger un ou deux hydroxyles afin d'oxyder le ou les hydroxyles restants. Cette protection peut se faire soit par un benzylidène acétal (**129**, **130**) après libération d'un des trois hydroxyles protégés par le cétal correspondant, soit par le *tert*-butyldiméthylsylane (**131**, **132**).

II.3.4.1 Protection du cyclohexanetriol par un benzylidène cétal.

Honda *et al.*⁹⁵ décrivent la synthèse d'une cyclohexanone intermédiaire pouvant conduire à la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone (**121**). Le dérivé du cyclohexanol à partir duquel celle-ci est formée permet quant à lui d'obtenir la 5-hydroxycyclohexénone (**109**) (**Schéma 59**).

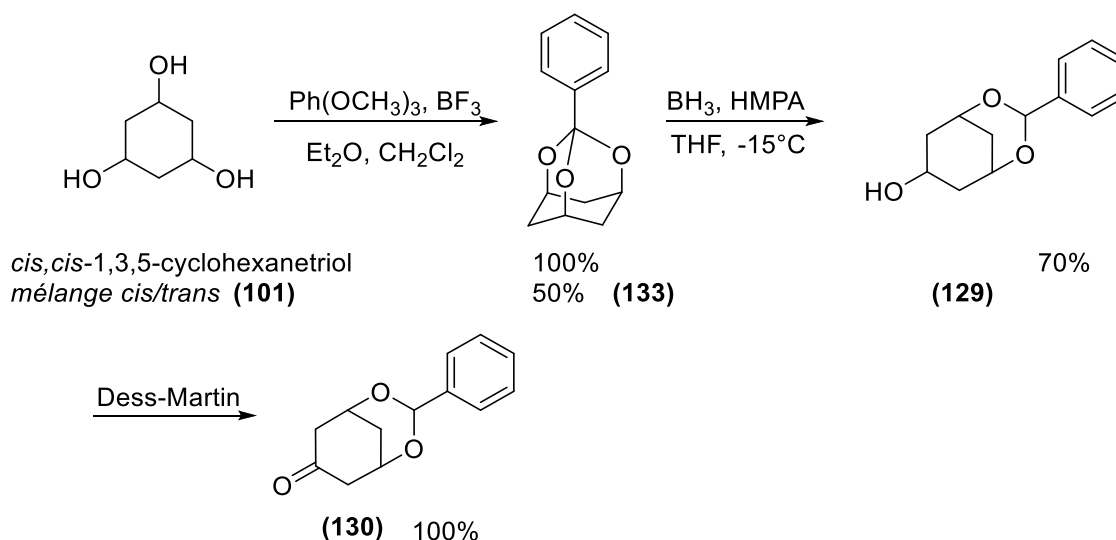


Schéma 59. Synthèse de la cyclohexanone intermédiaire.

Après avoir protégé les trois groupements hydroxyles par le triméthoxyméthylbenzène puis déprotégé sélectivement une seule des trois positions, une oxydation de Dess-Martin leur a permis d'oxyder le groupement hydroxyle pour obtenir la cyclohexanone.

Deux voies de synthèse ont été imaginées à partir de celle-ci. La première partirait du 3,5-*O*-benzylidène acétal du cyclohexanetriol (Schéma 60a). L'hydroxyle libre serait protégé par un groupement trialkylsilyle. Puis le benzylidène acétal serait retiré pour obtenir le diol, qui serait oxydé puis réagirait dans l'éthanol en milieu acide pour donner la cyclohexénone hydroxylée.

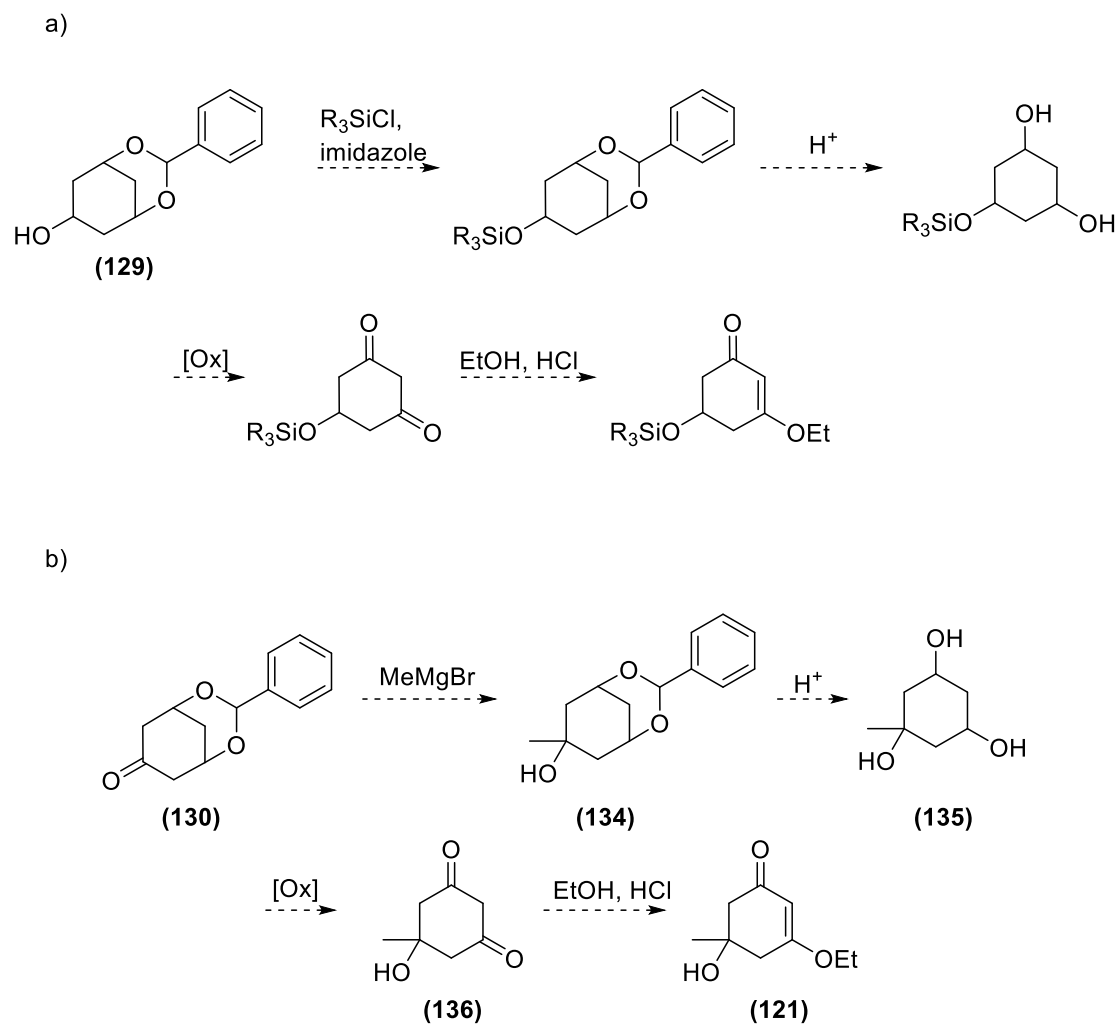


Schéma 60. Voies de synthèse proposées pour l'obtention de la 5-hydroxy et de la 5-hydroxy-5-méthylcyclohexénonecyclohexénone.

L'étape de double oxydation simultanée peut poser problème, au vu du rendement décrit dans la littérature par Seitz *et al.* pour la double oxydation simultanée d'un diol cyclique à six chaînons⁹⁶ (Schéma 61).

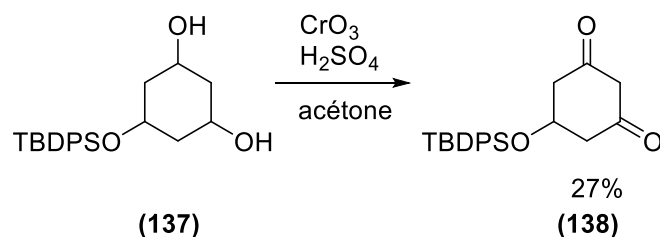
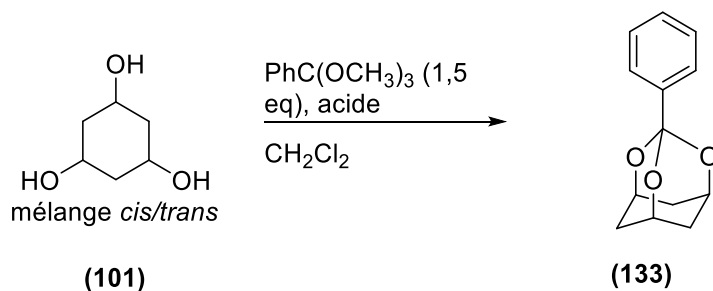


Schéma 61. Double oxydation simultanée par le trioxyde de chrome.

L'autre voie de synthèse partirait de la cyclohexanone, laquelle subit l'addition nucléophile du bromure de méthylmagnésium sur le carbonyle pour donner l'alcool quaternaire (**Schéma 60b**). Après déprotection des deux hydroxyles, leur oxydation simultanée aboutirait à la formation d'une dicétone. Celle-ci conduirait finalement à la cyclohexénone désirée par réaction dans l'éthanol en milieu acide.

Malheureusement aucunes conditions permettant de réaliser la première étape de protection n'ont pu être mises au point, l'acide paratoluènesulfonique ainsi que l'acide camphorsulphonique n'ont pas permis à la réaction d'avoir lieu, seuls les produits de départ et l'ester benzoïque issu du triméthoxyméthylbenzène ont été retrouvés (**Tableau 7**).

Tableau 7. Essais de protection du cyclohexanetriol par le benzylidène cétal.



Entrée	Acide (eq)	Produits
1	APTS (0,1)	Départ
2	CSA (0,1)	Départ

II.3.4.2 Protection du cyclohexanetriol par le tributylsilane

Cette voie de synthèse apparaissait néanmoins prometteuse, d'autres essais ont été réalisés en utilisant le TBS comme groupement protecteur lors de la première étape (**Schéma 62**). La 5-hydroxycyclohexénone peut être obtenue par isomérisation en milieu acide de la dicétone qui elle est obtenue après la protection d'un des hydroxyles et l'oxydation simultanée des deux hydroxyles libres. La 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone peut quant à elle être obtenue par isomérisation en milieu acide de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexan-1,3-dione. Celle-ci est formée par addition 1,2 sur la 3,5-bis((tert-butyl)diméthylsilyl)oxy)cyclohexanone puis oxydation simultanée des deux hydroxyles restant après déprotection. Cette cétone est elle-même obtenue en protégeant deux des hydroxyles puis en oxydant le troisième.

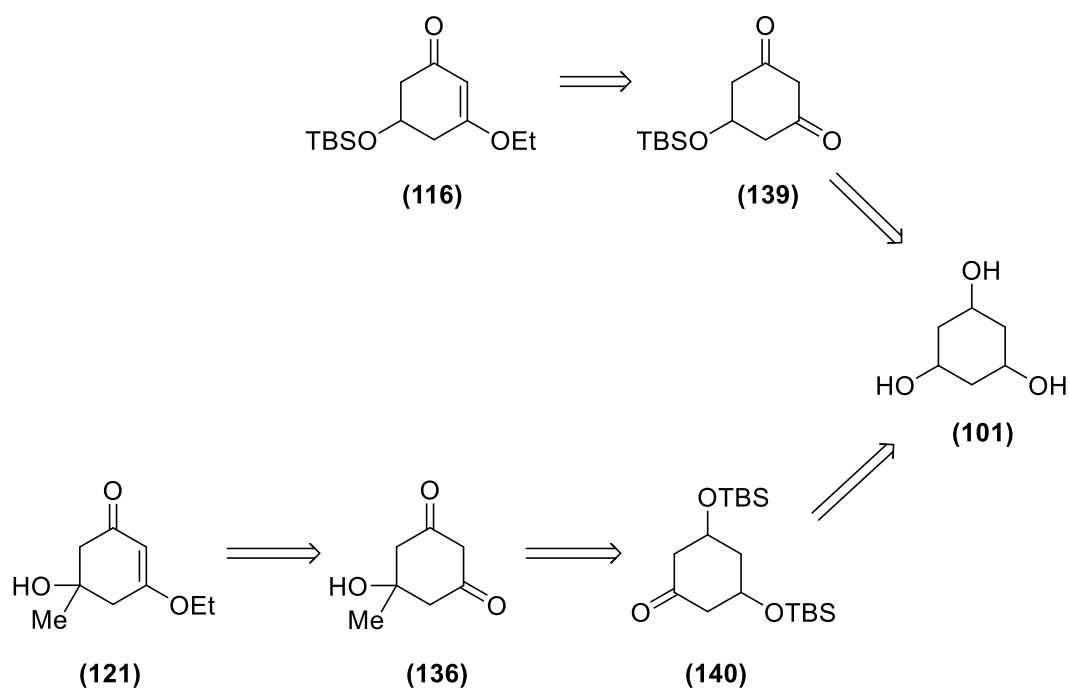


Schéma 62. Rétrosynthèse des 5-hydroxy- et de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone à partir du cyclohexanetriol.

La double protection par le TBS du cyclohexanetriol n'est pas décrite. En revanche Luo *et al.*⁹⁷ décrivent la double protection de la 3,5-dihydroxycyclohexanone avec un rendement quantitatif (Schéma 63).

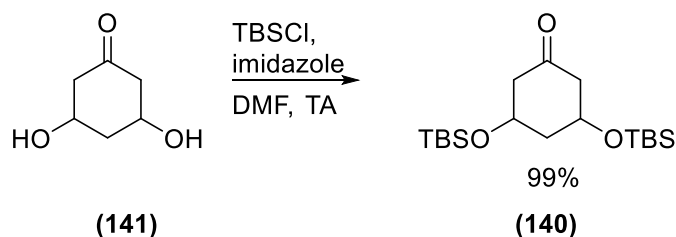


Schéma 63. Protection de la 3,5-dihydroxycyclohexanone par des groupements TBS.

La monoprotection d'un des hydroxyles du cyclohexanetriol est en revanche plusieurs fois décrite^{98,99} (Schéma 64).

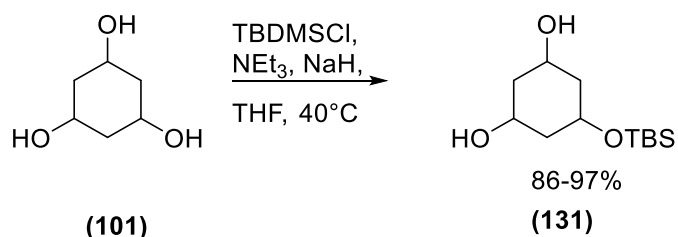


Schéma 64. Monoprotection du cyclohexanetriol par un groupement TBS.

Nous avons donc initialement cherché à réaliser la monoprotection du cyclohexanetriol d'après la littérature (Schéma 65). Le composé désiré n'a pas été formé mais le cyclohexanetriol diprotégé a été obtenu avec un rendement de 4%.

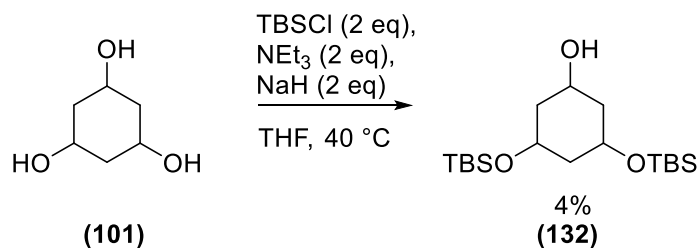


Schéma 65. Tentative de monoprotection du cyclohexanetriol d'après la littérature.

Nous avons ensuite utilisé le TBSCl en présence d'imidazole dans le DMF (Schéma 66). En variant le nombre d'équivalents de TBSCl nous avons pu former les composés mono- et di-protégés avec chacun 60% de rendement.

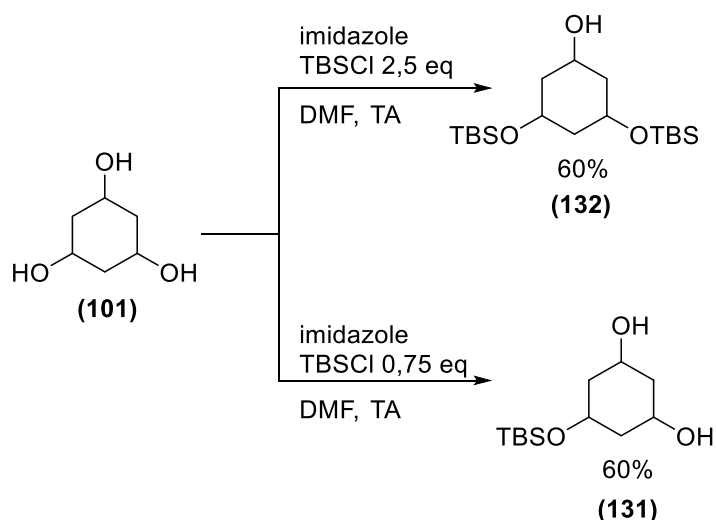


Schéma 66. Mono- et di-protection des hydroxyles du cyclohexane triol par le TBS.

En utilisant 2,5 équivalents de TBSCl on obtient de manière préférentielle le 3,5-bis((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)cyclohexanol après 24 h de réaction, tandis qu'en utilisant 0,75 équivalent on obtient préférentiellement le composé (131) après quelques heures.

De plus nous sommes parti du mélange *cis/trans* du cyclohexanetriol. Deux diastéréoisomères ont donc à chaque fois été isolés. Cependant nous avons utilisé le diastéréoisomère majoritaire dans la suite de la voie réactionnelle.

Nous nous sommes intéressés au composé di-protégé (132), permettant d'obtenir la cyclohexénone hydroxylée et méthylée (Schéma 67). Le groupement hydroxyle restant a été oxydé par le PCC sur alumine pour obtenir la cétone avec un rendement de 84%, sur laquelle a été additionné le bromure de méthylmagnésium pour obtenir l'alcool avec un rendement de 77%. Cette addition ne survenant pas d'un côté préférentiellement, chaque diastéréoisomère en donnait lui-même deux nouveaux. Les deux alcools secondaires ont été déprotégés par action du fluorure de tétra-butylammonium pour conduire au triol correspondant avec un rendement de 72%. A ce stade, l'étape suivante devait permettre d'obtenir la dicétone par oxydation simultanée des deux alcools. Celle-ci aurait été reprise dans l'éthanol en milieu acide après filtration, pour obtenir la cyclohexénone. L'oxydation au PCC sur alumine dans le dichlorométhane n'a cependant pas fonctionné, le triol de départ ayant été récupéré.

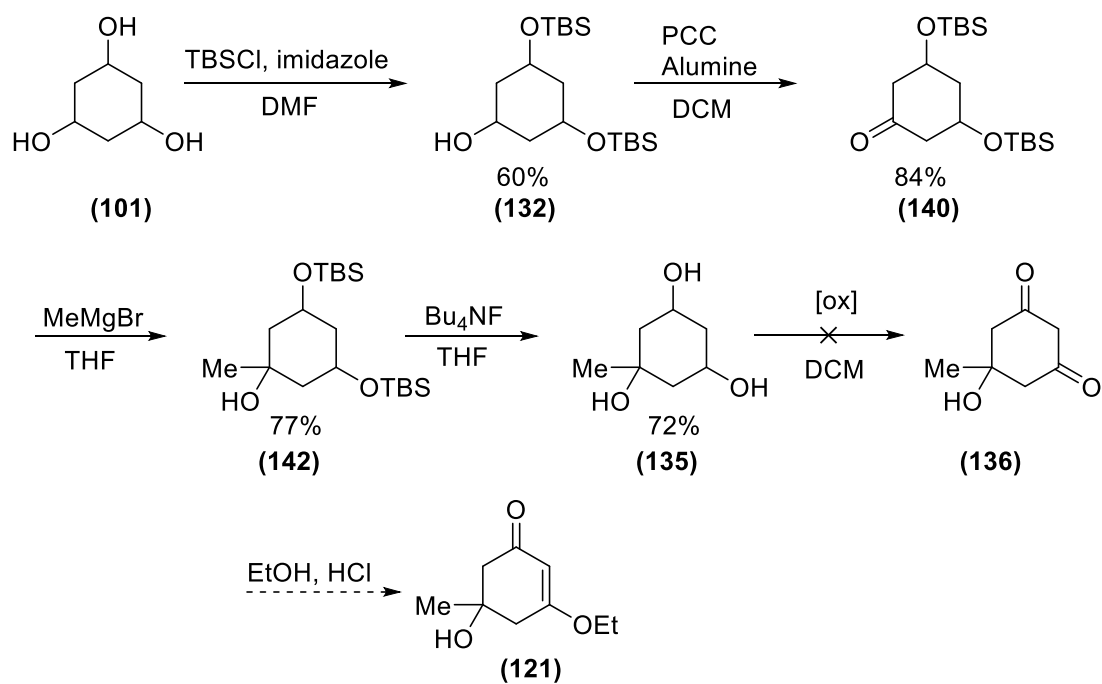
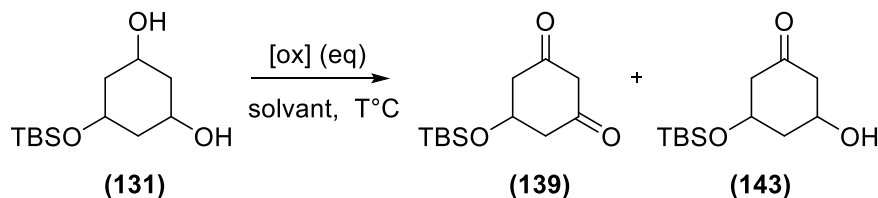


Schéma 67. Voie de synthèse de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone en partant du cyclohexanetriol.

Au vu du résultat précédent, une étude de cette réaction a été entreprise (**Tableau 8**).

Tableau 8. Etude de la réaction d'oxydation simultanée de deux hydroxyles.



Oxydant	Eq	Solvant	T°C	Résultat
PCC	5	DCM	reflux	30% (143)
PCC	5	ACN	reflux	/
MnO ₂ activé	20	DCM	TA	/
Swern	2,4	DCM	-78 °C jusqu'à TA	/
MnO ₂ activé + KMnO ₄	20 + 3	ACN	TA	/
Dess-Martin	4	CHCl ₃	TA	/

Lors des premiers essais le PCC au reflux du dichlorométhane a permis d'isoler le composé mono oxydé (**143**). En revanche la même réaction réalisée au reflux de l'acétonitrile n'a pas entraîné l'oxydation du produit de départ. Le dioxyde de manganèse activé (20 équivalents) dans le dichlorométhane n'a pas non plus permis de réaliser l'oxydation, de même lorsqu'on ajoute 3 équivalents de permanganate de potassium. Les oxydations de Swern et de Dess-Martin n'ont pas non plus permis de détecter la formation d'un produit oxydé, des mélanges complexes ont été retrouvés. Etant donné qu'aucun de ces essais d'oxydation ne s'est révélé concluant et malgré l'obtention efficace du triol méthylé (**135**), nous avons dû à regret abandonner cette voie de synthèse.

II.4. Synthèse de cyclohexénones sans groupe partant

Devant la difficulté rencontrée à obtenir la cyclohexénone possédant un groupe partant éthoxy en position 3, nous nous sommes tournés vers la synthèse de cyclohexénones sans groupe partant. Plusieurs voies ont été explorées (**Schéma 68**).

Une première synthèse des cyclohexénones méthylée mais aussi méthylée et hydroxylée en position 5 a été imaginée à partir du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane. Cette synthèse passe par la cyclisation du composé intermédiaire linéaire par aldolisation. Deux autres voies de synthèse partant du cyanoacétate d'éthyle ou du but-3-énoate d'isobutyle, impliquant une cyclisation par métathèse, ont également été proposées.

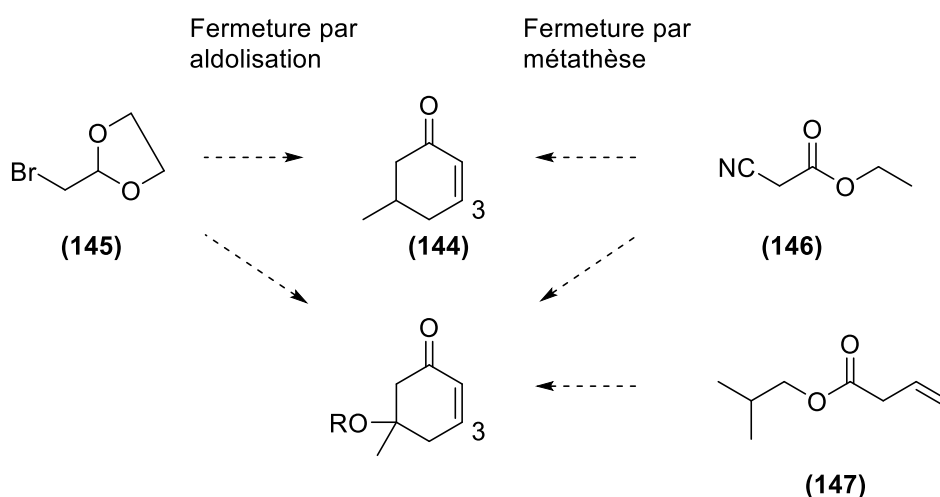


Schéma 68. Schéma général de la synthèse des cyclohexénones sans groupe partant en position 3.

II.4.1 Fermeture par aldolisation à partir du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane

Duhamel *et al.* décrivent la fermeture par aldolisation de plusieurs cétoaldéhydes en milieu acide¹⁰⁰ (**Schéma 69**).

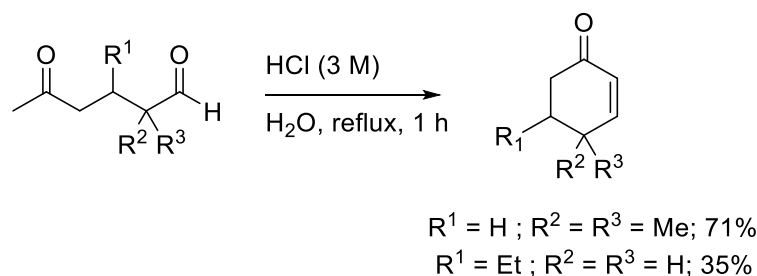


Schéma 69. Cyclisation d'un cétoaldéhyde par aldolisation.

II.4.1.1 Par hydroformylation du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane

L'utilisation du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane (**145**) permet potentiellement d'obtenir les deux cyclohexénones ne possédant pas de groupe partant (Schéma 70). La cyclohexénone peut être formée par aldolisation–crotonisation sur l'intermédiaire (**150**) en milieu acide, lui-même obtenu à partir de l'aldéhyde (**148**) ou de la cétone (**149**) par réaction avec l'acétone en milieu basique. La cétone (**149**) pourrait elle-même être issue de (**148**) par addition nucléophile du bromure de méthylmagnésium sur l'amine de Weinreb obtenue après oxydation de (**148**) en acide carboxylique. Le composé (**148**) pourrait être formé par une séquence élimination/hydroformylation à partir du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane (**145**).

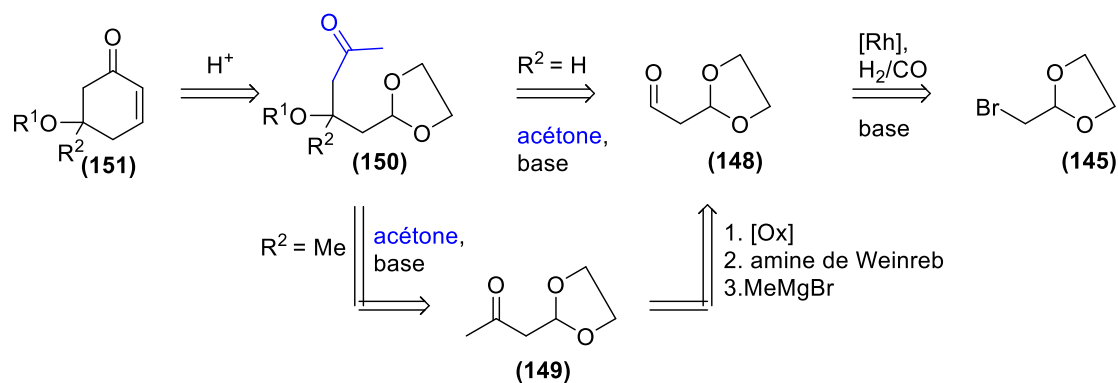


Schéma 70. Schéma de rétrosynthèse des cyclohexénones sans groupe partant à partir du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane.

L'hydroformylation permet la transformation des oléfines en aldéhydes par addition de monoxyde de carbone et de dihydrogène en utilisant un catalyseur de rhodium ou de cobalt. Du fait que les deux carbones de l'insaturation soient réactifs, le produit d'hydroformylation

peut être un mélange entre les aldéhydes linéaires et ramifiés. Les oléfines terminales conduisent majoritairement à la formation de l'aldéhyde linéaire.

En revanche les oléfines aromatiques ou celles possédant un hétéroatome directement lié conduisent majoritairement à l'aldéhyde ramifié (**Schéma 71**). En effet, sur les α -oléphines acétylées, le Rhodium peut être quélaté par l'oxygène. Dans le cas des α -oléphines aromatiques un équilibre peut conduire à la perte de l'aromatisme et à la délocalisation du rhodium, qui est stabilisé.

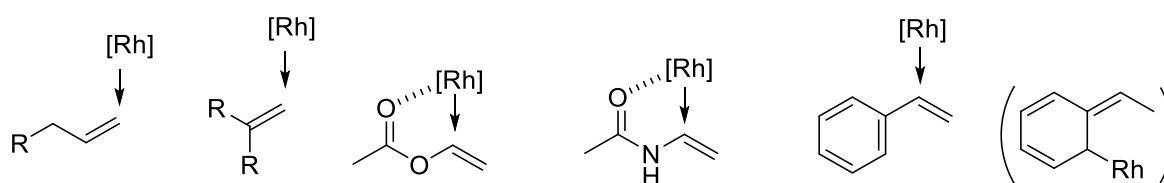


Schéma 71. Régiosélectivité de l'hydroformylation de différentes oléfines.

Cependant l'hydroformylation est également dépendante de l'encombrement. Dans notre cas, nous avons affaire à un alcène 1,1-disubstitué qui peut donc stabiliser le rhodium pour donner l'aldéhyde (**Schéma 72**). L'encombrement doit favoriser l'aldéhyde linéaire ainsi que la présence des deux atomes d'hydrogène qui enrichissent le carbone terminal en électrons, en plus de permettre une quélation partielle.

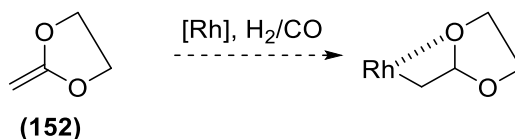


Schéma 72. Stabilisation du rhodium par l'oxygène conduisant à l'aldéhyde.

Le choix du ligand du rhodium peut également être crucial quant au résultat de la réaction. Nous avons testé deux ligands :

- Le biphephos, un diphosphate connu pour favoriser la formation des aldéhydes linéaires
- Le triphénylphosphite, électroniquement comparable au biphephos, mais stériquement moins contraint.

En utilisant un catalyseur également encombré comme le biphephos ou le triphénylphosphite, la formation de l'aldéhyde terminal est favorisée.

La formation du cétène est déjà décrite à partir du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane (**145**). La réaction a été réalisée sous ultrasons pour éviter la polymérisation observée en leur absence¹⁰¹. En revanche l'hydroformylation de ce type de composés n'a jamais été décrite.

Cette voie de synthèse est certes aventureuse mais l'hydroformylation est une technique maîtrisée au laboratoire, nous lui avons donc donné sa chance (**Schéma 73**).

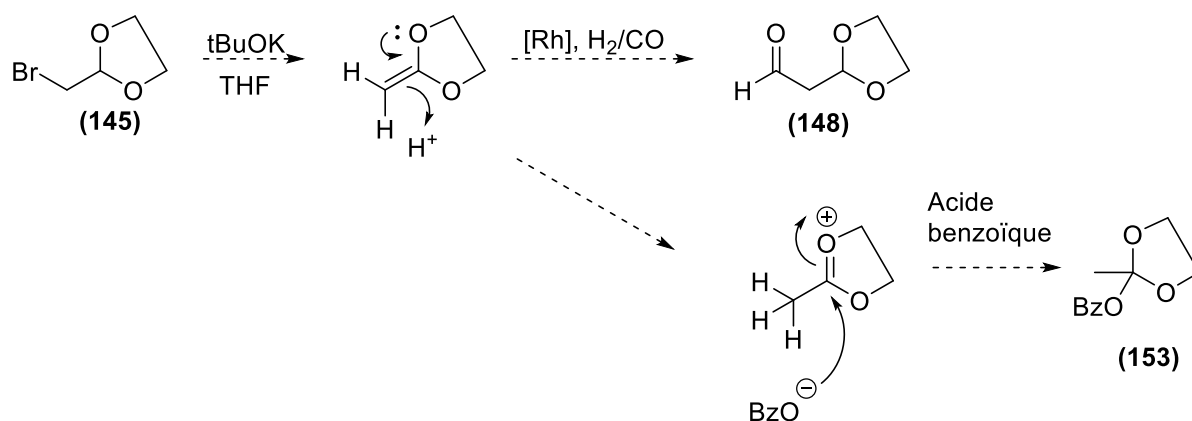


Schéma 73. Proposition de synthèse de la cyclohexénone en partant du 2-(bromométhyl)-1,3-dioxolane.

L'acétal de cétène résultant de la première étape étant très volatile, de l'acide benzoïque en excès a été ajouté au milieu réactionnel et le tout a été agité pendant 12 h. L'acide benzoïque vient s'additionner sur l'acétal de cétène formé, donnant le composé (**153**) beaucoup moins volatil qui permet de vérifier si la réaction a eu lieu ou non¹⁰². Lors du premier essai, le suivi de cette étape par CCM a montré que le produit de départ bromé était en grande majorité consommé et qu'un produit plus polaire était formé. Cependant l'analyse RMN ¹H du brut montre l'absence du produit attendu. On retrouve la présence de l'acide benzoïque ainsi qu'un autre composé majoritaire dont les signaux sont proches de ceux du produit de départ, faisant penser à un produit de la substitution du brome par le tert-butoxyde (**Schéma 74**).

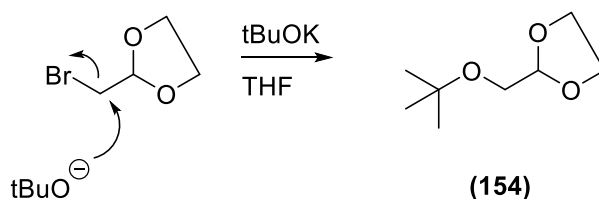


Schéma 74. Réaction supposée de type SN2 entre le tBuOK et le substrat bromé.

Afin de nous assurer que le produit attendu n'était pas formé avant d'être dégradé, deux essais de réaction « one pot » ont été tentés, afin d'obtenir directement l'aldéhyde (148) à partir du 2-bromométhyl-1,3-dioxolane (145) (Schéma 75).

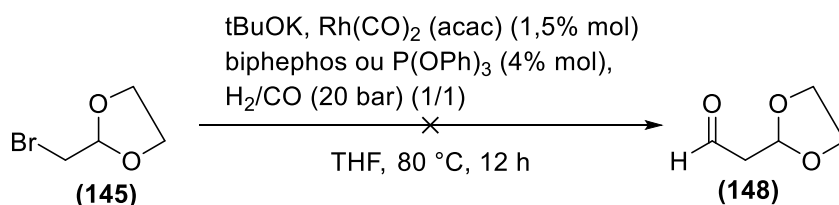


Schéma 75. Tentative de réaction « one pot » pour l'obtention de l'aldéhyde.

La réaction a été tentée deux fois en utilisant le biphephos puis le triphénylphosphite comme ligand. Dans le premier cas après traitement de la réaction un produit largement majoritaire comportant deux aromatiques a été retrouvé en RMN. Il s'agit vraisemblablement d'un produit d'oxydation du biphephos. Lors du second essai, on retrouve sur le spectre RMN les signaux correspondant au triphénylphosphite ainsi que le produit d'addition – élimination déjà retrouvé lors des précédentes réactions.

D'autres conditions de réaction pour l'obtention de l'alcène sont décrites dans la littérature, cependant les rendements donnés sont trop faibles pour nous permettre d'envisager l'enchaînement de cette étape d'élimination avec l'hydroformylation dans de bonnes conditions. Cette voie de synthèse a donc elle aussi été écartée même si l'hydroformylation d'acétal de cétène reste un sujet de recherche très prometteur.

II.4.1.2 Par formation de l'organomagnésien

Cette voie de synthèse devait permettre d'aboutir à la cyclohexénone méthylée et hydroxylée en seulement quatre étapes (Schéma 76). Le réactif de Grignard formé à partir du 2-bromométhyl-1,3-dioxolane (145) mis en présence de l'acétylacétone conduit au composé (156). S'en suit la déprotection de l'acétal (157) pour obtenir l'aldéhyde (158) qui, en milieu basique, cyclise pour donner la cyclohexanone intermédiaire qui permet après traitement en milieu acide d'obtenir la cyclohexénone (159).

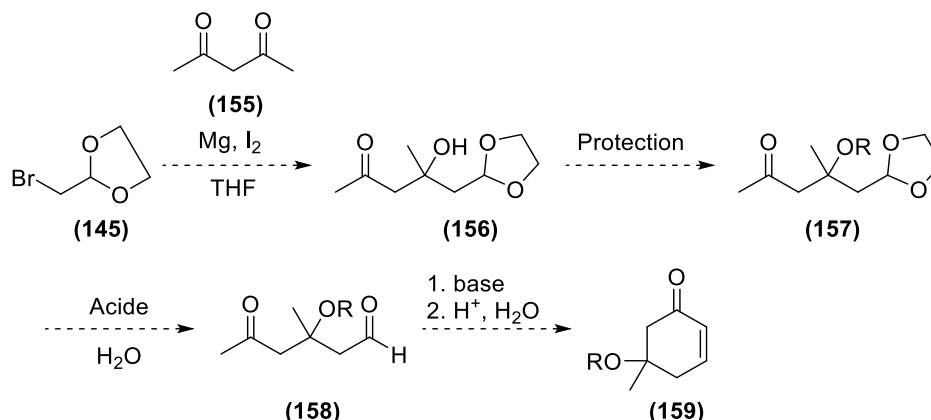


Schéma 76. Proposition de synthèse de la cyclohexénone passant par la formation d'un organomagnésien.

Différentes conditions de réaction de formation de l'organomagnésien ont été testées. Les premiers essais ont été réalisés dans l'éther éthylique à température ambiante. Le réactif de grignard n'a cependant pas été formé (très faible consommation du magnésium). Les essais suivants ont été réalisés dans le THF et le milieu réactionnel a été chauffé au reflux avant d'ajouter le dérivé bromé. Le réactif de grignard a cette fois-ci bien été formé, en témoigne la disparition du magnésium ainsi que l'apparition d'une couleur gris-noire dans le milieu

réactionnel. Malheureusement, il n'a pas réagi avec la cétone. Après ajout de la dicétone, aucune réaction n'a pu être constatée.

L'équilibre entre la dicétone et le β -cétoénol pouvant potentiellement altérer la réactivité du carbonyle, une des deux cétones a été protégée avec un acétal avant de réaliser la réaction de grignard sur l'autre carbonyle (**Schéma 77**). La première étape de protection a été réalisée sur 20 grammes de 2,4-pentanedione et a permis d'obtenir une grande quantité du cétal (**160**). La réaction de grignard sur le cétal n'a cependant donné à nouveau aucun résultat.

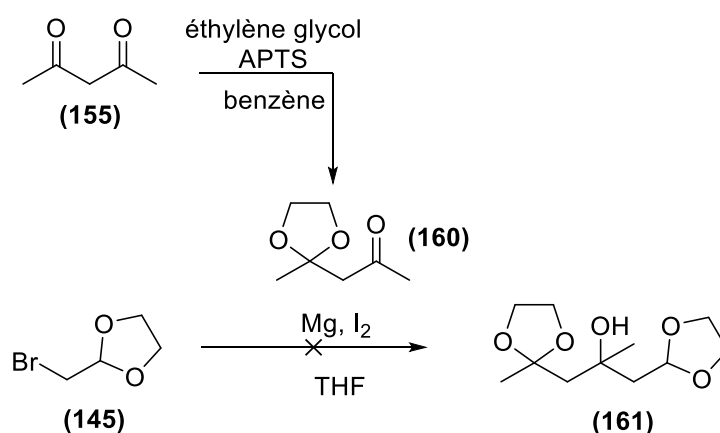


Schéma 77. Proposition de synthèse de la cyclohexénone en partant de l'acétylacétone mono-protégée par sous forme cétal.

II.4.2 Fermeture par métathèse

La métathèse est une réaction intéressante pour obtenir un cycle à partir d'un diène linéaire, car elle s'effectue dans des conditions douces, contrairement à l'aldolisation. Il n'y a donc pas de risque d'altération des fonctions présentes. De plus les rendements sont généralement excellents.

Nicolaou *et al*⁸⁴. ont ainsi synthétisé une cyclohexénone substituée en position 5 avec des rendements quantitatifs en utilisant le catalyseur de Grubbs de première génération dans le dichlorométhane (**Schéma 78**).

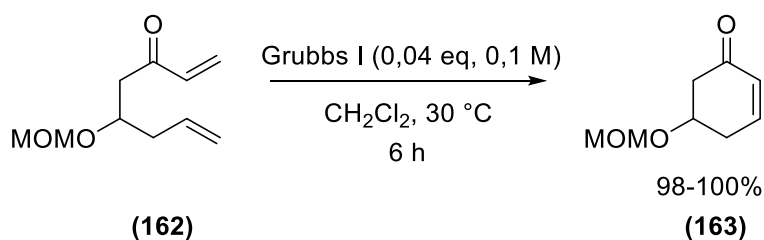


Schéma 78. Méthathèse cyclisante en utilisant le catalyseur de Grubbs de première génération.

Yoshida *et al.* ont utilisé le réactif de Grubbs de seconde génération, toujours dans le dichlorométhane, pour obtenir une cyclohexénone avec un rendement de 84% au bout de deux heures à température ambiante¹⁰³ (Schéma 79).

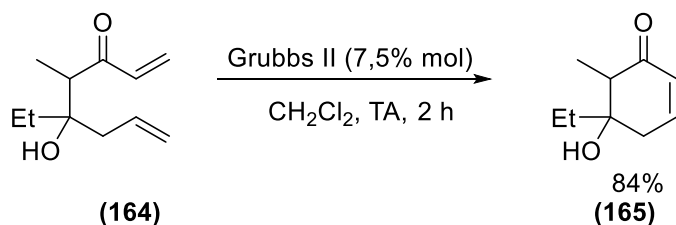


Schéma 79. Méthathèse cyclisante en utilisant le réactif de Grubbs de seconde génération.

Turks et Vogel ont eux réalisés la réaction dans le benzène à 80°C pour obtenir la cyclohexénone (167) avec 85% de rendement après seulement 30 min de réaction¹⁰⁴ (Schéma 80).

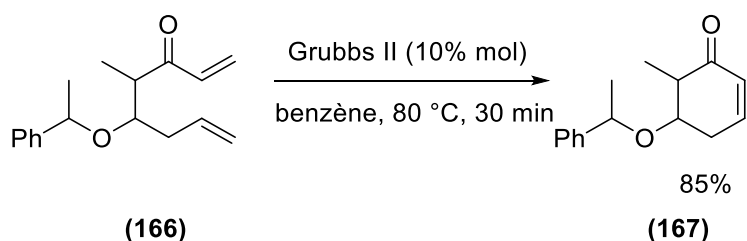


Schéma 80. Méthathèse cyclisante en utilisant le réactif de Grubbs de seconde génération.

En revanche Prasad et Kumar ont obtenu un rendement légèrement inférieur dû à la formation du macrocycle **(170)**¹⁰⁵. En outre, ils décrivent que plus la quantité de catalyseur de Grubbs est importante, plus le ratio s'oriente en faveur de la synthèse de la cyclohexénone **(169)** (**Schéma 81**).

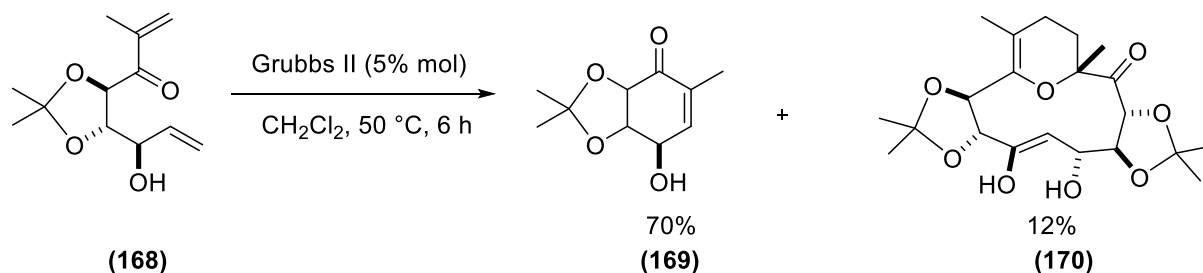


Schéma 81. Obtention d'une cyclohexénone et d'un macrocycle par métathèse.

Dans notre cas, la cyclohexénone substituée en position 5 (**151**) peut être obtenue par métathèse à partir de différents composés (**Schéma 82**). La cyclisation est effectuée sur le diène terminal (**171**), dont nous avons envisagé la synthèse au départ de trois composés : le but-3-énoate d'isobutyle (**147**), le cyanoacétate d'éthyle (**146**) et l'acétoacétate d'éthyle (**172**).

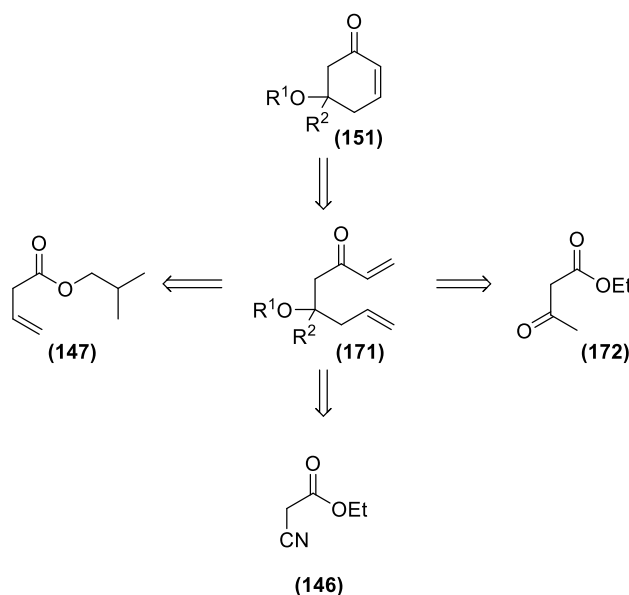


Schéma 82. Voies d'obtention des cyclohexénones substituées en position 5 passant par une cyclisation par métathèse.

II.4.2.1 A partir du but-3-énoate d'isobutyle

Comme énoncé précédemment, la cyclohexénone hydroxylée en position 5 (**151**) pourrait être obtenue par métathèse à partir du diène terminal (**174**) (Schéma 83). Celui-ci serait obtenu à partir de l'ester (**175**) en passant par l'amide de Weinreb afin d'introduire un groupement vinyle. L'ester (**175**) pourrait quant à lui être synthétisé à partir du but-3-énoate d'isobutyle (**147**) en formant l'époxyde qui réagirait avec le bromure de vinyle magnésium et dont l'hydroxyle résultant serait protégé par un groupement TBS.

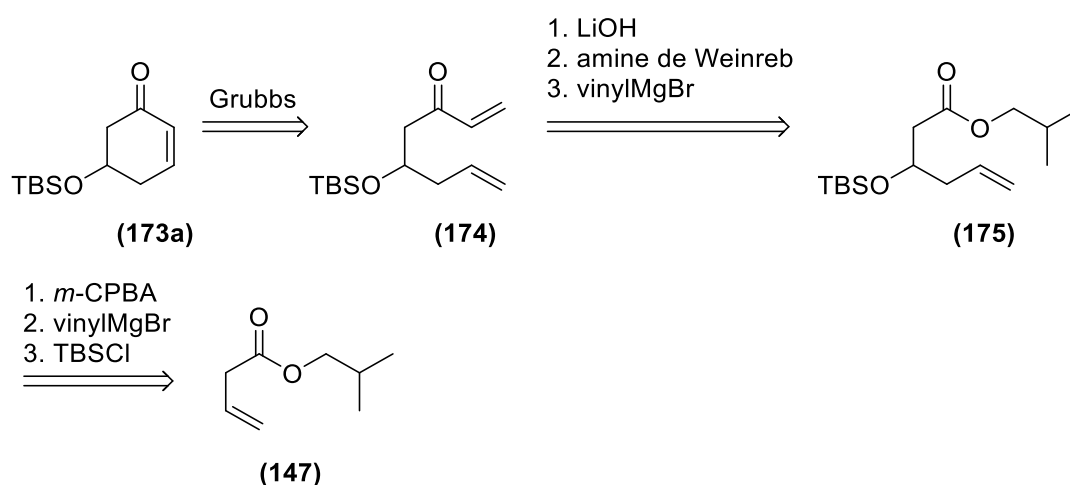


Schéma 83. Schéma de rétrosynthèse de la cyclohexénone à partir du but-3-énoate d'isobutyle.

La réaction d'époxydation du but-3-énoate d'isobutyle (**147**) avec le *m*-CPBA conduit au composé (**176**) avec un bon rendement (Schéma 84). La substitution nucléophile par le bromure de vinylmagnésium sur l'époxyde (**176**) conduirait ensuite à l'alcène hydroxylé (**177**).

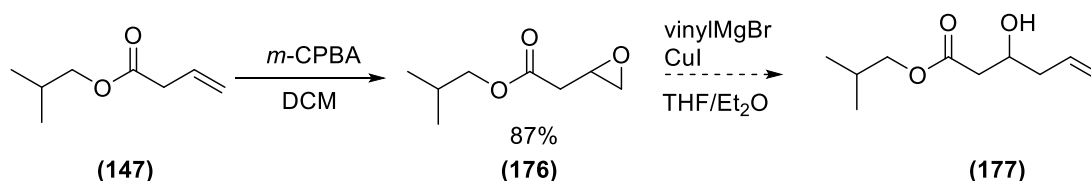
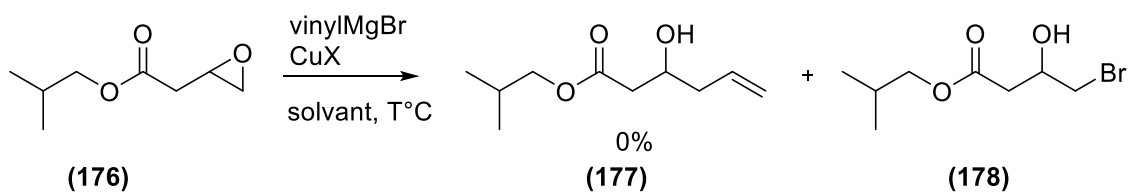


Schéma 84. Proposition de synthèse de la cyclohexénone en partant du 2-méthylpropyl but-3-énoate.

La première étape d'oxydation a permis d'obtenir l'époxyde avec un rendement de 87%. L'étape suivante en revanche s'est montrée problématique. Plusieurs cuprates ont été testés pour réaliser la transméallation (**Tableau 9**). Le premier essai a été réalisé avec l'iodure de cuivre dans le THF à température ambiante (entrée 1). Lors des deux essais suivants l'iodure de cuivre a été remplacé par le cyanure de cuivre avec 1,5 puis 2 équivalents de bromure de vinylmagnésium (entrées 2 et 3). Un autre essai a été tenté en formant le bromocuprate à -78°C dans un mélange d'éther et de THF avant de remonter à -40°C pour ajouter l'époxyde (2,2 équivalents) (entrée 4). Lors du dernier essai l'organocuprate a été formé à -30°C (entrée 5). Aucun de ces essais n'a permis l'obtention de l'alcène (**177**). L'analyse RMN montre qu'en réalité c'est le 4-bromo-3-hydroxybutanoate d'isopropyle (**178**) qui s'est formé. La littérature fait effectivement état de ce type de réaction secondaire¹⁰⁶.

Tableau 9. Conditions de réaction de substitution sur l'époxyde.



Entrée	Cuprate	Cuprate (eq.)	VinylMgBr (eq.)	Solvant	T°C
1	CuI	0,1	1,5	THF	TA
2	CuCN	0,1	1,5	THF	TA
3	CuCN	0,1	2	THF	TA
4	CuBr - DMS	1,1	2,2	Et ₂ O:THF 5:3	formation de l'organocuprate à -78 °C ajout de l'époxyde à -40 °C
5	CuBr - DMS	1,1	2,2	Et ₂ O:THF 5:3	formation de l'organocuprate à -30 °C, agitation à -78 °C puis ajout de l'époxyde à -40 °C

II.4.2.2 A partir du cyanoacétate d'éthyle

La cyclohexénone hydroxylée en position 5 (**179**) peut être obtenue en cyclisant le dialcène terminal (**180**) par métathèse. Celui-ci peut être obtenu à partir de l'ester (**181**) en passant par la formation de l'amide de Weinreb qui permet d'introduire un groupement vinyle après avoir protégé l'hydroxyle par un groupement silylé. Cet ester peut être formé en réduisant la cétone du composé (**182**), elle-même obtenue en faisant réagir le cyanoacétate d'éthyle (**146**) avec le bromure d'allyle (Schéma 85).

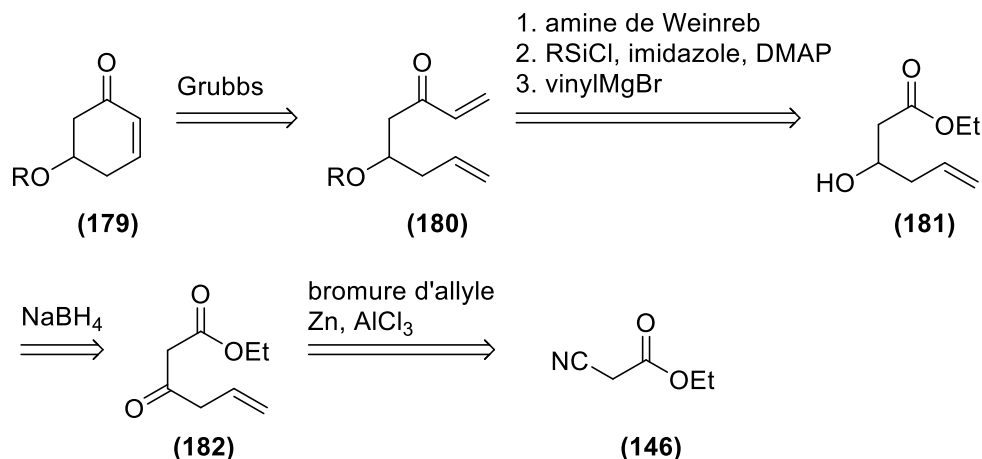


Schéma 85. Rétrosynthèse de la cyclohexénone hydroxylée en position 5 à partir du cyanoacétate d'éthyle.

L'étape d'allylation du cyanoacétate d'éthyle (**146**) a initialement été réalisée en faisant réagir celui-ci avec le réactif de grignard comme décrit par Bennett *et al.*¹⁰⁷. Lors de deux essais les deux réactifs ont tour à tour été mis en excès, mais la réaction n'a cependant pas eu lieu. En revanche la substitution nucléophile du bromure d'allyle sur le carbonyle en présence de trichlorure d'aluminium, comme décrit par Cook *et al.*¹⁰⁸ (Schéma 86), a permis d'obtenir le β -cétoester (**182**) avec un rendement de 96%. La deuxième étape consistait à réduire sélectivement la cétone sans toucher à l'ester. Le borohydrure de sodium, un hydrure doux, a donc été utilisée pour obtenir le composé (**181**) avec 82% de rendement après une heure de réaction à 0 °C.

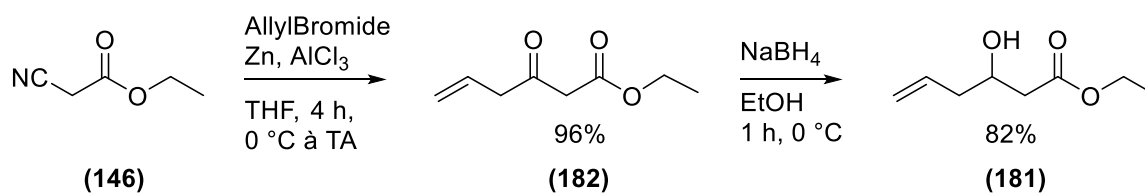


Schéma 86. Synthèse de la cyclohexénone en partant du cyanoacétate d'éthyle.

Dans un premier temps l'hydroxyle a été protégé avec un rendement de 64%, en vue de réaliser la saponification de l'ester par l'hydroxyde de lithium. La réaction a été réalisée dans le THF puis le dioxane (Schéma 87). Dans les deux cas, de manière inattendue, le produit de départ a été récupéré, seule une très faible quantité d'acide désilylé s'étant formée.

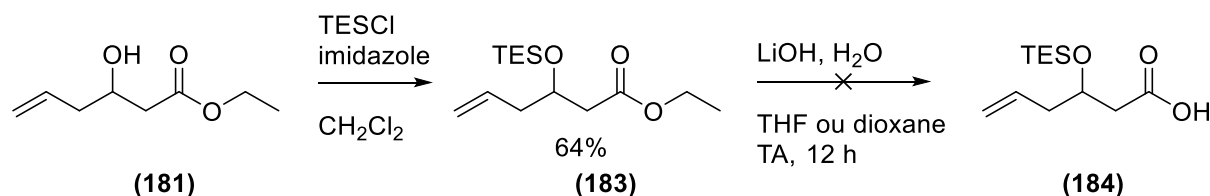


Schéma 87. Protection puis tentative de saponification de l'ester.

Nous avons donc décidé de passer par l'amide de Weinreb avant de protéger l'hydroxyle avec un groupement silylé (Schéma 88). L'amide de Weinreb (185) a été formée d'après la réaction décrite par Cohen et Overman¹⁰⁹ avec 73% de rendement. Afin de vérifier l'influence du groupement protecteur sur le couplage ultérieur entre l'ester et la cyclohexénone, la protection du groupement hydroxyle a été réalisée avec un groupement TBS et un groupement TES, avec des rendements similaires de 86% et 85%. Après protection de la fonction hydroxyle, les diènes (188) et (189) ont été obtenus par réaction avec le bromure de vinylmagnésium en seulement 30 minutes. La substitution nucléophile a mieux fonctionné sur le composé (189) protégé par un TES avec un rendement quantitatif contre 74% pour le composé protégé par un groupement TBS (188).

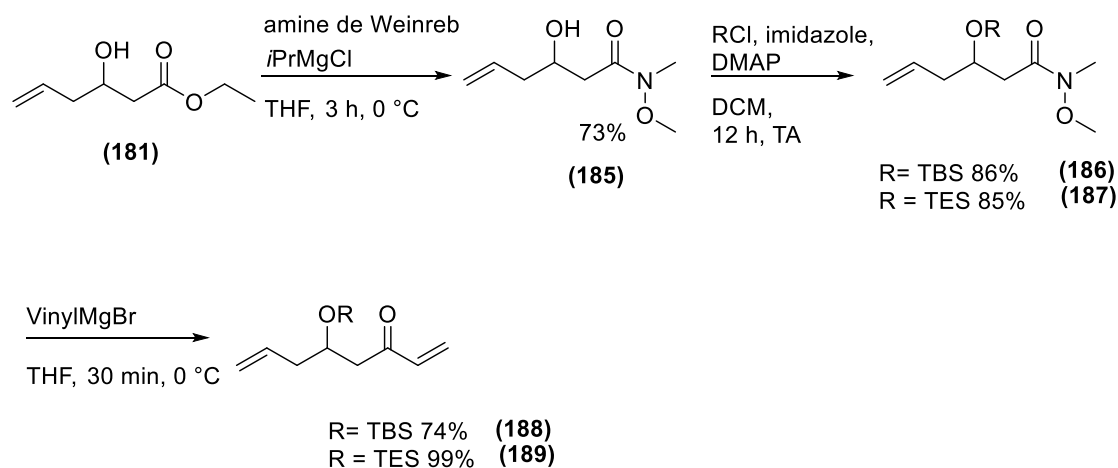


Schéma 88. Obtention du diène à partir de l'ester.

Enfin la cyclohexénone (**179**) a été obtenue par réaction de métathèse dans les conditions décrites par Yoshida *et al.*¹⁰³. Les premières cyclisations par métathèse ont été réalisées en utilisant le catalyseur de Grubbs de seconde génération (**Tableau 10**). Des rendements quantitatifs ayant été obtenus avec 4% puis 2% mol de catalyseur, les essais suivants ont été réalisés avec le catalyseur de première génération, plus économique. En présence de 4% mol de catalyseur un rendement toujours quantitatif a été obtenu. En revanche en diminuant à 2% mol le rendement a diminué (54-84%). Le catalyseur de Grubbs de première génération a donc par la suite été utilisé à hauteur de 4% mol.

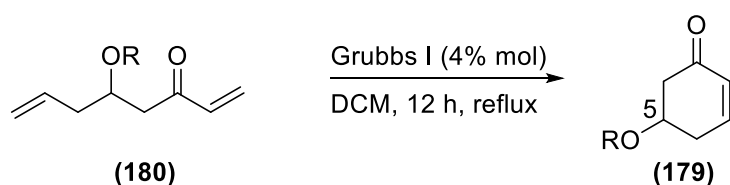


Tableau 10 : optimisation des conditions de réaction de la métathèse.

Entrée	Catalyseur	% mol.	rendement
1	Grubbs II	4	99%
2	Grubbs II	2	100%
3	Grubbs I	4	91%
4	Grubbs I	2	54%, 84% (n= 3)

La réaction s'est très bien déroulée dans les deux cas avec des rendements quantitatifs, et les cyclohexénones (**173**) et (**181**) possédant un hydroxyle protégé en position 5 ont finalement pu être obtenues (**Schéma 89**).

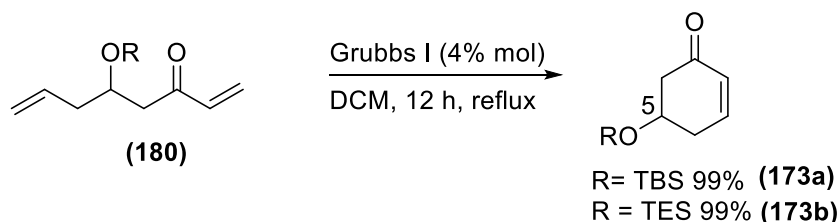


Schéma 89. Obtention de la cyclohexénone hydroxylée en position 5 par métathèse à partir du diène.

II.4.2.3 A partir de l'acétoacétate d'éthyle

Dans le but de synthétiser les dérivés méthylés et hydroxylés en position 5 nous avons imaginé une variante de cette voie de synthèse partant de l'acétoacétate d'éthyle (**Schéma 90**). La métathèse permet encore une fois la cyclisation du di-alcène terminal (**190**) obtenu en passant par la formation d'une amide de Weinreb à partir de l'ester (**191**). Celui-ci peut être synthétisé par réaction avec le bromure d'allylzinc en présence de trichlorure d'aluminium à partir de l'acétoacétate d'éthyle (**172**).

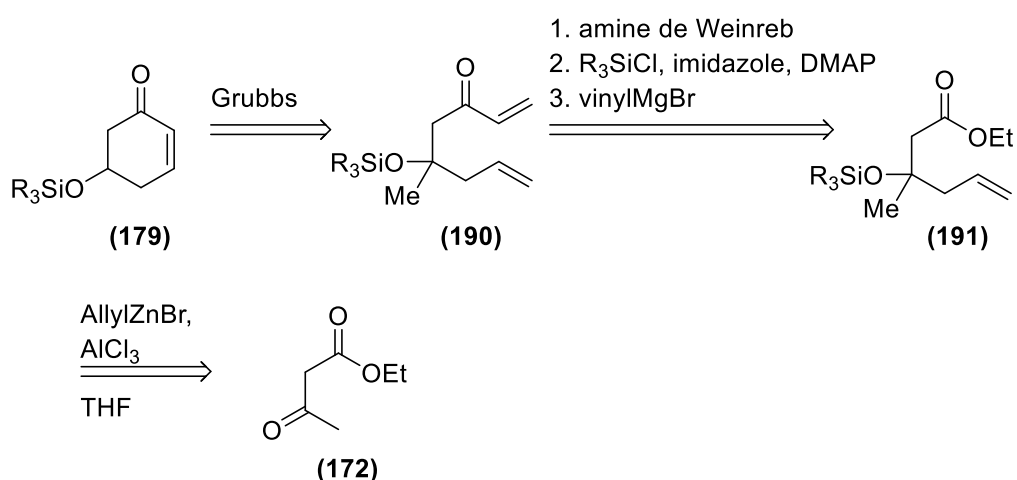


Schéma 90. Synthèse de la cyclohexénone méthylée et hydroxylée sur la position 5 à partir de l'acétoacétate d'éthyle.

La première tentative d'allylation de l'acétoacétate d'éthyle (**172**) en utilisant deux équivalents de bromure d'allylzinc n'a pas fonctionné. La deuxième tentative a été réalisée en présence de trichlorure d'aluminium comme décrit par Tanigushi *et al.*¹¹⁰, et a permis d'obtenir le composé (**192**) (Schéma 91). Cette étape d'allylation s'est très bien déroulée avec un rendement de 91%. L'amide de Weinreb (**193**) a ensuite été obtenue avec un rendement de 60%.

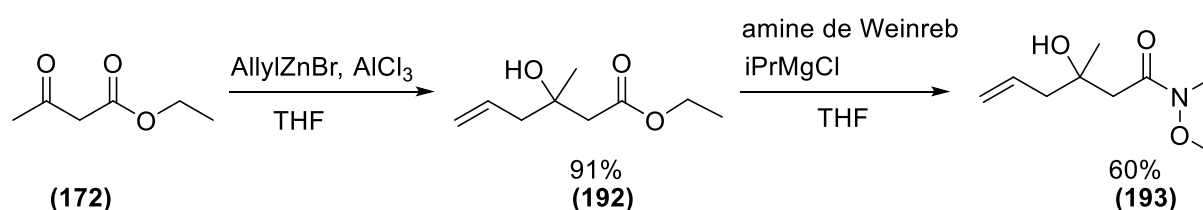


Schéma 91. Synthèse de l'amide de Weinreb en partant de l'acétoacétate d'éthyle.

La protection de l'hydroxyle par le triéthylsilane a été réalisée avec 83% de rendement, puis le diène a été synthétisé avec 71% de rendement (Schéma 92). Enfin la cyclohexénone méthylée et hydroxylée en position 5 a été formée par métathèse cyclisante avec 84% de rendement en utilisant le catalyseur de Grubbs I à 4% mol.

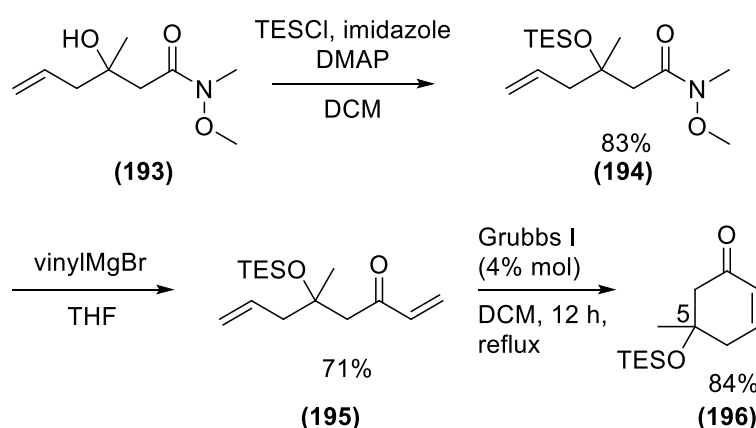


Schéma 92. Synthèse de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone à partir de l'amide de Weinreb.

Après de nombreuses tentatives infructueuses la 5-hydroxycyclohexénone (**179**) et la 5-méthyl-5-hydroxy cyclohexénone (**159**) ont donc enfin pu être obtenues avec de bons rendements. Et des voies de synthèse ne présentant pas d'étape particulièrement délicate comme c'était le cas pour la synthèse au départ du phloroglucinol (**102**). La métathèse permet la cyclisation à pH neutre et dans des conditions douces, ce qui était essentiel dans notre cas. La présence de ruthénium peut poser problème pour des tests biologiques, mais les purifications par HPLC semipréparative nécessaires jusqu'à l'obtention des dihydroanthracénones devraient permettre de s'en débarrasser entièrement.

Nous nous sommes intéressés à la synthèse énantiosélective de vismiones. En effet les vismiones naturelles possèdent toutes un centre asymétrique. En modifiant l'étape de réduction de la cétone (**172**), il serait possible d'obtenir une cyclohexénone énantiomériquement pure. En effet Fernandes et Mulay décrivent la synthèse stéréosélective du β -hydroxyl ester (**197**) à partir de l'acétoacétate d'éthyle en utilisant de la levure de boulanger, avec un rendement de 69%¹¹¹ (Schéma 93). La possibilité de réaliser une hydrogénation en utilisant le catalyseur de Noyori modifié est également décrite avec un rendement quantitatif. L'utilisation de levure de boulanger semble relativement aisée à mettre en place, cependant l'utilisation de matériel biologique est une source de variation puisqu'il est impossible de contrôler précisément le métabolisme des levures utilisées. L'utilisation du catalyseur de Noyori semble également relativement aisée, en plus de présenter un rendement quantitatif. Ce catalyseur est d'ailleurs peu cher (37 euros pour 100 g, prix Sigma Aldrich au 10/09/2018).

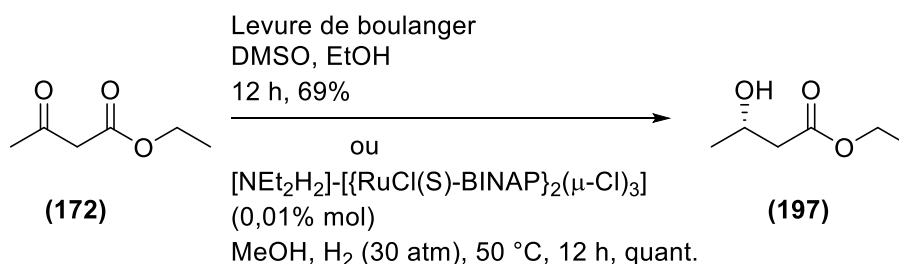


Schéma 93. Synthèse énantiosélective du β -hydroxyle ester¹¹¹.

Il est également possible d'obtenir une cyclohexénone hydroxylée et méthylée en position 5 énantiomériquement pure en passant par l'allylation asymétrique du β -cétoster,

d'après la méthode de réduction de cétones énantiosélective employée par Barnett *et al.*¹¹² (Schéma 94).

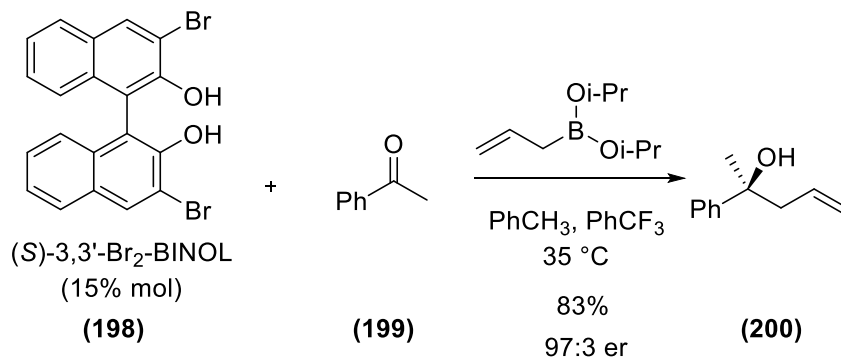


Schéma 94. Alkylation énantiosélective d'une cétone.

L'obtention d'une telle cyclohexénone permettrait de synthétiser des dihydroanthracénones énantiomériquement pures, ce qui est particulièrement intéressant pour plusieurs raisons. Les vismiones naturelles sont elles-mêmes énantiomériquement pures. Leur carbone asymétrique a été déterminé comme ayant une configuration absolue – (S) par dichroïsme circulaire vibrationnel, en se basant sur des calculs théoriques. La synthèse permettrait d'appuyer ce résultat. D'autre part, l'un des deux énantiomères d'un composé est potentiellement plus actif que l'autre. Le test simultané d'un mélange racémique ainsi que d'un énantiomère pur permettrait de vérifier si tel est le cas.

II.5. Synthèse des dihydroanthracénones par réaction d'annélation de Staunton-Weinreb

En utilisant ces différents éléments, plusieurs dihydroanthracénones ont été synthétisées selon la méthode de Staunton-Weinreb, comme décrit précédemment.

II.5.1 Dihydroanthracénones C-alkylées en position 6

La réaction de cyclisation a d'abord été réalisée en couplant des cyclohexénones mono (**105**) ou diméthylées (**106**) en position 5 avec l'ester diméthylé sur les positions 2 et 4 (**84**) (**Schéma 95**), tel que précédemment réalisé au laboratoire par Jean-Baptiste Gallé avec l'ester méthylique.

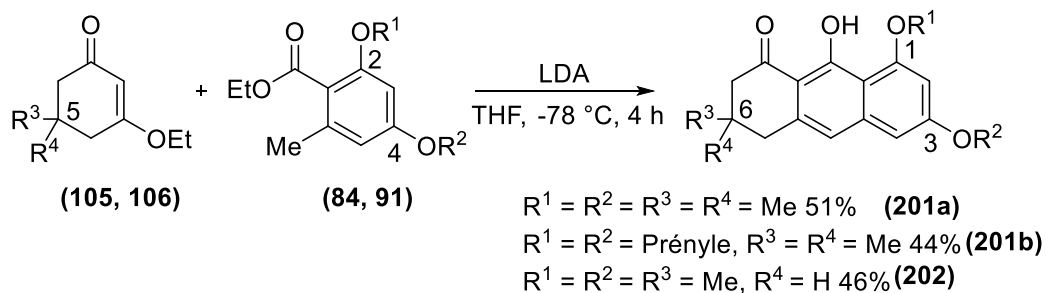


Schéma 95. Synthèse de dihydroanthracénones C-alkylées en position 6.

Les rendements de 51% (**201**) et 46% (**202**) obtenus sont moyens mais en accord avec la littérature pour ce type de réaction⁷⁰.

Les dihydroanthracénones naturelles étant substituées sur l'hydroxyle en position 3 alors que celui en position 1 reste libre, la première approche pour obtenir ce type de composés a été de tenter une déprotection sélective (**Schéma 96**).

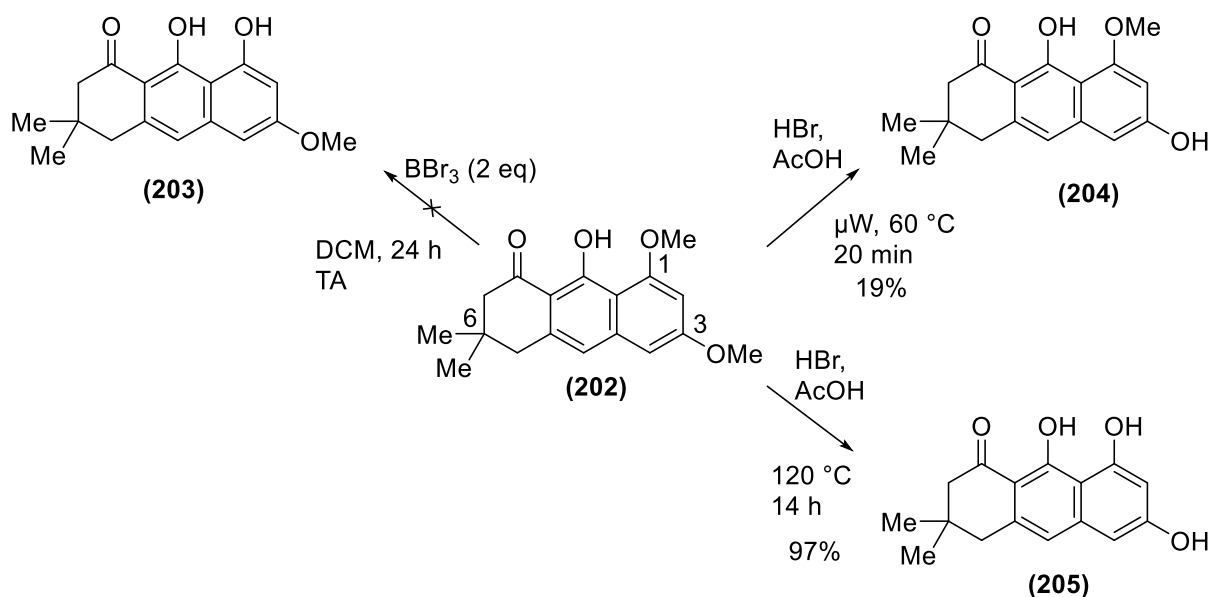


Schéma 96. Essais de monodéprotection de l'hydroxyle en position 1.

L'acide bromhydrique avait déjà été utilisé précédemment. La réaction chauffée à reflux pendant 4 h avait permis de déprotéger les positions 1 et 3 simultanément avec 97% de rendement pour obtenir le composé (205).

Nous avons donc, lors du premier essai, tenté la déprotection par le tribromure de bore (Schéma 97) pour obtenir le composé (203). Nous avons en effet supposé que celui-ci se lierait préférentiellement à l'hydroxyle sur position 1, grâce à une double interaction favorisant la déméthylation sur cette position. La réaction n'a cependant pas eu lieu et le produit de départ (202) a été récupéré.

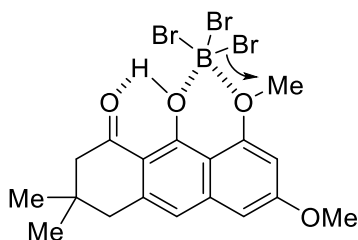


Schéma 97. Stabilisation du tribromure de bore par une liaison hydrogène.

Nous avons donc à nouveau tenté d'utiliser l'acide bromhydrique dans l'acide acétique. Un premier essai en chauffant sous irradiations micro-ondes à 120°C pendant 14 h, a également permis de déprotéger les positions 1 et 3 simultanément. Ensuite, en chauffant le mélange acide bromhydrique/acide acétique à 60°C pendant 20 minutes, c'est la dihydroanthracénone déméthylée sur la position 3 (**204**) qui a été obtenue avec un rendement de 19%. On peut donc supposer que l'hydrogène de l'hydroxyle présent sur le cycle central forme une liaison hydrogène avec la cétone, mais cette forme est en équilibre et cette liaison peut également lier l'hydrogène à l'oxygène présent sur la position 1, la rendant peu réactive. L'élimination se ferait donc préférentiellement sur la position 3 (**Schéma 98**).

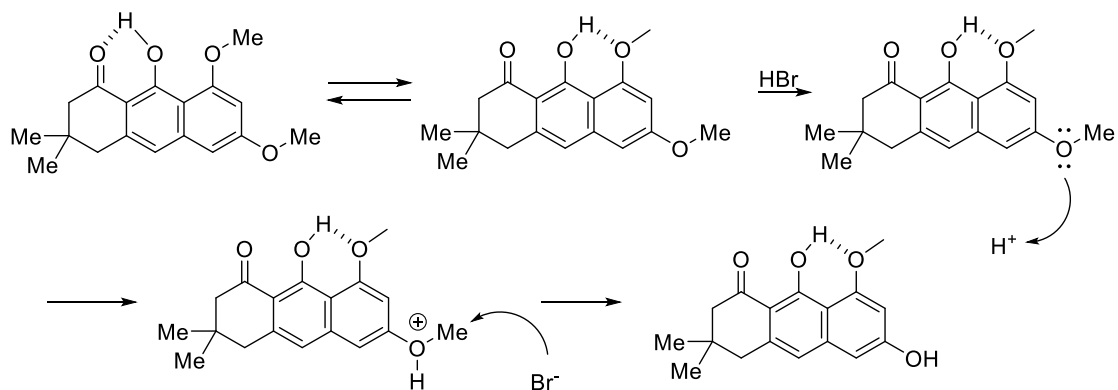


Schéma 98. Déprotection de l'hydroxyle sur la position 3 par l'acide bromhydrique.

Afin de se rapprocher des vismiones naturelles qui possèdent un groupement isoprénoïde en position 3, des essais d'alkylation ont été entrepris à partir du composé trihydroxylé (**Tableau 11**). Le DBU (2eq) avait précédemment permis d'obtenir les composés C-alkylés (**206**) et (**207**) avec 30% et 25% de rendement. Différentes bases (DBU, Collidine, DIPEA, TEA) et plusieurs solvants (acétone, ACN, dioxane, DMF, DMSO, NMP, THF) ont ici été testés afin de vérifier s'il était possible sous certaines conditions de favoriser la O-alkylation. Le ratio des composés obtenus a été mesuré d'après l'intensité des pics en HPLC. Les différentes bases ont conduit à la formation des deux composés C-alkylés (**206**) et (**207**). La TEA et la DIPEA ont conduit à un mélange en proportion égales deux composés tandis que le DBU a cette fois-ci conduit à une majorité du composé (**206**). La collidine a engendré une très faible formation du composé (**207**) (1%). La réaction a ensuite été réalisée en présence de DIPEA dans différents solvants. Le THF et le dioxane ont conduit à la

récupération quasi totale du produit de départ. La réaction dans le DMSO a donné respectivement 5% et 13% des composés (**206**) et (**207**), mais un produit de dégradation s'est formé en forte quantité. Le NMP, le DMF et l'acétonitrile ont conduit à des rendements similaires avec une majorité du composé (**207**) formée. Dans aucun des cas la *O*-alkylation n'a donc été observée.

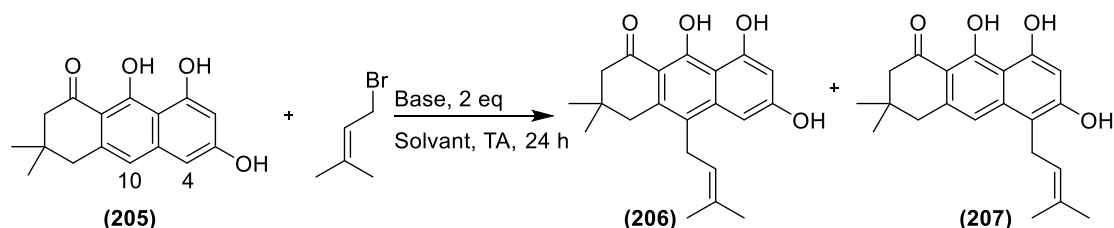


Tableau 11. Essais d'alkylation de la dihydroanthracénone

Entrée	Base	Solvant	% (206)	% (207)
1	DBU	Acétone	18	4
2	Collidine	Acétone	0	1
4	TEA	Acétone	5	5
3	DIPEA	Acétone	10	9
5	DIPEA	NMP	11	29
6	DIPEA	THF	0,3	0,7
7	DIPEA	Dioxane	0,4	0,8
8	DIPEA	DMSO	5	13
9	DIPEA	ACN	17	24
10	DIPEA	DMF	11	23

Pour obtenir des dihydroanthracénones possédant un groupement hydroxyle libre en position 1, des esters *O*-alkylés par un groupement méthyle ou prényle sur la position 3, mais possédant un groupe partant sur la position 1, ont été engagés dans la cyclisation avec une cyclohexénone *C*-alkylée en position 5 (**Schéma 99**). La cyclohexénone diméthylée ainsi que la cyclohexénone nue ont engendré des rendements similaires de 43% et 54%. La cyclohexénone monométhylée en revanche a conduit à la formation de la dihydroanthracénone avec seulement 18% de rendement.

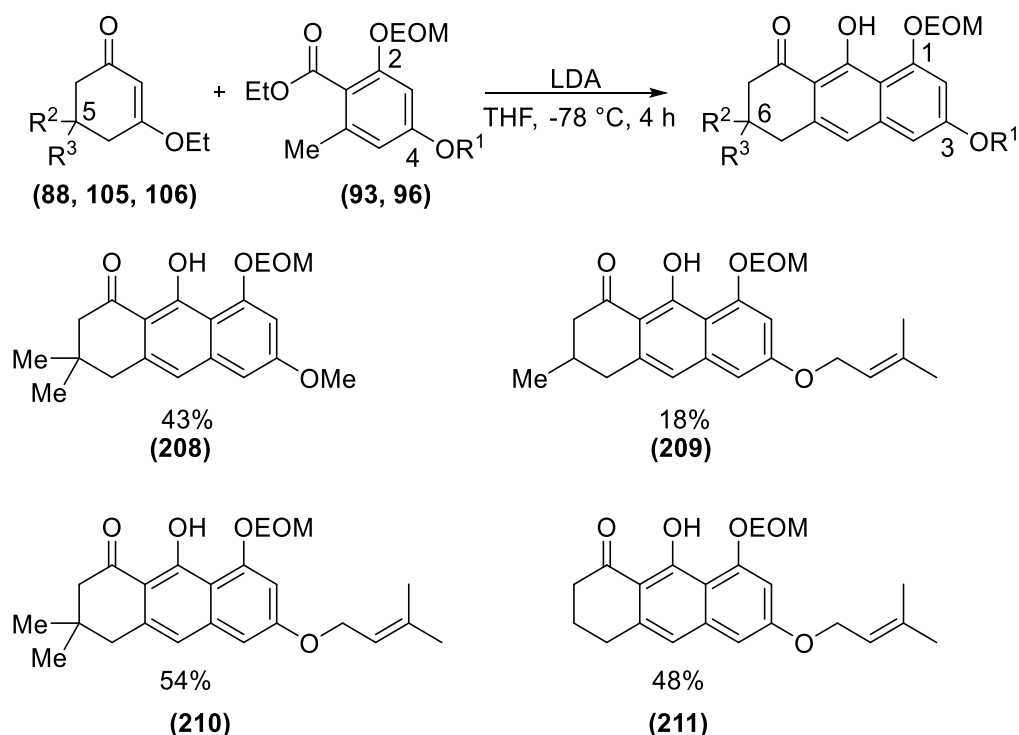


Schéma 99. Synthèse de dihydroanthracénones alkylées en position 3.

Afin d'étudier la nécessité du cycle saturé à 6 chaînons, nous avons effectué la cyclisation en présence de la cyclopenténone (**107**). Le composé cyclisé (**212**) a été obtenu avec 14% de rendement (Schéma 100).

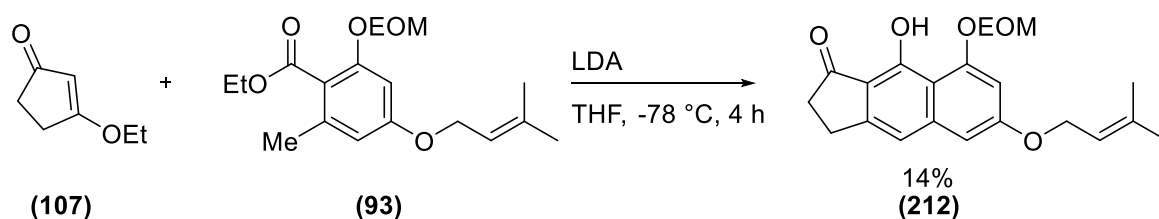


Schéma 100. Synthèse du composé comportant un cycle non aromatique à 5 carbones.

La réaction des différents composés obtenus dans une solution diluée d'acide chlorhydrique a permis la déprotection de l'hydroxy en position 1 avec des rendements quantitatifs (Schéma 101). Les deux rendements légèrement inférieurs obtenus sont dû à la purification par HPLC semipréparative, des pertes ayant été encourues lors de l'injection.

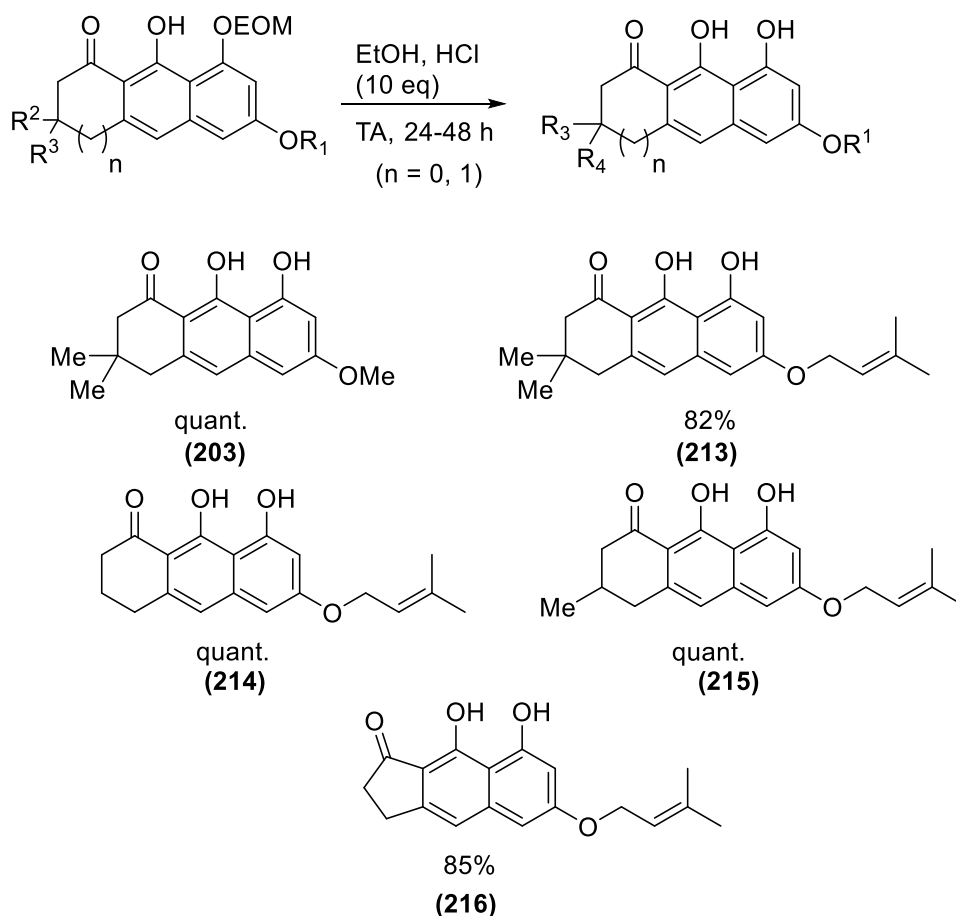


Schéma 101. Déprotection de l'hydroxyle en position 1.

Les dihydroanthracénones (208), (210) et (211) ont été synthétisées avec de relativement bons rendements. Le composé (212) en revanche a été obtenu avec seulement 18%. La cyclohexénone monométhylée ne semble pas moins stable que la cyclohexénone diméthylée. Il est en revanche possible que la présence d'un seul méthyle diminue la réactivité de la cyclohexénone lors du couplage.

L'étape de cyclisation étant le point faible de cette voie de synthèse, elle a fait l'objet d'une étude (Tableau 12). Dans les conditions classiques la cyclohexénone est introduite en léger excès par rapport à l'ester B, et le rendement avoisine les 50%. Lorsqu'un excès d'ester est introduit, le rendement baisse à 34%. A l'inverse lorsque la cyclohexénone est introduite en large excès un rendement de 60% est obtenu. Enfin lorsque la cyclohexénone est introduite en excès mais en présence de TMEDA. Le TMEDA peut quélater le complexe de lithium et ainsi favoriser la cyclisation. Cependant le rendement chute de manière inattendue à 12%. Ces

résultats suggèrent que la cyclohexénone est dégradée lors de la réaction, et qu'un excès de celle-ci est nécessaire pour que la réaction puisse se dérouler correctement. Cependant lorsque le nombre d'équivalents est augmenté de 1,8 à 3,6, le rendement n'augmente que de 6%. La quantité de cyclohexénone à engager pour obtenir une augmentation significative du rendement serait vraisemblablement beaucoup trop importante et par la suite 2 équivalents de cyclohexénone pour 1 équivalent d'ester sont les conditions retenues pour toutes les réactions de cyclisation similaires.

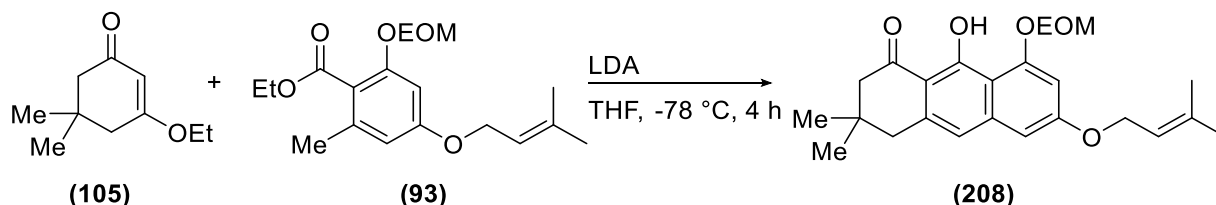


Tableau 12. Essais d'optimisation des conditions de couplage

Entrée	Conditions	Equivalents		Rendement (%)
		Cyclohexénone	Ester	
1	Classiques	1,8	1	54
2	Excès d'ester	1	1,5	34
3	Large excès de cyclohexénone	3,6	1	60
4	Présence de TMEDA	2,5	1	12

Cristallisation du composé NW01241 :

Comme cela a été montré lors d'études de stabilité, les vismiones naturelles sont trop facilement dégradées pour permettre leur cristallisation ($t_{1/2}$ vie < 50 h dans le DMSO). En revanche, le composé de synthèse NW012401 a démontré une stabilité dans le temps compatible, et a ainsi été cristallisé. Il a été envoyé au Service de Radiocristallographie de la Faculté de Chimie de Strasbourg, et sa structure tridimensionnelle a été déterminée (**Figure 24**). Les liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les oxygènes 1, 2 et 3 sont bien mises en évidence. Ces liaisons participent probablement à la stabilité des vismiones en solution. De

plus elles expliquent la réactivité particulière des dihydroanthracénones observée notamment lors des essais d'alkylation.

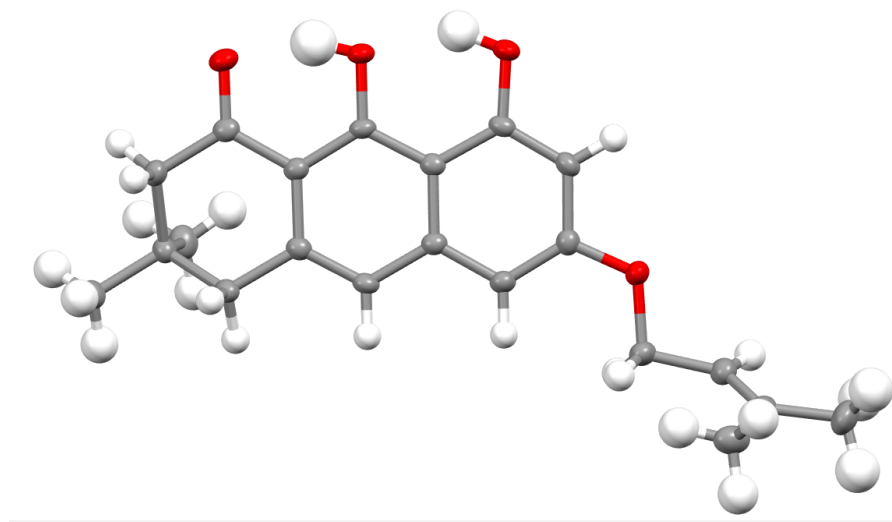


Figure 24. Structure tridimensionnelle du composé de synthèse NW012401

II.5.2 Dihydroanthracénones hydroxylées en position 6

Des esters *O*-alkylés en position 4 ont été engagés dans la cyclisation avec la cyclohexénone hydroxylée en position 5 (**Schéma 102**). En effet les dihydroanthracénones naturelles possèdent toutes un groupement hydroxyle, substitué ou non par un acétyle, sur la position 6. Le composé tétrahydroxylé (**223**) a également été synthétisé. La synthèse du composé PEGylé (**228**) a été effectuée en vue d'envisager la chromatographie d'affinité. Si l'activité de ce composé s'avère suffisante, cette sonde permettrait de tenter de visualiser le trajet intracellulaire des dihydroanthracénones, et éventuellement identifier une cible par chromatographie d'affinité. Le cyclopentane a été introduit afin d'évaluer l'influence sur l'activité d'un groupement encombrant sur la position 3 (**227**).

Les rendements obtenus lors de ces cyclisations se situent entre 13 et 22%. La présence de l'hydroxyle sur la cyclohexénone influe fortement sur sa réactivité.

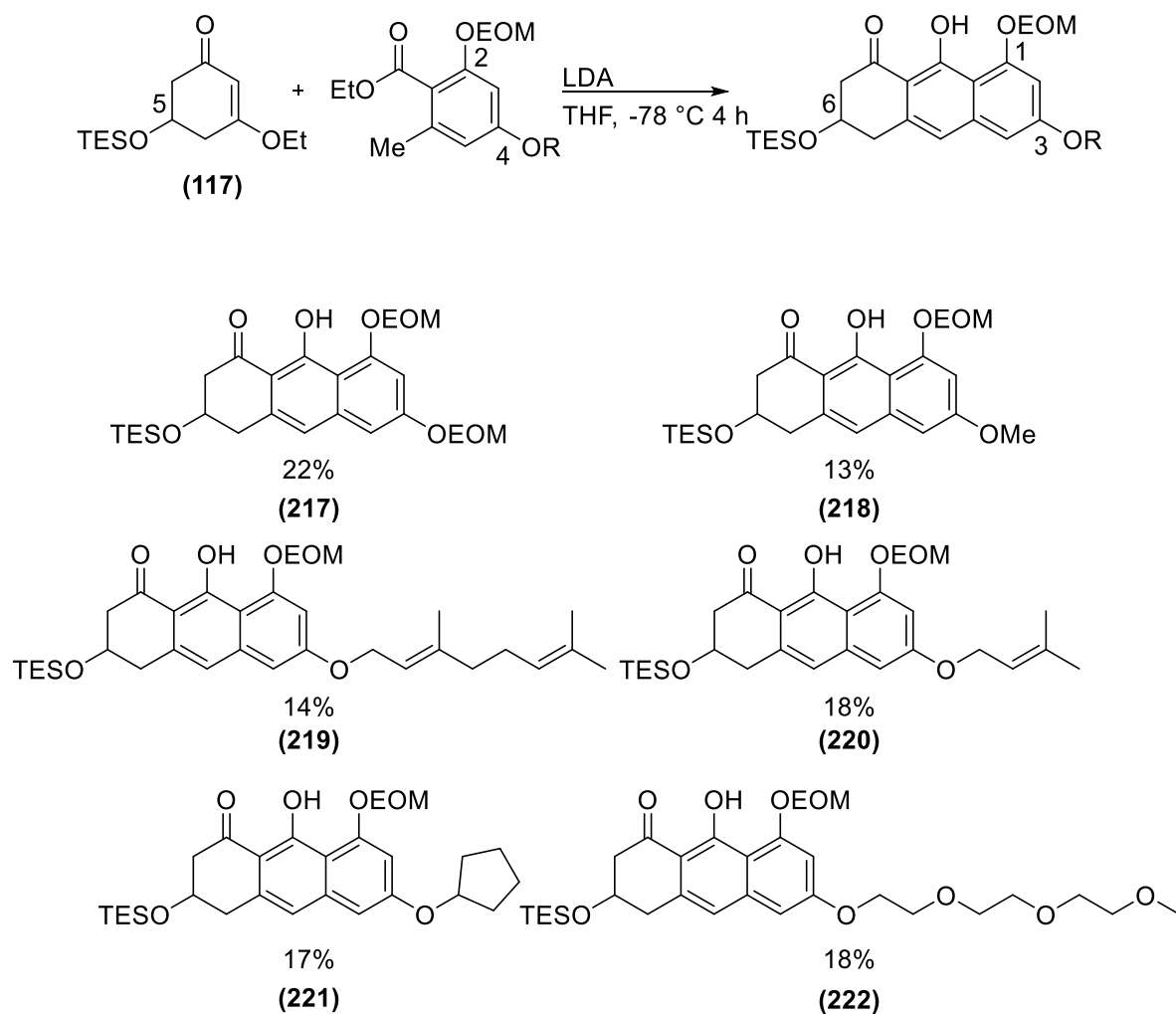


Schéma 102. Synthèse des dihydroanthracénones hydroxylées en position 6

La déprotection de l'hydroxyle sur la position 1 a été effectuée avec d'excellents rendements (**Schéma 103**).

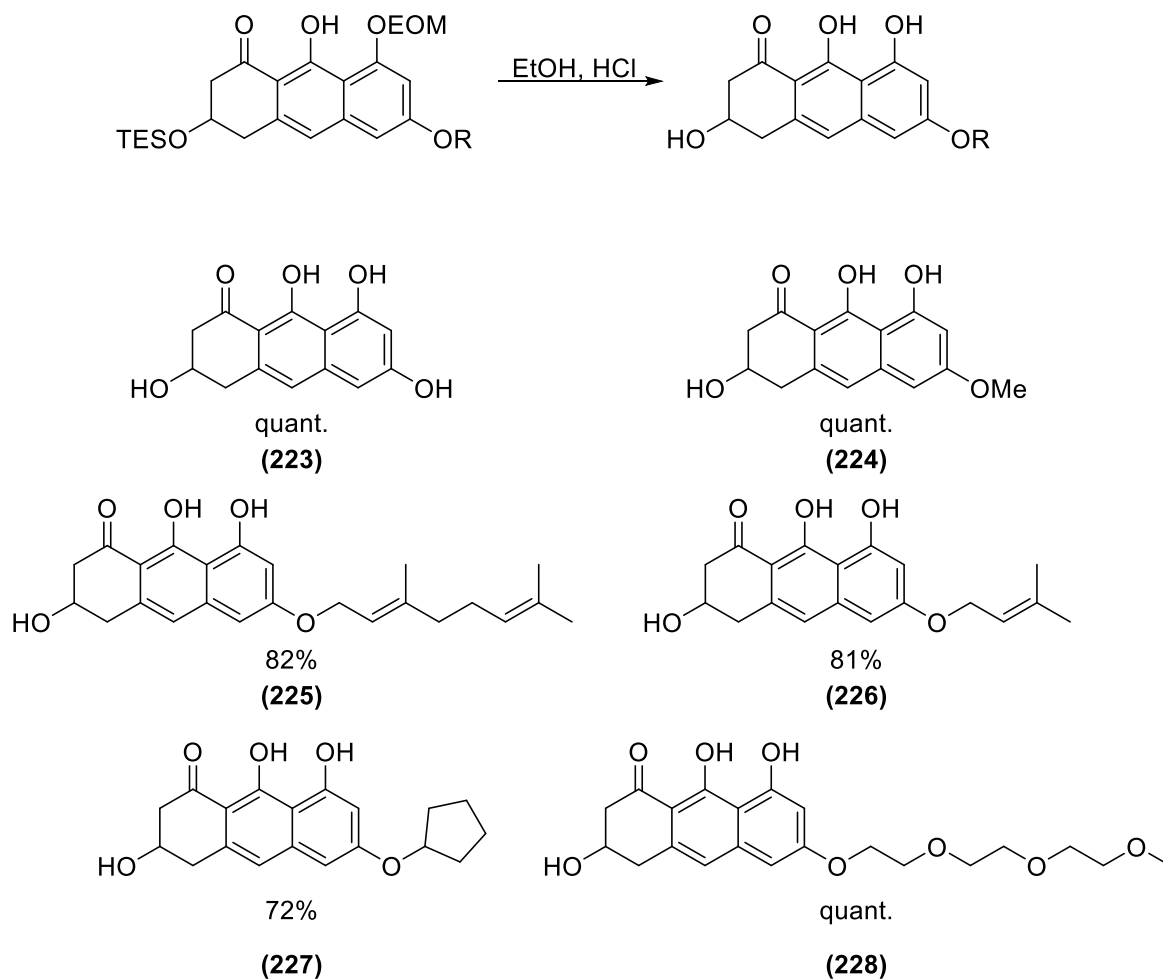


Schéma 103. Déprotection des dihydroanthracénones hydroxylées en position 6.

Comme décrit précédemment, des cyclohexénones sans groupe partant ont été synthétisées afin de trouver une alternative à la synthèse délicate des 5-hydroxycyclohexénone à partir du phloroglucinol, ainsi que pour obtenir la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone.

La réaction de cyclisation entre l'ester (**93**) et une cyclohexénone ne possédant pas de groupe partant a été initialement réalisée sur la cyclohexénone nue (**68**) (Schéma 104).

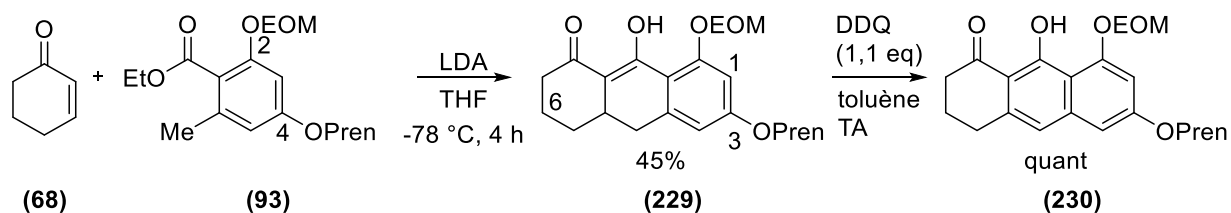


Schéma 104. Annélation de Staunton-Weinreb avec la cyclohexénone nue.

L'étape de cyclisation s'est bien déroulée et a permis d'obtenir le composé (229) avec 45% de rendement. Comparée à la cyclohexénone possédant un groupe partant éthoxyle, le rendement est similaire et la polymérisation supposée n'a pas l'air de diminuer le rendement. Celui-ci a pu être oxydé en dihydroanthracénone de manière quantitative par le DDQ (1,1 eq) à température ambiante.

Ce premier essai ayant été concluant, la réaction a ensuite été réalisée avec la cyclohexénone hydroxylée (173b) (Schéma 105). La cyclisation engageant la 5-hydroxycyclohexénone a engendré la formation du composé attendu (231) avec un rendement de seulement 1%, mais c'est le composé (232) déprotégé sur les deux positions qui a été obtenu majoritairement avec 11% de rendement.

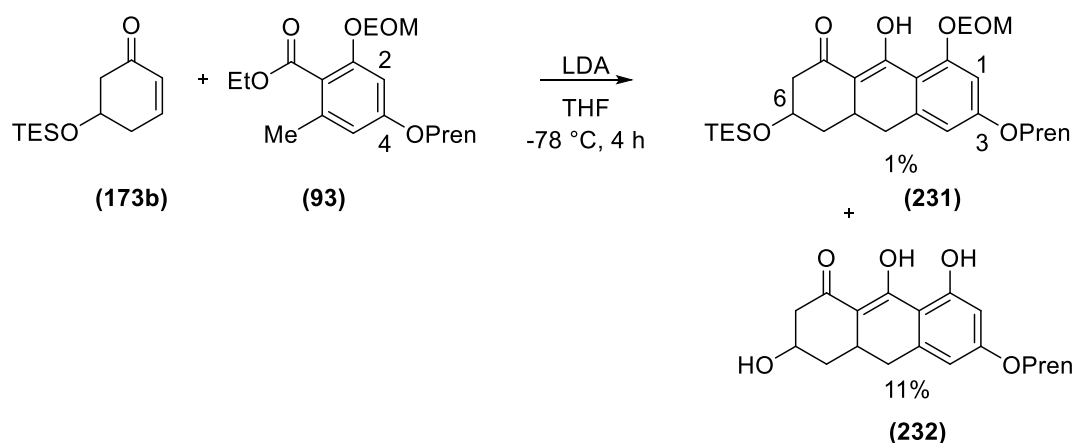


Schéma 105. Synthèse de la dihydroanthracénone hydroxylée en position 6 en partant d'une cyclohexénone ne possédant pas de groupe partant.

La forme déprotégée peut être expliquée par la purification en HPLC phase inverse. Afin d'obtenir une meilleure séparation, les solvants utilisés contiennent habituellement 0.1% de TFA. Or les groupements protecteurs présents sont facilement supprimés en milieu acide. Des solvants ne contenant pas de TFA sont donc employés pour la purification des dihydroanthracénones. Dans ce cas, c'est probablement un mélange de solvants contenant des traces de TFA qui a dû être utilisé. Cette réaction sera reproduite dès que possible pour obtenir le composé (231) en plus grande quantité.

Ce composé devra par la suite subir une oxydation douce pour produire la dihydroanthracénone (233) correspondante (Schéma 106).

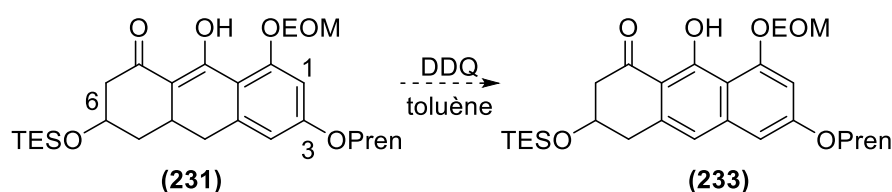


Schéma 106. Oxydation douce pour l'obtention des dihydroanthracénones à partir des composés intermédiaires.

Cette oxydation devra sans doute faire l'objet d'une optimisation minutieuse, vu la propension de ces composés à s'oxyder en anthrones et anthraquinones spontanément.

II.5.3 Dihydroanthracénones hydroxylées et méthylées en position 6

Les dihydroanthracénones méthylées et hydroxylées en position 6 peuvent être obtenues de manière classique par cyclisation entre un ester et la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone (Schéma 107, voie 1). Une autre voie de synthèse, toujours basée sur une cyclisation en présence de LDA, mais permettant de s'affranchir de la synthèse de la cyclohexénone, a également été explorée (Schéma 107, voie 2).

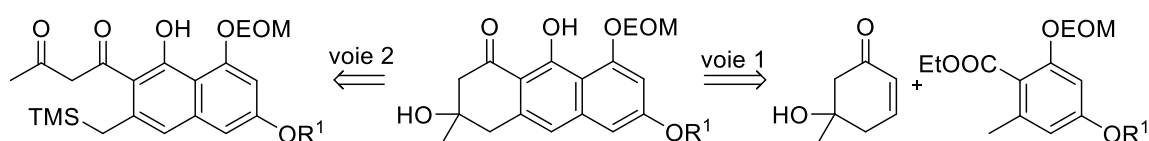


Schéma 107. Rétrosynthèse des dihydroanthracénones méthylées et hydroxylées en position 6.

II.5.3.1 A partir de la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone

Lors de la cyclisation engageant la 5-méthyl-5-hydroxycyclohexénone, c'est le composé attendu (**234**) qui a été obtenu majoritairement avec 27% de rendement, mais le composé (**235**) déprotégé sur la position 6 a également été formé avec 14% de rendement. 1% du composé (**236**) entièrement déprotégé a également été purifié (**Schéma 108**).

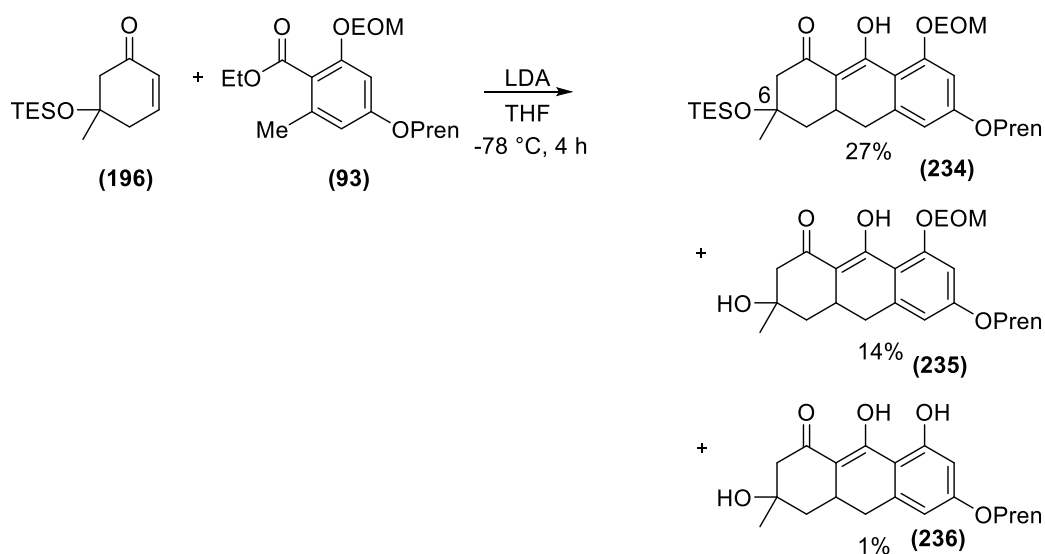


Schéma 108. Synthèse de la dihydroanthracénone hydroxylée et méthylée en position 6 en partant d'une cyclohexénone ne possédant pas de groupe partant.

Ce composé devra par la suite subir une oxydation douce pour produire la dihydroanthracénone correspondante (**Schéma 109**).

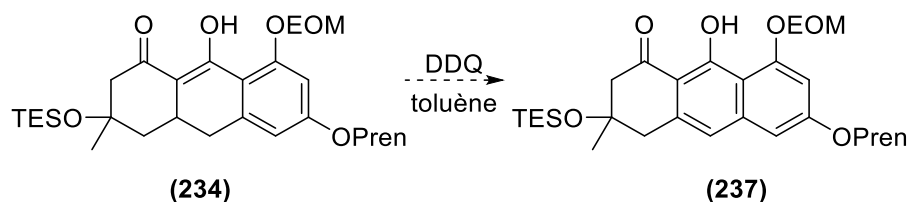


Schéma 109. Oxydation douce pour l'obtention des dihydroanthracénones à partir des composés intermédiaires.

Une tentative d'oxydation a toutefois été réalisée sur le composé dont la position 6 était déprotégée (**Schéma 110**). Malheureusement ce composé intermédiaire s'est rapidement suroxydé sous la forme anthraquinone.

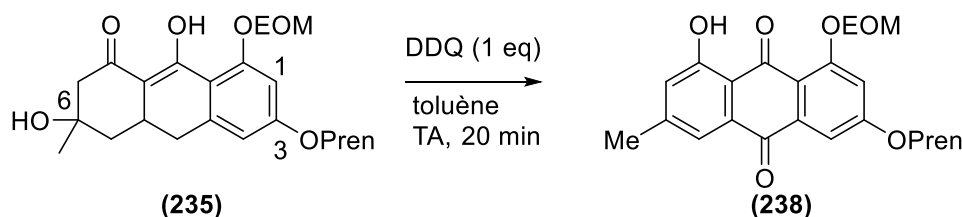


Schéma 110. Oxydation du composé déprotégé sur la position 6.

II.5.3.2 Synthèse alternative

Même si l'annélation de Weinreb a permis d'obtenir rapidement le squelette dihydroanthracénone, les rendements obtenus lors du couplage avec une cyclohexénone hydroxylée sont peu satisfaisants et de grandes quantités de celle-ci doivent être engagées. Afin de contourner ce problème, une voie de synthèse s'affranchissant du couplage avec une cyclohexénone a été envisagée (**Schéma 111**).

Le squelette dihydroanthracénone pourrait être obtenu à partir du composé bicyclique (**240**) qui réagirait avec le fluorure de césium. Celui-ci permettrait d'ôter le TMS, formant un anion qui permettrait de réaliser la cyclisation pour donner le cycle non aromatique. Le composé (**240**) serait lui-même obtenu à partir de l'ester (**241**) par réaction avec le TMSCl en présence de LDA pour protéger le méthyle puis réaction avec l'acétone en présence d'hydrure de sodium pour former l'acétoacétone. L'ester quant à lui pourrait être formé par un couplage de type Weinreb entre un ester (**243**) et un alcène linéaire (**242**).

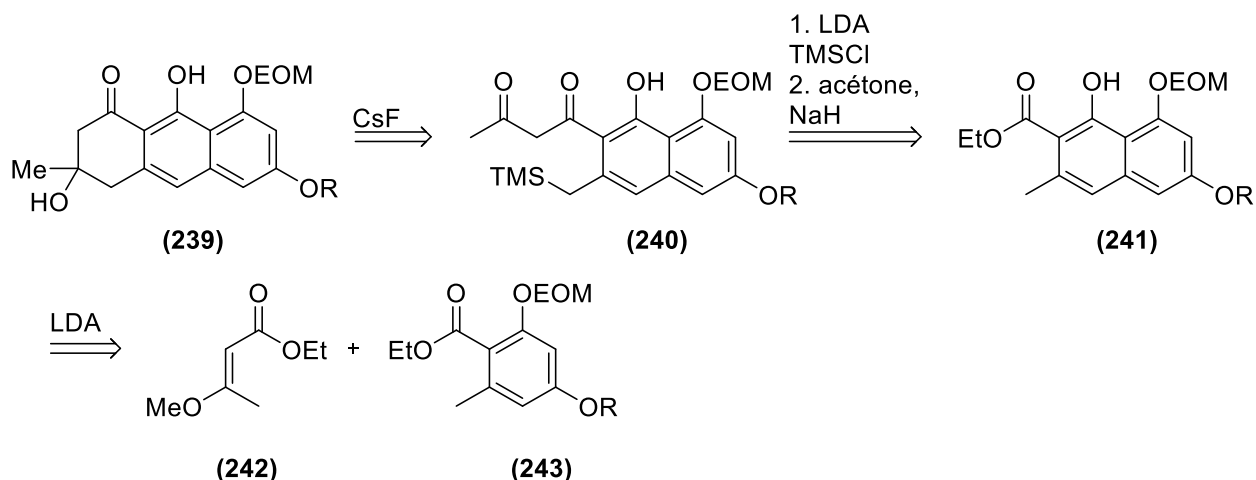


Schéma 111. Voie de synthèse s'affranchissant du couplage avec une cyclohexénone.

La première étape est comparable à la cyclisation classiquement utilisée pour coupler l'ester avec la cyclohexénone. Afin de pouvoir tenter directement les étapes suivantes une voie de synthèse raccourcie a été envisagée (Schéma 112), aboutissant au composé (246) comportant un seul cycle aromatique.

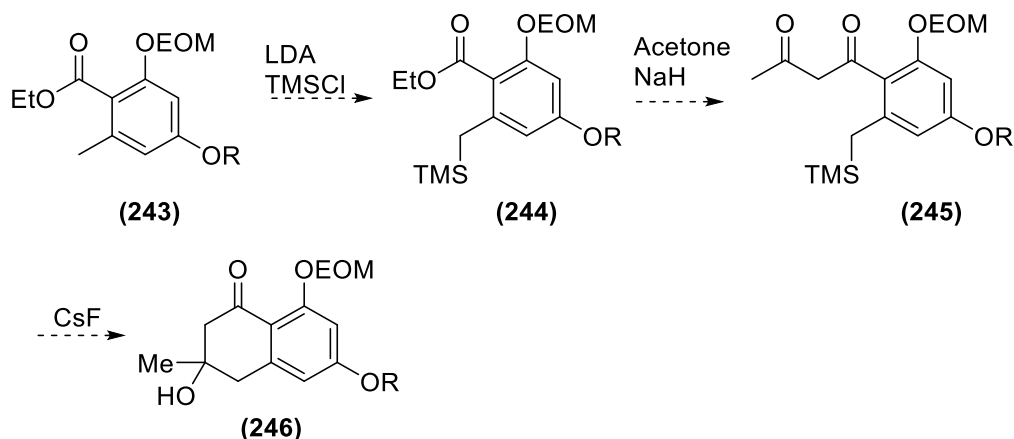


Schéma 112. Synthèse du composé (d) possédant un seul cycle aromatique.

La substitution nucléophile pour obtenir une dicétone à partir d'un benzoate d'éthyle est décrite dans la littérature. On peut citer les travaux développés par Zhang *et al.*¹¹³ qui obtiennent la 1-(4-bromophényl)-butane-1,3-dione avec un rendement de 85% (Schéma 113).

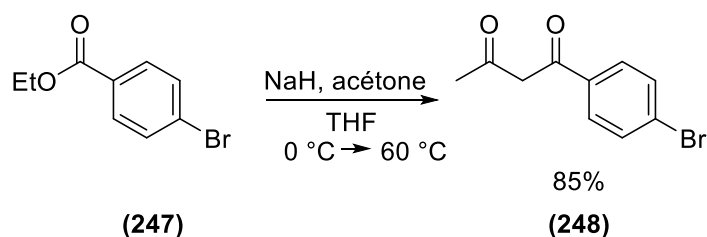


Schéma 113. Synthèse de la 1-(4-bromophenyl)-butane-1,3-par Zhang *et al.*

Le TMS a été introduit sur le groupement méthyle en position méta de l'ester avec un rendement de 81% (Schéma 112).

Après réaction de l'ester (93) dans le THF en présence de LDA et de TMSCl pour donner le composé (249) avec 81% de rendement (Schéma 114), une première tentative pour obtenir le composé (250) a été réalisée, en reprenant les conditions décrites précédemment, mais en augmentant seulement la température de 0 °C à 40 °C. Seul le produit de départ a été obtenu. Une deuxième tentative lors de laquelle le chauffage a été maintenu à 75 °C a donné un mélange de produit de départ et d'ester (249) désilylé.

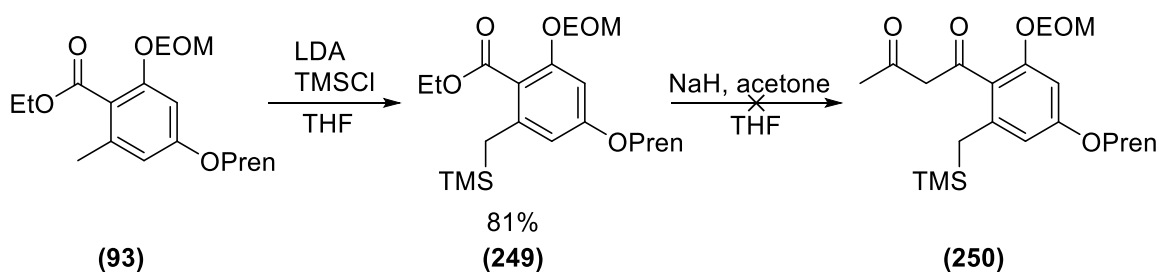


Schéma 114. Synthèse de la dicétone (x).

Afin d'accroître la réactivité de l'acétone, König décrit la synthèse de 1-aryl-1,3-butadiones (254) à partir d'esters phényles (251) en les faisant réagir avec la *N*-cyclohexylpropan-2-imine (252) en présence de LDA dans le THF¹¹⁴ (Schéma 115).

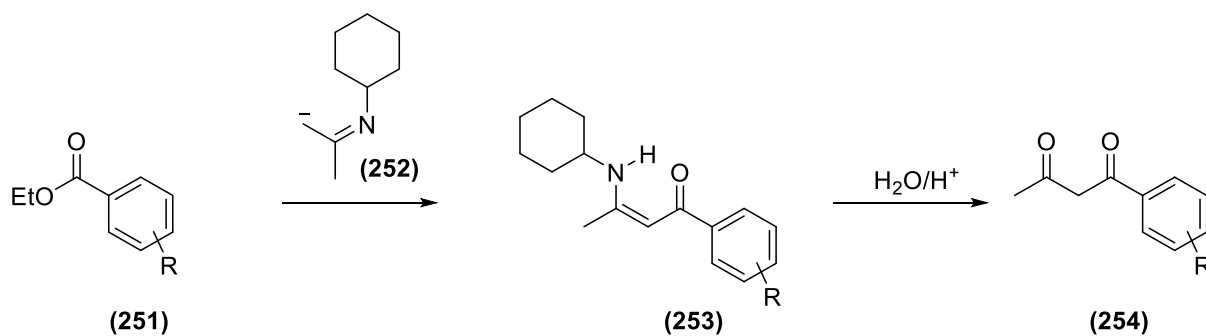


Schéma 115. Synthèse de 1-aryl-1,3-butane-1,3-diones.

La *N*-cyclohexylpropan-2-imine (**252**) a été synthétisée à partir de la cyclohexanamine et d'acétone dans le benzène comme décrit par Black et Blackman¹¹⁵. Celle-ci a été mise à réagir avec le LDA et l'ester (**249**) dans le THF, et le composé (**255**) a pu être obtenu avec 58% de rendement (Schéma 116). Un essai de déprotection de la cétone a été réalisé par HCl (0.5% mol) dans le THF à température ambiante, mais n'as pas fonctionné.

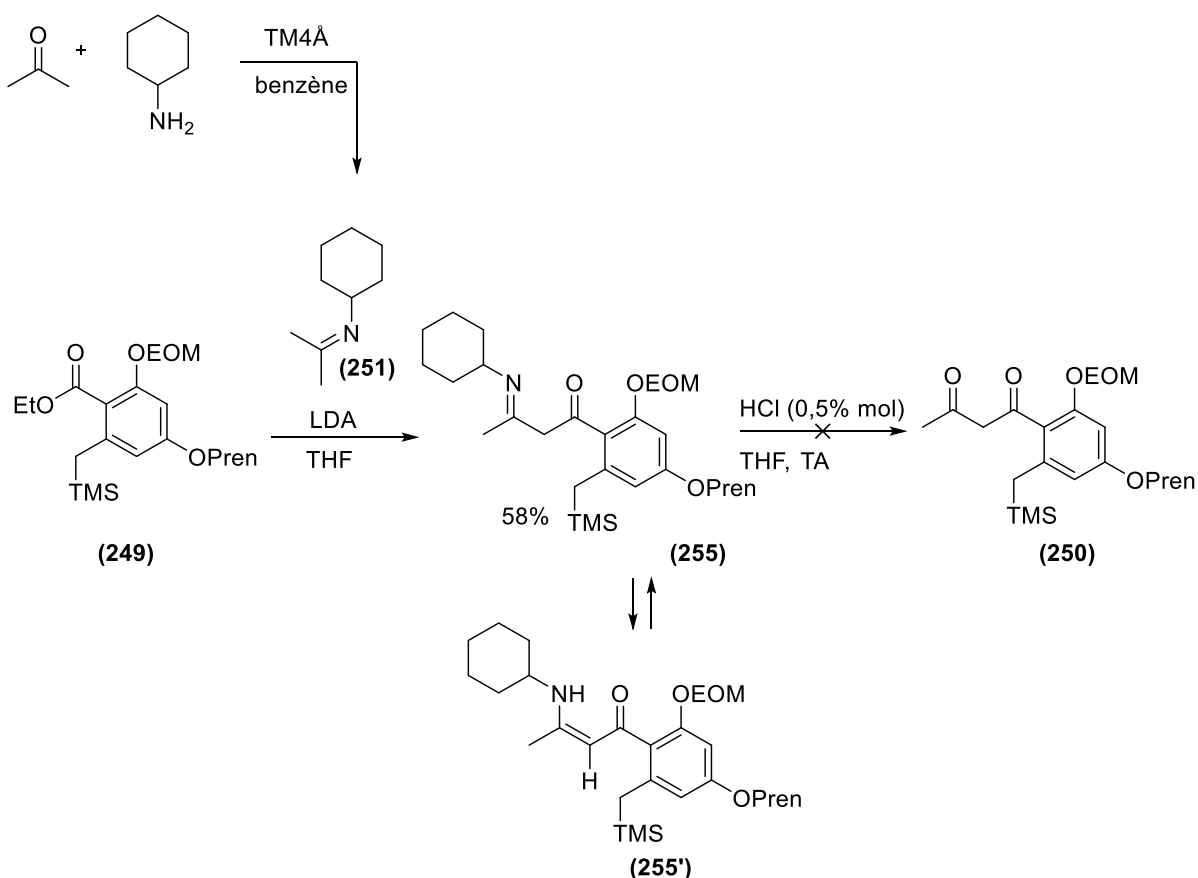


Schéma 116. Synthèse de la 1-aryl-1,3-butane-1,3-dione.

Cependant l'optimisation des conditions de réaction devrait permettre l'obtention de la dicétone (**250**). Geraghty et Morris ont notamment décrit la déprotection de la cétone en faisant réagir l'imine avec une solution d'acide chlorhydrique 10% à reflux pendant 11,5 h (**Schéma 117**)¹¹⁶.

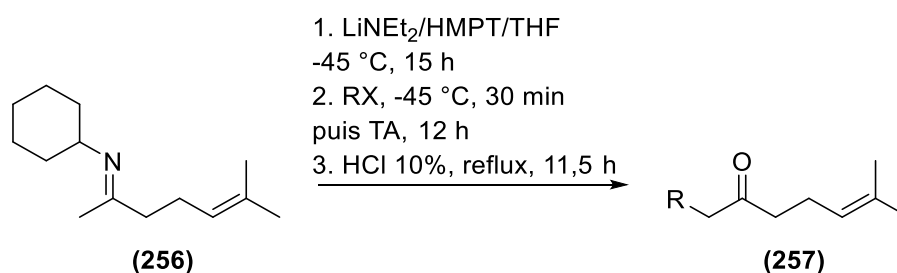


Schéma 117. Déprotection de la cétone par l'acide chlorhydrique.

Par ailleurs afin de tester les conditions de réaction du fluorure de césium, le couplage direct entre une cyclohexénone et un ester dont le groupement méthyle en ortho a été protégé par un groupement TMS a été réalisé (**Schéma 118**).

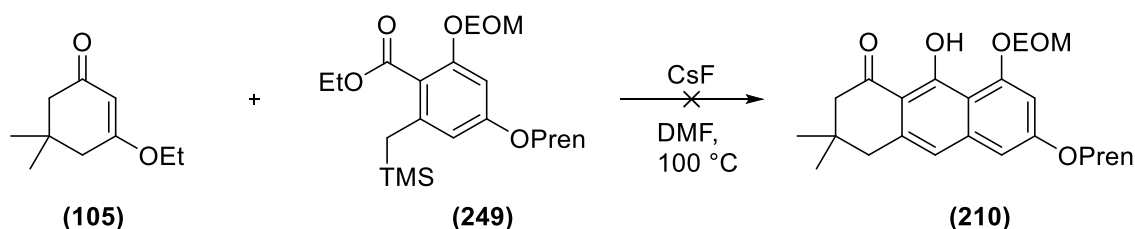


Schéma 118. Essai de couplage direct.

La réaction a été lancée à température ambiante, puis le milieu réactionnel a été chauffé à 80 °C pendant 6 h avant de monter à 100 °C pendant 24 h. Seuls les produits de départ ont été isolés.

III. Détermination de la configuration absolue des vismiones naturelles par dichroïsme circulaire vibrationnel.

III.1. Introduction

Comme nous envisageons la synthèse énantiosélective de vismiones, nous nous sommes interrogés sur la configuration absolue des vismiones naturelles, dans le but de pouvoir effectuer des comparaisons.

La cristallographie par rayons X est la manière la plus simple et efficace pour la détermination de la configuration absolue de molécules¹¹⁷. Elle nécessite cependant de posséder le composé sous forme de cristaux. Les vismiones ont tendance à cristalliser sous la forme de fines aiguilles dans l'heptane qui ne permettent pas d'envisager ce genre d'analyses.

Des tentatives de cristallisation dans un certain nombre de solvants usuels (acétone, pentane, ACN, MeOH, THF, AcOEt purs ou en mélanges) n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs cristaux, engendrant généralement la dégradation des molécules⁵. La technique du Dichroïsme Circulaire Vibrationnel (VCD) peut en revanche être utilisée afin de déterminer sans ambiguïté la stéréochimie absolue de nos molécules. Le VCD est une technique chiroptique spectroscopique. Elle repose sur l'aptitude d'une molécule chirale à absorber différemment une lumière infra-rouge polarisée circulairement gauche ou droite. Cette technique a été mise au point au cours des années 1970^{118,119} puis s'est développée au cours des quatre dernières décennies jusqu'à devenir décisive pour la détermination de la configuration absolue et la conformation de petites molécules chirales^{120,121}. Elle doit son efficacité à son association à des calculs de chimie quantique (DFT), permettant de simuler les spectres théoriques des différents énantiomères et conformères afin de les comparer aux données expérimentales.

Cette méthode consiste dans un premier temps à enregistrer le spectre VCD des deux énantiomères. Les énantiomères présentent des bandes VCD de signe opposé pour chaque mode vibrationnel, ainsi le spectre du VCD fournit une signature unique et riche de la configuration absolue du composé. En parallèle, Le spectre théorique de l'une des deux configurations est calculé arbitrairement, en utilisant des méthodes de chimie quantique. La contribution des différents conformères est définie par leur répartition statistique. Le spectre théorique de configuration absolue connue est comparé avec les spectres expérimentaux, dont l'un des deux se superpose et l'autre correspond à l'inverse de ce spectre¹²².

Le calcul du spectre théorique comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, l'ensemble des conformères envisageables pour une molécule donnée est modélisé. Puis, plusieurs étapes d'optimisation permettent de sélectionner les conformères les plus stables. Cette optimisation s'appuie sur le calcul des énergies de la mécanique moléculaire et sur l'utilisation des méthodes de calculs théoriques semi-empiriques et de calculs quantiques de la théorie de la densité fonctionnelle (DFT). Le calcul de l'énergie de Gibbs de chaque conformère permet ensuite l'élimination des conformations identiques, puis, la conformation la plus stable est déterminée. Enfin, la distribution de Maxwell-Boltzmann est utilisée afin de calculer la probabilité de chaque conformation par rapport à la conformation de plus basse énergie. Ainsi, le « nombre d'états » de chaque conformation est calculé par rapport à la conformation d'énergie la plus basse. Puis, le pourcentage d'état est calculé. Celui-ci s'exprime par le ratio du « nombre d'états » sur la somme des états. Afin de calculer le spectre théorique, 50 %, 90 % ou plus, des conformations les plus probables peuvent être pris en compte. Ainsi le spectre calculé pour une configuration absolue pourra être comparé aux spectres expérimentaux mesurés afin de déduire la configuration absolue des énantiomères¹²³.

III.2. Résultats

La configuration absolue de la vismione H (**2**) a été déterminée par Jean-Valère Naubron (collaboration Spectropole, FR 1739, Université de Marseille).

L'étude de la conformation a été réalisée sur les deux formes mésomères de la vismione H (Figure 25). L'analyse de la population de Boltzmann indique que ces deux formes coexistent en solution avec une majorité de la forme A.

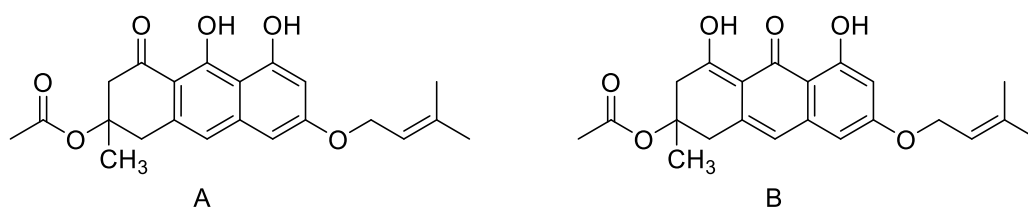


Figure 25. Formes mésomères de la vismione H (2)

Les enthalpies et les populations de Boltzmann ont été calculées dans le dichlorométhane. Seules les conformations possédant une population de Boltzmann supérieure à 3% ont été retenues. Les dix conformations les plus stables ont été utilisées pour générer les spectres IR et VCD moyens (**Figure 26**). Arbitrairement, ce sont les spectres de la vismione H de configuration absolue (S) qui ont été calculés. Les spectres IR et VCD de la vismione H ont ensuite été mesurés.

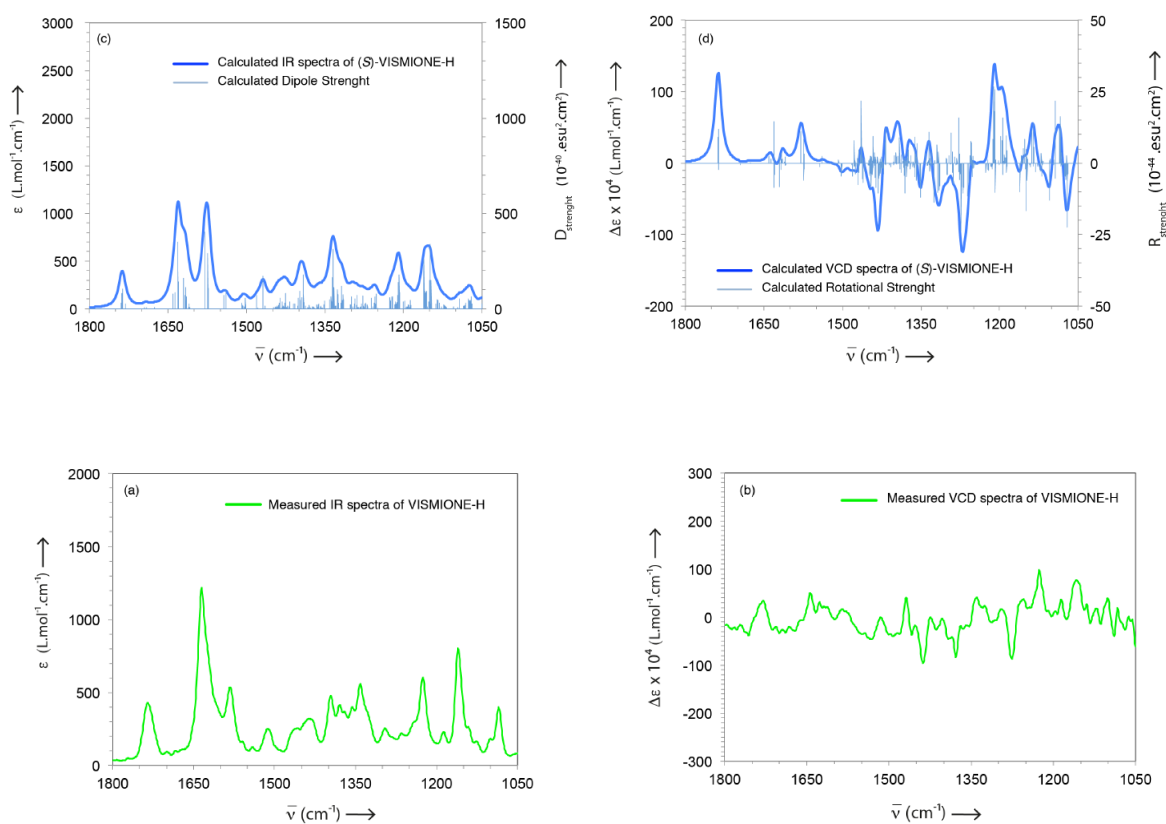


Figure 26. Spectres IR et VCD moyens calculés (en haut) et mesurés (en bas) de la vismione H.

Enfin, la superposition des spectres calculés et mesurés montre que les spectres calculés coïncident de façon satisfaisante avec les spectres mesurés (**Figure 27**). La configuration absolue (S) peut donc de façon non ambiguë être attribuée à la vismione H isolée à partir du genre *Psorospermum*.

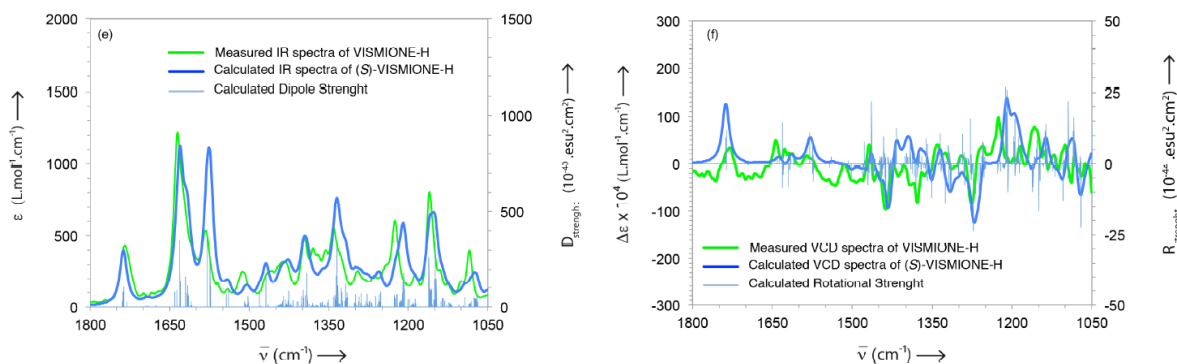


Figure 27. Superposition des spectres IR et VCD calculés et mesurés de la vismione H.

III.3. Discussion

C'est la première fois que la configuration absolue de la vismione H est déterminée. D'un point de vue biosynthétique, on peut raisonnablement penser que c'est le cas pour les autres vismiones issues de ce genre.

La configuration de certaines dihydroanthracénones avait déjà été résolue auparavant dans le genre *Vismia*. En effet la vismione A (**258**) et la vismione B (**259**) isolées du genre *Vismia* se sont révélées être également de configuration (S)¹²⁴ (**Figure 28**). Pour le montrer, un composé proche, l'éther 8-méthylque de la torosachrysonne (**257**), a été synthétisé de manière énantiosélective. La comparaison du spectre de dichroïsme circulaire (CD) de l'éther 8-méthylque de la torosachrysonne synthétisée avec celui de l'éther de synthèse et de la torosachrysonne naturelle (**18**), très proche, a permis d'identifier la configuration absolue (S).

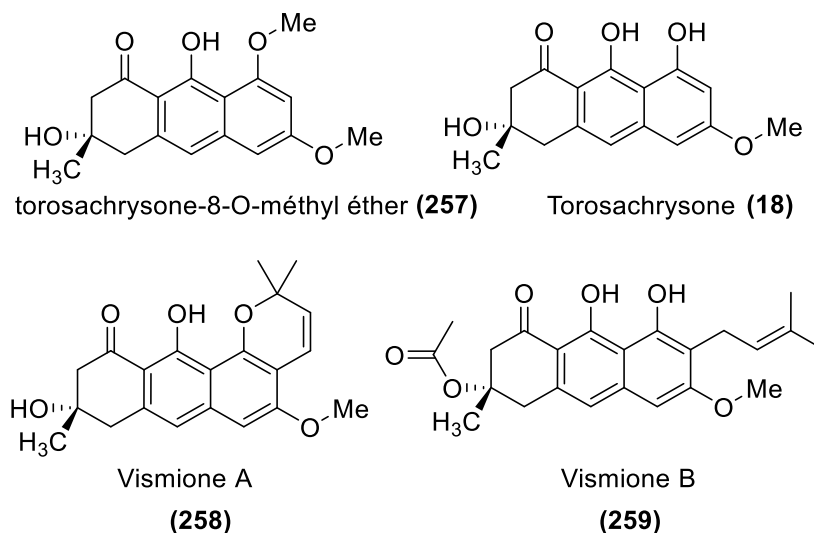


Figure 28. Vismiones de configuration (S) isolées du genre *Vismia* et dihydroanthracénones ayant permis de déterminer la configuration absolue par dichroïsme circulaire.

La synthèse totale des vismiones naturelles selon la voie actuellement utilisée permettrait d'obtenir ces vismiones en mélange racémique. En cas de succès, une voie de synthèse alternative a été imaginée, permettant de réaliser cette synthèse de manière énantiosélective. Il serait en effet intéressant d'évaluer l'activité de chaque énantiomère comparée à l'activité du mélange. Il est tout à fait possible en effet que l'un des énantiomères soit plus actif que l'autre.

IV. Conclusion

La première stratégie de synthèse d'analogues envisagée au laboratoire passait par la synthèse d'anthraquinones, celles-ci étant relativement faciles d'accès tout en possédant une certaine activité anti-protazoaires. Elles n'ont cependant pas conduit à leurs analogues anthrones comme cela avait été espéré. Cette stratégie a par la suite été abandonnée au profit de la synthèse directe des dihydroanthracénones, qui se sont également révélées être les composés naturels les plus actifs.

Ces dihydroanthracénones ont pu être synthétisées par la réaction d'annélation de Staunton Weinreb, qui est basée sur le couplage d'un ester ortho-toluidique et une cyclohexénone. La synthèse d'un panel d'esters différemment substitués s'est montrée relativement aisée. En revanche si les cyclohexénones C-alkylées se sont également montrées faciles d'accès et ont permis d'obtenir des dihydroanthracénones C-alkylées en position 6 avec des rendements honorables, la synthèse de cyclohexénones hydroxylées s'est révélée beaucoup plus problématique. De nombreuses voies de synthèse ont été explorées.

La réduction du phloroglucinol (**102**) par le rhodium en milieu basique sous pression d'hydrogène a permis la synthèse d'une cyclohexénone hydroxylée (**117**) possédant un groupe partant. Celle-ci a permis d'obtenir directement des dihydroanthracénones par couplage avec différents esters. Sa synthèse a cependant été particulièrement délicate, et une longue optimisation des conditions de réaction a été nécessaires avant d'obtenir un rendement correct et reproductible.

La cyclohexénone hydroxylée (**173b**) a également pu être obtenue en 6 étapes à partir du cyanoacétate d'éthyle. La cyclohexénone obtenue ne possède cependant pas de groupe partant et le composé intermédiaire obtenu lors du couplage avec un ester devra faire l'objet d'une oxydation ménagée pour obtenir la dihydroanthracénone correspondante sans aller jusqu'à la forme anthraquinone.

En 5 étapes en partant de l'acétoacétate d'éthyle la cyclohexénone hydroxylée et méthylée (**196**) a elle aussi pu être obtenue. Celle-ci permettra d'obtenir non seulement des dihydroanthracénones très proches des vismiones naturelles, qui possèdent toutes ces groupements hydroxyle et méthyle, mais également d'effectuer la synthèse totale de la desacétylvismione H (**5**).

Les vismiones naturelles possèdent toutes un carbone asymétrique en C-6. Une analyse par VCD réalisée sur la vismione H a montré que celle-ci était de configuration absolue S. Lorsque les conditions d'oxydation seront mises au point, une variante de la voie de synthèse, utilisant de la levure de boulanger, devrait permettre d'obtenir la cyclohexénone hydroxylée sans groupe partant de manière énantiosélective. La stéréochimie étant conservée lors de la réaction d'annélation, des dihydroanthracénones énantiomériquement pures seraient obtenues.

La détermination par VCD ayant été réalisée sur la base de calculs théoriques, la comparaison des spectres entre la vismione H (**2**) et un composé de synthèse de configuration connue permettrait de corroborer le résultat.

Ceci permettrait également d'évaluer l'activité anti-*Leishmania* d'une dihydroanthracénone énantiomériquement pure par rapport à celle du mélange racémique afin de déterminer si la stéréochimie joue un rôle dans l'activité.

La purification des dihydroanthracénones s'est montrée très délicate. Leur promptitude à donner les formes anthrones et anthraquinones correspondantes par élimination/oxydation a exclu tout contact avec la silice. L'utilisation de l'HPLC semi-préparative, avec des solvants ne contenant aucun acide comme c'est généralement le cas afin d'affiner la séparation, a permis de purifier tous les composés.

Au total 19 dihydroanthracénones ont été synthétisées, ainsi que deux composés de nature tétralone qui devraient conduire à des dihydroanthracénones (**Schéma 119**). Ces composés ont fait l'objet, pour la plupart, d'une évaluation de leur activité anti-*Leishmania* (**Chapitre IV**). Ces tests ont fourni des résultats intéressants sur l'influence de ces substituants.

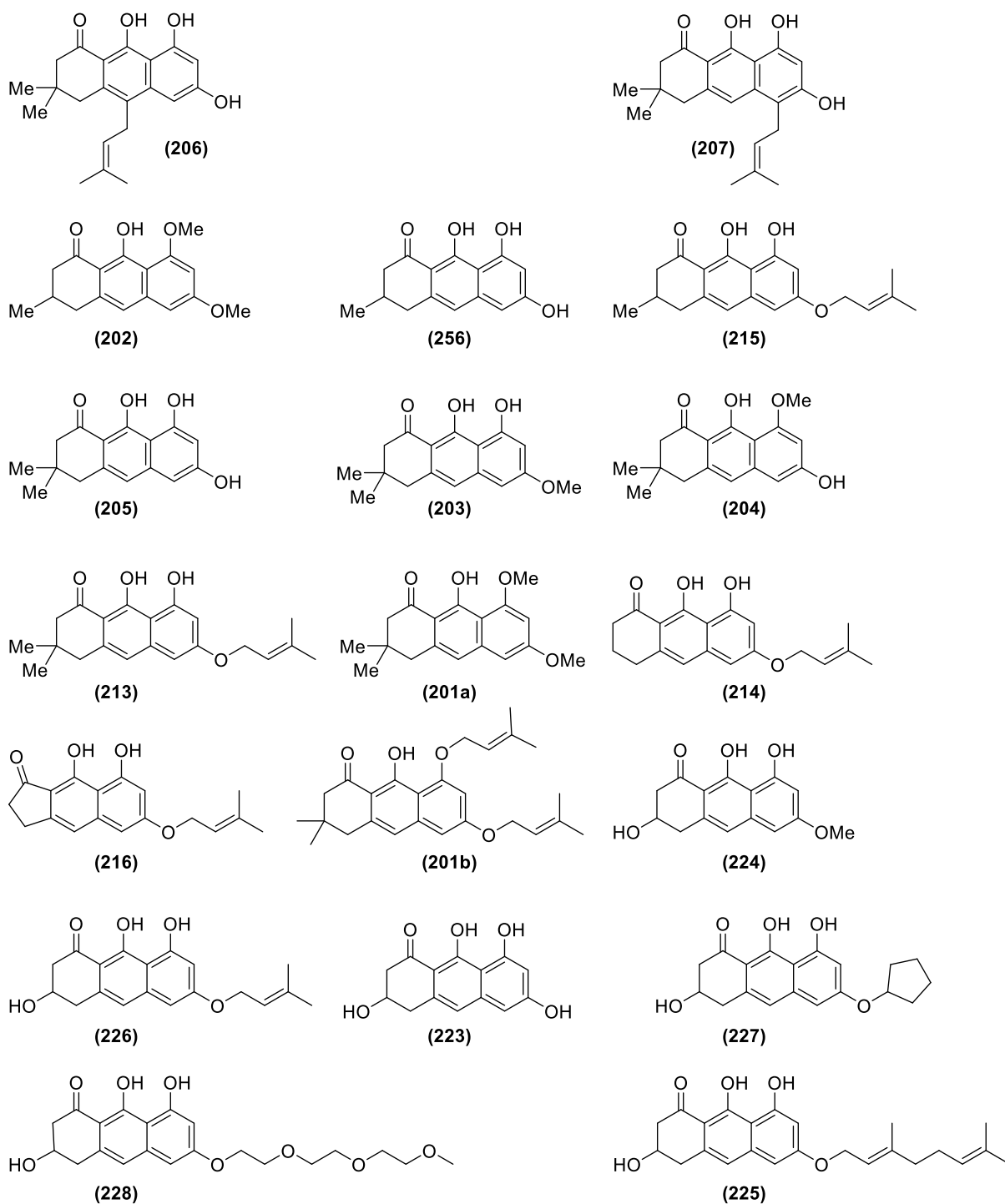


Schéma 119. Récapitulatif des dihydroanthracénones synthétisées.

Chapitre IV

Activités anti-*Leishmania* extra- et intra-cellulaires *in vitro* et *in vivo* des analogues synthétiques de vismiones, effet des vismiones sur la prénylation et étude de leurs propriétés de fluorescence intrinsèques

I. Introduction

Les molécules synthétiques obtenues ont été évaluées dans un premier temps sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Cependant ce modèle est relativement faussé puisque les composés doivent en temps normal passer les barrières de l'organisme et pénétrer à l'intérieur des macrophages pour exercer leur activité. Les composés et extraits les plus prometteurs ont donc également été testés sur amastigotes intramacrophagiques et *in vivo*.

Ces molécules, ainsi qu'une sélection de certains extraits, ont été testées sur des espèces à tropisme cutané, puisque dans ce cas « la cible » est plus facile à atteindre, et les propriétés physico-chimiques des composés ont donc une influence moins importante sur l'activité. De plus, le caractère cytotoxique marqué aura des conséquences moindres pour une utilisation topique. Afin de mesurer la sélectivité des composés pour le parasite vis-à-vis des autres cellules, des tests de cytotoxicité ont été entrepris.

Enfin, la littérature faisant état d'un recoupement relativement fréquemment entre activité anti-*Leishmania* et activité anti-fongique, certains composés et extraits ont également été testés sur *C. albicans* et *A. fumigatus*¹²⁵.

Les tests d'activités biologiques *in vitro* ont été réalisés à travers diverses collaborations :

- Les activités anti-*Leishmania* sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* (souche MHOM-ET-67/L82) et cytotoxiques sur myoblastes de muscles squelettiques de rat L6 ont été déterminées par l'équipe de Marcel Kaiser au *Swiss Tropical and Public Health Institute* de Bâle au sein de la plateforme de criblage de référence mondiale sur les maladies parasitaires;
- Les activités cytotoxiques sur cellules Hepa1.6, ThP1 et nHDF ont été déterminées par Flore Nardella à l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (Collaboration avec le Pr E. Candolfi);
- Les activités anti-*Leishmania* sur amastigotes axéniques et promastigotes de *L. infantum* et cytotoxiques sur macrophages murins J774A.1 ont été déterminées par Yenny Lozano, Lucie Paloque et Sandra Bourgeade-Delmas au sein de l'UMR 152 IRD-UPS PHARMA-DEV dans l'équipe BIOCID à Toulouse (Collaboration avec le Dr Éric Deharo).

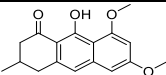
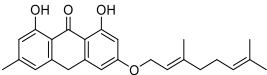
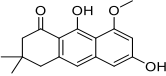
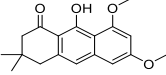
- Les activités *in vivo* sur modèle murin de leishmaniose viscérale ont été déterminées par Sébastien Pomel dans l'équipe BioCIS de l'UMR 8076 CNRS (Collaboration avec le Pr Philippe Loiseau).
- Les activités anti-*Leishmania* sur promastigotes et amastigotes axéniques des espèces à tropisme cutané *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* et *L. infantum* ont été déterminées par Katherine Milagros, Carrillo Torres, Denis Castillo Pareja et Michel Sauvain, au sein du laboratoire mixte international LAVI (UMR 152 IRD-UPS, Université Cateyano Heredia, Lima).
- Les activités sur les souches CAAL93 de *C. albicans* et ASFU7 d'*A. fumigatus* ont été déterminées par Carine Picot et Patrice Le Pape dans le Laboratoire de Parasitologie, Mycologie Médicale et Immunologie Parasitaire de Nantes (Collaboration avec le Pr Patrice Le Pape).

II. Activités sur les espèces à tropisme viscéral

II.1. Activités sur amastigotes axéniques de *L. donovani*.

Les dihydroanthracénones synthétisées ont été testées au *Swiss Tropical and Public Health Institute* de Bâle pour évaluer leur activité sur les formes amastigotes de *L. donovani*, ainsi que sur des cellules squelettiques de rat (L6) afin de mesurer la cytotoxicité et l'indice de sélectivité *L. donovani*/L6, dans les mêmes conditions expérimentales que celles mises en œuvre pour les vismiones naturelles (**Tableau 13**).

Tableau 13. Activité anti-*Leishmania* des dihydroanthracénones synthétisées sur *L. donovani* – partie 1.

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> CI ₅₀ (μM)	IS <i>L. donovani</i> / L6
JBG216 (202)		>100	na
NWGOEA (260)		61,831	1,841
NW005101 (204)		17,702	3,435
JBG203 (201a)		13,959	8,379

NW363D (256)		6,839	4,674
NW004801 (201b)		3,502	4,108
JBG218 (205)		2,709	5,939
NW007401 (216)		0,535	26,395
NW012901 (203)		0,506	13,492
NW007301 (215)		0,443	34,602
NW010401 (214)		0,417	12,539
NW012401 (213)		0,366	13,954
NW018401 (226)		0,010	401,445

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. donovani* par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine (n = 1). Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat L6 par test à la résazurine.

Références : activité anti-*Leishmania* : miltéfosine CI_{50} = 232 nM ; cytotoxicité : podophylloxine CI_{50} (L6) = 15,7 nM.

Les résultats présentés dans le **Tableau 13** font globalement ressortir trois profils d'activité. Les composés C-alkylés en position 6 et dont la position 1 est substituée (voir **Figure 1**), ainsi que ceux dont ni la position 1 ni la position 3 ne sont substituées possèdent les activités les plus faibles, de l'ordre du μ M (JBG216 (**202**), NW005101 (**204**), JBG203 (**201a**), NW363D (**256**), NW004801 (**201b**), JBG218 (**205**)). Les composés C-alkylés en position 6, dont l'hydroxyle en C-3 est substitué tandis que l'hydroxyle en position 1 reste libre, possèdent des activités submicromolaires (NW007401 (**216**), NW012901 (**203**), NW007301 (**215**), NW010401 (**214**), NW012401 (**213**), à l'exception de la seule anthrone NWGOEA (**260**), qui possède une activité plus faible de l'ordre du μ M). La nature du substituant en position 6 ne semble pas avoir d'influence majeure sur l'activité, les composés ne différant que par cette position possédant des activités semblables. De même, il ne semble pas y avoir de différence significative d'activité lorsque l'hydroxyle en position 3 est substitué par un groupement méthyle ou un groupement prényle. Enfin, le composé dont l'hydroxyle reste libre en position 1 lorsque celui en position 3 substitué, mais possédant un hydroxyle libre en C-6, voit son activité nettement augmentée (NW018401 (**226**)). En effet, ce composé

dont la structure correspond à la 6-desméthyl-désacétylvismione H possède une $CI_{50} = 0,010 \mu\text{M}$. Son activité est du même ordre de grandeur que celle des vismiones naturelles les plus actives : la désacétylvismione H ($0,031 \mu\text{M}$), la vismione H ($0,057 \mu\text{M}$) et la vismione D ($0,084 \mu\text{M}$), voire sensiblement améliorée.

Le **Tableau 14** présente les activités des différents composés hydroxylés en position 6 synthétisés. La vismione H a également été incluse à ces tests en tant que benchmark interne car le test d'activité employée présente une certaine variabilité. Nous pouvons d'ailleurs remarquer que la valeur de sa CI_{50} est déplacée d'un log par rapport aux résultats présentés dans le **Tableau 13**. En effet les composés **(223)** tétrahydroxylé, **(228)** et **(224)**, dont les positions 1 et 6 sont hydroxylées tandis que la position 3 est substituée, possèdent des activités de l'ordre du μM , contrairement à ce qui était attendu. Les composés *O*-alkylés en positions 6 étaient en effet supposés plus actifs que les composés *C*-alkylés sur cette position. Le composé **(225)** ainsi que la vismione H présentent des activités submicromolaires. Le composé **(226)** testé précédemment conserve une activité de l'ordre du nM. En comparant ces résultats avec les précédents, on voit que l'activité de la vismione H a chuté d'un facteur 13 ($CI_{50} = 743 \text{ nM}$ contre 57 nM). La miltéfosine utilisée comme référence, possédait lors des tests du **Tableau 13** une CI_{50} comprise entre 120 et 240 nM. Lors de cette dernière série de tests, la miltéfosine présentait une CI_{50} de 520 nM. La comparaison entre les deux séries de tests est donc délicate. Cependant ces résultats montrent que les composés **(225)** et **(226)**, correspondant respectivement à la 6-desméthylvismione D et à la 6-desméthyl-désacétylvismione H, possèdent des activités supérieures à celle de la vismione H. De plus, même avec la baisse d'activité lors de ce test, le composé **(226)** conserve une activité anti-*Leishmania* de l'ordre de la dizaine de nM.

Tableau 14. Activité anti-*Leishmania* des dihydroanthracénones synthétisées sur *L. donovani* – partie 2.

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> CI ₅₀ (µM)	IS <i>L. donovani</i> / L6
NW021102 (223)		11,585	16,965
NW018601 (228)		2,795	43,398
NW018201 (224)		1,014	19,874
VH (2)		0,743	22,080
NW018801 (225)		0,180	38,252
NW018401 (226)		0,035	342,609

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. donovani* par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat L6 par test à la résazurine.

Références : activité anti-*Leishmania* : miltéfosine CI₅₀ = 515 nM ; cytotoxicité : podophyllotoxine CI₅₀(L6) = 9,7 nM.

II.2. Activité sur amastigotes axéniques de *L. infantum*.

Le composé (226) étant le plus prometteur, il a été testé sur une autre espèce de *Leishmania* à tropisme viscéral, *L. infantum* (amastigotes axéniques), de façon comparée avec la VH (Tableau 15).

Tableau 15. Activités anti-*Leishmania* comparées de la vismione H et du composé synthétique (226) sur *L. infantum*.

Molécule	Structure	Activité <i>L. infantum</i> CI ₅₀ (µM) T0	Activité <i>L. infantum</i> CI ₅₀ (µM) T 1 semaine
VH		0,136	0,212
(226)		0,081	0,104

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. infantum* par estimation de la viabilité cellulaire par test à la luciférase. Référence : amphotéricine B : 57 ± 0.014 nM.

La vismione H avait déjà été testée auparavant sur les formes promastigotes et amastigotes de *L. infantum*⁷⁸. Son activité sur promastigotes s'était montrée faible avec une CI₅₀ supérieure à 300 nM en comparaison avec son activité sur amastigotes. La vismione H a montré une valeur moyenne de CI₅₀ = 174 ± 53,7 nM tandis que le composé **(226)** a présenté une valeur moyenne de CI₅₀ = 92 ± 16,2 nM.

Comme pour les tests sur *L. donovani*, le composé synthétisé possède une CI₅₀ plus basse. De plus, on observe pour les deux molécules une légère baisse d'activité lors du test à une semaine d'intervalle. On peut supposer, au vu de la facilité des dihydroanthracénones à se dégrader en leurs formes anthrones et anthraquinones correspondantes, qu'une dégradation partielle des composé testés pourrait être à l'origine de cet écart. D'autant plus que l'écart entre les résultats concernant la vismione H est plus important que celui observé pour le composé **(226)**. La diminution de l'activité plus importante dans le cas de la vismione H, mise en parallèle avec un changement de couleur de la solution stock vers le brun-orangé, suggère une stabilité plus faible de celle-ci par rapport au composé synthétique **(226)**.

III. Cytotoxicité

Le composé **(226)** possédant un index de sélectivité *L. donovani*/ L6 de l'ordre de 400, beaucoup plus élevé que pour les autres dihydroanthracénones, sa cytotoxicité a également été évaluée sur des cellules Hepa1.6 (cellules musculaires lisses de rat), ThP1 (monocytes humains) et pNHDF (fibroblastes humains) (**Tableau 16**), afin de confirmer ce résultat.

Tableau 16. Evaluation de la cytotoxicité du composé (226) sur les cellules Hepa1.6, ThP1 et pNHDF.

	CI ₅₀ Hepa1.6	IS <i>L. donovani</i> / Hepa1.6	CI ₅₀ ThP1	IS <i>L. donovani</i> /ThP 1	CI ₅₀ pNHDF	IS <i>L. donovani</i> /pNHDF
(226)	6,57	634	3,92	379	2,73	264

Le composé NW018401 a été testé sur des cellules d'hépatome de rat (Hepa1.6) sur des monocytes leucémiques humains (ThP1) ainsi que sur des fibroblastes dermiques humains (pNHDF) (n = 2). Référence : flavopiridol : CI₅₀ (Hepa1.6) = 0,102, CI₅₀ (ThP1) = 0,089, CI₅₀ (pNHDF) >1.

Les indices de sélectivité *L. donovani*/ Hepa1.6 et Thp1 se sont montrés très intéressants : 634 pour la souche Hepa1.6, 379 pour la souche ThP1 et 264 pour la souche

Thp1. Il existe donc une variabilité intercellulaire mais dans l'ensemble la sélectivité vis-à-vis du parasite reste très importante, et supérieure à celle des composés naturels. En effet, lors des tests de cytotoxicité sur cellules L6, seule la désacétylvismione H, qui est également la molécule naturelle la plus active sur *L.donovani*, avait présenté un indice de sélectivité intéressant (112, contre 401 pour le composé **(226)**). Toutes les autres dihydroanthracénones, naturelles ou synthétiques, possèdent des indices de sélectivité largement inférieurs à 100. Les valeurs de CI_{50} sont toutes de l'ordre du micromolaire.

IV. Activité sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*.

Le composé **(226)** s'étant montré prometteur lors des tests d'activité sur amastigotes axéniques, il a été testé sur un modèle d'amastigotes intramacrophagiques de *L.donovani*, plus proche de la réalité puisqu'il correspond au stade de développement rencontré chez l'individu infecté. Son activité a été évaluée avec une CI_{50} supérieure à 1,2 $\mu\text{g/mL}$ soit 3,66 μM , ce qui est intéressant, mais le composé s'est révélé toxique à partir de 3 $\mu\text{g/mL}$ (9 μM). Cette toxicité élevée est relativement inattendue au vu de l'indice de sélectivité amastigotes axéniques de *L. donovani*/cellules musculaires squelettiques de rat L6, (IS = 400). Ce résultat est néanmoins cohérent avec ceux obtenus lors de tests précédents réalisés sur les vismiones naturelles (**Tableau 17**). Leurs activités sur *L. donovani* intramacrophagiques étaient toutes de l'ordre de la dizaine de μM , avec une sélectivité maximale de 1,7 pour la vismione M⁵.

Lors des tests sur amastigotes axéniques, le parasite est directement accessible pour les dihydroanthracénones. En revanche lors des tests sur macrophages infectés, les composés doivent traverser les membranes cellulaires avant de pouvoir atteindre leur cible, ce qui peut expliquer la baisse d'activité. De plus, le parasite est dans une vacuole parasitophore où le pH est acide ($4,74 < \text{pH} < 5,26$)¹²⁶. Or la dégradation des vismiones est favorisée en milieu acide, ce qui peut expliquer les activités observées.

Tableau 17. Activités anti-*Leishmania* des vismiones naturelles sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*. (Thèse J-B. Gallé)

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> intraç (µM)	Cytotoxicité PMM (µM)	IS <i>L. donovani</i> / PMM
Désacétylvismione H (5)		32	18	0,6
Vismione H (2)		44	15	0,4
Vismione D (4)		> 2	6	< 0,2
Vismione C (6)		35	26	0,7
Acétylvismione D (3)		> 66	71	< 1
Acétylvismione F (7)		> 66	19	< 0,2
Vismione M (8)		13	21	1,7
Vismione F (9)		> 24	26	< 1

Les molécules ont été testées sur des cultures d'amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* (n = 1) par examen microscopique. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur macrophages murins par test à la résazurine.

Références : activité anti-*Leishmania* intracellulaire : miltéfosine CI₅₀ = 3 µM ; cytotoxicité : podophyllotoxine CI₅₀(macrophage) = 75 nM.

V. Activité *in vivo* sur un modèle murin de leishmaniose viscérale

L'activité de la vismione H (2) a pu être évaluée sur un modèle murin de leishmaniose viscérale dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Philippe Loiseau (UMR 8076 CNRS BioCIS). Lors de ce test, 8 souris ont été traitées avec 1 mg/kg par jour pendant 4 jours de vismione H, par voie intrapéritonéale. Une réduction de la charge parasitaire de 27% a été mesurée. Ce résultat n'est malheureusement pas statistiquement significatif. De plus au bout de 4 traitements une souris est morte, ce qui a conduit à ne pas réaliser d'injection supplémentaire, ainsi qu'à ne pas poursuivre l'expérience avec un traitement à doses plus élevées. De même que lors des tests sur amastigotes intramacrophagiques, la difficulté d'accès de la dihydroanthracénone à la vacuole parasitophore peut expliquer ce résultat mais surtout une mauvaise biodisponibilité suggérée par la faible solubilité de ces composés.

VI. Activité sur des espèces à tropisme cutané

Peu d'études font état d'activités sur les espèces de *Leishmania* à tropisme cutané au sein du genre *Psorospermum*. Cependant, une étude réalisée par Ahua *et al.* s'est intéressée aux propriétés anti-*Leishmania* de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Mali¹²⁷. De nombreuses plantes ont dans ce cadre été évaluées pour leur activité sur promastigotes et amastigotes de *L. major*. Les extraits dichlorométhaniques, méthanoliques et aqueux de *P. guineense* ont présenté des activités de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$ sur les deux formes du parasite.

D'autre part, un certain nombre de quinones d'origine naturelles ont montré une activité sur des souches à tropisme cutané¹²⁸. C'est le cas de la plombagine (**261**), une naphtoquinone isolée de *Pera benensis*, une plante bolivienne de la famille des Euphorbiacées dont l'écorce est utilisée en médecine traditionnelle par les indiens Chimane (**Figure 29**). Outre une activité submicromolaire sur des formes promastigotes de *L. donovani*, ce composé interfère avec le développement de *L. amazonensis* et *L. venezuelensis in vivo*¹²⁹. Il s'est révélé efficace pour traiter des lésions cutanées à des doses inférieures à celles utilisées pour le médicament de référence, le glucantime[®]. Une autre étude réalisée par Fournet *et al.* a mis en évidence son activité sur les formes promastigotes de *L. amazonensis* et *L. braziliensis* avec des $\text{CI}_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ dans les deux cas¹³⁰.

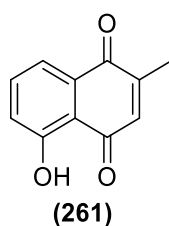


Figure 29. Structure de la plombagine.

Une collaboration avec le Dr Michel Sauvain, du laboratoire mixte international LAVI (UMR 152 IRD-UPS, Université Cateyano Heredia, Lima) a été entreprise. Elle a permis de d'évaluer l'activité de la vismione H ainsi que d'un extrait dichlorométhane d'écorce de *P. glaberrimum* (PGE2E) sur des formes promastigotes et amastigotes axéniques de différentes espèces de *Leishmania* à tropisme cutané (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. guyanensis*).

L'extrait PGE2E présente une activité de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$ sur les formes promastigotes des quatre souches testées (**Tableau 18**). Sur les formes amastigotes, l'extrait présente également une activité du même ordre de grandeur sur *L. amazonensis* et une activité de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$ sur *L. guyanensis*, tandis que sur *L. braziliensis* il présente une activité supérieure à $100 \mu\text{g/mL}$. Lors de précédents tests, la CI_{50} de l'extrait PGE2E avait été évaluée sur amastigotes axéniques de *L. donovani* à $0,69 \mu\text{g/mL}$, ce qui suggère une sélectivité vis-à-vis des formes viscérales des composés actifs présents dans l'extrait.

Tableau 18. Activité anti-*Leishmania* de l'extrait PGE2E sur des espèces à tropisme cutané.

Espèce	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	
	Promastigotes	Amastigotes axéniques
<i>L. amazonensis</i>	$7,8 \pm 2,5$	$3,7 \pm 0,4$
<i>L. braziliensis</i>	$8,1 \pm 1,6$	>100
<i>L. guyanensis</i>	$2,9 \pm 0,2$	$65,9 \pm 0,5$

L'extrait PGE2E a été testé sur des cultures axéniques d'amastigotes et promastigotes de *L. Braziliensis* et *L. guyanensis* par estimation de la viabilité cellulaire par test au MTT. Référence : amphotéricine B. Sur promastigotes : *L. amazonensis* : 40 nM, *L. Braziliensis* : 50 nM, *L. guyanensis* : 9 nM. Sur amastigotes : *L. amazonensis* : 100 nM, *L. braziliensis* : 300 nM, *L. guyanensis* : 800 nM.

Les activités de la vismione H sur les espèces à tropisme cutané sont inférieures à celles mesurées pour les formes viscérales (*L. donovani* et *L. infantum*). (**Tableau 19**). La CI_{50} mesurées est supérieure à $60 \mu\text{M}$ sur promastigotes et amastigotes axéniques des espèces *L. amazonensis* et *L. braziliensis* et les formes amastigotes de *L. guyanensis*. Une CI_{50} de $29,6 \mu\text{M}$ a en revanche été mesurée pour *L. guyanensis*.

Tableau 19. Activité de la vismione H sur des espèces à tropisme cutané.

Espèce	CI ₅₀ (µM) ± SD	
	Promastigotes	Amastigotes axéniques
<i>L. amazonensis</i>	> 60	> 60
<i>L. braziliensis</i>	> 60	> 60
<i>L. guyanensis</i>	29,6 ± 0,6	> 60

La vismione H a été testée sur des cultures axéniques d'amastigotes et promastigotes de *L. amazonensis*, *L. Braziliensis* *L. guyanensis* par estimation de la viabilité cellulaire par test au MTT. Référence : amphotéricine B. Sur promastigotes : *L. amazonensis* : 40 nM, *L. Braziliensis* : 50 nM, *L. guyanensis* : 9 nM. Sur amastigotes : *L. amazonensis* : 100 nM, *L. braziliensis* : 300 nM, *L. guyanensis* : 800 nM.

Ces résultats montrent une sélectivité pour la forme amastigote des espèces viscérales de *Leishmania* vis-à-vis des espèces cutanées, tandis que sur les formes cutanées l'activité semble être plus sélective des formes promastigotes. Les formes promastigotes sont les formes retrouvées chez le vecteur contrairement aux formes amastigotes, qui se développent lors du passage chez l'hôte. Les différences morphologiques et métaboliques entre les deux formes peuvent très bien expliquer la différence d'activité mesurée.

De plus l'extrait PGE2 présente une meilleure activité que la vismione H sur les formes promastigotes des espèces à tropisme cutané, ce qui suggère que d'autres composés, présents dans l'extrait, présenteraient une sélectivité vis-à-vis de ces formes.

VII. Activités antifongiques

La littérature fait état des composés ayant une activité antifongique et présentant une activité anti-*Leishmania* concomitante. C'est en effet le cas de la natamycine (**262**) et de la nystatine (**263**), deux antifongiques à large spectre (**Figure 30**). En effet, une approche de protéomique *in silico* réalisée par Sidana et Farooq¹²⁵ a révélé que ces deux composés se liaient à cinq cibles connues chez *L. donovani*, et bloquaient partiellement les sites d'action de quatre des cinq enzymes. Awasthi et Mitra quant à eux ont évalué l'activité de la natamycine sur des promastigotes et amastigotes axéniques de *L. donovani*¹³¹. Les CI₅₀ pour ces deux formes du parasite ont été évaluées respectivement à 15 et 8 µM.

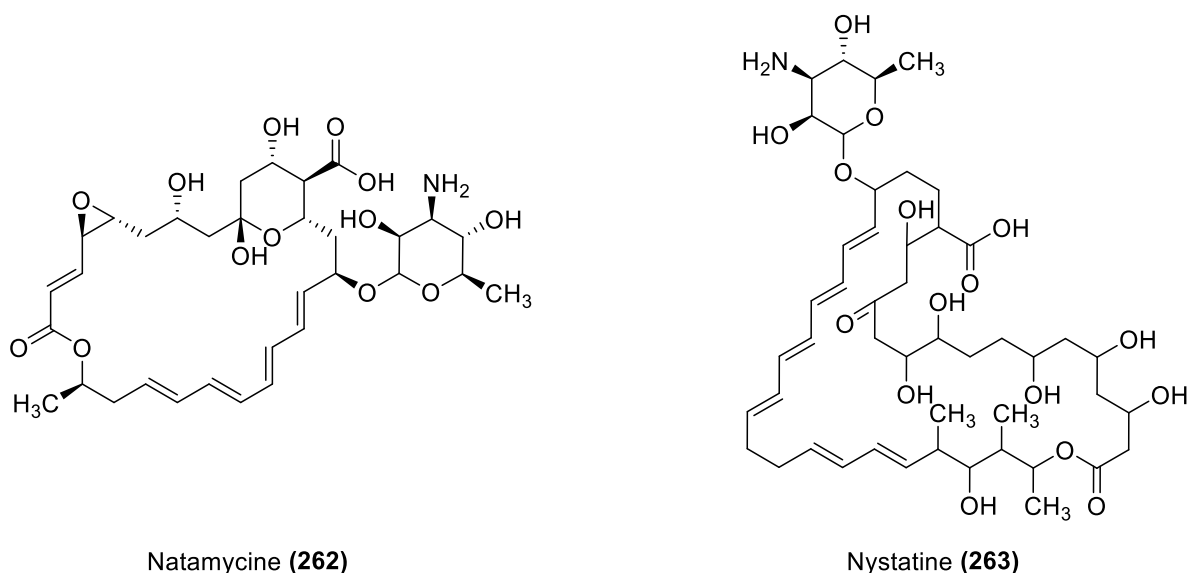


Figure 30. La natamycine et la nystatine, deux antifongiques présentant des propriétés anti-*Leishmania*

Les propriétés antifongiques de certains extraits et composés synthétiques issus de notre travail ont donc été testées sur *C. albicans* et *A. fumigatus* par Patrice Le Pape au Laboratoire de Parasitologie, Mycologie Médicale et Immunologie Parasitaire de Nantes (**Tableau 20**).

Les extraits dichlorométhane et aqueux provenant d'écorce, de racine, de tige, de tronc et de fruits des espèces de *Psorospermum* préidentifiées ont été évalués. Les vismiones naturelles issues de l'écorce de *P. glaberrimum* disponibles en quantité suffisantes et possédant une activité intéressante sur *Leishmania* ont également été retenues. Enfin, deux

molécules de synthèse parmi celles disponibles au moment de ce test ont également été retenues : le composé **(201b)** diprényle et le composé **(256)** trihydroxylé ont été sélectionnés. Comme la littérature mentionne des anthraquinones possédant une certaine activité antifongique, l'anthraquinone **(228b)** a également été sélectionnée. En effet, plusieurs des composés isolés actifs contre *C. albicans* dans la littérature sont C-alkylés par des groupements prényles et tous comportent de nombreux groupements hydroxyles^{48,132}.

Tableau 20. Activité d'extraits de *Psorospermum* et d'anthraquinones naturels et de synthèse sur *C. albicans* et *A. fumigatus*.

Extraits/Composés	Structure	<i>C. albicans</i> (CAAL93)			<i>A. fumigatus</i> (ASFU7)		
		CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)	SD	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)	SD
AGPE2E	-	30,2		18,8	>100		
PGE2E	-	6,9		0	>100		
PGL0T	-	>100			>100		
PFFr	-	>100			>100		
PKTc	-	>100			>100		
Vismione H (2)		>100	>100		>100	>100	
Vismione D (4)		>100	>100		>100	>100	
Acétylvismione D (3)		>100	>100		>100	>100	
(228b)		>100	>100		>100	>100	
(201b)		25,2	61,7	0	>100	>100	
(256)		>100	>100		81,09	314,2	12,4

Références : *C. albicans* : fluconazole : CI₅₀ = 0,13 µg/mL, SD = 0,07 ; *A. fumigatus* : voriconazole : CI₅₀ = 0,26 µg/mL, SD = 0,05 ; amphotéricine B : 0,38 µg/mL, SD = 0,03.

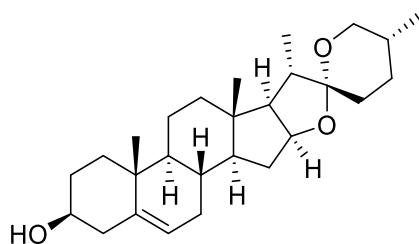
Les extraits PGE2E et APGE2E se sont montrés actifs sur la souche CAAL93 sensible au fluconazole de *C. albicans*, avec des CI_{50} respectives de 30,2 et 6,9 $\mu\text{g/mL}$. Ces extraits proviennent de l'écorce de *P. glaberrimum*, PGE2E étant un extrait dichlorométhane alors qu'APGE2E est l'extrait aqueux correspondant. Les trois vismiones naturelles testées, la vismione H, la vismione D et l'acétylvismione D, se sont toutes montrées inactives sur les deux champignons, ainsi que l'anthraquinone de synthèse (**228b**).

En revanche, les deux vismiones de synthèse ont présenté une certaine activité, bien que modérée. Le composé (**201b**) diprénylé possède une $CI_{50} = 61,7 \mu\text{M}$ contre *C. albicans*, tandis que le composé (**256**) possède une $CI_{50} = 314,2 \mu\text{M}$ contre la souche ASFU7 d'*Aspergillus fumigatus*, sensible aux dérivés azolés. Cependant ces activités restent très modérées pour des composés purs.

Au vu de ces premiers résultats il est difficile de tirer une conclusion quant à l'activité antifongique de vismiones. En effet, les trois vismiones naturelles se sont montrées inactives, tandis que les deux composés de synthèse on chacun montré une activité très modérée envers un des deux champignons. De plus, les extraits dichlorométhaniques et aqueux d'écorce de *P. glaberrimum* se sont révélés actif sur *C. albicans* (6,9 et 30,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivement). Or la teneur en vismione des extraits aqueux est beaucoup plus faible que celle des autres extraits dichlorométhaniques évalués (voir chapitre dosage des vismiones par FTMS). Il est donc tout à fait possible que l'activité antifongique soit due à des composés d'une nature différente, présents en concentration plus importante dans *P. glaberrimum* (et extraits par l'eau ou le dichlorométhane) que dans les autres espèces.

D'autre part, plusieurs publications relatent l'activité antifongique d'extraits issus du genre *Psorospermum*. Cette activité est liée à des molécules de type quinones, mais d'autres structures sont également mentionnées.

Effectivement Zubair *et al.* ont travaillé sur des extraits éthanoliques puis successivement hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol d'écorce de racines de *P. corymbiferum*, à partir desquels ils ont isolé la diosgénine (**264**), un stérol qui a montré une certaine activité sur *C. albicans* (MIC = 20 $\mu\text{g/mL}$; référence : amphotéricine B, MIC = 0,39 $\mu\text{g/mL}$)¹³³ (**Figure 31**). En revanche, l'acétylvismione F et la 1,8-dihydrohydroxyanthraquinone ont également été isolées mais n'ont pas montré d'activité.



Diosgénine (264)

Figure 31. Structure de la diosgénine isolée des racines de *P. corymbiferum*

Poumale *et al.* ont isolé la vismiaquinone à partir d'extraits méthanoliques de feuilles de *P. androsaemifolium*¹³⁴. Ils évalué son activité sur *C. albicans* par test de diffusion à l'agar avec un diamètre d'inhibition de 14 mm. L'alpha- (265) et la bêta-amyrine (266), deux triterpènes, ont également été isolées et ont montré des diamètres d'inhibition de 14 et 11 mm respectivement (Figure 32).

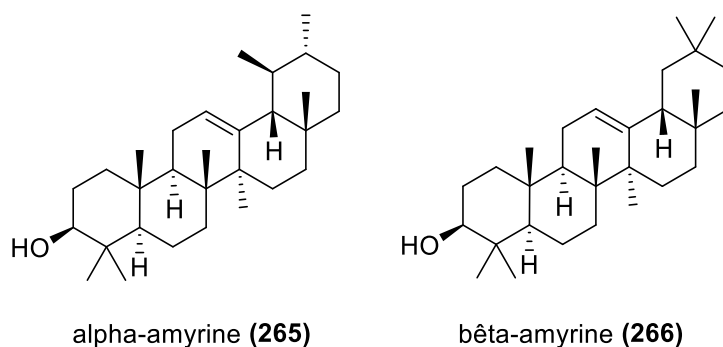


Figure 32. Structure de l'alpha –amyrine isolée des feuilles de *P. androsaemifolium*.

Certains anthranoïdes naturels ont cependant été décrits comme possédant des propriétés antifongiques. En effet, Kisaugau *et al.* ont montré que des extraits à l'éther de pétrole d'écorce de *P. febrifugum* à 100 mg/mL possédaient une activité sur *C. albicans* (*disk diffusion assay*, Ø 7 mm d'inhibition ; référence : fluconazole, Ø 27,75 mm), tandis que les extraits aqueux et dichlorométhane étaient inactifs¹³⁵. Tsaffack *et al.* ont quant à eux travaillé sur les racines de *P. febrifugum* ainsi que l'écorce de *P. adamauense*, dont ils ont isolé la fébrifuquinone (267) et l'adamabianthrone (268) qui ont été testées sur *C. albicans*, et mesuré leurs MIC₅₀ qui sont respectivement de 57,51 µM et 218,74 µM, ainsi que leurs MMC qui

sont de 115,02 μM et 156,25 μM , respectivement. (Référence : nystatine : MIC = 1,04 μM , MMC = 2.08 μM)⁴⁸ (Figure 33).

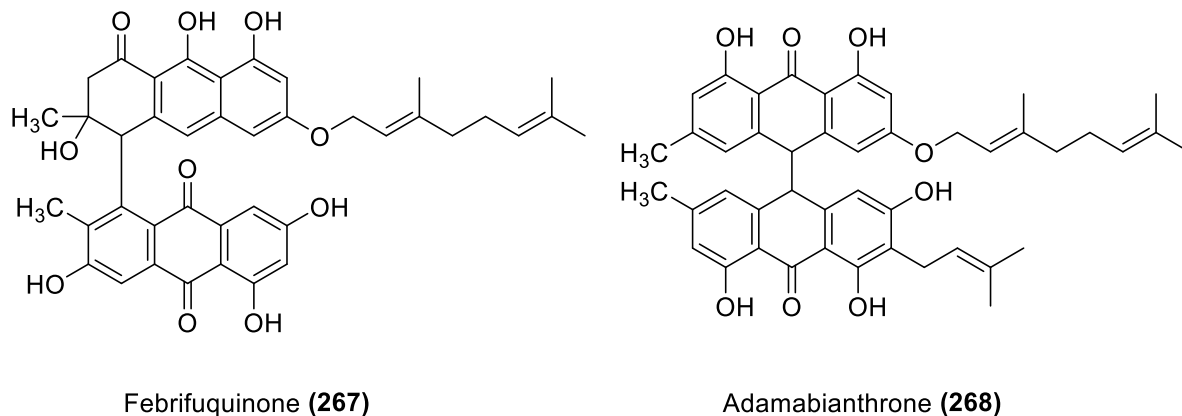


Figure 33. Structures de la fébrifuquinone et de l'adamabianthrone, extraites respectivement de *P. febrifugum* (racines) et *P. adamauense*, (écorce).

La vismiaquinone (269), la trihydroxyxanthone (270) et l'isogarcinol (271) ont été isolées par Tchakam *et al.* à partir d'extraits acétate d'éthyle et méthanol de feuilles de *P. aurantiacum* et *Hypericum lanceolatum*, une *Hypericacée*¹³² (Figure 34). Celles-ci se sont révélées actives sur *C. albicans*. La vismiaquinone présente une valeur de MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$, la trihydroxyxanthone une valeur de MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$, et l'isogarcinol une valeur de MIC = 64 $\mu\text{g/mL}$ (La griséofulvine utilisée comme témoin présente quant à elle une valeur de MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$).

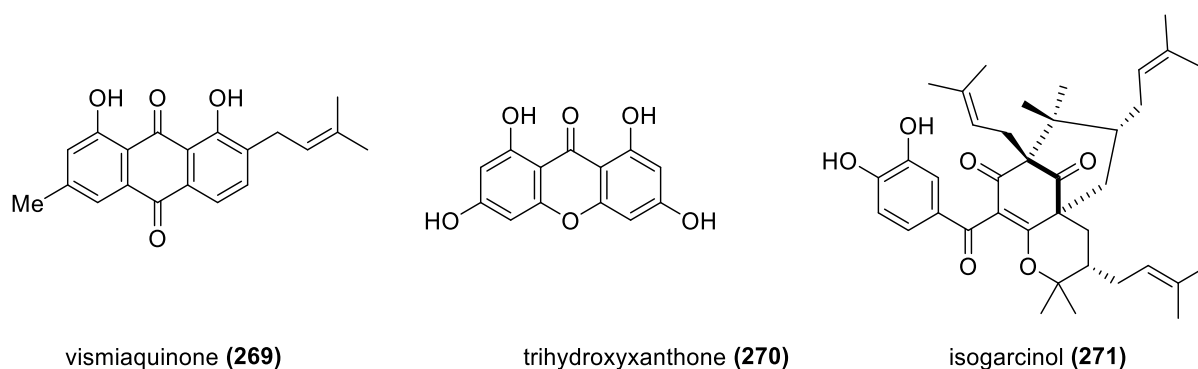


Figure 34. Structures des composés isolés de *P. aurantiacum* et *Hypericum lanceolatum*.

Excepté la diosgénine, isolée à partir d'écorce de racines de *P. corymbiferum*, possédant une activité submicromolaire, les autres composés évalués présentent des activités modérées, allant de la dizaine à la centaine de micromolaire. Les parties de plantes travaillées sont diverses (feuilles, écorce, écorce de racines). Or parmi les extraits testés dans le **Tableau 20**, les deux étant issus d'écorce (PGE2E et APGE2E) présentent une activité sur *C. albicans*, alors que les autres extraits provenant de tiges, fruits et tronc n'en présentent aucune. Il est possible que les composés actifs soient présents dans les différentes espèces de *Psorospermum* mais seulement dans certains organes de la plante. Il serait intéressant de tester des extraits de chaque organe provenant d'au moins deux espèces différents afin de conclure.

VIII. Conclusion

Les résultats des évaluations de l'activité anti-*Leishmania* des vismiones et dihydroanthracénones sont globalement très encourageants. Les extraits dichlorométhaniques de *Psorospermum* provenant de différents organes de la plante (tiges, tronc, fruits, écorce, feuilles) avaient montré des activités inférieures au $\mu\text{g/mL}$ sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Les vismiones naturelles isolées à partir de l'écorce de *P. glaberrimum* ont toutes montré des activités submicromolaires également sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. La vismione H et la désacétylvismione H possèdent notamment des activités de l'ordre de la dizaine de nanomolaire sur les formes amastigotes axéniques de *L. donovani*.

Les dihydroanthracénones synthétisées ont montré des activités sur amastigotes axéniques de *L. donovani* comprises entre la dizaine de micromolaire et la dizaine de nanomolaire, permettent de préciser une relation structure-activité, et trois positions clés ont été définies (**Figure 35**) :

- La position 1 : l'activité semble nettement améliorée lorsque cette position comporte un groupement hydroxyle libre ($R^1 = \text{H}$). (**201a**, **202**, **201b** vs **203**, **213**).

- La position 3 : l'alkylation de cette position semble bénéfique à l'activité. Deux cas de figures sont possibles. Lorsque la position 6 est C-alkylée, la nature du substituant sur la position 3 n'influe pas de manière significative sur l'activité (**216**, **203**). En revanche, lorsque la position 6 est hydroxylée, la substitution par un groupement prényle sur la position 3 ($R^3 = \text{prényle}$) entraîne une activité largement supérieure aux autres composés (**226** vs **224**, **228**, **225**).

- La position 6 : La présence d'un groupement hydroxyle sur cette position ($R^3 = OH$, $R^4 = H$) entraîne un gain d'activité d'un log sur *L. donovani* (226 vs 213).

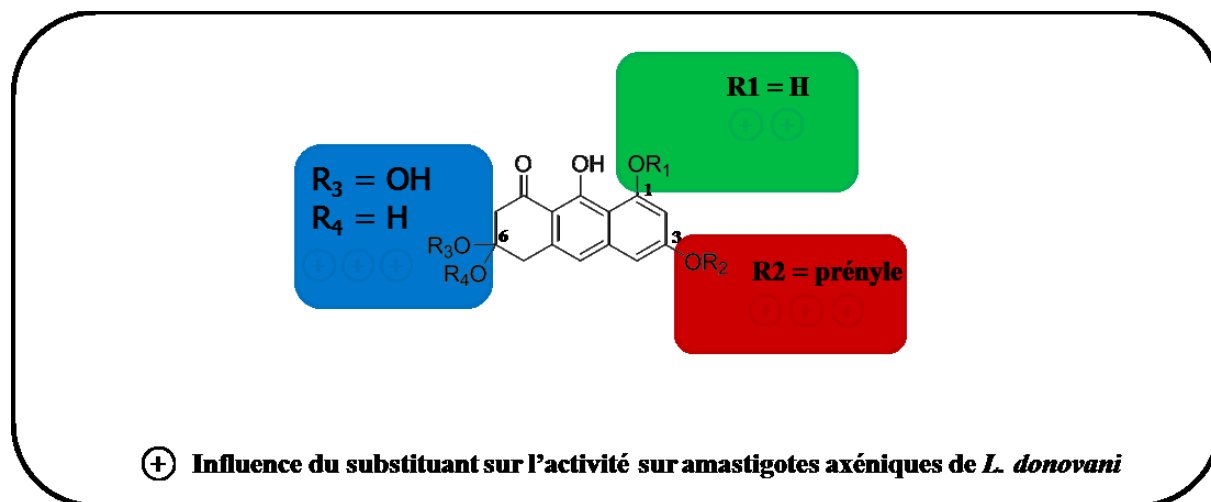


Figure 35. Positions de substitution clés des vismiones pour l'activité anti-*Leishmania* sur amastigotes axéniques de *L. donovani*.

L'influence des substitutions de ces trois positions sur l'activité sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, pressentie lors des travaux antérieurs à ce travail de thèse, a donc été confirmée. De plus l'influence bénéfique de la présence d'un hydroxyle sur la position 6 a été établie. En plus de présenter une activité similaire à celle des vismiones naturelles sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, le composé (226) a présenté une sélectivité largement supérieure à tous les autres composés, naturels ou de synthèse. Cette sélectivité a été confirmée par des tests de cytotoxicité sur différentes lignées cellulaires. L'activité de ce composé sur amastigotes axéniques de *L. infantum*, une autre espèce à tropisme viscéral, s'est également révélée très intéressante, sa CI_{50} étant inférieure de moitié à celle de la vismione H. Les tests sur macrophage infectés se sont révélés plus mitigés. Les vismiones naturelles ont montré des activités supérieures au micromolaire ainsi que des indices de sélectivité très faibles. Le composé (226) quant à lui révèle une activité de l'ordre du micromolaire mais une toxicité élevée. Il en est de même pour les tests *in vivo*, qui montrent également une activité faible et non significative, ainsi qu'une forte toxicité. Cette forte toxicité aurait pu être contournée pour une application cutanée. Cependant, l'extrait PGE2E et la vismione H se sont montrés peu actifs sur les souches cutanées de *Leishmania*.

Certains extraits et composés testés sur *C. albicans* et *A. fumigatus* ont présenté une activité modérée mais insuffisante pour une poursuite d'étude. Cependant les résultats suggèrent que d'autres molécules puissent être responsables de l'activité antifongique. Les anthraquinones notamment sont citées dans la littérature pour des activités de ce type.

Malgré les résultats mitigés sur macrophages infectés et sur modèle murin, le composé **(226)** paraît plus stable en nos mains et donc plus facile à manipuler lors d'investigations ultérieures. Cette stabilité a donc logiquement été évaluée de façon systématique.

IX. Etude de la stabilité des dihydroanthracénones en solution.

Le principal point négatif des vismiones est leur instabilité et leur propension à se dégrader en solution en leur forme anthrone et anthraquinone correspondantes (**Figure 36**). Cette propriété avait déjà été mise en évidence par Politi *et al.*¹³⁶, qui ont noté une modification du profil d'un extrait dichlorométhane de racines de *Vismia guineensis*, avec l'apparition de formes anthraquinones et bianthrone. Ces dégradations ont également été observées lors des manipulations des vismiones naturelles en solution au laboratoire, notamment lors de leur purification⁵.

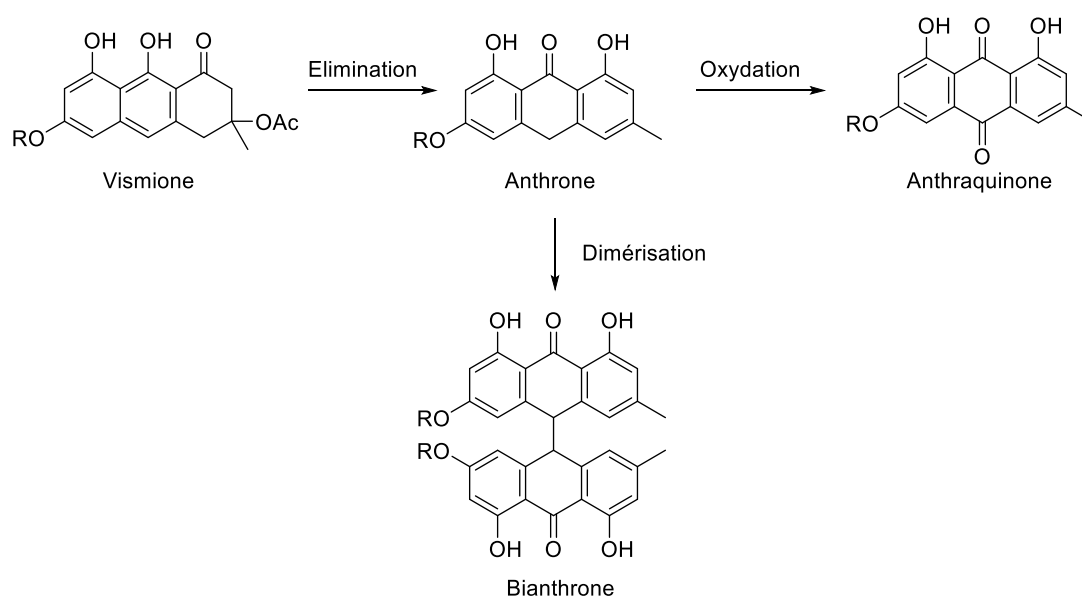


Figure 36. Dégradation des vismiones en solution.

Une étude de stabilité a donc été entreprise parallèlement sur deux molécules naturelles et deux dihydroanthracénones de synthèse.

IX.1. Etude de stabilité de deux vismiones naturelles et deux dihydroanthracénones de synthèse par HPLC dans le DMSO en atmosphère contrôlée.

Le DMSO est généralement utilisé pour reprendre les composés en solution lors des évaluations de l'activité biologique des composés, en raison de sa miscibilité à l'eau et donc aux milieux de culture. Il possède également une excellente capacité à solubiliser des composés d'une large plage de polarité. De ce fait, il a été utilisé pour solubiliser les dihydroanthracénones avant injection en HPLC semi-preparative, lors des purifications. Cependant, le DMSO possède un caractère oxydant pouvant dégrader les composés sujets à l'oxydation.

Quatre vismiones ont été choisies : deux naturelles et deux synthétiques, en fonction de la nature de leurs substituants traduisant la propension à se dégrader en leurs formes anthrones et anthraquinones. La vismione H et l'acétylvismione D diffèrent par l'*O*-alkylation en position 3 sur le cycle aromatique, tandis que la partie non aromatique, à l'origine de l'instabilité de ces composés, reste strictement la même. La vismione H étant nettement plus active que l'acétylvismione D, une éventuelle corrélation entre la stabilité et l'activité a été recherchée (**Figure 37**).

Le composé (**226**) possède une activité du même ordre de grandeur que celle de la vismione H, et diffère de celle-ci par l'absence de groupement méthyle ainsi que par la non-acétylation de l'hydroxyle en position 6 sur le cycle non aromatique, tandis que la partie aromatique reste strictement identique. L'absence du groupement acétyle rend ce composé potentiellement plus stable. Le composé (**213**) possède deux groupements méthyle en position 6 sur le cycle non aromatique, ce qui rend impossible une élimination conduisant à l'aromatisation du cycle pour obtenir la forme anthrone, qui peut survenir dans le cas des composés hydroxylés. Ce composé possède cependant une activité inférieure aux autres molécules considérées.

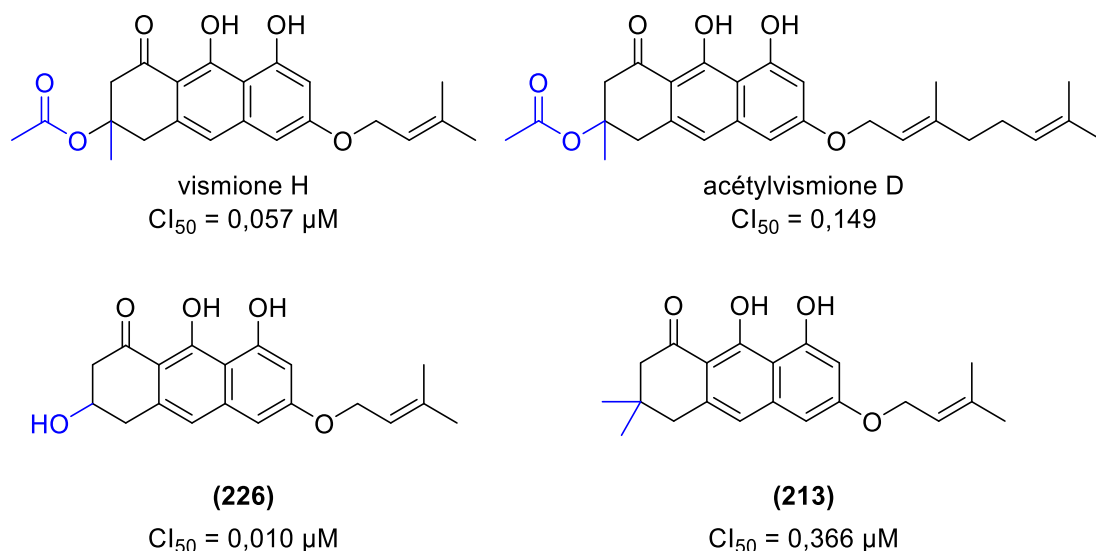


Figure 37. Composés naturels et synthétiques faisant l'objet de l'étude de stabilité des vismiones (CI_{50} déterminées sur amastigotes axéniques de *L. donovani*).

Un suivi de la dégradation de ces composés a été réalisé dans des tubes scellés, sous agitation dans du DMSO dégazé ($n = 3$). Les différentes formes de dégradation (anthrone, anthraquinone et bianthrone) ont pu être observées dans le temps grâce à leurs spectres UV caractéristiques⁵ (Figure 38).

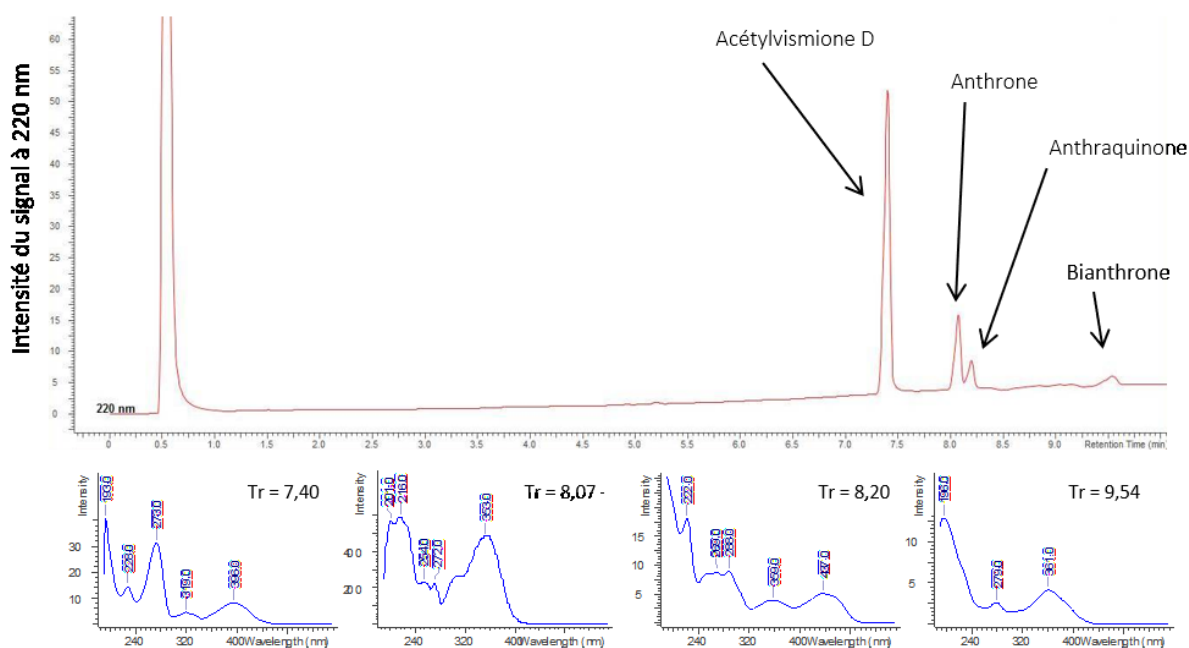


Figure 38. Chromatogramme du suivi HPLC de la dégradation de l'acétylvismione D sous atmosphère contrôlée. Tr : temps de rétention. Solution à 10 mg/mL d'acétylvismione D dans le DMSO. Détecteur DAD ($\lambda = 220 \text{ nm}$).

Le suivi de la vismione H et de l'acétylvismione D montre que lors des 10 premières heures, la vismione est dégradée au profit de la formation de l'anthrone (Figure 39, Figure 40). La vismione continue ensuite de se dégrader plus lentement, tandis que la forme anthrone disparaît pour former l'anthraquinone et la bianthrone. Les formes dégradées sont moins solubles que la forme vismione dans le DMSO, un précipité rouge s'est formé au fond des tubes au cours de l'expérience. Après deux semaines de réaction, il ne reste quasiment plus de composé en solution. Les comportements de la vismione H et de l'acétylvismione D sont sensiblement les mêmes. Le temps de demi-vie de la vismione H étant de 37,5 h alors que celui de l'acétylvismione D est de 50 h dans ces conditions.

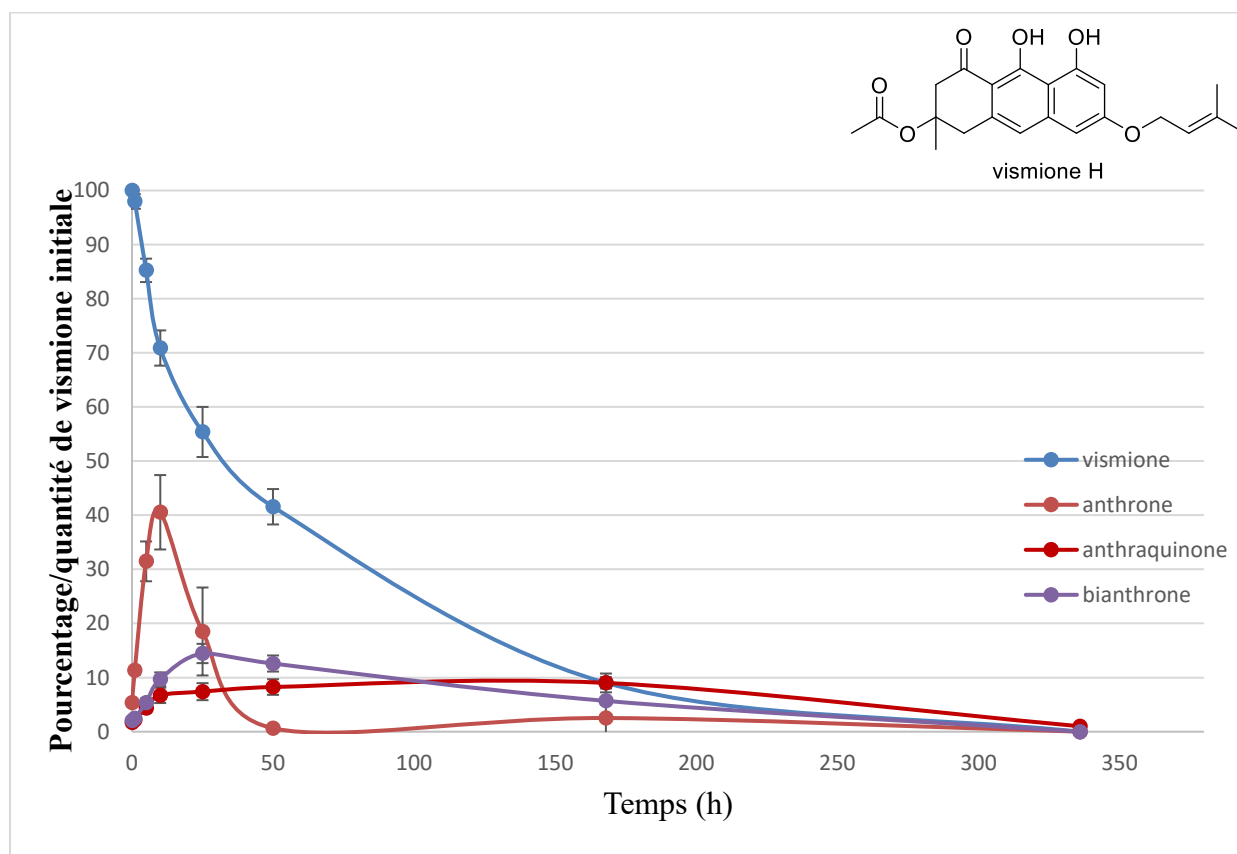


Figure 39. Suivi de la dégradation de la vismione H dans le DMSO sous atmosphère contrôlée (N = 3). Solutions à 2 mg/mL de vismione H dans le DMSO, sous atmosphère d'argon. Détecteur DAD ($\lambda = 220$ nm).

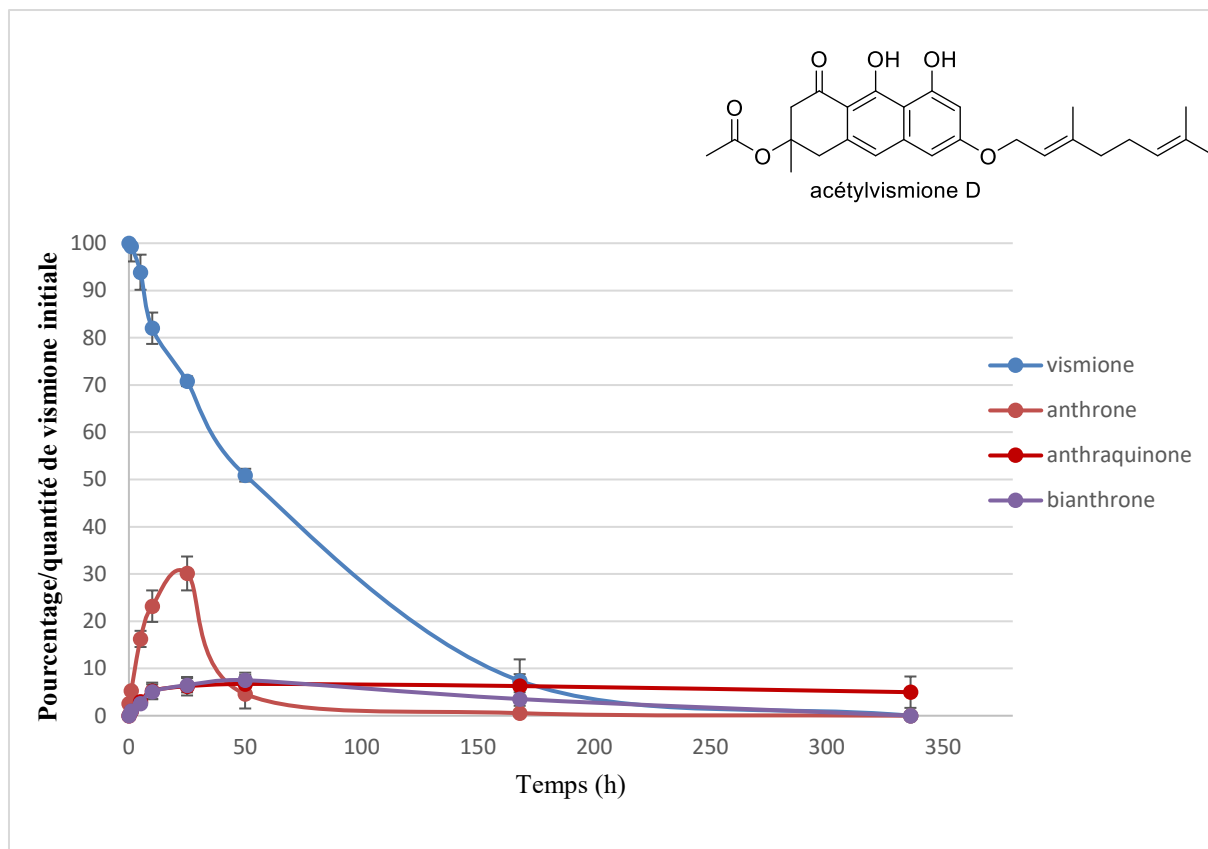


Figure 40. Suivi de la dégradation de l'acétylvismione D dans le DMSO sous atmosphère contrôlée (N = 3). Solutions à 2 mg/mL d acétylvismione D dans le DMSO, sous atmosphère d'argon. Détecteur DAD ($\lambda = 220$ nm).

La Figure 41 montre l'évolution de la couleur de la solution de vismione H au cours du temps, la vismione initialement jaune virant à l'orange puis au rouge.

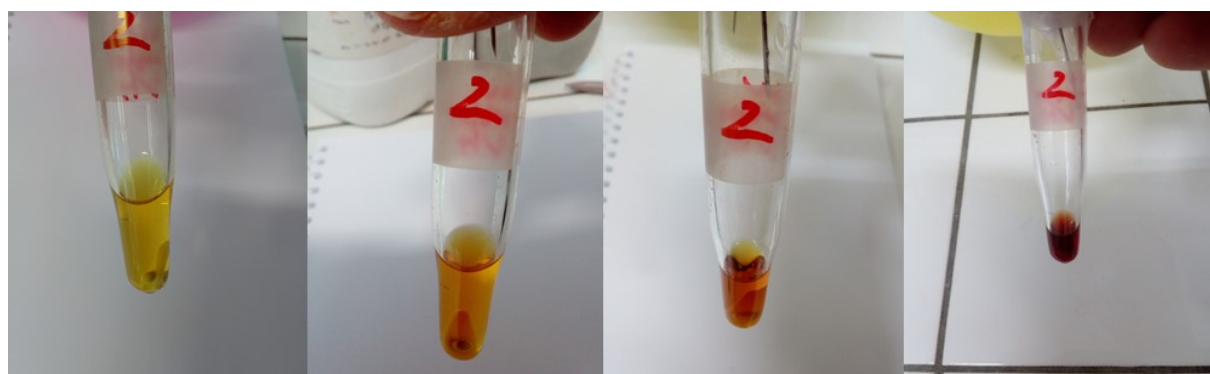


Figure 41. Modification de la couleur de la solution de vismione H lors de la dégradation. Solution à 2 mg/mL de vismione H dans le DMSO, sous atmosphère d'argon.

La dihydroanthracénone (**226**) en revanche n'a subi que peu de dégradation (**Figure 42**). En effet, après 10 h on retrouve une très légère formation d'anthrone qui est rapidement dégradée en la forme anthraquinone, présente à 5% après deux semaines de suivi. Aucune trace de la forme bianthrone n'est apparue, et la couleur jaune est restée sensiblement la même.

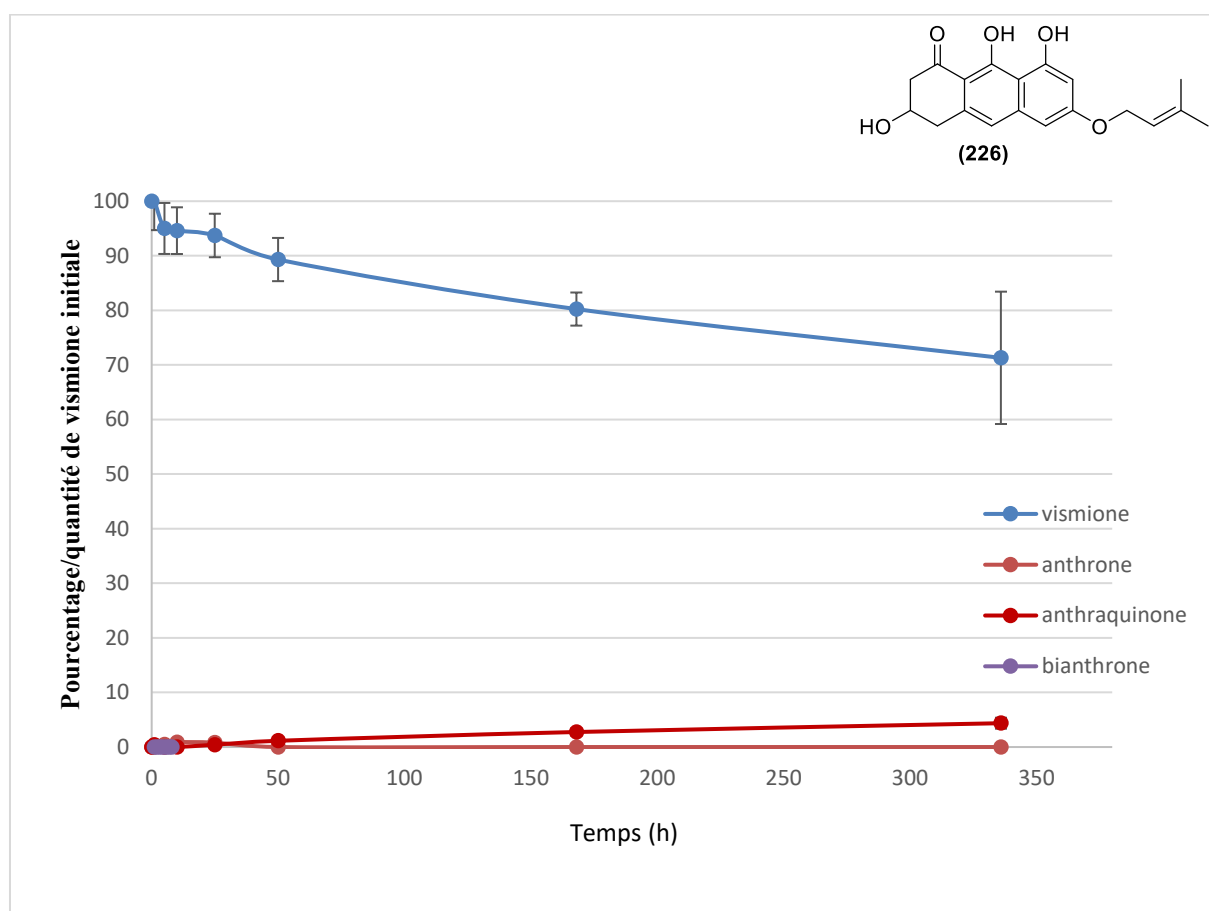


Figure 42. Suivi de la dégradation du composé (**226**) dans le DMSO en atmosphère contrôlée (N = 3). Solutions à 2 mg/mL du composé (**226**) dans le DMSO, sous atmosphère d'argon. Détecteur DAD ($\lambda = 220$ nm).

Sans surprise il en est de même pour le composé (**123**) (**Figure 43**), qui lui ne subit absolument aucune dégradation, 100% de la forme vismione étant retrouvée après deux semaines de suivi, et aucune diminution de la quantité globale de composé n'est observée.

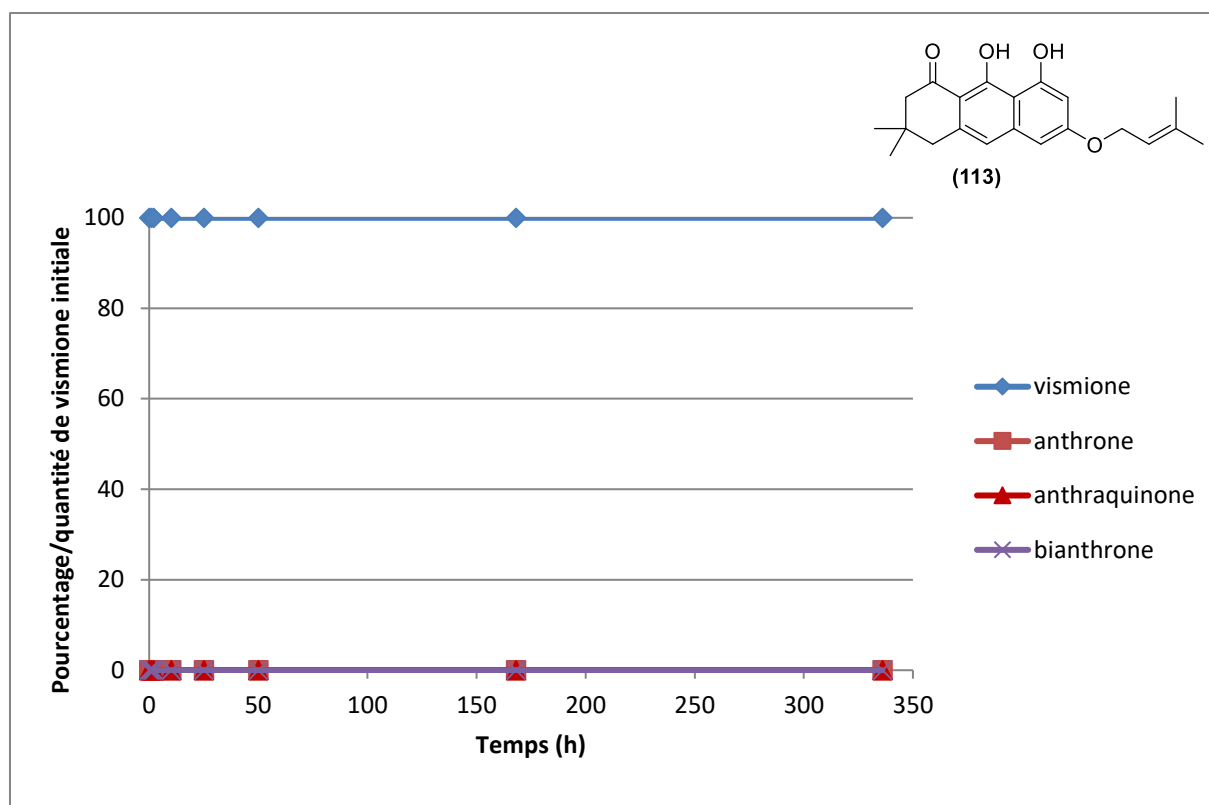


Figure 43. Suivi de la dégradation du composé (113) dans le DMSO en atmosphère contrôlée (N = 3). Solutions à 2 mg/mL du composé (113) dans le DMSO, sous atmosphère d'argon. Détecteur DAD ($\lambda = 220$ nm).

IX.2. Etude de stabilité de dihydroanthracénones par RMN ^1H

Lors de l'étude par HPLC, une diminution de la quantité globale de produit était remarquée lors de la dégradation. On peut supposer que les formes anthrones et anthraquinones sont moins solubles et précipitent, pouvant conduire à une sous-estimation de la dégradation. Des études de stabilité complémentaires par RMN ont donc été effectuées.

Une étude préliminaire de stabilité par RMN avait déjà été entreprise au laboratoire pour étudier la stabilité de la vismione H dans le DMSO et celle de l'acétylvismione D dans le DMSO et le méthanol. La dégradation des vismiones dans le méthanol ($t_{1/2\text{vie}}$ AVD (MeOH, argon) > 1 semaine) semble beaucoup plus lente que dans le DMSO ($t_{1/2\text{vie}}$ AVD (DMSO, argon) = 24 h, $t_{1/2\text{vie}}$ VH (DMSO, argon) = 72 h).

Il est possible de suivre l'apparition des différentes formes de dégradation en se basant sur déplacements des protons des groupements hydroxyles situés sur les cycles aromatiques des composés (Figure 44). Il est également possible de quantifier les différentes formes de dégradation par rapport à la vismione de départ en intégrant les pics correspondants.

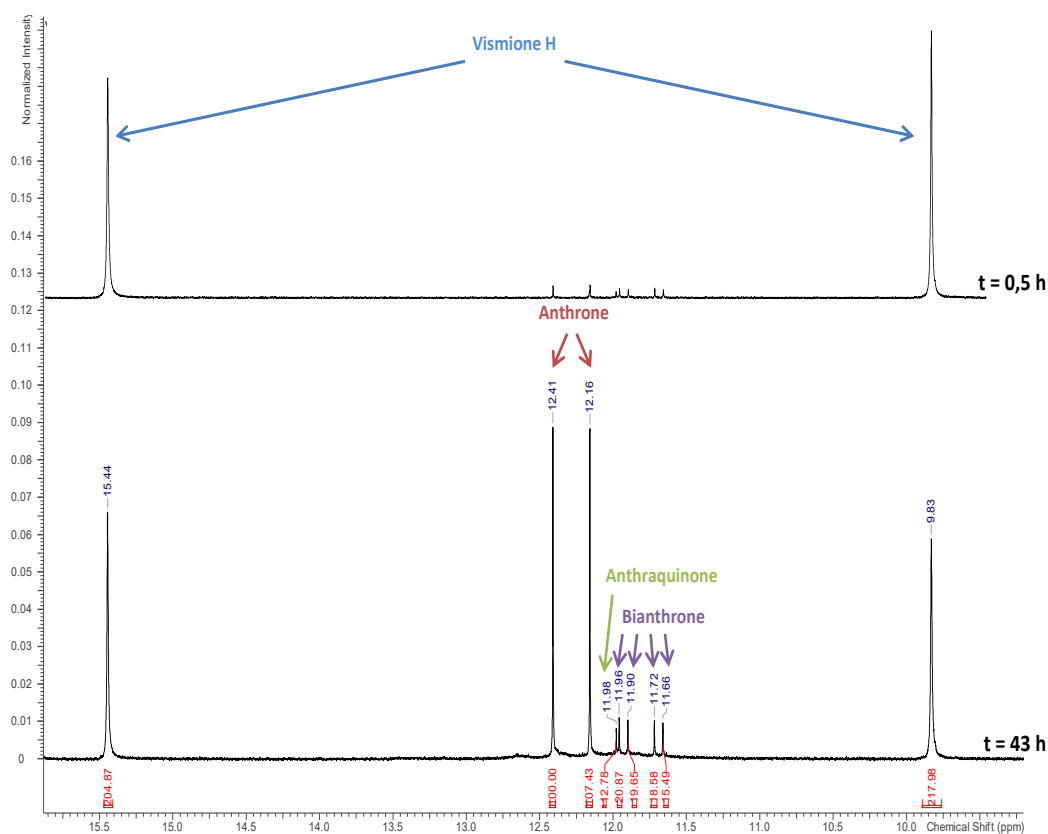


Figure 44. Spectres RMN ^1H de la solution de vismione H dans le DMSO-d_6 à $t = 0,5$ et $t = 43 \text{ h}$.

IX.2.1 Etude de stabilité du composé (226) dans le DMSO par RMN ^1H

Afin de confirmer le résultat obtenu lors de l'étude de stabilité par HPLC, la stabilité du composé (226) a été étudiée par RMN, en utilisant des tubes RMN possédant un bouchon avec septum permettant de les conditionner sous atmosphère d'azote. Elle a également été évaluée sous atmosphère normale. L'essai a été réalisé sur deux semaines. Au bout de ces deux semaines aucune forme de dégradation significative n'était visible (Figure 45). Ce résultat corrobore celui obtenu précédemment lors du dosage par HPLC. La RMN étant moins sensible, le très faible pourcentage d'anthraquinone mesuré n'a ici pas été observé.

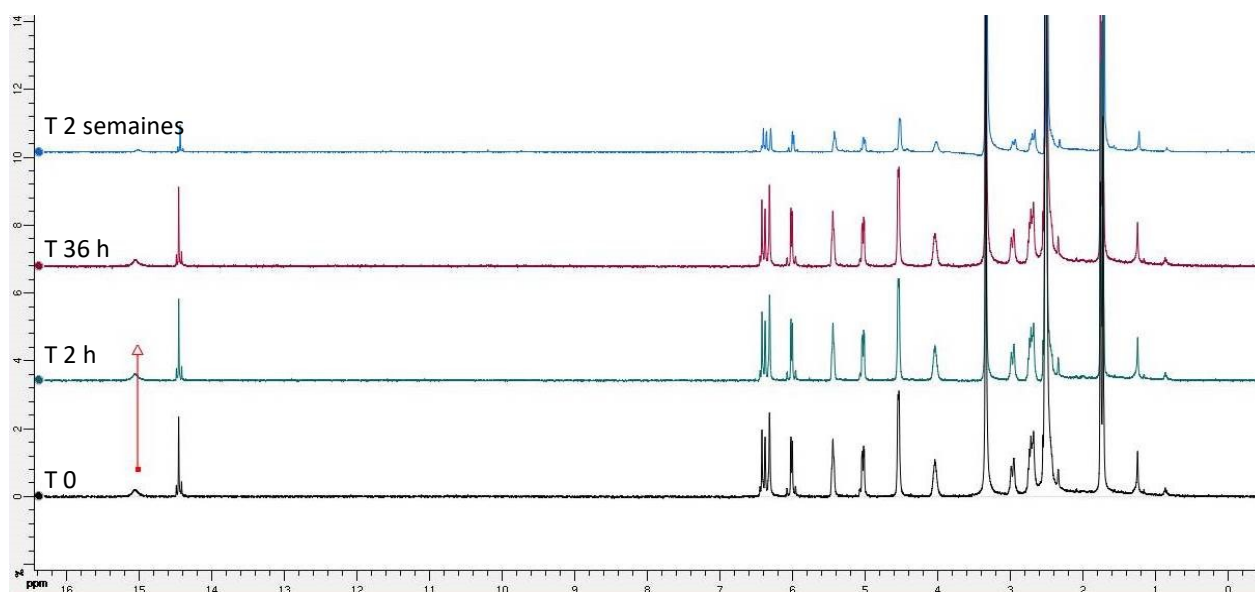


Figure 45. Suivi de la dégradation du composé NW018401 par RMN ^1H dans le DMSO sous atmosphère contrôlée. Solution à 5 mg/mL.

Lors de l'essai dans le DMSO sous atmosphère normale, en revanche, une dégradation est observée (Figure 46). En effet, 2 % de la forme anthrone est retrouvée après 24 h en solution. La quantité d'anthrone augmente ensuite jusqu'à arriver à 50 % de chaque forme au bout de deux semaines, soit une $t_{1/2\text{vie}}$ (DMSO, atm normale) de 2 semaines. La forme anthraquinone n'est pas apparue au terme de la durée du suivi.

En comparaison, lors d'une précédente expérience de suivi l'acétylvismione D présentait une $t_{1/2\text{vie}}$ (DMSO, atm normale) = 16 h, avec une large prédominance de la forme anthraquinone au terme du suivi.

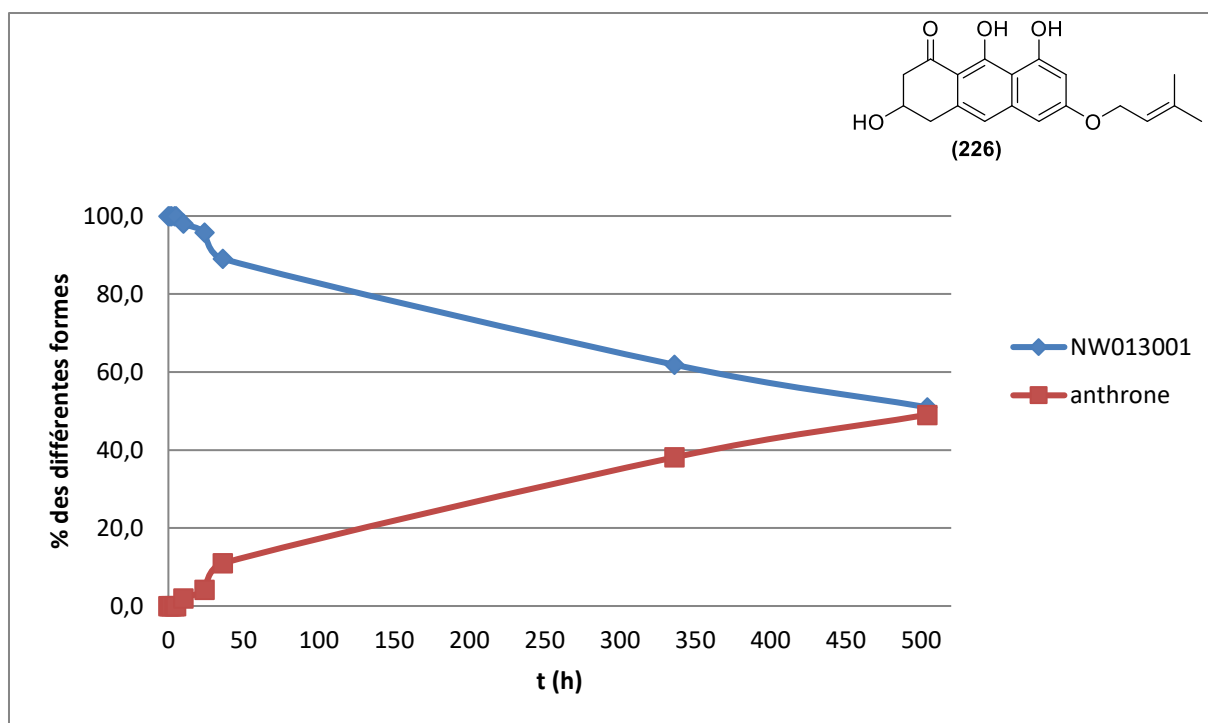


Figure 46. Suivi de la dégradation du composé (226) par RMN ^1H dans le DMSO sous atmosphère normale. Solution à 5 mg/mL.

IX.2.2 Etude de stabilité de la vismione D et de l'acétylvismione D dans le dichlorométhane par RMN ^1H sous atmosphère contrôlée

Les vismiones naturelles sont rapidement dégradées en solution dans le DMSO, même lorsqu'elles sont placées sous atmosphère inerte, comme l'a montré le suivi par HPLC. Un suivi de la dégradation dans le méthanol réalisé préalablement au laboratoire sur l'acétylvismione D, indiquait qu'après deux semaines la forme vismione était encore présente à 73% dans la solution. La stabilité de la vismione D et de l'acétylvismione D a ici été évaluée dans le dichlorométhane, un autre solvant largement utilisé lors de la purification des vismiones ainsi que du traitement des réactions menant aux dihydroanthracénones de synthèse. La vismione D et son analogue acétylé ont été testés en parallèle afin d'observer l'influence de l'acétyle sur la stabilité.

Le suivi de la vismione D montre qu'au bout de 3 jours il n'y a aucune trace de dégradation (Figure 47). La dégradation des vismiones est favorisée dans les solvants polaires et pro-oxydants comme le méthanol ou le DMSO, tandis que les solvants apolaires comme le dichlorométhane semblent les stabiliser.

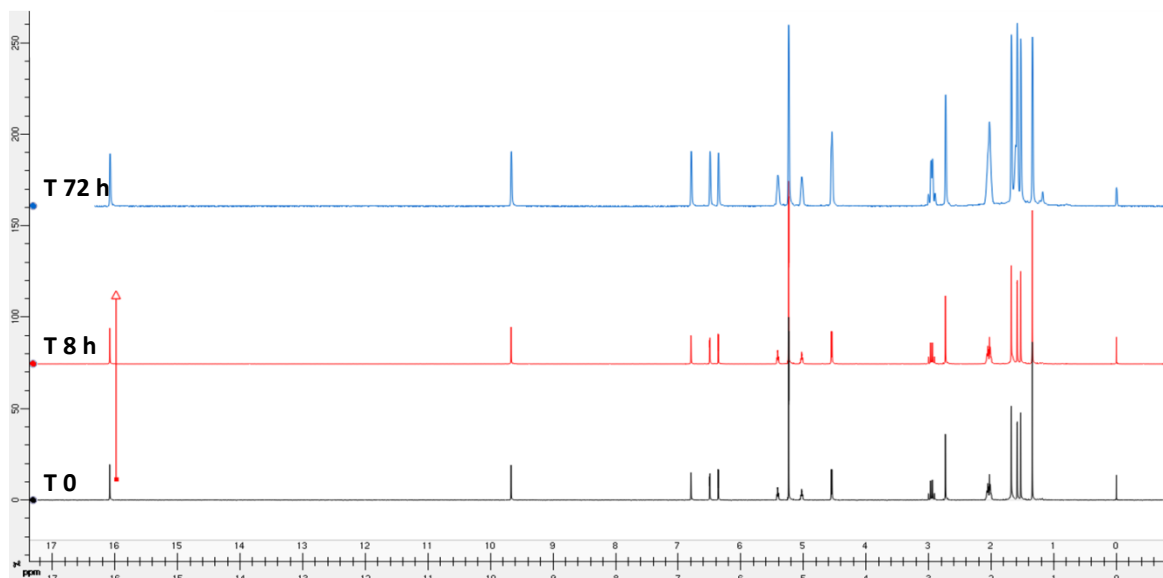


Figure 47. Suivi de la dégradation de la vismione D par RMN ^1H dans le dichlorométhane en atmosphère contrôlée. Solution à 5 mg/mL.

L'acétylvismione D quant à elle présentait 3% de forme anthrone et 1% de forme anthraquinone à $t = 0$. Après trois jours en solution dans le dichlorométhane la proportion de ces deux formes n'a absolument pas augmenté (Figure 48).

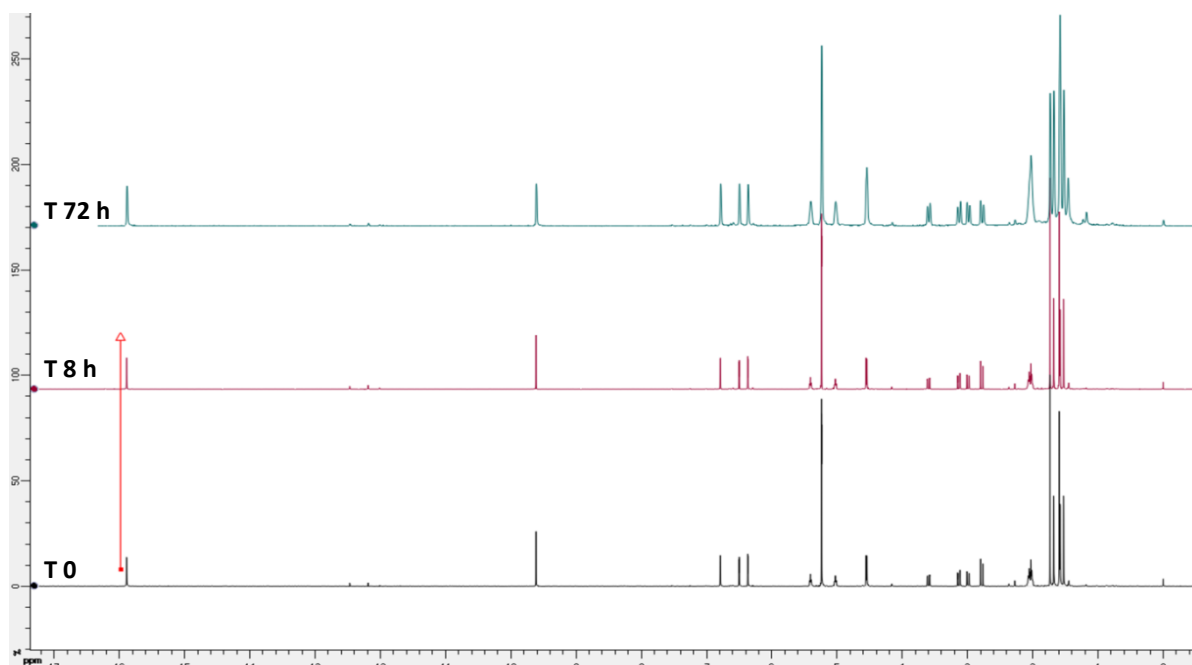


Figure 48. Suivi de la dégradation de l'acétylvismione D par RMN ^1H dans le dichlorométhane en atmosphère contrôlée. Solution à 5 mg/mL.

IX.3. Conclusion

Les tests effectués antérieurement montraient déjà l'instabilité des vismiones naturelles dans le DMSO (Thèse J-B. Gallé). Nos résultats confirment cette tendance mais montrent cependant qu'elles sont beaucoup plus stables dans le dichlorométhane, sous atmosphère contrôlée.

Le composé de synthèse NW018401, en plus de la très bonne activité mesurée précédemment, se montre beaucoup plus stable que les vismiones naturelles dans le DMSO. Ces caractéristiques font de ce composé un excellent outil pharmacologique potentiel, efficace et facile à manier, pour investiguer le mécanisme d'action au niveau intracellulaire.

X. Etude de l'effet des vismiones sur la prénylation des protéines

X.1. Introduction

La première hypothèse envisagée concernant le mécanisme d'action des vismiones s'appuyait sur la différence d'activités observées sur amastigotes axéniques de *Leishmania* entre les vismiones et leurs métabolites (activité de l'ordre de 100 fois supérieure pour les vismiones par rapport aux anthraquinones correspondantes), ainsi que sur leur faculté à se dégrader pour donner des composés de type quinones (anthrones, anthraquinones et bianthrones). Les vismiones agiraient donc comme des prodrogues permettant de délivrer les formes actives sur le site d'action.

Les quinones sont en effet connues pour participer à des phénomènes oxydatifs au niveau biologique¹³⁷⁻¹³⁹. La principale caractéristique des quinones vient de leurs propriétés rédox qui sont liées à la formation de systèmes aromatiques. Le mécanisme de la cytotoxicité des quinones fait intervenir une augmentation du stress oxydant en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent réagir directement avec les acides nucléiques, les lipides et les protéines conduisant à des dommages cellulaires qui provoquent la mort du parasite^{64,140}. Des composés quinoniques ayant montré des activités leishmanicides comme la mitomycine C, la doxorubicine¹⁴¹, la plombagine et la 2-méthoxy-1,4-naphtoquinone¹⁴² exercent leur activité en inhibant la trypanothione réductase, une enzyme responsable du maintien de l'équilibre rédox intracellulaire chez les trypanosomatidés. Le maintien de cet équilibre rédox chez les parasites est très important pour leur survie car ils ne doivent pas uniquement éliminer les métabolites toxiques qu'ils produisent mais aussi lutter contre le stress oxydant exercé sur eux par le système immunitaire de l'hôte⁶⁵.

Les études de stabilité entreprises semblent en revanche montrer une corrélation entre l'activité et la stabilité des vismiones, ce qui nous oriente vers un mécanisme d'interaction entre un ligand et sa cible. De plus, les molécules les plus actives portent un groupement prényle ou géranyle. Or la prénylation des protéines joue un rôle clé dans la survie du parasite⁶⁶ (**Figure 49**). Les protéines de la famille RAS qui portent un motif CAAX vont se voir greffer un groupement géranylgeranyl diphosphate (GGPP) ou farnésyldiphosphate (FPP) par une prényltransférase (farnésyltransférase ou géranylgeranyltransférase). Les protéines ainsi prénylées vont être adressées vers une membrane à laquelle elles vont s'ancrer, participant à sa structure.

Chez les tripanosomatides la farnésylation semble dominante¹⁴³. De plus, la farnésyltransférase du parasite est suffisamment différente de celle présente chez les mammifères pour qu'il soit possible de développer des inhibiteurs sélectifs de la forme parasitaire¹⁴³.

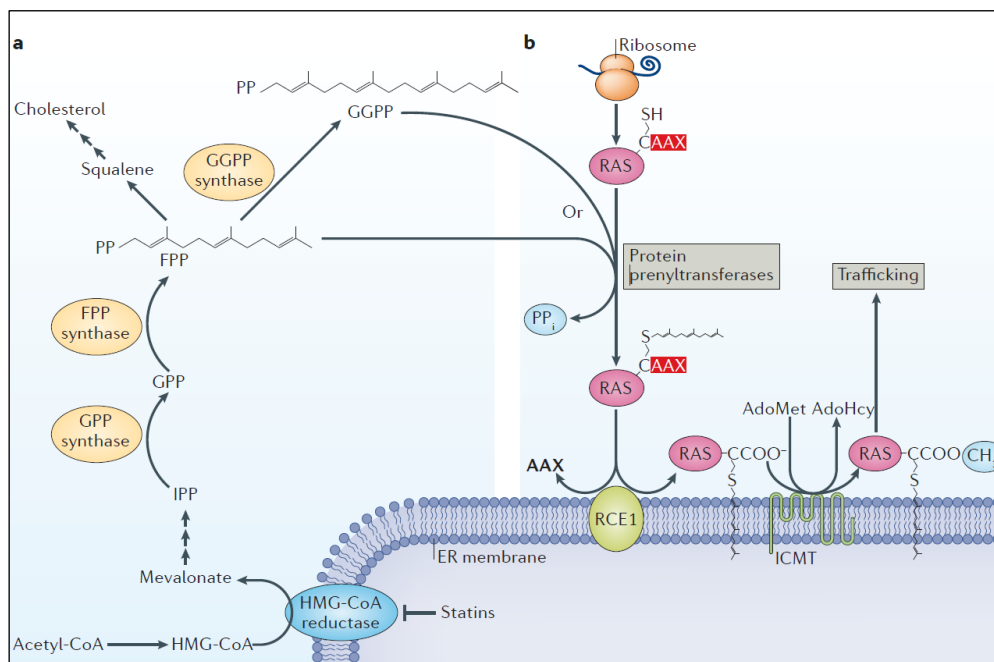


Figure 49 : métabolisme des isoprénoïdes et prénylation des protéines CAAX⁶⁶.

De nombreux composés prénylés ont été décrits dans la littérature comme possédant une activité anti-*Leishmania*. Socolsky *et al.* ont isolé à partir d'une fougère (*Elaphoglossum lindbergii*) des acylphloroglucinols prénylés (273, 274, 275)¹⁴⁴ (Figure 50). Ceux-ci présentent une activité de l'ordre de la dizaine de μM sur des promastigotes de *L. brasiliensis* et *L. amazonensis*. On peut d'ailleurs noter une certaine ressemblance dans l'organisation spatiale de ces composés avec les vismiones : ils sont constitués d'une partie aromatique prénylée et hydroxylée, et une partie comportant une cyclohexénone et une chaîne acylée, avec une partie centrale ouverte contrairement au second cycle aromatique des vismiones.

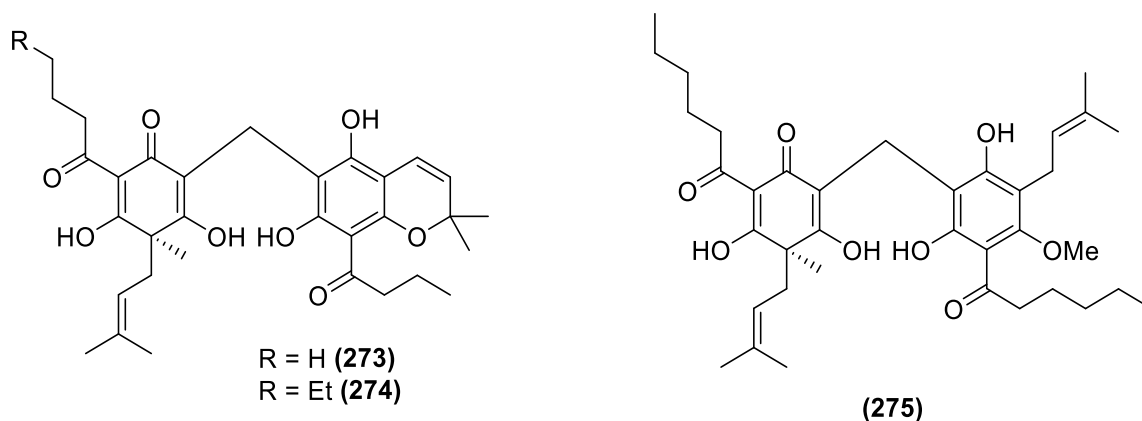


Figure 50. acylphloroglucinols issus de *Elaphoglossum lindbergii*.

Un isoflavane prénylé (276) isolé de *Smirnowia iranica* par Sairafianpour *et al.* a également montré une activité de l'ordre du micromolaire sur promastigotes de *L. donovani* et *L. infantum*, et des activités de l'ordre de la dizaine de μM sur amastigotes¹⁴⁵ (Figure 51).

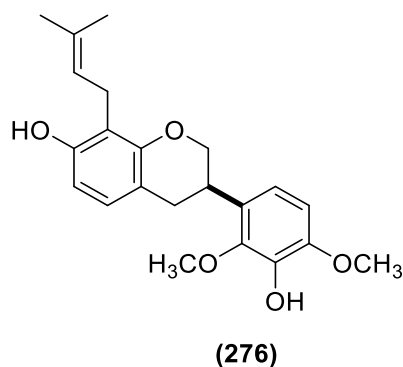


Figure 51. Isoflavane prénylé isolé de *Smirnowia iranica*.

Maciel-Rezende *et al.* ont quant à eux synthétisé une série de benzophénones alkylées (277, 278)¹⁴⁶ (Figure 52). Parmi eux, les trois composés prénylés testés ont présenté des activités de l'ordre du micromolaire sur promastigotes de *L. amazonensis*. Une autre benzophénone (279), isolée à partir de *Platonia insignis* par Costa *et al.*, a montré une activité du même ordre de grandeur sur *L. amazonensis* également¹⁴⁷.

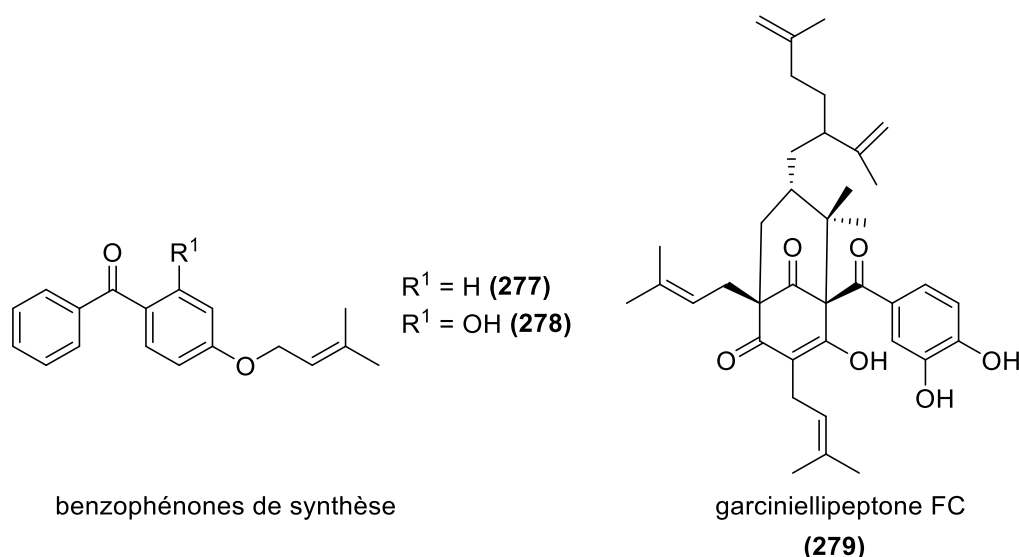


Figure 52. Benzophénones de synthèse et issue de *Platonia insignis* présentant une activité anti-*Leishmania*.

Enfin, quatre chalcones (**280**, **281**, **282**, **283**) portant des groupements prénylés ont été synthétisées par Passalacqua *et al.*¹⁴⁸ (Figure 53). Celles-ci présentent également des activités de l'ordre du micromolaire sur promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis* et *L. infantum*.

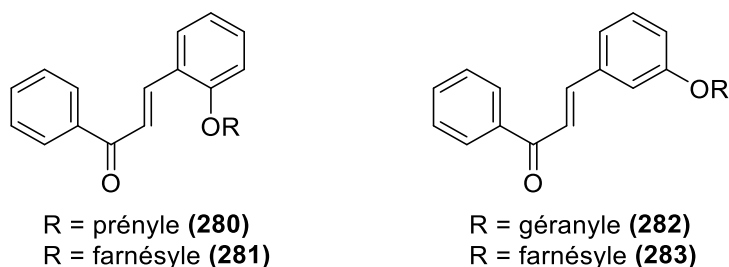


Figure 53. Structure des chalcones prénylées de synthèse.

D'autre part, plusieurs publications décrivent la prénylation des protéines comme étant un mécanisme essentiel à la survie de *Leishmania*. Bhardwaj *et al.* montrent en effet que l'infectiosité et la croissance du parasite décroissent fortement lorsque le gène codant pour la CAAX prényle protéase II, une enzyme jouant un rôle essentiel dans la voie de prénylation, est rendu silencieux⁴⁴. Kaur *et al.* ont quant à eux utilisé le monastrol, un anticancéreux, pour induire la formation de protéines Rap1A non prénylées au niveau intracellulaire chez

*Leishmania*¹⁴⁹. De ceci a résulté le blocage du cycle cellulaire en phase G1 des cellules parasitaires.

La littérature fait état de dérivés quinoniques prénylés interagissant avec la voie de prénylation chez *Leishmania*. Ho *et al.* ont montré que l'antroquinolol empêchait l'activation des protéines RAS, qui jouent un rôle important dans les modifications post-traductionnelles, en se fixant sur les enzymes farnésyltransférase et géranylgeranyltransférase-I¹⁵⁰. Cadelis *et al.* ont également montré que la tecomaquinone I (**14**) était capable d'inhiber la farnésyltransférase chez *T. cruzi* et *P. falciparum* avec des CI₅₀ submicromolaires¹⁵¹ (**Figure 54**).

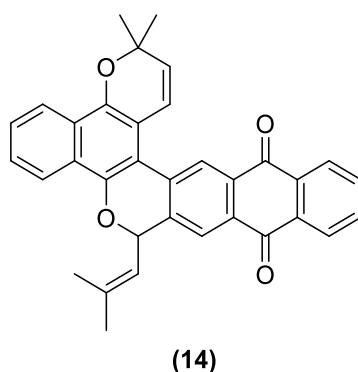


Figure 54. Structure de la tecomaquinone I.

X.2. Etude de l'effet des vismiones sur la prénylation des protéines dans un modèle végétal BY-2

Au vu de la littérature, on peut émettre l'hypothèse que les vismiones qui sont prénylées puissent interférer dans la voie de prénylation des protéines chez *Leishmania*. L'étude du mécanisme d'action des vismiones a donc débuté par une première approche sur un modèle végétal exprimant un système de prénylation de protéines à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) dans le cadre de la thèse de Quentin Chevalier. Ce modèle végétal repose sur l'utilisation de cellules de tabac BY-2 transformées exprimant une protéine senseur GFP-bd-CAAX placée sous promoteur inductible à la Dexaméthasone¹⁵² (**Figure 55**). La protéine possède un domaine basique (bd) d'une protéine prénylable de la famille des calmodulines¹⁵³ et un motif CVIL pour la geranylgeranylation. Ceci permet d'étudier au

microscope confocal l'impact des vismiones sur la voie plastidiale de biosynthèse des isoprénoïdes via la voie du MEP exprimée chez *Leishmania*¹⁵⁴.

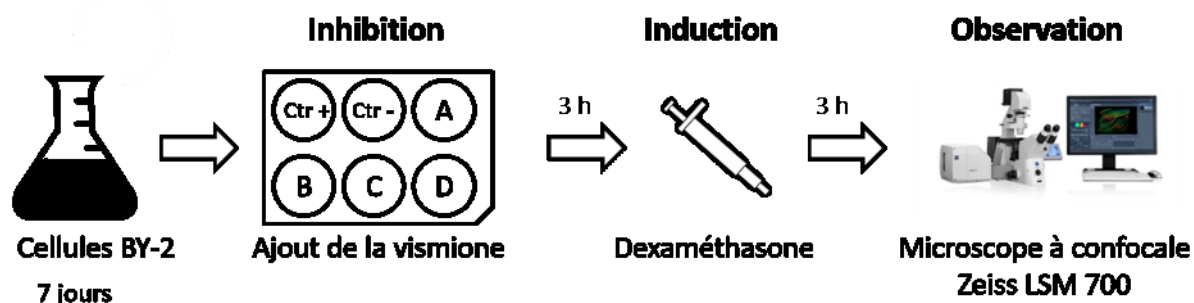


Figure 55. Protocole du test d'inhibition de la prénylation des protéines sur cellules BY-2::CVIL.

Dans le contrôle, la prénylation se déroule normalement (**Figure 56**), après induction de la GFP on observe un signal membranaire du senseur indiquant la bonne prénylation des protéines. Un autre contrôle est effectué en présence de fosmidomycine, qui inhibe la DXP réductoisomérase, une enzyme intervenant dans la voie plastidiale du MEP permettant la synthèse de précurseurs du géranylgeranyl diphosphate chez les plantes et certains apicomplexés. Dans ce cas, la fluorescence se retrouve dans le noyau : les protéines n'ont pas été prénylées et ne sont donc pas adressées vers la membrane.

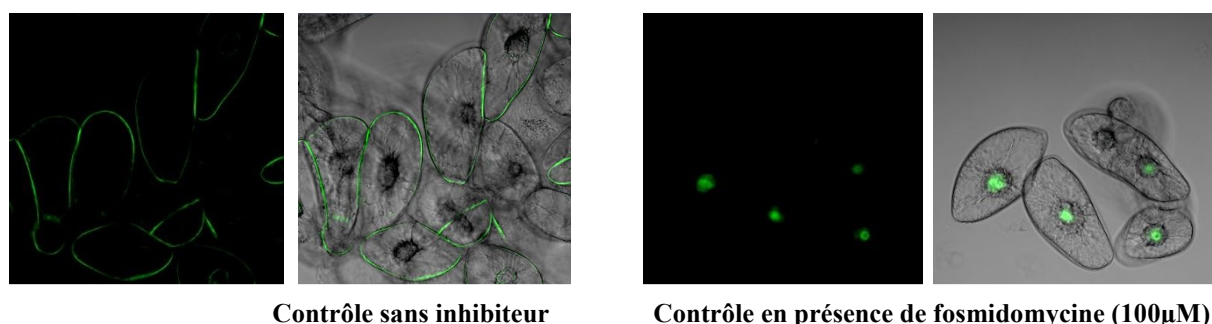
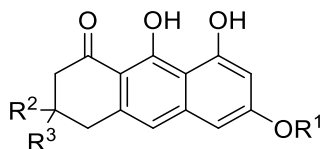


Figure 56. Contrôles BY-2::CVIL en absence et en présence de 100 µM de Fosmidomycine, un inhibiteur de la DXP réductoisomérase.

L'expérience a ensuite été réalisée en remplaçant la fosmidomycine par les dihydroanthracénones de synthèse ou les vismiones naturelles (**Tableau 21**)

Tableau 21. Liste des composés testés dans le modèle végétal BY-2.



dihydroanthracénones synthétiques	R ¹	R ²	R ³	<i>L. donovani</i> amastigotes axéniques CI ₅₀ (μM)
NW 211 01 (223)	H	OH	H	11,58
NW 184 01 (226)	Pre	OH	H	0,01
NW 0182 01 (224)	Me	OH	H	1,01
NW 0129 01 (203)	Me	CH ₃	CH ₃	0,51
NW 0186 01 (228)	PEG3	OH	H	2,8
NW 0124 01 (213)	Pre	CH ₃	CH ₃	0,34
NW 0188 01 (225)	Ger	OH	H	0,072
NW 0104 01 (214)	Pre	H	H	0,42
Vismiones naturelles				
VH (2)	Pre	OAc	CH ₃	0,06
VD (4)	Ger	OH	CH ₃	0,084
AVD (3)	Ger	OAc	CH ₃	0,09

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. donovani* (n = 2) par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine. Référence : miltéfosine CI₅₀ = 114 nM.

Lorsque les cellules sont incubées avec la vismione D (VD, 4), un phénotype intermédiaire est observé (**Figure 57**). A la concentration de 100 μM on retrouve de la fluorescence dans le noyau (6% des cellules) et les membranes (40% des cellules), mais la majorité de la fluorescence se trouve dans le cytosol sous forme d'amas de points appelés « dots » (54% des cellules). Ce phénomène est encore plus marqué avec la vismione H (VH, 2), pour laquelle 88% des cellules présentent ces « dots ». En revanche, en présence d'acétylvismione D (AVD, 3) à la concentration de 50 μM seuls 10% des cellules présentent

des « dots », alors que 90% des cellules présentent une fluorescence membranaire et 3 % une fluorescence nucléaire. Des résultats équivalents à l'AVD sont observés pour la VD à 50 μM .

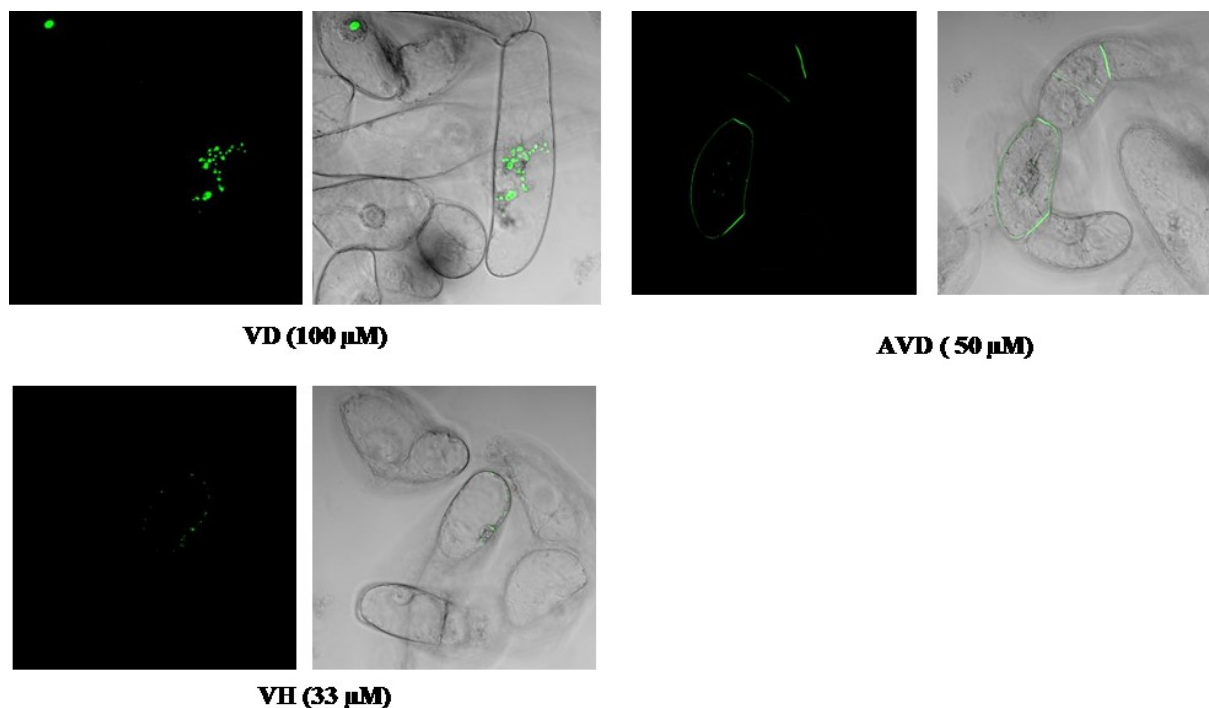


Figure 57. Phénotypes observés dans le test d'inhibition de prénylation des cellules BY-2::CVIL traités avec des vismions naturelles à 33, 50 et 100 μM .

Les cellules incubées avec les dihydroanthracénones de synthèse présentent toutes le même phénotype : la majorité (83-92%) de la fluorescence est membranaire, tandis qu'1 à 2% de la fluorescence est retrouvée dans le noyau et 1 à 10% sous forme de « dots » cytosoliques (Figure 58). Les cellules incubées avec la dihydroanthracénone NW018601 (**228**) portant un groupement triéthylèneglycol (PEG3) n'ont quant à elles présenté aucune fluorescence.

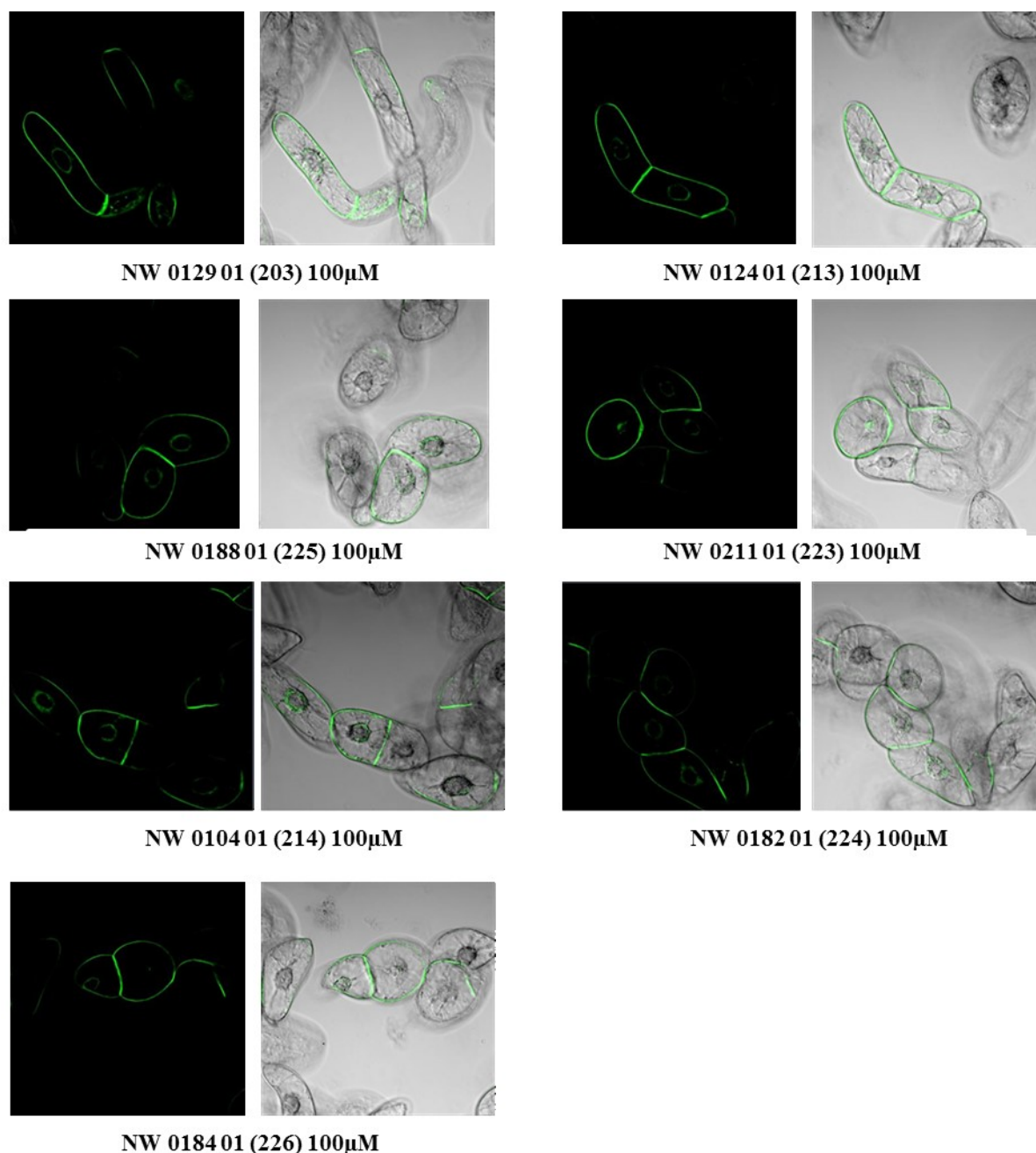


Figure 58. Observation au microscope confocal de cellules BY-2::CVIL après incubation avec les dihydroanthracénones de synthèse.

Nous observons un signal membranaire de la GFP-bd-CVIL, les composés testés ne semblent donc pas agir sur la prénylation des protéines. En revanche, la VH, la VD et l'AVD semblent jouer un rôle important dans l'apparition des « dots » observés. Ces trois vismiones présentent par ailleurs une activité anti-*Leishmania* très bonne avec des valeurs de CI_{50} submicromolaires du même ordre de grandeur sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Les dihydroanthracénones synthétiques entraînent toutes une légère modification du phénotype

observé, mais présentent des activités anti-*Leishmania* très différentes. Le composé NW018401 (**226**) entraîne un phénotype de fluorescence membranaire dans 90% des cas, alors qu'il présente une valeur de CI_{50} de 10 nM sur amastigotes axéniques de *Leishmania donovani*, soit une activité légèrement supérieure aux vismiones naturelles testées.

Nous avons donc un phénotype spécifique des vismiones naturelles, qui ne correspond pas au phénotype des inhibiteurs de la prénylation. Plusieurs questions se sont posées :

- La fluorescence observée est-elle due à la GFP ?
- Quelles sont les structures marquées ?
- S'il s'agit de la GFP, les phénotypes observés sont-ils le résultat d'une perturbation de mécanismes en amont de la prénylation ou en aval de la traduction, et donc d'une éventuelle cytotoxicité ?

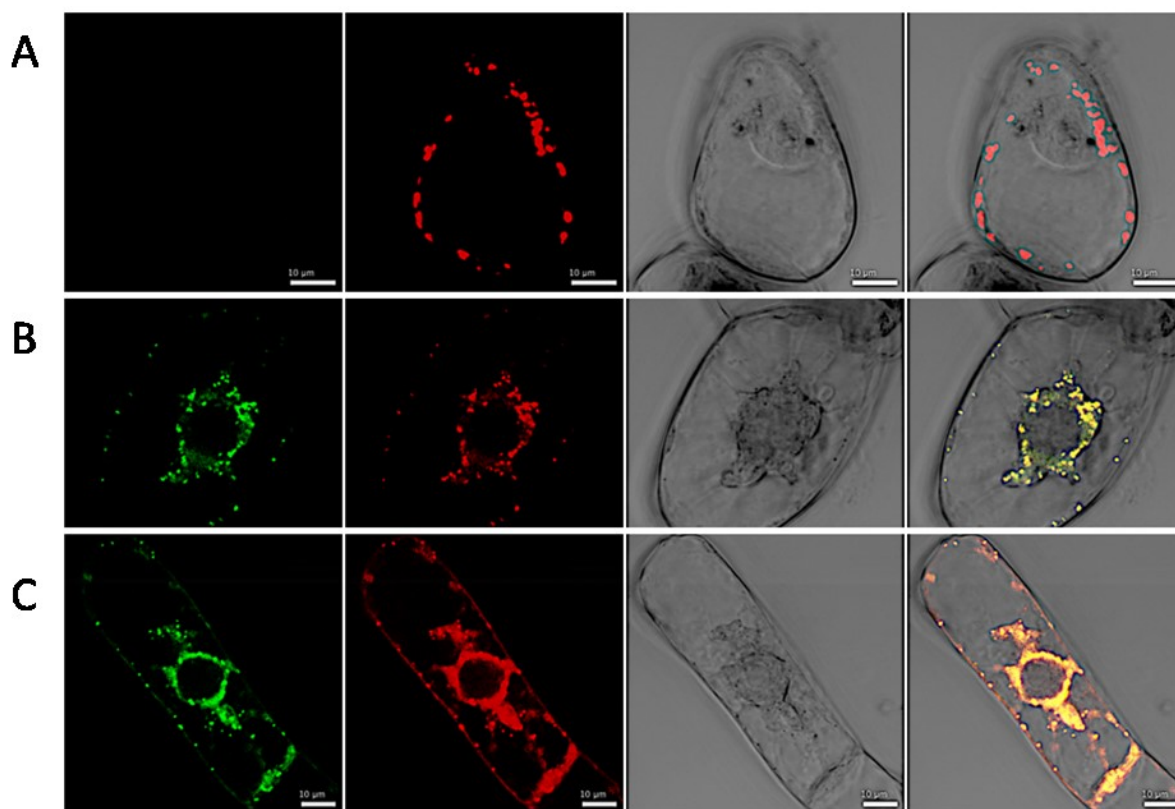


Figure 59. Observation de cellules BY-2 WT transformées transitoirement pour exprimer des protéines senseur des plastides et du Golgi. (A) Contrôle exprimant PT5-RFP marqueur des plastides. (B) Cellule transformée traitée avec 30 μ M de VH, mais n'exprimant pas la protéine PT5-RFP. (C) Cellules transformée avec le GMII-RFP et traitées avec 30 μ M de VH.

Des cellules BY-2 ont été transformées par biolistique pour exprimer transitoirement des protéines de fusion RFP (Red Fluorescent Protein) dans différents compartiments cellulaires. TMBD-2 RFP a été utilisée pour marquer le réticulum endoplasmique (RE)¹⁵⁵, α M-II-RFP le Golgi, CVIL-RFP la membrane¹⁵², SVIL-RFP le noyau¹⁵⁶, PT5-RFP les plastides¹⁵⁷, IVDH-RFP les mitochondries¹⁵⁸. Les cellules ont été incubées ou non avec la vismione H puis observées au microscope confocal. Dans les contrôles, une fluorescence rouge correspondant à la RFP a été observée (**Figure 59**). Dans les cellules incubées avec de la vismione H, quelques-unes expriment les protéines de fusion RFP avec des dots. En revanche, indépendamment des protéines de fusion RFP utilisées, toutes les cellules traitées présentent le même phénotype « dots » avec un signal jaune correspondant à la superposition du signal de fluorescence des canaux vert et rouge (**Figure 59**).

La fluorescence des cellules traitées à la vismione H est observable aussi bien avec les senseurs RFP qu'avec le senseur GFP, elle est donc indépendante de ces chromophores. En revanche, le spectre de fluorescence émis par les cellules traitées à une émission entre 500-600 nm et 600-700 nm. **Ces premières expériences mettent en évidence un effet propre de la vismione H sur les cellules BY-2**, mais la fluorescence observée est confondue avec les marqueurs utilisés limitant la caractérisation des structures observées dans les conditions d'observations sélectionnés.

En outre, ces résultats suggèrent de nouvelles hypothèses sur l'origine de la fluorescence spécifique aux vismiones :

- Correspond-elle à des composés synthétisés par les cellules BY-2 en réponse aux vismiones ou directement aux vismiones ?
- Auquel-cas, peut-on envisager de transposer ce modèle, avec les vismiones comme marqueurs, pour étudier la fluorescence observée directement chez *Leishmania* ?

Pour répondre à l'ensemble de ces questions une nouvelle méthode d'observation par spectrofluorimétrie et imagerie spectrale a été mise au point par Quentin Chevalier (IBMP) pour caractériser la fluorescence spécifique aux vismiones et la distinguer des fluorochromes utilisés dans les systèmes de marquage classiques.

X.3. Conclusion

Notre première hypothèse concernant l'inhibition au niveau de la prénylation des protéines par les vismiones a été invalidée par les résultats obtenus, du moins dans le modèle végétal employé. Cependant, les vismiones pourraient avoir un effet en amont de la prénylation des protéines, comme influencer l'expression ou la traduction. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. L'extraction des protéines de cellules traitées et non traitées avec les vismiones, puis l'analyse sur gel SDS-PAGE, puis Western blot contre la protéine senseur permettrait de vérifier si le contenu en protéine et GFP-bd-CVIL spécifiquement est différent.

XI. Etude des propriétés de fluorescence des vismiones

XI.1. Introduction

Les propriétés de fluorescence de l'acétylvismione D dans le méthanol avaient déjà été étudiées par J.-B. Gallé dans le cadre de ses travaux de thèse⁵.

Le rendement quantique de fluorescence de l'AVD avait été déterminé en utilisant le sulfate de quinine comme standard. Celui-ci montre en effet des maxima d'absorption et d'émission proches de ceux de l'AVD. Cette expérience avait permis de déterminer un rendement quantique de fluorescence pour l'acétylvismione D égal à $\phi_f = 2\%$, trop faible pour permettre d'utiliser l'acétylvismione D comme sonde fluorescente pour étudier son mécanisme d'action *in situ*. Cependant, les nouveaux résultats décrits dans le précédent paragraphe nous ont poussé à réexplorer les propriétés de fluorescence des vismiones lors d'un test de viabilité cellulaire, non pas en solution mais dans un environnement membranaire.

XI.2. Test de viabilité cellulaire en présence de vismione H

Afin d'évaluer la toxicité des vismiones sur les cellules, une méthode impliquant le couple FDA/IP a été utilisée. Le spectre de cellules traitées au di-acétate de fluorescéine (FDA)/iodure de propidium (IP) a été comparé à celui de cellules traitées avec 30 μM de VH. Les marqueurs utilisés peuvent être excités à 488 nm, la FDA pénètre dans les cellules en vie pour être hydrolysé par une estérase en fluoréscéine ($E_m \lambda_{\text{max}}$: 520 nm) qui marque le noyau ainsi que le cytosol. L'IP est un agent intercalant qui pénètre dans les cellules mortes ou en apoptose en marquant le noyau ($E_m \lambda_{\text{max}}$: 617 nm). Les cellules n'ont pas été induites et donc la fluorescence observée n'est pas celle de la GFP. On observe que la fluorescence émise par la FDA a un maximum dans la section 520 nm (499-508 nm) et émet un signal nucléaire et cytosolique de 499 à 578 nm (**Figure 60, Figure 62**). Les signaux émis par les cellules traitées à la vismione H sont différents (**Figure 61, Figure 62**). La fluorescence observée marque des dots intenses, certains présentant une composante $E_m \lambda_{\text{max}}$: 584 nm (578-587 nm), d'autres une composante $E_m \lambda_{\text{max}}$: 548 nm (542-551 nm). On note qu'il y a souvent un co-marquage des deux composantes. Un marquage plus diffus similaire à la composante 1 est observé autour du noyau et le long de la membrane plasmique (Mb). Le marquage diffus pourrait correspondre au cytosol (Cy) ou au reticulum endoplasmique (RE) et les « dots » à des vésicules.

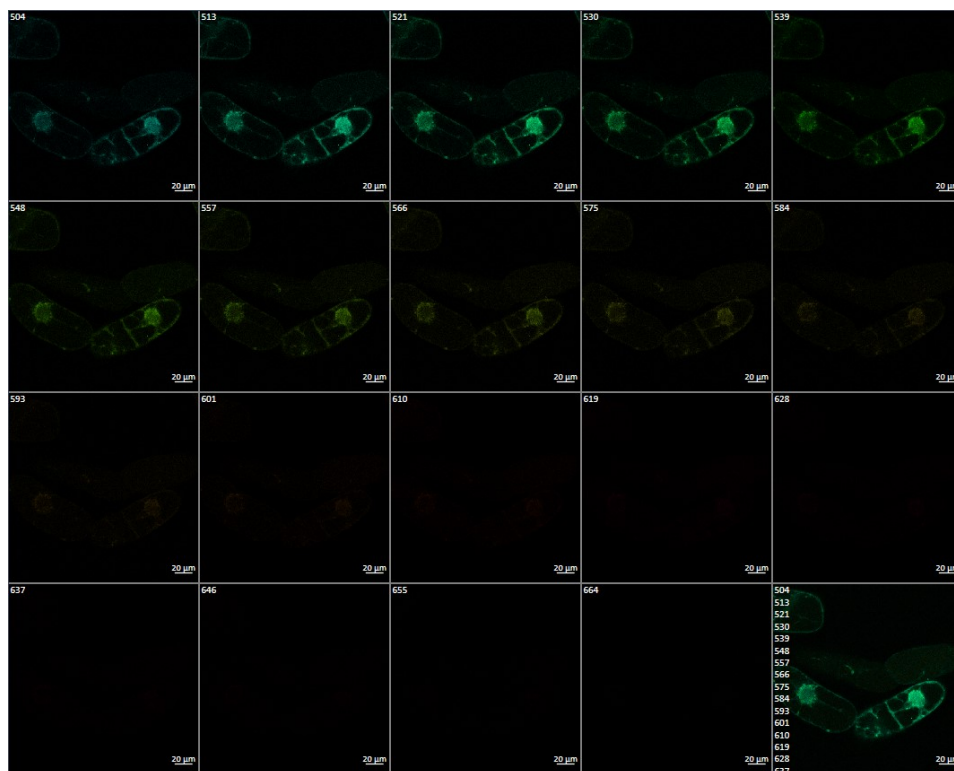


Figure 60. Vue en mosaïque entre 499 et 668 nm d'une observation par imagerie spectrale de cellules BY-2::CVIL non induites et marquées au FDA. Chaque case correspond à une section de 9 nm, la case dans le coin en bas à droite correspond à la vue lambda.

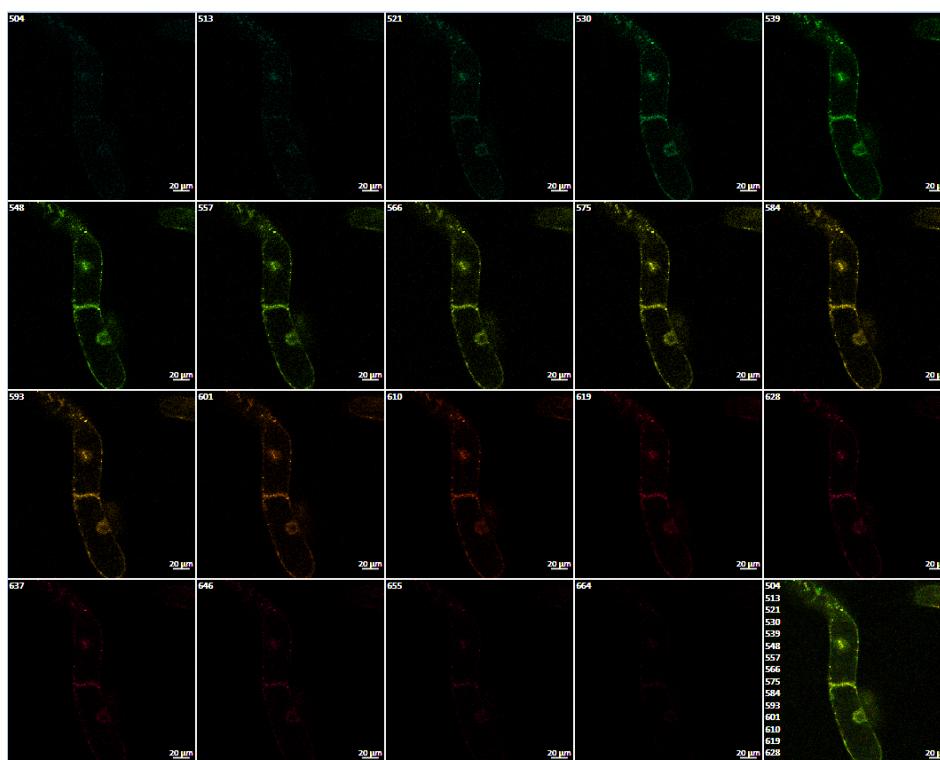


Figure 61. Vue en mosaïque entre 499 et 668 nm d'une observation par imagerie spectrale de cellules BY-2::CVIL non induites traitées avec 30 μM de VH. Chaque case correspond à une section de 9 nm, la case dans le coin en bas à droite correspond à la vue lambda.

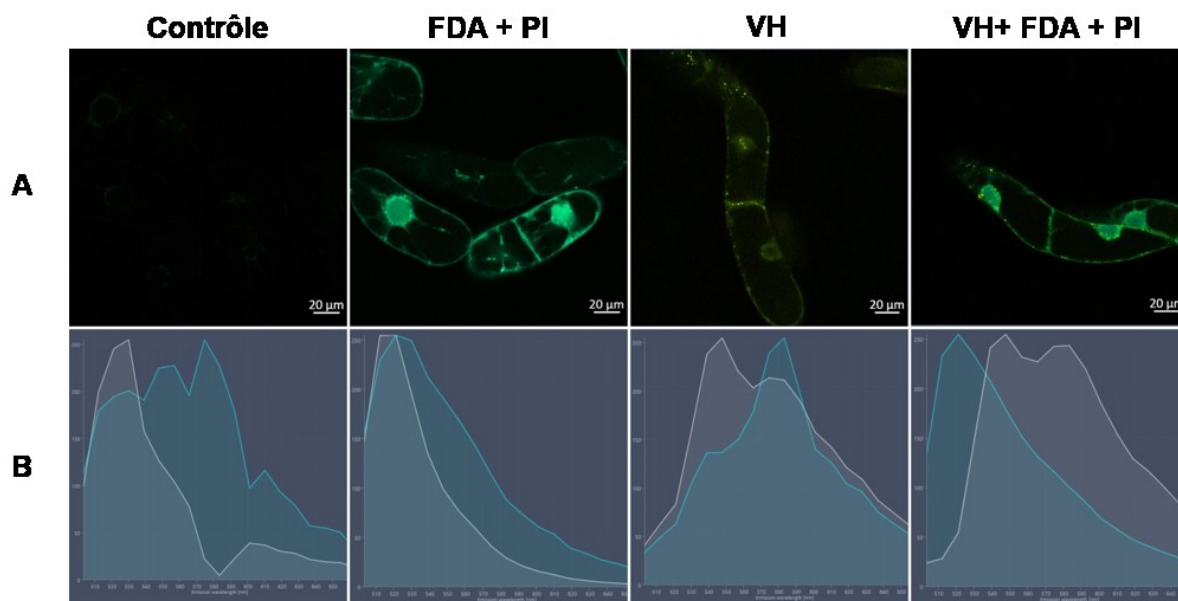


Figure 62. $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ à 488/499-668 nm, (A) vue lambda, (B) spectres des composantes ACE de cellules BY-2::CVIL non induites, marquées au FDA + IP (12,5 nM), traitées avec 30 μ M de VH ou avec 30 μ M de VH et marquées au FDA + IP (12,5 nM). En blanc le spectre de la composante 1, en bleu le spectre de la composante 2. (PI = iodure de propyidium)

La gamme de fluorescence émise par les cellules traitées à la vismione H (VH) s'étend de 525 nm à 641 nm. Malgré un chevauchement partiel des signaux de fluorescence de FDA et de la VH, les λ_{max} sont suffisamment éloignées pour les distinguer et associer les composantes aux traitements. Un test de viabilité a été réalisé avec des cellules traitées avec la VH à 15, 30 et 100 μ M, puis observées après ajout de FDA/IP à 12,5 nM.

Dans ces conditions, il est possible d'observer à $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 488/499-668 nm les signaux de FDA/IP et VH sans saturation (**Figure 62**). On note que l'intensité de la fluorescence de FDA décroît et disparaît en 15 minutes (fading) durant l'excitation, tandis que la fluorescence de la VH persiste après 15 min et a tendance à s'intensifier dans les premières minutes. L'augmentation de concentration en VH semble augmenter le nombre de dots observés et les cellules qui présentent des « signaux VH » sont généralement en vie : moins de 3% de cellules traitées avec 100 μ M de VH sont marquées à l'IP. **Ainsi, la VH ne semble pas avoir une cytotoxicité importante sur les cellules BY-2.**

D'après les résultats obtenus pour les tests d'inhibition de prénylation avec les vismiones naturelles, des phénotypes avec « dots » d'un diamètre moyen de 0,2-0,5 μ m et < 2 μ m ont été observé pour la VH, l'acétylvismione D (AVD) et la vismione D (VD) (**Figure 57**). Des expériences de spectrofluorimétrie et des observations par imagerie spectrale de

cellules traitées ou non ont été réalisées avec l'ensemble de ces composés et des dihydroanthracénones de synthèse.

XI.3. Spectrofluorimétrie

Les propriétés de fluorescence intrinsèques des molécules ont été évaluées par spectrofluorimétrie. (Le signal du faisceau d'excitation n'a pu être supprimé, il est visible par une raie de 482 à 492 nm lors de la seconde mesure (**Figure 63**).

La série de mesure 1 a montré qu'à 200 μ M seules la VH et l'AVD émettent un signal de fluorescence suffisant (**Figure 63**). Les spectres montrent deux λ_{\max} à 522, 548 nm pour la VH et 514, 542 nm pour l'AVD. Le signal de la VH est plus important que celui de l'AVD. Des spectres obtenus après 24 h (non représentés), montrent que l'intensité est diminuée et qu'un déplacement du spectre à 539, 567 nm pour la VH et 544, 564 nm pour l'AVD à lieu. La VD, qui n'est pas visible à 488 nm avant 24 h montre un signal avec un λ_{\max} à 544 nm. La gamme de λ_{Em} des spectres observés à $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm est comprise entre 486 et 603 nm avant 24 h et 522 et 613 nm après. Ainsi, les données de spectrofluorimétrie montrent des résultats similaires à ceux obtenus par imagerie spectrale, le groupement acétyle présent sur la position 6 de la VH et de l'AVD semble leur conférer des propriétés de fluorescence particulières. Un léger décalage est observé par rapport aux maxima observés. Néanmoins, les matrices sont différentes entre les analyses et la résolution du signal en imagerie spectrale n'est qu'à 9 nm.

Les séries de mesure 2 et 3 montrent que tous les composés émettent un signal à 405 et 458 nm, les intensités sont supérieures à celles obtenues à 488 nm pour chacun des composés testés. Le signal émis à $\lambda_{\text{Ex}} 458$ nm est environ 10 fois supérieur à celui obtenu à $\lambda_{\text{Ex}} 488$ nm et la $\lambda_{\text{Ex}} 405$ nm 100 fois supérieur à $\lambda_{\text{Ex}} 488$ nm. Après 24h, les spectres à $\lambda_{\text{Ex}} 405, 458$ nm de la VH et de l'AVD ne montrent qu'un faible signal tandis que la VD, le composé NW211 (**223**) et plus particulièrement le composé NW0184 01 (**226**) semblent conserver leur signal. Le groupement acétyle semble déstabiliser le composé vis-à-vis de la fonction hydroxyle. Ces résultats ont été confirmés par imagerie spectrale.

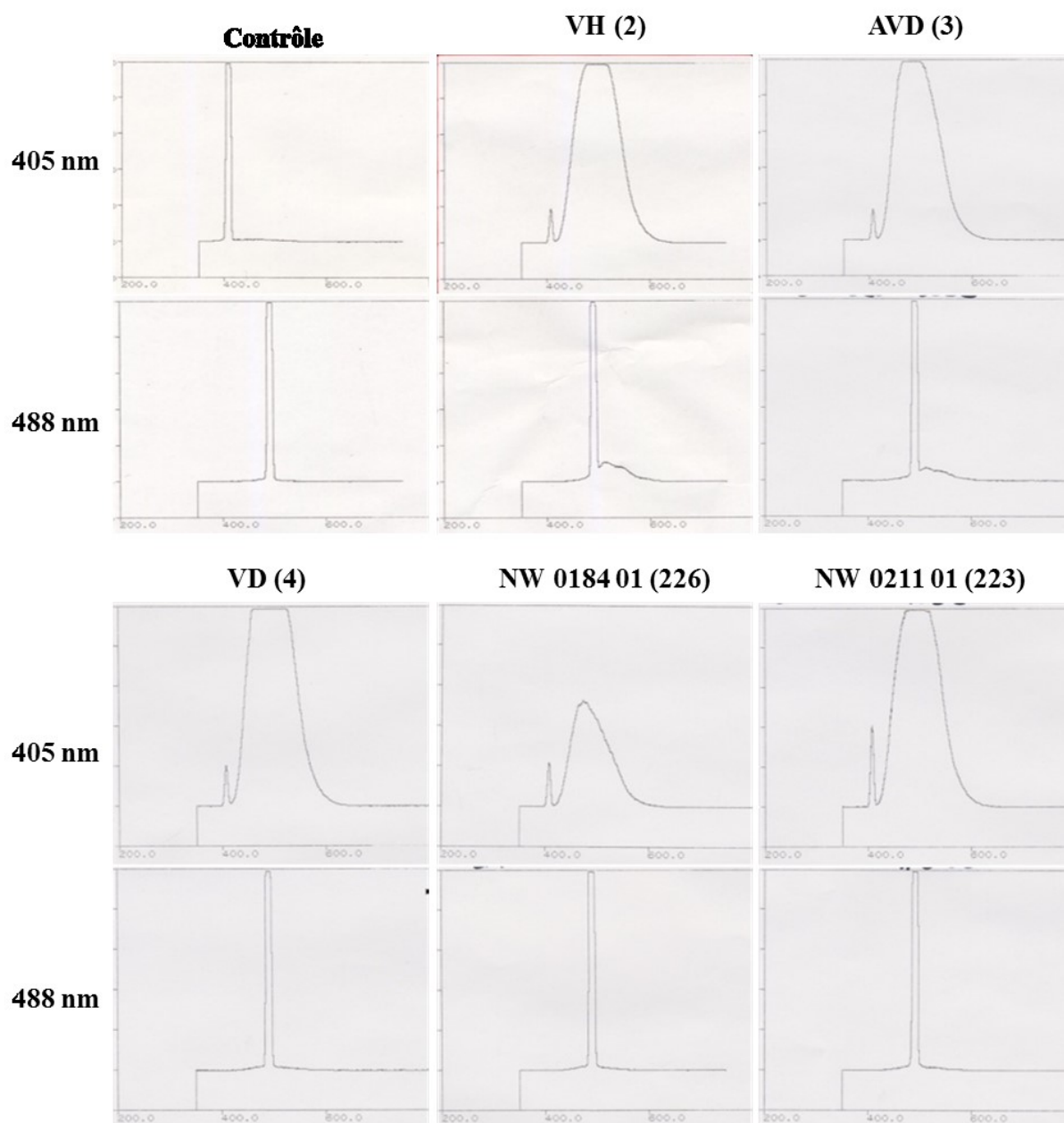


Figure 63. Spectres (Em/intensité) des vismiones et dihydroanthracénones de synthèse testées à 200 μM dans le DMSO. Au-dessus, λ_{EX} 405 nm et λ_{Em} 350-750 nm. En dessous, λ_{EX} 488 nm et un balayage λ_{Em} 350-750 nm. La raie présente dans chacun des spectres correspond au signal d'excitation.

XI.4. Visualisation de la fluorescence des vismiones et analogue synthétique par imagerie spectrale

Des cellules BY-2 ::CVIL non induites ont été traitées avec les différents composés à 30 μM pour les observations à 488 nm et 50 μM pour des observations à $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{Em}}$ à 405/410-668 nm. Les cellules ont été observées 24 h après traitements.

Les observations réalisées à $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 488/499-668 nm montrent que l'ensembles des vismiones émettent un signal de fluorescence avec des spectres particuliers contrairement aux cellules non traitées, qui émettent uniquement des signaux d'autofluorescence (**Figure 64**).

L'intensité et le spectre de la fluorescence des cellules traitées avec 30 μ M d'AVD est similaire à celle de la VH, les deux composantes extraites du spectre montrent les mêmes λ_{max} . En revanche, le phénotype observé avec la VD est légèrement différent : l'intensité de la fluorescence est plus faible, laissant apercevoir du signal d'autofluorescence dans la composante 1 (λ_{max} : 521 nm) et un signal de type vismione dans la composante 2 (λ_{max} : 521 et 575 nm). **Ainsi, les dots observées au test d'inhibition de prénylation correspondent bien à un effet spécifique des vismiones naturelles.** Cependant les spectres obtenus ne permettent pas de les différencier rigoureusement les unes des autres. La présence de deux composantes ACE bien distinct pour VH et AVD laisse supposer qu'elles proviennent de molécules différentes.

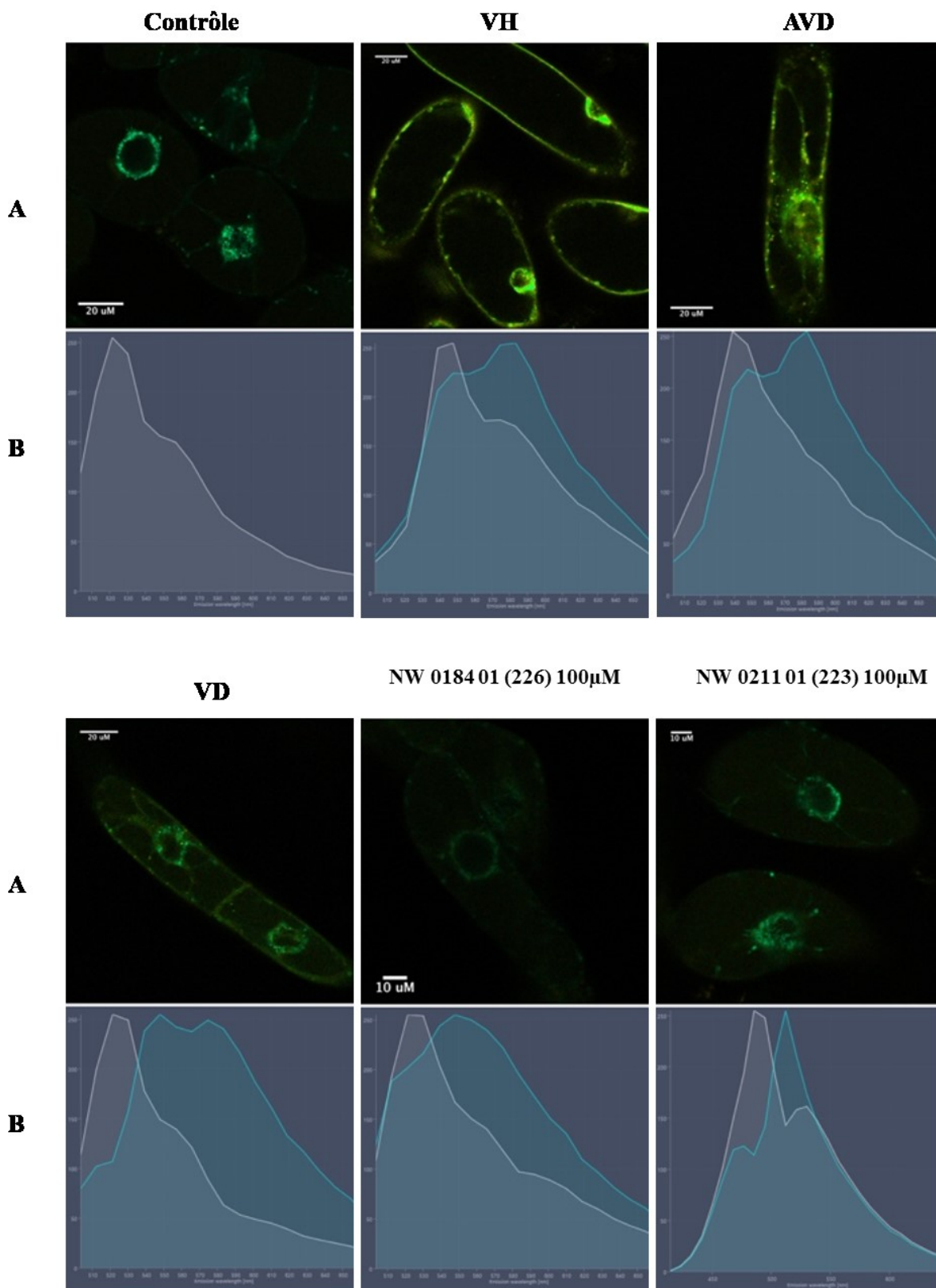


Figure 64. $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ à 488/499-668 nm, laser 2 % VH, AVD, VD et 26% Ctr, NW0184 01, NW211 (A) vue lambda, (B) spectres des composantes ACE de cellules BY-2::CVIL non induites contrôles, traitées avec 30 µM de VH, 30 µM d'AVD, 50 µM de VD, 50 µM de NW0184 01 ou 50 µM de NW211. En blanc le spectre de la composante 1, en bleu le spectre de la composante 2.

D'après les spectres, on peut supposer que la composante 2 correspond à une forme dégradée et la composante 1 à la forme initiale. Il est intéressant de constater que la mobilité et l'intensité de fluorescence avec un spectre de type vismione est plus importante dans les « dots », particulièrement pour la composante 2 (λ_{max} : 584 nm).

Le cas des dihydroanthracénones de synthèse est plus ambigu pour ce couple $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$. Les résultats sont différents, des signaux d'autofluorescence sont observés notamment autour du noyau, ils sont associés à la composante 1. Aucun « dot » n'est observé et la composante 2 à une intensité faible correspondant à un marquage diffus de la vacuole avec NW0184 01 (**226**) et NW211 (**223**).

Au couple $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$ à 405/410-668 nm, les cellules traitées par chacun des composés émettent de la fluorescence contrairement au contrôle (**Figure 65**). Les phénotypes observés diffèrent selon la localisation du signal et le spectre de fluorescence émis. Deux composantes très proches sont identifiées (λ_{max} : 520 et 547 nm) pour NW0184 01 (**226**), elles marquent le cytosol, plus faiblement la vacuole et fortement le RE visible par un signal au niveau de la membrane nucléaire. On note également la présence de structures sphériques > 2 μm marquées (non visibles sur l'acquisition), similaires à des vésicules mais plus grosses que celles observées avec la VH et l'AVD. NW211 (**223**) marque uniquement la vacuole (λ_{max} : 488 et 515 nm). Deux composantes très proches ressortent pour l'AVD (λ_{max} : 545 et 565 nm), néanmoins l'AVD semble marquer le cytosol et plus faiblement le RE. Des « dots » sont visibles et certains moins marqués par la composante 1. VH montre un phénotype similaire à l'AVD avec un léger décalage des maxima des deux composantes (λ_{max} 550 nm et 578 nm). Un phénotype intermédiaire entre NW0184 01 (**226**) et l'AVD est observé avec la VD, néanmoins le phénotype NW0184 01 (**226**) ressort plus que celui de l'AVD. La vacuole est faiblement marquée avec NW0184 01 (**226**) et la VD alors que quasiment aucun signal n'est présent avec l'AVD et la VH. Des résultats similaires avec des intensités plus faibles sont obtenus avec λ_{Ex} 458 nm.

Ainsi, la fluorescence observée en imagerie spectrale montre des résultats convergents avec ceux obtenus en spectrofluorimétrie. La fluorescence visualisée dans les cellules BY-2::CVIL non induites correspond aux vismiones et analogues synthétiques. Un couple $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$ à 405/410-668 nm permet d'observer l'évolution de ces composés dans la cellule, notamment par cinétique.

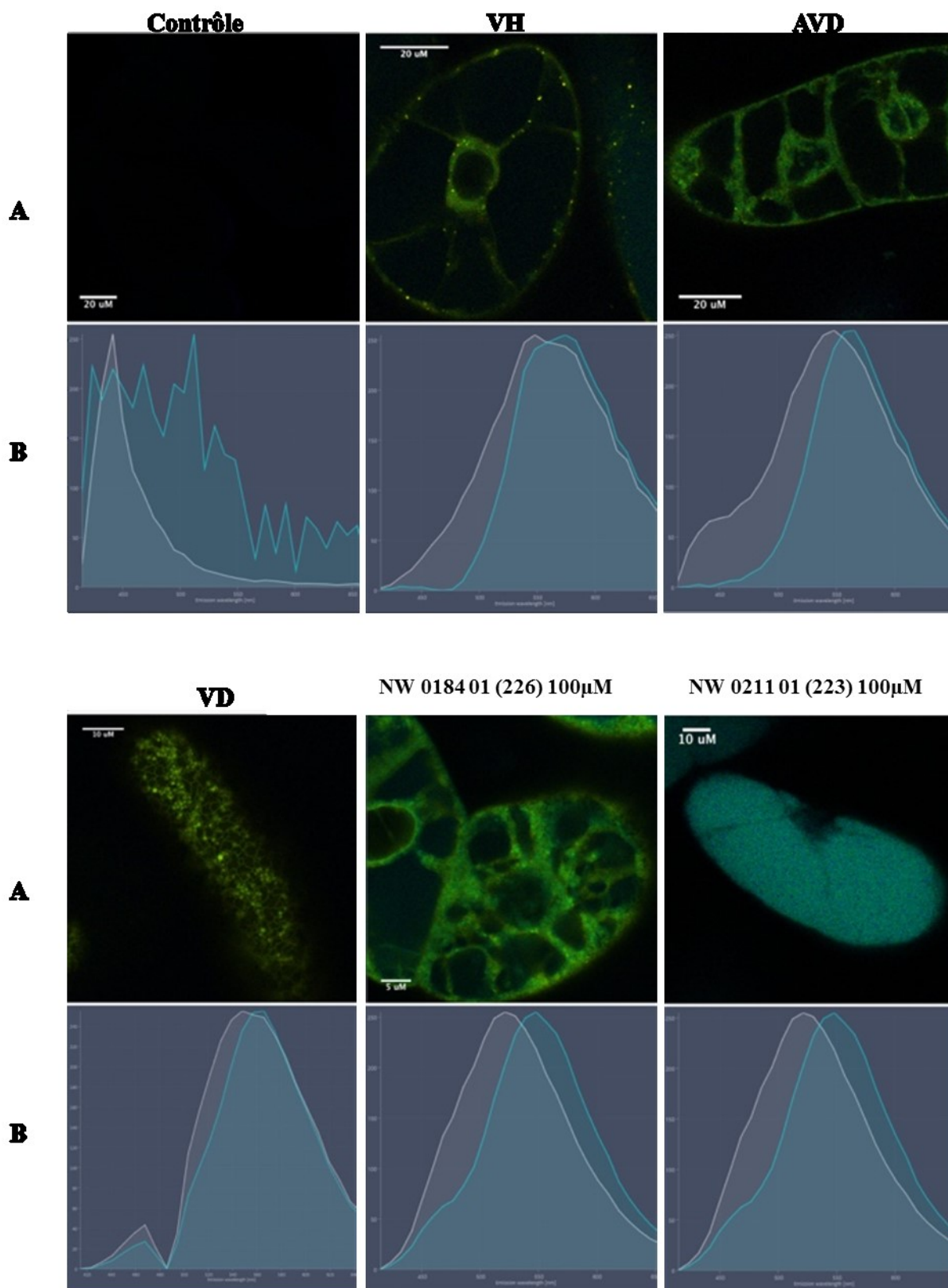


Figure 65. $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ à 405/410-668 nm, laser 0,2%, (A) Vue lambda, (B) spectres des composantes ACE de cellules BY-2::CVIL non induites contrôles, traitées avec 30 μ M de VH, 30 μ M d'AVD, 50 μ M de VD, 50 μ M de NW0184 01 ou 50 μ M de NW211. En blanc le spectre de la composante 1, en bleu le spectre de la composante 2.

Des cinétiques ont été réalisées avec des cellules BY-2::CVIL traitée par 50 μ M d'AVD et NW0184 01 (**226**), puis observée λ Ex/ λ Em à 405/410-668 nm durant 1h et 24h après (**Figure 66**). La fluorescence apparaît dans les premières secondes et diffuse dans le cytosol pour s'y accumuler. On observe une intensification de celle-ci avec un marquage du RE (enveloppe nucléaire marquée dans les 10 premières minutes). Le marquage est plus important avec NW0184 01 (**226**). Des « dots » apparaissent progressivement (RE/Cytosol) entre 0,5 et 1 h uniquement dans les cellules traitées avec l'AVD. 24 h après traitements les phénotypes décrits précédemment pour l'AVD et le composé NW0184 01 (**226**) sont visibles dans 95 % des cellules.

Aucun « dot » n'a été identifié dans les cellules traitées avec le composé NW0184 01 (**226**). Cependant, celui-ci marque la vacuole primaire avec une fluorescence similaire à NW0211 (**223**), puis des structures supérieures à 2 μ m ressemblant à un autre type de compartiment vésiculaire.

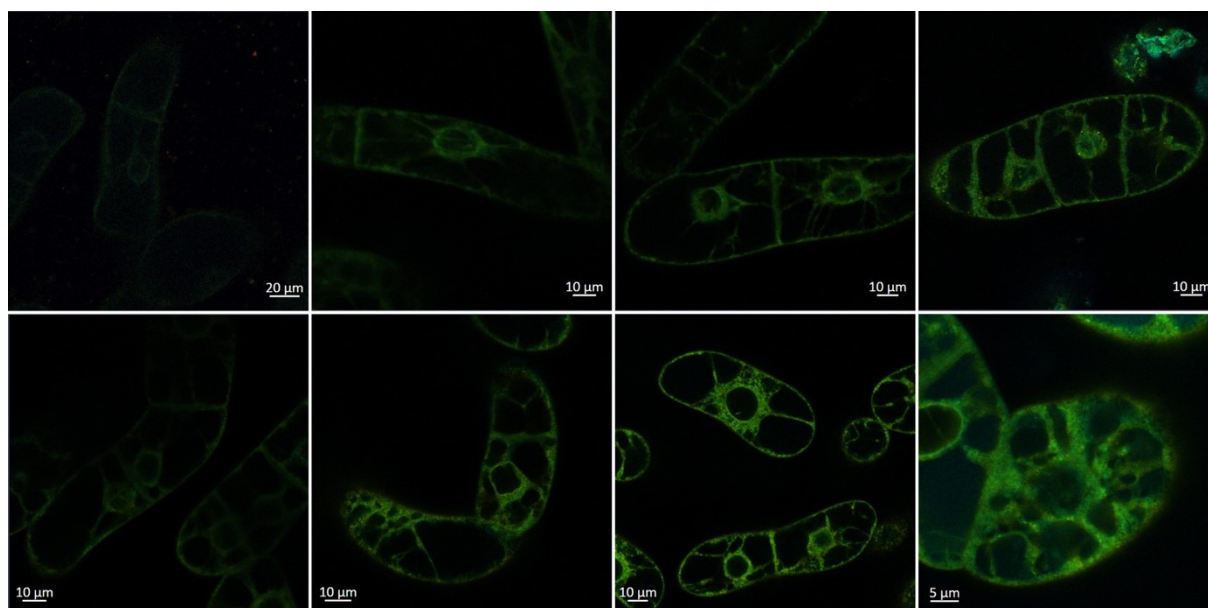


Figure 66. Vue lambda d'une cinétique de cellules BY-2::CVIL non induites traitées avec, au-dessus AVD 50 μ M, en dessous (**226**) 50 μ M. Observation λ Ex/ λ Em à 405/410-668 nm, laser 0,2 % à t0, t10, t30 min et t24 h.

XI.5. Conclusion

Cette étude a permis de caractériser par spectrofluorimétrie une fluorescence intrinsèque aux vismionones et dihydroanthracénones de synthèse et d'étudier par imagerie spectrale leur localisation *in-vivo* dans des cellules BY-2. Des expériences complémentaires ont été réalisées et ont permis d'identifier des structures marquées avec ces composés par rapport à différents marqueurs (protéines senseur, marqueur de viabilité). Des compartiments cellulaires tels que la vacuole, le RE et le Golgi sont marqués spécifiquement en fonction du composé utilisé (**Figure 67**). Des cinétiques ont montré que les composés pénètrent par diffusion dans le cytosol et marquent le RE. Les composés sans groupement prényle en position R1 sont retrouvés totalement dans la vacuole 24 h après. Les composés avec un prényle en position R1 et la fonction acétyle en R2 marquent spécifiquement des vésicules golgiennes et plus faiblement le RE 24 h après. Le spectre et l'intensité de certaines de ces vésicules suggèrent qu'elles contiennent une quantité plus importante d'une forme dégradée. Outre l'effet sur la localisation, l'analyse spectrofluorimétrique a montré que la fonction acétyle semble conférer des propriétés spectrales particulière à la VH et l'AVD, les rendant facilement observables entre 525 et 641 nm en excitant à 488 nm. L'ensemble des molécules testées émet de la fluorescence. En revanche la fluorescence de VH et AVD est drastiquement diminuée après 24 h dans le DMSO. Seules les molécules ne possédant pas de fonction acétyle conservent une fluorescence correcte dans les mêmes conditions, suggérant une stabilité plus importante. Enfin, les molécules avec un prényle en position R1 et un hydroxyle en position R2 marquent fortement le cytosol, le RE et d'autres structures sphériques de type vacuolaire. Une partie plus faible du signal est localisée dans la vacuole, il est similaire au composé sans prényle et suggère qu'il s'agit d'une forme dégradée sans ce groupement.

En corrélant ces résultats avec l'activité observée de ces composés sur *Leishmania donovani*, on peut suggérer des hypothèses sur l'implication des fonction R1, R2, R3 dans des phénomènes physiologiques liés à ces composés. Un groupement prényle en position R1 peut-avoir une importance pour l'activité et la stabilité car sa capacité à être dégradée et/ou mis dans la vacuole limite ce phénomène. L'absence d'une fonction acétyle en position R2 est favorable à la stabilité et à l'activité, il semble éviter la présence des composés dans des vésicules golgiennes. Ces vésicules sont possiblement un lieu privilégié pour la séquestration et/ou la dégradation des composés dans BY-2. Il est maintenant nécessaire de tester si l'approche est transposable au parasite traité. Ainsi, il serait intéressant d'observer si les

composés marquent des compartiments similaires dans le parasite ou le macrophage infecté. Le parasite utilise-t-il la vacuole parasitophore de manière analogue à celle des BY-2 ?

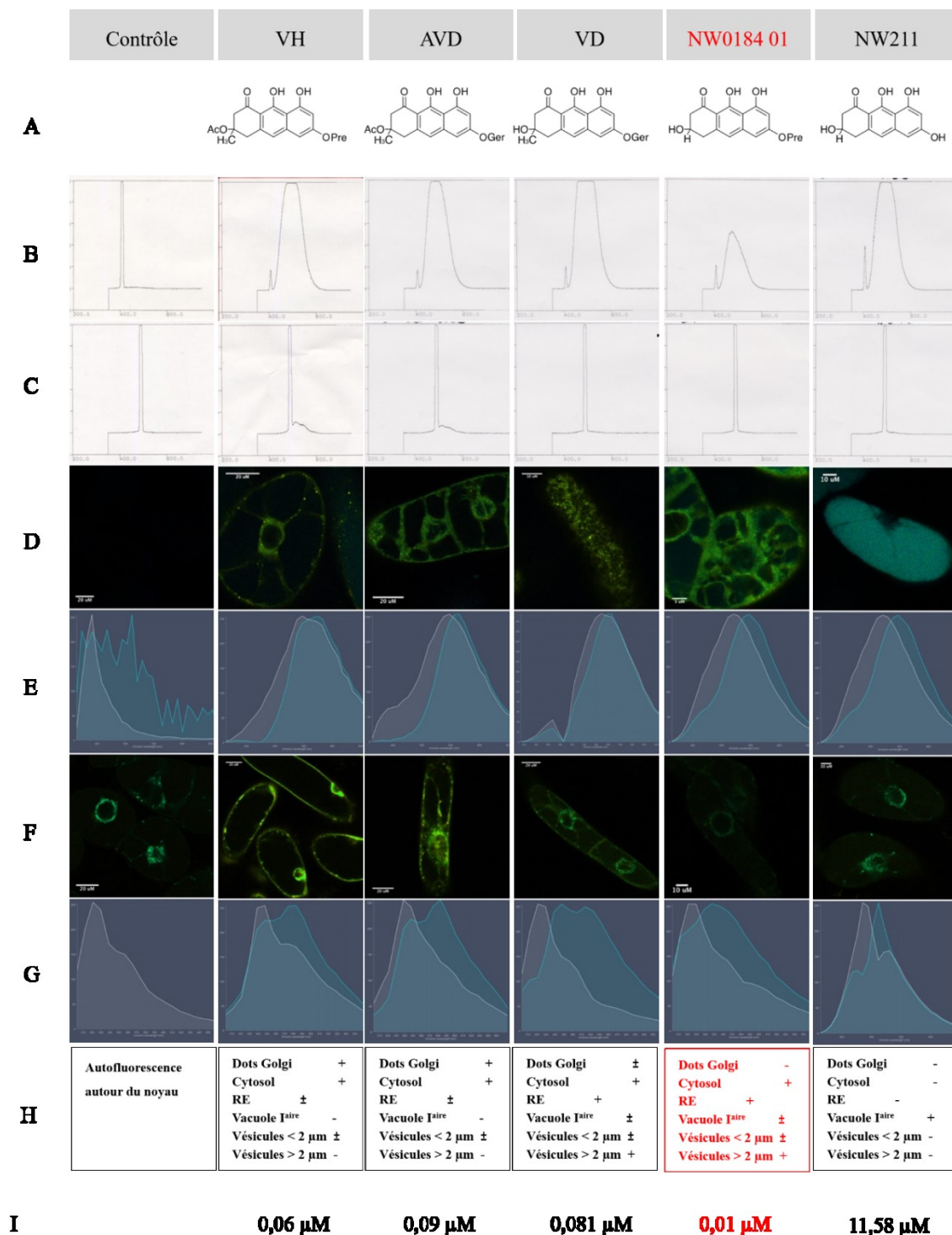


Figure 67. Résumé des résultats importants des travaux menés sur la fluorescence et les effets des vismiones et dihydroanthracénones de synthèse dans des cellules BY-2 de Tabac. Résultats, (A) structure chimique, (B) Spectrofluorimétrie $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ à 405/350-750 nm, (C) Spectrofluorimétrie $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ à 488/350-750 nm, (D, E) vue lambda $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ à 405/410-668 nm et composantes ACE associées, (F, G) vue lambda $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ à 488/499-668 nm et composantes ACE associées. En blanc le spectre de la composante 1, en bleu le spectre de la composante 2. (H) localisation de la fluorescence dans les cellules BY-2 de Tabac. (I) IC₅₀ contre *Leishmania donovani*.

Conclusion générale

Une approche ethnopharmacologique avait conduit à entreprendre des travaux sur des espèces végétales appartenant au genre *Psorospermum* (*Hypericaceae*) pour leurs propriétés antiprotozoaires.

Lors d'une première étude phytochimique, une série de molécules anthranoïdes prénylées, de type anthraquinones, anthrones, ainsi qu'une vismione, ont été isolées. Celles-ci ont révélé des activités sur *Plasmodium* et *Leishmania*. Des activités sur *P. falciparum* de l'ordre du micromolaire ont été déterminées pour tous les composés, sans qu'une relation structure-activité claire ne soit visible. Les activités évaluées sur amastigotes de *L. donovani* en revanche se sont révélées plus intéressantes pour les anthrones et la vismione, avec des valeurs de CI_{50} inférieures au micromolaire et des indices de sélectivité supérieurs ou égaux à 10. L'activité sur *Leishmania* semblait de plus régie par la nature et la position des substituants prénylés sur le squelette.

Par la suite, une nouvelle étude phytochimique a permis, au moyen de techniques de fractionnement adaptées, d'isoler 9 vismiones à partir de *P. glaberrimum*. Celles-ci ont montré des activités allant de 30 à 827 nM. De plus ces activités semblaient encore une fois fortement influencées par la nature et la position des substituants. Pour étudier cette relation structure-activité, une approche par synthèse organique a été entamée afin d'obtenir des analogues permettant de mieux cerner les déterminants structuraux responsables de l'activité. Enfin, l'instabilité des vismiones hors de la matrice végétale a été mise en évidence.

Ces résultats ont conduit à définir les objectifs des travaux présentés dans cette thèse.

Nous avons voulu confirmer l'intérêt des vismiones isolées du genre *Psorospermum* pour leur activité anti-*Leishmania*, ainsi que d'en comprendre les déterminants structuraux.

Pour ce faire, les vismiones ont été quantifiées dans les extraits précédemment isolés par spectrométrie de masse haute résolution, afin de corrélérer leur teneur avec l'activité anti-*Leishmania* des extraits. Une approche synthétique a été mise en place afin de réaliser une étude de relation structure-activité et de jeter les bases du développement d'un outil pharmacologique permettant d'approcher le site d'action des vismiones chez *Leishmania*. L'activité anti-*Leishmania* des molécules obtenues a été évaluée sur différents modèles dans le cadre de collaborations. Enfin, les premières études mécanistiques au niveau intracellulaire ont été réalisées en collaboration avec l'IBMP.

Une quantification des vismiones dans les extraits de différents organes et de différentes espèces de *Psorospermum* avait déjà été réalisée au laboratoire par HPLC couplée à un détecteur UV à une longueur d'onde spécifique. Cette méthode est cependant relativement imprécise. De plus, la quantification des différentes vismiones a été réalisée à partir de courbes d'étalonnage obtenues uniquement pour la vismione H et l'acétylvismione D, ce qui apporte un biais supplémentaire puisque toutes les vismiones ne présentent pas les mêmes maxima d'absorption.

Nous avons donc décidé de réaliser un nouveau dosage de ces vismiones par une méthode précise et fiable, dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, dans l'unité Œnologie disposant d'une U-HPLC couplée à un analyseur de masse Orbitrap.

27 extraits dichlorométhaniques et 4 extraits aqueux, issus des troncs, tiges, fruits et écorces de 9 espèces de *Psorospermum*, ont été sélectionnés. Une méthode d'analyse a été mise au point afin d'optimiser la séparation des vismiones en HPLC ainsi que l'ionisation des vismiones, permettant une détection optimale.

Les résultats du dosage ont confirmé les teneurs considérables présentes dans certains organes, notamment les tiges, troncs et écorces. Certains extraits contiennent en effet plus de 500 mg de vismiones par gramme d'extrait. L'acétylvismione D représente à elle seule jusqu'à 60% des vismiones totales. Or le rôle biologique des vismiones dans la plante n'est à ce jour pas élucidé. Compte tenu de la concentration importante dans les écorces (organe de surface), tandis qu'elle est faible dans les feuilles et les fruits, on peut supposer un mécanisme de défense de la plante face aux agressions. De plus, aucune quantification de vismiones n'a été réalisée dans d'autres genres renfermant des vismiones à notre connaissance. Il serait cependant intéressant de savoir si de fortes teneurs en vismiones sont retrouvées dans ces genres, ou si celles-ci sont propres au genre *Psorospermum*.

L'activité sur amastigotes axéniques de *L. donovani* de certains extraits avait été évaluée précédemment. En comparant la teneur en vismiones de ces extraits avec leur activité, nous avons montré qu'il y avait une corrélation forte entre ces deux variables. Dans le cas des vismiones totales ainsi que pour les vismiones les plus actives, la vismione H (**2**) et la desacétylvismione H (**5**), l'activité anti-*Leishmania* est positivement corrélée avec la teneur. Cependant, le nombre d'extraits ayant fait l'objet d'une évaluation de l'activité anti-

Leishmania est restreint. Il serait judicieux de réaliser des tests sur l'ensemble des échantillons dont la teneur en vismiones a été quantifiée.

Quoi qu'il en soit, ces résultats ont permis de confirmer notre hypothèse que les vismiones sont les molécules porteuses de l'activité anti-*Leishmania* au sein des espèces du genre *Psorospermum*.

La synthèse d'analogues des vismiones naturelles a représenté une grande part dans les travaux de cette thèse, et avait plusieurs objectifs. Les tests d'activité réalisés sur les vismiones naturelles isolées à partir d'extraits du genre *Psorospermum* avaient permis d'émettre des premières hypothèses sur trois positions de substitution clés. La synthèse d'analogues, grâce à l'obtention d'un large panel de composés diversement substitués sur ces positions d'intérêt, devait permettre tout d'abord d'en savoir davantage sur la relation structure-activité. Ainsi, 19 dihydroanthracénones portant des substituants différents, sur ces trois positions ont été synthétisés. Les composés C-alkylés sur la position 6 se sont montrés relativement aisés à obtenir avec de bons rendements, ils restent cependant structurellement plus éloignés des vismiones naturelles, toutes hydroxylées sur cette position. Ce type de substitution amenant une forte réactivité, la synthèse de composés O-alkylés en position 6 s'est révélée beaucoup plus délicate.

Le deuxième objectif était d'obtenir un outil pharmacologique permettant d'étudier le mécanisme d'action au niveau intracellulaire. En effet, les vismiones naturelles étant très instables lorsqu'elles sont mises en solution, il était nécessaire de développer un composé plus stable, et si possible possédant également une activité optimisée. En se basant sur la structure de la desacétylvismione H (**5**), la vismione naturelle la plus active, nous avons synthétisé le composé (**226**), correspondant à la 6-desméthyl-désacétylvismione H. Nous avons également synthétisé le composé (**228**), comportant un groupement PEG3 sur la position 3, dans l'optique de nous en servir comme *linker* et de l'utiliser comme sonde fluorescente.

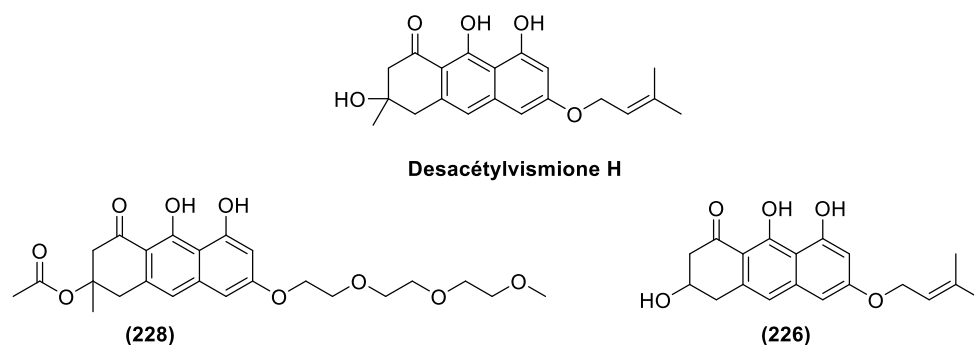


Figure 68. Structures de la desacétylvismione H et des composés synthétiques 226 et 228.

L'activité de tous ces composés a été évaluée sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Les résultats concordent avec ceux obtenus pour les vismiones naturelles. L'hydroxyle libre sur la position 1 ainsi qu'un groupement alkylé sur la position 3 favorisent l'activité. Ce gain d'activité est nettement plus fort lorsque la position est alkylée par un groupement prényle. De plus, les composés C-alkylés se sont montrés moins actifs que ceux possédant un hydroxyle sur la position 6. L'acétylation de cet hydroxyle semble avoir un faible effet négatif sur l'activité.

Le composé **(228)** comportant un groupement PEG3 a montré une activité de l'ordre du micromolaire mais un indice de sélectivité intéressant. Cependant, les résultats obtenus lors de ce test semblent globalement inférieurs à ceux obtenus précédemment. En effet, la vismione H, re-testée lors de cette série, a perdu un log d'activité. Le composé **(226)** en revanche a présenté lors de deux tests une CI_{50} de l'ordre de la dizaine de nM ($n = 2$), c'est à dire du même ordre de grandeur que celle de la desacétylvismione H. De plus, son indice de sélectivité de 400 ($n = 2$) pourrait le rendre très intéressant en tant qu'outil pharmacologique, comme espéré.

Compte tenu de son activité prometteuse sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, l'activité du composé **(226)** a été évaluée sur un modèle plus proche de la réalité. Le test sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*, qui correspond au stade de développement du parasite chez l'hôte, a permis de calculer une CI_{50} supérieure à 3.66 μ M. Cette valeur est intéressante, cependant sa toxicité a été évaluée à 9 μ M de manière inattendue au vu de l'indice de sélectivité amastigotes axéniques de *L. donovani*/cellules musculaires de rat L6. Elle reste cependant cohérente avec les résultats obtenus pour les vismiones naturelles, qui ont présenté des activités sur amastigotes intramacrophagiques de l'ordre de la dizaine de μ M et des indices de sélectivité inférieurs à 1.

D'autre part, l'activité de la vismione H a été évaluée sur un modèle murin de *leishmaniose* viscérale. Un résultat positif mais non significatif a été obtenu. De plus, une toxicité élevée a à nouveau été mesurée.

Enfin, le dernier objectif visé par l'approche de synthèse organique était de réaliser la synthèse totale de vismiones, encore jamais décrite à ce jour. Le composé synthétisé (**234**) de nature tétralone devrait permettre, après une étape d'oxydation ménagée, d'obtenir le composé protégé (**237**), qui par déprotection classique dans l'éthanol en présence d'acide chlorhydrique dilué, devrait permettre d'obtenir la desacétylvismione H sous forme d'un mélange racémique. L'étape d'oxydation s'annonce délicate, car, en milieu oxydant, la forme dihydroanthracénone poursuit rapidement son oxydation en anthrone et anthraquinone. Des conditions douces devront être mises au point.

Si cette synthèse aboutit, l'objectif suivant est d'arriver à la synthèse énantiosélective de la desacétylvismione H, en utilisant une variante de la voie de synthèse employée (**Schéma 120**). Dans le schéma de réaction actuel, le β -cétoester est allylé par le bromure d'allylzinc en présence de trichlorure d'aluminium pour obtenir l'ester β -hydroxylée en mélange racémique. L'allylboration asymétrique de la cétone la l'allylboronate de diisopropyle en présence de BINOL permet d'obtenir sélectivement un seul des énantiomères avec un ratio de 97 :3.

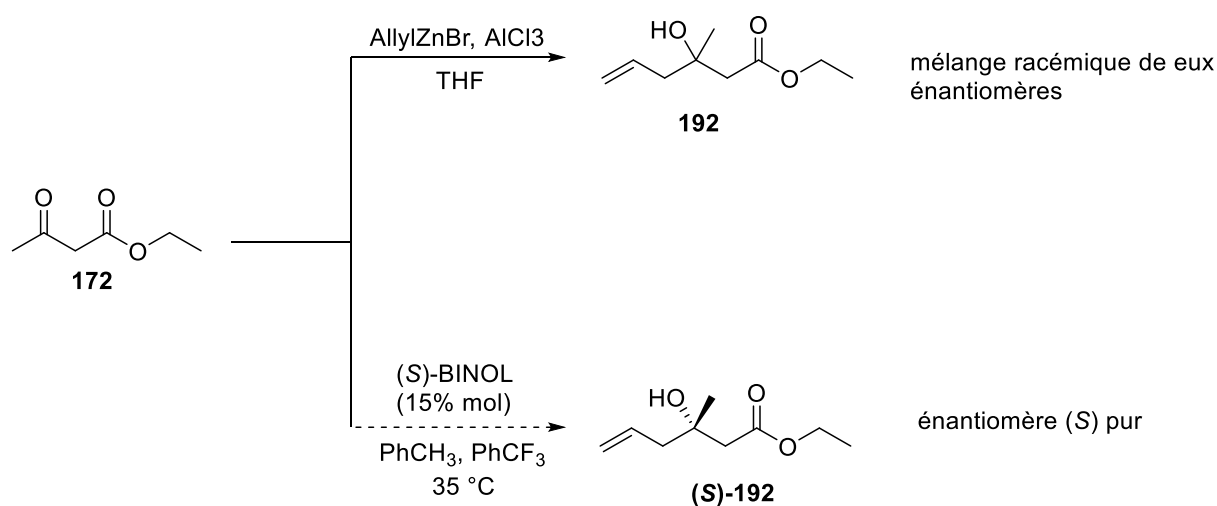


Schéma 120. Obtention de l'ester β -hydroxylé de manière classique et énantiosélective.

En vue de cette synthèse, nous avons voulu connaître la configuration absolue des vismiones naturelles. Leur réactivité n'ayant pas permis de les cristalliser en vue de déterminer leur configuration absolue par une méthode de diffraction des rayons X, une collaboration avec le Spectropole de Marseille a permis de déterminer par VCD la configuration absolue de la desacétylvismione H comme étant $-(S)$.

Il serait donc intéressant d'obtenir la (*R*)-desacétylvismione H synthétique afin de comparer l'activité des deux énantiomères, mais également la (*R*)-desacétylvismione H afin d'établir une comparaison entre le composé de synthèse et le composé naturel.

D'autre part, la stabilité de deux analogues synthétiques, (**213**) et (**226**) a été évaluée dans le DMSO sous atmosphère d'argon, en comparaison de la vismione H et de l'acétylvismione D. Comme attendu, le composé (**213**), diméthylé sur la position 6 et possédant une activité modérée sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, n'a montré aucune trace de dégradation dans le DMSO après plusieurs semaines en solution. Le composé (**226**) hydroxylé sur la position 6 a quant à lui montré 5% de formes de dégradation après deux semaines en solution dans le DMSO et possède une $t_{1/2\text{vie}}$ supérieure à 500 h. En comparaison, la vismione H et l'acétylvismione D possèdent des demi-vies de 37,5 et 50 heures respectivement, dans les mêmes conditions. Cette stabilité améliorée joue potentiellement un rôle sur l'activité, le composé ayant plus de temps pour exercer son action avant d'être dégradé en une forme moins active.

Pour finir, le fait que les vismiones actives soient prénylées, corrélé aux données de la littérature, nous a fait émettre l'hypothèse qu'elles agissaient comme inhibiteurs au niveau de la voie de biosynthèse des isoprénoides chez *Leishmania*. Des expériences ont été réalisées en collaboration avec l'IBMP sur un modèle végétal exprimant la voie de biosynthèse des isoprénoides. Elles ont montré qu'il y avait apparition d'un phénotype particulier, mais ne correspondant pas à celui d'inhibiteurs de la voie de prénylation. Les investigations sont en cours par Quentin Chevalier, dans le cadre de sa thèse, pour mettre en évidence le trajet intracellulaire des vismiones et leur éventuelle cible.

De façon intéressante lors de ces investigations, des propriétés de fluorescence marquées des vismiones ont été mises en lumière. Celles-ci permettent de suivre les vismiones par microscopie confocale de manière confortable sans faire appel à un fluorophore supplémentaire. Ces propriétés de fluorescence intrinsèques rendent caduque l'utilisation du composé (**228**) comme sonde liée à un chromophore. Cependant, le linker présent sur ce

composé pourrait permettre de réaliser des expériences de FISHing en greffant une amorce sur le linker.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de valider notre hypothèse affirmant que les vismiones sont porteuses de l'activité anti-*Leishmania* des extraits dichlorométhaniques du genre *Psorospermum*. Ils ont également permis d'approfondir les connaissances sur la relation structure activité des vismiones. Enfin, un outil pharmacologique intéressant, à savoir une sonde de fluorescence « naturelle » a pu être mise en évidence.

Une publication relatant les résultats de l'étude phytochimique ayant abouti à l'isolement des vismiones, ainsi que l'étude de leurs propriétés anti-*Leishmania*, a été soumise au Journal of Natural Products. Une seconde décrira la répartition des vismiones dans différentes espèces du genre *Psorospermum* et leurs organes. Deux autres publications valoriseront les résultats obtenus en synthèse organique et sur les propriétés de fluorescence des vismiones.

Experimental section

I. General experimental procedure

Microwave irradiations were performed using a BIOTAGE Smith Creator apparatus. Flash chromatography was performed on silica gel (30 μm , Interchim) or RP-18 (30 μm , Interchim) prepacked columns using a Spot Liquid chromatography apparatus from Armen Instrument. Semipreparative HPLC was performed using Sunfire C18OBD 5 μm 19x 150 mm column on a PLC 2020 apparatus from Gilson or using Waters XBridge prepshield RP18 OBD 5 μm 19x250 mm column on a Gilson semipreparative system equipped with 331/332 pumps, 156 UV/Vis detector and GX271 liquid handler.

Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out on aluminum sheets silica gel 60 F254 (Fluka, Sigma-Aldrich), and visualized under UV light at 254 and 365 nm before being revealed by KMnO_4 bath and heating (synthetic compounds), or vanillin-sulfuric acid bath and heating (natural compounds). UV-visible HPLC analysis were performed using Ascentis express C18 2.7 μm 4.6x75 mm column on an Agilent 1200 series apparatus.

NMR spectra were recorded on a Bruker 500 MHz, Ultrashield+, Avance III BBFO+ probe spectrometer and a Bruker Avance III 400 MHz BBFO+ probe spectrometer for ^1H and 100 MHz for ^{13}C .

Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual solvent and coupling constants (J) are reported in hertz (Hz). Signals are described as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quin (quintuplet), sxt (sextuplet), spt (septuplet), m (multiplet), dd (doublet of doublets), dt (doublet of triplets), dq (doublet of quadruplets), td (triplet of doublets), tt triplet of triplets), tq (triplets of quadruplets), tsxt (triplet of sextuplets), tspt (triplet of septuplets), qspt (quadruplet of septuplets), br s (broad singlet), br d (broad doublet), br t (broad triplet) and br spt (broad septuplet). Deuterated solvents were purchased from Sigma Aldrich or Euriso-top®. HRMS and LRMS analysis for synthesized compounds were obtained on an Agilent Technologies 6520 Accurate-Mass Q.Tof LC/MS apparatus using electrospray ionization mode and time-of-flight analyzer (ESI-TOF). LC-FTMS for vismiones quantification was performed using an Acquity BEH C18 (130A, 1.7 μm , 2.1 mm x 100 mm) column an an U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific) with an Exactive™ MS detector and an Accela PDA 1 cm LightPipe Flow cell UV detector.

II. HPLC analysis conditions

Analytical HPLC was used to monitor Staunton-Weinreb annulations and to determine the appropriate gradient for further purification of natural and synthetic compounds by semi-preparative HPLC. The “vismione” method mentioned below has been employed:

Apparatus	HPLC Agilent series			
Method name	Vismione			
Column	Ascentis Express C18 (7.5 cm x 4.6 mm x 2.7 µm)			
Time (min)	0	7.3	10	10.3 13.3
Solvent A: H2O 0,1% TFA	95	0	0	95 95
Solvent B: ACN 0,1% TFA	5	100	100	5 5
Temperature	25 °C			
Injection volume	5 µL			
Flow rate	1.600 mL/min			
Detection	190 to 550 nm			

III. LC-FTMS Quantification of vismiones

These experiments have been realized in the framework of a collaboration with the « Institut des Sciences de la Vigne et du Vin » (ISVV) of Bordeaux, in the Oenology unit directed by Dr Axel Marchal.

III.1. Standard solutions

Vismiones used as standards were isolated from PGUE and PGE2E dichloromethane extracts using purification method set-up by J.-B. Galle during his PHD⁷⁸. Three stock solutions were realized:

- Solution 1 : vismione H, vismione D, acétylvismione D, vismione F (1 g/L)
- Solution 2 : vismione M, désacétylvismione H, acétylvismione F (2 g/L)
- Solution 3 : vismione E (1 g/L)

Solution 1 was used to define HPLC conditions and optimal detection for mass analysis.

III.2. LC analysis conditions

The method « vismione » has been adapted to the ISVV apparatus as described below:

Apparatus:	U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific)							
Column:	Acquity BEH C18 (130A, 1.7µm, 2.1mm x 100 mm)							
Mobil phase:	Solvent A:H ₂ O mQ + 0.1% Formic acid							
	Solvent B:ACN LC-MS Optima (Thermo Fischer Scientific) + 0.1% Formic acid							
	Flow rate:500 µL/min							
	Gradient:							
	Time (min)	0	0,3	3,0	4,0	6,3	6,4	8,4
	% B	55	55	90	100	100	55	55
Injection:	5 µL (HTC0 Pal auto sampler)							

III.3. MS analysis conditions

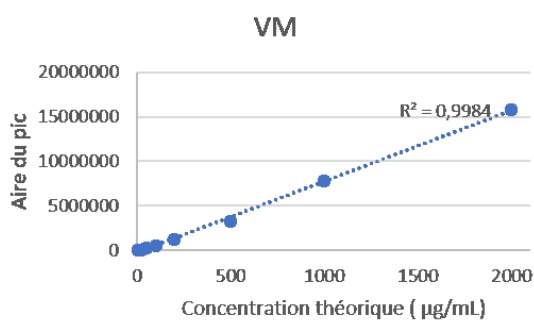
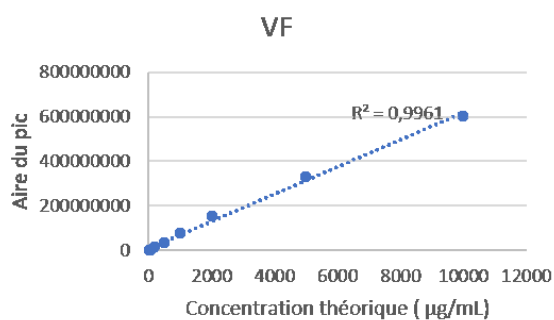
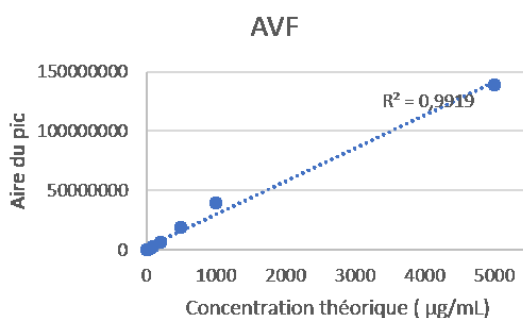
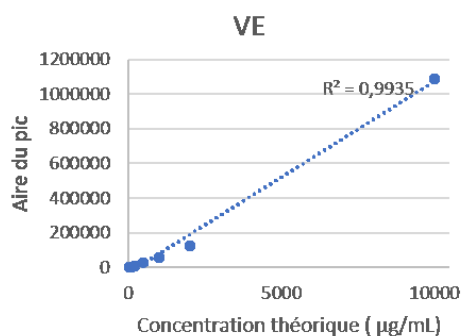
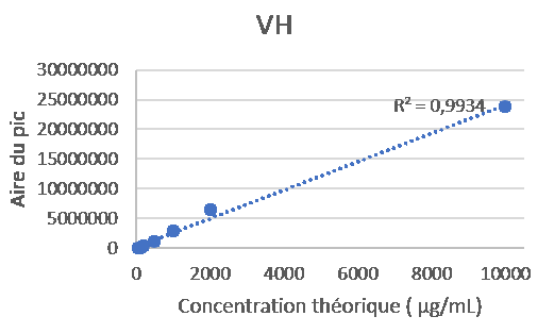
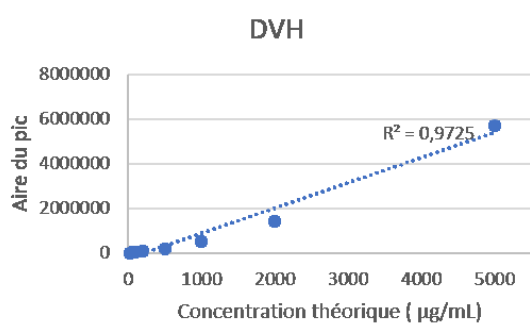
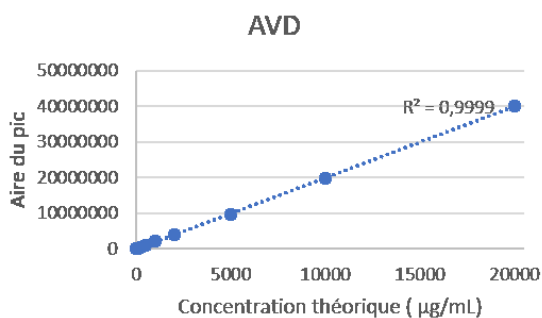
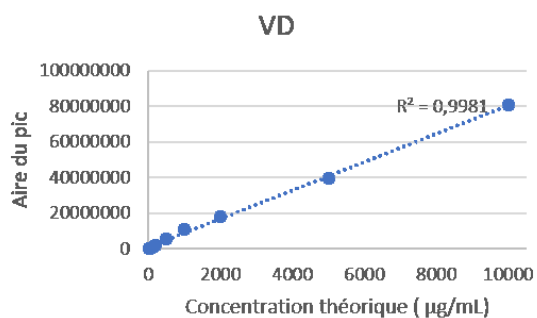
The FTMS analysis have been performed on an Exactive™ MS detector in negative mode with the following conditions:

Parameters	Negative mode
Sheath gas flow rate	80
Aux gas flow rate	15
Sweep gas flow rate	3
Spray voltage	3 kV
Capillary temp.	350 °C
Capillary voltage	-32,5 V
Tube lens voltage	-130 V
Skimmer voltage	-28 V
Heater temp.	320 °C

The datas have been processed with the Quanbrowser application of Xcalibur software V 2.1 for Exactive (Thermo Fisher Scientific).

III.4. Calibration curves

Calibration curves were made for deacetylvismione H (**5**), vismione H (**2**), vismione D (**4**), acetylvismione D (**3**), vismione E (**272**), vismione F (**9**), acetylvismione F (**7**) and vimione C (**6**) with standard solutions with concentrations ranging from 1 µg/L to 10 g/L in MeOH. The concentrations have been calculated from the area of the [M-H] peaks corresponding to the ionized vismiones.



III.5. Accuracy and repeatability

Accuracy and repeatability were assessed by injecting 100 µg/L and 10 mg/L standard solutions five times. Deviations < 10% are considered as acceptable. Results are shown for vismione F. Results for other vismiones are acceptable as well.

Vismione F (100 µg/L)	Mes. Concentration (µg/L)	Deviation
1	90,95	-9%
2	91,56	-8%
3	92,43	-8%
4	92,64	-7%
5	93,81	-6%

Vismione F (10 mg/L)	Mes. Concentration (µg/L)	Deviation
1	9546,74	-5%
2	10032,83	0%
3	9579,99	-4%
4	9288,46	-7%
5	9419,07	-6%

III.6. Vismiones quantification

Methylene chloride extracts were prepared following the procedure set up by J.-B. Galle during his PhD. The *Psorospermum* plant samples have been extracted twice with methylene chloride by 24 h maceration at room temperature ($30 \pm 5^\circ\text{C}$, Yaoundé) with a solvent ratio of 1/10 (m:v) and filtrated over cellulose filter. The filtrates were evaporated under atmospheric pressure without exceeding 40°C .

4 mg of each methylene chloride extract was dissolved in MeOH to a concentration of 2.00 g/mL. These solutions were then diluted to 100 mg/L and 10 mg/L. 5 µL of these solutions were analyzed by LC-FTMS with the above-mentioned method. The datas have been processed with the Quanbrowser application of Xcalibur software. According to the concentration of the major vismiones in the extracts 10 mg/L samples or 100 mg/L samples have been selected to be in the range of the calibration curve. All analysis have been performed one time (n = 1).

IV. Vismione stability assays in organic solvents

The stability of vismiones and dihydroanthracenones have been evaluated by NMR and HPLC methods.

IV.1. ¹H NMR experiments

Four milligrams of (**226**) were dissolved in 400 μL of DMSO-d₆, and analyzed by ¹H NMR regularly for 5 days. Each degradation product was identified by its spectrum and quantified by the mean of its hydroxyl or aromatic protons signals. The experiment has been performed under argon atmosphere and normal atmosphere.

Four milligrams of (**226**), VD and AVD were dissolved in 400 μL of CD₂Cl₂ and analyzed by ¹H NMR regularly for 5 days. Each degradation product was identified by its spectrum and quantified by the mean of its hydroxyl signals.

IV.2. HPLC experiments

Three samples of each compound (**226**, **213**, VD (**4**) and AVD (**3**)) were performed at 2mg/mL in DMSO and placed in sealed μwave tubes after argon have been flushed inside.

100 μL samples were regularly took via a syringe and analysed by HPLC with the method “vismione”. Each degradation product was identified by its retention time and quantified by the relative peak area.

V. Biological assays

V.1. *In vitro* antiprotozoal assays

These assays were conducted by Marcel Kaiser's team at the Swiss Tropical and Public Health Institute in Basel. The samples were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to obtain a concentration of 10 mg/mL and screened for antiprotozoal activity against *Leishmania donovani* and cytotoxicity against rat skeletal muscle myoblasts (L6 cells). The *in vitro* assays were conducted as described before¹⁵⁹.

V.1.1 *In vitro* activity against *L. donovani* axenic amastigotes

Amastigotes of *L. donovani* strain MHOM/ET/67/L82 were grown in axenic culture at 37 °C in SM medium at pH 5.4 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum under an atmosphere of 5% CO₂ in air. 100 μL of culture medium with 10⁵ amastigotes from axenic culture with or without a serial sample dilution were seeded in 96-well microtiter

plates. Serial sample dilutions were prepared. After 72 h of incubation the plates were inspected under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. 10 μ L of a resazurin solution (12.5 mg resazurin dissolved in 100 mL double-distilled water) was then added to each well and the plates incubated for another 2 h. Then the plates were read in a Spectramax Gemini XS microplate fluorometer using an excitation wavelength of 536 nm and an emission wavelength of 588 nm. Data were analyzed using the software Softmax Pro. Decrease of fluorescence (= inhibition) was expressed as percentage of the fluorescence of control cultures and plotted against the sample concentrations. From the sigmoidal inhibition curves the IC₅₀ values were calculated. Each IC₅₀ value obtained is the mean of at least two separate experiments performed in duplicate (the variation is max. 20%). Miltefosine was used as a reference drug.

V.1.2 Activity against *L. donovani* intracellular amastigotes assay

Mouse peritoneal macrophages (4 x 10⁴ in 100 μ l RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated FBS) were seeded into wells of Lab-tek 16-chamber slides. After 24 h 1.2 x 10⁵ amastigote *L. donovani* in 100 μ l were added. The amastigotes were taken from an axenic culture grown at pH 5.4. Four hours later, the medium containing free amastigote forms was removed and replaced by fresh medium. The next day the medium was replaced by medium with or without a serial sample dilution of seven 3-fold dilution steps covering a range from 0.04 to 30 μ g/mL. Parasite growth in the presence of the sample was compared to control wells. After 96 h of incubation, the medium was removed and the slides fixed with methanol for 10 min followed by staining with a 10% Giemsa solution. Infected and non-infected macrophages were counted for the control cultures and those exposed to the serial sample dilutions. The infection rates were determined. The results were expressed as a percentage reduction in parasite burden compared to control wells, and the IC₅₀ was calculated by linear regression analysis. The collection of mouse peritoneal macrophages was done at the Swiss Tropical and Public Health Institute (Basel) according to the rules and regulations for the protection of animal rights ("Tierschutzverordnung") of the Swiss "Bundesamt für Veterinärwesen". The animal work was approved by the veterinary office of Canton Basel-Stadt, Switzerland (permission number 2374).

V.1.3 *In vitro* activities against *L. infantum*

These assays were conducted by Yenny Lozano, Lucie Paloque and Sandra Bourgeade-Delmas (UMR 152 IRD-UPS PHARMA-DEV, BIOCID team). The samples were extemporaneously dissolved in DMSO and screened for antiprotozoal activity against promastigote and axenic and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* and cytotoxicity against mouse macrophage cell line.

V.1.4 *In vitro* activity against *L. infantum* promastigotes

The effects of the various samples on the growth of promastigotes of *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR *Leishmania*, Montpellier, France) were assessed using promastigotes expressing luciferase activity. Briefly, promastigotes in log-phase in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 50 µg/mL geneticin), were incubated at an average density of 106 parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in triplicate. Appropriate controls treated by DMSO and amphotericin B, reference drugs purchased from Sigma Aldrich, were added to each set of experiments. After a 72 h incubation period at 24 °C, each plate well was microscope-examined to detect the possible formation of precipitate. To estimate the luciferase activity of promastigotes, 80 µL of each well were transferred to white 96-well plates, Steady Glow reagent (Promega) was added according to the manufacturer's instructions, and the plates were incubated for 2 min. The luminescence was then measured in a Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50% (IC₅₀) was defined as the concentration of sample required to inhibit by 50% of the metabolic activity of *L. infantum* promastigotes compared to the control. IC₅₀ were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC₅₀ values represent the mean value calculated from three independent experiments.

V.1.5 *In vitro* activity against *Leishmania infantum* axenic amastigotes

L. infantum promastigotes in log phase were centrifuged at 900 G for 10 min; cell medium was then replaced by MAA-20 medium and maintained at 37 °C, 5% CO₂ to induce transformation into axenic amastigote forms 190. Axenic amastigotes were incubated at an average density of 4.106 cells/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of samples dissolved in DMSO (final concentration 1% v/v), in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO and amphotericin B, miltefosine and pentamidine were added to each set of

experiments. After a 72 h incubation period at 37 °C and 5% CO₂, the effects of the tested compounds were evaluated by estimation of the luciferase activity of the axenic amastigotes. Eighty microliters of each well were transferred to white 96-well plates, Steady Glow reagent (Promega) was added according to the manufacturer's instructions, and the plates incubated for 2 min. The luminescence was measured in a Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50% (IC₅₀) was defined as the concentration of drug required to inhibit 50% of the metabolic activity of *L. infantum* amastigotes compared to the control.

V.1.6 *In vitro* activity against cutaneous species of *Leishmania*.

This assay was performed by Katherine Milagros Carrillo Torres, Denis Castillo Pareja and Michel Sauvain, at the « laboratoire mixte international » LAVI (UMR 152 IRD-UPS, Université Cateyano Heredia, Lima).

For the determination of IC₅₀ values of the evaluated compounds was made by MTT assay. 100 µL of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes and axenic amastigotes (2 x 10⁶ parasites/mL), and *L. guyanensis* (5 x 10⁶ parasites/mL) were placed on a 96 wells plates. PGE2E extract (0.1 to 100 µg/mL) and vismione H (0.6 to 60 µM) in DMSO solution were then added. Amphotericin B was used as positive control (0.025 to 2.5 µM).

After 72 h of incubation at 2 °C or 33 °C for promastigotes or amastigotes respectively, 10 µL of MTT (10 mg/mL) were added to each well and the plate was placed for 4 hours of incubation in the same conditions than before. The enzymatic reduction of MTT molecule by mitochondrial dehydrogenase is shown by the formation of an insoluble blue salt called formazan. The reaction was stopped by adding 100 µL of a 50% isopropanol/10% dodecyl sodium sulfate homogenized and incubated for 30 min. The optical density was read at 595 nm using CHAMELEON V microplate reader. The growth inhibition percentage of the parasites was calculated by using the following formula:

$$(\text{OD control} - \text{OD compounds}) / \text{OD control} \times 100 = \% \text{ inhibition}$$

The Probit software was used for the IC₅₀ calculation.

V.2. *In vivo* antileishmanial evaluation

This experiment was realized by Sébastien Pomel, in collaboration with Pr Philippe Loiseau (UMR 8076 CNRS BioCIS).

The *in vivo* evaluation of the antileishmanial properties was realized by intraperitoneal route on the *L. donovani*/Balb/c mice model, comparatively to miltefosine, used as reference drug, according to previously described protocols^{160,161}.

Six- to eight- week-old Balb/c mice (Élevages Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were infected intravenously on day 1 with 10^7 *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3) amastigotes derived from spleen hamsters and randomly sorted into two groups of 8 mice, and one group of 10 mice as infected controls treated only with excipient (DMSO). The treatment by intraperitoneal route started one week post-infection, on day 8, and continued for four consecutive days until day 12 with vismione at 1 mg/kg dissolved in DMSO, and until day 13 with miltefosine dissolved in water at 10 mg/kg of body weight. At day 20, all groups of mice were autopsied and livers and spleens were weighed. Parasite load in the liver was determined by counting the number of amastigotes/500 liver cells in Giemsa-stained impression smears prepared from the liver and applying Stauber's formula. Three researchers counted the slides independently and the results are expressed as the% of reduction of parasite burden. The parasite burden of treatment groups and controls were compared using the Kruskal–Wallis nonparametric analysis of variance test for comparing two groups. Significance was established for a P value < 0.05.

V.3. In vitro cytotoxicity evaluation

V.3.1 Cytotoxicity against L6 Cells

Assays were performed in 96-well microtiter plates, each well containing 100 μ L of RPMI 1640 medium supplemented with 1% L-glutamine (200 mM) and 10% fetal bovine serum and 4×10^4 L6 cells (rat skeletal myoblasts). Serial sample dilutions were prepared. After 72 h of incubation, the plates were inspected under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. Then, 10 μ L of a resazurin solution (12.5 mg resazurin dissolved in 100 mL distilled water) was added to each well and the plates incubated for another 2 h. They were then read with a Spectramax Gemini XS microplate fluorometer at an excitation wavelength of 536 nm and an emission wavelength of 588 nm. The IC₅₀ values were calculated from the sigmoidal inhibition curves with SoftMax Pro software. Podophyllotoxin (P4405, Sigma, Saint Louis, MO, USA) was used as a positive reference.

V.3.2 Cytotoxicity against macrophage cells

These assays were conducted by Marcel Kaiser's team at the Swiss Tropical and Public Health Institute in Basel.

The evaluation of the cytotoxicity of tested molecules by MTT assay on the J774A.1 cell line (mouse macrophage cell line, Sigma-Aldrich) was done according to Mosmann¹⁶² with slight modifications. Briefly, cells ($5 \cdot 10^4$ cells/mL) in 100 μ L of complete medium, [RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in a humidified 6% CO₂ with 95% air atmosphere. After a 24 h incubation, 100 μ L of medium with various sample concentrations and appropriate controls were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 μ L of MTT solution (0.5 mg/mL in RPMI) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μ L) was added to dissolve the resulting formazan crystals. The plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer. DMSO or MeOH was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. IC₅₀ were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using

TableCurve 2D V5 software. IC₅₀ values represent the mean value calculated from three independent experiments.

V.3.3 Cytotoxicity against Hepa-1.6, ThP1 and NHDF cells

These assays were conducted by Flore Nardella at the Institut de Parasitologie et de Pathologie, in Strasbourg.

Cytotoxicity of compound (**226**) was assessed on Hepa-1.6, ThP1 and NHDF cell line by WSTT8 cell viability assay in order to determine a selectivity index regarding anti-*Leishmania* activity. These cells were harvested and counted on Kova slide in presence of Tryptan blue. 5000 cells per well (Hepa-1.6 et ThP1) or 500 cells per well (NHDF) were distributed on a 96 wells plate with a final volume of 100 µL. The plates were then incubated at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere until the next day to allow cells adhesion in the wells.

Cells integrity was assessed by inverted microscope observation. The evaluated compound was diluted in corresponding growth medium and 50 µL of each solution, equal to 3 times of the final concentration were added to each well at the desired concentration. The H line of each plate is used as DMSO control by adding 50 µL of growth medium containing the same concentration of DMSO that the wells containing the evaluated compound (7 concentrations from 0.138 to 100 µg/L). The plates were then incubated for 72 h in the same conditions as previously.

10 µL of reactant (WST-8, (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, nontoxic MTT analogue; cell counting kit 8, Sigma-Aldrich) were then added in each well and cells were incubated for 3 to 4 hours at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. When cells are alive, the tetrazolium salt is reduced by mitochondrial succinate deshydrogenase in a soluble derivative of Formazan, which has a yellow color. Reading the absorbance at 450/590 nm allows to evaluate the growth percentage (in relation to the mean DO of untreated controls = 100% growth) and to determine the compound CI₅₀. A control is also realized for colored compounds. Each experimentation is reconducted two times (n = 2) in triplicate.

VI. Investigations on isoprenoids pathway inhibition in a vegetal model

These experiments were performed by Quentin Chevalier, in collaboration with Andréa Hemmerlin (team *Metabolic Network*, UPR 2357, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, IBMP). The aim was to evaluate the potential interaction of vismiones with the prenylation pathway.

3 mL of transformed BY-2 tobacco cellular suspension were incubated with vismiones or synthetic dihydroanthracenones at concentrations ranging from 30 to 100 μM in methanol. These cells express rice Calmodulin (CVIL) coupled to GFP. Calmodulin possesses a nuclear addressing signal which is activated when the protein is prenylated. The Calmodulin-GFP coding gene is under control of a dexamethasone induced promoter. A well containing untreated cells and a well containing Fosmidomycine, an inhibitor of the deoxyxylulose phosphate reductase of the MEP pathway, are used as negative and positive controls.

The cells are incubated for 3 hours at room temperature, then 1.5 μL of Dexamethasone are added, then the evaluated compounds are also added. The cells are then incubated for 18 hours and confocal microscope observations are made regularly at different wavelength. Vismiones showed interesting fluorescence property at 584 nm.

When the protein is correctly prenylated, it is addressed to the plasmia membrane. In case of inhibition of the MEP pathway or prenyl transferase, it remains in the nucleus.

Pictures and timelapses are realized with confocal microscope, then the datas are observed and processed with ZEN V2.2 software.

VII. Investigations on vismiones fluorescence properties

The method is based on confocal microscope observation of spectral imaging of BY-2 cells incubated for 7 days with $\text{MS}^{1/2}$ growth medium at 25°C in the dark. A Zeiss LSM 780 microscope piloted by Zen Zeiss (version 2011) software and equipped with a Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 lens. Laser excitation parameters were set up at λ_{Ex} 488 nm, MBS filter 488 nm and the signal detection was made between 499 and 668 nm (λ_{Em} 499- 668 nm) with 19 9 nm channels. Laser power vary from 2 to 5 % for a 20-43 μM pinhole. Master and digital gain were set up at 820 and ,1 respectively. The acquisitions allows to visualise a mosaic view with each channel, and a lambda view, which is the

superposition of every channel in function of wavelength and intensity. After observation, pictures were annotated with image J version 1.51t (Wayne Rasband, NIH, USA) et assembled with Figure J version 1.10b.

Compounds inherent fluorescent properties were evaluated on a Shimadzu RF-5000U spectrofluorimeter piloted by a DR-15 Data/system controller w/Built-in recorder. Analyses were performed for VH (**2**), AVD (**3**), VD (**4**), (**226**) and (**223**) at 200 μM in DMSO. Amount 1 : λ_{EX} fixed at 488 nm and scanning λ_{EM} 350-750 nm. Amount 2 : λ_{EX} 405 nm et scanning λ_{EM} 350-750 nm.

VIII. Determination of absolute configuration of vismione H by VCD experiment

Determination of the absolute configuration of the molecule vismione H using Vibrational Circular Dichroism (VCD) spectroscopy was realized at "Service de spectroscopies Optiques et CD", Spectropole, Universités d'Aix-Marseille – Fédération des Sciences Chimiques de Marseille, by Jean-Valère NAUBRON.

VIII.1. VCD:

Infrared (IR) and vibrational circular dichroism (VCD) spectra were recorded on a Bruker PMA 50 accessory coupled to a Vertex70 Fourier transform infrared spectrometer. A photoelastic modulator (Hinds PEM 90) set at 1/4 retardation was used to modulate the handedness of the circular polarized light at 50 kHz. Demodulation was performed by a lock-in amplifier (SR830 DSP). An optical low-pass filter ($< 1800 \text{ cm}^{-1}$) before the photoelastic modulator was used to enhance the signal/noise ratio. A transmission cell equipped with BaF_2 windows and of 200 μm of optical pathlength was used. Solutions with a concentration of 0.03 mol/L were prepared by dissolving the solid samples in CD_2Cl_2 . The VCD spectrum of the pure enantiomer was measured at room temperature. The baseline correction was performed using subtraction of the VCD spectrum of the solvent. For each individual spectrum, about 12000 scans were averaged at 4 cm^{-1} resolution (corresponding to 3 hours measurement time). For IR absorption spectra, the cell filled with CD_2Cl_2 served as a reference. The spectra are presented without smoothing and further data processing.

VIII.2. Molecular modeling:

VIII.2.1 Conformational study.

This step has been performed using a stochastic exploration (annealing) of the potential energy surface (SEP) of the (S) enantiomer of the molecule. The annealing was done at semi-empirical level AM1-FS2, starting from two geometries one for each mesomeric form of the molecule (scheme 1). The two geometries have been optimized using density functional theory (DFT) with B3LYP functional and 6-311G(d,p) basis set and including solvent (CD_2Cl_2) effects with a polarisable continuum model (SMD). During the annealing, only the dihedral angles have been relaxed, the bonds lengths and the valences angles were kept frozen. This step, allowed to find 168 conformers among which the 85 most stable have been fully optimized using SMD(CD_2Cl_2)/B3LYP/6-311G(d,p) level. Using the geometries that have converged, Boltzmann population in CD_2Cl_2 have been calculated. For the construction of averaged IR and VCD spectra, only conformations with a Boltzmann population $> 3\%$ have been used.

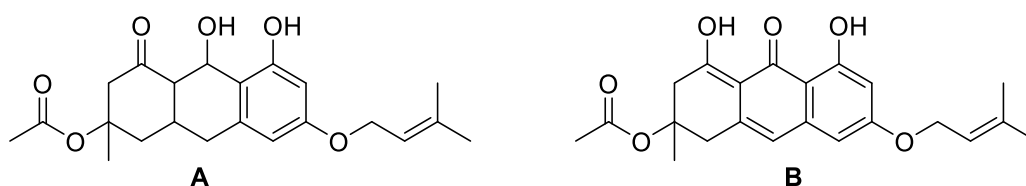


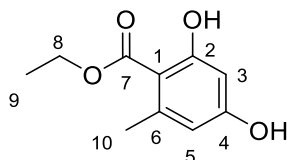
Schéma 121. Mesomeric forms of vismione H

VIII.2.2 Calculation of averaged IR and VCD spectra.

The vibrational frequencies, IR absorption and VCD intensities were calculated using the same theoretical level as for geometry optimization SMD(CD_2Cl_2)/B3LYP/6-311G(d,p). Computed harmonic frequencies are generally larger than those experimentally observed. They have been calibrated using a scaling factor of 0.98. IR absorption and VCD averaged spectra were constructed from calculated dipole and rotational strengths assuming Lorentzian band shape with a half-width at half maximum of 8 cm^{-1} . All calculations were performed using Gaussian 09 Rev D.01 package.

IX. Organic synthesis

Ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (**90**)



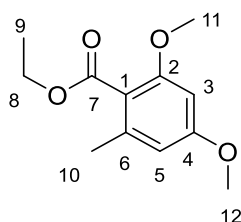
Chemical Formula:
 $C_{10}H_{12}O_4$
Molecular Weight: 196,20

Ethyl acetoacetate (3 g, 23.1 mmol) was added dropwise over 15 min to a suspension of sodium hydride in THF (1.3 g, 32.5 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was cooled to – 78 °C and n-butyllithium (11.42 mL, 21.7 mmol, 1.9 M) added dropwise over 15 min. The reaction mixture was warmed to rt for 17 h, heated at reflux for a further 24 h before cooling to 0 °C and acidifying to pH 1 using concentrated hydrochloric acid (4 mL, 48.8 mmol, 12 M). After 2 h at room temperature, water was added and the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and the solvent removed *in vacuo* to afford a brown oil which was purified via silica gel column chromatography ($C_5/EtOAc$ 90:10 to 80:20). The reaction yielded (**90**) (678 mg, 15%) as a brownish white solid.

TLC ($C_5/EtOAc$ 80:20): Rf0.35.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 11.82 (1H, s, OH-2), 6.25 (1H, s, H-5), 6.21 (1H, s, H-3), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz, H-7), 2.48 (3H, s, H-10), 1.39 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-9).

Ethyl 2,4-dimethoxy-6-methylbenzoate (**84**)



Chemical Formula: $C_{12}H_{16}O_4$
Molecular Weight: 224,26

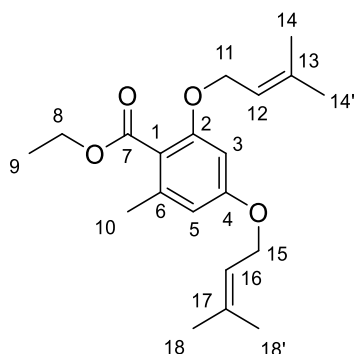
Ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (1.05 g, 5.35 mmol) was dissolved in acetone (10 mL) then K_2CO_3 (4.66 g, 33.72 mmol) and MeI (2.00 mL, 4.56 g, 32.11 mmol) were added. The mixture was set to reflux for 6h. After cooling, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate/HCl, dried over Na_2SO_4 and the solvent removed *in vacuo* to obtain a brown oil which

was purified via silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10 to 50:50). The reaction yielded **(84)** (1.12 g, 99%) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 90:10): R_f0.55.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.29 (2H, s, H-3,5), 4.34 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-8), 3.78 (2H, s, H-11,12), 2.27 (3H, s, H-10), 1.34 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9).

Ethyl 2,4-diprenyl-6-methylbenzoate (**91**)



Chemical Formula: C₂₀H₂₈O₄
Molecular Weight: 332,44

Ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (100 mg, 0.51 mmol) was dissolved in acetone (10 mL) then K₂CO₃ (414 mg, 3.00 mmol) and prenyl bromide (0.33 mL, 425 mg, 2.85 mmol) were added, then the mixture was set to reflux for 6 h. After cooling, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate/HCl, dried over Na₂SO₄ and the solvent removed *in vacuo* to obtain a brown oil which was purified via silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10 to 50:50). The reaction yielded **(91)** (160 mg, 94%) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.63.

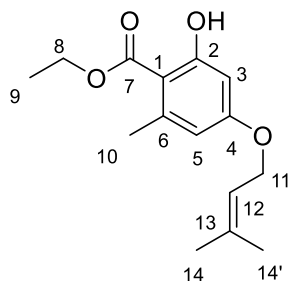
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.33 (1H, s, H-5), 6.31 (1H, s, H-3), 5.47 (1H, td, *J* = 6.8, 2.9 Hz, H-12), 5.42 (1H, td, *J* = 6.5, 2.5 Hz, H-16), 4.48 (4H, d, *J* = 6.7, H-11,15), 4.35 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-8), 2.28 (3H, s, H-10), 1.79 (3H, s, H-14), 1.75 (3H, s, H-14'), 1.74 (3H, s, H-18), 1.69 (3H, s, H-18'), 1.35 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-9).

IX.1. General procedure for *p*-monoalkylated esters synthesis

Ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (1 eq.) was dissolved in 150 eq. of acetone and K₂CO₃ (3.3 eq.) and the corresponding alkyl bromide (3 eq.) were added, then the mixture was set to reflux for 6 h. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate/HCl, dried over Na₂SO₄

and the solvent removed *in vacuo* to obtain a brown oil which was purified via silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10 to 50:50).

Ethyl 2-hydroxy-4-prenyloxy-6-methylbenzoate (91b)



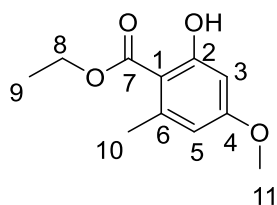
Chemical Formula: C₁₅H₂₀O₄
Molecular Weight: 264,32

The reaction yielded (91b) (269 mg, 100%) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 90:10): Rf0.85.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.31 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 6.27 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3), 5.44 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-12), 4.48 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-11), 4.37 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-8), 2.48 (3H, s, H-10), 1.77 (3H, s, H-14), 1.71 (3H, s, H-14'), 1.39 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-9).

Ethyl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate (91c)



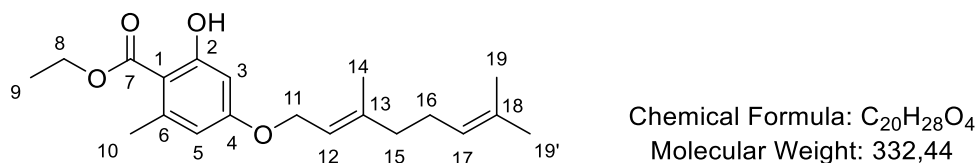
Chemical Formula: C₁₁H₁₄O₄
Molecular Weight: 210,23

The reaction yielded (91c) (132 mg, 82%) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 70:30): Rf0.70

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.83 (1H, s, OH-2), 6.30 (1H, s, H-5), 6.26 (1H, s, H-3), 4.37 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-8), 3.77 (3H, s, H-11), 2.49 (3H, s, H-10), 1.39 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-9).

Ethyl 2-hydroxy-4-geranyloxy-6-methylbenzoate (91d)



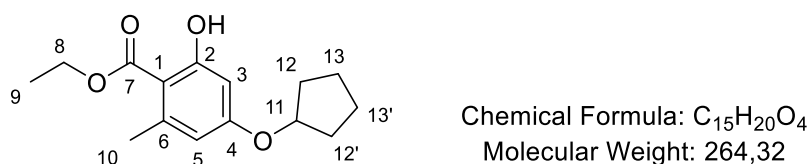
The reaction yielded (**91d**) (252 mg, 59%) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 98:2): R_f0.55.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.82 (1H, s, OH-2), 6.31 (1H, s, H-5), 6.27 (1H, s, H-3), 5.44 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-12), 5.07 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-17), 4.51 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, H-11), 4.37 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-8), 2.48 (3H, s, H-10), 2.14-2.01 (4H, m, H-15,16), 1.71 (3H, s, H-14), 1.66 (3H, s, H-19), 1.59 (3H, s, H-19'), 1.39 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171.9 (C-7), 165.7 (C-4), 163.4 (C-2), 143.2 (C-6), 141.9 (C-13), 132.1 (C-18), 123.1 (C-17), 118.9 (C-12), 111.9 (C-5), 105.4 (C-1), 99.6 (C-3), 65.1 (C-11), 61.6 (C-8), 39.7 (C-15), 26.5 (C-16), 25.8 (C-19), 24.6 (C-10), 17.9 (C-19'), 16.9 (C-14), 14.5 (C-9).

Ethyl 2-hydroxy-4-cyclopentyloxy-6-methylbenzoate (**91e**)

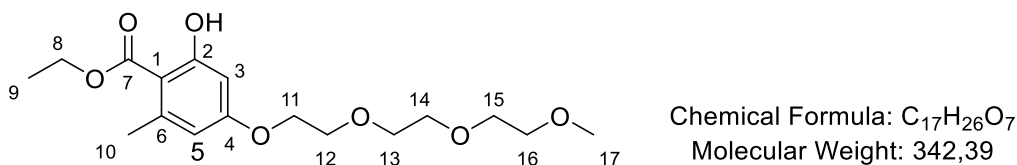


The reaction yielded (**91e**) (400 mg, 87%) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 98:2): R_f0.28.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.82 (1H, s, OH-2), 6.27 (1H, s, H-5), 6.22 (1H, s, H-3), 4.73 (1H, m, H-11), 4.37 (2H, q, *J* = 6.8 Hz, H-8), 2.48 (3H, s, H-10), 1.96-1.54 (8H, m, H-12, H-12', H-13, H-13'), 1.39 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H-9).

ethyl 2-hydroxy-4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-methylbenzoate (**91f**)



The PEG3 derivated ester was synthesised the same way by using the alkyle chloride in DMF. The reaction yielded (**91f**) (158 mg, 46%) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 98:2): Rf0.40.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.81 (1H, s, OH-2), 6.29 (2H, s, H-3,5), 4.37 (2H, q, J = 7.0 Hz, H-8), 4.10 (2H, t, J = 4.6 Hz, H-11), 3.82 (2H, t, J = 4.90 Hz, H-12), 3.73-3.60 (6H, m, H-13, H-14, H-15), 3.53 (2H, t, J = 4.7 Hz, H-16), 3.35 (3H, s, H-17), 2.48 (3H, s, H-10), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-9).

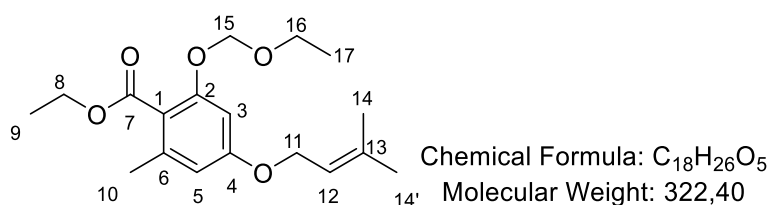
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171.8 (C-7), 165.5 (C-4), 163.0 (C-2), 143.1 (C-6), 111.6 (C-5), 105.5 (C-1), 99.4 (C-3), 72.0 (C-17), 70.9 (C-16), 70.7 (C-16), 70.6 (C-15), 69.4 (C-12), 67.4 (C-11), 61.2 (C-8), 59.0 (C-17), 24.4 (C-10), 14.3 (C-9).

IX.2. General procedure for EOM protection of *p*-monoalkylated esters

To a cooled solution of *p*-alkylated ester (1 eq.) in DCM (130 eq.) were added diisopropylethylamine (4 eq.) and EOMCl (4 eq.) and reaction mixture was stirred overnight. The reaction was then quenched with ice and the mixture was extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 98:2 to 70 :30) gave the desired products as viscous yellowish oils.

Ethyl 2-ethoxymethoxy-4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-methylbenzoate was purified by silica gel column chromatography using 100% ethyl acetate.

Ethyl 2-(ethoxymethoxy)-4-prenyloxy-6-methylbenzoate (**93**)

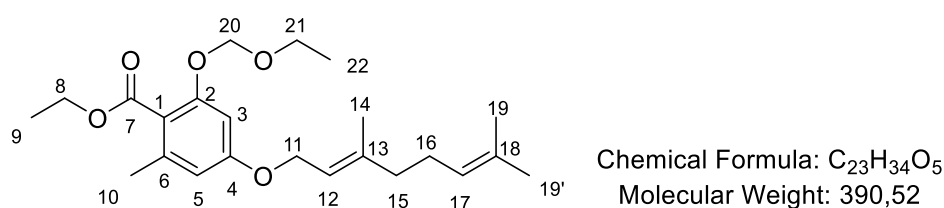


The reaction yielded (**93**) (440 mg, 72%) as a viscous yellowish oil.

TLC (C₅/EtOAc 90:10): R_f0.35.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.59 (1H, s, H-5), 6.39 (1H, s, H-3), 5.46 (1H, t, *J* = 6.7 Hz, H-12), 5.19 (1H, s, H-15), 4.48 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-11), 4.35 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-8), 3.71 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-16), 2.28 (3H, s, H-10), 1.78 (3H, s, H-14), 1.74 (3H, s, H-14'), 1.35 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9), 1.21 (3H, t, *J* = 7.12 Hz, H-17).

Ethyl 2-(ethoxymethoxy)-4-geranyloxy-6-methylbenzoate (**97**)



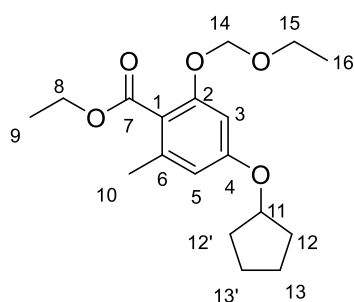
The reaction yielded (**97**) (368 mg, 81%) as a viscous yellowish oil.

TLC (C₅/EtOAc 95:5): R_f0.63.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.58 (1H, s, H-5), 6.38 (1H, s, H-3), 5.45 (1H, t, *J* = 6.6, H-12), 5.17 (1H, s, H-20), 5.09 (1H, t, *J* = 6.1 Hz, H-17), 4.51 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-11), 4.34 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-8), 3.71 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-21), 2.27 (3H, s, H-10), 2.16-2.02 (4H, m, H-15, H-16), 1.72 (3H, s, H-14), 1.67 (3H, s, H-19), 1.59 (3H, s, H-19'), 1.35 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9), 1.20 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-22).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 168.3 (C-7), 160.5 (C-4), 155.9 (C-2), 141.5 (C-6), 137.9 (C-13), 131.9 (C-18), 123.9 (C-17), 119.4 (C-12), 109.5 (C-1), 100.1 (C-5), 93.7 (C-3), 65.1 (C-11), 64.7 (C-21), 60.9 (C-8), 39.7 (C-15), 26.5 (C-16), 25.8 (C-19), 20.0 (C-10), 17.8 (C-19'), 16.8 (C-14), 15.2 (C-22), 14.4 (C-9).

Ethyl 2-(ethoxymethoxy)-4-cyclopentyloxy-6-methylbenzoate (**99**)



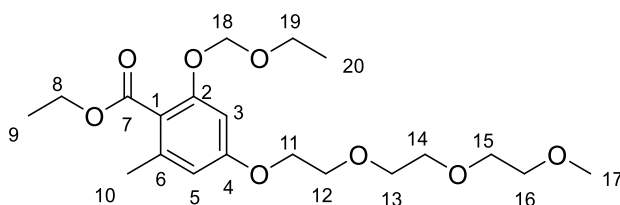
Chemical Formula: C₁₈H₂₆O₅
Exact Mass: 322,18

The reaction yielded (**99**) (409 mg, 84%) as a viscous yellowish oil.

TLC (C₅/EtOAc 90:1): Rf0.50

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.52 (1H, s, H-5), 6.33 (1H, s, H-3), 5.17 (1H, s, H-14), 4.72 (1H, m, H-11), 4.33 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-8), 3.7 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-15), 2.25 (3H, s, H-10), 1.96-1.54 (8H, m, H-12, H12', H13, H13'), 1.33 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9), 1.19 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-16).

Ethyl 2-(ethoxymethoxy)-4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-methylbenzoate (**98**)



Chemical Formula: C₂₀H₃₂O₈
Molecular Weight: 400,47

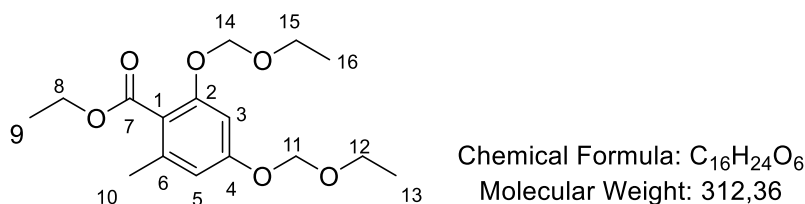
ethyl 2-ethoxymethoxy-4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-methylbenzoate was purified by silica gel column chromatography using 100% ethyl acetate. The reaction yielded (**98**) (149 mg, 84%) as a viscous yellowish oil.

TLC (EtOAc 100%): Rf0.50

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.59 (1H, s, H-5), 6.38 (1H, s, H-3), 5.18 (1H, s, H-18), 4.35 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H-8), 4.10 (2H, t, *J* = 4.7 Hz, H-11), 3.83 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, H-12), 3.75-3.62 (6H, m, H-13, H-14, H-15, H-19), 3.54 (2H, t, *J* = 4.6 Hz, H-16), 3.37 (1H, s, H-17), 2.25 (3H, s, H-10), 1.35 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9), 1.20 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-20).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 168.2 (C-7), 160.4 (C-4), 155.9 (C-2), 138.0 (C-6), 118.0 (C-1), 109.4 (C-5), 100.1 (C-3), 93.7 (C-17), 72.2 (C-16), 71.1 (C-15), 70.9 (C-14), 70.8 (C-13), 69.8 (C-12), 67.7 (C-11), 64.6 (C-19), 61.0 (C-8), 59.3 (C-17), 20.0 (C-10), 15.3 (C-20), 14.5 (C-9).

Ethyl 2,4-bis(ethoxymethoxy)-6-methylbenzoate (100)



To a cooled solution of *p*-alkylated ester (1 eq.) in DCM (100 eq.) were added diisopropylethylamine (5 eq.) and EOMCl (5 eq.) and reaction mass was stirred overnight. The reaction was then quenched with ice, and the mixture was extracted with DCM, dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (EtOAc 100%) gave the desired product as viscous yellowish liquid.

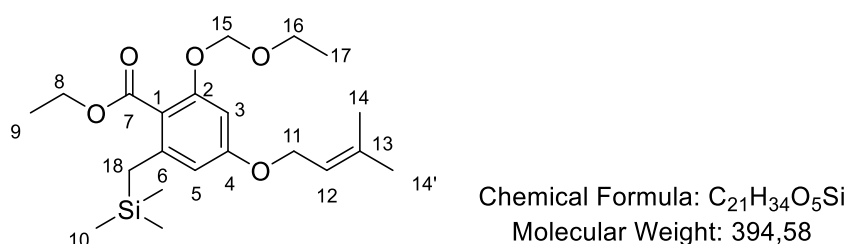
The reaction yielded **(100)**

(332 mg, 83%) as a viscous yellowish oil.

TLC (EtOAc 100%): Rf0.35.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.68 (1H, s, H-5), 6.52 (1H, s, H-3), 5.17 (2H, s, H-11, H-14), 4.34 (2H, q, J = 7.1 Hz, H-8), 3.69 (4H, m, H-12, H-15), 2.26 (3H, s, H-10), 1.78 (3H, s, H-10), 1.34 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-9), 1.19 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-13, H-16).

Ethyl-2-(ethoxymethoxy)-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-6-((trimethylsilyl)methyl)benzoate (249)

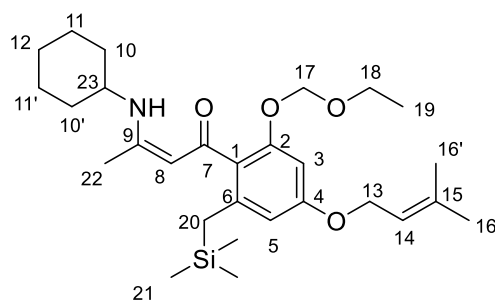


A solution of *n*-BuLi (1.86 mmol, 1.9 M in hexane) was added to DIPA (2.109 mmol) in THF (13 mL) at 0 °C. After stirring for 20 min, the mixture was cooled to -78 °C. A solution of ester (1.241 mmol) in THF (1 mL) was added and an intense red coloration was observed. After stirring for 1 h, redistilled Me₃SiCl (3.722 mmol) was added at -78 °C. After 1 h, water was added to stop the reaction and the reaction mixture was allowed to reach rt. The product was extracted with AcOEt, then dried on Na₂SO₄, the solvent was removed under vacuum and the product was purified by silica gel column chromatography with C₅/AcOEt 98/2 then 96/4. The product (**249**) was obtained with 84% yield as a colorless oil (103 mg).

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.75.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.46 (1H, s, H-5), 6.19 (1H, s, H-3), 5.43 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, Hz, H-12), 5.15 (1H, s, H-15), 4.48 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, H-11), 4.30 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H-8), 3.69 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-16), 2.28 (3H, s, H-10), 2.11 (2H, s, H-18), 1.77 (3H, s, H-14), 1.71 (3H, s, H-14'), 1.33 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9), 1.18 (3H, t, *J* = 7.12 Hz, H-17), 0.01 (9H, s, H-10).

(Z)-3-(cyclohexylamino)-1-(2-(ethoxymethoxy)-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-6-((trimethylsilyl)methyl)phenyl)but-2-en-1-one (255')



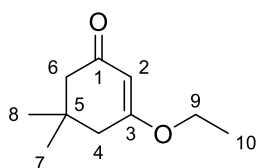
Chemical Formula: C₂₈H₄₅NO₄Si
Molecular Weight: 487,76

To a solution of *N*-isopropylidene cyclohexylamine (94 mg, 0.67 mmol) in THF at 0° LDA (1.3 eq) was added. The reaction mixture was stirred for 30 min then ethyl 2-(ethoxymethoxy)-4-[(3-methylbut-2-en-1-yl)oxy]-6-[(trimethylsilyl)methyl]benzoate (222 mg, 0.56 mmol) was added and the reaction mixture was kept at room temperature overnight. The reaction mixture was quenched with HCl 1M, extracted with DCM, dried (Na₂SO₄) and concentrated under vacuum.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.50.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.11 (1H, d, *J* = 8.6, NH), 6.45 (1H, s, H-5), 6.19 (1H, s, H-3), 5.45 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-14), 5.1 (1H, s, H-17), 5.02 (1H, s, H-8), 4.44 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, H-13), 3.67 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-18), 3.38 (1H, m, H-23), 2.28 (3H, s, H-10), 2.14 (2H, s, H-20), 1.95 (3H, s, H-16), 1.77 (3H, s, H-22), 1.71 (3H, s, H-16'), 1.57 (2H, s, H-12), 1.44-1.26 (4H, m, H-11, H-11'), 1.18 (3H, t, *J* = 4.8 Hz, H-19), 0.01 (9H, s, H-21).

3-ethoxy-5,5-dimethylcyclohex-2-en-1-one (105)



Chemical Formula: C₁₀H₁₆O₂
Molecular Weight: 168,24

To a solution of 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione (2.023 g, 14.43 mmol) in toluene (20 mL) were added *p*-TSA (246 mg, 1.43 mmol, 0.1 eq.) and ethanol (4.2 mL, 72.16 mmol, 5 eq.). The reaction mixture was stirred under reflux for 20 h. The solution was then extracted with EtOAc after addition of saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 50:50), yielded **(105)** (1.868 g, 77%) as light brown oil.

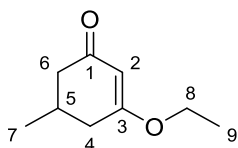
TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.42.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.22 (1H, s, H-2), 3.79 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H-9), 2.16 (2H, s, H-4), 2.08 (2H, s, H-6), 1.25 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10), 0.95 (6H, s, H-8, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 199.4 (C-1), 176.1 (C-3), 101.3 (C-2), 64.1 (C-9), 50.6 (C-6), 42.9 (C-4), 32.3 (C-5), 28.2 (C-7, C-8), 14.0 (C-10).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:169.1, found:169.3.

3-ethoxy-5-methylcyclohex-2-en-1-one (106)



Chemical Formula: C₉H₁₄O₂
Molecular Weight: 154,21

To a solution of 5-methylcyclohexane-1,3-dione (15.85 mmol, 2.00 g) in toluene (22 mL) were added *p*-TSA (270 mg, 1.57 mmol, 0.1 eq.) and ethanol (4.6 mL, 79.27 mmol, 5 eq.). The reaction mixture was stirred under reflux for 20 h. The solution was then extracted with

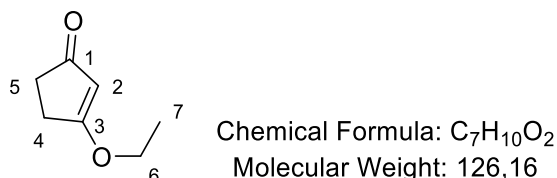
EtOAc after addition of saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 50:50), yielded **(106)** (932 mg, 38%) as light brown oil.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.37.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.28 (1H, s, H-2), 3.79 (2H, m, H-8), 2.36 (2H, d, *J* = 16.5 Hz, H-6), 2.16 (1H, m, H-5), 2.14-1.94 (2H, m, H-4), 1.31 (3H, t, *J* = 17.0 Hz, H-9), 1.02 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 199.8 (C-1), 177.3 (C-3), 102.5 (C-2), 64.3 (C-8), 45.3 (C-6), 37.4 (C-4), 28.9 (C-5), 21.1 (C-7), 14.3 (C-9).

2-ethoxycyclopenten-1-one (107)



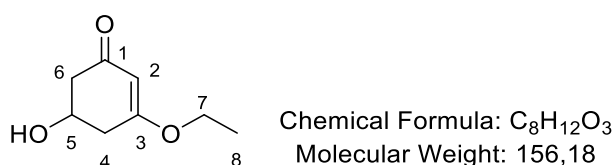
To a solution of cyclopentane-1,3-dione (80 mg, 0.816 mmol) in toluene (5 mL) were added *p*-TSA (14.6 mg, 0.085 mmol) and ethanol (0.24 mL, 4.08 mmol). The solution mixture was stirred under reflux for 20 h. The solution was then extracted with EtOAc after addition of saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 60:40 to 40:60), yielded **(107)** (89 mg, 87%) as light brown oil.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.15.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.24 (1H, s, H-2), 4.0 (2H, q, H-6), 2.56 (2H, t, *J* = 4.9 Hz, H-5), 2.39 (2H, t, *J* = 5.0 Hz, H-4), 1.37 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 206.1 (C-1), 190.2 (C-3), 104.3 (C-2), 67.8 (C-6), 34.1 (C-5), 28.7 (C-4), 32.3 (C-5), 14.2 (C-7).

3-ethoxy-5-hydroxycyclohex-2-en-1-one (109)



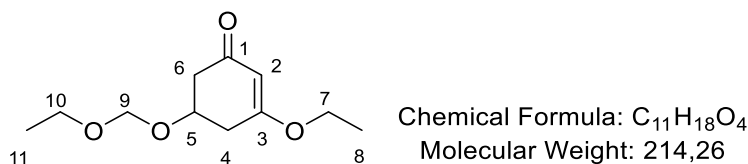
In a 25 mL stainless steel autoclave were introduced phloroglucinol (1.00 g, 6.17 mmol), NaOH (246.7 mg, 6.17 mmol), rhodium 5% on alumina (200 mg, 1.94 mmol) and 6 mL of water. The reactor was purged three times with H₂ (10 bar) and filled with H₂ (40 bar). The reaction was stirred over night, then filtered on celite and ethanol (100 mL) was added. The solution was acidified with 1.3 eq. of saturated HCl (0.67 mL, 8.02 mmol, 12 M) and stirred at room temperature for 3 days. Then 1.2 eq. of NaHCO₃ (6.49 mL, 7.40 mmol, 1.14 M) was added to keep the solution slightly acid. Most of the solvent was removed under vacuum at 30 °C to precipitate the salts, then ethanol was added and the solution was filtrated, then concentrated under vacuum at 30°C until nearly dry. The residual mixture was kept in ethanol and purified first on silica gel column chromatography (Et₂O 100%) to remove most of the impurities, then a second purification (Et₂O 100% to Et₂O/EtOH 90:10) was performed to get 391 mg of pure product (**109**) (41%) as a white solid. This particular procedure was set to avoid the polymerization of the reaction mixture with classic conditions of workup.

TLC (EtOAc 100%): Rf0.20.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.38 (1H, s, H-2), 4.35 (1H, m, H-5), 3.90 (2H, m, H-7), 2.74-1.41 (4H, m, H-4, H-6), 1.94 (1H, s, OH-5), 1.36 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 197.2 (C-1), 174.6 (C-3), 102.8 (C-2), 65.5 (C-7), 64.7 (C-5), 45.7 (C-6), 32.3 (C-5), 37.8 (C-4), 14.1 (C-8).

3-ethoxy-5-(ethoxymethoxy)cyclohex-2-en-1-one (**115**)



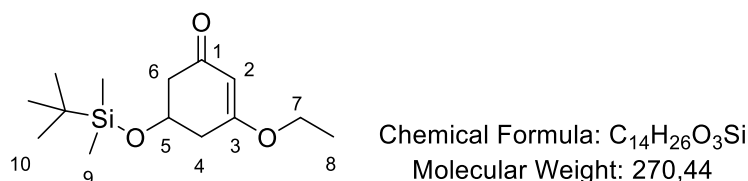
To a cooled solution of 3-ethoxy-5-hydroxycyclohex-2-en-1-one (100 mg, 0.640 mmol) in DCM (6 mL) were added diisopropylethylamine (0.423 mL, 2.56 mmol, 4 eq.) and EOMCl (0.240 mL, 2.56 mmol, 4 eq.) and reaction mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with ice, and the reactionmixture was extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 50 :50) gave the desired product (**115**) as a clear oil (109 mg, 79%).

TLC (EtOAc 100%): Rf0.50.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.36 (1H, s, H-2), 4.69 (1H, s, H-9), 4.19 (1H, m, H-5), 3.90 (2H, m, H-7), 3.56 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-10) 2.74-1.46 (4H, m, H-4, H-6), 1.34 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-8), 1.36 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 197.0 (C-1), 174.6 (C-3), 103.1 (C-2), 93.9 (C-9), 70.74 (C-5), 64.7 (C-7), 63.7 (C-10), 43.5 (C-6), 36.0 (C-4), 15.3 (C-8), 14.29 (C-11).

3-ethoxy-5-(*tert*-butyldimethylsilyl)cyclohex-2-en-1-one (**116**)



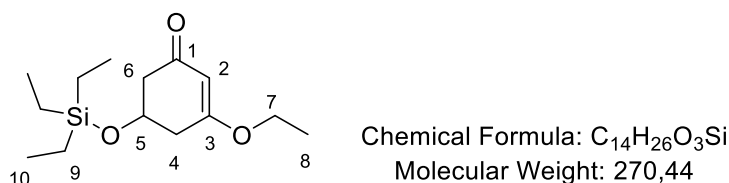
3-ethoxy-5-hydroxycyclohex-2-en-1-one (100 mg, 0.64 mmol, 1 eq.) was dissolved in 6 mL of DCM then imidazole (65.4 mg, 0.96 mmol, 1.5 eq.) and TBSCl (0.166 mL, 0.96 mmol, 1.5 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched with water, and the reaction mixture was extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 80:20) gave the desired product (**116**) as a clear oil (150 mg, 87%).

TLC (EtOAc 100%): R_f0.63.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.34 (1H, s, H-2), 4.22 (1H, m, H-5), 3.88 (2H, q, *J* = 6.8 Hz, H-7) 2.62-2.34 (4H, m, H-4, H-6), 1.35 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-8), 0.85 (9H, s, H-10), 0.50 (6H, s, H-9).

3-ethoxy-5-(triethylsilyl)cyclohex-2-en-1-one (**117**)

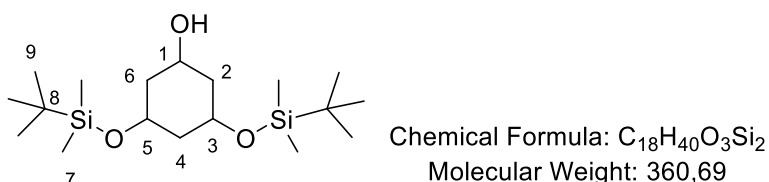
3-ethoxy-5-hydroxycyclohex-2-en-1-one (311 mg, 1.99 mmol, 1 eq.) was dissolved in 6 mL of DCM then imidazole (271.1 mg, 3.98 mmol, 2 eq.) and TESCl (0.675 mL, 3.98 mmol, 2 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched with water and the mixture was extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 80:20 to 70:30) gave the desired product (**117**) as a clear oil (524 mg, 97%).



TLC (EtOAc 100%): Rf0.65.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.34 (1H, s, H-2), 4.21 (1H, m, H-5), 3.88 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-7) 2.61-2.35 (4H, m, H-4, H-6), 1.35 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-8), 0.92 (9H, t, *J* = 8.0 Hz, H-10), 0.57 (6H, q, *J* = 7.9 Hz, H-9).

3,5-bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-cyclohexan-1-ol (132)



(*cis*- and *trans*- mixture)-phloroglucitol (500 mg, 3.78 mmol, 1 eq.), TBSCl (1.64 mL, 9.46 mmol, 2.5 eq.) then imidazole (643.9 mg, 9.46 mmol, 2.5 eq.) were introduced in a flask with 15 mL of DMF and the reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. The reaction was quenched with water and the mixture was extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/Et₂O 98:2) gave two stereoisomers, a clear oil (331 mg) and a white solid (384 mg) with a global yield of 52%.

Isomer 1 (clear oil) :

TLC (C₅/Et₂O 80:20): Rf0.25.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.22 (1H, s, H-1), 3.98 (2H, m, H-3, 5), 2.14-1.20 (6H, m, H-2, 4, 6), 0.86 (18H, s, H-9), 0.04 (8H, s, H-7).

Isomer 2 (white solid):

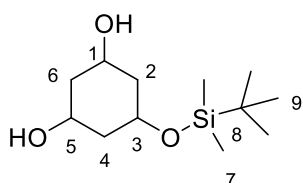
TLC (C₅/Et₂O 80:20): Rf0.15.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.56 (3H, m, H-1, H-13, H-15), 2.14-1.20 (6H, m, H-2, H-14, 6), 0.86 (18H, s, H-9), 0.04 (8H, s, H-7).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 66.7 (C-3, C-5), 66.4 (C-1), 45.2 (C-2, C-6), 44.9 (C-4), 26.1 (C-10), 18.4 (C-8), 4.43 (C-7).

(Isomer 3 was not isolated)

3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-cyclohexan-1-ol (**131**)



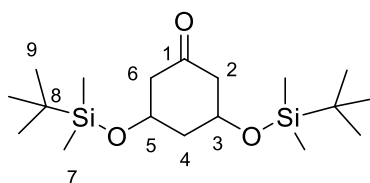
Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si}$
Molecular Weight: 246,42

(*cis*- and *trans*- mixture)-phloroglucitol (300 mg, 2.27 mmol, 1 eq.), TBSCl (0.196 mL, 1.14 mmol, 0.5 eq.) and imidazole (77.3 mg, 1.14 mmol, 0.5 eq.) were introduced in a flask with 9 mL of DMF then the reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. The reaction was quenched with water, and the mixture was extracted with Et_2O , dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (EtOAc 100%) to afford the desired product (**131**) with 60% yield

TLC (EtOAc/MeOH 90 :10): Rf0.30.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.38-3.72 (3H, m, H-1, H-3, H-5), 2.33-1.20 (6H, m, H-2, H-4, H-6), 0.88 (9H, s, H-9), 0.04 (4H, s, H-7).

3,5-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-cyclohexan-1-one (**140**)



Chemical Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{Si}_2$
Molecular Weight: 358,67

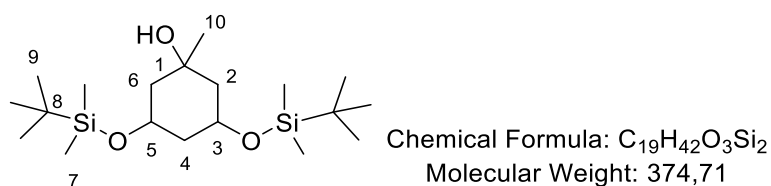
3,5-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-cyclohexan-1-ol (120 mg, 0.33 mmol, 1 eq.) and PCC on alumina (143.4 mg, 0.67 mmol, 2 eq.) were introduced in a flask with 2 mL of DCM. The reaction mixture was set to reflux for 20 min, then filtered on celite, concentrated under vacuum and purified on silica gel column chromatography ($\text{C}_5/\text{Et}_2\text{O}$ 96/4) to obtain the desired product (**140**) as a white solid.

TLC (C₅/AcOEt 80:20): R_f0.75.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.80 (2H, m, H-3, H-5), 2.59-2.22 (4H, m, H-2, H-6), 1.56 (1H, s, H-4), 0.88 (18H, s, H-9), 0.06 (8H, d, *J* = 6.2 Hz, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 207.7 (C-1), 66.0 (C-3, C-5), 51.1 (C-2, C-6), 45.2 (C-4), 25.9 (C-9), 18.3 (C-8), 4.5 (C-7).

1-methyl-3,5-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-cyclohexan-1-ol (136)



3,5-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-cyclohexan-1-one (97 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) was introduced in a flask with 2 mL THF and cooled to 0 °C. MeMgBr (0.10 mL, 0.30 mmol, 3 M, 1.1 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The reaction was quenched with aqueous NH₄Cl solution, extracted with DCM then EtOAc, dried, concentrated under vacuum and the mixture was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 98:2 to 90:10) to obtain two stereoisomeres as a clear oil (40 mg, 39%) and a white solid (39 mg, 38%).

Isomer 1 (Clear oil):

TLC (C₅/EtOAc 90:10): R_f0.40.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.91 (2H, m, H-3, H-5), 2.11-1.17 (6H, m, H-2, H-4, H-6), 1.23 (1H, s, H-10), 0.86 (18H, s, H-9), 0.04 (8H, s, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 71.6 (C-1), 66.7 (C-3, C-5), 47.9 (C-2, C-6), 45.7 (C-4), 32.1 (C-10), 26.1 (C-8), 18.4 (C-8), 4.4 (C-7).

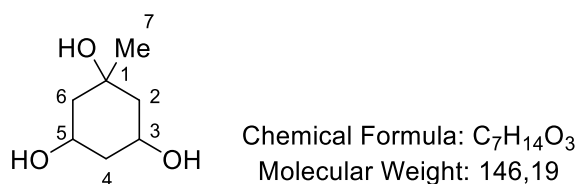
Isomer 2 (white solid) :

TLC (C₅/EtOAc 90:10): R_f0.25.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.72 (1H, m, H-1), 2.07-1.40 (6H, m, H-2, H-4, H-6), 1.14 (1H, s, H-10), 0.86 (18H, s, H-9), 0.04 (8H, s, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 69.7 (C-1), 67.1 (C-3, C-5), 48.3 (C-2, C-6), 44.2 (C-4), 28.2 (C-10), 25.9 (C-8), 18.2 (C-8), 4.7 (C-7).

1-methyl-3,5-dihydroxycyclohexan-1-ol (135)



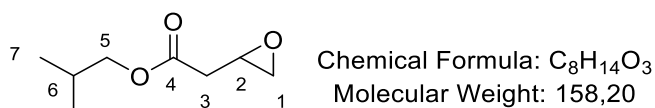
To a solution of substrat (**136**) (0.11 mmol) in THF (1 mL) 1 M solution of tetrabutyl ammonium fluoride (1 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. After the starting material was fully consumed as judged by TLC analysis, silica gel was added, and the reaction mixture was evaporated to dryness to give the crude product mixture on silica gel, which was then purified by silicagel column chromatography with DCM/MeOH 90:10 then 70:30.

TLC (EtOAc 100%): Rf0.30.

¹H NMR (400 MHz, CH₃OD) δ = 3.66-3.20 (5H, m, H-3, H-5, OH-1, OH-3, OH-5), 2.17-1.19 (6H, m, H-2, H-4, H-6), 1.08 (1H, s, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CH₃OD) δ = 70.6 (C-1), 66.8 (C-3, C-5), 49.5 (C-2, C-6), 45.5 (C-4), 27.7 (C-7).

Isobutyl 2-(oxiran-2-yl)acetate (176)

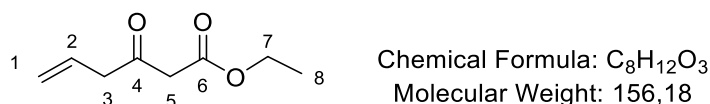


2-methylpropyl but-3-enoate (500 mg, 3.52 mmol, 1 eq.) and *m*-CPBA (2.25 ml, 5.63 mmol, 1.6 eq.) were introduced in a flask with 15 mL DCM, and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with water, extracted with DCM, dried, concentrated under vacuum and the mixture was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 98:2 to 90:10) to obtain (**176**) as a clear oil (484 mg, 87%)

TLC (C₅/EtOAc 80:20): Rf0.51.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.71 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, H-5), 3.08 (1H, m, H-2), 2.68-2.30 (4H, m, H-1, H-3), 1.74 (1H, m, H-6), 0.73 (6H, s, H-7).

Ethyl 3-oxohex-5-enoate (182)

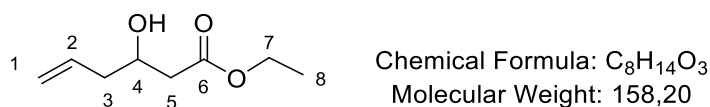


aluminum trichloride (53.3 mg, 0.40 mmol, 0.4 eq.) was added at once to a solution of zinc powder (261.6 mg, 4.0 mmol, 4 eq.), ethyl cyanoacetate (113.1 mg, 1.0 mmol, 1 eq.) and allyl bromide (0.131 mL, 1.5 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous THF (5 mL) at 0 °C (ice-water bath). The reaction mixture was warmed to room temperature and then stirred at room temperature. After the reaction was completed (monitored by TLC), aqueous HCl solution (1 M, 5 mL) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 5 minutes. The reaction mixture was filtered, then extracted with diethyl ether. Purification on silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 9:1 then 8:2) gave the desired product (**182**) (96% yield, 150 mg) as a yellowish oil.

TLC (C₅/EtOAc 70:30): Rf0.67.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.90 (1H, m, H-2), 5.20 (2H, m, H-1), 4.19 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H-7), 3.45 (2H, s, H-5), 3.3 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-3), 1.27 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-8).

Ethyl 3-hydroxyhex-5-enoate (**181**)

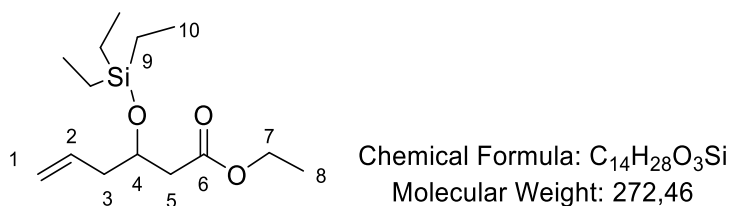


Ethyl 3-oxohex-5-enoate (150 mg, 0.96 mmol, 1 eq.) and NaBH₄ (18.2 mg, 0.48 mmol, 0.5 eq.) were introduced in a flask with 6 mL EtOH and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was extracted with DCM, concentrated under vacuum and the mixture was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10) to obtain (**181**) as a yellowish oil (124 mg, 82%).

TLC (C₅/EtOAc 80:20): Rf0.55.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.80 (1H, m, H-2), 5.11 (2H, m, H-1), 4.15 (2H, q, *J* = 7.2, H-7), 4.06 (1H, m, H-4), 2.54-2.36 (2H, m, H-5), 2.26 (2H, q, *J* = 6.3 Hz, H-3), 1.25 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, H-8).

Ethyl 3-(triethylsilyl)oxyhex-5-enoate (183)

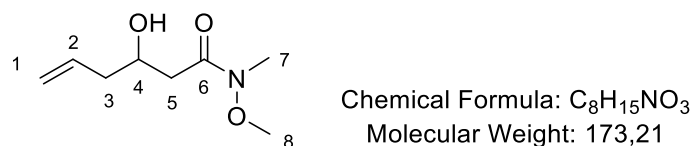


Ethyl 3-hydroxyhex-5-enoate (100 mg, 0.63 mmol, 1 eq.) and imidazole (163.5 mg, 2.4 mmol, 3.8 eq.) were added to a flask with DCM (4 mL) at 0 °C, then TESCl (0.428 mL, 2.53 mmol, 4 eq.) was added dropwise, and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with water and extracted with DCM, dried over anhydrous Na₂SO₄ and the mixture was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 96:4) to give the desired compound (**183**) (111 mg, 64%).

TLC (C₅/EtOAc 80:20): R_f0.80.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.78 (1H, m, H-2), 5.05 (2H, m, H-1), 4.19 (1H, m, H-4), 4.1 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-7), , 2.41 (2H, t, *J* = 5.6 Hz, H-5), 2.26 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-3), 1.23 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-8), 0.92 (9H, t, *J* = 7.9 Hz, H-10), 0.58 (6H, t, *J* = 7.9 Hz, H-9).

3-hydroxy-*N*-methoxy-*N*-methylhex-5-enamide (185)

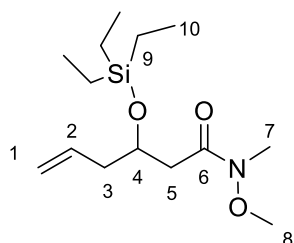


A THF solution of *i*-PrMgCl (10 mL, 20.0 mmol, 5 eq., 2.0 M) was added to a mixture of ester (633.0 mg, 4.00 mmol, 1 eq.), *N,O*-dimethyl hydroxyamine hydrochloride (975.5 mg, 10.00 mmol) and THF (20 mL) over 5 min. The solution was maintained at 0 °C for 3 h, then poured into cold saturated aqueous NH₄Cl solution (50mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted several times with CH₂Cl₂, the combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered, and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 50:50) to obtain the desired product (**185**) as a clear oil (707 mg, 100%)

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.15.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.82 (1H, m, H-2), 5.11 (2H, m, H-1), 4.09 (1H, m, H-4), 3.66 (3H, s, H-8), 3.17 (3H, s, H-7), 2.72-2.40 (2H, m, H-3), 2.28 (2H, m, H-5).

3-((triethylsilyl)oxy)-*N*-methoxy-*N*-methylhex-5-enamide (187)



Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_3\text{Si}$

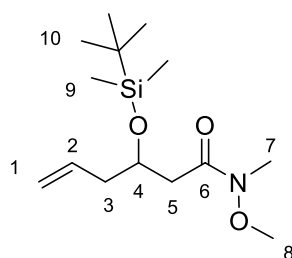
Molecular Weight: 287,48

3-hydroxy-*N*-methoxy-*N*-methylhex-5-enamide (707 mg, 4.08 mmol, 1 eq.) and imidazole (1.06 g, 15.51 mmol, 3.8 eq.) were added to a flask with DCM (20 mL) at 0 °C, then TESCl (2.77 mL, 16.33 mmol, 4 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with water and extracted with DCM, dried over anhydrous Na_2SO_4 and the mixture was purified by silica gel column chromatography (C_5/EtOAc 90:10) to give the desired compound (**187**) (949 mg, 81%).

TLC (C_5/EtOAc 90:10): R_f 0.25.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.82 (1H, m, H-2), 5.06 (2H, m, H-1), 4.29 (1H, m, H-4), 3.66 (3H, s, H-8), 3.15 (3H, s, H-7), 2.72-2.37 (2H, m, H-3), 2.28 (2H, t, J = 6.2 Hz, H-5), 0.92 (9H, t, J = 7.7 Hz, H-10), 0.58 (6H, q, J = 7.9 Hz, H-9).

3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-*N*-methoxy-*N*-methylhex-5-enamide (186)



Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_3\text{Si}$

Molecular Weight: 287,48

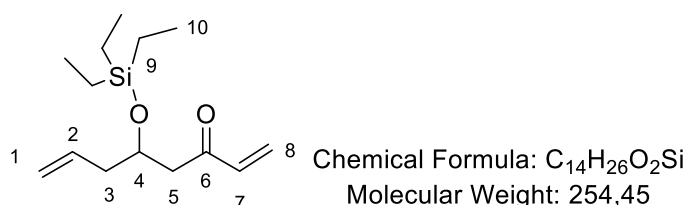
3-hydroxy-*N*-methoxy-*N*-methylhex-5-enamide (145 mg, 0.84 mmol, 1 eq.), imidazole (216.6 mg, 3.18 mmol, 3.8 eq.) and DMAP (9.84 mg, 0.08 mmol, 0.10 eq.) were added to a flask with DCM (4 mL) at 0 °C, then TBSCl (0.60 mL, 3.35 mmol, 4 eq.) was added dropwise, and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with water and extracted with DCM, dried over anhydrous Na_2SO_4 and the mixture was purified by silica gel

column chromatography (C₅/EtOAc 90:10) to give the desired compound (**186**) (207 mg, 86%).

TLC (C₅/EtOAc 80:20): R_f0.63.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.82 (1H, m, H-2), 5.06 (2H, m, H-1), 4.29 (1H, m, H-4), 3.66 (3H, s, H-8), 3.15 (3H, s, H-7), 2.74-2.34 (2H, m, H-3), 2.28 (2H, q, *J* = 6.2 Hz, H-5), 0.84 (9H, s, H-10), 0.04 (4H, d, *J* = 15.7 Hz, H-9).

5-((triethylsilyloxy)octa-1,7-dien-3-one (**189**))



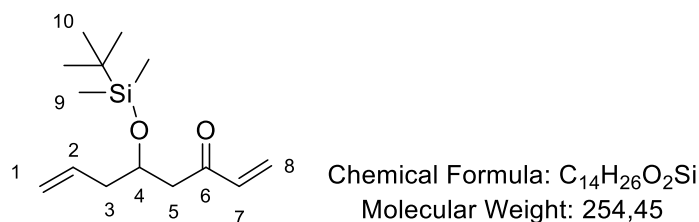
A THF solution of bromo(prop-2-en-1-yl)magnesium (0.866 mL, 1 M, 0.87 mmol, 3 eq.) was added to a 0 °C solution of amide (83 mg, 0.28 mmol, 1 eq.) and THF (2 mL) over 5 min. The solution was maintained at 0 °C for 30 min then the solution was poured into cold saturated aqueous NH₄Cl solution (5 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM several times. The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10) to give the desired compound (**189**) (65 mg, 99%).

TLC (C₅/EtOAc 90:10): R_f0.63.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.20 (2H, m, H-7), 5.82 (2H, m, H-2, 7), 5.06 (2H, m, H-1), 4.29 (1H, m, H-4), 2.69 (2H, m, H-3), 2.26 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-5), 0.91 (9H, t, *J* = 7.9 Hz, H-10), 0.56 (6H, q, *J* = 7.8 Hz, H-9).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 199.7 (C-6), 137.6 (C-7), 134.5 (C-2), 128.5 (C-8), 117.9 (C-1), 68.7 (C-4), 46.7 (C-3), 42.6 (C-5), 7.03 (C-9), 5.15 (C-10).

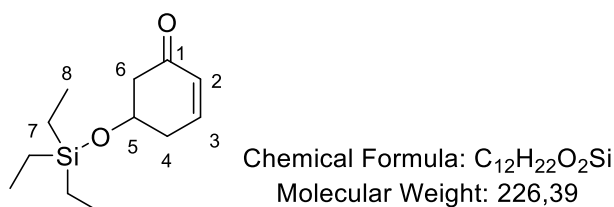
5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)octa-1,7-dien-3-one (188)



A THF solution of bromo(prop-2-en-1-yl)magnesium (2.16 mL, 1 M, 0.72 mmol, 3 eq.) was added to a 0 °C solution of amide (207 mg, 0.72 mmol, 1 eq.) and THF (5 mL) over 5 min. The solution was maintained at 0 °C for 30 min then was poured into cold saturated aqueous NH₄Cl solution (5 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM several times, the combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10) to give the desired compound (**188**) (136 mg, 74%).

TLC (C₅/EtOAc 90:10): R_f0.65.

5-((triethylsilyl)oxy)cyclohex-2-en-1-one (173b)



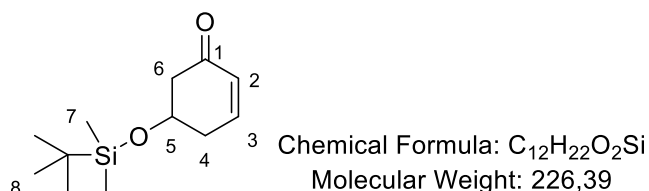
5-((triethylsilyl)oxy)octa-1,7-dien-3-one (64 mg, 0.25 mmol, 1 eq.) was introduced in a conical flask with 12 mL of DCM. Argon was forced into the mixture via a syringe for one minute, then the Grubbs I catalyst (4.15 mg, 0.005 mmol, 0.02 eq.) was added and the reaction mixture was set to reflux overnight under argon atmosphere. The residue was concentrated and purified by silica gel column chromatography (C₅/Et₂O 90:10 to 80:20) to give the desired cyclohexanone (**173b**) (56.9 mg, 100%).

TLC (C₅/Et₂O 80:20): R_f0.33.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.88 (1H, m, H-3), 6.05 (1H, dt, *J* = 10.1 Hz, 1.9 Hz, H-1), 4.21 (1H, m, H-5), 2.71-2.34 (4H, m, H-4, 6), 0.95 (9H, t, *J* = 7.9 Hz, H-9), 0.59 (6H, q, *J* = 8.0 Hz, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 198.8 (C-1), 147.1 (C-3), 130.4 (C-2), 67.6 (C-5), 48.4 (C-6), 35.9 (C-4), 6.9 (C-7), 5.0 (C-8).

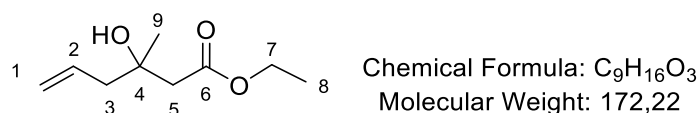
5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)cyclohex-2-en-1-one (**173a**)



5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)octa-1,7-dien-3-one (136 mg, 0.53 mmol, 1 eq.) was introduced in a conical flask with 25 mL of DCM. Argon was forced into the mixture via a syringe for one minute, then the Grubbs I catalyst (8.80 mg, 0.01 mmol, 0.02 eq.) was added and the reaction mixture was set to reflux overnight under argon atmosphere. The residue was concentrated and purified by silica gel column chromatography ($\text{C}_5/\text{Et}_2\text{O}$ 90:10 to 80:20) to give the desired cyclohexenone (**173a**) (119.8 mg, 99%).

TLC (C_5/EtOAc 90:10): Rf0.37.

ethyl 3-hydroxy-3-methylhex-5-enoate (**192**)

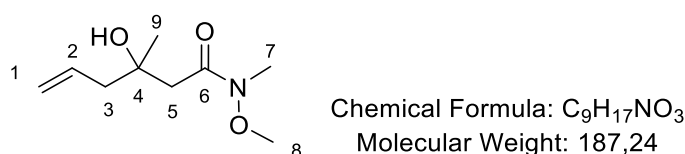


Aluminum trichloride (409.8 mg, 3.07 mmol, 0.4 eq.) was added at once to a solution of zinc powder (2.01 g, 30.74 mmol, 4 eq.), ethyl acetoacetate (1.00 g, 7.68 mmol, 1 eq.) and allyl bromide (1.00 mL, 11.53 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous THF (28 mL) at 0 °C (ice-water bath). The reaction mixture was warmed to room temperature and then stirred at room temperature. After the reaction was completed (monitored by TLC), aqueous solution of HCl (1 M, 5 mL) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 5 minutes. The reaction mixture was filtered, then extracted with diethyl ether. Purification on silica gel column chromatography (C_5/EtOAc 90:10) gave the desired product (**192**) (1.042 g, 79%).

TLC (C_5/EtOAc 0:10): Rf0.3.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.82 (1H, m, H-2), 5.07 (2H, tm, *J* = 13.6 Hz, H-1), 4.14 (2H, q, *J* = 7.3 Hz, H-7), 2.43 (2H, dd, *J* = 38.5 Hz, 15.3 Hz, H-4), 2.25 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-3), 1.25 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, H-8), 1.21 (3H, m, H-9).

3-hydroxy-*N*-methoxy-*N*,3-dimethylhex-5-enamide (193)

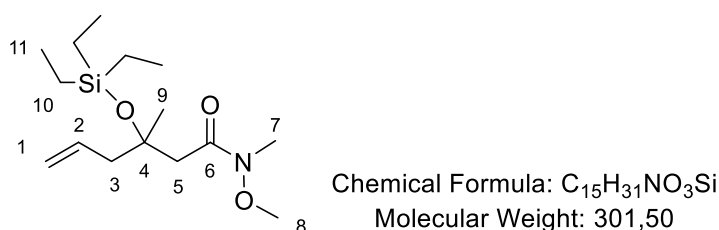


A THF solution of *i*-PrMgCl (18.17 mL, 36.35 mmol, 5 eq., 2.0 M) was added to a 0 °C mixture of ester (1.15 g, 7.27 mmol, 1 eq.), *N*,*O*-dimethyl hydroxyamine hydrochloride (1.77 g, 18.17 mmol, 2.5 eq.), and THF (34 mL) over 5 min. The solution was maintained at 0 °C for 3 h, then poured into cold saturated aqueous NH₄Cl solution (20 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted several times with CH₂Cl₂, the combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered, and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 50:50) to obtain the desired product (193) as a clear oil (707 mg, 100%)

TLC (C₅/EOAc 60:40): R_f0.42.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.86 (1H, m, H-2), 5.06 (2H, m, H-1), 3.65 (3H, s, H-8), 3.17 (3H, s, H-7), 2.55 (2H, dd, *J* = 35.5, 16.0 Hz, H-3), 2.30 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, H-5), 1.22 (3H, s, H-9).

N-methoxy-*N*,3-dimethyl-3-((triethylsilyl)oxy)hex-5-enamide (194)



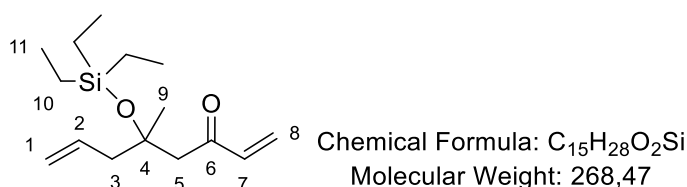
3-hydroxy-*N*-methoxy-*N*,3-dimethylhex-5-enamide (1.10 g, 6.83 mmol, 1 eq.), imidazole (1.30 g, 19.14 mmol, 2.8 eq.) and DMAP (80.37 mg, 0.66 mmol, 0.10 eq.) were added to a flask with DCM (30 mL) at 0 °C, then TESCl (3.47 mL, 20.51 mmol, 3 eq.) was added

dropwise, and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction was quenched with water and extracted with DCM, dried over anhydrous Na_2SO_4 and the mixture was purified by silica gel column chromatography (C_5/EtOAc 90:10) to give the desired compound (**194**) (1.62 g, 83%).

TLC (C_5/EtOAc 80:20): R_f 0.45.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.87 (1H, m, H-2), 5.05 (2H, m, H-1), 3.65 (3H, s, H-8), 3.14 (3H, s, H-7), 2.68-2.32 (4H, m, H-3, H-5), 1.37 (1H, s, H-9), 0.92 (9H, t, J = 7.5 Hz, H-10), 0.57 (4H, q, J = 7.7 Hz, H-9).

5-methyl-5-((triethylsilyl)oxy)octa-1,7-dien-3-one (**195**)

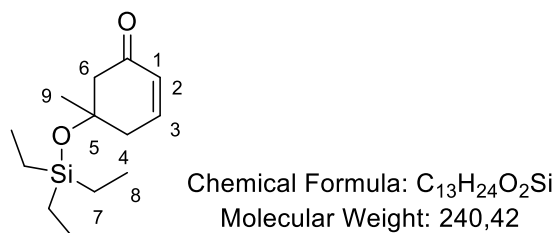


A THF solution of bromo(prop-2-en-1-yl)magnesium (5.76 mL, 1 M, 5.76 mmol, 3 eq.) was added to a 0 °C solution of amide (579 mg, 1.92 mmol, 1 eq.) and THF (14 mL) over 5 min. The solution was maintained at 0 °C for 30 min. The solution was poured into cold saturated aqueous NH_4Cl solution (10 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with DCM several times, the combined organic layers were dried (Na_2SO_4), filtered, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (C_5/EtOAc 98:2 to 70:30) to give the desired compound (**195**) (368 mg, 71%).

TLC (C_5/EtOAc 80:20): R_f 0.50.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.40 (1H, dd, J = 17.5 Hz, 10.4 Hz, H-8), 6.16 (1H, dd, J = 17.4 Hz, 1.4 Hz, H-8'), 5.85 (1H, m, H-2), 5.71 (1H, dd, J = 10.4 Hz, 1.3, H-7), 5.06 (2H, m, H-1), 2.66 (2H, dd, J = 80.6 Hz, 13.2 Hz, H-3), 2.32 (2H, m, H-5), 1.31 (3H, s, H-9), 0.91 (9H, t, J = 8.1 Hz, H-11), 0.56 (6H, q, J = 7.5 Hz, H-10).

5-methyl-5-((triethylsilyl)oxy)cyclohex-2-en-1-one (196)



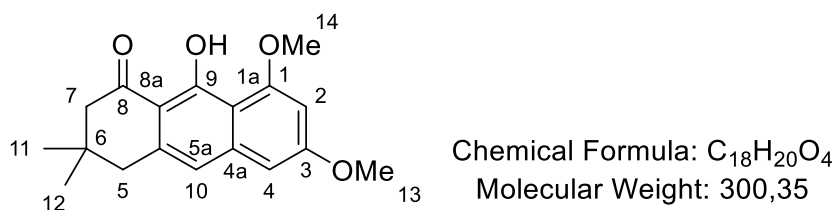
5-methyl-5-((triethylsilyl)oxy)octa-1,7-dien-3-one (368 mg, 1.37 mmol, 1 eq.) was introduced in a conical flask with 65 mL DCM. Argon was forced into the mixture via a syringe for one minute, then the Grubbs I catalyst (45.12 mg, 0.055 mmol, 0.04 eq.) was added and the reaction mixture was set to reflux overnight under argon atmosphere. The residue was concentrated and purified by silica gel column chromatography (C₅/Et₂O 90:10 to 80:20) to give the desired cyclohexenone (**196**) (276.8 mg, 84%).

TLC (C₅/Et₂O 80:20): Rf0.30.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.80 (1H, m, H-3), 6.03 (1H, dt, *J* = 10.2 Hz, 2.0 Hz, H-1), 2.62-2.40 (4H, m, H-4, 6), 1.33 (1H, s, H-9), 0.89 (9H, t, *J* = 7.8 Hz, H-8), 0.53 (6H, q, *J* = 7.8 Hz, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 199.1 (C-1), 147.0 (C-3), 129.3 (C-2), 74.5 (C-5), 53.5 (C-6), 41.7 (C-4), 29.2 (C-9), 7.2 (C-7), 6.8 (C-8).

9-hydroxy-6,8-dimethoxy-3,3-dimethyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (201a)



19 mL of dry THF were introduced in a flame dried flask under argon and cooled at -20 °C. DIPA (0.7 mL, 5.137 mmol, 3.6 eq.) was then added, followed by *n*-BuLi solution in hexane (3.1 mL, 5.0 mmol, 3.5 eq, 1.6 M). The reaction mixture was stirred 10 min at -20 °C then cooled to -78 °C prior to addition of ester (300 mg, 1.42 mmol) in 2 mL of dry THF. A deep red coloration was observed and the solution was stirred for 10 more min at -78°C. Then cyclohexenone (480 mg, 2.85 mmol, 2 eq) dissolved in 2 mL of dry THF was added dropwise over 5 min to the solution, and the color switched to brown then orange. The reaction mixture

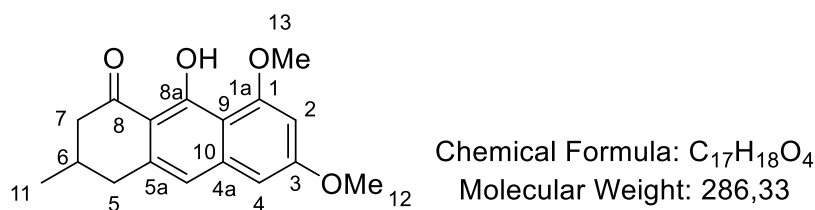
was stirred 15 more min at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and allowed to warm to room temperature for 3 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc after addition of aqueous solution of HCl (1 M). The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C_5/EtOAc 80:20) yielded **(201a)** (230.8 mg, 54%) as a yellow amorphous solid.

TLC (C_5/EtOAc 80:20): Rf0.41.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 15.18 (1H, s, OH-9), 6.84 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-4), 6.43 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2), 4.00 (3H, s, H-14), 3.91 (3H, s, H-13), 2.79 (2H, s, H-5), 2.55 (2H, s, H-7), 1.08 (6H, s, H-11, H-12).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 203.6 (C-8), 165.7 (C-9), 162.0 (C-1), 161.3 (C-3), 142.0 (C-5a), 138.6 (C-4a), 116.6 (C-10), 109.8 (C-8a, C-1a), 98.9 (C-4), 97.8 (C-2), 56.1 (C-14), 55.4 (C-13), 52.0 (C-7), 43.8 (C-5), 32.8 (C-6), 28.0 (C-12, C-11).

9-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (**202**)



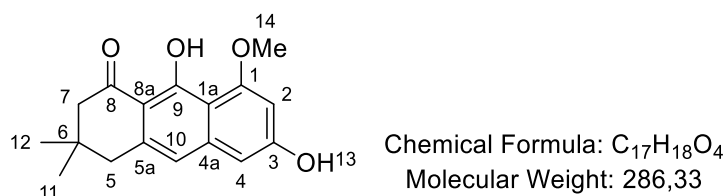
15 mL of dry THF was introduced in a flame dried flask under argon and cooled at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. DIPA (0.63 mL, 4.45 mmol, 3.6 eq.) was then added, followed by *n*-BuLi solution in hexane (2.7 mL, 4.33 mmol, 3.5 eq., 1.6 M). The reaction mixture was stirred 10 min at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ then cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to addition of ester (260 mg, 1.24 mmol) in 2 mL of dry THF. A deep red coloration was observed and the solution was stirred for 10 more min at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then cyclohexenone (381 mg, 2.47 mmol, 2 eq) dissolved in 2 mL of dry THF, was added dropwise over 5 min to the solution, and the color switched to brown then orange. The reaction mixture was stirred 15 more min at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ then allowed to warm to room temperature for 3 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc after addition of an aqueous solution of HCl (1 M). The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C_5/EtOAc 80:20) yielded **(202)** (163.4 mg, 46%) as a yellow amorphous solid.

TLC (C_5/EtOAc 80:20): Rf0.41.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.20 (1H, s, OH-9), 6.82 (1H, s, H-10), 6.54 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-4), 6.41 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 3.98 (3H, s, H-13), 3.90 (3H, s, H-12), 2.95 (1H, br d, *J* = 15.6 Hz, H-5), 2.75 (1H, br d, *J* = 16.7 Hz, H-5), 2.63 (1H, dd, *J* = 15.8 Hz, 10.7 Hz, H-7), 2.40 (1H, dd, *J* = 16.9 Hz, 11.3 Hz, H-7), 2.23 - 2.35 (1H, m, H-6), 1.13 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.8 (C-8), 165.8 (C-9), 162.0 (C-1), 161.3 (C-3), 141.9 (C-5a), 139.4 (C-4a), 115.9 (C-10), 110.4 (C-8a, C-1a), 98.9 (C-4), 97.8 (C-2), 56.1 (C-13), 55.4 (C-12), 46.6 (C-7), 38.3 (C-5), 29.7 (C-6), 21.1 (C-11).

6,9-dihydroxy-3,3,8-trimethyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (204)

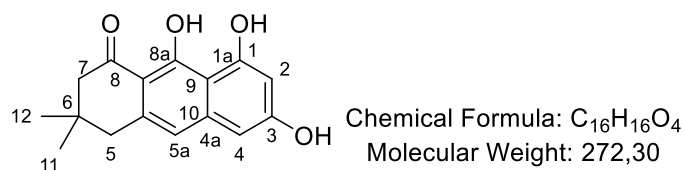


To a solution of **(201a)** (50 mg, 0.166 mmol) in acetic acid (2 mL) was added 1.0 mL of an aqueous solution of HBr (48%). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, then heated at microwave from 50 °C to 70 °C. When the reaction was over (monitored by TLC), it was quenched with H₂O. The aqueous solution was then extracted with EtOAc, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by semipreparative HPLC (H₂O/AcOEt 20:80 to 0:100 in 30 min, 20 mL/min) to yield **(204)** (9 mg, 19%) as a yellow amorphous solid.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.25.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.23 (1H, s, OH-9), 6.82 (1H, s, H-10), 6.54 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-4), 6.39 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 3.98 (3H, s, H-14), 2.95 (2H, s, H-7), 2.51 (2H, s, H-5), 1.04 (6H, s, H-11, H-12).

6,8,9-trihydroxy-3,3-dimethyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (205)

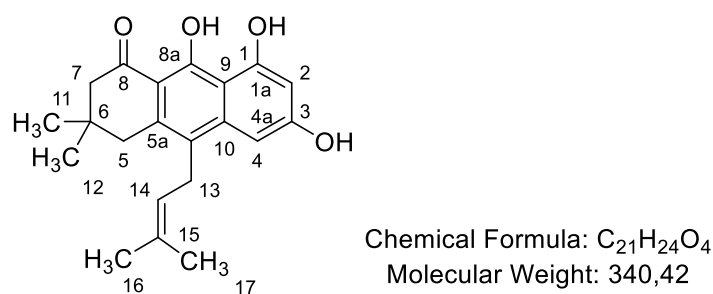


To a solution of **(201a)** (151.5 mg, 0.504 mmol) in acetic acid (10 mL) was added 5.0 mL of an aqueous solution of HBr (47%). The reaction mixture was refluxed overnight and quenched with H₂O. The aqueous solution was then extracted with EtOAc, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by RP18 flash chromatography (H₂O/MeOH 50:50 to 0:100 over 20 min, 20 mL/min) to yield **(205)** (130.4 mg, 95%) as a yellow amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.33 (1H, s, OH-9), 9.96 (1H, s, OH-1), 6.76 (1H, s, H-10), 6.51 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, H-4), 6.41 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, H-2), 5.67 (1H, br s, H-18), 2.75 (1H, s, H-5), 2.55 (2H, s, H-7), 1.09 (6H, s, H-11, H-12).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.3 (C-8), 166.6 (C-9), 160.4 (C-1), 159.8 (C-3), 141.2 (C-4a), 137.5 (C-5a), 116.5 (C-10), 115.8 (C-8a), 108.2 (C-1a), 102.2 (C-2), 101.1 (C-4), 50.9 (C-7), 43.3 (C-5), 33.0 (C-6), 28.1 (C-12, C-11).

6,8,9-trihydroxy-3,3-dimethyl-10-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (206)



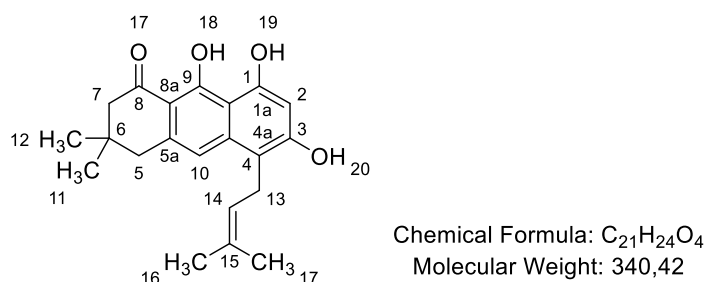
To a solution of **(205)** (32 mg, 0.12 mmol) in 1.5 mL of acetone were added DBU (18 μL, 0.12 mmol, 1 eq.) and 1-bromo-3-methylbut-2-ene (28 μL, 0.24 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was stirred for 22 h at room temperature. Acetone was removed under vacuum. Water was added and the aqueous solution was extracted with EtOAc after addition of an aqueous solution of HCl (1 M). The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by semipreparative HPLC (H₂O/MeOH 20:80 to

0:100 in 30 min, 20 mL/min) to yield **(206)** (12 mg, 30%) and **(207)** (10 mg, 25%) as yellow amorphous solids.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 10.42 (1H, d, J = 0.8 Hz, H-19), 6.70 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-4), 6.45 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 5.72 (1H, br s, H-20), 4.98 (1H, tspt, J = 6.0 Hz, J = 1.1 Hz, H-14), 3.46 (2H, br d, J = 6.0 Hz, H-13), 2.76 (2H, s, H-5), 2.55 (2H, s, H-7), 1.85 (3H, s, H-16), 1.71 (3H, s, H-17), 1.09 (6H, s, H-11, 12).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 203.4 (C-8), 166.2 (C-9), 161.3 (C-1), 159.9 (C-3), 140.7 (C-4a), 133.9 (C-5a), 132.2 (C-15), 124.3 (C-10), 122.4 (C-14), 108.0 (C-8a), 107.9 (C-1a), 100.9 (C-2), 100.1 (C-4), 50.3 (C-7), 40.6 (C-5), 32.3 (C-6), 28.4 (C-12, C-11), 27.3 (C-13), 25.6 (C-16), 18.2 (C-17).

6,8,9-trihydroxy-3,3-dimethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (**207**)



This product was obtained with **(206)** as described above.

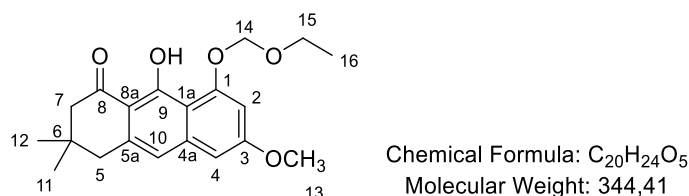
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 16.32 (1H, d, J = 0.9 Hz, OH-9), 10.01 (1H, d, J = 0.9 Hz, OH-1), 6.99 (1H, t, J = 1.4 Hz, H-10), 6.43 (1H, s, H-2), 5.79 (1H, br s, OH-3), 5.18 (1H, tspt, J = 6.7 Hz, 1.3 Hz, H-14), 3.56 (2H, br d, J = 6.8 Hz, H-13), 2.80 (2H, s, H-5), 2.56 (2H, s, H-7), 1.88 (3H, s, H-16), 1.74 (3H, d, J = 1.5 Hz, H-17), 1.10 (6H, s, H-11, H-12).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 203.1 (C-8), 166.4 (C-9), 158.3 (C-1), 157.5 (C-3), 138.8 (C-4a), 136.8 (C-5a), 133.4 (C-15), 122.1 (C-14), 113.2 (C-10), 111.0 (C-4), 107.9 (C-8a), 107.6 (C-1a), 101.1 (C-2), 50.8 (C-7), 43.6 (C-5), 32.8 (C-6), 27.9 (C-11, C-12), 25.5 (C-16), 23.8 (C-13), 17.8 (C-17).

IX.3. General procedure for dihydroanthracenones synthesis by Staunton-Weinreb annulation.

Dry THF (100 eq.) was introduced in a flame dried flask under argon and cooled at -20 °C. DIPA (3.6 eq.) was then added, followed by *n*-BuLi solution in hexane (3.5 eq.). The reaction mixture was stirred 10 min at -20 °C then cooled to -78 °C prior to addition of the corresponding ester (1 eq.) in 1 mL of dry THF. A deep red coloration was observed and the solution was stirred for 10 more min at -78 °C. Then the corresponding cyclohexenone (2 eq.) dissolved in 1 mL of dry THF, was added dropwise over 5 min to the solution and the color switched to brown then orange. The reaction mixture was stirred 30 more min at -78 °C then allowed to warm to room temperature for 3 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum and purified by semipreparative HPLC using appropriate H₂O/ACN gradient. Most of the ACN was removed by concentration under vacuum, and the remaining solutions of pure dihydroanthracenones in water were freeze-dried to obtain the pure compounds as yellow amorphous solids.

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-6-methoxy-3,3-dimethyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (208)



Yielded 60 mg (43%).

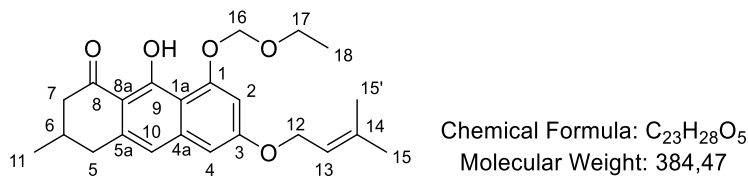
TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.70.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.09 (1H, s, OH-9), 6.81 (1H, s, H-10), 6.70 (1H, s, H-4), 6.60 (1H, s, H-2), 5.37 (2H, s, H-14), 3.87 (3H, s, H-13), 3.84 (2H, q, *J* = 7.3 Hz, H-15), 2.76 (2H, s, H-7), 2.52 (2H, s, H-5), 1.24 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-16), 1.05 (6H, s, H-11, H-12).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.7 (C-8), 165.6 (C-9), 161.8 (C-3), 158.5 (C-1) 141.8 (C-4a), 138.4 (C-5a), 116.6 (C-10), 102.5 (C-8a, C-1a), 100.4 (C-2, 4), 94.2 (C-14), 64.8 (C-15), 55.4 (C-13), 52.0 (C-7), 43.86 (C-5), 32.9 (C-6), 28.1 (C-11, C-12), 15.1 (C-16).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:345.17, found: 345.089

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-3-methyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (209)



Yielded 26 mg (13%)

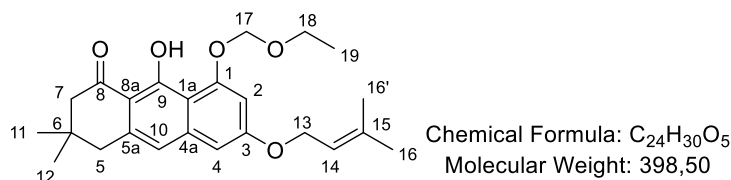
TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.75.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.06 (1H, s, OH-9), 6.80 (1H, s, H-10), 6.70 (1H, s, H-4), 6.60 (1H, s, H-2), 5.5 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-13), 5.35 (2H, s, H-16), 4.57 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-12), 3.82 (2H, q, *J* = 6.7 Hz, H-17), 2.98-2.33 (4H, m, H-7, H-5), 2.27 (1H, m, H-6), 1.80 (3H, s, H-15), 1.76 (3H, H-15'), 1.23 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-18), 1.11 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.9 (C-8), 165.9 (C-9), 161.3 (C-3), 158.7 (C-1), 141.9 (C-5a), 139.3 (C-4a), 138.9 (C-14), 119.3 (C-13), 116.0 (C-10), 111.1 (C-8a), 110.5 (C-1a), 103.1 (C-4), 101.4 (C-2), 94.5 (C-16), 65.1 (C-12), 64.8 (C-17), 46.8 (C-7), 38.6 (C-5), 29.9 (C-6), 26.1 (C-15), 21.3 (C-15'), 18.5 (C-11), 15.3 (C-18).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:385.48, found: 385.14

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-3,3-dimethyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (210)



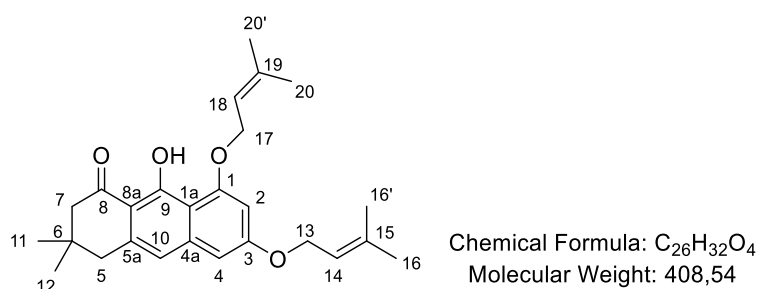
Yielded 95 mg (54%)

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.67.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.0 (1H, s, OH-9), 6.80 (1H, s, H-10), 6.70 (1H, s, H-4), 6.60 (1H, s, H-2), 5.5 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-14), 5.36 (2H, s, H-17), 4.57 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-13), 3.83 (2H, q, *J* = 6.7 Hz, H-18), 2.75 (2H, s, H-7), 2.51 (2H, s, H-5), 1.80 (3H, s, H-16), 1.76 (3H, H-16'), 1.23 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-19), 1.05 (6H, s, H-11, H-12).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.3 (C-8), 165.9 (C-9), 161.2 (C-3), 160.5 (C-1) 141.9 (C-5a), 138.9 (C-15), 138.4 (C-4a), 119.6 (C-17), 119.1 (C-14), 116.4 (C-10), 110.7 (C-8a), 109.8 (C-1a), 99.7 (C-4), 99.4 (C-2), 66.3 (C-13), 64.9 (C-18), 52.0 (C-7), 43.9 (C-5), 41.1 (C-6), 32.9 (C-19), 28.1 (C-11, C-12), 25.9 (C-16), 18.4 (C-16'),

9-hydroxy-3,3-dimethyl-6,8-bis((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (201b)



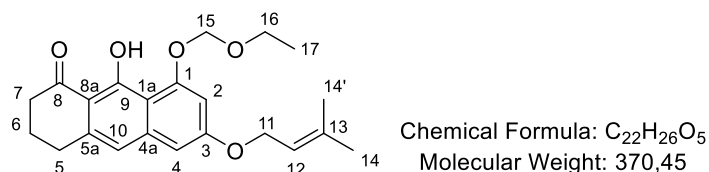
Yielded 100 mg (51%)

TLC (C₅/EtOAc 90:10): Rf0.63.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.03 (1H, s, OH-9), 6.79 (1H, s, H-10), 6.55 (1H, d, *J* = 2.0, H-4), 6.45 (1H, d, *J* = 2.0, H-2), 5.62 (1H, t, *J* = 6.2 Hz, H-18), 5.54 (1H, t, *J* = 6.2 Hz, H-14), 5.36 (2H, s, H-17), 4.66 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, H-17), 4.60 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-13), 2.77 (2H, s, H-7), 2.53 (2H, s, H-5), 1.82 (3H, s, H-20), 1.80 (3H, s, H-16), 1.78 (3H, s, H-20'), 1.75 (3H, H-16'), 1.23 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-20), 1.05 (6H, s, H-11, H-12).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.5 (C-8), 166.1 (C-9), 161.4(C-3), 160.6 (C-1), 142.2 (C-4a), 139.1 (C-19), 138.7 (C-15), 137.8 (C-5a), 119.7 (C-18), 119.3 (C-14), 116.7 (C-10), 110.8 (C-8a), 109.9 (C-1a), 99.9 (C-4), 99.6 (C-2), 66.5 (C-17), 65.0 (C-13), 52.2 (C-7), 44.1 (C-5), 41.3 (C-6), 33.1 (C-11), 28.2 (C-12), 26.1 (C-20), 26.0 (C-16), 18.6 (C-20'), 18.5 (C-16').

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (211)



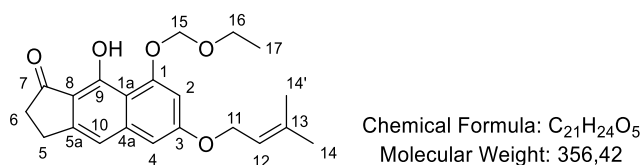
Yielded 21 mg (17%)

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.75.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.09 (1H, s, OH-9), 6.80 (1H, s, H-10), 6.70 (1H, s, H-4), 6.60 (1H, s, H-2), 5.50 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, H-12), 5.35 (2H, s, H-15), 4.57 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, H-11), 3.82 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-16), 2.91 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-7), 2.69 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, H-5), 2.06 (2H, m, *J* = 6.6 Hz, H-6), 1.79 (3H, s, H-14), 1.76 (3H, s, H-14'), 1.23 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 204.1 (C-8), 166.1 (C-9), 161.3 (C-3), 158.7 (C-1), 141.8 (C-5a), 139.7 (C-4a), 138.9 (C-13), 119.3 (C-12), 115.8 (C-10), 111.1 (C-8a), 110.9 (C-1a), 103.2 (C-4), 101.4 (C-2), 94.5 (C-15), 65.1 (C-11), 64.9 (C-16), 39.0 (C-7), 30.4 (C-5), 26.1 (C-14), 23.0 (C-6), 18.5 (C-14'), 15.3 (C-17).

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b]naphthalen-1-one (212)

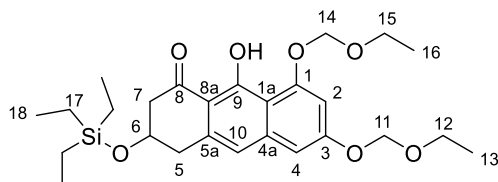


Yielded 23 mg (14%)

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.37.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.79 (1H, s, OH-9), 7.05 (1H, s, H-10), 6.70 (1H, s, H-4), 6.68 (1H, s, H-2), 5.51 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, H-12), 5.39 (2H, s, H-15), 4.57 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-11), 3.81 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-16), 3.11 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-6), 2.73 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-5), 1.80 (3H, s, H-14), 1.76 (3H, s, H-14'), 1.23 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-17).

6,8-bis(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-3-((triethylsilyl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (217)



Chemical Formula: C₂₆H₃₈O₇Si
Molecular Weight: 490,67

Yielded 46 mg (20%)

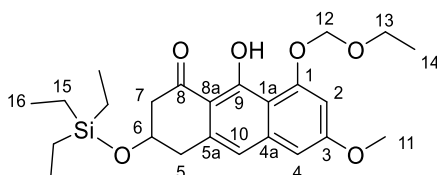
TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.75.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 14.94 (1H, s, OH-9), 6.86 (1H, s, H-10), 6.84 (1H, s, H-4), 6.76 (1H, s, H-2), 5.37 (2H, s, H-11), 5.29 (2H, s, H-14), 3.84 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-12), 3.74 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-15), 3.14-2.68 (4H, m, H-7, H-5), 1.23 (6H, t, *J* = 7.9 Hz, H-18), 0.59 (6H, q, *J* = 8.1 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 202.6 (C-8), 165.7 (C-9), 159.7 (C-3), 158.7 (C-1), 141.7 (C-4a), 136.6 (C-5a), 117.2 (C-10), 111.7 (C-8a), 110.8 (C-1a), 103.8 (C-4), 103.7 (C-2), 94.5 (C-14), 93.2 (C-11), 66.8 (C-6), 65.0 (C-12), 64.9 (C-15), 48.3 (C-7), 39.8 (C-5), 15.3 (C-13, C-16), 6.1 (C-17), 5.0 (C-18).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 491.24, found:491.15

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-6-methoxy-3-((triethylsilyl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (218)



Chemical Formula: C₂₄H₃₄O₆Si
Molecular Weight: 446,62

Yielded 35 mg (13%).

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.52.

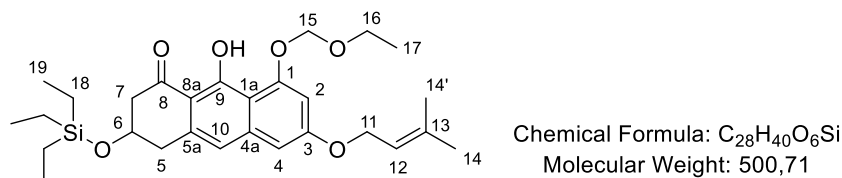
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 14.95 (1H, s, OH-9), 6.85 (1H, s, H-10), 6.69 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-4), 6.59 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-2), 5.36 (2H, s, H-12), 4.28 (1H, m, H-6), 3.87 (3H, s,

H-11), 3.83 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-13), 3.15-2.68 (4H, m, H-7, H-5), 1.23 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-14), 0.93 (9H, t, $J = 8.1$ Hz, H-16), 7.60 (6H, q, $J = 8.4$ Hz, H-15).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 202.4$ (C-8), 165.7 (C-9), 162.0 (C-3), 158.7 (C-1), 141.94 (C-4a), 136.7 (C-5a), 116.9 (C-10), 110.7 (C-8a), 102.9 (C-1a), 100.6 (C-2, C-4), 94.45 (C-12), 66.8 (C-6), 64.9 (C-13), 55.6 (C-11), 48.3 (C-7), 40.0 (C-5), 15.33 (C-15), 6.98 (C-14), 5.03 (C-16).

LRMS-ESI (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd: 447.62, found:447.12

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3-((triethylsilyl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (220)



Yielded 34 mg (18%)

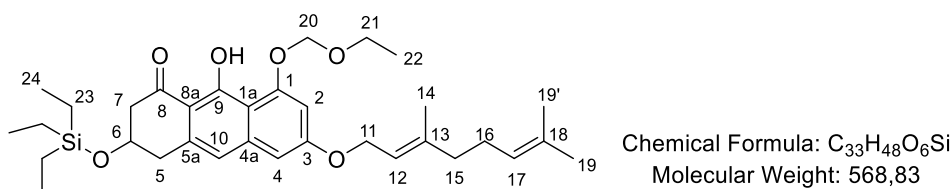
TLC (C_5/EtOAc 90:10): R_f 0.35.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 14.94$ (1H, s, OH-9), 6.83 (1H, s, H-10), 6.71 (1H, s, H-4), 6.61 (1H, s, H-2), 5.50 (1H, t, $J = 6.3$ Hz, H-12), 5.35 (2H, s, H-15), 4.58 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11), 4.28 (1H, m, H-6), 3.82 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-16), 3.13-2.68 (4H, m, H-7, H-5), 1.79 (3H, s, H-14), 1.76 (3H, s, H-14'), 1.23 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-17), 0.94 (9H, t, $J = 7.8$ Hz, H-19), 0.60 (6H, q, $J = 7.8$ Hz, H-18).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 202.4$ (C-8), 165.4 (C-9), 161.2 (C-3), 158.5 (C-1), 141.7 (C-4a), 138.9 (C-13), 136.4 (C-5a), 119.1 (C-12), 116.7 (C-10), 110.4 (C-8a, C-1a), 103.1 (C-4), 101.3 (C-2), 94.2 (C-15), 66.6 (C-6), 65.0 (C-11), 64.8 (C-16), 48.1 (C-7), 39.8 (C-5), 25.9 (C-14), 18.3 (C-14'), 15.1 (C-17), 6.8 (C-18), 4.8 (C-19).

LRMS-ESI (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd: 501.27, found:501.16

(E)-6-((3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)oxy)-8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-3-((triethylsilyl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (219)



Yielded 34 mg (18%)

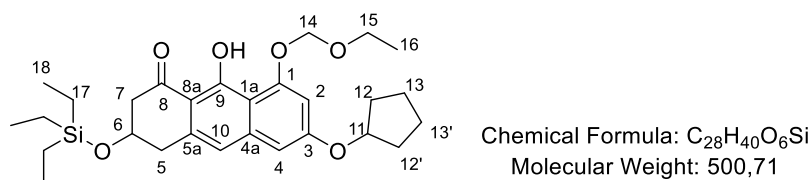
TLC (C₅/EtOAc 90:10): Rf0.40.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 14.94 (1H, s, OH-9), 6.83 (1H, s, H-10), 6.71 (1H, s, H-4), 6.61 (1H, s, H-2), 5.50 (1H, t, *J* = 6.3 Hz, H-12), 5.35 (2H, s, H-20), 5.08 (1H, t, *J* = 5.7 Hz, H-17), 4.61 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, H-11), 4.28 (1H, m, H-6), 3.83 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-21), 3.14-2.69 (4H, m, H-7, H-5), 2.10 (4H, m, H-15, H-16), 1.75 (3H, s, H-14), 1.66 (3H, s, H-19), 1.59 (3H, s, H-19'), 1.23 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-22), 0.94 (9H, t, *J* = 8.0 Hz, H-24), 0.60 (6H, q, *J* = 8.0 Hz, H-23).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 202.2 (C-8), 165.4 (C-9), 161.2 (C-3), 158.5 (C-1), 141.8 (C-4a), 141.7 (C-13), 136.4 (C-5a), 131.9 (C-18), 123.7 (C-17), 118.9 (C-12), 116.7 (C-10), 110.4 (C-8a), 107.3 (C-1a), 103.1 (C-4), 101.3 (C-2), 94.2 (C-20), 66.6 (C-6), 65.0 (C-11), 64.8 (C-21), 48.1 (C-7), 39.8 (C-5), 39.5 (C-15), 26.3 (C-16), 25.6 (C-19), 17.7 (C-19'), 16.8 (C-14), 15.1 (C-22), 6.8 (C-23), 4.8 (C-24).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 569.33, found: 569.22

6-(cyclopentyloxy)-8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-3-((triethylsilyl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (221)



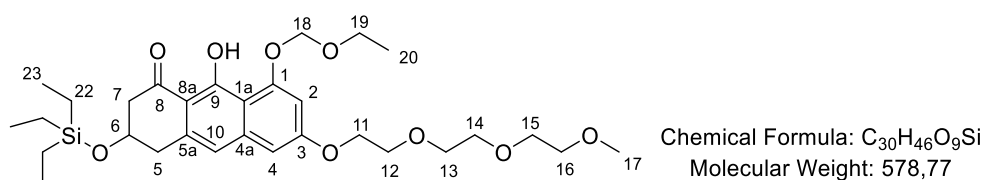
Yielded 74 mg (18%).

TLC (C₅/EtOAc 70:30): Rf0.65.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 14.95 (1H, s, OH-9), 6.82 (1H, s, H-10), 6.65 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-4), 6.57 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 5.36 (2H, s, H-14), 4.84 (1H, m, H-11), 4.28 (1H, m, H-6), 3.83 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-15), 3.14-2.68 (4H, m, H-7, H-5) 1.99-1.48 (8H, m, H-12, H-

12', H-13, H-13'), 1.20 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16), 0.94 (9H, t, $J = 8.1$ Hz, H-19), 7.60 (6H, q, $J = 8.4$ Hz, H-17).

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-6-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-3-((triethylsilyloxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (222)



Yielded 46 mg (20%)

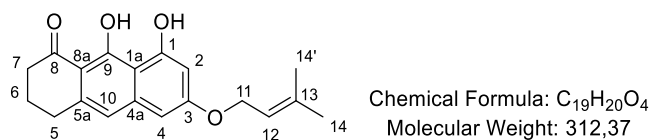
TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.75.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 14.94$ (1H, s, OH-9), 6.82 (1H, s, H-10), 6.72 (1H, s, H-4), 6.59 (1H, s, H-2), 5.37 (2H, s, H-14), 4.28 (1H, m, H-6), 4.20 (2H, m, H-11), 3.82 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-21), 3.91-2.51 (10H, m, H-12, 13, 14, 15, 16), 3.36 (3H, s, H-17), 3.24-2.85 (4H, m, H-7, H-5), 1.23 (6H, q, $J = 3.0$ Hz, H-22), 0.92 (9H, t, $J = 7.9$ Hz, H-23), 0.59 (6H, q, $J = 8.0$ Hz, H-22).

IX.4. General procedure for the deprotection of dihydroanthracenones

A solution of protected dihydroanthracenones in EtOH (15 mol/L) was stirred at room temperature under argon atmosphere, and aqueous solution of HCl (10 eq., 12 M) was added. The reaction was monitored by TLC and HPLC. When reaction was over, the mixture was concentrated and purified on semi preparative LC chromatography using appropriate H₂O/ACN gradient. Most of the ACN was then removed by concentration under vacuum, and the remaining solutions of dihydroanthracenones in water were freeze-dried to obtain the pure compounds as yellow amorphous powders.

8,9-dihydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (214)



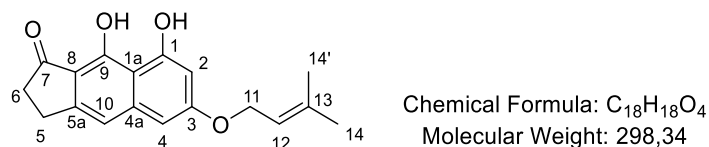
Yielded 16 mg (100%)

TLC ($C_5/EtOAc$ 70:30): R_f 0.5.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 15.09 (1H, s, OH-9), 9.85, (1H, s, OH-1), 6.79 (1H, s, H-10), 6.51 (1H, s, H-4), 6.46 (1H, s, H-2), 5.49 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-12), 4.57 (2H, d, J = 7.1 Hz, H-11), 2.91 (2H, t, J = 6.0 Hz, H-7), 2.71 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-5), 2.08 (2H, m, J = 6.3 Hz, H-6), 1.79 (3H, s, H-14), 1.75 (3H, s, H-14').

HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ calcd:313.1434, found: 313.1427

8,9-dihydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b]naphthalen-1-one (216)

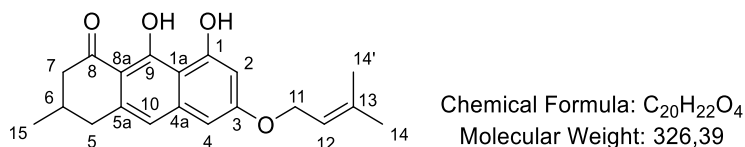


Yielded 28 mg (100%)

TLC ($C_5/EtOAc$ 70:30): R_f 0.37.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.76 (1H, s, OH-1), 7.08 (1H, s, H-10), 6.62 (1H, s, H-4), 6.51 (1H, s, H-2), 5.50 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-12), 4.58 (2H, d, J = 6.2 Hz, H-11), 3.16 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-6), 2.77 (1H, t, J = 6.4 Hz, H-5), 1.80 (3H, s, H-14), 1.75 (3H, s, H-14').

8,9-dihydroxy-3-methyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (215)



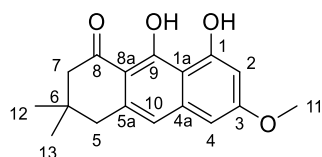
Yielded 17 mg (77%)

TLC (C₅/EtOAc 70:30): Rf0.75.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.29 (1H, s, OH-9), 9.84 (1H, s, OH-1), 6.78 (1H, s, H-10), 6.52 (1H, s, H-4), 6.46 (1H, s, H-2), 5.48 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-13), 4.57 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-12), 2.96-2.34 (4H, m, H-7, H-5), 2.29 (1H, m, H-6), 1.79 (3H, s, H-15), 1.74 (3H, s, H-15'), 1.12 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.5 (C-8), 166.4 (C-9), 162.8 (C-3), 159.8 (C-1), 141.0 (C-5a), 138.7 (C-4a), 138.1 (C-13), 119.1 (C-12), 116.1 (C-10), 108.1 (C-8a), 107.9 (C-1a), 101.1 (C-4), 100.4 (C-2), 65.0 (C-12), 45.6 (C-7), 37.7 (C-5), 29.9 (C-6), 25.8 (C-14), 21.1 (C-14'), 18.3 (C-15).

8,9-dihydroxy-6-methoxy-3,3-dimethyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (203)



Chemical Formula: C₁₇H₁₈O₄
Molecular Weight: 286,33

Yielded 47 mg (100%).

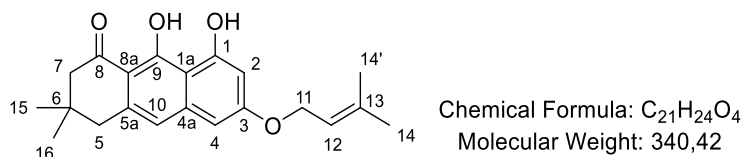
TLC (C₅/EtOAc 70:30): Rf0.67.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.26 (1H, s, OH-9), 9.86 (1H, s, OH-1), 6.82 (1H, s, H-10), 6.53 (1H, s, H-4), 6.47 (1H, s, H-2), 3.88 (3H, s, H-11), 2.76 (2H, s, H-7), 2.54 (2H, s, H-5), 1.55 (3H, s, H-12), 1.08 (3H, s, H-13).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.6 (C-8), 166.2 (C-9), 163.5 (C-1), 159.8 (C-3), 141.1 (C-4a), 137.5 (C-5a), 116.9 (C-10), 108.3 (C-8a), 108.0 (C-1a), 100.8 (C-4), 99.6 (C-2), 55.5 (C-11), 51.0 (C-7), 43.4 (C-5), 33.1 (C-6), 28.3 (C-11, C-12).

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:287.1278, found: 286.1278

8,9-dihydroxy-3,3-dimethyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (213)



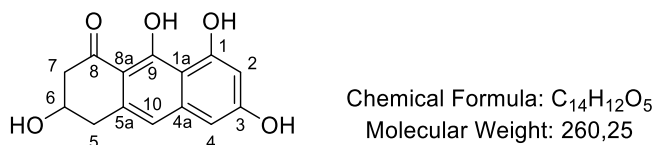
Yielded 47 mg (100%)

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.67.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.25 (1H, s, OH-9), 9.84 (1H, s, OH-1), 6.78 (1H, s, H-10), 6.52 (1H, s, H-4), 6.46 (1H, s, H-2), 5.49 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-12), 5.36 (2H, s, H-17), 4.57 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-11), 2.73 (2H, s, H-7), 2.52 (2H, s, H-5), 1.79 (3H, s, H-14), 1.74 (3H, H-14'), 1.06 (6H, s, H-15, H-16).

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:341.1749, found:341.1749

3,6,8,9-tetrahydroxy-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (223)



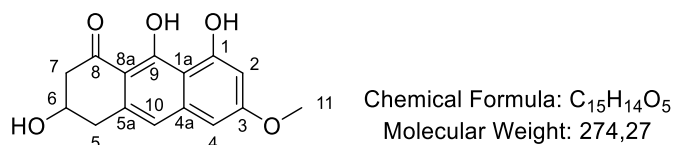
Yielded 24 mg (80%)

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.20.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 14.53 (1H, s, OH-9), 9.73 (1H, s, OH-1), 9.05 (1H, s, OH-3), 6.73 (1H, s, H-10), 6.46 (1H, s, H-4), 6.25 (1H, s, H-2), 4.27 (2H, m, H-6), 3.10-2.56 (4H, m, H-7, H-5).

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:261.0755, found: 261.0756

3,8,9-trihydroxy-6-methoxy-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (224)



Yielded 26 mg (100%).

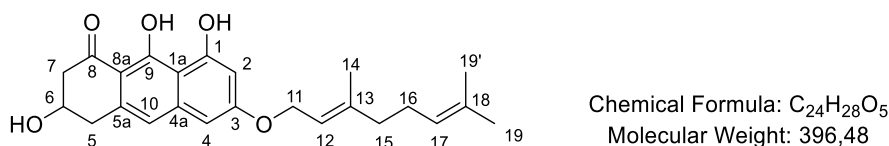
TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f0.50.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.11 (1H, s, OH-9), 9.78 (1H, s, OH-1), 6.87 (1H, s, H-10), 6.53 (1H, s, H-4), 6.47 (1H, s, H-2), 4.45 (1H, m, H-6), 3.87 (3H, s, H-11), 3.24-2.75 (4H, m, H-7, H-5).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 221.6 (C-8), 217.1 (C-9), 201.3 (C-3), 163.9 (C-1), 160.1 (C-4a), 134.7 (C-5a), 117.8 (C-1), 101.3 (C-2), 100.0 (C-4), 66.4 (C-8a), 61.8 (C-1a), 55.7 (C-6), 46.2 (C-11), 38.3 (C-7), 31.1 (C-5).

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:275.0914, found:275.0920

(E)-6-((3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)oxy)-3,8,9-trihydroxy-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (225)



Yielded 20 mg (100%)

TLC (C₅/EtOAc 90:10): R_f0.55.

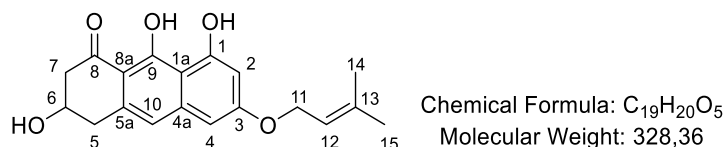
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.12 (1H, s, OH-9), 9.76 (1H, s, OH-1), 6.85 (1H, s, H-10), 6.53 (1H, s, H-4), 6.49 (1H, s, H-2), 5.48 (1H, t, *J* = 6.3 Hz, H-12), 5.07 (1H, t, *J* = 5.7 Hz, H-17), 4.60 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, H-11), 4.44 (1H, m, H-6), 3.23-2.75 (4H, m, H-7, H-5), 2.10 (4H, m, H-15, H-16), 1.74 (3H, s, H-14), 1.65 (3H, s, H-19), 1.59 (3H, s, H-19').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 201.1 (C-8), 166.4 (C-9), 163.3 (C-3), 160.1 (C-1), 142.0 (C-4a), 141.2 (C-13), 134.6 (C-5a), 132.1 (C-18), 123.9 (C-17), 119.1 (C-12), 117.8 (C-10),

108.9 (C-8a), 108.2 (C-1a), 101.7 (C-4), 101.0 (C-2), 66.4 (C-6), 65.3 (C-11), 46.1 (C-7), 39.8 (C-5), 38.3 (C-15), 26.5 (C-16), 25.8 (C-19), 17.9 (C-19'), 16.9 (C-14).

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:397.2010, found: 397.2003

3,8,9-trihydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (226)



Yielded 16 mg (81%)

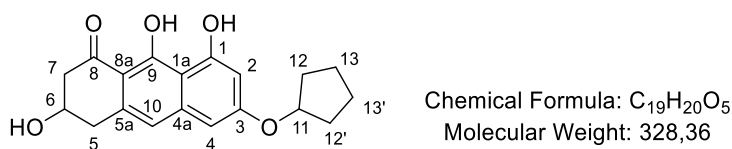
TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.50.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.14 (1H, s, OH-9), 9.79 (1H, s, OH-1), 6.85 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, d, *J* = 2.3, H-4), 6.50 (1H, d, *J* = 2.3, H-2), 5.51 (1H, tt, *J* = 6.8, 1.4, Hz, H-12), 4.60 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-11), 4.46 (1H, m, H-6), 3.24-2.78 (4H, m, H-7, H-5), 1.81 (3H, s, H-14), 1.77 (3H, s, H-14').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 200.9 (C-8), 166.2 (C-9), 163.1 (C-3), 159.9 (C-1), 141.0 (C-4a), 138.7 (C-13), 134.4 (C-5a), 119.1 (C-12), 117.6 (C-10), 108.4 (C-8a, C-1a), 101.5 (C-4), 100.7 (C-2), 66.2 (C-6), 65.1 (C-11), 45.9 (C-7), 38.1 (C-5), 25.8 (C-14), 18.3 (C-14').

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:329.1384, found:329.1388

6-(cyclopentyloxy)-3,8,9-trihydroxy-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (227)



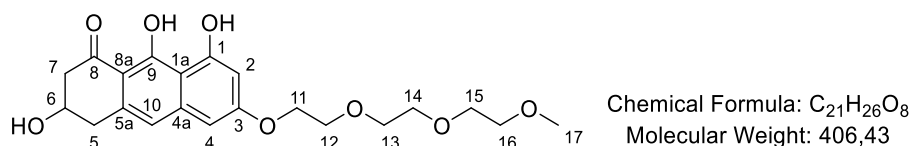
Yielded 74 mg (18%).

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.55.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.14 (1H, s, OH-9), 9.75 (1H, s, OH-1), 6.83 (1H, s, H-10), 6.65 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-4), 6.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 5.36 (2H, s, H-14), 4.83 (1H, m, H-11), 4.44 (1H, m, H-6), 3.22-2.75 (4H, m, H-7, H-5) 1.99-1.57 (8H, m, H-12, H-12', H-13, H-13').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 200.9 (C-8), 166.5 (C-9), 166.3 (C-3), 160.1 (C-1), 141.2 (C-4a), 134.4 (C-5a), 117.7 (C-10), 108.8 (C-8a), 102.3 (C-1a), 101.9 (C-4), 79.9 (C-2), 77.4 (C-11) 66.4 (C-6), 46.1 (C-7), 38.3 (C-5), 33.2 (C-12, C-12'), 24.3 (C-13, C-13').

3,8,9-trihydroxy-6-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (228)



Yielded 23 mg (72%).

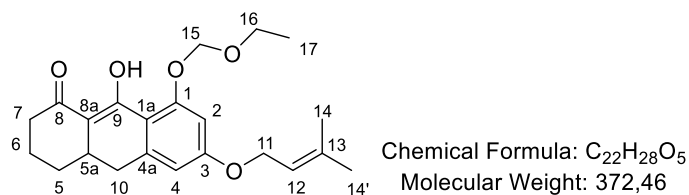
TLC (C₅/EtOAc 70:30): Rf0.55.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.10 (1H, s, OH-1), 6.76 (1H, s, OH-9), 6.84 (1H, s, H-10), 6.52 (1H, s, H-4), 6.48 (1H, s, H-2), 4.44 (1H, m, H-6), 4.19 (2H, t, *J* = 4.4, H-11), 3.87 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-12), 3.75-3.62 (8H, m, H-13, H-14, H-15), 3.53 (2H, t, *J* = 4.4, H-16), 3.36 (3H, s, H-17), 3.21-2.75 (4H, m, H-7, H-5).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 201.9 (C-8), 166.1 (C-9), 162.8 (C-3), 159.8 (C-1), 140.9 (C-4a), 134.5 (C-5a), 117.6 (C-10), 108.7 (C-8a), 108.1 (C-1a), 101.5 (C-4), 100.5 (C-2), 77.2 (C-16), 71.9 (C-15), 70.7 (C-14), 70.6 (C-13), 69.6 (C-12), 67.6 (C-11), 66.2 (C-6), 59.1 (C-17), 45.9 (C-7), 38.1 (C-5).

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:407.1700, found:407.17006

8,9-dihydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4,4a,10-tetrahydroanthracen-1(2H)-one (229)

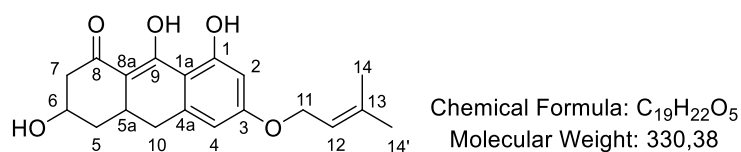


TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f0.15.

¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) δ = 6.91 (1H, d, *J* = 2.3, H-4), 6.37 (1H, d, *J* = 2.0, H-2), 5.44 (1H, tt, *J* = 6.6, 1.4 Hz, H-12), 5.15 (2H, s, H-15), 4.36 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, H-11), 3.63 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H-16), 2.39-2.12 (4H, m, H-10, H-6), 1.58 (1H, m, H-7), 1.55 (3H, s, H-14), 1.49 (1H, m, H-7), 1.44 (3H, s, H-14'), 1.26 (1H, m, H-5), 1.05 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-17), 0.95 (1H, q, *J* = 12.3, H-5).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 188.8 (C-8), 182.2 (C-3), 164.8 (C-1), 161.2 (C-9), 148.1 (C-4a), 139.5 (C-13), 120.7 (C-12), 116.3 (C-8a), 110.3 (C-4), 108.7 (C-1a), 102.9 (C-2), 95.1 (C-15), 66.3 (C-11), 65.8 (C-16), 39.2 (C-7), 34.7 (C-10), 32.1 (C-5), 31.4 (C-5a), 25.9 (C-14), 22.1 (C-6), 18.4 (C-14'), 15.6 (C-17).

3,8,9-trihydroxy-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4,4a,10-tetrahydroanthracen-1(2H)-one (230)



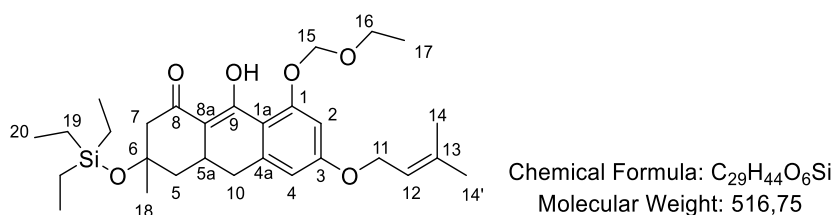
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 14.47 (1H, s, H-9), 12.20 (1H, s, H-1), 6.27 (1H, d, *J* = 2.0, H-4), 6.22 (1H, s, H-2), 5.44 (1H, tt, *J* = 6.6, 1.4 Hz, H-12), 4.51 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, H-11), 4.35 (1H, m, H-6), 3.03 (1H, m, H-5a), 2.77-2.63 (2H, m, H-10), 2.60-2.39 (2H, m, H-7), 2.07 (1H, m, H-5), 1.78 (3H, s, H-14), 1.72 (3H, s, H-14'), 1.50 (1H, t, *J* = 13, H-5), 1.05 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 191.7 (C-8), 173.4 (C-1), 165.0 (C-3), 164.9 (C-9), 144.6 (C-4a), 138.9 (C-13), 118.8 (C-12), 110.4 (C-8a), 107.4 (C-4), 106.6 (C-1a), 99.8 (C-2), 65.1

(C-6), 64.1 (C-11), 38.1 (C-7), 36.3 (C-5), 36.01 (C-10), 27.3 (C-5a), 25.8 (C-14), 18.2 (C-14')

HRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd:331.1540, found:331.1542

8-(ethoxymethoxy)-9-hydroxy-3-methyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3-((triethylsilyl)oxy)-3,4,4a,10-tetrahydroanthracen-1(2H)-one (234)

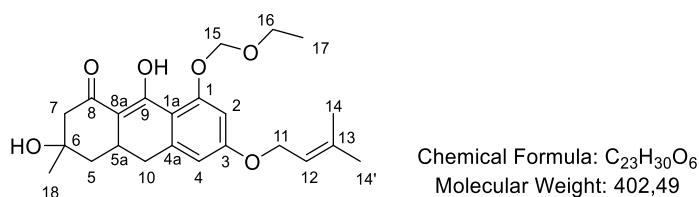


¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) δ = 6.67 (1H, d, *J* = 2.2, H-4), 6.39 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 5.45 (1H, tt, *J* = 6.6, 1.4 Hz, H-12), 5.31 (2H, dd, *J* = 20.6 Hz, 6.7 Hz, H-15), 4.52 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, H-11), 3.78 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H-16), 2.92, (1H, m, H-5a), 2.67-2.38 (4H, m, H-10, 6), 1.92 (1H, dd, *J* = 13.1 Hz, 4.6 Hz, H-5), 1.77 (3H, s, H-14), 1.73 (3H, s, H-14'), 1.33 (3H, s, H-18), 1.27 (1H, t, *J* = 12.1 Hz, H-5), 1.20 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-17), 0.86 (9H, t, *J* = 7.0 Hz, H-20), 0.52 (6H, t, *J* = 7.0 Hz, H-19).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 185.5 (C-8), 180.6 (C-3), 175.1 (C-1), 162.7 (C-9), 159.8 (C-4a), 146.3 (C-13), 138.8 (C-12), 119.0 (C-8a), 115.5 (C-4), 107.7 (C-1a), 107.6 (C-2), 102.3 (C-15), 94.3 (C-6), 71.1 (C-11), 65.0 (C-16), 64.6 (C-7), 44.0 (C-5), 37.7 (C-10), 30.5 (C-18), 29.4 (C-14), 25.8 (C-5a), 18.2 (C-14'), 15.1 (C-17), 7.0 (C-19), 6.6 (C-20)

HRMS-ESI (m/z) [M + Na]⁺ calcd:517.2799, found:539.2788

8-(ethoxymethoxy)-3,9-dihydroxy-3-methyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-3,4,4a,10-tetrahydroanthracen-1(2H)-one (235)



¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) δ = 6.68 (1H, d, J = 2.2, H-4), 6.41 (1H, d, J = 2.2, H-2), 5.93 (1H, s, OH-6), 5.45 (1H, tt, J = 6.6, 1.4 Hz, H-12), 5.28 (2H, dd, J = 20.6 Hz, 6.7 Hz, H-15), 4.52 (2H, d, J = 6.7 Hz, H-11), 3.79 (2H, q, J = 7.0 Hz, H-16), 2.92, (1H, m, H-5a), 2.79 (2H, m, H-6), 2.64-2.31 (2H, m, H-10), 1.96 (3H, s, H-18), 1.79 (3H, s, H-14), 1.75 (3H, s, H-14'), 1.56 (2H, m, H-5), 1.21 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-17).

Références bibliographiques

1. adjanohoun, E. J., Aboubakaz, N. & Dramane, K. *Traditional Medicine and Pharmacopoeia: Contribution to ethnobotanical and floristic studies in cameroon*. (1996).
2. Lenta, B. N. *et al.* Anti-plasmodial and cholinesterase inhibiting activities of some constituents of *Psorospermum glaberrimum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **56**, 222–226 (2008).
3. Lenta, B., Weniger, B., Kaiser, M. & Vonthron-Sénécheau, C. Antileishmanial natural prenylated anthranoids. *Planta Med* **78**, PI290 (2012).
4. Gallé, J.-B. *et al.* Identification of key structural characteristics of *Psorospermum glaberrimum* prenylated anthranoids involved in antileishmanial activity. *jnatprod* (submitted)
5. Gallé, J.-B. Pharmacochimie d'anthranoïdes issus du genre *Psorospermum* (*Hypericaceae*): isolement, activités antiparasitaires et synthèse d'analogues structuraux. (Strasbourg, 2015).
6. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* **7**, e35671 (2012).
7. Leishmaniasis. *World Health Organization* Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. (Accessed: 10th May 2018)
8. Eskandari, E. G., Doudi, M. & Abedi, S. The study of antileishmanial effect of *Medicago lupulina* leaves alcoholic extract on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) by MTT assay. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* **10**, 59–65 (2016).
9. Kumar, A. *Leishmania and leishmaniasis*. (Springer, 2013).
10. Sundar, S. & Chakravarty, J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* **16**, 237–252 (2015).

11. Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A. & Siqueira-Neto, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2**, 11–19 (2012).
12. Silva, J. F. M., de Queiroz, A. C. & Leite, A. B. Leishmaniasis: Standard Treatment and Recent Advances. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **9**, 254–257 (2017).
13. Chai, Y., Yan, S., Wong, I. L. K., Chow, L. M. C. & Sun, H. Complexation of antimony (SbV) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-d-mannose: Formation of both mono- and bis-adducts. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**, 2257–2263 (2005).
14. Frézard, F., Demicheli, C. & Ribeiro, R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules* **14**, 2317–2336 (2009).
15. Goto, H. & Lindoso, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **8**, 419–433 (2010).
16. Goto, H. & Lauletta Lindoso, J. A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America* **26**, 293–307 (2012).
17. Couto, D. V. *et al.* American tegumentary leishmaniasis - a case of therapeutic challenge. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **89**, 974–976 (2014).
18. Vyas, S. P. & Gupta, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *International Journal of Nanomedicine* **1**, 417–432 (2006).
19. Croft, S. L., Seifert, K. & Duchêne, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**, 165–172 (2003).
20. Wadhone, P. *et al.* Miltefosine Promotes IFN- γ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. *The Journal of Immunology* **182**, 7146–7154 (2009).

21. Perezvictoria, F. *et al.* Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resistance Updates* **9**, 26–39 (2006).
22. Wiwanitkit, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). *Therapeutics and Clinical Risk Management* **8**, 323–328 (2012).
23. *Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22 - 26 March 2010.* (World Health Organization, 2010).
24. Garnier, T. & Croft, S. L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Current opinion in investigational drugs* **3**, 538–544 (2002).
25. Seifert, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. *The Open Medicinal Chemistry Journal* **5**, 31–39 (2011).
26. Cheeran, M. M. *et al.* A review of clinical trials of treatments for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent (India, Bangladesh and Nepal). *TropIKA.net* **1**, 31 (2010).
27. Jain, V. & Jain, K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today* **0**, 1–10 (2017).
28. Manhas, R., Anand, S., Tripathi, P. & Madhubala, R. Deletion of Vitamin C biosynthesis enzyme, Arabino-1, 4-lactone oxidase in *Leishmania donovani* results in increased pro-inflammatory responses from host immune cells: Role of Vitamin C biosynthesis in *Leishmania*. *Molecular Microbiology* **91**, 1227–1239 (2014).
29. Boitz, J. M., Jardim, A. & Ullman, B. GMP reductase and genetic uncoupling of adenylate and guanylate metabolism in *Leishmania donovani* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* **208**, 74–83 (2016).

30. Efstathiou, A. *et al.* An inhibitor-driven study for enhancing the selectivity of indirubin derivatives towards leishmanial Glycogen Synthase Kinase-3 over leishmanial cdc2-related protein kinase 3. *Parasites & Vectors* **7**, 234 (2014).
31. Angiulli, G. *et al.* *Leishmania infantum* trypanothione reductase is a promiscuous enzyme carrying an NADPH:O₂ oxidoreductase activity shared by glutathione reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1850**, 1891–1897 (2015).
32. Zahir, A. A. *et al.* Green Synthesis of Silver and Titanium Dioxide Nanoparticles Using *Euphorbia prostrata* Extract Shows Shift from Apoptosis to G₀/G₁ Arrest followed by Necrotic Cell Death in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 4782–4799 (2015).
33. Keshavarz, F., Alavianmehr, M. M. & Yousefi, R. Molecular dynamics simulation and docking studies on the binding properties of several anticancer drugs to human serum albumin. *Molecular Biology Research Communications* **1**, 65–73 (2013).
34. Ramu, D. *et al.* Novel β -carboline-quinazolinone hybrids disrupt *Leishmania donovani* redox homeostasis and show promising antileishmanial activity. *Biochemical Pharmacology* **129**, 26–42 (2017).
35. Boitz, J. M. *et al.* Arginase Is Essential for Survival of *Leishmania donovani* Promastigotes but Not Intracellular Amastigotes. *Infection and Immunity* **85**, 1–14 (2017).
36. Das, M., Singh, S. & Dubey, V. K. Novel Inhibitors of Ornithine Decarboxylase of *Leishmania* Parasite (*Ld* ODC): The Parasite Resists *Ld* ODC Inhibition by Overexpression of Spermidine Synthase. *Chemical Biology & Drug Design* **87**, 352–360 (2016).
37. Yadav, A. *et al.* *Leishmania donovani*: impairment of the cellular immune response against recombinant ornithine decarboxylase protein as a possible evasion strategy of *Leishmania* in visceral leishmaniasis. *International Journal for Parasitology* **45**, 33–42 (2015).

38. da Silva, E. R., Maquiaveli, C. do C. & Magalhães, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Experimental Parasitology* **130**, 183–188 (2012).
39. Kumar Pandey, R., Prajapati, P., Goyal, S., Grover, A. & Kumar Prajapati, V. Molecular Modeling and Virtual Screening Approach to Discover Potential Antileishmanial Inhibitors Against Ornithine Decarboxylase. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **19**, (2016).
40. Balaña-Fouce, R., Álvarez-Velilla, R., Fernández-Prada, C., García-Estrada, C. & Reguera, R. M. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **4**, 326–337 (2014).
41. Bajwa, N., Mehra, N. K., Jain, K. & Jain, N. K. Pharmaceutical and biomedical applications of quantum dots. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **44**, 758–768 (2016).
42. Jain, K., Verma, A. K., Mishra, P. R. & Jain, N. K. Surface-Engineered Dendrimeric Nanoconjugates for Macrophage-Targeted Delivery of Amphotericin B: Formulation Development and *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 2479–2487 (2015).
43. Singh, S. *et al.* Molecular docking and structure-based virtual screening studies of potential drug target, CAAX prenyl proteases, of *Leishmania donovani*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **34**, 2367–2386 (2016).
44. Bhardwaj, R. *et al.* Evaluation of CAAX prenyl protease II of *Leishmania donovani* as potential drug target: Infectivity and growth of the parasite is significantly lowered after the gene knockout. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **102**, 156–160 (2017).

45. Yenesew, A., Ogur, J. A. & Duddeckt, H. (R)-Prechrysophanol from *Aloe graminicola*. *Phytochemistry* **34**, 1442–1444 (1993).
46. Dagne, E., Yenesew, A., Asmellash, S., Demissew, S. & Mavi, S. Anthraquinones, pre-anthraquinones and isoeleutherol in the roots of *Aloe* species. *Phytochemistry* **35**, 401–406 (1994).
47. Laphookhieo, S., Maneerat, W. & Koysomboon, S. Antimalarial and Cytotoxic Phenolic Compounds from *Cratoxylum maingayi* and *Cratoxylum cochinchinense*. *Molecules* **14**, 1389–1395 (2009).
48. Tsaffack, M. *et al.* Two new antimicrobial dimeric compounds: febrifuquinone, a vismione-anthraquinone coupled pigment and adamabianthrone, from two *Psorospermum* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **57**, 1113–1118 (2009).
49. Hussain, H. *et al.* Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharmaceutical Biology* **50**, 1448–1462 (2012).
50. Abdel-Rahman, I. A. M. *et al.* In vitro formation of the anthranoid scaffold by cell-free extracts from yeast-extract-treated *Cassia bicapsularis* cell cultures. *Phytochemistry* **88**, 15–24 (2013).
51. Dagne, E., Van Wyk, B.-E., Mueller, M. & Steglich, W. Three dihydroanthracenones from *Gasteria bicolor*. *Phytochemistry* **41**, 795–799 (1996).
52. Hussein, A. A. *et al.* Bioactive Constituents from Three *Vismia* Species. *Journal of Natural Products* **66**, 858–860 (2003).
53. Mbwambo, Z. H. *et al.* Anthranoid Compounds with Antiprotozoal Activity from *Vismia orientalis*. *Planta Medica* **70**, 706–710 (2004).
54. Endo, M. & Naoki, H. Antimicrobial and antispasmodic tetrahydroanthracenes from *Cassia singueana*. *Tetrahedron* **36**, 2449–2452 (1980).

55. Abdissa, N. *et al.* Cytotoxic Quinones from the Roots of Aloe dawei. *Molecules* **19**, 3264–3273 (2014).
56. François, G. *et al.* Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite Plasmodium falciparum : structure-activity relationships. *Parasitology Research* **85**, 582–588 (1999).
57. Babu, P. S., Gowda, D., Gupta, N. V. & Vaghela, R. Current Strategies and Advances in Nano Systems for Management of Leishmaniasis. **9**, 123–134 (2017).
58. Harborne, J. B. Chemistry, biological and pharmacological properties of African medicinal plants. *Phytochemistry* **46**, 1301 (1997).
59. Edward, R. Red/Far-Red Fluorescing DNA-Specific Anthraquinones for Nucl. in *Methods in Enzymology* **505**, 23–45 (Elsevier, 2012).
60. Malik, E. M. & Müller, C. E. Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs: anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal Research Reviews* **36**, 705–748 (2016).
61. Duval, R. & Duplais, C. Fluorescent natural products as probes and tracers in biology. *Natural Product Reports* **34**, 161–193 (2017).
62. Sandwall, P. Biosensors and Molecular Technologies for Cancer Diagnostics. *Medical Physics* **40**, 067301 (2013).
63. Kleemann, B., Loos, B., Scriba, T. J., Lang, D. & Davids, L. M. St John's Wort (Hypericum perforatum L.) Photomedicine: Hypericin-Photodynamic Therapy Induces Metastatic Melanoma Cell Death. *PLoS ONE* **9**, 1–20 (2014).
64. Johann, L., Lanfranchi, D. A., Davioud-Charvet, E. & Elhabiri, M. A Physico-Biochemical Study on Potential Redox-Cyclers as Antimalarial and Antischistosomal Drugs. *Curr Pharm Des* **18**, 3539–3566 (2012).

65. Turrens, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine* **25**, 211–220 (2004).
66. Wang, M. & Casey, P. J. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 110–122 (2016).
67. Yokoyama, K. *et al.* The effects of protein farnesyltransferase inhibitors on trypanosomatids: inhibition of protein farnesylation and cell growth. *Molecular and Biochemical Parasitology* **94**, 87–97 (1998).
68. Snider, B. B. & Zhang, Q. Synthesis of (.+-.)-okicenone and (.+-.)-aloesaponol III. *The Journal of Organic Chemistry* **58**, 3185–3187 (1993).
69. Müller, M., Lamottke, K., Löw, E., Magor-Veenstra, E. & Steglich, W. Stereoselective total syntheses of atrochryson, torosachryson and related 3,4-dihydroanthracen-1(2H)-ones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 2483–2489 (2000).
70. Donner, C. D. Tandem Michael–Dieckmann/Claisen reaction of ortho-toluates—the Staunton–Weinreb annulation. *Tetrahedron* **69**, 3747–3773 (2013).
71. Dodd, J. H. & Weinreb, S. M. Synthesis of the carbon framework of olivin. *Tetrahedron Letters* **20**, 3593–3596 (1979).
72. Roush, W. R., Hartz, R. A. & Gustin, D. J. Total Synthesis of Olivomycin A. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 1990–1991 (1999).
73. Prinz, H., Wiegbe, W. & Müller, K. Syntheses of Anthracenones. 1. Sodium Dithionite Reduction of *peri*-Substituted Anthracenediones. *The Journal of Organic Chemistry* **61**, 2853–2856 (1996).
74. Nicolaou, K. C. *et al.* Total Synthesis of Viridicatumtoxin B and Analogues Thereof: Strategy Evolution, Structural Revision, and Biological Evaluation. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 12137–12160 (2014).

75. Kuttruff, C. A., Mayer, P. & Trauner, D. Evolution of a Synthetic Strategy for the Variecolortides. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, 5151–5161 (2012).
76. Song, G.-P., Wang, P., Zhang, Z.-H., Shi, D.-K. & Li, Y.-X. Synthesis of 2',3'-Di- O - acetylfrangulin A and Prinoidin, Two Novel Anthracene L -Rhamnopyranosides Isolated from *Rhamnus nepalensis*. *Chinese Journal of Chemistry* **26**, 1715–1720 (2008).
77. Cameron, D. W. & Riches, A. G. Synthesis of stentorin. *Tetrahedron Letters* **36**, 2331–2334 (1995).
78. Gallé, J.-B. *Pharmacochimie d'anthranoïdes issus du genre Psorospermum (Hypericaceae) : isolement, activités antiparasitaires et synthèse d'analogues structuraux*. (Strasbourg, 2015).
79. Savard, J. & Brassard, P. Reactions of ketene acetals-14 The use of simple mixed vinylketene acetals in the annulation of quinones. *Tetrahedron* **40**, 3455–3464 (1984).
80. Snieckus, V. Directed ortho metalation. Tertiary amide and O-carbamate directors in synthetic strategies for polysubstituted aromatics. *Chemical Reviews* **90**, 879–933 (1990).
81. Nagem, T. J. & Jesus Faria, T. de. Quinonoid and other constituents of *Vismia martiana*. *Phytochemistry* **29**, 3362–3364 (1990).
82. Hauser, F. M. & Hewawasam, P. Regio- and stereospecific syntheses of 4-deoxyadriamycinone and 4,6-dideoxyadriamycinone from a common intermediate. *The Journal of Organic Chemistry* **53**, 4515–4519 (1988).
83. Li, T. & Walsgrove, T. C. A convergent rgiospecific route to the aklavinone ring system. *Tetrahedron Letters* **22**, 3741–3744 (1981).
84. Nicolaou, K. C., Lim, Y. H., Piper, J. L. & Papageorgiou, C. D. Total Syntheses of 2,2'- *epi* -Cytoskyrin A, Rugulosin, and the Alleged Structure of Rugulin. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 4001–4013 (2007).

85. Kraus, G. A. *et al.* Phthalide annulation: the synthesis of kalafungin, pachybasin and chrysophanol. *The Journal of Organic Chemistry* **48**, 3439–3444 (1983).
86. Mal, D., Pal, R. & Murty, K. V. S. N. Thiophthalides, a novel class of arene-annulating agents: synthesis of polynuclear hydroaromatic compounds. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **0**, 821–822 (1992).
87. Hill, B. & Rodrigo, R. Cyclohexenones as Michael Acceptors in the Staunton–Weinreb Annulation: A Simple Stannane Modification for the Synthesis of Polycyclic Systems. *Organic Letters* **7**, 5223–5225 (2005).
88. Dachavaram, S. S., Kalyankar, K. B. & Das, S. First stereoselective total synthesis of Neocosmosin A: a facile approach. *Tetrahedron Letters* **55**, 5629–5631 (2014).
89. Abri, A. & Ranjdar, S. Preparation of Nano Silica Supported Sodium Hydrogen Sulfate: As an Efficient Catalyst for the Trimethyl, Triethyl and *t*-Butyldimethyl Silylations of Aliphatic and Aromatic Alcohols in Solution and under Solvent-free Conditions. *Journal of the Chinese Chemical Society* **61**, 929–934 (2014).
90. McMurry, J. E. & Erion, M. D. Stereoselective total synthesis of the complement inhibitor K-76. *Journal of the American Chemical Society* **107**, 2712–2720 (1985).
91. Xu, X. & Xie, L. Chinese patent CN 101525281.
92. Smissman, E. E., Voldeng, A. N. & McCarthy, J. F. Synthetic Approach to Dihydrokavain. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **55**, 1101–1104 (1966).
93. Coote, S. C., O'Brien, P. & Whitwood, A. C. Stereoselective aziridination of cyclic allylic alcohols using chloramine-T. *Organic & Biomolecular Chemistry* **6**, 4299 (2008).
94. Kehrli, S., Martin, D., Rix, D., Mauduit, M. & Alexakis, A. Formation of Quaternary Chiral Centers by N-Heterocyclic Carbene-Cu-Catalyzed Asymmetric Conjugate Addition Reactions with Grignard Reagents on Trisubstituted Cyclic Enones. *Chemistry - A European Journal* **16**, 9890–9904 (2010).

95. Honda, T., Endo, K. & Ono, S. Construction of an Enantiomerically Pure 6-Substituted 3,5-syn-Dihydroxyhexanoic Acid System by an Enantioselective Deprotonation Strategy. Formal Synthesis of an Antiobesity Agent, (-)-Tetrahydrolipstatin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **48**, 1545–1548 (2000).
96. Seitz, T., Harms, K. & Koert, U. Vic-Tricarbonyl Compounds: Synthesis of (±)-9-epi-Wailupemycin A. *Synthesis* **46**, 381–386 (2013).
97. Luo, J., Ji, E., Ye, J., Wu, R. & Qiu, L. A mild and catalyst-free aromatization using dihydroxycyclohexanone derivatives as phenyl sources: a new approach to anilines. *Tetrahedron Letters* **54**, 4505–4508 (2013).
98. Fielden, J., Sprott, J. & Cronin, L. Design and stereospecific synthesis of modular ligands based upon cis-1,3-trans-5-substituted cyclohexanes. *New Journal of Chemistry* **29**, 1152 (2005).
99. Kong, L.-Y., Cui, Q., Jin, Z. & Xu, X.-H. Concise total synthesis of AB5046A and AB5046B. *Tetrahedron Letters* **59**, 1705–1707 (2018).
100. Duhamel, P., Hennequin, L., Poirier, J. M., Tavel, G. & Vottero, C. 1,5-Dicarbonyl compounds. *Tetrahedron* **42**, 4777–4786 (1986).
101. Díaz-Ortiz, A., Díez-Barra, E., de la Hoz, A. & Prieto, P. Preparation of Racemic and Enantiomerically Pure Cyclic Ketene Acetals. *Synthetic Communications* **23**, 1935–1942 (1993).
102. Wu, Z., Stanley, R. R. & Pittman, C. U. Selective Diesterification of Diols through Cyclic Ketene Acetal Intermediates. *The Journal of Organic Chemistry* **64**, 8386–8395 (1999).
103. Yoshida, K., Toyoshima, T. & Imamoto, T. Efficient synthetic routes to aromatic compounds using ring-closing olefin metathesis followed by dehydration, oxidation, and tautomerization. *Chemical Communications* **0**, 3774–3776 (2007).

104. Turks, M. & Vogel, P. Synthesis of Optically Active 5-Alkoxy-6-methylcyclohex-2-en-1-ones and 4-Alkoxy-5-methylcyclopent-1-enyl Benzoate. *The Journal of Organic Chemistry* **74**, 435–437 (2009).
105. Kumar, S., Sharma, S. & Chattopadhyay, S. K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia* **89**, 86–125 (2013).
106. Barlow, A. J., Compton, B. J. & Weavers, R. T. Synthesis of the 3-Methylene-2-vinyltetrahydropyran Unit; the Hallmark of the Sesquiterpene, Hodgsonox. *The Journal of Organic Chemistry* **70**, 2470–2475 (2005).
107. Bennett, F., Knight, D. W. & Fenton, G. Methyl (3R)-3-hydroxyhex-5-enoate as a precursor to chiral mevinic acid analogues. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **0**, 133 (1991).
108. Cook, C., Liron, F., Guinchard, X. & Roulland, E. Study of the Total Synthesis of (–)-Exiguolide. *The Journal of Organic Chemistry* **77**, 6728–6742 (2012).
109. Cohen, F. & Overman, L. E. Enantioselective Total Synthesis of Batzelladine F: Structural Revision and Stereochemical Definition. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 10782–10783 (2001).
110. Taniguchi, M., Oshima, K. & Utimoto, K. Stereoselective Allylation of 2-Formyl Amides or 3-Oxo Amides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **68**, 645–653 (1995).
111. Fernandes, R. A. & Mulay, S. V. Total Synthesis of (+)-Demethoxycardinalin 3. *The Journal of Organic Chemistry* **75**, 7029–7032 (2010).
112. Barnett, D. S., Moquist, P. N. & Schaus, S. E. The Mechanism and an Improved Asymmetric Allylboration of Ketones Catalyzed by Chiral Biphenols. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 8679–8682 (2009).

113. Zhang, K. *et al.* First Iridium Complex End-Capped Polyfluorene: Improving Device Performance for Phosphorescent Polymer Light-Emitting Diodes. *J. Phys. Chem.* **112**, 3907–3913 (2008).
114. König, B. Synthesis of Aryl-Substituted 1,3-Butadiones. *Synthetic Communications* **33**, 967–976 (2003).
115. Black, D. & Blackman, N. Nitrones and oxaziridines. XIII. A convenient method for the oxidation of primary- and secondary-alkyl amines to carbonyl compounds. *Australian Journal of Chemistry* **28**, 2547 (1975).
116. Geraghty, N. W. A. & Morris, N. M. Synthesis of 2-Alkyl-2-cyclopenten-1-ones. A Versatile Kinetic Alkylation-Ozonolysis Procedure for the Preparation of γ -Ketoaldehydes. *Synthesis* **1989**, 603–607 (1989).
117. Freedman, T. B., Cao, X., Dukor, R. K. & Nafie, L. A. Absolute configuration determination of chiral molecules in the solution state using vibrational circular dichroism. *Chirality* **15**, 743–758 (2003).
118. Holzwarth, G., Hsu, E. C., Mosher, H. S., Faulkner, T. R. & Moscovitz, A. Infrared circular dichroism of carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching modes. Observations. *Journal of the American Chemical Society* **96**, 251–252 (1974).
119. Nafie, L. A., Keiderling, T. A. & Stephens, P. J. Vibrational circular dichroism. *Journal of the American Chemical Society* **98**, 2715–2723 (1976).
120. Buffeteau, T., Cavagnat, D., Bouchet, A. & Brotin, T. Vibrational Absorption and Circular Dichroism Studies of (–)-Camphanic Acid. *The Journal of Physical Chemistry A* **111**, 1045–1051 (2007).
121. Stephens, P. J. *et al.* Determination of the absolute configurations of natural products via density functional theory calculations of vibrational circular dichroism, electronic

- circular dichroism, and optical rotation: The iso-schizozygane alkaloids isoschizogaline and isoschizogamine. *Chirality* **20**, 454–470 (2008).
122. Stephens, P. J. & Devlin, F. J. Determination of the structure of chiral molecules using ab initio vibrational circular dichroism spectroscopy. *Chirality* **12**, 172–179 (2000).
123. Cretin, B. Recherches sur les déterminants moléculaires contribuant à l'équilibre gustatif des vins secs. (2016).
124. Scott, A. I., Le Quesne, P. W. & Rahman, A.-U. *Natural products chemistry iii*. (Springer-Verlag Berlin An, 2012).
125. Sidana, A. & Farooq, U. Natamycin and Nystatin: Two Novel Inhibitors of *Leishmania Donovanii* Essential Enzymes. **4**, 4534–4544 (2015).
126. Antoine, J.-C. Parasitophorous Vacuoles of *Leishmania amazonensis*-Infected Macrophages Maintain an Acidic pH. *Infect. Immun.* **58**, 9 (1990).
127. Ahua, K. M. *et al.* Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **110**, 99–104 (2007).
128. Cheuka, P., Mayoka, G., Mutai, P. & Chibale, K. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules* **22**, 58 (2016).
129. Fournet, A., Baniós, A. A., Muñoz, V., Hocquemillers, R. & Cavé, A. Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Trop. Med. Parasitol.* **43**, 219–222 (1992).
130. Fournet, A. *et al.* Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* **37**, 159–164 (1992).

131. Awasthi, B. P. & Mitra, K. In vitro leishmanicidal effects of the anti-fungal drug natamycin are mediated through disruption of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction. *Apoptosis* **23**, 420–435 (2018).
132. Tchakam, P. D. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum* Engl. and *Hypericum lanceolatum* Lam. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**, (2012).
133. Zubair, M. *et al.* Bioactive Steroid from the Root Bark of *Psorospermum corymbiferum*. *Chinese Journal of Natural Medicines* **9**, 264–266 (2011).
134. Poumale, H. M. P. *et al.* Flavonoid Glycosides and Other Constituents of *Psorospermum androsaemifolium* Baker (Clusiaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **56**, 1428–1430 (2008).
135. Kisangau, D., Hosea, K., Joseph, C. & Lyaruu, H. *In Vitro* Antimicrobial Assay Of Plants Used In Traditional Medicine In Bukoba Rural District, Tanzania. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* **4**, 510 (2008).
136. Politi, M. *et al.* HPLC-UV/PAD and HPLC-MSn analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new bianthrone. *Phytochemical analysis* **15**, 355–364 (2004).
137. Ehrhardt, K. *et al.* The Redox Cyler Plasmodione Is a Fast-Acting Antimalarial Lead Compound with Pronounced Activity against Sexual and Early Asexual Blood-Stage Parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 5146–5158 (2016).
138. Krylova, N. *et al.* Redox regulation of mitochondrial functional activity by quinones. *Physiology International* **103**, 439–458 (2016).
139. Sidorov, P. *et al.* Redox Polypharmacology as an Emerging Strategy to Combat Malarial Parasites. *ChemMedChem* **11**, 1339–1351 (2016).

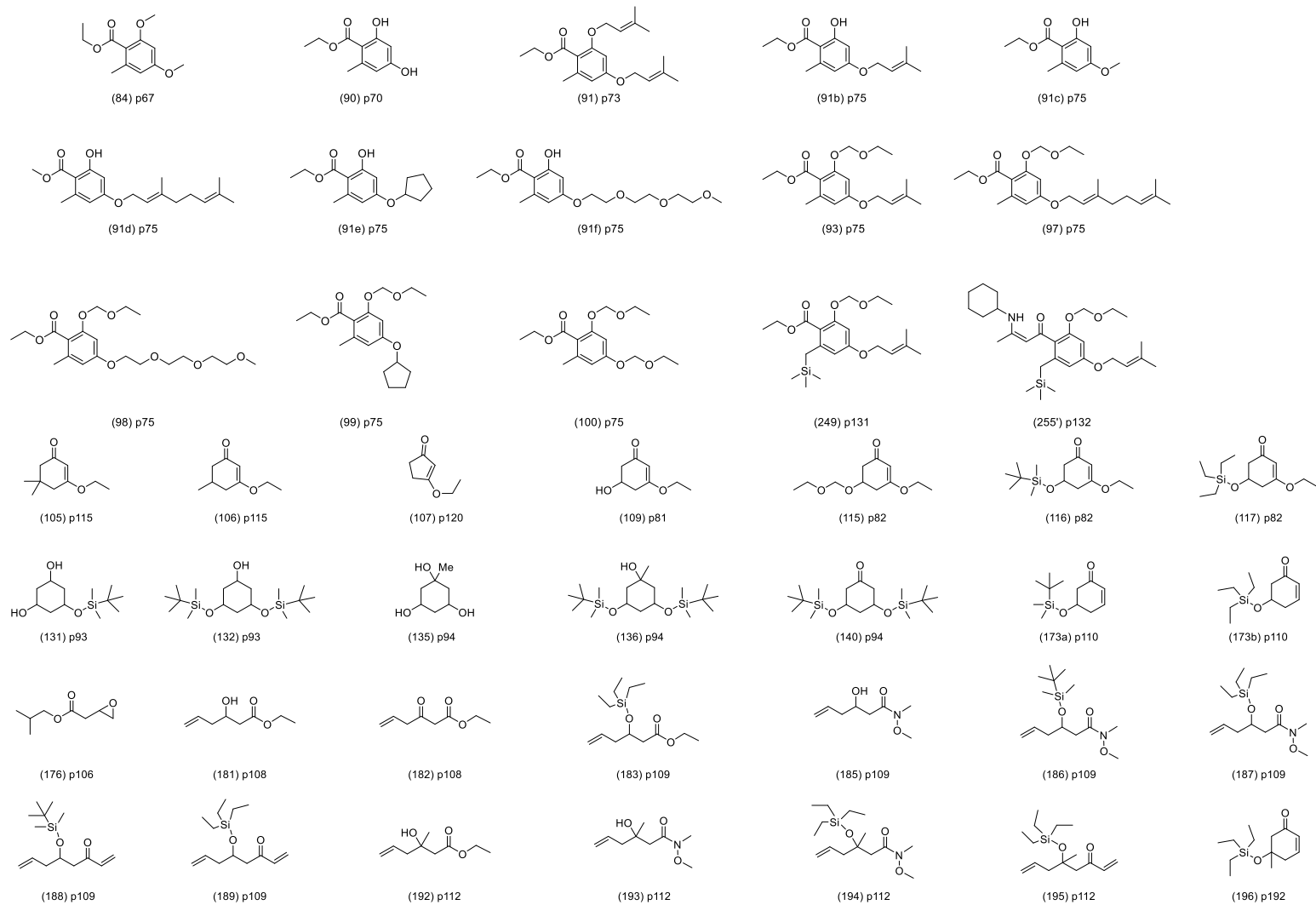
140. Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G. & Monks, T. J. Role of Quinones in Toxicology †. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 135–160 (2000).
141. Shukla, A. K., Patra, S. & Dubey, V. K. Evaluation of selected antitumor agents as subversive substrate and potential inhibitor of trypanothione reductase: an alternative approach for chemotherapy of Leishmaniasis. *Molecular and Cellular Biochemistry* **352**, 261–270 (2011).
142. Sharma, N., Shukla, A. K., Das, M. & Dubey, V. K. Evaluation of plumbagin and its derivative as potential modulators of redox thiol metabolism of *Leishmania* parasite. *Parasitology Research* **110**, 341–348 (2012).
143. Eastman, R. T., Buckner, F. S., Yokoyama, K., Gelb, M. H. & Van Voorhis, W. C. *Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications*. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation. *Journal of Lipid Research* **47**, 233–240 (2006).
144. Socolsky, C., Salamanca, E., Giménez, A., Borkosky, S. A. & Bardón, A. Prenylated Acylphloroglucinols with Leishmanicidal Activity from the Fern *Elaphoglossum lindbergii*. *Journal of Natural Products* **79**, 98–105 (2016).
145. Sairafianpour, M. *et al.* Leishmanicidal and Antiplasmodial Activity of Constituents of *Smirnowia i ranica*. *Journal of Natural Products* **65**, 1754–1758 (2002).
146. Maciel-Rezende, C. M. *et al.* Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **21**, 3114–3119 (2013).
147. Costa Júnior, J. S. *et al.* Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Natural Product Research* **27**, 470–474 (2013).

148. Passalacqua, T. G. *et al.* Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **25**, 3342–3345 (2015).
149. Kaur, J., Dutta, S., Chang, K.-P. & Singh, N. A member of the Ras oncogene family, RAP1A, mediates antileishmanial activity of monastrol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 1071–1080 (2013).
150. Ho, C.-L. *et al.* Antroquinonol blocks Ras and Rho signaling via the inhibition of protein isoprenyltransferase activity in cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **68**, 1007–1014 (2014).
151. Cadelis, M. M. *et al.* Discovery and preliminary structure–activity relationship studies on tecomaquinone I and tectol as novel farnesyltransferase and plasmodial inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**, 3102–3107 (2016).
152. Hartmann, M., Hemmerlin, A., Gas-Pascual, E., Tritsch, D. & Rohmer, M. The effect of MEP pathway and other inhibitors on the intracellular localization of a plasma membrane-targeted, isoprenylable GFP reporter protein in tobacco BY-2 cells. *F1000Research* **2**, (2013).
153. Hartmann, M., Gas-Pascual, E., Hemmerlin, A., Rohmer, M. & Bach, T. J. Development of an image-based screening system for inhibitors of the plastidial MEP pathway and of protein geranylgeranylation. *F1000Research* **4**, 14 (2015).
154. Rodriguez-Concepcion, M. The MEP Pathway: A New Target for the Development of Herbicides, Antibiotics and Antimalarial Drugs. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 2391–2400 (2004).
155. Merret, R., Cirioni, J.-R., Bach, T. J. & Hemmerlin, A. A serine involved in actin-dependent subcellular localization of a stress-induced tobacco BY-2 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase isoform. *FEBS Letters* **581**, 5295–5299 (2007).

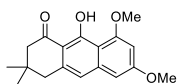
156. Gerber, E. *et al.* The Plastidial 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway Provides the Isoprenyl Moiety for Protein Geranylgeranylation in Tobacco BY-2 Cells. *The Plant Cell online* **21**, 285–300 (2009).
157. Hemmerlin, A., Rivera, S. B., Erickson, H. K. & Poulter, C. D. Enzymes Encoded by the Farnesyl Diphosphate Synthase Gene Family in the Big Sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 32132–32140 (2003).
158. Faivre-Nitschke, S. E., Couée, I., Vermel, M., Grienenberger, J. M. & Gualberto, J. M. Purification, characterization and cloning of isovaleryl-CoA dehydrogenase from higher plant mitochondria. *European Journal of Biochemistry* **268**, 1332–1339 (2001).
159. Scala, F. *et al.* Bromopyrrole Alkaloids as Lead Compounds against Protozoan Parasites. *Marine Drugs* **8**, 2162–2174 (2010).
160. Nakayama, H. *et al.* Efficacy of Orally Administered 2-Substituted Quinolines in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 4950–4956 (2005).
161. Nakayama, H. *et al.* In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **61**, 186–188 (2007).
162. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63 (1983).

Annexes

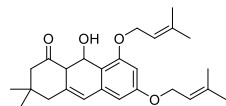
I. Liste des composés synthétisés-partie 1



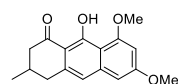
II. Liste des composés synthétisés-partie 2



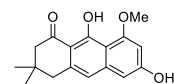
(201a) p115



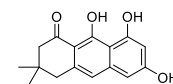
(201b) p115



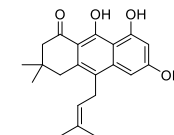
(202) p115



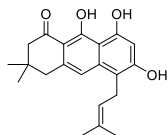
(204) p115



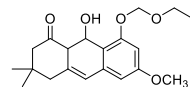
(205) p115



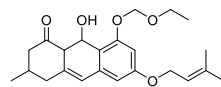
(206) p118



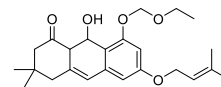
(207) p118



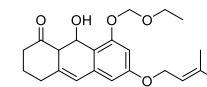
(208) p119



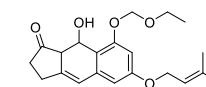
(209) p119



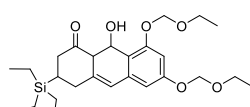
(210) p119



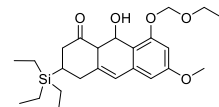
(211) p119



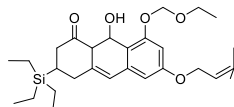
(212) p120



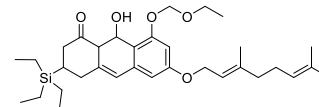
(215) p126



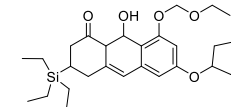
(218) p124



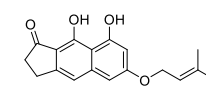
(220) p124



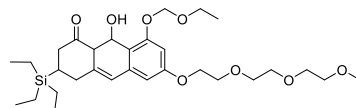
(219) p124



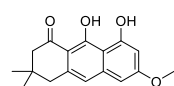
(221) p124



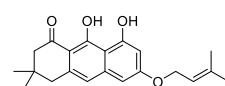
(216) p120



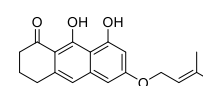
(222) p124



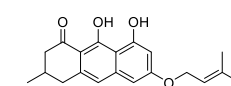
(203) p120



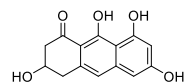
(213) p120



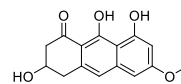
(214) p120



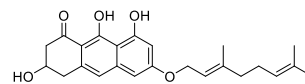
(215) p120



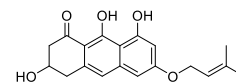
(223) p125



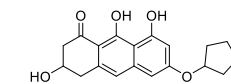
(224) p125



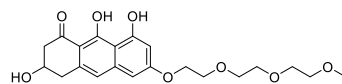
(225) p125



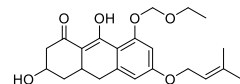
(226) p125



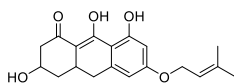
(227) p125



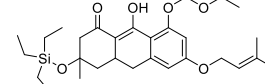
(228) p125



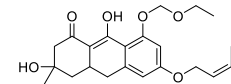
(229) p126



(230) p126



(234) p128



(235) p128

Synthèse et évaluation de l'activité anti-*Leishmania* d'anthranoïdes issus du genre *Psorospermum* (Hypericaceae) utilisé en médecine traditionnelle camerounaise

Résumé

L'étude de plantes appartenant au genre *Psorospermum*, a conduit à isoler plusieurs composés anthranoïdes, dont 9 vismiones, à partir de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum*. Celles-ci ont montré de fortes activités anti-*Leishmania*. Afin de vérifier que l'activité anti-*Leishmania* des extraits est corrélée à leur teneur en vismiones, un dosage par LC-FTMS des vismiones dans plusieurs organes de différentes espèces de *Psorospermum* a été réalisé. Une approche par synthèse organique a permis 1) d'obtenir une large variété d'analogues de vismiones dans le but de mieux comprendre les déterminants structuraux responsables de l'activité anti-*Leishmania* ; 2) de synthétiser un analogue présentant une activité optimisée ainsi qu'une stabilité augmentée par rapport aux vismiones naturelles ; 3) de mettre au point une voie de synthèse totale des vismiones, encore jamais réalisée à ce jour. L'activité anti-*Leishmania* des analogues synthétisés ainsi que leur cytotoxicité ont été évaluées. Enfin, des premières investigations sur le mécanisme d'action des vismiones ont été réalisées sur un modèle végétal exprimant une voie de biosynthèse essentielle à la croissance chez le parasite. Ces investigations nous ont conduits à étudier plus avant les propriétés de fluorescence intrinsèques des vismiones, qui en font potentiellement des outils intéressants en tant que sondes fluorescentes.

Mots-clés : *Psorospermum*, *Leishmania*, vismiones, dosage, dihydroanthracénones, synthèse, mécanisme d'action.

Abstract

The study of plants belonging to the *Psorospermum* genus, led us to isolate several anthranoïd compounds, among which 9 vismiones, from an extract of *P. glaberrimum* bark. The latter have shown strong anti-*Leishmania* activity. In order to check if the anti-*Leishmania* activity of the extracts correlates with their vismiones content, a dosage of the vismiones in several organs of various *Psorospermum* species has been carried out using LC-FTMS. Organic synthesis work has allowed: 1) to obtain a wide variety of vismione analogues in order to better understand which structural subunit is responsible for the anti-*Leishmania* activity; 2) to synthesize an analogue showing an optimised activity as well as an enhanced stability compared to natural vismiones; 3) set up a route for the total synthesis of vismione, which has never been achieved yet. The anti-*Leishmania* activities of the synthesized analogues, as well as their cytotoxicity were evaluated. Finally, preliminary investigations on the mode of action of vismiones were carried out on a plant model which has a biosynthetic pathway essential for the survival of the parasite. These investigations led us to further study the intrinsic fluorescence properties of the vismiones, which potentially make them interesting tools as fluorescent probes.

Keywords: *Psorospermum*, *Leishmania*, vismiones, dosage, dihydroanthracenones, synthesis, mechanism of action.