

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE : CHIMIE

ANNÉES 2009 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1208

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 15/11/2012

par

Jérémy DARDENNE

Premières pharmacomodulations de la meiogynine A, un
sesquiterpène dimère inhibiteur de l'interaction Bcl-
xL/Bak, régulant l'apoptose

Directrice de thèse : Mme Françoise Guéritte, directrice de recherche INSERM (ICSN-CNRS)

Co-directrice de thèse : Mme Fanny Roussi, chargée de recherche CNRS (ICSN-CNRS)

Composition du jury :

Rapporteurs : Mme Pascale Moreau
Mr Pierre van de Weghe

Examineurs : Mr Jean-Daniel Brion
Mr Laurent Micouin

Professeur (Université Blaise Pascal)
Professeur (Université Rennes 1)
Professeur (Université Paris Sud XI)
Directeur de recherche (Université Paris V)

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Françoise Guéritte sans qui je n'aurai pas pu réaliser de thèse. Une « chef » toujours présente avec qui il est très agréable de discuter et d'échanger des arguments en réunion et qui m'a fait découvrir Roche Continents 2012.

Je voudrais aussi remercier le Dr Fanny Roussi. Merci pour ces trois années, pour tout ce que tu m'as appris et pour ton infinie patience.

Je voudrais remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : le Professeur Jean-Daniel Brion, le Professeur Pierre van de Weghe, le Professeur Pascale Moreau ainsi que le Dr Laurent Micouin.

Que serait un doctorant sans son équipe ? Je voudrais remercier tous les personnes avec qui j'ai travaillé des plus anciens (Dalia, Claire, Leslie, Damien, Thierry, Sébastien, Elvina) qui m'ont tout enseigné sur la chimie et la vie à l'ICSN, aux plus jeunes (Xavier, Marion, Charlotte, Guillaume, Cécile, Erell, Barbara) avec qui il a toujours été agréable de partager des moments.

Des remerciements particuliers à mes collègues de « bureau » actuels, Olga pour m'avoir soutenu pendant nos deux années de vie « commune », Sandy pour la bible chimique qu'il est et les parties de tennis mémorables, et Dominique pour nous avoir fait bien rire avec Sandy et pour avoir partagé nos « problèmes ».

Je voudrais remercier aussi le CEI (Hélène, Simon, Amandine, Mélanie, Mélanie et Mehdi) pour tous les mardis midis de folie et les soirées que nous avons pu organiser.

Je n'oublie pas le service HPLC avec Suzanna, Franck et Odile qui m'ont toujours été d'une grande aide et qui m'ont supporté pendant toutes ces années.

Finalement, je remercie mes parents pour leur aide et leur soutien depuis toujours. Je voudrais remercier mes deux meilleurs amis Loïc et JF pour avoir été là, pour tous nos groupes, nos chansons et nos concerts, sans eux ça n'aurait pas été possible.

Je dédie cette thèse à celle qui est là pour moi depuis peu de temps mais qui a déjà tellement fait, mon ami d'enfance, Virginie.

Résumé

La régulation de l'apoptose fait partie des nouvelles cibles thérapeutiques dans la lutte contre le cancer. L'apoptose est l'autodestruction programmée des cellules qui, suite à un besoin physiologique, permet de réguler le développement des cellules. Dans de nombreux cancers, ce mécanisme est inhibé par une surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bcl-xL et Mcl-1. Ce phénomène entraîne le développement des cellules tumorales et des résistances aux chimiothérapies.

Dans cette optique, notre équipe à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles a développé un criblage de plantes tropicales sur ces cibles. Des écorces d'une annonacée de Malaisie, *Meiogyne Cylandrocarpa*, a été isolé un sesquiterpène dimère, la meiogynine A, présentant une bonne affinité vis-à-vis de Bcl-xL ($K_i = 10.7 \mu\text{M}$). Sa synthèse totale a été réalisée au laboratoire afin de déterminer sa configuration absolue et d'étudier les premières relations structure activité. Un des ses diastéréoisomères a également présenté une bonne affinité vis-à-vis de la protéine Bcl-xL.

Afin d'étudier et d'approfondir les premières relations structure activité, la modulation de la meiogynine A a été réalisée. La synthèse des diénophiles acides a été optimisée afin de conduire majoritairement aux diénophiles précurseurs des composés actifs. Différents triènes ont également été synthétisés au laboratoire en vue de modifier la partie Sud de la meiogynine A. Plusieurs analogues ont ainsi pu être obtenus et ont été évalués biologiquement sur des tests *in vitro* et *in cellulo*. Des études de modélisation moléculaire et de RMN structurale ont également été réalisées.

Mots Clés : Apoptose, protéine anti-apoptotique, Bcl-xL, Mcl-1, meiogynine A, Diels-Alder, annélation de Robinson, carboalumination de Negishi, couplage de Suzuki, modélisation moléculaire, RMN structurale.

Laboratoire de rattachement

Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS)

1, avenue de la Terrasse

91198 Gif Sur Yvette Cedex France

ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	13
1 BCL-XL, UNE PROTEINE ANTI-APOPTOTIQUE DE LA FAMILLE BCL-2 ET SES LIGANDS	19
1.1 Les protéines de la famille Bcl-2	19
1.1.1 L'apoptose	19
1.1.1.1 Définition et rôle	19
1.1.1.2 Voie extrinsèque	22
1.1.1.3 Voie intrinsèque ou voie mitochondriale	23
1.1.1.4 Apoptose et cancers	26
1.1.2 Les protéines de l'apoptose	27
1.1.2.1 Introduction	27
1.1.2.2 Bcl-xL	29
1.1.2.3 Mcl-1, comparaison avec Bcl-xL	30
1.1.2.4 Conclusion	35
1.1.3 Composés antagonistes des protéines anti-apoptotiques	36
1.1.3.1 Découvertes	36
1.1.3.2 ABT-737 et ABT-263 (Navitoclax)	39
1.1.3.3 Phénomène de résistance	41
1.1.3.4 Dernières avancées	43
1.2 Rappels sur la Meiogynine A	45
1.2.1 Criblages de plantes	45
1.2.2 Molécules isolées	46
1.2.3 La meiogynine A	47
1.2.3.1 Isolement	47
1.2.3.2 Structure	48
1.2.3.3 Premières relations structure-activité	48
1.2.3.4 Hypothèse de biogénèse	50
1.2.3.5 La « Diels-Alderase », une enzyme mystérieuse	51
1.2.4 Synthèse totale de la meiogynine A	55
1.3 Problématique et objectif du projet	58
2 AMELIORATION DE LA SYNTHÈSE DES DIENOPHILES	61
2.1 Synthèse de la meiogynine A	61
2.1.1 Rappel des travaux antérieurs	61
2.1.2 Problématique	65
2.2 L'annélation de Robinson, rappel bibliographique	66
2.3 L'addition de Michael	68
2.3.1 Rappel bibliographique sur l'addition de Michael asymétrique	68
2.3.1.1 Conditions stoechiométriques	68
2.3.1.2 L'organocatalyse, application à l'addition de Michael	70
2.3.1.2.1 Dérivés du prolinol	70
2.3.1.2.2 Le catalyseur de MacMillan	73
2.3.2 Résultats personnels	74
2.3.2.1 Conditions stoechiométriques	74
2.3.2.2 Conditions catalytiques	76
2.3.2.2.1 Le catalyseur de MacMillan	76
2.3.2.2.2 Les dérivés du prolinol : synthèse de catalyseurs	76
2.3.2.2.3 Addition de Michael, utilisation des catalyseurs synthétisés	78

2.4	Aldolisation et crotonisation	82
2.4.1	Rappel bibliographique	82
2.4.2	Résultats personnels	85
2.5	Fin de la synthèse des diénophiles	87
2.5.1	Formation des éthers d'énols trifliques	87
2.5.2	Formation des acides carboxyliques	88
2.6	Conclusion et perspectives	91
3	SYNTHESE DE TRIENES ET MODIFICATION DE LA PARTIE SUD	95
3.1	Synthèse du triène de la meiogynine A	95
3.1.1	Introduction	95
3.1.2	Résultats antérieurs	95
3.2	Synthèse de triènes aromatiques	98
3.2.1	Objectifs	98
3.2.2	Triènes aromatiques simples porteurs d'une fonction alcool ou acide	99
3.2.2.1	Rappel bibliographique : la carboaluminatation de Negishi	101
3.2.2.2	Mise au point de la réaction de Negishi	104
3.2.2.3	Oxydation de E- 137	106
3.2.2.4	Couplage de Suzuki-Miyaura, formation des triènes aromatiques 123 et 124	108
3.2.2.4.1	Cas du triène alcool 123	109
3.2.2.4.2	Cas du triène acide 124	109
3.2.2.5	Conclusion	112
3.3	Synthèse de triènes aromatiques, introduction de groupements « phénol » et « pyridines »	113
3.3.1	Objectifs	113
3.3.2	Tentative de formation d'un triène « phénol »	113
3.3.2.1	Synthèse de l'alcyne	113
3.3.2.2	Mise au point de la carboaluminatation de Negishi	115
3.3.2.3	Essais de formation d'un triène « phénol » méthoxy	117
3.3.3	Tentative de formation d'un triène « pyridine »	119
3.3.3.1	Synthèse de l'alcyne	119
3.3.3.2	Tentative de carboaluminatation	120
3.3.4	Conclusion	121
3.4	Formation d'un châssis moléculaire modulable	122
3.4.1	Principe et objectifs	122
3.4.2	Châssis moléculaire modulable <i>gem</i> -dibromé	123
3.4.2.1	Rappel bibliographique sur les couplages de Suzuki séquentiels sur des <i>gem</i> -dihalogènes alcènes 123	123
3.4.2.2	Synthèse d'une <i>cis</i> -décaline « <i>gem</i> -dibromée »	126
3.4.2.3	Essais de couplage de Suzuki, méthode de Molander	129
3.4.2.4	Conclusion et perspectives	130
3.5	Conclusion.	132
4	REACTION DE DIELS-ALDER ET RESULTATS BIOLOGIQUES	137
4.1	La réaction de Diels-Alder	137
4.1.1	Rappel bibliographique	137
4.1.1.1	Conditions thermiques	137
4.1.1.2	Conditions catalytiques	139
4.1.1.2.1	Cycloaddition de Diels-Alder catalysée par des acides de Lewis	139

4.1.1.2.2	Organocatalyse	141
4.1.1.2.3	Réaction de Diels-Alder catalysée par des acides boroniques	143
4.1.2	Résultats antérieurs	144
4.1.3	Résultats personnels	145
4.1.3.1	Mise au point des conditions de la réaction de Diels-Alder	145
4.1.3.2	Application à la réaction de Diels-Alder aux diénophiles chiraux 17	148
4.1.3.3	Obtention des analogues aromatiques de la meiogynine A	149
4.1.3.4	Synthèse d'analogues simplifiés	152
4.2	Résultats biologiques et relation structure activité	154
4.2.1	Tests biologiques	154
4.2.1.1	In vitro	154
4.2.1.1.1	Introduction	154
4.2.1.1.2	Principe du test in vitro sur Bcl-xL	154
4.2.1.2	In cellulo	157
4.2.1.2.1	Introduction	157
4.2.1.2.2	Test MTT	158
4.2.1.2.3	Test Annexin V/PI	160
4.2.1.2.4	Test de détection des caspases 3	162
4.2.1.2.5	Conclusion	163
4.2.2	Relation structure activité	163
4.2.2.1	Modélisation moléculaire	163
4.2.2.2	RMN structurale	167
4.2.2.2.1	Introduction et résultats antérieurs	167
4.2.2.2.2	Résultats des expériences sur les composés simplifiés	168
4.3	Conclusions et perspectives.	174
	CONCLUSION	177
	PARTIE EXPERIMENTALE	183
	1 SOLVANTS, PURIFICATIONS ET SUIVI DE REACTIONS	185
	2 ANALYSES ET APPAREILS UTILISES	185
	BIBLIOGRAPHIE	227
	ANNEXES	235

ABBREVIATIONS

A

ADN: acide désoxyribonucléique.

Ac : acétate

ACN: acétonitrile.

Apaf-1: apoptotic protease-activating factor-1, facteur activateur des protéases apoptotiques-1.

ARN: acide ribonucléique.

Aq.: aqueux.

B

BAK: Bcl-2-Antagonist Killer.

BAK-wt: BAK wild type.

Bcl-2: B-cell lymphoma 2, lymphome de cellules B.

BH: Bcl-2 homology domain , domaine d'homologie Bcl-2.

BuLi: butyle lithium (*n*-BuLi, *s*-Buli, *t*-BuLi).

C

Caspase: cysteinyl aspartate-specific protease, protéase à cystéine aspartate spécifique.

CCM: chromatographie sur couche mince.

D

DA: Diels-Alder.

DCM : dichlorométhane

d.e : excès diastéréoisomérique

DO : densité optique

DMA: diméthyle amine.

DMAP: 4-diméthylaminopyridine.

DMF: N,N-diméthylformamide.

DMSO: diméthylsulfoxyde.

E

e.e : excès énantiomérique

Et: éthyle.

Eq.: équivalent.

F

FADD: fas associating protein with death domain, protéine Fas associée à son domaine de mort.

Fas: apoptosis stimulating fragment, fragment stimulant l'apoptose.

G

GC/MS: chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse.

H

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

I

IAP: inhibitors of apoptosis proteins; protéines inhibitrices de l'apoptose.

IC₅₀: concentration maximale pour 50% d'inhibition.

K

K_d: constante de dissociation.

K_i: constante d'inhibition.

L

LDA: diisopropylamidure de lithium.

M

Majo : majoritaire

MAO : méthylaluminoxane

Mino : minoritaire

MMP: mitochondrial membrane permeabilization; perméabilisation de la membrane mitochondriale.

MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization, perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie.

MTBE : méthyl *tert*-butyl éther

MW: micro-ondes.

R

Rdt: rendement.

RMN: résonance magnétique nucléaire.

RX: rayons X.

T

T.: température.

T. A. : température ambiante.

TBAF: fluorure de tétra-*n*-butylammonium.

TBDMSCI: chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane.

tBid: caspase-8-cleaved Bid, Bid clivée par la caspase-8.

TFA: acide trifluoroacétique.

THF: tétrahydrofurane.

TNFR: tumor necrosis factor receptor, récepteur de facteur nécrosant de tumeur.

T. R. : temps de réaction.

Introduction

INTRODUCTION

Le cancer, connu depuis des milliers d'années, est une des maladies majeures de notre époque. Dans l'Égypte ancienne, elle était déjà connue et décrite comme l'œuvre des dieux. Hippocrate lui donna le nom de *carcinome* (nom grec traduit par cancer en français) et le décrivit comme une tumeur dure, non inflammatoire, avec tendance à la récurrence et à la généralisation, amenant à une issue fatale.¹ Depuis, des avancées scientifiques, notamment en médecine, ont permis de comprendre, d'identifier et de tenter de combattre le cancer. Les premières rémissions de cancer comme des leucémies aiguës ont été observées dans les années 50. Ceci a été possible grâce à l'utilisation des glucocorticoïdes associés à des anti-métabolites comme le méthotrexate (Méthotrexate®) ou la mercaptopurine (Purinethol®). A partir des années 70, la recherche s'est intéressée à l'identification des bases biologiques du cancer ce qui a conduit à la caractérisation des oncogènes cellulaires humains. Dans le même temps, de nouveaux médicaments basés sur de nouvelles approches thérapeutiques ont fait leur apparition comme les poisons du fuseau mitotique (la vinblastine (Velban®), la vincristine (Oncovin®), le paclitaxel (Taxol®), le docetaxel (Taxotère®)). Ces médicaments proviennent ou sont dérivés de produits naturels et sont tous encore utilisés de nos jours en chimiothérapie. Les agents alkylants (le busulfan, le carboplatine) et les agents interagissant avec les topoisomérases (l'étoposide, le topotecan) sont également des approches thérapeutiques de choix.²

Les différents traitements et approches thérapeutiques utilisés aujourd'hui ne sont pas capables de soigner l'ensemble des cancers existants. Dans son rapport sur l'observation du cancer en 2011, l'Institut National du Cancer a déclaré, qu'en 2008, le nombre de nouveaux cas de cancer dans l'Union Européenne était estimé à 2,4 millions et le nombre de décès à 1,2 millions.³ C'est pourquoi, l'étude et la découverte de nouvelles approches thérapeutiques sont toujours nécessaires. Parmi celles développées ces dernières années on peut citer les interactions avec des protéines intervenant dans le cycle cellulaire (telles que

¹ <http://www.helmo.be/esas/mapage/euxaussi/sante/cancer.html>

² Calvo, F. ; Bruzzoni-Giovanelli, H. ; Nouvelles Cibles moléculaires dans les traitements des cancers, l'actualité chimique, n°269-270 novembre-décembre 2003, 150-155

³ www.e-cancer.fr

la protéine p53), l'inhibition des télomérases, le développement d'anticorps monoclonaux ou encore la régulation de l'apoptose.^{2,4,5}

D'après la revue de Newman et Cragg, 34% des nouveaux anticancéreux développés entre 1981 et 2010 proviennent de produits naturels ou en sont des dérivés.⁶ Cela démontre que la recherche de molécules actives issues de la biodiversité est toujours d'actualité.

Notre équipe recherche de nouvelles molécules actives par des criblages d'extraits plantes issues de la biodiversité tropicale sur différentes cibles biologiques. Parmi celles-ci, on trouve les protéines agissant sur la régulation de l'apoptose, comme Bcl-xL ou Mcl-1, qui sont des cibles très étudiées en oncologie. C'est ainsi que la meiogynine A, un composé actif sur Bcl-xL, a été isolée d'une plante de Malaisie. Sa synthèse totale a été réalisée au laboratoire ce qui a permis de déterminer sa configuration absolue et d'établir les premières relations structure-activité. La meiogynine A a été obtenue par une réaction de Diels-Alder finale entre deux synthons. L'objectif de ce travail de thèse a été d'améliorer leur synthèse et d'obtenir des analogues afin d'enrichir et d'affiner les relations structure-activité.

Dans un premier temps, nous détaillerons le phénomène de l'apoptose, les protéines qui la régulent et les composés actifs sur celles-ci. La suite du manuscrit traitera de la mise au point de la synthèse des premiers analogues de la meiogynine A ainsi que de leur activité biologique.

⁴ Carter P. ; Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies, *Nat. Rev. Cancer*, **2001**, *1*, 118-129

⁵ Rang, H. P., *Pharmacology*, **2003**, 241

⁶ Newman, D. J. ; Cragg, G. M., *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 311-335

Chapitre 1

1 Bcl-xL, une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 et ses ligands

1.1 Les protéines de la famille Bcl-2

1.1.1 L'apoptose

1.1.1.1 Définition et rôle

L'apoptose est un concept biologique introduit en 1972 par Kerr *et coll*⁷ pour désigner un mécanisme cellulaire différent et complémentaire de la nécrose. Si la nécrose est une mort anormale due à une pathologie, l'apoptose, quant à elle, réfère à une mort cellulaire génétiquement programmée. Ce suicide est physiologique et permet de conserver l'intégrité des organismes uni- et pluricellulaires en régulant leur prolifération.⁸ L'apoptose survient *via* une cascade de caspases (CysteinyI ASpartate-specific ProteASES) qui sera détaillée plus tard. Les facteurs déclencheurs sont multiples : un dommage d'un ou des brins d'ADN ou la transmission d'un signal de mort. L'apoptose se différencie de la nécrose par ses modifications morphologiques spécifiques et l'absence de réaction inflammatoire (Figure 1).

⁷ Kerr, J. F. R ; Willie, A. H. ; Currie, A. R., *Br. J. Cancer*, **1972**, 26, 239-257

⁸ Herker, E. ; Jungwirth, H. ; Lehmann, K. A. ; Maldener, A. ; Fröhlich, K. U. ; Wissing, S. ; Büttner, S. ; Fehr, M. ; Sigrist, S. ; Madeo, F., *J. Cell Biol.*, **2004**, 162, 501-506

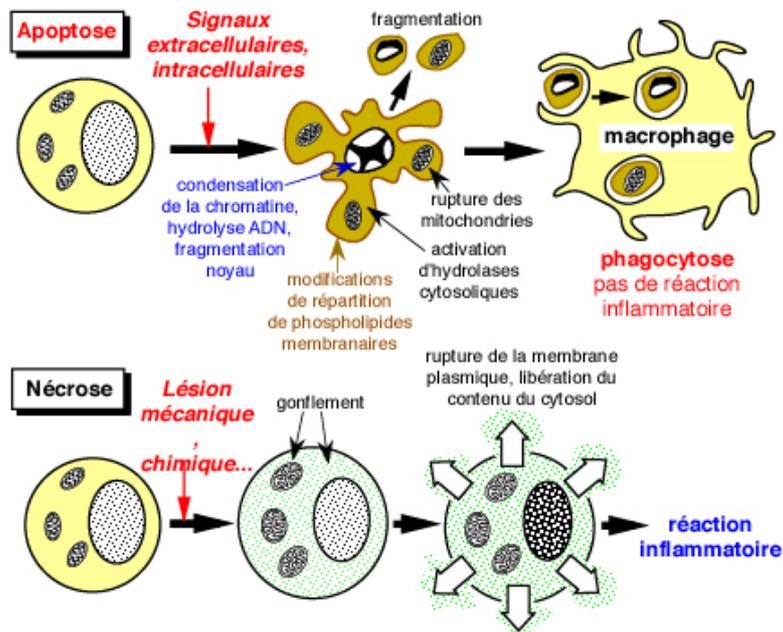


Figure 1 Différences entre les phénomènes de nécrose et d'apoptose⁹

Une fois l'apoptose déclenchée, la chromatine de la cellule se condense, puis l'ADN s'hydrolyse. La cellule rétrécit alors et se fragmente en différentes parties appelées corps apoptotiques. Ces derniers contiennent des éléments cytoplasmiques et nucléaires entourés de membrane provenant de la cellule elle-même. Ces corps sont relargués dans le milieu extracellulaire où ils seront phagocytés par les cellules voisines, évitant ainsi une réaction inflammatoire. Dans le cas de la nécrose, le relargage dans le milieu extracellulaire n'est pas contrôlé et entraîne cette réaction inflammatoire.

Le processus physiologique d'apoptose va permettre de réguler et de contrôler le nombre de cellules lors du développement d'un organisme.¹⁰ Ce processus va aussi participer au renouvellement des tissus en croissance. L'apoptose permet d'éliminer les cellules anormales, qui ont mutées suite à une erreur génétique non réparable par les PARP,¹¹ ainsi que celles ayant subi des altérations lors de leurs cycles cellulaires (mitose).¹² Il arrive cependant que l'apoptose soit dérégulée, ce qui conduit inexorablement à des pathologies :¹⁰

⁹ http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/apoptose.html

¹⁰ Zimmerman, K. C. ; Bonzon, C. ; Green, D. R., *Pharmacol. Ther.*, **2001**, 92, 52-70

¹¹ (Poly (ADP-ribose) polymérase, protéines réparant les dommages de l'ADN et qui déclenchent la mort cellulaire si besoin)

¹² Yu, S. W. ; Andrabi, S. A. ; Wang, H. ; Kim, N. S. ; G. G. ; Dawson, T. M. ; Dawson, V. L., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2006**, 103, 18314-18319

- son augmentation entraîne la mort anarchique et non-contrôlée de milliers de cellules indispensables. Ce phénomène est observé dans des maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, scléroses, Parkinson), des maladies auto-immunes (thyroïdites) ou des maladies cardio vasculaires (infarctus du myocarde),
- sa diminution entraîne la prolifération des cellules (comme c'est le cas dans les cancers).

Des études ont été menées pour déterminer et expliquer les modes de régulation de l'apoptose¹⁰ qui est une cible thérapeutique intéressante. Leur contrôle permettrait, en effet, de rétablir l'équilibre cellulaire. Dans le cas des cancers, la restauration de l'apoptose pourrait induire la mort des cellules tumorales évitant l'évolution de ceux-ci.

Deux voies de déclenchement de l'apoptose ont été découvertes, une voie extrinsèque et une voie intrinsèque (Figure 2). Ces deux voies ont en commun la protéine p53 qui n'est pas exprimée dans certains cancers.¹³ Elles vont finalement déclencher une cascade de caspases menant à l'apoptose.

¹³ Van Dyke, T., *New Engl. J. Med.*, **2007**, 356, 79-81

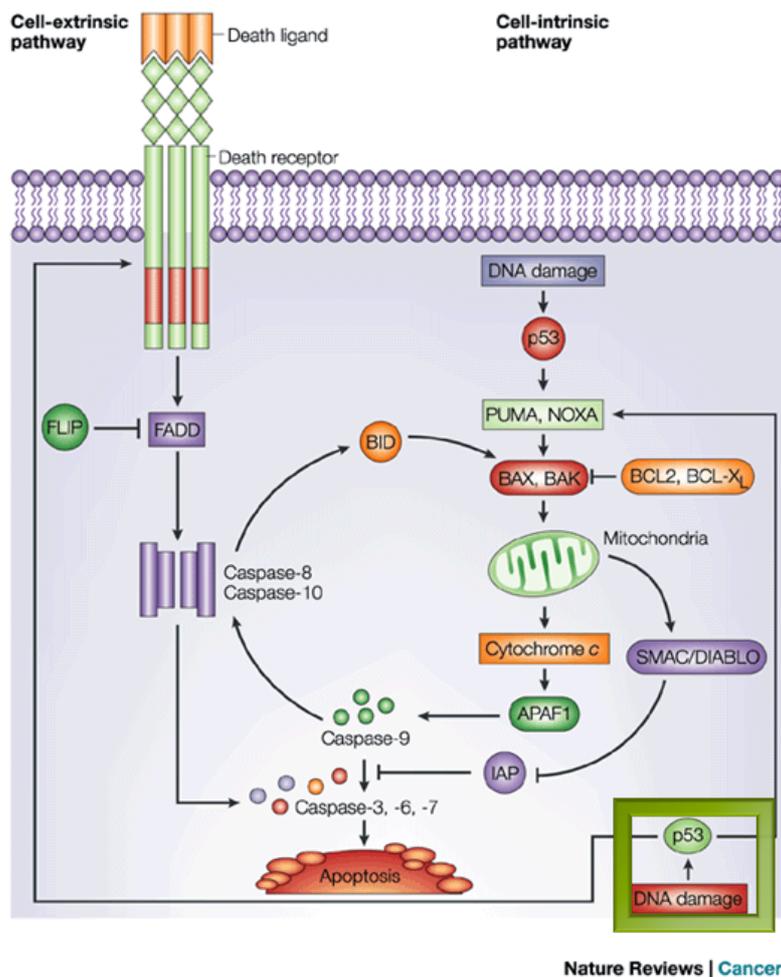


Figure 2 Les deux voies de régulation de l'apoptose¹⁴

1.1.1.2 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque dite des « récepteurs de mort » est activée par la liaison d'un ligand extracellulaire au récepteur de mort (comme TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand TRAIL-(Apo-2L) ou CD95).^{15,16} Cette liaison va entraîner le déclenchement des caspases 8 (dites « initiatrices »), puis des caspases 3, 6 et 7 (dites « effectrices ») qui induisent le démantèlement de la cellule. Les tumeurs désactivent cette voie moins souvent que la voie intrinsèque mais cela a déjà été observé dans certains cancers.¹⁷ L'activation des récepteurs de mort de la famille TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) va déclencher une cascade de

¹⁴ Ashkenazi, A., *Nat. Rev. Cancer* 2, **2002**, 420-430

¹⁵ Hinz, S. ; Trauzold, A., Boenicke, L., *Oncogene*, **2000**, 19, 5477-5486

¹⁶ Ramzi, M. ; Anshu, G. ; Anton-Scott, G., *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **2008**, 3, 20-30

¹⁷ Johnstone, R.W. ; Ruefli, A.A. ; Lowe, S.W., *Cell*, **2002**, 108, 153-164

caspases (Figure 2). Ces caspases se retrouvent impliquées dans l'ensemble du mécanisme apoptotique que ce soit par voie extrinsèque ou intrinsèque.

1.1.1.3 Voie intrinsèque ou voie mitochondriale

L'apoptose est contrôlée par une deuxième voie appelée voie intrinsèque ou mitochondriale. Comme son nom l'indique, elle fait intervenir la mitochondrie de la cellule. Suite à un stress cellulaire (hypoxie, endommagement de l'ADN, activation des oncogènes, perturbation des microtubules) le mécanisme apoptotique déclenche la libération du cytochrome C provenant de la mitochondrie (Figure 3).^{18,19} La libération dépend de la perméabilité de la membrane mitochondriale (MMP = Mitochondrial Membrane Permeabilization ou MOMP = Mitochondrial Outer Membrane Permeability) et celle-ci est régulée par les protéines de la famille de Bcl-2.²⁰

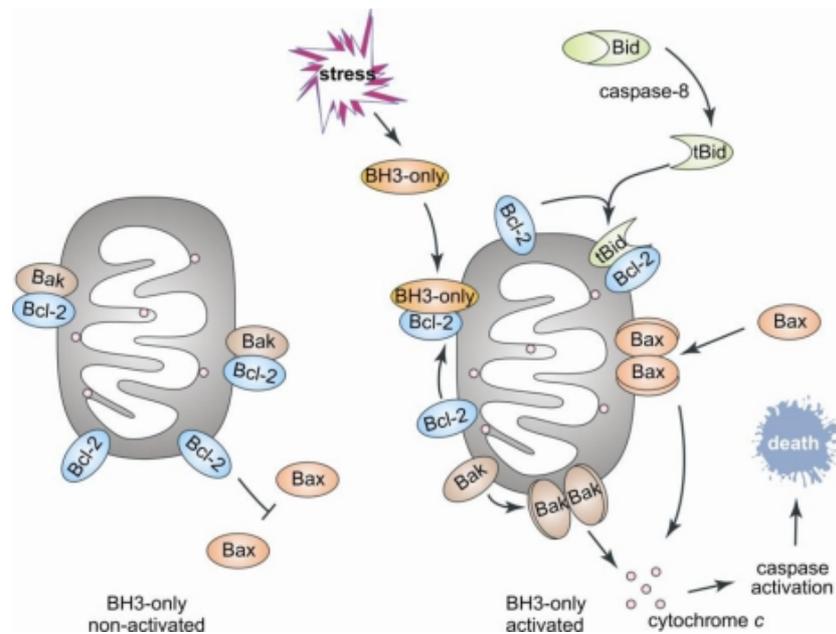


Figure 3 Libération du cytochrome C par la famille des protéines Bcl-2²¹

Cette famille se compose de deux sous-catégories (Figure 4). La première regroupe les protéines anti-apoptotiques. Les principales protéines sont :

¹⁸ Zamani, N. ; Kroemer, G., *Curr. Biol.*, **2003**, *13*, R71-R73

¹⁹ Green, D. R. ; Kroemer, G., *Science*, **2004**, *304*, 626-629

²⁰ Nika, N. D., *Clin. Cancer Res.*, **2007**, *13*, 7254-7262

²¹ Rautureau, G. J. ; Day, C. L. ; Hinds, M., *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, *11*, 1808-1824

- Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-B et Bcl-w qui présentent chacune quatre domaines d'homologie appelés BH1, BH2, BH3, BH4.
- Mcl-1 et Bfl-1 qui possèdent seulement les domaines BH1 à BH3.

La seconde sous-catégorie correspond aux protéines pro-apoptotiques. Celles-ci sont divisées en deux sous-groupes qui sont :

- les protéines BAX, BAK et BOK possédant les domaines BH1, BH2, BH3
- les protéines « BH3-only » ne possédant que le domaine d'homologie BH3 qui sont BAD, BIK, NOXA, HRK, BMF, BID, BIM et PUMA

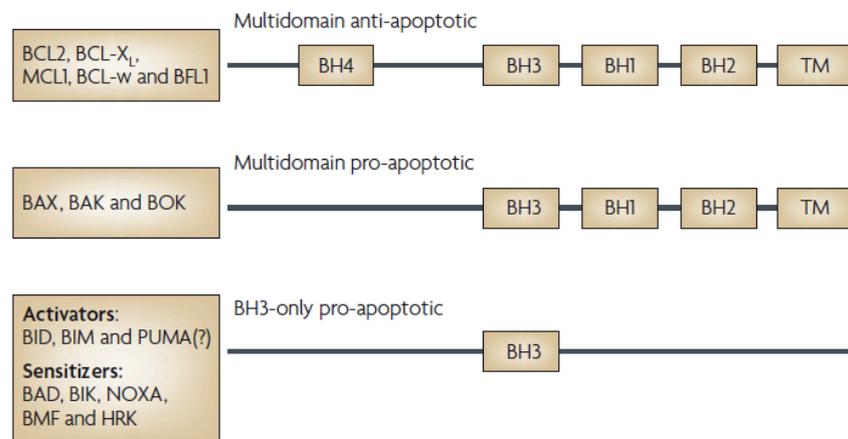


Figure 4 Classification des protéines de la famille Bcl-2²²

Les protéines qui possèdent un domaine transmembranaire (TM) sont insérées dans la membrane extracellulaire de la mitochondrie, les autres sont présentes dans le cytosol. Ces différentes protéines créent des couples de dimères qui ont des propriétés spécifiques. Les hétérodimères, avec une liaison entre une protéine anti-apoptotique et une protéine pro-apoptotique, rendent imperméable la paroi mitochondriale. Les homodimères de protéines pro-apoptotiques permettent la perméabilisation de la paroi mitochondriale et la libération du cytochrome C.

En réponse à un stress cellulaire, les protéines pro-apoptotiques multi-domaines d'une cellule normale sont activées par les protéines pro-apoptotiques « BH3-only ». Le mécanisme n'est pas déterminé pour le moment mais il existe deux hypothèses (Figure 5) :²²

²² Letai, A. G., *Nat. Rev. Cancer*, 2008, 8, 121-132

- une activation par voie indirecte. Les protéines « BH3 only » déplaceraient l'équilibre de liaisons entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques permettant à ces dernières d'exercer leur rôle (libérer le cytochrome C par formation d'homodimères),
- une activation par voie directe. Les protéines « BH3-only » inhiberaient les protéines anti-apoptotiques grâce aux protéines « Sensibilisatrices » et activeraient les protéines pro-apoptotiques grâce aux protéines « Activatrices » (Figure 5).

Néanmoins, l'ensemble des spécialistes s'accorde à dire que la voie indirecte est la plus plausible, nous prendrons donc celle-ci comme référence pour expliquer le fonctionnement de l'apoptose.

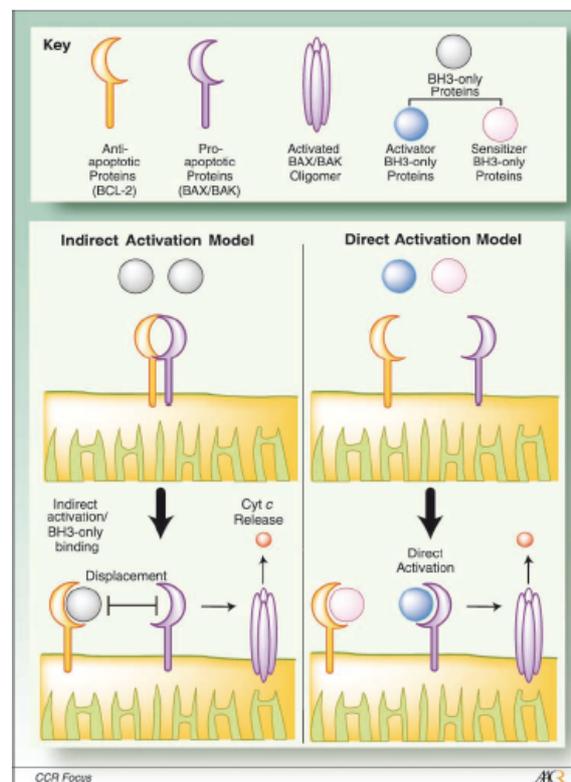


Figure 5 Activation par voies directes et indirectes²⁰

Lorsque les protéines pro-apoptotiques ont dimérisé et formé des pores sur la membrane de la mitochondrie, le cytochrome C peut être libéré. Il forme un complexe avec Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) qui se lie à la procaspase 9. L'ensemble constitue un complexe appelé apoptosome.²¹ Celui-ci active la procaspase 9 en caspase 9 qui active à son tour la procaspase 3 en caspase 3 qui elle-même active et clive la PARP (Figure 6). Ces caspases et la PARP sont des indicateurs du fonctionnement de l'apoptose et sont utilisées comme référence dans les tests biologiques.

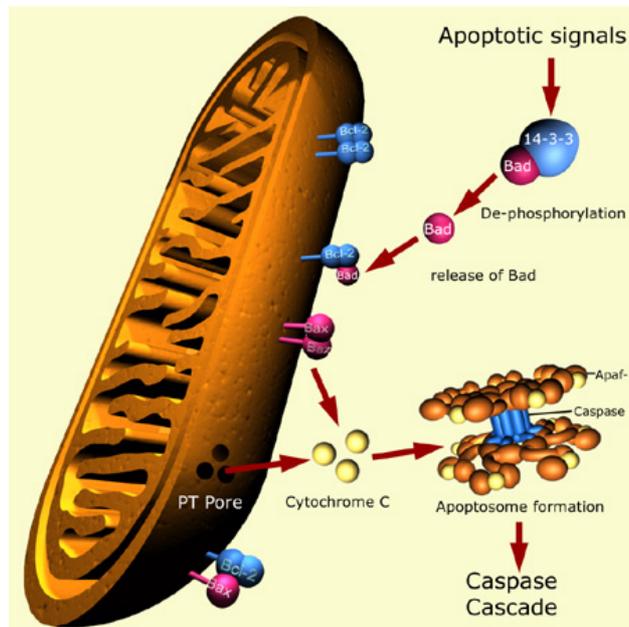


Figure 6 Déclenchement de la cascade des caspases²³

1.1.1.4 Apoptose et cancers

Dans une cellule cancéreuse, il y a surexpression des protéines anti-apoptotiques (comme Bcl-xL et Mcl-1). Celles-ci dimérisent avec les protéines pro-apoptotiques, empêchant la libération du cytochrome C et le bon déroulement de l'apoptose. La cellule devient alors immortelle. Les cellules cancéreuses prolifèrent formant des tumeurs puis éventuellement des métastases.

Le fonctionnement de l'apoptose est comparable, schématiquement, à un rhéostat (Figure 7). Les dimères de protéines formés entraînent la mort (« DEATH ») ou la survie de la cellule (« LIFE »).

²³ <http://www.rcdrg.sgu.ac.uk/research/cell-apoptosis/mitochondria>

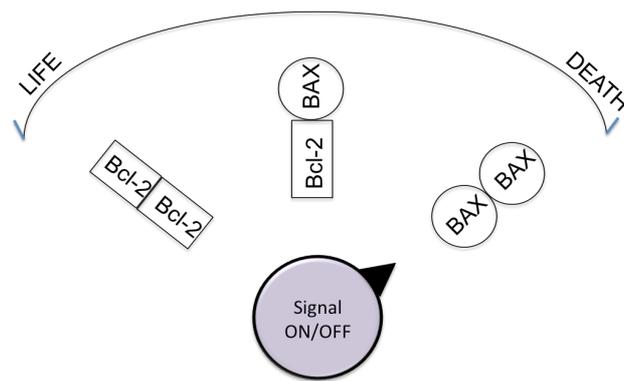


Figure 7 Rhéostat de l'apoptose¹⁶

Dans le cas de certains cancers, l'interrupteur est bloqué sur « LIFE » et rend les cellules tumorales insensibles à l'apoptose. Il semble intéressant de développer des composés qui vont venir perturber les équilibres de fixation de ces protéines et rétablir leur bon fonctionnement.

1.1.2 Les protéines de l'apoptose

1.1.2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1.1.1, les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale régulant ainsi la libération du cytochrome C. Nous avons montré l'intérêt de développer des composés permettant de restaurer le fonctionnement de l'apoptose. Cette restauration est possible grâce la libération des protéines pro-apoptotiques, leur permettant ainsi de jouer leur rôle au sein du mécanisme apoptotique.

Les premiers travaux se sont focalisés sur le développement de composés interagissant avec la protéine anti-apoptotique Bcl-xL qui est surexprimée dans certains cancers. Des résultats plus récents ont montré que la protéine anti-apoptotique Mcl-1 était aussi une cible intéressante.²⁴ Pour développer de tels composés, il est nécessaire de connaître la structure de chaque protéine cible ainsi que son mode de liaison avec les protéines pro-apoptotiques.

²⁴ Juin, P. ; Geneste, O. ; Raimbaud, E. ; Hickman, J. A., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1644, 251-260

La séquence d'alignement des acides aminés des protéines multi-domaines de la famille Bcl2 est présentée Figure 8.²⁵ Il a été montré que les domaines BH1, BH2 et BH3 sont essentiels pour la formation des homodimères et hétérodimères (voir 1.1.1.3). Les protéines pro-apoptotiques se lient aux protéines anti-apoptotiques grâce à leur domaine BH3. Ces interactions ont été étudiées en analysant, par RMN, le complexe formé par le domaine BH3 de Bak et Bad avec Bcl-xL.²⁶ Il a été mis en évidence que ces interactions sont de type Van der Waals. La séquence NWGR, encadrée en rouge, est indispensable pour l'interaction des protéines anti-apoptotiques avec les protéines pro-apoptotiques.

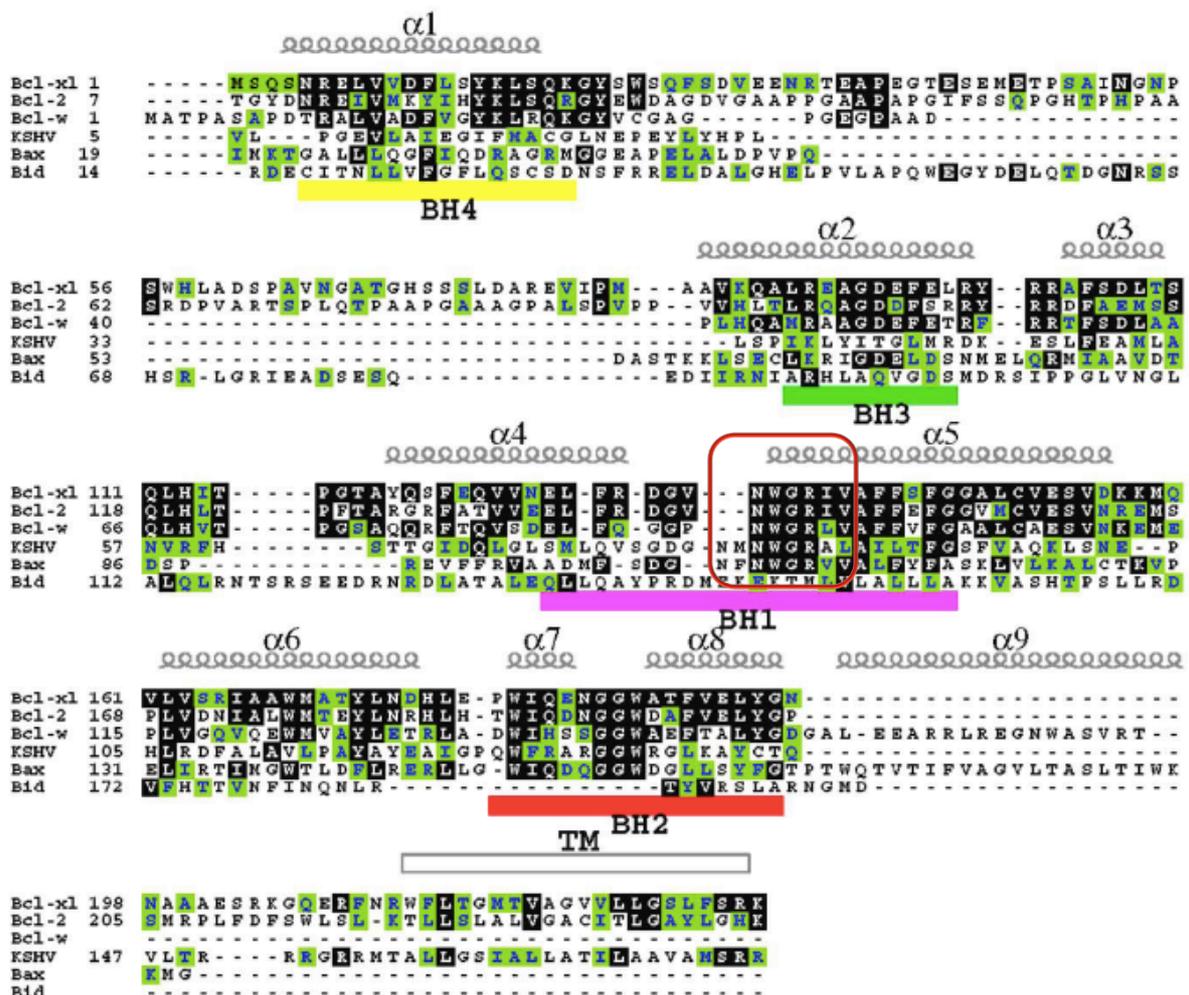


Figure 8 Séquence d'alignement des acides aminés des protéines de la famille Bcl-2. Les rectangles magenta, rouge, vert et jaune représentent respectivement les domaines BH1 à BH4, les hélices sont représentées au dessus de la séquence en gris²⁸

²⁵ Rutledge, S. E. ; Chin, J. W. ; Schepartz, A., *Curr. Opin. Chem. Bio.*, **2002**, 6, 479-485

²⁶ Sattler, M. ; Liang, H. ; Nettlesheim, D. ; Meadows, R. P. ; Harlan, J. E. ; Eberstadt, M. ; Yoon, H. ; Shuker, S. B. ; Chang, B. ; Minn, A. J. ; Thompson C. B. ; Fesik, S. W., *Science*, **1997**, 275, 983-986

1.1.2.2 Bcl-xL

La protéine Bcl-xL (B-cell lymphoma- xL) est une protéine anti-apoptotique possédant des domaines d'homologie BH1, BH2, BH3 et BH4 ainsi que le domaine TM qui l'ancre sur la membrane mitochondriale. La première structure publiée de Bcl-xL date de 1996, elle a été déterminée par cristallographie à rayons X et spectroscopie RMN.²⁷ L'étude a été réalisée sur une protéine humaine tronquée en complexe avec le peptide Bak. La structure totale possède huit hélices α . Les hélices $\alpha5$ et $\alpha6$ forment le cœur de la protéine (Figure 9). Elles sont principalement hydrophobes et sont entourées par les hélices $\alpha3$ et $\alpha4$ d'un côté et $\alpha1$ et $\alpha2$ de l'autre. L'hélice $\alpha5$ est précédée par une séquence d'acides aminés « NWGR » que l'on retrouve dans l'ensemble de la famille des protéines Bcl-2. Ceci correspond à N pour Asparagine, W pour Tryptophane, G pour Glycine et R pour Arginine. Cette séquence semble avoir un rôle structural et fonctionnel crucial. Le résidu tryptophane crée structurellement des liens hydrophobes avec les hélices $\alpha7$ et $\alpha8$. Le résidu arginine joue un rôle important dans l'association avec les protéines Bak et Bad car il a la possibilité de créer des interactions de type Van der Waals.

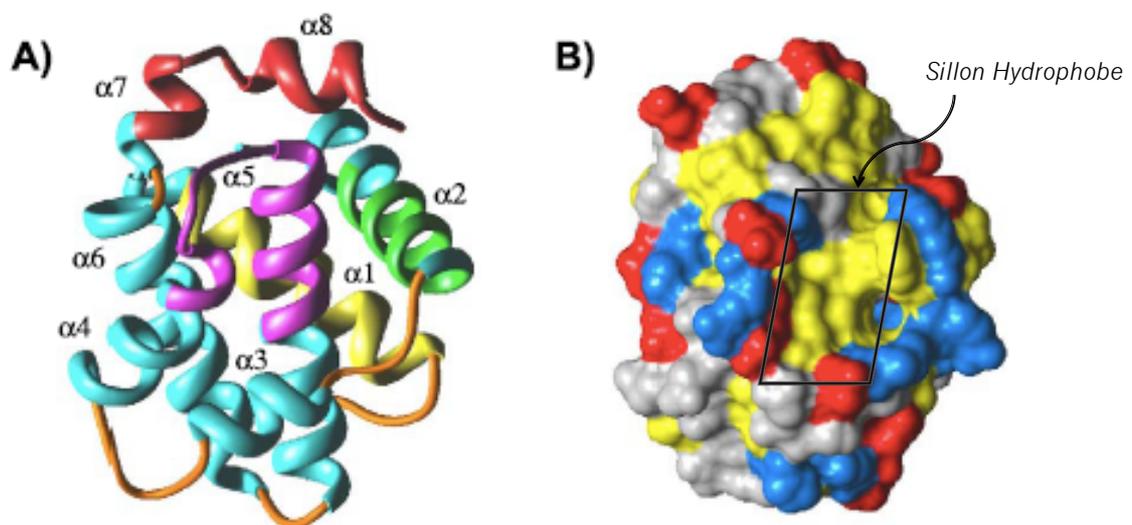


Figure 9 A) Représentation ruban de Bcl-xL, les domaines BH1 à BH4 sont respectivement de couleurs magenta, rouge, vert et jaune **B)** Surfaces de la protéine Bcl-xL²⁸

²⁷ Muchmore, S. W. ; Sattler, M. ; Liang, H. ; Meadows, R. P. ; Harlan, J. E. ; Yoon, H. S. ; Nettlesheim, D. ; Chang, B. S. ; Thompson, C. B. ; Wong, S. L. ; Ng, S. C. ; Fesik, S. W., *Nature*, **1996**, 381, 335-341

²⁸ Petros, A. M. ; Olejniczak, E. T. ; Fesik, S. W., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1644, 83-94

La protéine Bcl-xL présente un sillon hydrophobe (Figure 10) qui est le siège des interactions avec les protéines pro-apoptotiques et les ligands. Ce sillon se compose des domaines BH1 et BH2, *i.e* des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ partiellement et des hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$ dans leur intégralité.

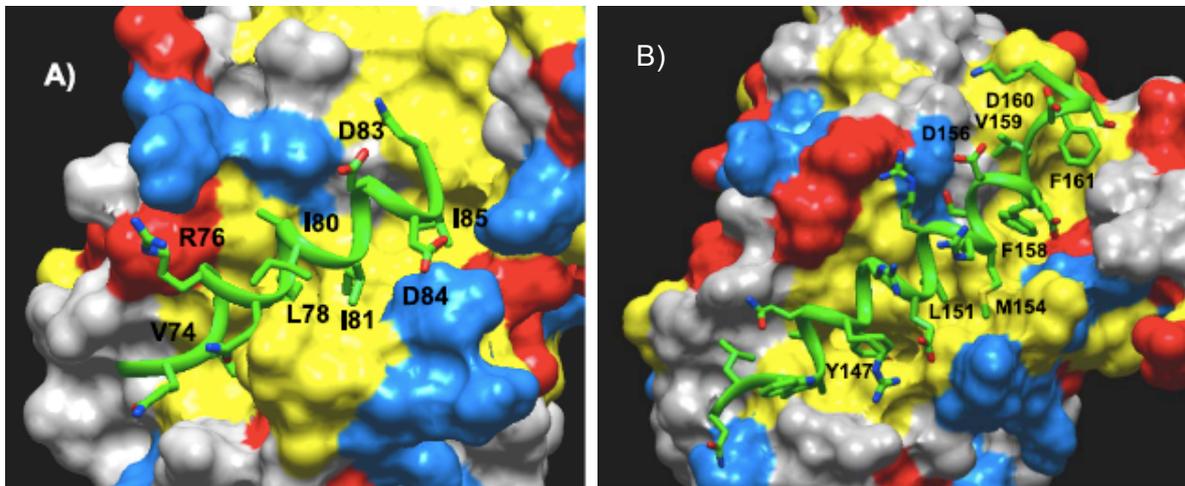


Figure 10 Représentation des couples Bcl-xL/peptide Bak (A) et Bcl-xL/peptide Bad (B)²⁶

1.1.2.3 Mcl-1, comparaison avec Bcl-xL

La protéine *Myeloid cell leukemia-1* (Mcl-1) est une protéine anti-apoptotique similaire à Bcl-xL. Elle possède les mêmes domaines d'homologies BH1, BH2, BH3 et empêche également les cellules de rentrer en apoptose.²⁹ La protéine Mcl-1 possède, comme la protéine Bcl-xL, huit hélices α (Figure 11).

²⁹ Han, J. ; Goldstein, L. A. ; Gastman, B. R. ; Rabinovitz, A. ; Rabinowich, H., *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 16383-16392

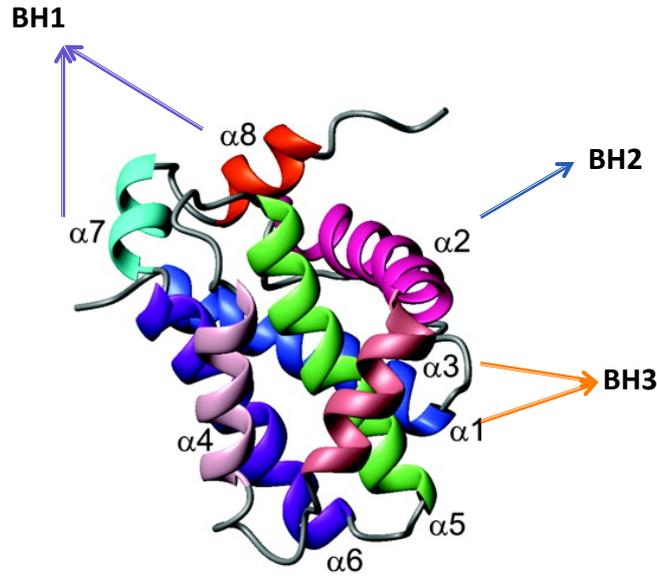


Figure 11 Structure ruban de Mcl-1, les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 5$ (rose et vert) forment le domaine BH1, les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$ (bleu et orange) forment le domaine BH2, hélice $\alpha 2$ (magenta) forme le domaine BH3³⁰

Le séquençage des acides aminés de la protéine montre également la présence de l'enchaînement « NWGR » qui précède l'hélice $\alpha 5$ et qui est nécessaire et essentiel pour les interactions avec les protéines pro-apoptotiques possédant le domaine d'homologie BH3 (Figure 12).

	1	10	20	30	40	50	60																																																																												
mmMcl-1	M	F	G	L	R	R	N	A	V	I	G	L	N	L	Y	C	G	G	A	S	L	G	A	G	G	S	P	A	G	A	R	L	V	A	E	E	A	K	A	R	R	E	G	G	E	A	A	L	L	P	G	A	R	V	V	A	R	P	P	61																							
	70	80	90	100	110	120	130	140																																																																											
mmMcl-1	P	V	G	A	E	D	P	D	V	T	A	S	A	E	R	L	H	K	S	P	G	L	L	A	V	P	P	E	E	M	A	A	S	A	A	A	A	I	V	S	P	E	E	L	D	G	C	E	P	E	A	I	G	K	R	P	A	V	L	P	L	L	E	R	V	S	E	A	A	K	S	S	G	A	D	G	S	L	P	S	T	144	
	150	160	170																																																																																
mmMcl-1	P	P	P	E	E	E	E	D	L	Y	R	Q	S	L	E	I	I	S	R	Y	L	R	E	Q	A	T	G	S	K	D	S	K	-----	178																																																	
mmBcl-x _L	-----	M	S	Q	S	N	R	E	L	V	V	D	F	L	S	Y	K	L	S	Q	K	G	Y	S	W	S	Q	F	S	D	V	E	E	N	R	T	E	A	P	E	E	T	E	A	E	R	E	T	-	P	S	A	I	N	G	N	P	S	W	H	L	A	D	S	P	A	V	N	G	A	T	G	H	S	72								
hsBcl-2	----	M	A	H	A	G	R	T	G	Y	D	N	R	E	I	V	M	K	I	H	Y	K	L	S	Q	R	G	Y	E	W	D	A	G	V	G	A	A	P	P	G	A	P	A	P	G	I	F	S	S	Q	P	G	H	T	P	H	P	A	A	S	R	D	P	V	A	R	T	S	P	L	Q	T	P	A	A	P	G	79					
hsBcl-w	----	M	A	T	P	A	S	A	P	D	T	R	A	L	V	A	D	F	V	G	Y	K	L	R	Q	K	G	Y	V	C	G	-----	30																																																		
	180	190	200	210	220	230	240	250																																																																											
mmMcl-1	--	P	L	G	E	A	G	A	G	R	R	A	L	E	T	L	R	R	V	G	D	G	V	Q	R	N	H	E	T	A	F	Q	G	M	L	R	K	L	D	I	K	N	E	G	D	V	K	S	F	S	R	V	M	V	H	V	F	K	D	G	V	T	N	W	G	R	I	V	T	L	I	S	F	G	A	F	V	A	K	H	L	259	
mmBcl-x _L	S	S	L	D	A	R	E	V	I	P	M	A	A	V	K	Q	A	L	R	E	A	G	D	E	F	E	L	R	Y	R	R	A	F	S	D	L	T	S	Q	L	H	I	T	P	G	T	A	Y	Q	S	F	E	Q	V	V	N	E	L	F	R	D	G	V	-	N	W	G	R	I	V	A	F	F	S	F	G	A	L	C	V	E	S	154
hsBcl-2	A	A	A	G	P	A	L	S	P	V	P	V	V	H	L	T	L	R	Q	A	G	D	D	F	S	R	R	Y	R	R	D	F	A	E	M	S	S	Q	L	H	L	T	P	F	T	A	R	G	R	F	A	T	V	V	E	L	F	R	D	G	V	-	N	W	G	R	I	V	A	F	F	E	F	G	G	V	M	C	V	E	S	161	
hsBcl-w	--	A	G	P	G	E	G	P	A	A	D	P	L	H	C	A	M	R	A	A	G	D	E	F	E	T	R	F	R	T	F	S	D	L	A	A	Q	L	H	V	T	P	G	S	A	Q	R	F	T	Q	V	S	D	E	L	F	Q	G	G	R	-	N	W	G	R	I	V	A	F	F	V	F	G	A	L	C	A	E	S	110			
	270	280	290	300	310	320	330																																																																												
mmMcl-1	K	S	V	N	Q	E	S	F	I	E	P	L	A	E	T	I	T	D	V	L	R	T	K	R	D	W	L	V	K	Q	R	G	W	D	G	F	V	E	F	F	H	V	Q	D	L	E	G	G	I	R	N	V	L	L	A	F	A	G	V	A	G	V	A	G	L	A	Y	L	I	R	331												
mmBcl-x _L	V	D	K	E	M	Q	V	L	S	R	I	A	S	W	M	A	T	Y	L	N	D	H	L	E	P	W	I	Q	E	N	G	G	W	D	T	F	V	D	L	Y	G	N	N	A	A	A	S	R	K	Q	E	R	F	N	R	W	F	L	T	G	M	T	V	A	G	V	V	L	L	G	S	L	F	S	R	K	233						
hsBcl-2	V	N	R	E	M	S	P	L	V	D	N	I	A	L	W	M	T	E	Y	L	N	R	H	L	H	T	W	I	Q	D	N	G	W	D	A	F	V	E	L	Y	G	P	S	M	R	P	L	F	D	F	S	W	L	S	L	K	T	L	S	L	A	L	V	G	A	C	I	T	L	G	A	Y	L	G	H	K	239						
hsBcl-w	V	N	K	E	M	E	P	L	V	G	Q	V	E	W	M	V	E	Y	L	E	T	R	L	A	D	W	I	H	S	G	G	W	A	E	F	T	A	L	Y	G	D	G	A	L	E	A	R	R	L	R	E	G	N	W	A	S	V	R	T	V	L	T	G	A	V	A	L	G	A	L	V	T	V	G	A	F	F	A	S	K	193		

Figure 12 Séquence comparatrice des protéines Mcl-1 (souris) et Bcl-xL (humaine)

³⁰ Day, C. L. ; Chen, L. ; Richardson, S. J. ; Harrison, P. J. ; Huang, D. C. S. ; Hinds, M. G., *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 4738-4744

Hormis quelques différences structurelles sur la ligne de séquençage, le mode de fixation et de liaison avec des protéines BH3-only reste sensiblement le même. En effet, Mcl-1 possède un sillon hydrophobe comparable à celui de Bcl-xL. L'hélice $\alpha 3$ est l'élément hydrophobe essentiel du sillon. La chaîne « NWGR » lie l'hélice $\alpha 3$ à l'hélice $\alpha 5$ et apporte un point d'ancrage aux protéines pro-apoptotiques et aux différents ligands développés.

Une étude récente a tenté de montrer les différences entre les modes de fixation avec Bcl-xL et Mcl-1.³¹ D'une part Mcl-1 forme un complexe avec un peptide mimant le domaine BH3 de BID (BID-BH3) et d'autre part, Bcl-xL forme un complexe avec un peptide mimant le domaine BH3 de Bad (Bad-BH3) (Figure 13). La Figure 13A superpose le complexe Mcl-1/BID-BH3 et le complexe Bcl-xL/Bad-BH3. Une des différences les plus importantes se situe au niveau de l'hélice $\alpha 3$. Une gêne stérique est notable entre la méthionine 231 de l'hélice $\alpha 3$ de Mcl-1 et la tyrosine 105 du peptide Bad-BH3.

Cela met en évidence les différences d'affinité des protéines anti-apoptotiques vis-à-vis des protéines pro-apoptotiques et les différentes possibilités de liaison avec des inhibiteurs.

³¹ Liu, Q. ; Moldoveanu, T. ; Sprules, T. ; Matta-Camacho, E. ; Mansur-Azzam, N. ; Gehring, K., *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 19615-19624

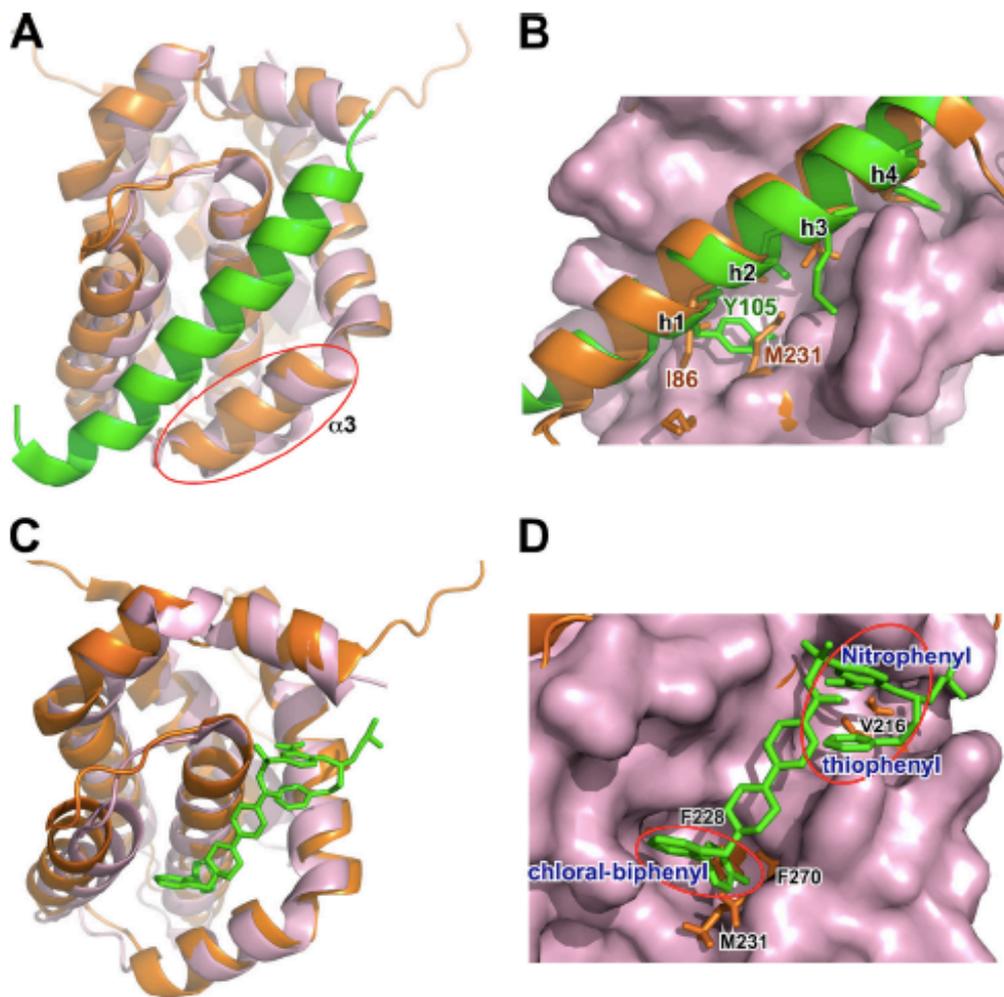


Figure 13 Différence de liaison entre les complexes Mcl-1/BID-BH3 et Bcl-xl/Bad-BH3, **13A** Superposition de Mcl-1 en orange en complexe avec BID-BH3 (non représenté) et de Bcl-xL (en rose) en complexe Bad-BH3 (en vert). Une des différences les plus notables se situe au niveau de l'hélice $\alpha 3$ (entourée en rouge), **13B** Clash entre la méthionine 231 de l'hélice $\alpha 3$ de Mcl-1 et la tyrosine 105 du peptide Bad-BH3. **13C** Représentation similaire à **13A** avec ABT 737, **13D** ABT-737 dans le sillon hydrophobe, clash avec la méthionine 231, les phénylalanine 228 et 270 ainsi que la valine 216³¹

Sur les Figure 13C et 13D, le composé ABT-737 représenté en vert, se lie à Bcl-xL au niveau du sillon hydrophobe et déclenche l'apoptose (Figure 14). Cette molécule a été développée par les laboratoires Abbott et est actuellement en essai clinique de phase II.

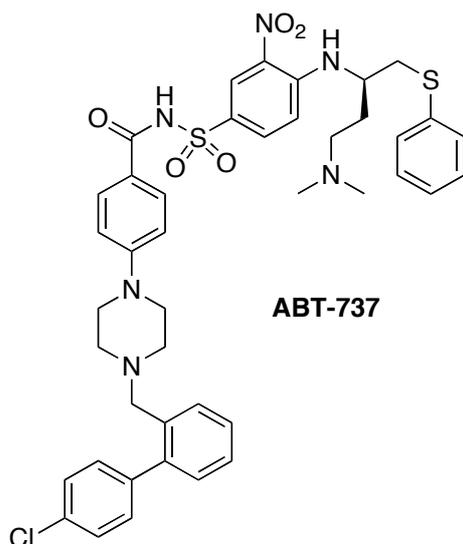


Figure 14 Structure d'ABT-737

Il apparaît clairement sur la Figure 13D une gêne stérique entre ABT-737 et des acides aminés de l'hélice $\alpha 3$ de Mcl-1. Cette gêne stérique explique la moins bonne affinité du composé d'Abbott vis-à-vis de la protéine Mcl-1 ainsi que son incapacité à détruire les cellules tumorales surexprimant Mcl-1.^{32,33,34}

Les différences de positionnement des domaines BH3 dans les sillons hydrophobes expliquent aussi les différentes constantes de dissociation des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (Tableau 1). On y remarque une complémentarité de ces deux protéines vis-à-vis de la famille des protéines pro-apoptotiques.

³² Fire, E. ; Gullà, S. V. ; Grant, R. A. ; Keating, A. E., *Protein Sci.*, **2010**, *19*, 507-519

³³ Konopleva, M. ; Contractor, R. ; Tsao, T. ; Samudio, I. ; Ruvolo, P.P. ; Kitada, S. ; Deng, X. ; Zhai, D. ; Shy, Y. X. ; Sneed, T. ; Verhaegen, M. ; Soengas, M. ; Ruvolo, V. R. ; McQueen, T. ; Schober, W. D. ; Watt, J. C. ; Jiffar, T. ; Ling, X. ; Marini, F. C. ; Harris, D. ; Dietrich, M. ; Estrov, Z. ; McCubrey, J. ; May, W. S. ; Reed, J. C. ; Andreefñ M., *Cancer Cell*, **2006**, *10*, 375-388

³⁴ van Delft, M. F. ; Wei, A. F. ; Mason, K. D. ; Vandenberg, C. J. ; Chen, L. ; Czabotar, P. E. ; Willis, S. N. ; Scott, C. L. ; Day, C. L. ; Cory, S. ; Adams, J. M. ; Roberts, A. W. ; Huang, D. C. , *Cancer Cell*, **2006**, *10*, 389-399

Tableau 1 Valeurs des constantes de dissociation des protéines de la famille Bcl-2 (en nM)²²

Protéine anti-apoptotique	Activatrice		Sensibilisatrice				
	BID	BIM	BAD	BIK	NOXA	HRK	PUMA
Bcl-xL	12±9	<10	60±19	17±12	-	92±11	<10
Mcl-1	<10	<10	-	109±33	19±2	-	<10

Mcl-1 est surexprimée dans certains cancers (cancers hématopoïétiques, cancers lymphoïques)^{35, 36, 37} et comme Bcl-xL, c'est une cible thérapeutique de choix pour la régulation de l'apoptose.

1.1.2.4 Conclusion

L'apoptose est un mécanisme cellulaire essentiel pour le maintien de l'équilibre physiologique. Les cellules endommagées sont détruites par cette mort programmée. Elle est contrôlée par deux voies, une voie extrinsèque faisant intervenir des récepteurs de mort au niveau du domaine membranaire de la cellule, et une voie intrinsèque ou mitochondriale contrôlée par la famille des protéines Bcl-2 qui vont réguler la perméabilité de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome C. Cette famille est divisée en deux catégories de protéines, les anti- et les pro-apoptotiques. Celles-ci vont former des homodimères et hétérodimères qui vont créer ou empêcher la formation des pores sur la membrane mitochondriale. Dans certains cancers, la surexpression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xL et Mcl-1, se traduit par la formation d'hétérodimères avec pour conséquence une prolifération des cellules cancéreuses et une résistance aux traitements classiques. La régulation de ce mécanisme de l'apoptose par des petites molécules peut être envisagée comme cible thérapeutique.

³⁵ Derenne, S. ; Monia, B. ; Dean, N. M. ; Taylor, J. K. ; Rapp, M. J. ; Harousseau, J. L. ; Bataille, R. ; Amiot, M., *Blood*, **2002**, *100*, 194-199

³⁶ Alvi, A. J. ; Austen, B. ; Weston, V. J. ; Fegan, C. ; MacCallum, D. ; Gianella-Borradori, A. ; Lane, D. P. ; Hubank, M. ; Powell, J. E. ; Wei, W. ; Taylor, A. M. ; Moss, P. A. ; Stankovic, T., *Blood*, **2005**, *105*, 4484-4491

³⁷ Cavaretta, I. T. ; Neuwirt, H. ; Untergrasser, G. ; Moser, P. L. ; Zaki, M. H. ; Steiner, H. ; Rumpold, H. ; Fuchs, D. ; Hobisch, A. ; Nemeth, J. A. ; Culig, Z., *Oncogene*, **2007**, *26*, 2822-2832

1.1.3 Composés antagonistes des protéines anti-apoptotiques

1.1.3.1 Découvertes

La restauration de l'apoptose est un axe de recherche important en oncologie. Certaines cibles thérapeutiques comme l'interaction avec la protéine p53, ainsi que la modulation du gène Bcl-2 visent à restaurer l'apoptose très en amont.^{38,39}

Certains cancers se traduisent par une surexpression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1, rendant les cellules tumorales résistantes aux traitements classiques. Un autre axe de recherche serait donc de concevoir des molécules perturbant cet équilibre protéine-protéine. Ces molécules, en se fixant aux sillons hydrophobes des protéines anti-apoptotiques, permettraient de relarguer les protéines pro-apoptotiques. Une fois libérées, celles-ci reprendraient leurs rôles dans la mécanique apoptotique. Ces recherches se sont donc concentrées sur l'élaboration de petites molécules ou de peptides susceptibles d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques.⁴⁰

Les composés développés jusqu'à présent sont issus de différents types de criblages:

- un criblage *in silico* (virtuel) de bibliothèques de molécules en se basant sur les structures des complexes protéiques pro- et anti-apoptotiques (par exemple : Bcl-xL/Bak),
- un criblage RMN de composés provenant de chimiothèques (produits de synthèse ou produits naturels). Des spectres RMN de ces protéines sont réalisés pour observer la formation potentielle d'un complexe avec un composé particulier,
- un criblage d'activité biologique de chimiothèques ou d'extractothèques par test de polarisation de fluorescence pour essayer de trouver les composés ayant une affinité vis-à-vis de Bcl-xL ou de Mcl-1.

Plusieurs molécules sont déjà en phase préclinique voire en phases cliniques (I ; II ; III), validant ainsi cette cible thérapeutique. Le Tableau 2 présente une liste non exhaustive des

³⁸ Snyder, E. L. ; Meade, B. R. ; Saenz, C. C. ; Dowd, S. F., *PLoS Biology*, **2004**, 2, 141-147

³⁹ Shen, C. ; Dirk Rattat, D. ; Buck, A. ; Mehrke, G. ; Polat, B. ; Ribbert, H. ; Schirrmeister, H. ; Mahren, B. ; Matuschek, C. ; Reske, S. N., *Cancer Biother. Radiopharmac.*, **2003**, 18, 17-26

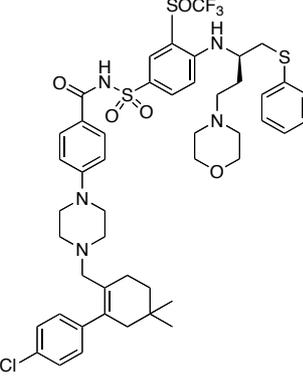
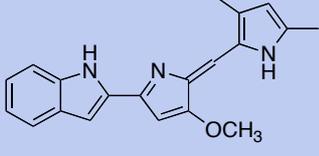
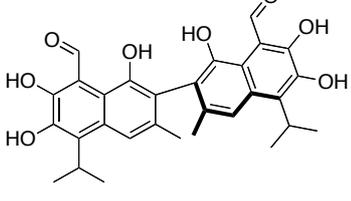
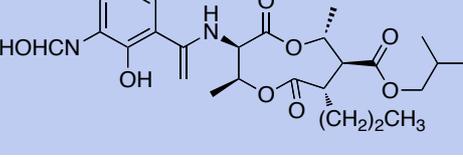
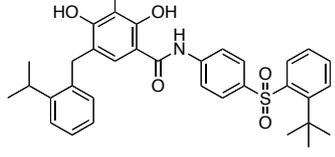
⁴⁰ Broch, S. ; Hénon, H. ; Debaud, A. L. ; Fogeron, M. L. ; Bonnefoy Bérard, N. ; Anizon, F. ; Moreau, P., *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 7132-7143

composés qui sont en cours d'études précliniques et cliniques. Il met en évidence la diversité chimique des composés capables d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques. Il résume également les différentes spécificités des antagonistes en cours d'études. Certains de ces produits sont d'origine naturelle comme l'antimycine A ou le (-)-gossypol (entrées **4, 5**). Le premier fut découvert par criblage d'activité par test de polarisation de fluorescence et le second par criblage RMN. HA14-1 est un antagoniste spécifique de Bcl-xL lui aussi découvert par criblage par test de polarisation de fluorescence.⁴¹

Ces différents composés sont plus ou moins sélectifs de protéines de la famille Bcl-2. Nous allons illustrer ceci en développant l'exemple d'ABT-737 qui a fait l'objet d'études approfondies. Son analogue, ABT-263 ou Navitoclax, administrable par voie orale est actuellement en études cliniques de phase II.

⁴¹ Wang, J. L. ; Liu, D. ; Zhang, Z. J. ; Shan, S. ; Han, X. ; Srinivasula, S. M. ; Croce, C. M. ; Alnemri, E. S. ; Huang, Z., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 7124-7129

Tableau 2 Spécificité des antagonistes des protéines anti-apoptotiques⁴²

Entrée	Composés	Structure	Cibles Thérapeutiques	Phases Cliniques	Protéines cibles
1	HA14-1 ⁴¹		Leucémie	Etudes précliniques	Bcl-2, Bcl- xL, Mcl-1
2	ABT-263 (Navitoclax, version orale d'ABT-737) ⁴³		Myélome multiples des os, leucémie myéloïde aigue, cancer du poumon	Phase II	Bcl-2, Bcl- xL, Bcl-w
3	Obatoclax (GX- 15-070) ⁴⁴		Myélome	Phase II/III	Bcl-2, Bcl- xL, Mcl-1
4	AT101 ((R)- Gossypol) ¹⁶		Tumeur du cerveau, gliome malin	Phase I/II	Bcl-2, Bcl- xL, Mcl-1
5	Antimycine A ¹⁶		/	Etudes précliniques	Bcl-2, Bcl- xL, Bcl-w
6	TW37 ¹⁶		Cancer du poumon et du pancréas	Etudes précliniques	Bcl-2, Bcl- xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl- 1

⁴² <http://www.cancer.gov/drugdictionary?CdrID=594869>

⁴³ Tse, C. ; Shoemaker, A. R. ; Adickes, J. ; Anderson, M. G. ; Chen, J. ; Jin, S. ; Johnson, E. F. ; Marsh, K. C. ; Mitten, M. J. ; Nimmer, P. ; Roberts, L. ; Tahir, S. K. ; Xiao, Y. ; Yang, X. ; Zhang, H. ; Fesik, S. ; Rosenberg, S. H. ; Elmore, S. W., *Cancer Res*, **2008**, *68*, 3421-3428

⁴⁴ Trudel, S. ; Li, Z. H. ; Rauw, J. ; Tiedemann, R. E. ; Wen, X. Y. ; Stewart, A. K., *Blood*, **2007**, *109*, 5430-5438

1.1.3.2 ABT-737 et ABT-263 (Navitoclax)

Les laboratoires Abbott ont développé un composé original, ABT-737, qui est un inhibiteur très efficace des interactions protéine-protéine de la famille Bcl-2. Cette molécule a été conçue à partir d'études de relation structure-activité par RMN.⁴⁵ Cette technique consiste à identifier dans un premier temps des ligands ayant une petite affinité avec la protéine sur un premier site. La seconde étape est de déterminer une autre série de ligands qui se lient à la protéine dans un site de fixation proche du premier. La dernière étape consiste à associer ces deux premiers ligands (appelés fragments) pour former un premier complexe.⁴⁶ La structure de ce complexe est alors optimisée afin d'améliorer son activité.

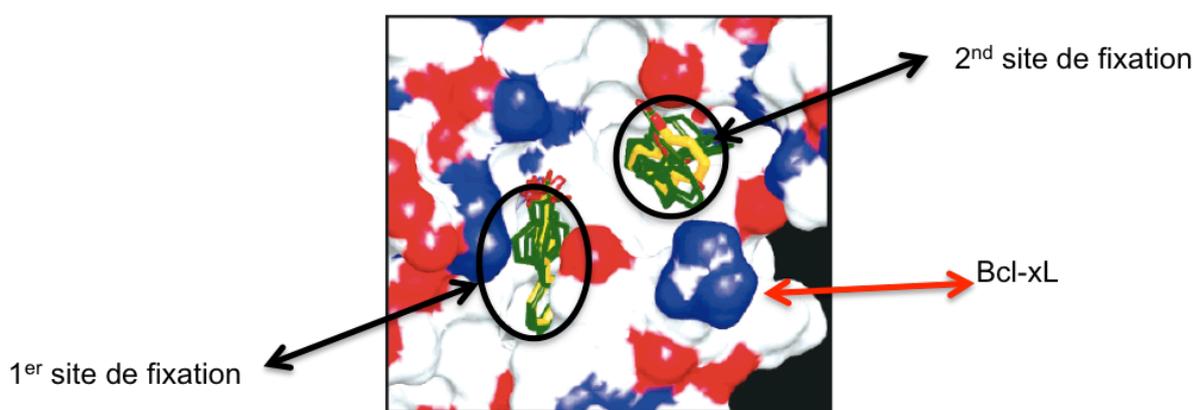


Figure 15 Criblage par relation structure-activité dans Bcl-xL⁴⁵

L'équipe de Fesik a comparé les cartes ¹⁵N-HSQC de la protéine Bcl-xL avec ou sans ligand et a ainsi criblé une librairie de 10 000 composés. De cette librairie, a été extrait le **fragment 1** qui présentait la meilleure constante de dissociation ($K_d = 300 \mu\text{M}$). Un second criblage sur le second site de fixation a alors été effectué sur une autre librairie de 3500 molécules et le **fragment 2** a été retenu grâce à son K_d de $6000 \mu\text{M}$.

⁴⁵ Petros, A. M. ; Dinges, J. ; Augeri, D. J. ; Baumeister, S. A. ; Betebenner, D. A. ; Bures, M. G. ; Elmore, S. W. ; Hajduk, P. J. ; Joseph, M. K. ; Landis, S. K. ; Nettesheim, D. G. ; Rosenberg, S. H. ; Shen, W. ; Thomas, S. ; Wang, X. ; Zanze, I. ; Zhang, H. ; Fesik, S. W., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 656-663

⁴⁶ Shuker, S. B. ; Hajduk, P. J. ; Meadows, R. P. ; Fesik, S. W., *Science*, **1996**, *29*, 1531-1534

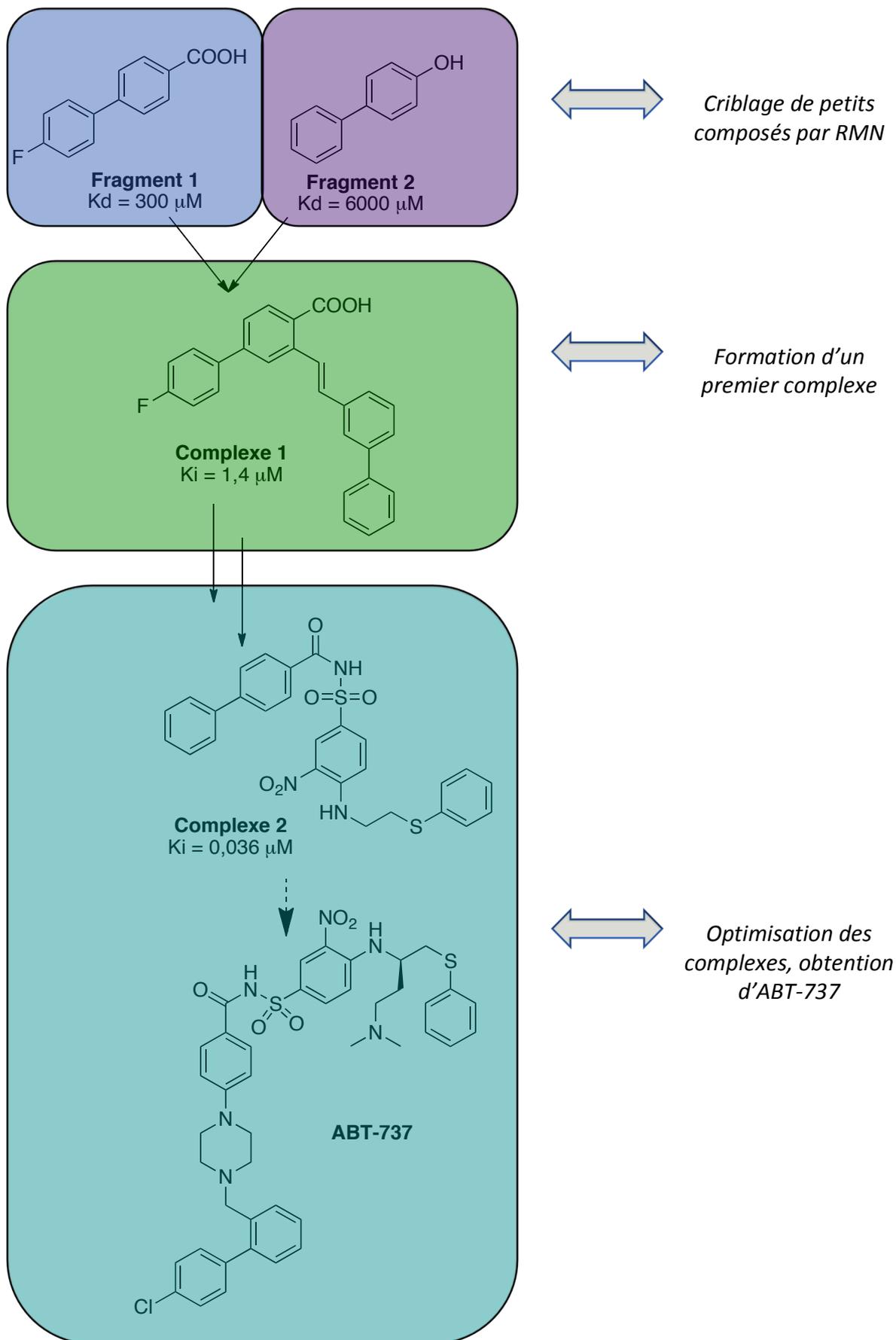


Schéma 1 Résumé de l'obtention d'ABT-737

L'étape suivante a consisté à relier ces deux fragments pour former le **complexe 1** qui interagit avec les deux sites de fixation à la fois (Figure 16). Il a fallu alors un énorme travail d'optimisation pour obtenir le **complexe 2** puis **ABT-737**.⁴⁷ Cette molécule possède une constante d'affinité avec Bcl-xL de 1 nM. Un analogue administrable par voie orale, **ABT-263**, est actuellement en phase I/II en traitement contre le cancer du poumon, du myélome multiple des os et de la leucémie myéloïde aigüe.^{16,45}

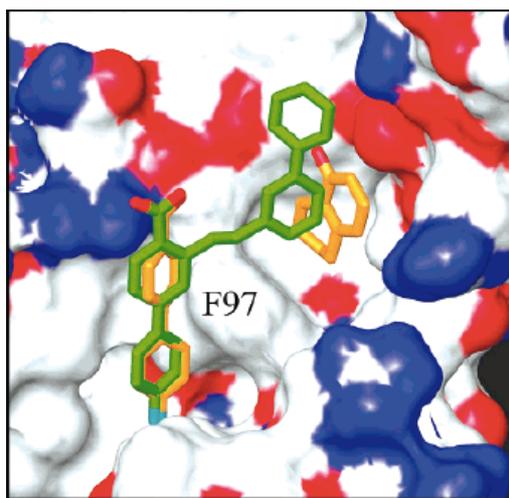


Figure 16 Complexe 1 (vert) et Fragments 1 et 2 (orange) dans leurs sites de fixation

1.1.3.3 Phénomène de résistance

La molécule des laboratoires Abbott **ABT-263** est en étude de phase clinique sur différents types de cancers. Les cliniciens ont noté l'apparition de phénomène de résistance sur certaines lignées cellulaires par exemple dans le cas de leucémie myéloïde.³³ Il semblerait, en effet, que les cellules n'exprimant pas Mcl-1 réagissent très bien au traitement. A l'inverse, celles présentant un nombre élevé de protéines Mcl-1 survivent. Comme nous l'avons vu précédemment (1.1.2.3), **ABT-737** ne peut se fixer au sillon hydrophobe de Mcl-1 à cause d'une gêne stérique trop importante due à certains acides aminés. Cette observation a été confirmée par d'autres tests montrant l'induction de l'apoptose par **ABT-737** lorsque la protéine Mcl-1 est neutralisée par une augmentation contrôlée de la production de la protéine Noxa (spécifique de Mcl-1).³⁷ La Figure 17 explicite le mécanisme des cellules sensibles ou résistantes au traitement par l'**ABT-737**. Dans le cas

⁴⁷ Stauffer, S. R., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2007**, 7, 961-965

d'une cellule sensible (pas ou peu de présence de protéines Mcl-1) les protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax) sont « libérées » de leurs interactions avec Bcl-xL (ainsi que Bcl-2 dans une moindre mesure). Elles peuvent ainsi former des dimères d'interaction protéique avec Bak, Bad et des protéines « BH3-only » comme Bim pour finalement mener à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et déclencher l'apoptose. Dans le cas des cellules résistantes à **ABT-737**, les protéines Mcl-1 vont se fixer à la protéine pro-apoptotique Bak et à la protéine « BH3-only » Bim. Le composé sera alors dans l'incapacité de déplacer et de perturber cette interaction ce qui entraînera la survie de la cellule.

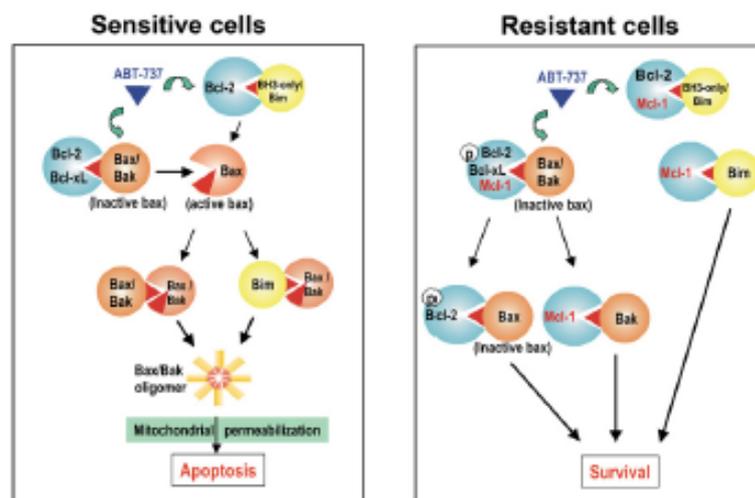


Figure 17 Mécanisme des cellules sensibles ou résistantes à **ABT-737**

D'autre part, cette étude a montré que certaines cellules présentaient des protéines Bcl-2 phosphorylées qui peuvent récupérer la protéine Bax relarguée par Bcl-xL et sur lesquelles la molécule des laboratoires d'Abbott n'a aucun effet.^{33,34} La solution proposée par les cliniciens est d'utiliser **ABT-263** en bi- voire trithérapie avec des molécules effectrices sur Mcl-1 pour être plus efficace.

1.1.3.4 Dernières avancées

Récemment une équipe chinoise a développé un nouveau composé **1** extrêmement affiné avec les protéines Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1 en utilisant un concept similaire à celui de Fesik.⁴⁸

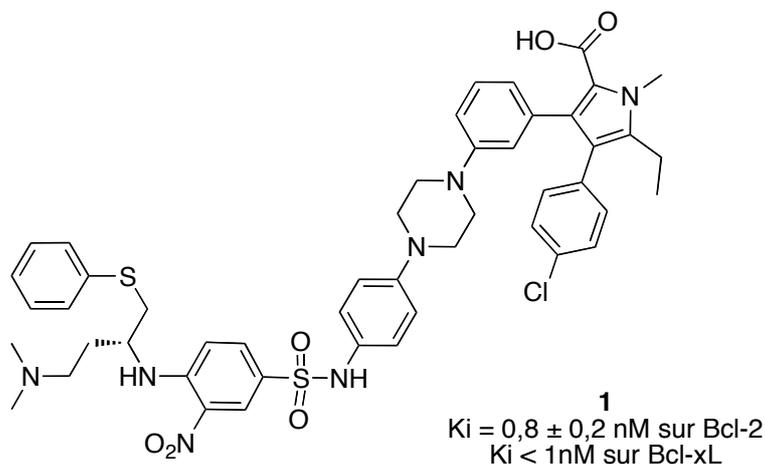


Figure 18 Composé **1** présentant une excellente affinité vis-à-vis des protéines Bcl-2 et Bcl-xL.

Ils ont montré que le domaine BH3 du peptide Bad interagissait avec deux sites distincts du sillon hydrophobe de Bcl-xL par l'intermédiaire de cinq acides aminés (leucine 109, tyrosine 105 et méthionine 112 pour le site 1 et phénylalanine 116 et 120 pour le site 2). La distance entre chacun de ces résidus a été évaluée. Les pharmacophores (représentés par des sphères dans la Figure 19) interagissent avec les résidus identifiés et permettent la fixation aux deux sites d'interaction de la protéine.

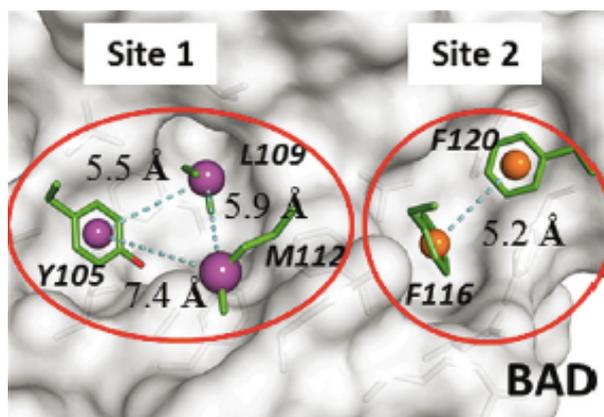


Figure 19 Sites de fixation observés sur la structure cristalline de Bcl-xL/Bad, les sphères représentent les pharmacophores nécessaires à l'interaction avec la protéine

⁴⁸ Zhou, H. ; Chen, J. ; Meagher, J. L. ; Yang, C. Y. ; Aguilar, A. ; Liu, L. ; Bai, L. ; Cong, X. ; Cai, Q. ; Fang, X. ; Stuckey, J. A. ; and Wang, S. , *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 4664–4682

En utilisant des composés connus pour interagir avec ces sites de fixation, une structure « noyau » a été déterminée. Celle-ci a permis, après optimisation, d'obtenir des composés plus affins avec ces sites. Deux composés **BM-501** et **BM-505**, interagissant exclusivement avec le premier et le second site de fixation respectivement, ont ainsi été élaborés (Figure 20).

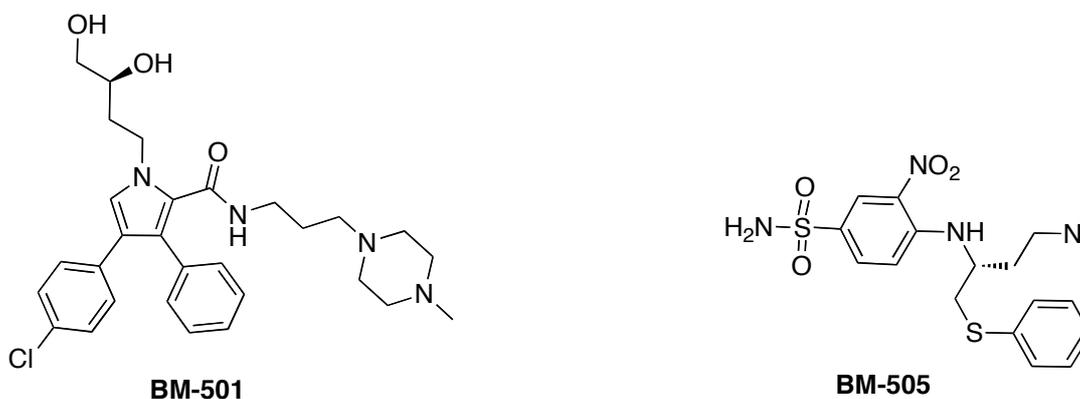


Figure 20 BM-501 et BM-505

Ces deux composés ont été reliés et le composé **1** a été obtenu après optimisation. Celui-ci présente des affinités excellentes vis-à-vis de Bcl-xL et Bcl-2 ($K_i < 1$ nM et $K_i = 0.8$ nM respectivement). Cependant, son affinité avec Mcl-1 est moindre (2 μ M). Ce composé a été testé sur deux lignées cellulaires cancéreuses H146 et H1417 et présente des IC_{50} de 60 et 90 nM respectivement.

1.2 Rappels sur la Meio gynine A

1.2.1 Criblages de plantes

Notre équipe développe des collaborations officielles avec différents pays tropicaux. Ces collaborations permettent de récolter des plantes endémiques de certaines régions du globe (Figure 21) et donc d'avoir accès à une grande biodiversité. Ces collaborations ont permis de constituer une extractothèque d'environ 6000 plantes et de plus de 14000 extraits de plantes.

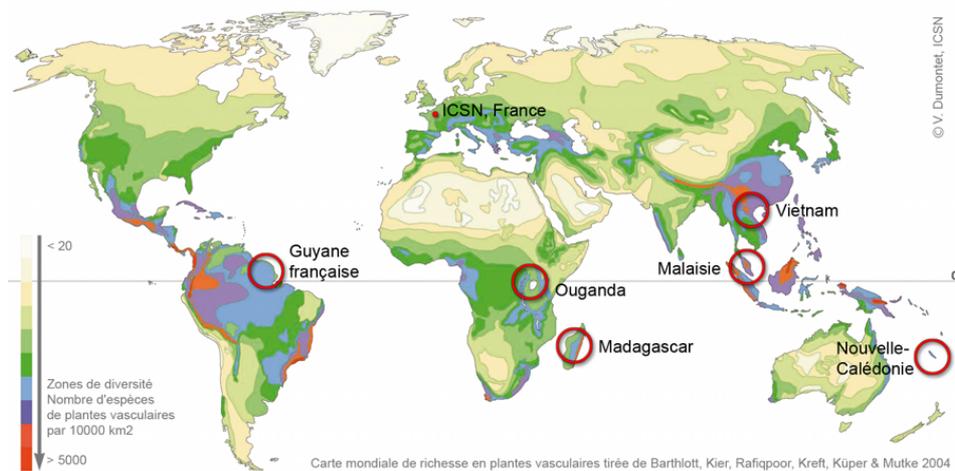


Figure 21 Les collaborations de l'équipe

Pour obtenir cette extractothèque, différentes parties des plantes récoltées (feuilles, écorces, tiges et/ou racines,...) sont préalablement séchées puis broyées avant d'être extraites à l'acétate d'éthyle. Les extraits obtenus sont ensuite filtrés sur colonne de polyamide afin d'éliminer les tannins et les polyphénols contenus dans la plante (ces composés sont souvent responsables de « faux positifs » lors d'essais et de tests biologiques). Les filtrats récupérés sont ensuite répartis en plaques 96 puits et sont criblés sur les différentes cibles enzymatiques et cellulaires. Les extraits présentant de bonnes réponses aux tests font l'objet d'un fractionnement automatisé et standardisé par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Les fractions obtenues sont de nouveau réparties en plaques multi-puits pour être soumises aux criblages. Les fractions actives font alors l'objet d'une purification plus poussée en vue de l'obtention des produits naturels responsables de l'activité biologique (Figure 22).

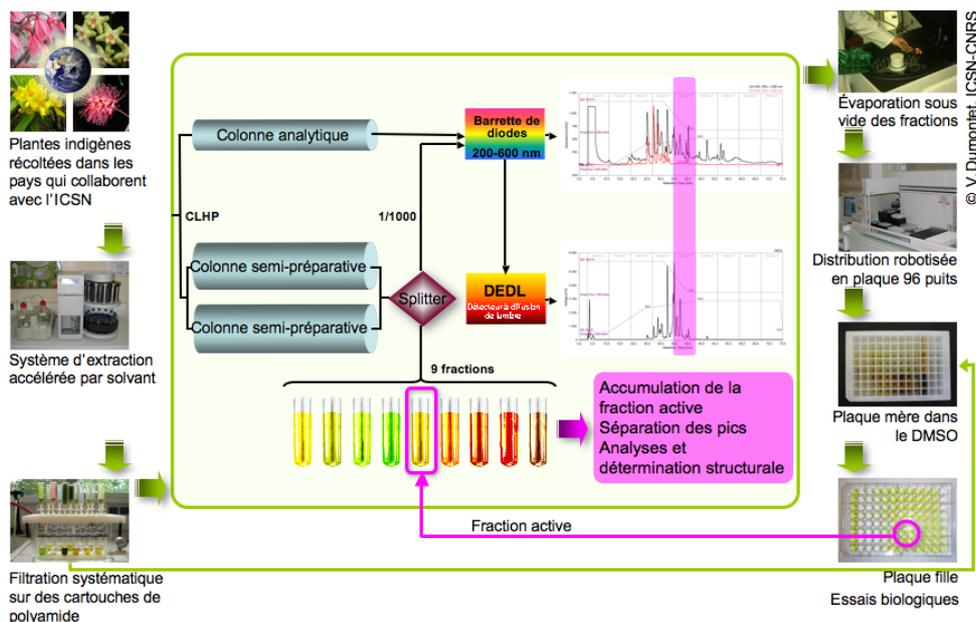


Figure 22 Fractionnement standardisé par HPLC

En collaboration avec les laboratoires Servier, notre équipe a testé des extraits de plantes sur Bcl-xL par un test de polarisation de fluorescence mettant en jeu l'interaction Bcl-xL/Bak.⁴⁹ Un nouveau test est en cours de mise au point pour Mcl-1/Noxa.

1.2.2 Molécules isolées

Les criblages réalisés par l'équipe, ces dernières années, ont permis d'isoler de nouveaux composés présentant une bonne constante d'affinité vis-à-vis de Bcl-xL (Figure 23).

La meiyogynine A **2**⁵⁰ et la kingianine G **3**⁵¹ proviennent de plantes malaisiennes, le drimane **4**⁵² d'une plante néo-calédonienne et les triterpènes **5** et **6**⁵³ de plantes vietnamiennes. Nous pouvons remarquer que ce sont des structures chimiques originales et variées pour une

⁴⁹ Qian, J. ; Voorbach, M. J. ; Huth, J. R. ; Coen, M. L. ; Zhang, H. ; Ng, S. C. ; Comess, K. M. ; Petros, A. M., Rosenberg, S. H. ; Warrior, U. ; Burns, D. J., *Analytical Biochemistry*, **2004**, 328, 131-138

⁵⁰ Litaudon, M. ; Bousserouel, H. ; Awang, K. ; Nosjean, O. ; Martin, M. T. ; Tran Huu Dau, M. E. ; Hadi, H. A. ; Boutin, J. A. ; Sévenet, T. ; Guéritte, F., *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 480-483

⁵¹ Leverrier, A. ; Awang, K. ; Guéritte, F. ; Litaudon, M. *Phytochemistry*, **2011**, 72, 1443-1452

⁵² Fomekong, F. D. ; Roussi, F. ; Le Callonec, C. ; Bousserouel, H. ; Litaudon, M. ; Guéritte, F., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 2192-2197

⁵³ Litaudon, M. ; Jolly, C. ; Le Callonec, C. ; Din Cuong, D. ; Retailleau, P. ; Nosjean, O. ; Nguyen, V. H. ; Pfeiffer, B. ; Boutin, J. A. ; Guéritte, F., *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 1314-1320

même cible. Cependant, les affinités mesurées sur l'interaction Bcl-xL/Bak sont bonnes (1-18 μM).

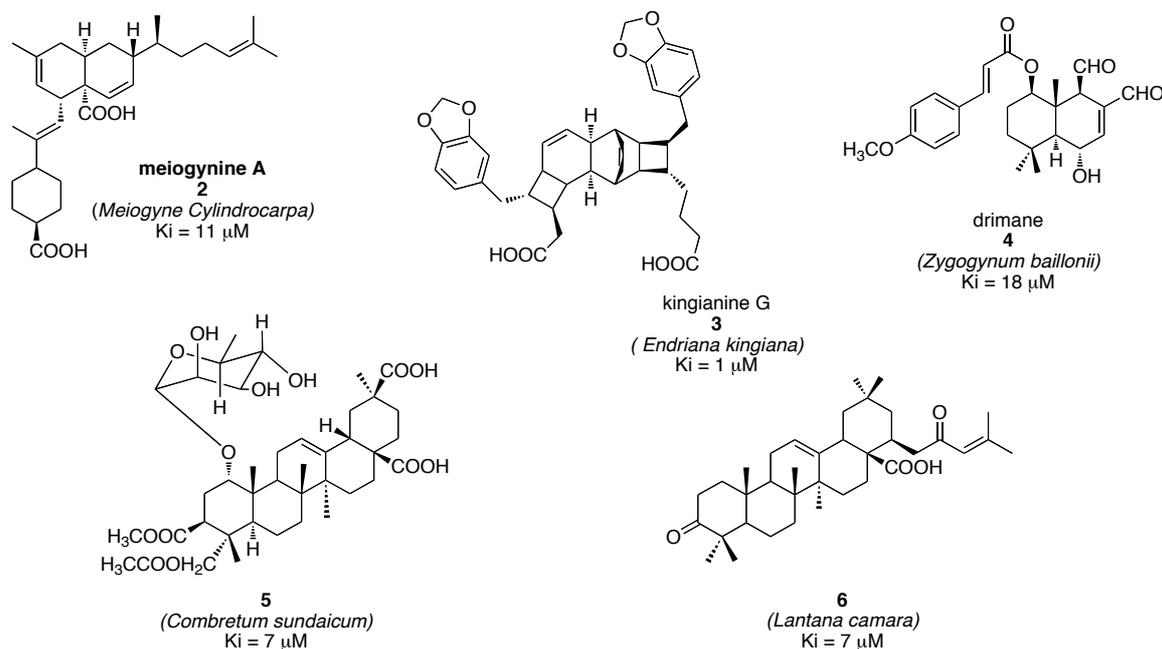


Figure 23 Nouveaux composés antagonistes de l'interaction Bcl-xL/Bak isolés dans l'équipe

Parmi ces différents composés, la meiogyne A **2** a attiré notre attention car elle possède une structure originale et une bonne affinité sur Bcl-xL.

1.2.3 La meiogyne A

1.2.3.1 Isolement

L'équipe a criblé près de 1476 extraits acétate d'éthyle provenant de 670 plantes malaisiennes sur Bcl-xL. L'extrait d'écorces de *Meiogyne cylindrocarpa* a montré une bonne affinité.⁵⁰ *Meiogyne cylindrocarpa* appartient à la famille des Annonacées (Figure 24). La Malaisie compte 140 espèces de cette famille et le genre *Meiogyne* en comporte 9.



Figure 24 Photos des fruits et fleurs de plantes du genre *Meiogyne*

Il est à noter que la forêt où *Meiogyne cylindrocarpa* a été récoltée, a été détruite et remplacée par une palmeraie. Le réapprovisionnement en matériel végétal est donc impossible. Néanmoins, les écorces ayant donné de bons résultats sur le test d'affinité, les extraits ont été purifiés, afin de déterminer la ou les molécules responsables de celle-ci. La molécule active, la meiogynine A **2** a ainsi pu être isolée.

1.2.3.2 Structure

La meiogynine A **2** possède un bicyclic de type *cis*-décaldine dont tous les substituants sont en *syn*. Elle possède une double liaison exocyclique tri-substituée de configuration *E* et cinq centres asymétriques en 1, 5, 7, 10 et 1''. Les centres 3' et 6' sont meso en *trans*. L'originalité de ce composé vient de la présence d'un acide carboxylique en tête de pont (Figure 25). La configuration relative des différents centres a été déterminée par RMN sauf celle du centre 1'' qui a été attribuée par modélisation moléculaire.⁵⁰ La meiogynine A **2** est un triterpène puisque elle est constituée de six unités isoprènes.

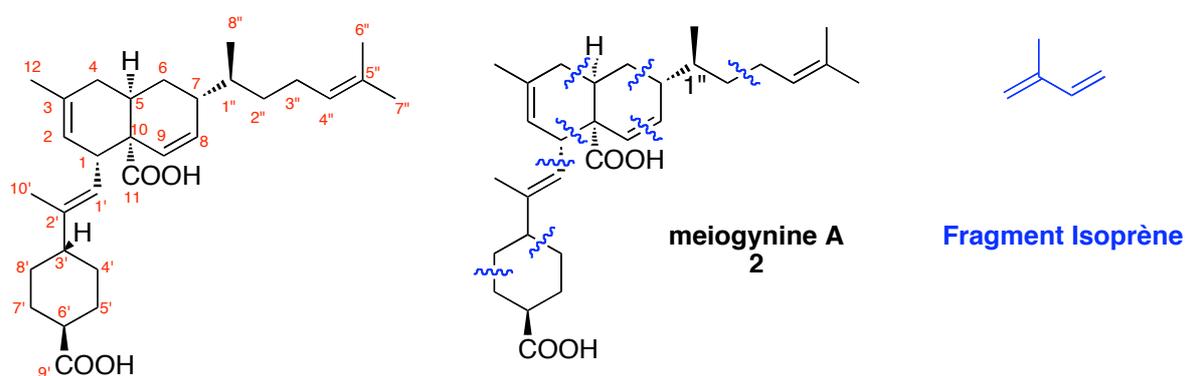


Figure 25 Meiozynine A et fragmentation isoprénique

1.2.3.3 Premières relations structure-activité

D'autres composés de la même famille ont été isolés lors de la purification (Figure 26).

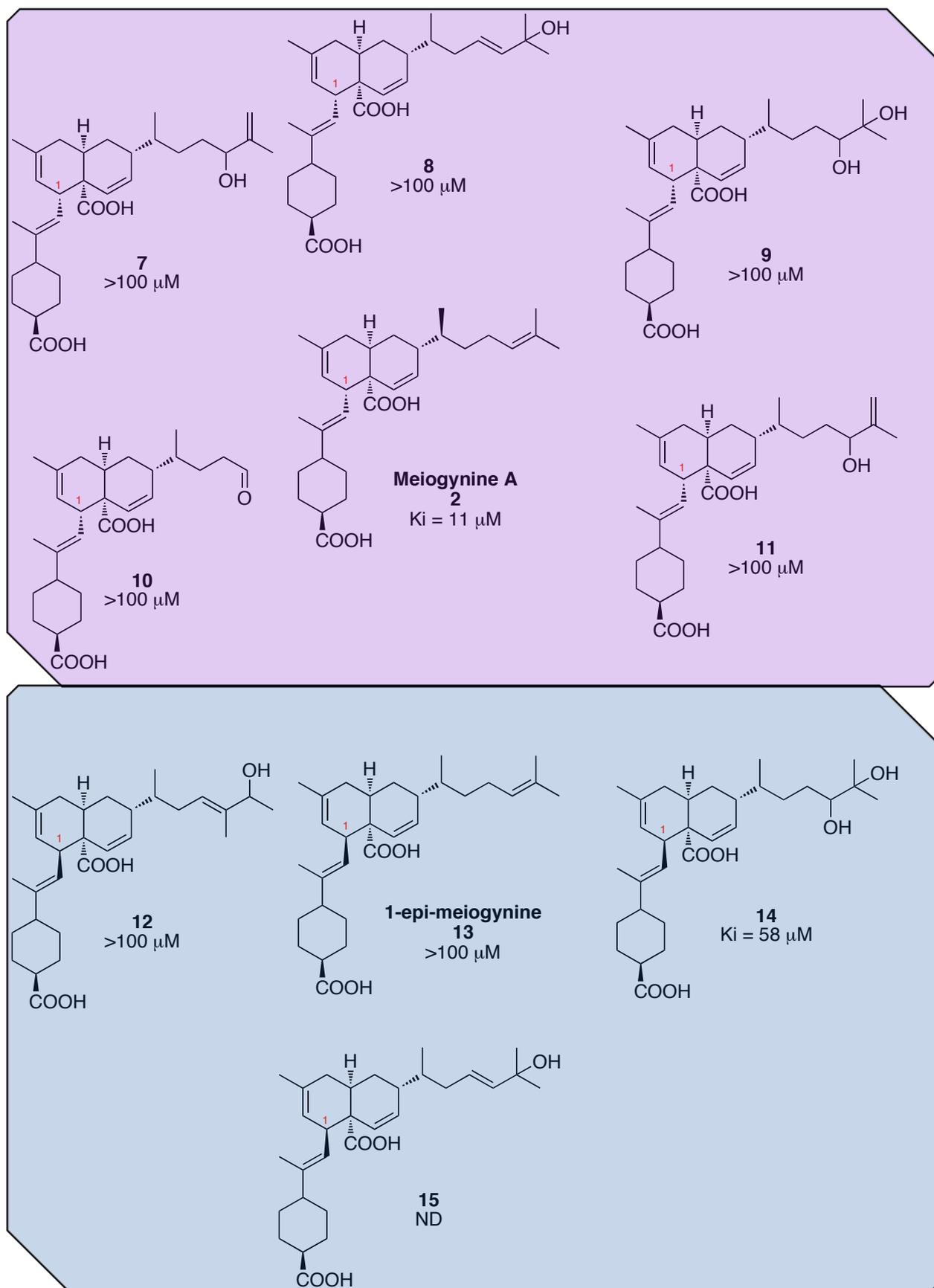


Figure 26 Composés isolés de *Meioygne Cylindrocarpa* classés selon la configuration du centre en 1

De cette famille se dégagent deux sous catégories se différenciant par la configuration du carbone en 1. Ce centre semble être crucial lorsqu'on observe la différence d'affinité entre le composé **2** et **13**. La présence de groupe(s) hydroxyle(s) sur la chaîne latérale entraîne une perte de l'activité (composés **8, 9, 10, 11**).

1.2.3.4 Hypothèse de biogénèse

Une hypothèse biogénétique a été proposée : la meioygnine A **2** proviendrait d'une dimérisation des deux unités **16** et **17** de type bisabolane (Figure 27).⁵⁰ Dans la littérature, des composés monomériques de type bisabol-1-one (chez *Lantana camara* une Verbenacée)⁵⁴ et de type *ent*-zingibérène (chez *Zingiber officinale* une Zingibéracée) ont déjà été retrouvés.

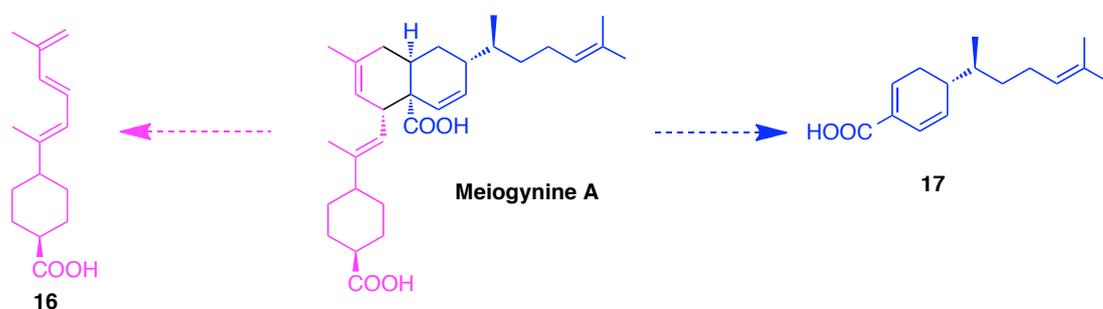


Figure 27 Hypothèse biogénétique de dimérisation

Des analyses GC/MS effectuées à partir des huiles essentielles des écorces de *Meioygne cylindrocarpa* viennent appuyer cette hypothèse en indiquant la présence de pics de masse à 220,35 et 222,37 pouvant correspondre respectivement aux composés **18, 19** ou **20** (Figure 28).

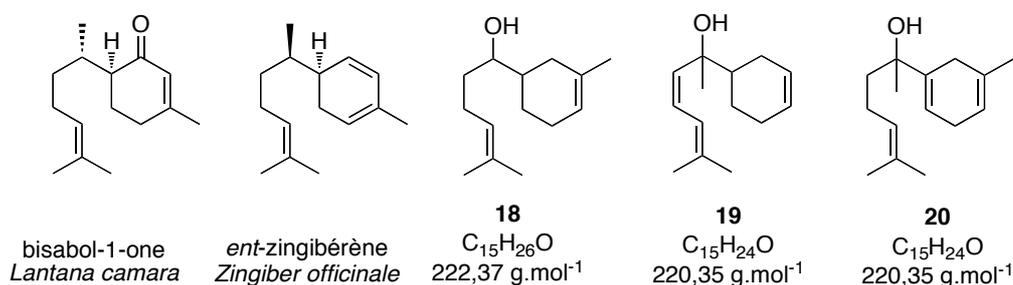


Figure 28 Composés de type bisabolane et zingibérène

⁵⁴ Hagiwara, H. ; Okabe, T. ; Ono, H. ; Kamat, V. P. ; Hoshi, T. ; Suzuki, T. ; Ando, M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **2002**, 895-900

Ces deux fragments **16** et **17** s'assembleraient par une réaction de type Diels-Alder pour conduire à la meiogynine A **2**. En effet, certaines études ont montré que cette réaction semble se produire dans les plantes et qu'elle pourrait être catalysée par des « Diels-Aldérase ».

1.2.3.5 La « Diels-Aldérase », une enzyme mystérieuse

Si la réaction de Diels-Alder est très utilisée et décrite en chimie organique, elle reste plus « mystérieuse » lorsqu'elle se produit au sein des plantes. En effet, depuis les années 70, les phytochimistes et les chimistes organiciens ont découvert quelques molécules dont la voie de biogénèse impliquerait des réactions de Diels-Alder et de rétro Diels-Alder. Cependant l'isolement d'enzymes spécialisées dans cette réaction est plus récent. La solanapyrone A **23**⁵⁵ a été isolée d'*Ascochyta rabiei*, un champignon responsable de la rouille des pois. L'étude de la biosynthèse (Schéma 2) de ce composé énantiomériquement pur a permis, pour la première fois, de mettre en évidence la présence d'une Diels-Aldérase.⁵⁶

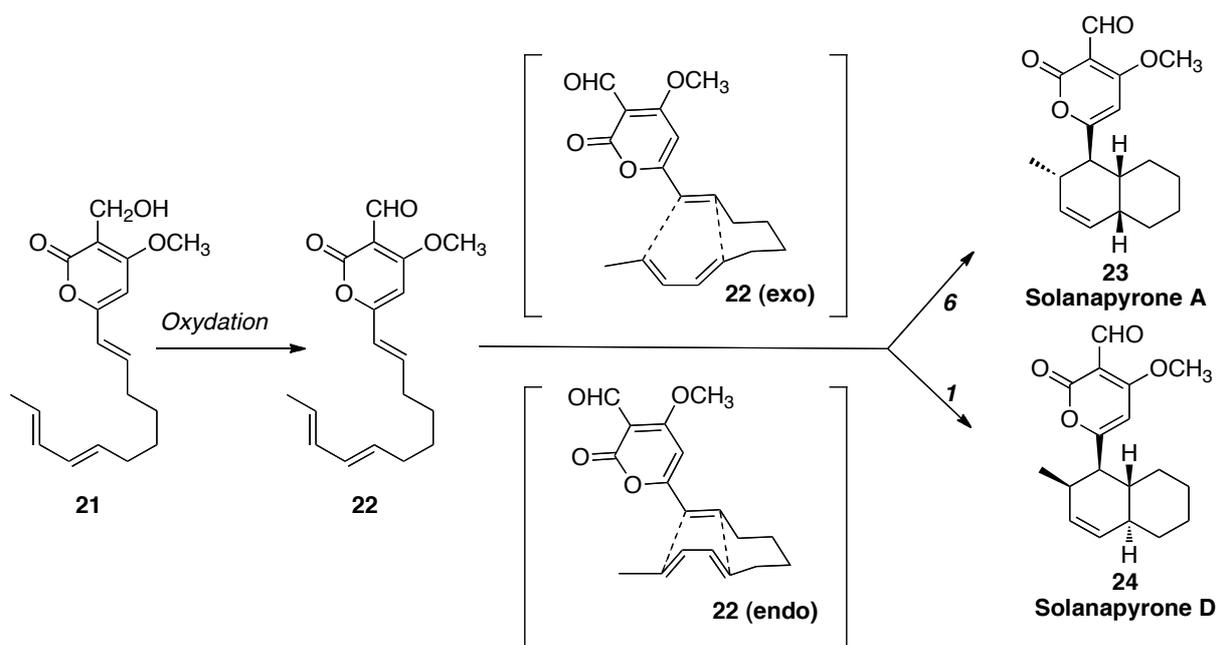


Schéma 2 Biogénèse supposée de la solanapyrone A impliquant une réaction de Diels-Alder

⁵⁵ Ichihara, A. ; Tazaki, H. ; Sakamura, S., *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 5373-5376

⁵⁶ Oikawa, H. ; Yokota, T. ; Abe, T. ; Ichihara, A. ; Sakamura, S. ; Yoshizawa, Y. ; Vederas, J. C., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1282-1284

Lors de l'extraction, les solanapyrones A **23** et D **24** ont été isolées dans un ratio 6:1. L'équipe de Ichihara a montré que les composés **22** *endo* et *exo* en sont les précurseurs. Les études de cycloaddition ont montré que le composé **21**, soumis à des conditions non enzymatiques, ne conduit pas aux solanapyrones. Dans les mêmes conditions, seulement 15% du précurseur **22** ont été convertis pour donner **23** et **24** avec un *ratio* 3:97. La différence par rapport au ratio obtenu lors de l'isolement permet de supposer la présence d'une enzyme venant catalyser cette réaction. Des études ont alors été menées sur les cellules de *A. solani*.^{57,58} Il a ainsi été démontré que l'étape d'oxydation et l'étape de cycloaddition étaient chacune catalysées par des enzymes différentes qui ont été isolées. La solanapyrone synthase permet d'obtenir le composé **23** à partir de **22** avec un *ratio* de 7,2:1 par rapport à **24**, avec une pureté énantiomérique de 98% pour **23** et de 67% pour **24**. Le Schéma 3 montre l'efficacité de la dernière étape de la synthèse enzymatique réalisée en utilisant l'enzyme comme catalyseur de la cycloaddition.

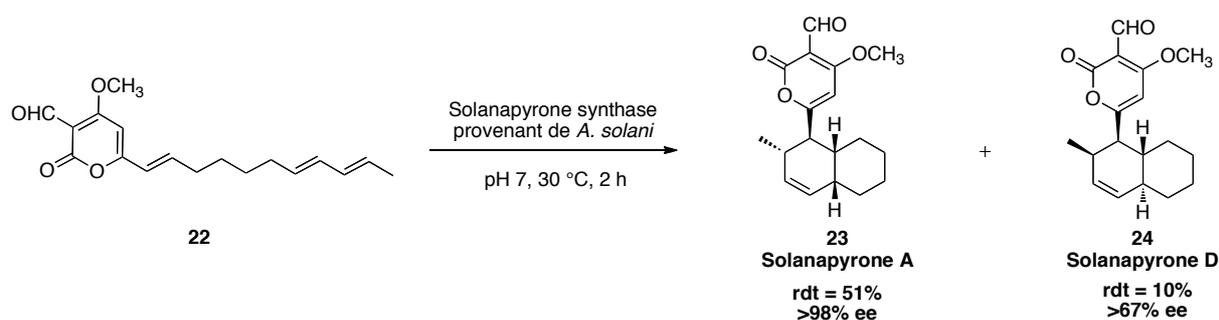


Schéma 3 Synthèse enzymatique des solanapyrones

Dans le cas des solanapyrones, la présence d'une Diels-Aldérase est indiscutable mais dans d'autres cas, il est difficile de trancher. C'est le cas du composé **27** qui provient de cultures de *Pyrenochaeta terrestris*, un champignon responsable de la maladie des racines d'oignons.⁵⁹ Deux voies de biogénèse sont envisageables à partir d'un précurseur commun **25**. La première passe par une addition de Michael et la seconde par une réaction de Diels-Alder (Schéma 4).

⁵⁷ Oikawa, H. ; Katayama, K. ; Suzuki, Y. ; Ichihara, A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 132-1322

⁵⁸ Katayama, K. ; Kobayashi, T. ; Oikawa, H. ; Honma, M. ; Ichihara, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1384, 387-395

⁵⁹ Sato, H. ; Konma, K. ; Sakamura, S. ; Furusaki, A. ; Matsumoto, T. ; Matsuzaki, T., *Agr. Biol. Chem.*, **1981**, 45, 795-797

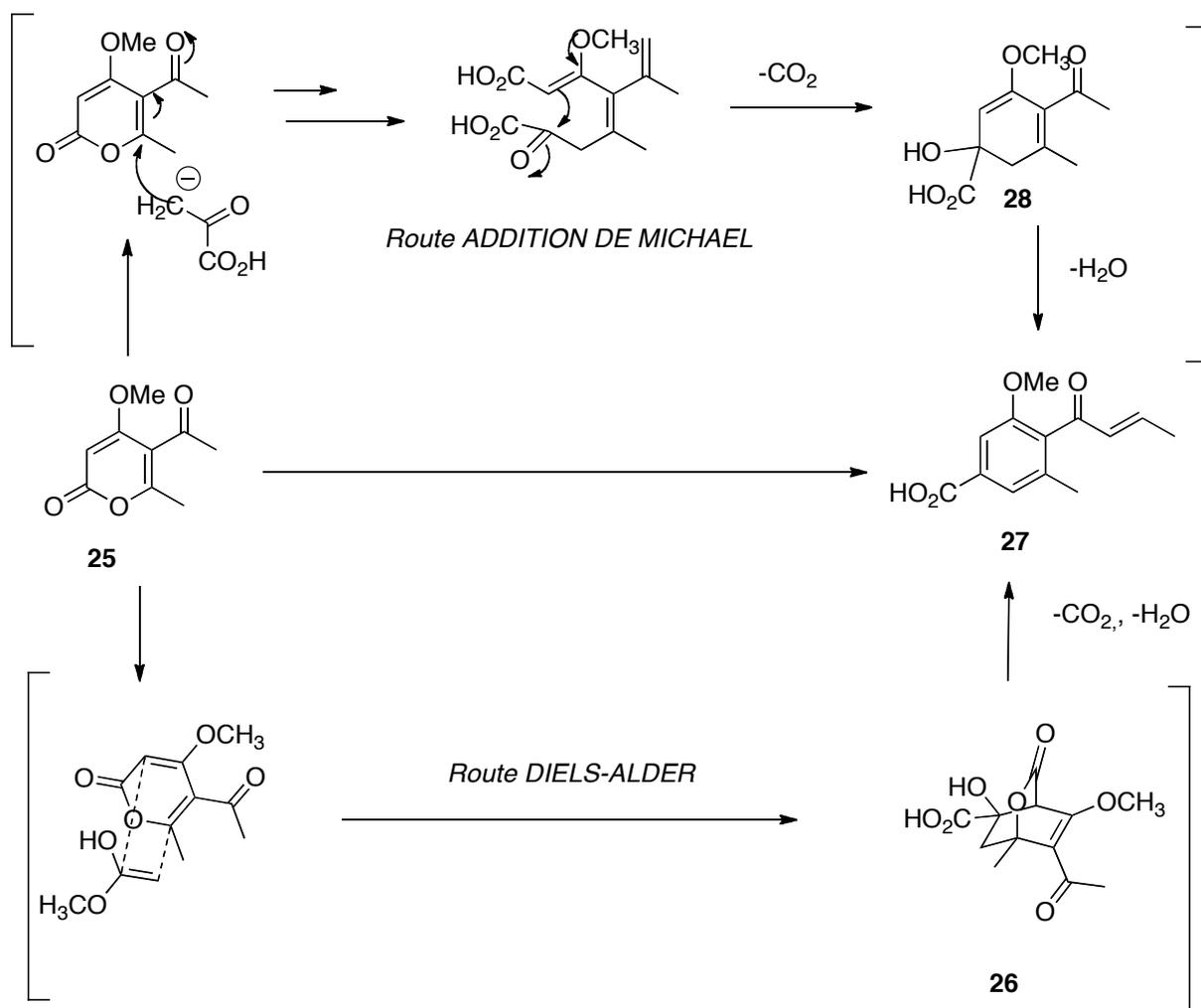


Schéma 4 Les deux voies de biogénèse du composé 27

Les études de *Macrophoma commelinae*⁶⁰ (où le composé 27 a été retrouvé) ont permis de mettre en évidence la présence d'une enzyme qui catalyse les réactions d'oxydation et de Diels-Alder intramoléculaire, la macrophomate synthase.⁶¹ Celle-ci réalise une réaction de cycloaddition en chélatant le composé 25 de départ. L'équipe de Jorgensen⁶² a montré que la voie passant par une addition de Michael est plus favorable énergétiquement. Cependant aucun adduit de la voie « Michael » n'a été retrouvé au sein des champignons et l'hypothèse de Diels-Alder reste la plus plausible.

⁶⁰ Sakurai, I. ; Suzuki, H. ; Shimizu, S. ; Yamamoto, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33, 5141-5143

⁶¹ Oikawa, H. ; Yagi, K. ; Watanabe, K. ; Yagi, K. ; Ohashi, S. ; Mie, T. ; Ichihara, A. ; Honma, M., *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 6983-6986

⁶² Guimaraes, C. R. W. ; Udier-Blagovic, M. ; Jorgensen, W. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 3577-3588

Le dernier exemple concerne la lovastatine **31** qui est un métabolite de *Aspergillus terreus*. Des études menées sur sa biosynthèse indiquent que l'intermédiaire décaline **30** est formé grâce à une enzyme (Schéma 5) à partir d'un précurseur de type triène **29**.⁶³

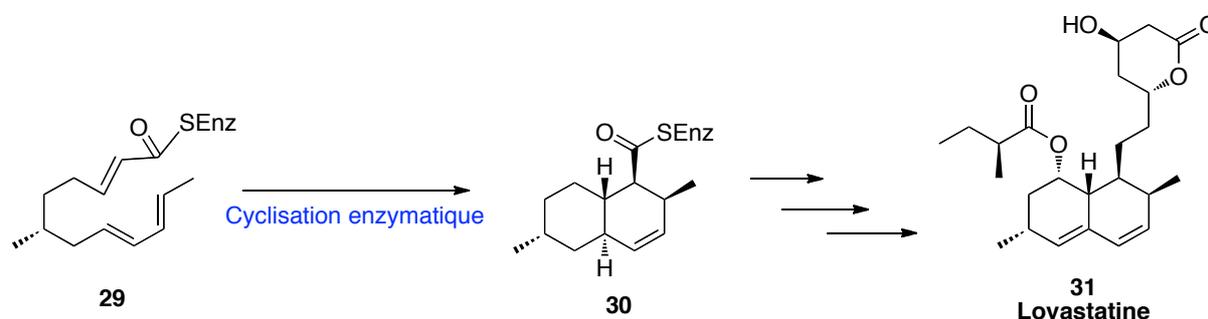


Schéma 5 Résumé de la voie de biosynthèse de la lovastatine

Cette enzyme a été isolée d'un autre champignon *Aspergillus nidulans*⁶⁴ et a été mise en réaction avec le composé **32**. Les produits **33** (*endo*), **34** et **35** (isomères) ont été obtenus en ratio 1:15:15 (Schéma 6). Sans la présence de l'enzyme, le triène **32** donne un mélange 1:1 de **34** et **35**. L'enzyme est donc nécessaire pour obtenir le produit *endo* **33**⁶⁵ qui est le seul à mener à la lovastatine **31**. Cela a permis aux scientifiques de confirmer le rôle de cette enzyme.

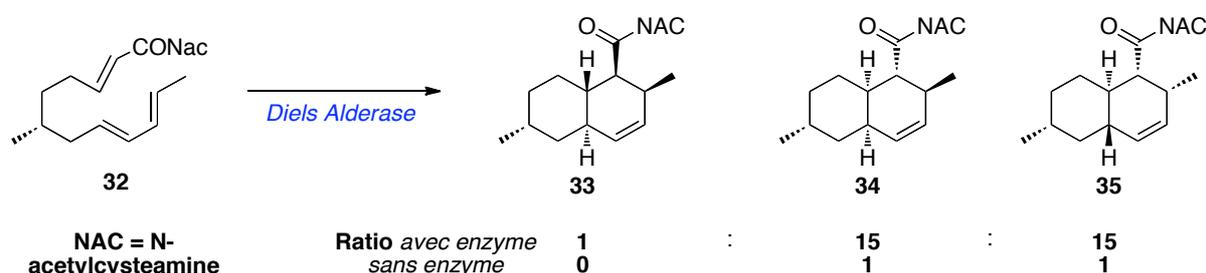


Schéma 6 Diels-Alder en présence d'une enzyme de type Diels-Aldérase

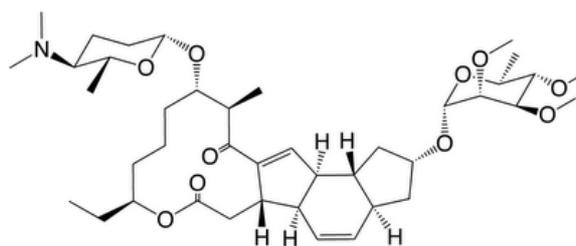
Récemment l'équipe de Liu a publié des travaux sur la caractérisation d'une Diels-Aldérase qui catalyse l'étape de cycloaddition qui a lieu lors de la biogénèse de la spinosyne A.⁶⁶

⁶³ Witter, D. J. ; Vederas, J. C., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2613-2623

⁶⁴ Kennedy, D. J. ; Auclain, K. ; Kendrew, S. G. ; Park, C. ; Vederas, J. C. ; Hutchinson, C. R., *Science*, **1999**, *284*, 1368-1372

⁶⁵ Auclain, K. ; Sutherland, A. ; Kennedy, J. ; Witter, D. J. ; Ven den Heever, J. P. ; Hutchinson, C. R. ; Vederas, J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 11519-11520

⁶⁶ Kim, H. J. ; Ruszczycky, M. W. ; Choi, Y. N. ; Liu, Y. N. ; Liu, H. W., *Nature*, **2011**, *473*, 109-112



Spinosyne A

Figure 29 Structure de la spinosyne A

L'ensemble de ces exemples permet de montrer qu'il existe des enzymes catalysant des réactions de cycloadditions dans les organismes vivants (plantes, champignons, etc...) même si la difficulté pour trouver et caractériser ces enzymes intrigue encore les chercheurs.⁶⁷ Les quelques exemples présentés ci-dessus ainsi que la présence des précurseurs de la réaction de Diels-Alder dans les huiles essentielles étayent l'hypothèse de biogénèse qui a été le point de départ de nos travaux sur la synthèse totale de la meiogynine A **2**.

1.2.4 Synthèse totale de la meiogynine A

Le laboratoire a réalisé la synthèse totale de la meiogynine A **2**, en suivant l'hypothèse de biogénèse précédemment développée, afin de déterminer la configuration absolue des différents centres et d'obtenir le produit en plus grande quantité pour palier à la disparition de la plante. Cette synthèse est convergente avec, d'une part l'obtention des diénophiles **17a-d**, et d'autre part, celle du triène **16** (Schéma 7).⁶⁸ La synthèse du composé **16** a été réalisée à partir des composés **37** et **38** en 6 étapes avec un rendement de **25%**. En parallèle les diénophiles **17a-d** ont été obtenus en 4 étapes à partir du (*S*)- et du (*R*)-citronellal. Ils ont été synthétisés en version racémique puis en version asymétrique (*de*=**45%**).

⁶⁷ Townsend, C. A., *Chem. Bio. Chem.*, **2011**, *12*, 2267-2269

⁶⁸ Fomekong, D. ; Roussi, F. ; Leverrier, A. ; Bréteché, A. ; Guéritte, F., *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 7412-7415

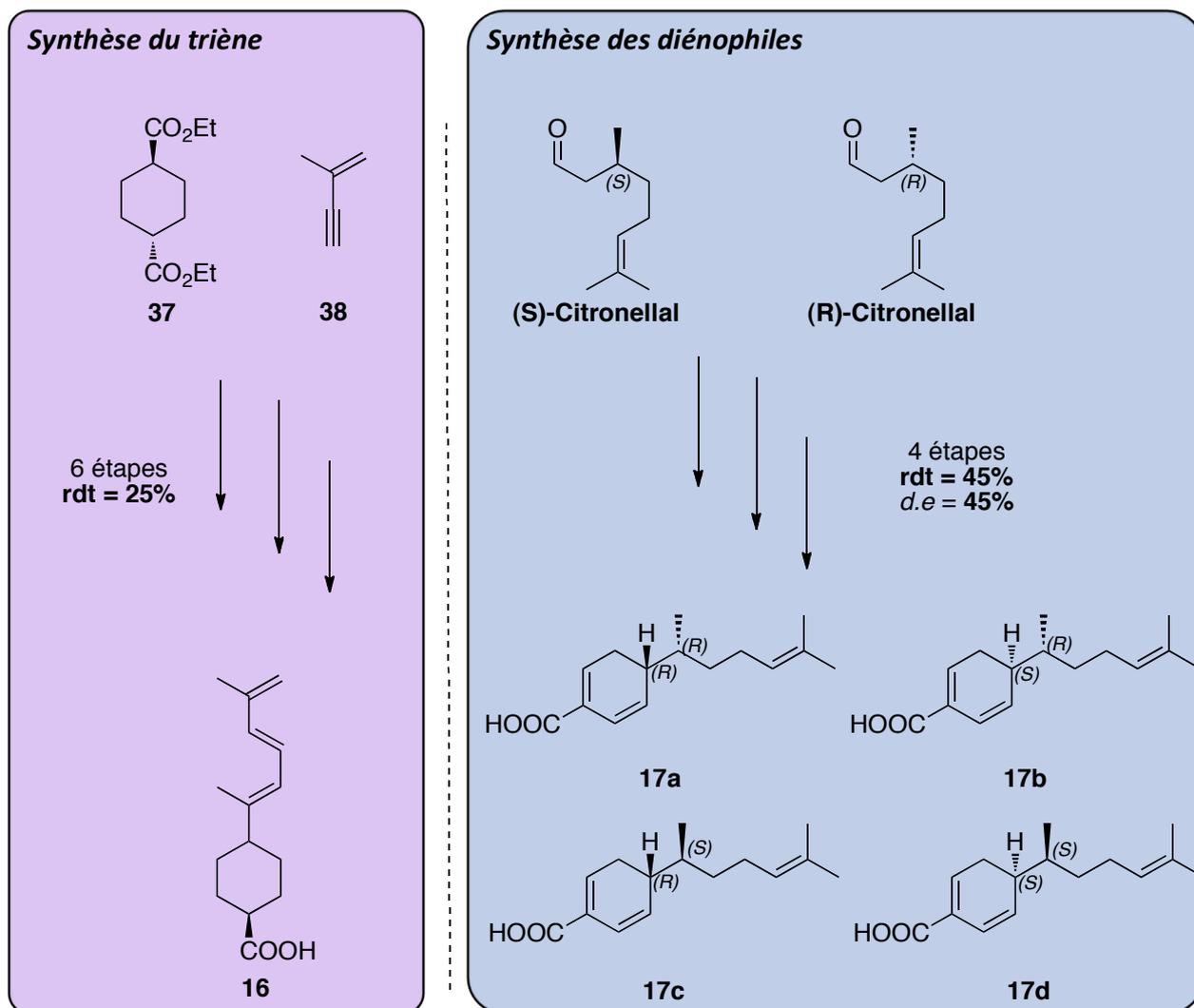


Schéma 7 Synthèse des précurseurs de la meiogynine A 2

Les diastéréoisomères du composé **17** ont été séparés par HPLC préparative. Chacun a été engagé dans une réaction de Diels-Alder en présence du triène **16** et d'un catalyseur de type acide boronique (Schéma 8). Les *cis*-décaldines ont été obtenues avec un ratio *endo/exo* de **91:9** en deux jours à 50 °C dans le dichlorométhane (DCM). La configuration absolue de la meiogynine A **2** et de ses diastéréoisomères **39**, **40**, **41** a pu être déterminée à partir de la stéréochimie connue des différents diénophiles en comparant différentes analyses comme la mesure du pouvoir rotatoire. L'activité de chaque composé sur l'interaction Bcl-xL/Bak a été évaluée. Il s'avère que le composé **39** dont seule la configuration du centre en 1'' est différente, est trois fois plus actif que la meiogynine A **2**.

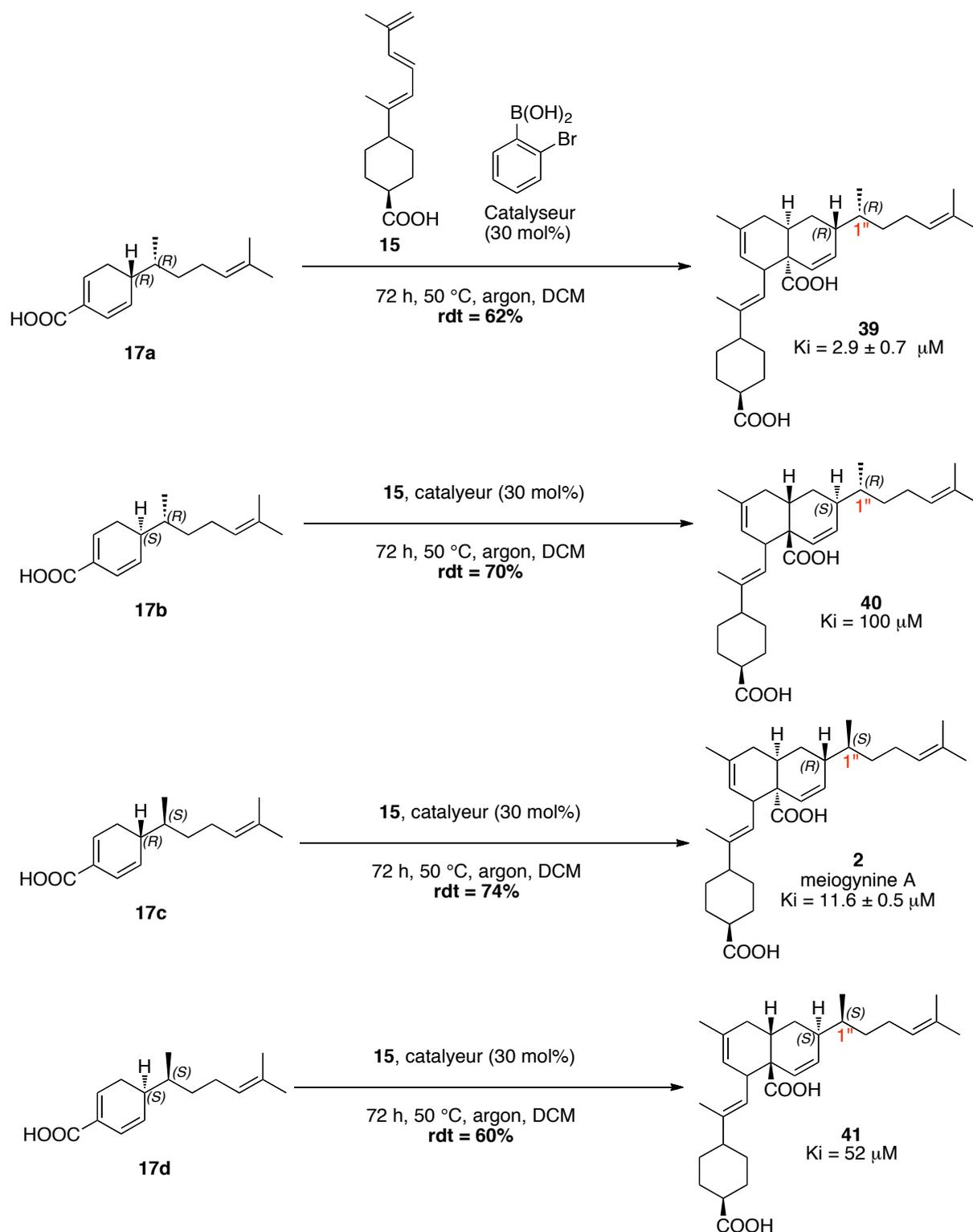


Schéma 8 Réaction de Diels-Alder finale et obtention de la meiogynine A **2** et de ses diastéréoisomères **39**, **40**, **41**

Pour résumer, la synthèse totale de la meiogynine A **2** a été réalisée selon une hypothèse biomimétique et la configuration absolue de ses centres a été déterminée. Trois diastéréoisomères de la meiogynine A **2** ont également été synthétisés, parmi eux l'isomère **39** trois fois plus actif.

1.3 Problématique et objectif du projet

La synthèse totale de la meiogynine A **2** est rapide et convergente. Cependant quelques problèmes se posent encore. La synthèse des diénophiles a conduit majoritairement à l'obtention des composés **17b** et **17d** (précurseurs des analogues **40** et **41**, les moins actifs) avec un excès diastéréoisomérique médiocre de **45%**. Enfin, le triène **16** est photosensible, instable et doit être utilisé très rapidement. La meiogynine A est de plus très lipophile ($\log P = 7.17$).

Le travail de ma thèse a débuté par l'amélioration de la synthèse des diénophiles **17** en optimisant les étapes d'addition de Michael et de crotonisation qui permettent le contrôle des deux centres asymétriques créés. Ces résultats seront présentés dans le chapitre II (Schéma 9).

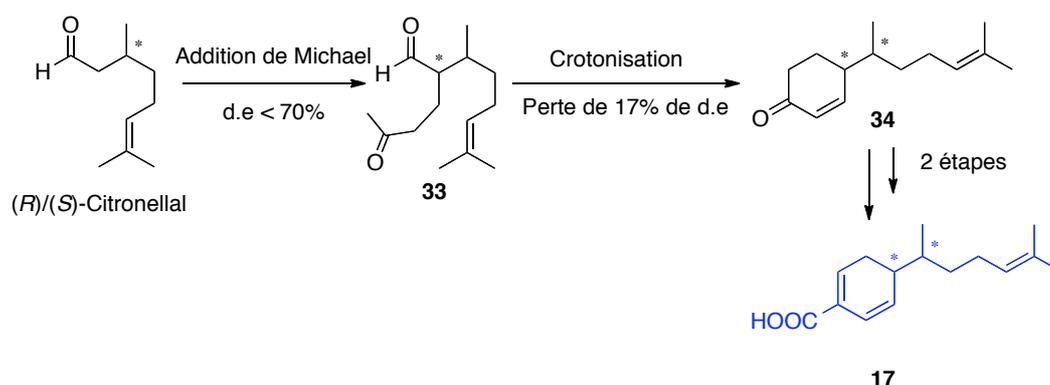


Schéma 9 Amélioration prévue de la synthèse des diénophiles

Dans le troisième chapitre, je présenterai les modifications réalisées sur le triène afin d'obtenir des intermédiaires plus stables, et plus facilement fonctionnalisables en vue d'élaborer des analogues de la meiogynine A **2** moins lipophiles (Schéma 10).

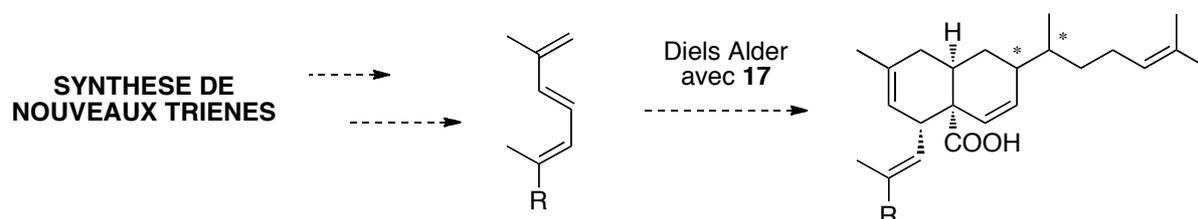


Schéma 10 Modulation de la partie sud de la meiogynine A **2**

Enfin dans un dernier chapitre, je présenterai la mise au point de la synthèse de deux analogues. Des études (RMN, modélisation moléculaire, évaluations biologiques *in vitro*, *in cellulo*) menées sur les composés synthétisés seront présentées. Enfin, les conclusions et les perspectives résultantes de ces travaux seront abordées.

Chapitre 2

2 Amélioration de la synthèse des diénophiles

2.1 Synthèse de la meiogynine A

2.1.1 Rappel des travaux antérieurs

Afin de réaliser la synthèse de la meiogynine A **2** et de déterminer la configuration absolue des différents centres asymétriques, deux précurseurs nécessaires à la réaction de Diels-Alder finale ont été élaborés. Le premier est un précurseur de type triène (**16**) et le second est de type diénophile (**17**) (voir Schéma 11).

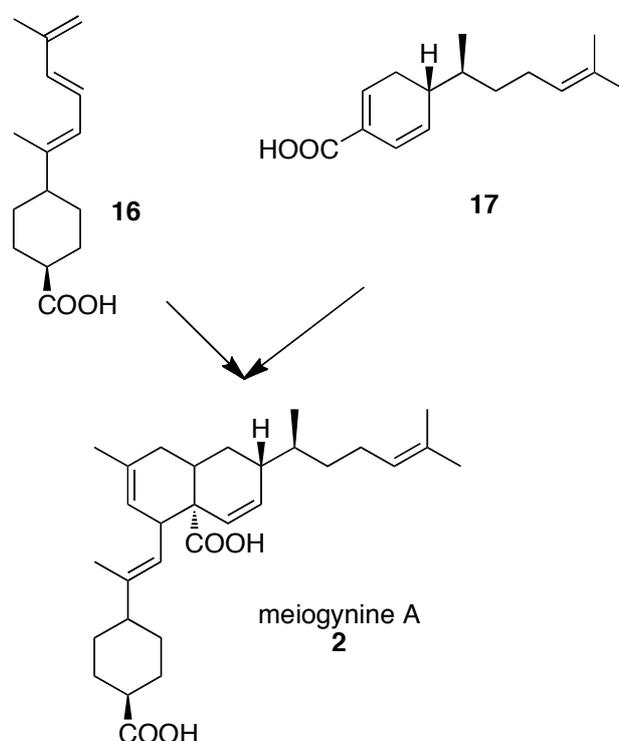


Schéma 11 Précurseurs nécessaires à l'obtention de la meiogynine A 2

La synthèse des diénophiles a été réalisée en parallèle en version racémique et asymétrique. Le (*R*) et (*S*)-citronellal ont été soumis à une annélation de Robinson constituée d'une première étape d'addition de Michael puis d'une crotonisation pour former une énone cyclique. En version racémique (conditions développées par Hagiwara⁶⁹), l'addition de

⁶⁹ Hagiwara, H. ; Okabe, T. ; Hakoda, K. ; Hoshi, T. ; Ono, H. ; Kamat, V. P. ; Suzuki, T. ; Ando, M., *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2705-2707

Michael sur la méthyl vinyle cétone **42**, en présence de diméthylamine dans l'acétonitrile à reflux pendant deux jours, a conduit aux cétoaldéhydes **33** avec un rendement de **96%**. Ceux-ci ont été directement engagés dans l'étape de crotonisation. Les énones racémiques **34** ont été obtenues avec un rendement de **89%**, en présence d'hydroxyde de potassium et d'hydroxyde de tétrabutylammonium en quantité catalytique au reflux pendant 6 heures.

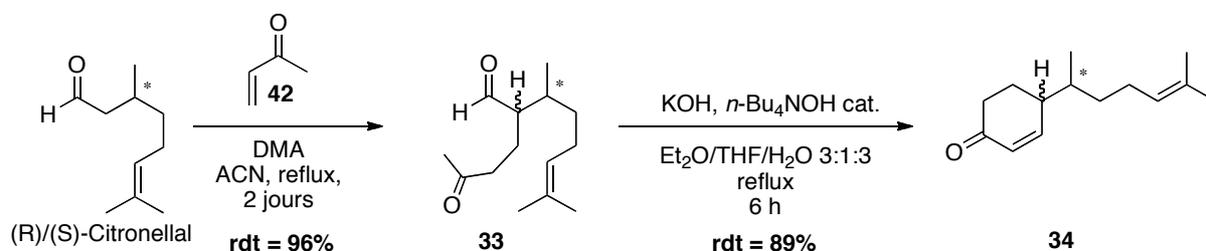


Schéma 12 Conditions racémiques d'obtention des énones **33** par annélation de Robinson.

En version asymétrique, les conditions décrites par Nicolaou^{70,71} dans sa synthèse de la biyouyanagine A ont été utilisées. Du diphenylméthylprolinol **43** développé par Enders⁷² et utilisé par Gellman⁷³ et un co-catalyseur de type catechol **44** ont été utilisés pour réaliser l'addition 1,4 de Michael. Nicolaou *et coll.* décrivent que l'intermédiaire **33** est obtenu en 24 heures à 4 °C avec des rendements de **90%** et **86%** et des excès diastéréoisomériques de **92%** et **93%** respectivement pour le (*R*)- et (*S*)-citronellal. La crotonisation est réalisée en présence d'hydroxyde de tétrabutylammonium dans un mélange ternaire de solvants (éther diéthylique: THF: eau) au reflux pour former les énones **34** avec des rendements de **85%** et **84%** et des excès de **86%** et **92%** respectivement pour le (*R*) et (*S*)-citronellal. Au laboratoire, des résultats très différents ont été obtenus en utilisant les mêmes conditions expérimentales. La première étape d'addition de Michael a nécessité un mois pour obtenir une conversion complète et a donné un excès de **54%** pour le (*R*)- et **60%** pour le (*S*)-citronellal. De plus la crotonisation, décrite comme très peu épimerisante par Nicolaou⁷¹ s'est révélée entraîner une perte d'excès de **17%** en moyenne (mesures réalisées par HPLC

⁷⁰ Shaw, D. M. ; Sarlah, D. ; Nicolaou, K. C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 4708-4711

⁷¹ Burton, D. R. ; Rowcliffe, E. ; Shaw, D. M. ; Sarlah, D. ; Wu, R. T. ; Nicolaou, K. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 11114-11121

⁷² Enders, D. ; Kipphard, H. ; Gerdes, P. ; BrenaValle, L. J. ; Bhushan, V., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1988**, 97, 691-704

⁷³ Chi, Y. ; Gellman, S. H., *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4253-4256

sur colonne Hypercarb dans un isocratique de méthanol). La comparaison des deux versions est illustrée Schéma 13.

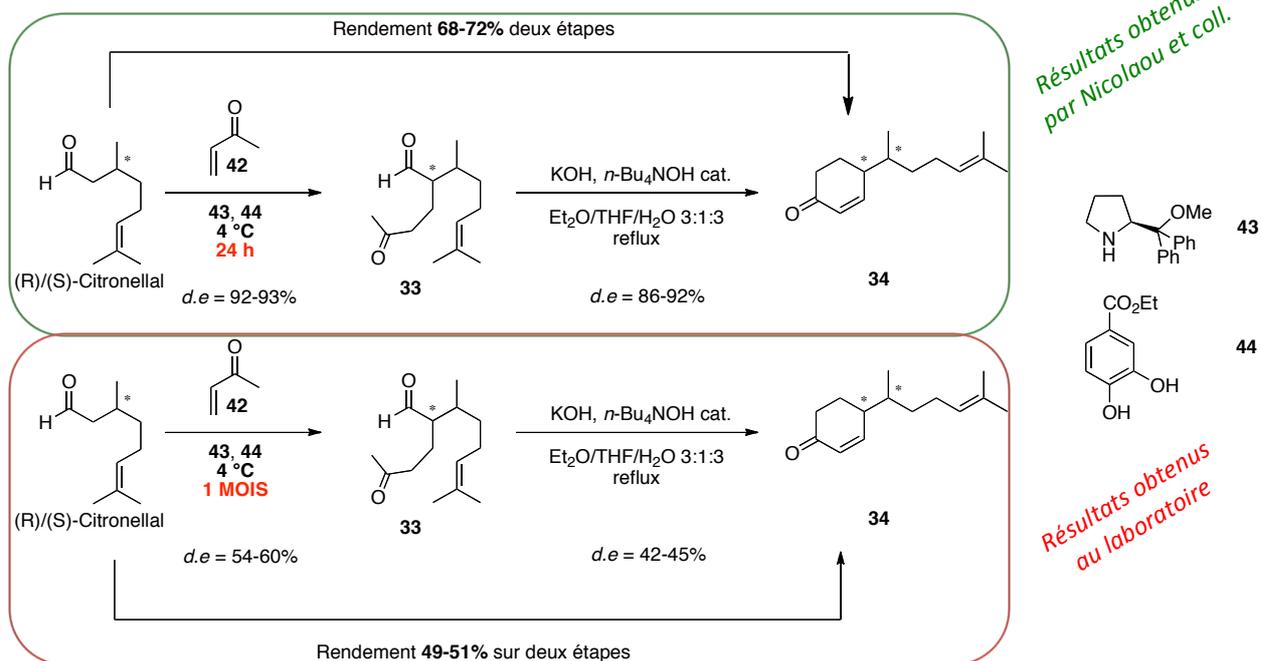


Schéma 13 Comparaison des résultats obtenus au laboratoire et par l'équipe de Nicolaou.

Le composé **34** racémique a été engagé dans une triflation. L'énolate formé grâce au NaHMDS est piégé sous forme d'éthers d'énols à l'aide du réactif de Comins⁷⁴ pour former le composé **45** avec un rendement de **90%** (Schéma 14). Celui-ci a conduit au diénophile **17** par un couplage metallo-catalysé en présence de monoxyde de carbone.

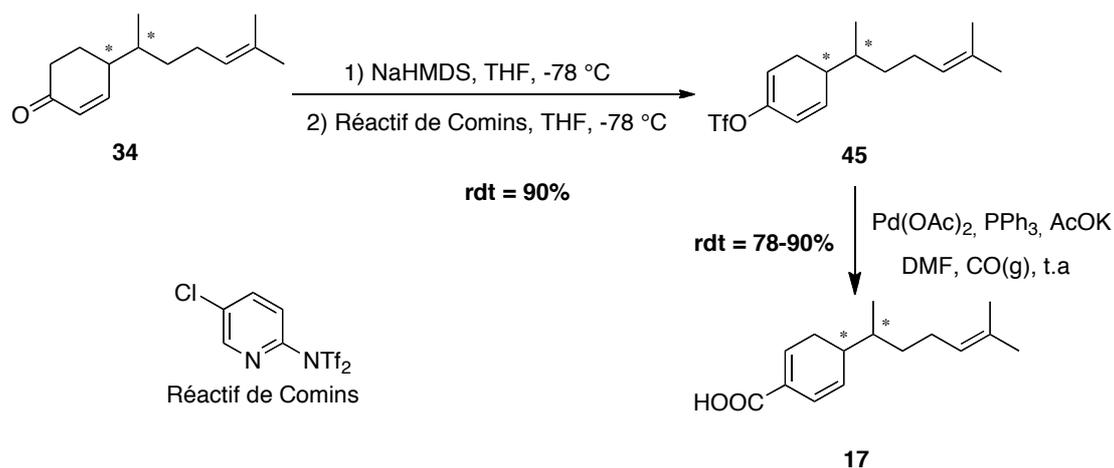


Schéma 14 Fin de la synthèse des diénophiles **17**

⁷⁴ Foti, C. J. ; Comins, D. L., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2656-2657

Les diastéréoisomères ont été séparés par HPLC préparative. Malgré le mauvais excès diastéréoisomérique obtenu en version asymétrique (**45%** et **42%**), la configuration absolue de chaque diénophile a pu être déterminée (Schéma 15). Malheureusement les diastéréoisomères majoritaires ont conduit, après la réaction de Diels-Alder, aux composés énantiomères de la meiogynine A **2** et de son diastéréoisomère le plus actif (**40** et **41**).

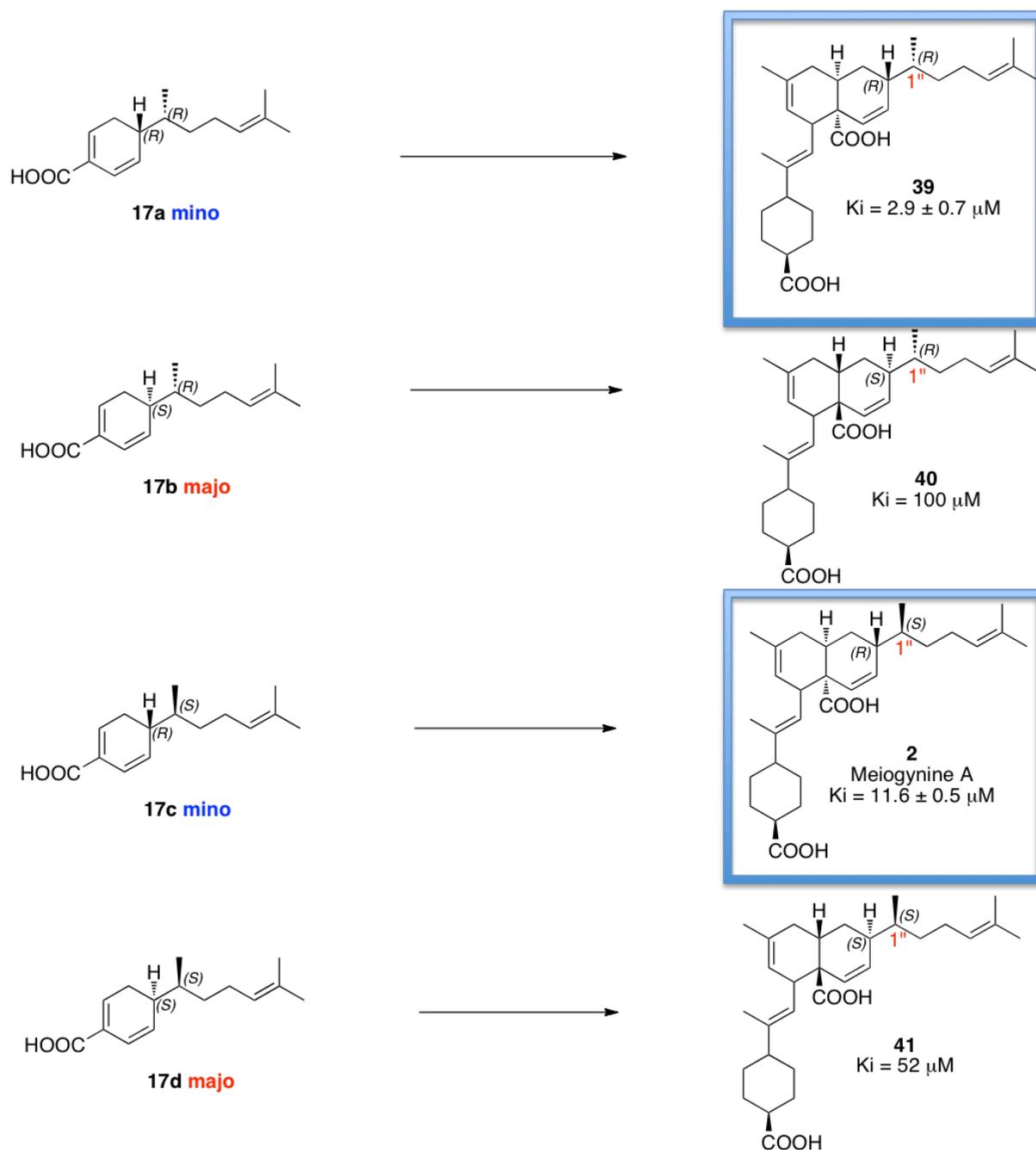


Schéma 15 Obtention de la meiogynine A **2** et de ses diastéréoisomères à partir des diénophiles **17a-d**

2.1.2 Problématique

L'addition 1,4 de Michael et la crotonisation constituent les étapes clés de la synthèse des diénophiles. Elles sont responsables de l'excès diastéréoisomérique obtenu. Dans un premier temps, mon travail a donc été d'optimiser ces deux étapes.

Pour l'addition de Michael, il est nécessaire d'augmenter la stéréosélectivité, d'obtenir les diastéréoisomères conduisant aux produits actifs de façon majoritaire et d'augmenter la vitesse de réaction. Pour cela plusieurs facteurs sont modulables :

- changer l'approche synthétique,
- contrôler la cinétique de la réaction qui passe par la chélation du partenaire de l'addition par le co-catalyseur. Une modification de celui-ci pourrait avoir un effet sur la cinétique de la réaction,
- inverser la configuration du centre formé qui découle de la configuration du catalyseur. Son changement permettrait d'obtenir les diastéréoisomères souhaités,
- augmenter la stéréosélectivité qui est, quant à elle, contrôlée par les groupements portés par le catalyseur de type proline. La modification de l'encombrement stérique pourrait apporter une meilleure sélectivité.

Selon la littérature, la réaction de crotonisation ne devrait pas entraîner de racémisation partielle, cependant nos observations indiquent le contraire. L'objectif de mon travail a consisté à trouver des conditions plus douces de crotonisation permettant de réduire la perte d'excès diastéréoisomérique.

La suite de ce chapitre traitera donc des résultats obtenus pour l'optimisation de la synthèse des diénophiles.

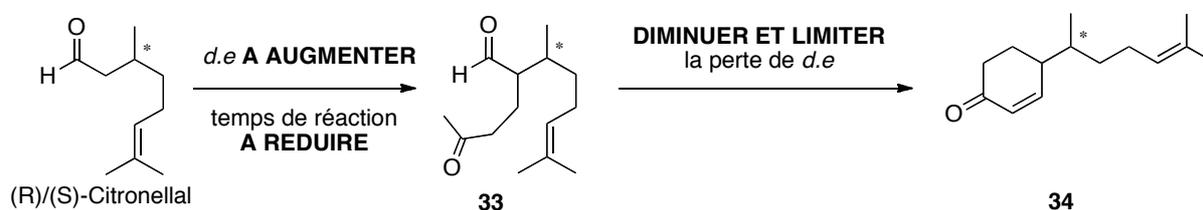


Schéma 16 Objectifs de mes travaux sur la synthèse des diénophiles

2.2 L'annélation de Robinson, rappel bibliographique

Les deux premières étapes de la synthèse des diénophiles constituent une annélation de Robinson. L'addition 1,4 de Michael, permet d'obtenir un cétyaldéhyde qui réagit ensuite en présence d'une base pour cycliser (Schéma 17).^{75,76,77} Par exemple, le dérivé **46** est obtenu par attaque de l'énolate de **45** sur la méthyle vinyle cétone par l'addition de Michael. Après tautomérisation, le composé **47** réagit de façon intramoléculaire pour cycliser en dérivé **48**. Après reprotonation pour donner le produit **49**, l'élimination du groupement hydroxyle se fait en présence de base pour conduire au dérivé **50**.

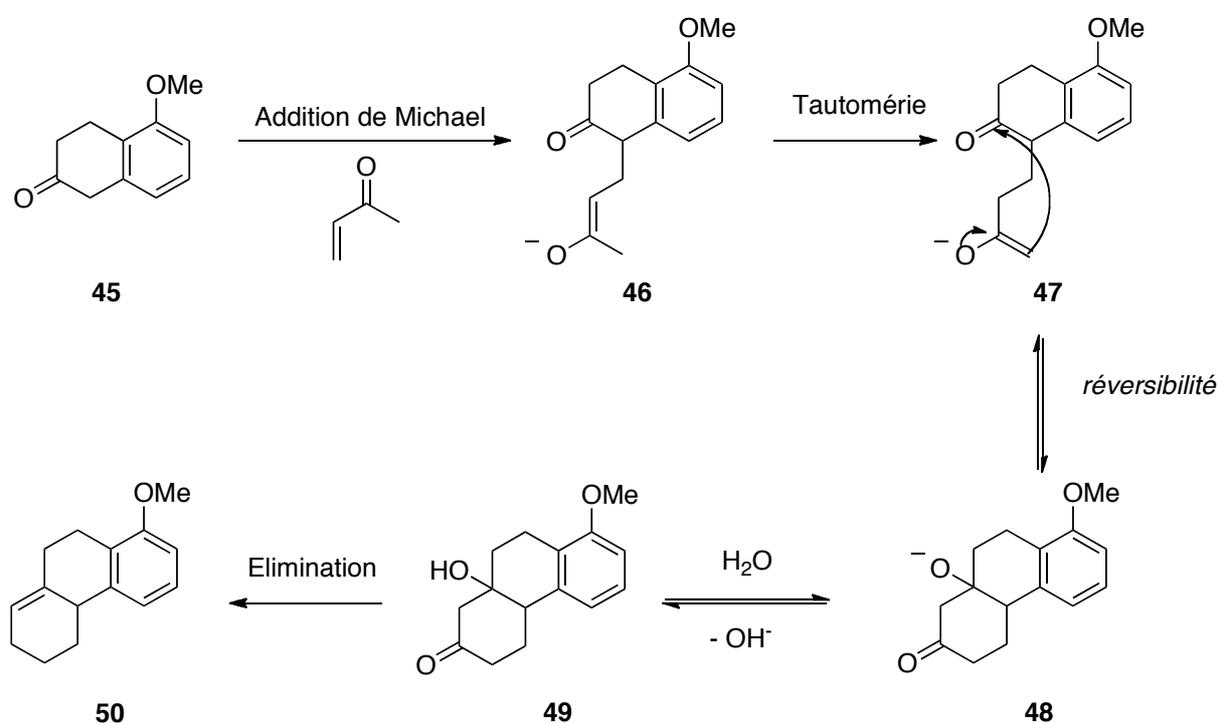


Schéma 17 Principe de l'annélation de Robinson

Cette réaction a connu des développements en synthèse asymétrique. Par exemple Yamamoto⁷⁸ a élaboré des composés tétracycliques **52** et **52'** précurseurs de la plantensimycine, par une réaction d'annélation de Robinson asymétrique en utilisant la proline en quantité stoechiométrique (Schéma 18). Le bicycle **51**, dont le centre 1 est

⁷⁵ Gawley, R. E., *Synthesis*, **1976**, 777-794

⁷⁶ Heathcock, C. H. ; Mahaim, C. ; Schlecht, M. F. ; Utawanit, T., *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 3264-3274

⁷⁷ Jung, M. E., *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 3-31

⁷⁸ Li, P. ; Payette, J. N. ; Yamamoto, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9534-9539

racémique, a été obtenu en 7 étapes. Il réagit avec la proline pour réaliser une addition de Michael intramoléculaire. L'ajout d'une base permet ensuite la crotonisation et la formation des tétracycles désirés **52** et **52'**. Le rendement est excellent (**95%**) et la diastéréosélectivité très bonne (**5:1**). Cette réaction permet, selon Yamamoto *et coll.*, de différencier les deux faces *Re* et *Si* de l'état intermédiaire et ainsi d'induire une diastéréosélectivité de la réaction. Selon Yamamoto *et coll.*, cette différence de réactivité s'explique par les écarts des énergies orbitales des LUMO de chaque conformère.⁷⁹ Ils observent que la (*L*)-proline conduit à l'isomère **52'** souhaité avec un ratio de 5 :1 grâce à un effet match. L'effet mismatch induit par la (*R*)-proline a conduit au tétracycle **52** avec un ratio 3:1 lors de leurs essais.

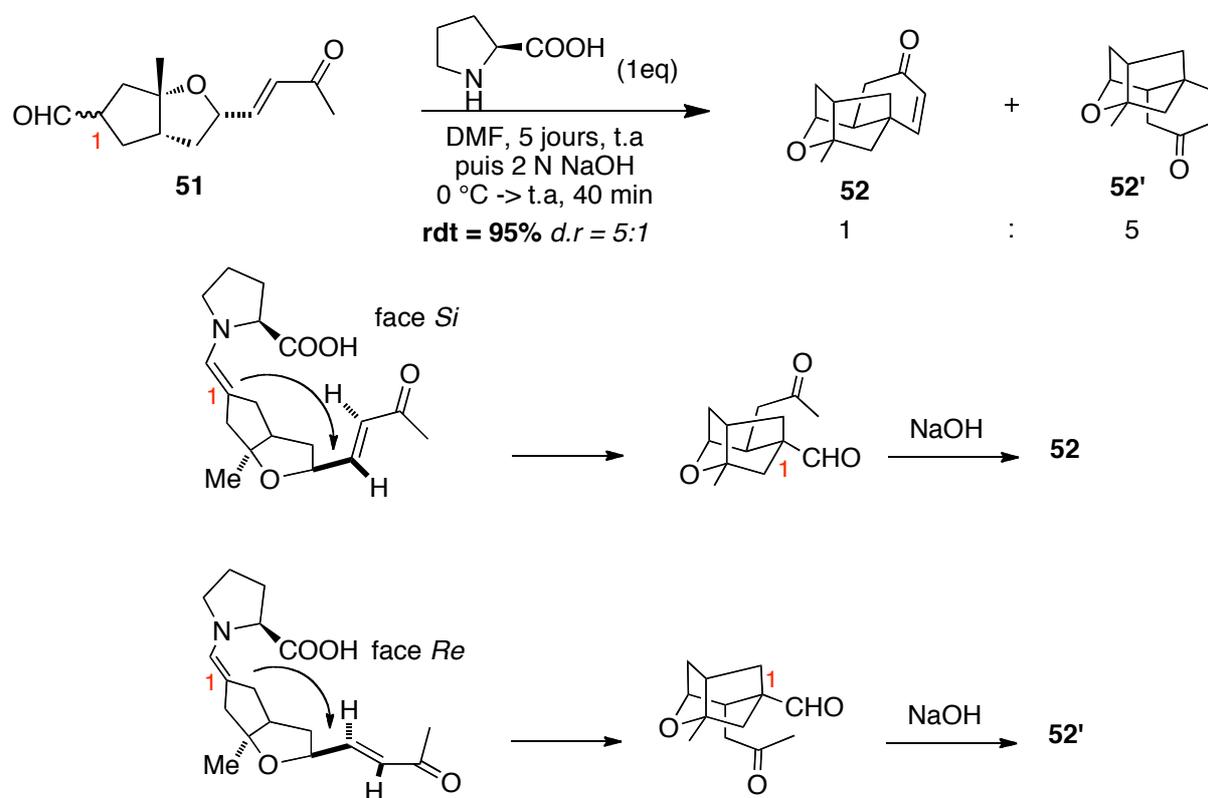


Schéma 18 Synthèse des composés tétracycliques **52** et **52'** par une annélation de Robinson diastéréosélective

⁷⁹ Yamamoto, Y. ; Nishii, S. ; Ibuka, T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 464-466

2.3 L'addition de Michael

2.3.1 Rappel bibliographique sur l'addition de Michael asymétrique

2.3.1.1 Conditions stoechiométriques

L'addition de Michael peut être rendue asymétrique par l'introduction d'une copule chirale. Cette copule encombre le substrat pour orienter la sélectivité de la réaction. Un des premiers exemples est la méthode « SAMP/RAMP » développée par Enders.⁸⁰ Les hydrazines chirales dérivées de la (*R*)- ou de la (*S*)-proline forment, avec des aldéhydes, des hydrazones **55** de façon instantanée et totale. L'ajout de LDA dans le THF à 0 °C permet de déprotoner le dérivé **55** en α de l'hydrazone qui s'additionne sur l'ester α, β insaturé **56** pour former le composé **57**. La copule SAMP est ensuite enlevée par ozonolyse dans le dichlorométhane pour conduire aux céto-esters **58**. Les groupements R_1 et R_2 sont généralement aliphatiques. Les excès énantiomériques obtenus sont excellents.

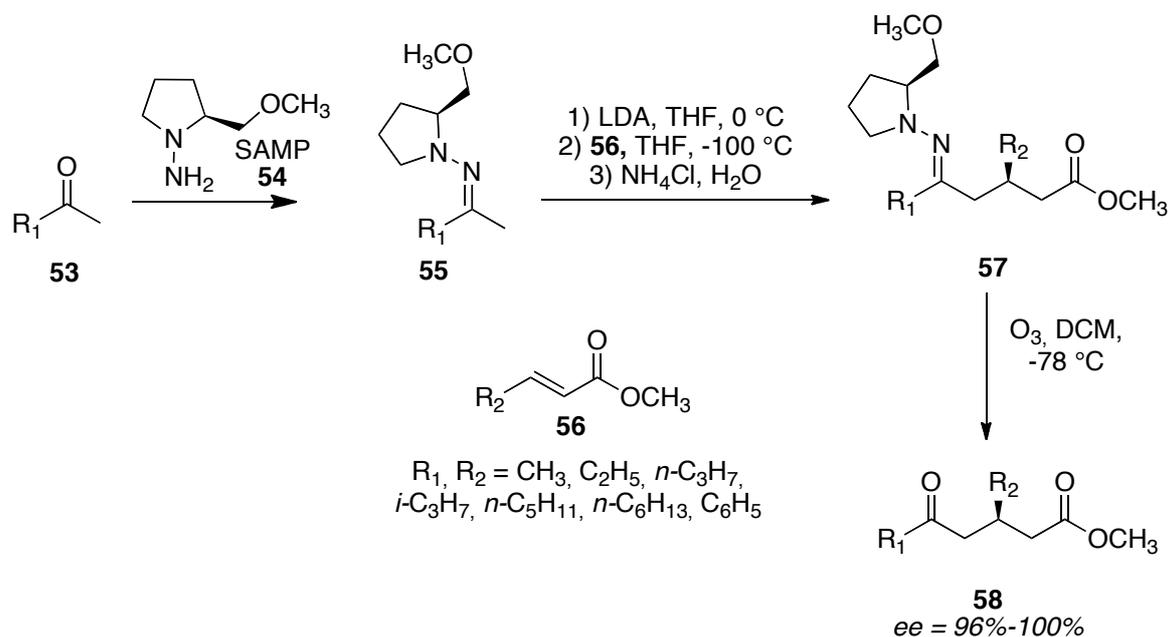


Schéma 19 Méthode SAMP/RAMP

Cette méthode peut être appliquée à la formation de 2 centres asymétriques consécutifs. En partant du propanal, Enders a obtenu le composé **61** avec de bons

⁸⁰ Enders, D. ; Rendenbach, B. E. M., *Tetrahedron*, **1986**, 42, 2235-2342

rendements en utilisant le SAMP **54**. Celui-ci est alors déprotégé par ozonolyse pour former le composé **62** qui est obtenu avec un excès diastéréoisomérique supérieur à **96%** (Schéma 20).

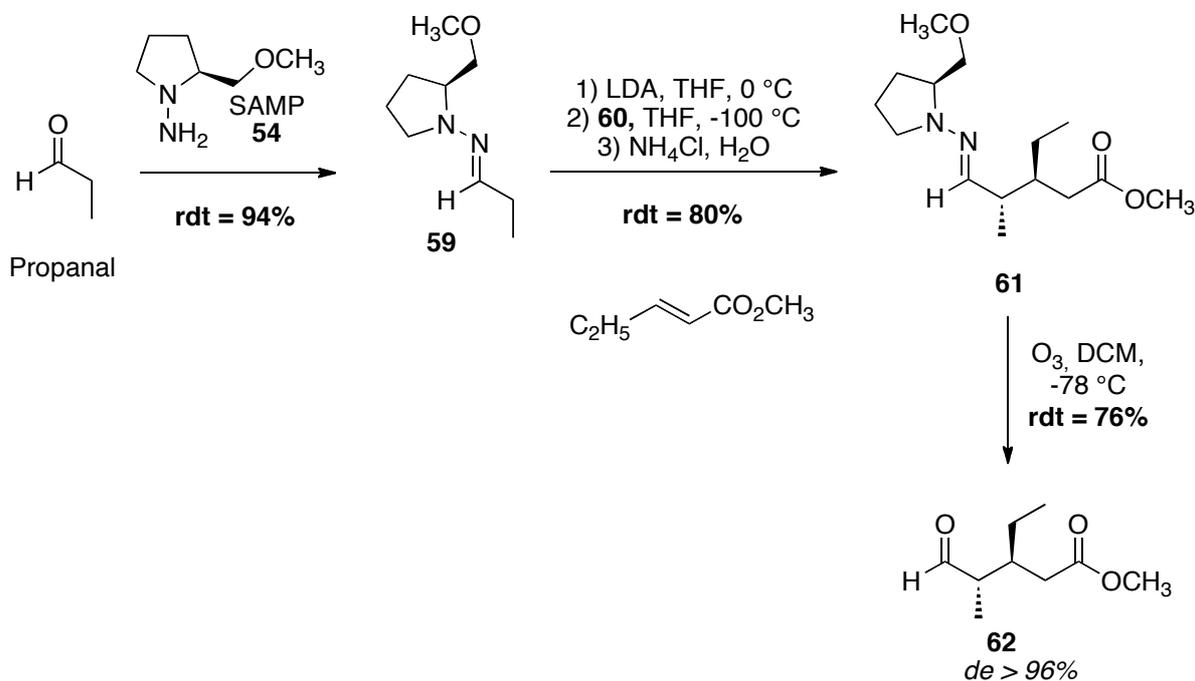


Schéma 20 Méthode SAMP appliquée à l'obtention de **62**

Plus récemment d'autres équipes, comme l'équipe de d'Angelo, ont développé ce concept.⁸¹ Une amine chirale encombrée a été utilisée pour former des énamines **63**. Celles-ci réagissent avec un accepteur de Michael pour former les produits désirés **64** comportant un centre quaternaire avec de très bons excès. Cependant il est à noter que la phénylvinylesulfone est plus réactive que la méthyle vinyle cétone et que le temps de réaction est relativement long même en utilisant cet accepteur de Michael (Schéma 21).

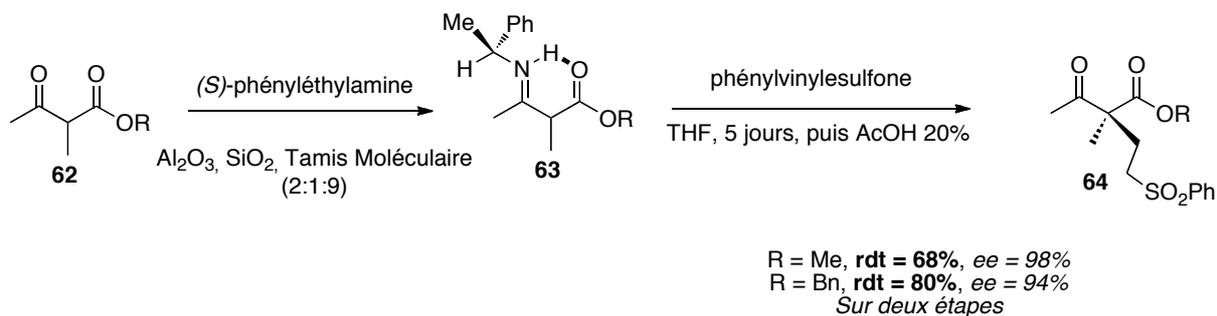


Schéma 21 Méthode développée par d'Angelo.

⁸¹ Pizzonero, M. ; Hendra, F. ; Delarue-Cochin, S. ; Tran Huu-Dau, M. E. ; Dumas, F. ; Cavé, C. ; Nour, M. ; d'Angelo, J., *Tetrahedron Asymmetry*, **2005**, *16*, 3853-3857

2.3.1.2 L'organocatalyse, application à l'addition de Michael

2.3.1.2.1 Dérivés du prolinol

L'organocatalyse est devenue depuis le début des années 90, un outil puissant de la synthèse organique moderne.⁸² L'organocatalyse consiste à utiliser des composés organiques comme catalyseur de réaction. Elle constitue une alternative moins onéreuse à la catalyse organométallique⁸³ ou à la catalyse enzymatique.⁸⁴ Parmi les catalyseurs les plus utilisés, la proline est un composé polyvalent capable d'intervenir dans la catalyse de plusieurs types de réactions (réaction de Mannich, réaction de Michael, réaction de Diels-Alder).⁸⁵

Ses dérivés sont prisés car ils sont faciles d'accès, nombreux et présentent d'excellents résultats tant au niveau du rendement que de la sélectivité. La fonctionnalisation des aldéhydes est un de leur champ d'application principal (Figure 30).⁸⁶

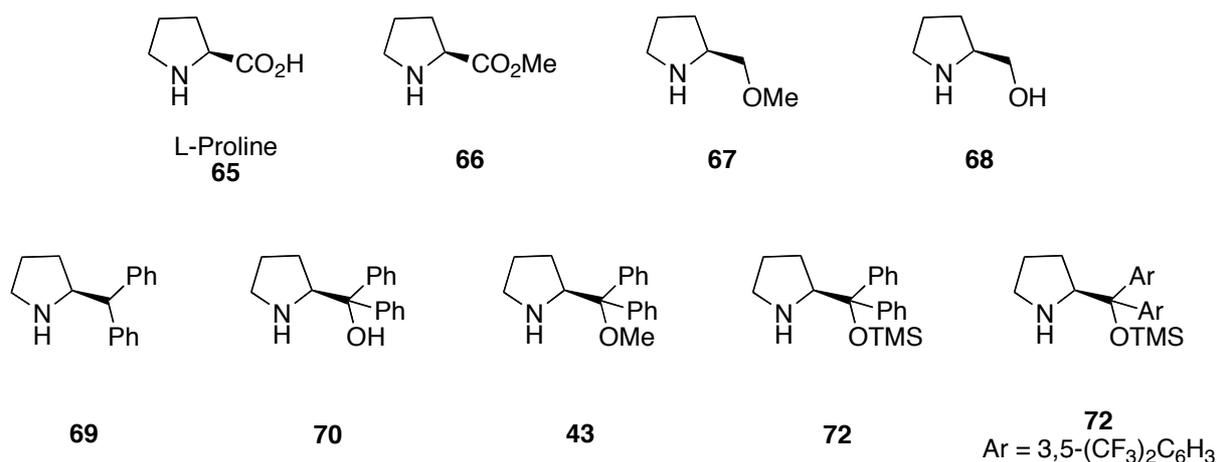


Figure 30 Exemples de dérivés de la proline utilisés en organocatalyse

L'amine secondaire du catalyseur forme avec l'aldéhyde un iminium ou une énamine transitoire plus réactif que le composé initial. L'iminium réagit avec un nucléophile et l'énamine avec un électrophile.⁸⁷ La sélectivité est contrôlée en fonction des substituants du catalyseur, de deux manières différentes (Figure 31):

⁸² Pelissier, H., *Tetrahedron*, **2007**, 63, 9267-9331

⁸³ Christoffers, J., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 7, 1259-1266

⁸⁴ Langenhan, J. M. ; Griffith, B. R. ; Thorson, J. S., *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1696-1711

⁸⁵ List, B., *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5573-5590

⁸⁶ Dalko, P. I. ; Moisan, L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 5138-5175

⁸⁷ Palom, C. ; Mielgo, A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 7876-7880

- par formation d'une liaison hydrogène pour les catalyseurs ayant un hydrogène acide (composés **65**, **68**, **69**, **71**)
- par gêne stérique en influençant l'approche de l'addition.

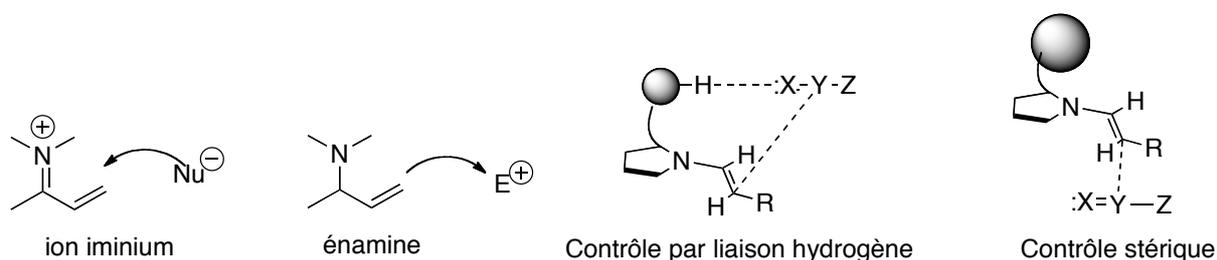


Figure 31

L'équipe de Gellman a étudié l'addition conjuguée d'aldéhydes linéaires sur des cétones α, β insaturées.⁷³ Ils ont développé une version asymétrique de cette réaction en criblant différents catalyseurs. Les conditions optimales qu'ils ont définies consistent à agiter à 4 °C, l'aldéhyde **73** et la cétone **42** en présence du dérivé proline **43** et du co-catalyseur **44**. Celui-ci chélaterait la cétone conjuguée, exaltant ainsi son électrophilie mais son utilisation n'est pas nécessaire pour tous les substrats.⁸⁰ Dans le cas de la méthyle vinyle cétone **42**, l'utilisation du catechol **44** n'a été nécessaire que pour la réaction avec le propionaldéhyde ($R_1 = \text{Me}$). L'énantiosélectivité (de **95** à **98%** selon la taille des chaînes alkyles R_1) ainsi que les rendements allant de **65** à **85%** sont excellents (Schéma 22). Un seul essai a été réalisé avec un groupement non aliphatique ($R_1 = \text{Bn}$), donnant également de bons résultats.

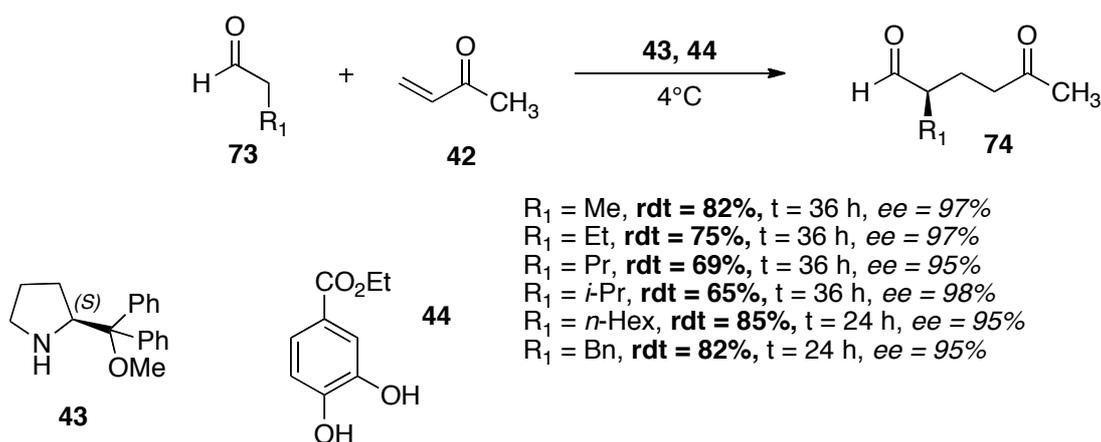


Schéma 22 Conditions optimales de l'addition de Michael catalysée par un dérivé proline

L'utilisation du co-catalyseur **44** devient obligatoire lorsque l'énone utilisée est moins réactive, par exemple l'éthyle vinyle cétone **75** (Schéma 23). Les temps de réaction sont en général plus longs, mais les rendements et excès énantiomériques restent excellents.

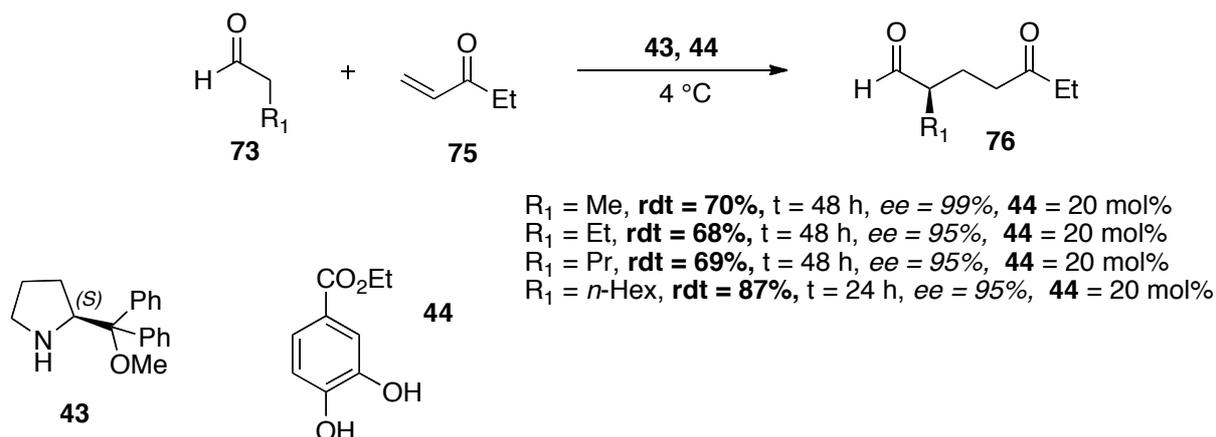


Schéma 23 Conditions d'addition de Michael développées par Gellman sur 76

La configuration du dérivé proline **43** influence la configuration du centre créé lors de la réaction. Il va former l'énamine **I** en se liant à l'aldéhyde **73** de façon spontanée. L'attaque de cette énamine **I** sur le composé **42** est l'étape clé pour l'induction chirale. En effet, la gêne stérique due aux groupements du catalyseur **43**, va orienter l'attaque de **I** sur la méthyle vinyle cétone **42** et le contrôle asymétrique de la liaison créée. La configuration obtenue est (*R*) si R_1 est un alkyle. Après hydrolyse, le dérivé **43** est reformé et le produit d'addition est obtenu.

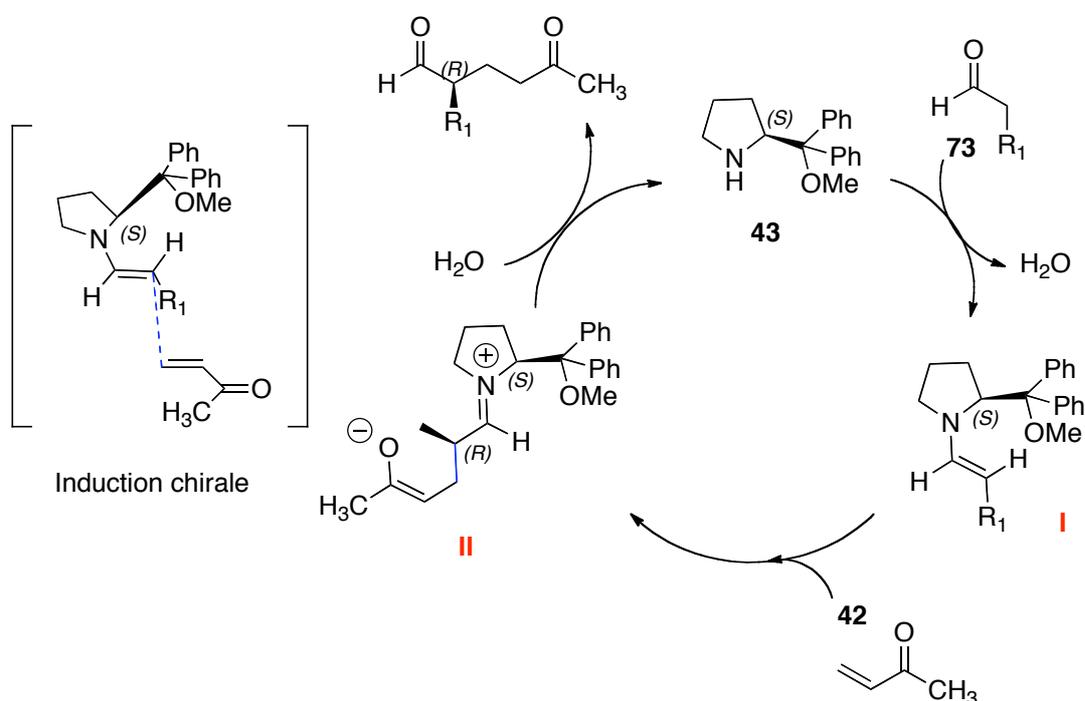


Schéma 24 Mécanisme de l'addition de Michael catalysée par un dérivé proline

2.3.1.2.2 Le catalyseur de MacMillan

Les oxazolidinones sont des organocatalyseurs connus pour augmenter la réactivité de cycloadditions. Certains dérivés des oxazolidinones comme l'imidazolidine **79** ont été utilisés dans des réactions d'addition de Michael et notamment dans la synthèse de la warfarine (Schéma 25).⁸⁸ L'addition de Michael entre les composés **77** et **78** conduit à la formation du dérivé **80** en équilibre avec le composé **81** avec un rendement excellent et un très bon excès énantiomérique. La réaction a été réalisée à l'échelle du kilogramme.

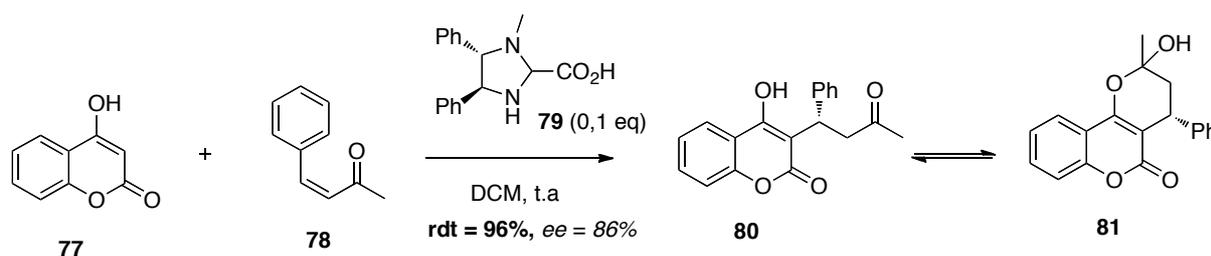


Schéma 25 Addition de Michael avec un dérivé du catalyseur de Macmillan

Le catalyseur de MacMillan **83** a été utilisé par Gellman⁸⁹ dans des réactions de Michael similaires dans leurs mises en œuvre, à celles utilisant les dérivés du prolinol. Le rendement est excellent ainsi que l'excès énantiomérique. L'équipe de Gellman explique l'induction de sélectivité du catalyseur de MacMillan grâce à l'encombrement stérique des carbones en α de l'azote formant l'énamine (Schéma 26). Ils ont démontré par des expériences nOe qu'une forme énamine prédomine, ce qui permet d'expliquer la stéréosélectivité de la réaction (Figure 32).

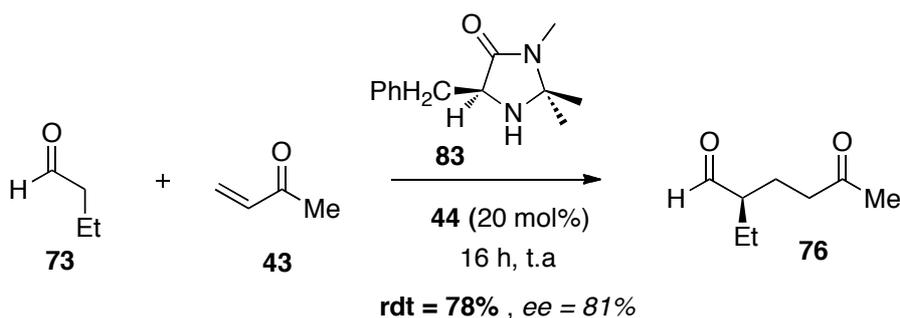


Schéma 26 Utilisation du catalyseur de MacMillan **83** dans une addition de Michael

⁸⁸ Halland, N. ; Hansen, T. ; Jørgensen, K. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4955–4957

⁸⁹ Peelen, T. J. ; Chi, Y. ; Samuel H. Gellman, S. H. , *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 11598-11599

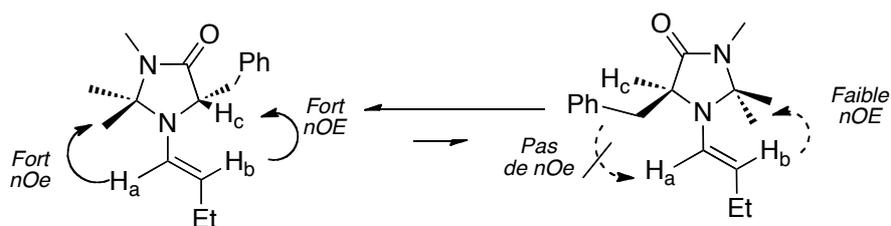


Figure 32 Induction de la stéréosélectivité par le catalyseur de MacMillan

2.3.2 Résultats personnels

2.3.2.1 Conditions stoechiométriques

Dans un premier temps, nous avons décidé de changer la voie de synthèse des diénophiles en utilisant les méthodes développées par Enders⁸⁰ ou d'Angelo.⁸¹ Les tests ont été réalisés sur le (*R*)-citronellal.

Les composés **84** et **85** ont été obtenus de manière quantitative par conversion totale du citronellal en imine **84** et en hydrazone **85** (Schéma 27).

L'addition de Michael sur l'imine **84** a été réalisée dans les conditions décrites par d'Angelo. La méthyle vinyle cétone **42** a été ajoutée à une solution de dibromure de magnésium (formé *in situ* avec du dibromoéthane et du magnésium) dans l'éther diéthylique puis le brut réactionnel a été hydrolysé par de l'acide acétique. Les essais réalisés n'ont pas conduit à l'apparition des composés **33** mais à la récupération du produit de départ et à de la dégradation.

L'addition de Michael a été réalisée sur l'hydrazine **85** dans les conditions décrites par Enders en utilisant du LDA. Aucune formation des dérivés **86** et **87** n'a été observée. Ces deux méthodes ont donc été abandonnées.

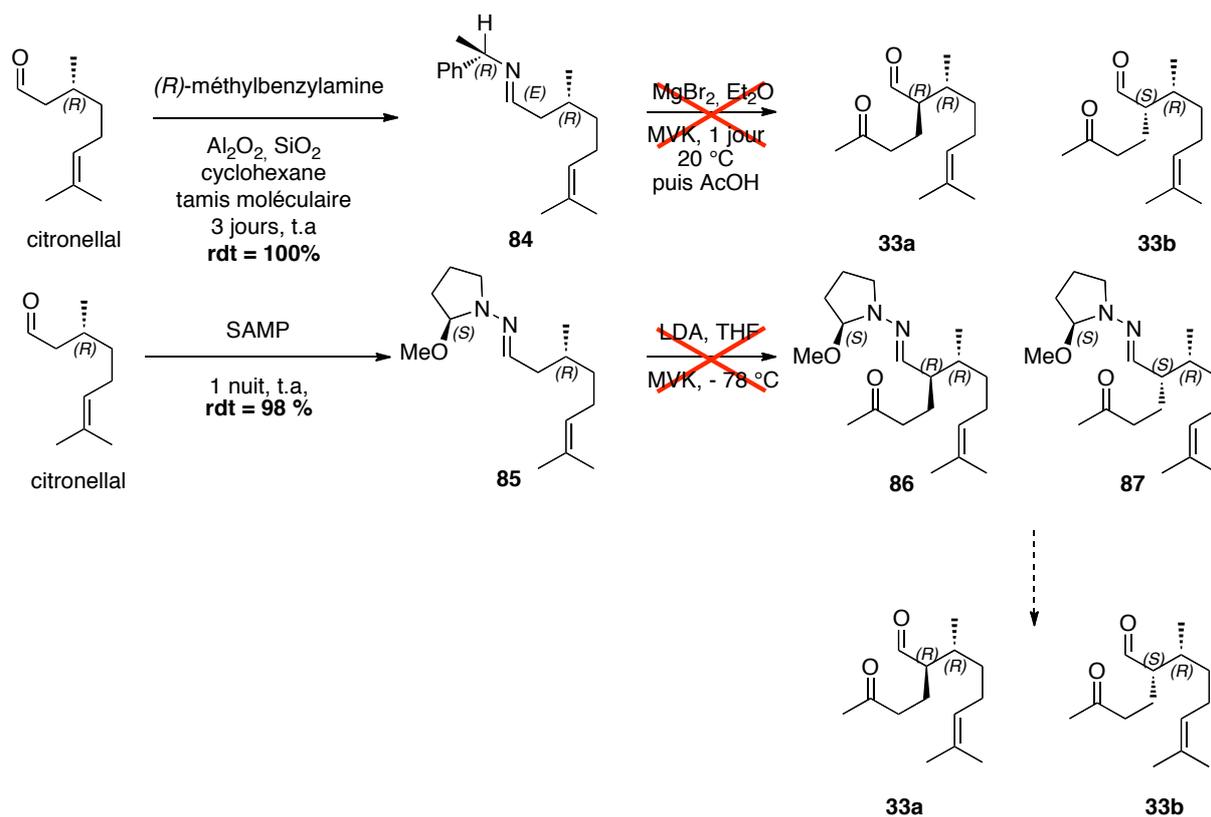


Schéma 27 Essai des méthodes de d'Angelo et Enders

Nous avons également utilisé la proline en quantité stoechiométrique. Cependant les produits désirés n'ont pas été obtenus (Schéma 28).

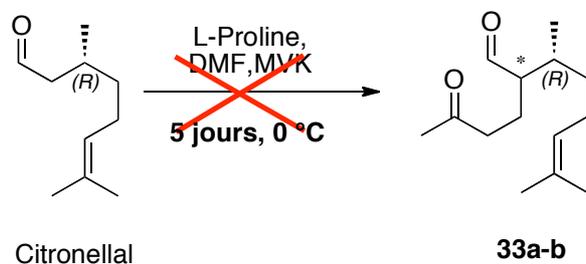


Schéma 28 Essai d'addition de Michael avec la proline comme copule chirale

2.3.2.2 Conditions catalytiques

2.3.2.2.1 Le catalyseur de MacMillan

Dans la même optique que précédemment, la voie de synthèse a été modifiée en utilisant le catalyseur de MacMillan **83** pour l'addition de Michael (Schéma 29). Cependant les résultats se sont révélés décevants. En effet, une très légère formation du composé désiré (<20% en 7 jours) a été observée. L'excès diastéréoisomérique d'environ **54%** a été mesuré par RMN. Cette voie de synthèse a également été abandonnée.

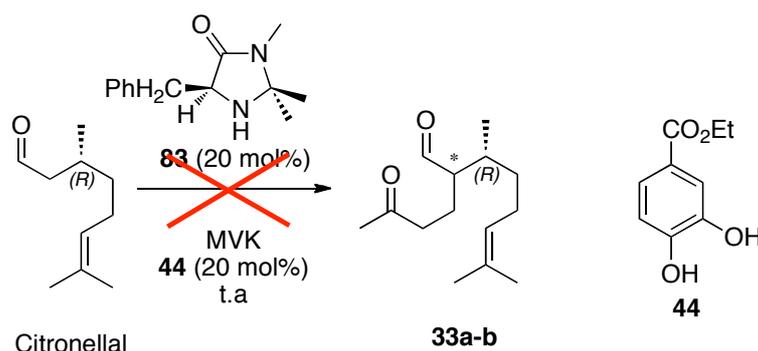


Schéma 29 Essai du catalyseur de MacMillan pour l'addition de Michael

2.3.2.2.2 Les dérivés du prolinol : synthèse de catalyseurs

Pour optimiser l'addition de Michael en utilisant les dérivés prolinols, nous avons synthétisé différents catalyseurs en faisant varier les groupements portés par l'oxygène et au pied de celui-ci en partant de l'ester méthylique de la *(R)*-benzyle proline **88**.⁷²

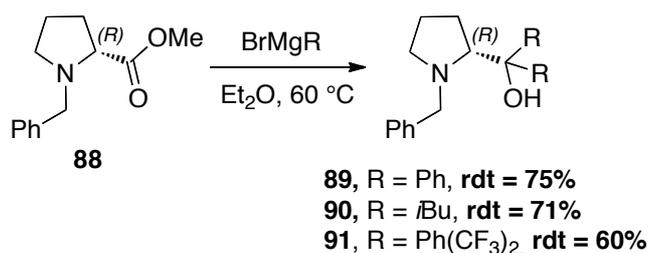


Schéma 30 Formation des composés **89**, **90**, **91**

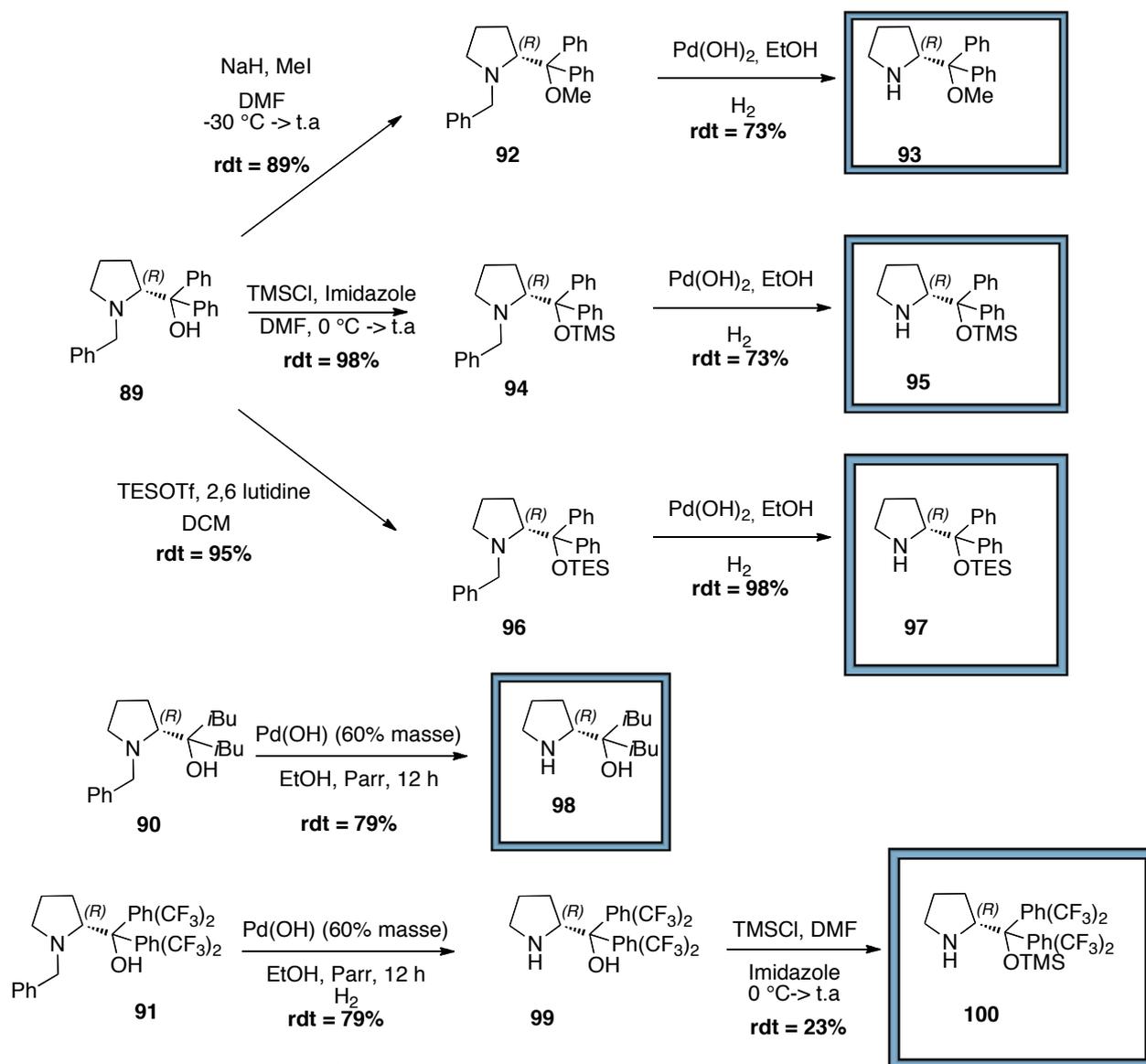
Les composés **89**, **90** et **91** ont été obtenus par condensation de deux équivalents du magnésien correspondant. Plusieurs groupements de tailles différentes ont été introduits afin d'étudier l'impact de la gêne stérique sur l'excès diastéréoisomérique de la réaction. La suite de la synthèse passe par la débenzylation de l'amine par hydrogénation en présence de palladium puis la fonctionnalisation de l'hydroxyle.

La débenzylation a été réalisée avec de l'hydroxyde de palladium (60% de la masse du substrat) dans l'EtOH dans un appareil de Parr.⁹⁰ Cette méthode décrite par Cube, s'est révélée plus efficace que la débenzylation avec le palladium sur charbon proposée par Enders. La fonctionnalisation de l'hydroxyle peut se faire avant ou après la débenzylation. Les composés **93**⁷³, **95**^{73,91} et **97**⁹¹ ont été obtenus à partir du dérivé **89** avec de bons rendements et correspondent à leurs descriptions dans la littérature. Les composés **90** et **91** se sont révélés moins réactifs. Les débenzylation ont donc été réalisées avant la fonctionnalisation de l'alcool. Le composé **98** n'a pas réagit mais le composé **99** a conduit au produit **100**⁹² avec un rendement moyen mais suffisant pour obtenir une quantité de catalyseur permettant d'effectuer quelques essais.

⁹⁰ Bernots, R. C. ; Cube, R. V., *Synth. Commun.*, **1990**, *20*, 1209-1212

⁹¹ Hayashi, Y. ; Gotoh, H. ; Hayashi, T. ; Shoji, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *27*, 4212-4215

⁹² Marigo, M. ; Wabnitz, T. C. ; Fielenbach, D. ; Joergensen, K. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* , **2005**, *5*, 794-797



2.3.2.2.3 Addition de Michael, utilisation des catalyseurs synthésés

Les essais d'addition de Michael ont été réalisés avec l'ensemble des différents catalyseurs synthésés et différents co-catalyseurs (Schéma 32). Comme ceux-ci chélatent la méthyle vinyle céton **42** et exalte sa réactivité, nous avons supposé que l'utilisation d'un co-catalyseur plus électro attracteur comme **101** et **102** pourrait améliorer la cinétique de la réaction. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

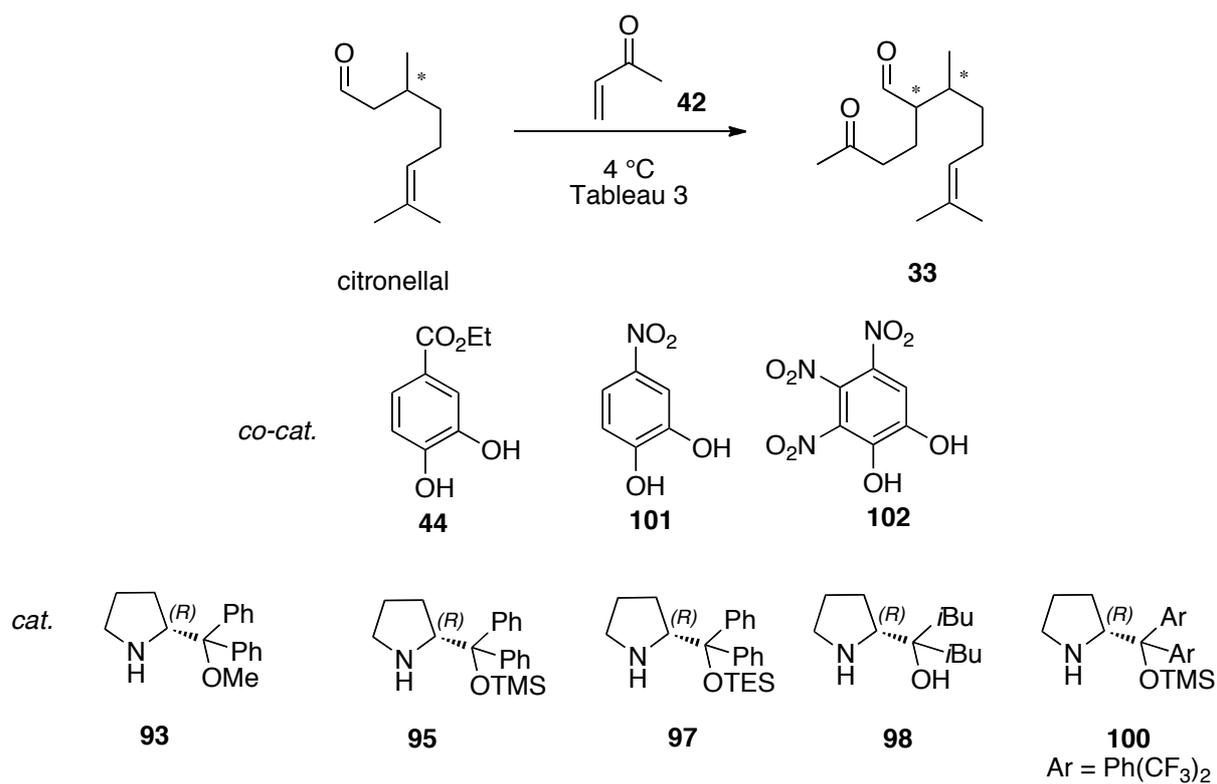


Schéma 32

Tableau 3 Criblage des conditions de l'addition de Michael

Entrée	citronellal	Cat.	Co-cat	t	d.e (%)	Rdt (%) ^c
1	S	93	44	1 mois	60 ^a	60
2	R	93	44	1 mois	54 ^a	80
3	S	93	101	14 jours	55 ^b	N.D
4	R	93	101	14 jours	75 ^a	70
5	S	98	101	<i>Pas de conversion</i>		
6	S	100	101	>1 mois	85 ^b	N.D
7	S	95	101	>1 mois	86 ^b	N.D
8	S	95	102	<i>Pas de conversion</i>		
9	S	95	44	7 jours	93 ^a	86
10	R	95	44	7 jours	95 ^a	73
11	S	97	44	7 jours	90 ^a	70 ^d
12	R	97	44	7 jours	93 ^a	86 ^d

a) déterminé par HPLC, b) déterminé par RMN ¹H, c) rendement après purification, d) expérience réalisée à t.a

Dans un premier temps, les conditions précédemment utilisées lors de la synthèse de la meiogynine A **2** ont été reproduites, en inversant la chiralité du catalyseur (entrée **1** et entrée **2**). Des excès diastéréoisomériques et une vitesse de réaction similaires ont été observés. Le co-catalyseur a ensuite été modifié en remplaçant l'ester éthylique de l'acide protocatechuique **44** par le 4-nitrocatechol **101**, plus électroattracteur. Le temps de réaction a ainsi pu être diminué de moitié avec des excès légèrement améliorés (entrées **3** et **4**). Avec le catalyseur **98**, aucune réaction n'a été observée (entrée **5**). L'utilisation de l'éther de triméthylsilyldiphénylprolinol **95** et de l'éther de triméthylsilyl-4,6-di-trifluorométhane-diphénylprolinol **100** ont permis d'obtenir les meilleurs excès malgré une conversion extrêmement lente (entrées **6** et **7**). Notons, néanmoins, que l'encombrement stérique des groupements au pied de l'oxygène semble avoir un faible effet sur la diastéréosélectivité. En utilisant le catalyseur **95** qui a donné le meilleur excès diastéréoisomérique, le co-catalyseur a été modifié pour du 4,6-dinitropyrogallol **102**. Malgré la présence de deux groupements nitro susceptibles d'augmenter l'effet électroattracteur, aucune conversion n'a été observée (entrée **8**). De façon surprenante, l'utilisation du co-catalyseur **44** avec le catalyseur **95** a donné un excellent résultat avec une sélectivité améliorée ainsi qu'un temps de réaction diminué (entrée **9**). Avec ces résultats, il est possible de supposer un effet de synergie du couple catalyseur/co-catalyseur. L'utilisation de co-catalyseur plus électroattracteur, comme les dérivés **101** et **102**, n'a pas permis d'augmenter significativement la vitesse de réaction sur l'ensemble des catalyseurs testés. L'encombrement stérique du catalyseur a été augmenté en utilisant de l'éther de triéthylsilyldiphénylprolinol **97** ce qui n'a apporté aucune amélioration de la vitesse de réaction ni de la diastéréosélectivité (entrées **11** et **12**).

Finalement, le couple composé de l'éther de triméthylsilyldiphénylprolinol **95** et de l'ester éthylique de l'acide protocatechuique **44** se révèle être le meilleur compromis avec un temps de réaction d'une semaine et des excès diastéréoisomériques excellents de **93%** pour le (*S*)-citronellal et **95%** pour le (*R*)-citronellal.

La détermination des excès diastéréoisomériques a été réalisée par HPLC sur une colonne AD-H (4,6 mmx150 mm ; 5 μ m) dans un mélange heptane/EtOH de 99/1 (Figure 33).

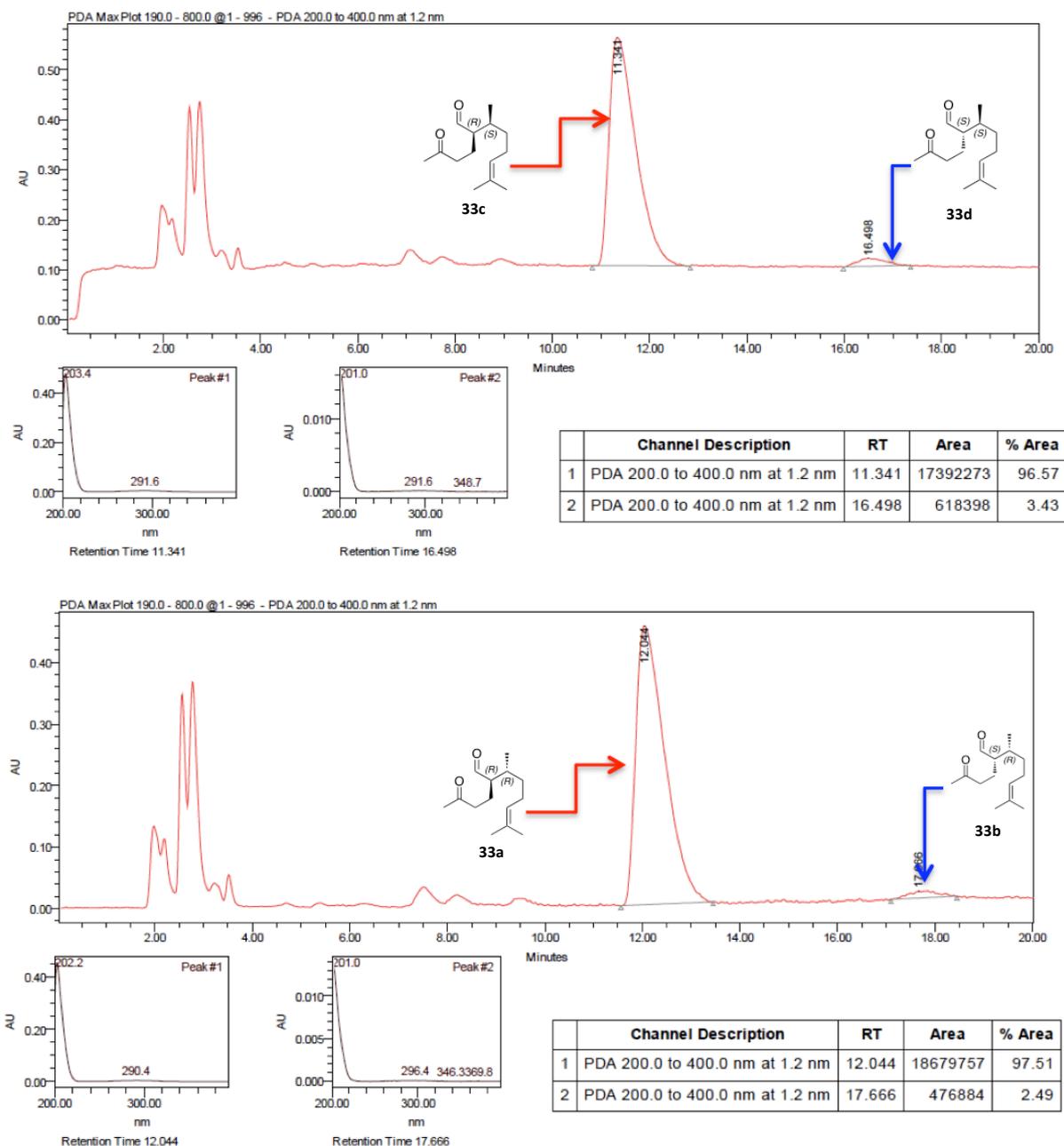


Figure 33 Détermination des excès diastéréoisomériques

Résumé : La réactivité et la sélectivité de l'addition 1,4 de Michael, étape clé de la synthèse des diénophiles, ont été améliorées. Après un criblage de conditions, une excellente sélectivité vis-à-vis des diastéréoisomères voulus (**93%** d'excès diastéréoisomérique pour le (*S*)-citronellal et **95%** d'excès pour le (*R*)-citronellal) a été obtenue et un temps de réaction bien meilleur a été observé (diminution du temps de réaction de 1 mois à 1 semaine). Néanmoins la séparation obtenue en conditions analytiques n'a jamais pu être transposée en une version préparative, c'est pourquoi nous avons continué avec le mélange des

diastéréoisomères pour la suite de la synthèse. Ceci n'est cependant pas gênant car l'excès diastéréoisomérique est excellent.

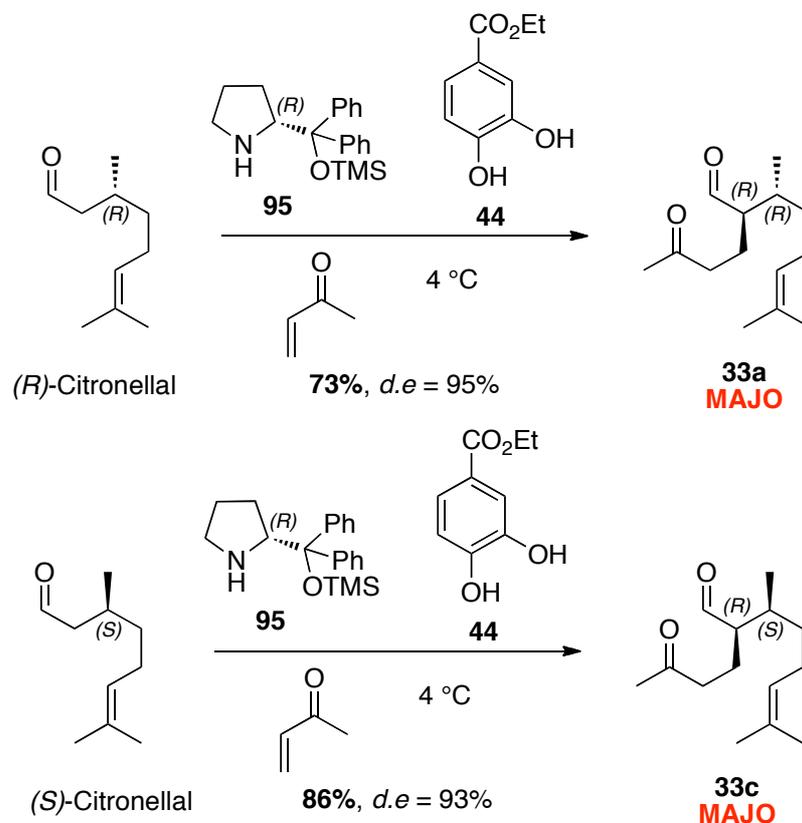


Schéma 33 Optimisation de l'addition de Michael

2.4 Aldolisation et crotonisation

2.4.1 Rappel bibliographique

Comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre, l'étape de crotonisation de l'annélation de Robinson s'est avérée épimérisante dans les conditions utilisées (2.1.1). De manière générale, celle-ci peut être catalysée soit par une base soit par un acide. Récemment l'équipe de Zhao a développé une annélation de Robinson dans des conditions acides.⁹³ Ils expliquent que la diamine **105** induit la diastéréosélectivité lors de l'addition de Michael et que l'introduction de l'acide 4-nitrobenzoïque augmente la vitesse de réaction et

⁹³ Hai-Feng C. ; Yang, Y-Q. ; Chai, Z. ; Li, P. ; Zheng, C-W. ; Zhu, S-Z. ; Zhao, G., *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 117-122

permet la crotonisation en cyclohexénone. Les temps de réactions sont courts (48 heures) et de bons excès ont été obtenus (dr 9:1, et *ee* = 99%). Cependant les fluoro-malonates (comme **103**) conduisent à des intermédiaires plus réactifs que notre cétyaldéhyde et ces conditions devraient être difficiles à utiliser dans notre cas (Schéma 34).

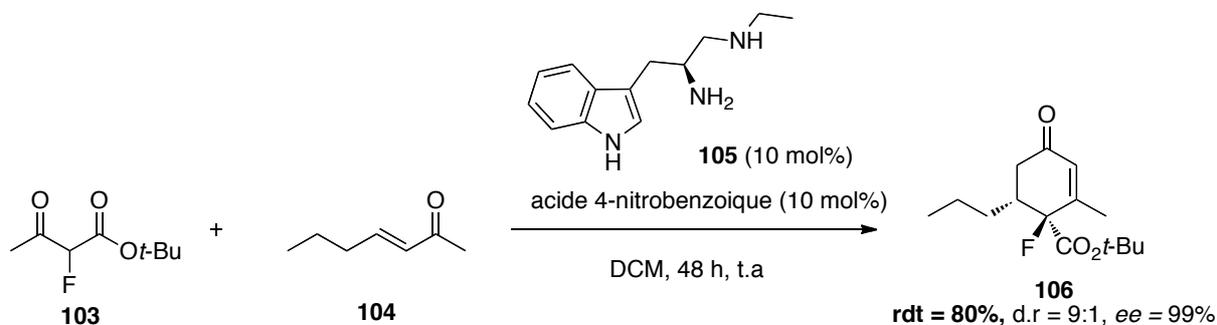
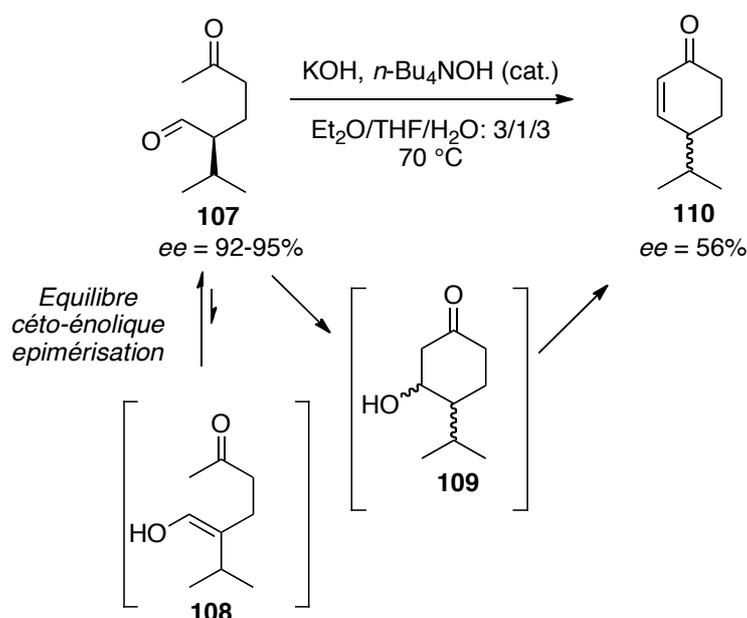


Schéma 34 Annélation de Robinson avec les conditions de Zhao

Dans sa synthèse d'eudesmanes, l'équipe de Baran, a observé une perte d'excès importante lors d'une crotonisation en utilisant les conditions employées par Nicolaou.⁹⁴ Ils expliquent cette perte d'excès énantiomérique (30%) par des conditions expérimentales trop drastiques (Schéma 35). En effet la présence d'une base assez forte peut entraîner une déprotonation épimerisante en α de l'aldéhyde (pour former le composé **108** en équilibre avec **107**) en compétition avec celle en α de la cétone (pour former le dérivé **109** qui conduit à **110**).

⁹⁴ Chen, K. ; Ishihara, Y. ; Moron Galan, M. ; Baran, P. S., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 4738-4744



Pour palier à ce problème, Baran a criblé différentes bases et solvants ainsi que différents partenaires facilitant l'élimination de l'hydroxyle comme le chlorure de mesyle. Des conditions acides ont également été testées. C'est l'utilisation de l'hydroxyde de lithium en quantité catalytique dans l'isopropanol à température ambiante qui a donné les meilleurs résultats.

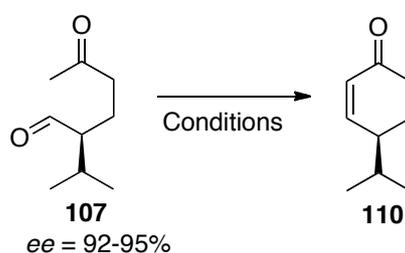


Tableau 4 Criblage des conditions d'aldolisation par Baran

Entrée	Conditions	Rdt/ee (%)
1	KOH, <i>n</i> -Bu ₄ NOH, THF/H ₂ O/Et ₂ O 50 °C 30 min	87/56
2	Pyridine, t.a, 12 h	Pas de réaction
3	LDA (1 éq), -78 °C, 30 min	Dégradation
4	Gel de silice, 50 °C, 12 h	Dégradation
5	DBU (1 éq), DCM, t.a ; MsCl (5 éq) NEt ₃ (10 éq), t.a, 1 h	75/34
6	TBAF (0,5 éq), ACN, t.a, 2 h ; puis MsCl, NEt ₃	34/0
7	LiOH (0,1 éq), THF/H ₂ O (3/1), 0 °C, 30 min ; puis MsCl, NEt ₃	78/74
8	LiOH (0,1 éq), MeOH 0 °C, 30 min ; puis MsCl, NEt ₃	71/80
9	LiOH (0,1 éq), <i>i</i> PrOH, t.a, 24H	71/89

2.4.2 Résultats personnels

Les mélanges de cétyaldéhydes **33a** et **33b**, puis **33c** et **33d** provenant de l'addition 1,4 de Michael optimisée, ont été mis en réaction en présence de lithine dans l'isopropanol pendant 24 heures. La diminution de la perte d'excès est notable. L'utilisation de ces conditions plus douces confirme que l'épimérisation provient de la base utilisée. L'hydroxyde de lithium semble induire plus rapidement la crotonisation que l'équilibre céto-énolique en α de l'aldéhyde. Les composés **34a-b** et **34c-d** ont alors été obtenus avec des excès diastéréoisomériques de **82%** et **81%** (Schéma 37).

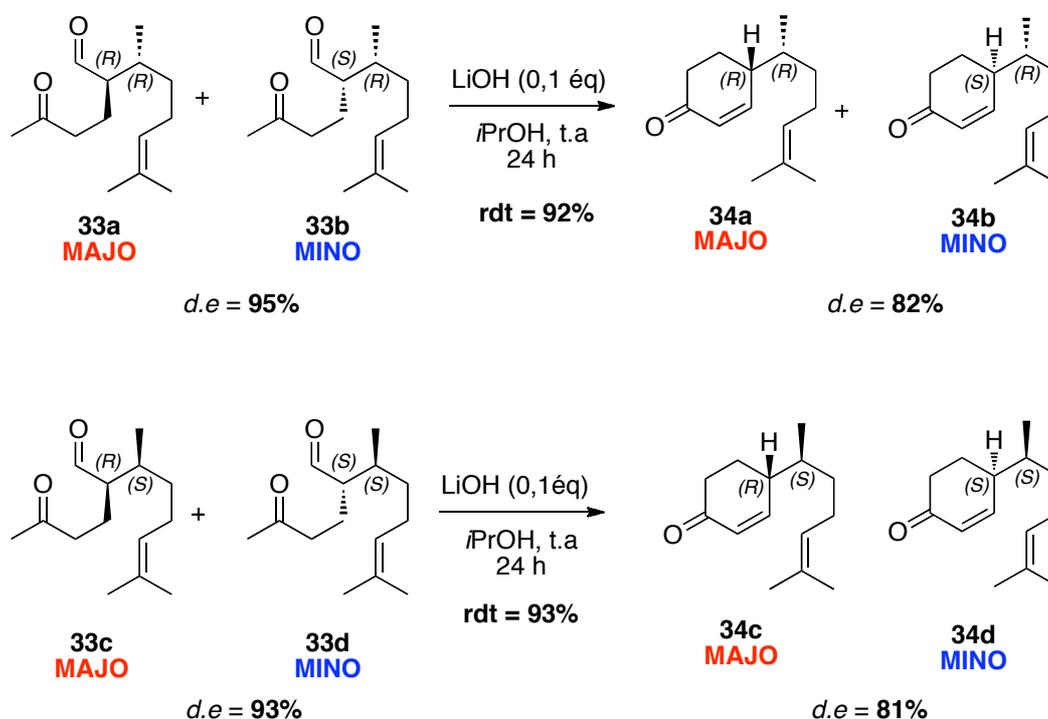


Schéma 37 Application des conditions de Baran à la synthèse des composés **33a-d**

Les rendements ont été améliorés et sont désormais de **92%** et **93%** pour les composés **34a-b** et **34c-d** respectivement. Il faut cependant purifier scrupuleusement les produits après l'étape d'addition de Michael car s'il reste de l'ester d'acide protocatechique, la réaction n'a pas lieu.

Les excès diastéréoisomériques ont été mesurés par HPLC sur colonne Hypercarb dans le méthanol (Figure 34).

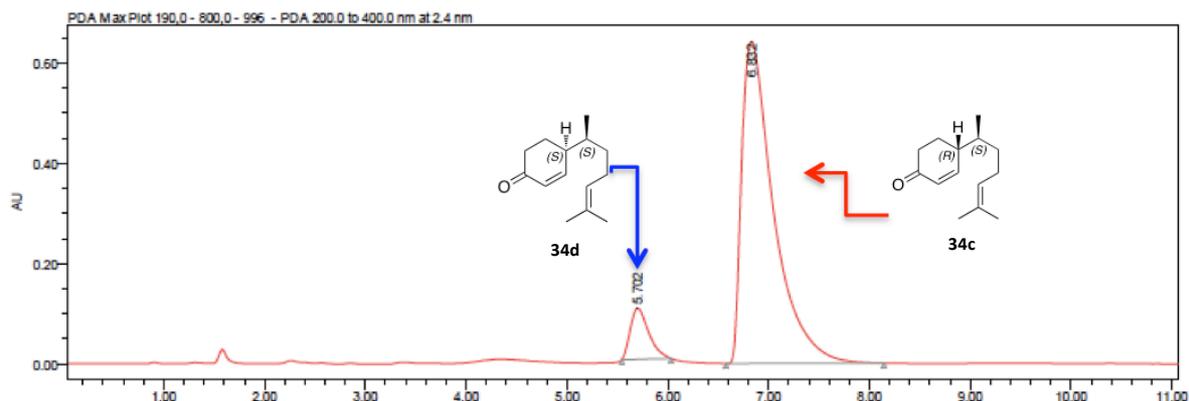


Figure 34 Mesure de l'excès diastéréosimérique des cyclohexenones 34

Il est à noter que malgré une séparation aisée en conditions analytiques, la séparation n'a jamais pu être transposée en version préparative, c'est pourquoi nous avons décidé de garder le mélange de diastéréoisomères jusqu'à la fin de la synthèse.

Résumé : La perte d'excès diastéréoisomérique observée lors de la synthèse des composés **34a-d** a pu être réduite en utilisant des conditions plus douces développées par l'équipe de Baran. La perte d'excès est désormais de **12** à **13%**. Les cyclohexenones **33** sont désormais obtenues avec d'excellents rendements (**92%** et **93%**). La sélectivité de l'annélation de Robinson se fait en faveur des diastéréoisomères conduisant aux produits actifs avec des excès diastéréoisomériques de **82%** et **81%**.

2.5 Fin de la synthèse des diénophiles

Après avoir mis au point l'annélation de Robinson, les composés **34a-d** ont été transformés en éthers d'énols trifliques **45a-d** puis carbonylés en acides **17a-d** (Schéma 38).

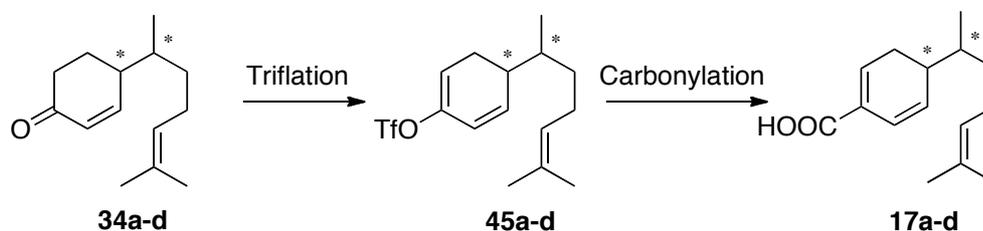


Schéma 38

2.5.1 Formation des éthers d'énols trifliques

Les intermédiaires triflates sont, depuis des années, des composés extrêmement utilisés pour homologuer des cétones en acides carboxyliques, esters ou amides α,β insaturés grâce à des couplages organométalliques.⁹⁵ Ces intermédiaires sont obtenus par piégeage d'énolates par de l'anhydride triflique **111**, le réactif de Murray **112** (*N*-(2-pyridyl)triflimide) ou le réactif de Comins **113** (*N*-(5-chloro-2-pyridyl)triflimide)⁹⁶ (Figure 35). Les énolates sont en général formés en utilisant des bases fortes de type LDA, NaHMDS ou LiHMDS.⁹⁷

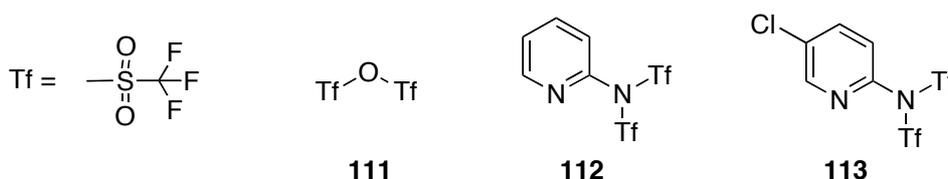


Figure 35 Donneurs de groupements triflates couramment utilisés

Le réactif de Comins **113** a été utilisé pour effectuer cette réaction par analogie avec les résultats antérieurs du laboratoire. Cependant, la quantité de réactif a été ajustée à 1,5 équivalents au lieu de 2,5, car celui-ci est très onéreux, sans répercussion sur les rendements de réaction (**91%** et **93%** respectivement).

⁹⁵ Cacchi, S. ; Morera, E. ; Ortar, G., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1109-1112

⁹⁶ Foti, C. J. ; Comins, D. L., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2656-2657

⁹⁷ Comins, D. L. ; Dehghani, A., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 6299-6302

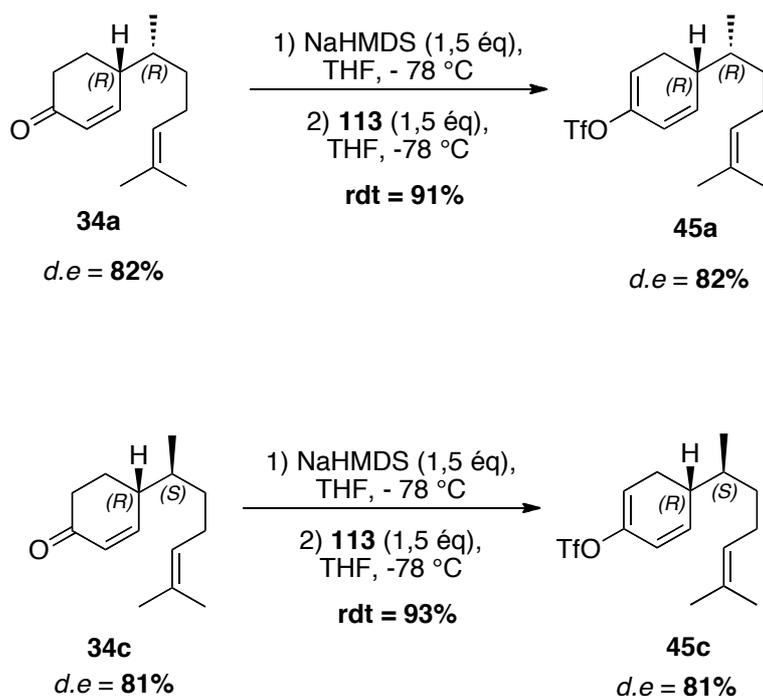


Schéma 39 Formation des triflates **45**

2.5.2 Formation des acides carboxyliques

L'étape finale de la synthèse des diénophiles consiste à transformer les composés triflates **45** en acides carboxyliques grâce à un couplage pallado-catalysé. La réaction de carbonylation est connue depuis une vingtaine d'années.⁹⁸ En présence d'acétate de palladium ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$) en quantité catalytique, de triphénylphosphine (PPh_3) et d'acétate de potassium (AcOK) dans le DMF, les éthers d'énols trifliques **34** sont transformés en acides carboxyliques **45** sous atmosphère de monoxyde de carbone en deux heures. Dans la synthèse de la meiogynine A **2**, cette réaction a conduit aux diénophiles acides avec des rendements compris entre **78** et **85%**.

Le monoxyde de carbone est un gaz toxique, son utilisation nécessite une logistique importante (détecteur de CO, étanchéité totale du système, bouteille de gaz...). C'est pourquoi nous avons tenté de le remplacer par du molybdène hexacarbonyle ($\text{Mo}(\text{CO})_6$) qui

⁹⁸ Freskos, J. N. ; Laneman, S. A. ; Reilly, M. L. ; Ripin, D. H., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 835-838

est décrit pour permettre la libération de molécule de CO au sein du milieu réactionnel.⁹⁹ Le comparatif des deux méthodes est présenté dans le Tableau 5.

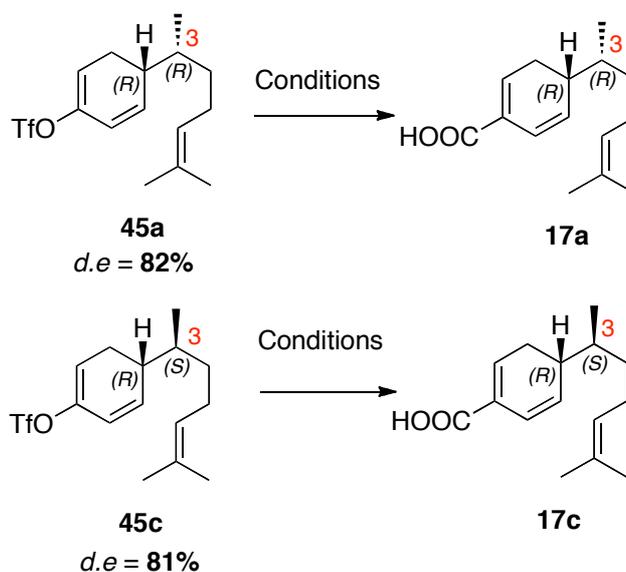


Tableau 5 Criblage des conditions de carbonylation

Entrée	C3	Conditions	Rendement (%)
1	R	Pd(OAc) ₂ , PPh ₃ , AcOK, DMF, Mo(CO) ₆ , t.a	48
2	S	Pd(OAc) ₂ , dpp, AcOK, THF, Mo(CO) ₆ , 80 °C	Traces
3	S	Pd(OAc) ₂ , dpp, AcOK, THF, Mo(CO) ₆ , 80 °C (M.W)	45
4	R	Pd(OAc) ₂ , dpp, AcOK, THF, Mo(CO) ₆ , 80 °C (M.W)	/
5	R	Pd(OAc) ₂ , PPh ₃ , AcOK, DMF, CO, t.a	78%
6	S	Pd(OAc) ₂ , PPh ₃ , AcOK, DMF, CO, t.a	85%

Les conditions décrites par Marradi (entrée **1**) conduisent à des rendements de réaction moyens. De plus, la formation du produit **17** aromatisé a été observée (Figure 36). Le ligand a alors été remplacé par de la 2,3-di(2-pyridyl)pyrazine (dpp) (entrées **2-4**). L'insertion du CO a été forcée en augmentant la température. Cependant les chauffages classiques ou par micro ondes n'ont pas permis d'apporter une meilleure insertion du monoxyde de carbone. En utilisant du monoxyde de carbone sous forme gazeuse, (entrées **5** et **6**), les diénophiles ont été obtenus avec un rendement de **78%** et **85%** respectivement.

⁹⁹ Marradi, M., *Synlett*, **2005**, 7, 1195-1196

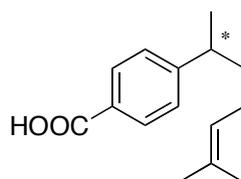


Figure 36 Composé 17 aromatique

Le mécanisme proposé pour cette réaction est classique (Schéma 41).¹⁰⁰ Après un échange de ligand, l'acétate de palladium formerait le complexe I qui subirait une addition oxydante sur les composés 45 par coordination au triflate. Le complexe II obtenu serait soumis à une carbonylation par insertion d'une molécule de CO entre le palladium et le reste de la molécule pour former le complexe III. Grâce à un échange de ligands celui-ci se transformerait en complexe IV. L'élimination réductrice finale libérerait un anhydride qui après hydrolyse donnerait le composé 17.

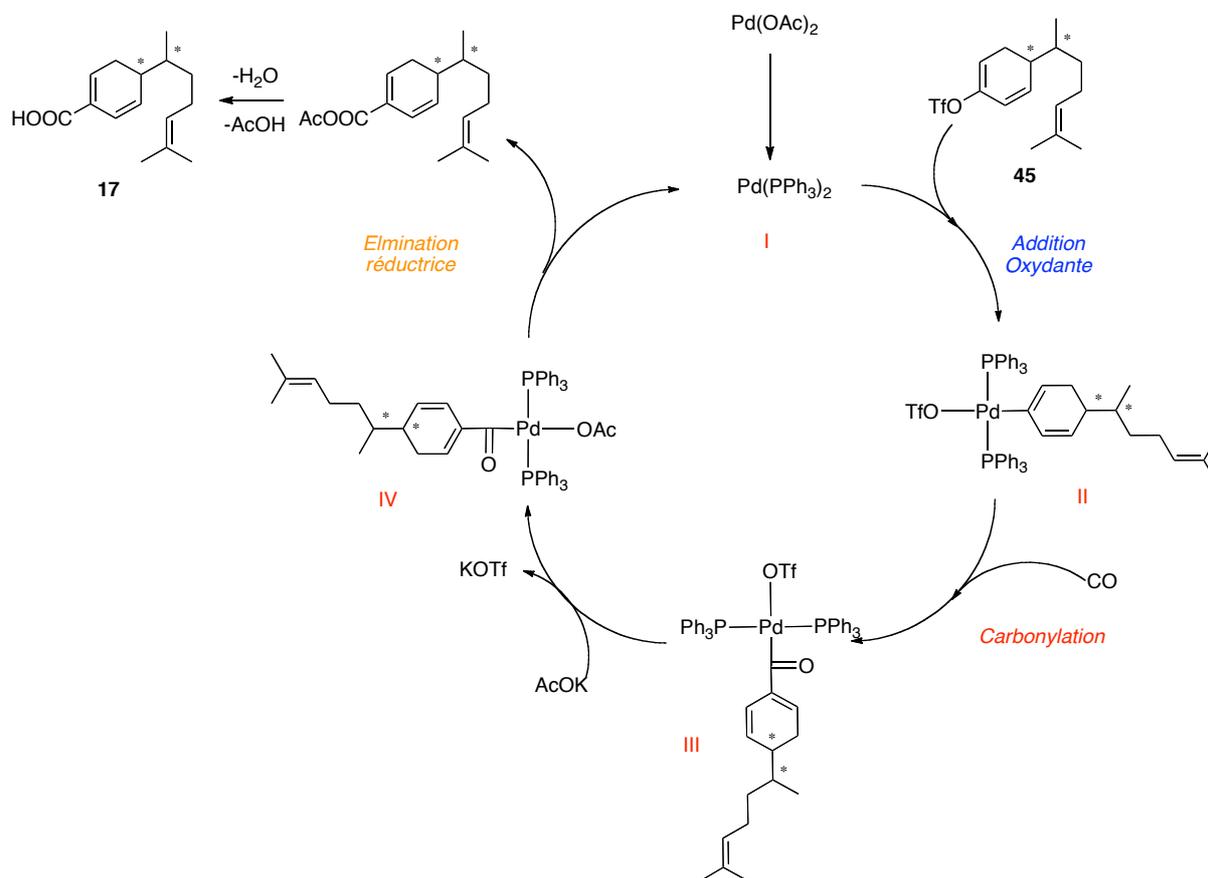


Schéma 41 Cycle catalytique de la carbonylation

¹⁰⁰ Cacchi, S. ; Lupi, A., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 3939-3942

Les composés **17a-b** et **17c-d** peuvent être séparés par HPLC préparative en utilisant une colonne Hypercarb. Cependant cette méthode est très fastidieuse, non automatisable et très « chronophage ». En effet, la présence des acides carboxyliques sur la molécule entraîne des effets de charge lors des injections d'HPLC. Cela se traduit par une accumulation des composés sur la colonne ce qui diminue la qualité de la séparation.

Tableau 6 Rendement massique des séparations sur HPLC préparative

Entrée	Composés	Conditions	Rendement massique (%)
1	17a-b	Hypercarb (semi préparative), MeOH/H ₂ O (95/5) +0,1% acide formique	13%
2	17c-d	Hypercarb (semi préparative), MeOH/H ₂ O (95/5) +0,1% acide formique	11%

Comme les diénophiles ont été obtenus avec de bons excès diastéréoisomériques, nous avons décidé de nous affranchir de leur séparation et de réaliser les réactions de Diels-Alder sur le mélange.

2.6 Conclusion et perspectives

Nous avons pour objectif d'améliorer la diastéréosélectivité des deux étapes clés de la synthèse diénophiles :

- améliorer le *ratio* entre les produits majoritaires et les produits minoritaires,
- changer la sélectivité pour obtenir les diastéréoisomères conduisant aux produits actifs,
- diminuer la perte d'excès lors de la crotonisation.

Pour cela différentes conditions pour l'addition 1,4 de Michael et pour la crotonisation ont été criblées. Les diastéréoisomères désirés ont été obtenus avec d'excellents excès, une cinétique de réaction et des rendements améliorés. En utilisant des conditions plus douces pour la crotonisation, la perte d'excès diastéréoisomérique a pu être minimisée. Les deux dernières étapes de la synthèse ont conduit aux diénophiles **17** avec de bons rendements. Finalement, à partir du (*R*)-citronellal, le diénophile **17a** a été obtenu en 4 étapes avec un rendement global de **48%** et un excès diastéréoisomérique de **82%**. Dans le cas du (*S*)-

citronellal, le diénophile **17c** a été obtenu avec un rendement de **63%** et un excès de **81%** (Schéma 42).

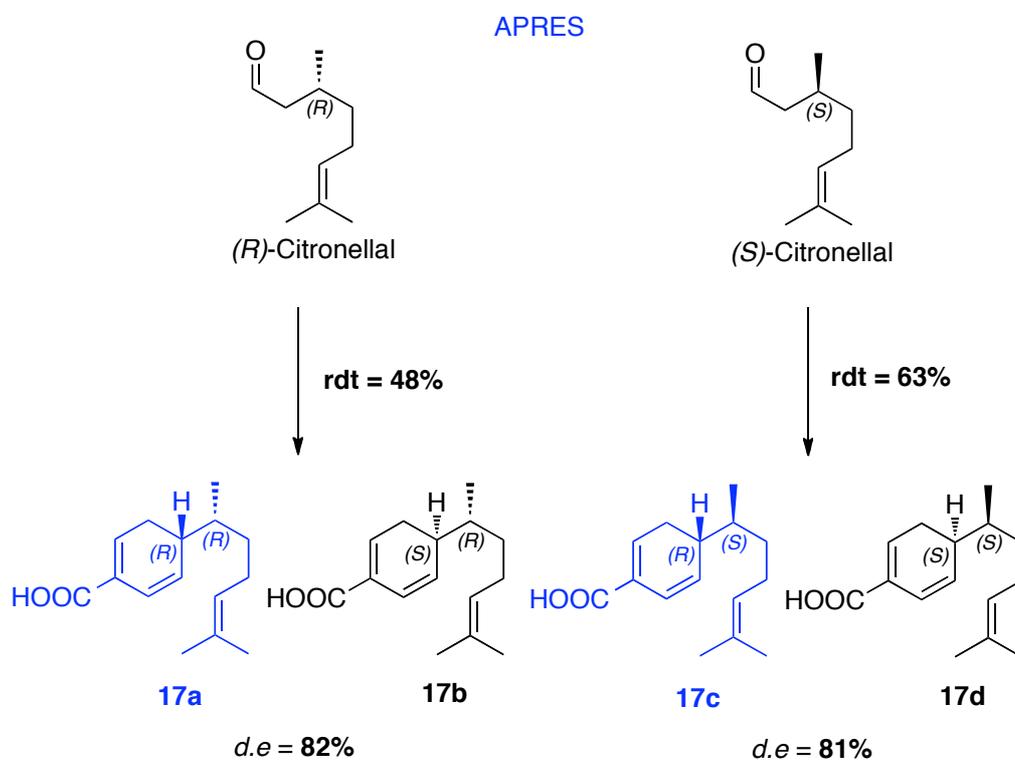
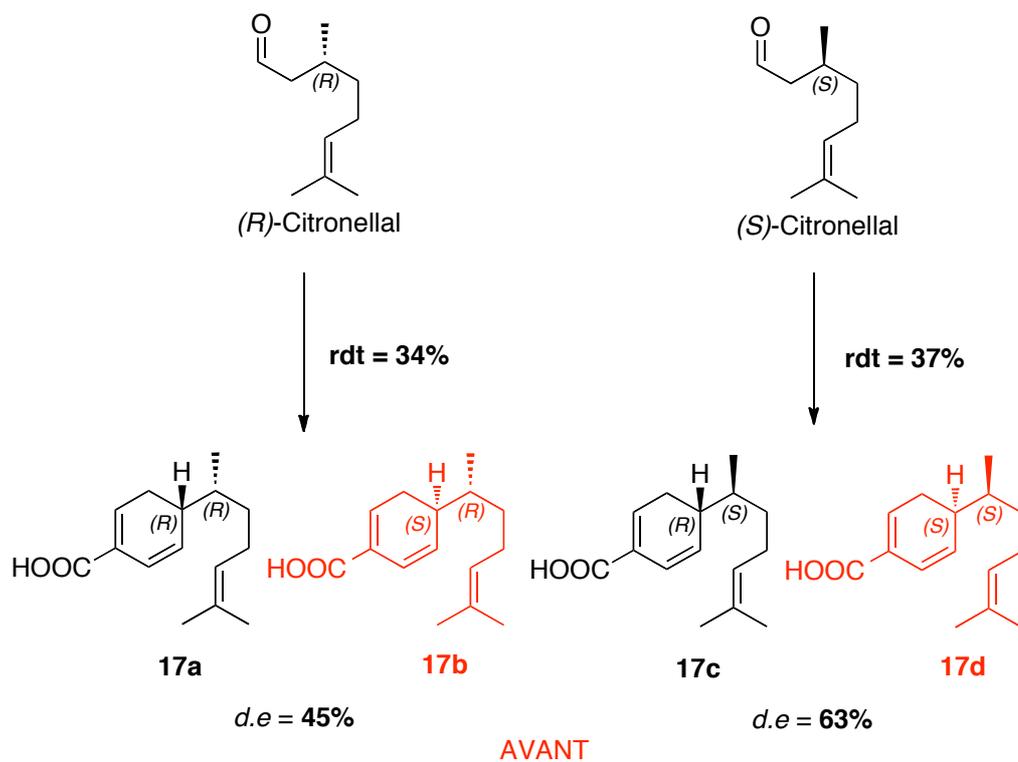


Schéma 42

Chapitre 3

3 Synthèse de triènes et modification de la partie Sud

3.1 Synthèse du triène de la meiogynine A

3.1.1 Introduction

L'un des objectifs de ces travaux de thèse est d'établir les relations structure-activité entre les dérivés de la meiogynine A **2** et les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Pour cela, la modification de la partie Sud de la meiogynine A **2** a été envisagée, afin d'étudier les effets sur l'affinité envers de la protéine. La synthèse de la meiogynine A **2**, précédemment présentée, repose sur une réaction de Diels-Alder utilisant deux partenaires, le triène **16** et un diénophile. La synthèse des diénophiles a été améliorée et est désormais efficace. Le triène **16** va être le synthon clé pour moduler la partie Sud de la meiogynine A **2** (Schéma 43).

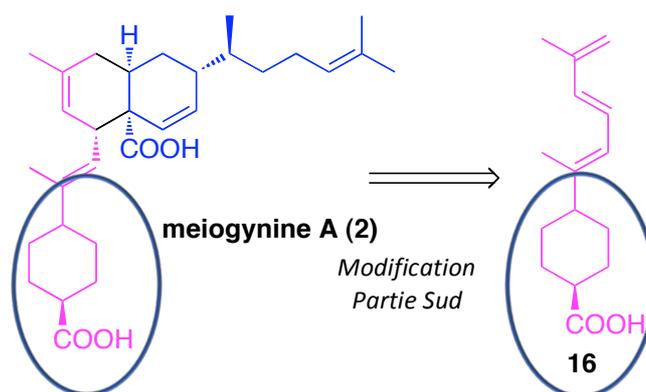


Schéma 43

3.1.2 Résultats antérieurs

La synthèse des précurseurs triène **16** repose sur l'obtention d'un alcyne clé **115** à partir du dérivé **114**, puis sa transformation en triène de configuration *E,E* comportant une double liaison tri-substituée (Schéma 44).

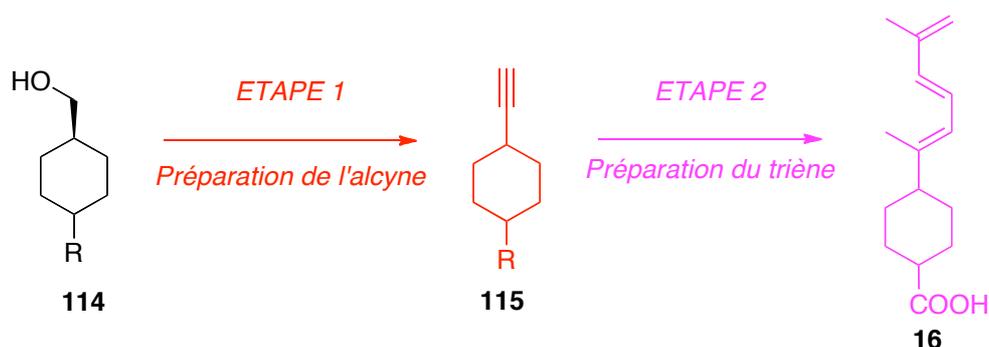


Schéma 44 Principe de formation et de préparation du triène

La synthèse a débuté par la monoprotection¹⁰¹ et la monooxydation¹⁰² du diol commercial **116** conduisant au composé **117** avec un rendement de 40% sur deux étapes. Celui-ci a été mis en réaction avec le réactif de Bestmann-Ohira **118**¹⁰³ pour donner l'alcyne **119** correspondant (Schéma 45).

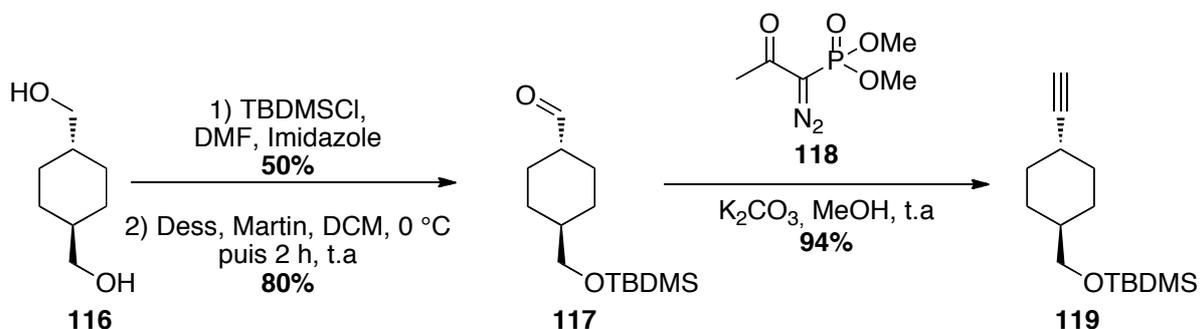


Schéma 45 Préparation du composé **119**

Le triène **16** a été formé en deux étapes par une carboalumination de Negishi (permettant de former la première double liaison trisubstituée majoritairement de configuration *E*) et un couplage de Suzuki (Schéma 46).

¹⁰¹ Rieger, J. M.; Brown, M. L.; Sullivan, G. W.; Linden, J.; Macdonald, T. L., *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 531–539

¹⁰² Dess, D. B.; Martin J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277–7287

¹⁰³ Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J., *Synlett*, **1996**, *6*, 521–522

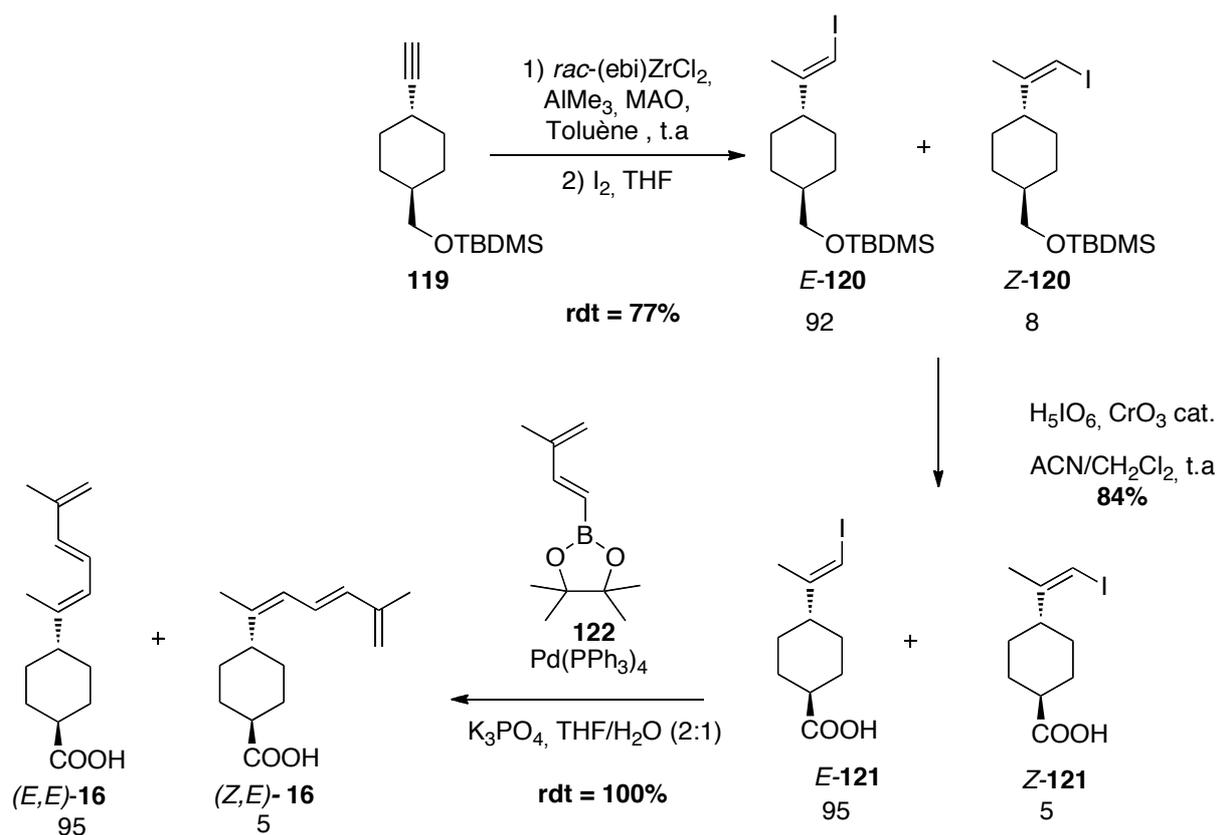


Schéma 46 Passage de l'alcyne **119** au triène cible **16**

Pour la carboalumination de Negishi, les conditions de Lipshutz ont été appliquées à l'alcyne **119**. Le diiode a été utilisé comme électrophile conduisant à la formation du vinyle iodé **120** avec une régiosélectivité de 92:8 en faveur du régioisomère *E*.

Le mélange de composés **120** a ensuite été oxydé.¹⁰⁴ Une réaction monotope a permis de déprotéger et d'oxyder l'hydroxyle conduisant à l'acide **121** avec un rendement de **84%** en présence d'acide périodique (H₅IO₆) et d'une quantité catalytique de chrome. Un enrichissement du ratio entre les isomères a été observé lors de la purification (95:5).

Un couplage de Suzuki a été réalisé entre l'alcène **121** et un ester boronique **122** obtenu en une étape. Plusieurs conditions ont été criblées en modifiant la base, les solvants et la température. Le composé (*E,E*)-**16** a été obtenu avec un rendement quantitatif. Le problème majeur rencontré avec ce composé est sa stabilité. En effet, il est photosensible et se dégrade très rapidement. Les réactions de Diels-Alder pour l'obtention des composés décaliniques doivent être réalisées dans les heures suivant la réaction.

¹⁰⁴ Zhang, S. ; Xu, L. ; Trudell, M. L., *Synthesis*, **2005**, *11*, 1757-1760

3.2 Synthèse de triènes aromatiques

3.2.1 Objectifs

L'introduction d'un cycle aromatique à la place du cyclohexyle sur la partie Sud de la molécule a été envisagée afin d'effectuer une première pharmacomodulation de la meiogynine A **2**. En effet, celle-ci nous permettrait de compléter les débuts de relation structure activité (1.2.3.3) et d'étudier son influence sur le comportement des analogues de la meiogynine A **2** vis-à-vis des protéines Bcl-xL et Mcl-1. De plus, si l'analogue aromatique peut être synthétisé par la même voie que la meiogynine A **2**, le triène aromatique dont il est issu devrait être plus stable que le triène **16**. Enfin, le cycle aromatique pourrait être fonctionnalisé par différents groupements. Ceux-ci permettraient de modifier les caractéristiques physico-chimiques de la molécule par rapport à la meiogynine A **2** (log P = 7.17).

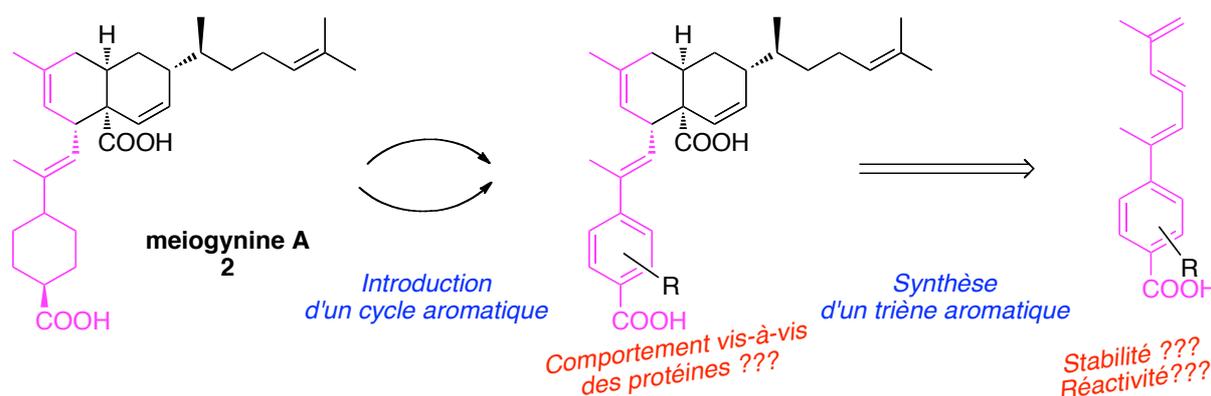


Schéma 47 Première modulation de la partie Sud de la meiogynine A **2** par l'introduction d'un cycle aromatique

La fonctionnalisation du cycle aromatique des analogues de la meiogynine A **2** peut se faire:

- dès le début de synthèse, nous verrons que cette voie ne fonctionne pas malgré l'ensemble de nos essais (Schéma 48).

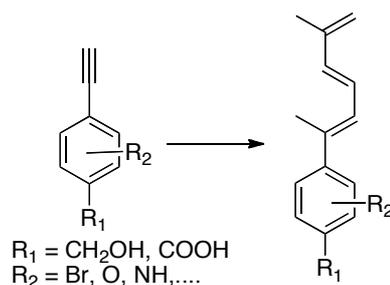


Schéma 48 Utilisation d'alcynes fonctionnalisés pour l'obtention de triènes aromatiques

- sur la molécule cible par introduction d'un atome brome sur le cycle aromatique puis un couplage de Suzuki. Il existe en effet, quelques exemples dans la littérature de ce type de réactions.^{105,106,107,108}

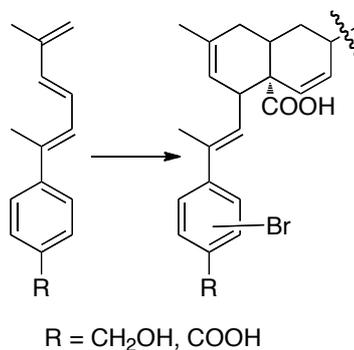


Schéma 49 Introduction de groupements sur les molécules cibles

3.2.2 Triènes aromatiques simples porteurs d'une fonction alcool ou acide

Afin de synthétiser un premier analogue aromatique simple de la meiogynine A **2**, nous avons élaboré, dans un premier temps les triènes aromatiques **123** et **124**. Ceux-ci pourraient, à priori, être obtenus de trois manières différentes *via* une réaction de Wittig,¹⁰⁹ de Takai¹¹⁰ ou de Negishi à partir des composés **126** ou **127** pour former le précurseur **125** (Schéma 50).

¹⁰⁵ Bennett, C. J. ; Caldwell, S. T. ; McPhail, D. B. ; Morrice, P. B. ; Duthie, G. G. ; Hartley, R. C., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 2079–2098

¹⁰⁶ Bringmann, G. ; Holenz, J. ; Weirich, R. ; Rübenacker, M. ; Funke, C. ; Boyd, M. R. ; Gulakowski, R. J. ; François, G., *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 497-512

¹⁰⁷ Mei, T. S. ; Giri, R. ; Mangel, N. ; Yu, J. Q., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 5215-5219

¹⁰⁸ Ooi, T. ; Uematsu, Y. ; Maruoka, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 2548-2549

¹⁰⁹ Schachtschabel, D. ; Boland, W., *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 1366-1372

¹¹⁰ Takai, K. ; Nitta, K. ; Utimoto, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 7408-7410

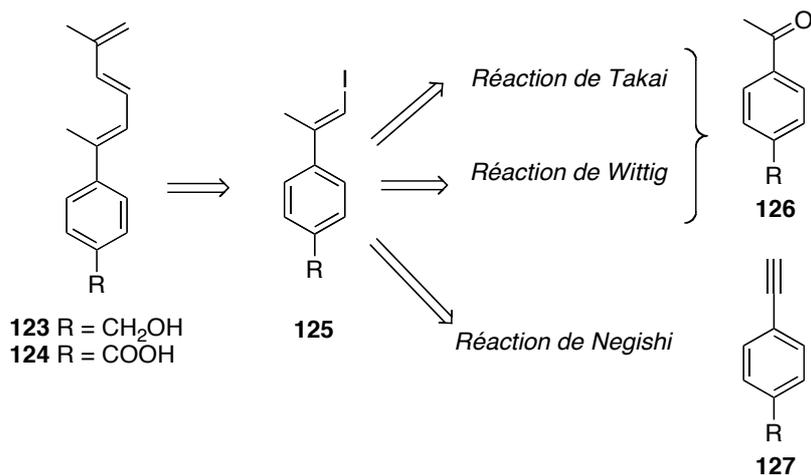


Schéma 50 Obtention du précurseur **125**

Les deux premières réactions ont été testées pendant la synthèse de la meiogynine A. La réaction de Wittig conduit au composé **129a** à partir de **128** avec un bon rendement mais une sélectivité *E/Z* moyenne de 60/40. La réaction de Takai n'a, quant à elle, pas permis d'obtenir **129b**. Néanmoins il est connu que pour ce type de réaction, les ratios *E/Z* sont en général compris entre 50/50 et 80/20 (Schéma 51).

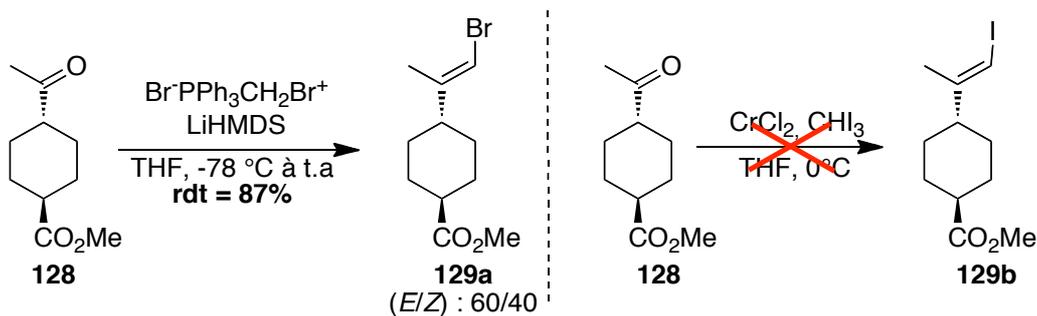


Schéma 51 Tentative d'obtention de vinyle halogéné par réaction de Wittig et Takai

C'est la raison pour laquelle, la réaction de Negishi avec l'alcool 4-éthynylbenzylique **130** a été choisie (Schéma 52).

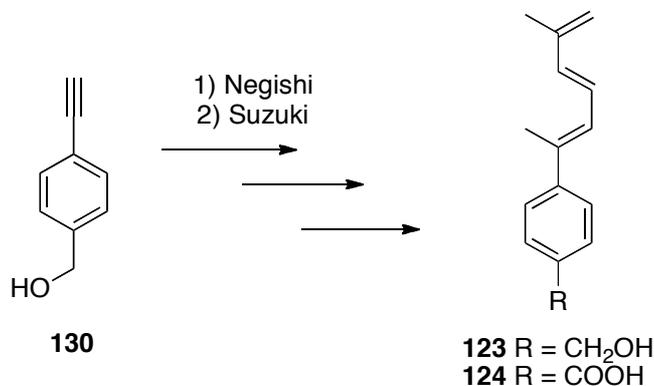


Schéma 52

3.2.2.1 Rappel bibliographique : la carboalumination de Negishi

L'équipe de Negishi a développé une réaction qui permet à partir d'un alcyne, d'obtenir aisément et régiosélectivement des vinyl halogénés en utilisant un alkyl d'aluminium en présence d'un catalyseur au zirconium (Schéma 53).^{111,112,113,114,115}

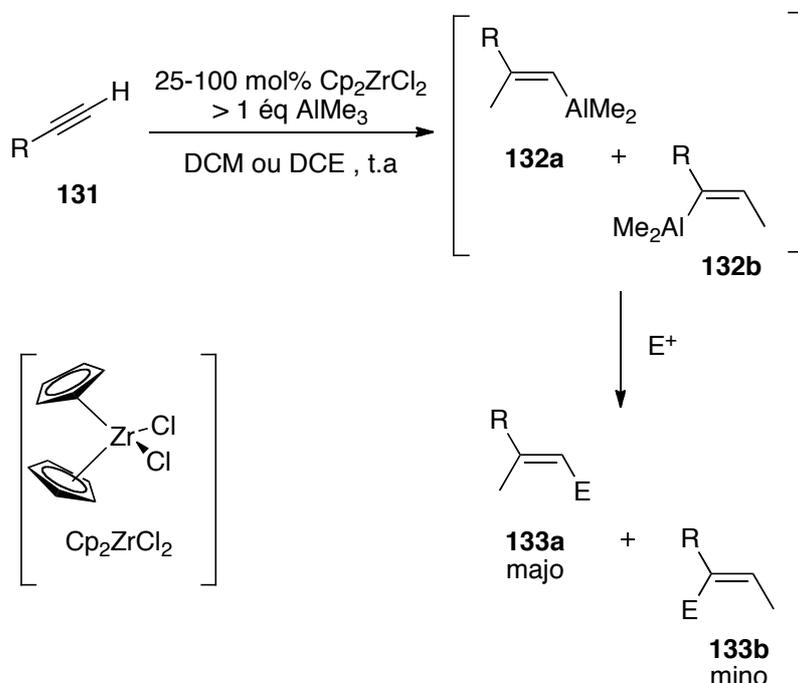


Schéma 53 Carboalumination classique de Negishi

Les alcynes **131** sont transformés en vinylalane en présence de dichlorure de zirconocène (Cp₂ZrCl₂) et de triméthylaluminium par *cis*-addition de ce dernier sur un acétylène (généralement terminal). Cette addition conduit majoritairement au *E*-vinylalane (**132a**). Par la suite, l'attaque d'un électrophile permet d'obtenir les alcènes **133a** et **133b**.

Plus récemment l'équipe de Wipf a amélioré la réactivité du couple triméthylaluminium/Zr en introduisant de l'eau au sein du mélange réactionnel.^{116,117,118} L'eau forme, par hydrolyse du triméthylaluminium, le méthylaluminoxane (MAO) *in situ*. La

¹¹¹ Xu, Z. ; Rao, H. ; Wang, G. ; Negishi, E. ; *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 3151-3182

¹¹² Van Horn, D. E. ; Negishi, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 2252-2254

¹¹³ Yoshida, T. ; Negishi, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 4985-4987

¹¹⁴ Negishi, E., *Chem. Scr.*, **1989**, 29, 457-459

¹¹⁵ Negishi, E. ; Takahashi, T., *Acc. Chem. Res.*, **1994**, 27, 124-130

¹¹⁶ Wipf, P. ; Lim, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, 1068-1071

¹¹⁷ Rebe, S. ; Wipf, R., *Chem. Commun.*, **2001**, 2, 299-307

¹¹⁸ Wipf, P. ; Nunes, R. L. ; Rebe, S., *Helv. Chim. Acta.*, **2002**, 85, 3478-3488

quantité de catalyseur au zirconium (5%) a ainsi pu être diminuée et les réactions ont pu être effectuées à plus basse température (-78 °C). Le rôle exact du MAO reste cependant inconnu. L'équipe de Lipshutz a optimisé cette réaction en la réalisant à température ambiante en présence de MAO et du catalyseur de Brintzinger (*rac*-(*ebi*)ZrCl₂) dans le toluène (Schéma 54).¹¹⁹

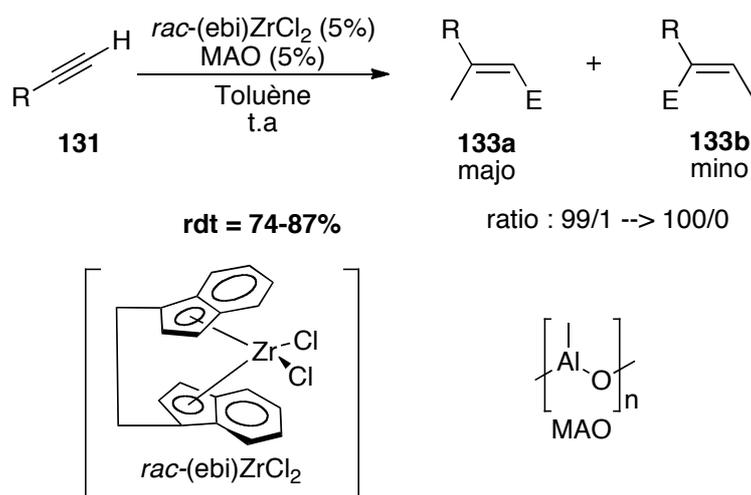


Schéma 54 Conditions de Lipshutz appliquées à la carboalumination de Negishi

La réaction est extrêmement stéréosélective (>98%) et régiosélective (>95%) en faveur de la formation des vinylalanes *E*. Bien que cette réaction soit généralement « substrat dépendante », elle a été utilisée dans de nombreuses synthèses totales (Schéma 55).^{120,121,122,123} Cependant sa mise en œuvre est difficile et le résultat est très sensible aux conditions de réaction.

¹¹⁹ Lower, A. ; Butler, T. ; Lipshutz, B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 15396-15398

¹²⁰ Negishi, E. ; King, A. O. ; Klima, W. L., Patterson, W. ; Silveira Jr., A., *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 2526-2528

¹²¹ Dirat, O. ; Kouklovsky, C. ; Langlois, Y., *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 6634-6642

¹²² Pitsinos, E. ; Athinaios, N. ; Xu, Z. ; Wang, G. ; Negishi, E., *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 2200-2202

¹²³ Amorelli, B. ; Lipshutz, B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 1396-1397

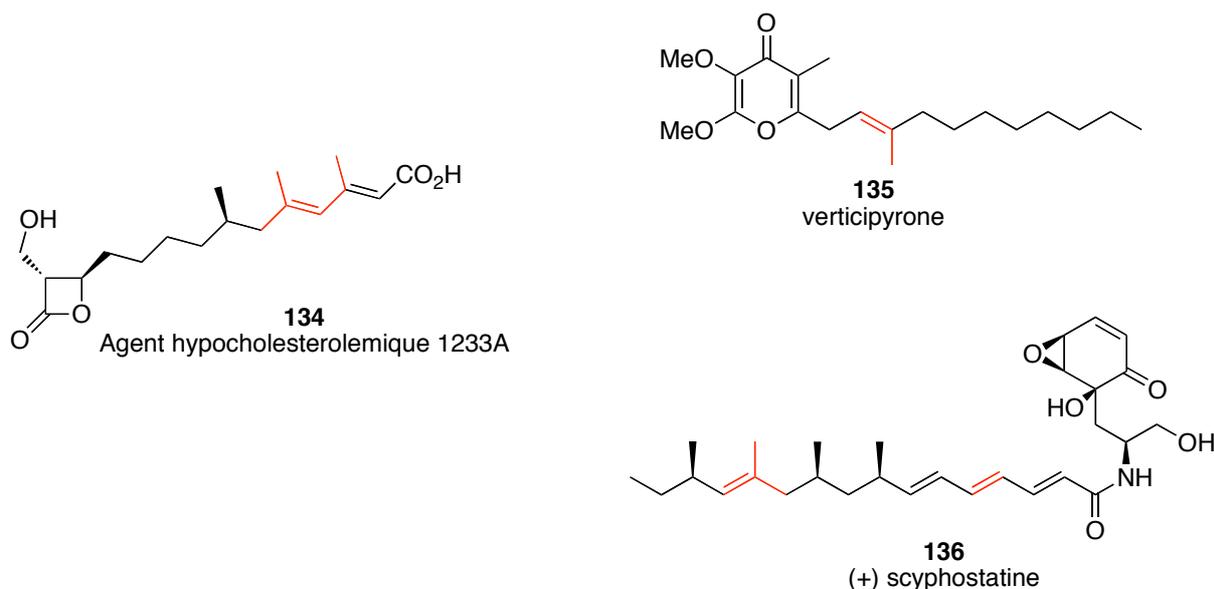


Schéma 55 Exemples de produits naturels (**134**,¹²¹ **135**,¹²³ **136**¹²²) dont la synthèse totale met en œuvre la réaction de Negishi pour former des oléfines (en rouge)

Le mécanisme de cette réaction proposé par Negishi en 1985¹²⁴ a été confirmé par Lipshutz. Le catalyseur au zirconium et le triméthylaluminium forment un complexe **I** par échange de ligands. Celui-ci va pouvoir, grâce à une orbitale vacante, capter l'alcyne et le rentrer dans sa sphère de coordination (**II**). L'étape **III** est déterminante pour la régiochimie, l'approche du triméthylaluminium se faisant par contrôle stérique. Les groupements portés par le zirconium vont permettre d'augmenter la gêne stérique et d'orienter l'approche du triméthylaluminium favorisant ainsi l'addition *cis*.

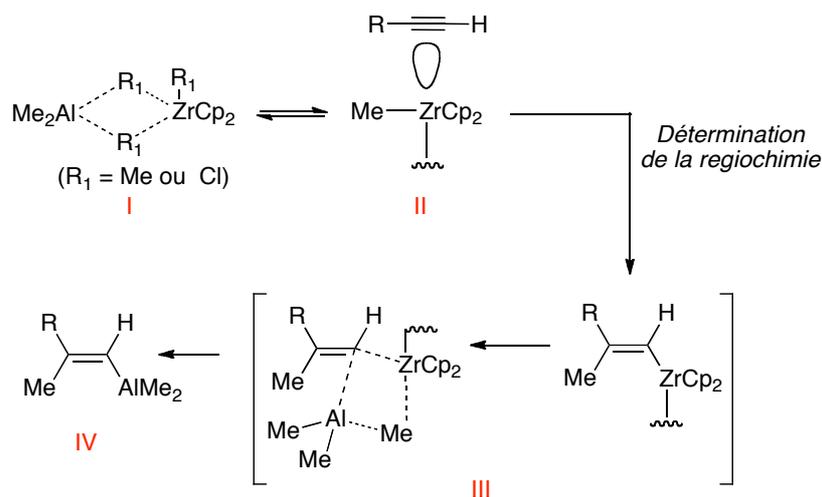


Schéma 56 Mécanisme de la carboaluminium proposé par Negishi

¹²⁴ Negishi, E. ; Van Horn, D. E. ; Yoshida, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6639-6647

3.2.2.2 Mise au point de la réaction de Negishi

Comme nous l'avons vu, la réaction de Negishi permet en une étape d'obtenir un intermédiaire vinyle iodé de configuration *E* comportant toutes les motifs désirées (méthyle, aromatique et halogène).

Dans un premier temps, l'alcyne **130** a été mis en réaction en présence du catalyseur de Brintzinger, de triméthylaluminium et de MAO dans le toluène à température ambiante pendant une journée. A -30 °C, du diiode a été ajouté et le mélange réactionnel a été agité pendant deux heures à 0 °C. Le vinyle iodé *E*-**137** a ainsi pu être obtenu (Schéma 57). Cependant la formation de 22% du vinyle iodé *Z*-**137** et de 22% de dérivé **138** a été observée (proportions évaluées par intégration des protons caractéristiques de chaque composé sur le spectre RMN ¹H du brut réactionnel Figure 37). La présence du composé **138** peut s'expliquer par l'hydrolyse de l'intermédiaire vinylalane, ce que signifie que deux heures d'agitation ne permettent pas une addition complète de l'électrophile.

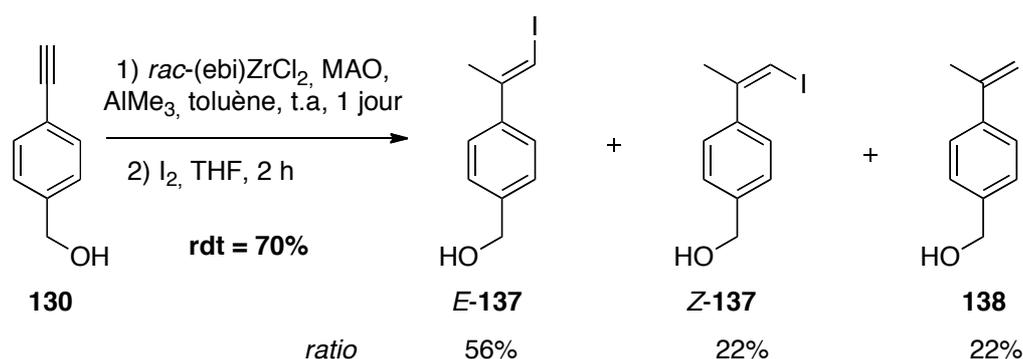


Schéma 57 Premier essai de couplage de Negishi sur **130**

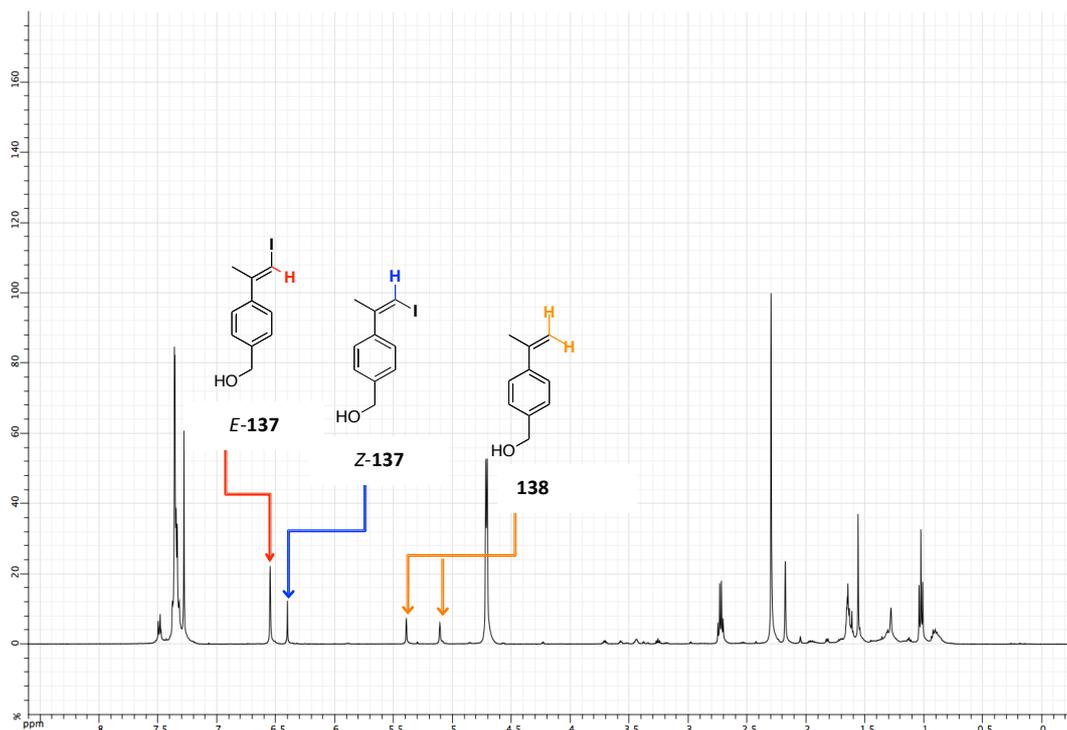


Figure 37 Evaluation des proportions de *E*-137/*Z*-137/138 par intégration des signaux en RMN du proton

La carboalumination de Negishi est connue pour être une réaction très « substrat dépendante » et très sensible. Ainsi, par exemple le vinyl iodé **140** décrit par Kouklovsky *et coll*¹²⁰ n'est obtenu qu'en utilisant du triméthylaluminium pur (dont l'utilisation est très difficile car il est extrêmement pyrophorique) alors que des solutions de triméthylaluminium dans le toluène donnent de très mauvais rendements. De plus le diiode est ajouté dans l'obscurité (Schéma 58).

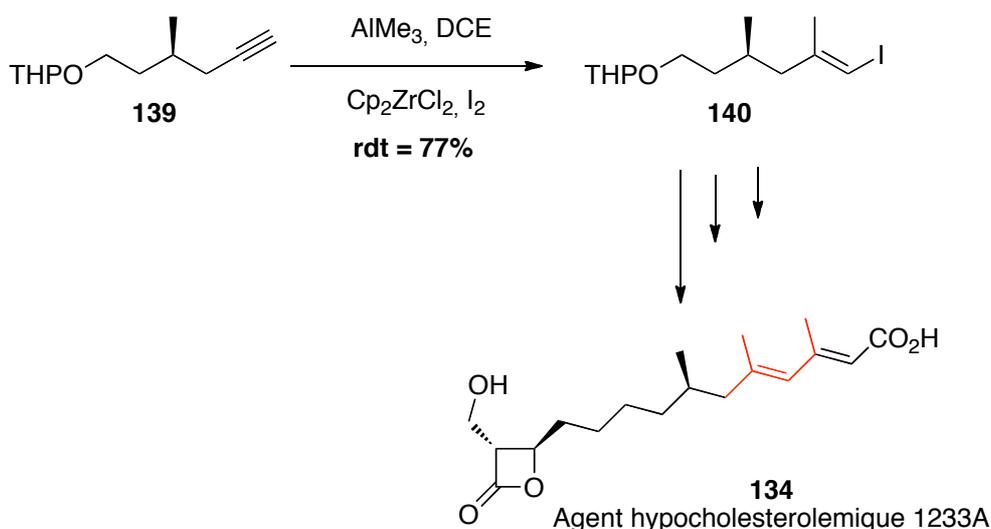


Schéma 58 La carboalumination de Negishi utilisée par Kouklovsky *et coll*

Dans notre cas, la réaction n'est possible qu'en utilisant du triméthylaluminium et du MAO parfaitement anhydres. L'utilisation de MAO ayant entraîné une chute des rendements et de la régiosélectivité, il semblait intéressant d'essayer de s'en affranchir. En effet, la carboalumination a été développée initialement par Negishi sans MAO qui permet simplement d'augmenter la réactivité du triméthylaluminium et d'améliorer la cinétique de la réaction. Les résultats des différents tests sont regroupés dans le Tableau 7.

Tableau 7 Mise au point de la carboalumination en l'absence de MAO, proportions observées des composés *E*-137/*Z*-137/138

Entrée	AlMe ₃	I ₂	Etape 1	Etape 2	Conversion	<i>E</i> -137	<i>Z</i> -137	138
1	3 éq	3 éq	1 jour	2 h	Non totale	80%	10%	10%
2	6 éq	6 éq	1 jour	1 jour	Non totale	92%	6%	2%
3	6 éq	6 éq	3 jours	1 jour	Totale	99%	<1%	/

L'utilisation de trois équivalents de triméthylaluminium et de diiode (entrée 1) ne permet pas une conversion totale de l'alcyne initial. L'augmentation de la quantité de triméthylaluminium et de diiode ainsi que du temps de réaction permettent la consommation totale de **130** (entrée 3). La régiosélectivité (99%) est excellente en faveur du composé *E*-137. La réaction de Negishi a donc été optimisée et conduit de façon régiosélective au composé *E*-137 (Schéma 59).

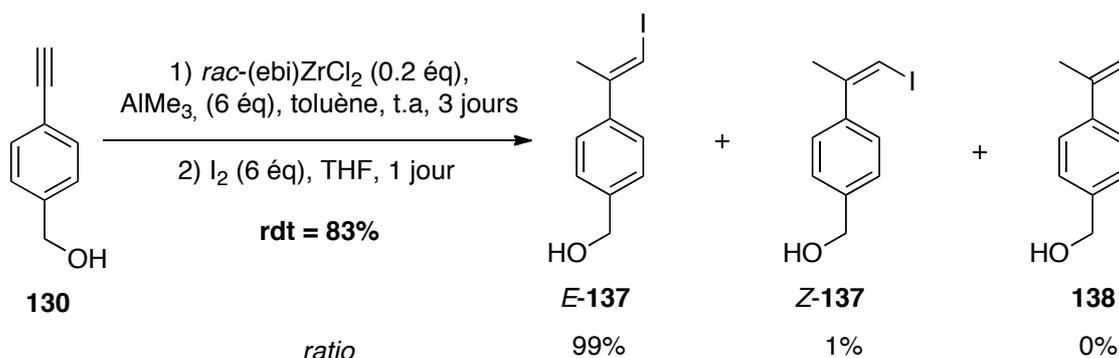


Schéma 59 Conditions adoptées pour la carboalumination de Negishi sur **130**

3.2.2.3 Oxydation de *E*-137

Afin de faciliter la purification du triène par extraction acido-basique, l'alcool **137** a été oxydé en acide carboxylique. Pour cela, plusieurs conditions ont été criblées, en commençant par une oxydation directe (Schéma 60 et Tableau 8).

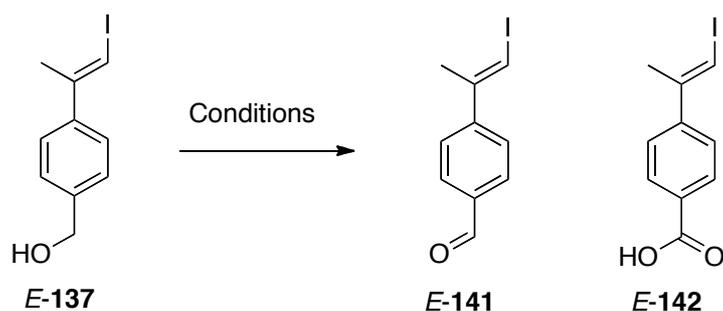
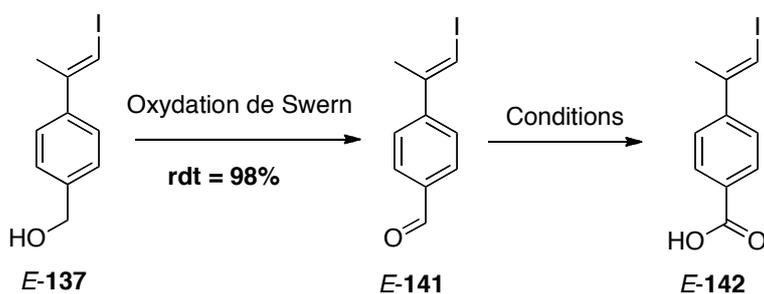


Tableau 8 Conditions de l'oxydation directe en **142** à partir de *E*-**137**

Entrée	Conditions	Proportion de 137	Proportion de 141	Proportion de 142
1	H ₅ IO ₆ (3 éq), CrO ₃ (cat), ACN/H ₂ O	/	100%	/
2	H ₅ IO ₆ (3 éq), CrO ₃ (cat), ACN/DCM	63%	25%	12%
3	IBA (0,3 éq), Oxone (1,3 éq), ACN/H ₂ O	50%	50%	/

Les oxydations utilisant l'acide periodique (entrées **1**¹²⁵ et **2**¹²⁶) en présence d'oxyde de chrome (VI) en quantité catalytique n'ont pas donné les résultats escomptés puisque des mélanges de **137/141/142** ont été obtenus. L'utilisation d'un réactif à base d'iode hypervalent comme IBA¹²⁷ (entrée **3**) n'a conduit qu'à la formation de l'aldéhyde. Une oxydation en deux étapes a donc été envisagée (formation de l'aldéhyde **141** puis oxydation de celui-ci). L'aldéhyde **141** a été obtenu avec un rendement de **98%** en utilisant les conditions de Swern, plus facile à mettre en œuvre. Des essais d'oxydation en acide **142** ont ensuite été réalisés (Tableau 9).



¹²⁵ Zhao, M ; Li, J. ; Song, Z. ; Desmond, R. ; Tschaen, D. M. ; Grabowski, E. J. J. ; Reider, P. J., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5323-5326

¹²⁶ Zhang, S. ; Xu, L. ; Trudell, M. L., *Synthesis*, **2005**, *11*, 1757-1760

¹²⁷ Thottumkara, A. P. ; Bowsher, M. S. ; Vinod, T. K., *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 2933-2936

Tableau 9 Conditions de l'oxydation en **142** à partir de **141**

Entrée	Conditions	Proportion de 141	Proportion de 142	Rdt (%)
1	NiCl ₂ (2,5 mol%), NaOCl (2 mol%), DCM/H ₂ O	100%		/
2	NaClO ₂ (2 éq), NaH ₂ PO ₄ (1,5 éq), 2-méthylbutene (15 éq), tBuOH/H ₂ O (Pinnick)	/	100%	67%

La méthode décrite par Miller¹²⁸ utilisant le dichlorure de Nickel et l'hypochlorite de sodium n'a pas permis d'oxyder l'aldéhyde **141** en acide **142**. En revanche, l'oxydation de Pinnick^{129,130} a conduit à l'acide **142** avec un rendement **67%** (entrée **2**). Le composé **142** a donc été obtenu avec un rendement de **66%** sur deux étapes à partir de l'alcool **137**.

3.2.2.4 Couplage de Suzuki-Miyaura, formation des triènes aromatiques **123** et **124**

Le couplage de Suzuki découvert en 1979¹³¹ permet de former une liaison C-C par condensation d'un composé vinyle ou d'un halogénure d'aryle avec un acide boronique vinylique ou aromatique, en présence d'un catalyseur au palladium et d'une base (Schéma 62).¹³²

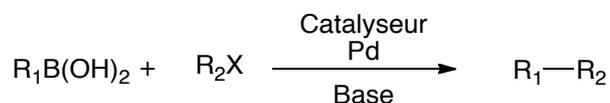


Schéma 62 Principe du couplage de Suzuki

Pour former le triène **16**, le couplage de Suzuki a nécessité un partenaire de type ester boronique **122** dont la synthèse fut décrite en 1992.¹³³ L'utilisation du catalyseur de Schwartz (Cp₂ZrHCl), connu pour la formation d'esters boroniques, a permis à d'obtenir **122** avec un meilleur rendement que la synthèse initiale et à l'échelle de 10-15 g (Schéma 63).^{134,135}

¹²⁸ Grill, J. M. ; Ogle, J.W. ; Miller, S. A., *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 9291-9296

¹²⁹ Kraus, G. A. ; Roth, B., *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 4825-4830

¹³⁰ Fujiwara, K. ; Awakura, D. ; Tsunashima, M. ; Nakamura, A. ; Honma, T. ; Murai, A., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2616-2617

¹³¹ Miyaura, N.; Yamada, K. ; Suzuki, A., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *20*, 3437-3440

¹³² Miyaura, N.; Suzuki, A., *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483

¹³³ Tucker, C. E. ; Davidson, J. ; Knochel, P., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 3482-3485

¹³⁴ PraveenGanesh, N. ; d'Hondt, S. ; Chavant, P. Y., *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 4510-4514

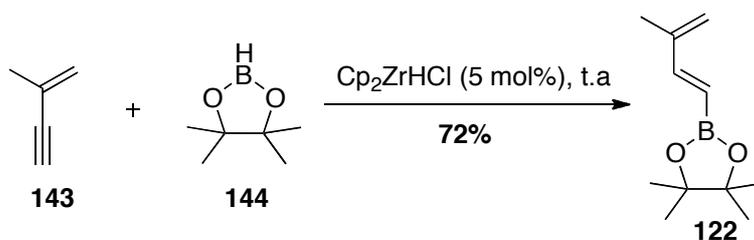


Schéma 63 Synthèse du composé **122**

3.2.2.4.1 Cas du triène alcool **123**

Le couplage du vinyle **137** avec l'ester boronique **122** en présence de tétrakis(triphényl)phosphine de palladium et de phosphate de potassium dans un mélange THF/eau (2:1) à 50 °C a conduit au triène aromatique (*E,E*)-**123** avec un rendement de **74%** (Schéma 64).

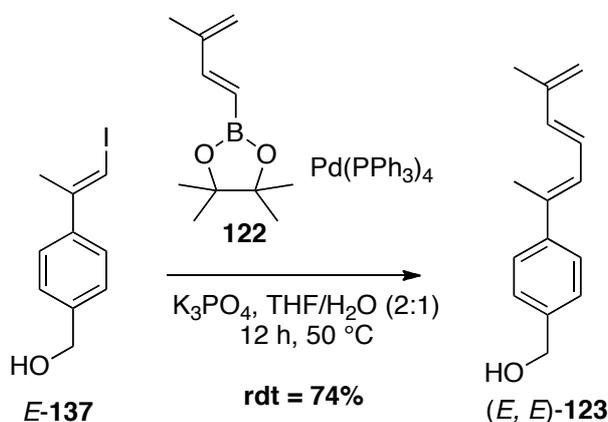


Schéma 64 Obtention du triène alcool aromatique **123** par couplage de Suzuki

3.2.2.4.2 Cas du triène acide **124**

Le couplage de Suzuki entre l'acide *E*-**142** et l'ester boronique **122** réalisé dans les mêmes conditions à température ambiante a montré des problèmes de reproductibilité. En effet, les rendements sont variables et la formation du composé **145** a été observée.

¹³⁵ Pereira, S. ; Srebnik, M., *Organometallics*, **1995**, *14*, 3127-3128

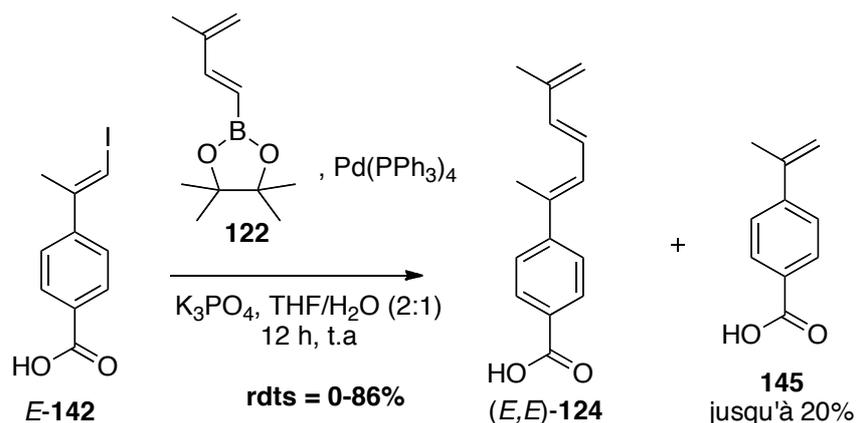


Schéma 65 Premiers essais de couplage de Suzuki sur le vinyle iodé **142**

Le mécanisme de ce couplage a largement été étudié et permet d'expliquer l'apparition du dérivé **145** (Schéma 66). Le palladium, au degré d'oxydation zéro, réaliserait une addition oxydante sur **E-142** en s'insérant dans la liaison carbone-iodé pour former l'intermédiaire **I**. Cet intermédiaire par un échange de ligand avec la base formerait l'espèce **II**. En parallèle le composé **122** formerait, en présence de la base, son homologue acide **122a**, qui, après transmétallation, avec **II** permettrait la formation de **III**. Une élimination réductrice du dérivé **III** conduirait à la régénération du palladium 0 et du composé (**E,E**)-**124**. Le dérivé **145** proviendrait donc de l'hydrolyse d'un des trois intermédiaires **I**, **II** ou **III**.

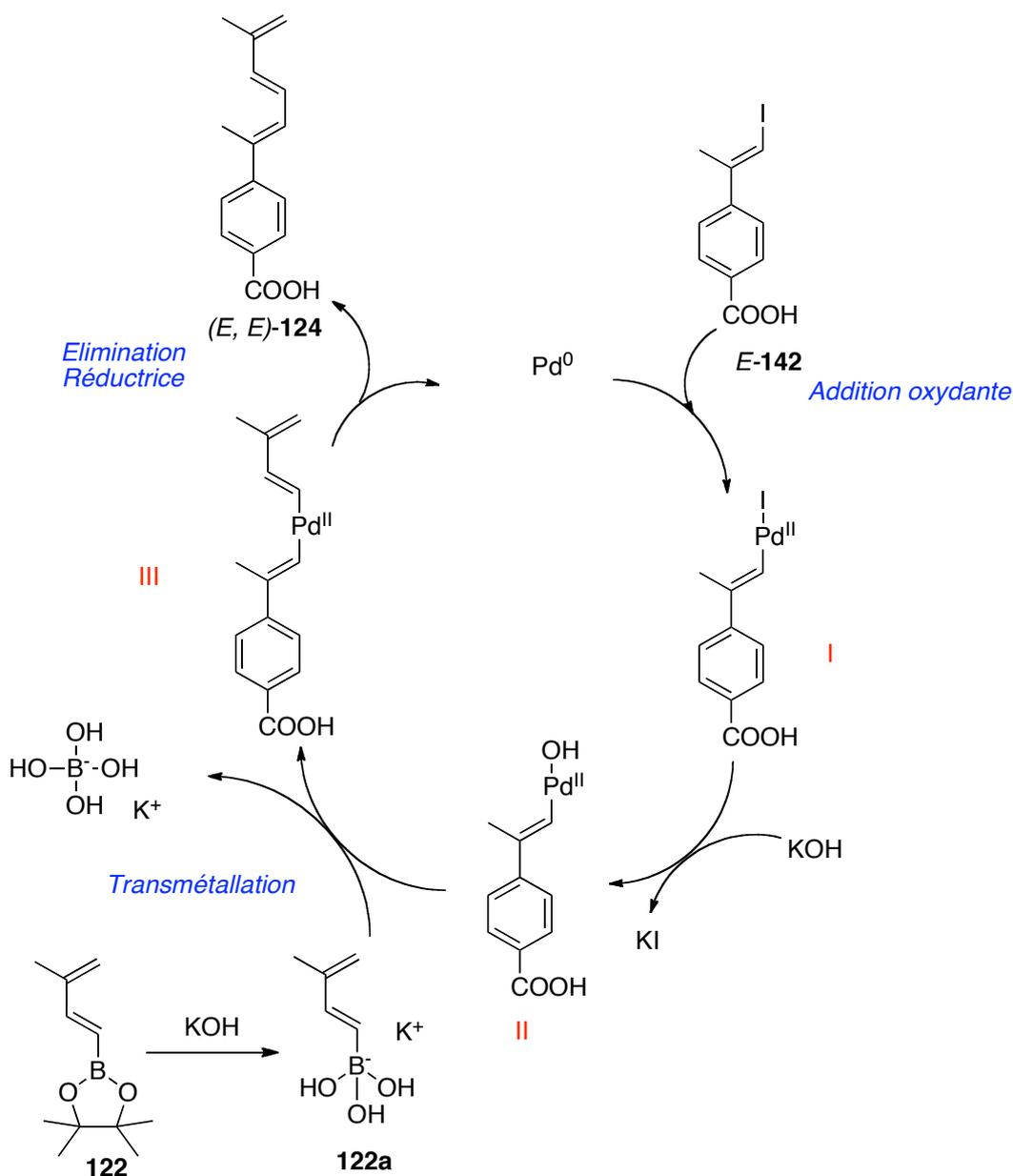


Schéma 66 Cycle catalytique du couplage de Suzuki sur *E*-142

Les réactions réalisées durant la nuit ont conduit au composé **124** avec de meilleurs rendements (nous avons supposé que soit les intermédiaires de réactions, soit le produit **124** était photosensible, tout comme l'était le triène **16**). Lorsque le couplage est réalisé dans l'obscurité, la réaction devient reproductible. Ainsi le composé **124** a été obtenu avec un rendement de **98%** (Schéma 67). Sa purification consiste en une simple extraction acido-basique une fois le substrat de départ consommé.

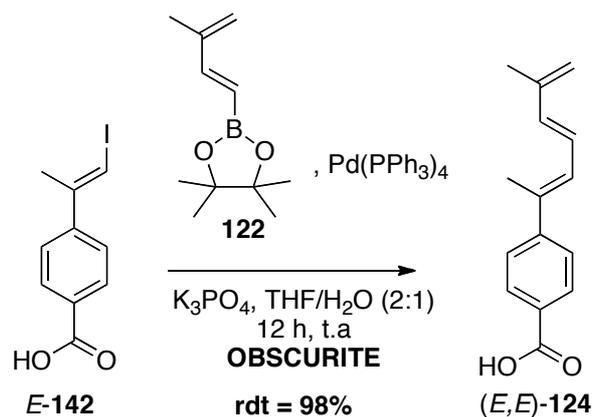


Schéma 67 Conditions optimales d'obtention du triène aromatique acide **124**

3.2.2.5 Conclusion

Les deux triènes **123** et **124** ont été synthétisés en peu d'étapes à partir de l'alcyne **130** avec d'excellents rendements et une sélectivité (*E,E*) de **99%** (Schéma 68). Ces triènes aromatiques ont montré une stabilité accrue en comparaison au triène aliphatique initial **16**. Cette stabilité sera un avantage pour la réalisation des réactions de Diels-Alder.

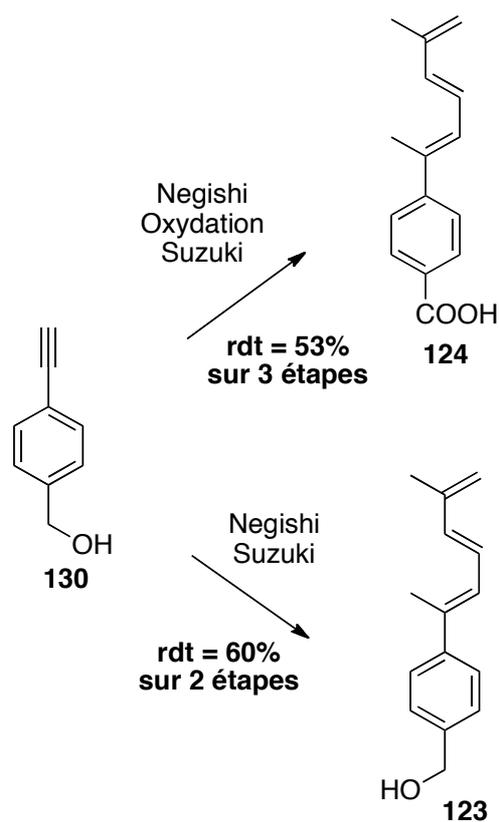


Schéma 68

3.3 Synthèse de triènes aromatiques, introduction de groupements « phénol » et « pyridines »

3.3.1 Objectifs

Comme nous l'avons vu précédemment, la modification de la partie Sud de la meiogynine A **2** nécessite la synthèse de nouveaux triènes (Figure 38). En effet, l'introduction de groupement « phénol » ou « pyridine » modifierait les caractéristiques physico-chimiques des produits finaux en diminuant leur lipophilie (3.2.1).

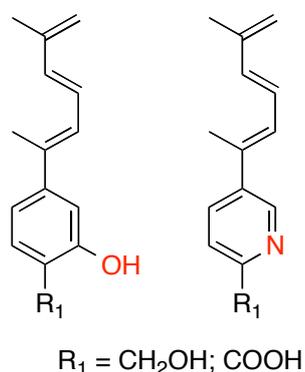


Figure 38 Introduction d'hétéroatomes sur les cycles aromatiques des triènes

3.3.2 Tentative de formation d'un triène « phénol »

3.3.2.1 Synthèse de l'alcyne

La stratégie de synthèse envisagée pour la préparation des triènes **148** et **149** est la même que celle adoptée précédemment. Le précurseur **147** devrait pouvoir être élaboré à partir du composé commercial **146**, puis conduire, après carboalumination et couplage de Suzuki, aux triènes **148** et **149** (Schéma 69).

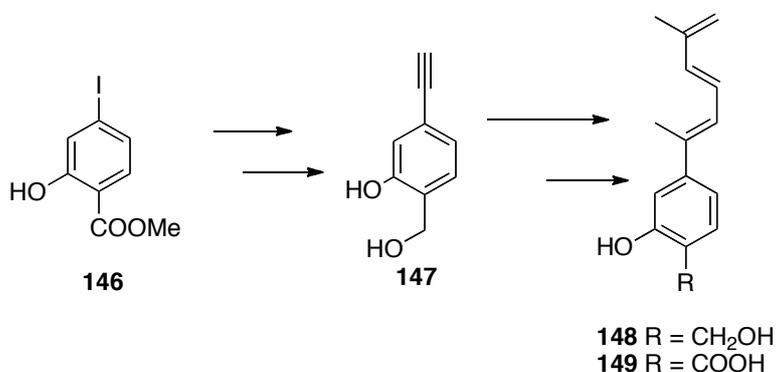


Schéma 69 Formation des triènes « phénol » **148** et **149**

Le 4-iodosalicylate de méthyle **146** a été engagé dans un couplage de Sonogashira en présence de triméthylsilylacétylène, de dichlorure de *trans*-bis(triphénylphosphine) de palladium, de triéthylamine et d'iodure de cuivre (I) pour former le composé **150** avec un rendement quantitatif.¹³⁶ Après purification, le dérivé **150** a été engagé dans une étape de désilylation en présence de fluorure de tétrabutylammonium dans le THF conduisant ainsi au composé **151** avec un rendement de **89%**. Cette voie est rapide, efficace et robuste (Schéma 70).

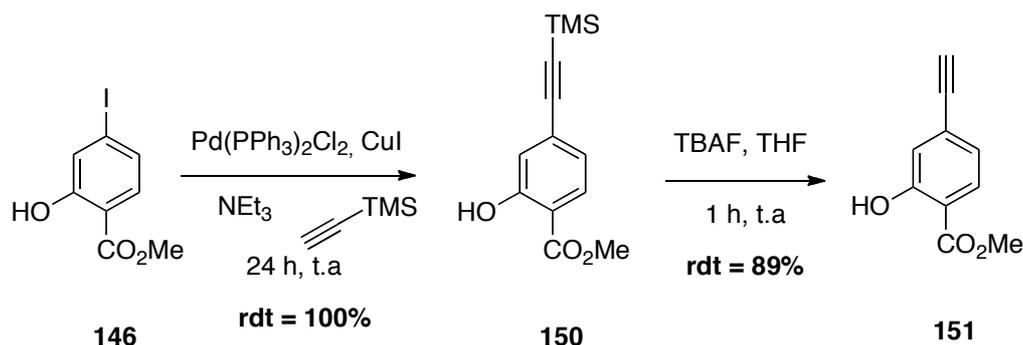


Schéma 70 Formation du dérivé **151** par couplage de Sonogashira puis déprotection

La réaction de carboalumination de Negishi n'est pas compatible avec des groupements carboxyles,¹¹⁵ qui peuvent chélater le triméthylaluminium empêchant la formation du vinylalane désiré. L'ester **151** a donc été réduit en alcool **147** par action du LAH dans l'éther diéthylique à -78 °C. Le composé **147** a été obtenu avec un rendement de **85%** (Schéma 71).

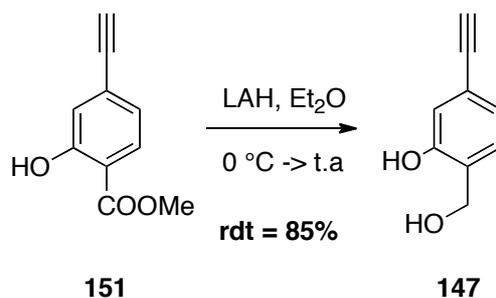


Schéma 71 Réduction de l'ester **151** en alcool **147**

¹³⁶ GALDERMA RESEARCH and DEVELOPMENT, S.N.C. ; WO2004/46096 A2, 2004, 31-32

3.3.2.2 Mise au point de la carboaluminéation de Negishi

Le composé **147** a été engagé dans une réaction de Negishi pour former l'intermédiaire vinyle iodé **152**. Cependant, malgré de nombreux essais (modification du temps de réaction, ajout ou non de MAO), celui-ci n'a pas pu être obtenu (Schéma 72).

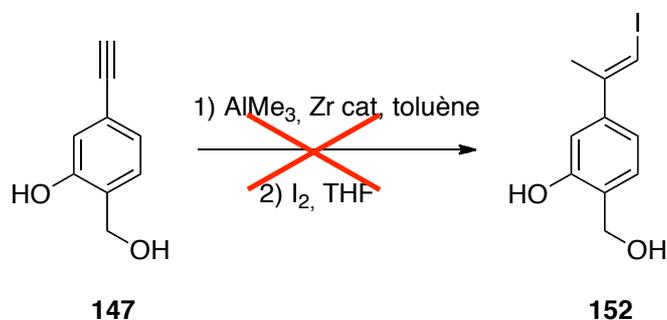


Schéma 72 Tentative de carboaluminéation sur le composé **147**

Il semblerait que les deux hydroxyles présents sur **147** pourraient chélater le triméthylaluminium et empêcher la formation d'un vinylalane et donc du composé iodé **152**. Pour palier ce problème, une protection des groupements hydroxyles par des groupements silyles a été envisagée. L'avantage de cette stratégie est que la déprotection peut être réalisée en même temps que l'oxydation en acide carboxylique.¹⁰⁴ La protection de l'alcool benzylique du composé **147** a conduit à un mélange complexe de **147**, **153** et **154** difficilement séparable par purification sur silice (Schéma 73).

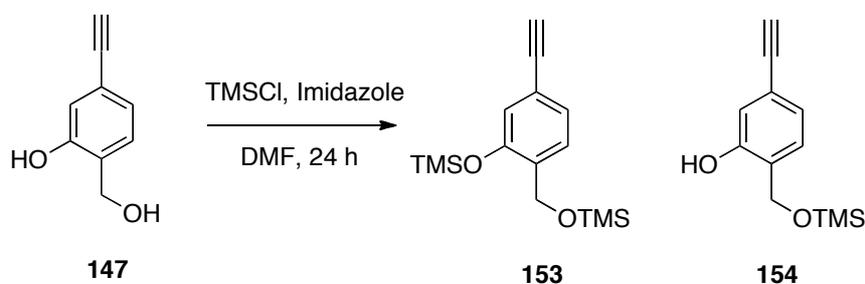


Schéma 73 Tentative de di-protection du composé **147**

Pour éviter cette double protection difficile, une silylation plus en amont du composé **151** a été envisagée (Schéma 74 et Tableau 10).

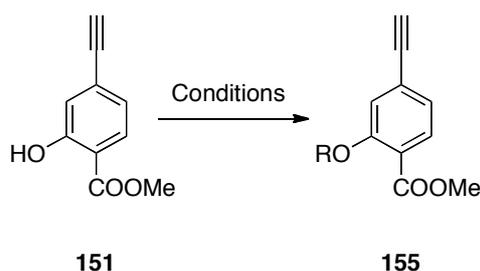


Schéma 74 Silylation de l'alcool **151**

Tableau 10 Conditions de protection de l'alcool 151

Entrée	R	Conditions	Rdt
1	TMS	TMSCl (4 éq), Imidazole (5 éq), DMF, 24 h	/
2	TBDMS	DIPEA (1,5 éq), TBDMSCl (1,5 éq), DCM, 50 °C, 24 h	87%

La tentative de silylation avec le chlorure de triméthylsilyle n'a pas donné de résultats satisfaisants puisque seul le produit de départ a été récupéré (entrée 1). En utilisant le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane, en présence de diisopropyléthylamine dans le dichlorométhane à 50 °C en tube scellé, le composé 155 a été obtenu avec un rendement de 87% (entrée 2). Ce dérivé a ensuite été réduit en présence LAH (Schéma 75) à -78 °C permettant ainsi d'éviter la formation du composé 157.

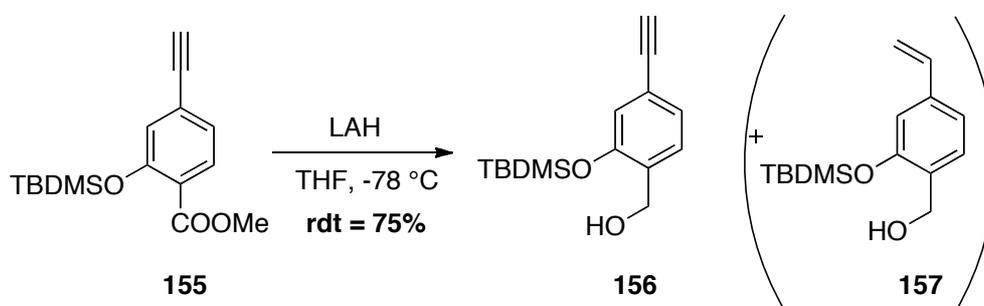


Schéma 75 Réduction de l'ester 155

Le phénol étant protégé, des essais de carboaluminations ont été réalisés, cependant l'alcyne semble peu réactif vis-à-vis du triméthylaluminium (Schéma 76 et Tableau 11). En effet, le dérivé 158 a été obtenu en mélange avec le produit de départ difficilement séparable et non utilisable pour un couplage de Suzuki (entrée 2). Les composés, possédant un phénol, semblent être peu réactifs vis-à-vis de la carboaluminations de Negishi. Cette voie de synthèse n'a pas été poursuivie.

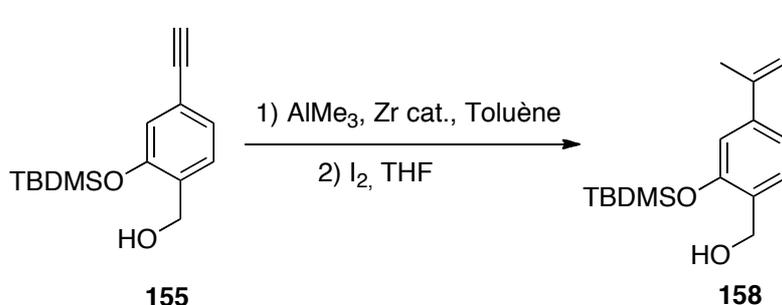


Schéma 76 Essais de carboaluminations sur l'alcyne 155

Tableau 11 Conditions de carboalumination de Negishi testées

Entrée	Conditions	155	158
1	AlMe ₃ (6 éq), <i>rac</i> -(ebi)ZrCl ₂ (0.2 éq) 24 h puis I ₂ , 2 h	99%	Traces
2	AlMe ₃ (6 éq), <i>rac</i> -(ebi)ZrCl ₂ (0.2 éq) 72 h puis I ₂ , 24 h	70%	30%
3	AlMe ₃ (6 éq), <i>rac</i> -(ebi)ZrCl ₂ (0.2 éq) + MAO (0.2 éq) 48 h puis I ₂ , 24 h	Dégradation et traces de 155	/

3.3.2.3 Essais de formation d'un triène « phénol » méthoxy

Afin d'introduire des groupements méthoxy sur les cycles aromatiques des triènes (composés **161** et **162** Schéma 77), l'utilisation du composé commercial **159** a été envisagée. Celui-ci pourrait conduire au composé **160**, précurseur des triènes désirés.

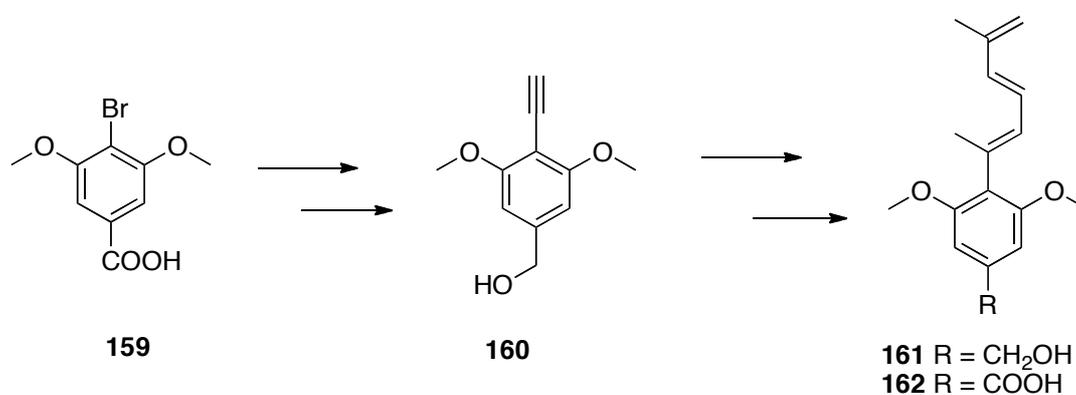


Schéma 77 Objectifs de formation du triène méthoxy

Le composé **159**, commercial, a directement été engagé dans un couplage de Sonogashira afin d'introduire l'alcyne. La présence des deux groupements méthoxy pourrait gêner stériquement l'insertion du palladium dans la liaison C-Br, c'est pourquoi les essais ont été réalisés à 70 °C afin de favoriser l'addition oxydante du palladium au niveau de la liaison carbone-halogène.¹³⁷ Malgré plusieurs essais, la formation de **163** n'a pas été observée, seul **159** a été récupéré (Schéma 78).

¹³⁷ Taeho, L. ; Hee Ryong, K. ; Shinae, K. ; Sanghee, K., *Tetrahedron*, **2006**, 17, 4081-4085

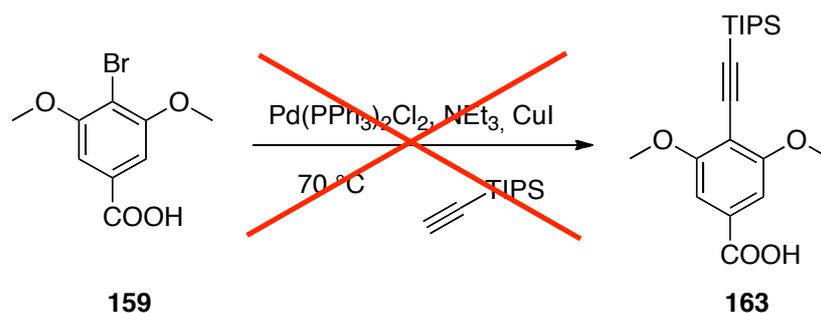


Schéma 78 Essai de couplage de Sonogashira sur **159**

Une réduction de l'acide carboxylique a été envisagée afin d'éviter une quelconque chélation du palladium par celui-ci. Le complexe de sulfure de diméthyle borane ($\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$) dans le THF a permis de réduire le composé **159** conduisant ainsi à l'alcool **164** avec un très bon rendement de **89%** (Schéma 79).¹³⁸

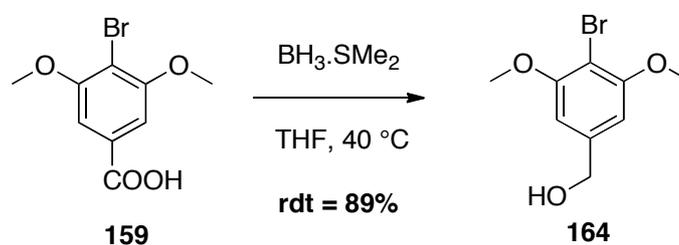


Schéma 79 Réduction de l'acide carboxylique **159**

Le dérivé **164** a été engagé dans un couplage de Sonogashira (Schéma 80 et Tableau 12), cependant le composé **165** n'a pas été obtenu à température ambiante (entrée **1**). Ni l'augmentation de la température (entrées **2-4**), ni un changement de conditions (entrée **5**) n'ont conduit au composé désiré. L'encombrement stérique important dû aux deux groupements méthoxy en *ortho* de l'halogène pourrait expliquer ce résultat.

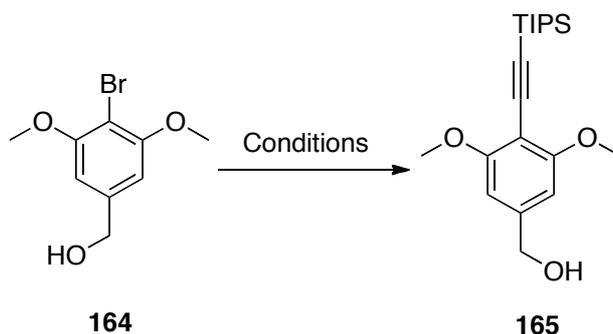


Schéma 80 Essai de couplage de Sonogashira sur l'alcool **164**

¹³⁸ Dirat, O. ; Kouklovsky, C. ; Langlois, Y., *J. Org. Chem.*, **1998**, *19*, 6634-6642

Tableau 12 Conditions de couplage de Sonogashira

Entrée	Conditions	Composé 165
1	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , NEt ₃ , TIPS-acétylène, CuI, THF, t.a	/
2	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , NEt ₃ , TIPS-acétylène, CuI, THF, 50 °C	/
3	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , NEt ₃ , TIPS-acétylène, CuI, Toluène, 80 °C	/
4	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , NEt ₃ , TIPS-acétylène, CuI, Toluène, 110 °C	/
5	Pd(PhCN) ₂ Cl ₂ , DIPEA, (tBu) ₃ P, TIPS-acétylène, CuI, dioxane, t.a	/

L'introduction d'un groupement aldéhyde en *para* de l'alcool, afin de le transformer en alcyne par une réaction de Bestmann-Ohira a été envisagé.¹⁰³ Pour cela, l'alcool **164** a été protégé par un groupement silyle conduisant au composé **166** avec un bon rendement de **73%**. Dans des conditions classiques, l'aldéhyde n'a pas été obtenu (Schéma 81)¹³⁹ et cette voie de synthèse a été abandonnée.

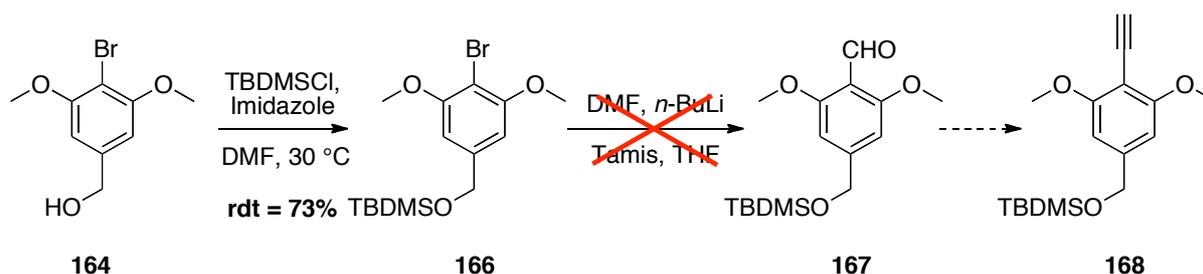


Schéma 81 Insertion d'alcyne sur le dérivé **164** par une séquence formylation/Bestmann-Ohira

3.3.3 Tentative de formation d'un triène « pyridine »

3.3.3.1 Synthèse de l'alcyne

L'utilisation du composé commercial **169** devrait conduire aux triènes **171** et **172** via une réaction de Negishi suivi d'un couplage de Suzuki comme développé précédemment (Schéma 82).

¹³⁹ Fabrice Gallou, F. ; Haennggi, R. ; Hirt, H. ; Marterer, W. ; Schaefer, F. ; Seeger-Weibel, M., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *34*, 5024-5027

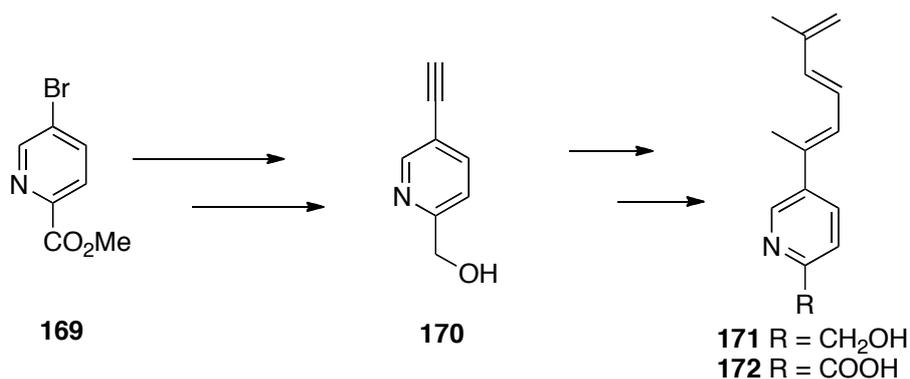


Schéma 82 Voie de synthèse des triènes **171** et **172**

Le méthyl 5-bromopicolinate **169** a été engagé dans un couplage de Sonogashira avec du PdCl₂(PPh₃)₂, de l'iodure de cuivre, de la triéthylamine et du triméthylsilylacétylène dans du THF sous atmosphère inerte à 60 °C pendant 18 heures.^{140,141} L'alcyne silylé **173** a été obtenu avec un rendement de **99%**, l'action du fluorure de tétrabutylammonium dans du THF a conduit à l'alcyne vrai **174** (Schéma 83).

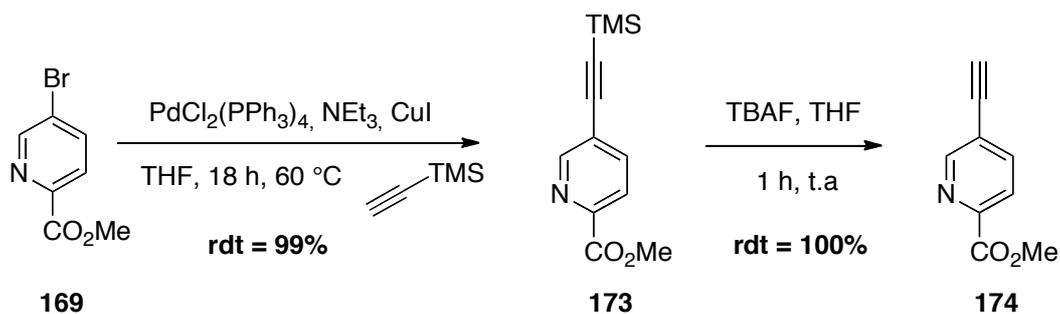


Schéma 83 Obtention de l'alcyne **174**

3.3.3.2 Tentative de carboalumination

Avant de réaliser la carboalumination, l'ester méthylique de **174** a été réduit en présence de LAH en alcool **175** à -78 °C avec un rendement de **70%**. Ces conditions permettent d'éviter la formation du composé **178** résultant d'une réduction de l'alcyne (Schéma 84).

¹⁴⁰ DUKE UNIVERSITY; ZHOU, Pei; TOONE, Eric, J. ; WO2012/31298 A2 ; **2012**

¹⁴¹ Park, B. G.; Pink, M.; Lee, D., *J. Organomet. Chem.*, **2011**, 25, 4039-4045

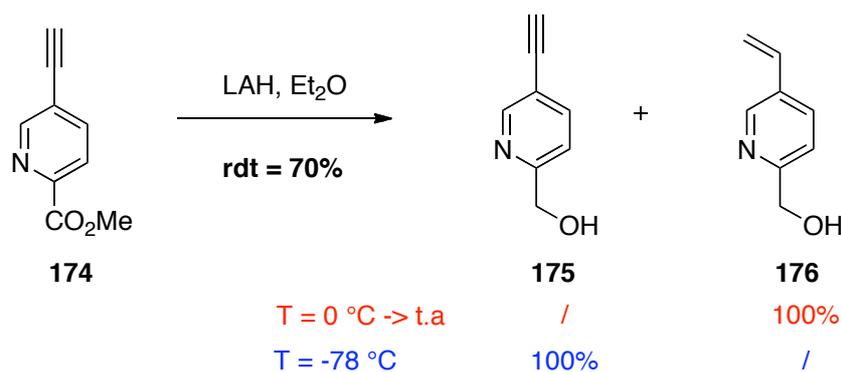


Schéma 84 Réduction de l'ester **174**

Le composé **175** a alors été engagé dans des essais de carboalumination, cependant il n'est pas assez réactif et s'est dégradé lors des différents essais. Le manque de réactivité pourrait être expliqué par la formation d'un complexe entre l'atome d'azote et le triméthylaluminium. La formation du composé iodé **177** n'a jamais été observée (Schéma 85). Cette voie de synthèse n'a pas permis d'obtenir les triènes escomptés.

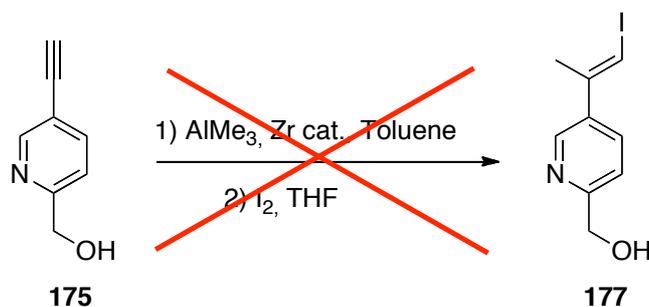


Schéma 85 Tentative de la carboalumination sur le composé alcool **175**

3.3.4 Conclusion

Les triènes aromatiques classiques **123** et **124** ont été obtenus avec de très bons rendements et une excellente régiosélectivité. Cependant nos tentatives de formation de triènes incluant des motifs « phénol » et « pyridine » se sont soldées par des échecs (Figure 39).

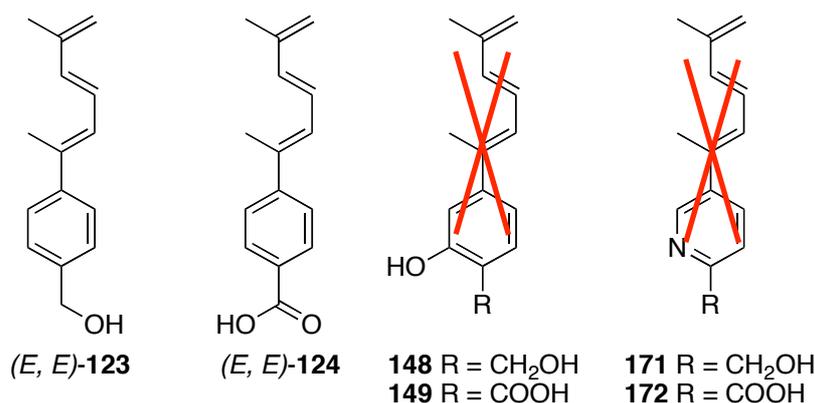


Figure 39 Récapitulatif des triènes obtenus

Une autre voie de modulation du squelette de la meiogynine A **2** est possible en utilisant un châssis moléculaire modulable. Les résultats obtenus sur ces travaux sont présentés dans la suite de ce chapitre.

3.4 Formation d'un châssis moléculaire modulable

3.4.1 Principe et objectifs

Le concept de châssis moléculaire repose sur la formation d'une *cis*-décaline possédant une fonction modulable sur la partie Sud. Cette fonction permettrait l'introduction rapide de différents groupements. La synthèse d'un composé possédant une fonction *gem*-dibromé a été envisagée. Ce châssis moléculaire pourrait provenir d'une réaction de Diels-Alder entre un triène dibromé **178** et les diénophiles **17** (Figure 40).

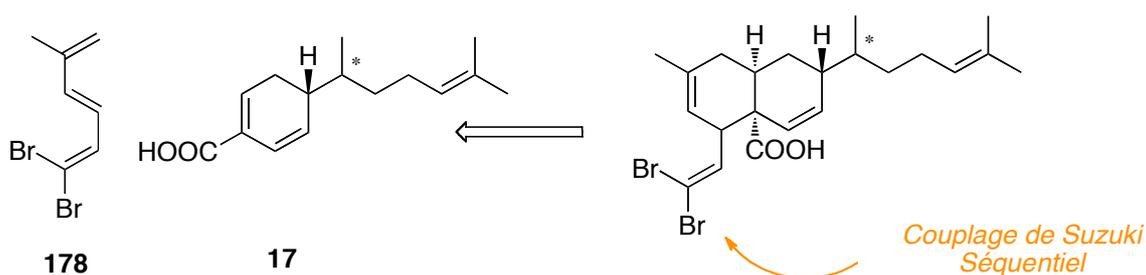


Figure 40 Concept de châssis moléculaire

Notre intérêt s'est porté sur le composé **178** puisqu'il existe des méthodes sélectives de couplage de Suzuki sur des composés *gem*-dihalogénés. Dans notre cas, cela pourrait permettre d'introduire deux groupements différents à la place de l'atome de brome de manière contrôlée.

3.4.2 Châssis moléculaire modulable *gem*-dibromé

3.4.2.1 Rappel bibliographique sur les couplages de Suzuki séquentiels sur des *gem*-dihalogènes alcènes

Récemment l'équipe de Molander a développé une méthode de couplages de Suzuki séquentiels permettant de substituer sélectivement un composé *gem*-dihalogéné avec des trifluoroborates.¹⁴² Ceux-ci sont très utilisés dans les couplages de Suzuki grâce à leur accessibilité, d'utilisation et leurs prix réduits.¹⁴³ Les composés dibromés sont engagés dans un premier couplage de Suzuki à 60 °C, le premier trifluoroborate va se lier du côté le moins encombré pour former une première liaison C-C (Schéma 86). Le second couplage est réalisé dans le même ballon de réaction, en augmentant la température à 80 °C menant à la formation d'une seconde liaison C-C à partir du second trifluoroborate. Le choix de la température est crucial particulièrement pour le premier couplage. Une hausse de température entraîne l'apparition de di-couplage. Il est à noter que Molander obtient une très bonne sélectivité en faveur des composés (*E,E*). Les composés **182** et **183** obtenus par cette méthode en sont des exemples.

¹⁴² Molander, G. A. ; Yokoyama, Y., *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2493-2498

¹⁴³ Molander, G. A. ; Figueroa, R., *Aldrichimica. Acta* **2005**, *38*, 49-56

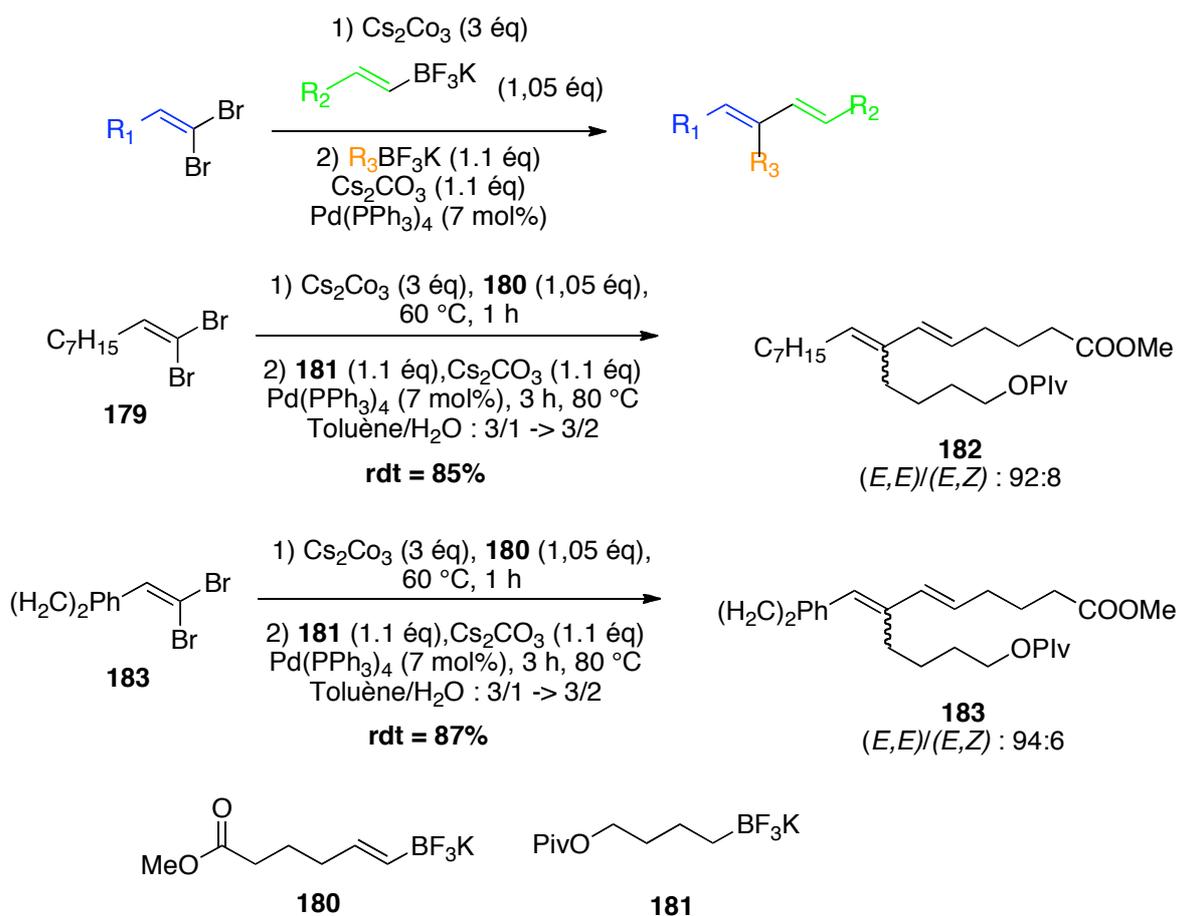


Schéma 86 Principe de couplages séquentiels sélectifs de Molander, et quelques exemples

La réaction est applicable à des composés où R_1 est aliphatique, cyclique ou linéaire. L'équipe de Roulland a démontré l'efficacité de l'atome chlore dans la réalisation de couplages de Suzuki séquentiels.¹⁴⁴ Des dichloroalcènes ont ainsi été utilisés dans des réactions de couplages de Suzuki. Les composés partenaires de couplage sont des boranes de type 9-BBN (Schéma 87). Les oléfines trisubstituées sont formées par deux méthodes différentes pour la formation d'une deuxième liaison C-C. Les composés **186** et **187** ont été obtenus par cette méthode. Les conditions de couplage de Suzuki sont adaptées aux substrats utilisés.

¹⁴⁴ Liron, F. ; Fosse, C. ; Pernolet, A. ; Roulland, E., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 2220-2223

3.4.2.2 Synthèse d'une cis-décaldine « gem-dibromée »

Le composé **188** a été synthétisé en deux étapes à partir de la méthacroleïne **193**. Elle a été transformée en dérivé **194** par une réaction de Wittig avec un rendement de **78%**. Le dérivé **194** a ensuite été réduit en présence de LAH pour former l'alcool **188** avec un rendement de **78%** (Schéma 89).¹⁴⁶

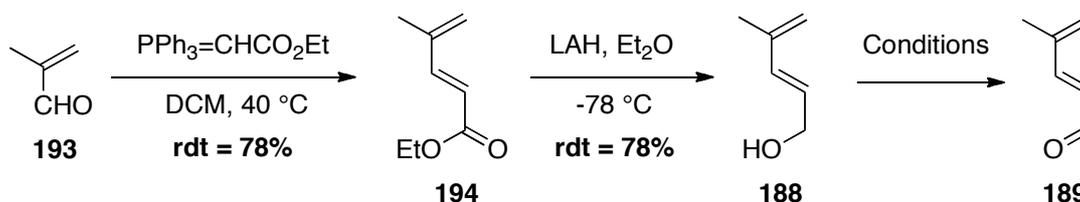


Schéma 89 Obtention du composé **188** et de **189**

L'oxydation de **188** en aldéhyde **189** a fait l'objet d'un criblage de conditions (Tableau 13).

Tableau 13 Oxydation de l'alcool **188** en aldéhyde **189**

Entrée	Conditions	189 - rdt (%)
1	PCC, DCM, t.a. ¹⁴⁷	90
2	TEMPO, NaOCl, KBr, DCM, 0 °C ¹⁴⁸	Traces
3	Dess-Martin, DCM, t.a	Traces et dégradation
4	MnO ₂ , DCM, t.a	75

Les oxydations avec le réactif de Dess-Martin ou en présence de TEMPO (entrées **2** et **3**) n'ont pas donné de bons résultats. Par contre, celles réalisées en présence de PCC ou de MnO₂ ont permis d'obtenir le dérivé **189** avec des rendements de **90%** et **75%** respectivement. L'oxyde de manganèse (IV) a été préféré au chlorochromate de pyridinium car il est moins toxique et plus facile à manipuler. Une fois l'aldéhyde **189** obtenu, la synthèse des composés dihalogénés a été étudiée (Schéma 90 et Tableau 14).

¹⁴⁷ Corey, E. J. ; Suggs ; J. W., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 16, 2647-2650

¹⁴⁸ Danheiser, R. L. ; Fink, D. M. ; Tsai, Y. M., *Org. Synth.*, **1993**, 8, 367

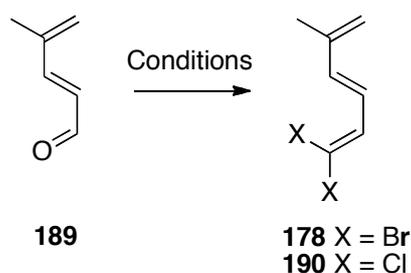


Schéma 90 Halogénération de l'aldéhyde **189**

Tableau 14 Conditions d'halogénération de l'aldéhyde **189**

Entrée	X	Conditions	Produit attendu	Rdt
1	Cl	Et ₂ O/THF (2/1,5), <i>n</i> BuLi (1 éq), POCl ₃ (1 éq), -78 °C	190	Produit de départ
2	Cl	Et ₂ O/THF (2/1,5), <i>n</i> BuLi (1 éq), POCl ₃ (1 éq), -100 °C	190	Produit de départ
3	Cl	PPh ₃ (3 éq), CCl ₄ (1,5 éq), Mg (1,5 éq), THF, t.a. ¹⁴⁹	190	dégradation
4	Cl	PPh ₃ , CCl ₄ , 80 °C ¹⁵⁰	190	dégradation
5	Br	PPh ₃ (4 éq), CBr ₄ (2 éq), DCM 0 °C ^{101,145}	178	44-77%

Tous les essais pour obtenir le composé di-chloré **190** (entrées **1-4**), même en utilisant des conditions drastiques (entrées **3-4**), ont conduit à la récupération du produit de départ ou à sa dégradation. Ils engendrent généralement la formation de mélange complexe de produits de dégradation. Le composé *gem*-dibromé **178** a pu être obtenu en utilisant du tétrabromométhane (entrée **5**). Cependant ce réactif est extrêmement toxique et les rendements varient entre **44** et **77%** car le dérivé **178** a tendance à polymériser.

Des essais de couplage de Suzuki ont ensuite été réalisés en utilisant le trifluoroborate **195** comme réactif dans les conditions décrites par Molander. Malheureusement, la température utilisée pour ces couplages entraîne la dégradation du composé dibromé **178** (Schéma 91).

¹⁴⁹ Vinczer, P. ; Struhar, S. ; Novak, L. ; Szantay, C., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 683-686

¹⁵⁰ Wang, C. ; Sun, C. ; Weng, F. ; Gao, M. ; Liu, B. ; Xu, B., *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 2984-2989

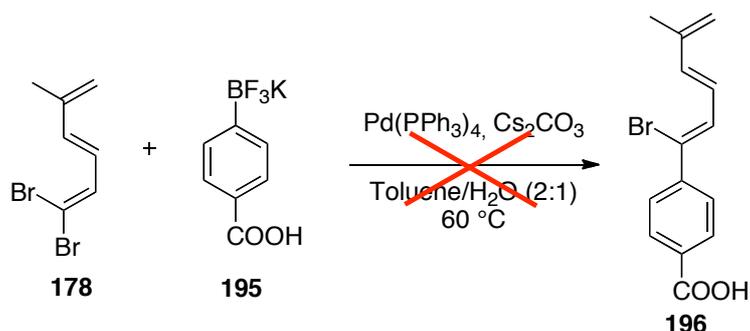


Schéma 91 Tentative de couplage de Suzuki sur le triène **178**

Le composé **178** a été engagé au préalable dans une réaction de Diels-Alder avec le diénophile **198** en vue de former la *cis*-décالية **200** modèle. En effet, celle-ci devrait être plus stable que **178** et plus résistante aux températures utilisées pour les couplages de Suzuki séquentiels. Le diénophile **198** a été synthétisé selon la méthode de Boger.¹⁵¹ Une réduction de Birch de l'acide benzoïque suivie d'une isomérisation permet d'obtenir le diénophile **198** à l'échelle de 10 g en mélange avec 10% d'acide benzoïque résiduel (Schéma 92).

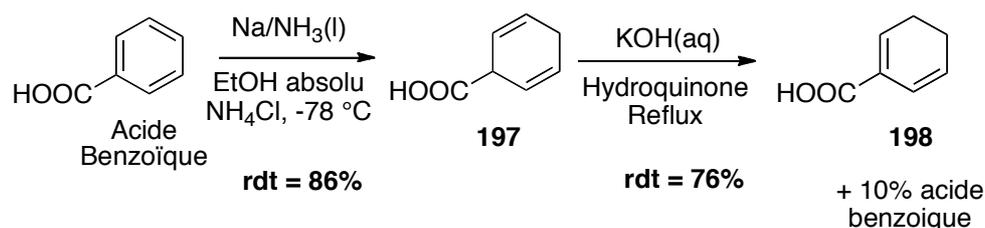


Schéma 92 Synthèse du diénophile **198**

La réaction de Diels-Alder entre **178** et **198** a été réalisée en présence de l'acide boronique **199**¹⁵² en quantité catalytique dans le DCM à 30 °C. La réaction conduit au composé **200** un rendement de **47%**. L'acide boronique chélate l'acide carboxylique de **198** augmente la réactivité de celui-ci et permet de réaliser la réaction à une température modérée, évitant ainsi la dégradation du composé dibromé **178** (Schéma 93).

¹⁵¹ Boger, D. L. ; Patel, M. ; Takusagawa, F., *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 1911-1916

¹⁵² Al-Zoubi, R. M. ; Marion, O. ; Hall, D. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2876-2879

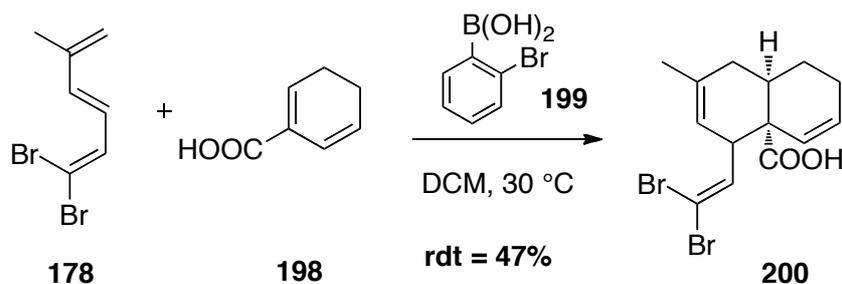


Schéma 93 Obtention du composé **200**

Le composé **200** s'est révélé plus stable que son précurseur **178** et a pu être purifié (Figure 41) par HPLC préparative sur colonne Sunfire (19x150 mm, 5 μm) dans un mélange isocratique acétonitrile/eau (35/65) avec 0,1% d'acide formique.

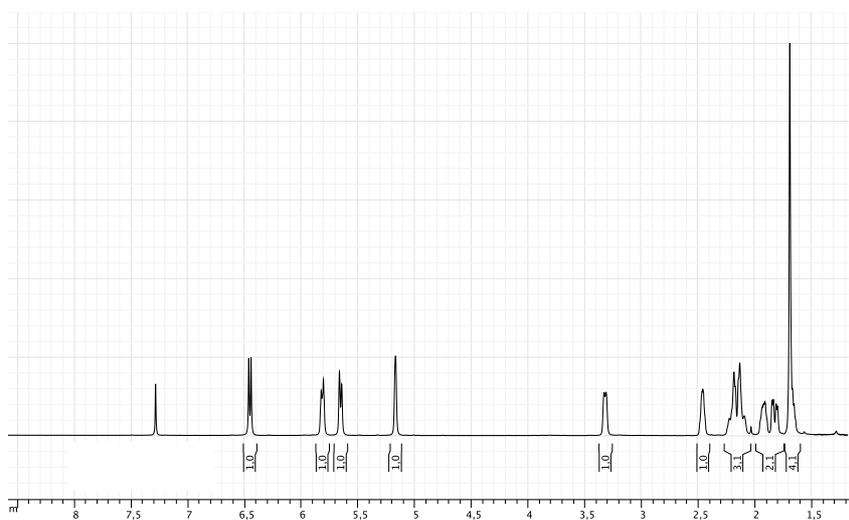


Figure 41 Spectre ^1H RMN du composé **200** après purification par HPLC dans le chloroforme.

3.4.2.3 Essais de couplage de Suzuki, méthode de Molander

En possession de notre premier châssis moléculaire **200**, nous avons voulu vérifier la validité de la voie de synthèse en réalisant des couplages de Suzuki dans les conditions développées par Molander.¹⁴¹ Afin de former le composé **201**, le dérivé **200** a été mis en réaction avec le trifluoroborate aromatique **195** commercial en présence de tetrakis(triphénylphosphine) de palladium, de carbonate de césium, dans un mélange toluène/eau (2:1) à 60 °C (Schéma 94). Cependant la formation du produit n'a pas été observée et le composé **200** s'est dégradé. La méthode d'obtention de **178** étant peu reproductible, la synthèse de **200** en grande quantité a été difficile et n'a pas permis de poursuivre les investigations sur ces couplages.

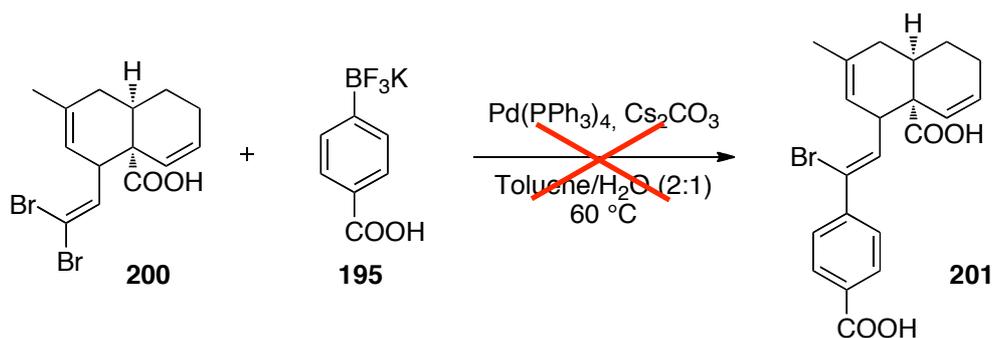


Schéma 94 Tentative de couplage de Suzuki dans les conditions de Molander sur la *cis*-décaline **200**

Cette approche reste cependant valable, une nouvelle optimisation de la voie de synthèse pourrait permettre d'obtenir une plus grande quantité du composé **200** pour cribler d'autres conditions de couplage et réaliser le di-couplage espéré.

3.4.2.4 Conclusion et perspectives

Un châssis moléculaire pouvant conduire aisément à la fonctionnalisation de la partie Sud de la meiogynine A **2** a été synthétisé. Les premiers essais de couplage n'ont pas été concluants mais le concept reste cependant valable. En effet, un autre type de châssis moléculaire **203** présentant un groupement hydroxyle en 1' pourrait être élaboré. La synthèse de précurseurs comme **202** a déjà été réalisée au laboratoire et pourrait permettre une fonctionnalisation de la partie Sud de la meiogynine A **2** par création de liaisons éthers ou esters sur la molécule **203** (Schéma 95).

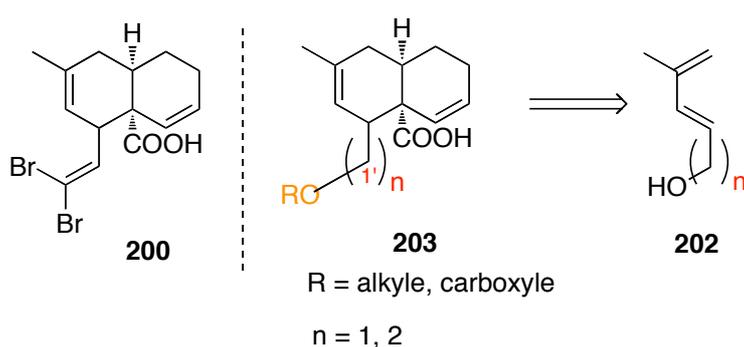


Schéma 95 Développement possible des châssis moléculaires **200** et **203**

D'autre part, une équipe chinoise a publié très récemment une méthode de formation de di-halogénoalcènes.¹⁵³ Ils ont démontré que la réaction est extrêmement régio et stéréosélective et conduit aux produits désirés avec d'excellents rendements (Schéma 96).

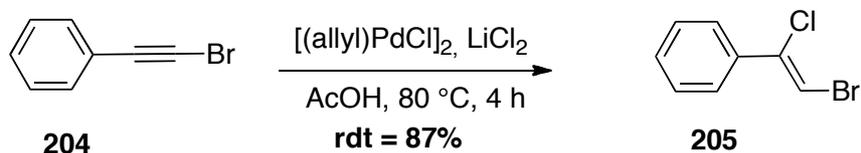


Schéma 96 Exemple de la méthode de di-halogénéation d'oléfines

Cette réaction pourrait être utilisée dans notre cas. Le bromo-alkyne **207** pourrait être synthétisé en présence de *n*-BuLi et de N-bromosuccinimide (NBS)¹⁵⁴. Son analogue chloré serait obtenu en utilisant du chlorure de benzenesulfonyle dans le THF et l'hexane (Schéma 97).¹⁵⁵ Le dihalogénoalcène **208** pourrait être obtenu en utilisant la méthode présentée précédemment. Un premier couplage avec la *cis*-décالية **210** (provenant d'une Diels-Alder entre **198** et **122** dont la synthèse a déjà été réalisée au laboratoire avec un excellent ratio *endo/exo* mais des rendements optimisables) devrait conduire au composé **211** qui, après un second couplage conduirait aux composés **212**. Une autre approche serait de réaliser un premier couplage de Suzuki pour former le triène **209** qui après une réaction de Diels-Alder pourrait conduire au composé **211**. La différence de réactivité des atomes d'halogènes devrait permettre ces doubles couplages séquentiels.

¹⁵³ Zhu, G. ; Chen, D. ; Wang, Y. ; Zheng, R., *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 5796-5798

¹⁵⁴ Sud, D. ; Wigglesworth, T. J. ; Branda, N. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 8017-8019

¹⁵⁵ Cahiez, G. ; Gager, O. ; Buendia, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1278-1281

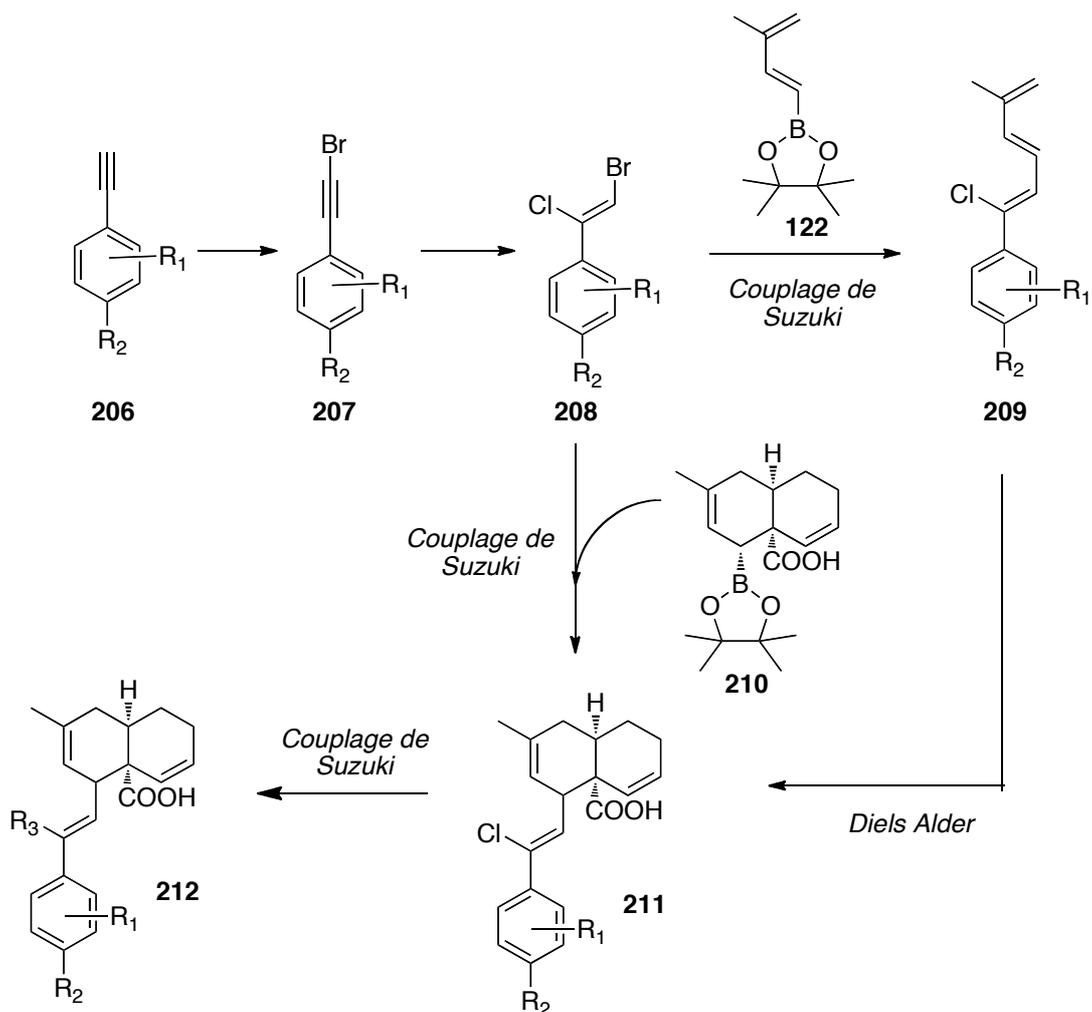


Schéma 97 Fonctionnalisation envisagée de la partie Sud de la meigynine A 2

3.5 Conclusion.

En résumé, en vue d'apporter une modification à la partie Sud de la meigynine A 2, les deux triènes **123** et **124** de configuration (*E,E*) ont été synthétisés avec de très bons rendements (**60%** sur deux étapes et **53%** sur trois étapes respectivement). Cependant, l'introduction d'hétéroatomes sur les cycles aromatiques de ces triènes n'a pas donné de résultats concluants (Schéma 98).

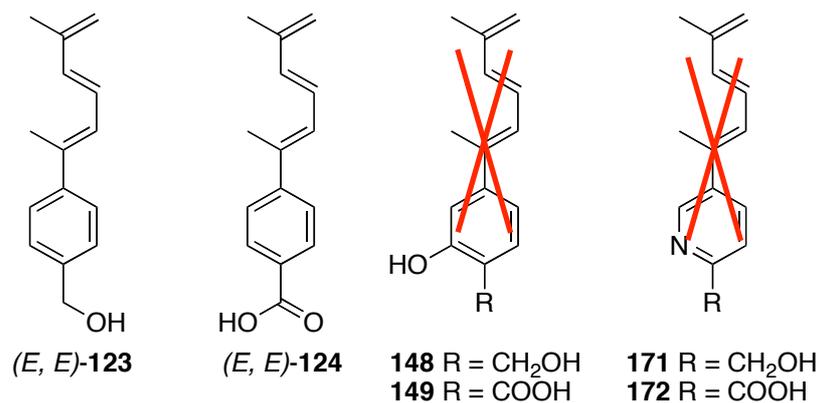


Schéma 98 Triènes synthétisés

Les triènes obtenus ont ensuite été utilisés dans des réactions de Diels-Alder avec différents diénophiles afin de conduire à de multiples analogues de la meiogynine A **2**. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus sur cibles biologiques, en RMN et modélisation moléculaire, seront présentés au chapitre suivant.

Chapitre 4

4 Réaction de Diels-Alder et résultats biologiques

4.1 La réaction de Diels-Alder

4.1.1 Rappel bibliographique

4.1.1.1 Conditions thermiques

La réaction de Diels-Alder est un outil puissant de la synthèse organique comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 1.2.4. Elle fut découverte par le professeur Otto Diels et son étudiant Kurt Alder en 1928.^{156,157} Ils ont mis en évidence la formation des composés **216** (mono-adduit) et **218** (di-adduit) par condensation du cyclopentadiène **213** et de la quinone **214** (Schéma 99). Dès cette époque, ils avaient perçu l'impact que cette réaction aurait en synthèse organique.

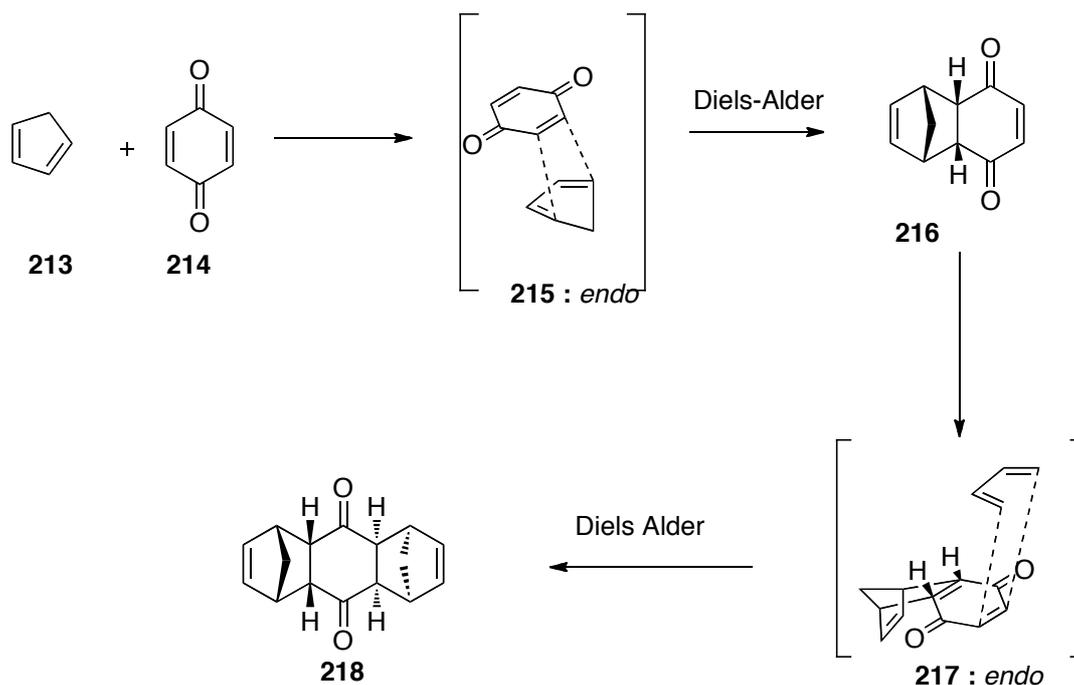


Schéma 99 La réaction découverte par Diels et Alder en 1928

¹⁵⁶ Diels, O. ; Alder, K., *Justus Liebigs Ann. Chem*, **1928**, 460, 98-122

¹⁵⁷ Pour des revues sur le sujet voir : Corey, E. J. ; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1650-1667 ; Nicolaou, K. C. ; Snyder, S. A. ; Montagnon, T. ; Vassilikogiannakis, G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1668-1698

L'efficacité de cette réaction réside dans sa capacité à conduire aisément à des produits cycliques complexes et à créer de façon contrôlée plusieurs centres asymétriques simultanément. Elle a été utilisée de manière extensive pour la synthèse totale de composés naturels. Par exemple, Woodward, dans sa synthèse de la cortisone et du cholestérol,¹⁵⁸ a utilisé une cycloaddition entre la quinone **219** et le butadiène pour former le bicycle **221** via un état de transition **220** *endo*, avant épimerisation en dérivé **222** (Schéma 100).

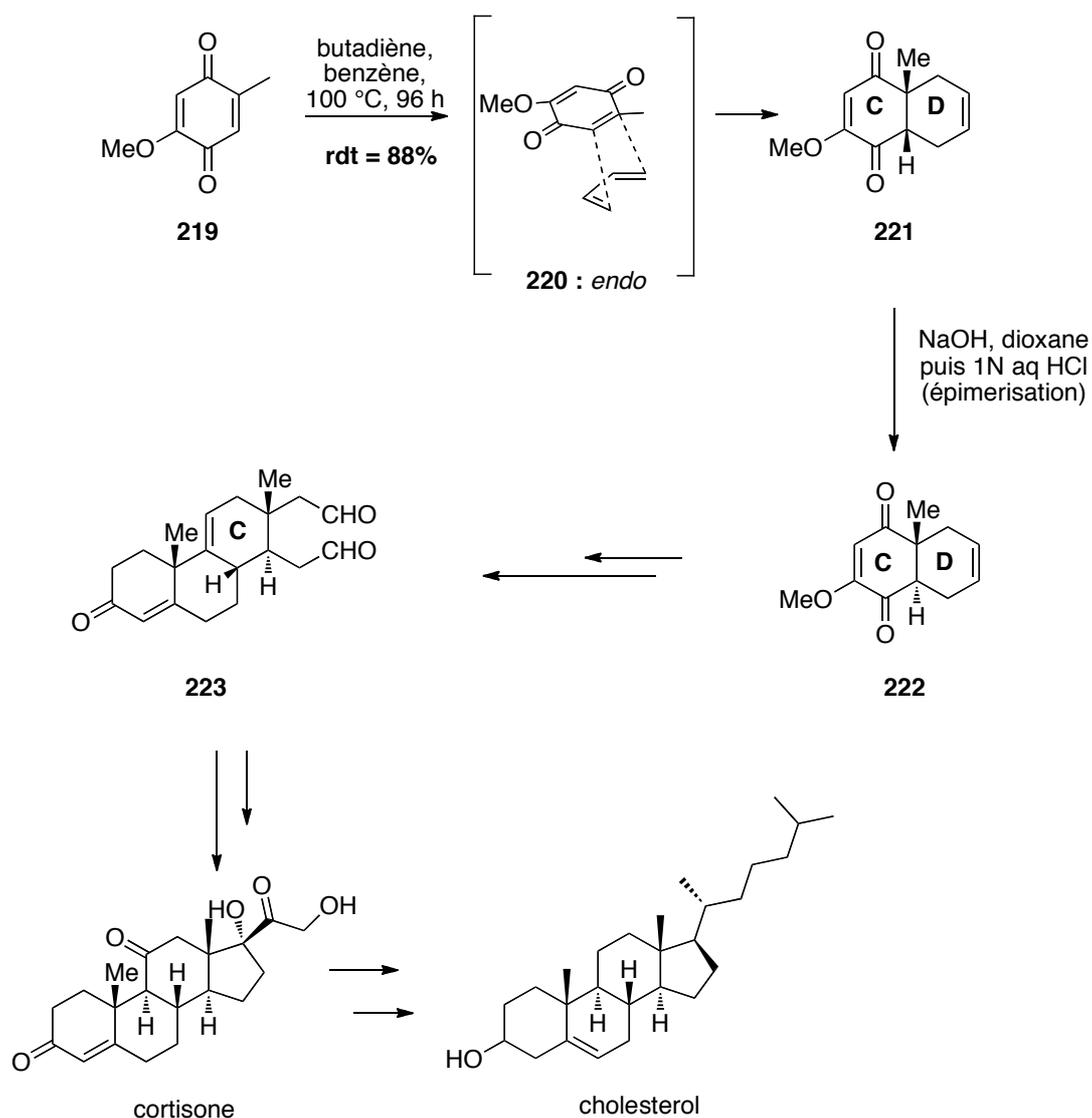


Schéma 100 Synthèse de la cortisone et du cholestérol par Woodward

¹⁵⁸ Woodward, R. B. ; Sondeinheimer, F. ; Taub, D. ; Heusler, K. ; Mclamore, W. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 4223-4251

De nombreux composés aux structures extrêmement complexes ont été synthétisés grâce à cette réaction.^{159,160,161,162} qui peut être effectuée par voie thermique ou à l'aide d'un catalyseur. C'est cette deuxième alternative, largement développée ces dernières années, qui va nous intéresser.¹⁶³

4.1.1.2 Conditions catalytiques

Il existe un nombre considérable de catalyseurs utilisés pour cette réaction.^{163,164} Ils sont de natures très variées (amines primaires, secondaires, alcaloïdes de cinchona, carbènes, acides de Lewis, etc...) et permettent de réaliser, dans certains cas, des réactions énantiosélectives.

4.1.1.2.1 Cycloaddition de Diels-Alder catalysée par des acides de Lewis

En 1963, Walborsky *et coll* ont découvert que la réaction de Diels-Alder pouvait être efficacement catalysée par des acides de Lewis.¹⁶⁵ Depuis, ce champ d'application a été énormément développé.^{163,166,167}

Dans l'exemple présenté sur le Schéma 101, le chlorure de zinc permet d'obtenir les composés **226** et **227** avec un excellent rendement (**90%**) à température ambiante.¹⁶⁸ La sélectivité faciale observée dépend de la taille de la chaîne aliphatique portée par le diénophile **224**. Plus celle-ci est longue plus la formation de **226** est favorisée (Schéma 101 et Tableau 15).

¹⁵⁹ Deng, J. ; Zhu, B. ; Lu, Z. ; Yu, H. ; Li, A., *J. Am. Chem.Soc.*, **2012**, *134*, 920–923

¹⁶⁰ Liu, P. ; Jacobsen, E. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 10772-10773

¹⁶¹ Dossetter, A. G. ; Jamison, T. F. ; Jacobsen, E. N., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *111*, 2549-2552

¹⁶² Miyaoka, H. ; Abe, Y. ; Sekiya, N. ; Mitome, H. ; Kawashima, E., *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 901-903

¹⁶³ Pour des livres sur le sujet voir : Fringuelli, F. ; Tattichi, A. ; *The Diels-Alder reaction : Selected Practical Methods*, **2002** ; Ishihara, K. ; Sakakura, *Science of Synthesis, Stereoselective synthesis*, ed. Evans, P. A, Thieme, **2011**, *3*, 67-123

¹⁶⁴ Merino, P. ; Marques-Lopez, E. ; Tejero, T. ; Herrera, R. P. ; *Synthesis*, **2010**, *1*, 1-26

¹⁶⁵ Walborsky, H.M ; Barash, L. ; Davis, T. C., *Tetrahedron*, **1963**, *19*, 2333

¹⁶⁶ Pindur, U. ; Lutz, G. ; Otto, C., *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 741-761

¹⁶⁷ Evans, D. A. ; Johnson, J. S., *Comprehensive Organic Catalysis* ; Jacobsen, E. N. ; Pfaltz, A. ; Yamamoto, H., Eds. ; Springer, Berlin, **1999**, 1177

¹⁶⁸ Liu, H. J. ; Han, Y., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 423-426

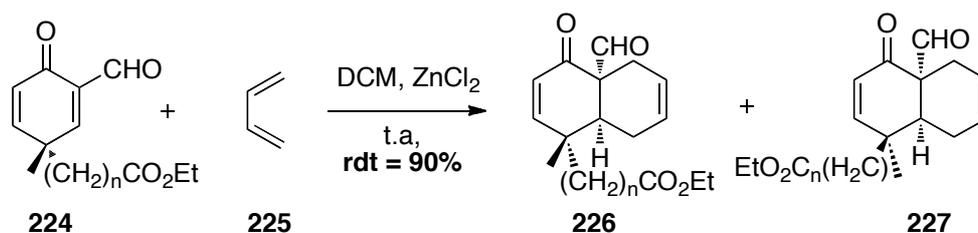


Schéma 101 Réaction de Diels-Alder catalysée par du chlorure de zinc

Tableau 15 Ratios 226/227 obtenus pour les cycloadditions entre les composés 224 et 225

Entrée	224 (n)	Ratio 226/227
1	0	0 : 100
2	1	63 : 37
3	2	84 : 16

Les acides de Lewis permettent également de favoriser dans certains cas la formation l'isomère minoritaire obtenu dans une réaction de Diels-Alder en conditions thermiques.¹⁶⁹ L'utilisation de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ dans la réaction de Diels-Alder entre l'isoquinoline **228** et le pentadiène **229** conduit préférentiellement à l'isomère **230** grâce à un meilleur recouvrement des orbitales secondaires HOMO du pentadiène avec les orbitales LUMO du complexe catalyseur-diéophile (Schéma 102).

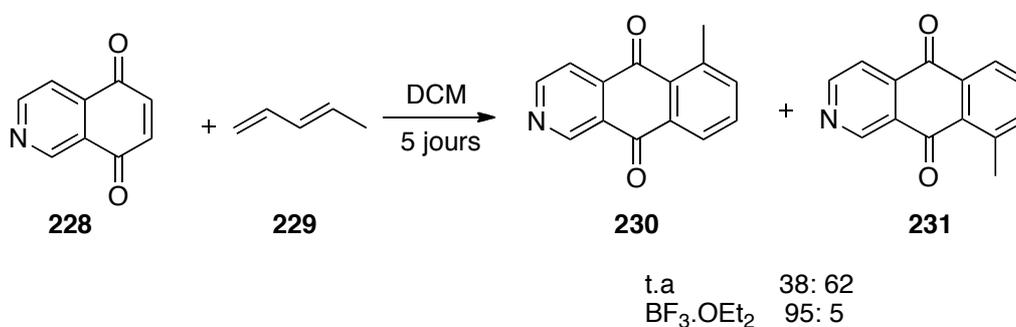


Schéma 102 Cycloadditions de Diels-Alder entre l'isoquinoline **228** et le diène **229**

Ces catalyseurs améliorent aussi parfois la cinétique de la réaction et permettent de la réaliser à des températures plus modérées. Ainsi, l'équipe de Meyers a utilisé du dichlorure de zinc pour catalyser la réaction entre le lactame bicyclique **232** et différents

¹⁶⁹ Beifuss, U. ; Tarasewski, M. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 2907

diènes **233** (Schéma 103).¹⁷⁰ Le Tableau 16 révèle que l'introduction de l'acide de Lewis permet de diminuer la température ainsi que le temps de réaction dans le cas où R est un groupement méthyle (entrées **1** et **2**). Le catalyseur permet aussi de diminuer la température lorsque R est un groupement aliphatique plus encombrant mais dans ce cas la cinétique de la réaction est diminuée (entrées **3** et **4**). Dans l'ensemble des cas, l'acide de Lewis favorise la formation du composé **234** (composé *endo*) avec des rendements équivalents à ceux obtenus sans catalyseur.

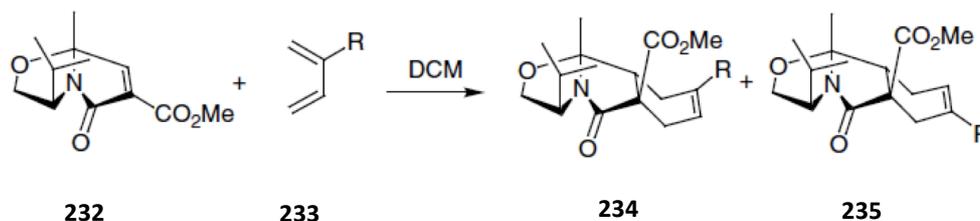


Schéma 103 Réaction de Diels-Alder entre les dérivés **232** et **233**

Tableau 16 Conditions de cycloadditions entre le composé **232** et les diènes **233**

Entrée	R	Cat	T (°C)	t (h)	234/235	Rdt (%)
1	Me	-	60	24	2	74
2	Me	ZnCl ₂	0	4	25	71
3		-	60	18	2,3	75
4		ZnCl ₂	0	36	15,2	66

Les acides de Lewis sont donc des outils précieux agissant sur la sélectivité et la cinétique de la réaction de Diels-Alder

4.1.1.2.2 Organocatalyse

Certains organocatalyseurs, comme le catalyseur de MacMillan **83** (voir 2.3.1.2) sont utilisés dans les réactions de cycloaddition.^{171,172} Par exemple, dans la synthèse totale de la solanapyrone D, MacMillan a développé une réaction de Diels-Alder intramolécule

¹⁷⁰ Meyers, A. I. ; Busacca, C. A., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 6977-6980

¹⁷¹ Lelais, G. ; MacMillan, D. W. C., *Aldrichimica Acta*, **2006**, 39, 79-87

¹⁷² Pour de récentes utilisations : Mossé, S. ; Alexakis, A., *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3577-3580 ; Hayashi, Y. ; Samanta, S. ; Gotoh, H. ; Ishikawa, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 6634-6637

catalysé par **83** pour conduire au bicyclic **237** à partir de l'aldéhyde linéaire **236** (Schéma 104).¹⁷³ L'imine transitoire formée par le catalyseur **83** et l'aldéhyde **236** permet de diminuer l'énergie de la LUMO du diénophile et de favoriser la réaction. Sa sélectivité est excellente (**dr** > **20 :1** et **ee** = 90%) et le dérivé **237** est obtenu avec un très bon rendement (**71%**). Le catalyseur **83** permet de réaliser la réaction à basse température (5 °C) et conduit sélectivement à la solanapyrone D naturelle produite dans le champignon par une Diels-Aldérase (voir 1.2.3.5).

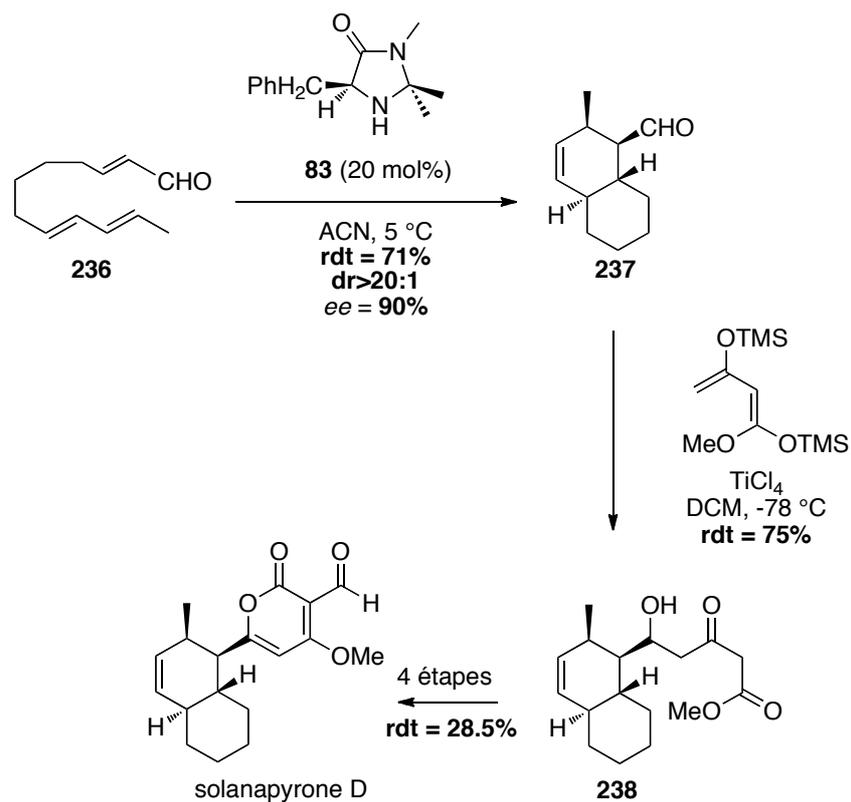


Schéma 104 Synthèse totale de la solanapyrone D par MacMillan

¹⁷³ Wilson, R. M. ; Jen, W. S. ; MacMillan, D. W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11616-11617

4.1.1.2.3 Réaction de Diels-Alder catalysée par des acides boroniques

Les travaux de Hall montrent que des acides boroniques aromatiques comme **239** (*ortho*-iodophényle) et **199** (*ortho*-bromophényle) pouvaient être utilisés en tant que catalyseurs dans les réactions de Diels-Alder avec des diénophiles acides (Schéma 105).¹⁵² Ces réactions étaient jusqu'à présent difficiles à réaliser. Les acides boroniques se lient avec le carbonyle du diénophile qui, appauvri en électrons, devient plus réactif.

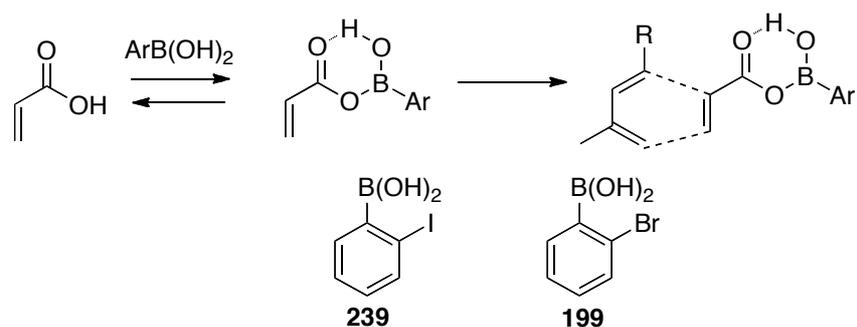


Schéma 105 Exemple de réaction de Diels-Alder catalysée par un acide boronique

Il a été démontré que cette méthode était applicable à des diénophiles acides carboxyliques α,β -insaturés mais aussi à des alcynes.¹⁷⁴ Les réactions sont réalisées à températures ambiantes (25-30 °C) dans le dichlorométhane (Schéma 106). Les composés **242** et **244** ont été obtenus avec d'excellents rendements à partir des diénophiles **241** et **243** et du diméthylbutadiène **240**.

¹⁷⁴ Zhen, H. ; Hall, D. G., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 3561-3564

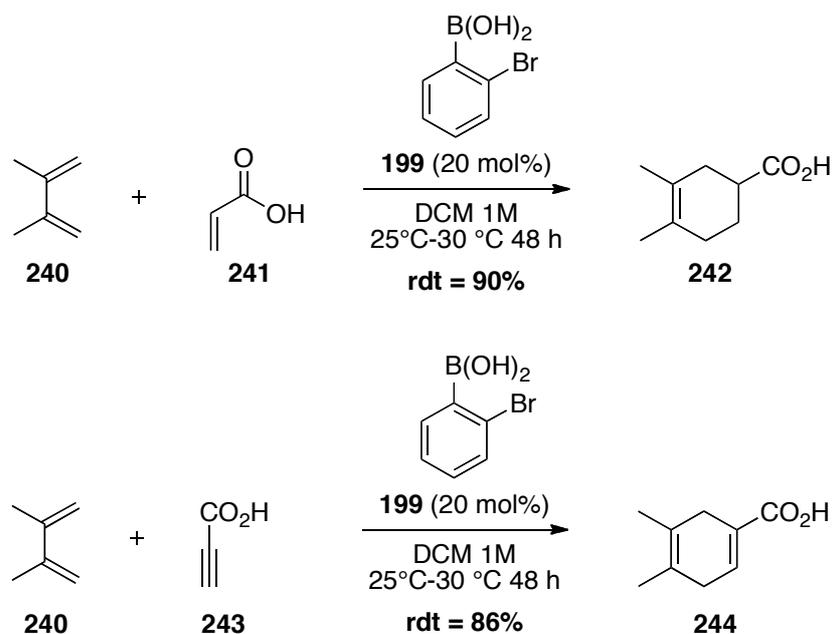


Schéma 106 Application de la méthode de Hall pour les cycloadditions en présence d'acide boronique

Cette méthode permet donc de réaliser des réactions de Diels-Alder dans des conditions douces avec différents diénophiles (acides carboxyliques α,β -insaturés ou alcynes). Ces conditions permettent de palier aux problèmes de dégradation des substrats de départ rencontrés lors des réactions de Diels-Alder réalisées par voie thermique.

4.1.2 Résultats antérieurs

La réaction de Diels-Alder est un outil de choix pour la synthèse totale du fait de son « économie d'atomes » et de la sélectivité dont elle fait preuve. La configuration relative du groupement R_3 est imposée par l'adduit *endo* ou *exo* (Schéma 107).

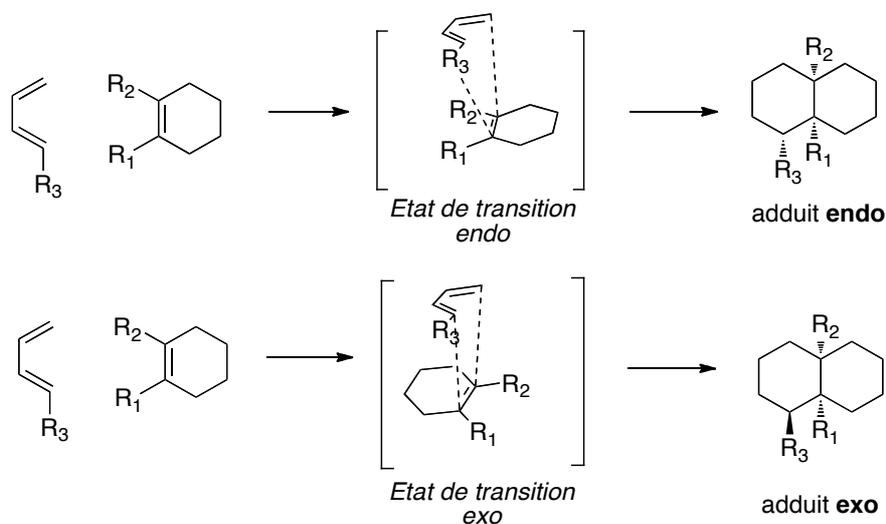


Schéma 107 Etat de transition modèle *endo* et *exo*

La meiogynine A **2** étant un adduit *endo*, tous les substituants sont en *syn* par rapport au bicyclic. Au laboratoire, après avoir obtenu les composés **16** et **17a-d**, la réaction de Diels-Alder a été effectuée dans les conditions décrites par Hall.¹⁵²

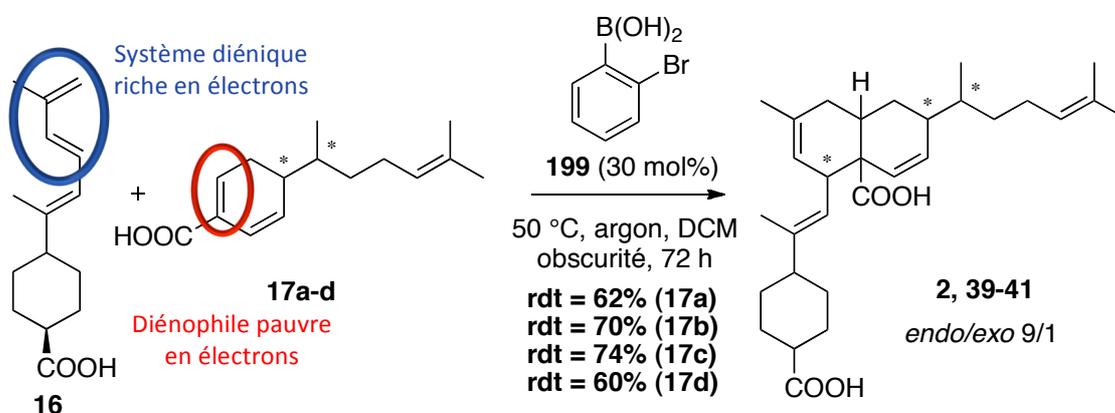


Schéma 108 Réaction de Diels-Alder réalisées pour l'obtention de la meiogynine A **2**⁵²

Les conditions ont été optimisées et la réaction a été menée à 50 °C dans l'obscurité à cause de la photosensibilité du substrat **16**. Les rendements obtenus sont compris entre **60** et **74%** avec un *ratio endo/exo* de 9:1 (Schéma 108). La régiosélectivité de la réaction s'explique la richesse du système diénique du triène **16** (entouré en bleu) qui réagit avec le diénophile (entouré en rouge) appauvri en électrons par la chélation de l'acide carboxylique par l'acide boronique **199**.

4.1.3 Résultats personnels

Nous avons vu dans les chapitres précédents, la mise au point de la synthèse des diénophiles **17** ainsi que des nouveaux triènes **123**, **124**. Ces précurseurs ont été mis en réaction pour former des analogues de la meiogynine A **2** par réaction de Diels-Alder. Les conditions de Diels-Alder ont d'abord été mises au point avec le diénophile simplifié **198**, plus facile d'accès.

4.1.3.1 Mise au point des conditions de la réaction de Diels-Alder

Le triène **124** et le diénophile **198** ont été mis en réaction pour conduire au composé simplifié **245** (Schéma 109 et Tableau 17).

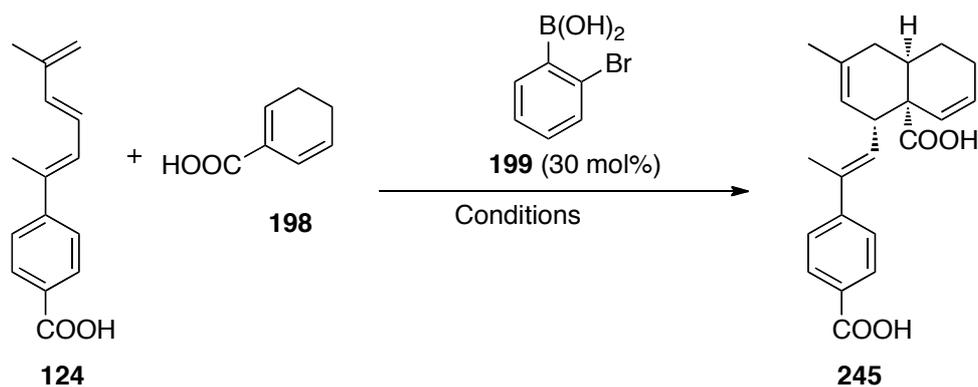


Schéma 109 Formation de l'adduit **245** par réaction de Diels-Alder entre le triène **124** et le diénophile **198**

Tableau 17 Conditions testées pour la formation de la décaline **245**

Entrée	Conditions	245 – rdt (%)
1	DCM, 50 °C, 15 jours	20% (50% de conversion)
2	Toluène, 50 °C, 15 jours	dégradation

Deux solvants différents ont été testés pour cette réaction. Dans le toluène en 15 jours à 50 °C, le produit de départ **124** s'est dégradé et un mélange de produits non identifiables et non séparables a été obtenu. En revanche, dans le dichlorométhane, la réaction a conduit à l'obtention du produit **245**. Cependant la conversion n'est pas totale et le rendement après purification n'est que de **20%**. La dégradation observée et la mauvaise conversion suggèrent que le composé **124** n'est pas assez réactif vis-à-vis du diénophile **198** et se dégrade au cours du temps sous l'effet de la température. Le composé **198**, en revanche, ne semble pas se dégrader, ni s'aromatiser dans ces conditions.

La réaction de Diels-Alder a été envisagée avec le triène **123**. En effet, celui-ci devrait réagir plus rapidement que le triène **124** car un groupement hydroxyle est moins électro-attracteur qu'un acide carboxylique. Le système diénique devrait être plus riche en électrons et plus réactif. Les différents essais sont regroupés dans le Tableau 18.

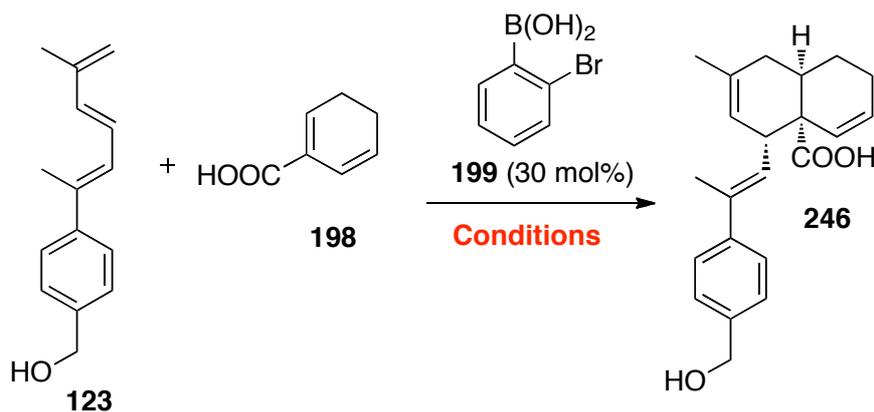


Tableau 18 Criblage des conditions pour la réaction de Diels-Alder entre les dérivés **123** et **198**

Entrée	Solvant	Température (°C)	Temps	Conversion	246 (rdt%)
1	DCM	50	14 jours	60%	/
2	Toluène	50	8 jours	100%	29
3	Benzène	60	8 jours	100%	65
4	DCE	60	8 jours	100%	64

Le dichlorométhane ne semble pas adapté pour la réaction de Diels-Alder car il solubilise difficilement le composé **123** et la conversion n'est pas totale après 14 jours (entrée **1**). Le toluène conduit à une conversion totale après 8 jours (entrée **2**) mais le rendement n'est que de **29%**. Les réactions réalisées dans le benzène et le DCE conduisent au composé **246** avec de bons rendements de **65** et **64%** respectivement. Le composé **246** a été obtenu avec un ratio *endo/exo* de 85/15 (déterminé par intégration des protons caractéristiques de **123** et **246** sur le spectre RMN ¹H du brut réactionnel).

La conversion du triène **123** est totale et les rendements sont bons même si le temps de réaction est plus long que dans le cas de la meiyogynine A **2** (72 heures). Ces conditions ont été appliquées aux diénophiles **17a-d**.

4.1.3.2 Application à la réaction de Diels-Alder aux diénophiles chiraux 17

Le premier essai de cycloaddition de Diels-Alder entre le diénophile **17a** et le triène acide **124** a été réalisé en parallèle de la mise au point des conditions sur le composé simplifié **246** (Schéma 111). Il a permis d'isoler le composé **247a** désiré après un mois de réaction. La mauvaise conversion explique les faibles quantités isolées.

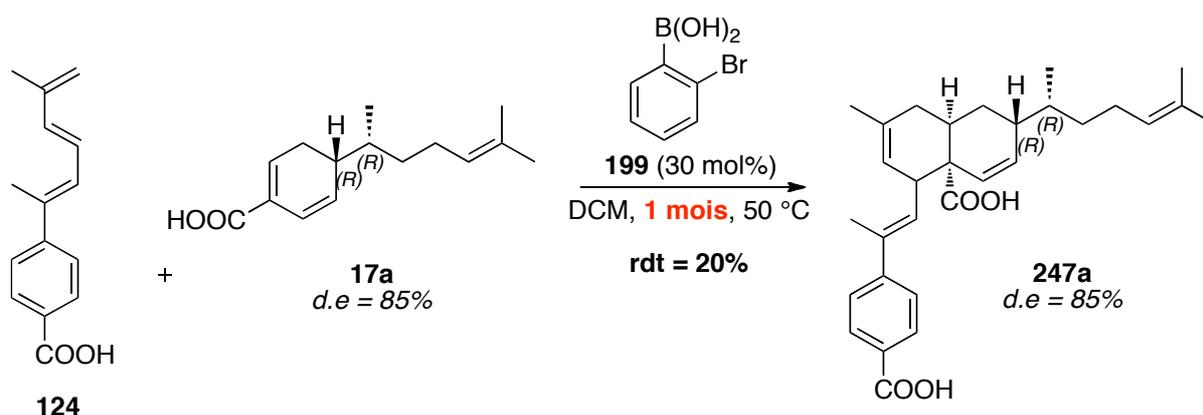


Schéma 111 Premier essai de réaction de Diels-Alder avec le mélange des diénophiles **17a-b**

La réaction de Diels-Alder entre le triène **123** et les diénophiles **17a** et **17c** a ensuite été réalisée en appliquant les conditions utilisées pour la synthèse du composé **246** (Schéma 112). Cependant les réactions réalisées dans le benzène ont donné de mauvais rendements (**19%** et **26%**), c'est pourquoi des essais dans le toluène ont été réalisés.

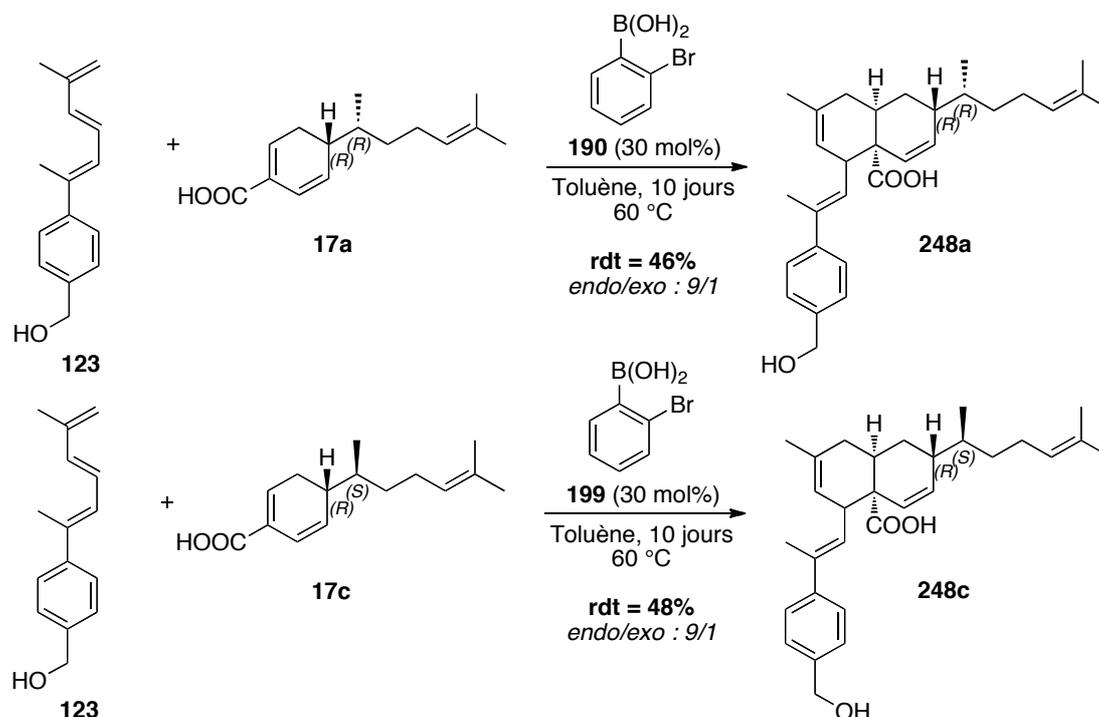


Schéma 112 Obtention des composés **248a** et **248c** par cycloadditions de Diels-Alder

Les réactions ont été réalisées dans le toluène avec le triène **123** et les diénophiles **17a** et **17c**. Les rendements sont bons. La sélectivité faciale est totale en *anti* de la chaîne latérale des diénophiles. Le ratio *endo/exo* est très bon et similaire à celui obtenu pour la meiogynine A **2**. L'état de transition présenté dans la Figure 42 explique la sélectivité faciale observée en faveur du composé *endo*.

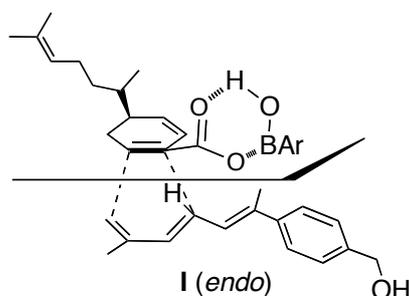


Figure 42 Sélectivité faciale de la réaction de Diels-Alder

4.1.3.3 Obtention des analogues aromatiques de la meiogynine A

Différentes conditions d'oxydations de l'alcool benzylique en acide carboxylique ont été criblées afin d'aboutir aux deux analogues désirés. Ces conditions ont été testées en parallèle sur les *cis*-décaldines **246** et **248c** (Schéma 113). Les conditions criblées sont regroupées dans le Tableau 19.

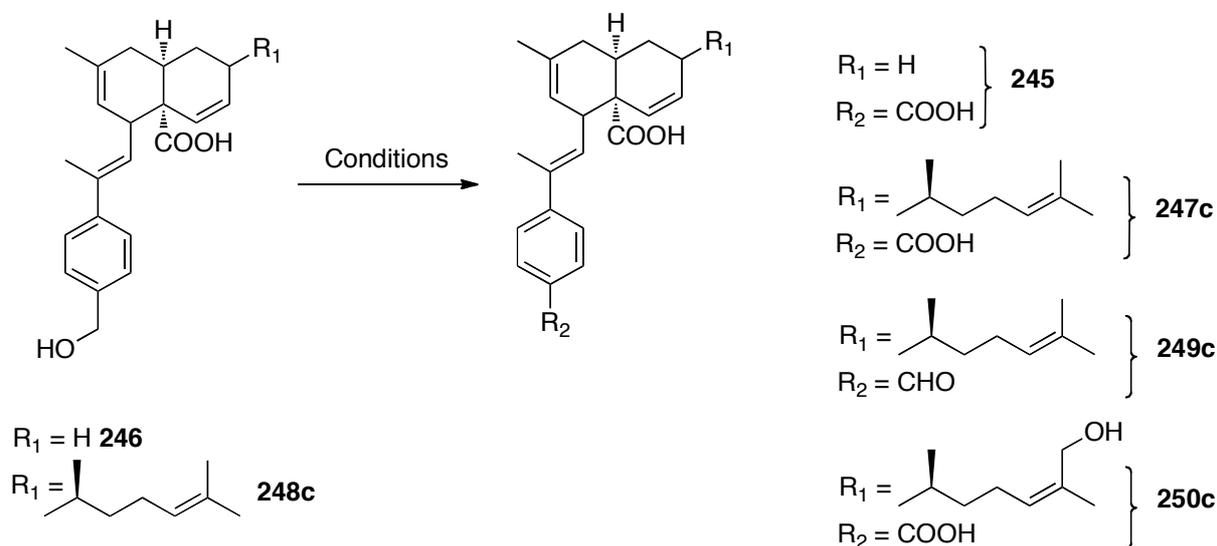


Schéma 113 Mise au point des conditions d'oxydations des alcools **246** et **248c**

Tableau 19 Conditions d'oxydations

Entrée	Produit de départ	Conditions	Produit d'arrivée
1	246	Pd/C, NaBH ₄ , H ₂ O, KOH, MeOH, O ₂ (air) ¹⁷⁵	/
2	246	PCC, H ₅ IO ₆	245 (30%)
3	246	Swern/CuCl, ACN, tBuOOH t.a. ¹⁷⁶	Dégradation
4	248	Pd/C, NaBH ₄ , H ₂ O, KOH, MeOH, O ₂ (air)	Dégradation
5	248	PCC, H ₅ IO ₆	Dégradation et traces de 250c
6	248	Swern/Pinnick	249c (N.D)
7	248	Réactif de Jones, Acétone, 1 h	247c (90%)

Un premier criblage a été réalisé sur le composé simplifié **246**. Des conditions douces utilisant l'oxygène de l'air comme oxydant n'ont pas conduit aux composés **245** et **247c** (entrées **1** et **4**). L'utilisation du PCC (entrée **2**) a permis d'observer la formation de l'acide carboxylique **245** avec un rendement modeste. Pour l'oxydation du composé **248c** (entrée **5**), ces conditions ont conduit à la dégradation du produit de départ accompagné de traces du dérivé **250c**. Ce dérivé a été visualisé sur le spectre RMN ¹H du brut réactionnel et confirmé par LC-MS sans être isolé.

L'aldéhyde **249c** a été obtenu par la méthode de Swern (entrée **6**) mais son oxydation en acide carboxylique **247c** par une réaction Pinnick n'a pas aboutie. L'utilistion du réactif de Jones a, par contre, conduit au composé cible **247c** (entrée **7**) indiquant qu'il faut utiliser des conditions drastiques pour oxyder l'alcool benzylique. Si l'on compare les entrées **5** et **7**, il semblerait que le chlorochromate de pyridinium permette l'oxydation de l'acide benzylique, mais que la présence d'acide periodique entraîne une suroxydation du composé au niveau de la chaîne latérale. A l'avenir, il pourrait être intéressant d'utiliser ces conditions (PCC, H₅IO₆) pour vérifier leur reproductibilité et accéder à d'autres analogues de la meiogynine A **2**.

¹⁷⁵ Chen, W. W.; Bi, H. P.; Li, C. J., *Synlett*, **2010**, 3, 477-485

¹⁷⁶ Mannam, S. ; Sekar, G., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 1083-1086

Ce sont finalement les conditions d'oxydation de Jones qui ont permis d'obtenir les analogues aromatiques de la meiogynine A **2**, **247a** et **247c**, avec des rendements de **85%** et **90%** respectivement (Schéma 114).

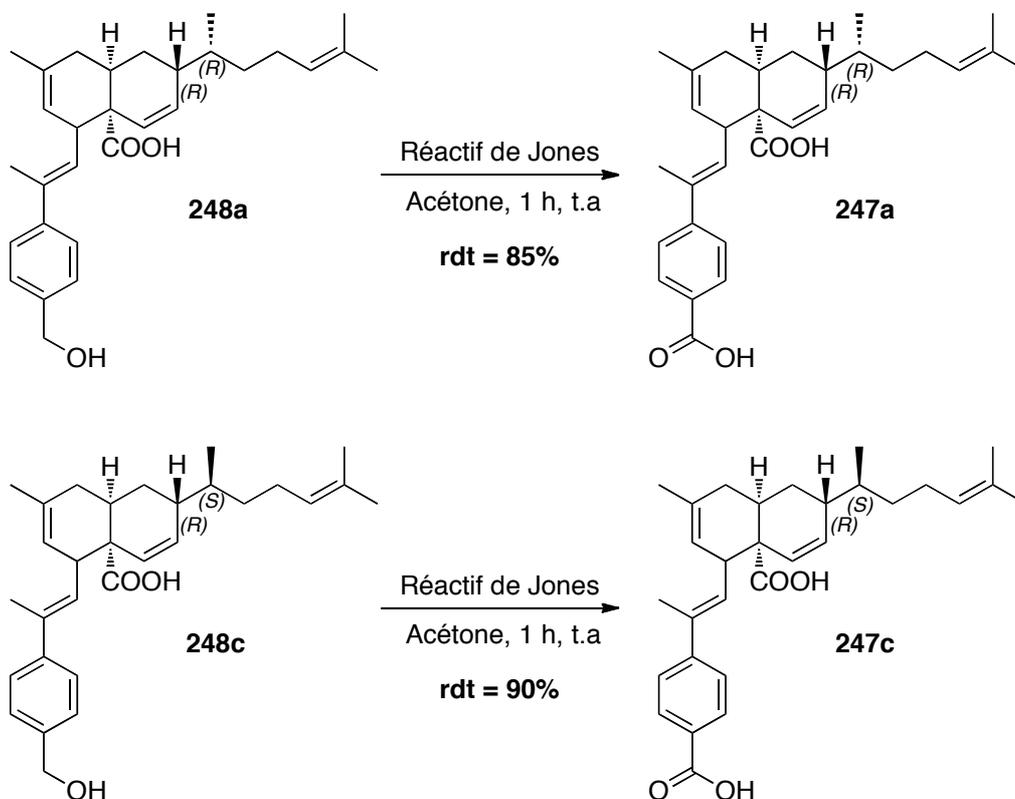


Schéma 114 Oxydation des *cis*-décalsines **248** en acide carboxylique.

Les composés **247a** et **247c** ont été séparés de leur diastéréoisomère minoritaire par chromatographie SFC semi-préparative (colonne IA, 40 °C, 150 bars, 15% MeOH, Figure 43).

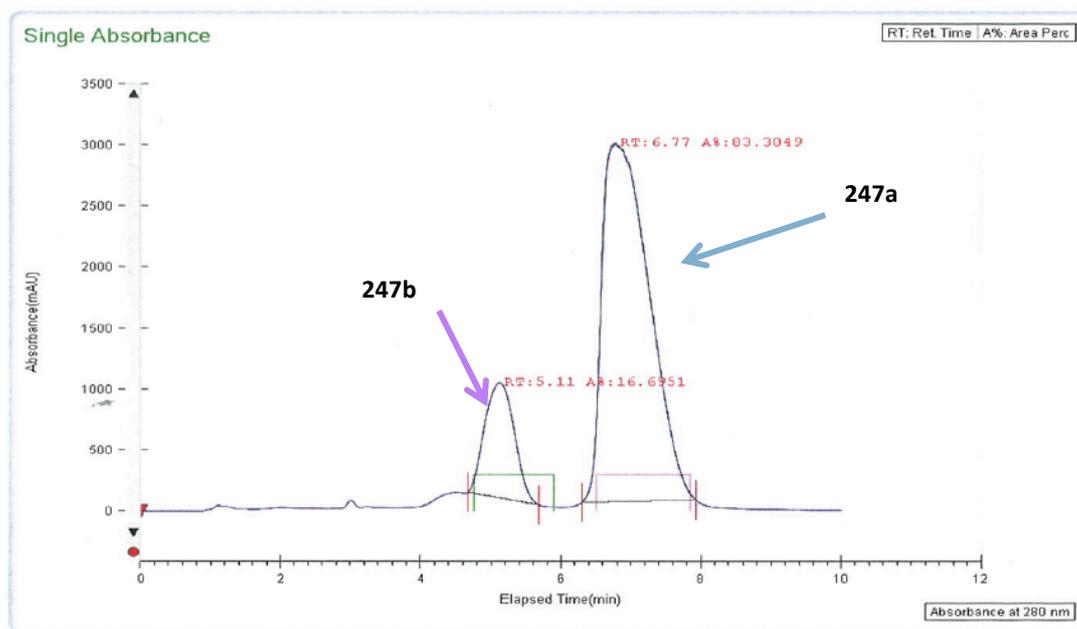


Figure 43 Chromatogramme SFC, séparation des composés **247a** et **247b**

Ces bons résultats confirment et justifient notre choix d'utiliser le triène alcool **123** rapport au triène acide carboxylique **124**. Dans le cas du triène **123** la réaction de Diels-Alder a permis d'obtenir les *cis*-décalsines **247** avec des rendements de **39%** et **43%** sur deux étapes. L'utilisation du triène **124** a conduit à l'obtention du composé **247** avec un rendement de **20%** et une conversion partielle. Il apparaît donc préférable d'utiliser le triène alcool **123** qui est plus riche en électron que le triène acide **124** et qui est donc plus réactif.

4.1.3.4 Synthèse d'analogues simplifiés

En parallèle, des analogues simplifiés au niveau de la partie Sud et de la partie Est de la meiogynine A **2** ont été synthétisés. Ces analogues pourraient apporter des informations sur le rôle de chaque partie de la meiogynine A **2** lors de sa fixation à la protéine Bcl-xL. Le composé simplifié **245** sans chaîne latérale (partie Est) a été décrit lors de la mise au point de la réaction de Diels-Alder. Différents composés ne possédant pas la partie Sud de la meiogynine A **2** ont ensuite été élaborés (Schéma 115). Pour cela, les diénophiles **17a** et **17c**, préalablement purifiés par HPLC, ont été mis en réaction avec du diméthylbutadiène **240** à la place du méthylbutadiène afin d'éviter les problèmes de régiosélectivité.

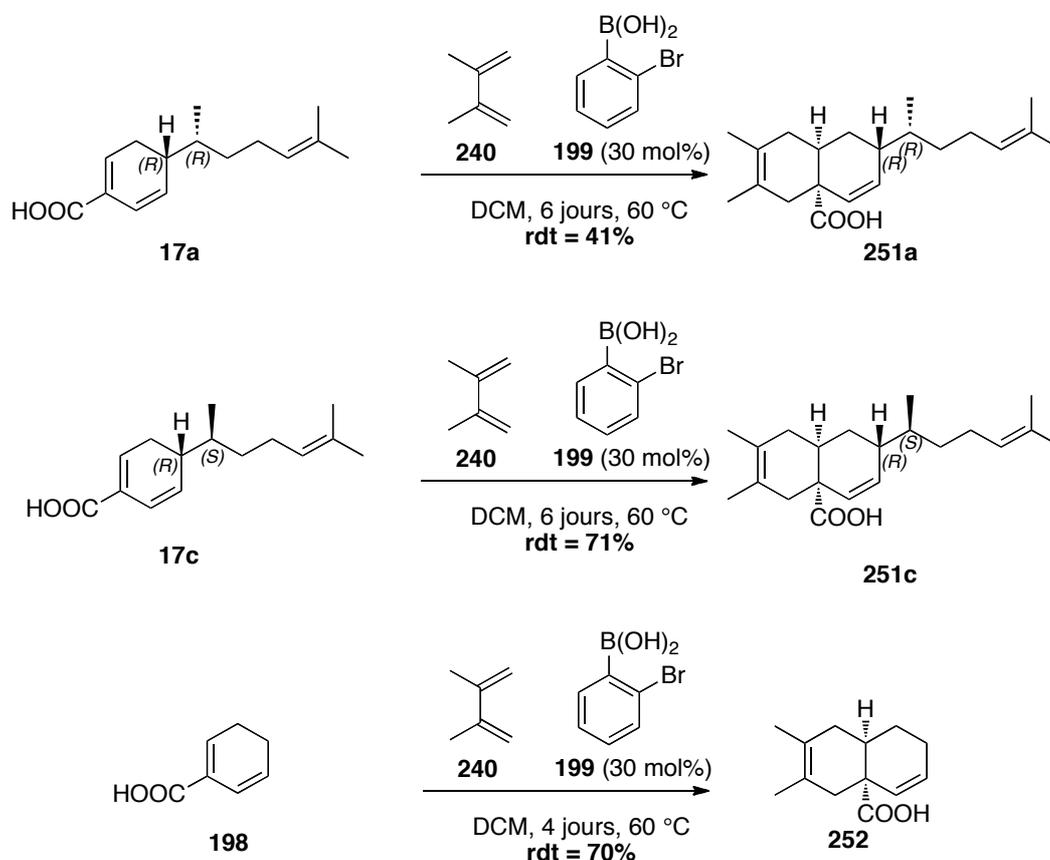


Schéma 115 Obtention des *cis*-décalsines **251a**, **251c** et **252**

Très peu de dégradation a été observée sur l'ensemble des réactions réalisées. En effet, le diméthylbutadiène **240** est volatile et peut être évaporé en fin de réaction conduisant à des bruts réactionnels moins complexes. Les composés **251a** et **251c** ont été obtenus avec des rendements de **41%** et **71%**. La différence de rendement entre les deux composés provient de problèmes rencontrés lors de la purification du composé **251a**.

Résumé : Huit composés analogues de la meiyoginine A **2** ont été synthétisés (Figure 44). Ces dérivés vont permettre de déterminer l'impact et le rôle de chaque partie de la molécule sur l'activité en réalisant une analyse comparative des résultats obtenus en modélisation moléculaire et en RMN.

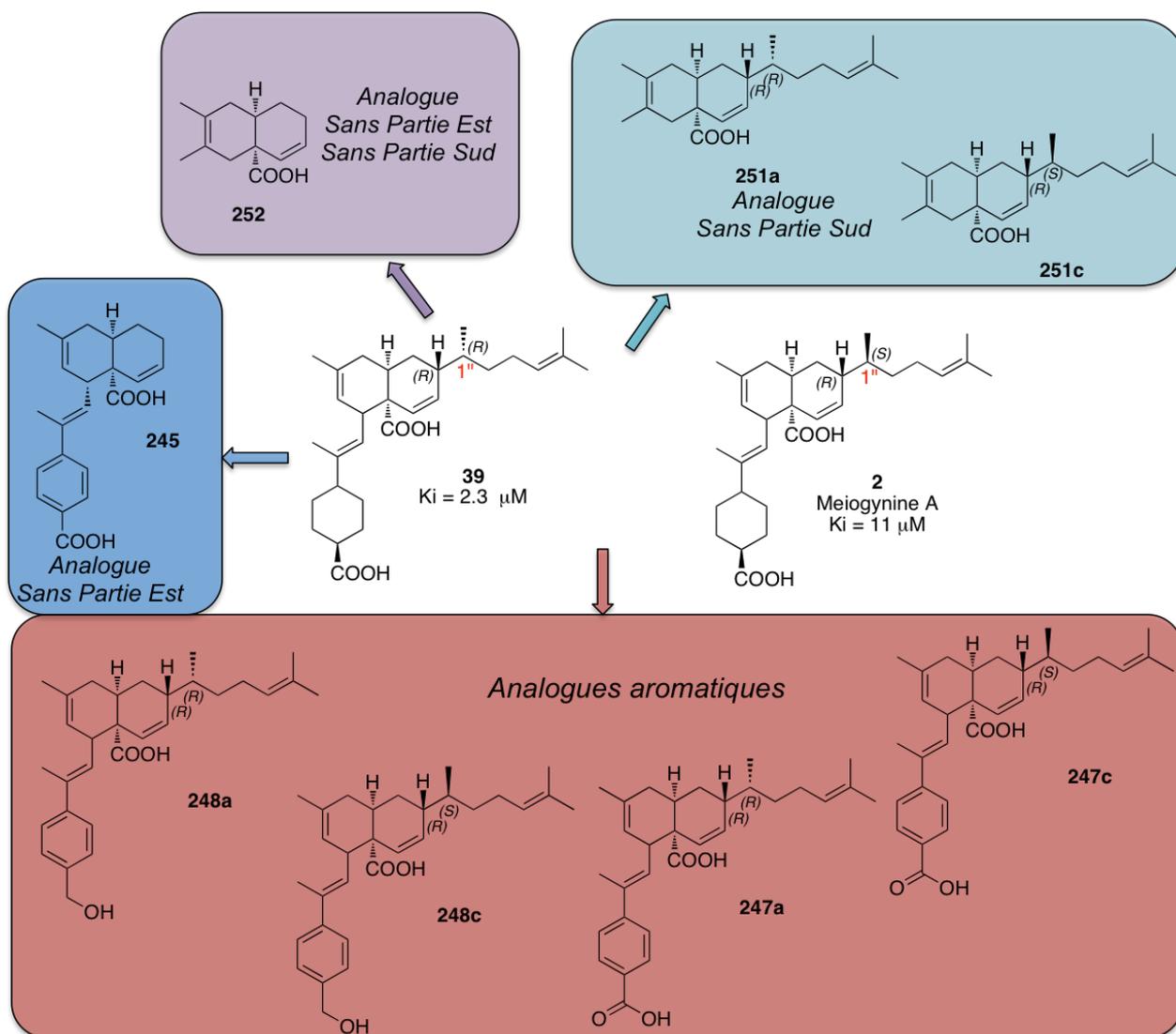


Figure 44 Analogues synthétisés de la meiyoginine A **2** et de son diastéréoisomère **39**

4.2 Résultats biologiques et relation structure activité

4.2.1 Tests biologiques

4.2.1.1 *In vitro*

4.2.1.1.1 Introduction

La meiogynine A **2** et son diastéréoisomère **39** présentent une affinité pour la protéine Bcl-xL. Notre objectif a été de former de nouveaux composés analogues afin d'obtenir des informations sur les relations structure activité. Le test sur Bcl-xL a été réalisé au début de ma thèse dans les laboratoires Servier et a ensuite été développé, au sein du laboratoire, par Charlotte Geny et Vincent Dumontet. Un test sur Mcl-1 est également en cours de mise au point.

4.2.1.1.2 Principe du test *in vitro* sur Bcl-xL

C'est un test de compétition, entre un peptide Bak (Bak-CF, marqué à la fluorescéine, ligand naturel de la protéine Bcl-xL) et un inhibiteur potentiel.^{177,178,179} Il consiste à mettre en solution la protéine Bcl-xL, le peptide Bak-CF et un inhibiteur potentiel de Bcl-xL. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la fluorescence est mesurée.

Le complexe Bcl-xL/Bak est « lourd » et par conséquent tourne lentement dans la solution ce qui conduit à une forte valeur de polarisation. En présence d'un inhibiteur, le peptide Bak-CF est déplacé par l'inhibiteur, il n'est plus lié à la protéine et donc tourne beaucoup plus vite dans le milieu. La rotation rapide diminue l'intensité de l'émission de fluorescence dans les directions privilégiées parallèle et perpendiculaire, ce qui induit une diminution de la polarisation globale (Figure 45). Finalement, un composé actif conduira à une diminution de la polarisation.

¹⁷⁷ Qian, J. ; Voorbach, M. J. ; Huth, J. R. ; Coen, M. L. ; Zhang, H. ; Ng, S.-C. ; Comess, K. M. ; Petros, A. M. ; Rosenberg, S. L., Warrior, U. ; Burns, D. J., *Anal. Biochem.*, **2004**, 328, 131-138

¹⁷⁸ Zhang, J. H. ; Chung, T. D. Y. ; Oldenburg, K. R., *J. Biomol. Screen.*, **1999**, 4, 67-73

¹⁷⁹ Zhang, H. ; Nimmer, P. ; Rosenberg, S. H. ; Ng, S. C. ; Joseph, M., *Anal. Biochem.*, **2002**, 307, 70-75

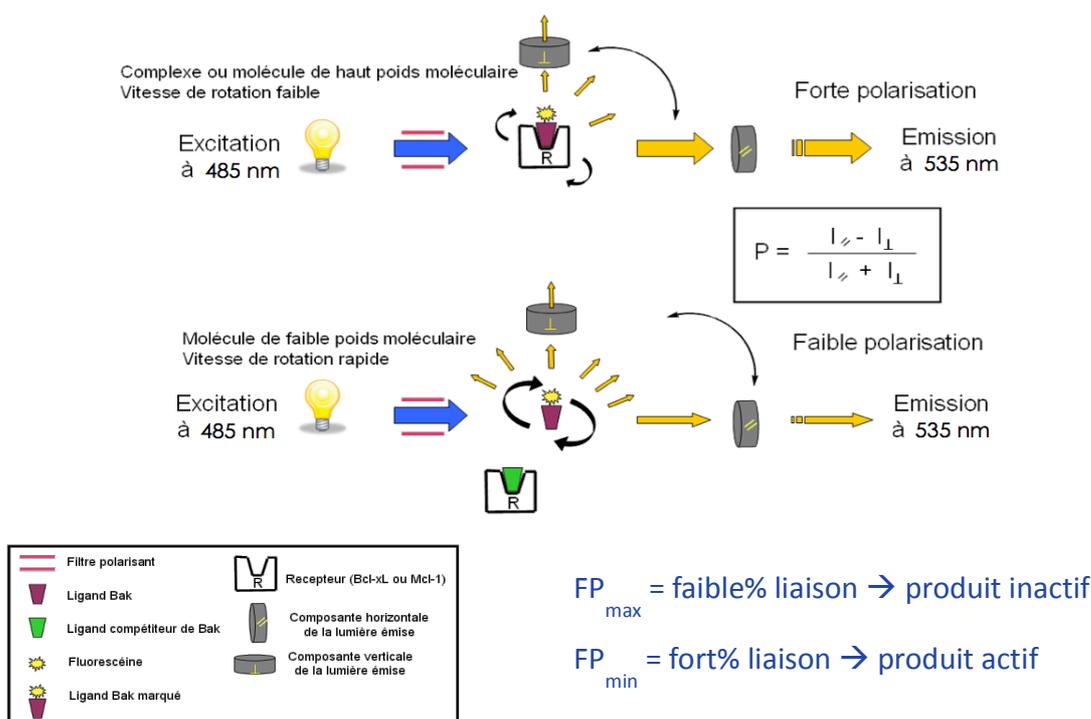


Figure 45 Principe du test biologique ici sur Bcl-xL/Bak

Les composés **245**, **248a**, **247a** et **247c** ont été testés sur Bcl-xL selon cette méthode (Tableau 20). Les dérivés **245** et **248a** n'ont révélé aucune affinité pour Bcl-xL. La comparaison des résultats entre les composés **245** et **247a** nous permet d'affirmer que la présence de la chaîne latérale joue un rôle important pour l'interaction avec la protéine. De plus, la configuration du centre C1'' semble améliorer l'affinité lorsque sa configuration absolue est (*R*) (comparaison entre la meiogynine A **2** et **39**, ainsi qu'entre les dérivés **247a** et **247c**). La présence de l'acide carboxylique sur la partie Sud de la molécule paraît indispensable pour permettre la fixation à la protéine (comparaison entre les composés **248a** et **247a**). Les activités des composés **247a** et **247c** montrent en revanche que l'introduction d'un cycle aromatique à la place du cyclohexyle de la meiogynine A **2** n'influe pas sur l'affinité vis-à-vis de la protéine (l'ordre de grandeur des constantes d'affinité est conservé).

Tableau 20 Résultats des tests d'affinités sur Bcl-xL pour meiogynine A **2** et ses analogues

Entrée	Composé	Ki
1	<p>2 meiogynine A</p>	12 ± 0,2 μM
2	<p>39</p>	1,4 ± 0,3 μM
3	<p>245</p>	> 100 μM
4	<p>248a</p>	> 100 μM
5	<p>247a</p>	4,6 ± 1,5 μM
4	<p>247c</p>	10,7 ± 0,98 μM

Le test sur Mcl-1, quant à lui, n'a pas encore été validé et les essais n'ont pas été réalisés sur nos composés.

4.2.1.2 *In cellulo*

4.2.1.2.1 *Introduction*

Récemment, une collaboration a été développée avec une équipe d'hématologistes de l'Institut Gustave Roussy (Dr Joëlle Wiels, Anaïs Pujals, UMR 8126 du CNRS). Leurs recherches portent sur l'oncogenèse et la résistance à l'apoptose des cellules de lymphocytes B dans les lymphomes de Burkitt associés ou non au virus Epstein Barr (EBV).¹⁸⁰ Il a été, en effet, montré que dans certains lymphomes dont les cellules sont EBV(+), on observe une résistance à l'apoptose plus importante à cause d'une surexpression des protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-xL, et Mcl-1 en particulier) (Figure 46).

Elles ont testé les composés synthétisés précédemment sur les lignées cellulaires qu'elles étudient. Celles-ci sont issues de lymphomes de Burkitt pour les BL2, BL2/B95 et LY47 (cellules tumorales) et de lymphocytes B infectés par le virus d'Epstein Barr (EBV) pour les Remb1 et 1602. Ces dernières ne sont pas tumorales mais leurs caractéristiques sont équivalentes à celles des lymphomes survenant chez les patients transplantés. Sur la Figure 46 sont représentées les protéines anti-apoptotiques surexprimées dans les lignées cellulaires étudiées. Mcl-1 et Bcl-xL sont fortement exprimées sur l'ensemble des lignées (à l'exception de BL28 qui ne semble pas exprimer Mcl-1). La technique du Western blot est qualitative mais permet de se rendre compte des proportions de chaque protéine présente au sein d'une même lignée cellulaire.

¹⁸⁰ Pujals, A. ; Renouf, B. ; Robert, A. ; Chelouah, S. ; Hollville, E. ; Wiels, J., *Cell and Death Disease*, **2011**, 2, e184

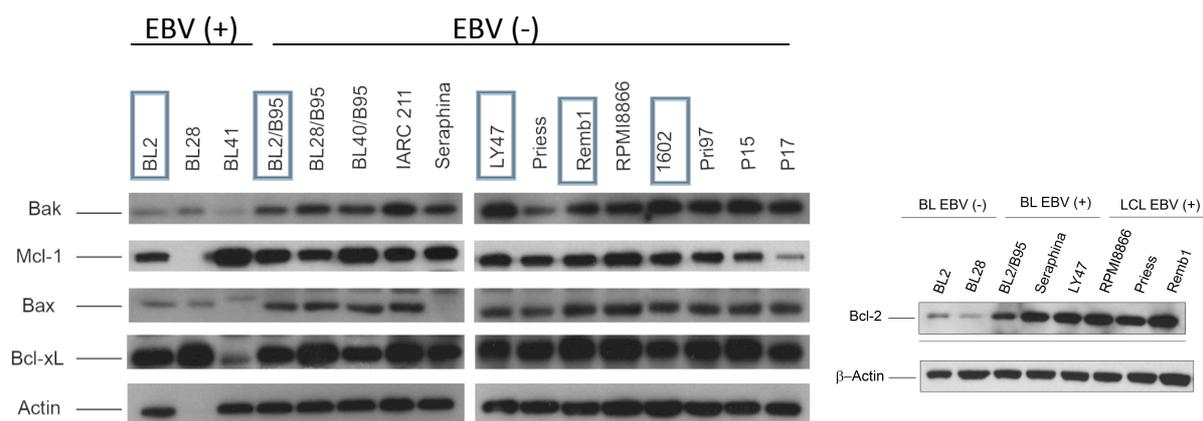


Figure 46 Proportion relative des différentes protéines anti-apoptotique dans les lignées cellulaires étudiées par Western Blot, EBV (+) = Cellules immortalisées par le virus Epstein Barr, EBV (-) = Cellules non immortalisées par le virus Epstein Barr

4.2.1.2.2 Test MTT

La meiogynine A **2** et les composés **245** et **247a** ont été testés sur 5 lignées cellulaires différentes (BL2 (BL EBV-), BL2B95 (BL EBV+), LY47 (BL EBV+), Remb1 (LCL EBV+), 1602 (LCL EBV +)) à 5 concentrations différentes (0, 1, 5, 10, 25 μ M, Figure 47).

Comme escompté, le composé **245** qui ne présente aucune activité *in vitro*, ne montre quasiment aucune cytotoxicité sur l'ensemble des lignées testées. De façon plus surprenante, la meiogynine A **2** est très peu cytotoxique (pas plus que **245**). Le composé **247a** analogue du diastéréoisomère **39** a montré des résultats encourageants sur 4 des lignées cellulaires (BL2, BL2/B95, Remb1 et 1602) avec des IC_{50} d'environ 5 μ M. Seule la lignée LY47 ne semble pas affectée.

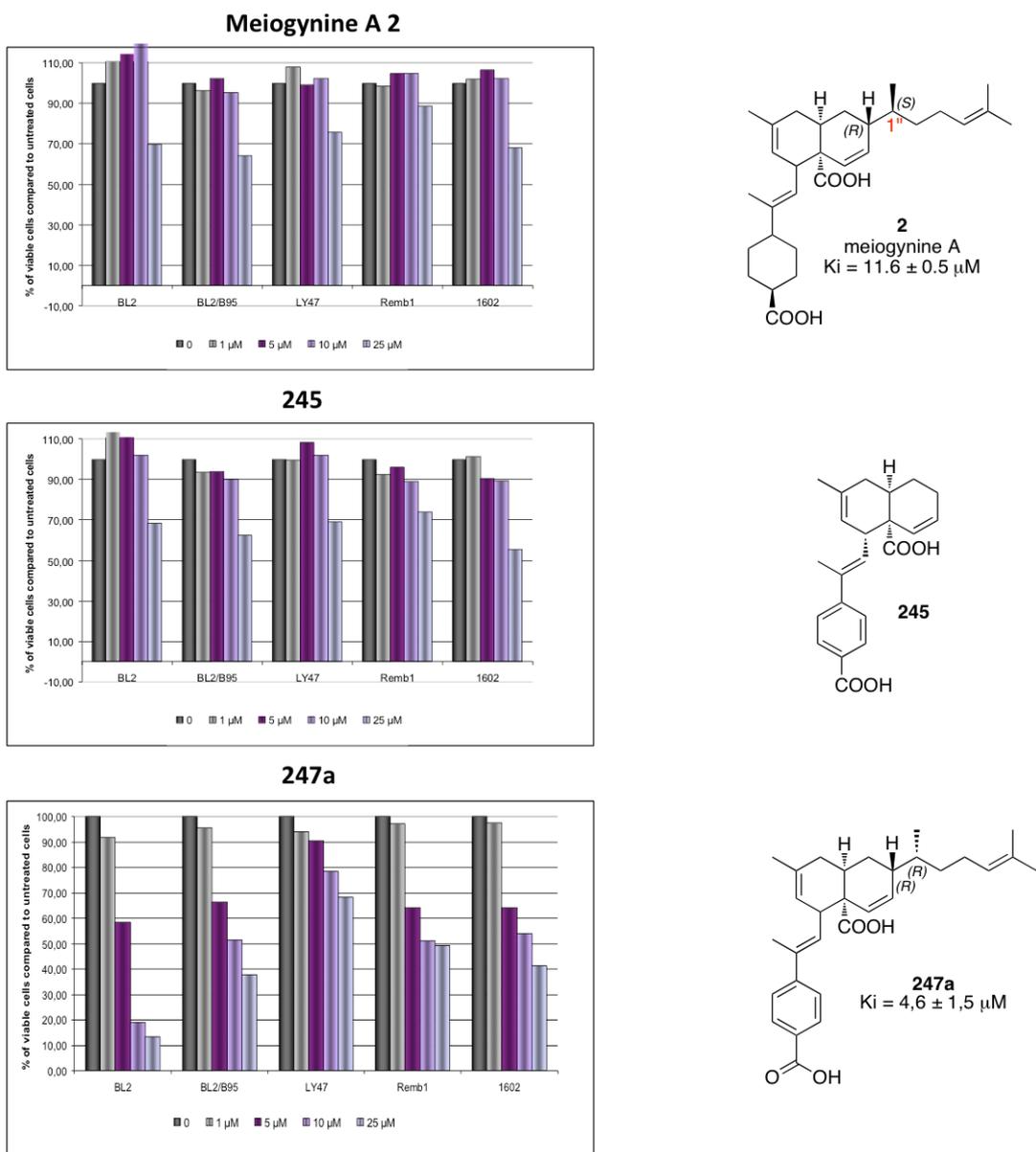


Figure 47 Résultats des tests MTT sur la meiognine A 2 et les composés **245** et **247a**. Les graphiques sont exprimés en pourcentage de cellules ayant survécues (ordonnée) et sont classés par concentrations croissantes (abscisse).

Un second test a été réalisé avec le composé **247a** dans une gamme de concentration plus restreinte (entre 0,5 et 10 μM) sur les mêmes lignées cellulaires et sur trois lignées supplémentaires (BL28, BL28/B95 et Seraphina qui sont également des cellules tumorales de lymphomes de Burkitt, Figure 48).

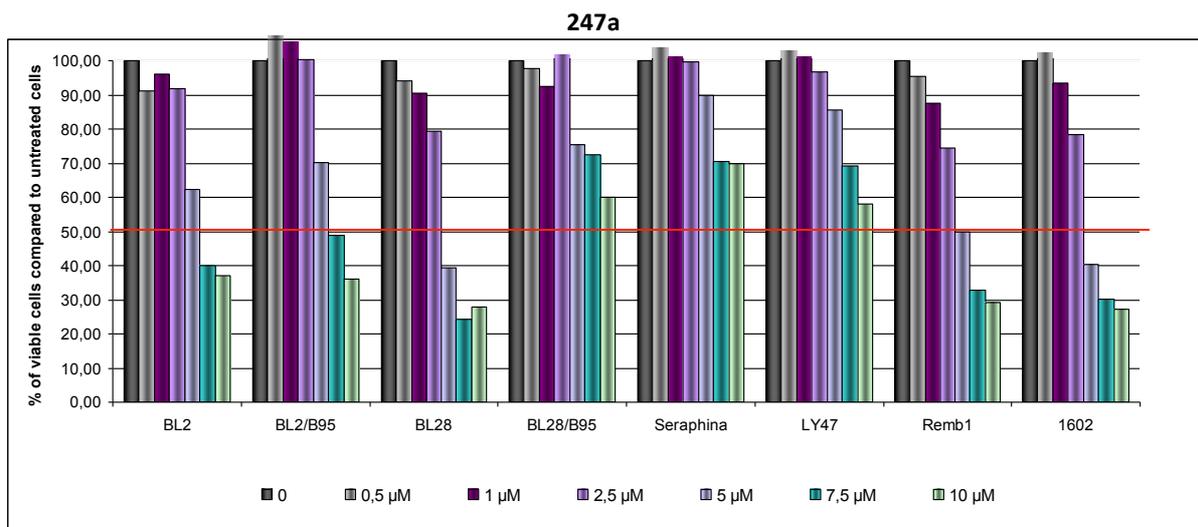


Figure 48 Test MTT du dérivé **247a** sur 8 lignées cellulaires avec des concentrations entre 0 et 10 μM

Ce test confirme les résultats précédents en indiquant que la molécule **247a** est cytotoxique à partir d'une concentration de 2,5 μM sauf pour les lignées BL28/B95, Seraphina et LY47 connues pour être très résistantes vis-à-vis des traitements classiques. Il est à noter que le composé ABT-737 (ligand de référence pour l'interaction avec Bcl-xL, 1.1.3.2) ne donne pas de si bons résultats sur ces lignées. Cela pourrait signifier que l'ensemble de ces lignées cellulaires surexpriment majoritairement Mcl-1 ce qui pourrait empêcher le composé ABT-737 de déclencher l'apoptose.

4.2.1.2.3 Test Annexin V/PI

Après un premier test qualitatif ne permettant que d'évaluer la cytotoxicité des composés, d'autres tests plus précis ont été effectués. En effet, il est nécessaire de savoir si les cellules sont mortes par apoptose. Le second test effectué à l'Institut Gustave Roussy est une évaluation de l'apoptose induite par **247a** par marquage annexine V/PI et analyse par cytométrie en flux.¹⁸¹ Lors de l'apoptose, les phosphatidylsérines sont externalisées (Figure 49). L'annexine V, couplée à un fluorochrome, se fixe sur ces phosphatidylsérines ce qui permet de marquer les cellules apoptotiques. De l'autre côté, Le PI (iodure de propidium) est un agent intercalant de l'ADN qui entre dans les cellules nécrotiques. Ce test va donc permettre de différencier les cellules mortes par nécrose de celles mortes par apoptose.

¹⁸¹ Protocole Pharmingen : <http://researcher.nsc.gov.tw/public/woody/Data/98611333871.pdf>

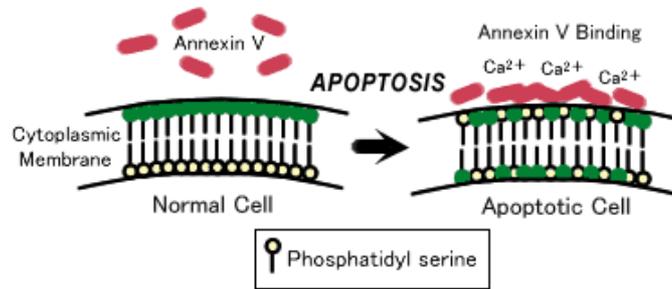


Figure 49 Liaison de l'annexin V sur des cellules apoptosées

Les résultats sont analysés au bout de 7 heures puis 24 heures (Figure 50).

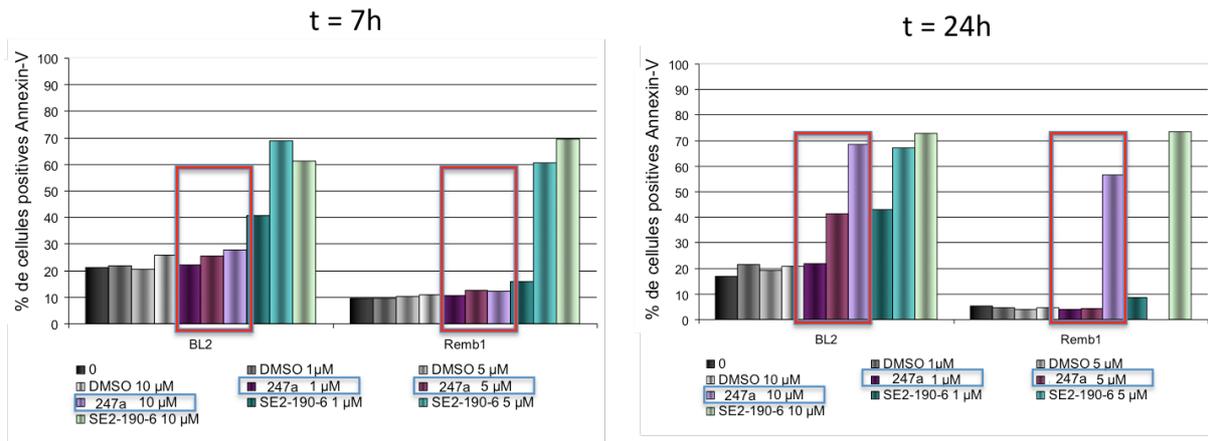


Figure 50 Test Annexin V/PI avec le composé **247a**, c'est le pourcentage de cellules positive à l'annexin V qui est pris en compte

Après 7 heures d'incubation, il y a peu d'apparition de cellules annexin V positives (<20% sur les deux lignées cellulaires). Par contre après 24 heures, nous observons une apparition claire de cellules positives à l'annexin V pour les deux lignées cellulaires testées. Pour une concentration de **247a** à 1 µM, la population de cellules positives ne dépasse pas les 20% pour BL2 et les 10% pour Remb1. A 5 µM, il y a environ 40% de cellules positives pour BL2 mais toujours environ 10% pour Remb1. A 10 µM il y a entre 50% et 65% de cellules annexin V positives pour les deux lignées cellulaires. Ces résultats signifient que **247a** déclenche bien l'apoptose sans aucune formation de cellules nécrosées. L'apoptose se déclenche au bout de 24 heures d'incubation pour une concentration en **247a** de 5 µM pour BL2 et 10 µM pour Remb1.

4.2.1.2.4 Test de détection des caspases 3

Un dernier test mis en place est un test de détection de caspases. Les caspases jouent un rôle essentiel dans le mécanisme apoptotique (voir 1.1.1). Le but de ce test est de détecter la formation d'une caspase spécifique de l'apoptose, la caspase 3. En cas de déclenchement de l'apoptose, la pro-caspase 3 est clivée en caspase 3 qui clive à son tour la PARP (Figure 51).

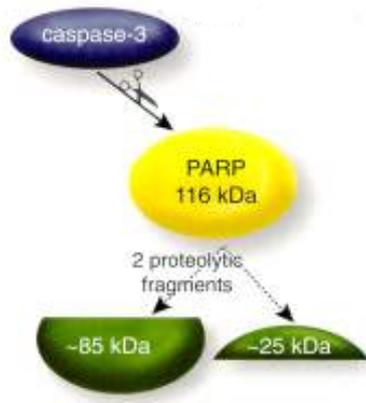


Figure 51 Activation et clivage de la caspase 3

L'analyse du clivage de la PARP et de la caspase 3 est réalisée par Western Blot. La concentration utilisée pour **247a** est de 10 μ M (Figure 52).

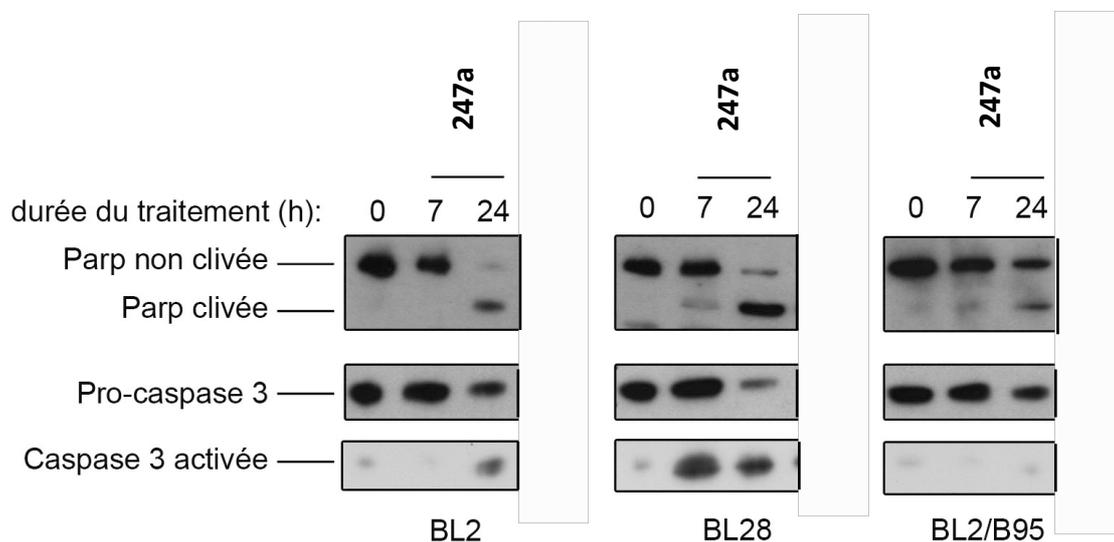


Figure 52 Western Blot du test pro-caspase 3 pour le composé **247a**

Nous observons, après 24 heures d'incubation de **247a** sur des lignées BL2 et BL28, une apparition de la PARP clivée et de la caspase activée. Cela confirme donc le déclenchement de l'apoptose par le composé **247a**.

4.2.1.2.5 Conclusion

Dans un premier test qualitatif (test MTT), la meiogynine A **2** et le composé simplifié **245** n'ont montré qu'une très faible cytotoxicité à 25 μM . Si le manque d'activité du composé **245** est attendue (pas d'activité *in vitro*), celui de la meiogynine A **2** est quant à lui plus surprenant. Cette inefficacité pourrait provenir de son incapacité à pénétrer dans la cellule et donc à atteindre les protéines anti-apoptotiques. Le composé aromatique **247a** analogue du diastéréoisomère le plus actif **39** de la meiogynine A **2**, possède une cytotoxicité appréciable. Il a fait l'objet d'évaluation sur deux autres tests plus spécifiques du mécanisme apoptotique dont les résultats confirment le déclenchement de l'apoptose par le composé **247a** à une concentration de 10 μM .

Ces résultats très encourageants ont révélé que le cycle aromatique de la partie Sud est nécessaire à l'activité biologique *in cellulo*. Afin de compléter et d'approfondir l'étude de relations structure activité, d'autres modifications pourront être envisagées soit en « habillant » ce cycle aromatique pour augmenter encore l'activité biologique, soit sur en modifiant d'autres parties de la molécule.

4.2.2 Relation structure activité

4.2.2.1 Modélisation moléculaire

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre plus large d'une ANR (ANR JCJC ApoMeioA) dont l'objectif est de développer des composés d'origine naturelle à activité anti-apoptotique. Cette ANR (coordinatrice F. Roussi) inclut des collaborations avec une équipe de modélisation moléculaire (Dr Bogdan Iorga, ICSN) et une équipe de RMN (Dr Eric Guittet, Dr Nicolas Birilakis, ICSN).

L'équipe de modélisation moléculaire (Dr Bogdan Iorga, Dr Claire Colas) a proposé un site de fixation pour la meiogynine A **2** au sein de Bcl-xL. La protéine Bcl-xL utilisé est la structure cristalline proposée par Fesik.⁴⁶ Comme les deux acides carboxyliques sont indispensables à l'activité biologique, il a été postulé que ces deux fonctions interagissent avec des acides aminés de type lysine ou arginine. Dans le sillon hydrophobe de la protéine Bcl-xL, seules 2 arginines (Arg **132** et Arg **139**) sont correctement positionnées (Figure 53). Comme nous l'avons vu précédemment (1.1.2), ces résidus sont également responsables de

la fixation du domaine BH3 des protéines pro-apoptotique comme Bak dans le sillon hydrophobe de Bcl-xL. L'interaction de la meiogynine A **2** avec ces arginines confirme sa capacité à relarguer la protéine pro-apoptotique. A la suite de cette étude de docking, les mêmes expériences pour le diastéréoisomère le plus actif de la meiogynine **39** et son analogue aromatique **247a** ont été réalisées.

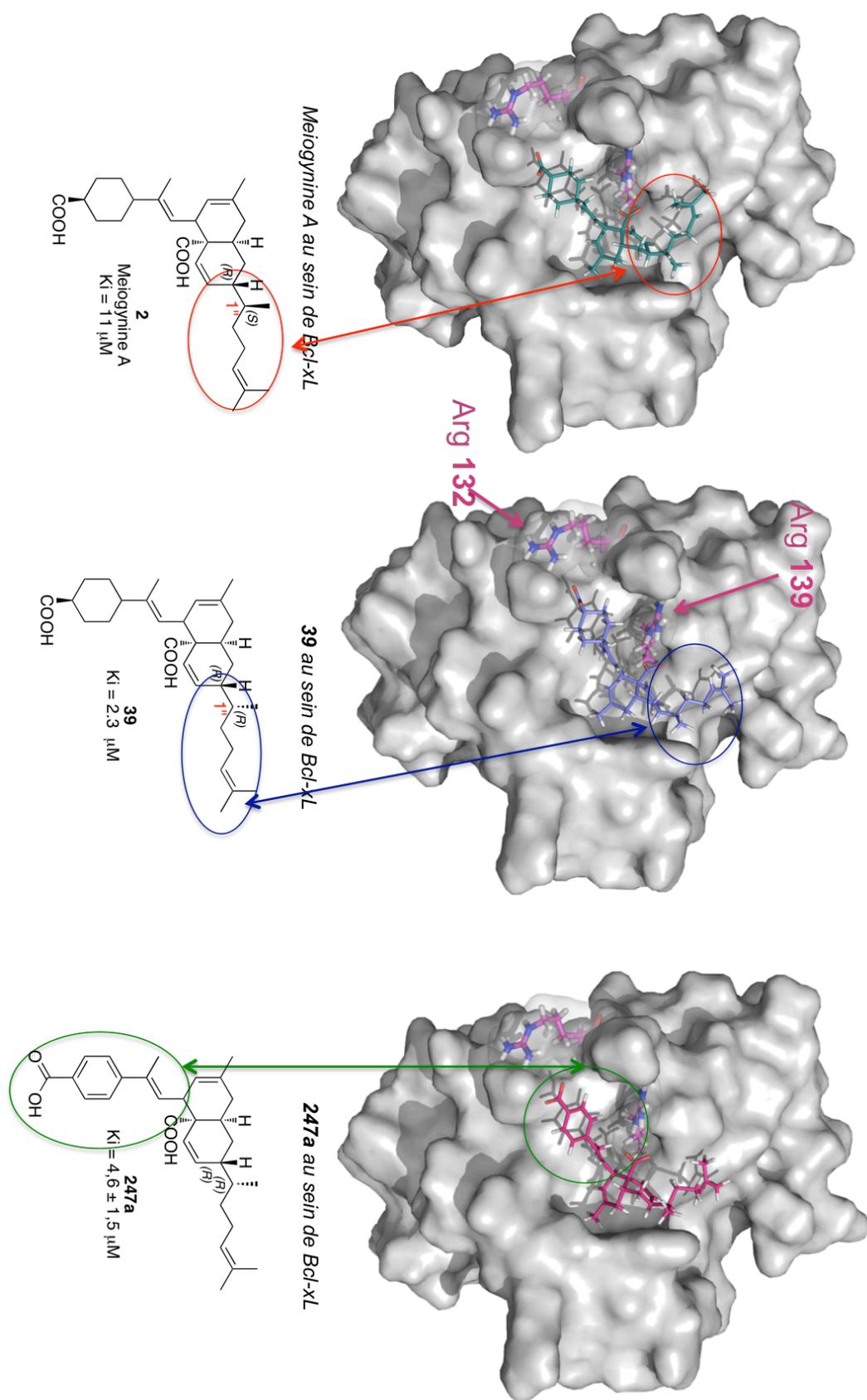


Figure 53 A gauche, cliché de docking de la meioygnine A **2** au sein de Bcl-xL ; Au centre, cliché du composé **39** au sein de Bcl-xL ; A droite cliché du composé **247a** au sein de Bcl-xL

En comparant les images de docking de la meiogynine A **2** et du composé **39**, nous remarquons que la chaîne latérale de la molécule se place différemment au sein du sillon hydrophobe du fait de la différence de configuration du centre C1''. Ceci explique la différence d'affinité vis-à-vis de la protéine et corrèle avec les résultats biologiques obtenus pour les composés dépourvus de chaîne latérale.

La comparaison des dérivés **39** et **247a** ne met pas en évidence de différence notable. La présence du cycle aromatique ne perturbe pas l'interaction entre l'acide carboxylique et l'arginine **132** du sillon hydrophobe. La chaîne latérale du dérivé **247a** se place de la même façon que celle du composé **39** dans le sillon. Deux types de modification sur le composé **247a** ont été envisagés afin d'augmenter son affinité avec Bcl-xL :

- une modification de la partie « Est » pour étendre l'interaction du composé avec le sillon hydrophobe, avec l'introduction de groupements aromatiques via des linkers éthers, esters, amides, etc... (travaux de post-doctorat du Dr Sandy Desrat dans notre équipe),
- une modification de la partie « Sud », par fonctionnalisation au niveau du cycle aromatique ou du cyclohexane en le reliant à des chaînes aliphatiques en *ortho* de l'acide carboxylique grâce à l'introduction d'un hétéroatome au niveau des cycles (Figure 54).

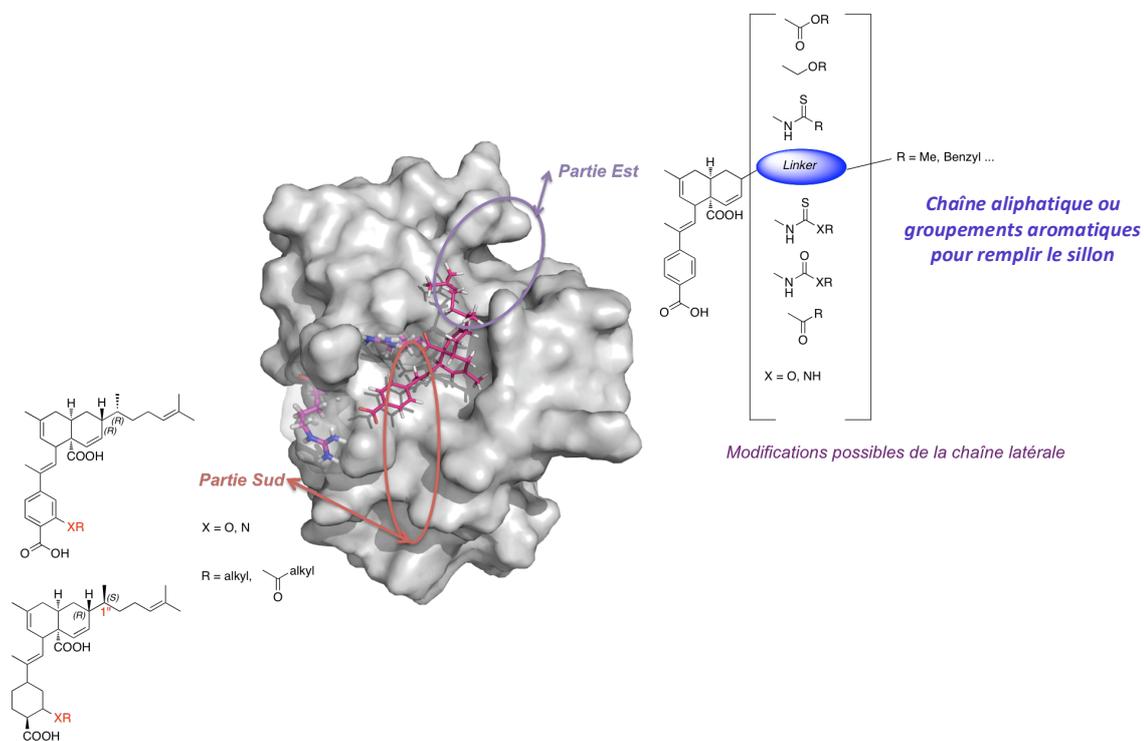


Figure 54 Modifications envisagées des parties Sud et Est du composé **247a**

Pour la partie aromatique, des propositions ont été présentées dans le chapitre 3 (3.4.2.4). Afin de moduler la partie cyclohexyle, une synthèse s'inspirant des travaux récents d'Hayashi sur la synthèse du Tamiflu a été envisagée.¹⁸² Ainsi la méthacroleïne en réaction avec **253** et **254** devrait conduire à **255** après protection de l'amine (Schéma 116). Une réaction de Bestmann-Ohira suivie d'une carboalumination de Negishi, un couplage de Suzuki et une déprotection devraient transformer le triène **255** en dérivé **256** qui par cycloaddition de Diels-Alder conduirait à la *cis*-décالية **257**. Des essais préliminaires ont été réalisés et ont permis d'obtenir les composés de départ **253** et **254**.

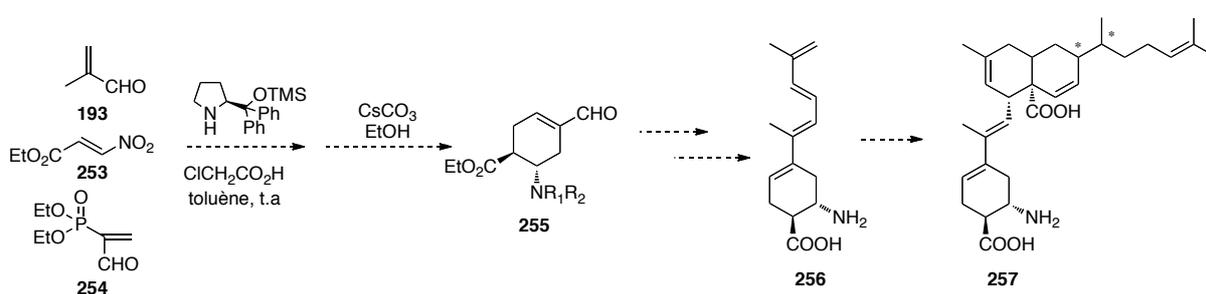


Schéma 116 Synthèse proposée pour l'obtention de l'analogue **257** de la meiogynine A **2**

Les tests de dockings de la meiogynine A **2** sur Mcl-1 et des différents analogues seront réalisés prochainement.

4.2.2.2 RMN structurale

4.2.2.2.1 Introduction et résultats antérieurs

Les acides aminés d'une protéine peuvent être attribués grâce à des cartes ^{15}N - ^1H en RMN 2D. En effet, chaque pic de corrélation de ces cartes correspond à un acide aminé précis de la protéine. L'attribution des acides aminés est alors possible par une analyse comparative du séquençage de la protéine et de la carte ^{15}N - ^1H . Une fois les acides aminés attribués, il est alors possible d'identifier les sites de fixation d'un ligand sur la protéine en étudiant le déplacement ou la disparition des pics de corrélation sur la carte ^{15}N - ^1H du complexe ligand-protéine. Le Dr Nicolas Birlirakis et le Dr Sophie Nogaret dans l'équipe du Dr Eric Guittet ont travaillé sur l'étude des complexes ligand-protéine de Bcl-xL et de Mcl-1. Ils

¹⁸² Hishikawa, H. ; Suzuki, T. ; Orita, H. ; Uchimaru, T. ; Hayashi, Y., *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 12616-12626

ont ainsi cherché à identifier les sites de fixation de la meiogynine A **2** et ont pu démontrer que la meiogynine A **2** se fixait dans le sillon hydrophobe de Bcl-xL et Mcl-1.¹⁸³

Lorsqu'un ligand ayant une affinité de l'ordre du μM est ajouté à une protéine, une disparition des signaux de corrélation des acides aminés qui interagissent avec lui est observée (échange chimique intermédiaire). Il en résulte une difficulté à interpréter de manière fine les résultats. C'est le cas de la meiogynine A **2** qui, de plus, précipite dans les conditions de l'expérience. Il était donc indispensable de synthétiser des ligands à moindre affinité mais solubles, de manière à se trouver dans le cas d'un échange chimique rapide plus facile à interpréter. Les composés **245**, **251a** et **252** ont été synthétisés dans ce but et leurs interactions avec Bcl-xL et Mcl-1 ont été évaluées.

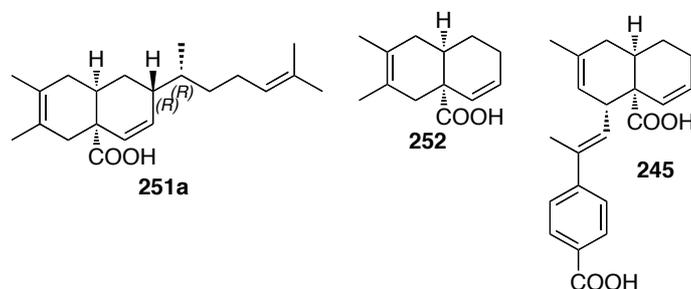


Figure 55 Ligands étudiés lors d'expériences de dosage RMN

Afin de simplifier la lecture des cartes ^{15}N - ^1H , les expériences ont été réalisées avec une protéine Bcl-xL tronquée (la numérotation de la séquence d'acides aminés de la protéine est différente de celle étudiée en modélisation moléculaire). En effet, la protéine Bcl-xL possède une chaîne extérieure d'acides aminés, n'interagissant pas avec les ligands, dont les pics de corrélation vont diminuer la lisibilité de la carte 2D. En la supprimant, la solubilité de la protéine pour les expériences est meilleure et la lisibilité de la carte ^{15}N - ^1H est accrue.

4.2.2.2.2 Résultats des expériences sur les composés simplifiés

4.2.2.2.2.1 Composé 252

Les expériences ont pu être réalisées sur la *cis*-décaline **252** soluble dans le tampon utilisé. Le titrage avec Bcl-xL et Mcl-1 montre une interaction beaucoup plus locale sur la

¹⁸³ Thèse de Doctorat de Sophie Nogaret, Université Paris-Sud XI

protéine comparé à la meïogynine A 2. La saturation de la protéine se fait dès le premier point de titrage.

Seuls 6 résidus de Bcl-xL (en vert) disparaissent (Figure 56). Ces résidus sont les Alanines 83 et 121, les Leucines 91 et 109 ainsi que la Sérine 124 et la Glycine 175. Trois de ces acides aminés sont situés dans le domaine BH1 (L91, L109 et A121) constituant le siège des interactions avec les protéines pro-apoptotiques. Ces disparitions confirment l'interaction avec le centre du sillon hydrophobe.

Une variation de déplacements de 21 résidus au total est également observée et plus particulièrement, une variation des signaux de la séquence NWGR. Le pic de corrélation correspondant à l'Arginine 118 (<-> Arginine 139 en modélisation moléculaire), appartenant à cette séquence, est déplacé. Ce résultat confirme l'interaction possible entre l'acide carboxylique en tête de pont de la *cis*-décàline et cette arginine (Figure 53).

Dans le cas de Mcl-1, l'effet observé est similaire (Figure 57). Une variation du déplacement de la Glycine de la séquence NWGR est observée. Le composé **252**, malgré sa petite taille, semble capable d'interagir spécifiquement avec le sillon hydrophobe de chaque cible.

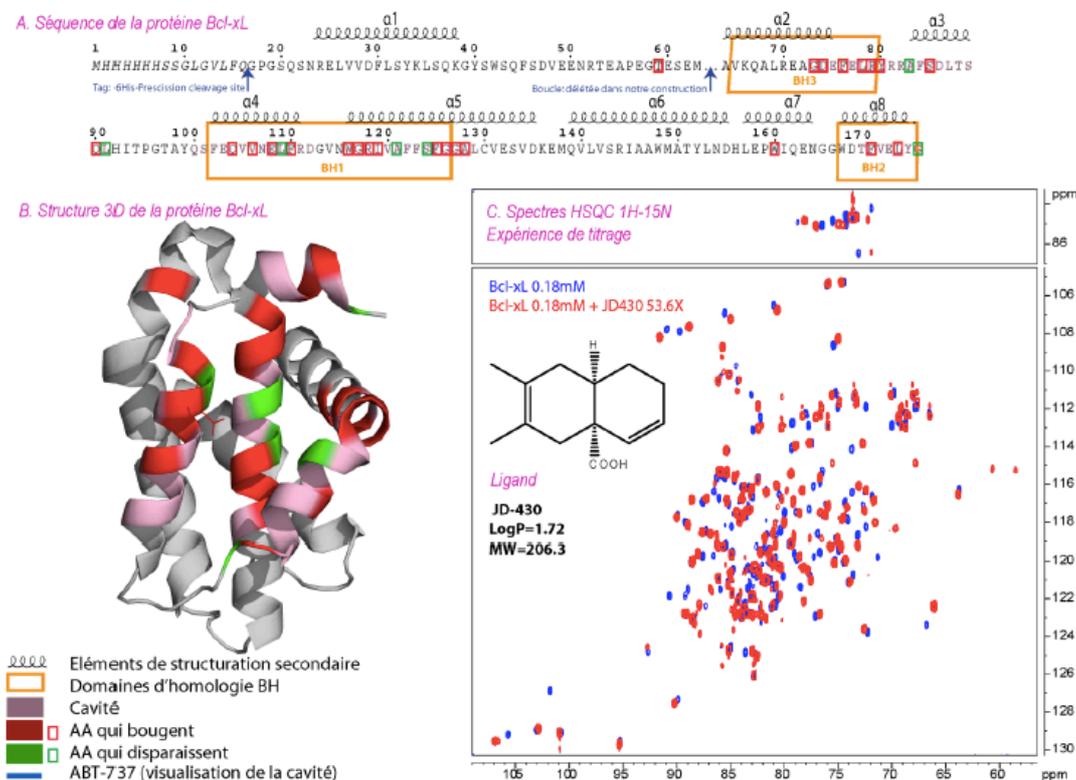


Figure 56 Identification des acides aminés affectés par l'interaction de la protéine Bcl-xL avec **252**. **A** Séquence d'acides aminés ; **B** structure 3D de la protéine Bcl-xL (pdb :2YXJ, complexe Bcl-xL/ABT-737) ; **C** Expériences de titrage : protéine libre (en bleu) et complexé (en rouge). En orange les domaines d'homologie BH, en rose les résidus de la cavité, en vert, les acides aminés en échange intermédiaires

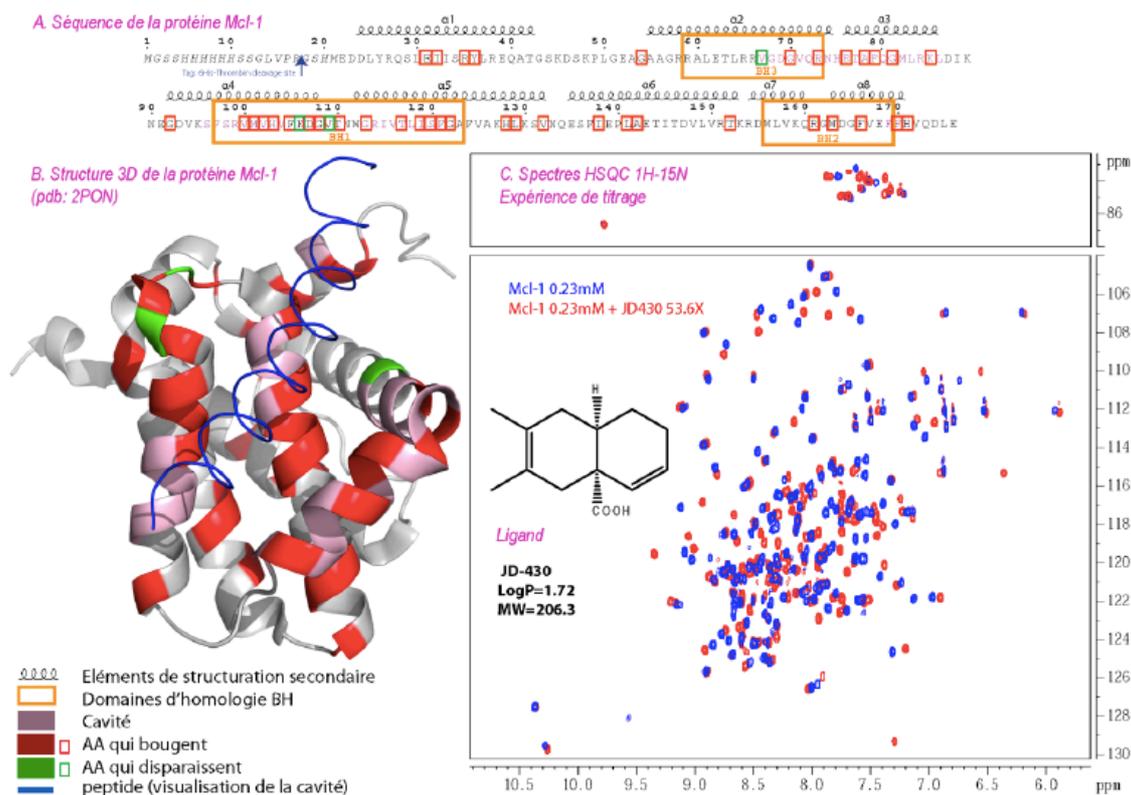


Figure 57 Identification des acides aminés affectés par l'interaction de la protéine Mcl-1 avec **252**. **A** Séquence d'acides aminés ; **B** structure 3D de la protéine Mcl-1 (pdb :2ROD, complexe Mcl-1/Noxa) ; **C** Expériences de titrage : protéine libre (en bleu) et complexé (en rouge)

4.2.2.2.2 Composé 251a

Le composé **251a** simplifié au niveau de la partie sud est beaucoup moins soluble dans les conditions de l'expérience. Cependant, les résultats observés sont proches de ceux trouvés avec **252** (Figure 58 et Figure 59). Cela pourrait signifier, que la chaîne latérale aliphatique n'a pas d'impact sur l'affinité avec les protéines comme cela avait été prédit par modélisation moléculaire et n'apporte pas d'informations supplémentaires à celles obtenues avec le composé **252**. Seule une variation de la Glycine de la séquence NWGR est observée dans l'interaction avec Bcl-xL. Dans le cas de Mcl-1, les pics de corrélation des acides aminés (tryptophane, glycine et arginine) de cette séquence ont été déplacés. Ces observations confirment l'interaction du bloc décalinique avec le domaine BH1 de chacune des protéines.

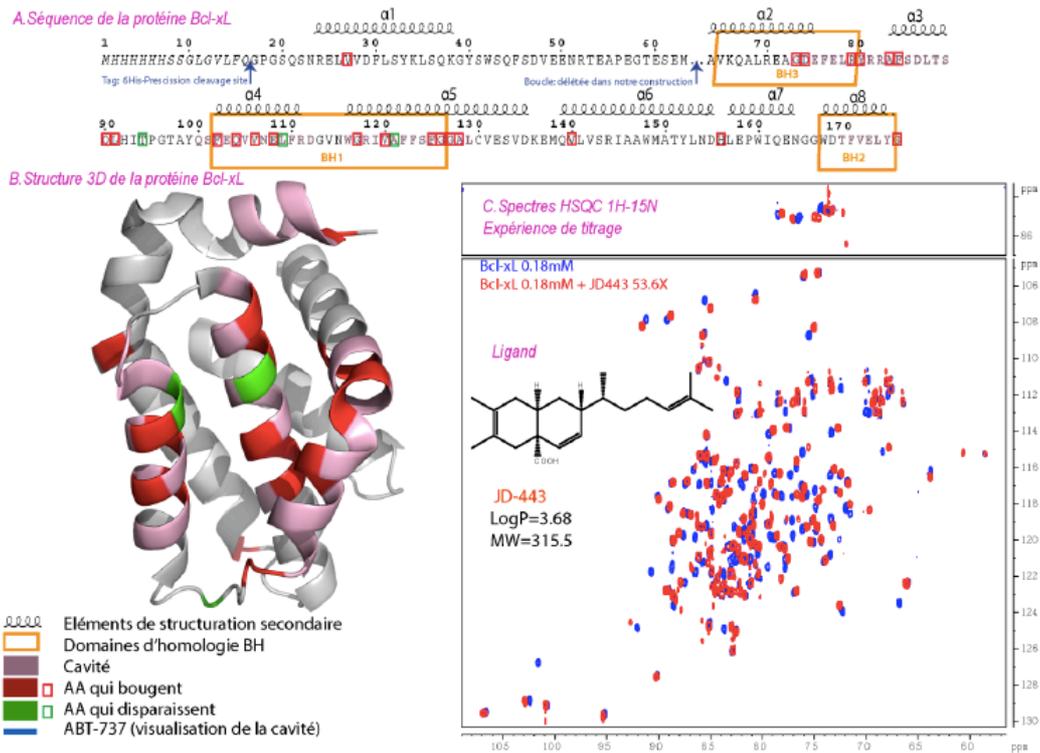


Figure 58 Identification des acides aminés affectés par l'interaction de la protéine Bcl-xL avec **251a**. **A** Séquence d'acides aminés ; **B** structure 3D de la protéine Bcl-xL (pdb :2YXJ, complexe Bcl-xL/ABT-737) ; **C** Expériences de titrage : protéine libre (en bleu) et complexé (en rouge). En orange les domaines d'homologie BH, en rose les résidus de la cavité, en vert, les acides aminés en échange intermédiaires

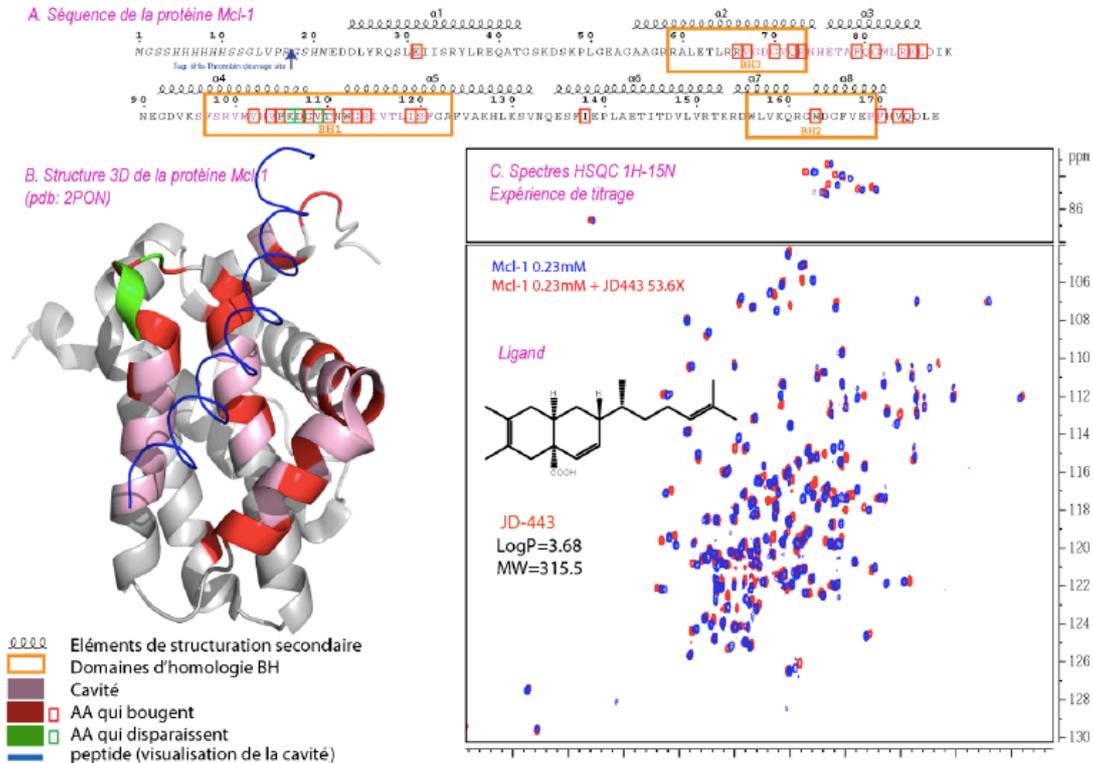


Figure 59 Identification des acides aminés affectés par l'interaction de la protéine Mcl-1 avec **251a**. **A** Séquence d'acides aminés ; **B** structure 3D de la protéine Mcl-1 (pdb :2ROD, complexe Mcl-1/Noxa) ; **C** Expériences de titrage : protéine libre (en bleu) et complexé (en rouge) En orange les domaines d'homologie BH, en rose les résidus de la cavité, en vert, les acides aminés en échange intermédiaires

4.2.2.2.3 Composé 245

Le composé **245** présente une solubilité suffisante, aucune précipitation n'est observée jusqu'au dernier point de titrage.

Les premières expériences semblent indiquer que le dérivé **245** est plus affiné que le composé **252**. Pour les deux protéines, les résidus affectés par l'interaction se situent au niveau du sillon hydrophobe (Figure 61 et Figure 61). Dans le cas de Bcl-xL, une variation de déplacements de l'Arginine 111 est observée (<-> Arginine 132 décrite en modélisation moléculaire). Ces observations confirment l'interaction du second acide carboxylique avec l'arginine 111. La propagation du déplacement des pics de corrélation, correspondant aux acides aminés, hors du sillon semble confirmer un effet « allostérique » du composé sur la cible protéique. Cela signifie que la protéine change de « forme » lorsqu'elle se complexe au composé **245**. L'expérience montre que l'affinité de la *cis*-décane **245** est comprise entre celle du dérivé **252** et celle de la meioyngine **A 2** confirmant la nécessité des deux acides carboxyliques pour l'affinité vis-à-vis des protéines.

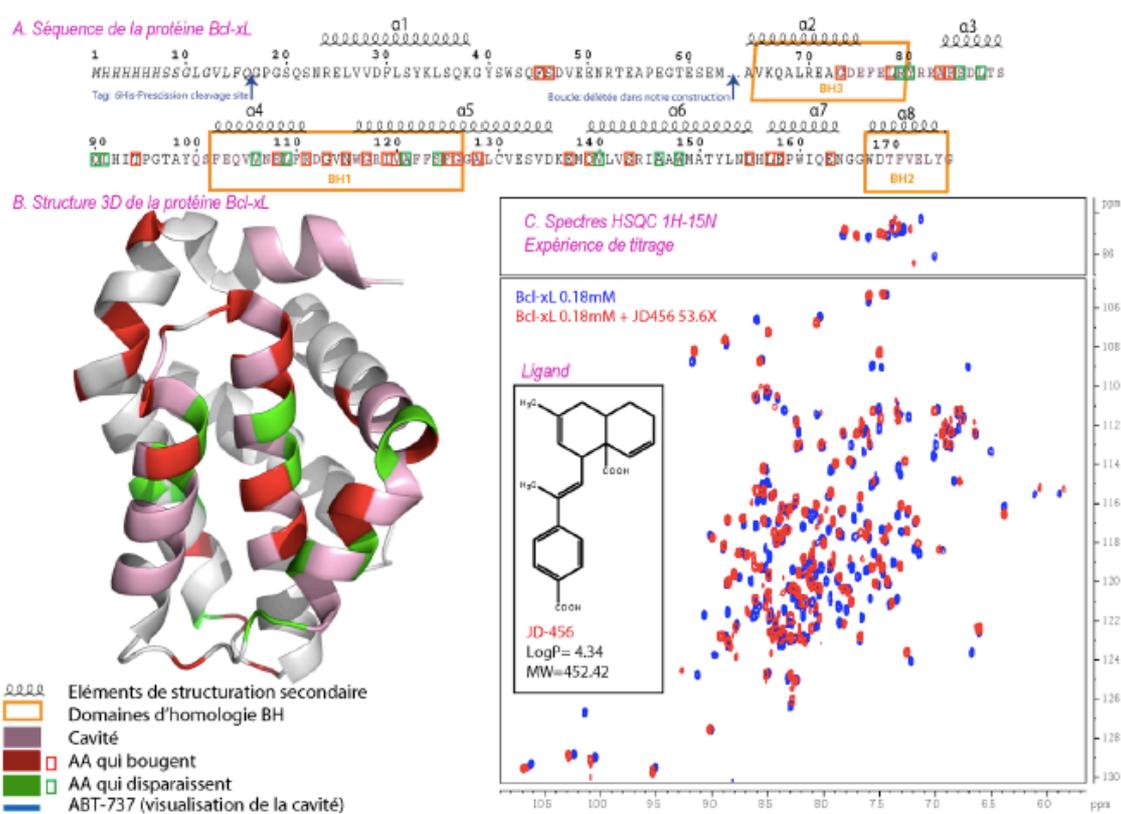


Figure 60 Identification des acides aminés affectés par l'interaction de la protéine Bcl-xL avec **245**. **A** Séquence d'acides aminés ; **B** structure 3D de la protéine Bcl-xL (pdb :2YXJ, complexe Bcl-xL/ABT-737) ; **C** Expériences de titrage : protéine libre (en bleu) et complexée (en rouge). En orange les domaines d'homologie BH, en rose les résidus de la cavité, en vert, les acides aminés en échange intermédiaires

collègues car il présente la meilleure solubilité sur l'ensemble des composés synthétisés et une affinité suffisante pour effectuer ces expériences.

4.3 Conclusions et perspectives.

Deux nouveaux composés analogues de la meiogynine A **2** ont été obtenus après une mise au point de la réaction de Diels-Alder entre le triène **123** et les diénophiles **17a** et **17c**. Après oxydation finale des alcools en acides carboxyliques, les composés cibles ont été obtenus avec des rendements corrects, une excellente sélectivité faciale et un très bon *ratio endo/exo* (Schéma 117).

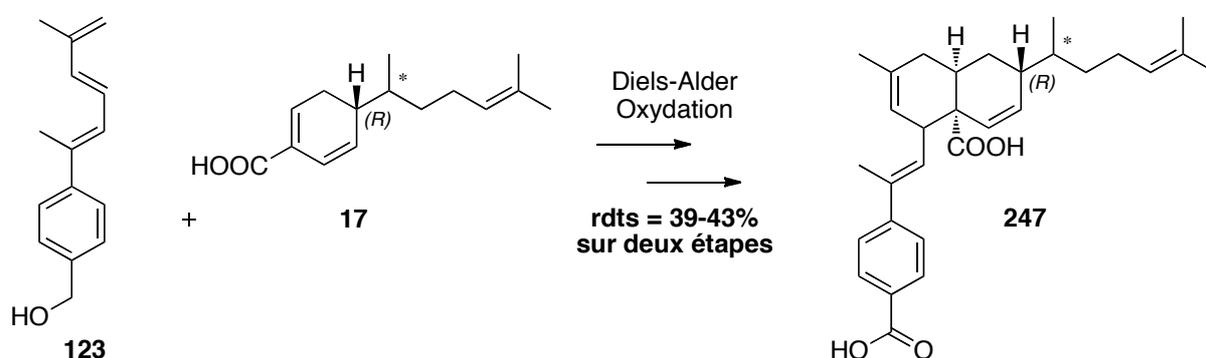


Schéma 117 Obtention des composés finaux **247**

La réaction de Diels-Alder optimisée a également permis d'obtenir les composés **251a**, **251c**, **252**, **245** avec des rendements compris entre **40** et **71%** (Figure 62). Tous ces composés ont ensuite été évalués sur l'interaction Bcl-xL/Bak. Les résultats viennent confirmer les premières relations structure-activité obtenues lors de la découverte de la meiogynine A **2** : l'affinité vis-à-vis de Bcl-xL nécessite la présence des deux acides carboxyliques (comparaison d'activités entre **247a** et **248a**) et la présence et l'orientation de la chaîne latérale sont importantes pour l'activité (comparaison entre **247a** et **247c**).

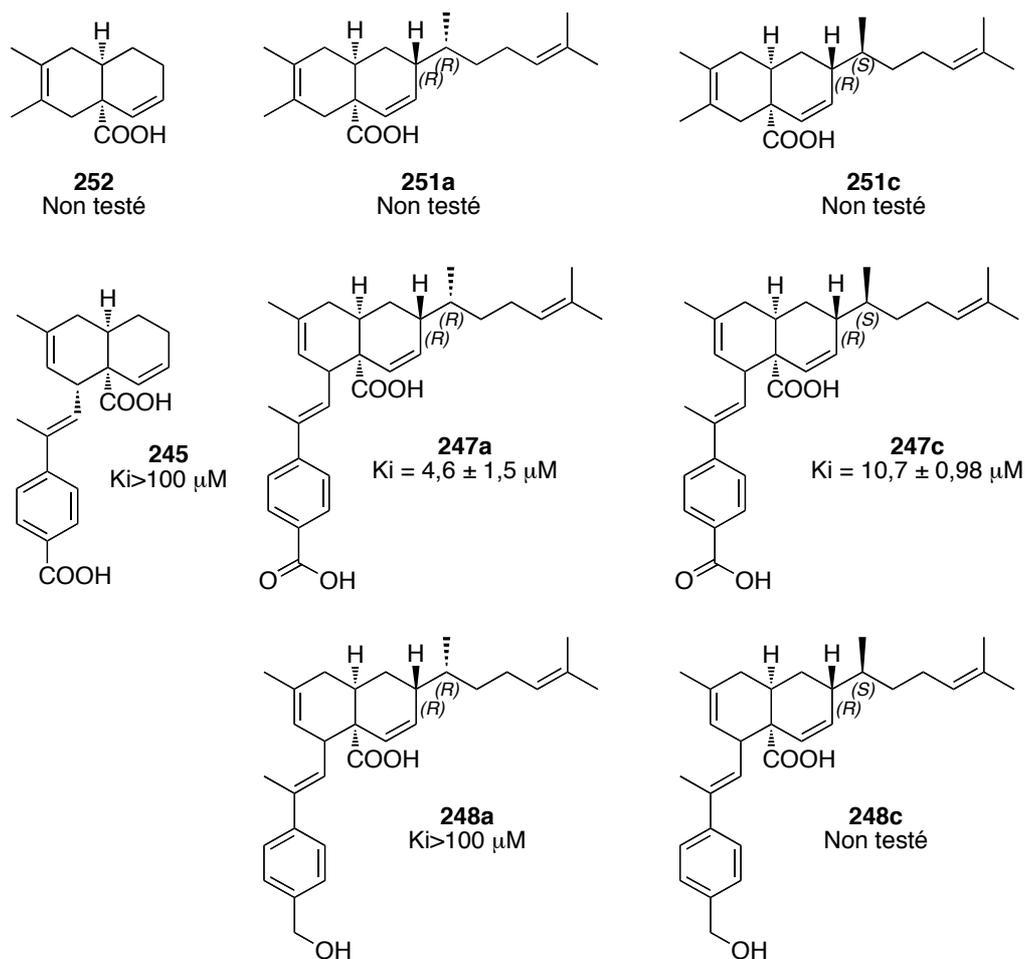


Figure 62 Les analogues de la meioyngine A 2 synthétisés et leur constante d'affinité sur Bcl-xL

Les composés **245** et **247a** ainsi que la meioyngine A 2 ont fait l'objet de tests *in cellulo* plus approfondis réalisés par nos collègues de l'IGR. Le composé **245** ne possédant pas de chaîne latérale et la meioyngine A 2 se sont révélés non-cytotoxiques sur les lignées utilisées contrairement au dérivé **247a** qui déclenche l'apoptose.

Des expériences de modélisation moléculaire ont été réalisées sur plusieurs dérivés et apportent une première explication quant au rôle et à la nécessité des deux acides carboxyliques sur la molécule.

Les expériences RMN ^1H - ^{15}N ont permis de démontrer l'importance du bloc décalinique pour la fixation au sein des sillons hydrophobes de Bcl-xL et Mcl-1. Le composé **245** s'est avéré être un excellent candidat pour de futures expériences de nOe filtrées. Ces expériences permettront d'affiner l'identification des acides aminés en jeu dans l'interaction entre les protéines et le ligand. Ces données orienteront la modulation du composé **247a** afin d'améliorer son affinité envers les protéines.

Même si les résultats des tests biologiques montrent que la chaîne latérale joue un rôle important pour l'activité, la modélisation moléculaire et la RMN modulent ce résultat. Si il est important de fonctionnaliser la meiogynine A sur la partie Est, des groupements aromatiques semblent plus appropriés qu'une chaîne isoprène ce qui nous laisse espérer un gain d'activité biologique pour les analogues envisagés.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce projet de thèse a été de synthétiser des analogues de la meiogynine A, un terpène isolé de *Meiogyne Cylindrocarpa*, une annonacée de Malaise. Elle possède une activité sur la protéine anti-apoptotique Bcl-xL qui joue un rôle primordial dans le processus de l'apoptose. L'obtention de ces analogues a permis d'enrichir les études de relations structure-activité.

La synthèse de la meiogynine A **2** repose sur la réaction Diels-Alder entre un diénophile **17** et un triène **16** (Schéma 118).

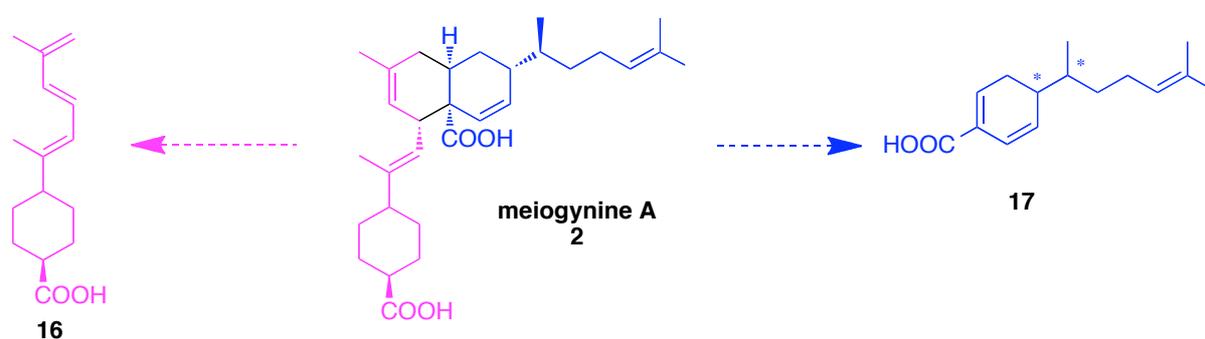


Schéma 118 Obtention de la meiogynine A **2** à partir des dérivés **16** et **17**

Dans une première partie, la synthèse des diénophiles **17** a été optimisée en augmentant la stéréosélectivité de la première étape d'addition de Michael et en diminuant la perte d'excès diastéréoisomérique lors de la crotonisation. La modification de la configuration du catalyseur utilisé a conduit majoritairement aux diénophiles désirés précurseurs de la meiogynine A **2** et de son diastéréoisomère actif **39** (Schéma 119). La synthèse est désormais très sélective et efficace en faveur des diénophiles souhaités. Les bons excès diastéréoisomériques (**81%** et **82%**) obtenus ont permis de s'affranchir d'une purification par HPLC préparative avant la réaction de Diels-Alder. Dans une seconde partie, nous avons synthétisé des triènes analogues à **16**. Deux triènes aromatiques **123** et **124** ont été obtenus avec de bons rendements et une excellente sélectivité *E,E*.

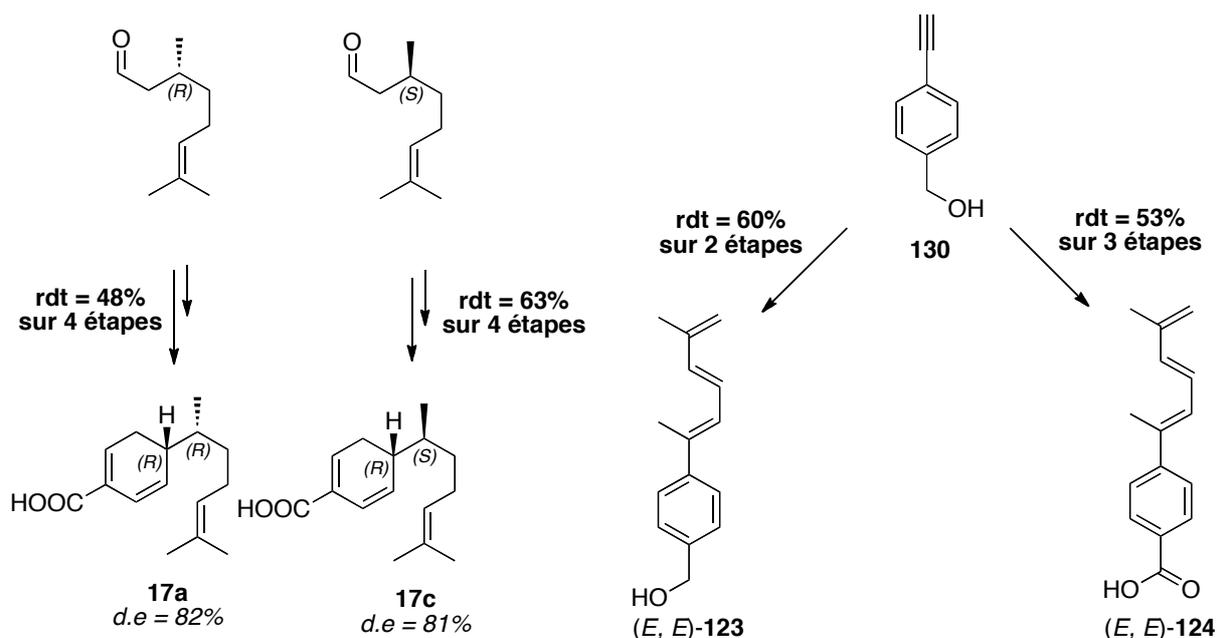


Schéma 119 Amélioration de la synthèse des diénophiles **17a** et **17c** et obtention des triènes aromatiques **123** et **124**

Enfin, la réaction de Diels-Alder finale entre le triène **123** et les diénophiles **17a** et **17c** a été mise au point conduisant aux *cis*-décalsines **248** avec des rendements de **46%** et **48%** et un bon rapport *endo/exo* ainsi qu'une sélectivité faciale totale. L'oxydation de ces composés, en vue de former les premiers analogues aromatiques de la meiogynine A **2**, a été mise au point et l'utilisation du réactif de Jones conduit aux composés **247a** et **247c**. En parallèle de ce travail, des analogues simplifiés de la meiogynine A **2** ont été synthétisés afin d'obtenir des informations sur le rôle de chaque partie de la molécule dans l'interaction avec les protéines Bcl-xL et Mcl-1. Les analogues **245**, **251a**, **251c** et **252** ont été obtenus avec des rendements compris entre **40** et **71%**.

Les composés **247a** et **247c** présentent de bonnes activités *in vitro* sur Bcl-xL (4.6 μ M et 10.7 μ M). L'introduction d'un cycle aromatique n'influe pas sur l'interaction avec la protéine. La *cis*-décalsine **247a** a également montré de bons résultats sur des tests *in cellulo* (cytotoxicité à une concentration de 10 μ M) et déclenche l'apoptose dans différentes lignées cellulaires à la différence de la meiogynine A qui n'est pas active sur ces tests.

Des expériences de modélisation moléculaire et de RMN ont confirmé le rôle des deux acides carboxyliques de la molécule finale, ainsi que l'importance du bloc décalinique dans l'interaction des composés avec les protéines Bcl-xL et Mcl-1.

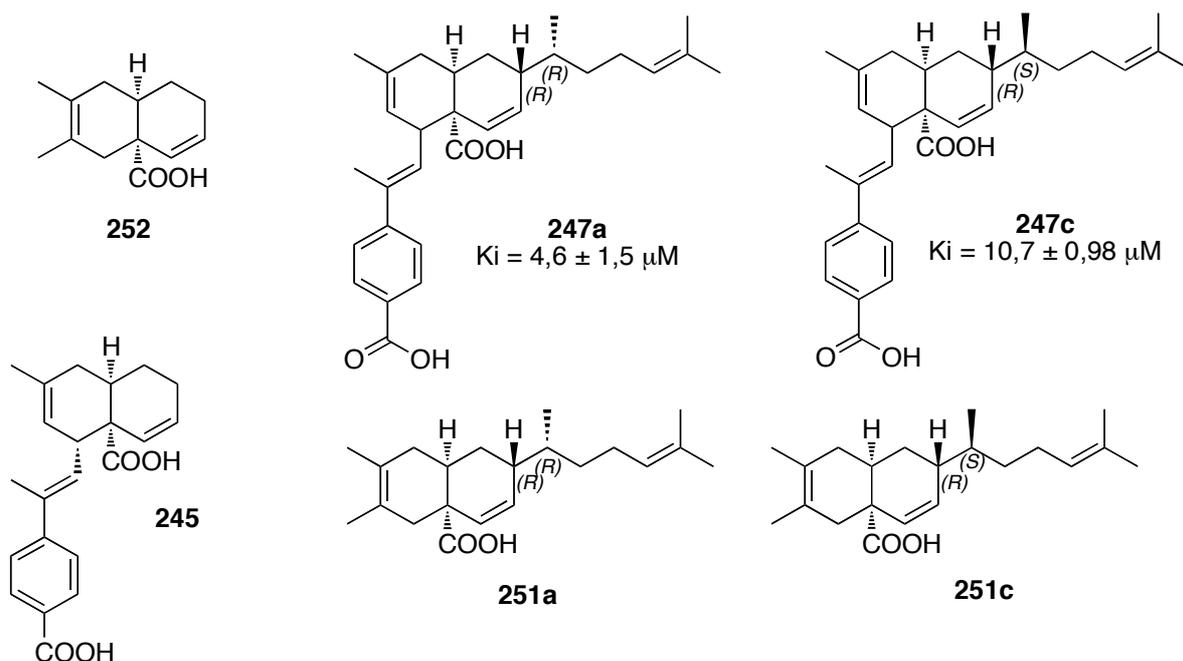


Schéma 120 Analogues obtenues de la meiogynine A 2

A l'avenir, il est envisagé de modifier la partie Est du dérivé **247a** afin d'étendre l'interaction avec le sillon hydrophobe. Une modification de la partie Sud de ce composé est également envisagée par l'introduction de groupements aliphatiques ou aromatiques.

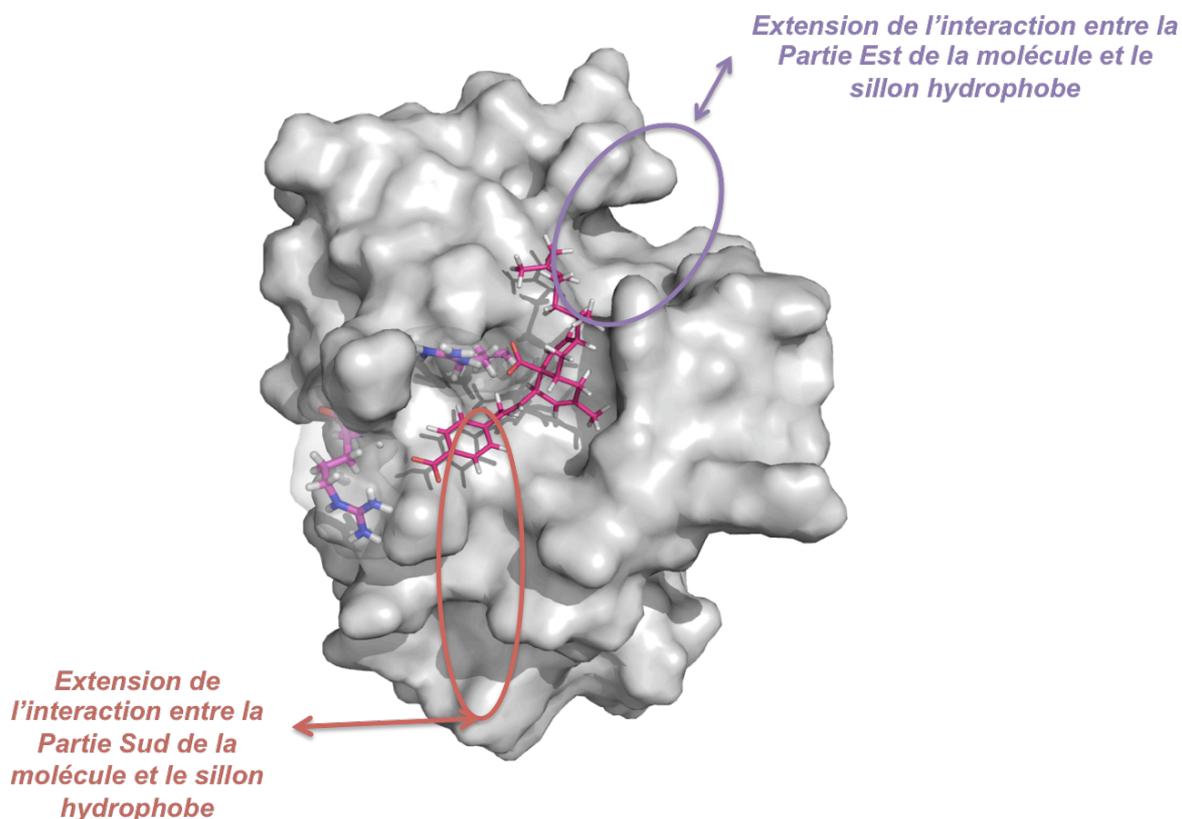


Figure 63 Modifications envisagées

Partie Expérimentale

Généralités

1 Solvants, purifications et suivi de réactions

1.1 Réactifs et Solvants

Les réactifs commerciaux sont utilisés sans purification supplémentaire.

Les solvants anhydres (THF, DMF, DCM, Toluène) sont commerciaux.

1.2 Chromatographies

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (gel de silice 60 F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur sur support d'aluminium). Les plaques ont été visualisées en utilisant une lampe UV ($\lambda = 254$ nm). La révélation des produits est réalisée par de l'éther sulfurique, du KMnO₄ ou réactif de molybdate d'ammonium sulfurique.

Les chromatographies flash sur colonne ont été réalisées avec un gel de silice 60 ACC 35-70 μm (SDS) sous une pression de 0,5 bar ou avec des colonnes prépaquées en phase inverse C18 Spherical VersaPak sur un Combiflash (Companion®).

2 Analyses et appareils utilisés

2.1 Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres de RMN (¹H et ¹³C) ont été réalisés sur des appareils Brüker 300 MHz (AC300), 500 MHz (ARX500), 600 Mhz (Avance 600) et 800 MHz (Avance 3). Le chloroforme deutéré (CDCl₃) est employé comme solvant. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés

en ppm, calibrés par rapport au chloroforme pris comme référence interne (7,27 ppm pour les spectres RMN ^1H et 77,14 ppm pour les spectres RMN ^{13}C) et les constantes de couplage (J) sont déterminées en Hertz. Pour la multiplicité des signaux, les abréviations suivantes sont utilisées : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). L'attribution des signaux a été effectuée à l'aide des techniques DEPT 135, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC en utilisant le logiciel NMR Notebook.

2.2 Spectométrie de masse

Les masses basses et hautes résolutions ont été effectuées par électrobulbion (Electro Spray Ionisation ESI) sur un appareil Thermoquest AQA Navigator avec un détecteur de temps de vol.

2.3 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés sur un appareil Anton Paar MCP 300. Ils sont définis par le quotient suivant : $[\alpha]_D = 100e/lc$ avec e la déviation en degré ($^\circ$), l la longueur de la cuve en dm et c la concentration ($c = 1$ pour $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). L'échantillon a été préparé avec du dichlorométhane HPLC.

2.4 Spectroscopie IR

Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR.

2.5 Chromatographie liquide haute performance

Les HPLC analytiques et préparatives ont été réalisées sur des chaînes Waters 2695 comprenant un détecteur PDA 995 et un DEDL 2420 et des chaînes Waters Acquity TQD (UPLC). Les colonnes utilisées en analytique et en préparative sont des colonnes de phase

inverse (Sunfire, Atlantis), chirales (AD-H) ou graphites (Hypercarb). Le méthanol et l'acétonitrile utilisés sont des solvants de type HPLC.

2.6 Protocole des tests biologiques *in vitro*

L'essai a été effectué au sein des Laboratoires SERVIER. L'affinité des échantillons pour Bcl-xL a été évaluée dans un test de compétition avec un ligand marqué (peptide Bak(BH3)). La protéine est obtenue par production dans E.coli et purification sur colonne Glutathion Sépharose (N. Cauquil, O. Geneste, IdRS), et le peptide Bak(BH3) couplé à la fluorescéine (Fluo-Bak(BH3)) est synthétisé à façon par la société NeoMPS. Typiquement, l'échantillon est incubé 30 minutes à température ambiante en présence de GST-Bcl-xL 100 nM et Fluo-Bak(BH3) à 15 nM, dans un tampon phosphate de sodium 20 nM pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, acide pluronique F-68 0.05%. Le volume réactionnel final est de 40 µL et la réaction est conduite en plaques noires 384 puits (COSTAR).

La mesure de l'inhibition (IC₅₀) de la polarisation de fluorescence est réalisée avec un lecteur de plaques Envision (PerkinElmer).

2.7 Protocole du test biologique MTT

Le test MTT utilise le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium) comme réactif. L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité de couleur violette dans la mitochondrie (Figure 64). La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Le protocole consiste à mettre en plaque 96 puits les cellules (200 000 cellules/puits, en duplicate) puis de les traiter avec différentes concentrations du composé testé ou de DMSO (contrôle). Après 24 heures de traitement, les cellules sont incubées 2 heures à 37 °C avec le MTT (25 µL) puis avec le tampon de lyse (100 µL) sur la nuit. Le lendemain, la DO (densité optique) à 550 nm est mesurée et les analyses sont réalisées en considérant que le puit de contrôle correspond à 100% de viabilité.

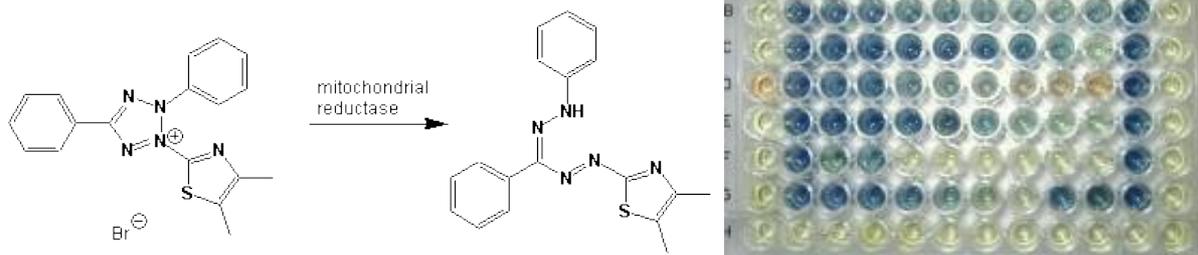


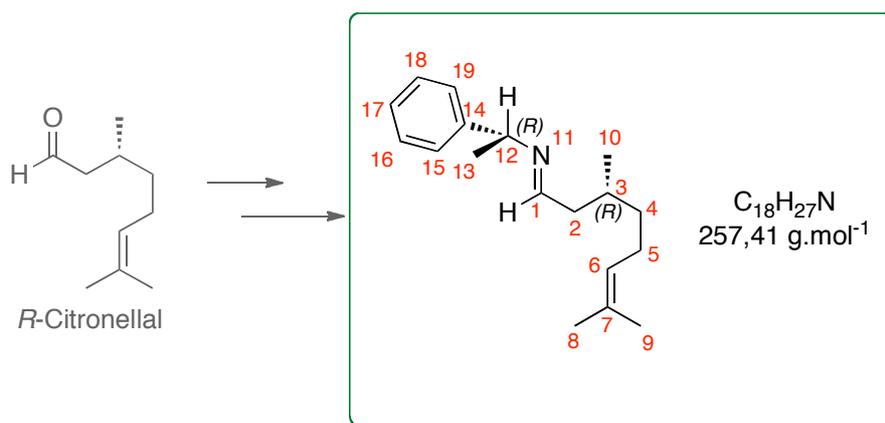
Figure 64 A gauche réduction du MTT, A droite une plaque typique de test avec en bleu les puits positifs

2.8 Protocole du test biologique annexin V/PI

Pour réaliser les tests, les cellules sont mises en plaques 12 puits (300 000 cellules par puits) puis incubées pendant 24 heures avec différentes concentrations de **247a**. Les cellules sont ensuite lavées et incubées avec une solution contenant l'annexine V pendant 10 min. Avant le passage au FACS (cytométrie de flux), l'iodure de propidium est rajouté. Les résultats sont analysés au bout de 7 et 24 heures.

CHAPITRE II

Composé 84



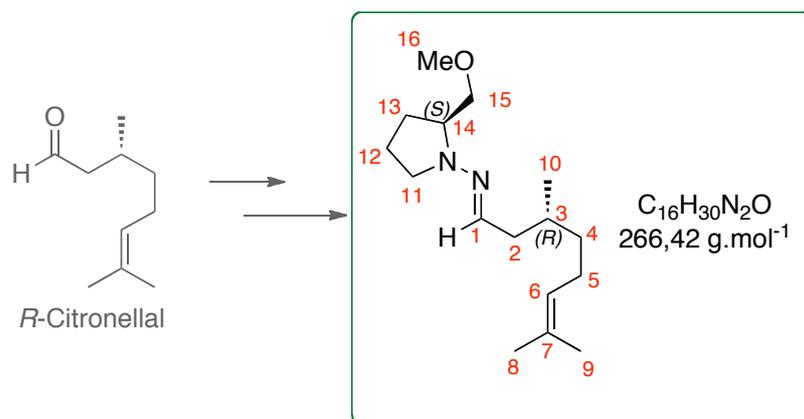
Une solution de (*R*)-citronellal (0.64 mmol, 0.12 mL) et de (*R*)-méthylbenzyle amine (0.71 mmol, 1.1 éq, 0.1 mL) en présence d'un mélange 2 : 1 : 2 (alumine (40 mg), silice (20 mg), tamis moléculaire 5 A (40 mg)) est agitée sous atmosphère inerte pendant 3 jours à 20 °C. Après consommation totale du (*R*)-Citronellal, le brut réactionnel est dilué dans le cyclohexane et filtré sur célite pour donner l'imine **84** (163 mg, **rdt = 100%**).

RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 0.94 (d, 3H-H₁₀, *J* = 6.7 Hz), 1.19-1.33 (m, 1H-H₂), 1.34-1.45 (m, 1H-H₂), 1.54 (d, 3H-H₁₃, *J* = 5.5 Hz), 1.63 (s, 3H-H₉), 1.71 (s, 3H-H₈), 1.76-1.86 (m, 1H-H₃), 1.95-2.09 (m, 2H-H₄), 2.10-2.21 (m, 1H-H₅), 2.25-2.39 (m, 1H-H₅), 4.33 (q, 1H-H₁₂, *J* = 6.2 Hz), 5.09 (t, 1H-H₆, *J* = 6.4 Hz), 7.26 (m, 1H-H₁₇), 7.43 (m, 4H-H₁₅, H₁₆, H₁₈, H₁₉), 7.79 (t, 1H-H₁, *J* = 5.2 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 17.6 (C₉), 19.6 (C₁₀), 24.5 (C₅), 25.4 (C₈), 25.7 (C₁₃), 30.7 (C₃), 36.9 (C₂), 42.9 (C₄), 69.8 (C₁₂), 124.5 (C₆), 126.5 (C₁₇), 126.7 (C₁₆/C₁₈), 128.3 (C₁₅/C₁₉), 131.4 (C₇), 145.0 (C₁₄), 163.4 (C₁).

MS (ESI, MeOH+DCM) : *m/z* [M+H]⁺ = 258.2

Composé 85



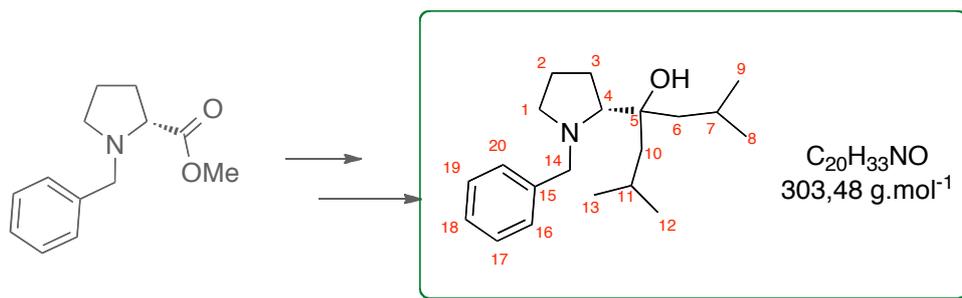
Une solution de (*R*)-citronellal (1.92 mmol, 0,35 mL) et (*S*)-(-)-1-Amino-2-(methoxyméthyl)pyrrolidine (1.92 mmol, 1 éq, 250 mg) est agitée pendant une nuit à 0 °C. Après conversion totale du (*R*)-Citronellal, l'hydrazone **85** formée est utilisée sans purification supplémentaire (501 mg, **rdt = 98%**).

RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 0.91 (d, 3H-H₁₀, *J* = 6.7 Hz), 0.56-1.29 (m, 2H-H₂), 1.29-1.32 (m, 1H-H₃), 1.58 (s, 3H-H₉), 1.66 (s, 3H-H₈), 1.76-2.09 (m, 8H-H₄, H₅, H₁₂, H₁₃), 2.20 (m, 1H-H₁₅), 2.70 (m, 1H-H₁₅), 3.35 (s, 3H-H₁₆), 3.37-3.44 (m, 2H-H₁₁), 3.51-3.58 (m, 1H-H₁₄), 5.08 (t, 1H-H₆, *J* = 5.8 Hz), 6.65 (t, 1H-H₁, *J* = 5.7 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 17.6 (C₉), 19.4 (C₁₀), 22.1 (C₁₂), 25.4 (C₅), 25.6 (C₈), 26.5 (C₁₃), 31.7 (C₃), 36.7 (C₂), 40.1 (C₄), 50.6 (C₁₁), 59.1 (C₁₆), 63.4 (C₁₄), 74.8 (C₁₅), 124.7 (C₆), 131.1 (C₇), 138.6 (C₁).

MS (ESI, MeOH+DCM) : *m/z* [M+H]⁺ = 268.1

Composé 90



A une solution de bromure d'isobutylmagnésium (5.4 mL, 2M) dans de l'éther diéthylique (3 mL), l'ester méthylique de benzyl-(D)-proline (1g, 4.28 mmol) est ajoutée sous argon. Le mélange est porté à reflux de l'éther diéthylique pendant 2 heures puis refroidi et une solution saturée de chlorure d'ammonium est ajoutée. Le brut réactionnel est filtré sur alumine puis purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/Heptane : 2/8) pour donner le composé **90** (917 mg, **rdt = 71%**).

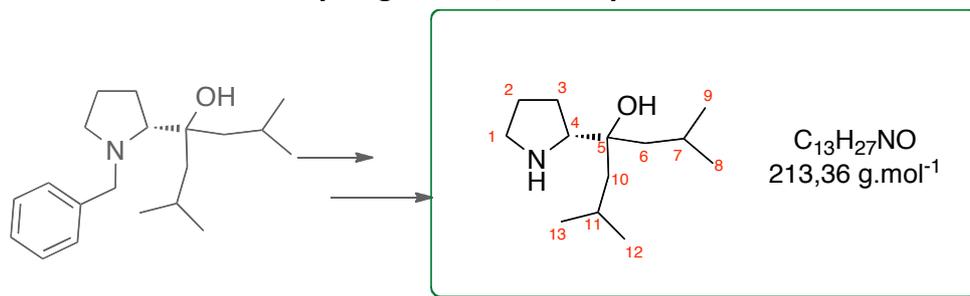
RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz): 0.87 (t, 6H-H₈, H₉, $J = 6.3$ Hz), 0.93 (t, 6H-H₁₂, H₁₃, $J = 6.1$ Hz), 1.24 (dd, 1H-H₆, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz), 1.44 (d, 2H-H₇, H₁₁), $J = 5.3$ Hz) 1.53 (dd, 1H-H₆, $J_1 = 14.3$ Hz, $J_2 = 5.9$ Hz), 1.58-1.83 (m, 6H-H₂, H₃, H₁₀), 2.38 (dt, 1H-H₄, $J_1 = 9.9$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz), 2.70-2.92 (m, 2H-H₁), 3.52 (d, 1H-H₁₄, $J = 14.3$ Hz), 4.02 (d, 1H- H₁₄, $J = 14.3$ Hz), 7.13 (m, 1H-H₁₈), 7.21-7.31 (m, 4H-H₁₆, H₁₇, H₁₉, H₂₀).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 23.1 (C2), 24.1 (C7), 24.6 (C9/C8), 24.7 (C14), 25.0 (C12), 25.1 (C11), 25.1 (C13), 27.7 (C3), 43.5 (C6), 46.5 (C10), 55.1 (C1), 63.4 (C5), 71.5 (C4), 126.8 (C18), 128.0 (C17/C19), 128.3 (C16/20), 140.6 (C15).

MS (ESI, MeOH+DCM) : m/z [M+H]⁺ = 304.2

Composé 98

Hydrogénation/débenzylation



Une solution du composé **90** (200 mg, 0.65 mmol) et d'hydroxyde de palladium (120 mg, 60% massique) dans l'éthanol est placée dans un appareil de Parr sous pression de dihydrogène pendant une nuit. Le brut réactionnel est filtré sur célite pour donner le composé **98** (108 mg, **rdt = 79%**).

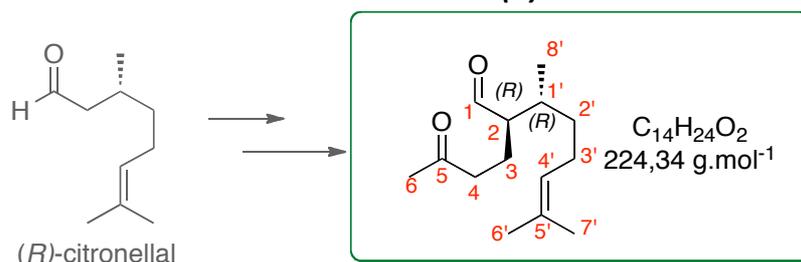
RMN 1H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 0.92 (d, 6H- H_9 , $J = 5.6 \text{ Hz}$), 0.95 (d, 6H- H_8 , $J = 5.6 \text{ Hz}$), 1.0 (t, 6H- H_{12} , H_{13} , $J = 7.0 \text{ Hz}$), 1.34 (dd, 1H- H_6 , $J_1 = 14.9 \text{ Hz}$, $J_2 = 4.7 \text{ Hz}$), 1.50 (m, 3H- H_6 , H_{10}), 1.60-1.82 (m, 6H- H_2 , H_3 , H_7 , H_{11}), 3.05 (m, 2H- H_1), 3.26 (t, 1H- H_4).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 75 MHz) : 23.4 (C2), 24.5 (C7), 24.8 (C9/C8), 25.1 (C12), 25.3 (C11), 25.5 (C13), 28.1 (C3), 42.7 (C6), 46.6 (C10), 54.8 (C1), 62.3 (C5), 70.4 (C4).

HRMS : m/z calculée pour $C_{13}H_{28}NO^+$ = 214.2171/ trouvée= 214.2171

Composé 33a

Addition de Michael sur le (*R*)-citronellal



L'éther de triméthylsilyldiphénylprolinol **99** (200 mg, 0.60 mmol, 5 mol%) et le 3,4-dihydroxybenzoate **44** (550 mg, 3.0 mmol, 20 mol%) sont ajoutés, à 0 °C, à une solution de (*R*)-citronellal (2,00 g, 12.9 mmol) et de méthyl vinyle cétone **42** (2.5 mL, 19.4 mmol). Le mélange réactionnel est agité à 0 °C jusqu'à la conversion totale du citronellal puis est purifié directement par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/Heptane 2/8) pour donner **33a** (2.10 g, **73%**, *de*: 95%). L'excès diastéréoisomérique a été déterminé par HPLC sur colonne chirale (AD-H 5 μ m, 4.6x150mm, éluant : Heptane/Ethanol 99/1).

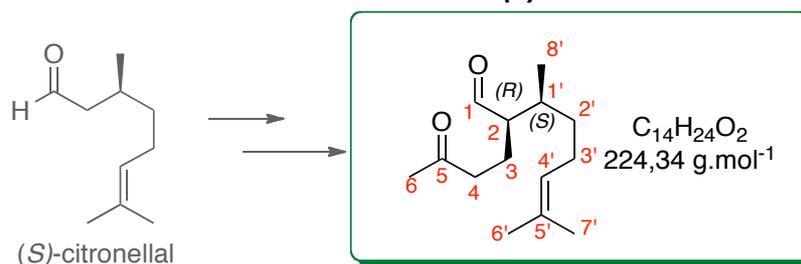
Diastéréoisomère majoritaire :

RMN ¹H (CDCl₃ 500 MHz) : 0.97 (d, 3H-H_{8'}, *J* = 7 Hz), 1.28 (m, 2H-H_{1'}, H_{2'}), 1.45 (m, 1H-H_{2'}), 1.58 (s, 3H-H_{7'}), 1.66 (s, 3H-H_{6'}), 1.82 (m, 1H-H₃), 1.90-2.25 (m, 4H-H₃, H₄, H_{3'}), 2.10 (m, 3H-H₆), 2.32 (m, 1H-H₂), 2.52 (m, 1H-H₄), 5.06 (t, 1H-H_{4'}, *J* = 7.0 Hz), 9.61 (d, 1H-H₁, *J* = 2.5 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 15.9, 17.6, 18.1, 25.6, 25.7, 29.9, 32.2, 34.4, 41.4, 55.9, 123.8, 131.8, 204.9, 207.9.

Composé 33c

Addition de Michael sur le (S)-citronellal



L'éther de triméthylsilyldiphénylprolinol **99** (200 mg, 0.60 mmol, 5 mol%) et le 3,4-dihydroxybenzoate **44** (550 mg, 3.0 mmol, 20 mol%) sont ajoutés, à 0 °C, à une solution de (S)-citronellal (2,00 g, 12.9 mmol) et de méthyl vinyle cétone **42** (2.5 mL, 19.4 mmol). Le mélange réactionnel est agité à 0 °C jusqu'à la conversion totale du Citronellal et est ensuite purifié directement par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/Heptane : 2/8) pour donner **33c** (2.50 g, 86%, de: 93%). L'excès diastéréoisomérique a été déterminé par HPLC sur colonne chirale (AD-H 5 μ m, 4.6x150mm, éluant : Heptane/Ethanol 99/1).

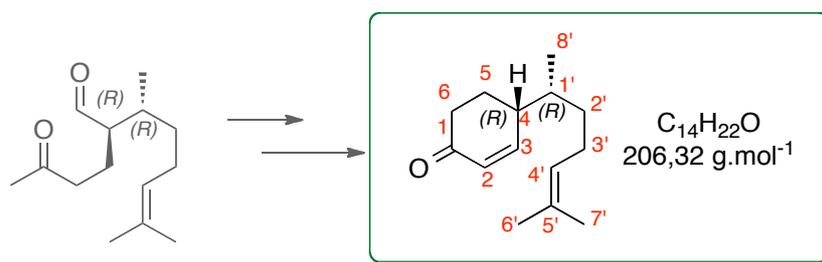
Diastéréoisomère majoritaire:

RMN^1H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 0.97 (d, 3H- $H_{8'}$, $J = 7$ Hz), 1.24 (m, 2H- $H_{1'}$, $H_{2'}$), 1.48 (m, 1H- $H_{2'}$), 1.52 (s, 3H- H_7), 1.66 (s, 3H- $H_{6'}$), 1.62-1.74 (m, 1H- H_3), 1.81-2.07 (m, 3H- H_3 , $H_{3'}$), 2.10 (m, 3H- H_6), 2.16 (m, 1H- H_4), 2.34 (m, 1H- H_2), 2.48 (m, 1H- H_4), 5.04 (t, 1H- $H_{4'}$, $J = 7.0$ Hz), 9.86 (d, 1H- H_1 , $J = 2.5$ Hz).

$RMN^{13}C$ ($CDCl_3$ 75 MHz) : 16.7, 17.5, 19.6, 25.4, 25.5, 29.8, 33.2, 33.8, 41.3, 56.0, 123.7, 131.7, 205.0, 207.8.

Composé 34a

Crotonisation du cétyaldéhyde 33a



L'hydroxyde de lithium monohydraté (42 mg, 1.0 mmol, 0.1 mol%) est ajouté à une solution de **33a** (2.10 g, 10.2 mmol) dans l'isopropanol (25 mL). Après 24 heures à température ambiante, une solution de chlorure d'ammonium est ajoutée. La phase organique est séparée, et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner le composé **34a** (1.91 g, **99%**, *de*: 82%). L'excès diastéréoisomérique a été déterminé par HPLC sur colonne Hypercarb (4.6x150mm, éluant : MeOH).

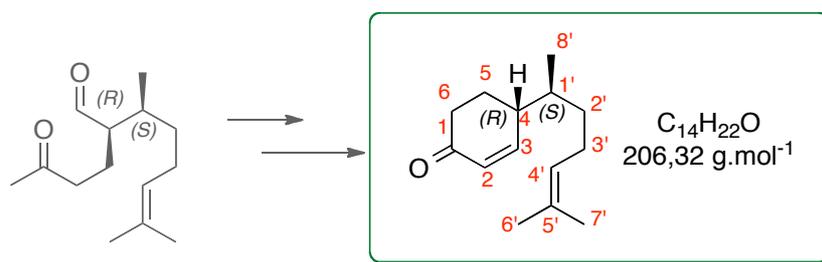
Diastéréoisomère majoritaire

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz): 0.91 (d, 3H- H_8 , $J = 7.0$ Hz), 1.24 (m, 2H- $H_{2'}$), 1.39 (m, 1H- $H_{2'}$), 1.53-1.67 (s, 6H- H_6 , H_7), 1.68 (m, 1H- $H_{1'}$), 1.78 (m, 1H- H_5), 1.86-2.12 (m, 2H- H_5 , $H_{3'}$), 2.25-2.55 (m, 3H- H_4 , H_6), 5.07 (t, 1H- $H_{4'}$, $J=7.0$ Hz), 6.00 (dd, 1H- H_2 , $J = 1.9$ Hz, 10.5 Hz), 6.85 (dt, 1H- H_3 , $J = 1.9$ Hz, 10.5 Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 16.5 ($C_{8'}$), 17.7 ($C_{7'}$), 23.9 ($C_{3'}$), 25.7 ($C_{6'}$), 25.8 (C_6), 33.9 ($C_{2'}$), 36.0 ($C_{1'}$), 37.7 (C_5), 41.6 (C_4), 124.2 ($C_{4'}$), 129.9 (C_3), 131.9 ($C_{5'}$), 154.3 (C_3), 200.1 (C_1).

Composé 34c

Crotonisation des cétyaldéhydes 33c



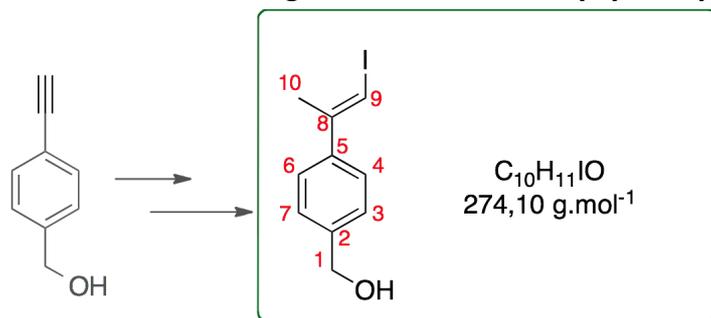
L'hydroxyde de lithium monohydraté (50 mg, 1.1 mmol, 0.1 mol%) est ajouté à une solution de **33c** (2.50 g, 11.1 mmol) dans l'isopropanol (25 mL). Après 24 heures à température ambiante, une solution de chlorure d'ammonium est ajoutée. La phase organique est séparée, et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner le composé **34c** (2.24 g, **98%**, *de*: 81%). L'excès diastéréoisomérique a été déterminé par HPLC sur colonne Hypercarb (4.6x150mm, éluant : MeOH)

Diastéréoisomère majoritaire

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz): 0.88 (d, 3H- $H_{8'}$, $J = 7.0 \text{ Hz}$), 1.24 (m, 2H- $H_{2'}$), 1.39 (m, 1H- $H_{2'}$), 1.54 (s, 6H- $H_{6'}$, $H_{7'}$), 1.68 (m, 1H- $H_{1'}$), 1.78 (m, 1H- H_5), 1.86-2.12 (m, 2H- H_5 , $H_{3'}$), 2.25-2.55 (m, 3H- H_4 , H_6), 5.07 (t, 1H- $H_{4'}$, $J = 7.0 \text{ Hz}$), 6.00 (dd, 1H- H_2 , $J = 1.9 \text{ Hz}$, 10.5 Hz), 6.82 (dt, 1H- H_3 , $J = 1.9 \text{ Hz}$, 10.5 Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 16.5 ($C_{8'}$), 17.7 ($C_{7'}$), 25.7 ($C_{3'}$), 25.8 ($C_{6'}$), 25.9 (C_5), 33.9 ($C_{2'}$), 36.1 ($C_{1'}$), 37.7 (C_6), 41.6 (C_4), 124.1 ($C_{4'}$), 129.9 (C_3), 131.8 ($C_{5'}$), 154.3 (C_3), 199.6 (C_1).

CHAPITRE III
Composé E-137
Carboalumination de Negishi sur l'alcool 4-éthynylbenzylique



Le triméthylaluminium (AlMe₃: 2.0 M solution dans le toluène, 12 ml, 22.70 mmol) est ajouté goutte à goutte à du dichlorure de *rac*-éthylènebis(indenyl)zirconocène (300 mg, 0.76 mmol) dans un ballon sec sous atmosphère inerte à température ambiante. Après 15 minutes d'agitation, une solution de l'alcool 4-éthynylbenzylique (500 mg, 3.8 mmol) dans du toluène anhydre (5 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à température ambiante puis est refroidi à -30 °C. Une solution de diiode (2.8 g, 22.7 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est ajoutée doucement. La solution est agitée pendant 1 jour à 0 °C. La réaction est stoppée avec précaution à la 0 °C par un ajout délicat d'une solution 1 :1 d'éther diéthylique et d'eau. Une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium est ajoutée. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées *in vacuo*. Le composé brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/Heptane: 2/8) pour donner **137** (858 mg, rdt = 83%).

*RMN*¹*H* (CDCl₃ 500 MHz) : 2.29 (s, 3H-H₁₀), 4.69 (s, 2H-H₁), 6.54 (s, 1H-H₉), 7.35 (m, 4H-H₃, H₄, H₆, H₇).

*RMN*¹³*C* (CDCl₃ 75 MHz) : 24.5 (C₁₀), 65.2 (C₁), 79.2 (C₉), 126.2 (C₃, C₇), 127.1 (C₄, C₆), 140.4 (C₈), 140.8 (C₅), 146.8 (C₂).

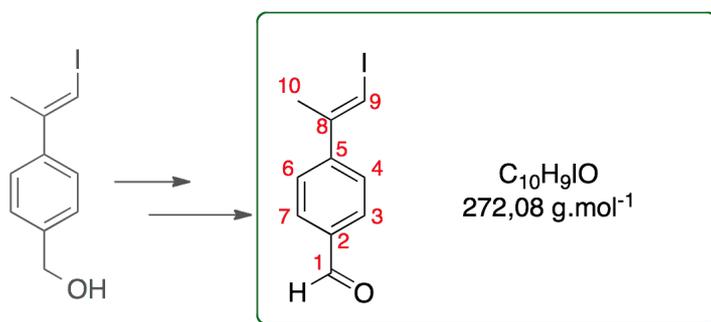
IR (cm⁻¹) : 3301, 3061, 2914, 2869, 1905;

MS (ESI) : *m/z* [M+Na⁺] : 296.9

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₀H₁₁IONa⁺ = 296.9752/ trouvée = 296.9760

Composé E-141

Oxydation de Swern sur le composé E-137

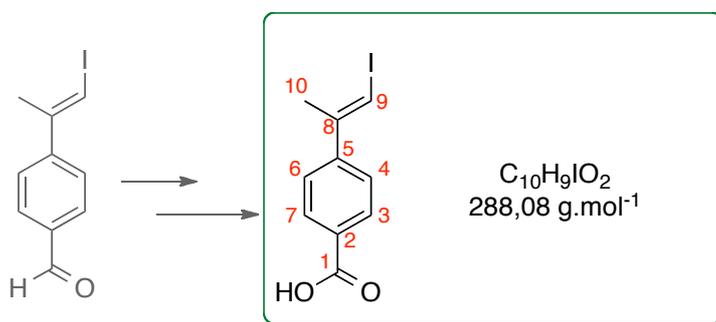


Le DMSO anhydre (0.6 mL, 6.9 mmol) est ajouté goutte à goutte à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ à une solution de chlorure d'oxalyle (0.3 mL, 3.4 mmol) dans du DCM anhydre (12 mL). Après 30 minutes, le produit **137** (630 mg, 2.30 mmol) dissout dans du DCM anhydre (6 mL) est ajouté. Après 30 minutes supplémentaires, la triéthylamine anhydre (1.8 mL, 13.8 mmol) est ajoutée et le mélange est agité à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes puis placé à température ambiante. De l'hydrogénocarbonate de sodium est ajouté et le mélange est extrait 3 fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo*. Le produit (618 mg, **rdt = 98%**) est alors engagé directement dans l'oxydation de Pinnick.

*RMN*¹*H* ($CDCl_3$, 300 MHz) : 2.27 (d, 3H-H₁₀, $J = 1.0 \text{ Hz}$), 6.71 (d, 1H-H₉, $J = 1.0 \text{ Hz}$), 7.47 (d, 2H-H₄, H₆, $J = 8.2 \text{ Hz}$), 7.81 (d, 2H-H₃, H₇, $J = 8.2 \text{ Hz}$), 9.97 (s, 1H-H₁).

Composé E-142

Oxydation de Pinnick sur E-141



Une solution de chlorite de sodium (417 mg, 4.6 mmol) et de dihydrogénophosphate de sodium (415 mg, 3.4 mmol) dans l'eau (7 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution d'aldéhyde **141** et de 2-méthylbutène (4.5 mL, 34.5 mmol) dans du 2-méthylpropan-2-ol (13 mL) à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité pendant 8 heures à température ambiante. Le mélange est basifié avec une solution d'hydroxyde de sodium à 10% et extraite trois fois avec de l'heptane. La phase aqueuse récoltée est acidifiée avec une solution d'acide chlorhydrique 1N et extraite trois fois avec de l'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner un solide blanc **142** (435 mg, rdt = 72%).

RMN^1H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 2.28 (s, 3H- H_{10}), 6.7 (s, 1H- H_9), 7.42 (d, 2H- H_4, H_6 , $J = 8.2 \text{ Hz}$), 8.03 (d, 2H- H_3, H_7 , $J = 8.2 \text{ Hz}$).

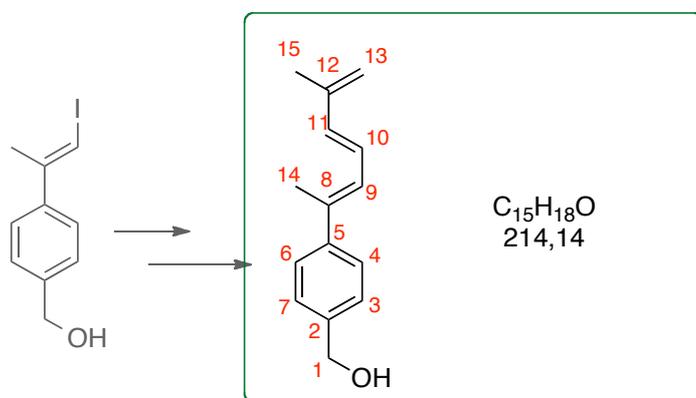
$RMN^{13}C$ ($CDCl_3$ 75 MHz) : 23.2 (C_{10}), 82.1 (C_9), 126.1 (C_3, C_7), 128.4 (C_2), 130.4 (C_4, C_6), 146.3 (C_5), 146.5 (C_8), 171.4 (C_1).

MS (ESI, MeOH) : m/z $[M-H]^-$ 286.9

$HRMS$: m/z calculée pour $C_{10}H_8O_2I^-$ = 286.9569 / trouvée = 286.9579

Composé (E,E)-123

Couplage de Suzuki



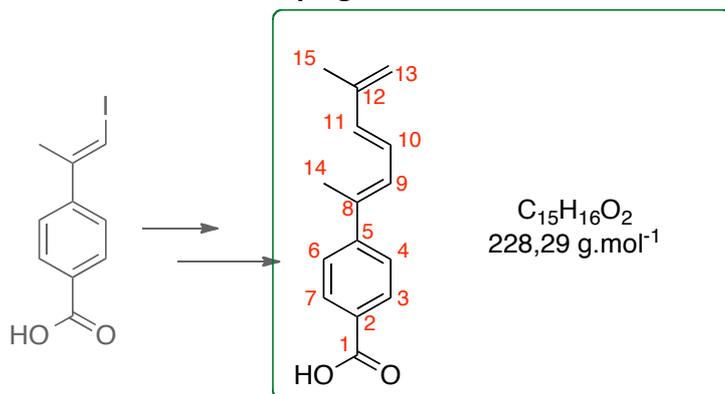
L'alcool vinyle iodé **137** (2.3 g, 8.39 mmol), l'ester boronique **122** (1.9 g, 10.06 mmol) et du phosphate de potassium (13.7 g, 67.12 mmol) sont dissous dans 90 mL d'un mélange de THF et d'eau (2 :1). Le tétrakis(triphénylphosphine) de palladium (928 mg, 0.83 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pendant une nuit à 50 °C dans l'obscurité sous argon. Le mélange est refroidi à température ambiante et une solution d'acide chlorhydrique 1N est ensuite ajoutée. La phase aqueuse est extraite trois fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo*. Le brut de réaction est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/Heptane : 1/9 à 3/7) pour donner le triène **123** (1.30 g, rdt = 74%).

RMN^1H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 1.97 (s, 3H- H_{15}), 2.23 (s, 3H- H_{14}), 4.71 (s, 2H- H_1), 5.06 (d, 2H- H_{15} , $J = 12.4$ Hz), 6.48 (d, 1H- H_{11} , $J = 14$ Hz), 6.60 (m, 2H- H_9 , H_{10}), 7.36 (d, 2H- H_4 , H_6 , $J = 8$ Hz), 7.48 (d, 2H H_3 , H_7 , $J = 8$ Hz)

$RMN^{13}C$ ($CDCl_3$ 75 MHz) : 16.1 (C_{14}), 18.6 (C_{15}), 65.1 (C_1), 116.8 (C_{13}), 125.7 (C_4), 125.8 (C_6), 127 (C_3/C_7), 127.3 (C_{10}), 136 (C_{11}), 136.2 (C_5), 139.6 (C_8), 142.4 (C_{12}), 142.5 (C_2)

Composé (E,E)-124

Couplage de Suzuki



L'acide vinyle iodé **142** (833 mg, 2.88 mmol), l'ester boronique **122** (672 mg, 3.46 mmol) et du phosphate de potassium (5.05 g, 23.04 mmol) sont dissous dans 45 mL d'un mélange de THF et d'eau (2 :1). Le tétrakis(triphénylphosphine) de palladium (323 mg, 0.28 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pendant une journée à température ambiante dans l'obscurité sous argon. Le mélange est basifié avec une solution de NaOH à 10% et extrait trois fois avec de l'éther diéthylique. La phase aqueuse est ensuite acidifiée avec une solution d'acide chlorhydrique 1N et extraite trois fois supplémentaires avec de l'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner le triène acide pur **124** (647 mg, rdt = 98%).

RMN 1H ($CDCl_3$ 300 MHz) : 1.88 (s, 3H- H_{15}), 2.16 (s, 3H- H_{14}), 5 (d, 2H- H_{13} , $J = 5.4 \text{ Hz}$), 6.51 (m, 3H- H_9 , H_{10} , H_{11}), 7.48 (d, 2H- H_4 , H_6 , $J = 7.8 \text{ Hz}$), 7.99 (d, 2H- H_3 , H_7).

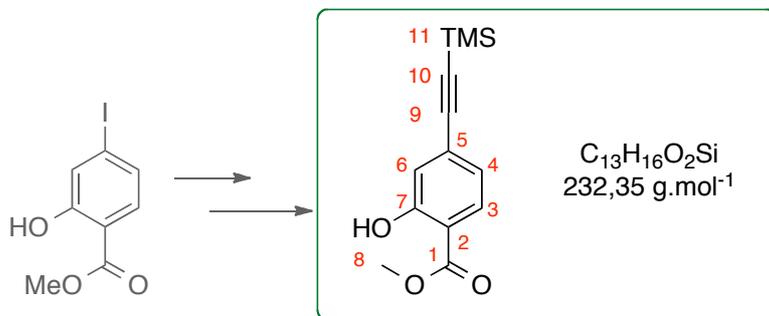
RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 75 MHz) : 15.9 (C_{14}), 18.6 (C_{15}), 117.8 (C_{13}), 125.5 (C_4 , C_6), 127.4 (C_8), 129.5 (C_{10}), 130.3 (C_3 , C_7), 135.2 (C_5), 137.7 (C_{11}), 142.2 (C_{12}), 148.2 (C_2), 171.5 (C_1).

MS (ESI, MeOH+ CH_2Cl_2) : m/z $[M-H]^-$ 227.1

HRMS : m/z calculée pour $C_{15}H_{16}O_2^- = 227.1072$ / trouvée = 227.1069

Composé 150

Couplage de Sonogashira



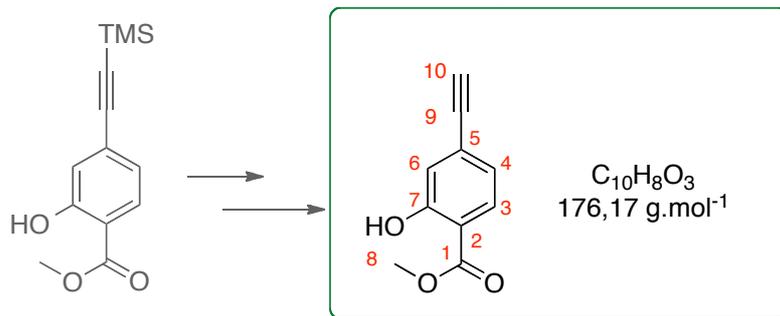
Le salicylate de 4-iodo-méthyle (550 mg, 2 mmol) et le triméthylsilylacétylène (230 mg, 2.4 mmol) sont dissous dans de la triéthylamine (5 mL). Le dichlorure de *trans*-bis(triphénylphosphine) de palladium (70 mg, 0.1 mmol) et l'iodure de cuivre (I) (28 mg, 1 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures puis une solution de chlorure d'ammonium est ajoutée. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo*. Le brut de réaction est purifié par chromatographie sur gel de silice (Heptane/DCM : 8/2) pour donner le composé **150** (463 mg, **rdt = 100%**).

RMN^1H ($CDCl_3$ 300 MHz) : 0.27 (s, 9H- H_{11}), 3.96 (s, 3H- H_8), 6.97 (dd, 1H- H_4 , $J_1 = 7.8 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.4 \text{ Hz}$), 7.08 (d, 1H- H_6 , $J = 1.4 \text{ Hz}$), 7.7 (d, 1H- H_3), 10.7 (s, 1H- H_{OH}).

$RMN^{13}C$ ($CDCl_3$ 75 MHz) : 1.2 (C13), 51.8 (C8), 53.5 (C10), 81.6 (C9), 111.4 (C2), 119.8 (C6), 124.9 (C4), 127.9 (C3), 128.5 (C5), 169.3 (C1).

Composé 151

Déprotection de l'alcyne 150



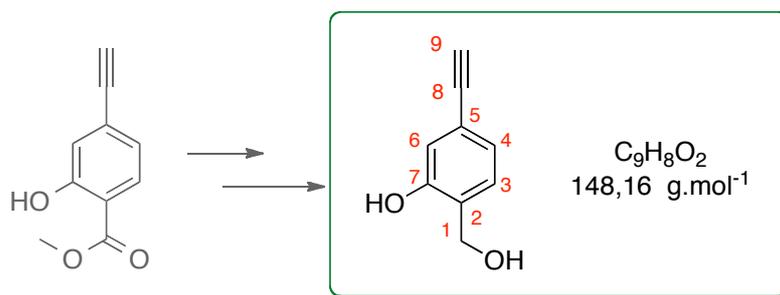
L'alcyne silylé **150** (500 mg, 2 mmol) est dissout dans 10 mL de THF et une solution à 1M de fluorure de tétrabutylammonium (2.2 mL, 2.2 mmol) est ajoutée. Le mélange est agité pendant une heure puis acidifié avec une solution d'acide chlorhydrique 1N. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner un solide beige **151** (310 mg, rdt = 89%).

RMN^1H ($CDCl_3$ 300 MHz) : 3.22 (s, 1H- H_9), 3.96 (s, 3H- H_{10}), 7.01 (dd, 1H- H_4 , $J_1 = 8.1 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.3 \text{ Hz}$), 7.12 (d, 1H- H_6 , $J = 1.3 \text{ Hz}$), 7.81 (d, 1H- H_3 , $J = 8.1 \text{ Hz}$), 10.76 (s, 1H- H_{OH}).

$RMN^{13}C$ ($CDCl_3$ 75 MHz) : 52.1 (C8), 81.6 (C9), 82.3 (C10), 112.3 (C2), 120.3 (C6), 125.2 (C4), 126.3 (C3), 128.5 (C5), 170.3 (C1).

Composé 147

Réduction de l'ester 151



A une solution de l'ester **151** (350 mg, 1.98 mmol) dans de l'éther diéthylique (35 mL) est ajouté délicatement le LAH (350mg) à -78°C . Après une nuit, une solution de NaOH 10% (3.5 mL) est ajouté, suivie de l'eau (3.5 mL) suivie de 3.5 mL de NaOH 10% supplémentaires sont ajoutés successivement. Le brut réactionnel est filtré sur célite pour éliminer les sels d'aluminium présents. Le filtrat obtenu est concentré *in vacuo* pour donner l'alcool pur **147** (249 mg, **rdt = 85%**).

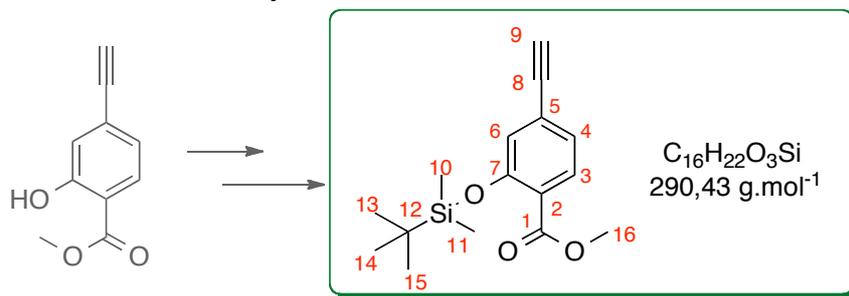
RMN ^1H (CDCl_3 300 MHz) : 3.07 (s, 1H- H_9), 4.88 (s, 2H- H_1), 7.01 (s, 1H- H_4) , 7.35 (s, 1H- H_6), 7.49 (s, 1H- H_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 75 MHz) : 64.6 (C1), 83.0 (C9), 83.9 (C8), 120.0 (C6), 123.5 (C5), 124.04 (C4), 127.6 (C3), 128.5 (C2), 152.1 (C7).

HRMS : m/z calculée pour $C_9H_7O_2^- = 147.0446$ / trouvée = 147.0442

Composé 155

Silylation de l'alcool ester 151



A une solution d'alcool ester **151** (500mg, 2.83 mmol) dans du DMF (20 mL) est ajouté à 0 °C la diisopropyléthylamine (1 mL, 5.67 mmol) suivi le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane (850 mg, 5.67 mmol). Le mélange réactionnel est agité trois heures à température ambiante puis il est traité avec l'eau glacée. La phase aqueuse est extraite trois fois avec du MTBE. Les phases organiques sont lavées à l'eau puis avec une solution saturée de NaCl. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner le composé **155** (715 mg, rdt = 87%).

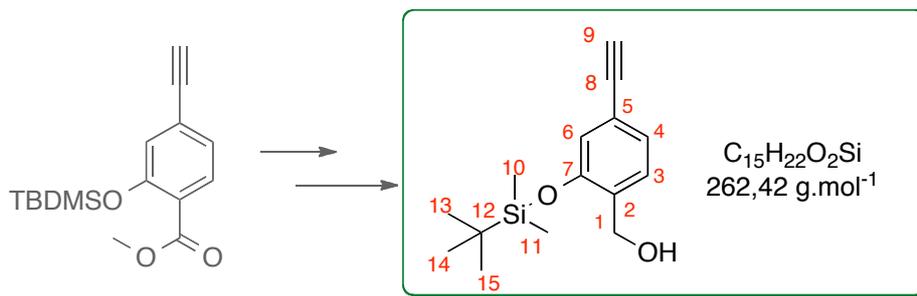
RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 0.26 (s, 6H-H₁₀, H₁₁), 1.04 (s, 9H-H₁₃, H₁₄, H₁₅), 3.20 (s, 1H-H₉), 3.89 (s, 3H-H₁₆), 7.01 (d, 1H-H₆, *J* = 1.5 Hz), 7.13 (dd, 1H-H₄, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 7.74 (d, 1H-H₃, *J* = 7.9 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : -4.1 (C₁₀/C₁₁), 25.8 (C₁₃/C₁₄/C₁₅), 51.9 (C₁₆), 79.3 (C₉), 80.1 (C₈), 124.5 (C₆), 124.6 (C₄), 129.8 (C₂), 129.9 (C₅), 131.7 (C₃), 155.1 (C₇), 174.2 (C₁).

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₆H₂₃O₃Si⁺ = 291.1416 / trouvée = 291.1428

Composé 158

Réduction de l'ester 155



A une solution de l'ester **155** (1.3 g, 4.47 mmol) dans de l'éther diéthylique (60 mL) est ajouté délicatement le LAH (1.3 g) à -78 °C. Après une nuit à -78 °C, une solution de NaOH 10% (13 mL) est ajoutée, suivi de l'eau (13 mL) et 13 mL de NaOH 10% supplémentaires sont ajoutés successivement. Le brut réactionnel est filtré sur célite pour éliminer les sels d'aluminium présents. Le filtrat obtenu est concentré *in vacuo* pour donner l'alcool **158** (920 mg, rdt = 75%)

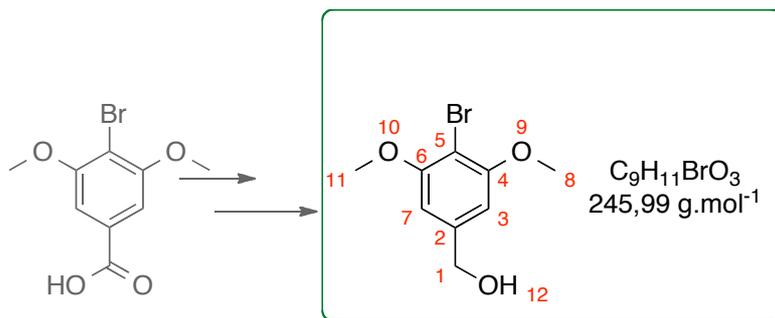
RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 0.25 (s, 6H-H₁₀, H₁₁), 0.99 (s, 9H-H₁₃, H₁₄, H₁₅), 3.03 (s, 1H-H₉), 4.64 (s, 2H-H₁), 6.89 (d, 1H-H₆, *J* = 1.5 Hz), 7.09 (dd, 1H-H₄, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 7.26 (d, 1H-H₃, *J* = 7.9 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : -4.1 (C₁₀/C₁₁), 18.2 (C₁₂), 25.7 (C₁₃/C₁₄/C₁₅), 61.5 (C₁), 83.4 (C₉), 84.5 (C₈), 121.6 (C₆), 122.2 (C₅), 125.5 (C₄), 128.5 (C₃), 132.7 (C₂), 153.1 (C₇).

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₅H₂₁O₂Si⁻ = 261.1311 / trouvée = 261.1315

Composé 164

Réduction de l'acide 159



Une solution 2M de complexe sulfure de diméthyle borane (3.6 mL, 7.4 mmol) dans du THF est ajoutée goutte à goutte à une solution d'acide 3,5-diméthoxy-4-bromobenzoïque (1 g, 3.7 mmol) dans du THF anhydre (40 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant une nuit à 40 °C. Une solution 1M d'acide chlorhydrique (20 mL) est ajoutée. Les produits volatiles sont enlevés *in vacuo*. La phase aqueuse résiduelle est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner un solide blanc **159** (882 mg, **rdt = 89%**).

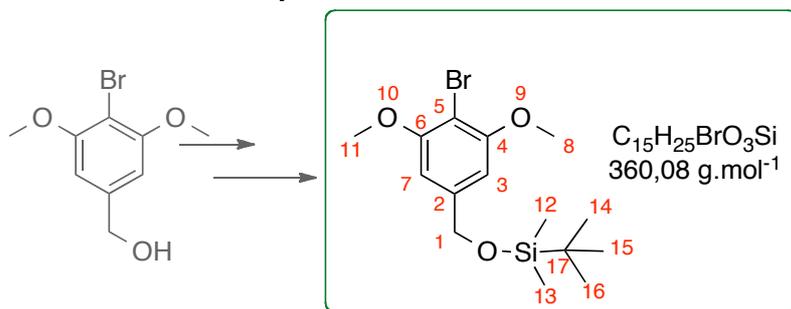
RMN ¹H (CDCl₃ 500 MHz) : 3.99 (s, 6H-H_{8,11}), 4.70 (s, 2H-H₁), 6.62 (s, 2H-H_{3,7}).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 56.4 (C8/C11), 64.9 (C1), 99.5 (C5), 103.2 (C3/C7), 141.8 (C2), 157.0 (C4/C6).

HRMS : *m/z* calculée pour C₉H₁₀BrO₃⁻ = 245.9921 / trouvée = 245.9919

Composé 166

Silylation de l'alcool 164



Du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane (490 mg, 26 mmol) et de l'imidazole (222 mg, 3.26 mmol) sont ajoutés à une solution de l'alcool **166** (440 mg, 1.63 mmol) dans du DMF anhydre (10 mL) sous atmosphère inerte. Après 16 heures d'agitation à 30 °C, une solution saturée de chlorure d'ammonium est ajoutée. La phase aqueuse est extraite trois fois par du MTBE. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo*. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/EtOH : 99/1) pour donner le composé final **166** (425 mg, rdt = 73%).

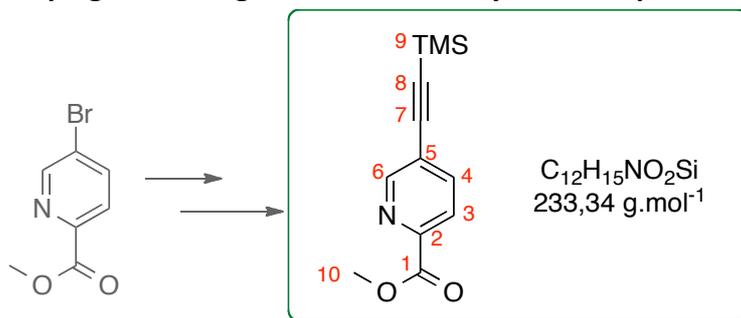
RMN 1H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 0.07 (s, 6H- $H_{12,13}$), 0.91 (s, 9H- $H_{14,15,16}$), 3.85 (s, 6H- $H_{8,11}$), 4.67 (s, 2H- H_1), 6.53 (s, 2H- $H_{3,7}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 75 MHz) : -4.6 (C12/C13), 18.4 (C17), 25.8 (C14/C15/C16), 56.5 (C8/C11), 64.5 (C1), 98.7 (C5), 102.1 (C3/C7), 142.4 (C2), 156.9 (C4/C6).

HRMS : m/z calculée pour $C_{15}H_{26}BrO_3Si^+$ = 360.0811 / trouvée = 360.0808

Composé 173

Couplage de Sonogashira sur le méthyl 5-bromopicolinate



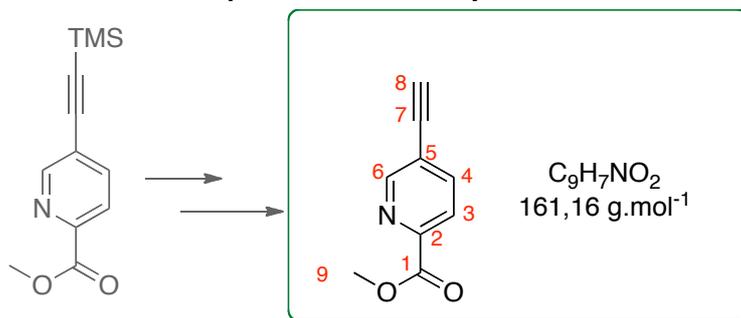
Le méthyl 5-bromopicolinate (500 mg, 2.31 mmol), du dichlorure de di(triphénylphosphine) de palladium (33 mg, 0.046 mmol) et de l'iodure de cuivre (13 mg, 0.07 mmol) sont dissouts dans un mélange de triéthylamine et THF (1 :1, 15 mL) sous atmosphère inerte. Le triméthylsilylacétylène (1 mL, 7 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à 60 °C pendant 18 heures. Le brut réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est concentré *in vacuo* puis purifié par chromatographie sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 9/1) pour donner le composé **173** (530 mg, **rdt = 100%**) sous forme d'une huile marron.

RMN ¹H (CDCl₃ 500 MHz) : 0.27 (s, 9H-H₉), 4.0 (s, 3H-H₁₀), 7.87 (dd, 1H-H₄, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz), 8.07 (d, 1H-H₃, *J* = 8.1 Hz), 8.76 (d, 1H-H₆, *J* = 1.4 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : -0.2 (C₉), 53.2 (C₁₀), 100.5 (C₈), 102.3 (C₇), 123.7 (C₅), 124.5 (C₃), 139.8 (C₄), 146.2 (C₂), 151.6 (C₆), 165.3 (C₁).

Composé 174

Déprotection de l'alcyne 173



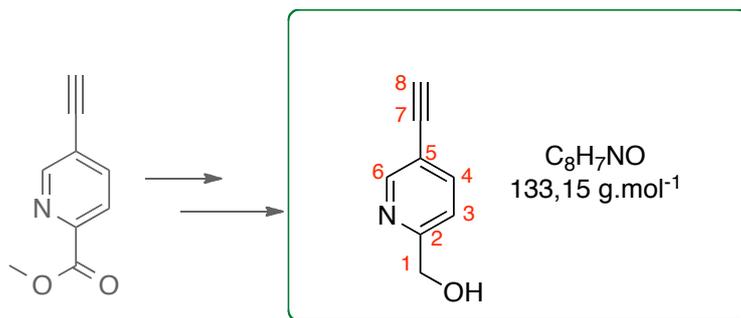
L'alcyne silylé **173** (383 mg, 1.64 mmol) est dissout dans 20 mL de THF et une solution à 1M de fluorure de tétrabutylammonium (1.9 mL, 1.9 mmol) est ajoutée. Le mélange est agité pendant une heure puis acidifié avec une solution d'acide chlorhydrique 1N. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées *in vacuo* pour donner le composé **174** (257 mg, rdt = 100%).

RMN^1H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 3.42 (s, 1H- H_8), 4.05 (s, 3H- H_9), 7.96 (dd, 1H- H_4 , $J_1 = 8.1 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.9 \text{ Hz}$), 8.14 (d, 1H- H_3 , $J = 8.1 \text{ Hz}$), 8.85 (d, 1H- H_6 , $J = 1.9 \text{ Hz}$).

$RMN^{13}C$ ($CDCl_3$, 75 MHz) : 52.2 (C9), 70.1 (C7), 79.6 (C8), 116.7 (C5), 120.5 (C3), 139.8 (C4), 147.2 (C2), 151.7 (C6), 162.6 (C1).

Composé 175

Réduction de l'ester 174



A une solution du l'ester **174** (250 mg, 1.64 mmol) dans de l'éther diéthylique (25 mL) est ajouté délicatement le LAH (250 mg) à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$. Après une nuit à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$, une solution de NaOH 10% (2.5 mL) est ajouté, puis de l'eau (2.5 mL) et 2.5 mL de NaOH 10% supplémentaires sont ajoutés successivement. Le brut réactionnel est filtré sur célite pour éliminer les sels d'aluminium présents. Le filtrat obtenu est concentré *in vacuo* et purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH : 97/3) pour donner l'alcool **175** (148 mg, **rdt** = **70%**).

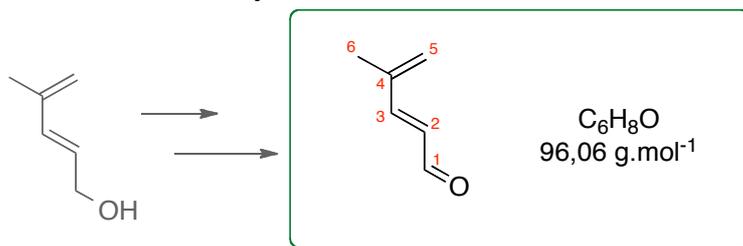
RMN ^1H (CDCl_3 500 MHz) : 3.97 (s, 1H- H_8), 4.73 (s, 2H- H_1), 7.28 (d, 1H- H_4 , $J = 8 \text{ Hz}$), 7.72 (d, 1H- H_3 , $J = 8 \text{ Hz}$), 8.59 (s, 1H- H_6).

RMN ^{13}C (CDCl_3 75 MHz) : 64.1 (C1), 68.0 (C7), 80.6 (C8), 115.4 (C5), 119.8 (C3), 139.7 (C4), 151.6 (C6), 155.3 (C2).

HRMS : m/z calculée pour $C_8H_8NO^+$ = 134.0600 / trouvée = 134.0606

Composé 189

Oxydation de l'alcool 188

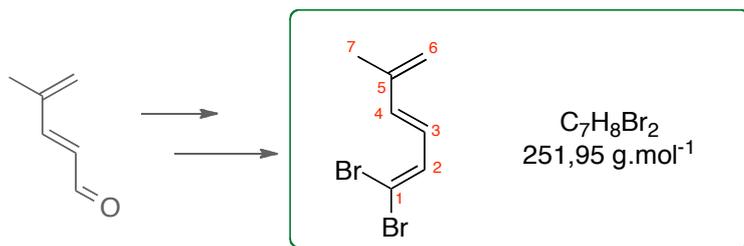


A une solution du diène alcool **188** (3.7 g, 37.7 mmol) dans 100 mL de dichlorométhane anhydre est ajouté, en excès, du dioxyde de manganèse (32.8 g, 377 mmol, 10.00 éq). Le mélange est agité à température ambiante sous argon pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur célite avec du dichlorométhane et le filtrat est concentré *in vacuo* pour donner le diène aldéhyde **189** (2.7g, rdt = 75%).

RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 1.87 (d, 3H-H₆, J = 1.2 Hz), 5.40 (d, 2H-H₅, J = 1.4 Hz), 6.10 (dd, 1H-H₂, J₁ = 7.8 Hz, J₂ = 15.8 Hz), 7.11 (d, 1H-H₃, J = 15.8 Hz), 9.55 (d, 1H-H₁, J = 7.8 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 18.1 (C6), 126.1 (C5), 129.3 (C3), 140.8 (C4), 154.7 (C2), 194.0 (C1).

Composé 178



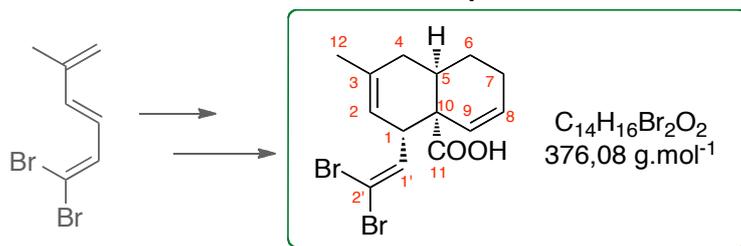
A une solution de triphénylphosphine (10.9 g, 41.6 mmol) dans du DCM (20 mL) est ajoutée, à 0 °C, une solution de tétrabromométhane (6.6 g, 20.8 mmol) dans du DCM (10 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant une heure puis une solution de l'aldéhyde **189** (1 g, 10.4 mmol) dans du DCM (10 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est de nouveau agité pendant 3 heures à 0 °C et de l'hexane est ensuite ajouté. Le brut réactionnel est filtré sur célite. Les restes d'oxyde de triphénylphosphine sont enlevés par précipitation dans du pentane pour donner le composé **178** (2 g, rdt = 77%).

RMN ¹H (CDCl₃ 500 MHz) : 1.88 (s, 3H-H₇), 5.12 (d, 2H-H₆, *J* = 9.4 Hz), 6.17 (dd, 1H-H₃, *J*₁ = 14.6 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz), 6.44 (d, 1H-H₄, *J* = 14.6 Hz), 6.96 (d, 2H-H₂, *J* = 9.4 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 19.2 (C7), 66.7 (C1), 125.1 (C6), 129.8 (C3), 130.8 (C4), 136.2 (C2), 140.5 (C5).

Composé 200

Diels-Alder sur le composé 178



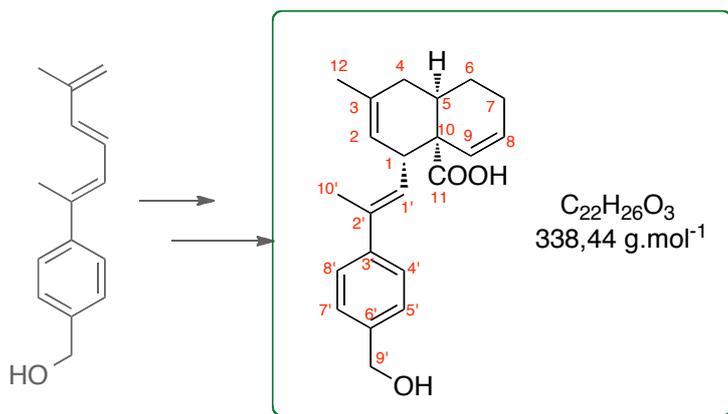
Le diénophile **198** (186 mg, 1.49 mmol) est ajouté à une solution du diène dibromé **178** (350, 1.49 mmol) et d'acide 2-bromobenzeneboronique (20 mg, 0.93 mmol) dans du dichlorométhane (3 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 2 jours à 50 °C dans l'obscurité. Le brut réactionnel est concentré *in vacuo* puis purifié par chromatographie sur gel de silice pour donner le composé **200** (251 mg, rdt = 47%).

Le produit est purifié par HPLC préparative sur colonne Sunfire (19x150 mm, 5 μm) dans un mélange acétonitrile/eau (65/35) + 0.1% d'acide formique.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) : 1.64 (s, 3H- H_{12}), 1.77 (dd, 1H- H_5 , $J_1 = 17.9 \text{ Hz}$, $J_2 = 6.2 \text{ Hz}$), 1.87 (m, 1H- H_7), 2-2.22 (m, 4H- H_6 , H_4), 2.41 (m, 1H- H_7), 3.32 (d, 1H- H_{11} , $J = 10 \text{ Hz}$), 5.12 (s, 1H- H_2), 5.61 (d, 1H- H_8 , $J = 10 \text{ Hz}$), 5.77 (d, 1H- H_9 , $J = 10 \text{ Hz}$), 6.41 (d, 1H- $\text{H}_{1'}$)

HRMS : m/z calculée pour $C_{14}H_{15}Br_2O_3Na$ = 398.8305 / trouvée = 398.8309

Composé 246



Le diénophile **198** (30 mg, 0.24 mmol) est ajouté à une solution du triène alcool **123** (100 mg, 0.47 mmol) et d'acide 2-bromobenzeneboronique (1.5 mg, 0.07 mmol) dans 3 mL de dichloroéthane. Le mélange réactionnel est agité à 60 °C sous argon jusqu'à disparition totale du diénophile **198** (suivi par CCM, 8 jours). Le brut réactionnel est purifié directement par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/Heptane 2/8 -> 5/5) pour donner le composé **246** (52 mg, rdt = 64%).

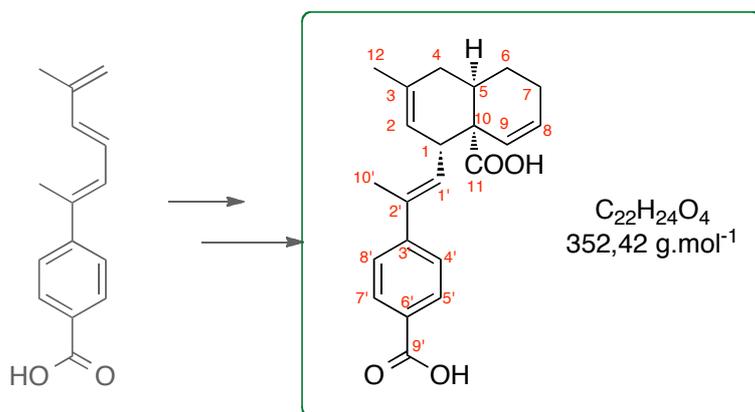
*RMN*¹*H* (*CDCl*₃ 500 MHz) : 1.21-1.36 (m, 2H-H₆), 1.67 (s, 3H-H₁₂), 1.84 (dd, 1H-H₅, *J*₁ = 16.7 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz), 1.95-2.02 (m, 3H-H₄, H₇), 2.09 (s, 3H-H_{10'}), 2.56 (s, 1H-H₇), 3.35 (s, 1H-H₁), 4.77 (s, 2H-H_{9'}), 5.23 (d, 1H-H₂; *J* = 3 Hz), 5.66 (t, 2H-H₈, H₉), 5.80 (d, 1H-H_{1'}, *J* = 10 Hz), 7.27 (d, 2H-H_{4'}, H_{8'}, *J* = 8 Hz), 7.34 (d, 2H-H_{5'}, H_{7'}, *J* = 8 Hz)

*RMN*¹³*C* (*CDCl*₃ 75 MHz) : 16.0 (C₁₂), 21.7 (C_{10'}), 23.3 (C₇), 23.9 (C₆), 28.6 (C₄), 31.6 (C₅), 43.8 (C₁), 51.5 (C₁₀), 65.0 (C_{9'}), 119.5 (C₂), 126.2 (C_{4'}/C_{8'}), 126.9 (C_{5'}/C_{7'}), 127.8 (C_{1'}), 129.0 (C₈), 129.6 (C₉), 135.5 (C₃), 135.2 (C_{2'}), 139.3 (C_{6'}/C_{3'}), 178.4 (C₁₁)

HRMS : *m/z* calculée pour C₂₂H₂₅O₃⁻ = 337.1804 / trouvée = 337.1804

IR (cm⁻¹) : 3387, 3016, 1709, 1363, 1215, 1026

Composé 245



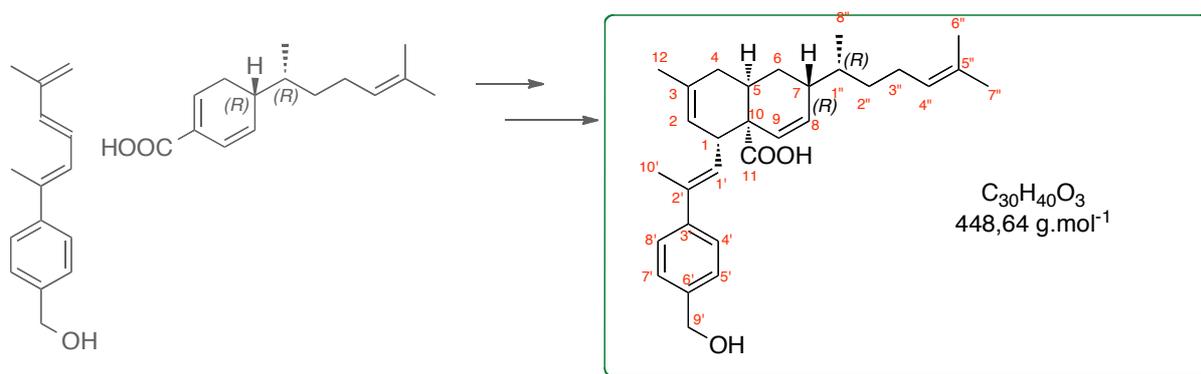
Le diénophile acide **198** (100 mg, 0.80 mmol) est ajouté à une solution de triène acide **124** (280 mg, 1.2 mmol) et d'acide 2-bromobenzèneboronique dans 4 mL de dichlorométhane. Le mélange réactionnel est agité à 60 °C pendant 15 jours (50% de conversion). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne en phase inverse (H₂O/MeOH (60/40 to 0/100)) pour donner le composé **245** (87 mg, rdt = 20%).

RMN ¹H (CDCl₃ 800 MHz) : 1.60-1.65 (m, 1H-H₆), 1.68 (s, 3H-H₁₂); 1.87-1.97 (m, 2H-H₄), 2.00-2.05 (m, 1H-H₇), 2.07 (s, 3H-H_{10'}), 2.08-2.12 (m, 2H-H₆), 2.16-2.20 (m, 1H-H₇), 2.64 (s, 1H-H₅), 3.39 (dd, 1H-H₁, $J_1 = 9.2$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz), 5.16 (s, 1H-H₂), 5.64 (d, 1H-H_{1'}, $J = 9.2$ Hz), 5.77 (d, 1H-H₈, $J = 10.5$ Hz), 5.81 (d, 1H-H₉, $J = 10.5$ Hz), 7.26 (d, 2H-H_{4'}, H_{8'}, $J = 7.8$ Hz), 7.61 (d, 2H-H_{5'}, H_{7'}, $J = 7.8$ Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃ 200 MHz) : 15.6 (C₁₂), 21.3 (C_{10'}), 23.4 (C₇), 23.8 (C₆), 27.9 (C₅), 31.1 (C₄), 44.9 (C₁), 48.8 (C₁₀), 118.8 (C₂), 125.5 (C_{4'}/C_{8'}), 127.4 (C₃), 129.2 (C₈), 129.6 (C₉), 130.1 (C_{5'}/C_{7'}), 134.4 (C_{2'}), 134.5 (C_{6'}), 138.5 (C_{3'}), 171.5 (C_{9'}), 181.4 (C₁₁).

HRMS : m/z calculée pour C₂₂H₂₃O₄⁻ = 351.1597 / trouvée = 351.1586

Composé 248a



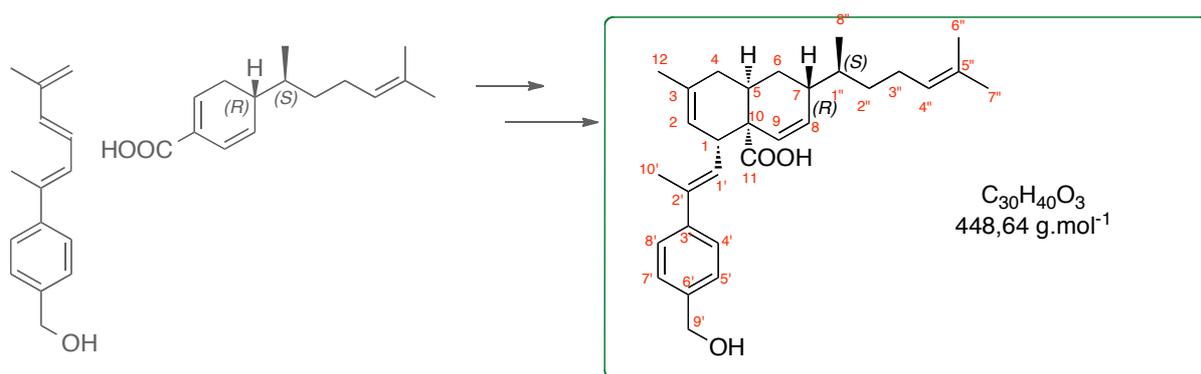
Le diénophile acide **17a** (200 mg, 0.86 mmol) est ajouté à une solution de triène **123** (370 mg, 1.72 mmol) et d'acide 2-bromobenzèneboronique (10.5 mg, 0.34 mmol) dans 2 mL de toluène. Le mélange est agité à 60 °C jusqu'à la consommation totale du diénophile (suivi par CCM, 10 jours). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (AcOEt/Heptane : 90/10 -> 50/50 + 0.1% d'acide acétique) pour donner le composé **247c** (175 mg, rdt = 46%).

RMN 1H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 0.77 (d, 3H- $H_{8'}$, $J = 6.2$ Hz), 1.14-1.22 (m, 1H- $H_{2''}$), 1.31-1.39 (m, 2H- $H_{1''}$, $H_{2''}$), 1.40-1.47 (m, 1H- H_4), 1.61 (s, 3H- $H_{6''}$), 1.65 (s, 3H- $H_{7''}$), 1.70 (s, 3H- H_{12}), 1.83-2.00 (m, 5H- H_4 , H_6 , $H_{3''}$), 2.03 (s, 3H- $H_{10'}$), 2.29-2.37 (m, 1H- H_7), 2.58-2.70 (m, 1H- H_5), 3.35 (dd, 1H- $H_{1'}$, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz), 4.63 (s, 2H- H_9), 5.09 (t, 1H- $H_{4''}$, $J = 6.6$ Hz), 5.22 (d, 1H- H_2 , $J = 4.1$ Hz), 5.53 (d, 1H- $H_{1'}$, $J = 10.4$ Hz), 5.66 (dd, 2H- H_8 , H_9 , $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz), 7.20 (d, 2H- $H_{4'}$, $H_{6'}$, $J = 8.1$ Hz), 7.26 (d, 2H- $H_{5'}$, $H_{7'}$, $J = 8.1$ Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 125 MHz) : 15.9 ($C_{8''}$), 16.0 ($C_{10'}$), 17.7 (C_{12}), 23.3 (C_6), 25.7 (C_4), 26.0 ($C_{6''}$), 28.0 ($C_{7''}$), 28.1 (C_5), 31.7 ($C_{3''}$), 33.9 ($C_{2''}$), 36.5 (C_7), 36.7 ($C_{1''}$), 44.0 (C_1), 48.4 (C_{10}), 65.0 ($C_{9'}$), 119.3 (C_2), 124.7 ($C_{4''}$), 126.1 ($C_{4'}/C_{8'}$), 126.7 ($C_{5'}/C_{7'}$), 127.9 ($C_{1'}$), 130.3 ($C_{5''}$), 131.2 (C_3), 132.0 (C_8), 134.1 (C_9), 134.7 ($C_{3'}$), 139.0 ($C_{6'}$), 143.5 ($C_{2'}$), 179.4 (C_{11}).

HRMS : m/z calculée pour $C_{30}H_{39}O_3 = 447.2899$ / trouvée = 447. 2919

Composé 248c



Le diénophile acide **17c** (200 mg, 0.86 mmol) est ajouté à une solution de triène **123** (370 mg, 1.72 mmol) et d'acide 2-bromobenzeneboronique (10.5 mg, 0.34 mmol) dans 2 mL de toluène. Le mélange est agité à 60 °C jusqu'à la consommation totale du diénophile (suivi par CCM, 10 jours). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice ((AcOEt/Heptane : 90/10 -> 50/50 + 0.1% d'acide acétique) pour donner le composé **247c** (185 mg, rdt = 48%).

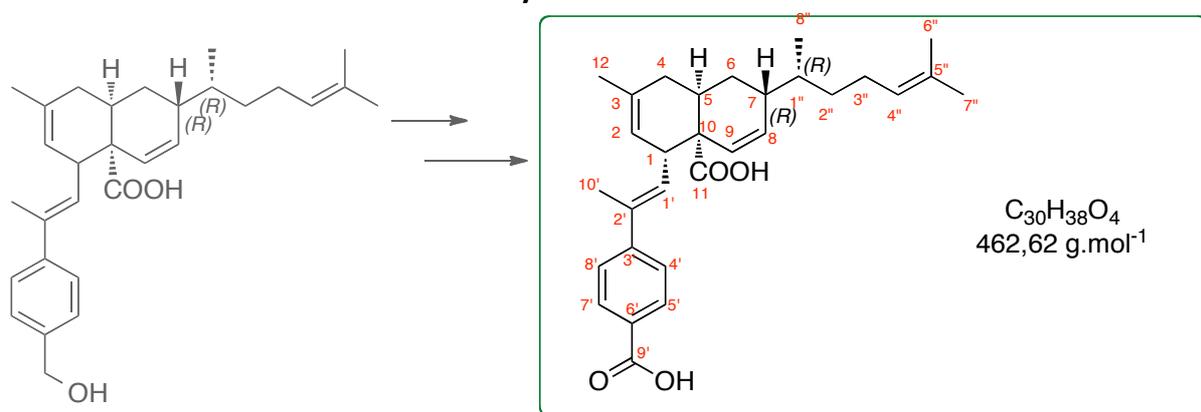
*RMN*¹*H* (CDCl₃ 500 MHz) : 0.59 (d, 3H-H_{8''}, *J* = 6.7 Hz), 1.03-1.13 (m, 1H-H_{2''}), 1.18-1.28 (m, 1H-H_{2''}), 1.40-1.47 (m, 1H-H₄), 1.48-1.52 (m, 1H-H_{1''}), 1.57 (s, 3H-H_{6''}), 1.59 (s, 3H-H_{7''}), 1.66 (s, 3H-H₁₂), 1.72-1.79 (m, 1H-H₄), 1.82-1.94 (m, 4H-H_{3''}, H₆), 1.96 (s, 3H-H_{10'}), 2.28-2.35 (m, 1H-H₇), 2.56-2.63 (m, 1H-H₅), 3.29 (dd, 1H-H₁, *J*₁ = 11.1 Hz, *J*₂ = 5.3 Hz), 4.56 (s, 2H-H_{9'}), 5.06 (t, 1H-H_{4''}, *J* = 6.4 Hz), 5.17 (d, 1H-H₂, *J* = 5.1 Hz), 5.45 (d, 1H-H_{1'}, *J* = 9.9 Hz), 5.58 (s, 2H-H₈, H₉), 7.12 (d, 2H-H_{4'}, H_{8'}, *J* = 7.8 Hz), 7.18 (d, 2H-H_{5'}, H_{7'}, *J* = 7.8 Hz)

*RMN*¹³*C* (CDCl₃ 125 MHz) : 14.9 (C_{8''}), 16.0 (C_{10'}), 17.8 (C₁₂), 23.5 (C₆), 24.8 (C₄), 25.9 (C_{6''}), 26.1 (C_{7''}), 28.3 (C₅), 31.9 (C_{3''}), 34.4 (C_{2''}), 36.0 (C₇), 36.4 (C_{1''}), 44.1 (C₁), 48.6 (C₁₀), 65.2 (C_{9'}), 119.4 (C₂), 124.9 (C_{4''}), 126.3 (C_{4'/C_{8'}}), 126.8 (C_{5'/C_{7'}}), 128.1 (C_{1'}), 129.9 (C_{5''}), 131.5 (C₃), 134.2 (C₈), 134.3 (C₉), 135.0 (C_{3'}), 139.3 (C_{6'}), 143.6 (C_{2'}), 179.9 (C₁₁)

HRMS : *m/z* calculée pour C₃₀H₃₉O₃ = 447.2899 / trouvée = 447.2915

Composé 247a

Oxydation de Jones



La *cis*-décaline **248a** (42 mg, 0.09 mmol) est ajoutée à une solution de réactif de Jones¹⁸⁵ (0.12 mL, 2.30 M) dans 1 mL d'acétone. Le mélange réactionnel est agité pendant une heure à température ambiante. Une solution aqueuse saturée de sulfate de sodium est ajoutée et la phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther diéthylique. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne en phase inverse (MeOH/H₂O + 0.1% acide formique 90/10->70/30) pour donner le composé **247a** (39 mg, rdt = 90%).

Le produit est ensuite purifié par chromatographie SFC semi-analytique sur une colonne AD-H 4.6x250 mm avec le méthanol comme co-solvant (15%).

RMN ¹H (CDCl₃ 600 MHz) : 0.85 (d, 3H-H_{8''}, J = 7 Hz), 1.16-1.25 (m, 1H-H_{2''}), 1.25-1.29 (m, 1H-H_{2''}), 1.35-1.42 (m, 1H-H_{3''}), 1.49(m, 1H-H_{1''}), 1.61 (s, 3H-H₁₂), 1.67 (s, 3H-H_{6''}), 1.68 (s, 3H-H_{7''}), 1.9-2.0 (m, 3H-H₆, H_{3''}), 2-2.07 (m, 2H-H₄), 2.09 (s, 3H-H_{10'}), 2.35 (m, 1H-H₇), 2.72 (m, 1H-H₅), 3.42 (dd, 1H-H₁, J₁ = 9.7 Hz, J₂ = 4.0 Hz), 5.1 (t, 1H-H_{4''}, J = 7 Hz), 5.19 (d, 1H-H₂, J = 4 Hz), 5.68 (d, 1H-H_{1'}, J = 9.7 Hz), 5.77 (t, 2H-H₉, H₁₀, J = 12.1 Hz), 7.25 (d, 2H-H_{4'}, H_{8'}, J = 7.5 Hz), 7.55 (d, 2H-H_{5'}, H_{7'}, J = 7.5 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃ 150 MHz) : 15.5 (C_{10'}), 16.2 (C_{8''}), 17.6 (C₁₂), 23.3 (C₆), 25.6 (C_{6''}), 25.7 (C_{7''}), 27.8 (C_{3''}), 28.4 (C₅), 31.4 (C₄), 33.7 (C_{2''}), 36.4 (C_{1''}), 36.8 (C₇), 45.0 (C₁), 48.9 (C₁₀),

¹⁸⁵ K. E. Harding, L. M. May, K. F. Dick, *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 1664-1665

118.7 (C2), 124.7 (C4'/C8'), 125.0 (C4''), 126.9 (C3'), 129.1 (C2'), 129.8 (C5'/C7'), 131.2 (C5''),
133.0 (C9), 134.0 (C8), 134.6 (C6'), 171.4 (C9'), 181.5 (C11)

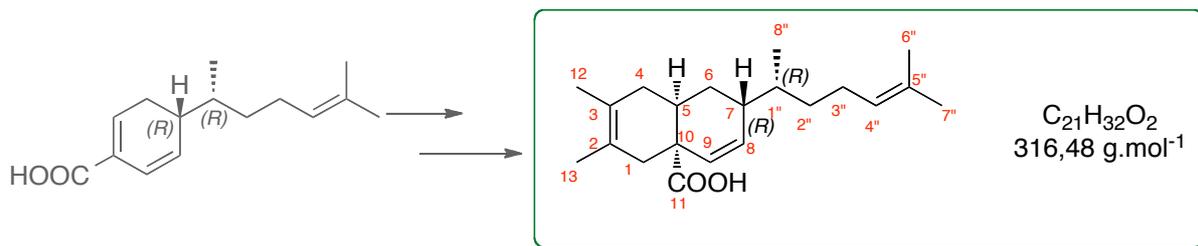
HRMS : m/z calculée pour $C_{30}H_{37}O_4$ = 461.2692 / trouvée = 461.2702

$\alpha_D = -17.8$ (c = 1 mg/ml, $CHCl_3$)

HRMS : m/z calculée pour $C_{30}H_{37}O_4$ = 461.2692 / trouvée = 461.2684

$\alpha_D = -60.4$ (c = 1 mg/ml, $CHCl_3$)

Composé 251a



Le 2,3-diméthylbutadiène (28.2 mg, 0.34 mmol) est ajouté à une solution de dienophile acide **17a** (40 mg, 0.17 mmol) et d'acide 2-bromophénylboronique (1.7 mg, 0.0085 mmol) dans 1 mL du DCM. Après 7 jours d'agitation à 60 °C, le brut réactionnel est concentré *in vacuo* et purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH (0->1%)) pour donner le composé **251a** (22 mg, rdt = 41%).

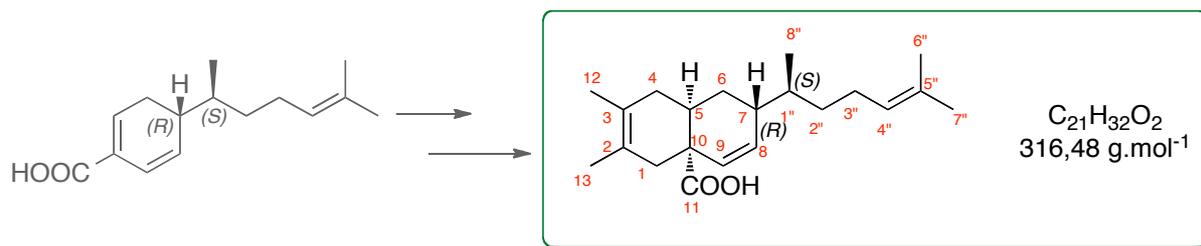
RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 0.89 (d, 3H-H_{8''}, J=6.6 Hz), 1.2 (m, 1H-H_{2''}), 1.47 (m, 2H-H₆, H_{1''}), 1.63 (m, 11H-H₆, H₁₂, H₁₃, H_{3''}, H_{6''}), 1.71 (s, 3H-H_{7''}), 1.81-2.17 (m, 5H-H₁, H₄, H_{2''}, H_{3''}), 2.2 (m, 1H-H₇), 2.37-2.51 (m, 2H-H₁, H₅), 5.12 (t, 1H-H_{4''}, J=6.4 Hz), 5.64 (dd, 1H-H₉, J₁=9.7 Hz, J₂=1.8 Hz), 5.73 (dd, 1H-H₈, J₁=9.7 Hz, J₃=2.9 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 16.8 (C_{8''}), 17.9 (C_{6''}), 19.0 (C₁₂), 19.1 (C₁₃), 25.9 (C_{7''}), 26.1 (C_{6''}), 28.5 (C_{3''}), 31.5 (C₅), 34.3 (C₄/C_{2''}), 37.0 (C₇), 37.6 (C_{1''}), 40.7 (C₁), 46.6 (C₁₀), 121.5 (C₃/C₂), 125.0 (C_{4''}), 130.4 (C₈), 131.4 (C_{5''}), 132.0 (C₉), 182.4 (C₁₁)

MS (ESI) : m/z [M+Na⁺]=339.2

HRMS : m/z calculée pour C₂₁H₃₂O₂Na = 339.2300 / trouvée = 339.2313

Composé 251c



Le 2,3-diméthylbutadiène (28.2 mg, 0.34 mmol) est ajouté à une solution de dienophile acide **198** (40 mg, 0.17 mmol) et d'acide 2-bromophénylboronique (1.7 mg, 0.0085 mmol) dans 1 mL du DCM. Après 7 jours d'agitation à 60 °C, le brut réactionnel est concentré *in vacuo* et purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH (0->1%)) pour donner le composé **251c** (38 mg, rdt = 71%).

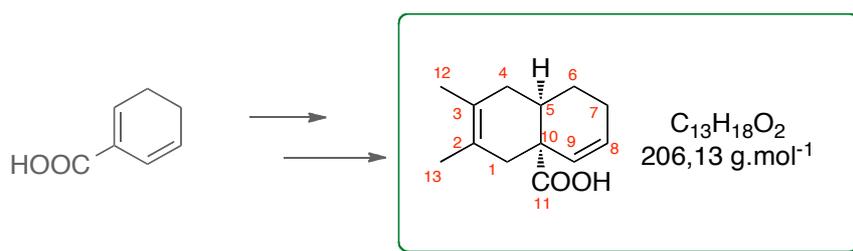
RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 0.84 (d, 3H-H_{8''}, J=7.0 Hz), 1.2 (m, 1H-H_{2''}), 1.53 (m, 2H-H_{1''}, H₆), 1.63 (m, 11H-H₆, H₁₂, H₁₃, H_{3''}, H_{6''}), 1.71 (s, 3H-H_{7''}), 1.81-2.17 (m, 5H-H₁, H₄, H_{2''}, H_{3''}), 2.2 (m, 1H-H₇), 2.37-2.51 (m, 2H-H₅, H₁), 5.12 (t, 1H-H_{4''}, J=6.4 Hz), 5.61 (dd, 1H-H₉, J₁=9.7 Hz, J₂=1.8 Hz), 5.69 (dd, 1H-H₈, J₁=9.7 Hz, J₃=2.9 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 15.8 (C_{8''}), 17.9 (C_{6''}), 19.0 (C₁₂), 19.1 (C₁₃), 25.7 (C_{7''}), 25.9 (C_{6''}), 26.0 (C_{3''}), 31.5 (C₅), 34.0 (C₄), 34.3 (C_{2''}), 36.5 (C₇), 36.7 (C_{1''}), 40.7 (C₁), 46.6 (C₁₀), 121.3 (C₃/C₂), 124.7 (C_{4'}), 129.8 (C₈), 131.2 (C_{5''}), 133.1 (C₉), 182.4 (C₁₁)

MS (ESI) : m/z [M+Na⁺]=339.2

HRMS : m/z calculée pour C₂₁H₃₂O₂Na = 339.2300 / trouvée = 339.2313

Composé 252



Le 2,3-diméthylbutadiène (118 mg, 1.44 mmol) est ajouté à une solution de dienophile acide **198** (178 mg, 1.44 mmol) et d'acide 2-bromophénylboronique (16 mg, 0.08 mmol) dans 3 mL du DCM. Après quatre jours d'agitation à 60 °C, le brut réactionnel est concentré *in vacuo* et purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/ Heptane 50/50) pour donner le composé **252** (215 mg, rdt = 70%).

Le produit est ensuite purifié par HPLC sur une colonne Sunfire® dans un mélange H₂O/acétonitrile (50/50) avec 0.1% d'acide formique.

RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) : 1.56 (m, 8H-H₆, H₁₂, H₁₃), 1.69 (m, 1H-H₄), 2.0 (m, 1H-H₁), 2.08 (m, 2H-H₇), 2.3 (m, 2H-H₄, H₅), 2.5 (d, 1H-H₁, *J*=17.5 Hz), 5.6 (dt, 1H-H₉, *J*=1.7 Hz, *J*=10 Hz), 5.7 (dt, 1H-H₈, *J*=3.3 Hz, *J*=10 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) : 18.8 (C13), 18.9 (C12), 24.3 (C7), 25.2 (C6), 32.3 (C5), 35.4 (C4), 38.9 (C1), 46.9 (C10), 121.3 (C3), 123.9 (C2), 128.0 (C8), 130.3 (C9), 183.0 (C11)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₃H₁₇O₂Na = 228.8810 / trouvée = 228.8813

Bibliographie

1. <http://www.helmo.be/esas/mapage/euxaussi/sante/cancer.html>
2. Calvo, F. ; Bruzzoni-Giovanelli, H. ; Nouvelles Cibles moléculaires dans les traitements des cancers, l'actualité chimique, n°269-270 novembre-décembre **2003**, 150-155
3. www.e-cancer.fr
4. Carter P: Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies, *Nat. Rev. Cancer*, **2001**, *1*, 118-129
5. Rang, H. P., *Pharmacology*, **2003**, 241
6. Newman, D. J.; Cragg, G. M., *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 311-335
7. Kerr, J. F. R ; Willie, A. H. ; Currie, A. R., *Br. J. Cancer*, **1972**, *26*, 239-257
8. Herker, E. ; Jungwirth, H. ; Lehmann, K. A. ; Maldener, A. ; Fröhlich, K. U. ; Wissing, S. ; Büttner, S. ; Fehr, M. ; Sigrist, S. ; Madeo, F., *J. Cell Biol.*, **2004**, *162*, 501-506
9. http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/apoptose.html
10. Zimmerman, K. C. ; Bonzon, C. ; Green, D. R., *Pharmacol. Ther.*, **2001**, *92*, 52-70
11. Poly (ADP-ribose) polymérase, protéines réparant les dommages de l'ADN et qui déclenchent la mort cellulaire si besoin)
12. Yu, S. W. ; Andrabi, S. A. ; Wang, H. ; Kim, N. S. ; G. G. ; Dawson, T. M. ; Dawson, V. L., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2006**, *103*, 18314-18319
13. Van Dyke, T., *New Engl. J. Med.*, **2007**, *356*, 79-81
14. Ashkenazi, A., *Nat. Rev. Cancer* **2**, **2002**, 420-430
15. Hinz, S. ; Trauzold, A., Boenicke, L., *Oncogene*, **2000**, *19*, 5477-5486
16. Ramzi, M. ; Anshu, G. ; Anton-Scott, G., *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **2008**, *3*, 20-30
17. Johnstone, R.W. ; Ruefli, A.A. ; Lowe, S.W., *Cell*, **2002**, *108*, 153-164
18. Zamani, N. ; Kroemer, G., *Curr. Biol.*, **2003**, *13*, R71-R73
19. Green, D. R. ; Kroemer, G., *Science*, **2004**, *304*, 626-629
20. Nika, N. D., *Clin. Cancer Res.*, **2007**, *13*, 7254-7262
21. Rautureau, G. J. ; Day, C. L. ; Hinds, M., *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, *11*, 1808-1824
22. Letai, A. G., *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, *8*, 121-132
23. <http://www.redrg.sgul.ac.uk/research/cell-apoptosis/mitochondria>
24. Juin, P. ; Geneste, O. ; Raimbaud, E. ; Hickman, J. A., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, *1644*, 251-260
25. Rutledge, S. E. ; Chin, J. W. ; Schepartz, A., *Curr. Opin. Che. Bio.*, **2002**, *6*, 479-485
26. Sattler, M. ; Liang, H. ; Nettlesheim, D. ; Meadows, R. P. ; Harlan, J. E. ; Eberstadt, M. ; Yoon, H. ; Shuker, S. B. ; Chang, B. ; Minn, A. J. ; Thompson C. B. ; Fesik, S. W., *Science*, **1997**, *275*, 983-986
27. Muchmore, S. W. ; Sattler, M. ; Liang, H. ; Meadows, R. P. ; Harlan, J. E. ; Yoon, H. S. ; Nettlesheim, D. ; Chang, B. S. ; Thompson, C. B. ; Wong, S. L. ; Ng, S. C. ; Fesik, S. W., *Nature*, **1996**, *381*, 335-341
28. Petros, A. M. ; Olejniczak, E. T. ; Fesik, S. W., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, *1644*, 83-94
29. Han, J. ; Goldstein, L. A. ; Gastman, B. R. ; Rabinovitz, A. ; Rabinowich, H., *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 16383-16392

30. Day, C. L. ; Chen, L. ; Richardson, S. J. ; Harrison, P. J. ; Huang, D. C. S. ; Hinds, M. G., *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 4738-4744
31. Liu, Q. ; Moldoveanu, T. ; Sprules, T. ; Matta-Camacho, E. ; Mansur-Azzam, N. ; Gehring, K., *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 19615-19624
32. Fire, E. ; Gullà, S. V. ; Grant, R. A. ; Keating, A. E., *Protein Sci.*, **2010**, *19*, 507-519
33. Konopleva, M. ; Contractor, R. ; Tsao, T. ; Samudio, I. ; Ruvolo, P.P. ; Kitada, S. ; Deng, X. ; Zhai, D. ; Shy, Y. X. ; Sneed, T. ; Verhaegen, M. ; Soengas, M. ; Ruvolo, V. R. ; McQueen, T. ; Schober, W. D. ; Watt, J. C. ; Jiffar, T. ; Ling, X. ; Marini, F. C. ; Harris, D. ; Dietrich, M. ; Estrov, Z. ; McCubrey, J. ; May, W. S. ; Reed, J. C. ; Andreefn M., *Cancer Cell*, **2006**, *10*, 375-388
34. van Delft, M. F. ; Wei, A. F. ; Mason, K. D. ; Vandenberg, C. J. ; Chen, L. ; Czabotar, P. E. ; Willis, S. N. ; Scott, C. L. ; Day, C. L. ; Cory, S. ; Adams, J. M. ; Roberts, A. W. ; Huang, D. C. , *Cancer Cell*, **2006**, *10*, 389-399
35. Derenne, S. ; Monia, B. ; Dean, N. M. ; Taylor, J. K. ; Rapp, M. J. ; Harousseau, J. L. ; Bataille, R. ; Amiot, M., *Blood*, **2002**, *100*, -194-199
36. Alvi, A. J. ; Austen, B. ; Weston, V. J. ; Fegan, C. ; MacCallum, D. ; Gianella-Borradori, A. ; Lane, D. P. ; Hubank, M. ; Powell, J. E. ; Wei, W. ; Taylor, A. M. ; Moss, P. A. ; Stankovic, T., *Blood*, **2005**, *105*, 4484-4491
37. Cavaretta, I. T. ; Neuwirt, H. ; Untergrasser, G. ; Moser, P. L. ; Zaki, M. H. ; Steiner, H. ; Rumpold, H. ; Fuchs, D. ; Hobisch, A. ; Nemeth, J. A. ; Culig, Z., *Oncogene*, **2007**, *26*, 2822-2832
38. Snyder, E. L. ; Meade, B. R. ; Saenz, C. C. ; Dowd, S. F., *PLoS Biology*, **2004**, *2*, 141-147
39. Shen, C. ; Dirk Rattat, D. ; Buck, A. ; Mehrke, G. ; Polat, B. ; Ribbert, H. ; Schirrmeister, H. ; Mahren, B. ; Matuschek, C. ; Reske, S. N., *Cancer Biother. Radiopharmac.*, **2003**, *18*, 17-26
40. Broch, S. ; Hénon, H. ; Debaud, A. L. ; Fogeron, M. L. ; Bonnefoy Bérard, N. ; Anizon, F. ; Moreau, P., *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 7132-7143
41. Wang, J. L. ; Liu, D. ; Zhang, Z. J. ; Shan, S. ; Han, X. ; Srinivasula, S. M. ; Croce, C. M. ; Alnemri, E. S. ; Huang, Z., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 7124-7129
42. Tse, C. ; Shoemaker, A. R. ; Adickes, J. ; Anderson, M. G. ; Chen, J. ; Jin, S. ; Johnson, E. F. ; Marsh, K. C. ; Mitten, M. J. ; Nimmer, P. ; Roberts, L. ; Tahir, S. K. ; Xiao, Y. ; Yang, X. ; Zhang, H. ; Fesik, S. ; Rosenberg, S. H. ; Elmore, S. W., *Cancer Res*, **2008**, *68*, 3421-3428
43. Trudel, S. ; Li, Z. H. ; Rauw, J. ; Tiedemann, R. E. ; Wen, X. Y. ; Stewart, A. K., *Blood*, **2007**, *109*, 5430-5438
44. <http://www.cancer.gov/drugdictionary?CdrID=594869>
45. Petros, A. M. ; Dinges, J. ; Augeri, D. J. ; Baumeister, S. A. ; Betebenner, D. A. ; Bures, M. G. ; Elmore, S. W. ; Hajduk, P. J. ; Joseph, M. K. ; Landis, S. K. ; Nettlesheim, D. G. ; Rosenberg, S. H. ; Shen, W. ; Thomas, S. ; Wang, X. ; Zanze, I. ; Zhang, H. ; Fesik, S. W., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 656-663
46. Shuker, S. B. ; Hajduk, P. J. ; Meadows, R. P. ; Fesik, S. W., *Science*, **1996**, *29*, 1531-1534
47. Stauffer, S. R., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2007**, *7*, 961-965
48. Zhou, H. ; Chen, J. ; Meagher, J. L. ; Yang, C. Y. ; Aguilar, A. ; Liu, L. ; Bai, L. ; Cong, X. ; Cai, Q. ; Fang, X. ; Stuckey, J. A. ; and Wang, S. , *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 4664-4682

49. Qian, J. ; Voorbach, M. J. ; Huth, J. R. ; Coen, M. L. ; Zhang, H. ; Ng, S. C. ; Comess, K. M. ; Petros, A. M., Rosenberg, S. H. ; Warrior, U. ; Burns, D. J., *Analytical Biochemistry*, **2004**, *328*, 131-138
50. Litaudon, M. ; Bousserouel, H. ; Awang, K. ; Nosjean, O. ; Martin, M. T. ; Tran Huu Dau, M. E. ; Hadi, H. A. ; Boutin, J. A. ; Sévenet, T. ; Guéritte, F., *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 480-483
51. Leverrier, A. ; Awang, K. ; Guéritte, F. ; Litaudon, M. *Phytochemistry*, **2011**, *72*, 1443-1452
52. Fomekong, F. D. ; Roussi, F. ; Le Callonec, C. ; Bousserouel, H. ; Litaudon, M. ; Guéritte, F., *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 2192-2197
53. Litaudon, M. ; Jolly, C. ; Le Callonec, C. ; Din Cuong, D. ; Retailleau, P. ; Nosjean, O. ; Nguyen, V. H. ; Pfeiffer, B. ; Boutin, J. A. ; Guéritte, F., *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 1314-1320
54. Hagiwara, H. ; Okabe, T. ; Ono, H. ; Kamat, V. P. ; Hoshi, T. ; Suzuki, T. ; Ando, M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **2002**, 895-900
55. Ichihara, A. ; Tazaki, H. ; Sakamura, S., *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 5373-5376
56. Oikawa, H. ; Yokota, T. ; Abe, T. ; Ichihara, A. ; Sakamura, S. ; Yoshizawa, Y. ; Vederas, J. C., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1282-1284
57. Oikawa, H. ; Katayama, K. ; Suzuki, Y. ; Ichihara, A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* , **1995**, 132-1322
58. Katayama, K. ; Kobayashi, T. ; Oikawa, H. ; Honma, M. ; Ichihara, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1384*, 387-395
59. Sato, H. ; Konma, K. ; Sakamura, S. ; Furusaki, A. ; Matsumoto, T. ; Matsuzaki, T., *Agr. Biol. Chem.*, **1981**, *45*, 795-797
60. Sakurai, I. ; Suzuki, H. ; Shimizu, S. ; Yamamoto, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 5141-5143
61. Oikawa, H. ; Yagi, K. ; Watanabe, K. ; Yagi, K. ; Ohashi, S. ; Mie, T. ; Ichihara, A. ; Honma, M., *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 6983-6986
62. Guimaraes, C. R. W. ; Udier-Blagovic, M. ; Jorgensen, W. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 3577-3588
63. Witter, D. J. ; Vederas, J. C., *J. Org. Chem.* , **1996**, *61*, 2613-2623
64. Kennedy, D. J. ; Auclain, K. ; Kendrew, S. G. ; Park, C. ; Vederas, J. C. ; Hutchinson, C. R., *Science*, **1999**, *284*, 1368-1372
65. Auclain, K. ; Sutherland, A. ; Kennedy, J. ; Witter, D. J. ; Ven den Heever, J. P. ; Hutchinson, C. R. ; Vederas, J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 11519-11520
66. Kim, H. J. ; Ruszczycky, M. W. ; Choi, Y. N. ; Liu, Y. N. ; Liu, H. W., *Nature*, **2011**, *473*, 109-112
67. Townsend, C. A., *Chem. Bio. Chem.*, **2011**, *12*, 2267-2269
68. Fomekong, D. ; Roussi, F. ; Leverrier, A. ; Bréteché, A. ; Guéritte, F., *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 7412-7415
69. Hagiwara, H. ; Okabe, T. ; Hakoda, K. ; Hoshi, T. ; Ono, H. ; Kamat, V. P. ; Suzuki, T. ; Ando, M., *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2705-2707
70. Shaw, D. M. ; Sarlah, D. ; Nicolaou, K. C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 4708-4711
71. Burton, D. R. ; Rowcliffe, E. ; Shaw, D. M. ; Sarlah, D. ; Wu, R. T. ; Nicolaou, K. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 11114-11121
72. Enders, D. ; Kipphard, H. ; Gerdes, P. ; BrenaValle, L. J. ; Bhushan, V., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1988**, *97*, 691-704
73. Chi, Y. ; Gellman, S. H., *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4253-4256

74. Foti, C. J. ; Comins, D. L., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2656-2657
75. Gawley, R. E., *Synthesis*, **1976**, 777-794
76. Heathcock, C. H. ; Mahaim, C. ; Schlecht, M. F. ; Utawanit, T., *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 3264-3274
77. Jung, M. E., *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 3-31
78. Li, P. ; Payette, J. N. ; Yamamoto, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9534-9539
79. Yamamoto, Y. ; Nishii, S. ; Ibuka, T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 464-466.
80. Enders, D. ; Rendenbach, B. E. M., *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 2235-2342
81. Pizzonero, M. ; Hendra, F. ; Delarue-Cochin, S. ; Tran Huu-Dau, M. E. ; Dumas, F. ; Cavé, C. ; Nour, M. ; d'Angelo, J., *Tetrahedron Asymmetry*, **2005**, *16*, 3853-3857
82. Pelissier, H., *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 9267-9331
83. Christoffers, J., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, *7*, 1259-1266
84. Langenhan, J. M. ; Griffith, B. R. ; Thorson, J. S., *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 1696-1711
85. List, B., *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 5573-5590
86. Dalko, P. I. ; Moisan, L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 5138-5175
87. Palom, C. ; Mielgo, A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 7876-7880
88. Halland, N. ; Hansen, T. ; Jørgensen, K. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 4955-4957
89. Peelen, T. J. ; Chi, Y. ; Samuel H. Gellman, S. H. , *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11598-11599
90. Bernots, R. C. ; Cube, R. V., *Synth. Commun.*, **1990**, *20*, 1209-1212
91. Hayashi, Y. ; Gotoh, H. ; Hayashi, T. ; Shoji, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *27*, 4212-4215
92. Marigo, M. ; Wabnitz, T. C. ; Fielenbach, D. ; Joergensen, K. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *5*, 794-797
93. Hai-Feng C. ; Yang, Y-Q. ; Chai, Z. ; Li, P. ; Zheng, C-W. ; Zhu, S-Z. ; Zhao, G., *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 117-122
94. Chen, K. ; Ishihara, Y. ; Moron Galan, M. ; Baran, P. S., *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 4738-4744
95. Cacchi, S. ; Morera, E. ; Ortar, G., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 1109-1112
96. Foti, C. J. ; Comins, D. L., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2656-2657
97. Comins, D. L. ; Dehghani, A., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 6299-6302
98. Freskos, J. N. ; Laneman, S. A. ; Reilly, M. L. ; Ripin, D. H., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 835-838
99. Marradi, M., *Synlett*, **2005**, *7*, 1195-1196
100. Cacchi, S. ; Lupi, A., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3939-3942
101. Rieger, J. M. ; Brown, M. L. ; Sullivan, G. W. ; Linden, J. ; Macdonald, T. L., *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 531-539.
102. Dess, D. B. ; Martin J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 7277-7287
103. Müller, S. ; Liepold, B. ; Roth, G. J. ; Bestmann, H. J., *Synlett*, **1996**, *6*, 521-522.
104. Zhang, S. ; Xu, L. ; Trudell, M. L., *Synthesis*, **2005**, *11*, 1757-1760
105. Bennett, C. J. ; Caldwell, S. T. ; McPhail, D. B. ; Morrice, P. B. ; Duthie, G. G. ; Hartley, R. C., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 2079-2098
106. Bringmann, G. ; Holenz, J. ; Weirich, R. ; Rübenacker, M. ; Funke, C. ; Boyd, M. R. ; Gulakowski, R. J. ; François, G., *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 497-512
107. Mei, T. S. ; Giri, R. ; Maugel, N. ; Yu, J. Q., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 5215-5219

- 108.Ooi, T. ; Uematsu, Y. ; Maruoka, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 2548-2549
- 109.Schachtschabel, D. ; Boland, W., *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 1366-1372
- 110.Takai, K. ; Nitta, K. ; Utimoto, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 7408-7410
- 111.Xu, Z. ; Rao, H. ; Wang, G. ; Negishi, E. ; *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 3151-3182
- 112.Van Horn, D. E. ; Negishi, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 2252-2254
- 113.Yoshida, T. ; Negishi, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 4985-4987
- 114.Negishi, E., *Chem. Scr.*, **1989**, *29*, 457-459
- 115.Negishi, E. ; Takahashi, T., *Acc. Chem. Res.*, **1994**, *27*, 124-130
- 116.Wipf, P. ; Lim, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, *32*, 1068-1071
- 117.Rebe, S. ; Wipf, R., *Chem. Commun.*, **2001**, *2*, 299-307
- 118.Wipf, P. ; Nunes, R. L. ; Rebe, S., *Helv. Chim. Acta.*, **2002**, *85*, 3478-3488
- 119.Lower, A. ; Butler, T. ; Lipshutz, B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 15396-15398
- 120.Negishi, E. ; King, A. O. ; Klima, W. L., Patterson, W. ; Silveira Jr., A., *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 2526-2528
- 121.Dirat, O. ; Kouklovsky, C. ; Langlois, Y., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 6634-6642
- 122.Pitsinos, E. ; Athinaios, N. ; Xu, Z. ; Wang, G. ; Negishi, E., *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 2200-2202
- 123.Amorelli, B. ; Lipshutz, B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1396-1397
- 124.Negishi, E. ; Van Horn, D. E. ; Yoshida, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6639-6647
- 125.Zhao, M. ; Li, J. ; Song, Z. ; Desmond, R. ; Tschäen, D. M. ; Grabowski, E. J. J. ; Reider, P. J., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5323-5326
- 126.Zhang, S. ; Xu, L. ; Trudell, M. L., *Synthesis*, **2005**, *11*, 1757-1760
- 127.Thottumkara, A. P. ; Bowsher, M. S. ; Vinod, T. K., *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 2933-2936
- 128.Grill, J. M. ; Ogle, J. W. ; Miller, S. A., *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 9291-9296
- 129.Kraus, G. A. ; Roth, B., *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 4825-4830
- 130.Fujiwara, K. ; Awakura, D. ; Tsunashima, M. ; Nakamura, A. ; Honma, T. ; Murai, A., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2616-2617
- 131.Miyaura, N. ; Yamada, K. ; Suzuki, A., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *20*, 3437-3440
- 132.Miyaura, N. ; Suzuki, A., *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- 133.Tucker, C. E. ; Davidson, J. ; Knochel, P., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 3482-3485
- 134.PraveenGanesh, N. ; d'Hondt, S. ; Chavant, P. Y., *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 4510-4514
- 135.Pereira, S. ; Srebnik, M., *Organometallics*, **1995**, *14*, 3127-3128
- 136.GALDERMA RESEARCH and DEVELOPMENT,S.N.C. ; WO2004/46096 A2, **2004**, 31-32
- 137.Taeho, L. ; Hee Ryong, K. ; Shinae, K. ; Sanghee, K., *Tetrahedron*, **2006**, *17*, 4081-4085
- 138.Dirat, O. ; Kouklovsky, C. ; Langlois, Y., *J. Org. Chem.*, **1998**, *19*, 6634-6642
- 139.Fabrice Gallou, F. ; Haenggi, R. ; Hirt, H. ; Marterer, W. ; Schaefer, F. ; Seeger-Weibel, M., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *34*, 5024-5027
- 140.DUKE UNIVERSITY; ZHOU, Pei; TOONE, Eric, J. ; WO2012/31298 A2 ; **2012**
- 141.Park, B. G. ; Pink, M. ; Lee, D., *J. Organomet. Chem.*, **2011**, *25*, 4039-4045
- 142.Molander, G. A. ; Yokoyama, Y., *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 2493-2498
- 143.Molander, G. A. ; Figueroa, R., *Aldrichim. Acta* **2005**, *38*, 49-56.

144. Liron, F. ; Fosse, C. ; Pernolet, A. ; Roulland, E., *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 2220-2223
145. Roush, W. R. ; Koyama, K. ; Curtin, M. L. ; Moriarty, K. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *116*, 7502-7512
146. Crimmins, M. T. ; Al-awar, R. S. ; Vallin, I. M. ; Hollis, W. G. Jr. ; O'Mahony, R. ; Lever, J. G. ; Bankaitis-Davis, D. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 7513-7528
147. Corey, E. J. ; Suggs, J. W., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 2647-2650
148. Danheiser, R. L. ; Fink, D. M. ; Tsai, Y. M., *Org. Synth.*, **1993**, *8*, 367
149. Vinczer, P. ; Struhar, S. ; Novak, L. ; Szantay, C., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 683-686
150. Wang, C. ; Sun, C. ; Weng, F. ; Gao, M. ; Liu, B. ; Xu, B., *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 2984-2989
151. Boger, D. L. ; Patel, M. ; Takusagawa, F., *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 1911-1916
152. Al-Zoubi, R. M. ; Marion, O. ; Hall, D. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2876-2879
153. Zhu, G. ; Chen, D. ; Wang, Y. ; Zheng, R., *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 5796-5798.
154. Sud, D. ; Wigglesworth, T. J. ; Branda, N. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 8017-8019
155. Cahiez, G. ; Gager, O. ; Buendia, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1278-1281
156. Diels, O. ; Alder, K., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1928**, *460*, 98-122
157. Pour des revues sur le sujet voir : Corey, E. J. ; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1650-1657 ; Nicolaou, K. C. ; Snyder, S. A. ; Montagnon, T. ; Vassilikogiannakis, G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1668-1698
158. Woodward, R. B. ; Sondeinheimer, F. ; Taub, D. ; Heusler, K. ; Mclamore, W. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, *74*, 4223-4251
159. Deng, J. ; Zhu, B. ; Lu, Z. ; Yu, H. ; Li, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 920-923
160. Liu, P. ; Jacobsen, E. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 10772-10773
161. Dossetter, A. G. ; Jamison, T. F. ; Jacobsen, E. N., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *111*, 2549-2552
162. Miyaoka, H. ; Abe, Y. ; Sekiya, N. ; Mitome, H. ; Kawashima, E., *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 901-903
163. Pour des livres sur le sujet voir : Fringuelli, F. ; Tattichi, A. ; *The Diels-Alder reaction : Selected Practical Methods*, **2002** ; Ishihara, K. ; Sakakura, *Science of Synthesis, Stereoselective synthesis*, ed. Evans, P. A. ; Thieme, **2011**, *3*, 67-123
164. Merino, P. ; Marques-Lopez, E. ; Tejero, T. ; Herrera, R. P. ; *Synthesis*, **2010**, *1*, 1-26
165. Walborsky, H.M ; Barash, L. ; Davis, T. C., *Tetrahedron*, **1963**, *19*, 2333
166. Pindur, U. ; Lutz, G. ; Otto, C., *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 741-761
167. Evans, D. A. ; Johnson, J. S., *Comprehensive Organic Catalysis* ; Jacobsen, E. N. ; Pfaltz, A. ; Yamamoto, H., Eds. ; Springer, Berlin, **1999**, 1177
168. Liu, H. J. ; Han, Y., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 423-426
169. Beifuss, U. ; Tarashevski, M. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 2907
170. Meyers, A. I. ; Busacca, C. A., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 6977-6980
171. Lelais, G. ; MacMillan, D. W. C., *Aldrichimica Acta*, **2006**, *39*, 79-87
172. Pour de récentes utilisations : Mossé, S. ; Alexakis, A., *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3577-3580 ; Hayashi, Y. ; Samanta, S. ; Gotoh, H. ; Ishikawa, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6634-6637
173. Wilson, R. M. ; Jen, W. S. ; MacMillan, D. W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11616-11617
174. Zhen, H. ; Hall, D. G., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 3561-3564
175. Chen, W. W. ; Bi, H. P. ; Li, C. J., *Synlett*, **2010**, *3*, 477-485

176. Mannam, S. ; Sekar, G., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 1083-1086
177. Qian, J. ; Voorbach, M. J. ; Huth, J. R. ; Coen, M. L. ; Zhang, H. ; Ng, S.-C. ; Comess, K. M. ; Petros, A. M. ; Rosenberg, S. L., Warrior, U. ; Burns, D. J., *Anal. Biochem.*, **2004**, 328, 131-138
178. Zhang, J. H. ; Chung, T. D. Y. ; Oldenburg, K. R., *J. Biomol. Screen.*, **1999**, 4, 67-73
179. Zhang, H. ; Nimmer, P. ; Rosenberg, S. H. ; Ng, S. C. ; Joseph, M., *Anal. Biochem.*, **2002**, 307, 70-75
180. Pujals, A. ; Benouf, B. ; Robert, A. ; Chelouah, S. ; Hollville, E. ; Wiels, J., *Cell and Death Disease*, **2011**, 2, e184
181. Protocole Pharmingen : <http://researcher.nsc.gov.tw/public/woody/Data/98611333871.pdf>
182. Hishikawa, H. ; Suzuki, T. ; Orita, H. ; Uchimar, T. ; Hayashi, Y. ; *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 12616-12626
183. Thèse de Doctorat de Sophie Nogaret, Université Paris-Sud XI
184. Sledz, P. ; Silvetre, H. L. ; Hung, A. H. ; Ciulli, A. ; Blundell, T. L. ; Abell, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 4544-4545

Annexes

Spectres RMN ^1H et ^{13}C

