



HAL
open science

Synthèse de nouveaux marqueurs fluorescents basés sur la structure de l'épicoconone pour la détection des protéines

Philippe A. Peixoto

► **To cite this version:**

Philippe A. Peixoto. Synthèse de nouveaux marqueurs fluorescents basés sur la structure de l'épicoconone pour la détection des protéines. Autre. INSA de Rouen, 2009. Français. NNT : 2009ISAM0014 . tel-00561525

HAL Id: tel-00561525

<https://theses.hal.science/tel-00561525>

Submitted on 1 Feb 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE NORMANDE DE CHIMIE

THESE

Présentée à l'

INSA DE ROUEN

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR ES SCIENCES SPECIALITE CHIMIE
ORGANIQUE**

**SYNTHESE DE NOUVEAUX MARQUEURS FLUORESCENTS
BASES SUR LA STRUCTURE DE L'EPICOCCONONE POUR
LA DETECTION DE PROTEINES.**

Par

Philippe Peixoto

Soutenue le 17 Décembre 2009

Devant le jury composé de

Dr. Christian Rolando
Dr. Frédéric Taran
Pr. Peter Karuso
Dr. Jieping Zhu
Pr. Jacques Rouden
Dr. Xavier Franck

CNRS – Lille
CEA - Saclay
Macquarie University
CNRS - Gif-sur-Yvette
ENSI Caen
CNRS - Rouen

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse

Je remercie vivement le Dr. Christian Rolando (Directeur de recherche à Lille), le Dr. Frédéric Taran (Directeur de recherche CEA à Saclay), le Dr. Jieping Zhu (Directeur de recherche à Gif-sur-Yvette), le Pr. Peter Karuso (Professeur à l'Université de Macquarie - Australie) et le Pr. Jacques Rouden (Professeur à l'ENSI de Caen) pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

A mon père,

Remerciements

Je tiens à remercier, en premier lieu, le Pr. Jean Charles Quirion, Directeur de l'UMR 6014/COBRA, pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de l'IRCOF, bâtiment réunissant tous les pré-requis au bon déroulement d'une thèse en chimie organique.

Je tiens ensuite à remercier le Professeur Pierre-Yves Renard pour sa grande sympathie et pour m'avoir mentionné, en premier, le sujet qui allait de devenir l'objet de ma thèse. Je souhaite également remercier celui-ci pour la qualité de ses séminaires qui m'ont, sans aucun doute, donné, entre autres, la possibilité d'améliorer mes prises de paroles en public. J'ai également une pensée très respectueuse envers le Pr. Francis Outurquin pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche (situé historiquement dans la cellule 127-128). Je tiens également à souligner sa bonne humeur au jour le jour et les discussions scientifiques « seleniées » qui ont éveillées chez moi un intérêt tout particulier pour cet atome trop souvent ignoré.

Je remercie également le Dr. Stéphane Leleu pour m'avoir ouvert les portes de l'IUT dans le but de m'aguerir à l'enseignement supérieur et plus particulièrement à la correction de centaines de comptes rendu de TP. Une pensée très positive est également destiné au Dr. Anthony Romieu pour sa bonne volonté sans limites, les précieux conseils et les enseignements apportés dans le domaine de la fluorescence.

Un grand merci est également adressé au Pr. Karuso et à l'ensemble de l'équipe Fluorotechnics (Pr. Duncan Veal et le Dr. Malcolm Ball) pour les évaluations de nos composés sur gels d'électrophorèse.

Je désire aussi transmettre mes remerciements à l'ensemble des étudiants qui, comme tant d'autres, se sont retrouvés « emprisonnés » dans les couloirs de l'IRCOF et avec qui j'ai eu un grand plaisir à interagir. Chronologiquement : Geoffroy Sorin, Yann Koci, Emilia Paunescu, Gaelle Fourrière, Cyril Ronco, Tristan Verdelet, ainsi que l'ensemble de l'équipe Quidd®.

Je voudrais surtout remercier du plus profond de moi-même mes camarades de cellule (d'abord 128 puis 229) pour avoir réussi à supporter mes sautes d'humeurs et plus particulièrement pour les grands moments passés aussi bien autour d'un bon repas ou devant un verre : Sebastien Redon, Mickael Marc, Jignesh Patel, Ludovic Peauger et Agathe Boulangé. Un sentiment spécial est destiné à cette dernière personne pour le travail accompli conjointement et pour celui à venir.

Enfin, comment oublier de remercier le Dr. Xavier Franck pour sa grande sympathie, sa disponibilité de tous les instants, l'excellente formation apportée, et pour sa légendaire passion contagieuse conduisant souvent à des discussions scientifiques enflammées. Je tiens également à souligner le sentiment de profonde gratitude à son égard pour m'avoir offert la possibilité de participer à de nombreux congrès, sans oublier un stage de trois semaines au sein du laboratoire du Pr. Karuso à l'Université de Macquarie.

« L'argument conclut et nous fait concéder la conclusion, mais il ne certifie pas et il n'éloigne pas le doute au point que l'âme se repose dans l'intuition de la vérité, car cela n'est possible que s'il la trouve par la voie de l'expérience »

Roger Bacon (1214-1294), *Opus majus*, tome II, p. 177

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.	1
1.1. Gels d'électrophorèse.	2
1. 1. 1. Gels en conditions natives (non-dénaturantes / 1 dimension).	3
1. 1. 2. Gels en conditions dénaturantes.	5
1. 1. 3. Gels d'électrophorèse bidimensionnelle.	7
1. 2. Marqueurs pour la détection de protéines sur gel d'électrophorèse.	8
1. 2. 1. Par détection colorométrique.	9
1. 2. 1. 1. Les Marqueurs covalents.	9
1. 2. 1. 1. 1. Les protocoles au nitrate d'argent.	9
1. 2. 1. 1. 2. Les protocoles au chlorure de dabsyl 1.	10
1. 2. 1. 1. 3. Détection UV des protéines par réaction des unités tryptophane sur des composés trihalogénés.	11
1. 2. 1. 2. Les Marquages non-covalents.	12
1. 2. 1. 2. 1. Les protocoles Coomassie Brilliant Blue (CBB) et Fast-green.	12
1. 2. 2. Par détection de fluorescence.	14
1. 2. 2. 1. Fluorescence.	14
1. 2. 2. 2. Les Marquages covalents.	18
1. 2. 2. 2. 1. Les sondes fluorescamines et autres MDPF :Addition d'une amine sur un acétal.	18
1. 2. 2. 2. 2. Les sondes CBQCA : Addition d'une amine sur un aldéhyde.	19
1. 2. 2. 2. 3. Le monobromobimane : Attaque des résidus cystéines sur halogénoalkane.	20
1. 2. 2. 2. 4. Les cyanines Cy3 et Cy5 : Attaque nucléophile sur des esters activés.	20
1. 2. 2. 2. 5. Les marqueurs Py-1, Py-3 et Py-5 : Formation d'ions pyridinium à partir d'ions pyriliiums.	21

1. 2. 2. 3. Les Marquages non-covalents.	22
1. 2. 2. 3. 1. Les sondes de comportant une aniline conjuguée : les sondes SYPRO orange, red et tangerine.	22
1. 2. 2. 3. 2. Les sondes SYPRO ruby et rose : les sondes de type sels de terres rares.	23
1. 2. 2. 3. 3. Les sondes de type fluorescéine.	24
1. 2. 2. 3. 4. les DCM : Les sondes de type tetrahydropyranique.	25
1. 2. 2. 3. 5. Les marqueurs Flamingo et Krypton : les sondes hybrides coumarines-cyanines.	25
1. 2. 2. 3. 6. Révélation par lecture de l'absorbance native des protéines.	26
1. 2. 2. 4. Un marqueur de type dihydropyranique : Lavapurple.	27
2. SYNTHÈSE D'AZAPHILONES – BIBLIOGRAPHIE.	31
2. 1. Synthèse de Whalley.	33
2. 2. Synthèse de Suzuki.	33
2. 3. Synthèse de Porco.	34
2. 4. Synthèse de Yao.	35
2. 5. Synthèse de Pettus.	37
3. VERS LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE L'EPICOCCONONE.	38
3. 1. Vers la synthèse de l'alcool 95.	39
3. 1. 1 Obtention du lactol 91 .	39
3. 1. 1. 1. Synthèse des amides 84 et 85 .	39
3. 1. 1. 2. Alkylation du cycle aromatique par orthométallation.	40
3. 1. 1. 3. Synthèse de la lactone 90 .	42
3. 1. 1. 4. Réduction de la lactone 90 en lactol 91 .	43
3. 1. 1. 5. Condition de déprotection désaromatisante.	44
3. 1. 1. 5. 1. Alcool primaire protégé par TBDPS.	44
3. 1. 1. 5. 2. Alcool primaire protégé par un pivaloate.	48

3. 2. A partir du lactol modèle en série desoxygéné.	52
3. 2. 1. Obtention du lactol modèle.	52
3. 2. 2. Désaromatisation oxydante.	56
3. 2. 2. 1. Rappels Bibliographiques.	56
3. 2. 2. 1. 1. Désaromatisation de phénols et de naphhtols.	56
3. 2. 2. 1. 2. Synthèse d'azaphilones par désaromatisation oxydante de phénols.	63
3. 2. 2. 2. Screening des conditions de désaromatisation oxydante.	66
3. 2. 2. 3. Etude mécanistique par suivi RMN.	67
3. 2. 2. 4. Optimisation du rendement.	80
4. FORMATION D'ACYLFURANONE ET D'ACYLPYRANONE PAR OUVERTURE DE DIOXINONES.	84
4. 1. Etude la réactivité d'acylcétène sur des α-hydroxycétones (formation de cycle à 5 chaînons).	84
4. 1. 1. Rappels Bibliographiques.	84
4. 1. 1. 1. Furanones par utilisation d'acylcétènes ou équivalents synthétiques.	84
4. 1. 1. 2. Utilisation de dioxinones comme précurseurs aux acylcétènes.	87
4. 1. 2. Etude méthodologique.	90
4. 1. 2. 1. Essais préliminaires.	90
4. 1. 2. 2. Influence de la quantité de base nécessaire.	91
4. 1. 2. 3. Influence de la quantité de dioxinone nécessaire.	92
4. 1. 2. 4. Influence de la concentration du milieu réactionnel.	93
4. 1. 2. 5. Influence de la base et du solvant utilisé.	94
4. 1. 2. 6. Influence du substrat de départ.	94
4. 1. 3. Application à la synthèse d'acylfuranones pour l'obtention d'analogues de l'épicocconone.	96
4. 1. 3. 1. Analogues de première génération.	96
4. 1. 3. 2. Analogues de deuxième génération.	110
4. 1. 3. 3. Evaluation des analogues pour la détection de protéines sur gel d'électrophorèse.	123
4. 1. 4. Application à la synthèse de la cadiolide B.	129
4. 1. 4. 1. Rappels Bibliographiques.	129
4. 1. 4. 2. Synthèse proposée basée sur une réaction monotope de cyclisation en acylfuranone - condensation sur un aldehyde.	131

4. 2. Etude la réactivité d'acylcétène sur des β-hydroxycétones (formation de cycle à 6 chaînons).	135
4. 2. 1. Rappels Bibliographiques.	135
4. 2. 2. Etude méthodologique.	136
4. 2. 3. Application à la synthèse de dictyopyrones.	141
4. 2. 3. 1. Rappels Bibliographiques.	141
4. 2. 3. 2. Synthèse proposé de la dictyopyrone C – ouverture d'un époxyde enantiopur.	142
5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.	146
6. PARTIE EXPERIMENTALE.	152
6. 1. Généralités.	152
6. 2. Abréviations des données spectroscopiques.	152
6. 3. Appareillage.	153
6. 4. Mode opératoire et données spectroscopiques.	154
6. 5. Mode opératoire pour la détermination des propriétés physico-chimiques analogues en solution.	263
6. 5. 1. Appareillage.	263
6. 5. 2. Solution mère.	263
6. 5. 3. Absorbance et fluorescence sans butylamine.	263
6. 5. 4. Absorbance et fluorescence avec butylamine.	264
6. 5. Mode opératoire pour l'évaluation des analogues sur gel SDS-PAGE.	265
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	267
8. ANNEXE.	273

Abréviations

2DE	: Gel d'électrophorèse bidimensionnel.
MALDI-TOF	: Source d'ionisation laser assistée par une matrice couplée à un analyseur de temps de vol. (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> et <i>Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>).
MALDI-MS-MS	: Source d'ionisation laser assistée par une matrice couplée à un ou plusieurs spectromètre de masse (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> et <i>Mass Spectrometry</i>).
ADN	: Acide D éoxyribo N ucléique.
ARN	: Acide R ibo N ucléique.
SDS	: S odium D odecyl S ulfate.
SDS-PAGE	: S odium D odecyl S ulfate – P olyacrylamide G el E lectrophoresis.
pHi	: pH isoelectrique.
IEF	: I so E lectro F ocalisation.
UV	: U ltra- V iolet.
TCA	: T richloro A cetic A cid.
CBB	: C oomassie B rilliant B lue.
S _x	: S ingulet au niveau énergétique x
T _x	: T riplet au niveau énergétique x.
MDPF	: 2- M ethoxy-2,4- D i P hényl-3(2H) F uranone.
CBQCA	: 3-(4- C arboxy B enzoyl)-2- Q uinoline C arbox A ldéhyde
Cy _x	: C yanine dont les unités indoliques sont séparées par x carbone.
Py _x	: Marqueur fluorescent ion P yrillium de type x
DCM	: 4-(D i C yano M ethylene)-2-methyl-6-(p-methylaminostyryl)-4H-pyran
ICT	: Transfert de charge intramoléculaire (<i>Internal Charge Transfert</i>).
Et	: E thyl
Ac	: A cétyl
APTS	: Acide P ara- T oluène S ulfonique.
Bn	: B enzyl.

DMSO	: DiMethylSulfOxide.
DMF	: DiMéthylFormamide.
TFA	: TriFluoroAcetic Acid.
DIEA	: DiIsopropylEthylAmine.
IBX	: Acide Iodoxybenzoïque.
PIFA	: PhenylIodaneDiAcetate.
PIDA	: PhenylIodanetriFluoroAcetate.
<i>m</i> -CPBA	: <i>m</i> éta-ChloroPerBenzoic Acid.
<i>s</i> -IBX	: <i>s</i> afe-Iodoxybenzoic Acid
DMAP	: DiMethylAminoPyridine.
Ts	: Tosyl.
Bu	: Butyl.
Me	: Methyl.
Boc	: ButOxyCarbonyl.
DIAD	: DiIsopropyl AzoDicarboxylate.
TMS	: TriMethylSilyl.
TMEDA	: TetraMethylEthyleneDiAmine.
LDA	: Lithium DiisopropylAmine.
<i>t</i> -Bu	: <i>tert</i> -Butyl.
DIBAL-H	: DiIsoButylAluminium - Hydride.
<i>i</i> -Pr	: <i>iso</i> -Propyl.
TBDPS	: Tert-ButylDiPhenylSilyl.
T _{amb}	: Température Ambiante.
CSA	: CamphorSulfonic Acid.
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince.
TBAF	: Tetra-ButylAmmonium Fluoride.
Piv	: Pivaloyl
MOM	: MethOxyMethyl
Nu	: Nucléophile.
TBDMS	: Tert-ButylDiMethylSilyl.
PMB	: Para-MethoxyBenzyl
RX	: Rayon X.
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

mg	: Milligramme.
ESIPT	: Transfert interne de proton à l'état excité (<i>Excited State Internal Proton Transfert</i>).
PET	: Transfert d'électron photoinduit (<i>Photoinduced Electron Transfert</i>).
HOMO	: Plus haute orbitale moléculaire occupée (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>).
LUMO	: Plus basse orbitale moléculaire occupée (<i>Lowest Occupied Molecular Orbital</i>).
I _F	: Intensité de fluorescence.
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire.
Tf	: Triflate.
COX	: Cyclo- O Xygénase.
DBU	: 1,8-Diaza B icyclo[5.4.0]Undec-7-ene

Préambule

Cette étude s'inscrit dans le cadre du développement de nouveaux marqueurs fluorescents de protéines. Ces marqueurs fluorescents auront un squelette proche d'un produit naturel, l'épicocconone, isolée en 2003 par le Pr. Karuso.

Le premier chapitre de cette étude sera consacré à la présentation des différentes méthodes d'analyses protéomique et des différents types de marqueurs fluorescents.

Dans un second temps, une étude bibliographique des synthèses d'azaphilones via désaromatisation oxydante sera présentée.

Le troisième chapitre présentera les efforts de synthèse permettant d'accéder au cœur du squelette de l'épicocconone par désaromatisation, puis le quatrième détaillera l'installation du motif furanone à partir de dioxinones. Les analogues ainsi obtenus seront étudiés du point de vue de la fluorescence et comparés au produit naturel.

1 – INTRODUCTION.

Les efforts d'automatisation et de miniaturisation des réactions associées aux acides nucléiques ont permis l'essor de la génomique qui a conduit au décodage du génome humain. Or à chaque gène correspond une protéine, l'étape suivante consiste donc à associer sa fonction à chaque protéine. La protéomique, qui consiste à déterminer la fonction des protéines, devient l'étape majeure dans la compréhension des phénomènes biologiques.

Pour ce faire, de nouveaux outils sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de chaque protéine impliquée dans les processus pathologiques ainsi que celles associées aux traitements. La protéomique doit ainsi permettre d'identifier facilement à la fois, les cibles et les médicaments potentiels. Une expérience classique consiste à comparer les profils protéiques de référence (dans des conditions normales ou pathologiques), aux profils obtenus après exposition avec la molécule candidate médicament.

L'étude des profils protéiques est généralement réalisée en deux temps via des gels d'électrophorèse bidimensionnels (2-DE) permettant d'abord de séparer les différentes protéines présentes dans un milieu suivant leurs propriétés physico-chimiques, puis de les identifier (par spectrométrie de masse, MALDI-Tof ou MALDI-MS-MS par exemple).

A titre d'exemple, une sur-expression de protéines en fonction de différentes pathologies pour un même type de cellules est représentée ci-après (**Figure 1**).

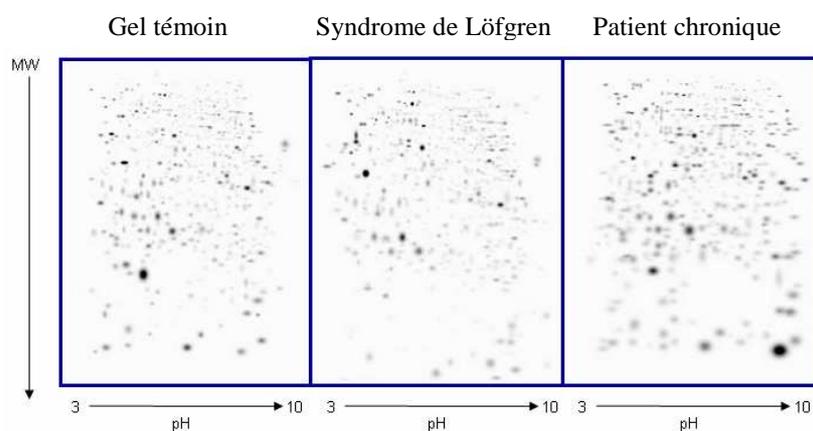


Figure 1 : Gels d'électrophorèse d'un même protéome présentant différentes pathologies.

La sarcoidose (maladie de Besnier, Boeck et Schaumann) est une maladie granulomateuse qui peut toucher de nombreux organes : le poumon préférentiellement mais aussi la peau, l'os, le cœur, le rein ou le système nerveux central.

Ces différences symptomatiques sont également exprimées au niveau du protéome de la cellule par une surexpression de certaines protéines. L'analyse de gels 2-DE représente donc une technique appropriée pour l'étude de ces maladies s'exprimant au niveau protéique.

Ainsi, pour une meilleure compréhension des méthodes électrophorétiques, un rappel préliminaire des deux paramètres déterminants qui sont la séparation des protéines et leur révélation semblent nécessaires.

1. 1. Gels d'électrophorèse.

La technique de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement d'ions (molécules ayant perdues leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.

Ainsi, les molécules anioniques migrent vers l'anode et les molécules cationiques se déplacent vers la cathode. Dans le cas des acides nucléiques, les charges sont portées par les groupements phosphates du squelette. Enfin, sur les protéines, la situation est plus complexe car il existe différents types de groupements ionisables (les fonctions acide et amine).

Les principales applications électrophorétiques utilisent un support poreux stabilisant la phase liquide : on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le support doit être homogène, poreux et inerte. Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

- Électrophorèse sur papier ;
- Électrophorèse sur acétate de cellulose ;
- Électrophorèse sur gel (amidon, agar, agarose, polyacrylamide...).

En biochimie, l'électrophorèse en gel est utilisée pour séparer les macromolécules biologiques en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est alors constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur. Deux polymères sont principalement utilisés : l'agarose et le polyacrylamide.

La concentration de polymère ainsi que son taux de réticulation pouvant varier par rapport à celle du tampon, plus le polymère sera concentré et réticulé, et plus la taille des pores du gel sera petite. Les propriétés du gel peuvent ainsi être adaptées à la taille des molécules à analyser.

- L'**agarose** est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement de l'ADN ou de l'ARN.
- Le **polyacrylamide** est utilisé à des concentrations de 4% à 20% (poids/volume) et permet de séparer des molécules plus petites : protéines, peptides et des fragments d'acides nucléiques. La réticulation (taux de ramification) lors de la polymérisation peut également être modulée pour modifier les paramètres de séparation.

Pour les deux types de polymères, le gel peut se faire en conditions natives ou en conditions dénaturantes. Dans ce second cas, la séparation des protéines se fait par l'ajout d'un agent dénaturant (détergent) dans le tampon : le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le gel est alors appelé SDS-PAGE (pour SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). C'est plutôt l'urée, un agent chaotropique, qui est utilisée lorsque la séparation de macromolécule tels que les acides nucléiques est envisagée.

1. 1. 1. Gels en condition natives (non-dénaturantes / 1 dimension).

Dans l'électrophorèse en conditions non dénaturantes, les molécules sont séparées dans la conformation la plus proche possible de leur état natif. Les étapes préalables permettant l'obtention de la solution contenant les molécules à séparer doivent donc éviter les conditions dénaturantes. Sauf cas particulier, il faut donc éviter les pH élevés ou au contraire très bas, des traitements à des températures élevées, les hautes forces ioniques (fortes concentrations en sel) et les agents chimiques dénaturants qui seront évoqués au paragraphe suivant.

Les résultats concernant la structure des molécules sont toujours délicats à interpréter car la séparation se fait en fonction de nombreux critères. Pour un support et un voltage donnés, la vitesse de migration dépendra de :

1. *la charge native de la molécule.* Plus la charge est importante, plus la vitesse de migration sera importante. Cette charge native peut varier en fonction du pH, qui est le plus souvent fixé par l'expérimentateur au moyen de l'utilisation d'une solution tampon. Selon le signe de la charge native, les molécules pourront migrer vers l'anode (molécules chargées négativement) ou vers la cathode (molécules chargées positivement). Pour les protéines, il convient donc de faire le dépôt à mi-chemin des deux électrodes, sauf à vouloir séparer une protéine dont on connaît la charge. Enfin, toutes les molécules non chargées ne seront pas séparées puisqu'elles ne migreront pas du tout. Cette question ne se pose pas pour les acides nucléiques (ADN et ARN) car les résidus phosphatés qu'ils contiennent leur donnent une charge toujours négative.
2. *la masse moléculaire.* Plus la masse moléculaire est importante, plus la vitesse de migration de la molécule sera faible. Toutefois, le choix du support reste essentiel. En effet, un support mal choisi peut entraîner une absence de migration (molécule trop grosse pour le maillage du support) ou au contraire une mauvaise, voir pas de séparation (molécule trop petite pour le maillage du support).
3. *la structure tridimensionnelle.* A masse moléculaire égale, une molécule pourra, selon sa forme, être plus ou moins ralentie dans sa progression par le support. Par exemple, une molécule de structure globulaire sera moins ralentie qu'une molécule de structure fibreuse.

De plus, cette technique présente certains avantages. Citons par exemple celui de permettre la séparation de molécules multimériques (résultant de l'association d'au moins deux polypeptides ou sous unités). En revanche, outre l'interprétation délicate, il est fréquent que les molécules présentes dans l'échantillon soumis à électrophorèse s'agrègent entre elles, formant de très gros ensembles impossibles à séparer.

Pour terminer, citons une variante de cette technique qui consiste à utiliser un gel dont le pH varie selon un gradient entre les deux électrodes. On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est alors généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication. De telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large, ex. 3-9, ou \pm étroite, ex. 4-5 ou 5-6,5), migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle. Elles ont alors une distribution statistique telle qu'elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel. Il existe de telles molécules de petit poids moléculaire et solubles (ampholines) et il existe également des gels à base d'acrylamide modifiée contenant des groupements acides et basiques fixés (gels d'immobilines). Pour chaque macromolécule chargée, sa charge va varier au fur et à mesure de son déplacement (le pH étant différent en chaque point du gel) jusqu'au moment où la molécule va atteindre son point isoélectrique. N'étant plus chargée, elle ne va plus se déplacer : on est à l'équilibre. Les différentes molécules sont donc séparées en fonction de leur point isoélectrique d'où le nom d'isoélectrofocalisation (IEF en anglais : IsoElectric Focusing).

1. 1. 2. Gels en conditions dénaturantes (1 dimension).

Comme son nom l'indique, dans cette variante, les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont les traitements thermiques, les hautes forces ioniques allant perturber les liaisons faibles qui participent au repliement des molécules (liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques), et bien sur, l'utilisation d'agents dénaturant comme l'urée ou le SDS.

Ce dernier est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines car il possède des caractéristiques particulièrement intéressantes : non seulement, il dénature les protéines, mais il se fixe dessus avec une densité linéaire approximativement constante, c'est à dire que le nombre de molécules de SDS qui se fixe sur une protéine est approximativement proportionnel au nombre d'acides aminés qui la composent, donc à sa masse moléculaire. Or, le SDS est une molécule chargée négativement. En sa présence, toutes les protéines vont donc adopter la même forme (dérivée) avec une charge négative proportionnelle à la masse moléculaire. On estime ainsi qu'il se fixe en moyenne environ deux molécules de SDS par acide aminé. Sauf cas particulier, la charge native est faible donc négligeable par rapport aux charges portées par le SDS. Il en résulte qu'en présence de SDS la seule variable qui différencie les protéines est **la masse moléculaire**. La forme n'intervient plus (puisque les protéines sont dénaturées) et la charge native non plus (puisque les charges apportées par le SDS sont largement plus nombreuses).

La séparation se faisant donc uniquement en fonction de la masse moléculaire, par voie de conséquence, l'interprétation des résultats obtenus est généralement beaucoup plus simple que pour une électrophorèse en condition non-dénaturante. Un autre avantage est l'utilisation d'un détergent qui permet de solubiliser les protéines hydrophobes, et en particulier les protéines membranaires, qui ne peuvent être séparées par électrophorèse en conditions non dénaturantes. Comme le support le plus adapté pour séparer les protéines est le gel de polyacrylamide (compte tenu du fait qu'une protéine typique fait autour de 50 kDa) on parle couramment de SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis en milieu SDS). L'urée est, elle, généralement utilisée pour dénaturer l'ADN. Un autre agent chimique couramment utilisé est le β -mercaptoéthanol. C'est un agent réducteur qui a pour propriété de réduire les ponts disulfures des protéines, donc de détruire ces pontages covalents qui ne sont pas cassés par le SDS. Cela permet de séparer les différents polypeptides reliés par de tels ponts au sein d'une même protéine. La comparaison de SDS-PAGE avec et sans β -mercaptoéthanol d'un même échantillon est donc riche d'informations sur la structure quaternaire des protéines.

1. 1. 3. Gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

L'électrophorèse bidimensionnelle ne fait que reprendre les deux types d'électrophorèses présentées dans les deux paragraphes précédents, mais appliquées successivement sur le même gel selon deux orientations différentes (*Figure 2*).

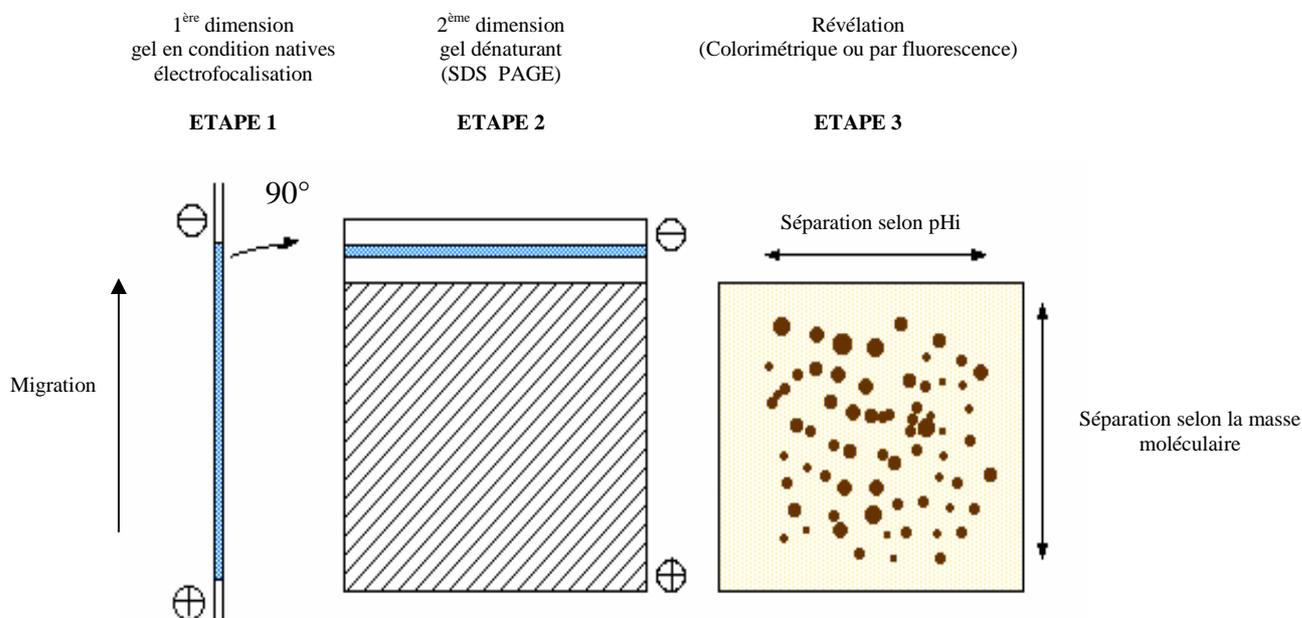


Figure 2 : Représentation schématique du principe de gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

Tout d'abord, une isoélectrofocalisation est effectuée (1^{ère} migration – **ETAPE 1**). Cependant, dans un échantillon complexe comme un broyat total d'un tissu, le nombre de protéines (plusieurs milliers) est tel que de nombreuses molécules possèdent un point isoélectrique apparent identique, et ne sont donc pas séparées les unes des autres lors de cette première étape. Une seconde migration à 90° de la première est alors réalisée sur SDS-PAGE permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire, d'où le nom d'électrophorèse bidimensionnelle (2^{ème} migration – **ETAPE 2**). Ainsi, à l'issue de cette deuxième étape, des spots sur toute la surface du gel sont observés après révélation.

Plusieurs centaines de spots peuvent ainsi être individualisés sur des gels de grande taille. Leur révélation est alors effectuée par l'utilisation de différents marqueurs de protéines (**ETAPE 3**) et une caractérisation peut également être effectuée dans certains cas par couplage avec un spectromètre de masse.

Une des étapes limitante de ce processus est de disposer d'un outil efficace permettant de quantifier précisément, puis de repérer sur le gel l'ensemble des protéines sécrétées, quelles que soient leurs quantités. Pour cela, il faut disposer de biomarqueurs des protéines efficaces et non spécifiques

L'émergence de ces nouvelles technologies pousse donc à développer de nouveaux marqueurs plus efficaces, ceux-ci devant être viables tant du point de vue économique que du point de vue fondamental.

1. 2. Marqueurs pour la détection de protéines sur gel d'électrophorèse.

La « détection » de protéines est nécessaire, et, est un pré-requis aussi bien pour l'obtention de données qualitatives que quantitatives sur un protéome donné. En protéomique sur 2-DE, la « détection » est souvent liée à la fixation, c'est-à-dire à la création d'une liaison réversible ou irréversible entre la protéine et un colorant organique ou inorganique. Ainsi, différentes approches ont été développées et optimisées pour divers types de révélations de protéines¹ ; la détection colorimétrique ou par émission de fluorescence des adduits marqueurs/protéines faisant intervenir des interactions de nature covalente ou non-covalente.

Aux prémices de l'analyse protéiques, les marquages de type covalents ont longtemps été considérés comme meilleurs car induisant une plus grande sensibilité (pas de perte de signal lors des lavages effectué post-migration). Cependant, l'essor de la spectrométrie de masse permettant en routine, de déterminer la nature des protéines séparées sur gel d'électrophorèse, est venu inverser la tendance. La dernière décennie a donc vu l'apparition d'une nouvelle classe de marqueurs de protéines non covalents.

Un compromis entre la sensibilité du signal et la compatibilité avec les nouvelles techniques analytiques représentant un réel défi dans le cadre d'étude bio-analytiques, un bref rappel des méthodes existantes prend à ce stade de l'étude toute son importance.

(1) Miller, I. ; Crawford, J. ; Gianazza, E. *Proteomics*, **2006** , 6, 5385-5408.

1. 2. 1. Par détection colorimétrique.

1. 2. 1. 1. Les Marqueurs covalents.

1. 2. 1. 1. 1. Les protocoles au nitrate d'argent.

Le premier marquage au nitrate d'argent remonte au début des années 1980^{2,3,4}. Cette technique de révélation de protéines est basée sur la saturation des gels en sels d'argent. Une seconde étape consiste au lavage du gel afin de casser les interactions faibles avec les ions métalliques présent dans la matrice. Une dernière étape permet alors de faire apparaître les bandes par réduction au formaldéhyde des ions argent présentant des affinités avec les protéines.

De nos jours, il existe plus de cent façons de marquer des protéines aux sels d'argent sur gel de polyacrylamide. Cependant, il existe deux grandes catégories de protocoles : en milieu alcalin ou en milieu acide. Les marquages aux sels d'argent sont des procédures multi-étapes. Voici les quatre étapes majeures (outre les étapes de lavages) :

1. *Fixation*, pour insolubiliser les protéines et éliminer les composés interférant dans les gels
2. *Sensibilisation*, pour améliorer la formation de l'image.
3. *L'imprégnation de l'argent*, avec du nitrate d'argent ou de l'argent ammoniacal.
4. *Développement de l'image*, avec du carbonate de sodium⁵ (pour les marquages acides) ou avec de l'acide citrique^{6,7,8} (pour les marquages alcalins) et une faible mais essentielle quantité de formaldéhyde (réducteur des ions argent dans les deux cas).

(2) Switzer, R. C. 3rd, Merril, C. R., Shifrin, S., *Anal. Biochem.* **1979**, 98, 231–237.

(3) Oakley, B. R. , Kirsch, D. R. , Morris, N. R., *Anal. Biochem.* **1980**, 105, 361–363.

(4) Merril, C. R., Switzer, R. C., Van Keuren, M. L., *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 4335–4339.

(5) Hochstrasser, D. F. ; Harrington, M. G. ; Hochstrasser, A. C. ; Miller, M. J. ; Merril, C. R. *Anal. Biochem.* **1988**, 173, 424–435.

(6) Heukeshoven, J. ; Dernick, R. *Electrophoresis* **1985**, 6, 103–112.

(7) Heukeshoven, J. ; Dernick, R. *Elektrophorese Forum '86*, **1986**, Radola, B. J. (Ed.) , VCH, Weinheim, 22–27.

(8) Blum, H., Beier, H. ; Gross, H. J. *Electrophoresis* **1987**, 8, 93–99.

La sélection se fait alors en fonction de besoins spécifiques. En effet, les marquages en milieu basique sont dits être plus sensibles pour les protéines basiques⁹ mais la quantité d'ammoniaque semble être un point crucial dans la reproductibilité. De plus, ce type de procédé n'est pas compatible avec les gels en conditions dénaturantes.

En ce qui concerne les protocoles de marquage en conditions acides, ils sont eux, compatibles avec des gels aussi bien dénaturés que non-dénaturés mais ne montrent pas une grande reproductibilité en fonction des conditions utilisées.

De ce fait, malgré une sensibilité pouvant atteindre 100 pg, les problèmes de reproductibilité et la faible gamme de linéarité (10^2) limitent l'utilisation de ce type de marquage pour les analyses quantitatives en 2-DE. Enfin, notons que le marquage aux sels d'argent ne révèle généralement que les protéines sur la surface du gel, rendant possible des analyses ultérieures.

1. 2. 1. 1. 2. Les protocoles au chlorure de dabsyl **1**.

En 1983 l'équipe du Pr. Tzeng¹⁰ a mis en évidence l'utilisation de chlorure de dabsyl **1** (*Schéma 1*) pour la révélation de protéines sur gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE. Dans ce cas, c'est l'utilisation d'une fonction chlorure de sulfonyl qui a permis de rendre ce composé très réactif vis à vis des fonctions amines conduisant à un sulfonamide **2**. Cette grande réactivité a alors conduit à un mode opératoire très rapide et d'une bonne sensibilité.

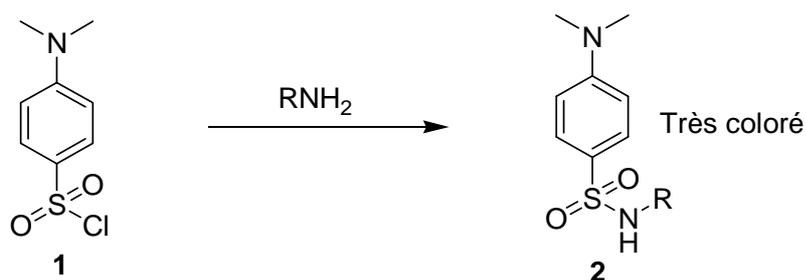


Schéma 1 : Création d'une liaison sulfonamide.

(9) Rabilloud, T. ; *Electrophoresis* **1990**, *11*, 785–794.

(10) Tzeng, M., C., *et al. Analytical biochemistry*, **1983**, *128*, 412-414.

1. 2. 1. 1. 3. Détection UV des protéines par réaction des unités tryptophane sur des composés trihalogénés.

Une nouvelle technique de révélation des protéines par détection UV a récemment été introduite par le Pr. Edwards¹¹ par utilisation de composés trihalogénés présents sur dans le gel de polyacrylamide. Dans ce cas, le gel est imprégné soit de chloroforme, soit d'acide trichloroacétique (TCA) puis irradié par une lumière polarisée de 300 nm qui permet alors l'obtention de bandes de protéines fluorescentes. Le mécanisme de la réaction induite par photoactivation, a été proposé par ce même groupe et suppose une réaction de formylation radicalaire¹² des indoles présents sur les protéines (unités tryptophanes - *Schéma 2*). Cette réaction conduit alors à un aldéhyde aromatique fluorescent **3**.

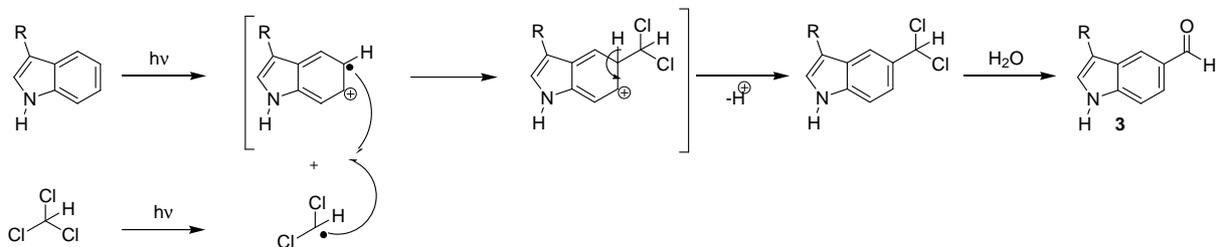


Schéma 2 : Mécanisme de formylation des indoles présent dans les protéines.

Cependant, la visualisation des protéines est très dépendante de la quantité d'unités tryptophane dans les protéines analysées.

Une extension de cette méthode a finalement été décrite en 2004 par ce même groupe en additionnant les composés trihalogénés préalablement à la migration¹³. Ainsi, 20 µg de protéines globulaires typiques peuvent être observées en 5 minutes et jusqu'à 20 ng de protéines riches en tryptophanes telles que les anhydrases carboniques sont détectées par marquage pré migratoire. Enfin, la volatilité du chloroforme a finalement amener cette équipe à un protocole optimisé et répétable par utilisation de trichloroéthanol.

-
- (11) Kazmin, D.; Edwards, R., A.; Turner, R., J.; Larson, E.; Starkey, J. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 91–96.
(12) Edwards, R., A.; Jickling, G.; Turner, R., J. *J. Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 362–368.
(13) Ladner, C., L.; Yang, J.; Turner, R., J.; Edwards, R., A. *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 13–20.

1. 2. 1. 2. Les Marquages non-covalents.

1. 2. 1. 2. 1. Les protocoles Coomassie Brilliant Blue (CBB) et Fast-green.

- Les solutions de CBB

Les CBB ont été introduits pour la détection de protéines en 1963¹⁴ et sont toujours fréquemment utilisés sur gel d'électrophorèse. Le CBB est une molécule triarylméthane disulfonaté qui est vendue sous deux variantes (**Figure 3**) : la coomassie R-250 **4** (rouge) et la G-250 **5** (verte, molécule structurellement proche de R-250 mais présentant deux méthyles aromatiques bloquant les rotations internes de la partie aromatique).

En solution acide, les sondes s'associent aux groupements aminés des protéines par interactions électrostatiques et hydrophobiques (marquage non-covalent).

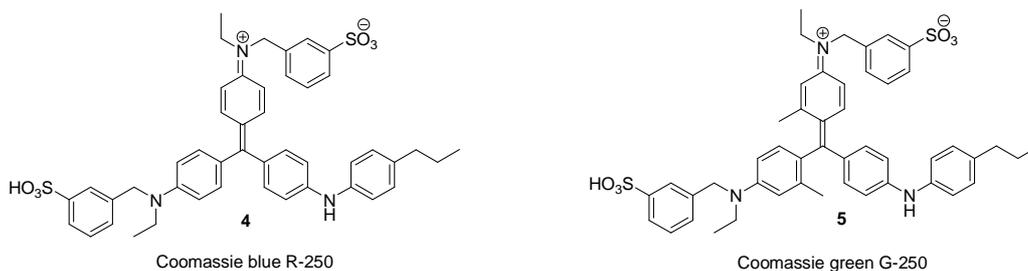


Figure 3 : Formule développée des coomassies R-250 et G-250

Les protocoles originaux décrivent la fixation des coomassies en utilisant 1% de marqueur en solution alcoolique acide (acide acétique, acide trichloracétique ou encore dans certains cas par addition d'acide sulfosalicylique). Un lavage acide alcoolique dépourvu de coomassie permet alors une réduction du bruit de fond jusqu'à apparition de signaux clairs¹⁵. Enfin, le caractère non-covalent rend le marquage par des CBB simple d'utilisation et compatible avec des analyses de spectrométrie de masse (limite détection de 10 à 100 ng¹⁶) et une linéarité de la réponse d'un facteur 10 est également observée¹⁷.

(14) Fazekas de St Groth, S. ; Webster, R. G. ; Datyner, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, 71, 377–391.

(15) Weber, K. ; Osborn, M. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 4406–4412.

(16) Poland, J. ; Rabilloud, T. ; Sinha, P. *The Proteomics Handbook*, **2005**, Walker, J.M., Humana Press, Totowa.

(17) Patton, W. F. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2002**, 771, 3–31.

- Les CBB colloïdaux

Diezel & *al.*¹⁸ ont introduit les CBB (de type G) en solution dans le TCA pour la fixation sur les protéines. Ils ont alors observé une diminution significative du bruit de fond après fixation dans de telles conditions. Ceci a finalement été explicité par la conversion du CBB dans un état colloïdal en présence de 12.5 % de TCA.

En effet, pendant l'équilibre conduisant à la fixation sur les protéines, le marqueur est alors présent sous une forme colloïdale ainsi que sous une forme libre en solution. La faible concentration de CBB libre peut alors pénétrer la matrice électrophorétique et se fixer correctement aux protéines tandis que les marqueurs sous forme de particules colloïdales sont exclus et réduisent, par voie de conséquence, le bruit de fond. Récemment, Le groupe du Pr. Lazarev¹⁹ a montré que la fluorescence de la CBB pouvait être utilisée en scannant les gels avec un laser infrarouge. Ceci a alors permis d'augmenter de deux ordres de grandeurs la sensibilité rendant les CBB au moins deux fois plus sensibles que le SYPRO Ruby et augmentant leur gamme de linéarité à 10³.

- Fast Green FCF

Les Fast Green **6** (*Figure 4*) constituent une autre "ancienne" génération de marqueurs organiques. Ils peuvent également être utilisés pour la détection de protéines sur PAGE, SDS PAGE, ou bien même IEF^{20,21,22}.

(18) Diezel, W., Kopperschlager, G., Hofmann, E., *Anal. Biochem.* **1972**, *48*, 617–620.

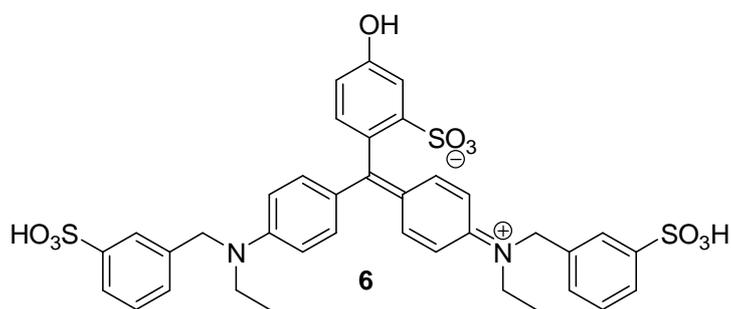
(19) Smejkal, G. B. ; Robinson, M. H. ; Lazarev A. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2511–2519.

(20) Gorovsky, M. A. ; Carlson, K. ; Rosenbaum, J. L. *Anal. Biochem.* **1970**, *35*, 359–370.

(21) Allen, R. E. ; Masak, K. C. ; McAllister, P. K. *Anal. Biochem.* **1980**, *104*, 494–498.

(22) Syrový, I. ; Hodný, Z. ; *J. Chromatogr.* **1991**, *569*, 175–196.

Ils restent moins sensibles que les CBB pour la quantification mais montrent toutefois une bonne gamme de linéarité (facteur 10^2).



Fast green FCF

Figure 4 : Formule développée de Fast green FCF.

1. 2. 2. Par détection de fluorescence.

Les limitations des méthodes colorimétriques ont mené au développement de nombreux marquage par fluorescence ayant des sensibilités proches des marquages à l'argent et ayant une large gamme de linéarité (de l'ordre de 10^4).

1. 2. 2. 1. Fluorescence.

Les biomarqueurs peuvent être des marqueurs fluorescents s'ils peuvent se lier (de façon covalente ou non) aux protéines et révéler leur présence par le biais d'une simple excitation lumineuse. En effet, la fluorescence résulte d'un processus triphasique qui s'opère sur des molécules qui sont appelées fluorophores ou marqueurs fluorescents. Le processus responsable de la fluorescence est illustré par un diagramme d'états électroniques : le diagramme de Jablonski.

Dans un premier temps, l'absorption d'un photon d'énergie appropriée (domaine UV-visible) fait passer une molécule de fluorophore de l'état fondamental à un état électronique excité. Une telle transition correspond à la promotion d'un électron dans une orbitale inoccupée d'énergie supérieure. D'après l'approximation de *Born-Oppenheimer*, les mouvements des électrons sont beaucoup plus rapides que ceux des noyaux (c'est-à-dire les vibrations moléculaires). Le passage d'un électron dans une orbitale antiliante lors de l'excitation prend environ 10^{-15} s, ce qui est un temps très court par rapport au temps caractéristique des vibrations moléculaires (10^{-10} à 10^{-12} s).

Cette observation est à la base du principe *Franck-Condon* selon lequel une transition électronique se produit sans changement des positions des noyaux dans l'entité moléculaire et son environnement. L'état résultant est appelé état *Franck-Condon* (correspondant à un état singulet S_2 ou S_1^*), et la transition impliquée est dite verticale²³ (**Figure 5, Etape 1**).

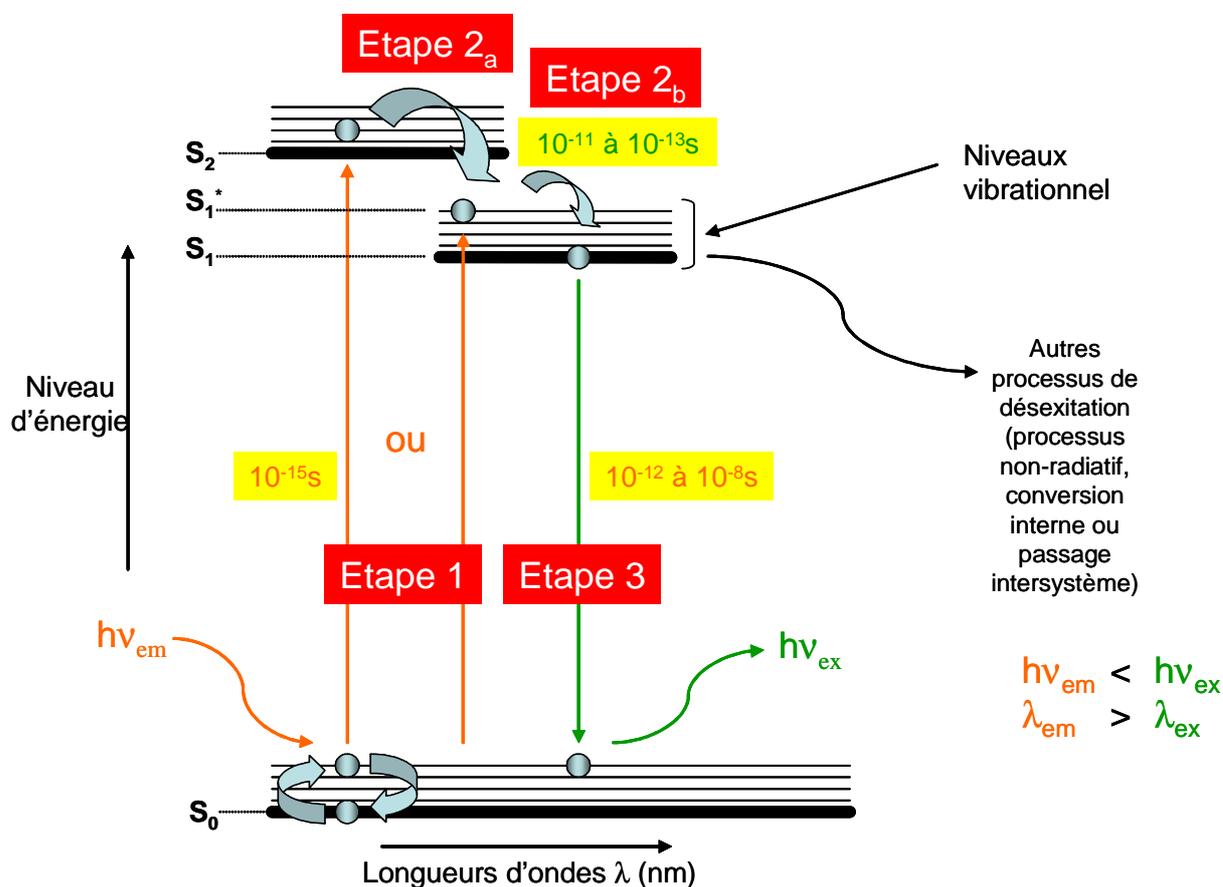


Figure 5 : Diagramme de Jablonski simplifié illustrant le processus de fluorescence (phase 1 : excitation à l'état S_2 ou S_1^* , phase 2 : passage à l'état excité S_1 , phase 3 : émission de fluorescence).

Dans un deuxième temps, un processus de conversion interne, qui est une transition non radiative permet le passage entre deux états électroniques de S_2 à S_1^* (Dans le cas d'un état Franck-Condon d'énergie S_2 – **Etape 2_a**). En solution, ce processus est suivi d'une relaxation vibrationnelle vers le plus bas niveau vibrationnel (S_1^* vers S_1) de l'état électronique final (**Etape 2_b**). En effet, cette relaxation correspond à un transfert d'énergie entre la molécule excitée avec les molécules de solvants environnantes dans des temps de l'ordre de 10^{-12} s.

(23) Valeur ; B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*, 2004, De Boeck., Bruxelles, 9-21.

L'émission de photons accompagnant la relaxation de S_1 vers S_0 est appelée *fluorescence* (**Etape 3**). L'émission de fluorescence ne se produit généralement qu'à partir de l'état excité S_1 et la durée de vie d'un tel état électronique influe directement sur la fluorescence. En effet, ce processus radiatif de relaxation de l'état S_1 allant de 10^{-12} à 10^{-8} s peut entrer en compétition avec d'autres mécanisme de désexcitation si l'émission de photons est trop lente (désexcitation non-radiative, conversion interne ou encore passage intersystème). Enfin, le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'ondes plus grandes (ce qui correspond à des énergies plus basses) que le spectre d'absorption en raison de la perte d'énergie vibrationnelle à l'état excité. L'écart entre le maximum de la première bande d'absorption et le maximum de fluorescence est appelé déplacement de Stokes (ou stokes' shift).

Une troisième voie possible de désexcitation à partir de S_1 est le passage intersystème, c'est-à-dire le passage à un état triplet T_1 (**Figure 6**).

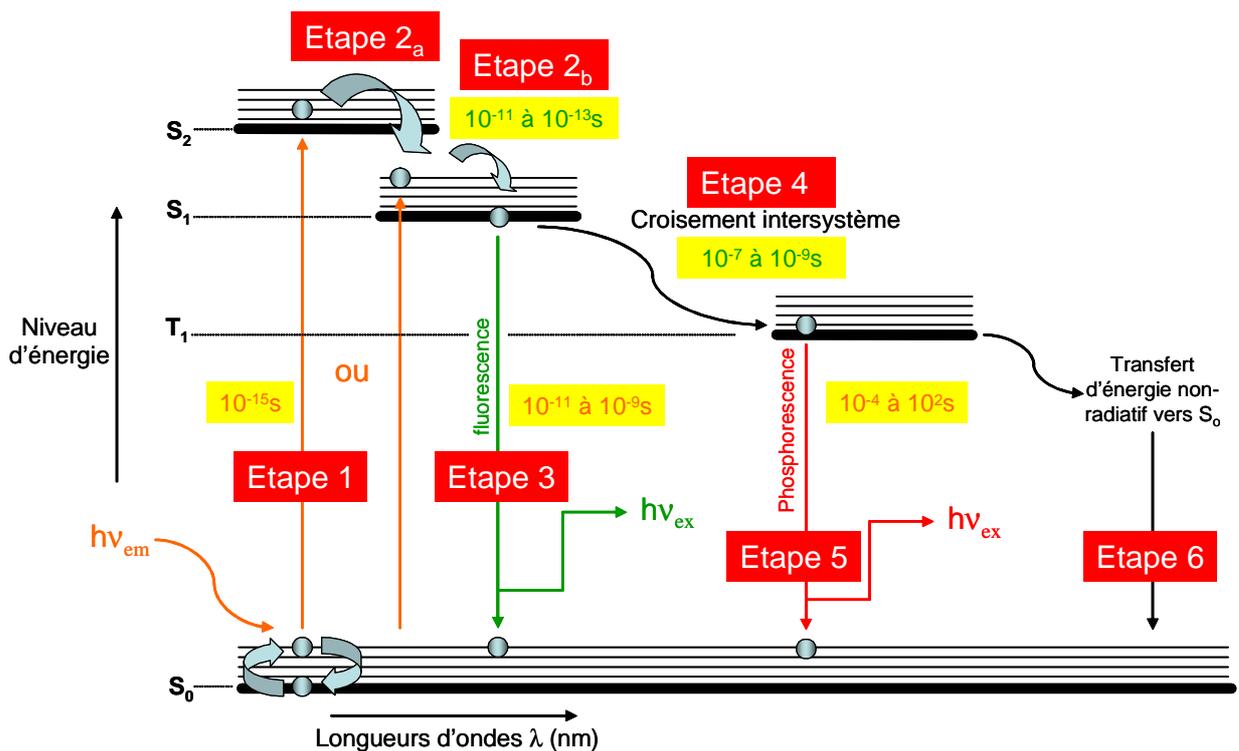


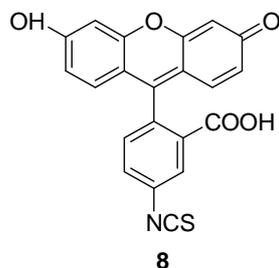
Figure 6 : Diagramme de Jablonski simplifié illustrant le processus de phosphorescence

Le passage intersystème (ou encore croisement intersystème) est une transition non-radiative entre deux niveaux vibrationnels de deux états électroniques de multiplicité différentes (Par exemple S_1 à T_1 - **Etape 4**).

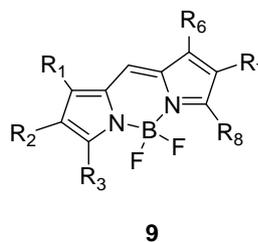
Le passage intersystème est un processus s'opérant dans des temps de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-9} s et peut ainsi entrer en compétition avec les autres voies de relaxation (fluorescence et conversion interne de S_1 à S_0).

En solution, la désexcitation non radiative de l'état T_1 vers un niveau S_0 l'emporte dans la majorité des cas sur la désexcitation radiative appelée *phosphorescence* (**Etape 5**). En effet, la désexcitation radiative de l'état excité triplet T_1 (de multiplicité différente) vers S_0 est théoriquement interdite (transition interdite) mais demeure possible grâce au couplage spin-orbite. De ce fait, la vitesse d'émission de phosphorescence est rendue de 100 à 1000 fois plus petite que pour la fluorescence (S_1 à S_0) permettant alors généralement un processus non-radiatif vers S_0 prédominant (**Etape 6**). Cependant, à froid et/ou dans un milieu rigide, les collisions sont inhibées et une émission de phosphorescence peut être observée (de plusieurs secondes à plusieurs minutes) si la durée de vie de l'état triplet est suffisamment longue (de 10^{-4} à 10^2 s).

Il existe un grand choix de fluorophores, chacun pouvant être caractérisé par ses spectres d'excitation et d'émission. Voici deux exemples de fluorophores couramment utilisés (**Figure 7**) : une fluorescéine **8** et la famille des Bodipy® **9**.



$\lambda_{ex} = 496 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = 516 \text{ nm}$



$\lambda_{ex} = \text{de } 495 \text{ à } 582 \text{ nm selon R}$
 $\lambda_{em} = \text{de } 503 \text{ à } 591 \text{ nm selon R}$

Figure 7 : Structures de la fluorescéine (à gauche) et des bodipy (à droite).

1. 2. 2. 2. Les Marquages covalents.

1. 2. 2. 2. 1. Les sondes fluorescamines et autres MDPF²⁴ : Addition d'une amine sur un acétal.

Au début des années 1980, plusieurs sondes fluorescentes ont été reportées dans la bibliographie pour la détection de protéines et leurs utilisations aussi bien post-migration que pré-migration²⁵. La fluorescamine **10** (*Schéma 3*) a d'ailleurs été utilisée il y a plus de 25 ans pour marquer des chromatines en gel 2D²⁶. Ce composé et ses dérivés synthétiques se caractérisent par une émission de fluorescence après addition d'une amine sur un acétal activé conduisant à la formation irréversible d'une 2-pyrroline.

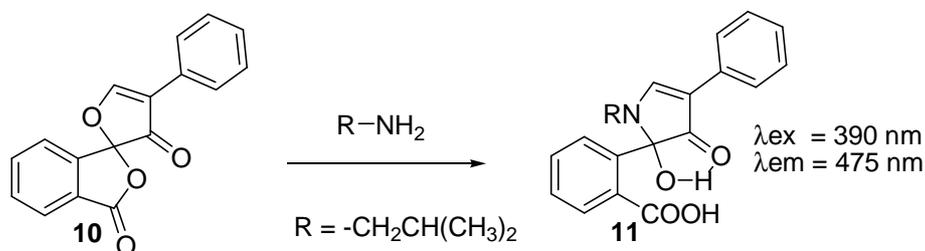


Schéma 3 : Mécanisme d'ouverture de la fluorescamine par une amine.

Le MDPF **12** (2-méthoxy-2,4-diphényl-3(2H)furanone, *Figure 8*) peut également être cité bien qu'appartenant à la même famille de composés car il s'est révélé être plus sensible et plus stable que la fluorescamine²².

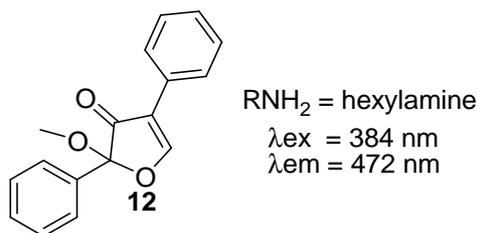


Figure 8 : Formule développée MDPF.

-
- (24) Barger, B. O. ; White, R. C. ; Pace, J. L. ; Kemper, D. L. ; Ragland, W. L. *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 327–335.
(25) Jackson, P. ; Urwin, V. E. ; Mackay, C. D. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 330–339.
(26) Jackowski, G. ; Liew, C. C. *Anal. Biochem.* **1980**, *102*, 321–325.

1. 2. 2. 2. 2. Les sondes CBQCA : addition d'une amine sur un aldéhyde.

Un second exemple de marqueur fluorescent se liant de façon covalente aux protéines a été publié par le Pr. Novotny en 1991. En effet, ce groupe a développé un nouveau fluorophore basé sur une structure quinoline fonctionnalisée présentant une fonction aldéhydique : CBQCA²⁷ **13** (3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldéhyde). Ainsi, après réaction avec une amine et formation d'une imine intermédiaire, les composés fluorescents de type isoindoliques sont formés (*Schéma 4*).

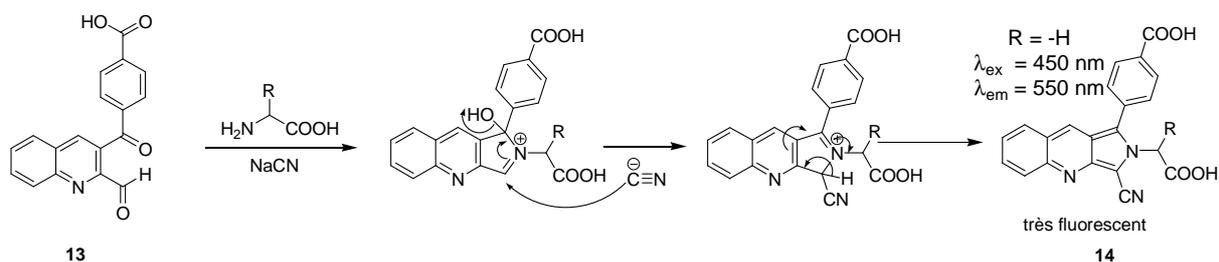


Schéma 4 : Formation des adduits isoindoliques fluorescent en présence de cyanures.

Bien que non-testée sur gel d'électrophorèse, la sensibilité de ce marqueur a pu être évaluée en chromatographie liquide capillaire sur des acides aminés et des polypeptides. De très faibles quantités d'adduits ont ainsi pu être détectées (en solution : de 10 à 70 amol pour les acides aminés et de 5 à 14 amol pour les peptides) avec une bonne linéarité de réponse (de l'ordre de 10^3). De plus, la formation de miscelles par ajout de SDS permet de multiplier la sensibilité par un facteur 10.

A notre connaissance, bien que très sensible, ce marqueur n'a jamais été utilisé sur les gels d'électrophorèse. De plus, la toxicité du cyanure de sodium dans le tampon représenterait vraisemblablement un risque non-acceptable pour des analyses qui se doivent d'être mises en place facilement. Enfin, un fort bruit de fond serait généré par le produit de départ (spectre d'excitation et d'émission proche du composé **14**) conduisant à une diminution indéniable de la sensibilité.

(27) Liu, J.; Hsieh, Y., Z. ; Wiesler, D.; Novotny, M. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 408-412.

1. 2. 2. 2. 3. Le monobromobimane : Attaque des résidus cystéines sur un bimane bromé.

En 1993, le groupe du Pr. Jackson a montré que le motif bimane pouvait être utilisé pour révéler les protéines sur gel d'électrophorèse en préparant le dérivé bromé **15** pouvant subir des attaques nucléophiles²⁸. Cette méthode s'est révélée très intéressante dans le cadre de détection de protéines portant des dérivés cystéine car il se forme une liaison irréversible après substitutions nucléophile des thiols présents sur la protéine (*Schéma 5*). Bien que la détection non-spécifique soit rendue impossible par cette réactivité, une fixation pré-migratoire des protéines possédant des résidus cystéines est donc réalisable.

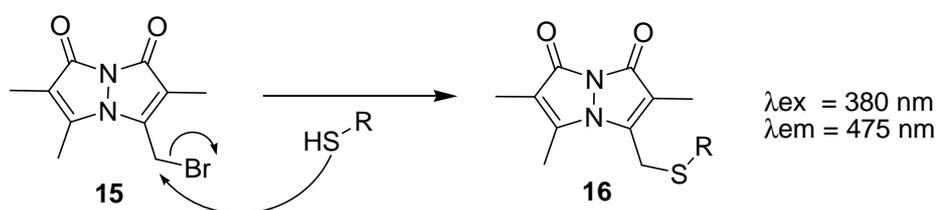


Schéma 5 : Liaison du bromobimane par ses résidus cystéines.

Finalement, une sensibilité de l'ordre de 10 pmol de cystéine a pu être observée. Cependant, le composé alkylant étant lui même très fluorescent, de nombreux lavages, sources de diminution du signal, sont indispensables pour éviter un bruit de fond résiduel trop important.

1. 2. 2. 2. 4. Les cyanines Cy3 et Cy5 : Attaque nucléophile sur des esters activés.

Un marqueur covalent très utilisé pour la détection de protéines est constitué d'un des motifs les plus répandus dans le monde de la fluorescence : Les cyanines Cy3 **17** et Cy5 **18**. Ces cyanines fonctionnalisées (*Figure 9*) utilisables sur gels d'électrophorèse ont été introduite par le Pr. Minden²⁹ en 1997. La nature covalente de la liaison permet également de marquer les protéines en amont de la migration et conduit à des limites de détection proches des marquages au nitrate d'argent.

(28) Urwin, V., E.; Jackson, P. *Anal. Biochem.* **1993**, 209, 57-62.

(29) Ünlü, M.; Morgan, M., E.; Minden, J., S.; *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2071-2077.

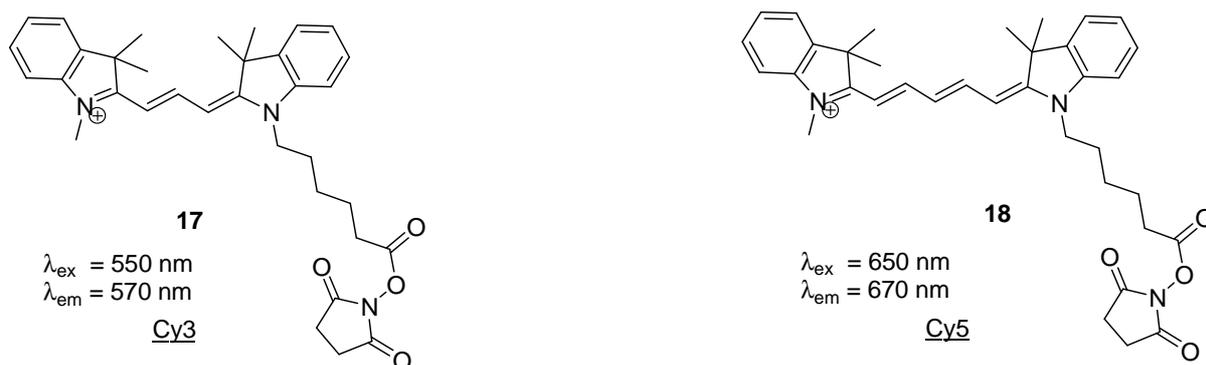


Figure 9 : Cyanines 3.0 et 5.0 pour les marquages de protéines sur gel d'électrophorèse.

Deux inconvénients majeurs sont distinguables dans le cas de l'utilisation des ces marqueurs de protéines. Tout d'abord, leur synthèse conduit généralement aux produits de dialkylation lors de l'étape pour insérer le bras espaceur (Le dérivé monoalkylé et le dérivé dialkylé étant difficilement séparables). De plus, la forte fluorescence de ces composés induit une augmentation non négligeable du bruit de fond rendant leur utilisation post-migratoire difficile (lavages intensifs nécessaires du signal ou utilisation de billes polymériques réagissant avec le reste de fluorophore). Enfin, comme pour l'ensemble des autres fluorophores covalents, la modification des protéines portant une ou plusieurs unités cyanines peut modifier son élution sur gel et limite les études de détermination structurales par spectrométrie de masse.

1. 2. 2. 2. 5. Les marqueurs Py-1, Py-3 et Py-5 : Formation d'ions pyridinium à partir d'ions pyriliums.

L'essor des études protéomiques a conduit à l'apparition de structures innovantes se liant aux protéines. En ce sens, en 2004, l'équipe du Pr. Wolfbeis s'est attaché à la construction de nouveaux motifs à fort potentiel : les ions pyriliums conjugués Py-(1,3 ou 5) (**Schéma 6, 19-20-21**). Ces ions pyriliums sont très connus pour leur grande sensibilité vis-à-vis des amines et peuvent, de ce fait, conduire à des ions pyridiniums conjugués très fluorescents³⁰. De plus comme dans le cas des cyanines, ces composés se distinguent par un grand Stokes' Shift en fonction du nombre de double liaison entre les deux noyaux aromatiques.

(30) Weltz, B., K.; Yarmoluck, S., M.; Craig, D., B.; Wolfbeis, O., S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5400-5402.

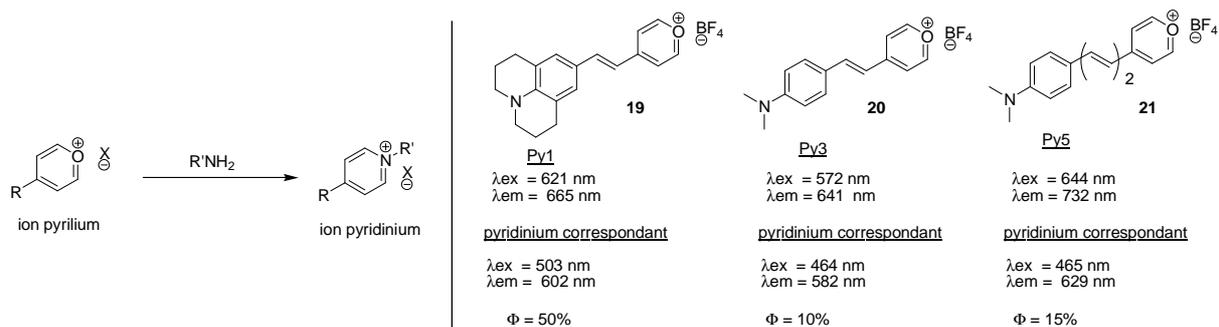


Schéma 6 : Propriétés physicochimiques des pyriliums et des pyridiniums correspondants.

Cette grande différence entre longueur d'onde d'excitation et longueur d'onde d'émission est d'une importance primordiale dans le cadre d'études électrophorétiques car elle permet de s'affranchir des problèmes techniques induits par le recouvrement des bandes spectrales. De plus, ils sont également plus accessibles du point de vue synthétique que les cyanines (seuls fluorophores covalents ayant des longueurs d'ondes d'émission similaires) et permettent également des fixations pré-migratoires.

Bien que combinant de nombreux points positifs, ces composés possèdent néanmoins des lacunes inhérentes aux fluorophores covalents : impossibilité de caractériser les protéines séparées par spectrométrie de masse (adduit très stable). De plus, leur grande réactivité leur confère également une instabilité néfaste, rendant leur conservation plus difficile.

1. 2. 2. 3. Les Marquages non-covalents.

La nature covalente de la plupart des marqueurs très sensibles disponibles empêchant l'analyse des protéines par spectrométrie de masse (couplage 2-DE/Spectromètre de masse), une nouvelle classe de sondes a vu le jour : les sondes fluorescentes qui s'associent aux protéines de façon non-covalente

1. 2. 2. 3. 1. Les sondes SYPRO[®] orange, red et tangerine : les sondes de type aniline conjuguée.

Les premières molécules fluorescentes s'associant aux protéines par une liaison de nature non-covalente sont les SYPRO[®] Red **22**, Orange **23**, et Tangerine **24** (*Figure 10*). Elles se lient aux micelles par des interactions hydrophobes formées par le détergent entourant les protéines dans les gels dénaturés de type SDS ; entraînant dans certains cas une mauvaise fixation en fonction de la classe de protéines^{31,32}.

(31) Steinberg, T. H. ; Haugland, R. P. ; Singer, V. L. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 238–245.

(32) Steinberg, T. H., Jones, L. J. ; Haugland, R. P. ; Singer, V. L. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 223–237.

Elles se distinguent notamment par de très bons stokes shift (de 100 à 150 nm) Le marquage est réalisé en une étape après électrophorèse mais peut également être inclus directement dans le tampon conduisant à l'économie d'une étape. Une réduction du bruit de fond par des lavages des gels afin d'éliminer l'excès de fluorophore a finalement conduit à la détection 1 à 10 ng de protéines.

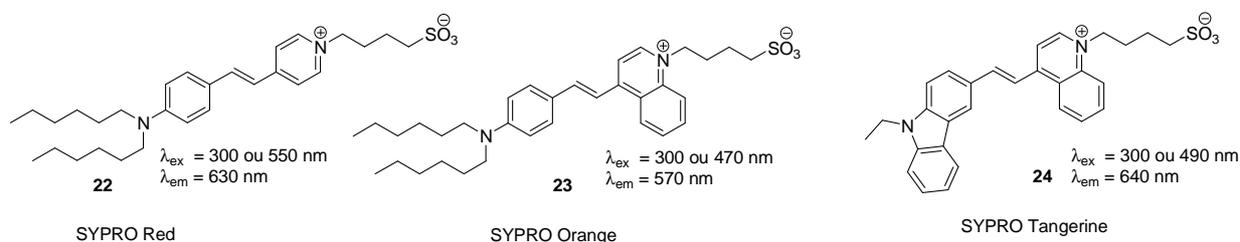


Figure 10 : Formule développée des sondes de type aniline conguguées

1. 2. 2. 3. 2. Les sondes SYPRO[®] ruby et rose : les sondes de type sels de terres rares.

SYPRO[®] Ruby **25**^{33,34} (**Figure 11**), la plus utilisée des sondes fluorescentes, est un complexe bathophénantroline de ruthénium s'associant, comme le CBB, aux résidus cationiques présent sur une protéine.

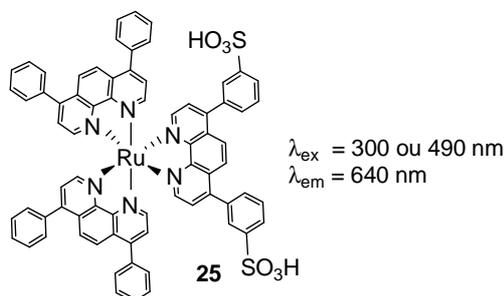


Figure 11 : Formule développée du SYPRO[®] Ruby

Le succès de SYPRO[®] Ruby, a généré un grand nombre de copies basées sur des sels de terres rares comme les sondes RUBEO[®] (Genotech), ou bien Lumitein[®] (Biotum) dont les structures protégées ne sont pas publiées. Le complexe de ruthénium est fluorescent de façon inhérente (avec un stokes shift généralement de l'ordre 300 nm : $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$) et, de ce fait, la limitation inhérente de cette méthode est la nécessité de laver le gel en fin de marquage afin de réduire le bruit de fond non-spécifique³⁵.

- (33) Beggren, K.; Chernokalskaya, E.; Steinberg, T., H.; Kemper, C.; Lopez, M., F.; Diwu, Z.; Haugland, R., P.; Patton, W., F. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 2509-2521.
- (34) Rabillout, T.; Strub, J.-M.; Luche, S.; Girardet, J.-L.; Van Dorsselaer, A.; Lunardi, J. *Proteome*, **2000**, *1*, 1-14.
- (35) Tsangaris, G. ; Weitzdoerfer, R. ; Pollak, D. ; Lubec, G. ; Fountoulakis, M. ; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1168-1173.

En ce qui concerne la sensibilité, SYPRO[®] Ruby permet de détecter des protéines de l'ordre de 1 ng en ayant tout de même une gamme de linéarité de 10³. Ces résultats font aujourd'hui de ce composé la référence pour la détection de protéines sur gel d'électrophorèse. Il est intéressant de remarquer qu'un dérivé de SYPRO possédant un ester activé (marquage covalent de protéines dans ce cas) a été développé par le groupe du Pr. Rolando : le bis-(2,2'-bipyridine)-4'-methyl-4-carboxybipyridine-ruthenium-*N*-succidimylester-bis(hexafluoro) phosphate (ASCQ_Ru). Celui-ci a permis d'atteindre une meilleure limite de détection de l'ordre de 80 pg³⁶. Enfin, malgré la popularité croissante de ces marqueurs de type complexes de terres rares, un problème majeur est généré par leur utilisation à grande échelle : le recyclage des eaux de lavages riches en sels de métaux lourds. Ceci a donc conduit à une incessante recherche du composé idéal combinant tous les avantages de ce type.

1. 2. 2. 3. 3. Les sondes de type fluorescéine.

Les fluorescéines sont des fluorophores bien connus dans la bibliographie³⁷. Elles font partie des structures les plus étudiées dans le domaine des sondes fluorescentes de par leurs propriétés physicochimiques très intéressantes (stokes shift d'environ 60 nm et très bons rendements quantiques). Cependant, il est connu qu'en milieu basique, leur fluorescence est très limitée^{38, 39} empêchant ainsi une utilisation sur gels d'électrophorèse. Cette pH-dépendance a finalement été expliquée par les nombreuses formes ioniques de la fluorescéine qui peuvent émettre chacune différemment.

Le groupe du Pr. Kang a récemment montré que la fluorescence de tels composés augmentait de façon surprenante en milieu acide et en présence de protéines. Dans ce sens, l'addition d'une chaîne hydrocarbonée a permis d'augmenter les interactions hydrophobiques avec les protéines. Ce fluorophore modifié **26** (*Figure 12*) a ainsi pu être utilisé comme marqueur de protéine non-covalent dans les gels d'électrophorèse de type SDS-PAGE⁴⁰.

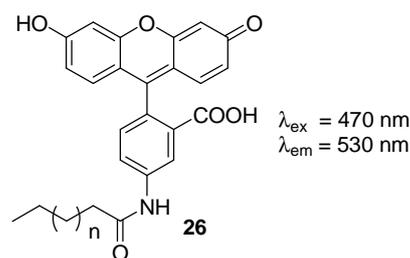


Figure 12 : Marqueur de type fluorescéine.

-
- (36) Tokarski, C. ; Cren-Olivé C. ; Fillet, M. ; Rolando, C.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1407–1416.
(37) Berlman, I. B. *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Press, New York **1971**.
(38) Dutta, A. K. ; Salesse, C. *Langmuir* **1997**, *13*, 5401–5408.
(39) Stepanek, M., Podhajecka, K., Prochazka, K., *Langmuir* **1999**, *15*, 4185–4193.
(40) Kang, C. ; Kim, H. ; Kang, D. ; Jung, D., Y.; Suh, M. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3297–3304.

Finalement, des bandes de 1 ng de protéines et dans certains cas de 0.1 ng ont pu être détectées. Cependant une linéarité de la réponse n'a été observée que pour une gamme allant de 1 à 126 ng de protéines.

1. 2. 2. 3. 4. les DCM : Les sondes de type tetrahydropyraniques.

Le groupe du Pr. Suzuki a reporté, en 2005, l'utilisation de nouvelles structures fluorescentes pour la détection de protéines : Les DCM⁴¹ **27** et **28** (4-(Dicyanométhylène)-2-méthyl-6-(p-méthylaminostyryl)-4H-pyran / *Figure 13*).

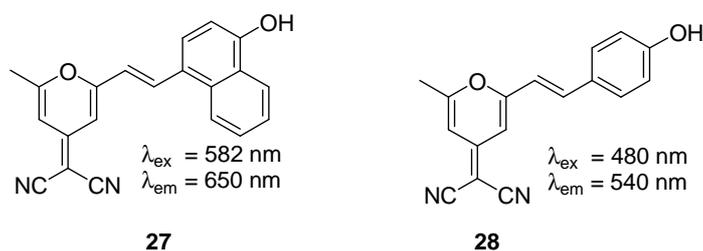


Figure 13 : Marqueurs DCM

Ces composés conduisent à un transfert de charge intramoléculaire (ICT : mécanisme d'émission de fluorescence le plus courant) à l'état excité qui subit de grande variation de leurs propriétés physicochimiques en fonction du milieu. En effet, une augmentation de l'émission de fluorescence étant observée en milieu hydrophobe, la détection de protéines sur gel d'électrophorèse par ces composés a pu être envisagée. En effet, de interactions hydrophobiques stabilisant l'ICT sont observées en présence de protéines plus SDS. Un Stokes' shift de l'ordre de 60 et 68 nm a été mis en évidence pour les composés **27** et **28** respectivement. Une sensibilité allant jusqu'à 100 ng/mL a finalement été observée ainsi qu'une très bonne linéarité (10^4).

1. 2. 2. 3. 5. Les marqueurs Flamingo et Krypton : les sondes hybrides coumarines-cyanines.

Les sondes Flamingo[®] **29** et Krypton[®] **30** sont les deux sondes les plus récemment introduites. Elles ont montré un gros potentiel (*Figure 14*). Développées par la société Dyonics⁴², les deux sont de types coumariniques, et plus précisément des hybrides coumariniques s'associant avec le SDS entourant les protéines sur le gel.

(41) Suzuki, Y.; Yokoyama, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17799-17802.

(42) Wenzel, M. ; Czerney, P. ; Schweder, B. ; Lehmann, F. Protein identifying and quantifying method. WO2006/079334 Aug. 3 2006, Dyomics GMBH.

Il y a peu de bibliographie concernant ces deux sondes mais il est suggéré qu'elles sont aussi sensibles que le SYPRO (référence en terme de sondes fluorescences) ou bien encore que l'argent en restant compatibles avec les analyses par spectrométrie de masse^{43,44,45}.

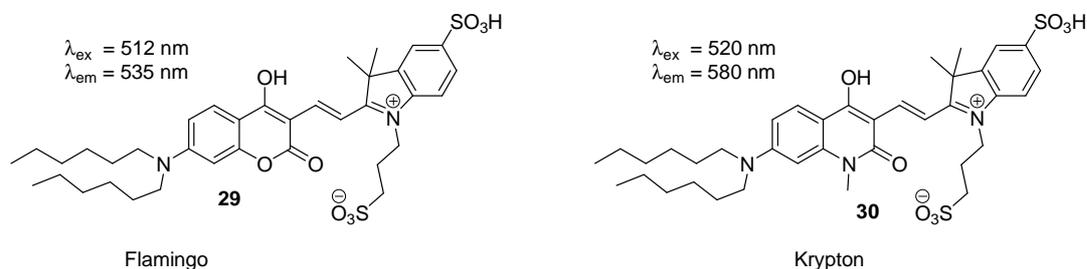


Figure 14 : Formule développée du Flamingo et du Krypton

Cependant, même si le coefficient d'absorption moléculaire est très important ($\epsilon = 105000$), le Stokes' shift est lui petit en présence de protéines aussi bien pour le Krypton que pour le Flamingo (de l'ordre de 30 à 60 nm) entraînant des problèmes techniques liées au recouvrement des bandes spectrales.

1. 2. 2. 3. 6. Révélation par lecture de l'absorbance native des protéines.

Une nouvelle approche a été initiée par le groupe du Pr. Anselmitti en 2003 et consiste en la lecture de la fluorescence native des protéines⁴⁶. Cette équipe s'est appuyée sur le concept développé par Yamamoto *et al.* qui avait permis de révéler les protéines par simple détection UV à 280 nm de leur unité tryptophane avec une sensibilité de l'ordre du microgramme. Ici, la lecture de la fluorescence des ces unités tryptophanes (fluorescence natives des indoles) a permis la détection de bandes de 1 à 5 ng de protéines. Cette méthode représente ainsi un gain de temps non-négligeable dans le cadre d'étude protéiques. La détection reste hautement dépendante de la quantité de tels acides aminés et une linéarité de réponse moins bonne que pour les SYPRO[®] Ruby a finalement été observée ($<10^3$).

(43) Harris, L. R. ; Churchward, M. A. ; Butt, R. H. ; Coorssen J. R. *J. Proteome Res.* **2007**, 6 (4), 1418-1425.

(44) Wolf, B. D. ; Desai, S. ; Shiflett, S. ; Bell, P. A. Krypton A : sensitive fluorescent protein stain for protein detection in polyacrylamide gels. 20th Annual Symposium of The Protein Society, San Diego, CA, August 5-9, 2006.

(45) Berkelman, T. Detection and quantitation of proteins using a novel fluorescent dye. BioRad technical bulletin 5352, http://www.biorad.com/cmc_upload/Literature/194338/Bulletin_5352.pdf

(46) Roegener, J.; Lutter, P.; Reinhart, R.; Bluggel, M.; Meyer, H., E.; Anselmitti, D. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 157-159.

Malgré la pléthore de marqueurs, il apparaît cependant clairement qu'aucun ne présente l'ensemble des avantages souhaitables dans le cadre d'étude protéomique. D'une façon générale, bien que schématique :

A - Les marqueurs covalents :

- ☺ Bonne sensibilité, Bonne gamme de linéarité, Bon Stokes' shift.
- ☹ Non-compatibles avec des analyses ultérieures car modifie la masse des protéines.

B - Les marqueurs non-covalents :

- ☺ Compatibles avec des analyses post-migrations, bon Stokes' shift (dans certains cas).
- ☹ Sensibilité et gamme de linéarité très dépendante du nombre de lavages nécessaires pour réduire le bruit de fond résiduel du marquage non-spécifique.

Décrite en 2003, une molécule isolée d'un champignon appelé *Epicoccum nigrum* par le groupe du Pr. Karuso semble cependant remplir l'ensemble du cahier des charges.

1. 2. 2. 4. Un marqueur de type dihydropyranique : Lavapurple.

Lavapurple est un marqueur pro-fluorescent basé sur l'épicocconone⁴⁷ **31** (*Figure 15*) qui a été introduit juste après SYPRO Ruby en temps que Deep Purple total protein stain⁴⁸ (GE Healthcare).

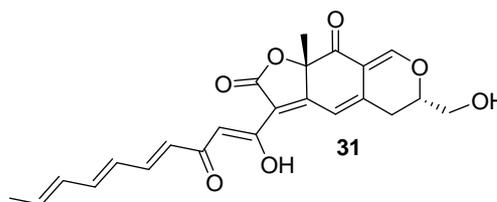


Figure 15 : Structure l'épicocconone configurations absolues non-conues.

Ce produit naturel de structure originale est non ou peu fluorescent. En revanche, en se liant de façon covalente à une amine (en particulier la fonction amine des unités lysine des protéines), il forme un complexe de transfert de charge interne⁴⁹ (en anglais *ICT complex*) sur la molécule **32** qui possède un stokes' shift très important (90 nm). En effet, il fluoresce dans le proche InfraRouge (610 nm) quand il est soumis à un rayonnement UV ou visible (395 ou 520 nm).

(47) Bell, P. J. ; Karuso, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (31), 9304-9305.

(48) Mackintosh, J. A. ; Choi, H.-Y. ; Bae, S. H. ; Veal, D. A. ; Bell, P. J. ; Ferrari, B. C. ; Van Dyk, D. D. ; Verrills, N. M. ; Paik, Y. K. ; Karuso P. *Proteomics* **2003**, 3 (12), 2273-2288.

(49) Crawford, A., S.; Veal, D., A., Scott, G., B., I.; Choi, H., Y., Karuso, P. *J. Prot. Res.* **2008**, 7, 361-366.

Le mécanisme de fixation de l'épicoconone aux protéines passe par la formation d'une énamine stabilisée **32** par liaison hydrogène intramoléculaire⁵⁰ évitant ainsi un maximum le relargage du fluorophore (*Schéma 7*). Une quantité de l'ordre du picogramme a finalement pu être détectée après optimisation rendant ce composé plus sensible que le SYPRO Ruby.

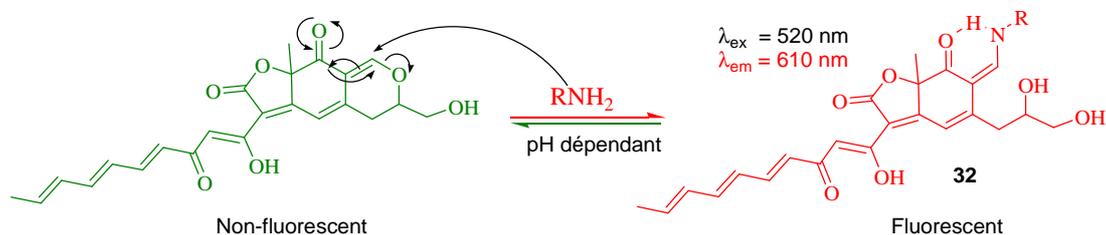


Schéma 7 : Mécanisme de fixation des protéines

De plus, le complexe formé s'associe également dans le gel aux micelles de SDS présentes autour de la protéine (*Figure 16*).

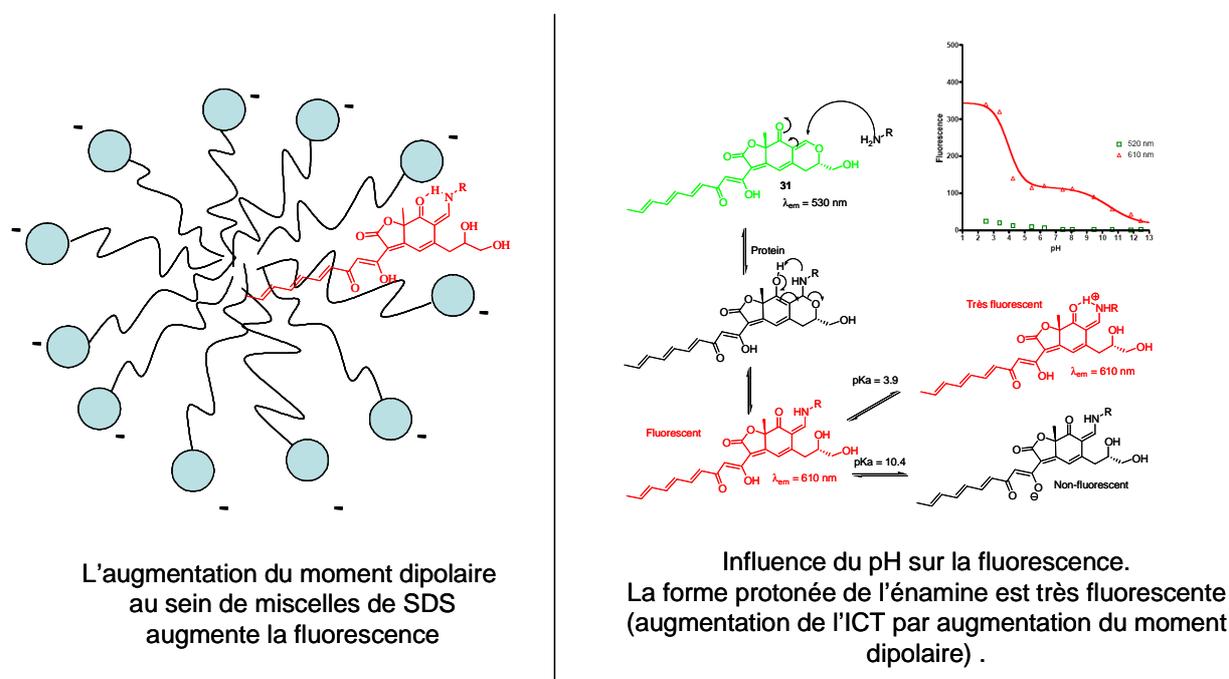


Figure 16 : Augmentation de la fluorescence en milieu apolaire par interactions hydrophobiques.

Cette incursion miscellaire augmente notamment de façon synergique la fluorescence par un facteur 10 sur une gamme de linéarité rarement atteinte⁵¹ ($>10^4$). Ceci est expliqué par l'augmentation du moment dipolaire de la molécule au sein de micelles. L'augmentation de la fluorescence en fonction du pH (forme énamine protonée à pH 2.5) confirme l'importance du moment dipolaire dans l'émission de fluorescence de la molécule.

(50) Coghlan, D. R. ; Mackintosh, J.A. ; Karuso, P. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2401-2404.

(51) Svensson, E. ; Hedberg, J. J. ; Malmport, E. ; Bjellqvist, B. *Anal. Biochem.* **2006**, 355 (2), 304-306.

Malgré la bonne stabilité de l'énamine dans les conditions opératoires, une réversibilité est observée en fonction du pH⁵² (Stabilité maximale à pH 2.5 – **Figure 17**). Ceci conduit donc à la libération des protéines marquées permettant ainsi leurs analyses en spectrométrie de masse post-migratoire. Cette réversibilité est une première dans le cadre de marqueurs non-spécifiques covalents de protéines sur gel d'électrophorèse. Elle vient ainsi combler la principale lacune de tels marqueurs. La nature réversible de la liaison rend ainsi possible la libération de l'épicocconone dans les conditions de digestion tryptique précédant les analyses de masse. Ces coupures tryptiques permettent alors la génération de massifs moléculaires qui peuvent être référencées dans une base de données correspondant aux empreintes digitales massique du peptide à déterminer.

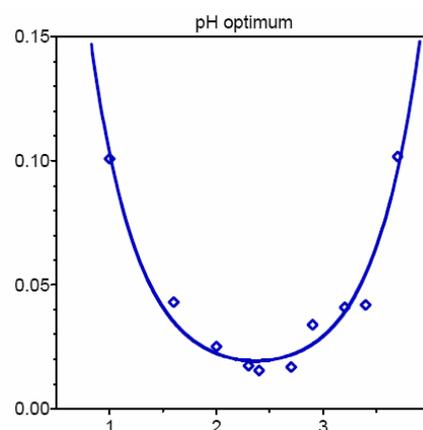


Figure 17 : Réversibilité en fonction du pH de l'énamine.

Cette molécule a également la particularité d'être utilisable *in cellulo* (permettant donc des tests sur des cellules vivantes en laboratoire) du fait de sa non cytotoxicité⁵² et de sa capacité à former un adduit très fluorescent en milieu hydrophobe. Le marquage des protéines membranaires du noyau a ainsi pu être réalisé après passage de la barrière cytoplasmique et élargit donc encore le panel d'utilisation de ce marqueur pro-fluorescent (membrane cytoplasmique également révélée).

Enfin, malgré de nombreux avantages, l'épicocconone comporte néanmoins une limitation : son temps de demi-vie sous irradiation en gel d'électrophorèse. En effet, le groupe du Pr. Lazarev⁵³ a montré une photostabilité (83 % de blanchiment après 19 minutes) inférieure au SPYRO Ruby (44% de blanchiment après 19 minutes) limitant le nombre possible d'accumulations.

Le but de notre étude sera donc de mettre au point la première synthèse de l'épicocconone. Ceci permettra d'identifier des relations structures-fluorescence qui conduiront d'une part, à obtenir une gamme de fluorophores de structures analogues mais de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission différentes, et d'autre part à améliorer sa photostabilité.

(52) Choi, H. Y. ; Veal, H.Y. ; Karuso, P. *J. Fluorescence*, **2006**, *15*, 475-482.

(53) Smejkal, G. B. ; Robinson, M. H. ; Lazarev, A. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2511–2519.

La détermination de la configuration absolue des centres asymétriques par une synthèse énantioselective représente un second challenge qui pourra être relevé une fois la synthèse racémique mise au point. L'épicocconone faisant partie de la famille des azaphilones, il convient d'étudier les précédents bibliographiques reportant les synthèses de tels composés afin de proposer la voie synthétique la plus efficace et convergente possible.

2. SYNTHÈSE D'AZAPHILONES – BIBLIOGRAPHIE.

Monascurobicine⁵⁴, rubropunctamicine⁵⁵, (+)-sclerotiorine⁵⁶, (-)-mitorubine⁵⁷ et daldinines⁵⁸ (mélange de quatre esters possédant une longue chaîne plus ou moins insaturée) sont des métabolites produits par respectivement les champignons *Monascus purpureus* Wentii, *Monascus rubropunctatus* Sato, *Penicillium sclerotiorum* van Beyma, *Penicillium rubrum* and *Daldinia concentrica* (**Figure 18**).

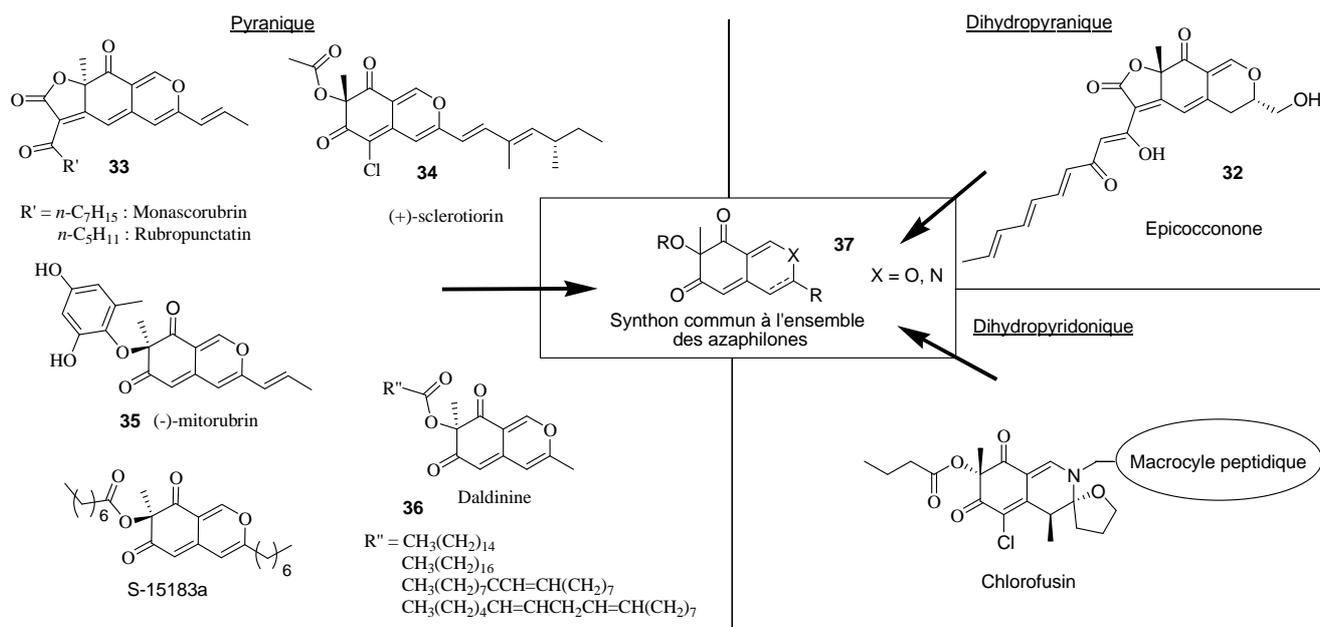


Figure 18 : Exemples d'azaphilones - Synthon commun à l'ensemble des structures

Il est intéressant de remarquer que le synthon **37** en série pyranique ou dihydropyranique pourrait représenter une brique moléculaire pour la construction de l'ensemble de ces structures.

Les azaphilones sont ainsi nommées de part leur affinité pour les composés aminés. La particularité structurale de ces composés est la présence d'un cycle pyranique en leur sein qui leur confère la capacité de se lier à des amines et à conduire à des γ -pyridones⁵⁹.

- (54) Kumasaki, S.; Nakanishi, K.; Nishikawa, E.; Ohashi, M. *Tetrahedron*, **1962**, *18*, 1171.
 (55) Haws, E., J.; Holker, J., S., E.; Kelly, A.; Powell, A., D., G.; Robertson, A. *J. Chem. Soc.* **1959**, 3598.
 (56) [a] Eade, R. A.; Page, H.; Robertson, A.; Turner, K.; Whalley, W., B. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 4913.
 [b] Whalley, W., B.; Ferguson, G.; Marsh W., C.; Restivo, R., J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **1976** 1366.
 (57) Büchi, G.; White, J., D.; Wogan, G., N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 3484.
 (58) Hashimoto, T.; Tahara, S.; Takaoka, S.; Tori, M.; Asakawa, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 2397.
 (59) Juzlová, P.; Martínková, L.; Kroen, V. *J. Ind. Microbiology*, **1996**, *16*, 163.

L'épicoconone, bien qu'ayant un noyau dihydropyranique, est aussi classée parmi les azaphilones. Pour l'épicoconone, une réversibilité de la liaison a été démontrée et, de par ce fait, pourrait expliquer la faible cytotoxicité reportée par le groupe du Pr. Karuso (*Schéma 8*).

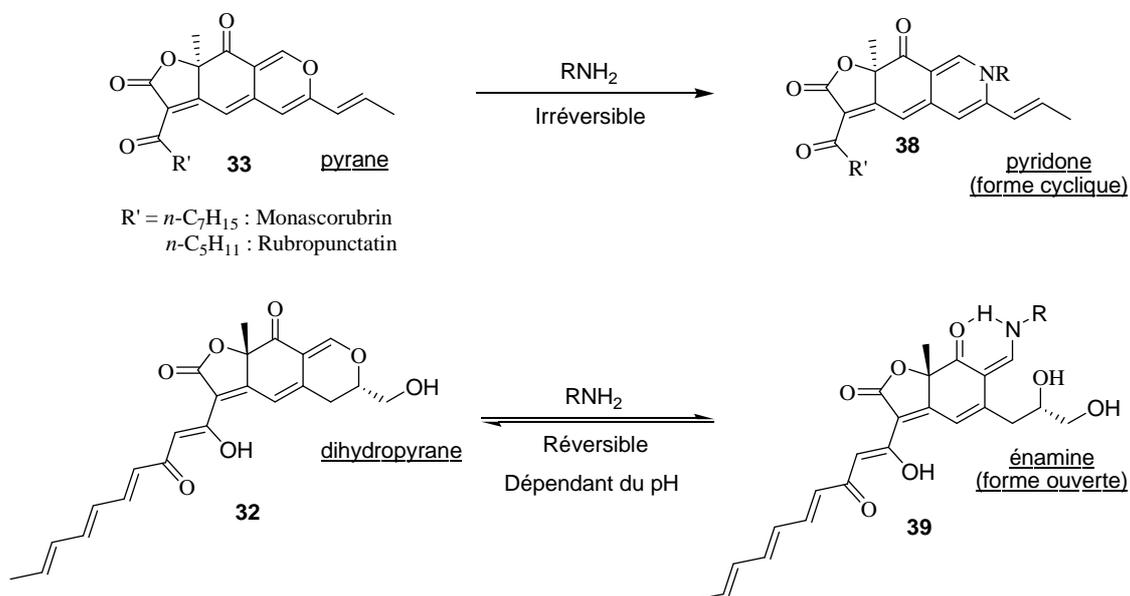


Schéma 8 : Formation irréversible de γ pyrones / Formation réversible d'énamine.

La biosynthèse des azaphilones pyraniques⁶⁰, leurs synthèses, leurs toxicités^{61,62,63,64} ainsi que leur activités biologiques^{65,66,67,68,69} ont intensément été étudiés pendant les 50 dernières années. Cependant, bien que structurellement très proches de l'épicoconone, ces molécules diffèrent dans leurs propriétés. En effet, ces molécules conduisent à des pyridones en présence d'amines (RNH_2). La liaison créée entre l'amine et l'azaphilone devient alors quasiment irréversible, ce qui explique leur forte cytotoxicité.

Les différentes stratégies rétrosynthétiques seront reportées ci-après afin de comprendre et d'envisager la voie synthétique la plus convergente et efficace possible (la bibliographie concernant la désaromatisation oxydante sera traitée en détail plus en aval dans le manuscrit / cf 4. 2. 2. *Désaromatisation oxydante*).

- (60) Kurono, K. ; Nakanishi, K. ; Shindo, K. ; Tada, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **1963**, *11*, 359 (
- (61) Vlegaar, R. ; Steyn, P., S. ; Nagel, W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1974**, 45.
- (62) Hetherington, A., C. ; Raistrick, H. *Phil. Trans. Roy. Soc. (London), Ser. B*, **1931**, 220, 269.
- (63) Pollock, A. V. *Nature (London)*, **1947**, *160*, 331.
- (64) Oku, H. ; Nakanishi, T. *Phytopathology*, **1963**, *53*, 1321.
- (65) Nukina, M.; Marumo, S. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 2603.
- (66) Haraguchi, H.; Taniguchi, M.; Motoba, K.; Shibata, K. Oi, S.; Hashimoto K. *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, *54*, 2167.
- (67) Takahashi, M.; Koyama, K. Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, *38*, 625.
- (68) Matsuzaki, M.; Tahara, H.; Inokoshi, J.; Tanaka, H. *J. Antibiotics*, **1998**, *51*,1004.;
- (69) Da-Jun Yang, D.; Tomoda, H.; Tabata, N.; Masuma, R.; Omura, S. *J. Antibiotics*, **1996**, *49*, 223.

2. 1. Synthèse de Whalley.

Le groupe du Pr. Whalley a reporté la première synthèse d'azaphilones (sclérotiorine⁷⁰ et tétrahydrosclérotiorine⁷¹). Ces synthèses sont basées sur une procédure qui sera reprise dans la majorité des futures synthèses d'azaphilones à savoir, la cyclisation-désaromatisation d'un énoïl sur un aldéhyde en milieu acide puis le piégeage de l'intermédiaire réactionnel par un oxydant (*Schéma 9*).

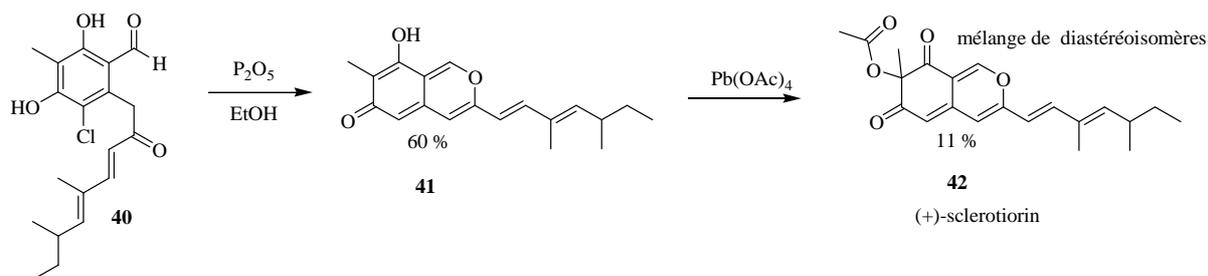


Schéma 9 : Première synthèse d'azaphilones - Synthèse de Whalley.

Il est important de remarquer que dans ces travaux préliminaires, l'intermédiaire réactionnel **41** est isolé et caractérisé, preuve d'une relative stabilité de celui-ci dans le cas de cycle pyranique. Cet intermédiaire est alors piégé par du tetracétate de plomb ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) pour conduire à l'azaphilone **42**.

2. 2. Synthèse de Suzuki.

Comme dans la synthèse proposée par le groupe du Pr. Whalley, le groupe de Suzuki s'est basé sur une cyclisation-désaromatisante d'un énoïl sur un aldéhyde en condition acide. Cependant, dans ce cas, l'acide utilisé est l'acide *p*-toluènesulfonique (APTS) et l'intermédiaire est directement piégé *in-situ* par du $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ⁷².

De plus, ce groupe a également résolu le talon d'Achille de cette voie d'accès aux azaphilones en mettant au point une synthèse très efficace du substrat de départ (*Schéma 10*). Ainsi, une première désaromatisation d'un diphenol monobenzylé **45** est réalisée pour conduire à un *o*-quinol **46**. Une attaque de type Michael d'un acétoacétate sur l'*o*-quinol **46** suivie d'une réaromatisation et perte de CH_3COOEt conduit finalement à la cétone aromatique **47**.

(70) Chong, R.; King, R., R.; Whalley, W., B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1969**, 1512.

(71) Birchall, G.; Galbraith, M.; Gray, R. W.; King, R. R.; Whalley, W. B. *J. Chem. Soc., (C)*, **1971**, 3559.

(72) Suzuki, T.; Okada, C.; Arai, K.; Awall, A.; Shimizu, T.; Tanemura, K.; Horaguchi, T. *J. Heterocycl. Chem.*, **2001**, *38*, 1409 – 1418

Finalement, une déprotection du phénol benzylique par de l'hydrogène activé suivi d'une carbonylation du cycle aromatique par réaction de type Friedel-Craft conduit au cétoaldéhyde précurseur **49** avec un rendement de 53 % sur 6 étapes.

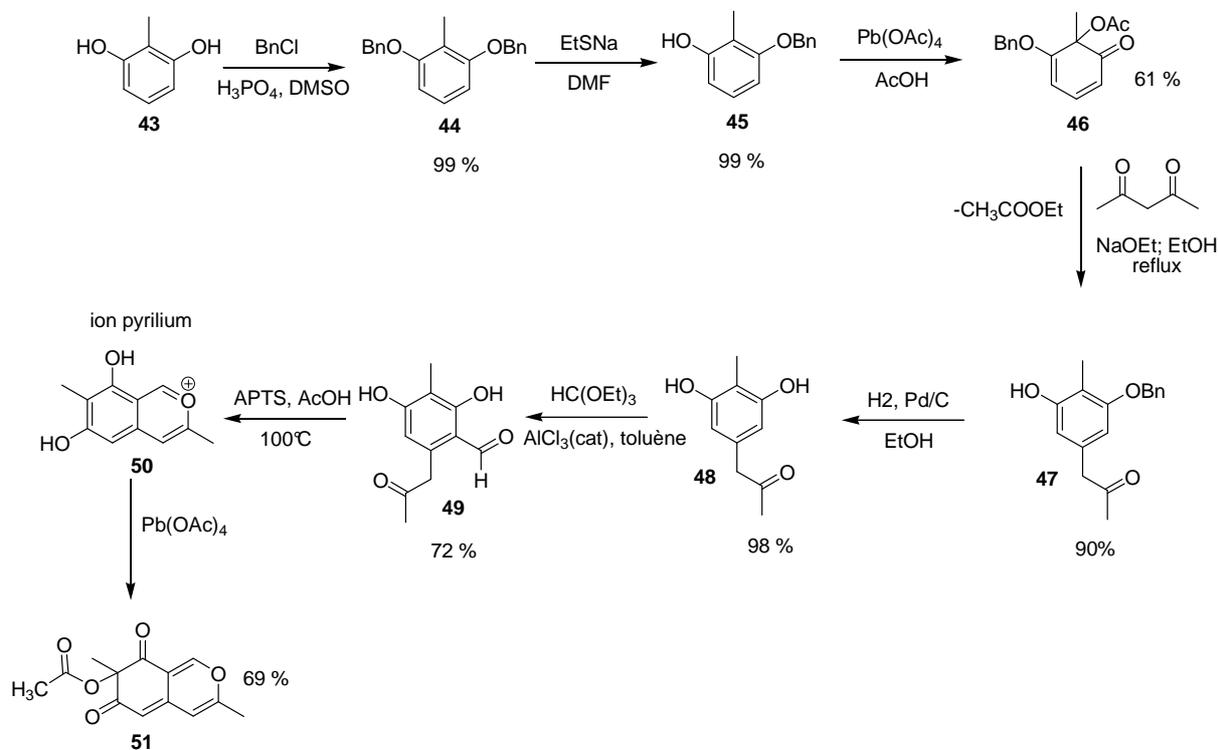


Schéma 10 : Synthèse d'azaphilones de Suzuki

L'intermédiaire réactionnel piégé ne correspond donc pas à une quinone comme dans la synthèse de Whalley mais à un ion pyrilium **50**. Ceci a été confirmé par des études RMN en variant notamment le contre ion présent sur l'oxonium. Cependant, la formation de tel composé semble nécessiter une forte activation thermique (100°C) qui est peu compatible avec des molécules hautement fonctionnalisées. Le traitement de **50** par Pb(OAc)₄ conduit alors au produit possédant le squelette de la daldinine A **51** avec un rendement de 69%.

2. 3 Synthèse de Porco.

Publiée en 2004, cette synthèse diffère des autres dans la méthode de cyclisation-désaromatisation. En effet, le groupe du Pr. Porco a réussi à cycliser un énole sur un alcyne grâce à l'activation par un sel d'or (AuCl₃). Intermédiairement, le même type d'oxonium est aussi formé et conduit après oxydation aux azaphilones (*Schéma 10*).

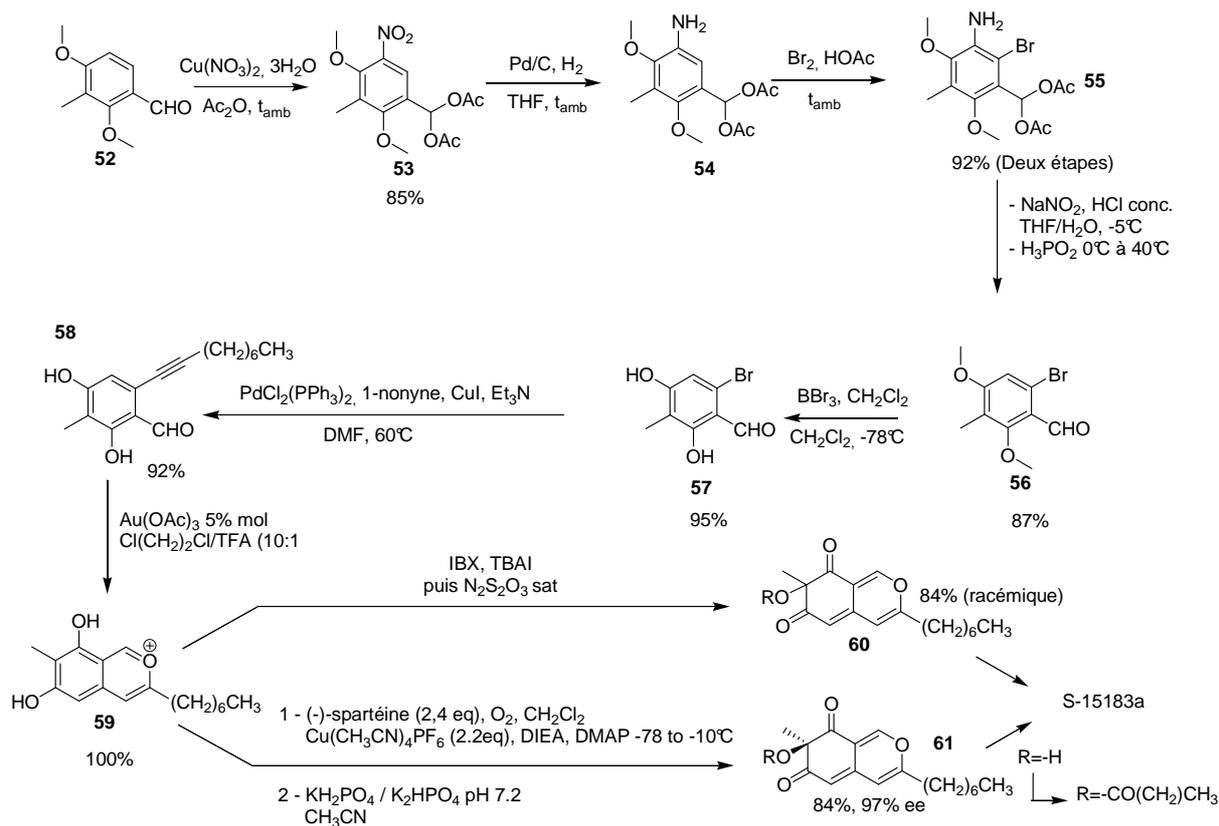


Schéma 11 : Synthèse d'azaphilones de Porco

L'oxydation de l'ion pyrylium formé intermédiairement a pu être réalisée de façon très efficace (60 % de rendement global en céto-aldéhyde **58** à partir du composé **52**) selon deux méthodes différentes : soit par action de l'IBX⁷³, soit par une élégante méthode utilisant de l'oxygène singulet complexé par différents ligands^{74,75}. Cette deuxième méthode a d'ailleurs pu être réalisée de façon énantiosélective par utilisation de spartéine comme ligand de l'oxygène singulet. Un précurseur d'azaphilone a pu alors être obtenu en 8 étapes avec des rendements globaux de 50%.

2. 4. Synthèse de Yao.

Publiée en 2005, la première synthèse reportée par le groupe de Yao est basée sur l'addition de l'anion du dithiane préalablement fonctionnalisé sur l'halogénure benzylique **64**^{76,77} (Schéma 12).

(73) Zhu, J.; Germain, A. R.; Porco, J. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1239-1243.

(74) Zhu, J.; Grigoriadis, N. P.; Lee, J. P.; Porco, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9342-9343.

(75) Zhu, J.; Porco, J. A. *Org. Lett.* **2006**, *22*, 5169-5171.

(76) Wei, W.-G.; Yao, Z.-J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4585-4590.

(77) (a) Wei, W.-G.; Qian, W.-J.; Zhang, Y.-X.; Yao, Z.-J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4171-4174.

(b) Wei, W.-G.; Zhang, Y.-X.; Yao, Z.-J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11882-11886.

Après déprotection de la cétone masquée et aménagement fonctionnel, l'énol généré à partir de la cétone **71** en condition acide HClO₄ s'additionne sur l'aldéhyde en position ortho du cycle aromatique pour conduire à un ion oxonium (pyrilium **72**) qui sera oxydé au Pb(OAc)₄. L'étape d'oxydation-désaromatisation conduit alors au produit désiré **73** précurseur de la chlorofusine avec un rendement de 51 % sur deux étapes.

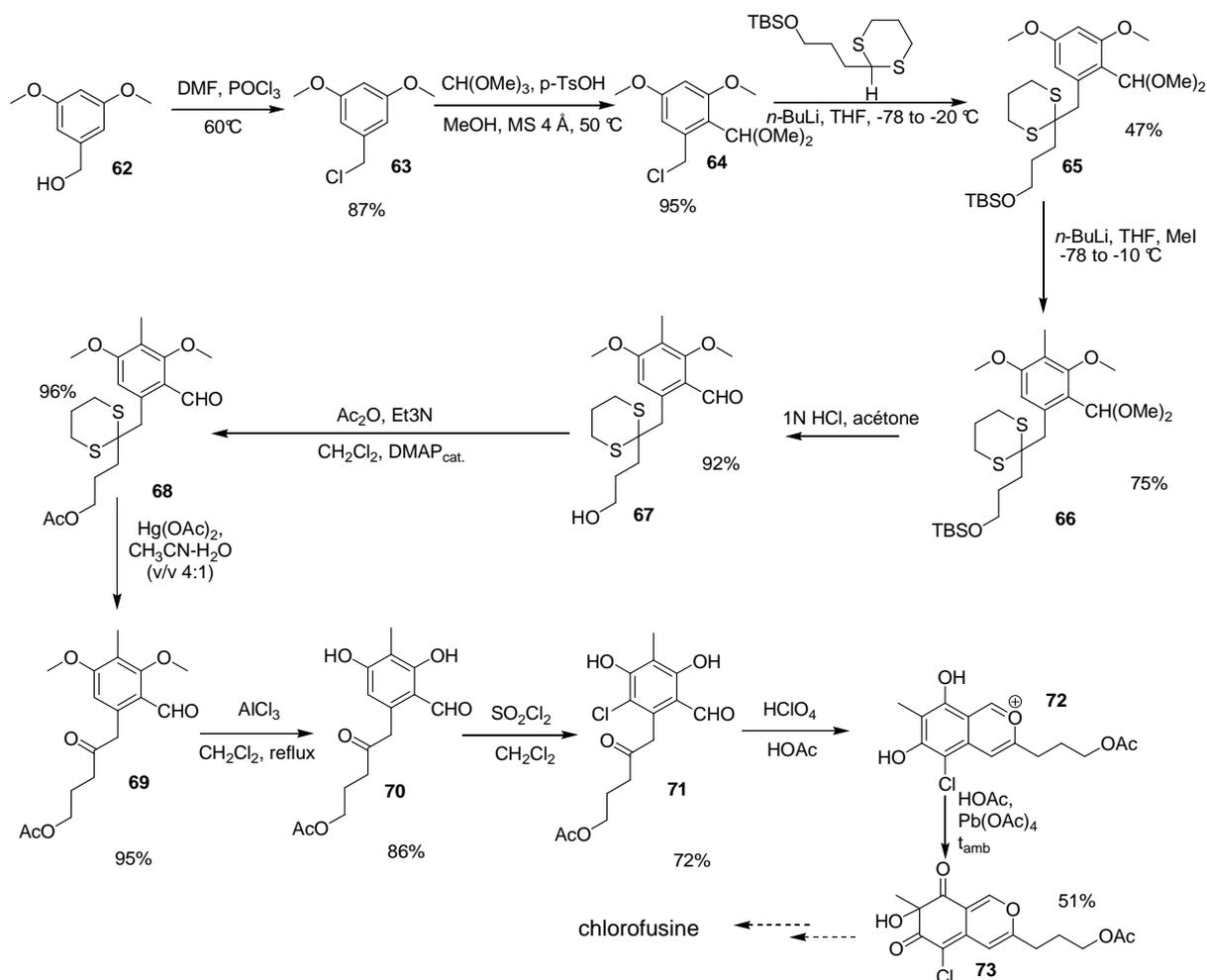


Schéma 12 : Synthèse de Yao

Cette synthèse apporte donc une information importante concernant le type d'acide à utiliser : l'acide perchlorique semble être le meilleur acide pour obtenir une forme pyrilium **72** intermédiaire. En effet, la forme oxonium est alors obtenue sans la nécessité de chauffer comme c'est le cas dans les synthèses décrites par Whalley. Un inconvénient majeur qu'est l'explosivité de cet acide rend cependant ce composé difficilement utilisable pour des synthèses sur grande échelle. Une information sous-jacente à cette méthode est toutefois très intéressante : un acide fortement déshydratant semble donc être la clé pour l'obtention de l'ion pyrilium en condition douce.

2. 5. Synthèse de Pettus.

La dernière synthèse d'azaphilones a été publiée en 2006 par le groupe du Pr. Pettus (*Schéma 13*). Elle diffère des autres synthèses par le fait que la cétone présente sur le composé **77** (nécessaire à la cyclisation) est introduite via l'acylation d'un anion benzylique formé régioselectivement par un amide de Weinreb⁷⁸. Après aménagement fonctionnel, la synthèse du noyau pyridinique **82** est réalisée par désaromatisation du noyau aromatique du composé **80** en milieu acide suivie d'une oxydation à l'IBX. Le produit désiré précurseur de la daldinine **82** est alors obtenu en 7 étapes avec un rendement de 57 % à partir du cétoaldéhyde **80**.

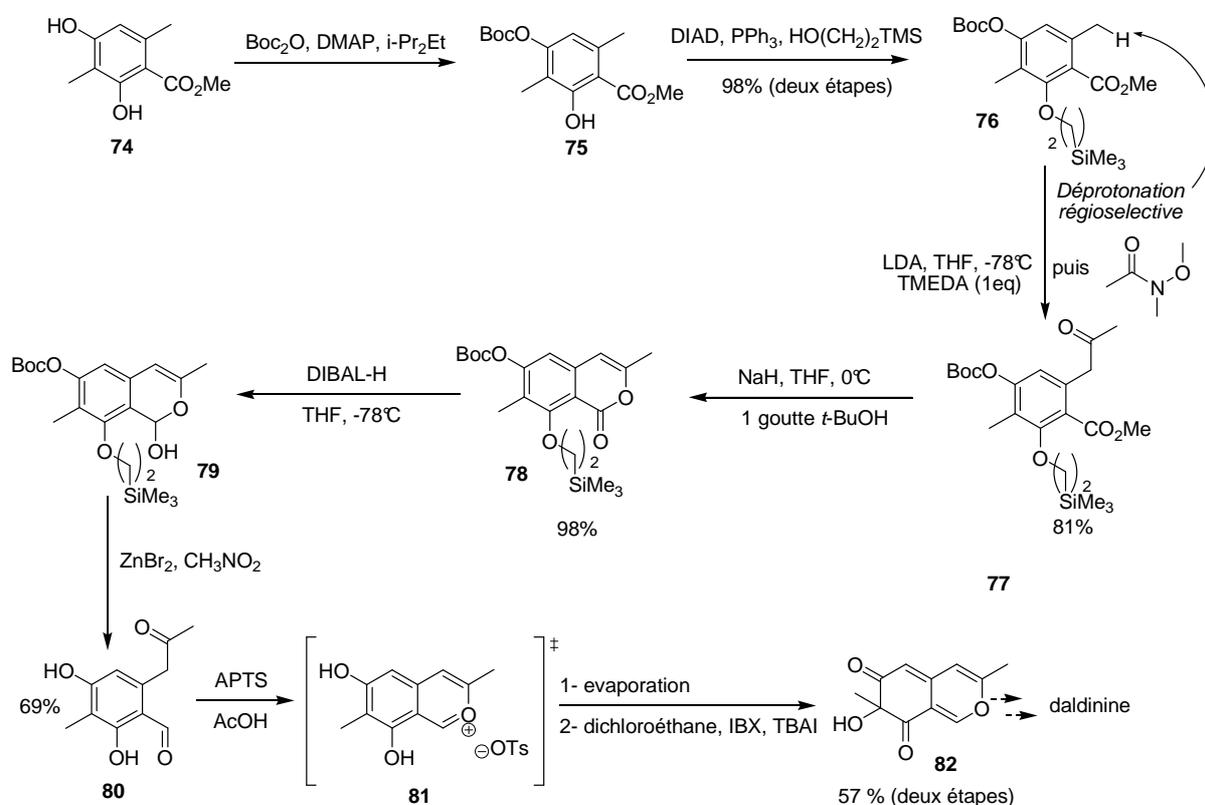


Schéma 13 : Synthèse d'azaphilones de Pettus

Dans cette variante, il faut souligner que l'intermédiaire est isolé par évaporation à sec du milieu réactionnel puis redissout dans le dichloroéthane pour l'étape d'oxydation. Ceci laisse penser que l'intermédiaire de type oxonium est relativement stable et pourrait être isolé intermédiairement. Enfin, bien qu'efficace, cette synthèse souffre d'une faible accessibilité du produit de départ **74** dont la synthèse est relativement longue.

⁷⁸

Marsini, M., A.; Gowin, K., M. ; Pettus, T., R., R., R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3481-3483.

Aux vues de ces différentes synthèses, il apparaît clairement qu'une désaromatisation d'un cycle aromatique présentant une cétone benzylique en position ortho d'un aldéhyde aromatique et très favorisée en milieu acide et que l'intermédiaire ion pyrilium aromatique peut être piégé par introduction d'un oxydant. Cependant la différence structurale majeure entre les azaphilones présentés ci-avant et l'épicoconone pourrait remettre en cause toutes ces hypothèses. En effet, l'ion oxonium formé **85** serait « seulement » benzylique dans le cadre de la synthèse de l'épicoconone (*Schéma 14*). Ceci pourrait ainsi conduire à une absence de désaromatisation des diphenols. Des études de désaromatisation en condition acide déshydratante seront donc nécessaires afin de vérifier la voie synthétique.

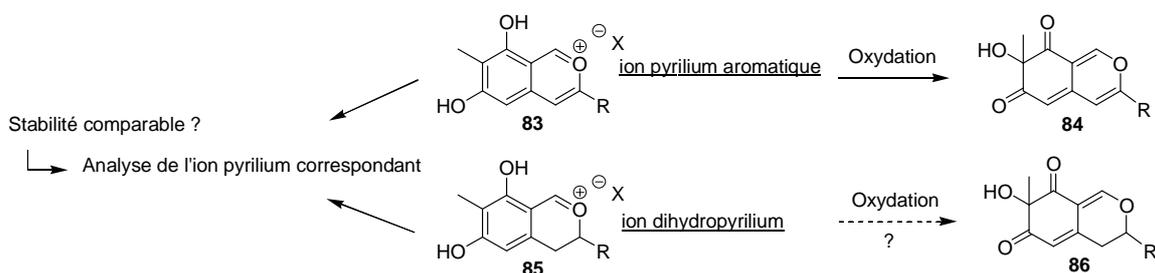


Schéma 14 : Confrontation des intermédiaires possible. Stabilité relative.

3. VERS LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE L'EPICOCCONONE.

Toute synthèse de molécule naturelle est, en partie, rendue pertinente par l'abondance, le prix et la symétrie du substrat de départ envisagé. Le substrat de départ sélectionné remplit toutes ces conditions car il est facilement disponible, peu cher et de symétrie C_2 (2,6-diméthoxytoluène **83**)

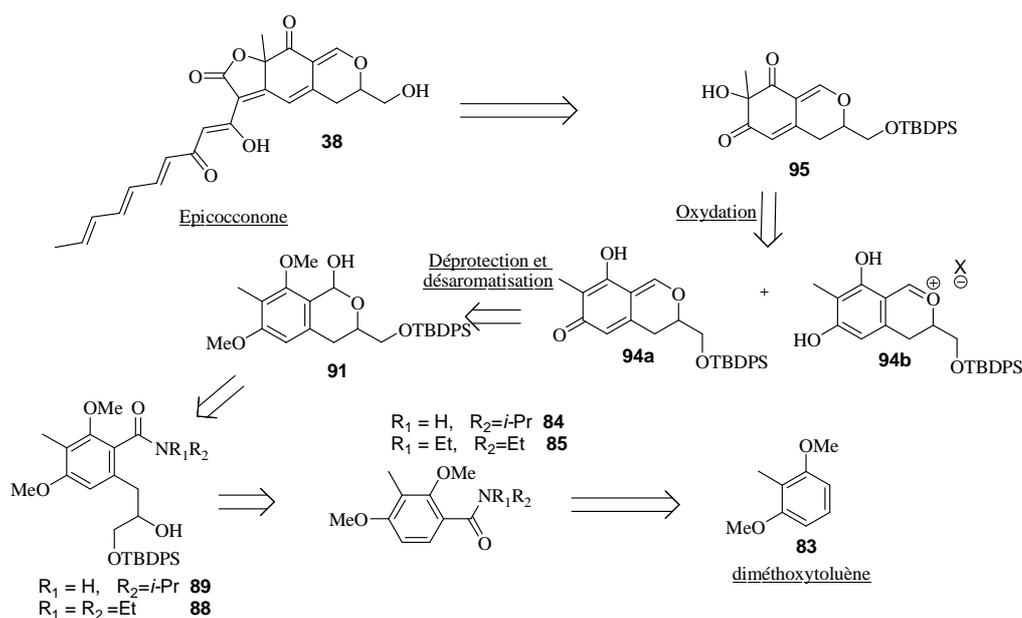


Schéma 15 : Rétrosynthèse envisagée à partir du diméthoxytoluène.

L'épicoconone pourrait ainsi être obtenue par addition de la β -hydroxydicétone **95** sur un β -cétoester pré-fonctionnalisé suivi d'une cyclisation de type Knöevenagel. La dicétone serait préparée à partir du lactol **91** par déprotection suivi de désaromatisation oxydante. Le lactol **91** pourrait être synthétisé en deux étapes à partir des amidoalcools **88** ou **89** via cyclisation en lactone et réduction. Deux amidoalcools ont été envisagés (primaire et secondaire) issus des amides **84** et **85** correspondants après orthoméallation et piégeage par un époxyde (approche n'ayant jamais été envisagée dans la synthèse d'azaphilones). Enfin, ces amides **84** et **85** seraient obtenus à partir du diméthoxytoluène via réaction de Friedel et Crafts.

3. 1. Vers la synthèse de l'alcool tertiaire **95**.

3. 1. 1 Obtention du lactol **91**.

3. 1. 1. 1. Synthèse des amides **84** et **85**.

- Synthèse de l'amide **84** :

L'amide secondaire **84** (*Schéma 16*) s'obtient à partir du diméthoxytoluène et de l'isocyanate d'isopropyle (*i*-PrNCO) par amidation en présence de chlorure d'aluminium (AlCl_3) dans le dichlorométhane⁷⁹ (CH_2Cl_2). Il est à noter que seul cet acide de Lewis permet ce genre d'activation de l'isocyanate. En effet, les autres acides de Lewis testés pour cette réaction (TiCl_4 , SnCl_4 , $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$) n'ont pas conduit au produit désiré. Finalement, l'amide **84** est obtenu avec un rendement de 95% après purification.

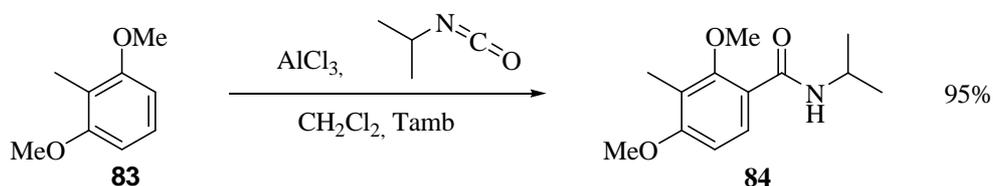


Schéma 16 : Acylation du diméthoxytoluène.

(79) Dobler, M., R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 963-964.

- Synthèse de l'amide **85** :

L'amide tertiaire **85** (*Schéma 17*) s'obtient, via une acylation de Friedel et Crafts, à partir du diméthoxytoluène et du chlorure de diéthyle carbamoylé en présence de tétrachlorure d'étain (SnCl_4) à reflux du CH_2Cl_2 . L'amide **85** est obtenu avec un rendement de 99% après purification.

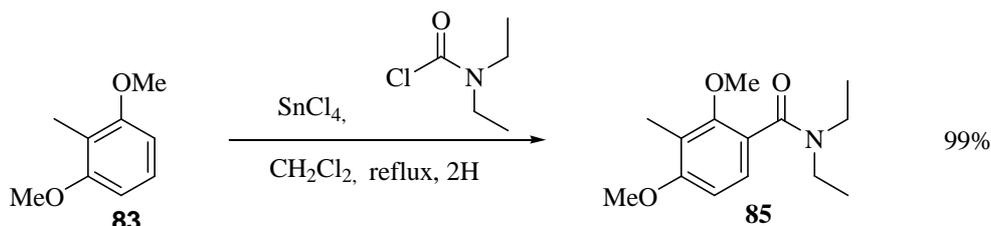


Schéma 17 : Acylation du diméthoxytoluène.

3. 1. 1. 2. Alkylation du cycle aromatique par orthoméallation.

L'alkylation du cycle aromatique se fait par addition d'un époxyde après avoir effectué une métallation orthodirigée par la fonction amide (*Schéma 18*). De plus, l'utilisation d'un époxyde dérivé du glycidol permettrait d'avoir accès à une synthèse énantio pure de l'épicoconone car ses deux énantiomères sont disponibles commercialement. Enfin, afin de réaliser l'alkylation désirée, le glycidol doit être protégé de telle façon qu'il supporte les conditions réactionnelles. Dans un premier temps, la synthèse racémique de l'épicoconone étant envisagée, c'est le glycidol racémique qui sera utilisé.

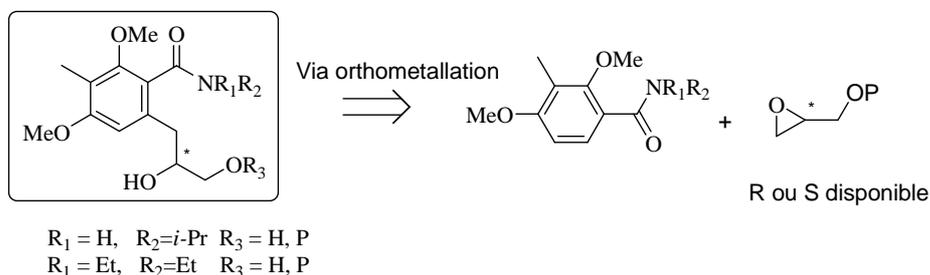


Schéma 18 : Voie de synthèse envisagée de l'amidoalcool.

L'alkylation se fait en deux étapes. La première correspond à la métallation du cycle aromatique orthodirigée par un amide secondaire ou tertiaire. La deuxième est l'addition sur l'époxyde. Un contrôle rigoureux de la température est nécessaire afin de bien contrôler la formation des différentes espèces.

Amide tertiaire : Cette *o*-métallation a déjà été largement décrite par le groupe du **Pr. Snieckus**⁸⁰ avec des électrophiles peu encombrés (mais non avec des époxydes). Ce groupe a alors obtenu les produits désirés avec de très bons rendements.

Amide secondaire : L'alkylation d'un cycle aromatique par un époxyde via métallation orthodirigée **par une amine secondaire** est une réaction ayant déjà été réalisée par le groupe du **Pr. Lepoittevin**⁸¹ en 1994 et du **Pr. Nicolaou**⁸² en 2001. En présence de TMEDA et avec un contrôle thermique semblable à celui de l'amide secondaire, ces groupes obtiennent le produit désiré avec un rendement de 70%

Le choix d'un groupement protecteur de l'alcool primaire présent sur le glycidol compatible avec l'alkylation du cycle aromatique est un facteur important en vue de la synthèse totale de la molécule naturelle. En effet, cette protection doit être stable à l'ensemble des conditions opératoires de la totalité de la synthèse et doit être facilement déprotégeable en fin de synthèse. L'utilisation des dérivés silylés semble être une bonne approche car ils sont labiles dans des conditions réactionnelles douces (milieux fluorés) et stables aussi bien en milieux acides faibles qu'en milieux basiques ou organométalliques. L'alcool libre du glycidol est tout d'abord protégé sous forme d'éther de *tert*-butyldiphénylsilyle. Cette protection se fait en utilisant le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilane (TBDPSCI) en présence d'imidazole et de diméthylaminopyridine (DMAP) dans le diméthylformamide (DMF). Le glycidol racémique protégé **86** est obtenu avec un rendement de 89% après purification (*Schéma 19*).

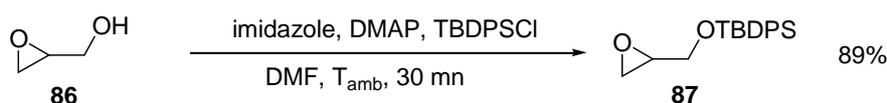


Schéma 19 : Protection du glycidol par TBDPSCI

(80) Snieckus, V. ; Beak, P. *Acc. Chem. Res.*, **1982**, *15*, 306-312.

(81) Choukchou-Braham, N.; Asakawa, Y.; Lepoittevin, J. P.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3949-3952.

(82) Tae, J.; Gray, D ; Nicolaou, K. C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3675-3678.

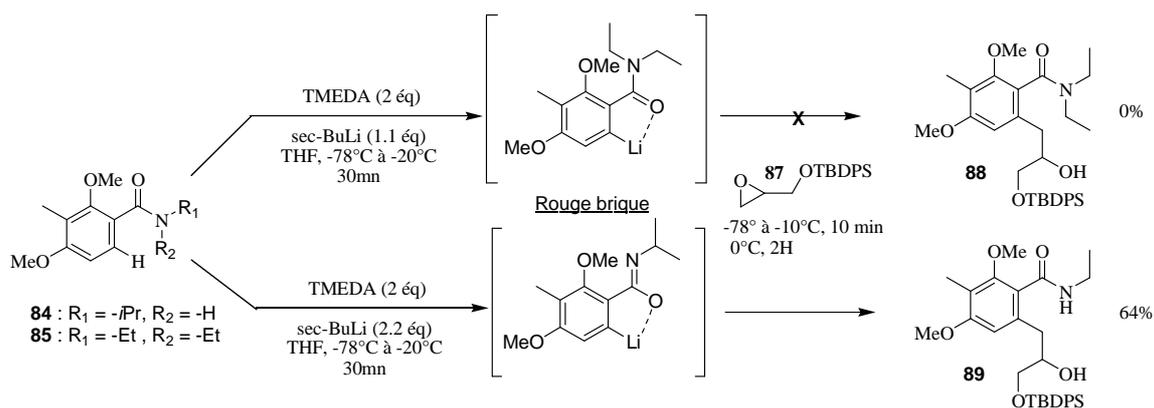


Schéma 20 : Alkylation du cycle aromatique par métallation orthodirigée.

La réaction d'*o*-métallation est réalisée dans les mêmes conditions de contrôle de température que dans la littérature pour l'un et l'autre des amides **84** et **85** (deux équivalents de base nécessaire pour l'amide secondaire). Dans les deux cas, une coloration rouge brique caractéristique de l'anion est alors observée (**Schéma 20**). Malgré la formation de l'espèce lithiée aucune trace de produit désiré n'est mise en évidence avec l'amide tertiaire malgré de nombreuses tentatives. L'encombrement stérique généré par l'amide tertiaire en étant certainement la cause (*A posteriori* de notre étude, des résultats allant de le sens des observations effectuées en série amide tertiaire ont été reportée par le Pr. Clayden⁸³ : une activation par du BF₃.OEt₂ est nécessaire afin d'ouvrir l'époxyde par cet intermédiaire orthométallé). La solution semble donc être l'utilisation d'un amide secondaire car moins encombré. Après une rapide optimisation, 64 % de produit désiré **89** est finalement obtenu. Ce résultat est très intéressant car le rendement obtenu est comparable à ceux décrit pour des époxydes plus simple⁸². Une forte dépendance à la qualité du *sec*-butyllithium (*s*-BuLi) est observée. En effet, celui-ci est très sensible et doit être conservé à -20°C. Ceci se traduit généralement par un précipité de lithine (LiOH) présent avant même ouverture d'une bouteille neuve gênant la formation de l'espèce orthométallée lors de la réaction. A noter que la régiosélectivité est totale, comme attendu car aucun autre régioisomère n'a été détecté.

3. 1. 1. 3. Synthèse de la lactone 90.

La lactonisation d'amidoalcools est une réaction réalisable en condition acide. Un premier essai a été effectué en utilisant l'Acide *p*-toluènesulfonique (APTS) mais n'a pas donné les résultats escomptés (faibles rendements). La présence d'eau au sein même de la structure cristalline de l'APTS (pentahydrate) semble être la cause de cette mauvaise réactivité.

⁸³ Clayden, J. ; Stimson, C., C. ; Hellinwell, M.; Keenan, M. *Synlett* **2006**, 6, 873-876.

L'utilisation de l'acide camphorsulfonique (CSA) est alors envisagée car il est non hydraté sous forme cristalline commerciale. La synthèse de la lactone **90** a donc été effectuée à partir de l'amidoalcool **89** en présence de CSA au reflux du toluène. La lactone **90** est obtenue avec un rendement de 96% après purification (*Schéma 21*).

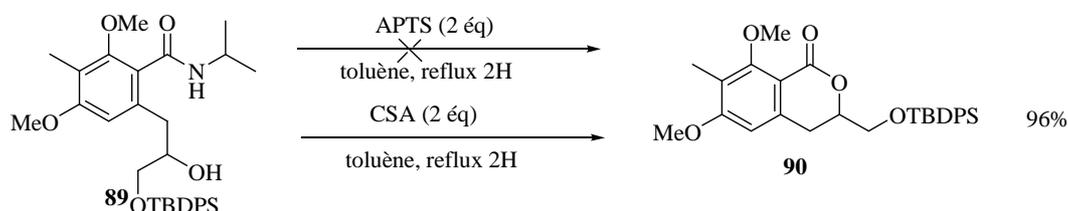
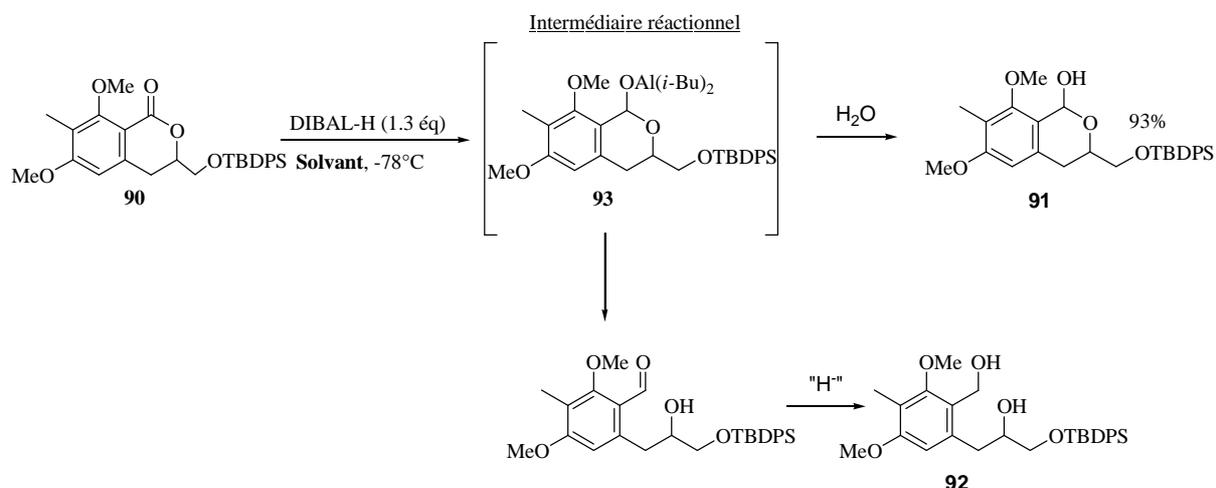


Schéma 21 : Lactonisation en milieu acide de l'amido alcool 5

3. 1. 1. 4. Réduction de la lactone **90** en lactol **91**.

La réduction de la lactone **90** en lactol **92** nécessite des conditions très précises. En effet, un certain nombre d'essais ont été réalisés afin de réduire convenablement le substrat de départ (*Tableau 1*).



Solvant	91	92
CH ₂ Cl ₂	0 %	50 %
THF	35 %	30%
Toluène	93%	0%

Tableau 1 : Rendement en lactol 91 en fonction du solvant de réaction.

C'est principalement dans le choix du solvant qu'une optimisation a été effectuée. En effet, lorsque le solvant utilisé est le CH₂Cl₂, le produit subit une sur-réduction non contrôlable en diol **92** (50%) via ouverture de l'acétal intermédiaire en aldéhyde. Dans le THF, cette sur-réduction est moins observée (30%).

Finalemment c'est dans le toluène que la réduction de la lactone **90** par l'hydrure de diisobutylaluminium à -78°C a conduit au lactol avec de très bons rendements sans obtention du diol (*Schéma 22*). Le lactol **91** est obtenu à hauteur de 93% après purification.

3. 1. 1. 5. Condition de déprotection désaromatisante.

3. 1. 1. 5. 1. Alcool primaire protégé par TBDPS.

- Déprotection en milieu acide :

La formation d'un ion pyrrillium ou bien encore d'une forme quinonique correspond à la deuxième étape clef de la synthèse (après l'ouverture d'époxyde par orthoméallation). Elle suppose la déprotection des deux éthers méthyliques et, éventuellement, la désaromatisation « one pot » du noyau aromatique par perte d'eau en milieu acide (*Schéma 22*).

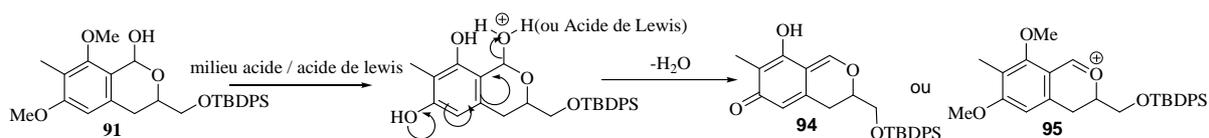


Schéma 22 : mécanisme supposé de la déprotection-désaromatisation escomptée

Le mécanisme de déprotection des éthers méthyliques suppose la présence d'un acide de Lewis complexant les doublets libres de l'oxygène ainsi que la présence d'un contre-ion suffisamment nucléophile pour attaquer le méthyle afin de libérer le phénol (*Schéma 23*). De plus, il est intéressant de noter que la présence d'un groupement attracteur (carbonyle) sur la position ortho (En R_1 sur le composé **91**) du cycle aromatique conduit généralement à une déprotection plus rapide.

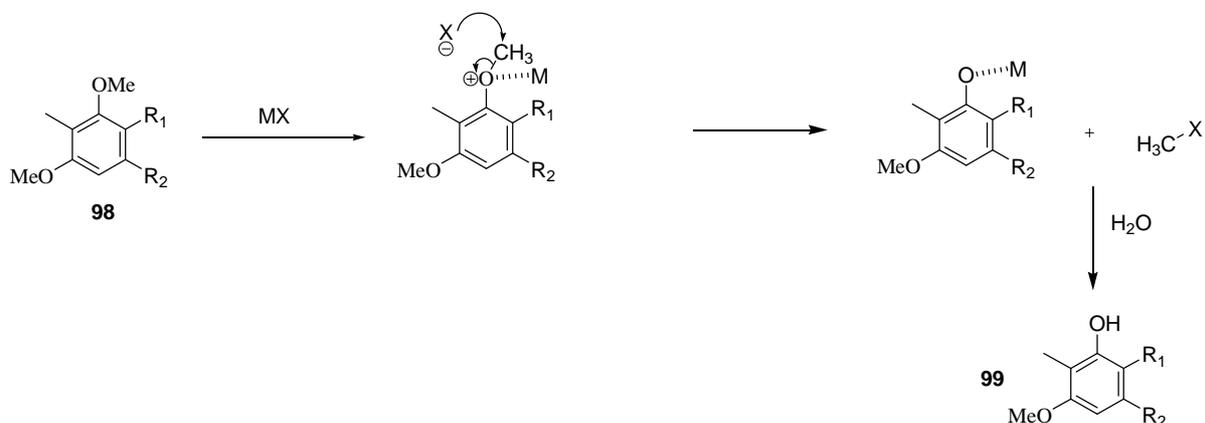


Schéma 23 : Mécanisme de déprotection des éthers méthyliques aromatiques

La principale difficulté sur le lactol est la déprotection du deuxième éther méthylique car les différents exemples reportés dans la bibliographie dans le cas de deux éthers méthyliques sont réalisés à température élevée ou bien en utilisant des acides de Lewis très fort. Le lactol **91** étant fonctionnalisé, avec notamment la présence d'un alcool protégé sous forme d'éther silylé, un compromis entre température de déprotection et force de l'acide devra donc être trouvé.

Un grand nombre d'essais a été effectué (**Tableau 2**). La majeure partie des conditions opératoires de la littérature^{72,75,84,85,86} ont été testées mais n'ont pas conduit au produit désiré. Au mieux, un seul des deux phénols est déprotégé dans les conditions acides. Le tableau ci-après représente l'ensemble des essais effectués afin de déprotéger les deux éthers méthyliques.

Entrée	Réactif	Température	Temps	Ref	Produit
1	BBr ₃ (2 éq)	-78°C à Tamb	1 nuit	72	Dégradation
2	BBr ₃ (3 éq)	-78°C à Tamb	1 nuit	72	Dégradation
3	BBr ₃ (5 éq)	-78°C	7H	72	Transméthylation (70%) 96
4	BCl ₃ (2.5 éq)	-10°C	30mn		Transméthylation (50%) 96
5	BCl ₃ (6éq)/CH ₂ Cl ₂	reflux	30mn		Transméthylation (10%) 96
6	BCl ₃ / n-Bu ₄ NI	-78°C à Tamb	2H		Dégradation
7	AlCl ₃ (8 éq)	Tamb	1H	75/83	Dégradation
8	AlCl ₃	0°C	1H	75/83	Dégradation
9	HCl (6 éq)/MeOH	0°C	30 min		Transacétalisation (90%) 97
10	HCl (6 éq)/MeOH	reflux	1H		Dégradation
11	Pyridine/HCl/DMF	Tamb à reflux	1H	82	Dégradation
12	HBr/AcOH	Tamb	10mn	81	Dégradation

Tableau 2 : Résultats des essais de déprotection des phénols en conditions acides.

La plupart des essais de déprotection réalisés en présence de BBr₃ (**Entrée 1 et 2**) conduisent ainsi à une dégradation avec notamment l'apparition d'une trainée caractéristique sur chromatographie sur couche mince (CCM). Ce n'est que lorsque que la température de réaction est maintenue à -78°C (**Entrée 3**) qu'une surprenante transméthylation a été observée en présence de cet acide de Lewis (**Figure 19**). Le méthyl présent sur le phénol est alors transféré sur le lactol présent en ortho diminuant ainsi les tensions stériques présent sur le substrat de départ (transfert du méthyl sur un lactol porté par un carbone sp₃)

(84) Huang, W-H. ;Chien, P-Y. ;Yang, C-H. ; Lee, A-R. *Chem. Pharm. Bull.*, **2003**, *5*, 339-340.

(85) Malamas, M.S. ; Manas, E.S. ; McDevitt, R.E. ; Gunawan, I. ; Xu, Z.B. ; Collini, M.D. ; Miller, C.P. ; Dinh, T. ; Henderson, R.A. ; Keith, .C. ; Harris, H.A. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5021-5040.

(86) Demyttenaere, J. ; Vervisch, S. ; Debenedetti, S. ; Coussio, J. ; Maes, D. ; De Kimpe, N. *Synthesis*, **2004**, *11*, 1844-1848.

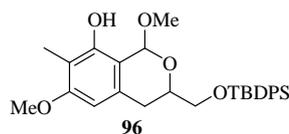


Figure 19 : Produit de monodéprotection 96.

L'utilisation de BCl_3 a également conduit au produit de transméthylation **96**. Ce lactol monodéprotégé **96** est alors isolé avec un rendement de 50% lorsque la réaction est effectuée à -10°C pendant 30 minutes (**entrée 4**) et seulement 10% dans des conditions plus dure (dû à la forte dégradation du substrat de départ au reflux du CH_2Cl_2 , **entrée 5**). En présence d'iodure, 6 heures de réaction à température ambiante (T_{amb}) suffisent alors à dégrader complètement le substrat de départ.

Un changement de la nature de l'acide de Lewis et notamment l'utilisation d' AlCl_3 n'a pas conduit à de meilleurs résultats (**entrée 7 et 8**). En effet, cet acide de Lewis est moins fort que son analogue boré est nécessite donc une température de réaction supérieure. Ainsi, sa mise en réaction à T_{amb} pendant 1 heure avec le produit de départ induit une forte dégradation du milieu réactionnel.

L'utilisation d'acide Brønsted (Acide chlorhydrique - HCl), n'a pas conduit à des résultats plus probants (**Entrée 9 et 10**). En effet, seule la mise en réaction du substrat de départ à 0°C pendant 30 minutes a permis d'isoler un produit d'acétalisation **97** (*Figure 20*) en présence de méthanol. Lorsque le milieu réactionnel est placé à reflux du méthanol, une dégradation similaire du substrat de départ est également observée.

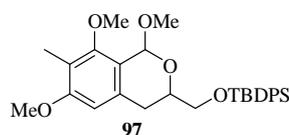


Figure 20 : Produits de transacétalisation 97.

Enfin, la mise en œuvre d'autres conditions acides de Brønsted n'a pas conduit à un produit majoritaire, une forte dégradation étant alors observée. En effet, aussi bien l'utilisation d'un acide de Brønsted faible (Sel de pyridinium à chaud, **entrée 11**) qu'un acide de Brønsted très fort à basse température (Acide bromhydrique, **entrée 12**) n'ont pas permis d'isoler le produit de double déprotection.

Bien qu'il n'ait pas été jusqu'alors possible de déterminer quelle était la nature des dégradations observées, il semble probable que la présence de l'alcool primaire protégé sous forme d'éther silylé soit à l'origine de cette sensibilité en milieu acide. En effet, il a été montré par le Pr. Sunggak Kim⁸⁷ que les composés possédant des alcools protégés par des groupements silylés sont sensibles aux acides de Lewis (et principalement à BBr₃) et conduisent aux produits de déoxysilylation.

Un compromis entre force de l'acide, température de réaction, et stabilité du substrat ne pouvant être trouvé, la déprotection des éthers méthyliques en milieu acide est donc abandonnée. Un essai de déprotection en milieu basique est néanmoins réalisé.

- Déprotection en milieu basique :

Un essai de déprotection est réalisé en milieu basique à chaud et en présence de thiols en suivant les protocoles expérimentaux de la bibliographie⁸⁸. Bien que le chauffage soit considéré comme une caractéristique des conditions dures, l'absence d'acides de Lewis pourrait permettre d'éviter les réactions secondaires observées précédemment. Le lactol **91** est donc mis en présence de d'éthanethiol (EtSH) et de NaH à reflux dans le DMF (*Schéma 24*). Aucun produit majoritaire n'est mis en évidence et une trainée caractéristique de produit de dégradation est observée sur CCM.

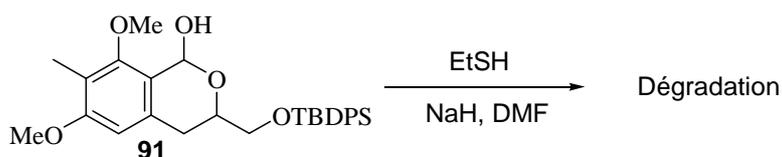


Schéma 24 : Dégradation du substrat de départ en milieu basique.

Malgré l'absence d'acide de Lewis pour complexer l'oxygène, le substrat de départ ne résiste donc pas aux conditions de déprotection basiques nécessitant une forte activation thermique.

(87) Park, J.H.; Kim, S. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 3111-3113.

(88) Nayak, M.K.; Sharma, L.; Chakraborti, A.K. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 6406-6414.

Ceci conclut donc les essais de déprotection désaromatisante sur le produit protégé par des éthers méthyliques car, aussi bien en milieu acide qu'en milieu basique, le lactol **91** est dégradé et ne conduit pas au produit didéprotégé. Le compromis entre condition douce de réaction et température nécessaire de déprotection ne peut donc, à l'évidence, pas être trouvé pour une molécule fonctionnalisée telle que la nôtre (présence d'un alcool primaire silylé).

Un changement du groupement protecteur de l'alcool primaire est alors entrepris puisque celui-ci semble être à la base des dégradations observées.

3. 1. 1. 5. 2. Alcool primaire protégé par un pivaloate.

Une protection sous forme de pivaloate semble être le meilleur compromis pour supporter les conditions fortement acides de déméthylation. L'échange de groupement protecteur est alors réalisé en 3 étapes à partir du lactol **92**.

- Synthèse de l'acétal mixte pivaloylé **102** :

La première étape consiste à acétaliser le lactol **91** par du méthanol (MeOH). Bien que cette réaction représente une étape superflue, elle reste néanmoins nécessaire afin d'avoir, en aval, une déprotection correcte de l'alcool primaire. En effet, une déprotection de cet alcool primaire sans protection sous forme d'acétal conduit irrémédiablement à de nombreux produits secondaires. L'acétal **97** est donc obtenu par traitement du lactol **91** au méthanol en présence de CSA (*schéma25*).

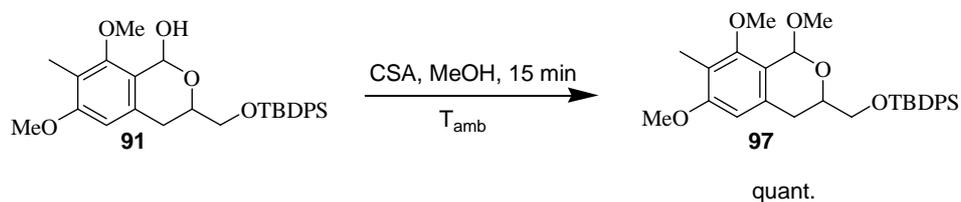


Schéma 25 : transacétalisation du lactol 7.

La seconde étape correspond à la déprotection de l'alcool primaire présent sur l'acétal **97** par le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) dans le CH₂Cl₂. Le produit est alors isolé avec un rendement quantitatif (*Schéma 26*).

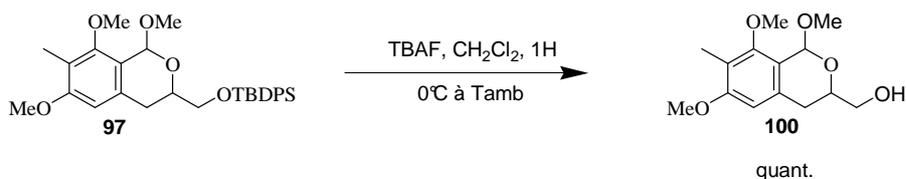


Schéma 26 : déprotection de l'alcool primaire 100.

Finally, the re-protection of the primary alcohol is achieved by pivaloyl chloride in the presence of diisopropylethylamine and DMAP in CH_2Cl_2 . These conditions lead to the pivaloyl alcohol **101** with a yield of 78% over two steps (*schéma 27*).

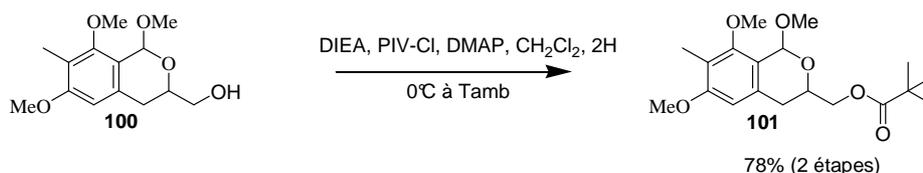


Schéma 27 : Protection de l'alcool primaire 100.

The lactol **101** can then be put in conditions of oxidative desaromatization. Pivaloyl esters being less labile protective groups than silyl ethers, they can be placed in stronger and harsher acidic conditions. A significant reduction of degradations obtained previously should therefore be observed.

- Déprotection désaromatisante :

In classical reaction conditions, no trace of the quinone derivative **102** or of a pyrilium ion **103** was isolated. In fact, when the product **101** is put in the presence of aluminum chloride (AlCl_3) at reflux in CH_2Cl_2 (*Schéma 28*), only a trace of the deprotected product **105** (2%) is isolated accompanied by a majority of the monodeprotected product **104** (90%).

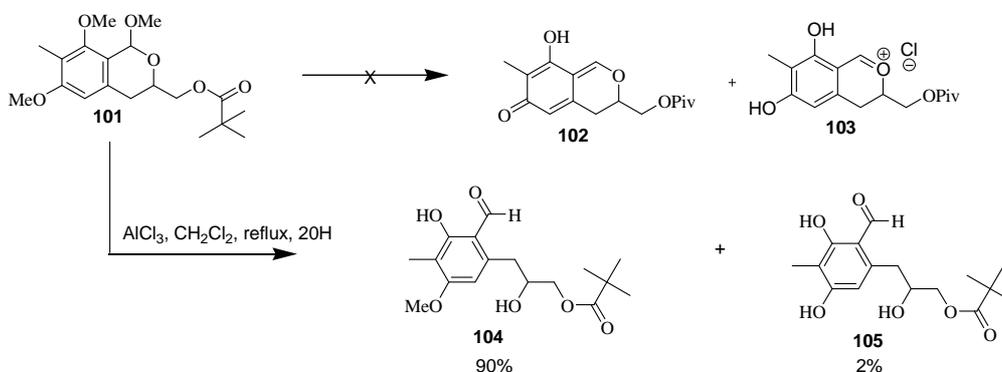


Schéma 28 : déprotection du lactol 101.

Il est intéressant de remarquer que les produits **104** et **105** sont isolés sous forme aldéhydique et non sous forme lactol. Ceci tend à confirmer l'hypothèse déjà envisagée : le produit sous forme quinonique ou sous forme d'ion pyrilium n'est pas stable à l'hydrolyse et ne peut donc être purifié.

Un nouvel essai a alors été entrepris. Le but de cet essai étant de chauffer plus fort que précédemment afin de favoriser la double déprotection des éthers méthyliques. Pour cela une déprotection des phénols a été mise en œuvre dans des conditions acides similaires (*Schéma 29*) en faisant varier le solvant (chloroforme, ébullition 60°C). Là encore, la forme quinonique n'a pu être mise en évidence. Cependant, le composé désaromatisé **106**, présentant un motif dichlorométhylène supplémentaire, a été obtenu. Celui-ci provient d'une réaction haloforme entre le diphénol **105** cyclisé en quinone **102** et le chloroforme (CHCl₃) catalysé par AlCl₃. Deux diastéréoisomères sont alors obtenus avec un rapport 50/50.

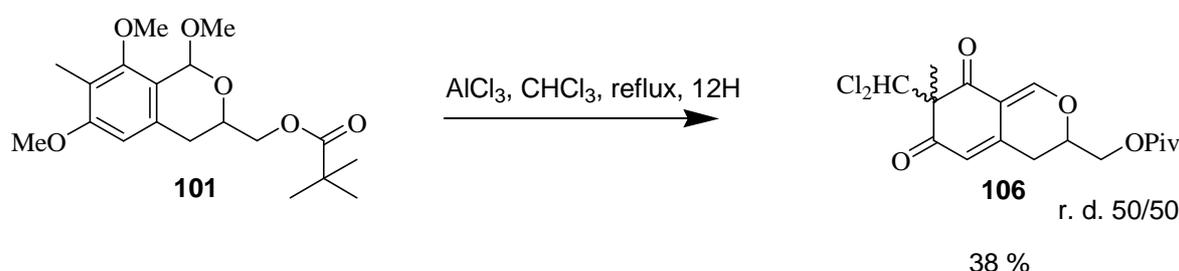


Schéma 29 : déprotection et désaromatisation du lactol 5

Il semble donc que l'énergie nécessaire à la double déprotection ait bien été fournie par le passage d'une température de réaction de 40°C à 60°C. Ce résultat est extrêmement intéressant car il d'envisager un possible piégeage de l'intermédiaire via un oxydant adéquat.

Cette étude sur l'acétal **101** nous apporte donc deux informations cruciales :

- 1- Il est possible d'obtenir une double déprotection conduisant à la forme intermédiaire quinonique ou ion pyrilium. Cependant ces intermédiaires réactionnels sont non-isolables.
- 2- Le piégeage de l'intermédiaire par un électrophile, même faible, est réalisable ce qui ouvre la porte à une oxydation «one-pot» de déprotection/désaromatisation/oxydation (*Schéma 30*).

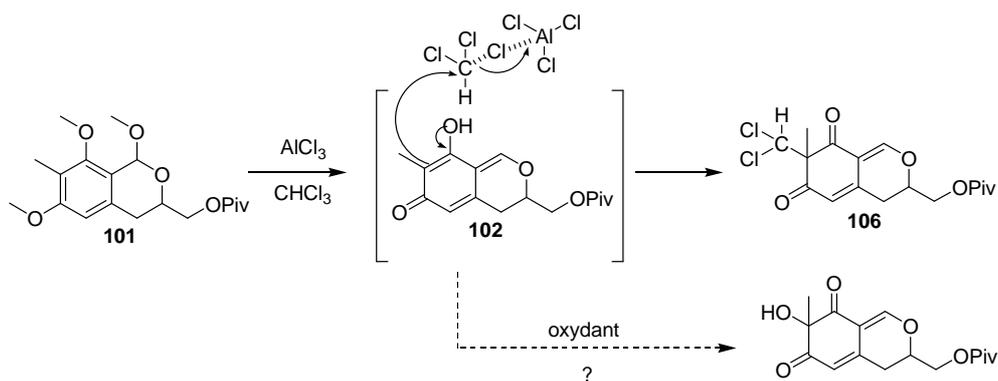


Schéma 30 : Désaromatization par réaction de type haloforme sur le chloroforme.

Un dernier essai au reflux du toluène a été réalisé. Cette expérience n'a conduit à aucun produit majoritaire. Un mélange complexe de produit polytoluylés est alors obtenu. Afin de contourner la difficulté, la déprotection des éthers méthyliques a été entreprise à l'étape de la lactone. En effet, la déméthylation de phénols est plus facile dans le cas de la présence de groupement carbonyle en ortho⁷⁴ et la fonction lactone serait la forme « protégée » de la fonction acétal.

- Déprotection sur la lactone – passage à une molécule modèle.

Après déprotection de l'alcool primaire silylé **90** et reprotction de celui-ci en ester de pivaloyle **107**, cette nouvelle lactone est donc engagée dans une déméthylation par AlCl_3 dans le CH_2Cl_2 (**Schéma 31**). Le produit désiré (**108**) est obtenu au bout de 12H de reflux du CH_2Cl_2 en présence de 10 équivalents de AlCl_3 et a pu être isolé avec un rendement de 80 % sur 3 étapes.

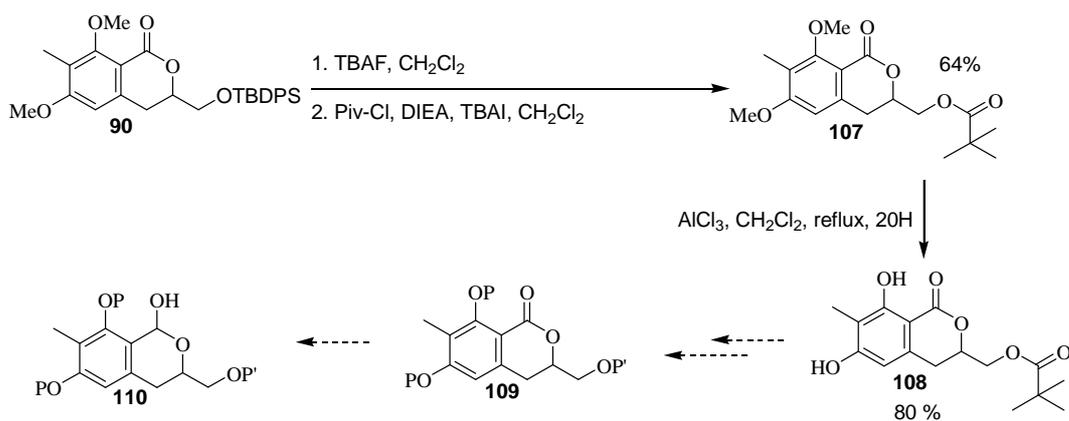


Schéma 31 : déprotection des éthers méthyliques sur la lactone 110.

Une méthode de déprotection des deux éthers méthyliques compatible avec la présence d'un alcool primaire (protégé sous forme de pivaloate) est donc réalisable en présence d'une fonction carbonyle en ortho et ouvre donc la voie à la synthèse du produit naturel. L'étape de réduction de la lactone n'étant pas compatible avec la présence d'un pivaloate, et afin de tester le plus rapidement possible la réaction monotope envisagée (*Schéma 32*), la poursuite des essais sera faite sur une molécule modèle ne présentant pas d'alcool primaire. Cette série « desoxy » nous permettra ainsi de nous affranchir des problèmes liés à sa déprotection et reprotection, raccourcissant d'autant la synthèse, sans remettre en cause les étapes clés.

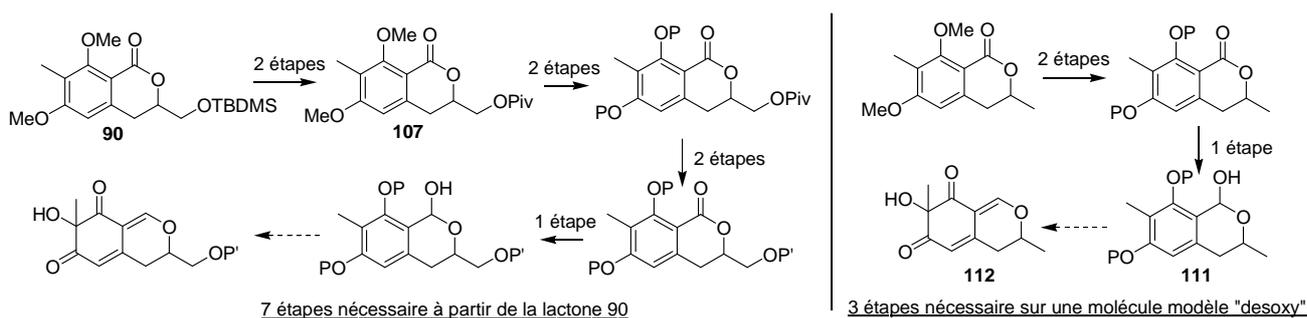


Schéma 32 : Déprotection désaromatisante puis oxydation sur un analogue deshydroxylé.

3. 2. A partir du lactol modèle en série desoxygénée.

3. 2. 1. Obtention du lactol modèle.

En série desoxygénée, un lactol **118** possédant des phénols protégés sous forme d'éthers méthoxyméthyliques (MOM) est alors ciblé. En effet, ce groupement protecteur est stable en présence d'hydrures (permettrait la synthèse du lactol à partir de la lactone) et sa labilité en condition acide rendrait sa désaromatisation oxydante possible en « one pot ». Ce lactol serait obtenu de manière analogue au lactol **91** (*Schéma 33*).

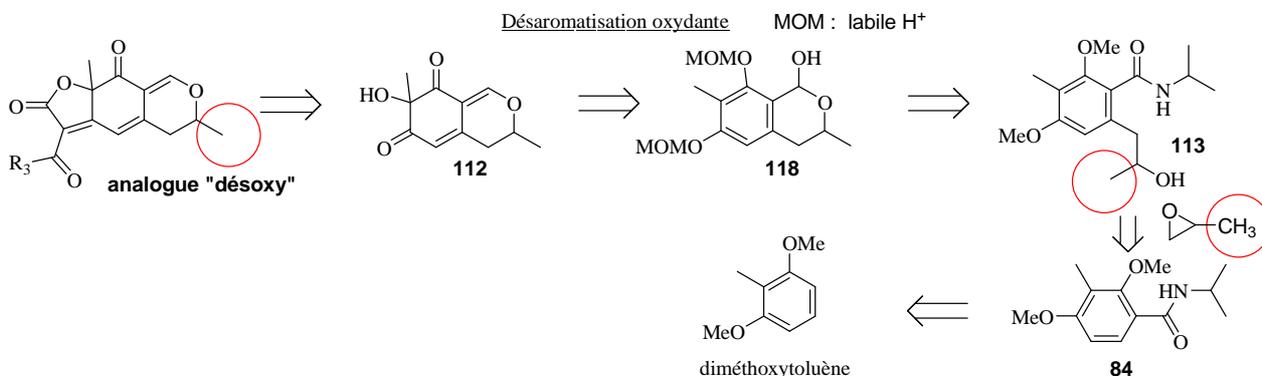


Schéma 33 : schéma rétrosynthétique d'obtention d'analogue « desoxy » de l'épicocconone.

Ainsi, l'analogue desoxy désiré pourra être obtenu après l'introduction du cycle furanonique à partir de l'alcool **112** issu de la désaromatisation oxydante du lactol **118**. Ce dernier sera préparé comme précédemment en employant l'oxyde de propylène au lieu du glycidol.

- Synthèse de l'amidoalcool **113** :

Après orthoméallation de l'amide **84** et ouverture de l'époxyde correspondant, l'amidoalcool **113** a été isolé à hauteur de 82 % après purification. (*Schéma 34*).

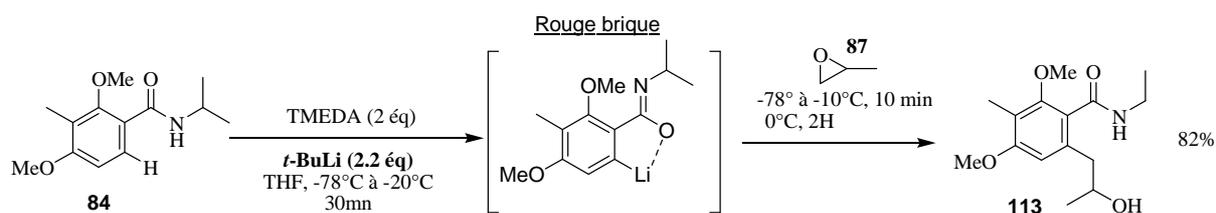


Schéma 34 : Alkylation du cycle aromatique par ouverture de l'oxyde de propylène

A noter que la régiosélectivité est totale, comme attendu, en utilisant l'amide ortho-directeur car aucun autre régioisomère n'a été détecté. L'étape d'orthoméallation dirigée conduit ainsi au produit de couplage **113** désiré avec un meilleur rendement que lorsque l'époxyde utilisé est un glycidol protégé. Finalement, une plus grande reproductibilité a été observée par utilisation de *t*-BuLi, beaucoup plus stable que le *sec*-BuLi (meilleure conservation conduisant à un très faible taux de LiOH).

- Synthèse de la lactone **20** :

La lactone **114** à été obtenue à partir de l'amidoalcool **113** après lactonisation en condition acide (*Schéma 35*). Le produit est isolé avec un rendement de 96%.

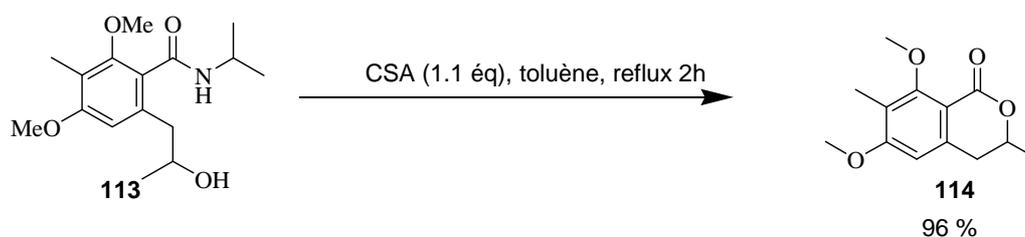


Schéma 35 : Lactonisation en condition acide de l'amidoalcool 113.

Une quantité catalytique d'acide ne permettant pas d'obtenir le composé désiré (libération d'une amine primaire rendant la réaction équilibrée), 1.1 équivalent de CSA correspond à la quantité optimale pour lactoniser.

- Synthèse de la lactone diphenolique **115**:

Comme pour la lactone **110**, les phénols protégés sous forme d'éthers méthyliques ont pu être déprotégés par l'utilisation de 10 équivalents d' AlCl_3 à reflux du dichlorométhane (*Schéma 36*). Le produit diphenolique **115** est alors isolé avec un rendement quantitatif.

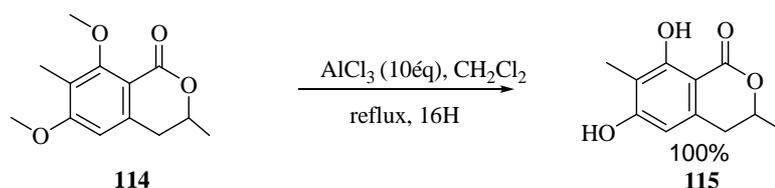


Schéma 36 : déprotection des éthers méthyliques.

- Protection des phénols :

La nécessité de trouver un groupement aussi bien stable en conditions réductrices (pour réduire la lactone en lactol) que labile en milieu acide (afin de réaliser la réaction de désaromatisation oxydante), la protection des phénols sous forme d'éther de méthoxyméthyle (MOM) a été envisagée. Une observation intéressante a alors été constatée (*Schéma 37*). En effet, en réalisant la protection des phénols dans des conditions classiques d'alkylation, c'est-à-dire en présence d'un excès de base aminée tertiaire et de chlorure de méthoxyméthyle, seul le produit de monoprotection sur la position « sud » **116** a été observé et ce malgré un chauffage du milieu réactionnel (pour des raisons de commodité, nous appellerons phénol « sud » le phénol situé en para de la fonction lactone et phénol « nord » celui en ortho). Un effet inductif trop important de la lactone en ortho du phénol « nord » permet d'expliquer la trop faible réactivité du phénolate résultant de la déprotonation. Ainsi, une chimiosélectivité totale d'un phénol vis-à-vis de l'autre a ainsi pu être mise en évidence.

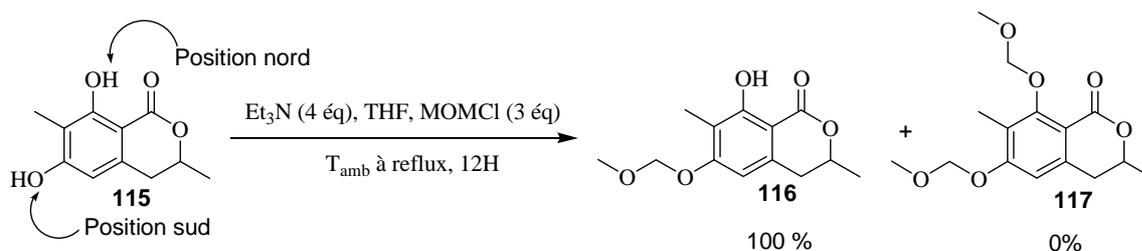


Schéma 37 : chimiosélectivité du phénol « sud » par l'utilisation de bases tertiaires.

Cette chimiosélectivité, qui permet ainsi d'entrevoir une différenciation possible des groupements protecteurs des phénols, sera exploité dans des études postérieures (4. 2. 2. 3.)

Cette non-nucléophilie du phénol « nord » a finalement pu être contrée par un changement de base (*Schéma 38*). En effet, l'utilisation d'hydrure de sodium (NaH) conduit au produit de double protection. Le produit désiré di-MOM **117** est alors isolé avec un rendement de 98%.

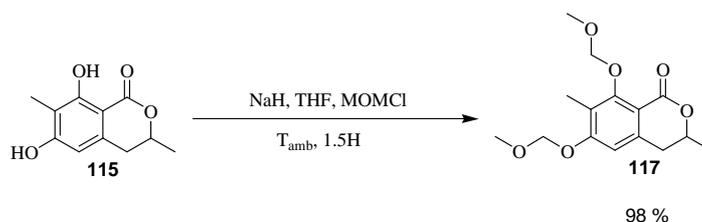


Schéma 38 : Double protection des phénols par l'utilisation de NaH

Dans ce cas, la différence de réactivité s'explique par la nature du phénolate. En effet, l'utilisation de NaH conduit à un phénolate de sodium rendant le phénolate plus nucléophile et donc moins sensible à l'effet inductif de la lactone.

- Synthèse du lactol **118** :

Dans le toluène, la réduction de la lactone **117** par le DIBAL-H à -78°C conduit au lactol **118** avec de très bons rendements sans obtention du diol (*Schéma 39*). Le lactol **118** est alors obtenu avec un rendement de 95 %.

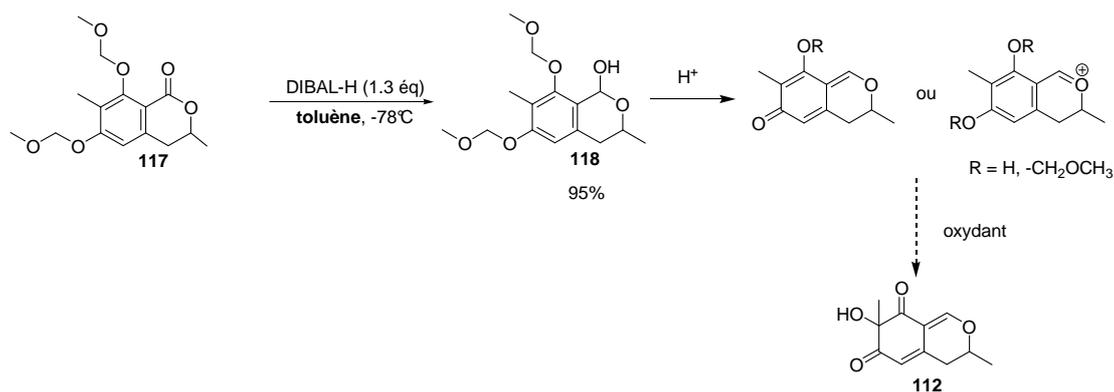


Schéma 39 : Réduction de la lactone 117 par le DIBAL-H dans le toluène.

A partir de cet intermédiaire synthétique **118**, nous pouvons envisager l'étude de la réaction de désaromatisation oxydante. En effet, le traitement du lactol **118** par un acide devrait conduire au précurseur supposé quinonique (ou d'ion dihydropyrylium) de l'alcool **112** pouvant vraisemblablement être piégé par un oxydant.

3. 2. 2. Désaromatisation oxydante.

La stratégie rétrosynthétique envisagée passe par la formation de l'alcool tertiaire **112** provenant de la désaromatisation d'une forme quinonique ou d'un ion dihydropyrylium diphenolique en condition acide oxydante. Afin de réussir cette réaction « one pot » sur le lactol **118**, il convient donc d'étudier les réactions de désaromatisation oxydante de phénol (*Schéma 40*).

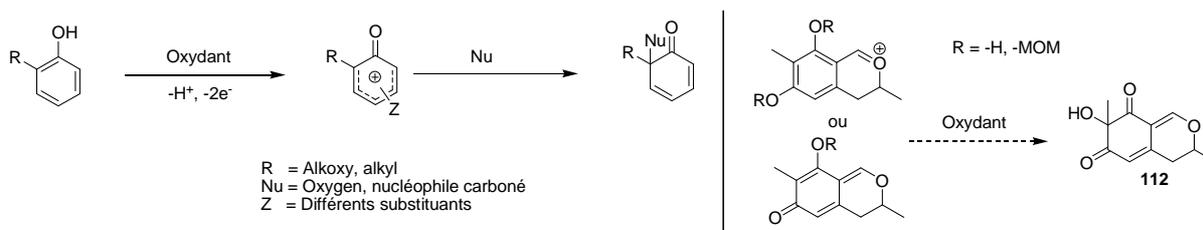


Schéma 40 : Mécanisme sommaire de désaromatisation

3. 2. 2. 1. Rappels bibliographiques.

3. 2. 2. 1. 1. Désaromatisation de phénols et de naphthols.

De nombreux systèmes d'oxydations mettent en jeu des métaux lourds, des dérivés de l'iode hypervalent, des dérivés halogénés, ou des procédés d'oxydation anodiques pour désaromatiser des phénols⁸⁹. Ainsi, Il existe de nombreux substrat (*Schéma 41*) pour synthétiser des *o*-quinols : l'oxydation de la position en ortho dans le cas de la présence d'un transfert d'oxygène nucléophile (1), l'oxydation d'*o*-alkoxyphénols en présence d'un nucléophile carboné (2), la cycloaddition [4+2] sur une *o*-méthylènequinone (3), l'addition d'un nucléophile carboné sur une *o*-quinone (4), ou encore le réarrangement d'un éther d'aryle dans le cas (5). Dans le cadre de cette étude, un intérêt plus particulier sera apporté à l'obtention d'*o*-quinol par transfert d'oxygène.

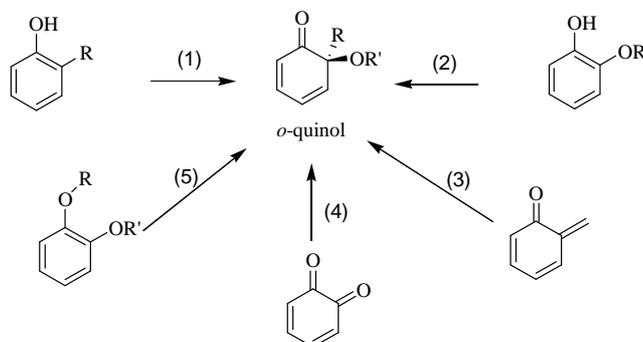
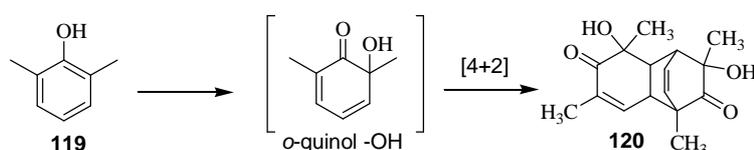


Schéma 41 : Différentes méthodes d'obtention d'o-quinols

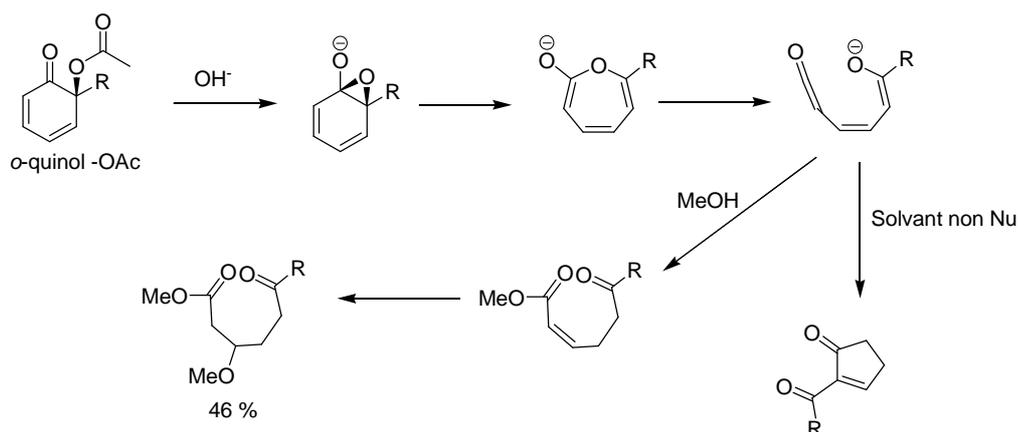
(89) Quideau, S. ; Pouységou, L. ; Deffieux, D. *Synlett*, **2008**, 4, 467–495.

Malgré ces nombreuses méthodes, les *o*-quinols de phénols font partis des substrats les moins pratiques dans le cadre d'étude méthodologique de désaromatisation oxydante car ils ont à une forte tendance à donner des réactions secondaires dues à l'instabilité du produit formé. En effet, les *o*-quinol (-OH) se convertissent rapidement en dimères **120**⁹⁰ par cycloaddition [4+2] (*Schéma 42*). Cette tendance a d'ailleurs été mise à profil dans le cadre de synthèse de produits naturels. De plus, certains *o*-quinols (-OAc) peuvent conduire à une ouverture de cycle en milieu basique alors que les éthers (-OAlkyl) montrent une relative stabilité^{91,92,93}.

Dimérisation



Ouverture des *o*-quinols -OAc



*Schéma 42 : Réaction secondaires des *o*-quinols : dimérisation ou dégradation par ouverture de cycle d'un quinol -OAc en milieu basique*

Enfin, les *o*-quinols hydroperoxydés trisubstitués peuvent se dégrader suivant deux mécanismes^{94,95} en milieu basiques (*Schéma 43*). Tout d'abord, l'*o*-quinol hydroperoxydé **121** peut conduire à un *p*-quinol **124** via la formation d'un oxétane **122** (par addition 1,6) conduisant à la formation d'un époxyde **123** puis induisant une migration du groupement alkyle R₁ (*Voie bleue*).

- (90) Magdziak, D. ; Meek, S. J. ; Pettus, T. R. R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1383-1429.
 (91) Siegel, A.; Wessely, F.; Stockhammer, P.; Antony, F.; Klezl, P. *Tetrahedron* **1958**, *4*, 49.
 (92) Carman, R. M.; Van Dongen, J. M. A. M. *Aust. J. Chem.* **1986**, *39*, 2171.
 (93) Eley, K. L.; Crowley, P. J.; Bugg, T. D. H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2091.
 (94) Nishinaga, A.; Nishizawa, K.; Tomita, H.; Matsuura, T. *Synthesis* **1977**, 270.
 (95) Mandal, S.; Macikenas, D.; Protasiewicz, J. D.; Sayre, L. M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4804.

La deuxième voie met en œuvre un réarrangement sigmatropique de l'hydroperoxyde *o*-quinolique **121** qui conduit à l'oxétane **126** ouvert par un énol et formant *in fine* le *p*-quinol *syn*-époxydé **127** (Voie rouge).

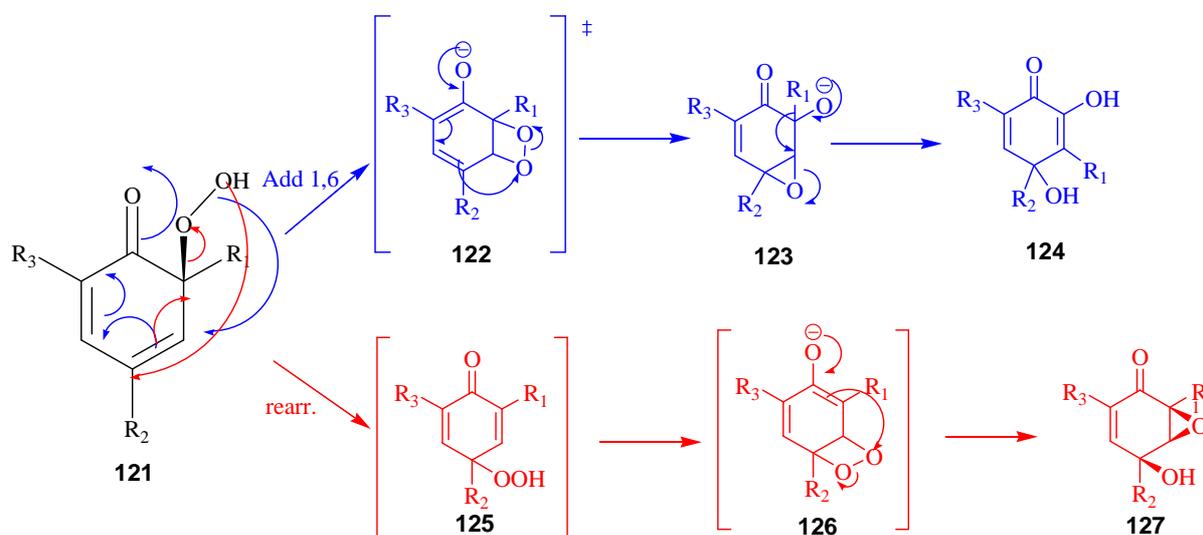


Schéma 43 : 2 mécanismes identifiés de dégradation d'*o*-quinols hydroperoxylés

Parmi toutes les méthodes citées précédemment, l'oxydation de phénols *o*-substitués par la présence d'un oxygène nucléophile reste la plus utilisée. Les différentes méthodes d'oxydation désaromatisante de tels phénols seront décrites dans cette partie bibliographie

Oxydation au plomb tétracétate :

Les groupes de Pinhey⁹⁶ and Thomas⁹⁷ ont étudié le mécanisme proposé par Wessely⁹⁸ dans les années 1950 d'oxydation de phénols alkylés en position ortho. Les deux groupes concordent sur un transfert d'oxygène intramoléculaire à partir d'un complexe intermédiaire ArOPb(OAc)₃. En 1980, Le groupe du Pr. Bath⁹⁹ a reporté que l'oxydation de l'*o*-méthylnaphtol par Pb(OAc)₄ conduisait au produit désiré avec un rendement de 67 % (Schéma 44, 129). Cette étude a notamment démontré que l'utilisation de naphtol dans le cadre d'étude méthodologique d'oxydation désaromatisante était plus simple car entraînait moins de réactions secondaires.

(96) Greenland, H.; Pinhey, J. T.; Sternhell, S. *Aust. J. Chem.* **1986**, 39, 2067.

(97) Lethbridge, A.; Norman, R. O.; Thomas, C. B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 2464.

(98) (a) Wessely, F.; Sinwel, S.; *Monatsh. Chem.* **1950**, 81, 1055.

(b) Wessely, F.; Holzer, L.; Vilcsek, H. *Monatsh. Chem.* **1952**, 83, 1253.

(c) Wessely, F.; Holzer, L.; Langer, F.; Schinezel, E.; Vilcsek, H. *Monatsh. Chem.* **1955**, 86, 831.

(d) Wessely, F.; Zbiral, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1957**, 605, 98.

(e) Wessely, F.; Leitich, J. *Monatsh. Chem.* **1961**, 92, 1004.

(99) Perumal, P. Th.; Bhatt, M. V. *Synthesis* **1980**, 11, 943.

Toutefois, certains sous-produits de transposition allylique du groupe –OAc formé également ont été mis en évidence dans certains cas limites.

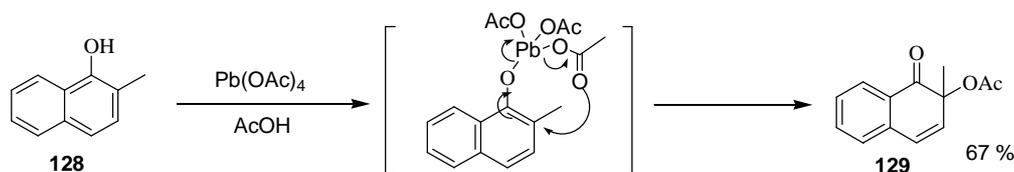


Schéma 44 : Désaromatisation du naphthol par $Pb(OAc)_4$

Oxydation par l'anhydride benzeneseleninic :

C'est en 1977 que le groupe du Pr. Barton¹⁰⁰ a réalisé une désaromatisation en utilisant l'anhydride phénylséleninique (*Schéma 45*). Comme pour le $Pb(OAc)_4$, l'anhydride phénylséleninique permet une libération intramoléculaire d'un atome d'oxygène. Ainsi, le groupe du Pr. Lynn¹⁰¹ et plus récemment le groupe du Pr. Myers¹⁰² ont tiré profit de cette réactivité pour la synthèse du lacinilène.

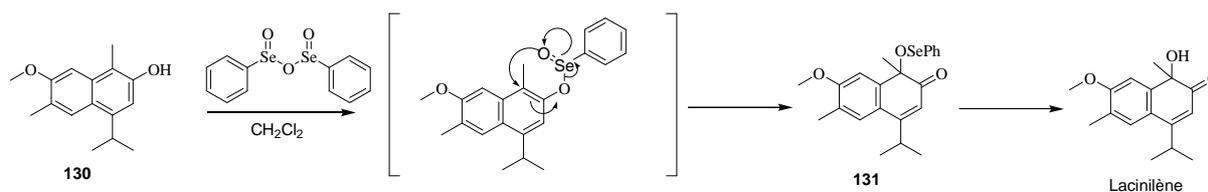


Schéma 45 : Désaromatisation par l'anhydride seleninique.

Oxydation par des peracides:

En 1963, le premier exemple de désaromatisation d'*o*-alkylphénols a pu être réalisé par l'utilisation de peracides¹⁰³. En effet, l'utilisation d'acide trifluoroacétique en présence d'eau oxygénée (formation d'acide trifluoroperacétique) a permis l'obtention du dimère provenant de la réaction de cycloaddition du dérivé désaromatisé du 2,6-diméthylphénol sur lui-même. Ceci constitue ainsi une preuve irréfutable de la présence d'un intermédiaire *o*-oxydé (*Schéma 46*).

(100) Barton, D. H. R.; Brewster, A. G.; Ley, S. V.; Read, C. M.; Rosenfeld, M. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 567.

(101) Jeffs, P. W.; Lynn, D. G. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1617.

(102) Gant, T. G.; Meyers, A. I. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3707.

(103) McClure, J. D. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 69.

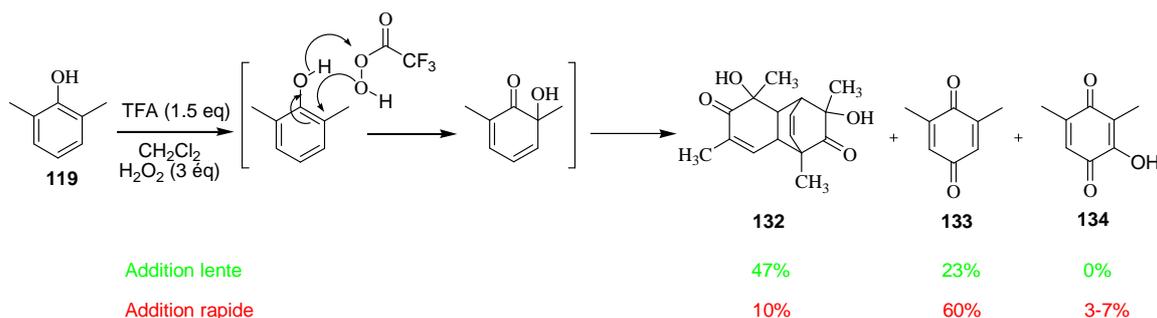


Schéma 46 : Oxydation du 2,6-diméthylphénol par le TFAA.

D'une manière générale, les *o*-quinols ou leurs équivalents hydroperoxydiques sont générés à partir d'*o*-alkylphénols par traitement basiques en présence d'hydroperoxyde ou de K_2O ^{104,105}. Parmi ces exemples, l'hydroperoxyde de *t*-butyle est l'oxydant ayant eu le plus de succès en combinaison avec un métal de transition. Par exemple, le groupe du Pr. Krohn a reporté l'utilisation de sels de zirconium, titane, ou de molybdène pour catalyser la désaromatisation de naphthols¹⁰⁶. Toutefois, bien que remarquable, cette réaction n'a été appliquée qu'aux dérivés naphtyliques, dont les *o*-quinols correspondants ne dimérisent pas ou peu (**Schéma 47**).

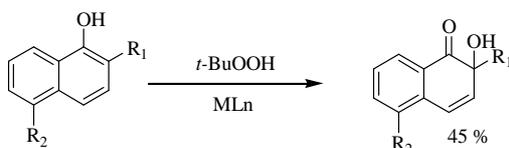


Schéma 47 : Désaromatisation de *o*-alkylnaphtol par *t*-BuOOH en présence de métaux de transition.

Oxydation par fluorure d'acide perchlorique :

En 1961, le groupe du Pr. Ward a utilisé un nouvel oxydant : le fluorure d'acide perchlorique conduisant, avec des rendements faibles, aux dimères fluorés et oxygénés correspondants¹⁰⁷. Ainsi, encore une fois, le passage par l'intermédiaire désaromatisé a été démontré mais celui-ci s'est révélé instable.

Il est intéressant de remarquer que dans un solvant polaire l'oxydation conduit au produit de désaromatisation via un transfert de l'oxygène nucléophile tandis que dans un solvant apolaire, c'est le fluorure qui est responsable de la désaromatisation pour conduire à *o*-fluoroquinone (**Schéma 48**).

(104) (a) Matsuo, M.; Matsumoto, S.; Iitaka, Y. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3514.

(b) Matsumoto, S.; Matsuo, M.; Iitaka, Y. *J. Chem. Res.* **1987**, 58

(105) Matsumoto, S.; Matsuo, M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1435.

(106) Krohn, K.; Brueggmann, K.; Doering, D.; Jones, P. G. *Chem. Ber.* **1992**, *125*, 2439.

(107) Kende, A. S.; MacGregor, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4197.

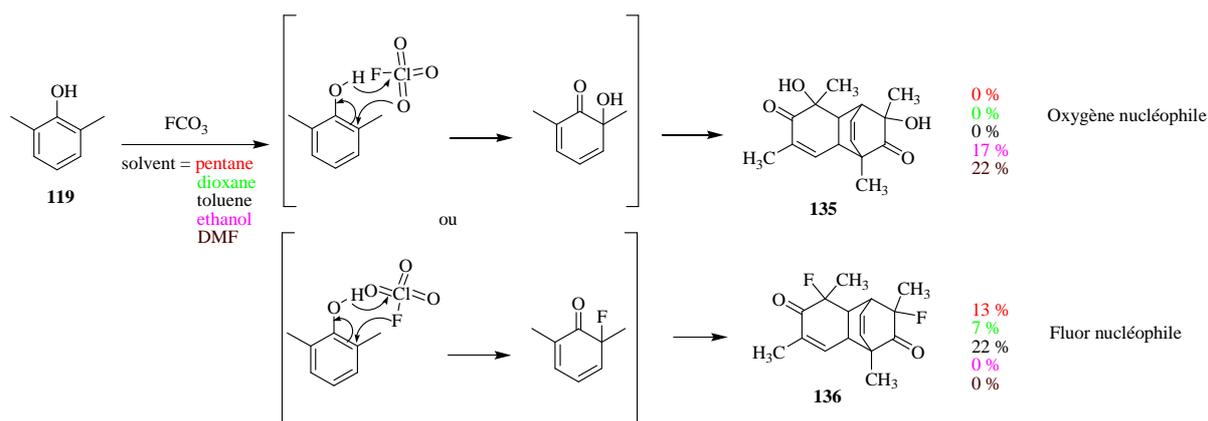


Schéma 48 : Oxydation du cycle aromatique par $FClO_3$

Oxydation par les dérivés de l'iode hypervalent :

A cause de leur tendance à conduire aux dérivés *p*-quinolique, l'utilisation de phénol a généralement été limitée aux cyclisations par piégeage intramoléculaire de l'intermédiaire réactionnel *o*-quinolique. Les exemples d'oxydation du Pr Woods utilisant du PIFA¹⁰⁸, des groupes des Pr. D'hoshino¹⁰⁹ et Spillings¹¹⁰ utilisant du PIDA ainsi que le groupe du Pr. Alder oxydant par $NaIO_4$, mettent d'ailleurs bien en évidence ces extensions¹¹¹ conduisant aux dérivés spiro (Schéma 49).

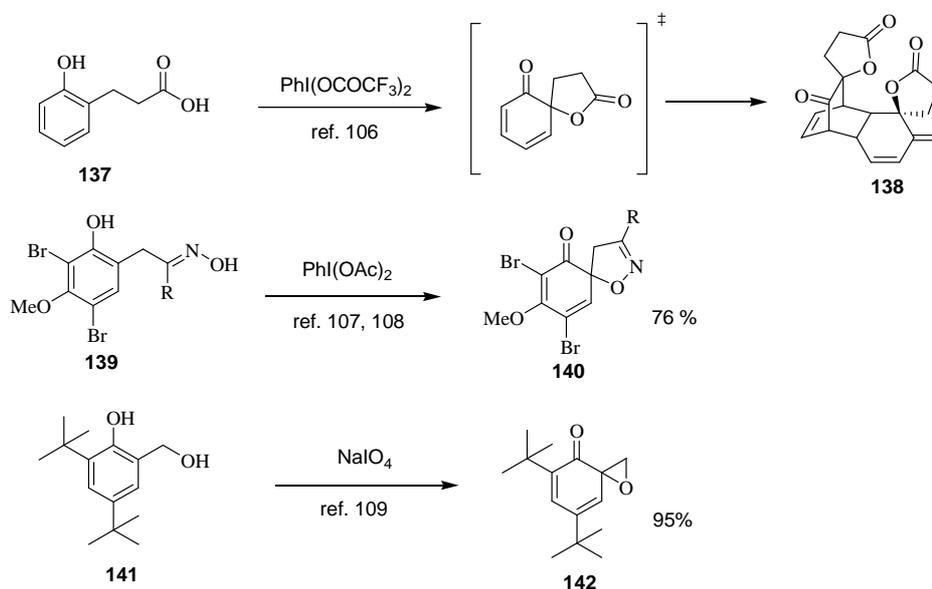
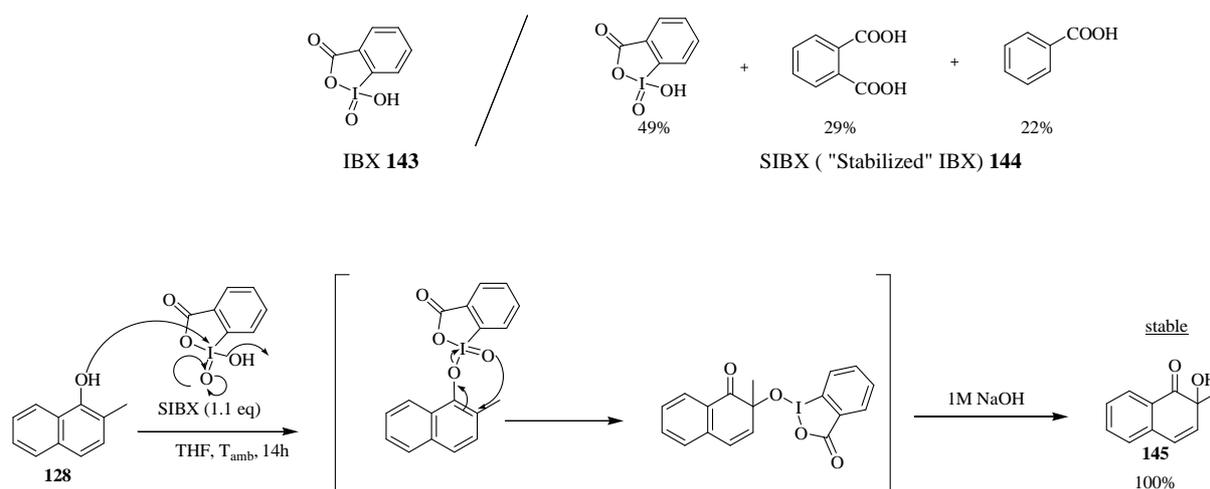


Schéma 49 : Piégeage intramoléculaire de l'intermédiaire désaromatisé.

- (108) Drutu, I.; Njardarson, J. T.; Wood, J. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 493.
 (109) (a) Murakata, M.; Yamada, K.; Hoshino, O. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14713.
 (b) Murakata, M.; Yamada, K.; Hoshino, O. *Heterocycles* **1998**, *47*, 921.
 (c) Murakata, M.; Yamada, K.; Hoshino, O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 443.
 (110) Boehlow, T. R.; Harburn, J. J.; Spilling, C. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3111.
 (111) Becker, H.-D.; Bremholt, T.; Adler, E. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 4205.

Enfin, au début des années 2000, les groupes du Pr. Pettus¹¹² et du Pr. Quideau^{113,114,115,116,117} ont montré que l'acide 2-iodoxybenzoïque **143** (IBX) et son analogue stabilisé non-explosif **144** (Safe IBX noté SIBX) étaient des dérivés particulièrement intéressants pour la désaromatisation oxydante de phénols sélectivement sur la position ortho du cycle aromatique (*Schéma 50*).



L'utilisation d'IBX permet donc de contrôler les réarrangements inhérents des *o*-quinols en *p*-quinols. Ceci ouvre donc la voie à un nouveau challenge : la réalisation de réaction de désaromatisations oxydantes énantiosélectives.

En 2008, le groupe du Pr. Kita a ainsi publié le premier exemple d'oxydant chiral d'iode(III) hypervalent conduisant à des excès énantiomériques significatifs¹¹⁸ (*Schéma 51*). Cet oxydant est basé sur une structure novatrice rigidifiée par une jonction spirobisindanique. De plus, une version catalytique (15% mol) de cette réaction a pu être mise au point en présence de 1 éq de *m*-CPBA (co-oxydant) et a conduit à des excès énantiomériques de l'ordre de 65 %.

- (112) Magdziak, D.; Rodriguez, A. A.; Van De Water, R. W.; Pettus, T. R. R. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 285.
(113) Gagnepain, J.; Mereau, R.; Dejugnac, D.; Leger, J.-M.; Castet, F.; Deffieux, D.; Pouysegu, L.; Quideau, S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6493.
(114) Lebrasseur, N.; Gagnepain, J.; Ozanne-Beaudenon, A.; Leger, J.-M.; Quideau, S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6280.
(115) Gagnepain, J.; Castet, F.; Quideau, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1533
(116) Gagnepain, J.; Castet, F.; Quideau, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 628.
(117) Quideau, S.; Pouysegu, L.; Deffieux, D.; Ozanne, A.; Gagnepain, J.; Fabre, I.; Oxoby, M. *Arkivoc* **2003**, *6*, 106.
(118) T. Dohi, A. Maruyama, N. Takenaga, K. Senami, Y. Minamitsuji, H. Fujioka, S. B. Caemmerer, Y. Kita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *120*, 3847.

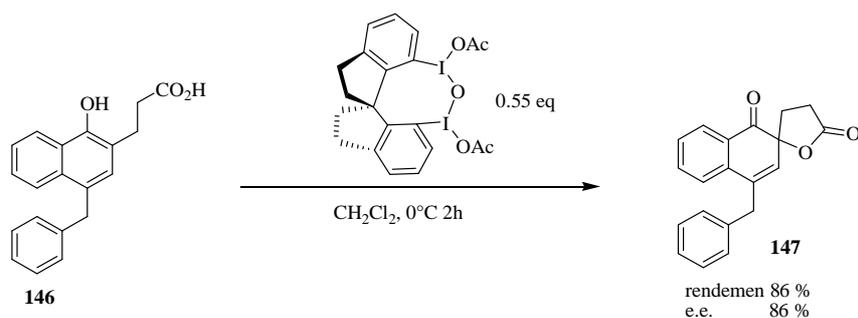


Schéma 51 : Oxydation par les dérivés spirobiindoliques de périodanes (III).

Enfin, le groupe du Pr. Quideau s'est également engagé dans la synthèse de nouveaux dérivés de périodanes chiraux. De nombreuses structures ont ainsi été décrites utilisant aussi bien des périodanes de degré d'oxydation (III) que (V)¹¹⁹. Les structures dérivées de BINOL ont montré les meilleures activités avec notamment des excès énantiomériques atteignant 50% (*Schéma 52*). Cependant, il est important de souligner que les périodanes chiraux ne sont pas préalablement préparés mais formés *in-situ*. Cette formation pouvant conduire à des baisses d'énantioselectivité par oxydation directe du cycle aromatique par le *m*-CPBA.

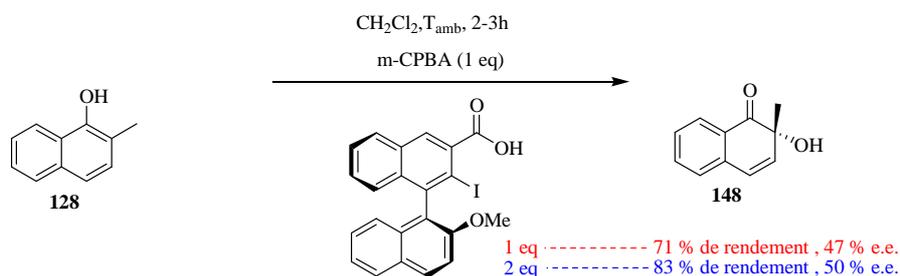


Schéma 52 : Oxydation par des périodanes dérivés de binols chiraux formé *in-situ*.

3. 2. 2. 1. 2. Synthèse d'azaphilones par désaromatisation oxydante de phénols.

Dans le cas de synthèse d'azaphilones, molécules proches de l'épicoconone, 3 méthodes de désaromatisation ont été reportées dans la bibliographie. L'oxydation du cycle aromatique constituant l'étape déterminante des synthèses décrites, elle met généralement en évidence l'importance de l'intermédiaire réactionnel de type oxonium qui est oxydé *in situ*

(119) Quideau, S. ; Lyvinec, G. ; Marguerit, M. ; Bathany, K. ; Ozanne-Beaudenon, A. ; Buffeteau, T. ; Cavagnat, D. ; Chénéde, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4605.

Méthode au $Pb(OAc)_4$: Synthèses de Whaley, Suzuki et de Yao.

La méthode la plus reportée pour la désaromatisation oxydante fait intervenir le plomb tétracétate comme oxydant de l'intermédiaire réactionnel (**Schéma 53**). Ici, l'importance de la forme d'ion pyrilium comme intermédiaire réactionnel subissant l'oxydation est déterminante car la réaction est réalisée par un transfert d'oxygène nucléophile sur un cycle aromatique appauvri. En effet, après complexation d'un des phénols sur le plomb, il se produit un transfert d'oxygène en α de la position complexée.

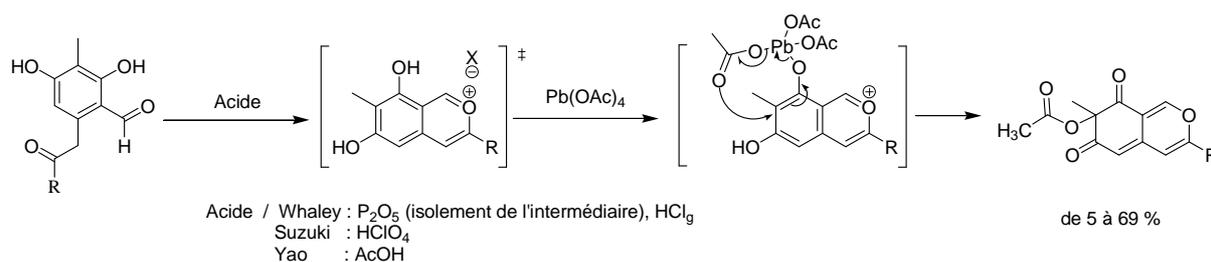


Schéma 53 : mécanisme de désaromatisation oxydante par $Pb(OAc)_4$

Bien qu'efficace et décrite de façon extensive dans la bibliographie, cette méthode conduit à des rendements assez faibles en fonction du groupement R présent sur le précurseur céto-aldéhyde et de l'acide utilisé. De plus, la toxicité de l'oxydant utilisé (dérivés de plomb) constitue un frein à une synthèse sur grosse échelle.

Méthode à IBX : Synthèses de Porco et de Pettus.

Deux exemples ont été reportés dans la bibliographie pour l'oxydation d'oxonium en présence d'IBX (**Schéma 54**). Encore une fois, la présence d'un cycle aromatique appauvri facilite l'oxydation car elle est réalisée par l'attaque d'un oxygène nucléophile.

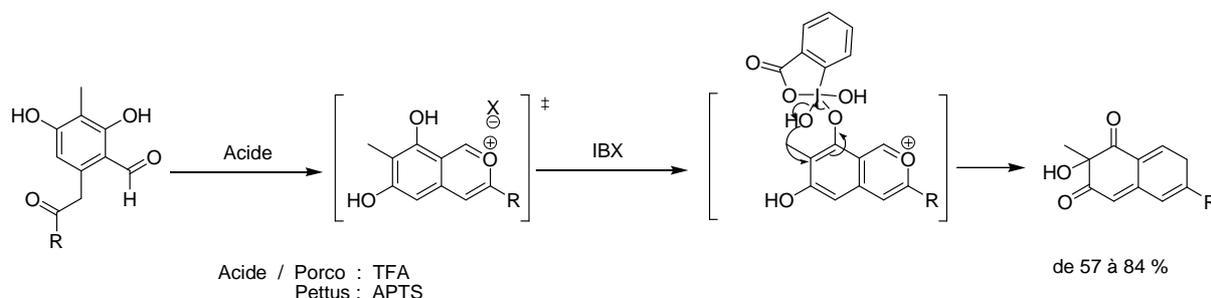


Schéma 54 : Mécanisme de désaromatisation oxydante par l'IBX.

Cette méthode conduit à l'alcool tertiaire désiré avec des rendements très satisfaisants atteignant 84%. Cette méthode étant très simple à mettre en œuvre, l'IBX semble être l'oxydant de choix pour réaliser un screening rapide des conditions d'obtention de notre alcool désaromatisé.

Méthode à l'oxygène singulet : Synthèses de Porco et de Yao.

Cette méthode d'oxydation a été introduite par Porco en 2005 et a été reprise en 2007 par le groupe du Pr. Yao. Ces méthodes reprennent une approche plus biomimétique d'oxydation de phénols et ne font pas intervenir d'intermédiaire de type pyrilium (*Schéma 55*). L'utilisation d'oxygène singulet en présence de cuivre est rendu possible par sa complexation avec des ligands appropriés et a pu, par un screening de ces ligands, être rendu énantioselective. L'alcool de désaromatisation est alors obtenu avec un excès énantiomérique de 95 à 97% par l'utilisation de (-)-spartéine.

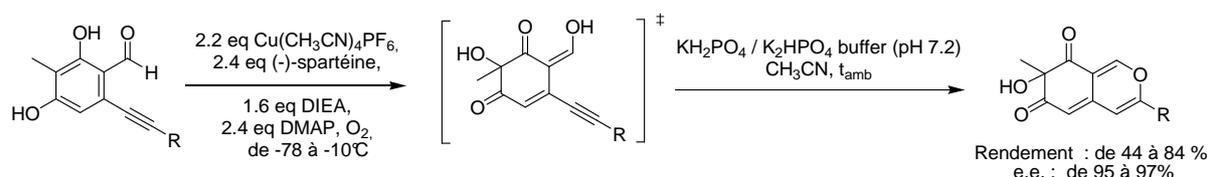


Schéma 55 : Désaromatisation oxydante de Porco.

Cette méthode est très intéressante car c'est la seule permettant d'obtenir une énantioselectivité lors de l'oxydation. De plus, les rendements affichés restent concurrentiels en comparaison des ceux obtenus par utilisation d'oxydant portant un oxygène nucléophile (si un soin particulier est apporté au niveau du contrôle de la pression en oxygène).

Aux vues de la bibliographie et afin d'obtenir au plus vite l'alcool tertiaire **112** désiré, la méthode utilisée sera celle mise en évidence par le Pr. Porco et le Pr. Pettus *via* utilisation d'IBX en milieu acide. En effet, une réactivité proche des azaphilones pyraniques devrait être observée lors de la mise en réaction du lactol modèle **118**. Cependant, une stabilité inférieure pouvant être envisagée (*Figure 21*), une étude méthodologique sur la nature de l'acide peut être engagée.



Figure 21 : Stabilité différente entre les séries pyraniques et dihydropyraniques

3. 2. 2. 2. Screening des conditions de désaromatisation oxydante.

Après de nombreux tests non-concluants (pas de traces de produits désirés) effectués en faisant varier la température et la nature de l'acide (acides aqueux : HClO₄, APTS, acides non-aqueux : AcOH, BF₃.OEt₂), une trace de l'alcool **112** désiré a pu être obtenu par utilisation d'acide trifluoroacétique (TFA) et d'un équivalent d'IBX dans le dichlorométhane (*Schéma 56*). Cet alcool correspond donc au produit de double déprotection suivi de désaromatisation oxydante.

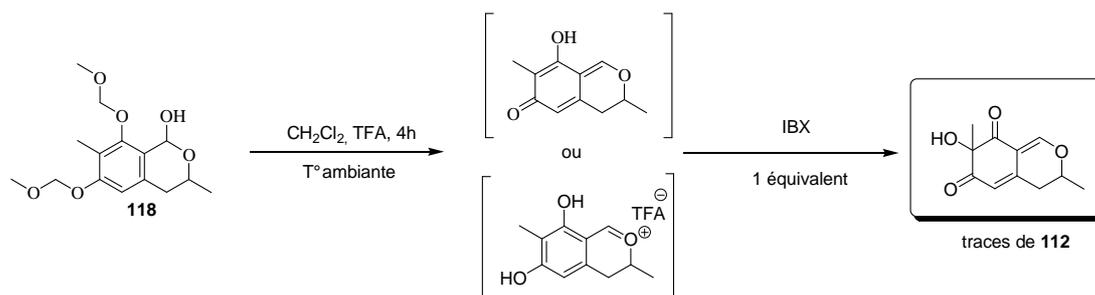


Schéma 56 : Premiers essais de désaromatisation oxydante par IBX en présence de TFA

L'ajout de 2 équivalents d'IBX après 4H de réaction avec du TFA a permis d'obtenir 50% de produit désaromatisé (*Schéma 57*) sous forme d'un mélange diastéréomérique 50/50. Cependant, soupçonnant une instabilité de l'intermédiaire réactionnel, et afin d'augmenter le rendement, l'IBX a été ajouté de façon plus précoce et de façon concomitante au TFA.

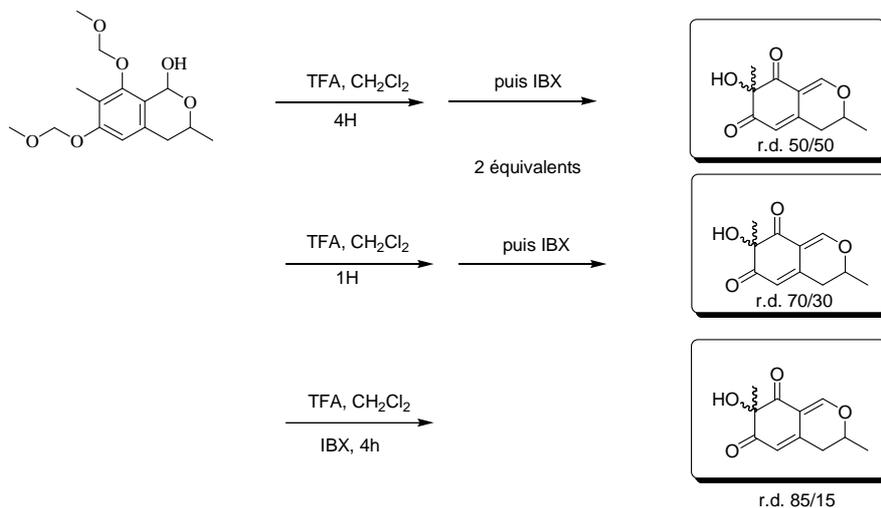


Schéma 57 : Evolution de la diastéréosélectivité d'oxydation en fonction du temps de réaction avant ajout d'IBX

De façon surprenante, aucun effet sur le rendement n'est observé. Par contre, une nette différence au niveau du rapport diastéréomérique a pu être mise en évidence.

Ainsi, si l'IBX est ajouté 1H après le TFA, le rapport diastéréomérique est de 70/30. Enfin, si l'IBX est ajouté simultanément au TFA, le rapport atteint 85/15.

Malgré ces premiers résultats satisfaisants, une faible reproductibilité de cette réaction a été observée. En ce sens, les conditions d'hydrolyse semblent jouer un rôle très important dans le rendement obtenu. En effet, il a été observé une baisse conséquente de rendement lors du lavage au thiosulfate de sodium saturé lors des premiers essais. Ainsi, un unique lavage basique par de l'hydrogénocarbonate de sodium a été entrepris après chaque essais afin de s'affranchir des dérivés d'iode hypervalent résiduels difficiles à séparer après purification sur gel de silice.

Finalement, malgré une conversion totale par suivi CCM de la réaction le rendement ne dépassa pas 50 % à ce stade de l'étude.

Afin de rationaliser le manque de reproductibilité de la réaction en termes de rendement et la surprenante diastéréoselectivité d'oxydation, une étude mécanistique de la réaction par suivi RMN a alors été entreprise.

3. 2. 2. 3. Etude mécanistique par suivi RMN.

- Détermination de l'intermédiaire réactionnel :

La première information nécessaire est la détermination de l'intermédiaire réactionnel. Ceci a pu être rendu possible par le suivi RMN de la réaction dans le Chloroforme deutérié (*Schéma 58, Figure 22*).

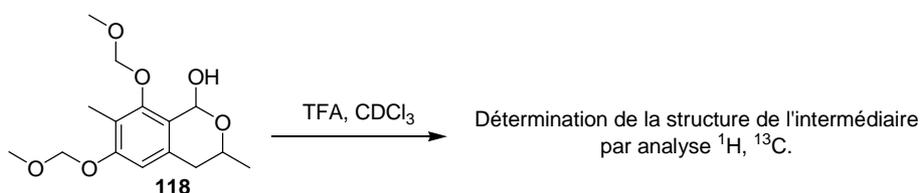


Schéma 58 : Mise en solution du lactol 118 dans le chloroforme deutérié en présence de 25 équivalents de TFA.

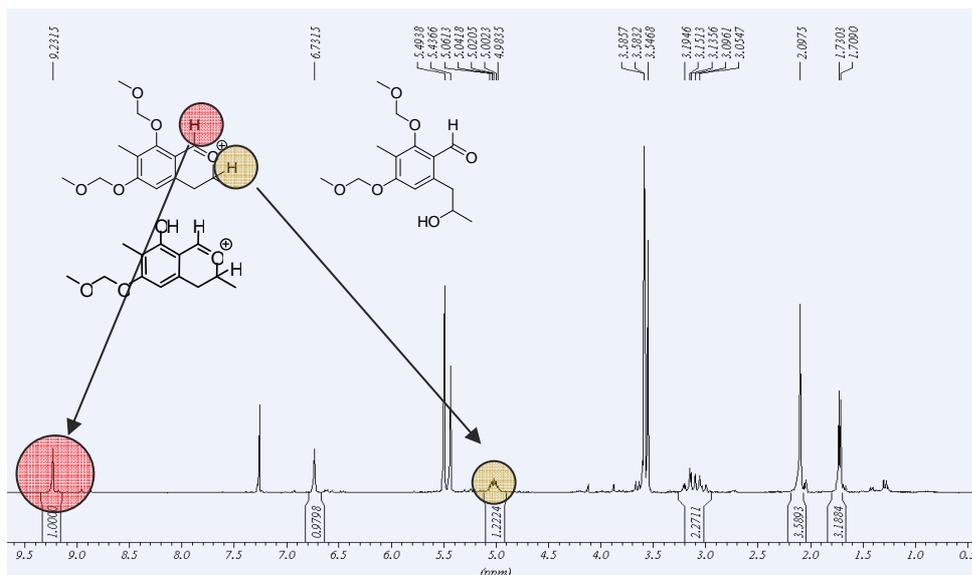


Figure 22 : Spectre de RMN ^1H de l'intermédiaire réactionnel après 5 min de réaction.

Ainsi, l'ajout de 25 équivalents de TFA au lactol **118** a permis de mettre en évidence un fort déblindage du proton au pied de l'oxygène dihydropyranique de 4.45 ppm à 5.04 ppm. Ce déblindage de 0.5 ppm montre que la forme intermédiaire présente dans le milieu réactionnel est de type cyclique (Figure 23). En effet, une molécule ouverte sous forme aldéhydique **151** ferait apparaître un proton au pied de l'oxygène avec un déplacement chimique inférieur à 4 ppm.

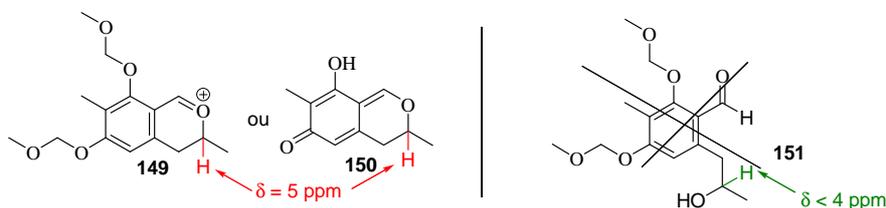


Figure 23 : Pas de forme ouverte de type aldéhydique dans le milieu réactionnel

La deuxième information que l'on peut déduire est que, le proton situé en position acétalique subit également un déblindage de 5.8 à 9.23 ppm prouve de la très faible densité électronique du carbone le portant. Cette observation est d'ailleurs proche de celle effectuée par le Pr. Suzuki⁷² en série ion pyrylium : 9.54 ppm. Ce constat combiné à la présence des signaux caractéristiques des deux éthers methoxyméthyliques empêche d'envisager toute forme quinonique **150** et confirme l'ion pyrylium (Figure 24).

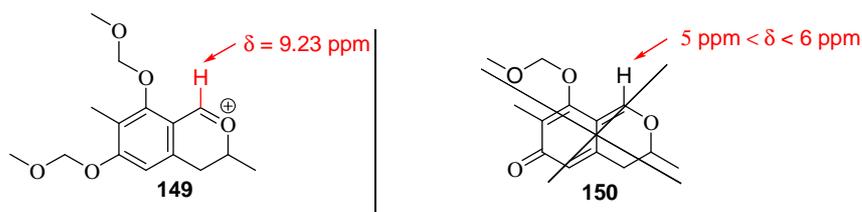


Figure 24 : Forme pyrylium confirmée.

La présence d'acide trifluoroacétique (TFA) pourrait mener à la formation d'un acétal de trifluoroacétate. Cette espèce n'a pu être mise en évidence par RMN du fluor (^{19}F) puisque l'on observe qu'un seul pic de fluor correspondant au TFA ($\delta = -78$ ppm).

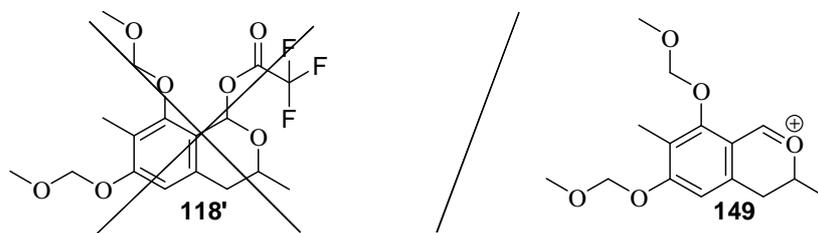


Figure 25 : Confirmation par RMN ^{19}F de l'absence d'acétal.

Enfin, pour lever les derniers doutes concernant la forme intermédiaire un spectre RMN ^{13}C de type DEPT 135 a été effectué (Figure 26). Finalement, la présence d'un carbone primaire à 178 ppm (175 ppm en série pyrilium reporté par le Pr. Suzuki⁷²) vient confirmer l'existence de la forme oxonium dans le milieu.

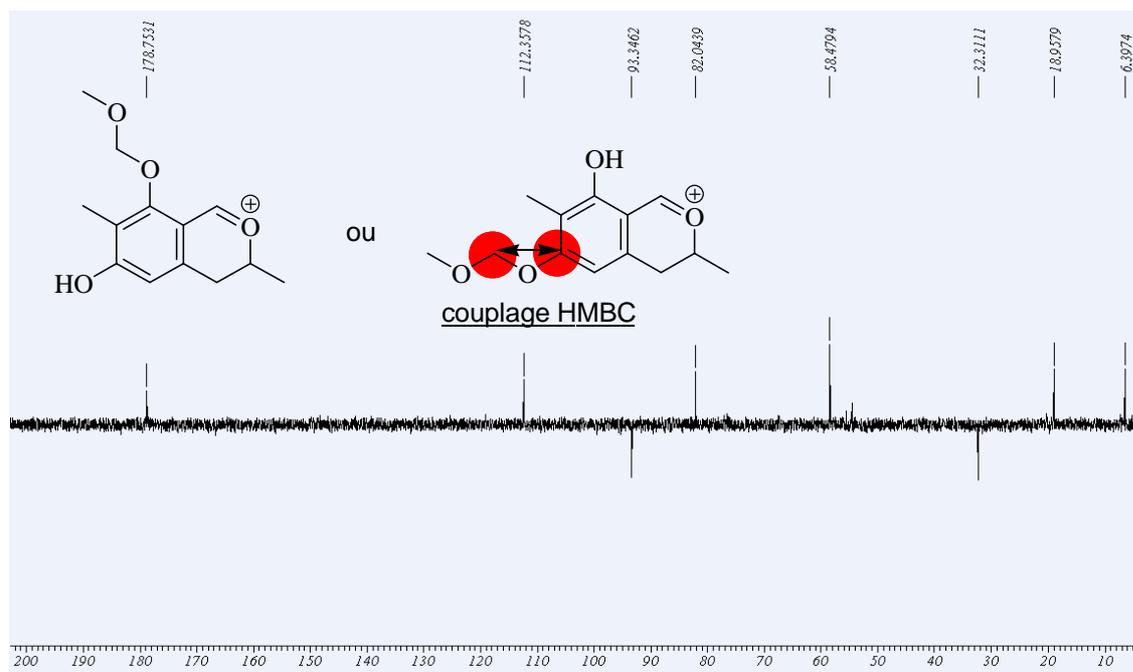


Figure 26 : spectre RMN ^{13}C (DEPT135) de l'intermédiaire réactionnel en présence de TFA.

Il est intéressant de remarquer que le temps nécessaire à la réalisation de spectre carbone (25 minutes) a permis la déprotection d'un des deux éthers méthoxyméthylés. De plus, la régiosélectivité de cette déprotection semble être contrôlée de façon cinétique car un seul carbone acétalique de MOM à 82 ppm est observé. Finalement, des études de RMN en 2 dimensions de type HMBC ont permis de déterminer que le groupement protecteur « nord » est le plus labile. En effet, un couplage entre le CH_2 acétalique du MOM « sud » et le carbone portant le phénol protégé a pu être identifié.

En conclusion, l'étude des spectres RMN du proton et du carbone 13 a pu mettre en évidence la nature **d'ion dihydropyrylium** de l'intermédiaire réactionnel. Ceci a pu être confirmé en RMN ^1H par la présence d'un pic à 5.00 ppm indiquant la nature cyclique de l'intermédiaire et d'un pic à **9.23 ppm** correspondant au proton dihydropyranique de l'ion dihydropyrylium (déblindage en accord avec la bibliographie pour les RMN de pyrylium). De plus, les études complémentaires effectuées par carbone 13 mise en évidence la déprotection sélective d'un des deux groupements protecteur après 25 minutes de réaction en conditions acides. Ce pic caractéristique à 9.23 ppm correspond donc à deux formes intermédiaires mono et diprotégés.

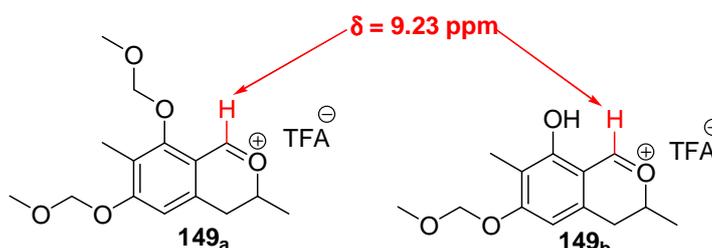


Figure 27 : Le pic à 9.23 ppm correspond aux deux intermédiaires mono et diprotégés.

- Détermination de la quantité optimale de TFA nécessaire à la réaction.

Comme observé lors de l'analyse carbone précédente, la déprotection des éthers est dépendante du temps de réaction. Cela indique donc que la vitesse de déprotection est certainement liée à la quantité de TFA. La détermination de la quantité minimale de TFA est donc nécessaire afin d'avoir une déprotection la plus séquentielle possible et ainsi pouvoir l'étudier par un suivi en RMN ^1H (*Schéma 59*).

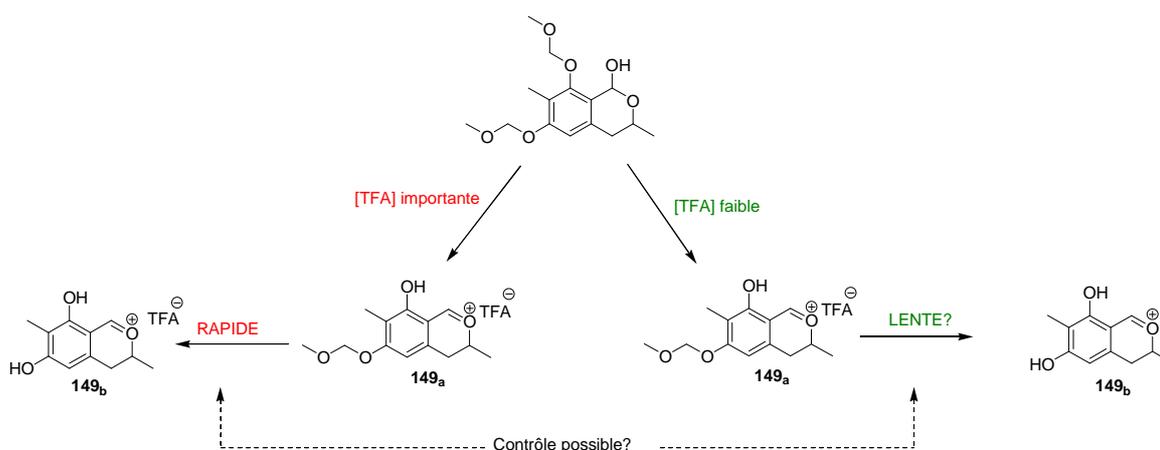


Schéma 59 : Contrôle probable de la cinétique de déprotection des éthers de MOM par la quantité d'acide.

Un lissage du spectre (apparition des constantes de couplage) a alors été observé jusqu'à l'ajout de 6 équivalents de TFA (*Figure 28*).

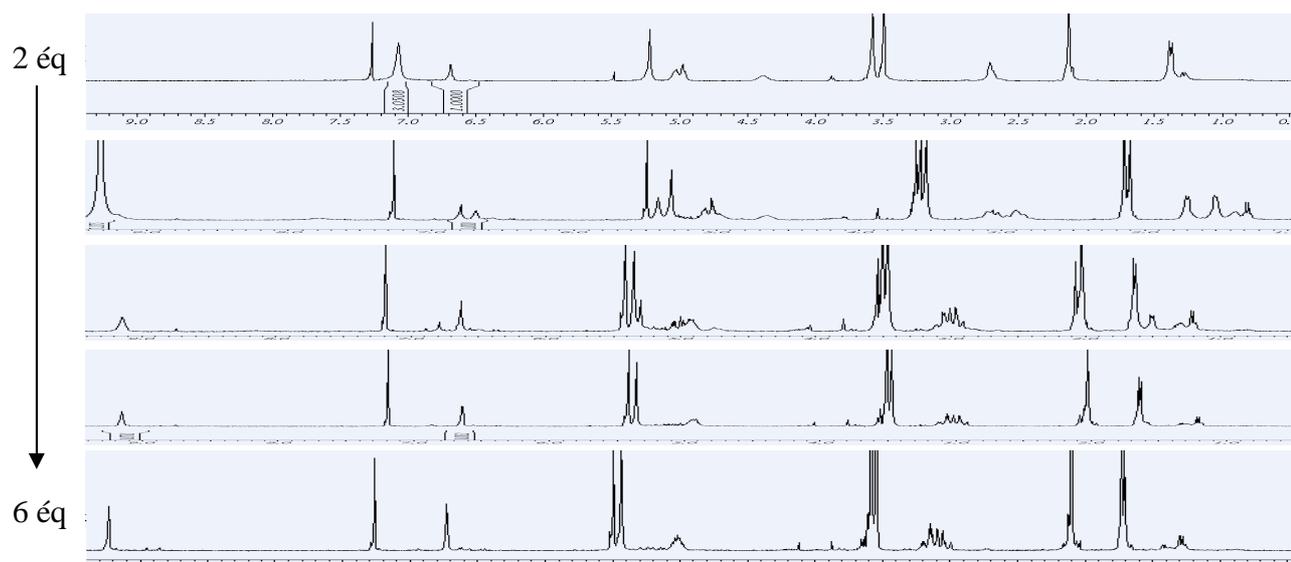


Figure 28 : Evolution du spectre RMN ^1H de l'intermédiaire réactionnel de type oxonium par ajout de 1 à 6 équivalents de TFA.

A ce stade de l'étude, la quantité nécessaire de TFA utilisée pour les désaromatisations oxydantes a donc été fixée à 7 équivalents afin d'avoir la meilleure résolution en RMN ^1H possible et le meilleur contrôle de la cinétique de déprotection des éthers méthoxyméthyliques. De plus, les résultats obtenus préliminairement par ajout de l'IBX après 1 ou 4 heures de réaction semble indiquer que l'excès diastéréomérique est intimement lié à la cinétique de déprotection des éthers méthyliques.

RESUME :

- 1- Seule la forme d'ion pyrilium est présente dans le milieu (apparition d'un pic à 9,23 ppm correspondant à la forme mono et diprotégée).
- 2- Les deux éthers méthoxyméthyliques n'ont pas une cinétique de déprotection équivalente, la vitesse de déprotection du phénol « nord » étant plus élevée.
- 3- 7 équivalents de TFA est la quantité optimale pour observer l'évolution du système par spectre RMN ^1H et pour mettre en évidence une déprotection séquentielle des éthers méthoxyméthyliques.

Il convient donc alors d'étudier l'évolution du spectre ^1H de l'intermédiaire réactionnel en fonction du temps afin de lier cette régiosélectivité de déprotection des phénols à une éventuelle discrimination diastéréofaciale d'oxydation, responsable de la diastéréosélectivité observée.

- Etude de la diastéréosélectivité de la réaction.

Etude de l'évolution de l'intermédiaire réactionnel en fonction du temps par observation du massif à 9.23 ppm.

Afin de lier l'excès diastéréomérique à la cinétique de déprotection des phénols, l'évolution en fonction du temps en RMN du ^1H de l'intermédiaire réactionnel est réalisée en présence de TFA (*Schéma 60*). Un nouvel intermédiaire commence à apparaître après 20 min de mise en réaction (le proton à 9.23 ppm est lentement convertit en un massif à 9.00 ppm). Au bout de 4h, seule la nouvelle espèce présentant un proton à 9.00 ppm est présente dans le milieu. Celle-ci correspond à l'intermédiaire di-déprotégé C.

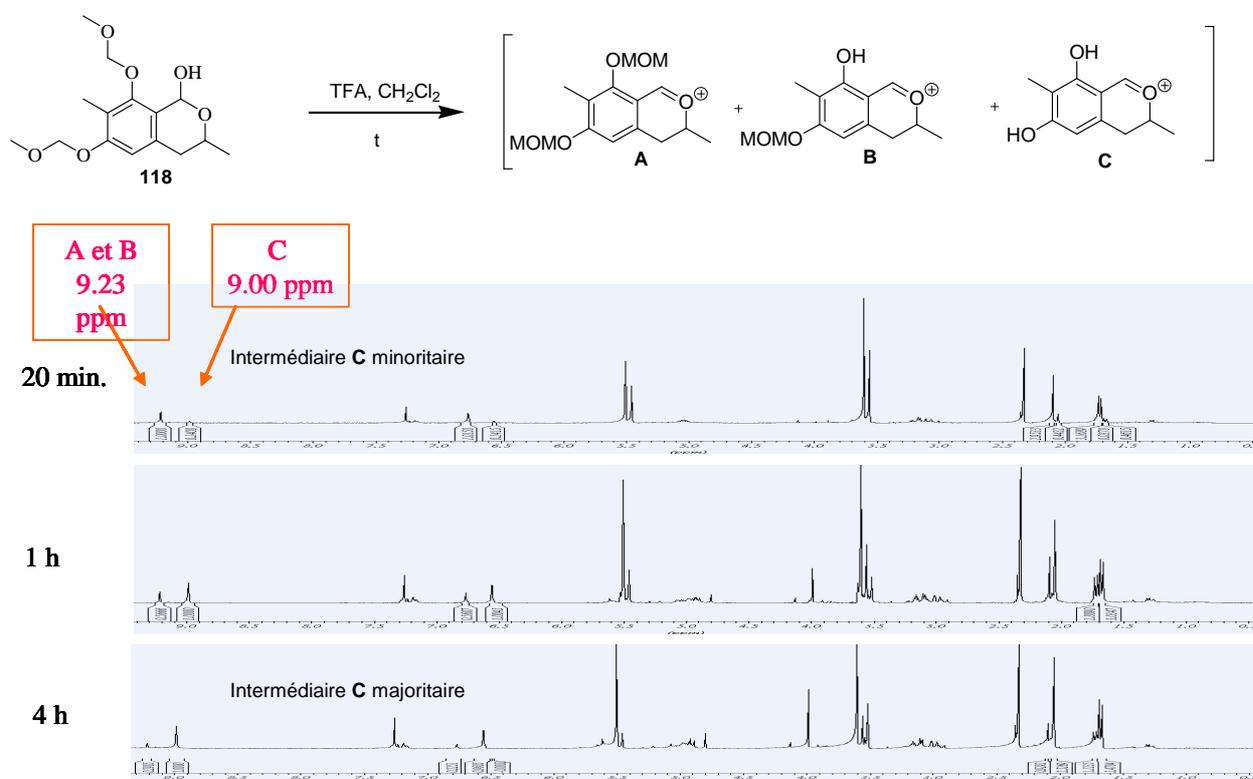


Schéma 60 : Evolution de l'intermédiaire réactionnel en fonction du temps en présence de 7 éq de TFA. Apparition d'un massif à 9.00 ppm.

Comme spécifié précédemment, aucune différence en RMN ^1H n'est observée entre les formes A et B. De plus, un troisième intermédiaire possédant un pic à 9.00 ppm apparaît et devient majoritaire au bout de 4h de réaction. Ce troisième intermédiaire correspond à l'oxonium diphenolique. Les observations faites sur ce suivi RMN de la déprotection des éthers de MOM viennent donc confirmer ce que les analyses précédentes laissaient entrevoir : la déprotection séquentielle des éthers méthoxyméthyliques peut être à la base de la diastéréosélection observée.

En effet, une baisse de la diastéréosélectivité est observée en fonction du temps d'attente avant ajout d'IBX, conduisant au mélange 50/50 de diastéréoisomères si l'ajout est effectué après 4h de réaction (composé diphenolique). Afin de vérifier cette hypothèse, il convient donc de modifier les groupements protecteurs présents sur le lactol de départ afin de modifier la cinétique de déprotection (suivi par RMN) et d'étudier son impact sur la diastéréosélectivité (diphénol : r. d. faible – monophénol : r. d. fort).

Etude de l'évolution du spectre ^1H de l'intermédiaire réactionnel sur un diphénol protégé différemment sur la position nord et sud.

Différents lactols présentant des phénols différemment protégés ont alors été synthétisés (*Schéma 61*). Ainsi, le groupement protecteur de la position sud a été modifié. Ceci est rendu possible par la sélectivité de protection rencontrée précédemment en fonction de la base utilisée. Ainsi, trois lactols **154**, **157** et **160** ont pu être synthétisés avec des rendements allant de 31 à 83 % en partant de la lactone diphenolique **115**.

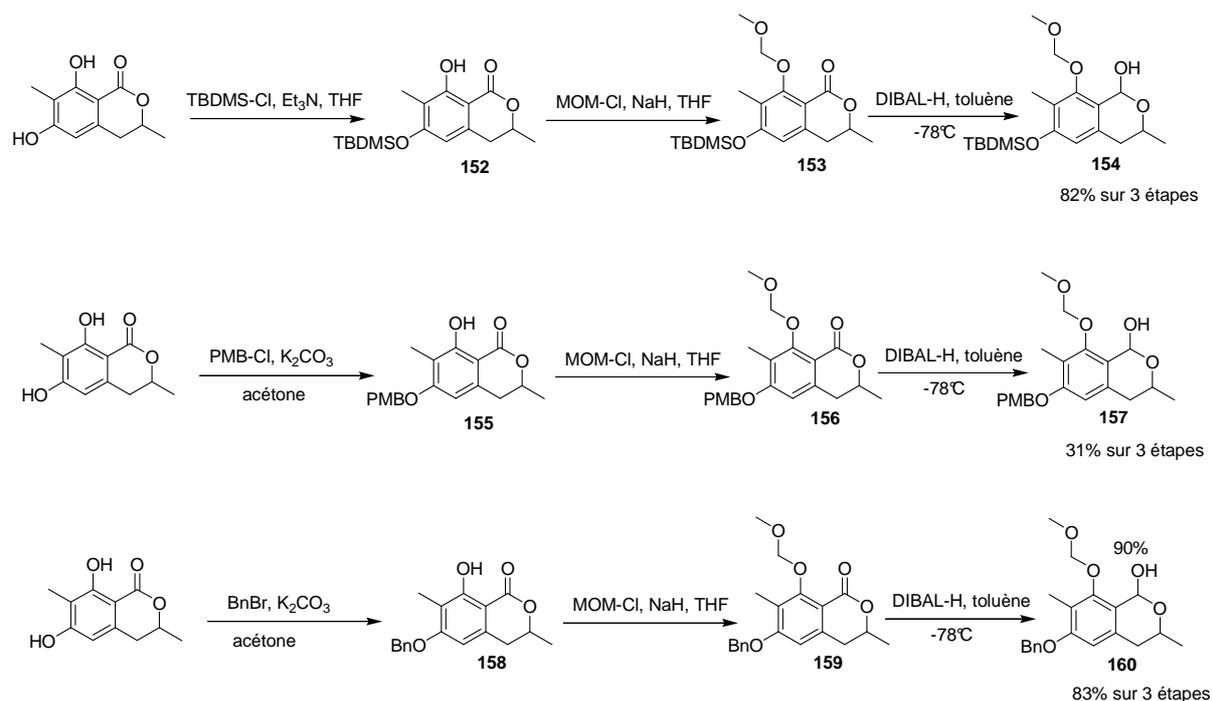
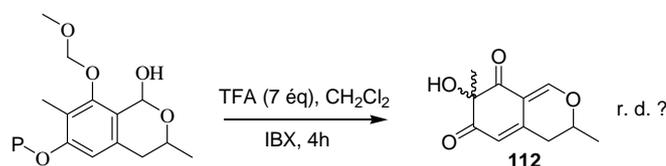


Schéma 61 : Préparation des précurseurs différemment protégés en position sud.

En premier lieu, un groupement protecteur très labile en condition acide (t-butyldiméthylsilane) devant conduire à une baisse de la diastéréosélectivité de la réaction a été introduit et a conduit au lactol **154** en deux étapes (formation de l'intermédiaire diphenolique rapide). Dans un second temps, un lactol **157** portant un groupement protecteur de type *p*-methoxybenzyle ayant une stabilité proche des éthers méthoxyméthyliques et devant conduire à une diastéréosélectivité comparable a été synthétisé.

Enfin, un lactol **160** portant un éther benzylique connu pour être bien plus stable en condition acide a été introduit sur la position « sud ». Une augmentation de la diastéréosélectivité devrait alors être observée dans ce cas (formation de l'intermédiaire diphenolique lente). Comme pour le lactol **118**, les désaromatisations des lactols **154**, **157** et **160** ont été réalisées en ajoutant l'IBX de façon simultanée à l'acide trifluoroacétique (*Tableau 3*)



P	Rendement	r. d.
-TBDMS	50 %	51/49
-PMB	45 %	70/30
-Bn	32 %	71/29

Tableau 3 : Rapport diastéréomérique en fonction du groupement protecteur de la position « sud ».

Comme prévu, la présence d'un groupement protecteur silylé très labile en condition acide conduit à une chute de la diastéréosélectivité (50/50). Ensuite, une diastéréosélectivité moindre est identifiée dans le cas d'un lactol présentant un éther *p*-méthoxybenzylique. Enfin, de façon surprenante, un éther benzylique en position sud ne conduit pas à une amélioration du rapport diastéréomérique. Ces résultats devraient donc être confirmés en étudiant par RMN ¹H l'évolution de la déprotection des phénols présent sur l'ion dihydropyrylium sans ajout d'IBX.

Premier cas : Groupement protecteur = -TBDMS

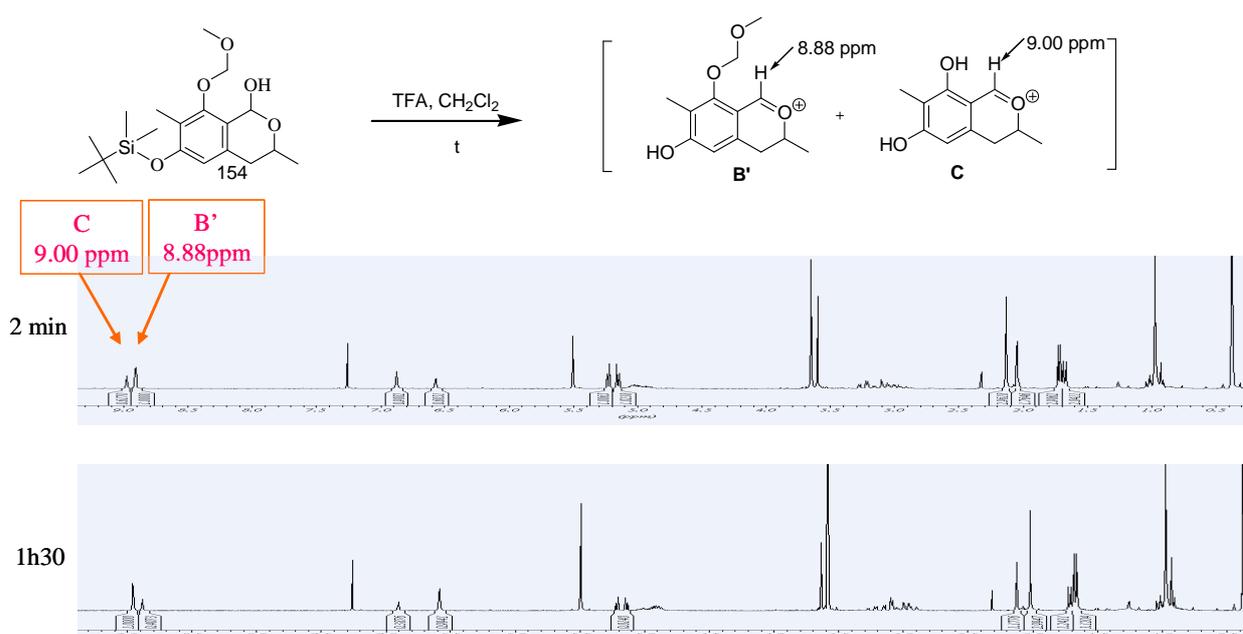


Schéma 62 : suivi RMN de la déprotection de l'intermédiaire réactionnel du lactol 154.

Dans ce premier cas (*Schéma 62*), une troisième espèce, encore jamais observée, apparaît au bout de deux minutes avec un déplacement chimique de 8.88 ppm. Celle-ci correspond au produit de monodeprotection **B'** de la position sud. En effet, il bien est connu que les éthers de phénols silylés sont très labiles en milieu acide. Cet intermédiaire réactionnel conduit alors au mélange 50/50 des deux diastéréoisomères confirmant l'importance de la protection du phénol sud sur la diastéréosélectivité. Enfin, après 1h30, le produit diphénolique **C** correspondant au pic à 9.0 ppm est formé de façon majoritaire.

Deuxième cas : Groupement protecteur = -PMB

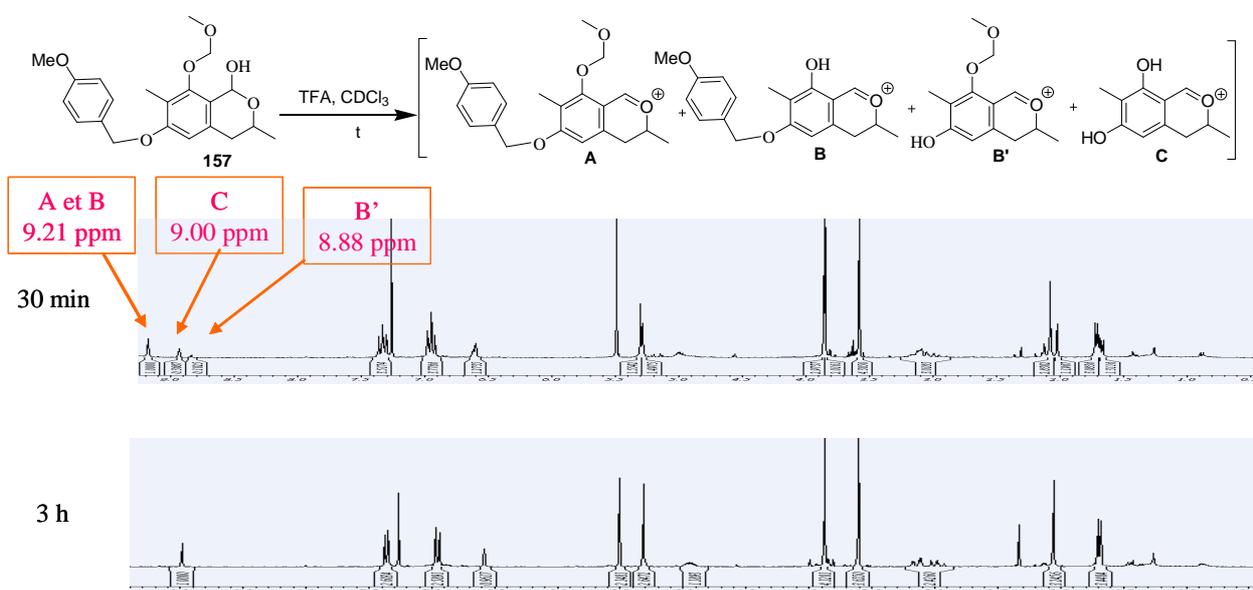


Schéma 63 : Suivi RMN de la déprotection de l'intermédiaire réactionnel du lactol 157.

Aucune amélioration de l'excès diastéréomérique n'a été observé lorsque le groupement protecteur de la position sud est un *p*-méthoxybenzyle. Ceci est dû à la labilité supérieure des PMB en comparaison aux MOM (*Schéma 63*). En effet, dans ce cas, trois espèces sont observées sur le suivi RMN contrôle. A $t = 30$ min., les intermédiaire **A** et **B** sont présents de façon majoritaires. Cependant, et contrairement au cas de la double protection par des éthers de MOM, une trace de l'intermédiaire **B'** ayant un déplacement chimique de 8.88 ppm est alors identifié. Ceci démontre donc que l'éther de PMB est moins stable que l'éther de MOM en présence de TFA. Enfin, après 3h de réaction, seul le pic à 9.00 ppm correspondant à l'intermédiaire **C** est identifié.

Ceci pourrait être expliqué par la grande stabilité du carbocation *p*-méthoxybenzylique formé en milieu acide (*Schéma 64*).

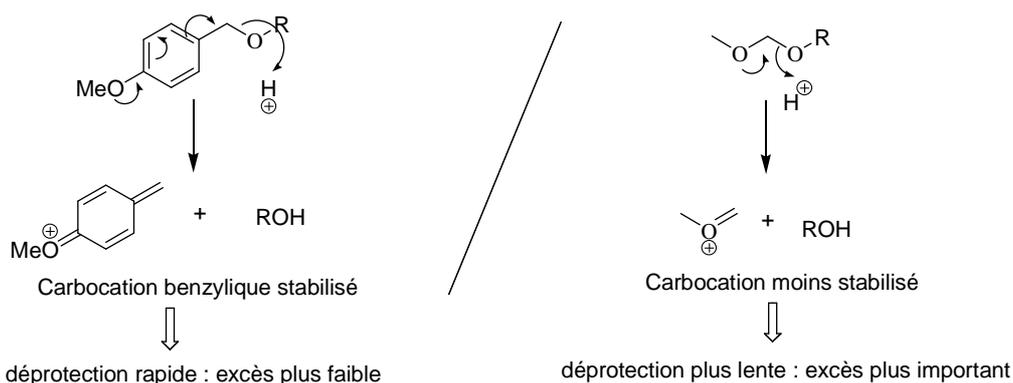


Schéma 64 : Explication mécanistique de la plus faible stabilité des éthers phénolique de p-méthoxybenzyle vis-à-vis des éthers méthoxyméthyliques

Ce résultat confirme encore une fois notre hypothèse de départ concernant l'importance de la stabilité du groupement protecteur en position sud sur la discrimination diastéréofaciale de l'oxydation. En effet, le groupement PMB étant moins stable que les groupements MOM dans les conditions réactionnelles, celui-ci conduit à un rapport diastéréomérique plus faible.

Troisième cas : Groupement protecteur = -Bn

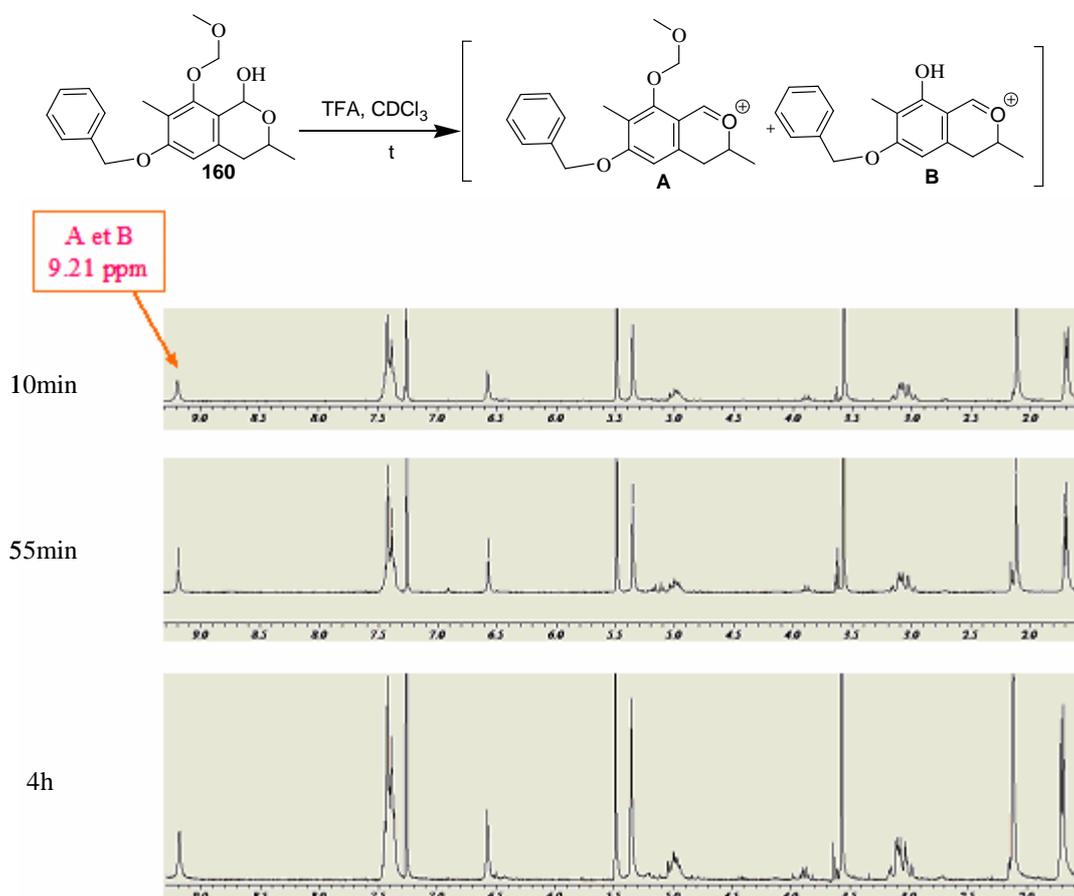


Schéma 65 : Suivi RMN de la déprotection de l'intermédiaire réactionnel du lactol 160

Malgré une grande stabilité du groupement protecteur en position sud (uniquement le pic à 9.20 ppm présent au bout de 4h correspondant aux formes A ou B protégée en position sud, *Schéma 65*), l'oxydation conduit à un mélange 70/30 des deux diastéréoisomères.

Cette contre-expérience semble contredire l'hypothèse mécanistique précédemment envisagée. En effet, bien que le phénol en position sud soit protégé et semble stable dans les conditions acides réactionnelles (pas de pic à 9.00 ppm ni à 8.88 ppm), une faible diastéréosélectivité est observée. Ainsi, seul un rapport 70/30 est finalement obtenu. Une explication probable peut permettre de comprendre ce résultat surprenant : c'est l'IBX qui déprotège l'éther de phénol benzylique en position sud.

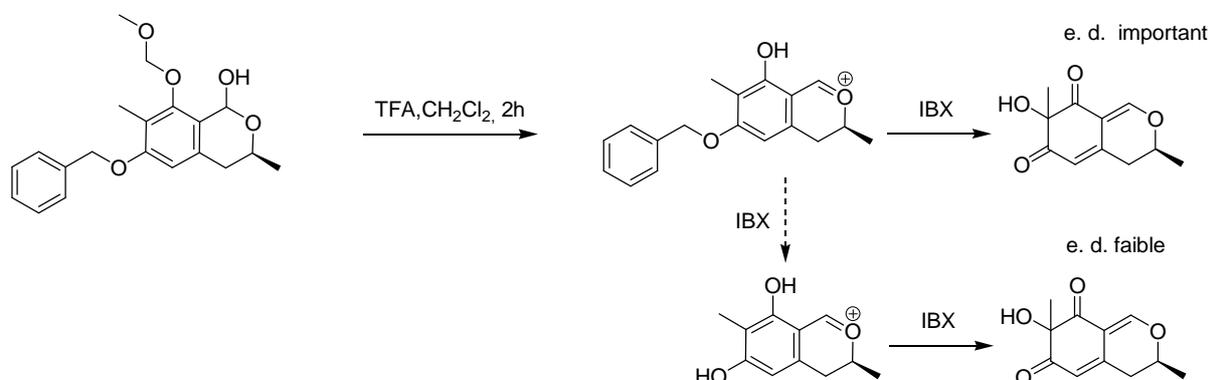


Schéma 66 : Probable explication de la chute de diastéréosélectivité malgré la haute stabilité de l'éther de phénol benzylique en milieu acide.

Cette déprotection de phénols protégés sous forme d'éther benzylique par des dérivés de l'iode hypervalent a déjà été reportée ces dernières années¹²⁰. Il donc est probable qu'un mécanisme oxydatif comparable de type radicalaire (Single électron Transfert. SET) soit à l'origine de la déprotection du groupement benzylique en position sud et induise une chute de la diastéréosélectivité (*Schéma 67*).

(120) Nicolau, K., C.; Montagnon, T. ; Baran, P., S. ; Zhong, Y., -L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, **2245**

En ce sens, un rendement plus faible en alcool (32%) provenant de la consommation d'un équivalent d'IBX permettrait de confirmer cette hypothèse.

Mécanisme SET transposé à notre intermédiaire

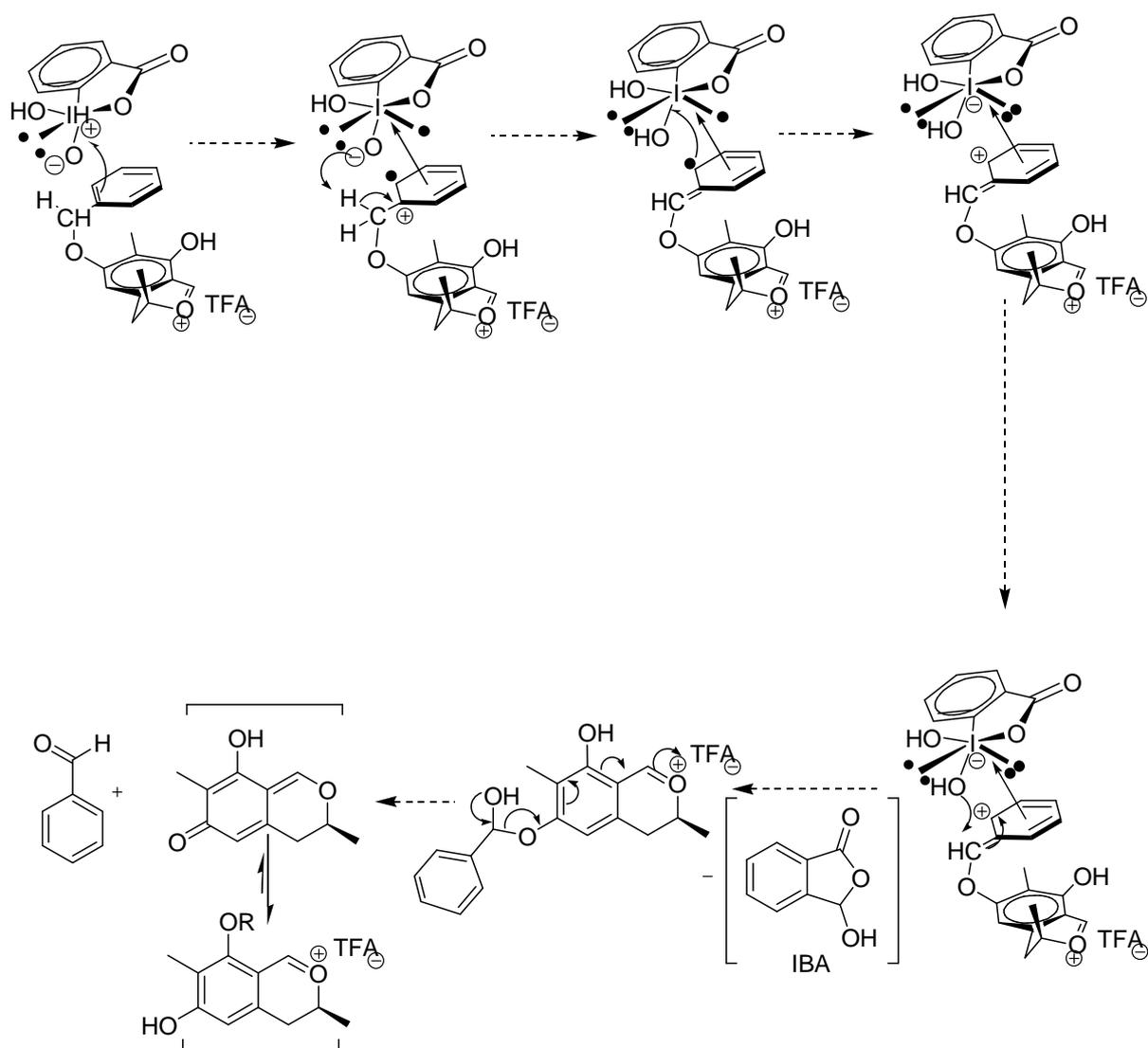


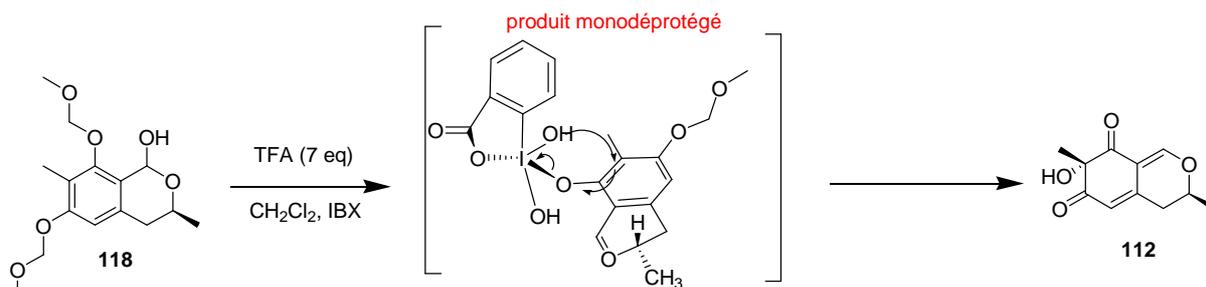
Schéma 67 : Déprotection du phénol benzylé en présence d'IBX selon un mécanisme SET.

Mécanisme proposé :

De nombreux essais de séparation des deux diastéréoisomères **112** ont été réalisés en vue de leur identification, cependant, aucun n'a aboutit. En effet, malgré son acétalysation en ester *p*-nitrobenzoïque, afin de faciliter une séparation des énantiomères, suivie d'une tentative de purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi préparative, aucune séparation n'a pu être réalisée.. Bien que l'identification de l'isomère majoritaire n'ait pu être effectuée jusqu'à présent, et que, de ce fait, aucune certitude n'est acquise concernant la diastéréosélectivité de l'oxydation, un premier mécanisme pourrait être proposé aux vues des suivis RMN.

En effet, après liaison de l'IBX sur l'intermédiaire déprotégé sélectivement sur la position nord, une répulsion stérique de l'IBX au méthyle dihydropyranique conduirait à une discrimination diastéréofaciale et mènerait dans un premier temps à un diastéréoisomère majoritaire (*Schéma 68*). Dans le cas des composés diphenoliques, l'IBX pourrait se complexer aux deux phénols mais préférentiellement au phénol sud plus accessible. Aucune répulsion stérique au méthyle dihydropyranique ne serait ainsi possible (*Schéma 62*).

A - Le phénol nord est déprotégé : 1 seul diastéréomère majoritaire (**non-déterminé** / **RX en cours**)



Pas de transfert d'oxygène sur la face inférieure
car répulsion stérique entre l'IBX et le méthyle dihydropyranique

Schéma 68 : Une seule possibilité de liaison de l'IBX sur l'intermédiaire dans le cas du produit monodéprotégé.

B - Les deux phénols sont déprotégés : 2 diastéréomères 50/50. Deux possibilités d'accroche à l'IBX mais l'accroche « sud » serait majoritaire car moins encombrée et plus loin du méthyle dihydropyranique ne conduisant pas à une discrimination diastéréofaciale.

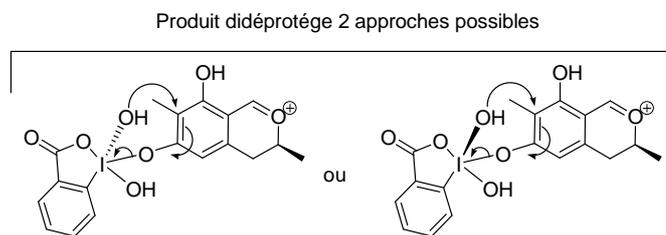


Schéma 69 : Mise évidence de la perte de diastéréosélectivité sur l'intermédiaire diphénolique.

3. 2. 2. 4. Optimisation du rendement.

- Pour l'obtention de l'alcool modèle 25

Une faible reproductibilité dans les rendements en alcool désaromatisé a été observée tout au long de cette étude. En effet, un rendement supérieur à 50% n'a, à ce stade, jamais pu être obtenu malgré une conversion totale en produit désiré sur le suivi RMN ; les conditions d'hydrolyse semblant donc jouer un rôle primordial dans la quantité d'alcool isolé.

Tous les essais réalisés subissaient jusqu'alors un lavage intensif en fin de réaction par de l'hydrogencarbonate de sodium saturé afin de séparer les résidus d'IBX difficilement séparables sur gel de silice. Il s'en suivait une forte coloration violette de la phase aqueuse. Après différents essais, il est apparu que l'alcool se dégradait proportionnellement aux nombres de lavages basiques. Un nouveau protocole a donc été mis en place.

- 1 - Filtration des résidus d'IBX et lavage des insolubles par CH_2Cl_2 .
- 2 - Evaporation à sec du filtrat.
- 3 - Préparation d'un dépôt de silice puis purification.

Ce protocole a pu permettre l'obtention de 64 % de produit désiré. Bien que satisfaisant, le rendement a été une nouvelle fois optimisé et pour ce faire, un modèle ne présentant pas de carbone stéréogène au pied de l'oxygène dihydropyranique a été synthétisé afin de simplifier le spectre RMN observable sur le brut réactionnel (pas de diastéréoisomères). Ceci permettra alors de juger de façon plus aisée le ou les produits présents dans le brut réactionnel. De plus, l'obtention de cet alcool pourrait finalement permettre l'accès et l'évaluation d'une nouvelle lignée de molécules proche de l'épicocconone.

- Pour l'obtention de l'alcool modèle **164**:

Cette partie s'inscrit dans le cadre de la thèse d'Agathe Boulangé. De façon similaire, l'alcool **164** présentant deux méthyles au pied de l'oxygène dihydropyranique a été obtenu avec un rendement global de 31 % en 7 étapes en changeant l'époxyde ouvert par une espèce orthométallée (*Schéma 70*).

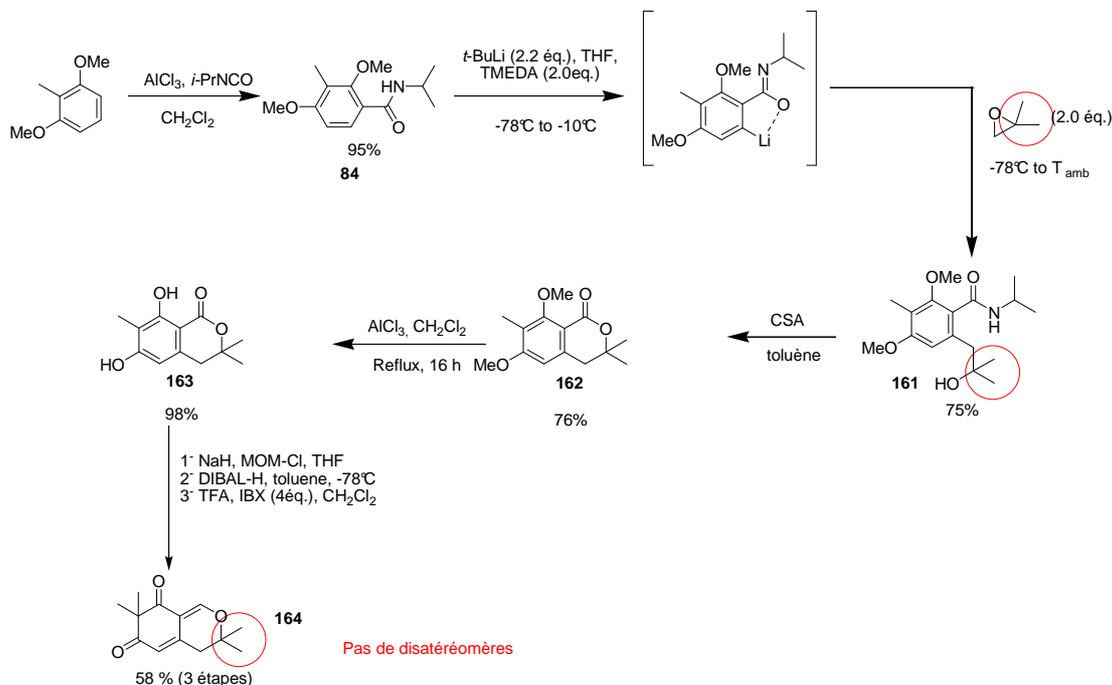


Schéma 70 : Synthèse en 8 étapes de l'alcool diméthylé.

L'analyse du brut réactionnel lors de la dernière étape d'oxydation a permis de mieux comprendre la perte de produit obtenu lors des essais en série précédente. En effet, dans ce cas, le spectre RMN est véritablement simplifié (*Schéma 71*). Celui-ci a permis d'identifier, en plus de l'alcool **164**, une espèce présente à 40% dans le brut réactionnel. Cette espèce désaromatisée correspond à l'intermédiaire réactionnel, un adduit d'IBX de l'alcool désiré. Cet adduit est finalement « hydrolysé » au cours de la purification et conduit au relargage de l'alcool sur l'ensemble du gel de silice. Il semblerait donc que la perte majeure de produit de désaromatisation oxydante soit due à un adduit d'IBX présent dans le brut réactionnel. Un essai d'« hydrolyse » de cet intermédiaire sur petite quantité a alors été entrepris afin d'identifier uniquement le produit désiré sur le brut réactionnel (Les lavages par des réducteurs aqueux conduisent comme c'est le cas pour les lavages basiques à une dégradation du produit désiré). Ainsi, le brut réactionnel a été placé dans 5 mL de CDCl₃ en présence de silice (*Schéma 71*). Après 2 jours de réaction, uniquement l'alcool de désaromatisation est observé.

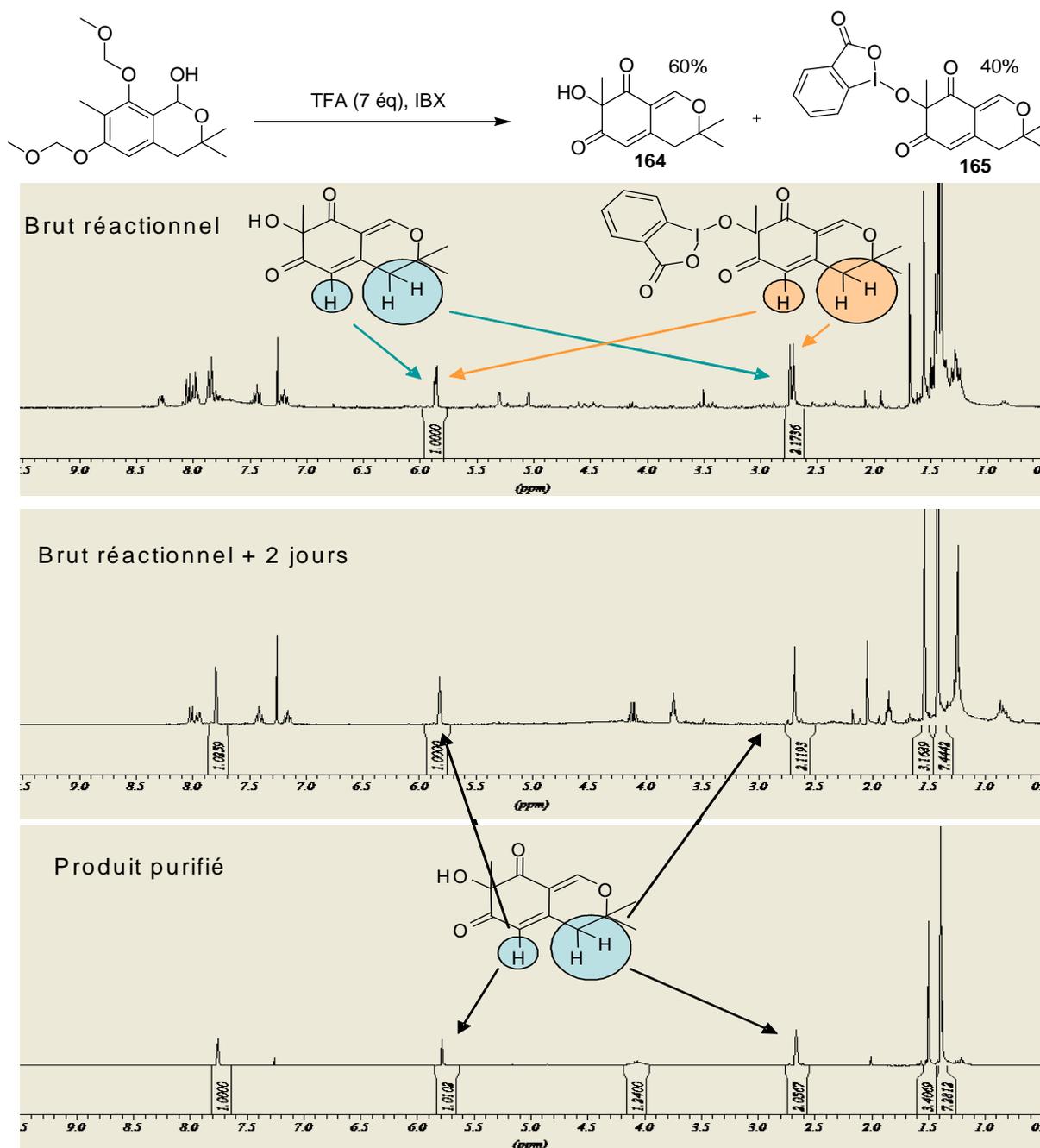


Schéma 71 : Suivi en RMN du ^1H de la cassure des adduits d'IBX par de la silice après deux jours de réaction.

Sur petite quantité, une hydrolyse des adduits d'IBX a ainsi pu être réalisée (résolution en un seul pic aussi bien à 2.5 qu'à 5.8 ppm). Cependant, cette méthode n'a malheureusement pas montré une bonne reproductibilité dans l'« hydrolyse » des adduits de dérivés d'IBX sur plus grosse quantité (problèmes de solubilité des dérivés d'IBX dans les solvants utilisés – prise en masse de la silice). Afin de trouver une réactivité similaire à la silice en milieu homogène, le brut réactionnel après évaporation a alors été solubilisé dans du méthanol avec ou sans TFA (Schéma 72). Après 10h de réaction, aucune évolution n'est observée sur le suivi RMN.

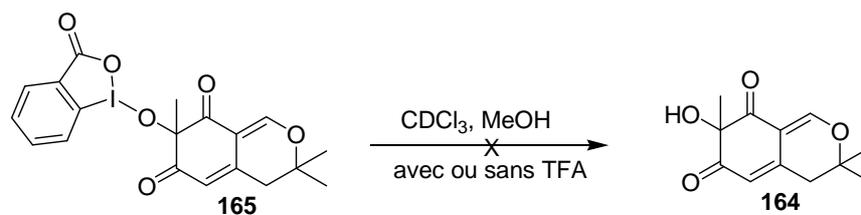


Schéma 72 : Aucune hydrolyse des adduits en solution dans le MeOH avec ou sans TFA.

Finalement, c'est l'utilisation de réducteur en milieu organique (cyanoborohydrures de sodium) qui a permis d'obtenir une hydrolyse correcte des adduits d'IBX (*Schéma 73*) et ainsi d'augmenter le rendement en produit purifié. D'autres réducteur sont actuellement à l'étude afin de s'affranchir des cyanures libérés par de l'utilisation de NaBH_3CN .

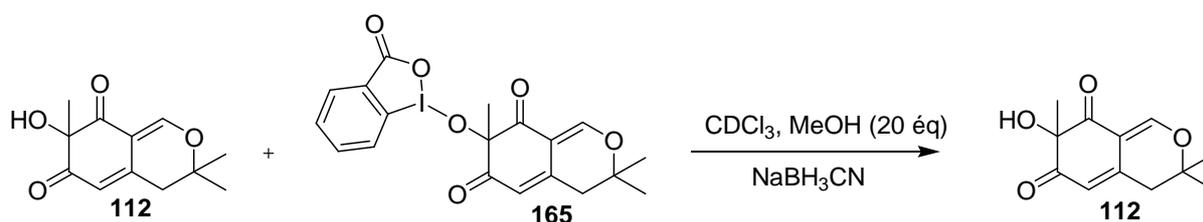


Schéma 73 : réduction des adduits d'iode hypervalent en présence de réducteur soluble en milieu organique

Une synthèse hautement convergente conduisant à l'alcool tertiaire **112** issu de la désaromatisation oxydante a donc été réalisée sur deux molécules modèles (un ou deux méthyles au pied de l'oxygène dihydropyranique). Ceci peut ouvrir maintenant la voie à la synthèse du produit naturel. Dans le cadre de cette synthèse, il faut distinguer deux étapes déterminantes : l'ouverture d'un époxyde par une espèce orthométallée et une réaction de désaromatisation oxydante.

Le suivi par RMN de la désaromatisation oxydante a permis de déterminer la nature d'un intermédiaire réactionnel de type ion dihydropyrylium. Ceci a finalement conduit à la compréhension du mécanisme réactionnel permettant d'optimiser le rendement de la réaction. De plus, une diastéréoselection par ω -transfert (transfert de chiralité à longue distance) a été observé sur l'analogue monométhylé et a permis d'obtenir le produit désiré avec un rapport diastéréomérique de 85/15.

L'étape suivante dans le but de synthétiser l'épicocconone et des analogues est donc la formation d'un cycle furanonique préfonctionnalisé.

4. FORMATION D'ACYLFURANONE ET D'ACYLPYRANONE PAR OUVERTURE DE DIOXINONES.

4.1. Etude la réactivité d'acylcétène sur des α -hydroxycétones (formation de cycle à 5 chaînons).

Après avoir obtenu l'alcool quaternaire préalablement envisagé dans le schéma rétrosynthétique, l'étape suivante correspond à l'introduction du motif furanone et de la chaîne polyinsaturée (*Schéma 74*).

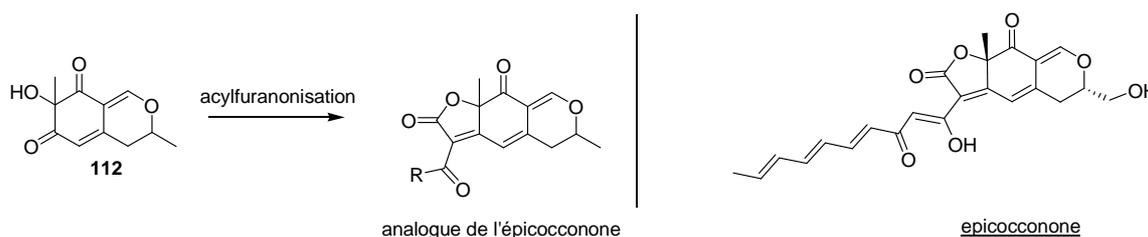


Schéma 74 : Formation d'acylfuranone à partir d'une α -hydroxycétone.

4.1.1. Rappels bibliographiques.

4.1.1.1. Furanones par utilisation d'acylcétènes ou équivalent synthétique.

Les furanones fonctionnalisés en position 3 et 5 sont des composés présent dans de nombreux produits naturels^{121,122,123,124,125} ou synthétiques^{126,127} à activité biologique (*Figure 29*).

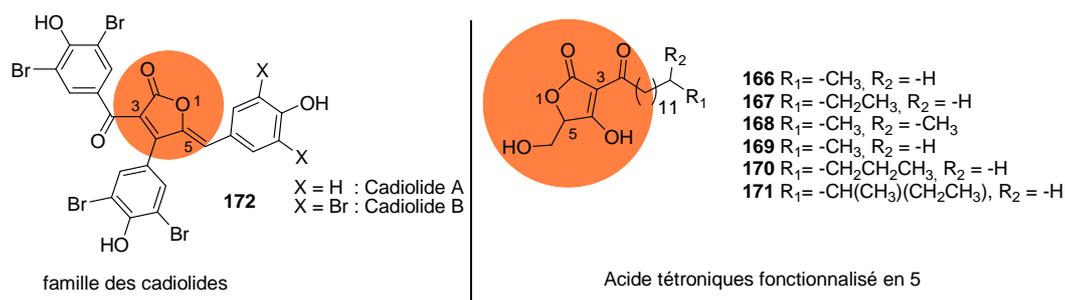


Figure 29 : Produit naturel possédant des furanones acylées en position 3

- (121) Ley, S., V.; Clase, J., A.; Mansfield, D., J.; Osborn, H., M., I., *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, 33, 1533-1544
- (122) Tsuchida, T.; Inuma, H.; Nishida, C.; Kinoshita, N.; Sawa, T.; Amada, M.; Takenchi, T. *J. Antibiot.* **1995**, 48, 1104-1109
- (123) Werner, A.; Hadacek, F. *Phytochem. Anal.* **1995**, 6, 218-223.
- (124) Hung, H.; Comins, D., L., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 391-392
- (125) Monde, I., C.; Takasugi, M.; Katsui, N.; Masamune, T. *Chem. Lett.* **1990**, 1283-1285
- (126) Yokota, M.; Masayuki, Y.; Yanagisawa, T.; Kosakai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 865-871.
- (127) Pshenichnyj, G.V.; Mashenkov, V.A.; Hevskii, L.S. *Khim. Geterotsykl. Soedin.* **1986**, 1371-1374.

C'est notamment le cas pour les molécules portant des unités d'acides tétroniques **166**, **167**, **168**, **169**, **170** et **171** (furanones acylées en position 3) qui sont des composés naturels isolés ayant montré de activité inhibitrice de la protease HIV-1. En effet, la capacité de l'acide 3-acyl-5-(hydroxyméthyl)-tétronique à inhiber aussi bien les protéases du virus du sida¹²⁸ que les phospholipases A₂¹²⁹ a conduit au développement de nouvelles méthodes synthétiques de formation de ce type de composés¹³⁰. Ces synthèses sont ainsi généralement réalisées à partir des furanes¹³¹, de furanones^{132,133,134} nues ou bien encore d' α -hydroxycétone en présence d'ester activés en conditions basiques.

A partir d' α -hydroxycarbone :

La première méthode de formation d'acylfuranone a été reportée en 1954 par le groupe du Pr Lacey¹³⁵ (*Schéma 75*). Cette méthode a d'ailleurs été reprise par le groupe du Pr. More¹³⁶ en 1988 pour la synthèse de dérivés d'acide tétronique.

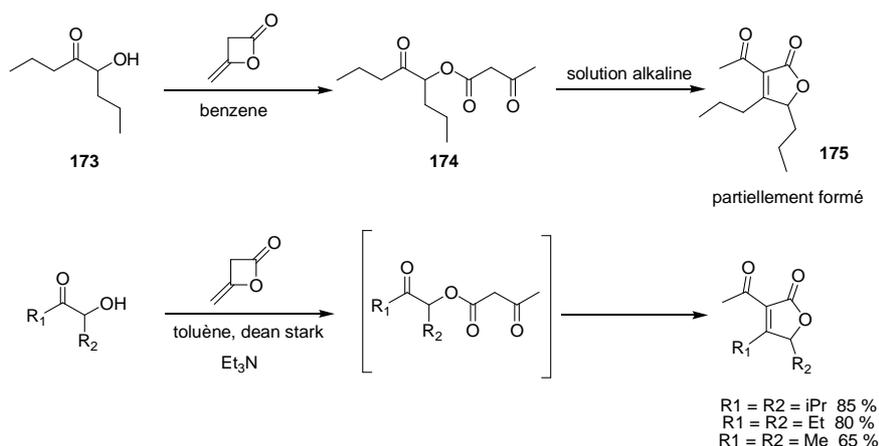


Schéma 75 : Première formation « one-pot » de γ -lactones

Elle comprend deux étapes. La première correspond à l'addition de l'alcool d'un α -hydroxycarbone sur le dièteène (conduisant au β -cétoester **174** après ouverture par un nucléophile). Une cyclisation de l'acétoacétate **174** résultant sur le carbonyle présent en α est alors possible en milieu basique à chaud pour conduire à la 3-acylfuranone correspondante.

- (128) Koggo, B.E., Hug, P., Moss, S.; Laschdo, F.; Peter, H., H., *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 143-147.
(129) Schiehser, G.A.; Cautield, C.E., Senko, N.A.; Von Burg, G.F. *US 5,366,993* **1994**
(130) Rao, Y.S. *Chem. Rev.* **1976**, *76*, 625-693
(131) Oraziano, M., L.; Iesce, M., I. *Synthesis* **1985**, 1151-1153.
(132) Honda, T.; Mizutani, K.; Kanai, I., C., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9374-9378.
(133) Matsuo, K., Arase, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 2091-2094.
(134) Matsuo, IC, Hasuike, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2803-2806.
(135) Lacey, R., N., *J. Chem. Soc.* **1954**, 816-822
(136) Ager, D.J.; Mole, S.J. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1807-1810.

Des essais monotopes ont pu, dans certains cas, conduire aux lactones désirées mais des réactions secondaires et des problèmes d'élimination d'eau n'ont pas permis de rendre la méthode généralisable à l'ensemble des carbonyles en α -hydroxylés (rendements également conditionnés par leurs températures d'ébullition).

C'est en 1998 qu'une évolution de cette méthode a été reportée par le groupe du Pr. Kulinkovich¹³⁷ : l'addition d'une α -hydroxycétone sur un β -cétoester suivi d'une cyclisation par réaction de Knoevenagel de façon monotope (*Schéma 76*). Ceci conduit alors aux composés désirés avec des rendements variables.

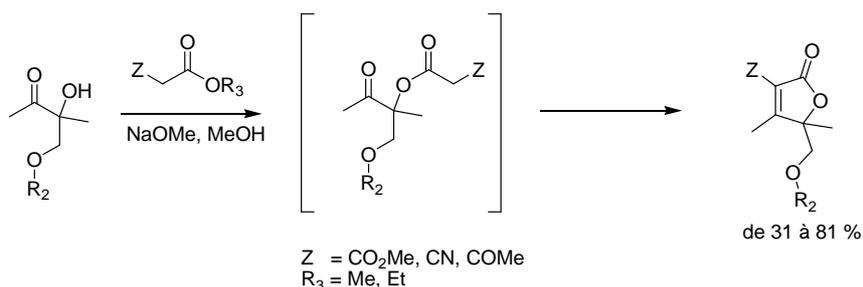


Schéma 76 : Synthèse de d'acylfuranones monotope

De mauvais rendements ont été obtenus dans le cas d'alcool fortement encombrés (*Schéma 77*). Ceci représente une limitation majeure de cette méthode qui n'est, ainsi, pas généralisable. En effet, dans ce cas, il a été montré que l'encombrement stérique autour de l'alcool jouait un rôle déterminant. Ainsi, en présence de deux méthyles en position β de la cétone (composé **178**), aucune trace de produit désiré n'est observé.

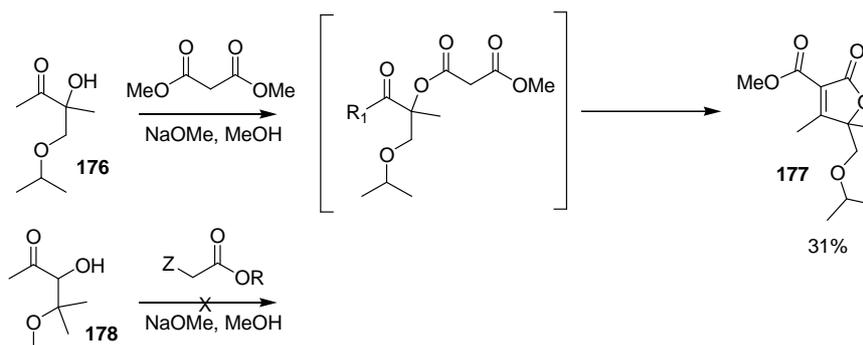


Schéma 77 : Limitation de la méthode - alcools encombrés.

Aux vues des résultats reportés dans la bibliographie, il apparaît donc que la synthèse de ce type de composés pourrait donc se faire de façon monotope mais qu'elle nécessiterait une addition facilitée de l'alcool sur le synthon dicarboxylé avant cyclisation.

(137) Tyvorskii, V., I.; Kukharev, A., S.; Kulinkovich, O., G. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 1801-1808.

4. 1. 1. 2. Utilisation de dioxinones comme précurseurs aux acylcétènes.

De part leur grande réactivité, les acylcétènes semblent être d'excellents synthons pour accéder à des acylfuranones à partir d' α -hydroxycétone. En effet, à l'issue de l'addition très favorisée d'un nucléophile sur le cétène (pas de problème lié à l'encombrement de l'alcool) un énolate est généré et peut réaliser une cyclisation de type Knoevenagel sur la cétone en α (*Schéma 78*).

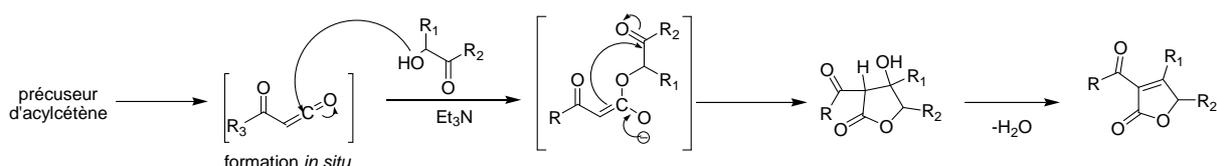


Schéma 78 : Possible formation d'acylfuranone par utilisation d'acylcétène.

- Généralités sur les acylcétènes¹³⁸ :

Les acylcétènes **182** sont des outils très intéressants en chimie organique (*Schéma 79*). Ils peuvent être générés *via* thermolyse ou photolyse de dioxinones **181**¹³⁹, de β -cétioester **179**¹⁴⁰ ou bien encore de diazodicétones **185**¹²² (par réarrangement de Wolff).

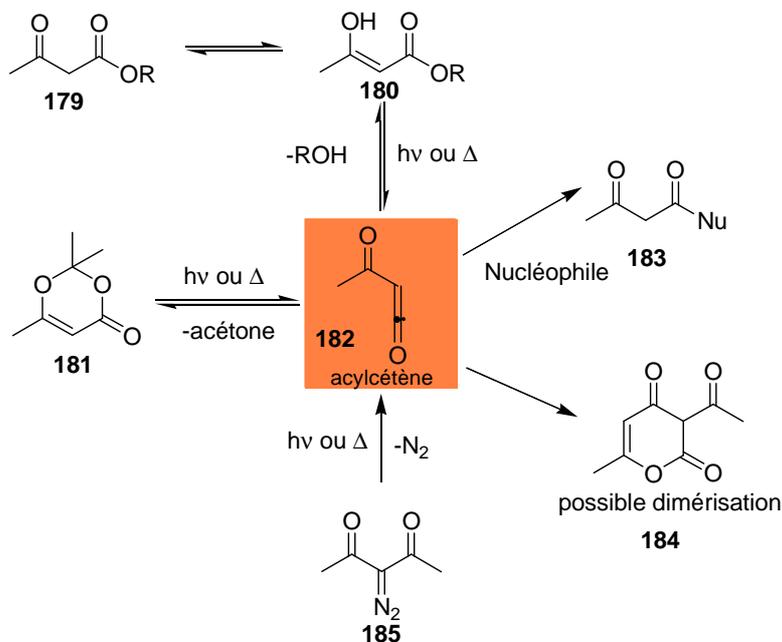


Schéma 79 : Accès aux acylcétènes.

(138) Bell, K.; Sadasivam, D., V.; Gudipati, I., R.; Ji, H.; Birney, J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1295–1297.

(139) Clemens, R. J.; Hyatt, J. A. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2431–2435.

(140) Wentrup, C.; Heilmayer, W.; Kollenz, G. *Synthesis* **1994**, 1219–1248.

Bien que très approprié, l'utilisation de tels synthons en synthèse organique présente certaines limitations. En effet, la formation des acylcétènes (dans le cas des dioxinones ou dans le cas des acétoacétates) est réversible et suppose donc qu'ils soient piégés par un nucléophile plus réactif que le produit éliminé. Dans le cas de précurseurs de type diazo, bien qu'irréversibles, leur explosivité limite leur emploi.

Cette réactivité vis-à-vis des nucléophiles est également observée pour le diketene **186** (*Schéma 80* - Il ne s'ouvre toutefois pas en acylcétène). Malheureusement, celui-ci est difficilement accessible sur le marché car très instable. De plus, l'accès aux diketenes différemment substitués n'a, à notre connaissance, jamais été décrit dans la littérature.

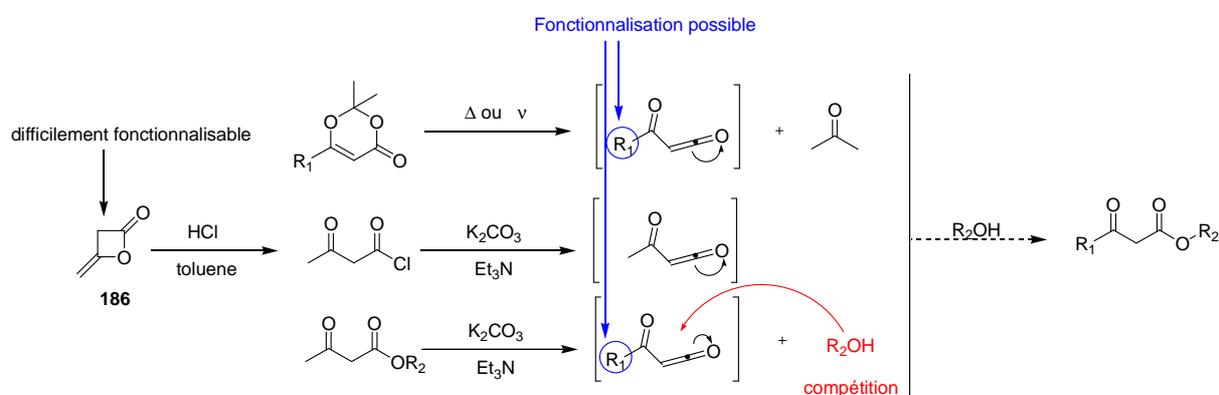


Schéma 80 : comparaison diketene – acétoacétate - dioxinones.

Enfin, bien que les acétoacétates soient de bons précurseurs d'acylcétènes, leur décomposition entraîne la libération d'un alcool (*Schéma 80* -R₂OH) qui peut générer le piégeage de l'acylcétène par un alcool plus encombré. L'absence d'alcools résiduels dans le milieu après formation de l'acylcétène rend, de ce fait, les dioxinones bien plus intéressantes que les acétoacétates dans l'optique de piéger un acylcétène par un alcool tertiaire encombré (synthèse d'analogues de l'épicocconone).

L'étude et l'application de la méthodologie de synthèse d'acylfuranones à partir d' α -hydroxycétones et de dioxinones (jamais reporté) s'inscrit ainsi parfaitement dans le cadre de ce travail. Cela a finalement conduit au développement d'une troisième étape clé (introduction du cycle acylfuranonique) pour la synthèse d'analogues de l'épicocconone. (*Schéma 81*).

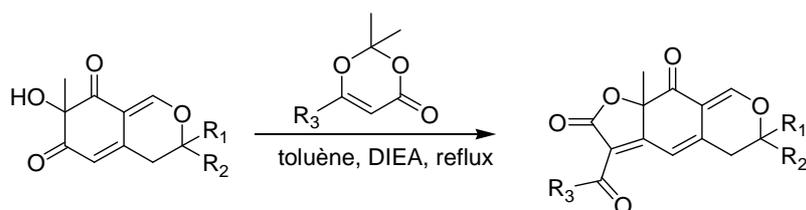


Schéma 81 : Utilisation de dioxinones pour la synthèse de cycles furanoniques fonctionnalisés

La possibilité de fonctionnaliser facilement les dioxinones représente un deuxième avantage pour l'utilisation de telles molécules dans la synthèse d'analogues de l'épicocconone. Il convient donc à ce stade d'analyser les différentes méthodes de synthèse référencées dans la bibliographie.

- Synthèse des dioxinones

La création de synthons polyvalents utilisables pour une grande variété de composés est un des buts majeurs en synthèse organique. Ainsi, la possibilité de faire varier un des substituants sur un squelette commun tels que celui des dioxinones ouvrent la voie à une généralisation presque totale dans le cadre d'utilisation d'intermédiaires de type acylcétènes. Entre 1983 et 1990, le groupe du Pr. Sato a décrit deux voies d'accès plus générales à ce type de composés. La première s'articule autour de la réactivité de β -cétoacide¹⁴¹ ou encore de β -cetoester *t*-butylique¹⁴² en condition acide. La seconde fait intervenir un acide de Meldrum à chaud¹⁴³.

Utilisation de β -cetoacide ou de β -cetoester :

Cette méthode consiste à mettre un β -cétoacide ou ses dérivés esters *t*-butyliques (déprotégés *in situ*) en présence d'une cétone (généralement l'acétone ou un équivalent synthétique) en condition acide (**Schéma 82**). L'accès aisé à ce type de précurseur peut ainsi permettre l'obtention d'une grande variété de dioxinones.

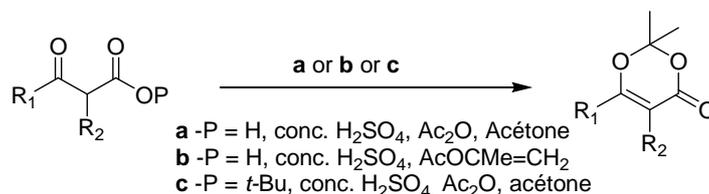


Schéma 82 : Synthèse de dioxinones à partir de β -cétoacide ou de β -cetoester *t*-butylique.

-
- (141) Sato, M.; Ogasawara, K.; OI, K.; Kato, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 1896.
(142) Heneger, K., E.; Winkler, J., D. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1051.
(143) Sato, M.; Sekigushi, K.; Osagawara, H.; Kaneko, C. *Synthesis* **1985**, 224.

Une faible sensibilité au groupement R₁ et R₂ est observée confirmant la généralité de la méthode pour des substrats stables en milieu acide.

Utilisation de dérivés d'acide de Meldrum :

Cette deuxième approche permet d'envisager la synthèse de composés précurseurs portant des substituants instables en condition acides. Elle reste toutefois limitée car il est nécessaire de chauffer dans le toluène en présence d'une cétone pour observer la formation de la dioxinone désirée. La synthèse de dioxinones différemment fonctionnalisées est réalisée en 2 étapes : acylation d'un acide de meldrum et ouverture en acylcétène (*Schéma 83*).

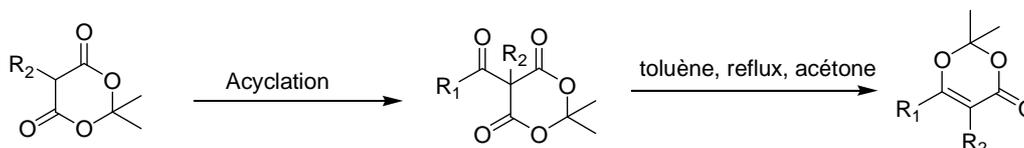


Schéma 83 : Synthèse de dioxinones fonctionnalisées à partir d'acides de Meldrum.

4. 1. 2. Etude méthodologique.

Afin de mettre en place une méthode efficace de synthèse d'acylfuranones pour l'obtention d'un analogue de l'épicocconone, une étude méthodologique sur des modèles moléculaires a alors été engagée. Ainsi, un procédé monotope d'addition/cyclisation d'une α -hydroxycétone sur un acylcétène provenant de l'ouverture de dioxinones a été réalisé.

4. 1. 2. 1. Essai préliminaire.

Le premier essai réalisé à partir de la 3-hydroxy-3-méthylbutan-2-one à reflux du toluène en présence de 1.05 éq de 6-méthyl-1,3-dioxin-4-ones et de 2 éq de diisopropylethylamine (DIEA) a permis d'obtenir le produit désiré avec 71% de rendement (*Schéma 84*).

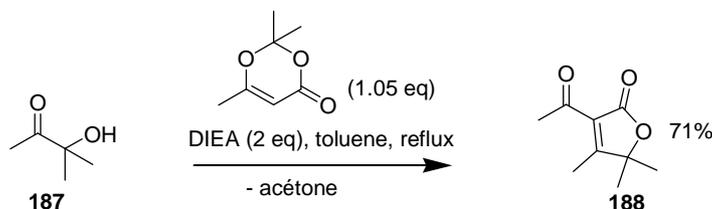


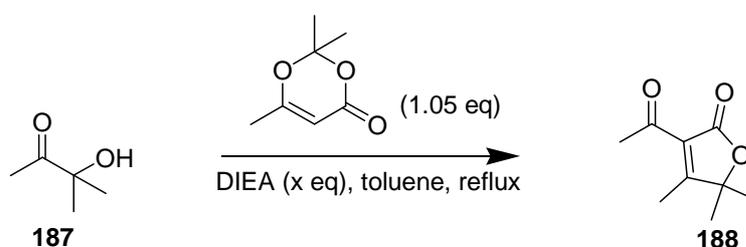
Schéma 84 : Premier essai de cyclisation par une dioxinone en présence d'une base tertiaire.

Ce premier résultat satisfaisant valide le synthon acylcétène pour réaliser cette addition-cyclisation de façon monotope. De plus, un spectre RMN très propre du brut réactionnel permet d'envisager une très bonne chimiosélectivité.

Afin d'optimiser le rendement de cette réaction, une variation des conditions opératoires a alors été entamée.

4. 1. 2. 2. Influence de la quantité de base nécessaire.

Une variation de la quantité de base introduite a été envisagée (*Tableau 4*). Ainsi, le même alcool a été mis en réaction au reflux du toluène en présence d'une quantité décroissante de base azotée tertiaire (DIEA) et de 2 éq de dioxinone.



Dioxinone	DIEA (x éq)	Toluene	yield
1.05 éq	2 éq	15 mL	71 %
1.05 éq	1 éq	15 mL	64 %
1.05 éq	0.5 éq	15 mL	58 %

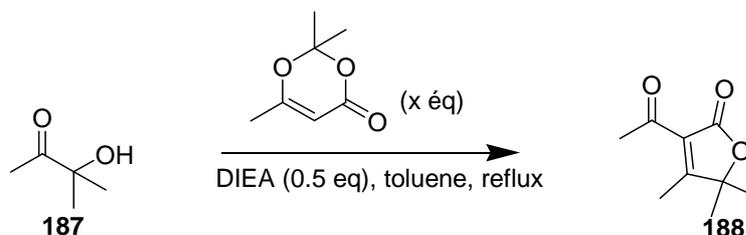
Tableau 4 : Variation de la quantité de base.

Ce tableau laisse apparaître que la quantité de base joue un rôle déterminant dans le rendement obtenu en fin de réaction. En effet, l'utilisation de base de Hunig en quantité stoechiométrique ou sous-stoechiométrique ne permet pas d'atteindre les 71 % de rendement observés lorsque deux équivalents de base sont additionnés.

Cependant, l'analyse RMN du brut réactionnel de l'expérience réalisée en condition sous-stœchiométrique ne laisse pas apparaître les sous-produits minoritaires observés dans les autres cas. Ceci laisse donc penser que la quantité optimale de base est bien 0.5 équivalent mais que l'intégralité de la dioxinone n'a pas pu être convertie à cause d'une cinétique trop diminuée de l'addition de l'alcool sur l'acylcétène (perte de l'acylcétène?). Une optimisation de la quantité de dioxinone a alors été envisagée afin d'augmenter le rendement tout en gardant la grande chimiosélectivité observée lors de l'essai réalisé avec 0.5 équivalent de DIEA.

4. 1. 2. 3. Influence de la quantité de dioxinone nécessaire.

Une variation de la quantité de dioxinone a alors été amorcée (*Tableau 5*). Ainsi, le même alcool a été mis en réaction au reflux du toluène en présence d'une quantité croissante de dioxinone et de 0.5 éq de DIEA.



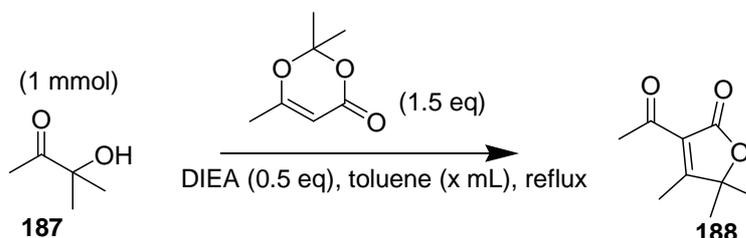
Dioxinone (x éq)	DIEA	Toluene	yield
1.05 éq	0.5 éq	15 mL	58 %
1.20 éq	0.5 éq	15 mL	74 %
1.50 éq	0.5 éq	15 mL	87 %
2.00 éq	0.5 éq	15 mL	83 %

Tableau 5 : Variation de la quantité de dioxinone.

Ces essais laissent apparaître l'importance de la quantité de dioxinone en présence d'une quantité sous-stœchiométrique de base. En effet, le meilleur rendement en produit **188** ainsi qu'une absence de produit de départ ont été observés dans le cas de l'utilisation de 1.5 équivalents de précurseur d'acylcétène (brut réactionnel ne faisant pas apparaître de sous-produit de réaction). A ce stade, un effort supplémentaire d'optimisation en faisant varier la concentration du milieu réactionnel a été abordée afin d'essayer d'obtenir une conversion quantitative du substrat de départ.

4. 1. 2. 4. Influence de la concentration du milieu réactionnel.

Une variation de la quantité de solvant a alors été envisagée (**Tableau 6**). Ainsi, une mmole du même alcool a été mis en réaction au reflux du toluène en présence de 1.5 équivalents de dioxinone et de 0.5 éq de DIEA.



Dioxinone	DIEA	Toluene (x mL)	yield
1.5 éq	0.5 éq	5 mL	84 %
1.5 éq	0.5 éq	10 mL	88 %
1.5 éq	0.5 éq	15 mL	87 %

Tableau 6 : Variation de la quantité de solvant.

Les données reportées dans ce tableau font apparaitre la faible influence de la concentration (une concentration plus importante du milieu réactionnel aurait néanmoins pu être envisagée), de faibles variations dans les rendements en produit isolé ayant été observées. Cependant, deux explications peuvent être mis en avant concernant la non-quantitativité de la réaction (**Schéma 85**):

- 1- Une probable déshydratation de l'alcool en condition basique à chaud pourrait expliquer cette chute de rendement.
2. La libération d'une molécule d'eau à chaud pourrait entrainer une dégradation de l'acylcétène par décarboxylation à chaud.

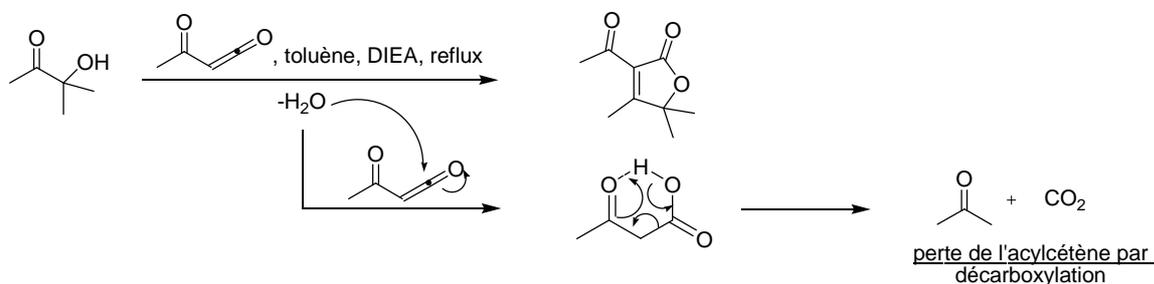


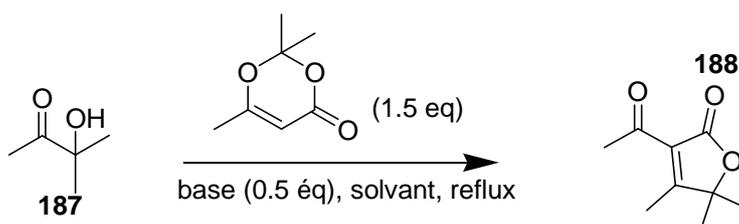
Schéma 85 : Cause probable de non-quantitativité de la réaction.

Au vues des résultats satisfaisants obtenus précédemment (88% de rendement), il n'est pas nécessaire à ce stade d'empêcher la formation d'eau par ajout de tamis moléculaire.

Enfin, la compatibilité de la Et₃N (base ayant une réactivité similaire à la DIEA tout en étant moins onéreuse – T_{eb} = 88°C) ainsi que la solvato-dépendance de cette réaction à été étudiée.

4. 1. 2. 5. Influence de la base et du solvant utilisé.

L'α-hydrocétone **187** modèle a été mise en réaction dans les conditions optimisée en présence de Et₃N et de NMP (*Tableau 7*). Dans ce cas, la NMP est choisie car il est connu que la DMF se dégrade à chaud en libérant des quantités non-négligeable de diméthylamine.



Dioxinone	Base	Solvant	yield
1.5 éq	DIEA 0.5 éq	Toluène 10 mL	88 %
1.5 éq	Et ₃ N 0.5 éq	Toluène 10 mL	83 %
1.5 éq	Et ₃ N 0.5 éq	NMP 10 mL	Polymérisation

Tableau 7 : Changement de la base / de la polarité du solvant.

Aux vues de ces résultats, la triéthylamine semble être la base de choix pour cette réaction par rapport au compromis à trouver entre le rendement et le coût de l'expérience (*entrée 1 et 2*).

L'utilisation de NMP comme solvant à conduit à une polymérisation du milieu réactionnel laissant envisager une meilleure réactivité dans les solvants apolaires. La fragmentation thermique de la dioxinone se réalisant avec une cinétique intéressante vers 100°C, le toluène est donc le candidat idéal pour ce type de réaction.

4. 1. 2. 6. Influence du substrat de départ.

Afin de vérifier la généralité de la méthode mise au point, il convient de tester un substrat de départ supposé moins stable dans les conditions réactionnelles. L'hydroxyacétone a alors été choisie.

En effet, une fois la cyclisation effectuée, les protons dihydrofuraniques sont beaucoup plus acides et peuvent conduire à une dégradation ou bien encore à une polymérisation du produit désiré (*Schéma 86*). Une attaque de l'eau libérée sur le cycle furanonique pourrait également générer de forte dégradation.

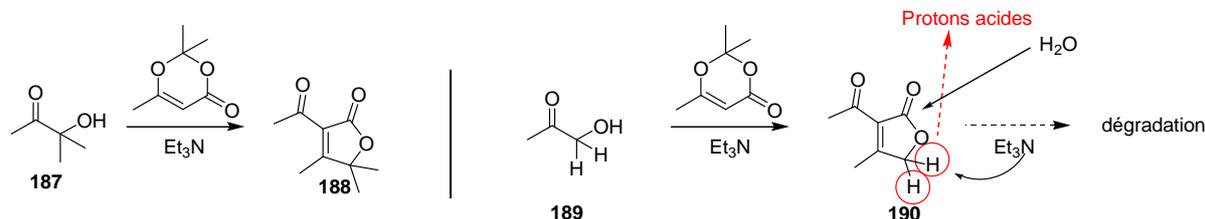
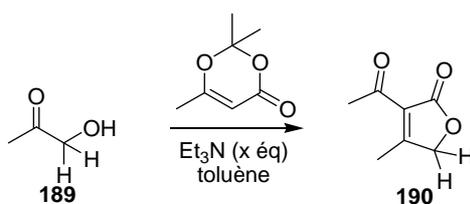


Schéma 86 : Comparaison alcool tertiaire / alcool primaire. Dégradation possible dans le cas d'alcool primaire en présence de base à chaud.

La 3-hydroxypropan-2-one a alors été mise en réaction en présence de 1.5 équivalent de dioxinones à chaud dans le toluène avec respectivement 0.5 et 2 équivalents de triéthylamine (*Tableau 8*).



Dioxinone	Et ₃ N (x éq)	Toluène	Rendement
1.5 éq	0.5 éq	10 mL	58%
1.5 éq	0.5 éq	10 mL	88%*
1.5 éq	2 éq	10 mL	dégradation

Tableau 8 : Importance des conditions réactionnelles - quantité sous-stoechiométriques de base nécessaire et de tamis moléculaire.

Le produit désiré est obtenu avec un rendement de 58% lors de l'utilisation de 0.5 éq de Et₃N (*entrée 1*). Ce tableau reporte donc l'importance primordiale de la quantité de base ajoutée dans ce type de réaction. En effet, l'ajout de 2 équivalents (*entrée 2*) conduit à une polymérisation du milieu réactionnel, rendue possible par l'acidité des protons dihydrofuraniques. Cependant, seulement 58% de produit désiré est isolé. Ainsi, des substrats tels que les 2-(5H)-furanones) serait plus sensibles à l'eau libérée dans le processus de cyclisation.

Cette hypothèse a finalement été confirmée après l'ajout de tamis moléculaire qui a permis d'augmenter le rendement de la réaction jusqu'à 88% (*entrée 2*).

4. 1. 3. Application à la synthèse d'acylfuranones pour l'obtention d'analogues de l'épicocconone.

4. 1. 3. 1. Analogues de première génération.

Afin de synthétiser des analogues du produit naturel, la méthodologie mise au point pour la formation de cycle acylfuranoniques en une étape à partir d' α -hydroxycétones et de dioxinoniques fonctionnalisés a été utilisée.

La principale modification structurale dans ces analogues de première génération est liée à la partie sud de la molécule. En effet, il serait intéressant d'étudier l'influence du groupement β -dicétonique présent la chaîne polyinsaturée du produit naturel sur la fluorescence en synthétisant en premier lieu les dérivés présentant une seule cétone (*Schéma 87*). De plus, la grande chimiothèque d'acides (produit de départ de la synthèse de dioxinones fonctionnalisées) pourrait représenter un réel avantage dans le cadre de l'étude de la relation structure-fluorescence en remplaçant la chaîne polyinsaturée par, aussi bien, un cycle aromatique, qu'un cycle hétéroaromatique ou bien encore qu'une chaîne aliphatique.

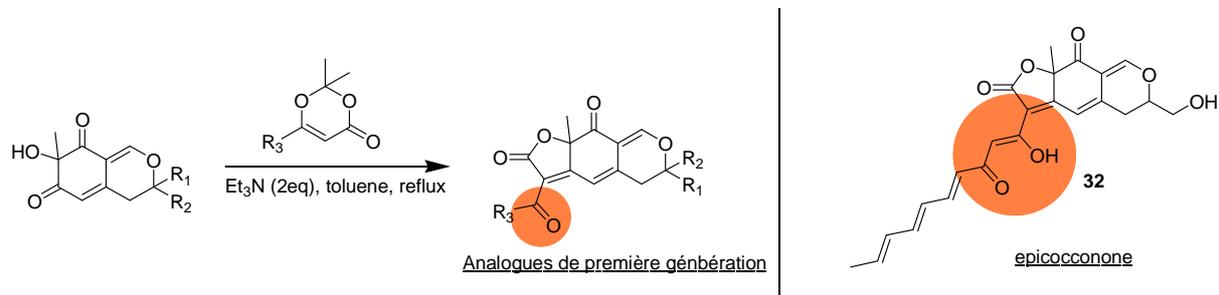


Schéma 87 : Première génération – une seule cétone sur la chaîne latérale.

- Synthèse des dioxinones:

Les dioxinones ont pu être préparées selon les conditions décrites par le Pr. Sato : formation de dioxinones à partir d'un β -cétoester *t*-butylique (voir chapitre 5. 1. 1. 2.). Bien que connue, il a tout de même fallu mettre une synthèse efficace et très générale d'accès aux β -cétoesters *t*-butyliques.

Une première étape consiste en la formation d'un amide de Weinreb à partir des acides aromatiques ou bien encore des chlorures d'acide correspondants. L'addition d'énolates de l'acétate de *t*-butyle sur ces amides de Weinreb a permis l'obtention des acétoacetates précurseurs des dioxinones dans les conditions décrites par la bibliographie (*Schéma 88*).

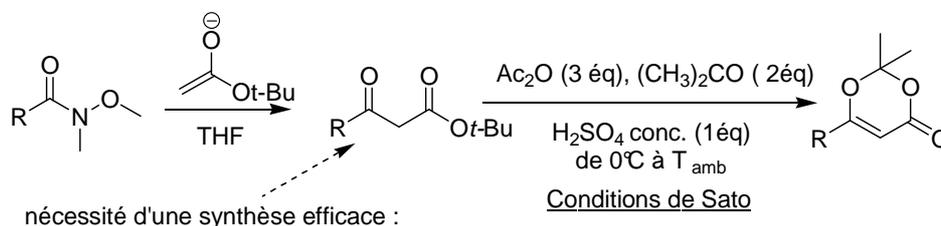


Schéma 88 : Synthèse de dioxinones à partir des β-cétoester t-butyliques

Malgré les bons rendements donnés par le Pr. Sato et plus récemment par le Pr. Blechert¹⁴⁴, ce contrôle de la réaction par des quantités précises de solvant, d'acides et d'anhydride acétique n'a pas conduit à de très bons taux de conversion. En effet, en solution concentrée un β-cétoester *t*-butylique portant une partie aromatique n'est pas soluble dans le milieu réactionnel ce qui a mené à une optimisation des conditions opératoires. Ainsi, après un screening rapide des quantités respectives de chaque partenaire, il est apparu que seule la quantité d'acide est déterminante. En effet, une trop grande concentration en H₂SO₄ mène à une déprotection trop rapide de l'ester et inévitablement à un plus faible contrôle de la cyclisation. En ce sens, l'ajout d'une quantité plus importante d'acétone et d'anhydride acétique ont permis d'obtenir une conversion totale en dioxinone sans formation de sous produits (*Schéma 89*).

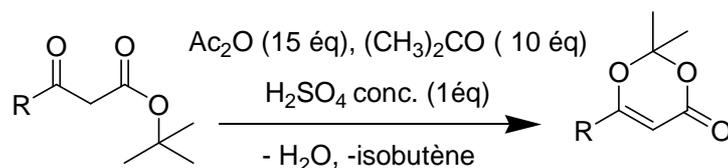
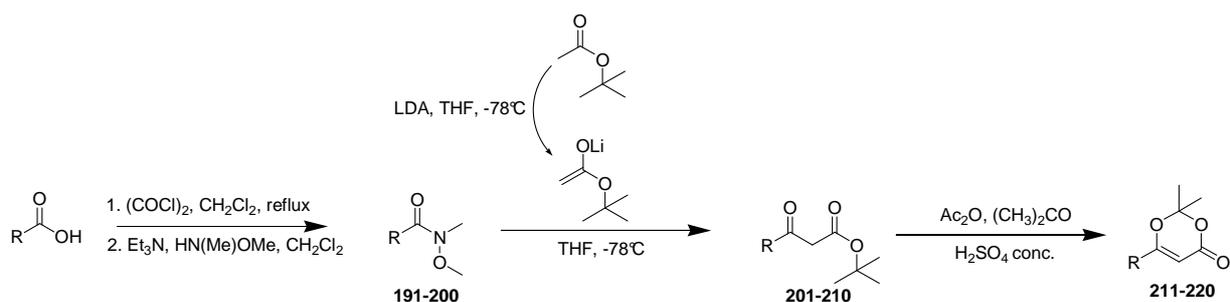


Schéma 89 : Condition optimisée de formation de dioxinones.

Les dioxinones ont finalement pu être synthétisées comme prévu en condition deshydratante avec de rendements moyens à excellents. Dix dioxinones portant différentes fonctions (alkyle, aryle) ont pu être synthétisées par cette méthode (*Tableau 9*).

¹⁴⁴ Gebauer, J.; Blechert, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2021-2025



-R	Amide de Weinreb	β -cétoester.	Dioxinones
-Phenyl	98% 191	99% 201	64% 211
2-Furyl	94% 192	94% 202	64% 212
-C ₇ H ₁₅	86% 193	91% 203	71% 213
2-Naphtyl	92% 194	96% 204	50% 214
-Benzyl	91% 195	90% 205	59% 215
- <i>p</i> -diméthylaminophenyl	78% 196	96% 206	71% 216
-méthoxy- <i>bis</i> (éthoxy)phényl	72% 197	74% 207	97% 217
- <i>o</i> -methoxyphenyl	70% 198 (ester)	69% 208	54% 218
- <i>p</i> -methoxyphenyl	95% 199	98% 209	57% 219
- <i>p</i> -nitrophényl	96% 200	85% 210	69% 220

Tableau 9 : Tableau récapitulatif de rendements de dioxinones.

Les dioxinones ont ainsi été synthétisées avec des rendements globaux allant de 50 à 62% . Les meilleurs rendements sont observés pour les composés **213** (71%) et **217** (97%). Il est intéressant de noter que ce sont leurs esters *t*-butyliques (**203** et **207**) qui se sont avérés être les plus solubles dans les conditions réactionnelles. Ceci confirme ainsi le rôle prépondérant que joue la solubilité des esters dans la cyclisation (observation faite lors de l'optimisation).

Après la synthèse de l'ensemble de ces dioxinones, seul le composé **212** s'est montré peu stable à température ambiante (furyl), la totalité ayant pu être purifiée sur gel de silice. Ceci permet encore une fois de mettre en exergue la plus meilleure stabilité des dioxinones en comparaison des dérivés acides de Meldrum correspondants.

Enfin, le faible rendement global dans le cas de l'*o*-methoxyphényl est du à la méthode de synthèse : passage par un ester méthylique et pas un amide de Weinreb (*Schéma 90*).

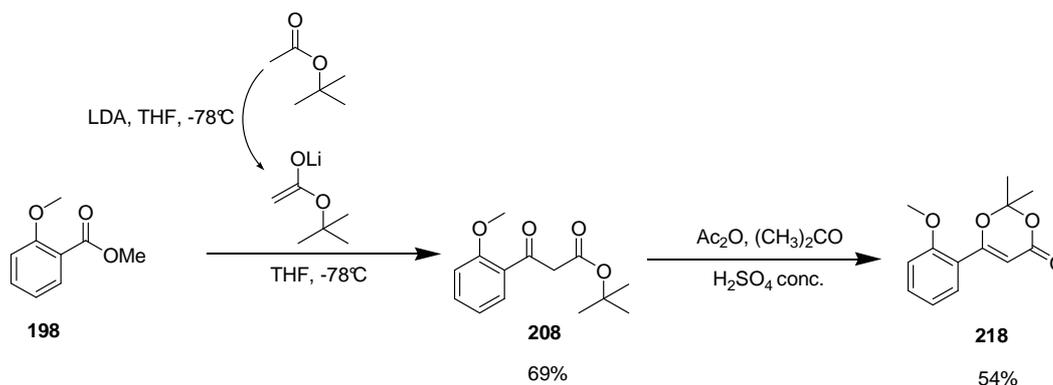


Schéma 90 : Synthèse de la dioxinone o-methoxy 218.

Comme attendu, l'addition de l'énolate de l'ester *t*-butylique sur l'ester benzoïque **198** conduit à un rendement inférieur de 69%. Ceci est expliqué par la faible stabilité de l'intermédiaire tétraédrique présent après addition d'un énolate sur un ester, libérant *in situ* le β -cétoester pouvant être déprotoné en α et donc consommer un équivalent de l'énolate de l'acétate de *t*-butyle.

Après l'obtention des premières dioxinones fonctionnalisées, la synthèse d'analogues de l'épicocconone a pu alors être entamée.

- Synthèse des analogues de première génération :

Une difficulté supplémentaire est présente dans le cas de cet alcool de départ. En effet, la formation de deux régioisomères furanoniques pourrait être observée par la présence de deux cétones en position α de l'alcool. Le but de cette partie est donc de valider la voie synthétique en étudiant la possible régiosélectivité de la réaction.

Un premier essai de formation du cycle acylfuranonique a été réalisé en suivant les conditions préalablement optimisées sur l' α -hydroxydicétone **112** (sur un mélange de diastéréoisomères) et en utilisant la dioxinone **211** à reflux du toluène et en présence de 0,5 équivalent d'Et₃N (*Schéma 91*).

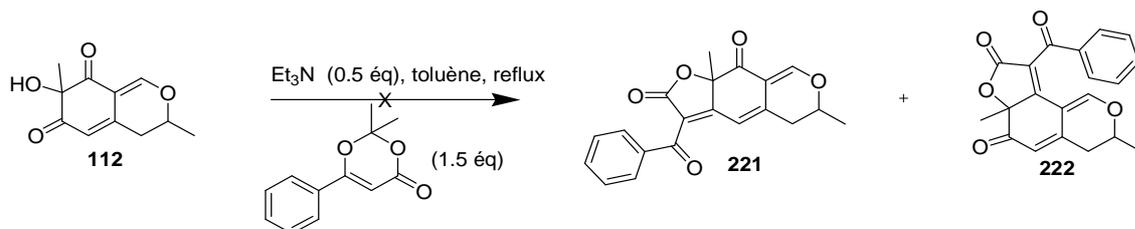


Schéma 91 : Synthèse d'analogues de l'analogue phénylique en position sud.

Dans ces conditions optimisées (0.5éq de Et₃N), aucune trace de furanone n'est observée. La conjugaison avec l'oxygène dihydropyranique (donneur) semble donc diminuer l'électrophilie des cétones en entraînant une mauvaise cyclisation de type Knoevenagel (**Schéma 92** – l'effet donneur diminue l'électrophilie des cétones). Cependant, aucune trace de β-cétoester correspondant au produit d'addition de l'alcool sur l'acylcétène n'a été isolée.

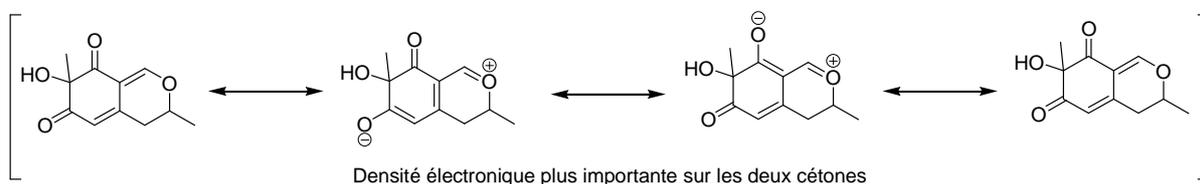


Schéma 92 : Les 3 formes mésomères de l'alcool tertiaire 112.

Cette réactivité différente a donc conduit à une nouvelle optimisation des conditions réactionnelles sur ce type de substrats portant des cétones moins réactives. Ainsi, l'utilisation de deux équivalents d'Et₃N à reflux du toluène permet de générer de façon quantitative et non partielle (comme c'est le cas lors d'une utilisation catalytique de la base) l'énolate, conduisant au produit désiré avec un rendement de 60% (**Schéma 93**).

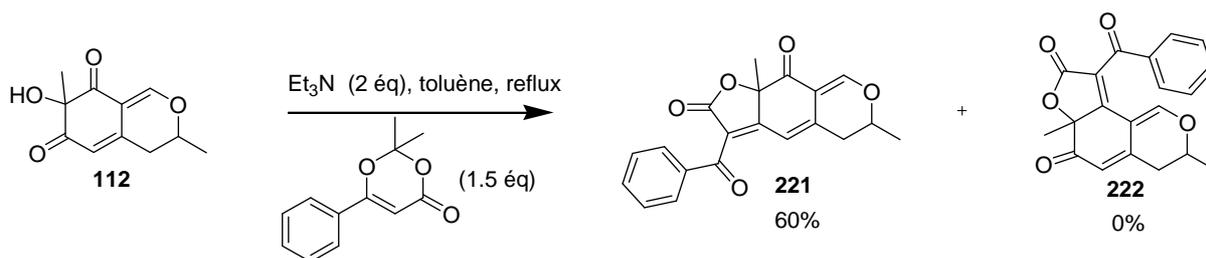


Schéma 93 : Synthèse de l'analogue 221 en utilisant deux équivalents de Et₃N.

De façon surprenante, aucune trace du mauvais régiosiomère n'est observée. La cyclisation de type Knoevenagel semble être contrôlée sur la cétone située en position « sud ».

Aucune certitude concernant les raisons de cette régiosélectivité étant acquise, une première hypothèse pourrait néanmoins être formulée : une contrainte stérique déplacerait l'équilibre vers la formation du produit de cyclisation en position para de l'éther d'énol intracyclique (*Schéma 94*).

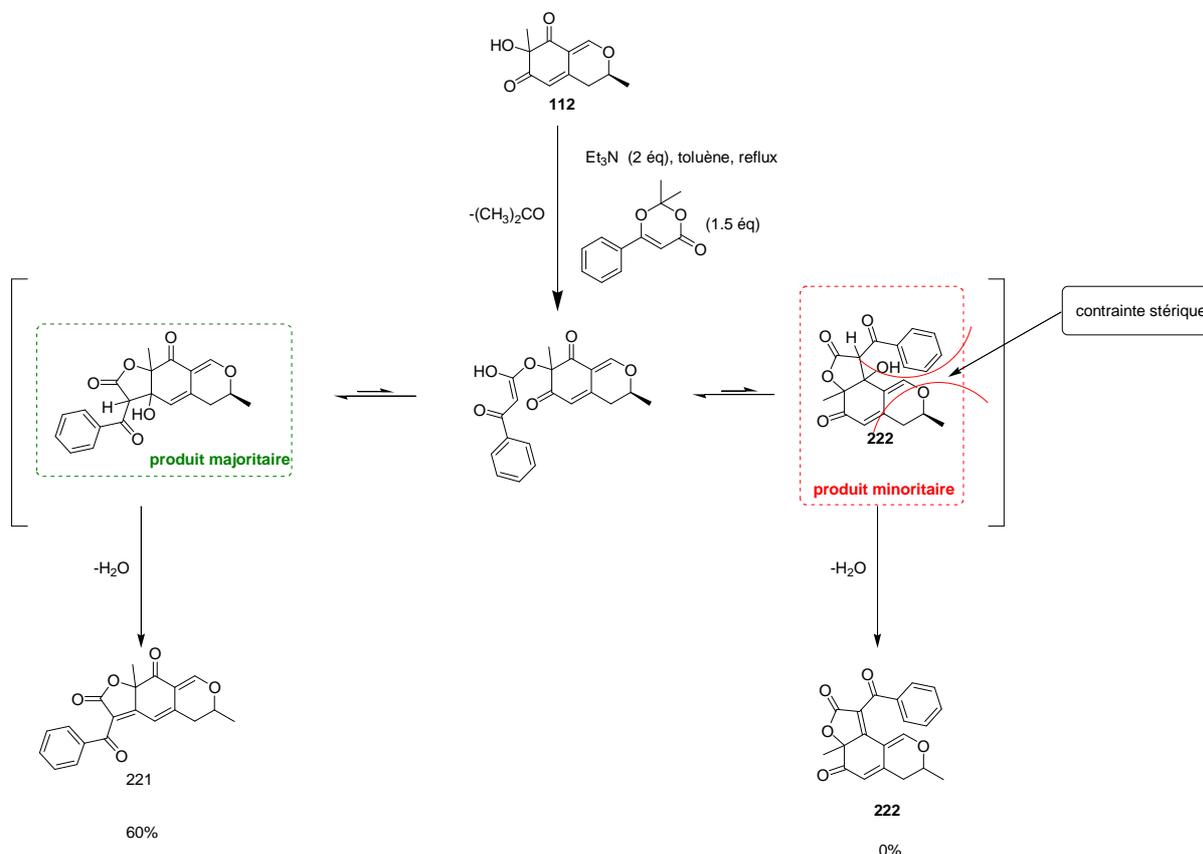
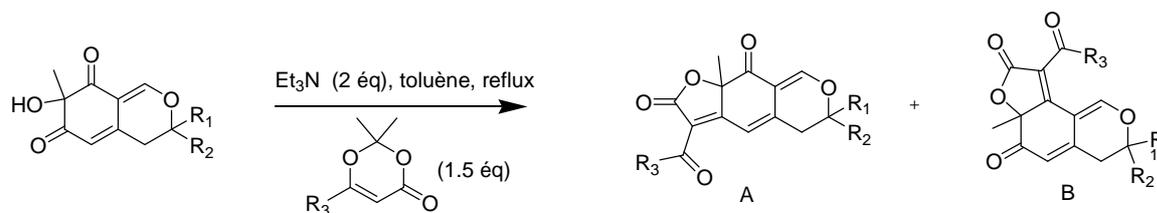


Schéma 94 : Une contrainte stérique contrôlerait la régiosélectivité.

Il faut souligner que la faible différence énergétique entre les deux cétones (2.3 ppm d'écart en RMN ^{13}C / position sud : 197,5 ppm et position nord 195,2 ppm) ne permettrait pas, à elle seule, d'expliquer la chimiosélectivité totale rencontrée.

A partir des alcools **112** et **164**, 12 analogues de l'épicocconone ont alors été synthétisés par la formation d'un cycle furanonique en une étape donnant accès à une première lignée de nouveaux pro-fluorophores. Ceci a pu être obtenu par l'utilisation des dioxinones **211** à **220** préparées précédemment (*Tableau 14*).



Entrée	-R ₁	-R ₂	-R ₃	Rendement A	Rendement B
1	-CH ₃	-H	-Phenyl	70% 221*	0% 222
2	-CH ₃	-H	2-Furyl	90% 223	0% 224
3	-CH ₃	-H	-C ₇ H ₁₅	25% 225	30% 226 (conversion)
4	-CH ₃	-H	2-Naphtyl	62% 227*	0% 228
5	-CH ₃	-H	-Benzyl	30% 229	0% 230
6	-CH ₃	-H	- <i>p</i> -diméthylaminophenyl	15% 231	0% 232
7	-CH ₃	-H	- <i>p</i> -methoxy- bis(éthylèneglycol)phényl	15% 233	0% 234
8	-CH ₃	-H	- <i>o</i> -methoxyphenyl	27% 235	0% 236
9	-CH ₃	-H	- <i>o</i> -hydroxyphenyl	85% 237	0% 238
10	-CH ₃	-H	- <i>p</i> -methoxyphenyl	66% 239	0% 230
11	-CH ₃	-H	- <i>p</i> -nitrophényl	54% 241	0% 242
12*	-CH ₃	-CH ₃	- <i>p</i> -methoxyphenyl	86% 243*	0% 244

Tableau 10 : Synthèse des analogues de première génération (* réalisé en présence de tamis moléculaire).

Une grande variété de groupement a pu ainsi être introduite en R₃ avec une très importante chimiosélectivité sur la cétone sud. C'est uniquement dans le cas de l'introduction d'une chaîne aliphatique (moins encombrante) que 30% du mauvais régioisomère de cyclisation est observé (**Entrée 3**). Ceci semble donc confirmer l'hypothèse évoquée précédemment dans le cas de substituant aromatique : la chimiosélectivité sur la cétone sud serait engendrée par la contrainte stérique lors de la cyclisation.

Les rendements obtenus sont corrects dans la majorité des cas, sauf pour les composés très polaires qui rendent la purification de ceux-ci difficiles (**entrée 231** et **233**).

De plus, un facteur déterminant n'a pas été pris en compte lors de ces essais préliminaires de cyclisation : la forte dépendance à l'eau de cette réaction. En effet, le problème de libération d'eau dans le milieu n'a été identifié qu'à posteriori de ces études préliminaires et l'utilisation de tamis moléculaire 4 A n'a été réalisé qu'à partir du composé **243**. Un gain non-négligeable est ainsi obtenu car le composé **243** est isolé avec un rendement de 86%.

Il faut souligner que le composé *o*-hydroxyphényl **237** provient du composé *o*-methoxyphényl **235** après déprotection de l'éther méthylique en présence de 10 équivalent AlCl₃ à reflux du dichlorométhane. Les 85 % isolés mettent ainsi en avant la grande stabilité des analogues en milieu acide.

Enfin, la nécessité d'une évaluation rapide des propriétés de fluorescence sur de nombreux analogues a conduit à des essais préliminaires de cyclisation sur de faibles quantités (0.05 mmol – 10 mg d'alcool) menant à l'isolement de seulement quelques mg de composé finaux (validé par spectrométrie de masse et RMN ¹H). De ce fait, la caractérisation complète de certains analogues (cas des composés **225**, **229**-instable, et **231**) n'a pu être réalisée par manque de matière.

- Détermination du diastéréoisomère majoritaire d'oxydation.

La séparation du diastéréoisomère majoritaire a pu être effectuée sur le composé naphtylique **227**. En effet, c'est dans ce cas que la séparation sur gel de silice est la plus « aisée ». Une expérience a été réalisée sur un mélange initial de diastéroisomères 75:25.

Lors de la première purification, l'intégralité du produit formé a été isolée et les déplacements chimiques caractéristiques en RMN ¹H du diastéréoisomère majoritaire ont pu être identifiés.

Une deuxième purification a permis d'isoler 1.5 mg du deuxième produit qui s'est avéré être le diastéréoisomère majoritaire. Une cristallisation de ce diastéréoisomère a finalement pu être obtenue par un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (1/10) sous lent flux d'azote (évaporation sur 4 jours). Il faut souligner l'importance de la cristallisation sous lent flux d'azote afin d'éviter toute possible ouverture du cycle dihydropyranique par l'humidité ambiante. Les monocristaux récupérés ont finalement conduit à une structure aux rayons X confirmant l'anti-oxydation vis-à-vis du méthyle dihydropyranique lors de la réaction de désaromatisation oxydante (*Schéma 95*).

Ceci vient donc apporter un argument de poids à l'hypothèse mécanistique formulée précédemment, à savoir, un transfert de chiralité à longue distance (ω transfert) est observé lors de l'oxydation (en anti du méthyle dihydropyranique) lorsque le premier groupement MOM (en positio nord) est déprotégé.

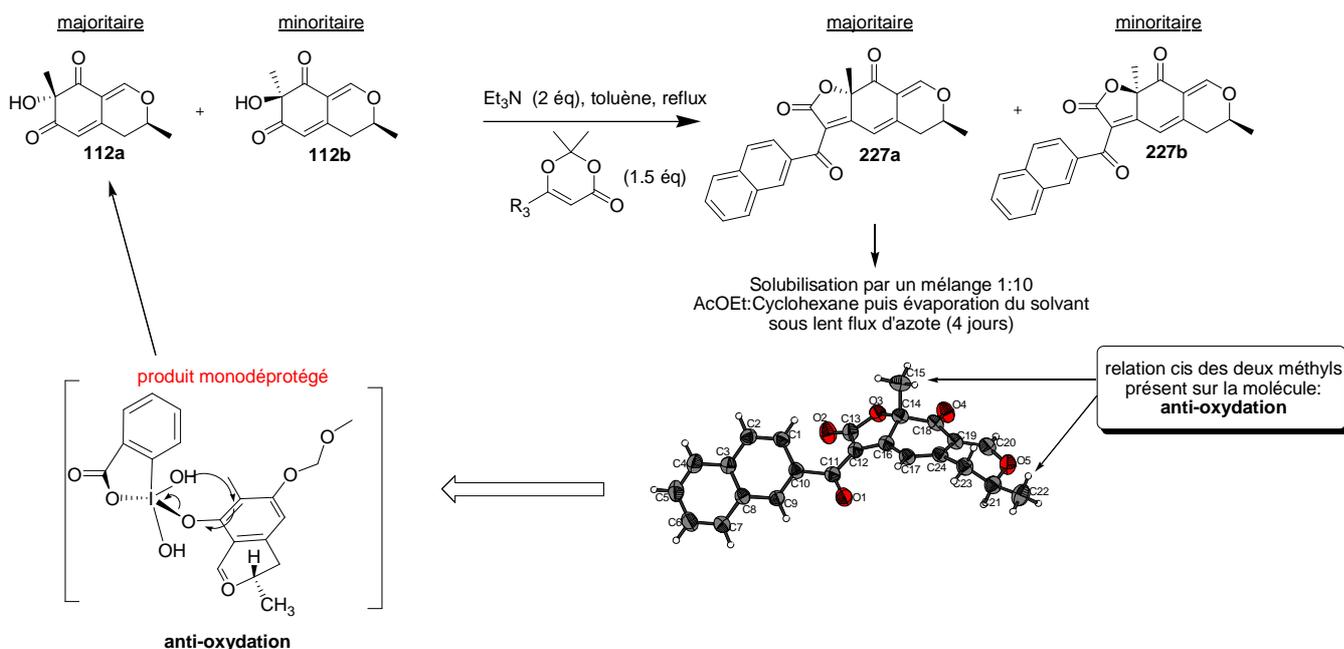


Schéma 95 : Détermination du diastéréoisomère majoritaire par structure aux rayons X.

- Evaluation des propriétés spectrales des analogues de première génération:

L'étude des propriétés de fluorescence des composés en solution a alors été débutée au sein de notre laboratoire. Pour ce faire, la butylamine a été utilisée comme mime de protéines (**Schéma 96**).

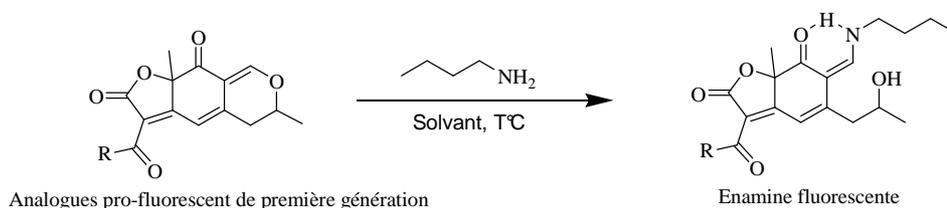


Schéma 96 : Test comparatif de fluorescence / utilisation de butylamine

Ces composés se caractérisant par la formation d'une énamine fluorescente en présence de protéines, il convient d'étudier la fluorescence de ces composés à chaque maximum de longueurs d'ondes d'excitation. Ainsi, la fluorescence de la molécule native ainsi que la fluorescence de l'adduit énaminique a été réalisée.

Une variation de la fluorescence en fonction du solvant utilisé a été observée. En effet, c'est dans les solvants très apolaires qu'un signal significatif a été distingué (Dans l'eau une extinction quasi-complète de la fluorescence est obtenue).

Cette observation vient confirmer les résultats de fluorescence de l'épicoconone. En effet, il a été prouvé que l'ajout de SDS permettait à la molécule naturelle de s'insérer dans les micelles formées par le détergent (« environnement hydrophobe ») et d'augmenter de façon significative la fluorescence observée en comparaison au milieu aqueux. De ce fait, c'est l'acétonitrile qui a été sélectionnée afin d'obtenir une résolution optimale pour comparer rapidement les différents analogues synthétisés (**Figure 30**). Les analogues de première génération ont donc été placés en solution dans l'acétonitrile ($54 \mu\text{mol.L}^{-1}$) avec ou sans butylamine ($10 \text{ éq } 540 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Sur la **Figure 30**, seuls les spectres d'absorption de l'analogue **239** sont représentés car l'ensemble des analogues présentent des courbes très similaires (maximum d'absorption et allure très proche).

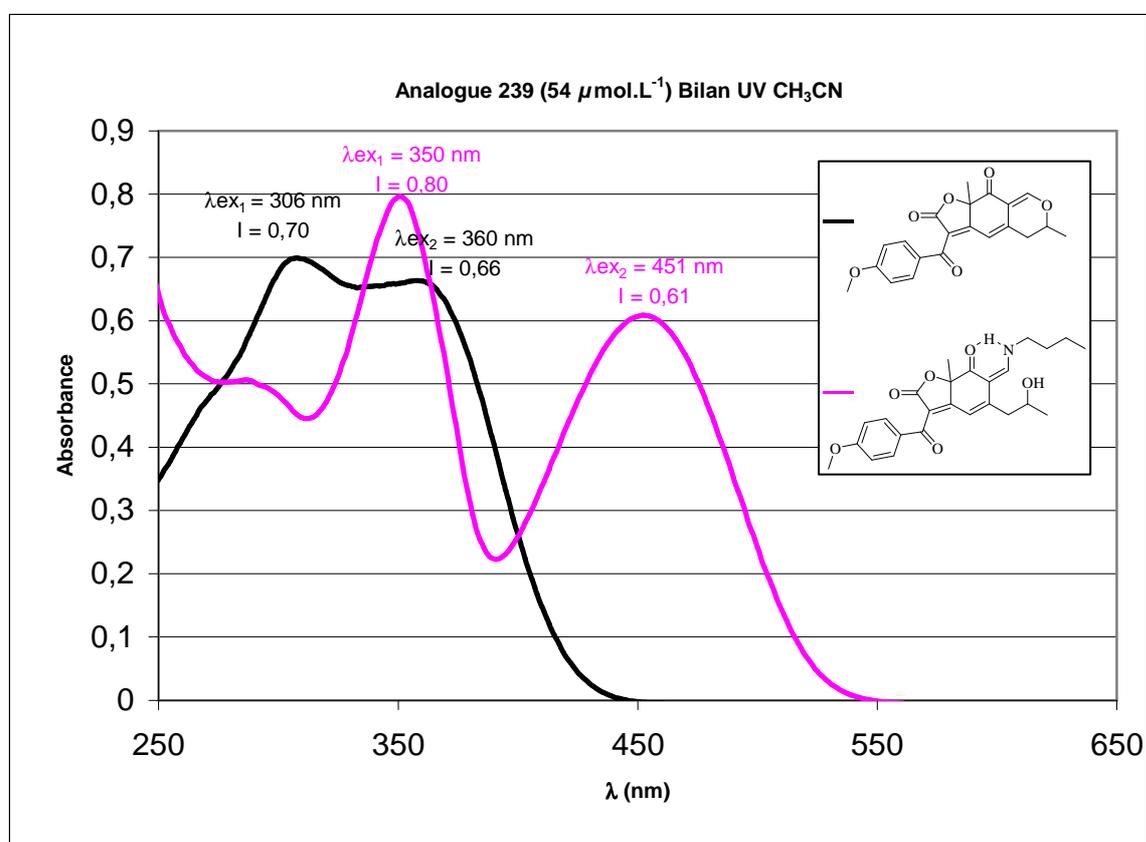


Figure 30 : Profil UV de l'analogue p-méthoxyphényl avec et sans butylamine

Deux spectres d'absorbance sont ainsi observés pour l'analogue **239** en fonction de la présence (**Figure 30**, courbe mauve) ou de l'absence de butylamine (**Figure 30**, courbe noire). Ceux-ci correspondent respectivement aux spectres de l'énamine (formation quantitative et instantanée) ou de la molécule native. Un effet bathochrome est alors observé en présence de BuNH_2 et deux maxima sont observés pour chaque courbe :

Absorption sans butylamine (molécule native) : $\lambda_{\text{ex}1}$: 308 nm et $\lambda_{\text{ex}2}$: 360 nm.

Absorption avec butylamine (énamine) : $\lambda_{\text{ex}1}$: 350 nm et $\lambda_{\text{ex}2}$: 451 nm.

La fluorescence de la forme native et de la forme énaminique ont été alors évaluées pour chaque maximum d'excitation (**Figure 31**).

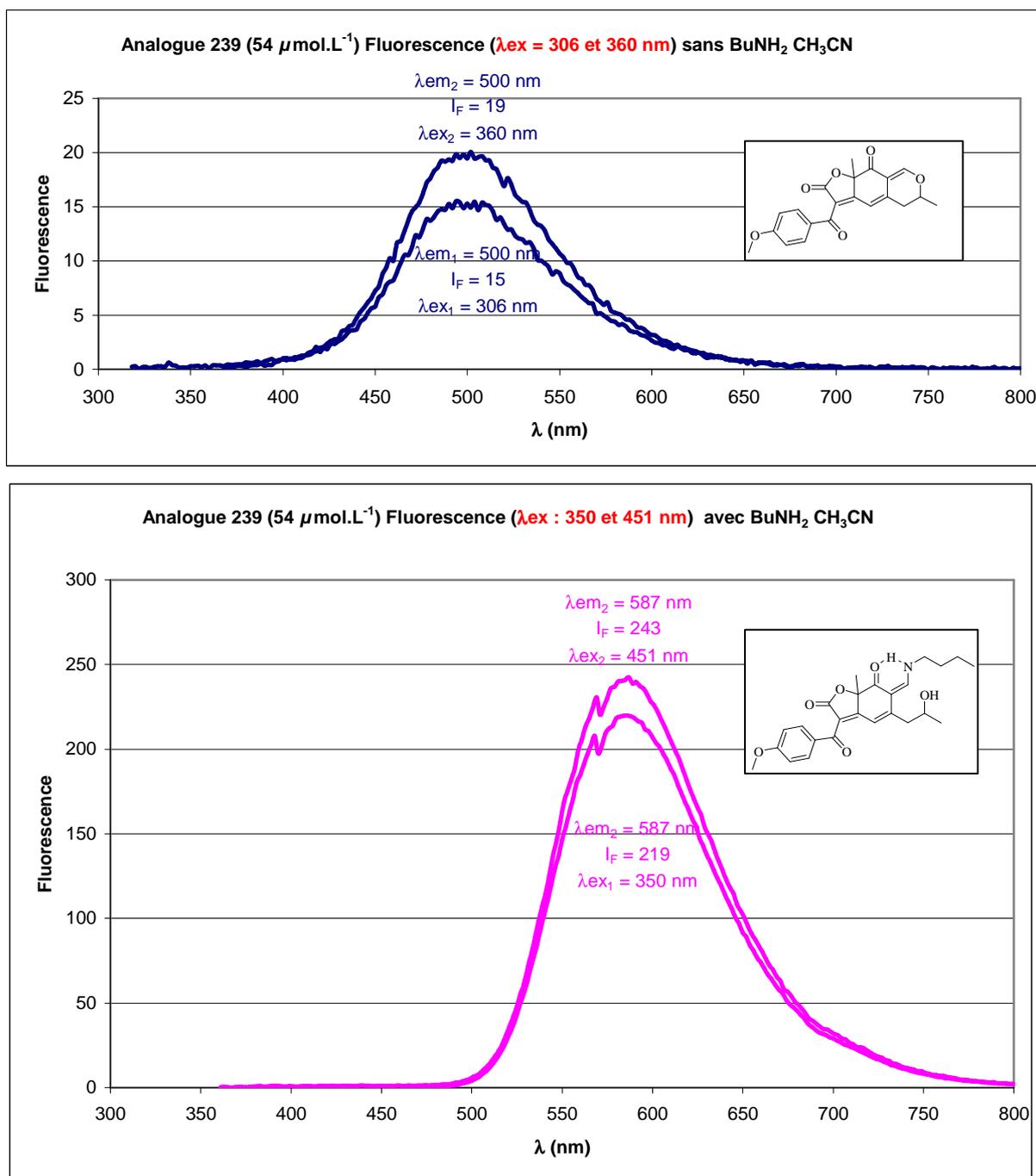


Figure 31 : Profil Fluo de l'analogue p-méthoxyphényl 239 avec ou sans butylamine

Tout d'abord, une faible émission de fluorescence ($I_{\text{F}} = 15$ à 19 , *courbe bleues*) de l'analogue **239** natif est observée avec une intensité maximale à 500 nm après excitation aussi bien à 306 ou 360 nm. A noter que pour l'ensemble des analogues, la fluorescence la plus forte découle toujours de la longueur d'onde d'excitation la plus importante.

L'ajout de butylamine conduit à une augmentation du phénomène de fluorescence ($I_F = 219$ ou 243 , courbes mauves) après excitation à 350 ou 451 nm. Un effet bathochrome est alors observé avec une émission de fluorescence de l'énamine à 587 nm. Ceci représente donc un déplacement de Stokes de 237 et 136 nm respectivement. Une faible différence de fluorescence est d'ailleurs observée en fonction de la longueur d'onde sélectionnée.

Un point négatif est toutefois observé sur cet analogue : comme pour l'épicoconone, une bande d'émission très large d'environ 200 nm est obtenue. Elle découle du nombre d'état vibrationnel au niveau énergétique S_1 et est liée à la structure même du noyau fluorescent.

- RESUME :
- 1 - Le marquage par une amine a donc été validé en solution par la création quantitative d'une liaison covalente entre la butylamine (utilisation de butylamine comme mime de protéines) et l'analogue de première génération.
 - 2 - La molécule native est faiblement fluorescente alors que l'adduit énaminique est fluorescent (la fluorescence émise reste toutefois modeste).
 - 3 - Un effet bathochrome est observé aussi bien sur le spectre d'absorbance que sur le spectre de fluorescence (environ 100 nm).
 - 4 - Un Stokes' shift de 130 et 237 nm, supérieur celui de l'épicoconone (97 et 224 nm), est obtenu.

Comme évoqué précédemment, les composés de première génération (de **221** à **243**) ont des spectres d'absorption très proches. De plus, ils ont la particularité d'émettre dans les mêmes gammes de longueurs d'ondes et ont un profil de fluorescence (forme de la courbe) identique. Afin de comparer qualitativement et de façon rapide l'intensité de fluorescence en fonction des variations structurales réalisées sur ces analogues de première génération, une simple lecture de l'intensité de fluorescence dans l'acétonitrile est réalisée (à une concentration identique de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Ces résultats sont reportés dans le *tableau 11* et comparé aux valeurs obtenues pour l'épicoconone.

Analogue	Molécule native			Enamine			
	λ_{UV} (nm)	λ_{fluo} (nm)	Intensité	λ_{UV} (nm)	λ_{fluo} (nm)	Δ Stokes	Intensité
221	313/372	510	58	351/472	585	113	98
223	311/369	507	442	352/465	593	128	193
225	309/370	499	31	350/466	582	116	81
227	298/357	512	48	351/464	570	106	173
229	319/376	505	65	351/473	585	112	92
231	325/360	435	8	354/433	570	141	5
233	307/364	523	9	349/453	590	137	120
235	326/370	504	5	351/469	589	120	147
237	324/368	508	1	350/463	597	134	32
239	308/358	502	19	351/452	586	134	225
241	305/380	/	0	347/489	/	/	0
243	308/361	501	26	354/460	590	130	155
Epicocconone	308/384	562	160	385/512	609	97	3950

Tableau 11 : Fluorescence des analogues seuls et des analogues en présence de butylamine à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Les modifications structurales effectuées sur la partie sud de la molécule n'ont donc pas conduit à une amélioration vraiment représentative de la fluorescence des composés de première génération (aucuns composés ne dépassent 250 unités de fluorescence). Les composés ayant montrés la meilleure fluorescence et le meilleur Stokes' shift (environ 130 nm) sont les composés portant un groupement donneur sur le cycle aromatique (**223** – furyl/ **239** - *p*-methoxyphényl). Ils restent cependant plus de dix fois inférieurs à l'épicocconone ($I_F = 3950$). Enfin, une différence majeure est observée au niveau des longueurs d'ondes maximales d'absorption, l'épicocconone absorbant après addition de la butylamine à 512 nm (effet bathochrome de 79 à 40 nm).

Une faible fluorescence est observée pour les composés portant des substituants très donneurs. C'est le cas pour les analogues de type *p*-diméthylaniline **231** ou *o*-phénol **237**. Cette faible fluorescence est également observé lorsqu'un groupement fortement attracteur tel que le *p*-nitro **241**. Ceci pourrait être expliqué par un phénomène de transfert d'électron photoinduit (PET). En effet, le Pr. Burgess a montré que la substitution de Bodipy avec des groupements très donneur ou très attracteurs pouvaient conduire à des extinctions de fluorescence par la capacité de tels substituants à donner ou accepter des électrons¹⁴⁵ (via leur HOMO ou LUMO). Ainsi, l'introduction d'un groupement diméthylaniline ou *p*-nitrophényl sur le cœur de l'analogue a pu conduire dans notre cas à une extinction de fluorescence par un mécanisme similaire (**Figure 32**).

(145) Loudet, A. ; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

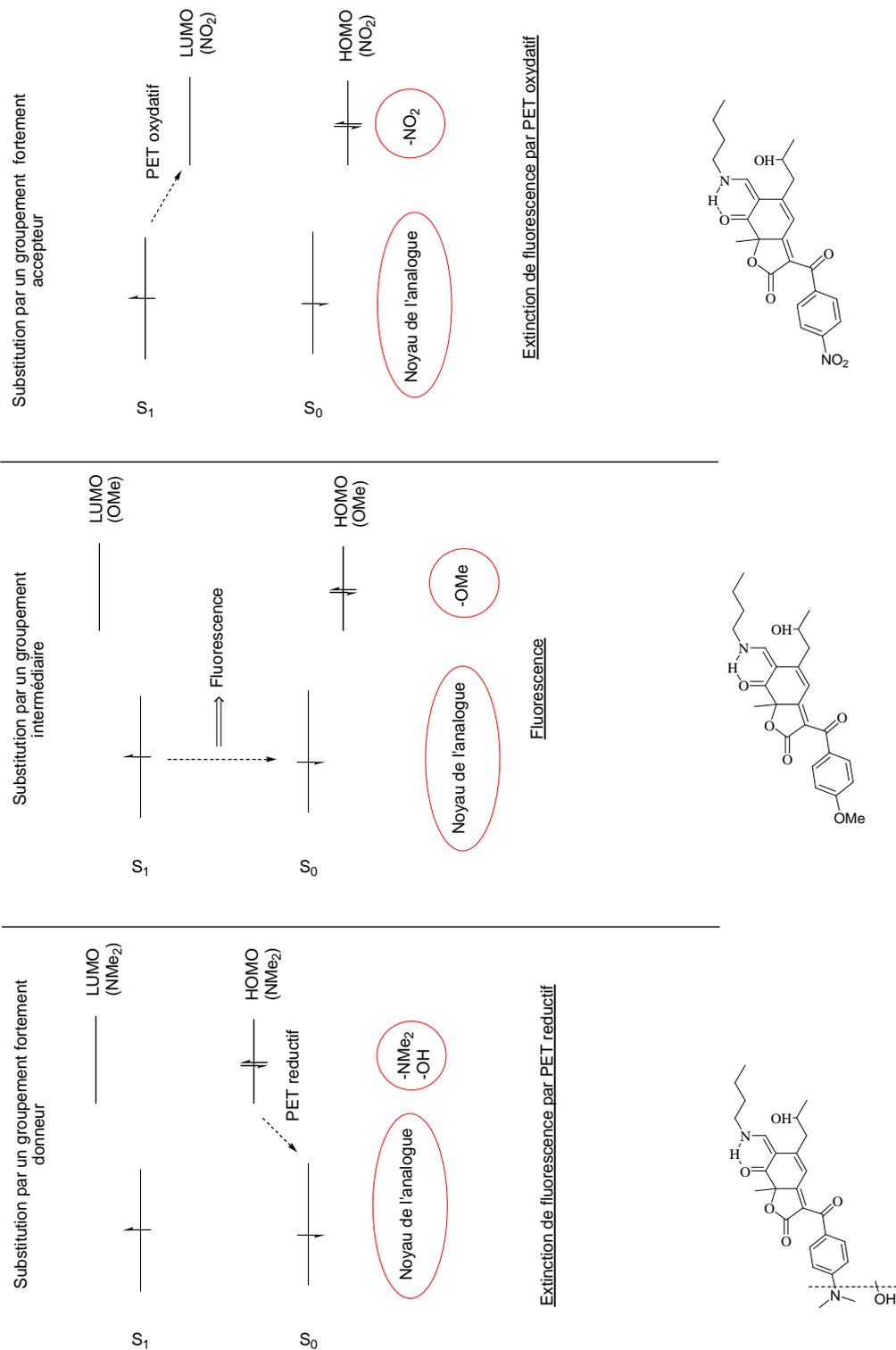


Figure 32 : Les groupements donneurs provoquent une extinction par PET reductif – Les groupements attracteurs provoquent une extinction de fluorescence par PET oxydatif.

Aux vues de l'écart important en intensité de fluorescence avec l'épicocconone, il semble donc déterminant d'introduire une β -dicétone sur la partie sud de la molécule (seule différence structurale majeure). Ceci conduira aux analogues de deuxième génération.

Malgré différents essais, aucune trace de produit d'acylation **246** n'est isolée. En effet, l'énolate 1-4 ne semble pas suffisamment dur pour effectuer une addition sur un amide de Weinreb.

La mise en réaction d'analogues synthétiques des amides de Weinreb que sont les chlorures d'acides a alors été envisagée. Cependant l'utilisation de tels composés suppose une limitation de rendement. En effet, seul 50% de composé devrait être obtenu dans le meilleur des cas par utilisation de 1 éq d'énolate (*Schéma 99*). En effet, les méthyldioxinones acylées de type **246** présente deux protons acides qui peuvent eux-même être déprotonés par un énolate de lithium. Finalement, malgré l'utilisation de 2 équivalents d'énolate, seul 47% de produit désiré est isolé.

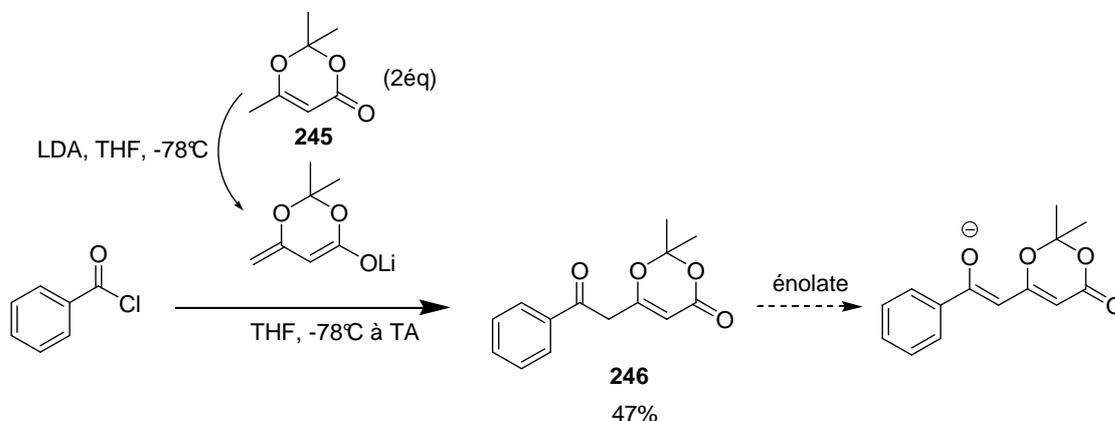


Schéma 99 : Acylation des dioxinones par utilisation de chlorure d'acide.

Dans un second temps, un groupement $R_4 = -Me$ devant permettre de stabiliser les analogues dicétoniques a été inséré sur le motif dioxinone. Ceci a pu être réalisé en milieu basique par addition de l'énolate **245** sur de l'iodure de méthyle (MeI) avec un rendement de 100 % (*Schéma 100*).

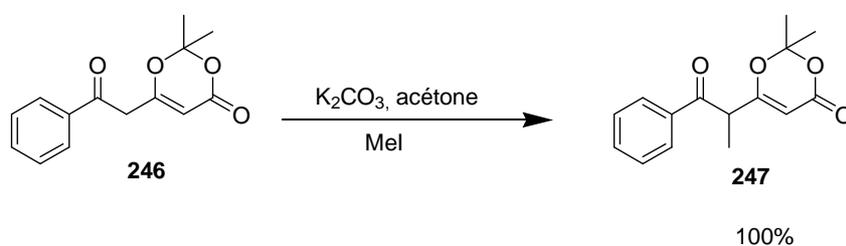


Schéma 100 : Synthèse de la dioxinone méthylée 247.

A partir de ces dioxinones, la synthèse d'analogues de l'épicocconone présentant le β -cétoénol sur la position sud a ainsi pu être engagée.

- Synthèse des analogues de deuxième génération :

La mise en réaction des composés **246** n'a pas permis l'obtention des composés désirés dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment (*Schéma 101*).

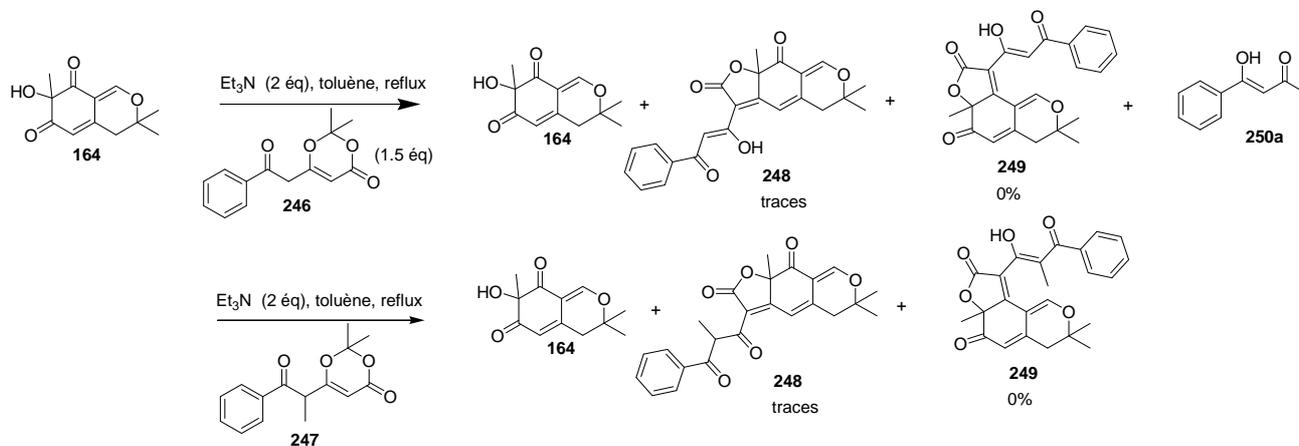


Schéma 101 : Forte dégradation des dioxinones dans les condition réactionnelles – Faible conversion de l'alcool de départ.

Dans ces conditions réactionnelles, aucune trace de mauvais analogues **249** n'a été détecté et très peu d'analogue **248** (2 mg) a pu être isolé. Il est important de noter que malgré ce faible rendement, le spectre RMN ^1H du brut réactionnel fait état de la non-conversion de l'alcool de départ et de la disparition de la dioxinone **246**. De plus, une forte dégradation du milieu réactionnel est observée ainsi qu'un produit majoritaire **250a** issu de la décarboxylation de la dioxinone est observé (*Schéma 102*). La décarboxylation menant au composé **250a** peut être expliquée par la présence d'eau dans le milieu réactionnel après les premières traces de formation du composé désiré **248** (le produit de décarboxylation n'ayant pu être isolé en série phényl, il sera décrit en série *p*-méthoxy **250b**)..

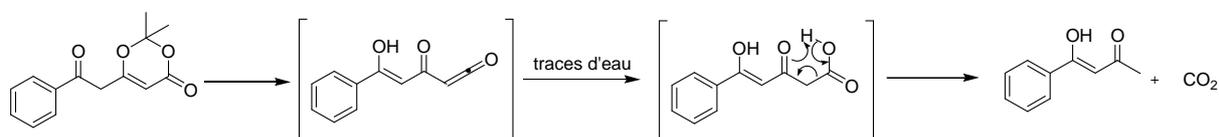


Schéma 102 : Décarboxylation de l'acécétène provenant de la dioxinone 246.

Un nouvel essai a été réalisé en présence de tamis moléculaire. Cependant, aucune amélioration en termes de conversion n'a été observée. Il semble donc que la dioxinone **246** ne soit pas stable à chaud dans le toluène et que ces conditions conduisent à sa forte dégradation. De plus, un bilan similaire a été obtenu lors de la mise en réaction de la dioxinone méthylée **247**.

A ce stade, une protection de la cétone présente sur la dioxinone sous forme d'éther d'énol silylé a donc été décidée afin d'étudier son impact sur la stabilité de l'acylcétène intermédiaire. L'utilisation de chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle (TBDMSCl) n'ayant pas conduit à l'éther d'énol désiré, cette protection a pu être réalisée en présence d'un excès de triméthylamine par ajout de triflate de *t*-butyldiméthylsilyle (TBDMSOtf) dans le dichlorométhane (*Schéma 103*). Cependant, la faible stabilité de l'éther d'énol silylé correspondant a rendu difficile sa conservation (déprotection totale à température ambiante au bout de 4h). Les dioxinones silylés ont donc été mises en réaction rapidement après formation et filtration rapide sur gel de silice.

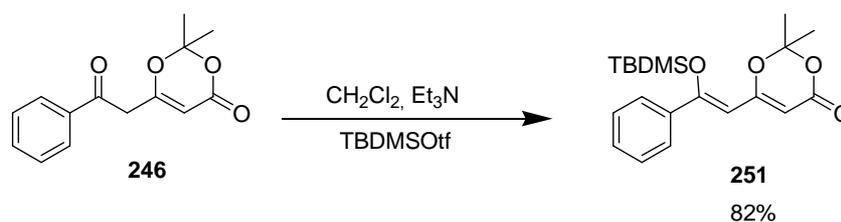


Schéma 103 : Protection de la cétone présente sur la dioxinone 246 sous forme d'éther d'énol silylé.

Un essai de cyclisation sur l'alcool **164** a alors pu être mis en œuvre dans les conditions réactionnelles classiques en présence de tamis moléculaire. L'analogue dicétonique a alors été isolé avec un rendement de 39% (*Schéma 104*).

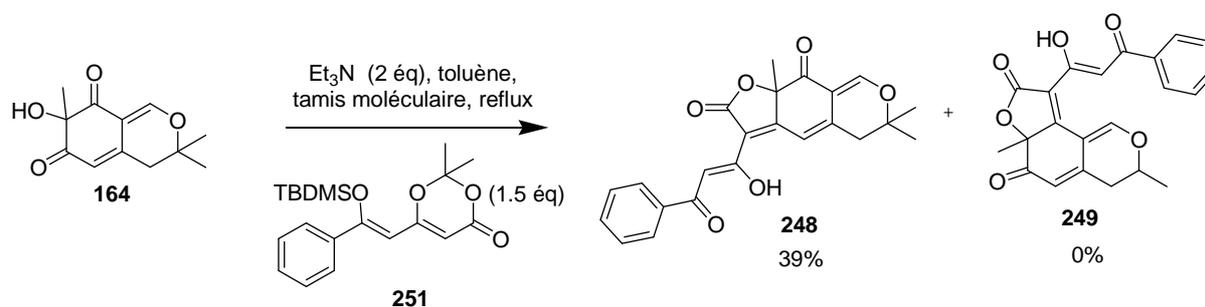


Schéma 104 : L'utilisation d'une dioxinone protégée permet d'augmenter le rendement en analogue 248.

L'utilisation de la dioxinone silylée **251** a donc permis d'augmenter la conversion en analogue dicétonique **248**. Ceci confirme la meilleure stabilité de l'acylcétène correspondant lorsque la cétone présente sur ce type de dioxinone est protégée. Malgré ce meilleur résultat, le rendement en composé désiré reste faible et l'analogue souffre d'une désilylation dans les conditions opératoires car seul le produit déprotégé est isolé. Une déprotection similaire partielle des dioxinones à chaud pourrait donc expliquer ces faibles rendements.

Enfin, aucunes traces de composé **249** est détectée. Une chimiosélectivité très forte sur la cétone « sud » est donc également observée en série dicétonique.

Afin d'augmenter le rendement de la réaction, une modification de la nature de l'éther d'énol a été engagée. En ce sens, la protection sous forme d'éther d'énol méthylique a été réalisée (obtention du mélange de C et O alkylation) par utilisation de diméthylsulfate (Me_2SO_4) en présence de carbonate de potassium (K_2CO_3) dans l'acétone. Cependant, la mise en réaction de cette dioxinone dans les conditions réactionnelles classique de synthèse des analogues n'a pas permis d'isoler le produit désiré (*Schéma 105*). En effet, une forte dégradation du milieu réactionnel est alors observée.

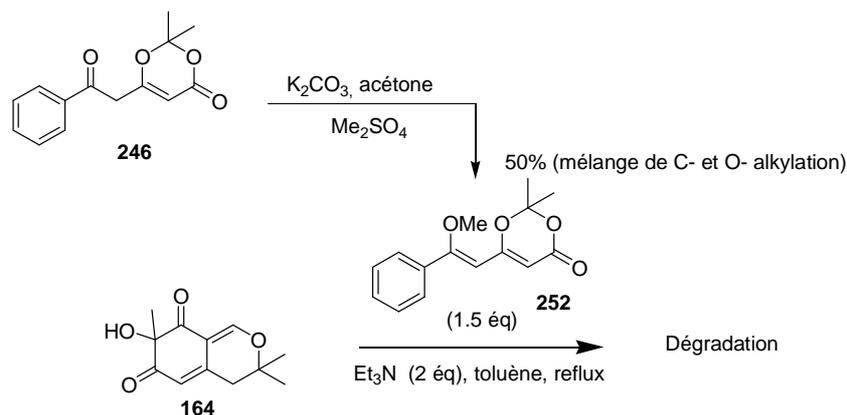
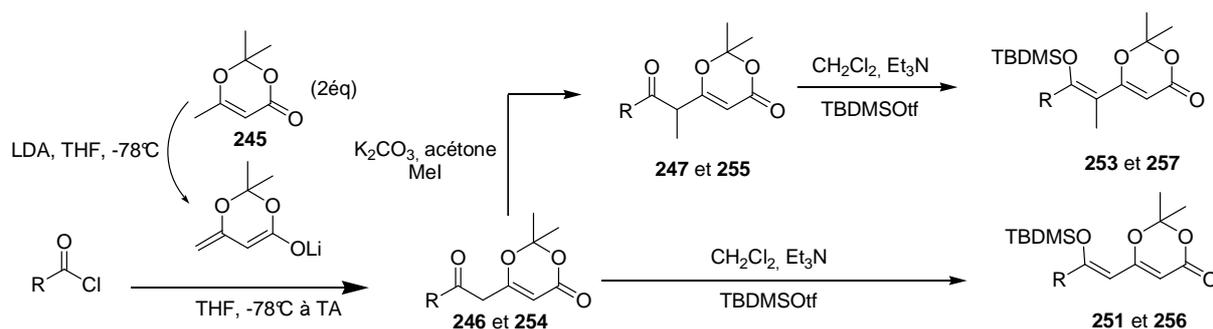


Schéma 105 : L'utilisation de dioxinones protégées sous forme d'éther d'énol méthyliques conduit à une forte dégradation du milieu réactionnel.

Aux vues de ces résultats, et afin de comparer rapidement l'influence sur la fluorescence d'une variation structurale en présence d'une β -dicétone sur la position « sud » des analogues, quatre dioxinones ont été synthétisées (4 de type éther d'énol dont deux présentent un méthyle entre le motif dioxinone et la cétone masquée - *Tableau 12*).

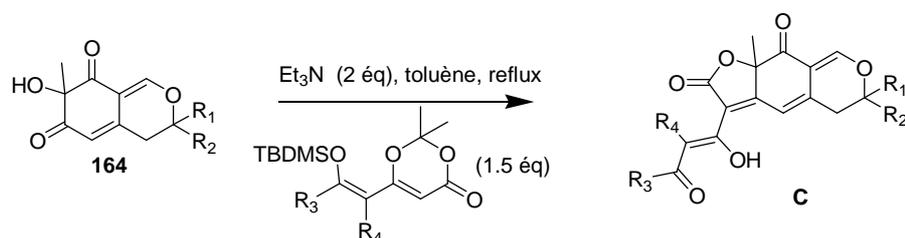


-R	Dioxinone	Dioxinone (Me)	Dioxinone silylée	Dioxinone silylée (Me)
-phényl	47% 246	81% 247	81% 251	61% 253
-p-méthoxyphényl	41% 254	100% 255	82% 256	62% 257

Tableau 12 : Tableau de rendement en dioxinones protégées.

Cette méthode conduit donc à l'obtention des dioxinones sous forme d'éther d'énol silylé avec ou sans le méthyle entre les futurs 1,3 dicarbone avec des rendements globaux allant de 23 à 38% (respectivement deux et trois étapes). Ce faible rendement global est principalement dû à la faible conversion en produit d'acylation de l'énolate de la méthyl dioxinone **245** (inférieur à 50 %). Enfin, les énols silylés ont montré une certaine sensibilité sur gel de silice conduisant à des rendements moindres malgré une conversion complète sur RMN du brut réactionnel.

À partir de ces quatre dioxinones, cinq analogues de l'épicocconone présentant la β -dicétonone en position sud ont pu être synthétisés.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	C
-H	-Me	- <i>p</i> -méthoxyphényl	-H	12% 258*
-Me	-Me	- <i>p</i> -méthoxyphényl	-H	15% 259
-Me	-Me	- <i>p</i> -méthoxyphényl	-Me	25% 260
-Me	-Me	-phényl	-H	39% 248
-Me	-Me	-phényl	-Me	29% 261

Tableau 13 : Tableau de rendement des analogues dicétoniques C. (*réalisé sans tamis moléculaire).

Tout d'abord, le **Tableau 13** reporte une conversion assez faible en analogues dicétoniques (rendements isolé inférieur à 40%). Cependant, seuls certains de ces analogues ont été synthétisés en présence de tamis moléculaire. Ainsi, les composés **258** et **259** devraient conduire à des rendements supérieurs en cas d'utilisation de desséchant. Ensuite, une différence majeure en RMN entre les composés substitués par un méthyle (**260** et **261**) et les autres (**258**, **259**, **249**) a été observée. En effet, dans le cas de R₄ = Me, la molécule n'adopte pas une forme cétoénolique mais dicétonique (**Figure 33**).

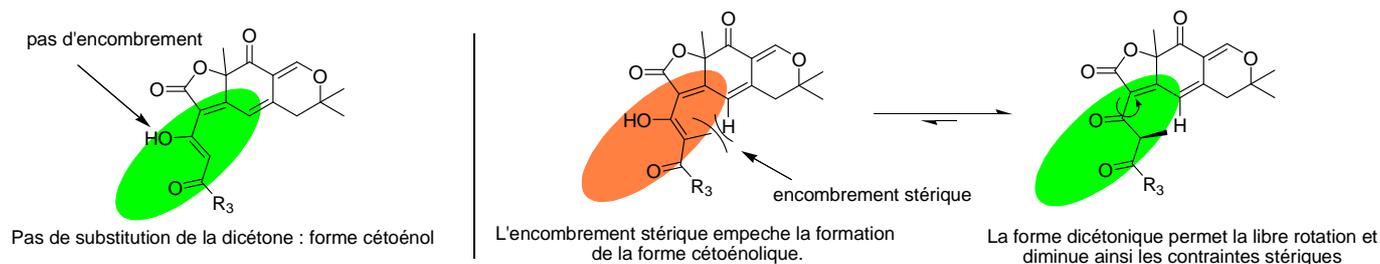


Figure 33 : Différence structurale induite par la présence d'un méthyle entre les deux cétones.

Il semblerait que la présence d'un méthyl entre le 1,3-dicarbonyle induise une contrainte stérique plus importante en α des cétones en position « sud » empêchant la formation de la forme cétoénolique. De ce fait, une hybridation sp_3 du carbone portant le méthyl réduirait d'autant les tensions et pourrait expliquer un comportement différent de ces analogues dicétoniques (plus proches des analogues de première génération).

Enfin, et dans le cadre de la thèse d'Agathe Boulangé, une optimisation de la réaction est cours avec notamment une variation du groupement protecteur de la cétone. En effet, la stabilité des éthers d'énol silylés présents sur la dioxinone semble être le véritable talon d'Achille de la méthode.

- Evaluation des propriétés spectrales des analogues de première génération:

De façon similaire aux analogues de première génération, c'est la butylamine qui a été choisie comme mime de protéines pour les évaluations de fluorescence des analogues dicétoniques dans l'acétonitrile. Un premier essai a été effectué avec le composé cétoénolique **248** (*Figure 34*). Ainsi, cet analogue a été placé en solution dans l'acétonitrile ($54 \mu\text{mol.L}^{-1}$) avec ou sans butylamine ($30 \text{éq } 5.4 \text{ mmol.L}^{-1}$).

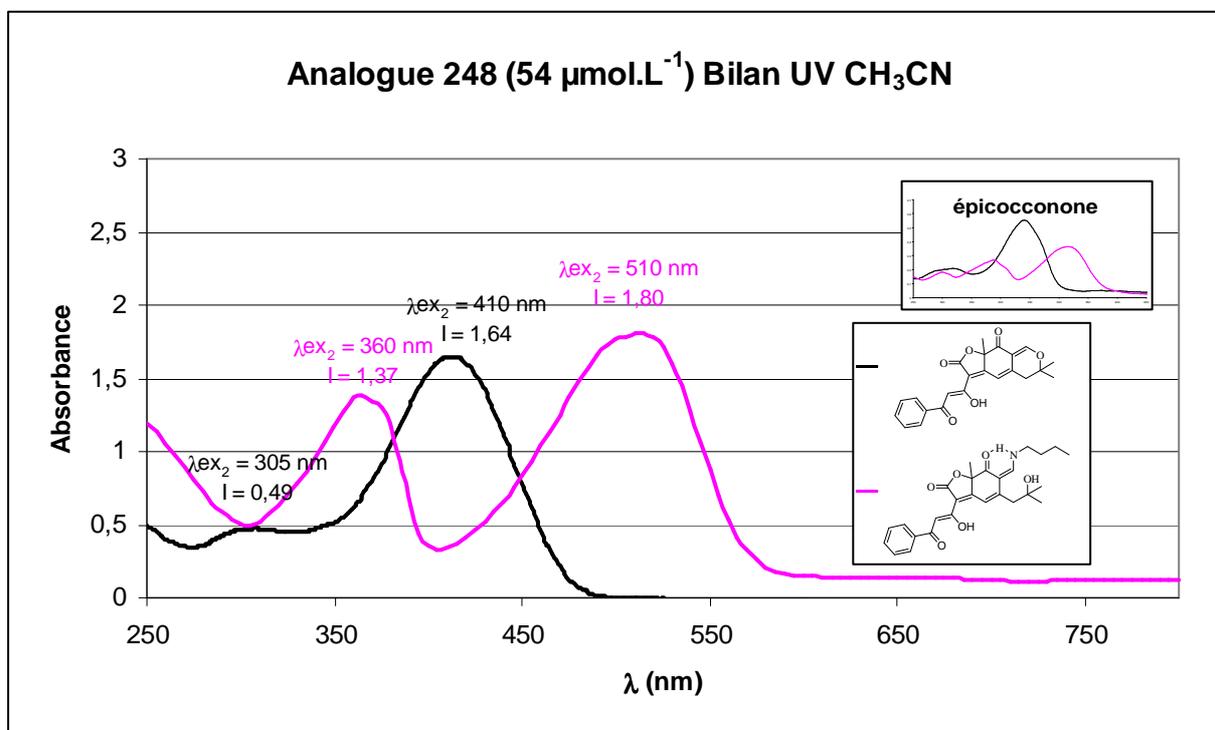


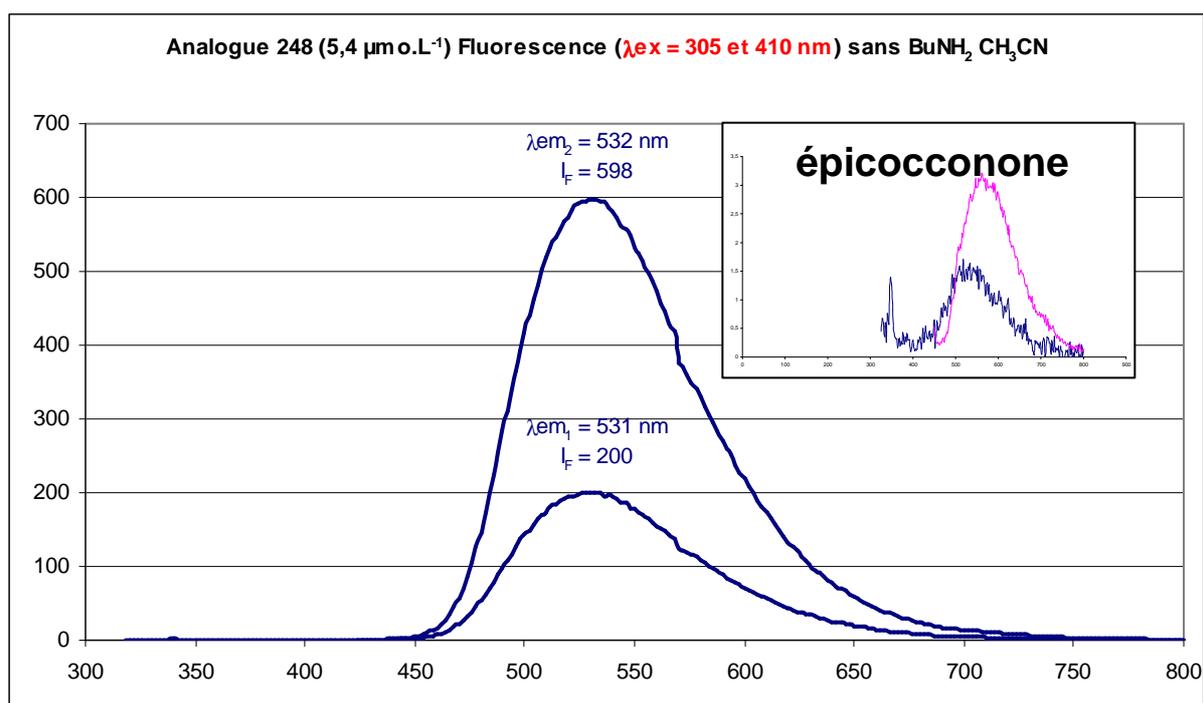
Figure 34 : Profil UV de l'analogue 248 avec et sans butylamine à $54 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Deux spectres d'absorbance sont obtenus pour l'analogue **248** en fonction de la présence (*Figure 35*, courbe mauve) ou de l'absence (*Figure 34*, courbe noire) de butylamine. Celles-ci correspondent respectivement aux spectres de l'énamine (formation quantitative) ou de la molécule native. Comme précédemment, les courbes obtenues pour l'analogue **248** sont représentatives des autres analogues adoptant une forme cétoénolique (composés **259**, **258** et épicoconone). En effet, pour les analogues **260** et **261**, des profils d'absorbance et de fluorescence proche des analogues de première génération sont obtenus). Il est également intéressant de remarquer que la présence de deux méthyles au pied de l'oxygène semble ralentir l'addition de BuNH₂ et de ce fait, 30 éq sont nécessaires pour que la conversion soit rapide (< 1 minute) et quantitative. Un effet bathochrome est alors observé en présence de BuNH₂ et deux maximums sont observés pour chaque courbe :

Sans butylamine (molécule native) : λ_{ex_1} : 305 nm et λ_{ex_2} : 410 nm.

Avec butylamine (énamine) : λ_{ex_1} : 360 nm et λ_{ex_2} : 510 nm.

Un spectre d'absorption plus en accord avec celui de l'épicoconone est obtenu (voir l'allure sur *Figure 35*). En effet, dans le cas de composé cétoénolique une bande majoritaire est observée à 410 nm pour la molécule native (430 nm pour l'épicoconone) tandis qu'en présence de BuNH₂, une bande d'absorption avec un maximum à 510 nm est obtenue (512 nm pour l'épicoconone). Enfin, une intensité plus importante en absorption est observée en comparaison des analogues de première génération. La fluorescence de la forme native et de la forme énaminique ont été alors évaluées pour chaque maximum d'excitation (*Figure 35*).



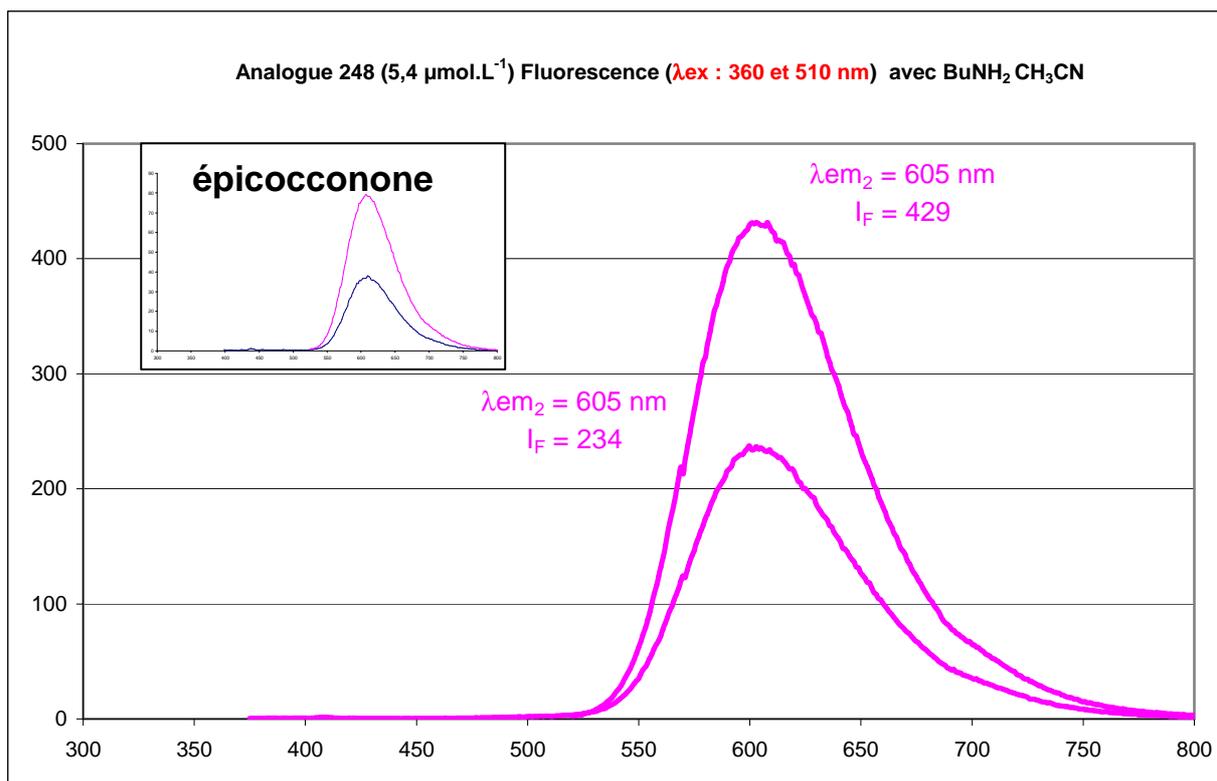


Figure 35 : Profil de fluorescence de l'analogue 248 avec ou sans butylamine à 5.4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A des concentrations similaires aux analogues de 1^{ère} génération, une saturation du signal est observée. Ainsi, les mesures pour ces analogues de deuxième génération ont été réalisées à 5.4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Une forte émission de fluorescence ($I_{\text{F}} = 200$ à 598, courbes bleues) de l'analogue **248** sans butylamine est alors observée contrairement aux analogues de première génération et à l'épicocconone. Ainsi, ces composés dicétoniques de deuxième génération ne peuvent plus être considérés comme pro-fluorophores contrairement à l'épicocconone (fluorescence native : $I_{\text{F}} < 5$ à 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A ce stade, aucune explication ne peut être apportée concernant cette différence non-négligeable de fluorescence native.

L'ajout de butylamine permettant la formation de l'énamine conduit dans le cas des composés cétoénoliques à une diminution du phénomène de fluorescence par rapport à la molécule native ($I_{\text{F}} = 234$ ou 429, courbes mauves) après excitation à 360 ou 510 nm. Un effet bathochrome est alors observé avec une émission de fluorescence de l'énamine à 605 nm. Ceci représente donc un déplacement de Stokes de 245 et 95 nm respectivement. Une grande différence de fluorescence est d'ailleurs observée en fonction de la longueur d'onde sélectionnée. Cependant, bien que moins fluorescent que la molécule native, cet analogue dicétonique est beaucoup plus fluorescent que les analogues de première génération.

- RESUME : 1 - La β -cétoénol joue un rôle très important dans la fluorescence de ce type de structure. Ces analogues de deuxième génération, aussi bien natif que sous forme énaminique étant fortement fluorescents, différent de la molécule naturelle qui est pro-fluorescente.
- 2 - Un effet bathochrome est observé aussi bien sur le spectre d'absorbance que sur le spectre de fluorescence après ajout d'amine.
- 3 - Un Stokes shift de 95 et 245 nm, proche de celui de l'épicocconone, est obtenu.

Comme précédemment et afin de comparer qualitativement de façon très rapide l'intensité de fluorescence en fonction des variations structurales réalisées sur ces analogues de deuxième génération, une simple lecture de l'intensité de fluorescence dans l'acétonitrile est réalisée (à des concentrations identiques de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Ces résultats sont reportés dans le **Tableau 14** et sont comparés aux valeurs obtenues pour l'épicocconone.

Analogue	Molécule native			Enamine			
	λ_{UV} (nm)	λ_{flu} (nm)	Intensité	λ_{UV} (nm)	λ_{flu} (nm)	Δ Stokes	Intensité
258	304/414	530	3088	366/497	596	99	3020
259	305/415	524	2727	366/505	603	98	3988
260*	276/384	564	2583	350/498	588	90	264
248	308/414	531	5537	365/512	606	94	4157
261*	322/384	505	2628	351/489	591	102	202
Epicocconone	308/384	562	160	385/512	609	97	3950

Tableau 14 : Fluorescence des analogues seuls et des analogues en présence de butylamine normalisé à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

La comparaison entre les entrées 1 et 2 (composés **258** et **259**) permet d'identifier l'influence de la présence d'un méthyle supplémentaire au pied de l'oxygène dihydropyranique pour les analogues de seconde génération. De façon surprenante, la présence de ce méthyl sur les analogues dicétoniques induisent une augmentation de fluorescence de la forme énaminique (passage de 3020 à 3950 d'intensité maximale de fluorescence). Ceci n'ayant pas été observé pour les analogues de première génération, la présence de ce second groupement méthyle induirait donc une conformation plus bloquée de l'énamine provenant de l'analogue **259**.

Ceci empêcherait donc **en partie** sa libre rotation source de desexcitation non-radiative (*Schéma 106*). Cependant, malgré cette différence dans l'émission de fluorescence, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ne varient que très peu.

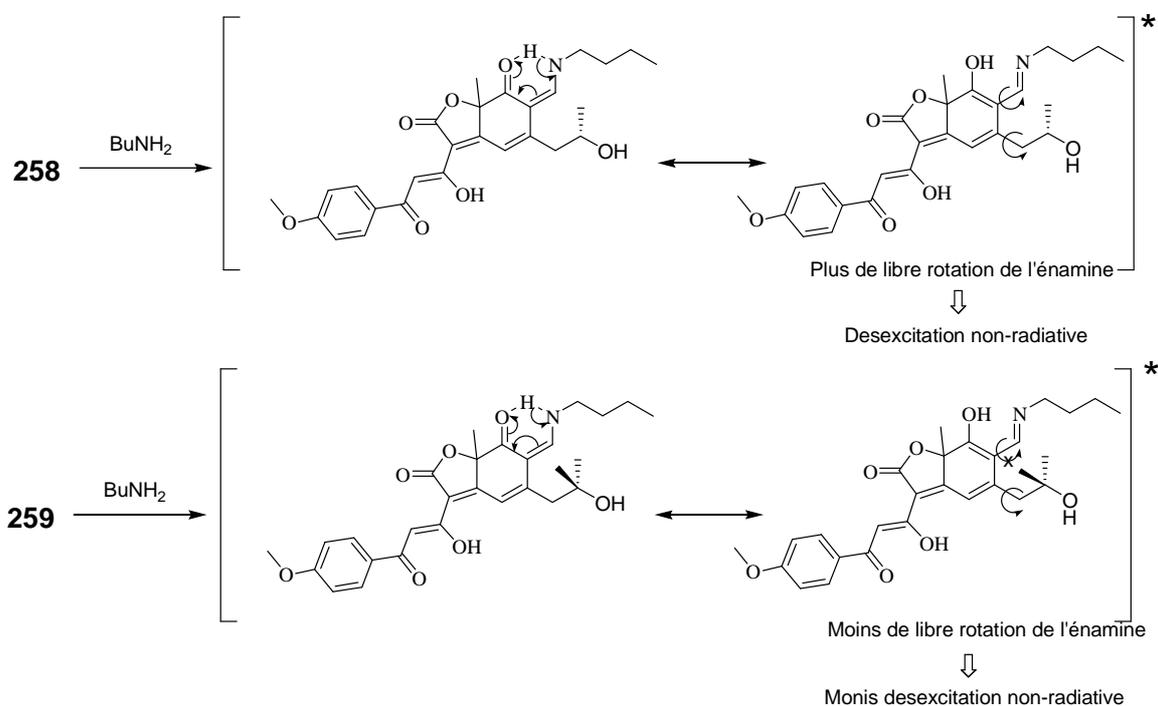


Schéma 106 : Desexcitation non-radiative par libre rotation sur l'énamine 262 (conformation moins bloquée).

La comparaison directe de la fluorescence de l'épicocconone ($I_F = 3950$ à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) avec les analogues **259** ($I_F = 3988$ à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et **248** ($I_F = 4157$ à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) montre la faible influence sur la fluorescence de l'aromatique situé en position sud après le cétoénol. C'est la substitution des analogues entre les deux cétones qui a plus influencé la fluorescence de l'énamine. En effet, les énamines provenant des composés **260** et **261** montrent des propriétés proches des analogues de première génération. Ceci est à rapprocher d'une forme dicétonique observée en RMN du ¹H dans le CDCl₃ des analogues **260** et **261** qui empêcherait la participation de la forme cétoénolique indispensable pour une importante fluorescence de ces composés.

Concernant le mécanisme de fluorescence de l'épicocconone décrit par le Pr. Karuso (transfert de charge intramoléculaire ou ICT), l'analogie structurale ainsi que les caractéristiques physicochimiques des analogues de deuxième génération (λ_{ex} , λ_{em} et intensité de fluorescence) mettent en évidence la participation importante de la fonction 1,3-dicéto dans le phénomène d'ICT.

Les analogues de première génération ne comportant pas ce motif 1,3-dicétoone présentent des caractéristiques physicochimiques plus éloignées du produit naturel (λ_{ex} , λ_{em}) et une intensité de fluorescence beaucoup plus faible.

Le mécanisme de type ICT mettant en jeu un système push-pull entre un groupement donneur et un groupement accepteur, des équilibres cétone-énols et imine-énamines peuvent permettre de délocaliser les électrons entre les différentes formes de ces fonctions et créer ainsi les conditions de transfert de charge. Un mécanisme reprenant les informations tirées des relations structures-fluorescence (importance du cétoénol) peut donc être proposé mais les formes présentes peuvent varier d'un solvant à l'autre et en fonction du pH.

Ainsi, dans un solvant organique tel que l'acétonitrile où nous avons mesuré les intensités relatives de fluorescence (*Schéma 107*), nous pouvons envisager qu'un transfert de proton entre la fonction cétone et l'énamine se produise dans un premier temps, conduisant à un énol et une imine. Ce transfert de proton pourrait avoir lieu spontanément ou être réalisé suite à l'excitation. Dans ce dernier cas, il s'agirait d'un Transfert de Proton Intramoléculaire à l'Etat Excité (ESIPT), mécanisme fréquemment rencontré en fluorescence. Suite à ce transfert, l'énol généré en position nord serait le groupe donneur et la fonction cétone en position sud serait le groupe accepteur, permettant le début du push-pull et conduisant à une nouvelle espèce présentant donc deux fonctions donneuses en position sud (énols ou énolates) et deux fonctions acceptrices en position nord (cétone et imine, voir iminium). A ce moment, le moment dipolaire de la molécule serait maximum et le transfert de charge résultant serait important, d'où une forte fluorescence.

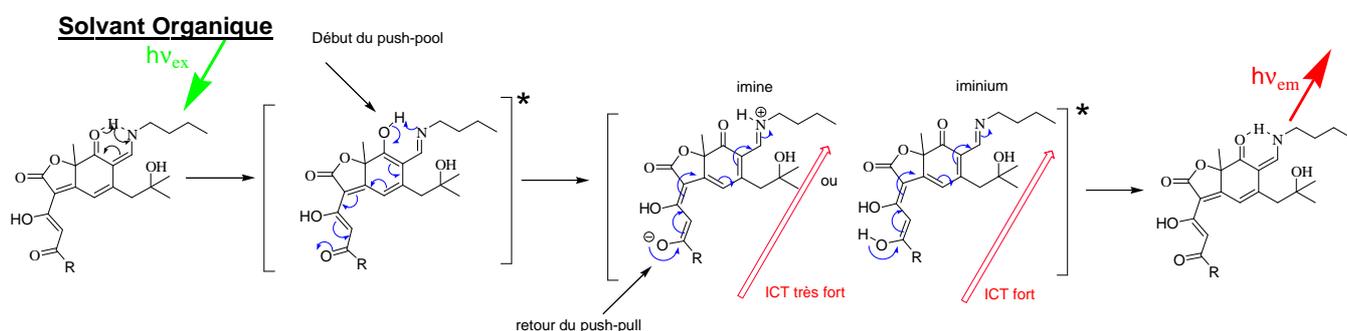


Schéma 107 : Push-pull constant entre les deux équilibres cétoénolique et cétoénaminique dans le CH_3CN .

Dans l'eau neutre, Il a été reporté par le Pr. Karuso que l'adduit énaminique de l'épicocconone n'émettait que faiblement. Cependant, une forte augmentation de la fluorescence est observée lorsque cet adduit est placé en pH acide (pH 2.3).

Ainsi, à la lumière de ce premier mécanisme, une explication de ce phénomène pourrait être proposée (*Schéma 108*). En effet, les possibilités d'échange de proton avec le solvant en milieu tamponné (neutre ou acide) permettent de mieux connaître la nature de l'espèce intermédiaire présentant le moment dipolaire le plus fort (responsable de l'ICT).

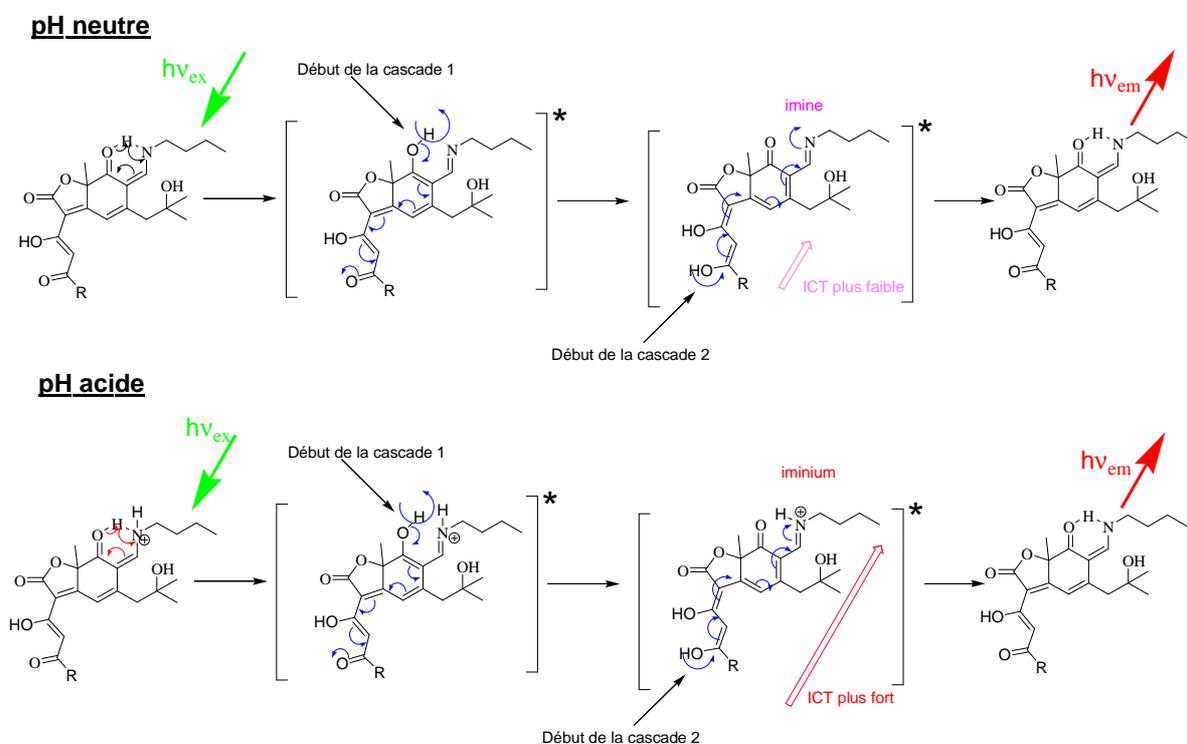


Schéma 108 : Push-pull constant entre les deux équilibres cétoénolique et cétoénaminique dans l'eau.

Ainsi, en milieu neutre, l'intermédiaire présentant le moment dipolaire le plus fort possède deux accepteurs en position nord (cétone et imine) et deux donneurs (deux énols) en position sud. A ce moment, le transfert de charge se produisant ne serait pas suffisant pour observer une bonne fluorescence dans l'eau (Le phénomène de fluorescence généré par un mécanisme de type ICT est connu pour être fortement atténué lorsque la polarité du solvant augmente).

Cependant, en milieu acide, l'imine en position nord est protonée et conduirait donc à une augmentation très importante du moment dipolaire de l'intermédiaire. Ceci se traduirait par une augmentation du transfert de charge entre les fonctions donneuse en position sud (deux énols) et les fonctions acceptrices en position nord (cétone et iminium). Ceci permettrait alors une émission de fluorescence plus importante dans l'eau.

Enfin, l'augmentation de la fluorescence après l'ajout d'un détergent tel que le SDS a également été reportée par le Pr. Karuso. Ceci va dans le même sens que notre proposition mécanistique car, en créant artificiellement un milieu apolaire par la formation miscelle, le SDS contribue à augmenter de façon synergique le moment dipolaire et donc l'ICT.

Enfin, La fluorescence des molécules natives trouve une explication à travers cette première esquisse de mécanisme. En effet, dans ce cas, un transfert de charge entre un énolate et un oxonium dihydropyranique induirait une bonne fluorescence (*Schéma 109*). De plus, l'absence de libre rotation (ici produit cyclisé) permettrait d'expliquer la meilleure fluorescence native de certains composés en comparaison des formes énaminiques.

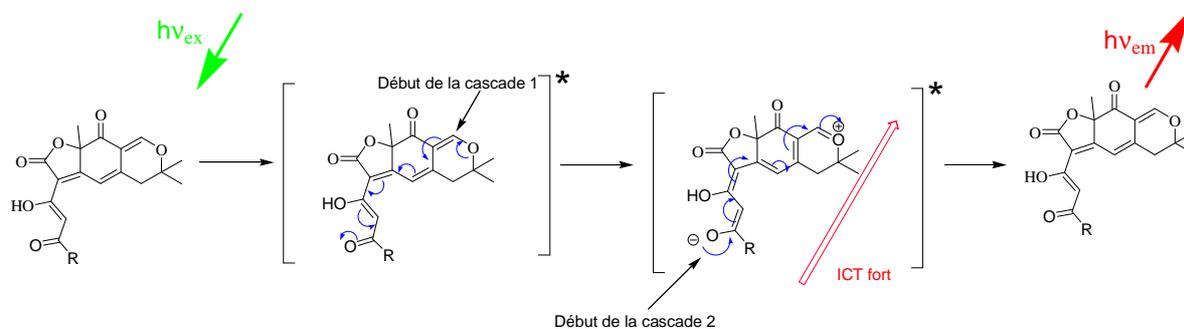


Schéma 109 : Mécanisme de fluorescence pour les molécules natives

En conclusion, un équilibre cétoénolique (sud) et un équilibre cétoénaminique seraient engagés dans un push-pull conduisant à l'apparition d'une espèce intermédiaire possédant un fort moment dipolaire. Ce fort moment dipolaire serait alors responsable de la meilleure fluorescence de ces composés de deuxième génération. De plus, le déclenchement de ce push pull par l'équilibre cétoénaminique pourrait être de type ES IPT si celui-ci intervient à l'état excité. Une collaboration avec le Pr. Datta (physicien à Université de Bombay) permettra, sous peu, d'avoir de plus amples informations sur ce mécanisme de fluorescence.

Enfin, de façon surprenante, les composés substitués par un méthyle entre les deux cétones en position sud sont très fluorescent nativement dans l'acétonitrile. Il semblerait donc que dans des solvants plus polaires, la molécule native adopte une forme cétoénolique. Des études ultérieures confirmeront probablement cette observation par RMN du proton dans l'acétonitrile. Après évaluation de leurs propriétés spectrales par mesures de fluorescence en solution dans l'acétonitrile, l'application de nos analogues pour la révélation de protéines sur gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE a alors été envisagée.

4. 1. 3. 3. Evaluation des analogues pour la détection de protéines sur gel d'électrophorèse.

Afin de tester nos analogues rapidement, une collaboration a été engagée avec l'équipe qui a isolé la molécule naturelle en 2003 et qui est à la base de la compagnie Fluorotechnics®: le groupe du Pr. Karuso de l'Université de Macquarie University (Australie).

La collaboration avec ces deux entités a finalement conduit à la réalisation des gels SDS PAGE en utilisant nos analogues de première et deuxième génération afin des les comparer à l'épicoconone.

- Analogues de première génération.

L'ensemble des gels réalisés a été révélé par 50 mL d'une solution basique (tampon borate pH 10.2) d'analogue à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ceux-ci ont été comparés à un gel témoin révélé par 50 mL d'une solution basique (tampon borate pH 10.2) d'épicoconone à $0.89 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les protéines suivantes ont donc été insérées dans chaque puits du gel ($1 \mu\text{g}$ par puits sauf pour l'entrée 1) :

Puits	Protéines ou mélange de protéines
1	GE Low molecular weight markers (125 ng)
2	Porcine IgG
3	Lysozyme
4	Transferrin
5	Ovalbumin
6	β -lactoglobulin
7	Carbonic anhydrase
8	Alkaline phosphatase
9	Soybean trypsin inhibitor
10	Creatinase
11	Bovine Plasma
12	RNase B

Tableau 15 : Protéines révélées sur les gels d'électrophorèse.

Comme attendu, ce sont les analogues naphtyliques **227**, et *p*-méthoxyphényliques **239** qui ont montrés les meilleurs résultats (gel comparables) en première génération (**Figure 36**). Il faut souligner que les gels révélés par les analogues de première génération ont été irradié 488 nm tandis que pour l'épicoconone, l'excitation a été effectuée à 532 nm.

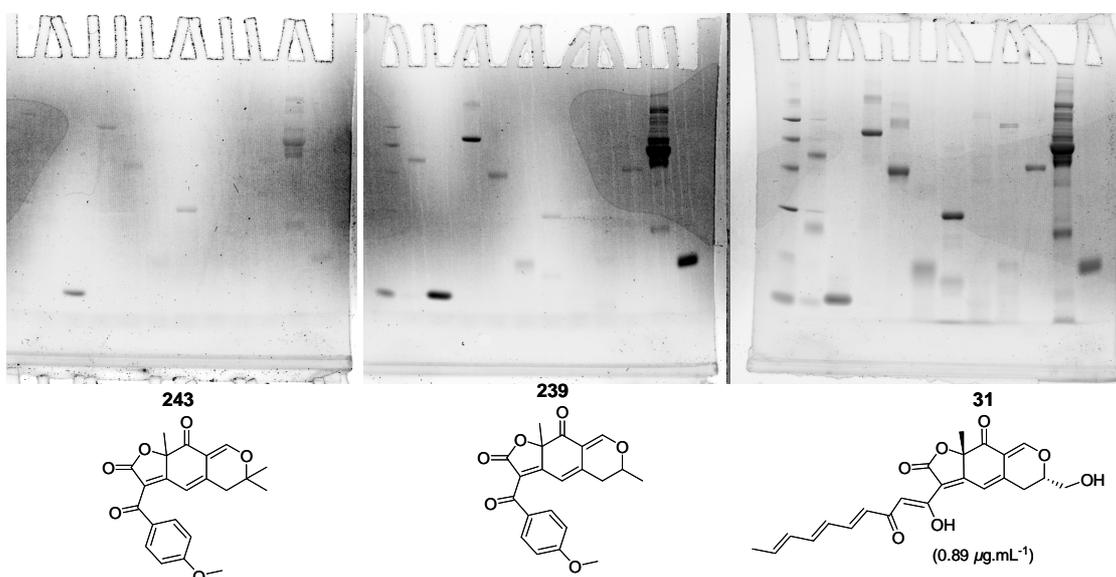


Figure 36 : Gel SDS-PAGE révélés par $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'analogue de première génération.

La comparaison des gels réalisés en utilisant les deux analogues *p*-méthoxyphényliques **243** et **239** (*Figure 36*) de première génération ont montrés de grandes différences de marquage. Quatre informations importantes peuvent être déduites de ces gels :

- 1 - Les analogues de première génération pénètrent bien dans les gels et permettent une fixation correcte des protéines dans cette matrice.
- 2 - Bien qu'ayant des fluorescences comparables en solution, une différence entre le composé **243** et **239** est observée pour le marquage de certaines protéines sur gel d'électrophorèse. Ceci pourrait donc indiquer que l'attaque des protéines (fonctions amines encombrées) est ralentie sur les analogues portant deux méthyles au pied de l'oxygène dihydropyranique, bien que le temps de marquage soit d'une heure.
- 3 - Comme observé lors des tests de fluorescence, ces analogues sont moins fluorescents que la molécule naturelle et conduisent à une moins bonne détection des protéines. Ainsi, de nombreux spots correspondant à d'autres protéines apparaissent lors de l'utilisation d'épicoconone.

Bien que moins fluorescent, une meilleure sensibilité est observée pour certaines protéines par marquage avec l'analogue **239** (**Puit 3** - lysozyme). Ceci laisse donc penser que soit l'analogue ne se fixe pas parfaitement à l'ensemble des protéines, soit la fluorescence émise est trop faible pour leurs détections. Afin de lever le doute sur la fixation non-spécifique de l'ensemble des protéines par nos analogues de première génération, un nouveau gel (*Figure 37*) a été réalisé en utilisant une concentration dix fois plus importante de l'analogue **239**.

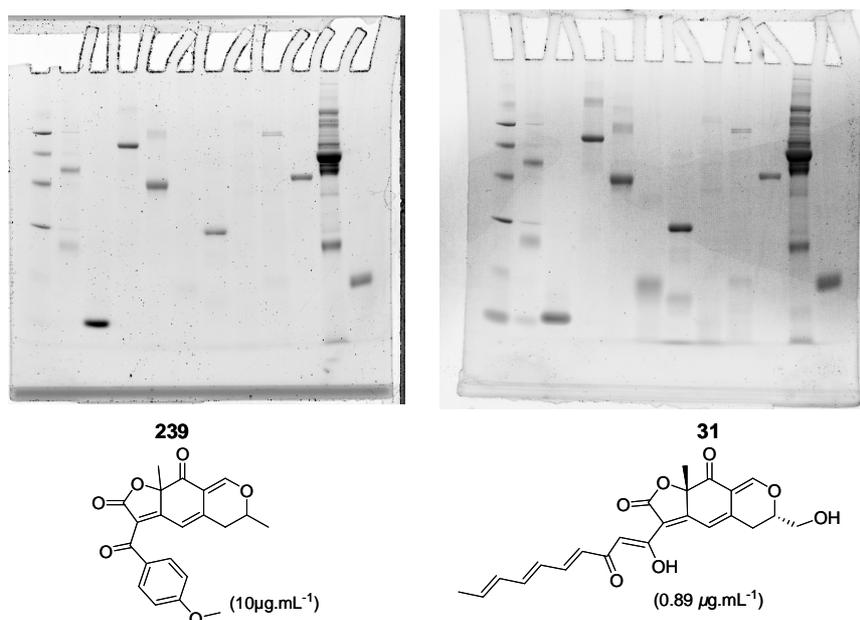


Figure 37 : Comparaison entre un gel révélé par l'analogue 239 (10 fois plus concentré) et l'épicoconone.

Ce dernier gel révélé par l'analogue **239** permet de repérer de nouveaux spots. Ceci confirme donc que l'analogue de première génération se lie de façon non-spécifique à l'ensemble des protéines. Cependant, à une concentration trop faible, certains spots ne sont pas révélés par l'émission de fluorescence trop faible des adduits énaminiques de première génération.

- Analogues de deuxième génération.

Comme pour les analogues de première génération, l'ensemble des composés ont été utilisés pour révéler les protéines sur gel d'électrophorèse. Ainsi, 50 mL d'une solution tampon borate (pH 10.2) à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'analogues de deuxième génération a permis de marquer les différents gels. Comme précédemment, un gel témoin par une solution tampon borate (pH 10.2) à $0.89 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'épicocconone est utilisé comme témoin. Comme attendu suite aux évaluations de ces analogues de deuxième génération en solution, de bien meilleurs résultats sont obtenus lors de leurs utilisations comme marqueurs de protéines sur gels d'électrophorèse (**Figure 38**).

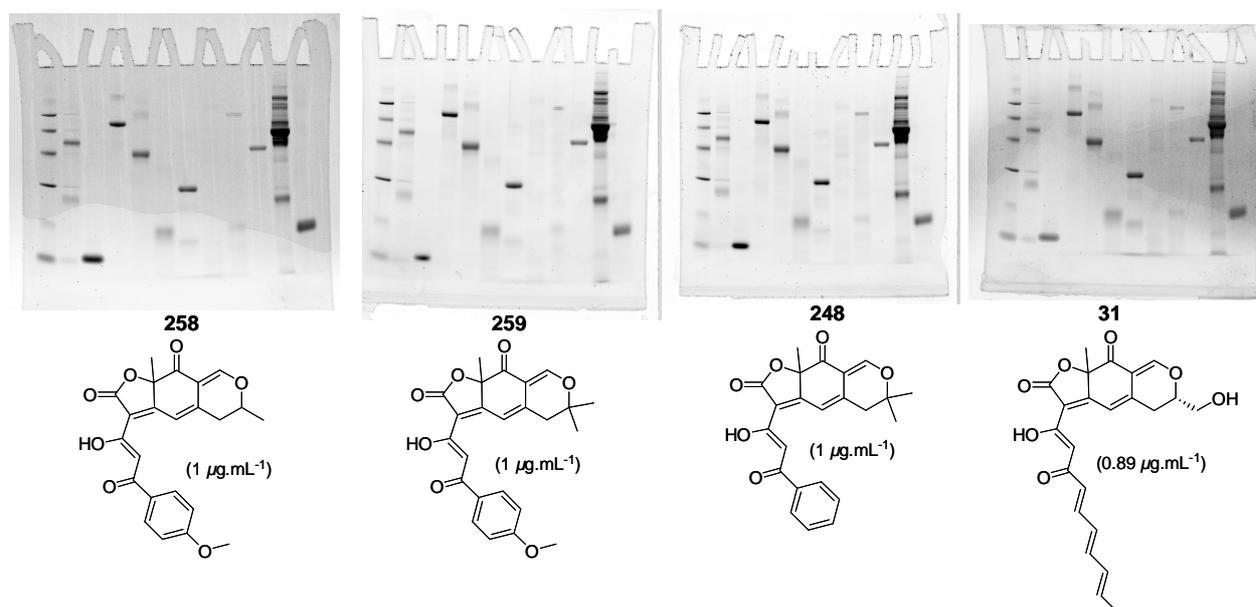


Figure 38 : Comparaison des gels révélés par des analogues de deuxième génération et l'épicocconone (excitation à 532 nm).

En premier lieu, à concentration identique, beaucoup plus de protéines sont détectées en utilisant des analogues de 2^{ème} génération par rapport aux analogues de première génération. En effet, l'ensemble des protéines visibles sur le gel témoin sont observables avec nos trois analogues cétoénoliques. De plus, un bruit de fond amoindri semble également être observé pour les gels révélés par les analogues **248** et **259**.

Afin de comparer de façon quantitative les révélations en fonction du marqueur utilisé, l'analyse par retraitement informatique des intensités relatives de chaque spot a été réalisée par le Dr. Malcolm Ball (Université de Macquarie).

Rapport signal/bruit :

Marqueur utilisé	Signal/bruit
épicocconone	3.4
Analogue 259	10.5
Analogue 258	4.9
Analogue 248	9.8

Tableau 16 : Tableau comparatif des valeurs de signal/bruit.

Dans le cas de l'utilisation des analogues **259** et **248**, un bruit de fond nettement amoindri permet un gain non-négligeable de la sensibilité. Cette différence majeure de bruit de fond pourrait être expliquée par une recyclisation plus importante des fluorophores lors des lavages du gel se succédant au marquage des protéines dans le cas de l'épicocconone et de l'analogue **248**. Ainsi, une molécule possédant uniquement un méthyle dihydropyranique pourrait être plus sensible à une recyclisation en milieu acide car moins encombrée (**248** et **épicocconone** : un carbone tertiaire porte l'oxygène dihydropyranique – *Schéma 110*). Ceci pourrait alors conduire au relargage partiel et à la diffusion dans le gel des molécules natives fluorescentes générant un bruit de fond nuisible.

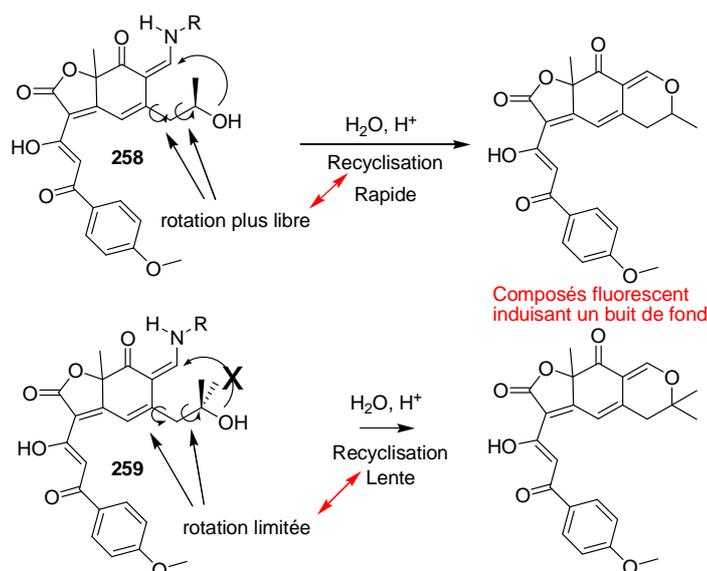


Schéma 110 : Marquage très rapide des protéines sur l'analogue 258 / relargage rapide de 258 par cyclisation rapide en milieu acide aqueux.

En effet, bien qu'en solution aqueuse le maximum de stabilité de l'énamine ait été décrit par le Pr. Karuso à pH acide (2.3), cette recyclisation a bien été observée lors des tests de fluorescence en milieu organique (acétonitrile). Ainsi, après addition d'une solution diluée de TFA (concentration finale 10^{-3} mol.L⁻¹) dans la cuve d'absorbance contenant une solution d'énamine, une lente conversion en composé natif est observée. Le spectre d'absorbance recueilli après 30 minutes de réaction ne fait alors apparaître que le composé cyclisé.

- RESUME : 1 - Les analogues de première génération sont moins fluorescents et ne permettent pas, à concentration identique, une révélation des protéines aussi efficace que l'épicocconone.
- 2 - Comme attendu suite aux tests de fluorescence en solution dans l'acétonitrile, la présence de la β -dicétone joue un rôle déterminant pour la révélation de protéines sur gels d'électrophorèse.
- 3 - Un bruit de fond trois fois supérieur est observé dans le cas de l'utilisation de l'analogue **258** et de l'épicocconone portant un méthyle dihydropyranique. La présence de deux méthyles dihydropyraniques pourrait donc bloquer partiellement une recyclisation relarguant la molécule native, source de de bruit de fond.

Des tests de limites de détection (gels à concentration décroissante en protéines) et une étude de photostabilité étant actuellement en cours au sein de l'Université de Macquarie, de plus amples conclusions ne peuvent ainsi être énoncée au vues de ces premiers résultats.

Une synthèse robuste et très convergente d'analogues de l'épicocconone a donc été mise en place. Celle-ci a finalement permis d'obtenir un grand nombre d'analogues avec une grande diversité fonctionnelle sur la partie sud de la molécule. Cette grande diversité a conduit à une étude de la relation structure-fluorescence mettant en exergue l'importance du groupement β -cétoénolique en position sud. Une méthode rapide d'estimation des propriétés physicochimique a été mise en œuvre et une collaboration avec l'équipe ayant découvert le produit naturel a conduit à l'évaluation de nos analogues sur gels d'électrophorèse SDS-PAGE. Pour les meilleurs analogues (**259** et **248**), un bruit de fond nettement amoindri est alors observé en comparaison d'un gel témoin utilisant le produit naturel. Ceci permet d'espérer *in fine* un gain de sensibilité important traduit une baisse significative de la limite de détection.

Afin de valoriser la méthodologie de synthèse d'acylfuranone mise en œuvre précédemment, un nouveau travail de synthèse de produits naturels a été engagé. La cible sélectionnée est celle décrite précédemment : le Cadiolide B.

4. 1. 4. Application à la synthèse du cadiolide B.

4. 1. 4. 1. Rappels bibliographiques.

La synthèse totale d'un produit naturel a été engagée : le cadiolide B (**Figure 39**). En effet, ce produit naturel est basé sur un cœur de type acylfuranone, structure proche des composés dihydrofuranique dont nous venons de voir la synthèse à partir de dioxinones.

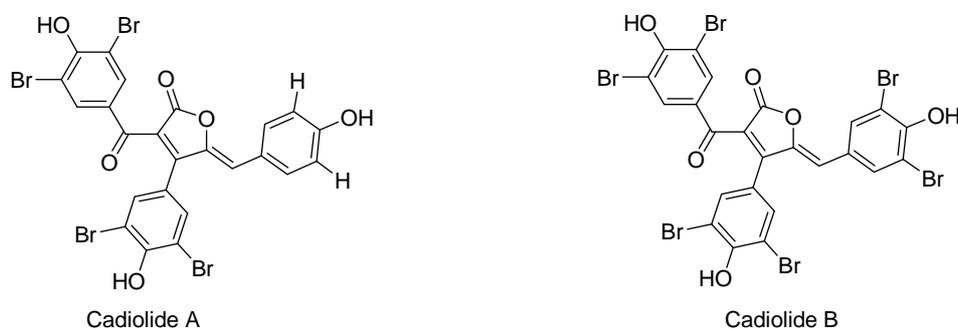


Figure 39 : Structure du Cadiolide A et du Cadiolide B.

En 1998, ces deux composés ont été isolés par le groupe du Pr. Ireland d'une ascidie indonésienne du genre *Botryllus*¹⁴⁶ (organisme marin). Ces composés possèdent des activités d'inhibiteur sélectif de cyclo-oxygénase 2 (COX-2)¹⁴⁷. Les cyclo-oxygénases (COX) sont des enzymes qui permettent la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Trois isoenzymes COX sont connues : COX-1, COX-2 et COX-3. Les "COX-1" font parties d'une famille d'enzymes constitutives de l'organisme qui se trouvent dans une immense majorité des cellules, et impliquées dans de nombreux mécanismes. Leur activité est indirectement liée à la production des thromboxanes (hormones à effet vasoconstricteurs conduisant à une augmentation de la pression artérielle). Les "COX-2" font parties d'une famille d'enzymes responsables de l'activité inflammatoire.

(146) Smith, C., J.; Hettich, R., L.; Jompa, J.; Tahir, A.; Buchanan, M., V.; Ireland, C. M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4147-4150.

(147) Prasit, P.; Brideau, W., C.; Chan, C. C.; Charleson, S.; Cromlish, W.; Ethier, D.; Evans, J., F.; Ford-Hutchisson, A., W.; Gauthier, J., Y.; Gordon, R.; Guay, J.; Gresser, M.; Kargman, S.; Kennedy, B.; Leblanc, Y.; Léger, S.; Mancini, J.; O'Neill, G., P.; Ouellet, M.; Percival, M., D.; Perrier, H.; Riendeau, D.; Rodger, I.; Tagari, P.; Thérien, M.; Vickers, P.; Wong, E.; Xu, L., J.; Young, R., N.; Zamboni, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *9*, 1773-1778.

Ces molécules ont été synthétisées pour la première fois par le groupe du Pr. Pouliot en 2005¹⁴⁸.

- Synthèse de Pouliot :

Cette synthèse s'articule autour d'une fonctionnalisation d'un noyau dihydrofuranonique (*Schéma 111*). Elle a été réalisée en 6 étapes et conduit au produit désiré avec un rendement total de 42%.

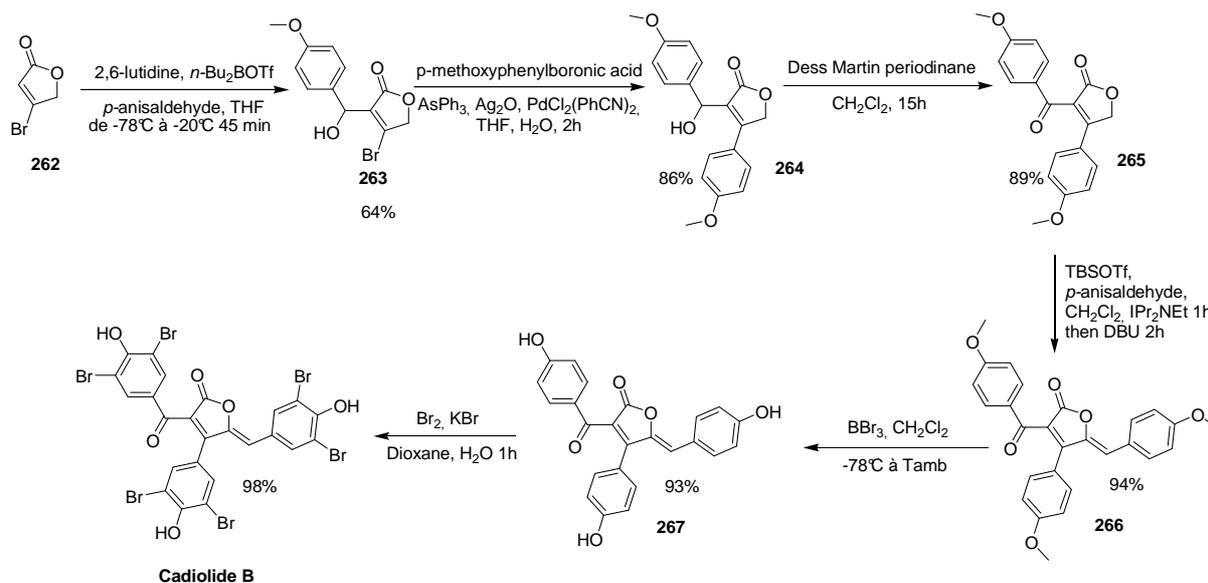


Schéma 111 : Synthèse totale de la cadiolide B.

Bien que menant au cadiolide B avec un rendement très satisfaisant de 43%, cette synthèse est critiquable au niveau du coût de la furanone bromé **262** (5g : 693\$). Ainsi, la nécessité de synthétiser cette bromofuranone de départ à partir de la furanodione¹⁴⁹ (*Schéma 112*) amène cette synthèse à 7 étapes avec un rendement global de 36% (à noter le prix de la furanodione – 5g : 90\$).

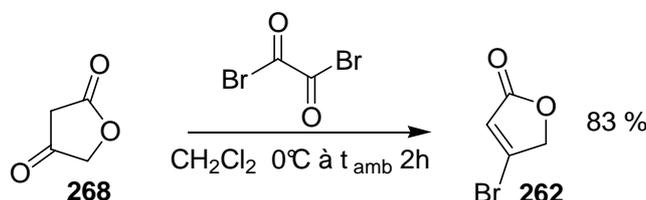


Schéma 112 : Synthèse de la bromo-furanone de départ.

L'utilisation des dioxinones comme précurseur de l'acylfuranone du cadiolide B a alors été envisagée, et ce, en choisissant correctement les différents partenaires.

(148) Boukouvalas, J.; Pouliot, M. *Synlett* **2005**, 2, 343-345.

(149) Jas, G. *Synthesis* **1991**, 965-966.

4. 1. 4. 2. Synthèse proposé basée sur une réaction monotope cyclisation en acylfuranone - condensation sur un aldehyde.

Schéma rétrosynthétique :

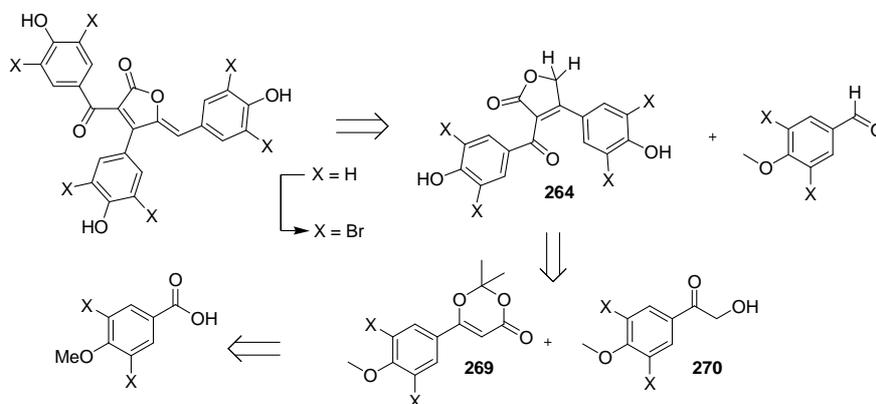


Schéma 113 : Schéma rétrosynthétique proposé pour la synthèse de Cadiolide B.

Le Cadiolide B pourra ainsi être synthétisé à partir de l'acylfuranone **264** après condensation en milieu basique du *p*-méthoxybenzaldéhyde. L'acylfuranone **264** pourra finalement être obtenue en une étape à partir de l' α -hydroxycétone **269** et de la dioxinone **270** suivant la méthodologie mise au point précédemment. A noter que la bromation des cycles aromatiques pourra être effectuée en fin de synthèse ou pourra être réalisée sur les synthons de départ. Enfin, les conditions de cyclisation se réalisant à chaud en présence d'une base, la formation du produit portant trois cycles aromatiques pourra être envisagée de façon monotope et multi-composante si l'addition de l'énolate intracyclique provenant de **264** sur l'aldéhyde se produisait après cyclisation.

Essai sur une molécule modèle :

Afin de mettre au point au plus vite les conditions opératoires de réaction monotope multicomposante, des essais sur un substrat modèle ont alors été entamés. Ces essais ont été réalisés sur deux α -hydroxycétones en utilisant la 5-méthyl-dioxinone **181** et le *p*-nitrobenzaldéhyde à reflux du toluène en présence de Et_3N (**Schéma 114**).

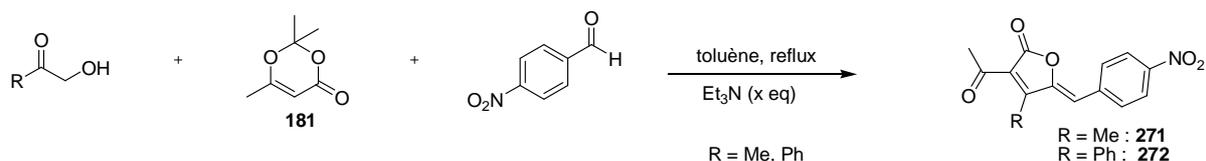


Schéma 114 : Premiers essais de cyclisation-addition monotope.

-R	Dioxinone	Base	Solvent	yield
-Me	1 eq	Et ₃ N 1 eq	Toluene 10 mL	3 %, 271
-Me	1 eq	Et ₃ N 0.2 eq	Toluene 10 mL	16 %, 271
-Me	2 eq	Et ₃ N 0.05 eq	Toluene 10 mL	9 %, 271
-Ph	2 eq	Et ₃ N 0.05 eq	Toluene 10 mL	30% (50% NMR), 272

Tableau 17 : Premier essais de cyclisation-addition multicomposante.

Les **entrées 1 à 3** mettent en exergue la faible conversion en produit désiré dans le cas de l'utilisation de 3-hydroxybutan-2-one. Ceci pourrait trouver une explication par les deux positions sur la molécule présentant des protons d'une acidité proche et induisant une dégradation en milieu basique (**Schéma 115**).

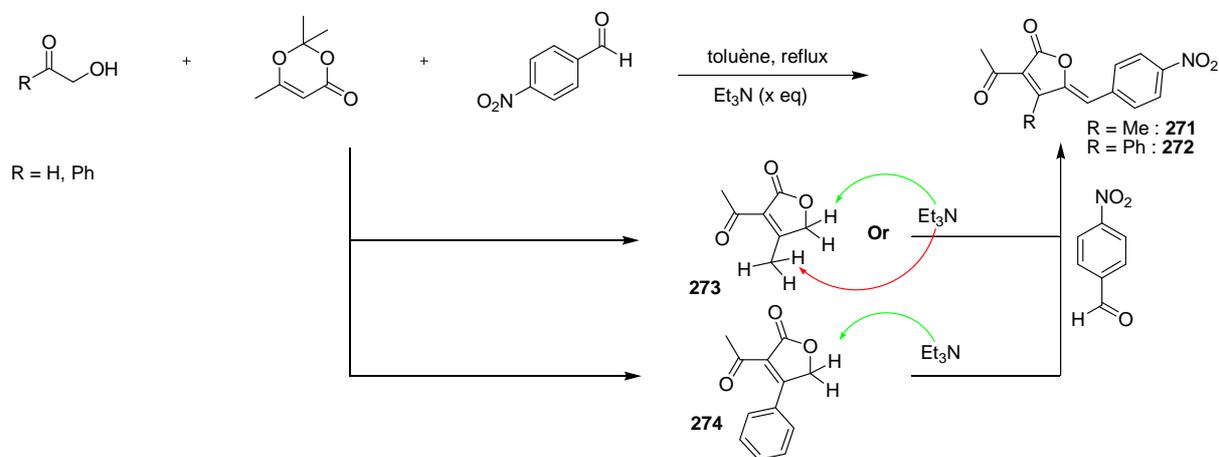


Schéma 115 : Perte de la chimiosélectivité de déprotonation dans le cas des méthylacylfuranones.

De plus, l'addition de base en conditions catalytique (0.2 éq) semble avoir eu un effet direct sur le rendement. En effet, 16% de produit désiré a ainsi pu être isolé. Soupçonnant une perte de l'acylcétène, une augmentation de la quantité de précurseur d'acylcétène a été entreprise. Cela n'a malheureusement pas eu l'effet escompté sur le rendement en produit désiré puisque seulement 9% ont été isolés (à ce stade de l'étude, l'influence du tamis moléculaire n'avait pas encore été mis en évidence).

Ce tableau montre enfin que le produit désiré a pu être obtenu avec une bonne conversion lorsque l'alcool de départ est la 2-hydroxy-1-phényléthanone. En effet, 50% de produit désiré a été obtenu sur le brut réactionnel lorsque la base est utilisée en quantité catalytique (5% mol), et que deux équivalents de dioxiones sont additionnés. Une précipitation du composé **52** a alors été effectuée dans l'éther diéthylique et 30 % de produit désiré a été obtenu.

Il est toutefois intéressant de noter une donnée importante : Le milieu noircit fortement en fonction de la quantité de base utilisée et également en fonction du temps de réaction. Non-décrite dans le tableau précédent, une augmentation de la quantité d'aldéhyde mène aussi au même phénomène. Ceci peut être expliqué par la libération de deux molécules d'eau :

- 1- La cyclisation du β -cétoester sur la cétone conduit à une première libération d'eau.
- 2- La condensation de la furanone (**273** ou **274**) formée intermédiairement sur l'aldéhyde mène à la libération d'une deuxième molécule d'eau.

Bien qu'ayant une faible influence dans le cadre d'une cyclisation classique (56% rendement sans tamis moléculaire pour la formation de l'intermédiaire), il semble que la libération de deux molécules d'eau à haute température en milieu basique puisse conduire à des réactions de type Cannizaro (*Schéma 116*).

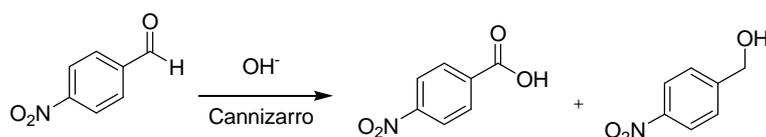


Schéma 116 : Dégradation de l'aldéhyde en présence d'eau.

Cela permet aussi d'expliquer la perte non-négligeable d'acylcétène observé depuis le début de l'étude mécanistique par réaction de décarboxylation lorsque deux équivalents d'eau sont libérés (*Schéma 117*).

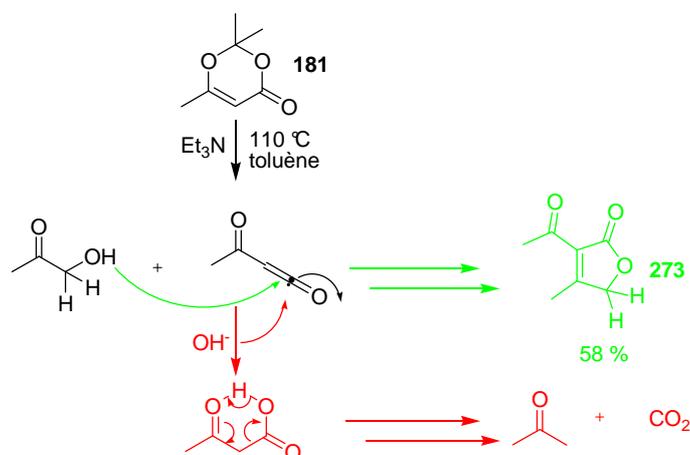
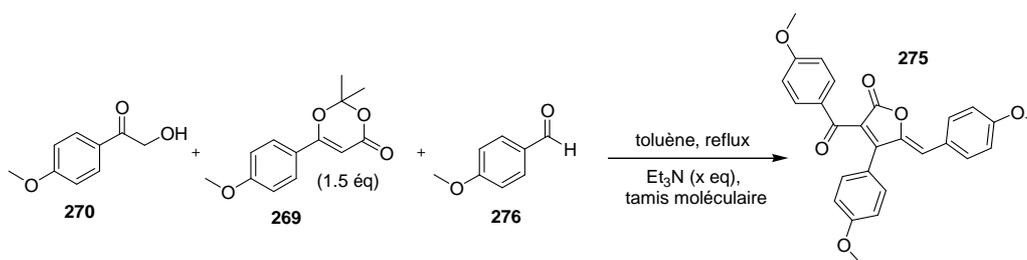


Schéma 117 : Possible décarboxylation de l'acylcétène en présence d'eau.

Synthèse de la cadiolide B :

Au vues des résultats obtenus lors des essais préliminaires, l'utilisation de tamis moléculaire semble donc déterminante. De nouveaux essais ont alors été engagés en présence de tamis moléculaire en partant cette fois des synthons adéquats pour l'obtention du cadiolide B. La réaction multicomposante a donc été réalisée à partir de l' α -hydroxycétone **270**, de la dioxinone **269** et du *p*-méthoxybenzaldéhyde **276** à reflux du toluène en présence de 0.05 éq de Et₃N et de tamis moléculaire.



Entrée	Et ₃ N	Rendement 275
1	0.05	Traces
2	2	41%
3	4	14%

Tableau 18 : Tabelau de rendement en composé de cylisation/condensation **275**

Contrairement aux essais faisant intervenir le *p*-nitrobenzaldéhyde, l'utilisation de *p*-methoxybenzaldéhyde ne conduit pas au produit de condensation **275** lorsque la quantité de base est catalytique. En effet, seules des traces de composé sont obtenus dans ce cas (**entrée 1**, **Tableau 18**). Ceci trouve une explication dans la réactivité de cet aldéhyde. En effet, c'est la présence d'un groupement donneur (-OMe) sur le cycle aromatique qui empêche une bonne condensation de l'énolate sur l'aldéhyde. Une façon de contrer cette baisse de réactivité est l'augmentation de la quantité de base dans le milieu. Bien que les études préliminaires aient mis en avant la forte dégradation du milieu dans le cas de l'augmentation de base, une optimisation a bien été observée pour la synthèse multicomposante du composé **275**. En effet, 41% ont pu finalement être isolé lors de l'utilisation de 2 éq. de Et₃N (**entrée 2**).

Une optimisation des conditions opératoires est actuellement en cours afin d'augmenter encore la conversion en produit désiré, et notamment l'ajout d'acide de Lewis pouvant favoriser l'addition sur l'aldéhyde. Ceci représente donc une synthèse formelle du cadiolide B. Le produit naturel pourra alors être synthétisé en 2 étapes selon les conditions décrites par le Pr. Pouliot après déprotection des éthers méthyliques et bromation des cycles aromatiques.

4. 2. Etude la réactivité d'acylétène sur des β -hydroxycétones (formation de cycle à 6 chaînons).

Une fois les conditions de formation d'acylfuranones mise au point, une extension de cette méthode à la synthèse d'acylpyranones a alors été envisagée.

4. 2. 1. Rappels bibliographiques.

Très peu de méthodes décrivent les synthèses d'acyldihydropyranones. En effet, suite aux travaux du Pr. Lacey¹¹⁷ en 1954 (utilisation du diketene dans la synthèse d'acyldihydrofuranones et d'acyldihydropyranones), seul le groupe du Pr. Oshima^{150,151} a également synthétisé des acyldihydropyranones par condensation intracyclique d'un β -cétoester sur une cétone en condition basique (*schéma 118*).

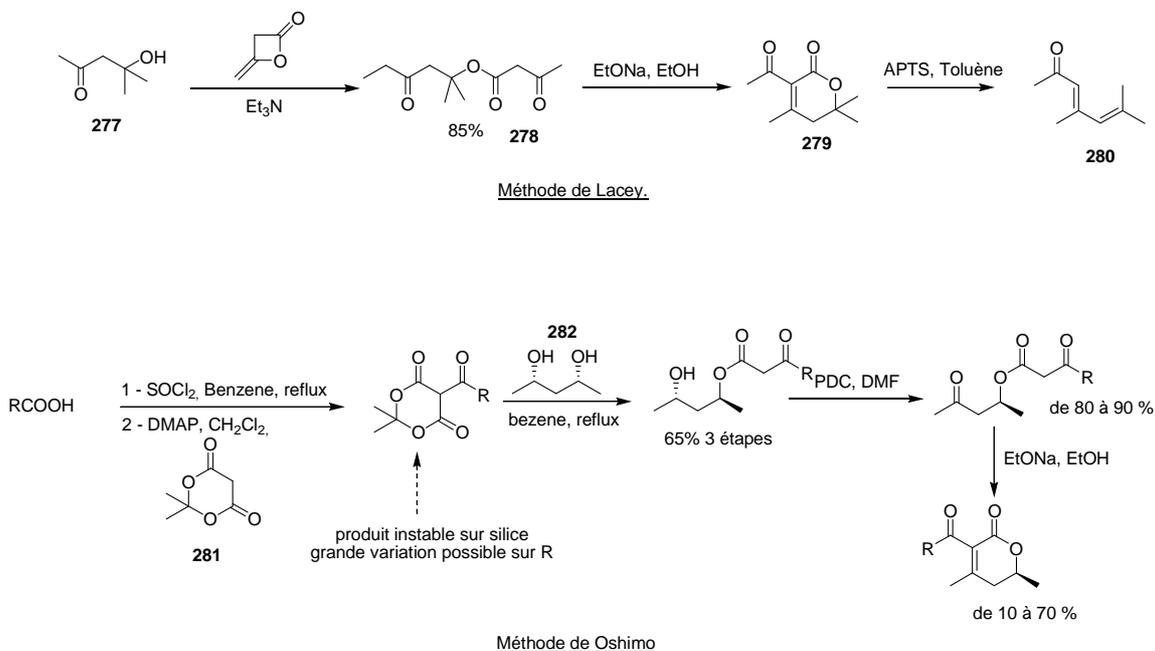


Schéma 118 : Méthode de Lacey - utilisation de diketene / Méthode de Oshima – utilisation d'acides de Meldrum.

Ainsi, en présence d'une solution alcaline, la cyclisation intramoléculaire se produit et conduit aux dihydropyranones avec des rendements moyens à mauvais. En effet, malgré une fonctionnalisation très large des acides de Meldrum, la dernière étape conduit à des rendements erratiques. Ceci est d'autant plus observé que la chaîne R est grande.

¹⁵⁰ Takaya, Y.; Kikuchi, H.; Terui, Y.; Komiya, J.; Furukawa, K.; Sekiya, K.; Motomura, S.; Ito, A.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 985–989.

¹⁵¹ Kikuchi, H.; Sasaki, K.; Sekiya, J.; Maeda, Y.; Amagai, A.; Kubohara, Y.; Oshima, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3203–3214.

De plus, cette synthèse de dihydropyranone énantiopure mise en évidence par le Pr. Oshima ne permet pas d'obtenir une convergence totale dans la fonctionnalisation car elle est conditionnée par l'accessibilité du diol **282**.

4. 2. 2. Etude méthodologique.

Afin d'optimiser l'accès aux produits de types dihydroacylpyranones, l'application aux β -hydrocétone de la méthodologie de synthèse mise au point sur des cycles à 5 chaînons à été entamée (*Schéma 119*).

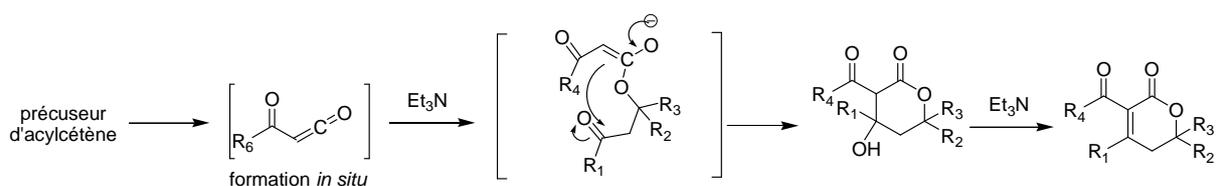


Schéma 119 : Synthèse de Dihydroacylpyranones par addition / cyclisation de β -hydroxycétone sur un acylcétène.

- Essai préliminaire :

Le premier essai a été réalisé à partir de la 3-hydroxy-3-méthylbutan-2-one **283** à reflux du toluène en présence de 1.5 éq de 6-méthyl-1,3-dioxin-4-ones **181** et de 0.5 éq de diisopropylethylamine. Ces conditions réactionnelles n'ont pas permis d'obtenir la pyranone **284** désirée et seul le produit d'addition le β -dicétonique **285** est isolé avec un rendement de 62% (*Schéma 120*).

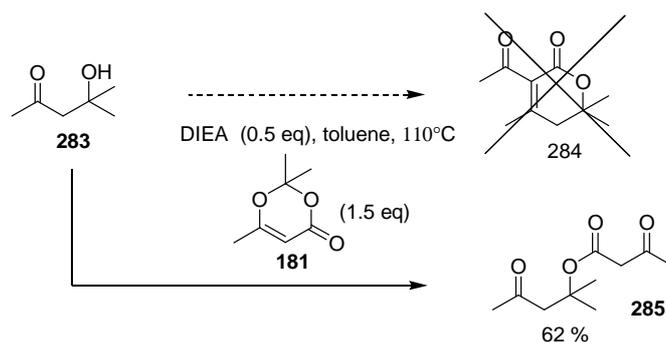


Schéma 120 : Essai préliminaire - Pas de pyranone formée.

Les études précédentes relatant l'importance de la base utilisée pour cycliser l'acétoacétate (Base alcaline), un essai de cyclisation d'un acétoacétate a été effectué en présence d'EtONa dans l'éthanol (*schéma 120*). Le produit désiré **287** a pu ainsi être isolé avec un rendement de 80%.

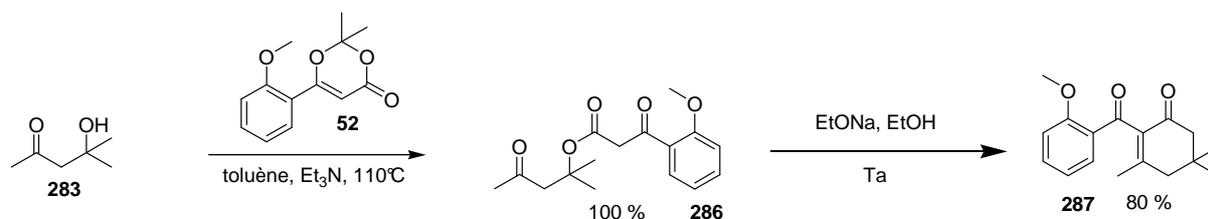
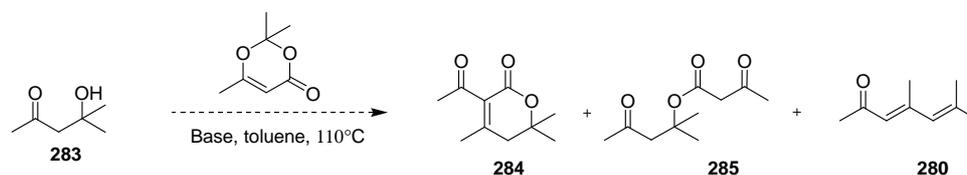


Schéma 121 : Cyclisation de l'acétoacétate dans l'éthanol base une base alcaline.

Afin de s'affranchir du changement de base intermédiaire, une nouvelle étude méthodologique a alors été entamée pour pouvoir réaliser cette réaction à chaud et de façon monotope comme dans le cas des cycles à 5 chaînons. Pour cela une variation de la base, du solvant et de leurs quantités respectives a été entamée.

- Influence de la nature de la base et du solvant :

L'alcool tertiaire **283** a donc été pris comme modèle moléculaire et un screening de la base (une base minérale Cs_2CO_3 et une base forte éliminante DBU) a été mis oeuvre (*tableau 19*). Les différentes réactions ont été mise en oeuvre à l'aide d'un automate et le suivi des différentes réactions est réalisé par Chromatographie sur Couche Minche (CCM).



Entrée	Dioxinone	Base	Solvant	Compound formed
1	1.5 eq	DBU (1 eq)	NMP	285
2	1.5 eq	DBU (1 eq)	Toluene	280
3	1.5 eq	DBU (1 eq)	Xylene	280
4	1.5 eq	DBU (1 eq)	DME	/
5	1.5 eq	DBU (1 eq)	Acetonitrile	285
6	1.5 eq	DBU (1 eq)	Water	/
7	1.5 eq	Cs_2CO_3 (1eq)	NMP	/
8	1.5 eq	Cs_2CO_3 (1eq)	Toluene	284
9	1.5 eq	Cs_2CO_3 (1eq)	Xylene	280 + traces de 284
10	1.5 eq	Cs_2CO_3 (1eq)	DME	285 + traces de 284
11	1.5 eq	Cs_2CO_3 (1eq)	Acetonitrile	285 + traces de 284
12	1.5 eq	Cs_2CO_3 (1eq)	Water	/

Tableau 19 : Suivi CCM de la réaction en faisant varier le solvant et la base.

C'est l'utilisation de Cs_2CO_3 qui a permis d'obtenir la pyranone **284** désirée. De plus, le solvant de choix semble être le toluène (**entrée 8**). En effet, lorsque la température du milieu est trop haute (xylène 150°C , **entrée 9**) c'est le produit de décarboxylation **280** qui se forme, tandis que lorsque celui-ci n'atteint pas une température suffisante (diméthoxyethane, acétonitrile), la réaction s'arrête à l'étape de l'acétoacétate **285** (**entrée 10 et 11**).

Des résultats allant dans le sens de la décarboxylation à chaud dans le xylène ont également été mis en évidence lors de l'utilisation de DBU. En effet, cette base forte éliminante conduit de façon plus importante au produit de décarboxylation **280** à des températures moins élevées (toluène 110°C , **entrée 2**). Ce produit avait déjà été obtenu par Lacey *et al.* après chauffage de la pyranone en présence d'acide *p*-toluène sulfonique. La décarboxylation de dihydropyranone est donc réalisable en milieu basique (**schéma 122**).

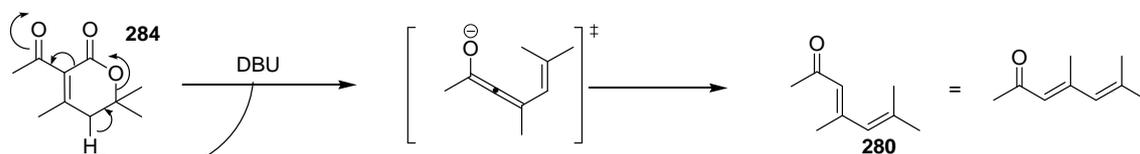


Schéma 122 : Formation de cétones α,β,γ insaturées

Enfin, comme observé lors de l'étude de formation de cycle à 5 chaînons, les solvants apolaires semblent être les meilleurs dans l'optique d'une cyclisation en acylpyranone.

- Optimisation des conditions opératoires :

Suite à ce premier screening rapide, l'addition/cyclisation de la 4-hydroxy-4-méthylpentane-2-one **283** sur l'acétylène a finalement permis d'obtenir 86 % de produit désiré par l'utilisation de seulement 10% mol de Cs_2CO_3 au reflux du toluène. La même quantité de DBU n'a pas permis d'obtenir un rendement supérieur à 40% en acylpyranone car, la encore, le produit désiré est accompagné du composé **280** de décarboxylation (**schéma 123**).

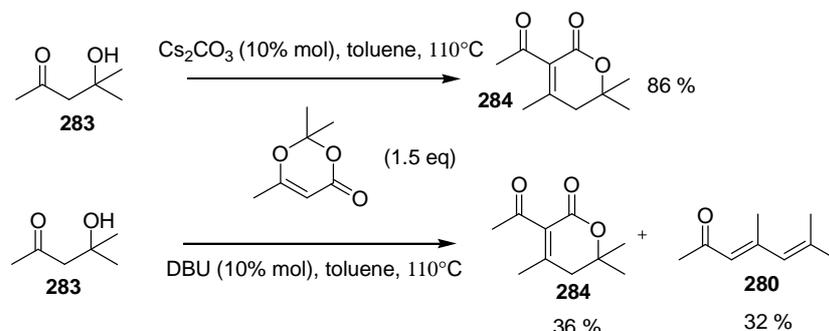
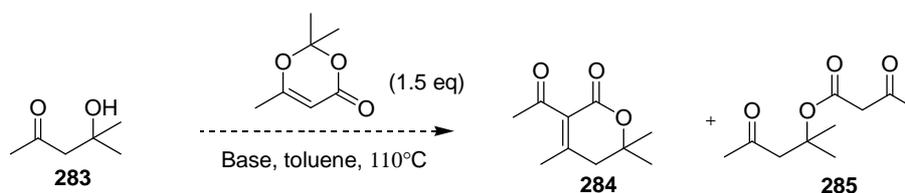


Schéma 123 : Optimisation des conditions réactionnelles - 10% mol Cs_2CO_3 nécessaire.

Afin de parfaire l'étude, un suivi par RMN du milieu réactionnel a alors été entamé.

- Etude cinétique de la réaction par suivi RMN :

La même réaction a été suivie par RMN ^1H . Trois réactions ont alors été mise en oeuvre en parallèle dans le toluène à chaud en faisant varier la base utilisée et en présence de 1.5 éq de dioxinone. Dans un premier cas, le milieu réactionnel est mis en présence de 10% mol Cs_2CO_3 (**Tableau 20 - Expérience A**). Un possible effet de la DMAP a également souhaité être étudié par ajout dans une seconde expérience de 10% mol DMAP (**Tableau 20 - Expérience B**). A noter que la cyclisation ne se produit pas dans le cas d'utilisation de DMAP seule (Seul la β -dicétone est alors isolée). Enfin, la dernière expérience est l'expérience témoin sans base (**Tableau 20 - Expérience C**).



Expérience	Dioxinone	Base	Solvant	Rendement
A	1 eq	CS_2CO_3 0.1 eq	Toluene 10 mL	86 %, 284
B	1 eq	CS_2CO_3 0.1 eq + DMAP 0.1eq	Toluene 10 mL	95 %, 284
C	1 eq	Sans base	Toluene 10 mL	100 %, 285

Tableau 20 : Résultats du suivi RMN de la réaction (rendements RMN)

Une augmentation du rendement en produit cyclisé est obtenue lors d'utilisation de DMAP combiné à l'utilisation de CS_2CO_3 due à une augmentation de la vitesse de formation du β -cétoester (moins de perte d'acylcétène), augmentant d'autant plus la formation en dihydropyrane correspondante.

Afin d'essayer de comprendre le mécanisme exact de cette réaction, un suivi cinétique a été effectué (**Figure 40**).

Comme supposé, un léger effet de la DMAP est observé sur le suivi cinétique.

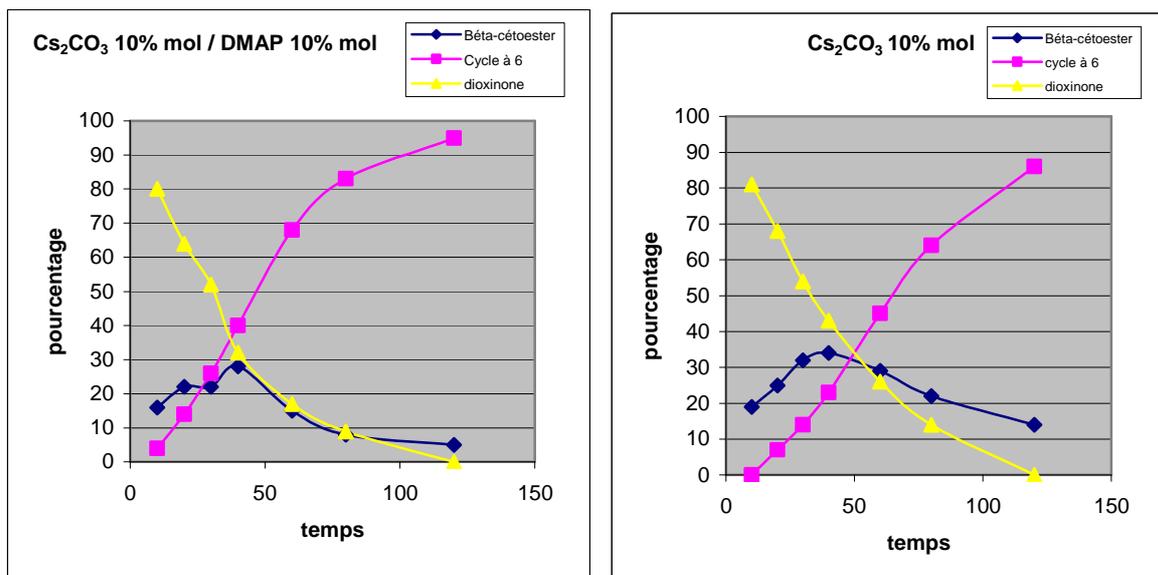


Figure 40 : Comparatif cinétique avec ou sans DMAP.

En effet, une chute plus importante de la quantité de dioxinone (Courbe jaune – graphique de gauche), associée à une cinétique de formation plus importante en produit cyclisé est observée. Cela traduirait la présence d’une quantité supérieure d’intermédiaire réactionnel de type acétoacétate dans le milieu réactionnel (Schéma 124). La DMAP semble ainsi catalyser la formation du β -cetoester et limiter la dégradation de l’acylcétène. Le rendement global en est donc amélioré d’autant.

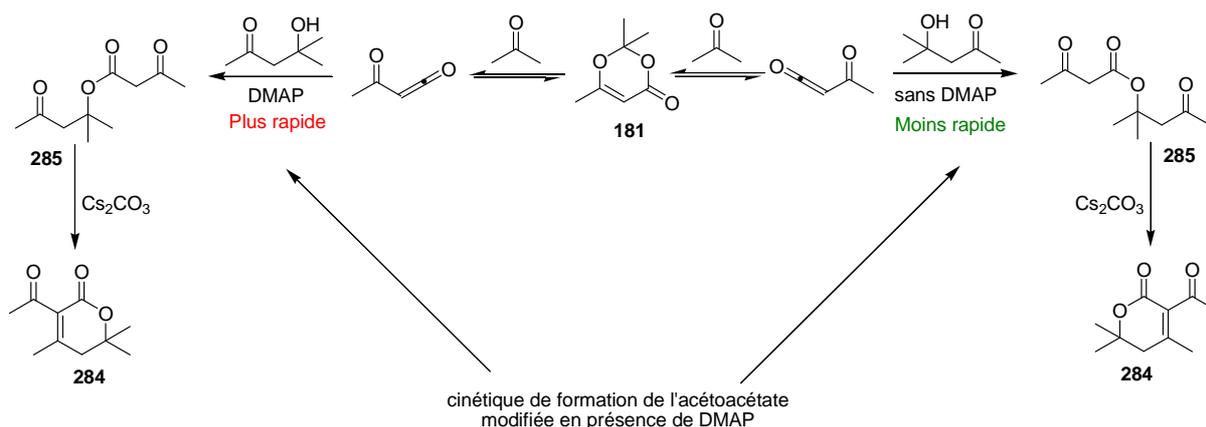


Schéma 124 : Formation de l'acétoacétate intermédiaire plus rapide en présence de DMAP .

4. 2. 3. Application à la synthèse de dictyopyrones.

4. 2. 3. 1. Rappels bibliographiques.

Afin de valoriser cette méthode de cyclisation monotope à 6 chaînons, la synthèse de dictyopyrones a été engagée.

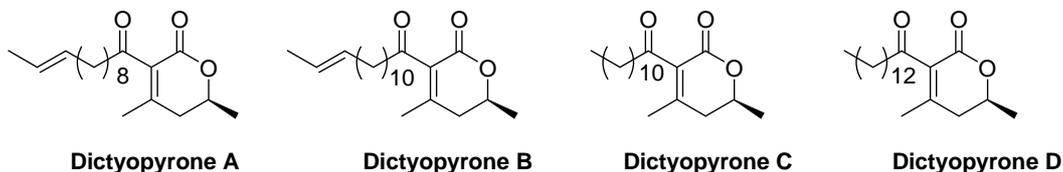
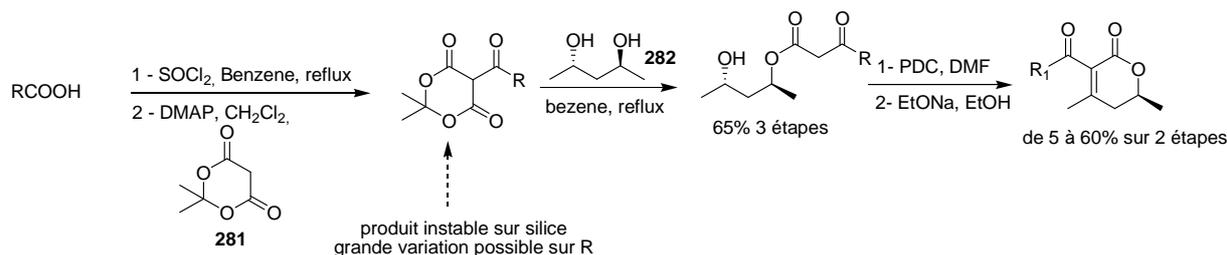


Figure 41 : Formule développée des 4 Dictyopyrones isolées.

Les dictyopyrones A à D sont des composés isolés en 2000 de souches de moisissure *Dictyostellium* par le groupe du Pr. Oshima¹³². Ces molécules présentent un squelette unique de type acylpyranone. Il a alors été montré que la dictyopyrone C inhibait la croissance cellulaire et augmentait la morphogénèse dans *D. Discodermum*. Plus récemment, il a également été reporté que ces composés inhibait la croissance cellulaire de certaines cellules leucémiques humaines de type K562¹³³.

- Synthèse d'Oshima :

La première synthèse de ces composés a été développée par Oshimo^{132,133}. Comme indiqué précédemment (voir chapitre 5. 3. 1.), cette synthèse s'articule autour de l'ouverture d'un acide de Meldrum suivie d'une cyclisation de l'acétoacétate après oxydation de l'alcool secondaire en cétone (*schéma 125*).



Bien que convergente, cette méthode souffre de nombreux inconvénients déjà discutés précédemment qui induisent une baisse du rendement global et une forte dépendance en diol énantiopur. Une nouvelle approche plus convergente de ce type de molécule semble donc justifiée.

4. 2. 3. 2. Synthèse proposé de la dictyopyrone C - ouverture d'un époxyde énantiopur.

- Schéma rétrosynthétique :

La synthèse proposée s'articulera sur une fonctionnalisation d'une β -hydroxycétone énantiopure **293** obtenue après ouverture d'un époxyde chiral par l'anion d'un méthylthiane.

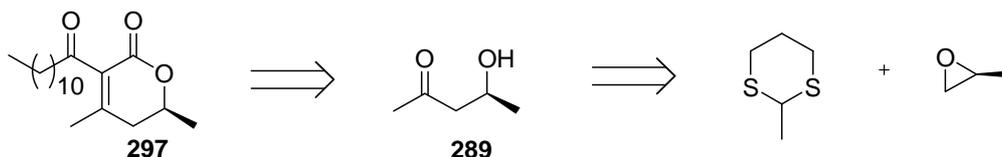


Schéma 126 : Schéma rétrosynthétique pour la synthèse de la dictyopyrone :

- Optimisation sur une molécule modèle :

Dans le cadre de cette synthèse, l'obtention d'une β -hydroxycétone optiquement pure représente un premier effort. Celle-ci a pu alors être synthétisée en 2 étapes à partir du méthylthiane et de l'époxyde correspondant selon les conditions développée par Pr. Porco¹⁵² (*Schéma 127*). Ainsi, Après déprotonation au BuLi du méthylthiane et addition du carbanion stabilisé résultant sur de l'oxyde de propylène énantiopur, le composé **288** est obtenu avec un rendement de 99%. Après déprotection de la cétone masquée par du chlorure mercurique (II) dans un mélange acétonitrile/eau, la β -hydroxycétone **289** énantiopure est alors isolée avec de très bons rendements.

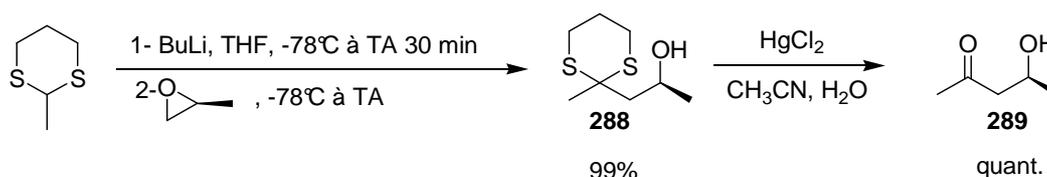


Schéma 127 : Synthèse de la β -hydroxycétone 63 énantiopure.

Il est important de remarquer que l'utilisation de PIFA pour la déprotection du dithiane intermédiaire a conduit à une forte dégradation de l'alcool énantiopur. Ceci a aboutit à l'utilisation de dérivés mercuriques plus toxiques et moins recommandables dans l'optique de synthèse de composés bioactifs. La synthèse du composé racémique provenant de l'époxyde racémique a également été réalisée avec des rendements similaires afin de fixer les conditions de différenciation des deux énantiomères en HPLC chirale.

(152) Kulkarni, B., A.; Roth, P., A.; Lobkovsky, E.; Porco, J., A., Jr. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 56-72

Une fois les conditions HPLC chirale mise au point, un essai de cyclisation à chaud dans le toluène a été effectué à partir de la β -hydroxycétone énantiopure en présence de 1.5 éq de dioxinone méthylique commerciale et de 10% mol de Cs_2CO_3 (**Schéma 128**). L'acylfuranone modèle **294** est ainsi obtenue avec un rendement de 86%.

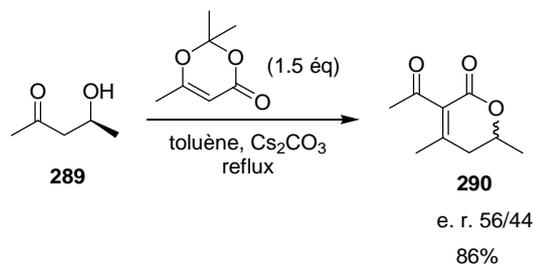


Schéma 128 : Cyclisation à chaud - épimérisation du centre asymétrique.

Malgré une conversion très comparable à celle observée précédemment, une forte épimérisation du centre asymétrique présent au pied de l'oxygène a été observée. Bien que surprenante dans le cas de β -hydroxycétone, il semble donc qu'à chaud la molécule subisse une perte constante du β -cétoester qui recycalise *in situ* de façon non-stéréocontrôlée (**Schéma 129**). De plus, contrairement aux cas de l'utilisation de DBU, le carboxylate de césium généré est stable et ne conduit pas au produit de décarboxylation à reflux du toluène.

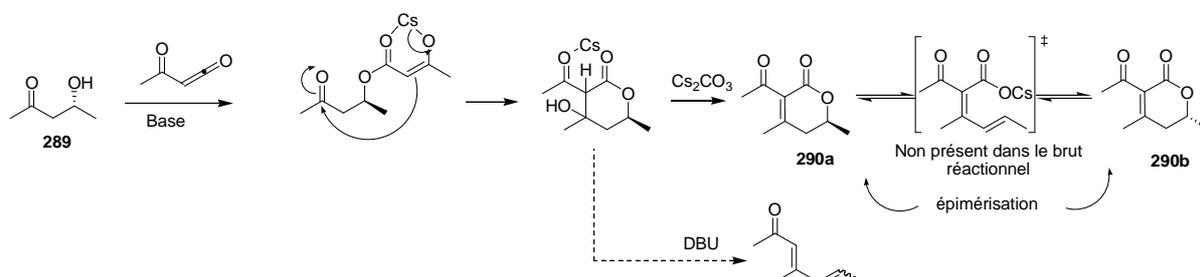


Schéma 129 : Mécanisme d'épimérisation à chaud en présence de DBU.

Après formation du β -cétoester intermédiaire énantiopur à chaud sans base (contrôlé par HPLC chirale), un essai de cyclisation dans les conditions alcalines (MeONa/MeOH) décrites par les Pr. Oshimo et Lacey a alors permis d'obtenir le composé **290** désiré avec un meilleur rapport énantiomérique de 96/4 et un rendement de 80 % (**Schéma 130**).

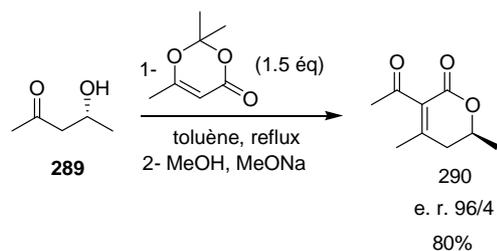


Schéma 130 : Meilleur rapport énantiomérique en cyclisant à froid.

- Synthèse de la dictyopyrone C :

Après optimisation des conditions opératoires sur la molécule modèle, la synthèse de la dictyopyrone C **292** a été engagée. Tout d'abord, un premier essai en présence de base a été réalisé afin de confirmer l'épimérisation précédemment observée sur l'analogue. Malheureusement, seulement 30 % d'acyldihydropyranone **292** racémique est obtenue (*Schéma 131*).

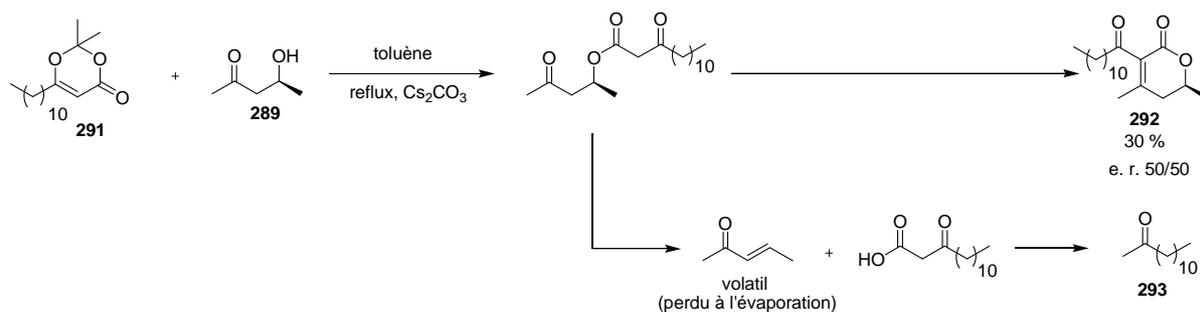


Schéma 131 : Tentative de synthèse de Dictyopyrone C en une étape - confirmation de l'épimérisation.

De façon surprenante, très peu de produit **292** désiré est observé. Seule la cétone **293** provenant de la décarboxylation de l'acylcétène piégée par l'eau libérée au cours de la réaction est isolée majoritairement. Bien que contrariante, cette décarboxylation montre la nécessité de réaliser cette manipulation en présence de tamis moléculaire. En effet, une longue chaîne carbonée semble faire baisser la vitesse de cyclisation. Ainsi, après formation du β -cétoster, une élimination de celui-ci pourrait libérer un β -cétacide dans le milieu qui subirait une décarboxylation à chaud.

Notons que la libération des premières traces d'eau provenant de la réaction de Knoevenagel peut piéger l'acylcétène et entraîner une décarboxylation similaire conduisant au composé 293 (*Schéma 132*).

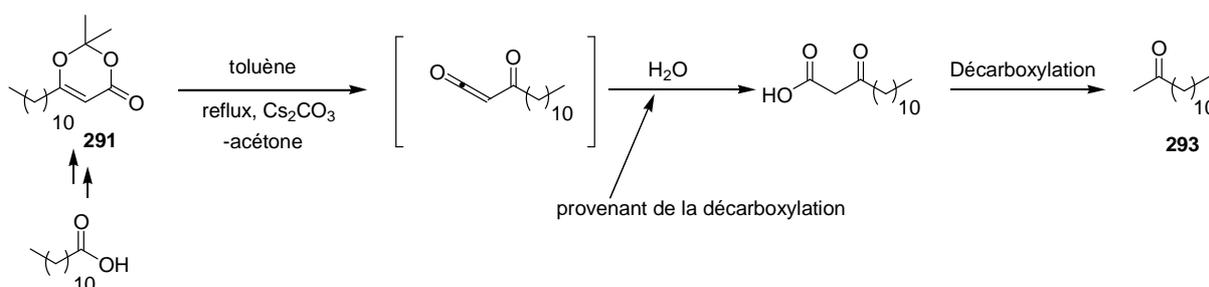


Schéma 132 : décarboxylation provenant du β -cétacide.

Cette épimérisation partielle étant probablement due au solvant très polaire (MeOH) et à la base très éliminante (MeONa), un nouvel essai de cyclisation pourra être envisagé en utilisant cette fois du DBU (*Schéma 133*). Après formation du β -cétoester énantiopur (formation sans base – contrôlé par HPLC chirale) à chaud dans le toluène, le milieu réactionnel sera donc refroidi à 0°C et 2 éq de DBU pourront être additionnés.

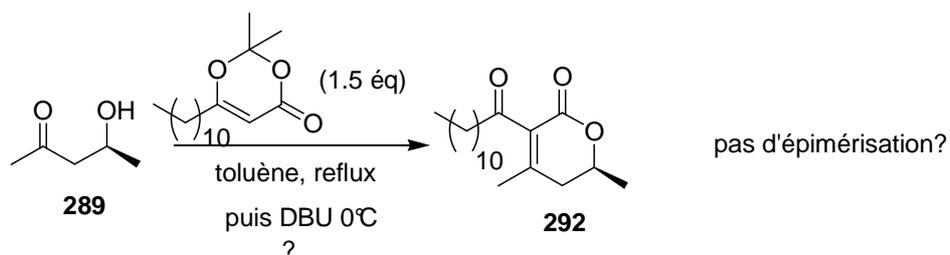


Schéma 133 : Cyclisation par DBU à froid - Pas d'épimérisation.

La synthèse racémique de la Dictyopyrone C a ainsi pu être réalisée avec un rendement global de 29 % en 3 étapes. Cependant, l'utilisation de tamis moléculaire ainsi qu'une la modification de la nature de la base devrait conduire au produit énantiopur avec de très bons rendements. Une optimisation des conditions réactionnelles est donc en cours.

Enfin, la possibilité de fonctionnalisation apportée par la méthode laisse entrevoir un accès très rapide à une librairie d'analogues de ce type de composés bioactifs (*Schéma 134*).

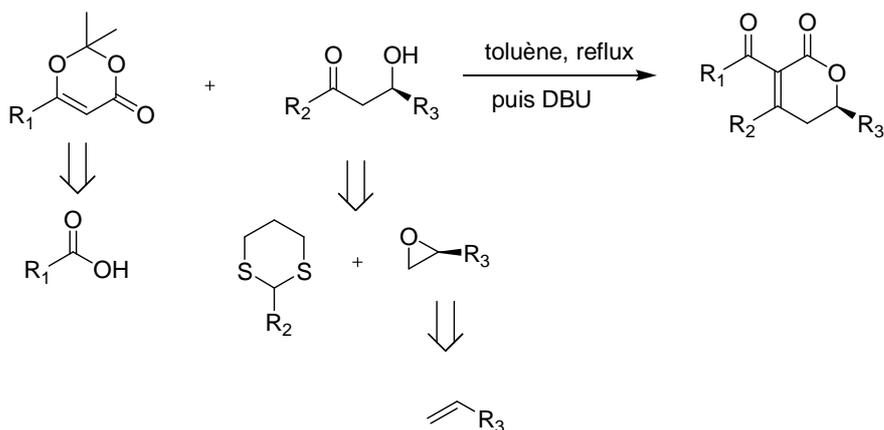


Schéma 134 : Convergence de la méthode pour l'accès aux dictyopyrones.

5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

5. 1. Conclusion générale.

A ce jour, l'électrophorèse bi-dimensionnelle PAGE est un des outils les plus puissants dans la séparation de mélange complexes de protéines permettant d'avoir une bonne visibilité d'un protéome cible.

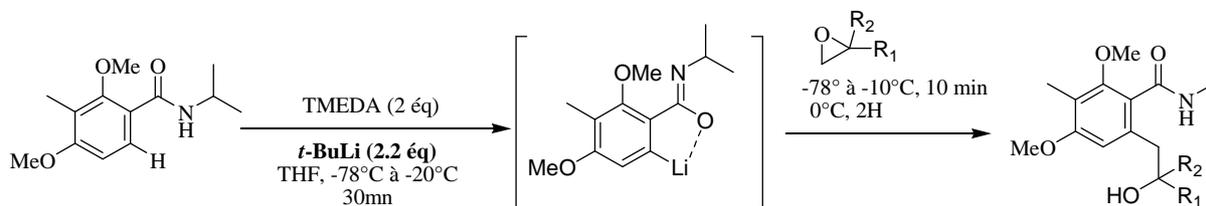
Un des facteurs déterminant dans le procédé de visualisation de ces véritables cartes protéiques de la cellule est la qualité du marqueur utilisé pour révéler les protéines séparées. Un des marqueurs les plus prometteur reporté récemment dans la bibliographie par le Pr. Karuso (Macquarie University – Australie) est l'épicocconone. En effet, cette azaphilone dihydropyranique naturelle isolée d'*Epicoccum nigrum* est désormais disponible commercialement et vendu sous forme d'extrait du champignon naturel pour le marquage non-spécifique de protéines sur gel d'électrophorèse (vendue sous le nom de Deep Purple®). Ce produit naturel se distingue notamment par sa grande sensibilité (<1ng de protéines détectées) et également par sa gamme de linéarité de l'ordre de 10⁴. La réversibilité de la liaison covalente créée avec les protéines marquées permet également à l'utilisateur de ce fluorophore unique de coupler à la technique d'électrophorèse, la spectrométrie de masse donnant accès à une détermination plus poussée de la protéine isolée.

Un autre facteur déterminant dans la bonne détection des ces gels est le niveau du bruit de fond généré par le marqueur utilisé. L'épicocconone étant vendu sous forme d'extrait du produit naturel, sa synthèse chimique permettrait donc de limiter le bruit de fond inhérent lors du marquage et également de pouvoir étudier les relations structures fluorescence afin d'optimiser toujours plus la révélation des protéines.

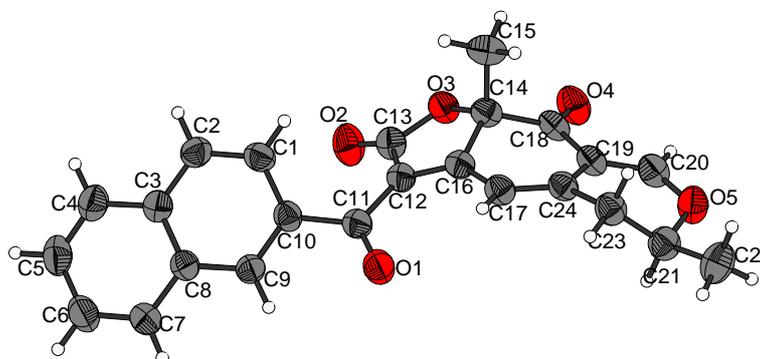
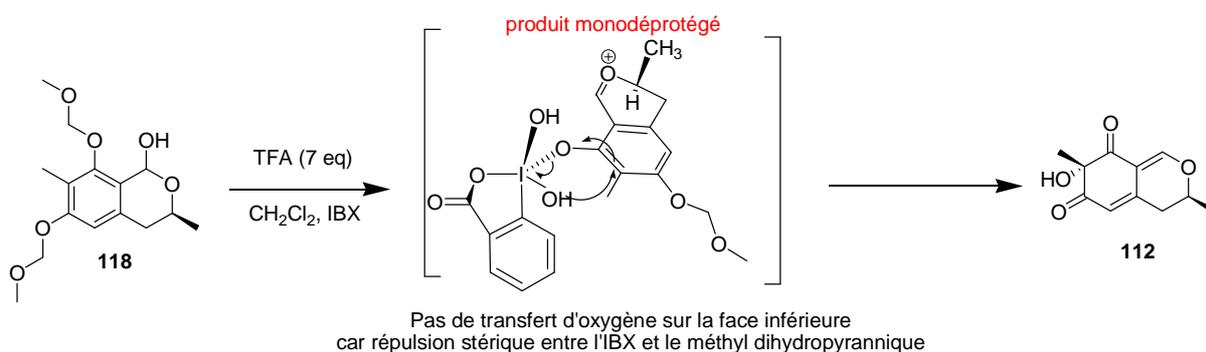
Aux vues du fort intérêt porté à ce marqueur et de la nécessité d'outils de plus en plus efficace, la synthèse totale de l'épicocconone a donc été engagée dans le cadre de ce travail doctoral.

L'effort synthétique entrepris a finalement conduit à un panel assez large d'analogues désoxygéné de l'épicoconone en 9 étapes ; la voie synthétique s'articulant autour de trois étapes déterminante que sont :

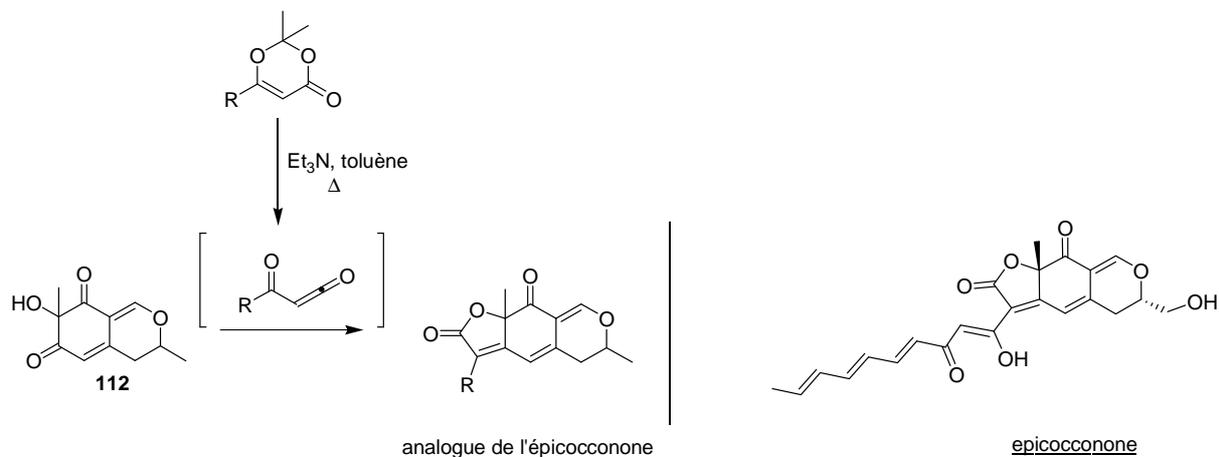
1 - Une ouverture d'époxyde par une espèce ortho métallée :



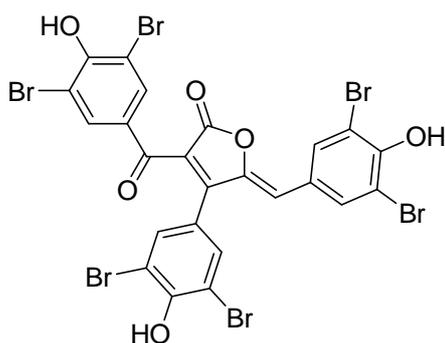
2 – Une désaromatisation oxydante diastéréosélective. L'étude mécanistique par RMN de cette réaction a mis en évidence un intermédiaire dihydropyrylium jamais reporté auparavant pouvant être piégé diastéréosélectivement par un donneur d'oxygène nucléophile. L'analyse RX du diastéréoisomère majoritaire de l'analogue provenant de cette réaction a finalement clairement indiqué une oxydation trans vis-à-vis du méthyl dihydropyranique et de ce fait confirmer le mécanisme préalablement envisagé.



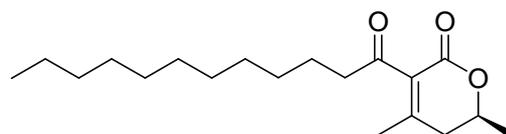
3- Une cyclisation furanonique monotope *via* la chimie des acylcétènes en milieu basique obtenu après ouverture de dioxinones à chaud.



La réactivité des acylcétènes a alors été mis à profits de deux synthèse totale de produits naturels : Cadiolide B (Hemisynthèse en 1 étape – formation de cycle à 5 chaînons) et le dictyopyrone C (Synthèse stéréosélective en 3 étapes – formation de cycle à 6 chaînons).

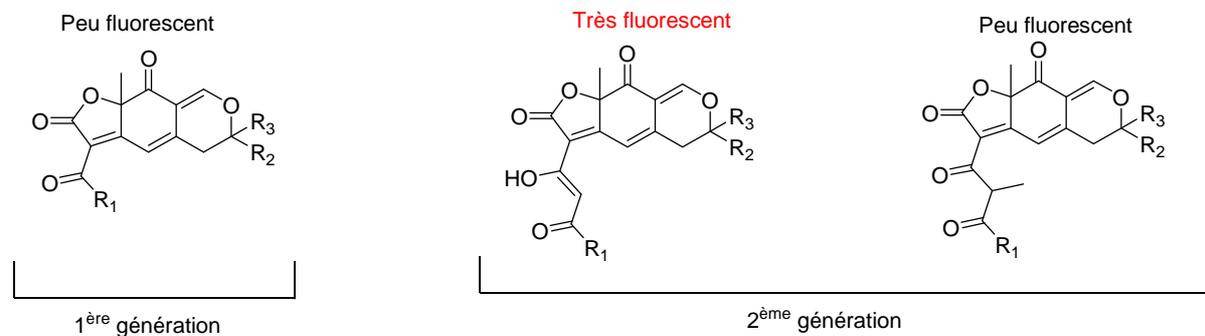


Cadiolide B



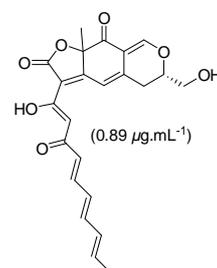
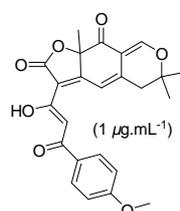
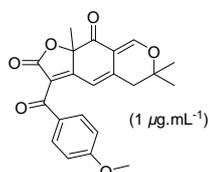
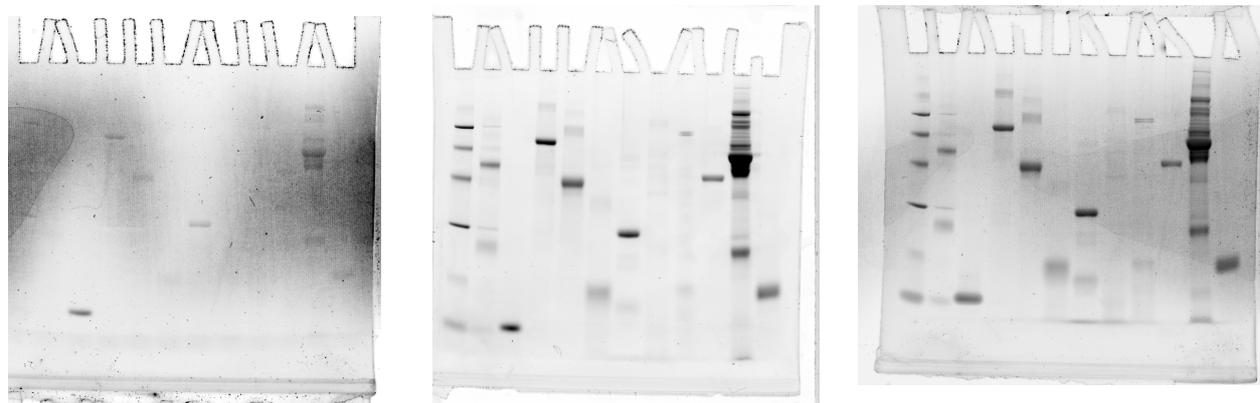
Dictyopyrone C

Enfin, deux types types d'analogues de l'épicoconone ont été synthétisés : les analogues de première génération (une cétone sur la partie sud de la molécule) ainsi que les analogues de deuxième génération (une dicétone sur la partie sud de la molécule).



La variété de structures synthétisées ont pu permettre d'émettre une relation structure-fluorescence : La dicétone en position sud est d'une grande importance si elle peut adopter une forme cétoénolique. De plus, une très faible influence de la partie insérée en R₁ a finalement été observée.

L'ensemble des analogues ont été testés au sein de l'Université de Macquarie par le Dr. Malcolm Ball. Une moins bonne révélation est observée pour les analogues de première génération tandis que les analogues de première génération sont plus sensibles que le produit naturel. En effet, un bruit de fond divisé par trois est finalement obtenu.



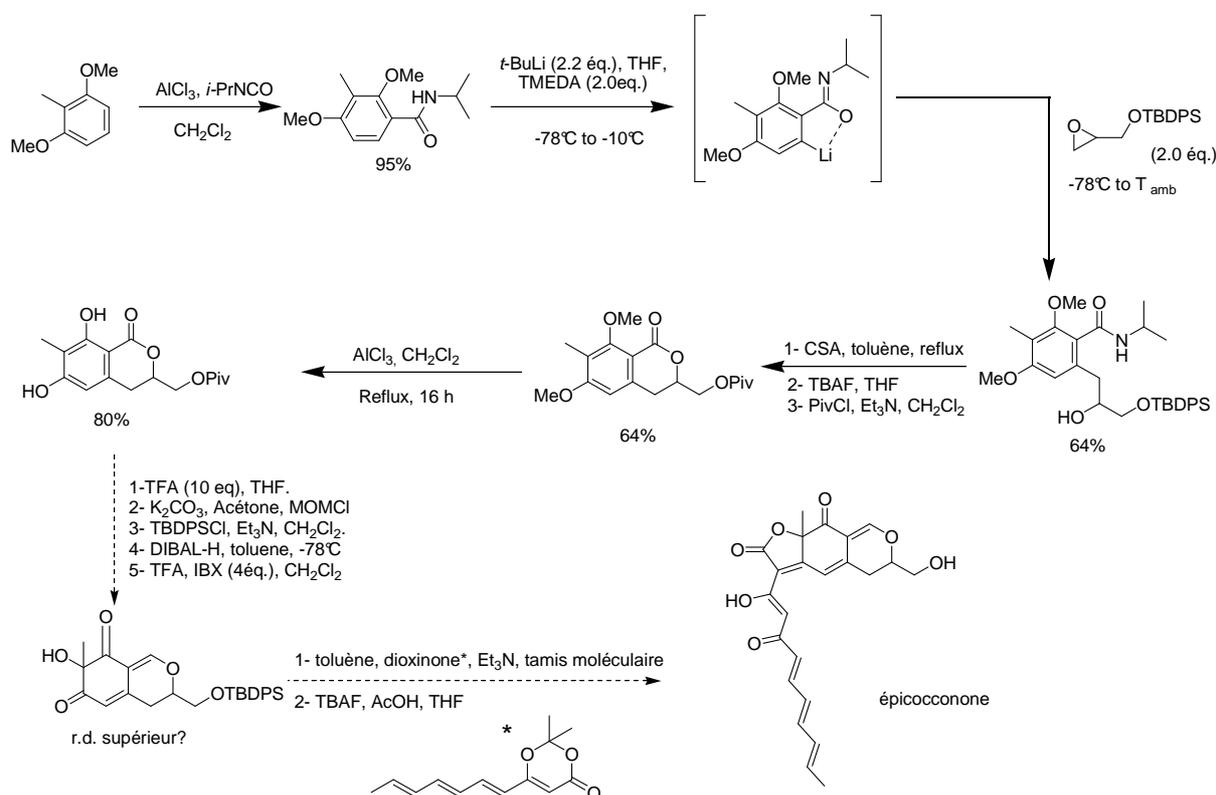
L'optimisation systématique de chaque étape a permis d'obtenir les analogues avec des rendements globaux très satisfaisant dans le cadre de molécule aussi complexes (de 10 à 45% de rendement).

5. 2. Perspectives.

5. 2. 1. Analogues de troisième génération.

La relation structure-fluorescence en modifiant la partie sud (chaîne latérale) ayant été effectuée dans le cadre de ce travail, des variations structurales au niveau du cycle dihydropyranique pourront être envisagé. Cependant, de plus amples informations concernant les nouvelles cibles à l'étude ne pourront être détaillées pour des raisons de confidentialité.

Une synthèse énantioselective de l'épicocconone pourra donc être envisagée en 14 étapes selon la voie synthétique déjà mise en place en vue de déterminer la configuration absolue du produit naturel.

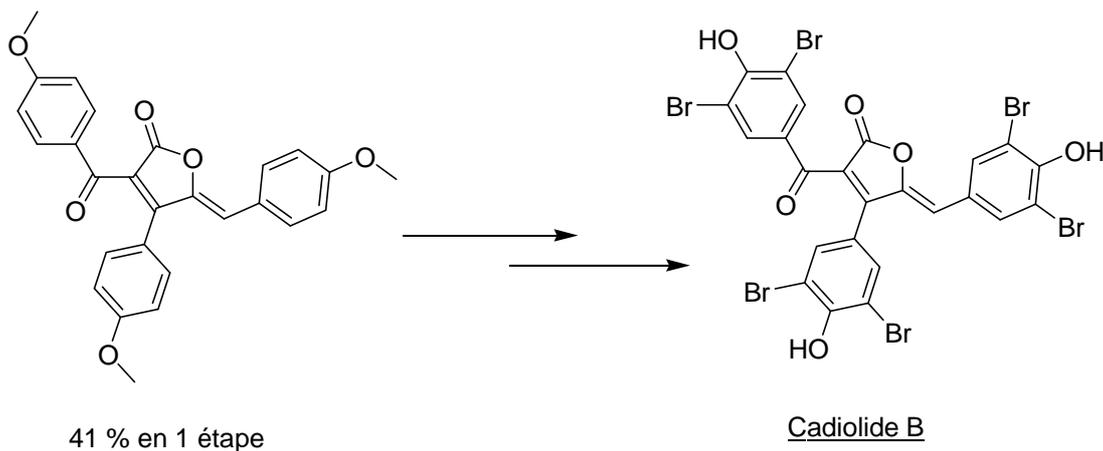


Il sera alors intéressant d'étudier la diastéréoselectivité obtenue dans le cas d'un dihydropyran substitué par un groupement méthylène portant un alcool silylé très encombrant.

5. 2. 2. Cadiolide B et dictyopyrone C.

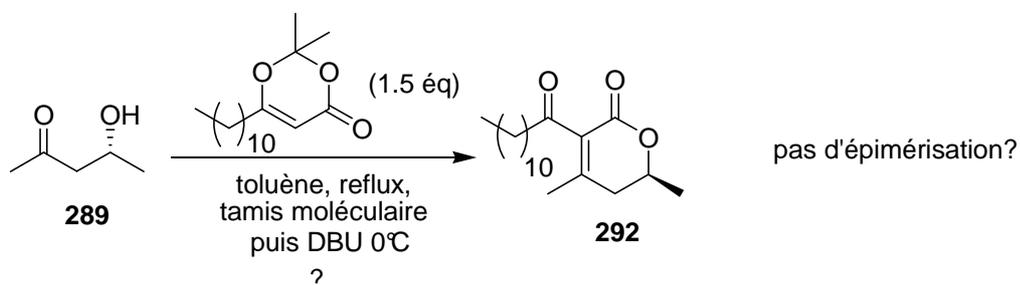
Cadiolide B

L'hémisynthèse de la Cadiolide B ayant été réalisée en 1 étape, une optimisation du rendement de la réaction pourra être envisagée. La fin de la synthèse sera alors réalisée selon les conditions de décrites par le Groupe du Pr. Pouliot.



Dictyopyrone C

La synthèse en 3 étapes du Cadiolide B ayant été réalisé avec un rendement global de 29%, l'optimisation du rendement ainsi que l'optimisation des conditions de cyclisation épimérisante pourra finalement être réalisée en présence d'une base telle que DBU dans un solvant apolaire. En ce sens, la formation du β -cétoester sans base (pas d'épimérisation) et en présence de tamis moléculaire suivie de l'addition à 0°C de DBU devrait conduire à la dictyopyrone C avec de bons rendements et un bon excès énantiomérique.



6. PARTIE EXPERIMENTALE.

6. 1. Généralités.

Chaque description se décompose comme suit :

- le numéro, le nom, la structure, la formule, le poids moléculaire, le R_f , l'aspect, le point de fusion et le rendement.
- le mode opératoire,
- les données spectroscopiques.
- les données annexes.

Tous les solvants et les bases aminées anhydres sont préalablement distillés, selon les méthodes appropriées :

- le THF, l'éther diéthylique et le toluène sont distillés sur sodium et benzophénone,
- le dichlorométhane et le chloroforme sont distillés sur P_2O_5 ,
- La TMEDA est distillée sur Na, la iPr_2NEt , la iPr_2NH et la Et_3N sur CaH_2 .

L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice Merck 60F, 0.2mm, avec une révélation par une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique suivi d'un léger chauffage.

Les purifications sont effectuées sur colonne par chromatographie flash sur gel de silice. Le support utilisé est le gel de silice de marque SdS, granulométrie de (40 à 63 μm). La pression est appliquée par air comprimé.

6. 2. Abréviations des données spectroscopiques.

1H RMN	:	Résonance magnétique nucléaire du proton 1
^{13}C RMN	:	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
<i>s</i>	:	signifie singulet
<i>t</i>	:	signifie triplet
<i>dd</i>	:	signifie doublet de doublet
<i>m</i>	:	signifie multiplet
<i>q</i>	:	signifie quadruplet

6. 3. Appareillage.

RMN :

Le spectre de résonance magnétique nucléaire a été réalisé sur un spectromètre BRUCKER AM 300 (300MHz-¹H RMN et 75MHz-¹³C).

Le spectre est décrit des champs forts vers les champs faibles.

Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au chloroforme deutérié pris comme référence interne. Les constantes de couplage (*J*) sont indiquées en Hertz (Hz)

Infra rouge :

Les spectres d'absorption infra-rouge ont été réalisés sur spectrophotomètre PERKIN ELMER FTIR 1420. Les bandes d'absorption sont exprimées en cm⁻¹.

Points de fusion :

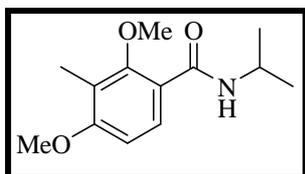
Les points de fusion sont déterminés au microscope à platine chauffante et ne sont pas corrigés.

Analyses élémentaires :

Les analyses élémentaires ont été effectuées sur CARLO-ERBA 1106.

6. 4. Mode opératoire et données spectroscopiques.

84 : N-isopropyl-2,4-dimethoxy-3-methylbenzamide



$C_{13}H_{19}NO_3$

$M = 237.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.25$ (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

White cristal. $M_p = 45^\circ\text{C}$.

Yield = 95 %

In a round-bottomed (RB) flask flushed with Argon (Ar), 2.80 g (21 mmol, 1.05 eq) of Aluminium trichloride ($AlCl_3$) was slowly added to a 20 mL CH_2Cl_2 solution of 3.04 g (20 mmol, 1 eq) of dimethoxytoluene at room temperature (RT). The mixture was stirred for 10 min. and 2.36 mL (25 mmol, 1.25 eq) of isopropylisocyanate was then introduced dropwise at RT. After 10h, the reaction was quenched at 0°C with a saturated solution of ammonium chloride (NH_4Cl_{sat}) and extracted twice with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were then washed with a 1N solution of Hydrochloric acid (HCl) and then with a saturated solution of hydrogenocarbonate ($NaHCO_{3sat}$). The organic layer was dried over magnesium sulfate ($MgSO_4$) and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (8:2) mixture of cyclohexane/ethyl acetate (Cy/EtOAc) to give 4.50 g (95%) of compound **84**.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm} : 1.25 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, 2 x CH_3), 2.15 (s, 3H, CH_3), 3.73 (s, 3H, CH_3), 3.86 (s, 3H, CH_3), 4.26-4.37 (m, 1H, CH), 6.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.68 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, N-H), 7.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, CH_{ar}).

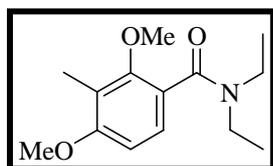
^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm} : 9.1, 24.0, 41.4, 56.0, 61.5, 106.7, 119.4, 119.8, 130.2, 157.5, 161.3, 164.8.

IR : 3285, 3075, 2968, 2840, 1636.4 cm^{-1}

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 238$ $[M + H]^+$

Analysis calculated for $C_{13}H_{19}NO_3$: C, 65.80 ; H, 8.07. Obtained : C, 65.85 ; H, 8.0.

85 : N,N-diethyl-2,4-dimethoxy-3-methylbenzamide



$C_{14}H_{21}NO_3$

$M = 251.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.24$ (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

Yellow oil.

Yield = 99 %

In a RB flask flushed with Argon, 2.80 mL (22 mmol, 1.1 eq) of diethylcarbamoyl chloride was added to a 20 mL CH_2Cl_2 solution of 3.04 g (20 mmol, 1 eq) of dimethoxytoluene at RT. The mixture was stirred for 10 min. and 2.6 mL (22 mmol, 1.1 eq) of tin tetrachloride ($SnCl_4$) was then introduced dropwise at $0^\circ C$. After 2h at reflux, the reaction was quenched at $0^\circ C$ with NH_4Cl_{sat} and extracted twice with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were then washed with HCl 1N and then with $NaHCO_{3sat}$. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (8:2) mixture of cyclohexane/ethyl acetate (Cy/EtOAc) to give 5.12 g (99%) of compound **85**.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm} : 1.00 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 2.13 (s, 3H, CH_3), 3.15 (br d, 2H, CH_2), 3.30 (br d, 2H, CH_2), 3.75 (s, 3H, CH_3), 3.81 (s, 3H, CH_3), 6.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_{ar}).

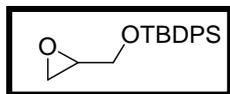
^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm} : 9.0, 13.0, 14.1, 39.1, 43.2, 55.8, 61.7, 106.1, 120.0, 124.2, 125.1, 155.1, 159.2, 169.5.

IR : 3479, 2972, 2838, 1738, 1652, 1614, 1455, 1380, 1270, 1223, 1109, 1021, 1000, 954, 809.

MS (E. I.) : $m/z = 252$ $[M + H]^+$.

Analysis calculated for $C_{14}H_{21}NO_3$: C, 66.91 ; H, 8.42. Obtained : C, 66.84 ; H, 8.54.

87 : *tert*-butyl(oxiran-2-ylmethoxy)diphenylsilane



$C_{19}H_{24}O_2Si$

$M = 312.48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.74$ (Cyclohexane/EtOAc – 80/20)

Uncolored oil.

Yield = 84 %

In a RB flask flushed with Argon, 258 mg (2 mmol, 0.1 eq) of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) was added to a 20 mL dimethylformamide (DMF) solution of 2.03 g (21 mmol, 1.05 eq) of imidazole and 1.33 mL (20 mmol, 1.0 eq) of glycidol at RT. 2.6 mL (22 mmol, 1.1 eq) of *t*-butyldiphenylchlorosilane (TBDPSCl) was then introduced slowly at 0°C. After 1h30 at RT, the reaction was quenched at 0°C with water (H₂O) and extracted twice with cyclohexane. The combined organic layers were then washed with NH₄Cl_{sat} and then with NaHCO_{3sat}. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (95:5) mixture of Cy/EtOAc to give 5.39 g (84%) of compound **87**.

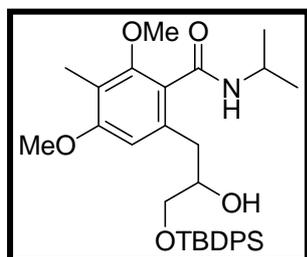
1H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 1.07 (s, 9H, 3 x CH₃), 2.62 (dd, $J = 5.1$ Hz et $J = 2.7$ Hz, 1H, CH), 2.76 (t, $J = 4.2$, 1H, CH), 3.14 (m, 1H, CH), 3.72 (dd, $J = 12.0$ Hz et $J = 4.7$ Hz, 1H, CH), 3.87 (dd, $J = 12.0$ Hz et $J = 3.2$ Hz, CH), 7.42 (m, 6H, CH_{ar}), 7.69 (m, 4H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 19.6, 27.1, 44.8, 52.6, 64.6, 128.1, 130.0, 133.6, 136.0.

IR : 3050, 2930, 2894, 2858, 1472, 1428, 1113 cm⁻¹.

Analysis calculated for $C_{19}H_{24}O_2Si$: C, 73.03 ; H, 7.74. Obtained : C, 72.91 ; H, 7.77.

89 : 6-(3-{{tert-butyl(diphenyl)silyl}oxy}-2-hydroxypropyl)-N-isopropyl-2,4-dimethoxy-3-methylbenzamide



$C_{31}H_{41}NO_5Si$

$M = 549.77 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.29$ (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

White powder. $M_p = 90^\circ\text{C}$.

Yield = 64%

In a RB flask flushed with Argon, 6.1 mL (40 mmol, 2 eq) of tetramethylethylenediamine (TMEDA) was added to a 200 mL tetrahydrofuran (THF) solution of 4.74 g (20 mmol, 1 eq) of amide **84** at RT. 33.9 mL (44 mmol, 2.2 eq) of *sec*-butyllithium (*s*-BuLi 1.3 M in hexane) was then introduced dropwise at -78°C . The mixture was then stirred at -15°C for 30 min. and recooled to -78°C after the formation of the characteristic red orthometallated intermediate. 6.28 g (20 mmol, 1 eq) of epoxide **87** was then added dropwise at -78°C and the media was warmed to -10°C . The mixture was then allowed to warm slowly to RT over 3h. The reaction was then quenched with H_2O and extracted with EtOAc. The combined organic layer was then washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and then with $\text{NaHCO}_3_{\text{sat}}$. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (70:30) mixture of Cy/EtOAc to give 6.98 g (64%) of compound **89**.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 1.10 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.24 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.26 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 2.10 (s, 3H, CH_3), 2.86 (dd, $J = 8.4$ Hz et $J = 13.5$ Hz, 1H, CH), 2.97 (dd, $J = 3.6$ Hz et $J = 13.6$ Hz, 1H, CH), 3.63 (dd, $J = 7.2$ Hz et $J = 9.9$ Hz, 1H, CH), 3.70 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.77-3.87 (m, 1H, CH), 4.75-4.80 (m, 1H, CH), 4.17-4.33 (m, 1H, H_8), 5.34 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, O-H), 6.26 (d, $J = 8$ Hz, 1H, N-H), 6.57 (s, 1H, CH_{ar}), 7.3-7.48 (m, 6H, CH_{ar}), 7.62-7.75 (m, 4H, CH_{ar}).

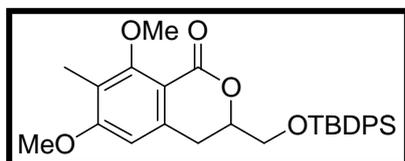
$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 9.0, 19.7, 22.8, 23.0, 37.6, 42.2, 55.9, 62.1, 67.9, 73.3, 104.0, 108.6, 118.3, 128.0, 130.0, 134.0, 136.0, 137.8, 156.2, 159.6, 167.7

IR : 3265, 3073, 3052, 2959, 2858, 1632 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 550$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Analysis calculated for $C_{31}H_{41}NO_5Si$: C, 69.91 ; H, 7.88. **Obtained** : C, 70.04 ; H, 7.87.

90 : 3-({[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy}methyl)-6,8-dimethoxy-7-methyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-one



$C_{29}H_{34}O_5Si$

$M = 490.66 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.74$ (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

White powder. $M_p = 114^\circ\text{C}$.

Yield = 96 %

In a RB flask flushed with Argon, 5.26 g (22 mmol, 2 eq) of camphorsulfonic acid (CSA) was added to a 200 mL toluene solution of 6.0 g (11 mmol, 1 eq) of compound **89** at RT. After 2h at reflux, the reaction was quenched at RT with $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ and extracted with diethylether (Et_2O). The organic layer was then washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel using a (8:2) mixture of Cy/EtOAc to give 3.17 g (96%) of compound **90**.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 1.07 (s, 9H, 3 x CH_3), 2.13 (s, 3H, CH_3), 2.94 (dd, $J = 16.0 \text{ Hz}$ et 3.2 Hz , 1H, CH), 3.09 (dd, $J = 16.0 \text{ Hz}$ et $J = 7.9 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3.83 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$ et $J = 15 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3.83 (s, 3H, CH_3), 3.89 (s, 3H, CH_3), 3.92 (dd, $J = 5.4 \text{ Hz}$ et $J = 15 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.42-4.52 (m, 1H, CH), 6.49 (s, 1H, CH_{ar}), 7.31-7.48 (m, 6H, CH_{ar}), 7.63-7.69 (m, 4H, CH_{ar})

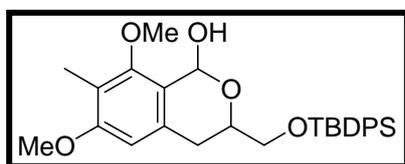
$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 8.8, 19.5, 27.0, 31.6, 56.0, 61.7, 65.1, 105.0, 111.1, 120.6, 128.00, 128.02, 130.1, 133.1, 133.2, 135.76, 135.82, 140.1, 161.6, 162.2, 162.6.,

IR : 3057, 3012, 2961, 2931, 2857, 1723, 1599, 1462, 1326, 1244, 1133, 1114, 734, 703 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 491$ $[\text{M} + \text{H}]^+$

Analysis calculated for $C_{29}H_{34}O_5Si$: C, 70.99 ; H, 6.98. *Obtained* : C, 69.35 ; H, 6.56.

91 : 3-({[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy}methyl)-6,8-dimethoxy-7-methyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-ol



$C_{29}H_{36}O_5Si$

$M = 492.68 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.74$ (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

White powder. $M_p = 107^\circ\text{C}$.

Yield = 93 %

In a RB flask flushed with Argon, 5.46 mL (8.2 mmol, 1.3 eq) of diisobutylaluminium hydride (DIBAL-H) was added at -78°C to a 150 mL toluene solution of 3.09 g (3.1 mmol, 1 eq) of compound **90**. After 1h, the reaction was quenched at -78°C with H_2O and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel using a (85:15) mixture of Cy/EtOAc to give 2.88 g (93%) of compound **91**.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 1.09 (s, 9H, 3 x CH_3), 2.13 (s, 3H, CH_3), 2.63-2.81 (m, 2H, CH_2), 3.72-3.92 (m, 8H, $\text{CH}_3\text{-CH}_3\text{-CH}_2$), 4.37-4.49 (m, 1H, CH), 6.15 (s, 1H, CH), 6.42 (s, 1H, CH_{ar}), 7.32-7.49 (m, 6H, CH_{ar}), 7.61-7.79 (m, 4H, CH_{ar}).

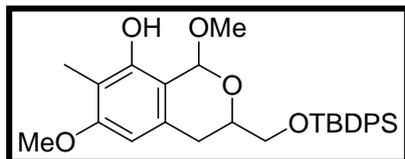
$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 9.7, 20.1, 27.7, 31.2, 56.4, 62.1, 67.5, 68.0, 89.8, 106.8, 118.5, 121.6, 128.4, 130.4, 133.5, 134.4, 136.4, 157.4, 159.5.

IR : 3392 (OH), 3071, 2930, 2856, 1720, 1612, 1598, 1465 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 475$ $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$.

Analysis calculated for $C_{29}H_{36}O_5Si$: C, 70.70 ; H, 7.37. *Obtained* : C, 70.79 ; H, 7.06.

96 : 3-({[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy}methyl)-1,6-dimethoxy-7-methyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-8-ol



C₂₉H₃₆O₅Si

M = 492.68 g.mol⁻¹

R_f = 0.74 (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

Uncolored oil

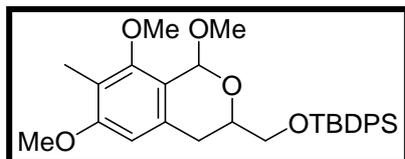
Yield = 50 %

In a RB flask flushed with Argon, 0.5 mL (0.5 mmol, 2.5 eq) of boron trichloride (BCl₃ 1 M in hexan) was added at -10°C to a 5 mL CH₂Cl₂ solution of 100 mg (0.2 mmol, 1 eq) of compound **91**. After 30 min., the reaction was quenched at -10°C with NaHCO_{3sat} and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was then washed with NH₄Cl_{sat} and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silica gel using a (90:10) mixture of Cy/EtOAc to give 50 mg (50%) of compound **96**.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 1.12 (s, 9H, 3 x CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.81 (dd, J = 16.4 Hz et 3.5 Hz, 1H, CH₂), 2.99 (dd, J = 16.2 Hz et J = 12.0 Hz, 1H, CH₂), 3.51 (s, 3H, CH₃), 3.8 (s, 3H, CH₃), 3.85-3.96 (m, 1H, CH₂), 4.03 (dd, J = 4 Hz et J = 12 Hz, 1H, CH₂), 4.69-4.81 (m, 1H, CH), 6.29 (s, 1H, CH), 6.43 (s, 1H, CH_{ar}), 7.32-7.46 (m, 6H, CH_{ar}), 7.70-7.85 (m, 4H, CH_{ar})

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 9.3, 19.7, 27.2, 30.8, 55.9, 61.2, 67.2, 67.3, 89.2, 106.3, 117.6, 120.3, 128.0, 129.9, 133.7, 133.9, 136.0, 157.1, 158.8.

97 : *tert*-butyl(diphenyl)[(1,6,8-trimethoxy-7-methyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methoxy]silane



C₃₀H₃₈O₅Si

M = 506.71 g.mol⁻¹

R_f = 0.75 (Cyclohexane/EtOAc – 75/25)

Uncolored oil

Yield = 90%

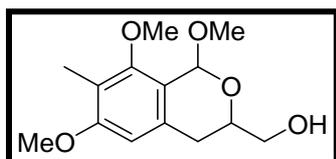
Two experimental procedures for the transacetalisation of the compound **91** :

In a RB flask flushed with Argon, 0.5 mL (6 mmol, 6 eq) of HCl (37% in water) was added at 0°C to a 10 mL MeOH solution of 490 mg (1 mmol, 1 eq) of compound **91**. After 10 min., the reaction was quenched at RT with NaHCO_{3sat} and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with NH₄Cl_{sat} and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. 455 mg (90%) of compound **97** was obtained without further purification.

In a RB flask flushed with Argon, 7.85 g (33 mmol, 2 eq) of CSA was added at 0°C to a 150 mL MeOH solution of 8.08 mg (17 mmol, 1 eq) of compound **91**. After 10 min., the reaction was quenched at RT with H₂O and extracted with Et₂O. The organic layer was then washed with NaHCO₃ and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. 8.370 g (100%) of compound **96** was obtained without further purification.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δppm : 1.07 (s, 9H, 3 x CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.57-2.66 (m, 2H, CH₂), 3.53 (s, 3H, CH₃), 3.71-3.88 (m, 8H, 2 x CH₃ et CH₂), 4.30-4.37 (m, 1H, CH), 5.62 (s, 1H, CH), 6.36 (s, 1H, CH_{ar}), 7.37-7.43 (m, 6H, CH_{ar}), 7.66-7.75 (m, 4H, CH_{ar}).

100 : (1,6,8-trimethoxy-7-methyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methanol



C₁₄H₂₀O₅

M = 268.31 g.mol⁻¹

R_f = Unstable on silicagel

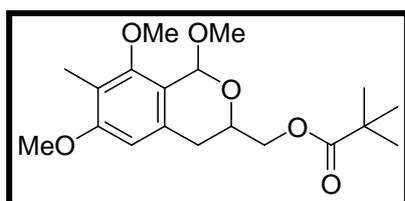
Uncolored oil.

Quantitative conversion

In a RB flask flushed with Argon, 5.52 g (18 mmol, 2 eq) of *t*-butylammonium fluoride trihydrate (TBAF) was added at RT to a 200 mL THF solution of 4.43 g (9 mmol, 1 eq) of compound **91**. After 40 min., the reaction was quenched at RT with H₂O and extracted with Et₂O. The organic layer was then washed with NaCl_{sat}. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. 100% conversion of compound **91** to the compound **100** was observed in NMR. The compound **100** was then pivaloylated without further purification due to instability on silica gel.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 2.12 (s, 3H, CH_3), 2.54 (dd, $J=3.6$ Hz et $J=16.5$ Hz, 1H, CH), 2.78 (dd, $J=11.4$ Hz et $J=16.2$ Hz, 1H, CH), 3.56 (s, 3H, CH_3), 3.68-3.87 (m, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, CH_3), 3.80 (s, 3H, CH_3), 4.31 (m, 1H, CH), 5.64 (s, 1H, CH), 6.39 (s, 1H, CH).

101 : (1,6,8-trimethoxy-7-methyl-3,4-dihydro-1H(-isochromen-3-yl)methyl pivalate



$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_6$

$M = 352.42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 65\%$ (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

White powder. $M_p = 78^\circ\text{C}$.

Yield = 78 % (2 steps).

In a RB flask flushed with Argon, 2.16 mL (21.9 mmol, 2.5 eq) of triethylamine (Et_3N) and 106 mg (0.88 mmol, 0.1 eq) of DMAP were added at 0°C to a 150 mL CH_2Cl_2 solution of 2.35 g (8.8 mmol, 1 eq) of compound **100**. 2.16 mL (17.6 mmol, 2 eq) of pivaloyl chloride (PivCl) was then added at 0°C and the mixture allowed to warm to RT. After 12h, the reaction was quenched at RT with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and then with $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silica gel using a (90:10) mixture of Cy/EtOAc to give 2.40 g (78%) of compound **101** in two steps.

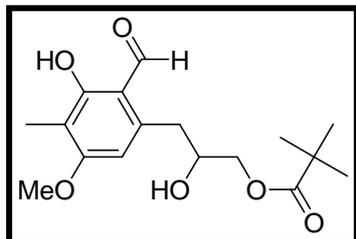
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 1.25 (s, 9H, 3 x CH_3), 2.11 (s, 3H, CH_3), 2.57 (dd, $J=3.8$ Hz et $J=16.2$ Hz, 1H, CH), 2.71 (dd, $J=11.7$ Hz et $J=16.2$ Hz, 1H, CH), 3.56 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 3H, CH_3), 3.80 (s, 3H, CH_3), 4.20 (dd, $J=6.8$ Hz et $J=11.7$ Hz, 1H, CH), 4.26 (dd, $J=3.8$ Hz et $J=11.7$ Hz, 1H, CH), 4.31 (m, 1H, CH), 5.62 (s, 1H, CH), 6.39 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 8.8, 27.2, 29.7, 38.8, 54.9, 55.6, 61.1, 64.8, 66.5, 95.7, 105.7, 118.0, 120.1, 131.8, 156.7, 158.8, 178.4.

IR : 2958, 2935, 1730, 1611, 1590, 1480, 1464, 1428, 1358, 1332, 1285, 1164, 1128, 1108, 1048, 1004, 960, 821, 704 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 351$ [M - OMe] $^+$.

104 : 3-(2-formyl-3-hydroxy-5-methoxy-4-methylphenyl)-2-hydroxypropyl pivalate.



$C_{17}H_{24}O_6$

$M = 324.37 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.55$ (Cyclohexane/EtOAc – 40/60)

Uncolored oil.

70 % conversion.

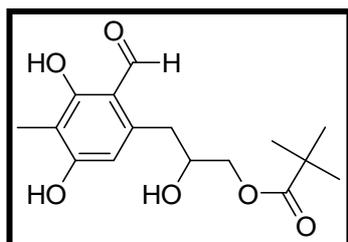
In a RB flask flushed with Argon, 370 mg (3 mmol, 9 eq) of aluminium trichloride ($AlCl_3$) was added at RT to a 20 mL CH_2Cl_2 solution of 100 mg (0.3 mmol, 1 eq) of compound **101**. The mixture was then heated at solvent reflux. After 12h, the reaction was quenched at RT with HCl 1N and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with $NaHCO_{3sat}$ and then with $NaCl_{sat}$. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silica gel using a (80:20) mixture of Cy/EtOAc to give 82 mg (90%) of the compound **104**.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm} : 1.23 (s, 9H, 3 x CH_3), 2.03 (s, 3H, $3H_{12}$), 3.05 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, CH_2), 3.88 (s, 3H, CH_3), 4.01-4.12 (m, 2H, CH_2), 4.17-4.24 (m, 1H, CH), 6.31 (s, 1H, CH), 10.13 (s, 1H, CH), 12.49 (s, 1H, OH).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm} : 8.0, 28.0, 36.8, 40.1, 57.3, 68.7, 71.9, 107.4, 112.4, 115.2, 144.8, 163.9, 165.5, 179.5, 196.5.

IR : 3456, 2962, 1731, 1627, 1462, 1285, 1254, 1146, 821, 737 cm^{-1} .

105 : 3-(2-formyl-3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)-2-hydroxypropyl pivalate



$C_{16}H_{22}O_6$

$M = 310.34 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.40$ (Cyclohexane/EtOAc – 40/60)

White powder. M_p (degradation 250 °C).

Yield = 2 %.

Isolated along with the compound **104** to give 1.5 mg (2%) of the compound **105**.

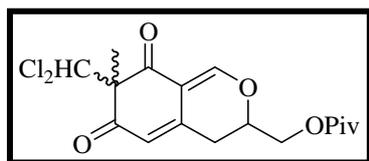
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 1.12 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.91 (s, 3H, CH_3), 2.86 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.88 – 4.01 (m, 3H, CH-CH_2), 6.15 (s, 1H, CH), 7.41 (s, 1H, OH), 9.97 (s, 1H, OH), 12.64 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 7.0, 27.1, 35.3, 38.8, 67.3, 70.6, 110.0, 110.4, 112.8, 141.3, 162.1, 164.1, 178.4, 193.5.

IR : 3154, 2970, 2886, 1701, 1622, 1293, 1251, 1181, 1123, 1095 cm^{-1} .

Analysis calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_6$: C, 64.75 ; H, 8.01. *Obtained* : C, 64.61 ; H, 8.15.

106 : [7-(dichloromethyl)-7-methyl-6,8-dioxo-4,6,7,8-tetrahydro-3H-isochromen-3-yl]methylpivalate



$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}_5$

$M = 375.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.52$ (Cyclohexane/EtOAc – 70/30)

Orange oil.

Yield = 38 %.

In a RB flask flushed with Argon, 370 mg (3 mmol, 9 eq) of AlCl_3 was added at RT to a 20 mL chloroform (CHCl_3) solution of 100 mg (0.3 mmol, 1 eq) of compound **101**. The mixture was then heated to the solvent reflux. After 12h, the reaction was quenched at RT with HCl 1N and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ and then with NaCl_{sat} . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. A complete conversion into two diastereomers (d. r. 47:53) was observed in NMR of the crude. The crude product was chromatographed on silica gel using a (80:20) mixture of Cy/EtOAc to give only 40 mg (38%) of the second diastereomer of the compound **106**.

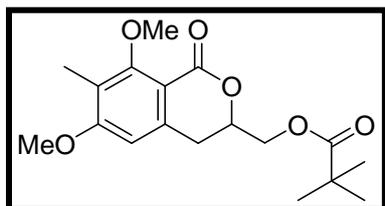
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 1.22 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.48 (s, 3H, CH_3), 2.78-2.82 (m, 2H, CH_2), 4.31 (dd, $J = 5.4$ Hz et $J = 12.4$ Hz, 1H, CH), 4.38 (dd, $J = 3.6$ Hz et $J = 12.3$ Hz, 1H, CH), 4.50 (m, 1H, CH), 5.85 (s, 1H, CH), 6.15 (s, 1H, CH), 7.89 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 21.45, 27.5, 30.1, 39.3, 64.1, 65.6, 74.8, 76.3, 111.8, 118.8, 146.3, 160.7, 178.4, 193.4, 195.2.

IR : 3448, 2974, 1732, 1693, 1648, 1621, 1556, 1480, 1452, 1415, 1370, 1319, 1282, 1230, 1154 cm^{-1} .

MS (APCI, negative mode) : $m/z = 393$ $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^-$.

107 : (6,8-dimethoxy-7-methyl-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl pivalate



$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_6$

$M = 336.38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.67$ (Cyclohexane/EtOAc – 60/40)

White powder. $M_p = 152^\circ\text{C}$.

Yield = 64 % (2 étapes).

In a RB flask flushed with Argon, 5.17 g (16.4 mmol, 5 eq) of TBAF was added at RT to a 100 mL THF solution of 1.61 g (3.3 mmol, 1 eq) of compound **90**. After 1h30, the reaction was quenched at RT with H_2O and extracted with Et_2O . The organic layer was then washed with NaCl_{sat} . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 100% of deprotected compound was observed in NMR. The deprotected compound was then pivaloylated without further purification due to a difficult purification on silica gel (as for compound **100**).

In a RB flask flushed with Argon, 3.51 mL (25 mmol, 7.5 eq) of Et_3N and 40 mg (0.33 mmol, 0.1 eq) of DMAP were added at 0°C to a 50 mL CH_2Cl_2 solution of 970 mg (3.3 mmol, 1 eq) of alcohol **100**. 1.66 mL (13.2 mmol, 4 eq) of PivCl was then added at 0°C and the mixture allowed to warm to RT. After 1h, the reaction was quenched at RT with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and then with $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silica gel using a (80:20) mixture of Cy/EtOAc to give 780 mg (64%) of compound **107** over two steps.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 1.23 (s, 9H, 3 x CH_3), 2.13 (s, 3H, CH_3), 2.83 (dd, $J = 3 \text{ Hz}$ et $J = 15.8 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3.02 (dd, $J = 11.7 \text{ Hz}$ et $J = 15.8 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, CH_3), 3.88 (s, 3H, CH_3), 4.28 (dd, $J = 4.5 \text{ Hz}$ et $J = 12 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.36 (dd, $J = 5.3 \text{ Hz}$ et $J = 12 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.62 (m, 1H, CH), 6.47 (s, 1H, CH_{ar}).

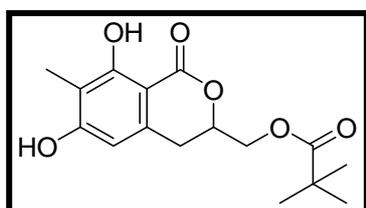
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : 8.9, 27.5, 31.6, 39.2, 56.2, 61.9, 65.1, 75.2, 105.0, 111.0, 121.0, 139.6, 161.8, 162.0, 162.9, 178.6.

IR : 2971, 2360, 1725, 1458, 1245, 1147 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 337$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Analysis calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_6$: C, 64.27 ; H, 7.19. Obtained : C, 64.46 ; H, 7.31.

108 : (6,8-dihydroxy-7-methyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-3-yl)methyl pivalate



$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_6$

$M = 308.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.42$ (Cyclohexane/EtOAc – 60/40)

White powder. $M_p = 137^\circ\text{C}$.

Yield = 80 %.

In a RB flask flushed with Argon, 2.11 g (16 mmol, 10 eq) of AlCl_3 was added at RT to a 20 mL CH_2Cl_2 solution of 560 mg (1.60 mmol, 1 eq) of compound **107**. The mixture was then heated to the solvent reflux. After 16h, the reaction was quenched at RT with HCl 1N and extracted with 40 mL of EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layer was then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silica gel using a (70:30) mixture of Cy/EtOAc to give 440 mg (79%) of the compound **108**.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.22 (s, 9H, 3 x CH_3), 2.12 (s, 3H, CH_3), 2.82 (dd, $J = 3.6 \text{ Hz}$ et $J = 16 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3.00 (dd, $J = 11.5 \text{ Hz}$ et $J = 15.9 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.34 (d, $J = 4 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 4.72 (m, 1H, CH), 5.26 (s, 1H, OH), 6.22 (s, 1H, CH_{ar}), 11.36 (s, 1H, OH).

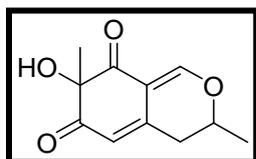
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : 7.0, 27.1, 35.3, 38.8, 67.3, 70.6, 110.0, 110.4, 112.8, 141.3, 162.2, 164.1, 178.4, 193.5.

IR : 3347, 2973, 2360, 1732, 1626, 1511, 1435, 1372, 1319, 1277, 1156, 1110 cm^{-1} .

MS (ESI, negative mode.) : $m/z = 421$ $[\text{M} - \text{H} + \text{TFA}]^-$.

Analysis calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_6$: C, 62.33 ; H, 6.54. Obtained : C, 62.65 ; H, 6.26.

112 : 7-hydroxy-3,7-dimethyl-3H-isochromene-6,8(4H,7H)-dione



$C_{11}H_{12}O_4$ **2 diastereomers 50/50**

$M = 208.21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.24$ (Cyclohexane/EtOAc – 40/60)

Uncolored oil.

Yield = 67 %.

In a RB flask flushed with Argon, 0.45 mL (6.1 mmol, 7 eq) of trifluoroacetic acid (TFA) and 0.95 g (3.4 mmol, 4 eq) of IBX were added at RT to a 10 mL CH_2Cl_2 solution of 253 mg (0.9 mmol, 1 eq) of compound **118**. After 3h at RT, the media was filtered to separate the IBX residu and the filtrate was evaporated. The crude was then diluated with CH_2Cl_2 and chromatographed on silica gel using a gradient (from 80:20 to 40:60) mixture of Cy/EtOAc to give 118 mg (67%) of compound **112** as a mixture of diastereomers.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,46-1.53 (m, 6H, CH_3), 2,59-2.82 (m, 2H, CH_2), 3.76 (se, 1H, OH), 4.36-4.43 (m, 1H, CH), 5.76 (s, 1H, CH), 7.83 (s, 1H, CH).

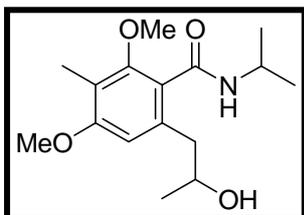
^{13}C RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 20.1, 20.2, 28.9, 29.2, 35.0, 35.1, 75.39, 75.40, 83.2, 83.4, 110.9, 115.9, 116.4, 147.2, 147.6, 160.7, 195.2, 195.6, 197.5 197.0.

IR : 3445, 2981, 2359, 1703, 1660, 1615, 1567, 1455, 1275, 1240, 1101 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 209$ $[M + H]^+$ (55), 226 $[M + H_2O]^+$ (100).

Analysis calculated for $C_{11}H_{12}O_4$: C, 63.45 ; H, 5.81. Obtained : C, 63.12 ; H, 5.74.

113 : 6-(2-hydroxypropyl)-N-isopropyl-2,4-dimethoxy-3-methylbenzamide



$C_{16}H_{25}NO_4$

$M = 295.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.39$ (Cyclohexane/EtOAc – 50/50)

White powder. $M_p = 154^\circ C$.

Yield = 82 %.

In a RB flask flushed with Argon, 6.1 mL (40 mmol, 2 eq) of TMEDA was added to a 200 mL tetrahydrofuran (THF) solution of 4.74 g (20 mmol, 1 eq) of compound **84** at RT. 33.9 mL (44 mmol, 2.2 eq) of *t*-butyllithium (*t*-BuLi 1.3 M in hexane) was then introduced dropwise at -78°C. The mixture was then stirred at -15 °C for 30 min. and recooled to -78°C after the formation of the characteristic red orthometallated intermediate. 1.43 mL (20 mmol, 1 eq) of propylene oxide was then added dropwise at -78°C and the media was warmed to -10 °C. The mixture was then allowed to warm slowly to 0°C over 1h30 and a second equivalent of propylene oxide was introduced. The mixture was then allowed to warm slowly to RT over 1h30. The reaction was then quenched with H₂O and extracted with EtOAc. The combined organic layers were then washed with NH₄Cl_{sat} and then with NaHCO_{3sat}. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (70:30) mixture of Cy/EtOAc to give 5.9 g (82%) of compound **113**.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δppm : 1.22-1.31 (m, 9H, 3 x CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.71 (dd, *J* = 8.4 Hz et *J* = 13.5 Hz, 1H, CH), 2.80 (dd, *J* = 3.6 Hz et *J* = 13.6 Hz, 1H, CH), 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.83 (s, 3H, CH₃), 3.99 (brs, 1H, CH), 4.17-4.33 (m, 1H, CH), 4.98 (s, 1H, O-H), 6.26 (d, *J* = 8 Hz, 1H, N-H), 6.57 (s, 1H, CH_{ar}).

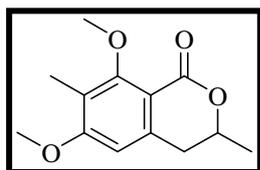
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δppm : 8.9, 22.7, 23.0, 24.7, 42.2, 43.1, 55.9, 62.1, 69.0, 108.6, 118.3, 123.2, 138.2, 156.2, 159.5, 167.7

IR : 3271, 2968, 1633, 1604, 1605, 1574, 1538, 1455, 1402, 1329, 1185, 1124 cm⁻¹.

MS (ESI, positive mode.) : *m/z* = 296 [M + H]⁺.

Analysis calculated for C₁₆H₂₅NO₄: C, 65.06 ; H, 8.53. **Obtained** : C, 64.97 ; H, 8.99.

114 : 6,8-dimethoxy-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-one



C₁₃H₁₆O₄

M = 236.26 g.mol⁻¹

R_f = 0.76 (Cyclohexane/EtOAc – 50/50)

White powder. M_p = 128°C.

Yield = 92 %.

In a RB flask flushed with Argon, 3.68 g (15.4 mmol, 1.1 eq) of camphorsulfonic acid (CSA) was added to a 150 mL toluene solution of 6.0 g (11 mmol, 1 eq) of compound **113** at RT. After 2h under reflux, the reaction was quenched at RT with NaHCO_{3sat} and extracted with diethylether (EtOAc). The organic layer was then washed with NaHCO_{3sat} and then with NH₄Cl_{sat}. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was finally precipitate in cyclohexane to give 3.02 g (92%) of compound **114**.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δppm : 1.47 (d, J = 6Hz, 3H, CH₃), 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.71 (dd, J = 3.4 Hz et J = 15.8 Hz, 1H, CH), 2.80 (dd, J = 10.6 Hz et J = 16.2 Hz, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, CH₃), 3.87 (s, 3H, CH₃), 4.48-4.59 (m, 1H, CH), 6.44 (s, 1H, CH).

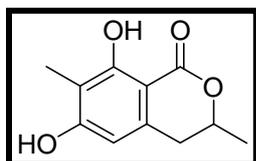
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δppm : 8.6, 20.8, 36.4, 55.8, 61.6, 73.9, 104.6, 110.7, 120.3, 140.4, 161.4, 162.4, 162.8.

IR : 2972, 1714, 1600, 1456, 1248, 1222, 1007cm⁻¹.

MS (ESI, positive mode) : m/z = 237 [M + H]⁺.

Analysis calculated for C₁₃H₁₆O₄: C, 66.09 ; H, 6.83. Obtained : C, 65.67 ; H, 7.21.

115 : 6,8-dihydroxy-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one



C₁₁H₁₂O₄

M = 208.21 g.mol⁻¹

R_f = 0.4 (Cyclohexane/EtOAc – 60/40)

White powder. M_p = 191°C.

Yield = 100 %.

In a RB flask flushed with Argon, 17.33 g (130 mmol, 10 eq) of AlCl₃ was added at RT to a 200 mL CH₂Cl₂ solution of 3.02 g (13 mmol, 1 eq) of compound **107**. The mixture was then heated to the solvent reflux. After 16h, the reaction was quenched at RT with HCl 1N and extracted with 400 mL of EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layer was then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was finally precipitated in 5 mL of CH₂Cl₂ to give 2.70 g (100%) of compound **115**.

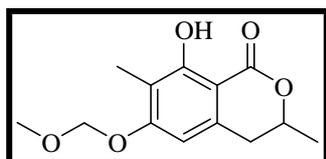
¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.24 (d, J = 6.27 Hz, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.80-2.85 (m, 2H, CH₂), 4.60-4.71 (m, 1H, CH), 5.43 (s, 1H, OH), 6.20 (s, 1H, CH_{ar}), 11.48 (s, 1H, OH).

^{13}C RMN (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 7.7, 21.1, 34.9, 76.0, 101.8, 105.9, 110.9, 138.4, 160.3, 162.6, 170.6.

IR : 3166, 1614, 1506, 1436, 1378, 1312, 1263, 1114, 828, 795, 698, 590 cm^{-1} .

Analysis calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$: C, 63.45 ; H, 5.81. Obtained : C, 62.79 ; H, 5.39.

116 : 8-hydroxy-6-(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one



$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$

$M = 252.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.75$ (Cyclohexane/EtOAc – 50/50)

White powder. $M_p = 80^\circ\text{C}$.

Yield = 100 %.

In a RB flask flushed with Argon, 0.51 mL (5.2 mmol, 4 eq) of Et_3N and 1.90 mL (4 mmol, 3 eq) of methoxymethyl chloride (MOM-Cl, 2.1M in toluene) were added at RT to a 20 mL THF solution of 267 mg (1.3 mmol, 1 eq) of compound **115**. After 2h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (75:25) mixture of Cy/EtOAc to give 326 mg (100%) of compound **116**.

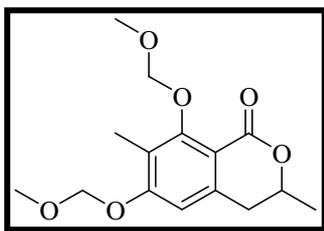
^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.49 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 2.11 (s, 3H, CH_3), 2.81-2.87 (m, 2H, CH_2), 3.48 (s, 3H, CH_3), 4.62-4.69 (m, 1H, CH), 6.45 (s, 1H, CH_{ar}), 11.35 (s, 1H, OH).

^{13}C RMN (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 8.2, 21.1, 35.2, 56.6, 76.0, 94.3, 102.7, 104.1, 113.3, 138.2, 161.1, 161.8, 170.5.

IR : 2932, 1663, 1585, 1508, 1428, 137, 1318, 1287, 1258, 1156, 1123, 1058, 971, 931, 801 cm^{-1} .

Analysis calculated $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$: C, 61.90 ; H, 6.39. Obtained : C, 61.71 ; H, 6.58.

117 : 6,8-bis(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-
isochromen-1-one



$C_{15}H_{20}O_6$

$M = 296.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.55$ (Cyclohexane/EtOAc – 50/50)

White powder. $M_p = 57^\circ\text{C}$.

Yield = 98 %.

In a RB flask flushed with Argon, 660 mg (65 mmol, 5 eq) of sodium hydride (NaH, 95%) and 14.8 mL (31 mmol, 3 eq) of MOM-Cl (2.1M in toluene) were added at RT to a 250 mL THF solution of 2.6 g (12.7 mmol, 1 eq) of compound **115**. After 2h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (65:35) mixture of Cy/EtOAc to give 3.08 g (98%) of compound **117**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.46 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, CH_3), 2.20 (s, 3H, CH_3), 2.84 (m, 2H, CH_2), 3.48 (s, 3H, CH_3), 3.60 (s, 3H, CH_3), 4.54 (m, 1H, CH), 5.06 (dd, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH), 5.13 (dd, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH), 5.20 (dd, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2), 5.26 (dd, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2), 6.70 (s, 1H, CH_{ar}).

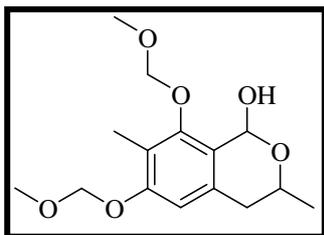
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 9.8, 21.0, 36.5, 56.7, 57.9, 74.4, 94.4, 101.7, 108.1, 111.5, 121.6, 140.4, 159.6, 160.1, 163.5.

IR : 2975, 2932, 1715, 1600, 1248, 1160, 1130, 1058, 990, 928, 900.

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 297$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (50), 614 [$2\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (100).

Analysis calculated for $C_{15}H_{20}O_6$: C, 60.80 ; H, 6.80. **Obtained** : C, 60.79 ; H, 6.93.

118 : 6,8-bis(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-
isochromen-1-one



$C_{15}H_{22}O_6$

$M = 298.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.55$ (Cyclohexane/EtOAc – 50/50)

White powder. $M_p = 96^\circ\text{C}$.

Yield = 98 %.

In a RB flask flushed with Argon, 3.1 mL (2.6 mmol, 1.3 eq) DIBAL-H (0.87 M in toluene) was added at -78°C to a 50 mL toluene solution of 588 mg (2 mmol, 1 eq) of compound **117**. After 1h, the reaction was quenched at -78°C with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with HCl 0.5N and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. 2.88 g (100%) of compound **118** was obtained without further purification.

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.34 (d, J = 6,21 Hz, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.61 (m, 2H, CH₂), 3.47 (s, 3H, CH₃), 3.61 (s, 3H, CH₃), 3.63 (d, J = 2.8 Hz, OH), 4.40-4.47 (s, 1H, CH), 5.03 (dd, J = 2.5 Hz, 2H, CH₂), 5.18 (s, 2H, CH₂), 5.17 (d, J = 2.85 Hz, 1H, CH), 6.65 (s, 1H, CH_{ar}).

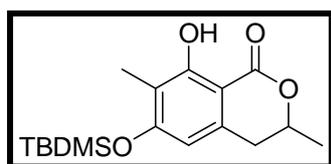
¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 10.2, 21.6, 35.8, 56.4, 57.8, 63.2, 89.3, 94.8, 100.2, 110.13, 118.8, 123.3, 133.5, 154.8, 156.4.

IR : 3324, 29..., 1714, 1593, 1446, 1393, 1320, 1207, 1158, 1120, 1053, 992 cm⁻¹.

MS (ESI, positive mode) : m/z = 281 [M - H₂O + H]⁺.

Analysis calculated for C₁₅H₂₂O₆ : C, 60.39 ; H, 7.43. Obtained : C, 60.31 ; H, 7.09.

152 : 6- {[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-8-hydroxy-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one



C₁₇H₂₆O₄Si

M = 322.47 g.mol⁻¹

R_f = 0.32 (Cyclohexane/EtOAc – 80/20)

White powder. M_p = 84°C.

Yield = 97 %.

In a RB flask flushed with Argon, 4.3 mL (25 mmol, 5 eq) of diisopropylethylamine (DIEA) and 0.8 g (4 mmol, 3 eq) of *t*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) were added at RT to a 50 mL THF solution of 1.04 g (5 mmol, 1 eq) of compound **115**. After 2h, the reaction was quenched at RT with NH₄Cl_{sat} and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (8:2) mixture of Cy/EtOAc to give 1.56 g (97%) of compound **152**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.22 (s, 6H, 2 x CH_3), 0.98 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.45 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.04 (s, 3H, CH_3), 2.75-2.87 (m, 2H, CH_2), 4.55-4.67 (m, 1H, CH), 6.13 (s, 1H, CH_{ar}), 11.35 (s, 1H, OH).

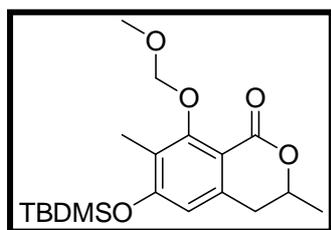
$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : -3.6, 8.8, 18.5, 20.9, 25.8, 34.8, 75.8, 102.0, 109.3, 115.2, 137.5, 160.4, 162.4, 170.4.

IR : 2957, 2931, 2897, 2860, 1667, 1625, 1580, 1511, 1424, 1365, 1317, 1285, 1263, 1170, 1127, 1048, 863, 844, 813.8, 803, 783 cm^{-1} .

MS (ESI, negative mode.) : $m/z = 321$ [M - H] $^-$.

Analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{Si}$: C, 63.32 ; H, 8.13. **Obtained** : C, 63.28 ; H, 8.05.

153 : 6- $\{[tert\text{-butyl}(\text{dimethyl})\text{silyl}]\text{oxy}\}$ -8-(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one



$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Si}$

$M = 366.52$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.32$ (Cyclohexane/EtOAc – 80/20)

White powder. $M_p = 80^\circ\text{C}$.

Yield = 92 %.

In a RB flask flushed with Argon, 303 mg (12 mmol, 5 eq) of NaH (95%) and 89 mg (0.1 mmol, 0.24 eq) of tetramethylammonium iodide (TBAI) were added at RT to a 30 mL CH_2Cl_2 solution of 880 mg (2.4 mmol, 1 eq) of compound **152**. 3.4 mL (7.2 mmol, 3 eq) of MOM-Cl (2.1M in toluene) was then added dropwise at RT. After 2h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (7:3) mixture of Cy/EtOAc to give 808 mg (92%) of compound **153**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.25 (s, 6H, 2 x CH_3), 1.01 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.46 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 2.18 (s, 3H, CH_3), 2.75 (dd, $J = 3.4$ Hz et $J = 15.8$ Hz, 1H, CH), 2.82 (dd, $J = 10.9$ Hz et $J = 16.1$ Hz, 1H, CH), 3.60 (s, 3H, CH_3), 4.51-4.58 (m, 1H, CH), 5.06 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH), 5.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH), 6.39 (s, 1H, CH_{ar}).

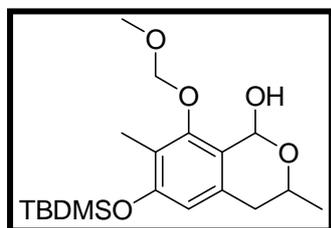
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : -3.9, 10.4, 18.5, 20.8, 25.8, 36.2, 57.8, 74.2, 101.5, 110.9, 113.0, 123.6, 139.7, 159.3, 160.1, 163.5.

IR : 2932, 2859, 1721, 1598, 1473, 1427, 1326, 1249, 1163, 1129, 1055, 988, 931, 862, 783 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : 367 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (85), 750 $[2\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ (100), 755 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ (99).

Analysis calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Si}$: C, 62.26 ; H, 8.25. Obtained : C, 62.31 ; H, 8.24.

154: 6-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy]-8-(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-ol



$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Si}$

$M = 368.54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.56$ (EtOAc/ CH_2Cl_2 – 30/70)

White powder. $M_p = 98^\circ\text{C}$.

Yield = 92 %.

In a RB flask flushed with Argon, 2.87 mL (2.9 mmol, 1.3 eq) DIBAL-H (1M in toluene) was added at -78°C to a 20 mL toluene solution of 808 mg (2.2 mmol, 1 eq) of compound **153**. After 1h, the reaction was quenched at -78°C with H_2O and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with HCl 0.5N and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 742 mg (92%) of compound **154** was obtained without further purification.

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.19 (s, 3H, CH_3), 0.20 (s, 3H, CH_3), 1.00 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.33 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, CH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3), 2.75 (m, 2H, CH_2), 3.60 (s, 3H, CH_3), 3.71 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, OH), 4.40-4.47 (m, 1H, CH), 5.02 (s, 2H, CH_2), 6.15 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, CH), 6.36 (s, 1H, CH_{ar}).

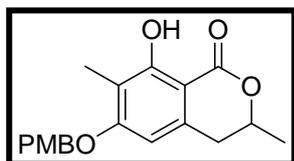
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : -4.01, -3.97, 10.7, 18.5, 21.5, 25.9, 35.5, 57.7, 63.0, 89.3, 100.0, 114.8, 120.5, 122.6, 132.9, 155.92, 155.95.

IR : 3401, 2957, 2931, 1610, 1580, 1473, 1389, 1326, 1257, 1159, 1120, 984 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 351$ $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.

Analysis calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Si}$: C, 61.92 ; H, 8.75. Obtained : C, 62.43 ; H, 9.39.

155 : 8-hydroxy-6-[(4-methoxybenzyl)oxy]-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-one



C₁₉H₂₀O₅

M = 328.36 g.mol⁻¹

R_f = 0.36 (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

White powder. M_p = 117°C.

Yield = 34 %.

In a RB flask flushed with Argon, 2.76 mL (20 mmol, 10 eq) of potassium carbonate (K₂CO₃) and 0.42 mL (3 mmol, 1.5 eq) of *p*-methoxybenzyl chloride (PMBCl) were added at RT to a 30 mL acetone solution of 416 mg (2 mmol, 1 eq) of compound **115**. After 48h, the reaction was quenched at RT with NH₄Cl_{sat} and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (8:2) mixture of Cy/EtOAc to give 220 mg (34%) of compound **155**.

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.49 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.78-2.87 (m, 2H, CH₂), 3.82 (s, 3H, CH₃), 4.61-4.68 (m, 1H, CH), 5.09 (s, 1H, CH), 6.30 (s, 1H, CH_{ar}), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH₂), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH₂), 11.23 (s, 1H, OH).

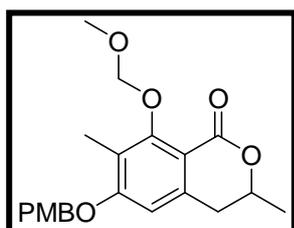
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ ppm : 8.2, 21.0, 35.3, 55.6, 70.3, 75.9, 102.1, 102.5, 112.7, 114.3, 128.7, 129.1, 138.4, 159.8, 161.6, 162.7, 170.5.

IR : 2933, 1656, 1624, 1584, 1515, 1425, 1366, 1319, 1252, 1172, 1126, 1034 cm⁻¹.

MS (ESI, *négative mode*) : *m/z* = 327 [M - H]⁻.

Analysis calculated for C₁₉H₂₀O₅ : C, 69.50 ; H, 6.14. **Obtained** : C, 69.49 ; H, 6.16.

156 : 6-[(4-methoxybenzyl)oxy]-8-(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-one



C₂₁H₂₄O₆

M = 372.41 g.mol⁻¹

R_f = 0.32 (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

White powder.

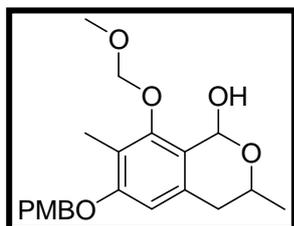
Yield = 91 %.

In a RB flask flushed with Argon, 129 mg (5.40 mmol, 10 eq) of NaH (95%) and was added at RT to a 20 mL THF solution of 200 mg (0.61 mmol, 1 eq) of compound **155**. 0.95 mL (2 mmol, 3.3 eq) of MOM-Cl (2.1M in toluene) was then added dropwise at RT. After 2h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (7:3) mixture of Cy/EtOAc to give 206 mg (91%) of compound **156**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.46 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.23 (s, 3H, CH_3), 2.78-2.87 (m, 2H, CH_2), 3.60 (s, 3H, CH_3), 3.83 (s, 3H, CH_3), 4.50-4.58 (m, 1H, CH), 5.04 (s, 2H, CH), 5.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH), 5.16 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH), 6.54 (s, 1H, CH_{ar}), 6.93 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H, CH_2), 7.35 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : 9.8, 20.8, 36.5, 55.5, 57.8, 70.3, 74.1, 101.5, 106.1, 110.5, 114.3, 121.1, 128.4, 129.1, 140.5, 159.3, 159.8, 161.6, 163.4.

157 : 6-[(4-methoxybenzyl)oxy]-8-(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-ol



$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_6$
 $M = 374.43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.32$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

White powder.

Yield = 100 %.

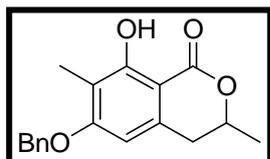
In a RB flask flushed with Argon, 0.7 mL (0.7 mmol, 1.3 eq) DIBAL-H (1M in toluene) was added at -78°C to a 20 mL toluene solution of 200 mg (0.54 mmol, 1 eq) of compound **156**. After 1h, the reaction was quenched at -78°C with H_2O and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with HCl 0.5N and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 202 mg (100%) of compound **157** was obtained without further purification.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.35 (s, $J = 5.9$ Hz, 3H, CH_3), 2.14 (s, 3H, 3H_{12}), 2.60-2.64 (m, 2H, CH_2), 3.61 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 3H, CH_3), 4.40-4.46 (m, 1H, CH), 4.97 (s, 2H, CH_2), 5.04 (s, 2H, CH_2), 6.18 (s, 1H, CH), 6.49 (s, 1H, CH_{ar}), 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, CH_2), (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : 10.4, 21.8, 36.0, 55.8, 58.0, 63.3, 70.5, 89.5, 100.4, 108.2, 114.4, 118.5, 122.6, 129.3, 129.6, 133.5, 155.0, 158.2, 159.8.

IR : 3429, 2960, 1613, 1515, 1255, 1120 cm^{-1} .

158 : 6-(benzyloxy)-8-hydroxy-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one



$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$

$M = 298.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.81$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder. $M_p = 133^\circ\text{C}$.

Yield = 99 %.

In a RB flask flushed with Argon, 1.66 g (12 mmol, 4 eq) of K_2CO_3 and 0.43 mL (3.5 mmol, 1.2 eq) of benzyl bromide (BnBr) were added at RT to a 30 mL acetone solution of 624 mg (3 mmol, 1 eq) of compound **115**. After 1h10, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 890 mg (99 %) of compound **158** was obtained without further purification

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.49 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.15 (s, 3H, CH_3), 2.79-2.92 (m, 2H, CH_2), 3.82 (s, 3H, CH_3), 4.55-4.72 (m, 1H, CH), 5.13 (s, 2H, CH_2), 6.30 (s, 1H, CH_{ar}), 7.31-7.49 (m, 5H, CH_{ar}), 11.34 (s, 1H, OH).

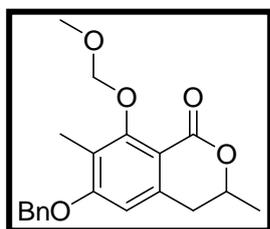
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : 8.2, 21.0, 35.3, 70.4, 75.9, 102.2, 102.4, 112.7, 127.3, 128.4, 129.0, 136.7, 138.4, 161.6, 162.6, 170.5.

IR : 2930, 1660, 1626, 1583, 1512, 1428, 1367, 1320, 1289, 1262, 1172, 1128 cm^{-1} .

MS (ESI, *négative mode*) : $m/z = 297$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$.

Analysis calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$: C, 72.47 ; H, 6.08. Obtained : C, 72.85 ; H, 6.26.

159 : 6-(benzyloxy)-8-(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-one



$C_{20}H_{22}O_5$

$M = 342.39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.65$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder. $M_p = 124^\circ\text{C}$.

Yield = 91 %.

In a RB flask flushed with Argon, 454 mg (18 mmol, 6 eq) of NaH (95%) and was added at RT to a 20 mL THF solution of 890 mg (3 mmol, 1 eq) of compound **155**. 2.9 mL (6 mmol, 2 eq) of MOM-Cl was then added dropwise at RT. After 45 min, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was chromatographed on silicagel with a (75:25) mixture of Cy/EtOAc to give 930 mg (91%) of compound **159**.

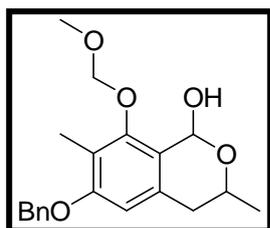
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.46 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.75-2.88 (m, 2H, CH_2), 3.60 (s, 3H, CH_3), 4.50-4.58 (m, 1H, CH), 5.07 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH), 5.12 (s, 2H, CH), 5.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH), 6.52 (s, 1H, CH_{ar}), 7.35-7.42 (m, 5H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : 9.8, 20.9, 36.5, 57.9, 70.5, 74.2, 101.5, 106.1, 110.7, 114.3, 121.1, 128.4, 129.1, 140.5, 159.3, 159.8, 161.6, 163.4.

MS (E. I.) : 343 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (60), 365 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (40), 702 $[2\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ (65), 707 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ (100).

Analysis calculated for $C_{20}H_{22}O_5$: C, 70.16 ; H, 6.48. *Obtained* : C, 70.18 ; H, 6.50.

160 : 6-(benzyloxy)-8-(methoxymethoxy)-3,7-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-ol



$C_{20}H_{24}O_5$

$M = 344.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.65$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder.

Yield = 92 %.

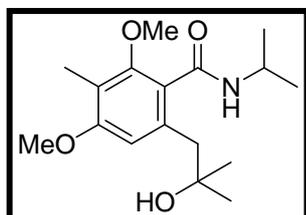
In a RB flask flushed with Argon, 3.25 mL (3.25 mmol, 1.3 eq) DIBAL-H (1M in toluene) was added at -78°C to a 40 mL toluene solution of 854 mg (2.5 mmol, 1 eq) of compound **159**. After 1h, the reaction was quenched at -78°C with H_2O and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with HCl 0.5N and then with a saturated solution of sodium chloride (NaCl_{sat}). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 791 mg (92%) of compound **160** was obtained without further purification.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.35 (s, 3H, CH_3), 2.17 (s, 3H, CH_3), 2.52-2.68 (m, 2H, CH_2), 3.62 (s, 3H, CH_3), 3.65 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, OH), 4.39-4.47 (m, 1H, CH), 5.02 (s, 2H, CH_2), 5.05 (dd, $J = 6.2$ Hz, CH_2), 6.18 (s, $J = 2.5$ Hz, 1H, CH), 7.32-7.48 (m, 5H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ ppm : 9.9, 21.3, 31.0, 35.5, 57.5, 62.8, 70.1, 89.0, 99.9, 107.6, 118.0, 122.2, 127.1, 127.9, 128.6, 133.0, 137.1, 154.5, 157.6.

IR : 3347, 2929, 1609, 1454, 1385, 1324, 1268, 1120, 1085, 1053, 994, 932 cm^{-1} .

161 : 6-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-*N*-isopropyl-2,4-dimethoxy-3-methylbenzamide



$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_4$

$M = 309.40\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.30$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder. $M_p = 153^{\circ}\text{C}$.

Yield = 82 %.

Similar procedure than for the synthesis of compound **113**. The crude product was finally precipitated in cyclohexane to give 11.25 g (82%) of compound **161**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.24 (d, $J = 6.57$ Hz, 6H, CH_3), 1.30 (s, 6H, CH_3), 2.10 (s, 3H, CH_3), 2.79 (s, 2H, CH_2), 3.70 (s, 3H, CH_3), 3.83 (s, 3H, CH_3), 4.24-4.31 (m, 1H, CH), 5.68 (s, 1H, OH), 6.25 (d, $J = 7.35$ Hz, 1H, NH), 6.48 (s, 1H, CH_{ar}).

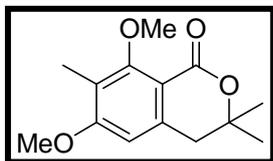
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 8.7, 22.6, 30.4, 42.0, 46.7, 55.8, 62.0, 69.3, 110.0, 118.3, 123.1, 137.2, 156.2, 158.9, 167.8.

IR : 3312, 2971, 1619, 1579, 1463, 1402, 1188, 1122 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 310$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_4$: C, 65.99 ; H, 8.80. Obtained : C, 66.19 ; H, 8.78.

162 : 6,8-dimethoxy-3,3,7-trimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one



$C_{14}H_{18}O_4$

$M = 250.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.50$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder. $M_p = 138^\circ\text{C}$.

Yield = 76 %.

Similar procedure than for the synthesis of compound **114**. The crude product was finally precipitated in cyclohexane to give 3.91 g (76%) of compound **162**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.34 (s, 6H, CH_3), 2.07 (s, 3H, CH_3), 2.86 (s, 2H, CH_2), 3.76 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 3H, CH_3), 6.40 (s, 1H, CH_{ar}).

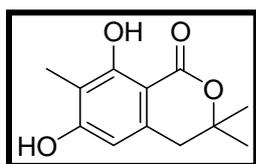
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8.5, 27.1, 40.6, 55.7, 61.4, 79.0, 105.3, 110.5, 120.1, 139.1, 161.1, 162.1, 162.4.

IR : 2977, 2963, 1710, 1598, 1458, 1300, 1231, 1156, 1127, 1104 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode): $m/z = 251$ [$M + H$] $^+$.

Analysis calculated for $C_{14}H_{18}O_4$: C, 67.18 ; H, 7.25. Obtained : 67.48 ; H, 7.54.

163 : 6,8-dihydroxy-3,3,7-trimethyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one



$C_{12}H_{14}O_4$

$M = 222.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.38$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder. $M_p = 204^\circ\text{C}$.

Yield = 98 %.

Similar procedure than for the synthesis of compound **115**. The crude product was finally precipitated in dichloromethane to give 2.17 g (98%) of compound **163**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.40 (s, 6H, CH_3), 2.01 (s, 3H, CH_3), 2.91 (s, 2H, CH_2), 6.26 (s, 1H, CH_{ar}), 7.76 (s, 1H, OH), 11.60 (s, 1H, OH).

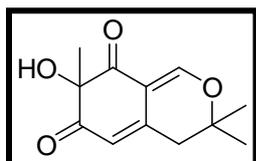
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8.4, 27.9, 39.8, 83.2, 101.9, 107.8, 110.9, 139.4, 163.0, 163.4, 171.3.

IR : 3356, 1622, 1436, 1361, 1104 cm^{-1} .

MS (ESI, negative mode) : $m/z = 221$ $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Analysis calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C, 64.85 ; H, 6.35. **Obtained** : C, 64.80 ; H, 6.45.

164 : 7-hydroxy-3,3,7-trimethyl-3H-isochromene-6,8(4H,7H)-dione



$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$

$M = 222.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.2$ (Cyclohexane/EtOAc– 40/60)

Brown oil.

Yield = 58 % (4 steps).

Compound **164** was prepared as for **112**, starting from lactone **163**. A first bis protection using MOMCl, followed by a reduction of the resulting lactone with DIBAL-H (1M in toluene) were done without purification to provide the intermediate lactol. IBX desaromatisation yielded finally 1.70 g (58% overall yield) of the compound **164**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.36 (s, 6H, H), 1.49 (s, 3H, CH_3), 2.66 (s, 2H, CH_2), 4.05 (se, 1H, OH), 5.78 (s, 1H, CH), 7.75 (s, 1H, CH).

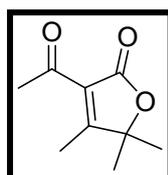
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 25.9, 26.5, 28.9, 39.67, 81.1, 83.2, 109.6, 116.6, 147.0, 159.2, 195.2, 197.7.

IR : 3433, 2979, 2932, 1706, 1660, 1615, 1568, 1287, 1269, 1179, 1091 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode.) : $m/z = 223$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Analysis calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C, 64.85 ; H, 6.35. **Obtained** : C, 65.22 ; H, 6.89.

188 : 3-acetyl-4,5,5-trimethylfuran-2(5H)-one



$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$

$M = 168.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.48$ (Pentane/ Et_2O – 50/50)

Uncolored cristal. $M_p = 47^\circ\text{C}$.

Yield = 82 %.

In a RB flask flushed with Argon, 0.14 mL (1 mmol, 0.5 eq) of Et₃N and 0.42 mL (3 mmol, 1.5 eq) of dioxinone **181** (95%) were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.23 mL (2 mmol, 1 eq) of 3,3-dimethylbutan-2-one. The mixture was then heated to the reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with NH₄Cl_{sat} and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. 276 mg (82%) of compound **188** were obtained without further purification.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δppm : 1.37 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃).

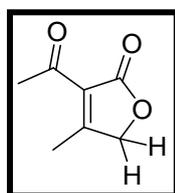
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δppm : 13.3, 24.4, 30.2, 85.7, 123.6, 169.4, 180.9, 195.4.

IR : 1760, 1691, 1288, 1030 cm⁻¹.

MS (ESI, negative mode.) : m/z = 167 [M - H]⁻.

Analysis calculated for C₉H₁₂O₃: C, 64.27 ; H, 7.19. **Obtained** : C, 64.23 ; H, 7.21.

190 : 3-acetyl-4-methylfuran-2(5H)-one



C₇H₈O₃

M = 140.14 g.mol⁻¹

R_f = 0.22 (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Uncolored oil.

Yield = 88 %.

In a RB flask flushed with Argon, 70 μL (0.5 mmol, 0.5 eq) of Et₃N, 0.24 mL (1.5 mmol, 1.5 eq) of dioxinone **181** (95%) and 200 mg molecular sieves were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.12 mL (1 mmol, 1 eq) of 3,3-dimethylbutan-2-one. The mixture was then heated to the reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with NH₄Cl_{sat} and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a gradient (from 70:30 to 60:40) mixture of Cy/EtOAc to give 123 mg (88%) of compound **190**.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δppm : 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.52 (s, 3H, CH₃), 4.74 (s, 2H, CH₂).

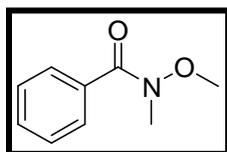
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δppm : 14.9, 30.3, 72.7, 125.3, 171.4, 174.6, 194.9.

GENERAL PROCEDURE A : Synthesis of Weinreb amides 191-

200.

In a RB flask flushed with Argon, 1.25 eq of oxalyl chloride (COCl_2) and 0.004 eq of dimethylformamide (DMF) were added at RT to a CH_2Cl_2 solution (0.1 mol.L^{-1}) containing 1 eq of benzoic acid. After 1.5h, the media was evaporated under vacuum to remove the excess of oxalyl chloride. CH_2Cl_2 (0.1 mol.L^{-1}), 1.4 eq. of Weinreb amine and 3 éq of Et_3N were then successively added at RT. After 2 hours, the reaction was quenched at RT with $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ and extracted with twice with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were then washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and NaCl_{sat} . The organic layer was then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using an appropriate gradient of a Cyclohexane/EtOAc mixture to give the desired Weinreb amide **191-200**.

191 : N-methoxy-N-methylbenzamide



$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$

$M = 165.19 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.16$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

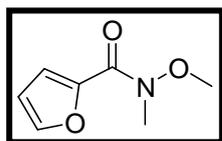
Yield = 98 %.

Form benzoic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 2.93 g (98 %) of the amide **191**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 3.29 (s, 3H, CH_3), 3.48 (s, 3H, CH_3), 7.21-7.40 (m, 3H, CH_{ar}), 7.53-7.64 (m, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 33.8, 61.0, 128.05, 128.13, 130.6, 134.2, 169.9

192 : N-methoxy-N-methylfuran-2-carboxamide



$\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_3$

$M = 155.15 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.26$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Yellow oil

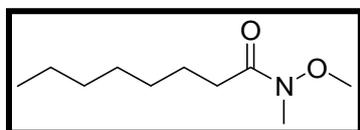
Yield = 94 %.

Form furoic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 2.72 g (94 %) of the amide **192**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 3.34 (s, 3H, CH_3), 3.76 (s, 3H, CH_3), 6.50 (dd, $J = 1.7$ Hz et $J = 3.6$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.02 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.47 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 33.1, 61.4, 111.7, 117.4, 145.3, 145.6, 159.1.

193 : *N*-methoxy-*N*-methyloctanamide



$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_2$

$M = 187.28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.28$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

Yield = 86 %.

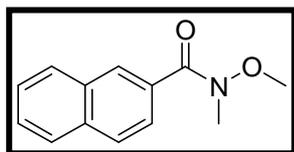
Form capric acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 3.23 g (86 %) of the amide **193**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.29 (m, 8H, CH_2), 1.61 (m, 2H, CH_2), 2.38 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 3.16 (s, 3H, CH_3), 3.66 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 14.4, 22.9, 25.0, 29.4, 29.7, 32.0, 32.5, 33.0, 61.5, 175.1.

IR : 2929, 2856, 1670, 1466, 1414, 1388, 1177, 998 cm^{-1} .

194 : *N*-methoxy-*N*-methyl-2-naphthamide



$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2$

$M = 215.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.36$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Yellow oil

Yield = 92 %.

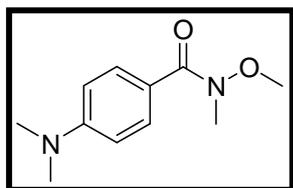
Form naphthyllic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 3.70 g (92%) of the amide **194**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 3.85 (s, 3H, CH_3), 3.52 (s, 3H, CH_3), 7.47-7.55 (m, 2H, CH_{ar}), 7.73-7.89 (s, 4H, CH_{ar}), 8.22 (s, 1H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 34.0, 61.2, 125.1, 126.6, 127.5, 127.76, 127.82, 128.8, 128.9, 131.5, 132.6, 134.3, 170.0.

IR : 3057, 2969, 2934, 1643, 1477, 1415, 1378, 1185, 1126, 986, 866, 817, 757 cm^{-1} .

196 : 4-(dimethylamino)-*N*-methoxy-*N*-methylbenzamide



$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

$M = 208.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.51$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder. $M_p = 35^\circ\text{C}$.

Yield = 78 %.

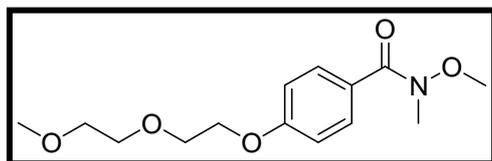
Form *p*-dimethylaminobenzoic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 826 mg (78 %) of the amide **196**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 3.02 (s, 3H, CH_3), 3.34 (s, 3H, CH_3), 3.59 (s, 3H, CH_3), 6.64 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 7.72 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 34.4, 40.2, 60.8, 110.7, 120.4, 130.7, 152.1, 170.0.

IR : 2933, 2814, 1606, 1527, 1413, 1363, 1229, 1186, 946, 826, 756 cm^{-1} .

197 : *N*-methoxy-4-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)-*N*-methylbenzamide



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_5$

$M = 283.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.10$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow oil

Yield = 72 %.

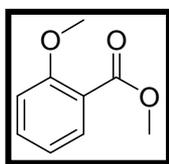
Form *p*-diethyleneglycolbenzoic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 329 mg (72%) of the amide **197**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 3.35 (s, 3H, CH_3), 3.40 (s, 3H, CH_3), 3.55 (s, 3H, CH_3), 3.58 (dd, $J = 2.8$ Hz et 4.9 Hz, 2H, CH_2), 3.72 (t, $J = 2.8$ Hz et 4.9 Hz, 2H, CH_2), 3.88 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2), 4.17 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2), 6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, CH_{ar}), 8.03 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, CH_{ar}), 11.73 (se, 1H, OH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 33.9, 59.0, 60.9, 67.4, 69.6, 70.7, 71.9, 113.8, 126.1, 130.4, 160.7, 169.3.

IR : 2932, 2601, 2497, 1637, 1607, 1509, 1458, 1421, 1376, 1303, 1255, 1175, 1110, 845, 756 cm^{-1} .

198 : methyl 2-methoxybenzoate



$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$

$M = 166.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.15$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

Yield = 70 %.

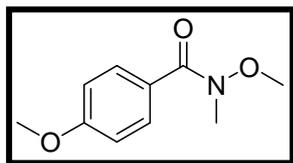
In a RB flask flushed with Argon, 3.49 g (25 mmol, 1.25 eq) of K_2CO_3 and 1.0 mL (24 mmol, 1.2 eq) of methyl iodide (MeI) were added at RT to a 100 mL acetone solution containing 2.0 mL (20 mmol, 1 eq) of methyl *o*-hydroxybenzoate. After 13h, the reaction was quenched at RT with $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ and extracted with twice with EtOAc. The combined organic layers were then washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and NaCl_{sat} . The organic layer was then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a gradient (from 70:30) mixture of Cy/EtOAc to give 2.31 mg (70 %) of compound **198**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 3.88 (s, 3H, CH_3), 3.89 (s, 3H, CH_3), 6.94-6.99 (m, H, CH_{ar}), 7.45 (td, $J = 1.9$ et 7.8 Hz, 1H, CH), 7.78 (dd, $J = 1.9$ Hz et 7.8 Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 51.9, 55.8, 111.9, 119.9, 120.0, 131.5, 133.45, 159.0, 166.6.

IR : 3004, 2952, 2840, 1732, 1601, 1583, 1494, 1464, 1436, 1305, 1254, 1086, 1024, 757 cm^{-1} .

199 : *N*,4-dimethoxy-*N*-methylbenzamide



$C_{10}H_{13}NO_3$

$M = 195.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.46$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder. $M_p = 70^\circ\text{C}$.

Yield = 95 %.

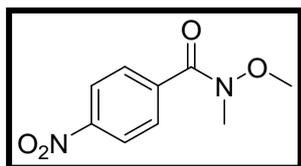
Form *p*-methoxybenzoic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 3.71 g (95%) of the amide **199**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 3.35 (s, 3H, CH_3), 3.56 (s, 3H, CH_3), 3.84 (s, 3H, CH_3), 6.89 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.71 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 34.2, 55.6, 61.2, 113.6, 126.3, 130.9, 161.8, 169.7.

IR : 2935, 1637, 1608, 1512, 1459, 1421, 1375, 1305, 1254, 1173, 1029, 842 cm^{-1} .

200 : *N*-methoxy-*N*-methyl-4-nitrobenzamide



$C_9H_{10}N_2O_4$

$M = 210.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.31$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Yellow oil

Yield = 96 %.

Form *p*-nitrobenzoic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A to give 4.04 g (96%) of the amide **200**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 3.33 (s, 3H, CH_3), 3.48 (s, 3H, CH_3), 7.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, CH_{ar}), 8.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, CH_{ar}).

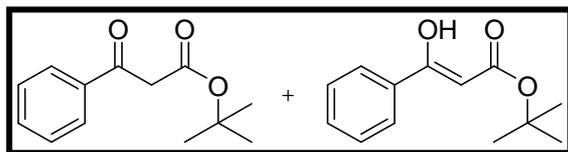
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 33.3, 61.6, 123.4, 129.4, 140.2, 148.9, 167.8.

IR : 3116, 2941, 1638, 1601, 1526, 1356, 1315, 1214, 978, 864, 711 cm^{-1} .

GENERAL PROCEDURE B : Synthesis of *t*-butylesters 201-210.

In a RB flask flushed with Argon 3.1 eq of *n*-butyllithium (*n*-BuLi, 1.2M in hexane) were added at -78°C to a THF solution (0.1 mol.L⁻¹) containing 3 eq of diisopropylamine (DIPA). After 30 min at 0°C, the media was recooled to -78°C and 3 eq of freshly distilled *t*-butylacetate were added. After 30 min at -78°C, 1 eq of Weinreb amide were finally added at this temperature. After 1h, the reaction was quenched at RT with NaHCO_{3sat} and extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were then washed with NH₄Cl_{sat}. The organic layer was then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using an appropriate gradient of a Cyclohexane/EtOAc mixture to give the desired *t*-butylesters **201** to **210**.

201 : *tert*-butyl 3-oxo-3-phenylpropanoate et (Z)-*tert*-butyl 3-hydroxy-3-phenylacrylate



C₁₃H₁₆O₃ **Diketonic et ketoenolic forms 78/22.**

M = 220.26 g.mol⁻¹

R_f = 0.58 (Cyclohexane/EtOAc – 80/20)

Uncolored oil

Yield = 99 %.

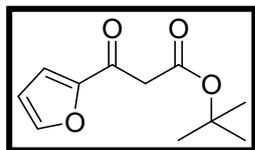
Form the Weinreb amide **191**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 3.91 g (99%) of the *t*-butylester **201**.

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.32 (s, 7H, CH₃), 1.42 (s, 2H, CH₃), 3.77 (s, 1.6H, CH₂), 5.48 (s, 0.2H, CH), 7.25-7.46 (m, 3H, CH_{ar}), 7.63 (d, *J* = 7 Hz, 0.4 H, CH_{ar}), 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1.6 H, CH_{ar}), 12.67 (s, 0.2H, OH).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 27.7, 28.2, 47.2, 81.0, 81.7, 88.7, 125.8, 128.3, 128.4, 128.6, 130.9, 133.4, 133.6, 136.1, 166.6, 170.7, 173.0, 192.9.

IR : 3062, 2980, 2933, 1732, 1688, 1637, 1599, 1450, 1408, 1369, 1326, 1326, 1278, 1154, 690 cm⁻¹.

202 : tert-butyl 3-(furan-2-yl)-3-oxopropanoate



$C_{11}H_{14}O_4$

$M = 210.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.65$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

White powder. $M_p = 76^\circ\text{C}$.

Yield = 94 %.

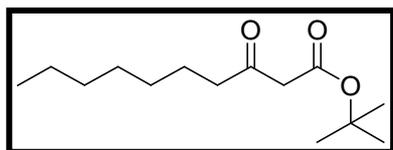
Form the Weinreb amide **192**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 3.36 g (94%) of the *t*-butylester **202**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.41 (s, 9H, CH_3), 3.73 (s, 2H, CH_2), 6.53 (dd, $J = 1.7 \text{ Hz}$ et $J = 3.6 \text{ Hz}$, 2H, CH_{ar}), 7.23 (d, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 1H, CH_{ar}), 7.58 (d, $J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 28.2, 47.2, 82.4, 112.9, 118.3, 147.1, 152.4, 166.5, 181.9.

IR : 1732, 1681, 1469, 1154, 762 cm^{-1} .

203 : tert-butyl 3-oxodecanoate



$C_{14}H_{26}O_3$

$M = 242.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.76$ (Cyclohexane/EtOAc– 75/25)

Uncolored oil

Yield = 91 %.

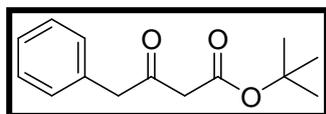
Form the Weinreb amide **193**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 3.75 g (91%) of the *t*-butylester **203**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0.81 (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.21 (m, 8H, CH_2), 1.41 (m, 9H, CH_3), 1.52 (m, 2H, CH_2), 2.14 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 3.28 (s, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 14.3, 22.8, 23.7, 28.2, 29.2, 29.3, 31.9, 43.1, 50.9, 82.0, 166.7, 203.7.

IR : 2930, 2857, 1716, 1457, 1410, 1369, 1318, 1252, 1149 cm^{-1} .

205 : tert-butyl 3-oxo-4-phenylbutanoate



$C_{14}H_{18}O_3$

$M = 234.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.60$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

Yield = 90 %.

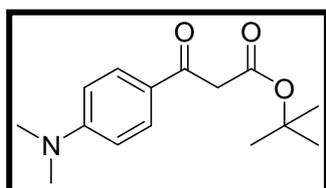
Form the Weinreb amide **195**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 3.58 g (90%) of the *t*-butylester **205**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.47 (s, 9H, CH_3), 3.38 (s, 2H, CH_2), 3.82 (s, 2H, CH_3), 7.20-7.37 (m, 5H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 28.1, 49.7, 50.0, 82.1, 127.4, 128.9, 129.8, 133.6, 166.5, 201.0.

IR : 3061, 3031, 2980, 2933, 1732, 1714, 1645, 1497, 1456, 1394, 1369, 1323, 1254, 1147, 966, 844, 736, 700 cm^{-1} .

206 : tert-butyl 3-(4-(dimethylamino)phenyl)-3-oxopropanoate



$C_{15}H_{21}NO_3$

$M = 263.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.81$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder. $M_p = 62^\circ\text{C}$.

Yield = 96 %.

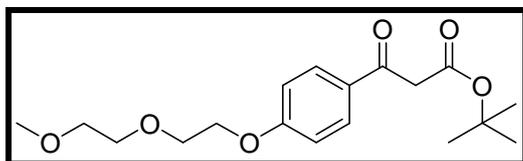
Form the Weinreb amide **196**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 720 mg (96%) of the *t*-butylester **206**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.42 (s, 9H, CH_3), 3.02 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 2H, CH_2), 6.60 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 7.81 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 28.2, 40.2, 47.1, 81.7, 110.8, 124.3, 131.0, 153.8, 167.8, 191.1.

IR : 2975, 2930, 1734, 1653, 1600, 1553, 1530, 1366, 1238, 1287, 1171, 1135 cm^{-1} .

207 : *tert*-butyl 3-(4-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)phenyl)-3-oxopropanoate



$C_{18}H_{26}O_6$

$M = 338.40 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.50$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow oil

Yield = 74 %.

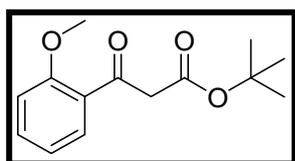
Form the Weinreb amide **197**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 128 mg (74%) of the *t*-butylester **207**.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.39 (s, 9H, CH_3), 3.34 (s, 3H, CH_3), 3.53 (dd, $J = 3.0$ Hz et 5.2 Hz, 2H, CH_2), 3.72 (t, $J = 2.9$ Hz et 5.1 Hz, 2H, CH_2), 3.80 (s, 2H, CH_2), 3.88 (t, $J = 4.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.17 (t, $J = 4.3$ Hz, 2H, CH_2), 6.91 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, CH_{ar}), 8.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 28.1, 47.4, 59.3, 67.8, 69.7, 71.0, 72.1, 82.0, 114.6, 129.6, 131.0, 163.2, 167.2, 191.7.

IR : 2979, 2930, 2880, 1732, 1678, 1602, 1510, 1308, 1259, 1173, 1142, 841 cm^{-1} .

208 : *tert*-butyl 3-(2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate



$C_{14}H_{18}O_4$

$M = 250.29 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.35$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

Yield = 69 %.

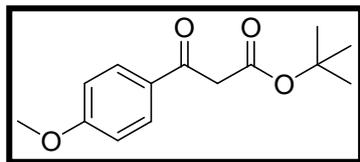
Form the ester **198**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 2.25 g (69%) of the *t*-butylester **208**.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.37 (s, 9H, CH_3), 3.85 (s, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, CH_3), 6.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_{ar}), 6.98 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.45 (td, $J = 1.9$ Hz et 7.3 Hz, 1H, CH), 7.78 (dd, $J = 1.9$ Hz et 7.7 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 28.1, 52.2, 55.5, 81.4, 111.6, 120.9, 126.7, 131.2, 134.7, 159.2, 167.5, 193.8.

IR : 3076, 2978, 2841, 1732, 1674, 1600, 1487, 1248, 1153, 1022, 760 cm^{-1} .

209 : tert-butyl 3-(4-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate



$C_{14}H_{18}O_4$

$M = 250.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.76$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Yellow oil

Yield = 98 %.

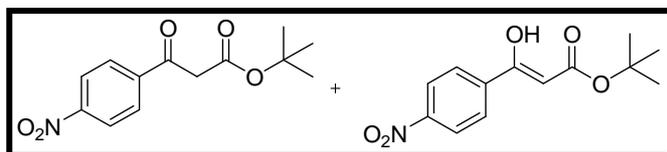
Form the Weinreb amide **199**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 4.375 g (98%) of the *t*-butylester **209**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.39 (s, 9H, CH_3), 3.79 (s, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, CH_3), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 27.9, 47.1, 55.5, 81.7, 113.8, 129.2, 130.8, 163.8, 167.0, 191.5.

IR : 2978, 2935, 2841, 1732, 1678, 1602, 1512, 1326, 1260, 1171, 1028, 841 cm^{-1} .

210 : tert-butyl 3-(4-nitrophenyl)-3-oxopropanoate



$C_{13}H_{15}NO_5$ **Diketonic et ketoenolic forms 17/83.**

$M = 265.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$f = 0.59$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Yellow oil

Yield = 85 %.

Form the Weinreb amide **200**, the reaction was performed as detailed in the general procedure B to give 3.83 g (85%) of the *t*-butylester **210**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.41 (s, 1.5H, 3 x CH_3), 1.55 (s, 7.5H, 3 x CH_3), 3.92 (s, 0.3H, CH_2), 5.68 (s, 0.8H, CH), 7.91 (d, $J = 9.0$ Hz, 1.7H, 2 x CH_{ar}), 8.09 (d, $J = 9.0$ Hz, 0.3H, 2 x CH_{ar}), 8.26 (d, $J = 9.0$ Hz, 1.7H, 2 x CH_{ar}), 8.33 (d, $J = 9.0$ Hz, 0.3H, 2 x CH_{ar}), 12.71 (s, 0.8H, OH).

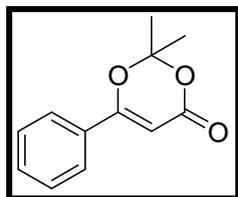
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 28.4, 28.7, 48.0, 82.6, 83.3, 92.3, 124.2, 124.4, 127.3, 130.0, 140.2, 141.0, 149.6, 151.0, 166.4, 168.2, 172.9, 192.0.

IR : 2982, 1732, 1694, 1644, 1595, 1531, 1346, 1276, 1154, 854 cm^{-1} .

GENERAL PROCEDURE C : Synthesis of dioxinones 211-220.

In a RB flask flushed with Argon, 15 eq of acetic anhydride (Ac₂O) and 1 eq of sulfuric acid were added at 0°C to a 10 eq acetone solution containing 1 eq of *t*-butylester. The media was then allowed to warm slowly to RT over 10 min. After 45 min., the reaction was quenched at RT with an aqueous solution containing 30 eq of sodium carbonate (Na₂CO₃) and EtOAc were added. The biphasic media was then stirred for 40 min (hydrolysis of the resulting acetic anhydride) and the aqueous layer was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were then washed with NH₄Cl_{sat}. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude was finally chromatographed on silica gel using an appropriate gradient of a Cyclohexane/EtOAc mixture to give the desired dioxinones **211** to **220**.

211 : 2,2-dimethyl-6-phenyl-4*H*-1,3-dioxin-4-one



C₁₂H₁₂O₃

M = 204.22 g.mol⁻¹

R_f = 0.38 (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

White powder. M_p = 66°C.

Yield = 64 %.

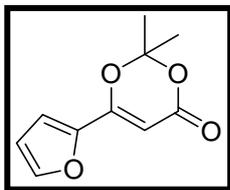
From the *t*-butylester **201**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 1.56 g (64%) of the dioxinone **211**.

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.78 (s, 6H, CH₃), 5.87 (s, 1H, CH), 7.40-7.66 (m, 3H, CH_{ar}), 7.67 (d, J = 7.4 Hz, 2H, CH_{ar}).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 25.2, 91.4, 106.8, 126.5, 129.0, 131.2, 132.3, 162.1, 165.2.

IR : 2998, 1727, 1450, 1389, 1363, 1279, 1225, 1204, 990, 770, 691 cm⁻¹.

212 : 6-(furan-2-yl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{10}H_{10}O_4$

$M = 194.18 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.36$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Red oil

Yield = 64 %.

Form the *t*-butylester **202**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 716 mg (64%) of the dioxinone **212**.

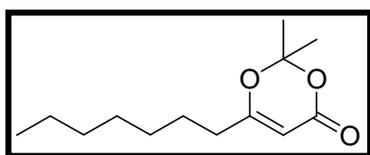
1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.71 (s, 6H, CH_3), 5.74 (s, 1H, CH), 6.49 (dd, $J = 1.7$ Hz et $J = 3.6$ Hz, 2H, CH_{ar}), 6.86 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.53 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 25.0, 89.6, 107.0, 112.5, 114.2, 146.3, 156.4, 161.6.

IR : 3134, 3000, 2945, 1727, 1679, 1641, 1470, 1361, 1278, 1205, 1017 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 195$ [M + H] $^+$.

213 : 6-heptyl-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{13}H_{22}O_3$

$M = 226.31 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.55$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

Yield = 71 %.

Form the *t*-butylester **203**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 989 mg (71%) of the dioxinone **213**.

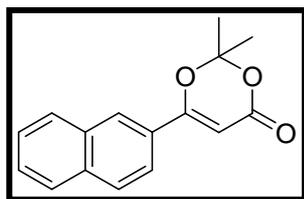
1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0.82 (m, 3H, CH_3), 1.22 (m, 8H, CH_2), 1.47 (m, 2H, CH_2), 1.62 (s, 6H, CH_3), 2.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2), 5.16 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 14.1, 22.7, 25.1, 25.8, 28.98, 29.01, 31.7, 33.7, 93.2, 106.3, 161.5, 172.3.

IR : 2999, 2929, 2858, 1732, 1634, 1463, 1392, 1463, 1392, 1271, 1205, 1013, 901, 806 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 227$ [M + H] $^+$.

214 : 2,2-dimethyl-6-(naphthalen-2-yl)-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{16}H_{14}O_3$

$M = 254.28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.45$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow powder. $M_p = 129^\circ\text{C}$.

Yield = 50 %.

Form the *t*-butylester **204**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 250 mg (50%) of the dioxinone **214**.

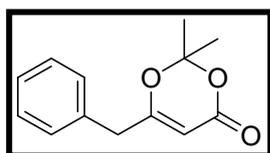
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.85 (s, 6H, 2 x CH_3), 6.02 (s, 1H, CH), 7.51-7.60 (m, 2H, CH_{ar}), 7.65 (dd, $J = 1.5 \text{ Hz}$ et $J = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, CH_{ar}), 7.84-7.92 (m, 3H, CH_{ar}), 8.21 (s, 1H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 25.3, 91.88, 106.9, 122.6, 127.4, 128.0, 128.38, 128.42, 128.9, 129.2, 132.9, 135.1, 162.2, 165.1.

IR : 1721, 1615, 1374, 1336, 1278, 1253, 1204, 1040, 956, 903, 809 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 255$ [M + H] $^+$.

215 : 6-benzyl-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{13}H_{14}O_3$

$M = 218.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.39$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

Yield = 59 %.

Form the *t*-butylester **205**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 350 mg (59%) of the dioxinone **215**.

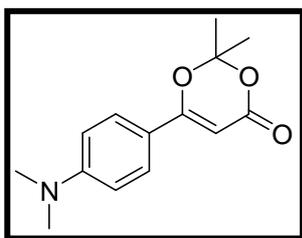
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.52 (s, 6H, CH_3), 3.41 (s, 2H, CH_2), 3.11 (s, 2H, CH_3), 7.11-7.27 (m, 5H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 25.1, 40.3, 94.3, 106.8, 127.6, 129.0, 129.4, 134.3, 161.5, 170.6.

IR : 3089, 3064, 3031, 3000, 2943, 1732, 1634, 1602, 1496, 1456, 1392, 1272, 1203, 1014, 902, 801, 703 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 219$ [M + H] $^+$.

216 : 6-(4-(dimethylamino)phenyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{14}H_{17}O_3$

$M = 247.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.62$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder. $M_p = 160^\circ\text{C}$.

Yield = 71 %.

Form the *t*-butylester **206**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 334 mg (71%) of the dioxinone **216**.

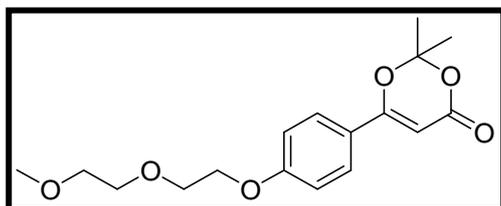
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.76 (s, 6H, CH_3), 3.03 (s, 3H, CH_3), 5.69 (s, 1H, CH), 6.66 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, CH_2), 7.55 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 25.2, 40.2, 87.1, 106.1, 111.5, 117.7, 128.1, 153.0, 163.0, 165.9.

IR : 1703, 1596, 1530, 1443, 1376, 1283, 1253, 1200, 1040, 803 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 248$ $[M + H]^+$.

217 : 6-(4-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)phenyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{17}H_{22}O_6$

$M = 322.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.24$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow oil

Yield = 97 %.

Form the *t*-butylester **207**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 112 mg (97%) of the dioxinone **217**.

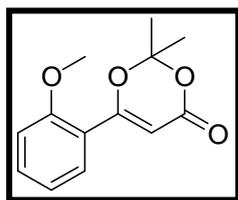
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.76 (s, 6H, CH_3), 3.37 (s, 3H, CH_3), 3.56 (dd, $J = 2.8$ Hz et 4.9 Hz, 2H, CH_2), 3.69 (t, $J = 2.9$ Hz et 4.9 Hz, 2H, CH_2), 3.86 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2), 4.17 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2), 5.76 (s, 1H, CH), 6.93 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 8.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 25.3, 59.4, 67.9, 69.8, 71.1, 72.2, 89.7, 106.6, 115.1, 123.7, 128.4, 162.3, 162.5, 165.2.

IR : 2926, 2879, 1722, 1606, 1512, 1363, 1252, 1204, 1180, 1125, 804 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 323$ $[M + H]^+$.

218 : 6-(2-methoxyphenyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



C₁₃H₁₄O₄

M = 234.25 g.mol⁻¹

R_f = 0.26 (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow powder. M_p = 117°C.

Yield = 54 %.

Form the *t*-butylester **208**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 1.02 g (54%) of the dioxinone **218**.

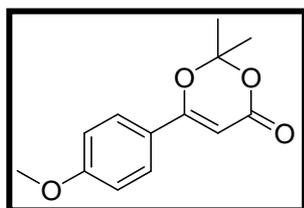
¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.74 (s, 6H, CH₃), 3.85 (s, 3H, CH₃), 6.29 (s, 1H, CH), 6.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H, CH_{ar}), 6.98 (t, J = 8.1 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.45 (td, J = 1.7 Hz et 7.9 Hz, 1H, CH), 7.78 (dd, J = 1.7 Hz et 7.9 Hz, 2H, CH₂).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 28.1, 52.2, 55.5, 81.4, 111.6, 120.9, 126.7, 131.2, 134.7, 159.2, 167.5, 193.8.

IR : 2997, 1728, 1621, 1575, 1490, 1463, 1357, 1288, 1247, 1205, 1021, 768 cm⁻¹.

MS (ESI, positive mode) : m/z = 235 [M + H]⁺.

219 : 6-(4-methoxyphenyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



C₁₃H₁₄O₄

M = 234.25 g.mol⁻¹

R_f = 0.18 (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow cristal. M_p = 68°C.

Yield = 57 %.

Form the *t*-butylester **209**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 1.60 g (57%) of the dioxinone **219**.

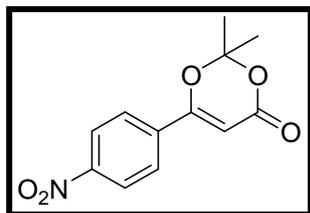
¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.77 (s, 6H, CH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃), 5.77 (s, 1H, CH), 6.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, CH_{ar}).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 25.2, 55.7, 89.5, 106.5, 114.4, 123.5, 128.4, 162.4, 163.0, 165.1.

IR : 2999, 2940, 2842, 1721, 1607, 1513, 1363, 1252, 1179, 1027, 804 cm⁻¹.

MS (ESI, positive mode) : m/z = 235 [M + H]⁺.

220 : 2,2-dimethyl-6-(4-nitrophenyl)-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{12}H_{11}NO_5$

$M = 249.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.31$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Yellow powder. $M_p = 158^\circ\text{C}$.

Yield = 69 %.

From the *t*-butylester **210**, the reaction was performed as detailed in the general procedure C to give 480 mg (69%) of the dioxinone **220**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.82 (s, 6H, CH_3), 6.03 (s, 1H, CH), 7.87 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 x CH_{ar}), 8.29 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 x CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 25.5, 94.5, 107.8, 124.4, 127.7, 137.3, 150.1, 161.3, 162.7.

IR : 2969, 1734, 1726, 1595, 1518, 1343, 1321, 1276, 1254, 1196 cm^{-1} .

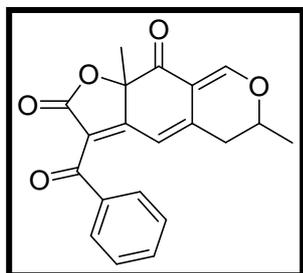
MS (ESI, negative mode) : $m/z = 248$ $[\text{M} - \text{H}]^-$.

GENERAL PROCEDURE D : Synthesis of epicocconone's analogs (first and second generation).

In a RB flask flushed with Argon, 2 eq of Et_3N , 1.5 eq dioxinone and molecular sieves (200 mg per mmol) were added at RT to a toluene solution containing 1 eq of alcohol **112** or alcohol **164**. The mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with HCl 1N and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate and the combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using an appropriate of a Cyclohexane/EtOAc mixture. The combined pure fractions were then evaporated and the residue was precipitated using a 1:10 mixture of Et_2O /pentane (first Et_2O and then pentane) to give the desired analogs of epicocconone (first and second generation).

The analogs have shown an incompatibility with either elemental analysis technique or fusion point determination due to their tendency to be hydrolysed by the humidity as soon as they are eaten (HRMS are under way)

221 : 3-benzoyl-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{20}H_{16}O_5$ **2 diastereomers 70/30.**

$M = 336.34 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.51$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder

Yield = 70 %.

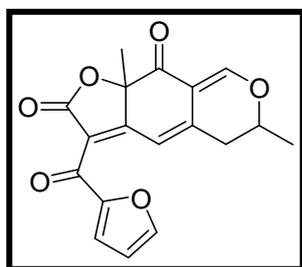
Form the alcohol **112** and the dioxinone **211**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 113 mg (70%) of the analog **221**. One of the two diastereomer was obtained pure.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.47 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.75 (s, 3H, CH_3), 2.67 (ddd, $J = 3.1-10.5$ et 16.6 Hz, 1H, CH), 2.78 (dd, $J = 3.6$ et 16.6 Hz, 1H, CH), 4.33 (m, 1H, CH), 6.50 (s, 1H, CH), 7.45 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.57 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.82 (s, 1H, CH), 7.83 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 19.9, 27.6, 35.3, 86.8, 110.8, 111.4, 119.69, 128.4, 129.6, 133.8, 136.3, 141.9, 160.2, 168.1, 169.7, 188.9, 189.3.

MS (IC) : $m/z = 337$ $[M + H]^+$.

223 : 3-(2-furoyl)-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{18}H_{14}O_6$ **2 diastereomers 40/60**

$M = 326.30 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.36$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder

Yield = 90 %.

Form the alcohol **112** and the dioxinone **212**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 65 mg (90%) of the analog **223**.

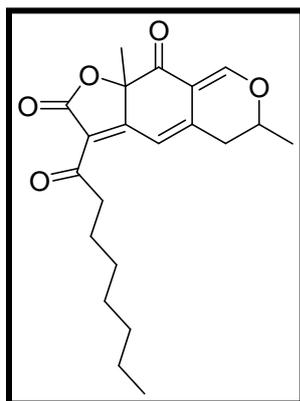
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.49 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.72 (s, 1.8H, CH_3), 1.79 (s, 1.2H, CH_3), 2.60 (dd, $J = 11.1$ et 17.1 Hz, 0.4H, CH), 2.70 (dd, $J = 10.7$ et 16.2 Hz, 0.6H, CH), 2.82 (dd, $J = 2.8$ et 16.4 Hz, 1H, CH), 4.33 (m, 0.6H, CH), 4.41 (m, 0.4H, CH), 6.58 (s, 1H, CH), 6.75 (s, 1H, CH_{ar}), 7.60 (s, 1H, CH_{ar}), 7.68 (s, 1H, CH_{ar}), 7.82 (s, 0.6H, CH), 7.85 (s, 0.4H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 20.0, 20.1, 27.7, 28.1, 34.8, 35.5, 75.57, 75.63, 86.98, 87.00, 111.1, 111.5, 111.6, 111.8, 112.9 (2C), 118.0, 119.2, 122.4, 122.5, 142.4, 142.9, 148.1, 148.2, 151.57, 151.62, 160.4 (2C), 167.8, 168.0, 171.1, 172.1, 174.56, 174.63, 189.5, 190.2.

IR : 2360.1, 1756.1, 1704.4, 1633.8, 1593.4, 1557.6, 1463.1, 1392.7, 1235.8, 1109.7, 1024.5, 948.8, 921.4, 855.8, 741.9 cm^{-1} .

MS (IC) : $m/z = 327$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

225 : 6,9a-dimethyl-3-octanoyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_5$ **2 diastereomers 50/50.**

$M = 358.43$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.85$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow oil.

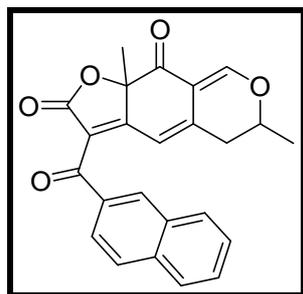
Yield = 30 %.

Form the alcohol **112** and the dioxinone **213**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 13 mg (30%) of the analog **225**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.26 (s, 8H, CH_2), 1.43 (s, 3H, CH_3), 1.48 (m, 2H, CH_2), 2.63 (m, 2H, CH_2), 2.92 (m, 2H, CH_2), 4.33 (m, 0.5H, CH), 4.45 (m, 0.5H, CH), 7.01 (s, 0.5H, CH), 7.03 (s, 0.5H, CH), 7.81 (s, 0.5H, CH), 7.84 (s, 0.5H, CH).

$\text{MS (ESI, positive mode.)}$: $m/z = 359$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ (30), 734 $[2\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ (100).

227 : 6,9a-dimethyl-3-(2-naphthoyl)-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{24}H_{18}O_5$ **2 diastereomers 50/50**

$M = 386.4 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.31$ (Cyclohexane/EtOAc– 75/25)

Yellow cristal (RX structure).

Yield = 62 %.

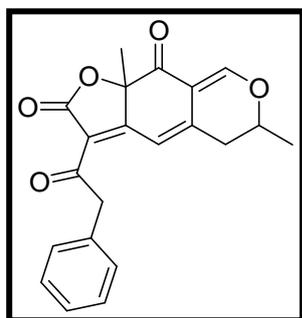
Form the alcool **112** and the dioxinone **214**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 25 mg (62%) of the analog **227**. One of the two diastereomer was obtained pure.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.45 (d, $J = 6.2$ Hz, 1.5H, CH_3), 1.46 (d, $J = 6.2$ Hz, 1.5H, CH_3), 1.79 (s, 1.5H, CH_3), 1.85 (s, 1.5H, CH_3), 2.55 (dd, $J = 10.7$ et 16.6 Hz, 0.5H, CH), 2.66 (dd, $J = 10.9$ et 16.8 Hz, 0.5H, CH), 2.76 (d, $J = 16.6$ Hz, 0.5H, CH), 2.77 (d, $J = 16.8$ Hz, 0.5H, CH), 4.32 (m, 0.5H, CH), 4.42 (m, 0.5H, CH), 6.51 (s, 0.5H, CH), 6.53 (s, 0.5H, CH), 7.51-7.63 (m, 2H, CH_{ar}), 7.83-7.95 (m, 5H, $4CH_{ar}+1CH$), 7.84 (s, 1H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 20.0, 20.1, 27.7, 28.1, 34.7, 35.4, 75.5 (2C), 87.1 (2C), 110.7, 111.0, 111.7, 111.8, 119.3, 120.2, 124.68, 124.72, 127.0 (2C), 127.9 (2C), 128.5 (2C), 129.0 (2C), 130.0 (2C), 132.3 (2C), 132.4 (2C), 133.85, 133.94, 136.1 (2C), 142.0, 142.3, 160.3 (2C), 168.3, 168.4, 169.7, 170.6, 188.86, 188.9, 189.6, 190.2.

MS (IC) : 387 $[M + H]^+$.

229 : 6,9a-dimethyl-3-(phenylacetyl)-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{21}H_{18}O_5$ **2 diastereomers 50/50**.

$M = 350.36 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.49$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Red oil

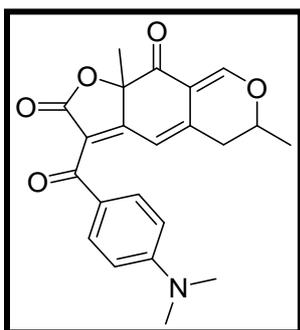
Yield = 27 %.

Form the alcool **112** and the dioxinone **215**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 45 mg (27%) of the analog **29**. One of the two diastereomer was obtained pure (unstability of compound impede its complete characterisation).

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.48 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.65 (s, 3H, CH_3), 1.79 (s, 1.2H, CH_3), 2.69 (dd, $J = 1.3$ et 16.8 Hz, 1H, CH), 2.79 (dd, $J = 3.8$ et 16.8 Hz, 1H, CH), 4.30 (s, 3H, CH_3), 4.33 (m, 1H, CH), 6.98 (s, 1H, CH), 7.21-7.33 (m, 5H, CH_{ar}), 7.81 (s, 1H, CH_{ar}).

MS (IC) : $m/z = 351$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

231 : 3-[4-(dimethylamino)benzoyl]-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ **2 diastereomers 60/40**

$M = 379.41$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.35$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Yellow oil

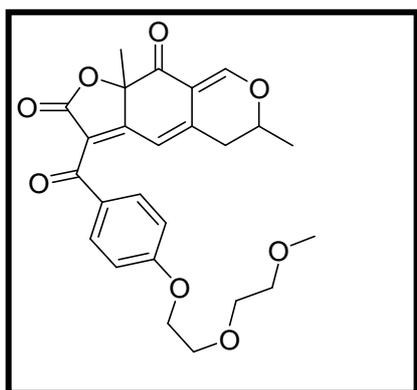
Yield = 15 %.

Form the alcohol **112** and the dioxinone **216**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 8 mg (15%) of the analog **231**. One of the two diastereomer was obtained pure.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.48 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.73 (s, 3H, CH_3), 2.62 (dd, $J = 10.8$ et 17.7 Hz, 1H, CH_2), 2.75 (dd, $J = 3.3$ et 17.5 Hz, 1H, CH_2), 3.1 (s, 6H, 2x CH_3), 4.31 (m, 1H, CH), 6.44 (s, 1H, CH), 6.64 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.78 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.79 (s, 1H, CH).

MS (IC) : $m/z = 380$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

233 : 3-{4-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]benzoyl}-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_8$

$M = 454.47$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.38$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow oil

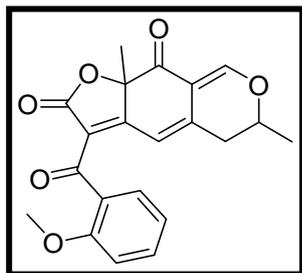
Yield = 15 %.

Form the alcohol **112** and the dioxinone **217**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 5 mg (15%) of the analog **233**. One of the two diastereomer was obtained pure.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.47 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.74 (s, 3H, CH_3), 2.67 (dd, $J = 10.6$ et 16.4 Hz, 1H, CH), 2.78 (dd, $J = 3.8$ et 16.5 Hz, 1H, CH), 3.39 (s, 3H, CH_3), 3.57 (dd, $J = 2.8$ Hz et 4.9 Hz, 2H, CH_2), 3.71 (t, $J = 2.9$ Hz et 4.9 Hz, 2H, CH_2), 3.87 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2), 4.21 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2), 4.31 (m, 1H, CH), 6.46 (s, 1H, CH), 6.94 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.82 (s, 1H, CH), 7.83 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 19.0, 26.5, 34.3, 58.1, 66.6, 68.5, 69.8, 70.9, 74.3, 85.8, 109.9, 110.5, 113.3, 119.5, 128.4, 131.2, 140.2, 158.9, 162.5, 167.4, 167.7, 186.1, 188.5.

235 : 3-(2-methoxybenzoyl)-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$ **2 diastereomers 70/30**

$M = 366.36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.66$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder.

Yield = 27 %.

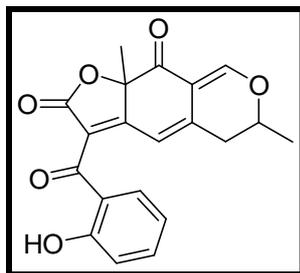
Form the alcohol **112** and the dioxinone **218**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 83 mg (27%) of the analog **235**. One of the two diastereomer was obtained pure.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.48 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.70 (s, 3H, CH_3), 2.69 (dd, $J = 10.9$ et 16.2 Hz, 1H, CH), 2.83 (dd, $J = 3.2$ et 16.4 Hz, 1H, CH), 3.76 (s, 3H, CH_3), 4.35 (m, 1H, CH), 6.75 (s, 1H, CH), 6.92 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.47 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.54 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.80 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 20.3, 27.7, 35.7, 56.0, 75.7, 86.5, 111.7, 111.98, 112.03, 121.2, 122.0, 128.2, 130.6, 134.6, 141.6, 159.3, 159.9, 167.3, 168.3, 189.0, 190.2.

MS (IC) : $m/z = 367$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

237 : 3-(2-hydroxybenzoyl)-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{20}H_{16}O_6$ **2 diastereomers 60/40**

$M = 352.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.36$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow cristal

Yield = 85 %.

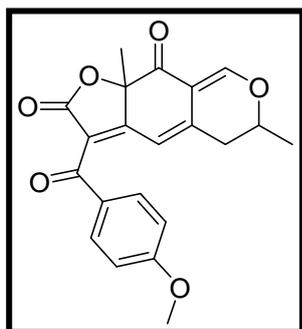
In a RB flask flushed with Argon, 100 mg (0.80 mmol, 8 eq) of $AlCl_3$ was added at RT to a 10 mL CH_2Cl_2 solution of 36 mg (0.10 mmol, 1 eq) of compound **235**. The mixture was then heated at solvent reflux. After 16h, the reaction was quenched at RT with HCl 1N and extracted with 20 mL of EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layer was then dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The desired product was finally precipitate using a 1:10 mixture of CH_2Cl_2 /pentane (first CH_2Cl_2 and then pentane) to give 30 mg (85%) of the analog **237**. *One of the two diastereomer was obtained pure.*

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.49 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.77 (s, 3H, CH_3), 2.69 (dd, $J = 10.6$ et 16.4 Hz, 1H, CH), 2.79 (dd, $J = 3.6$ et 16.8 Hz, 1H, CH), 4.35 (m, 1H, CH), 6.35 (s, 1H, CH), 6.91 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.53 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.61 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.85 (s, 1H, CH), 11.82 (s, 1H, OH).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 20.2, 27.7, 35.5, 75.7, 87.3, 110.3, 111.5, 118.5, 119.4, 119.5, 119.9, 132.8, 137.9, 142.1, 160.7, 163.3, 168.0, 168.3, 189.3, 193.2.

MS (IC) : $m/z = 353$ [M + H] $^+$.

239 : 3-(4-methoxybenzoyl)-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{21}H_{18}O_6$ **2 diastereomers 30/70**

$M = 366.36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.61$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder.

Yield = 66 %.

Form the alcohol **112** and the dioxinone **219**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 24 mg (66%) of the analog **239**.

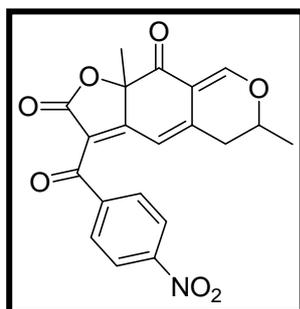
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.46 (d, $J = 6.4$ Hz, 2.1H, CH_3), 1.47 (d, $J = 6.4$ Hz, 0.9H, CH_3), 1.74 (s, 2.1H, CH_3), 1.74 (s, 0.9H, CH_3), 2.56 (ddd, $J = 1.8 - 11.1$ et 17.0 Hz, 0.3H, CH), 2.67 (ddd, $J = 1.1 - 10.6$ et 16.4 Hz, 0.7H, CH), 2.76 (dd, $J = 3.4$ et 16.7 Hz, 1H, CH), 3.87 (s, 3H, CH_3), 4.35 (m, 0.7H, CH), 4.42 (m, 0.3H, CH), 6.48 (s, 1H, CH), 6.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.81 (s, 0.7H, CH), 7.84 (s, 0.3H, CH), 7.84 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 20.1 (2C), 27.6, 28.0, 34.7, 35.5, 55.7 (2C), 75.5 (2C), 87.0 (2C), 110.7, 111.0, 111.7, 111.8, 113.8 (2C), 113.9 (2C), 119.72, 120.6, 129.4, 129.5, 132.3 (4C), 141.4, 141.7, 160.07, 160.12, 164.40, 164.44, 168.4, 168.6, 168.9, 169.9, 187.2, 187.3, 189.6, 190.3.

MS (ESI, positive mode) : 367 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (40), 750 $[2\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ (100), 755 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ (40), 771 $[2\text{M} + \text{K}]^+$ (90).

MS (IC) : $m/z = 367$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

241 : 6,9a-dimethyl-3-(4-nitrobenzoyl)-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NO}_7$ **2 diastereomers 50/50**

$\text{M} = 381.34$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\text{R}_f = 0.31$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Yellow powder.

Yield = 51 %.

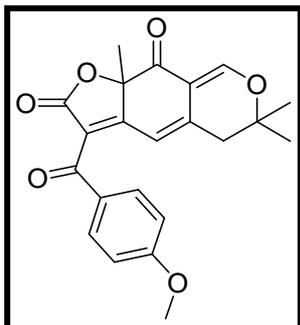
Form the alcohol **112** and the dioxinone **220**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 44 mg (51%) of the analog **241**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.51 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.77 (s, 1.5H, CH_3), 1.83 (s, 1.5H, CH_3), 2.64-2.90 (m, 2H, CH_3), 4.40 (m, 0.5H, CH), 4.46 (m, 0.5H, CH), 6.75 (s, 1H, CH), 7.87 (s, 1H, CH), 7.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.94 (s, 1H, CH_{ar}), 8.28 (s, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 20.1, 20.2, 28.2, 28.6, 34.9, 35.7, 75.8, 75.9, 87.4 (2C), 111.0, 111.4, 111.6, 111.9, 117.1, 118.0, 123.61, 123.64, 130.60, 130.62, 141.6, 141.8, 144.3, 144.9, 150.47, 150.51, 161.3, 161.5, 168.1, 168.2, 173.2, 174.2, 188.2, 188.3, 189.4, 190.1.

MS (IC) : $m/z = 382$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

243 : 3-(4-methoxybenzoyl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{22}H_{20}O_6$

$M = 380.39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.52$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder.

Yield = 86 %.

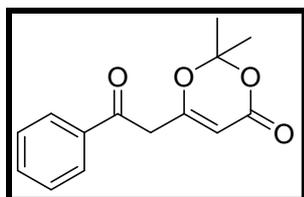
From the alcohol **164** and the dioxinone **219**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D to give 161 mg (86%) of the analog **243**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.36 (s, 3H, CH_3), 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.76 (s, 3H, CH_3), 2.57 (q, $J = 16.6$ Hz, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, CH_3), 6.47 (s, 1H, CH), 6.91 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.74 (s, 1H, CH), 7.82 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, 2 x CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 26.2, 26.4, 27.9, 39.8, 55.7, 81.2, 87.0, 110.6, 111.4, 113.8, 119.9, 129.4, 132.3, 141.4, 158.8, 164.4, 168.5, 169.3, 187.2, 189.8.

MS (IC) : 381 $[M + H]^+$.

246 : 2,2-dimethyl-6-(2-oxo-2-phenylethyl)-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{14}H_{14}O_4$

$M = 246.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.64$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White cristal. $M_p = 114^\circ\text{C}$.

Yield = 47 %.

In a RB flask flushed with Argon, 16.2 mL (40.4 mmol, 2.0 eq) of *n*-BuLi (1.2M in hexane) were added at -78°C to a 200 mL THF solution containing 5.60 mL (40.0 mmol, 2 eq) of DIPA. After 30 min at 0°C , the media was recooled to -78°C and 5.3 mL (40.0 mmol, 2 eq) of dioxinone **181** were added. After 30 min at -78°C , 2.30 mL (20.0 mmol, 1 eq) of benzoyl chloride were finally added at this temperature. After 2h at -40°C , the reaction was quenched at 0°C with HCl 1N and extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were then dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The desired product was finally precipitate using a 1:10 mixture of Et_2O /pentane (first Et_2O and then pentane) to give 2.28 g (47%) of compound **246**.

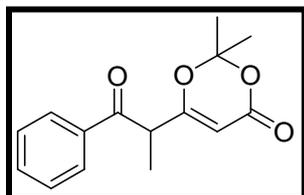
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.70 (s, 6H, CH_3), 3.90 (s, 2H, CH_2), 5.42 (s, 1H, CH), 7.50 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.92 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 25.2, 43.6, 70.8, 97.2, 107.6, 128.6, 128.2, 134.3, 136.1, 165.5, 193.4.

IR : 3098, 2999, 2962, 2930, 1716, 1687, 1644, 1392, 1377, 1222, 1019, 822.

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 247$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

247 : 2,2-dimethyl-6-(1-methyl-2-oxo-2-phenylethyl)-4 -1,3-dioxin-4H-one



$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$

$M = 260.29$ g.mol $^{-1}$

$R_f = 0.72$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Uncolored oil.

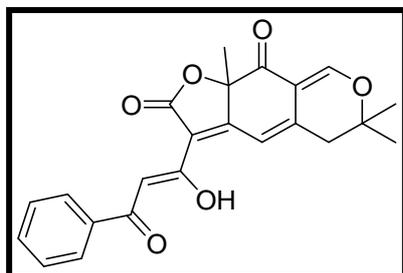
Yield = 100 %.

In a RB flask flushed with Argon, 2.49 g (18 mmol, 5 eq) of K_2CO_3 and was added at RT to a 20 mL acetone solution of 884 mg (3.6 mmol, 1 eq) of compound **247**. 0.45 mL (7.2 mmol, 2 eq) of MeI was then added dropwise at RT. After 2h at reflux, the reaction was quenched at RT with H_2O and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$, dried over MgSO_4 , and concentrated under vacuum. 967 mg (100%) of compound **247** was then obtained without further purification.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.44 (d, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 1.51 (s, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H, CH), 5.39 (s, 1H, CH), 7.46 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.58 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, CH), 7.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 15.6, 24.6, 25.3, 45.9, 95.1, 107.2, 128.8, 129.1, 134.1, 135.9, 161.2, 170.2, 196.6.

248 : 3-[(1Z)-1-hydroxy-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{23}H_{20}O_6$

$M = 392.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.59$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder.

Yield = 39 %.

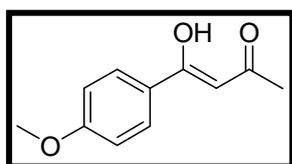
Form the alcohol **164** and the silylated dioxinone **251**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D to give 62 mg (39%) of analog **248**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.40 (s, 3H, CH_3), 1.46 (s, 3H, CH_3), 1.73 (s, 3H, CH_3), 2.71 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, CH), 2.78 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, CH), 7.11 (s, 1H, CH), 7.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.50 (s, 1H, CH), 7.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.76 (s, 1H, CH), 8.00 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 26.2, 26.5, 28.0, 40.1, 81.4, 86.5, 97.3, 110.7, 113.5, 114.6, 127.9, 128.8, 133.2, 135.2, 141.4, 159.0, 168.1, 168.3, 174.4, 189.8, 190.5.

MS (ESI, positive mode) : 393 $[M + H]^+$, 494 $[M + Et_3N + H]^+$, 495 $[M + Et_3N + 2H]^+$.

250b: (Z)-4-hydroxy-4-phenylbut-3-en-2-one:



$C_{11}H_{12}O_3$

$M = 192.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.85$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

White powder.

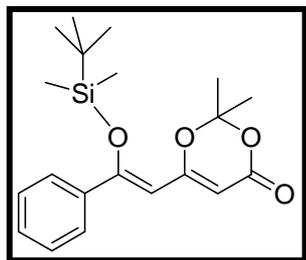
Yield = 32 %.

Isolated along with the compound **258** to give 21 mg (32%) of the compound **250b**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2.16 (s, 3H, CH_3), 3.85 (s, 3H, CH_3), 6.11 (s, 1H, CH), 6.93 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 25.6, 55.8, 96.1, 114.2, 114.3, 127.8, 129.4, 131.4, 163.4, 184.4, 191.9.

251 : 6-((Z)-2-[[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy]-2-phenylvinyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{20}H_{28}O_4Si$

$M = 360.52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.82$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Yellow oil.

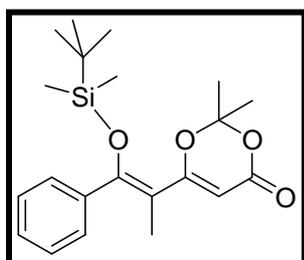
Yield = 82 %.

In a RB flask flushed with Argon, 2.0 mL (25 mmol, 3 eq) of diisopropylethylamine (DIEA) and 1.3 mL (1.5 mmol, 1.5 eq) of *t*-butyldimethylsilyl triflate (TBDMSOTf) were added at RT to a 30 mL CH_2Cl_2 solution of 930 mg (3.8 mmol, 1 eq) of compound **247**. After 2h, the reaction was quenched at RT with $NaHCO_{3sat}$ and extracted with 60 mL of EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with NH_4Cl_{sat} and then dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The crude product (100% conversion) was chromatographed on silicagel with a (9:1) mixture of Cy/EtOAc to give 1.120 g (82%) of compound **251** (**Unstability on silica gel**).

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : -0.06 (s, 6H, CH_3), 0.97 (s, 9H, CH_3), 1.69 (s, 6H, CH_3), 5.41 (s, 1H, CH), 5.85 (s, 1H, CH), 7.30-7.36 (m, 3H, CH_{ar}), 7.44-7.47 (m, 2H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : -3.5, 18.4, 25.1, 25.9, 93.7, 103.5, 105.6, 126.8, 128.4, 129.9, 138.5, 161.8, 162.4, 163.6.

253 : 6-((Z)-2-[[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy]-1-methyl-2-phenylvinyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{21}H_{30}O_4Si$

$M = 374.55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.88$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

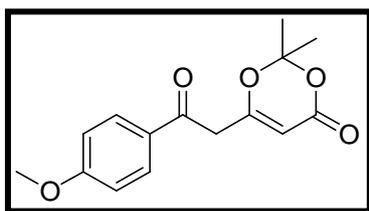
Yellow oil

Yield = 62 %.

Similar procedure than for the synthesis of silylated dioxinone **251** (starting from the dioxinone **247**) to give 700 mg (62%) of the silylated dioxinone **253** (Unstability on silicagel).

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.0 (s, 6H, 2 x CH_3), 1.12 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.51 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.15 (s, 3H, CH_3), 5.30 (s, 1H, CH), 7.40-7.53 (m, 5H, 5 x CH_{ar}).

254 : 6-[2-(4-methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$

$M = 276.28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.53$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Yellow powder. $M_p = 82^\circ\text{C}$.

Yield = 41 %.

Similar procedure than for the synthesis of dioxinone **246** (starting from the *p*-methoxybenzoyl chloride) to give 1.24 g (41%) of compound **254**.

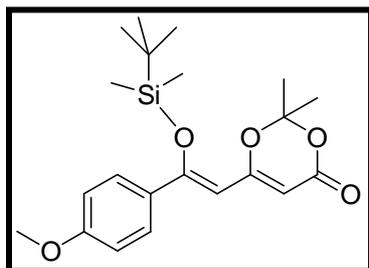
$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.70 (s, 6H, CH_3), 3.90 (s, 2H, CH_2), 5.42 (s, 1H, CH), 7.50 (t, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H, CH_{ar}), 7.63 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H, CH_{ar}), 7.92 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 25.2, 43.6, 70.8, 97.2, 107.6, 128.6, 128.2, 134.3, 136.1, 165.5, 193.4.

IR : 3000, 2842, 1728, 1682, 1639, 1601, 1575, 1376, 1273, 1173, 1018, 838 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 277$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (10), 360 [$\text{M} + 2\text{Na} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}$] $^+$ (100).

256 : 6-[(Z)-2-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-(4-methoxyphenyl)vinyl]-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Si}$

$M = 390.55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.48$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

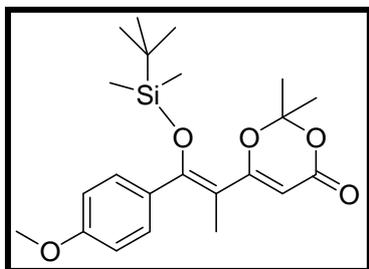
Yield = 82 %.

Similar procedure than for the synthesis of silylated dioxinone **251** (starting from the dioxinone **254**) to give 463 mg (82 %) of silylated dioxinone **256** (Unstability on silicagel).

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : -0.04 (s, 6H, CH_3), 0.99 (s, 9H, CH_3), 1.7 (s, 6H, CH_3), 3.82 (s, 3H, CH_3), 5.38 (s, 1H, CH), 5.83 (s, 1H, CH), 6.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.42 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : -3.7, 18.2, 24.9, 25.7, 55.2, 93.0, 102.0, 105.3, 113.5, 128.1, 130.6, 160.8, 161.5, 162.4, 163.7.

257 : 6-[(Z)-2-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-(4-methoxyphenyl)-1-methylvinyl]-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Si}$

$M = 404.57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.68$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

Yellow oil

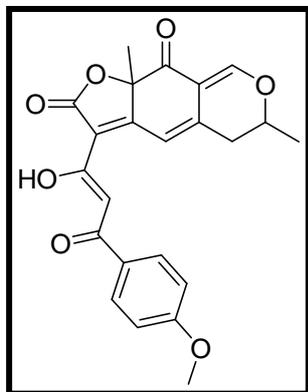
Yield = 98 %.

Similar procedure than for the synthesis of silylated dioxinone **251** (starting from the dioxinone **255**) to give 235 mg (98 %) of compound **257**. (Purified on a short pad of silicagel using a (5:5) mixture of Cy/EtOAc as eluant.)

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : -0.22 (s, 6H, CH_3), 0.89 (s, 9H, CH_3), 1.35 (s, 6H, CH_3), 1.88 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 3H, CH_3), 5.00 (s, 1H, CH), 6.79 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : -3.9, 13.7, 18.3, 24.6, 25.7, 55.3, 93.2, 105.3, 110.0, 113.2, 130.3, 130.9, 157.1, 160.0, 162.4, 168.4.

258 : 3-[(1Z)-1-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-6,9a-dimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{23}H_{20}O_7$ **2 diastereoisomers 60/40**

$M = 408.40 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.59$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder.

Yield = 12 %.

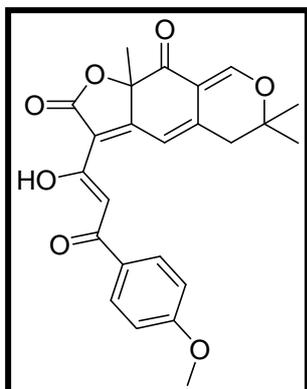
Form the alcohol **112** and the dioxinone **256**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D (without molecular sieves) to give 17 mg (12%) of the analog **258**.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.49 (d, $J = 6.4$ Hz, 1.8H, CH_3), 1.50 (d, $J = 6.4$ Hz, 1.2H, CH_3), 1.69 (s, 1.2H, CH_3), 1.76 (s, 1.8H, CH_3), 2.65 (ddd, $J = 1.7 - 10.73$ et 17.0 Hz, 0.6H, CH), 2.73 (ddd, $J = 1.5 - 11.1$ et 16.8 Hz, 0.4H, CH), 2.87 (dd, $J = 2.8$ et 17.1 Hz, 1H, CH), 3.88 (s, 3H, CH_3), 4.35 (m, 0.4H, CH), 4.45 (m, 0.6H, CH), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.07 (s, 0.4H, CH), 7.09 (s, 0.6H, CH), 7.44 (s, 1H, CH), 7.81 (s, 0.4H, CH), 7.84 (s, 0.6H, CH), 8.00 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 20.2, 20.4, 27.9, 28.3, 35.1, 35.9, 55.9 (2C), 75.79, 75.84, 86.7 (2C), 97.1, 97.14, 111.9, 112.0, 113.0, 113.4, 114.3 (4C), 114.6, 115.4, 128.8 (2C), 130.41 (2C), 130.44 (2C), 141.1, 141.4, 160.1, 160.2, 164.09, 164.13, 166.9, 167.9, 168.6, 168.7, 173.0 (2C), 189.9, 190.5, 190.57, 190.64.

MS (ESI, positive mode) : 409 $[M + H]^+$, 510 $[M + Et_3N + H]^+$.

259 : 3-[(1Z)-1-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{24}H_{22}O_7$

$M = 422.43 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.59$ (Cyclohexane/EtOAc– 50/50)

Yellow powder.

Yield = 15 %.

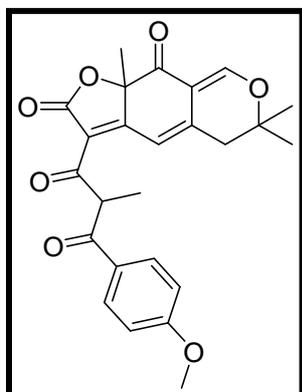
Form the alcohol **164** and the dioxinone **256**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D to give 32 mg (15%) of the analog **259**.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1.39 (s, 3H, CH_3), 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.72 (s, 3H, CH_3), 2.73 (d, $J = 6,78$ Hz, 2H, CH_2), 3.88 (s, 3H, CH_3), 6.94 (d, $J = 9,03$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.10 (s, 1H, CH), 7.45 (s, 1H, CH), 7.75 (s, 1H, CH), 7.99 (d, $J = 8,85$ Hz, 2H, CH_{ar}).

^{13}C RMN (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 26.2, 26.6, 28.0, 40.1, 55.7, 81.3, 86.5, 96.9, 110.7, 113.6, 114.1, 114.7, 128.6, 130.2, 140.9, 158.8, 163.9, 167.3, 168.5, 172.6, 189.9, 190.4.

MS (ESI, positive mode) : 423 $[M + H]^+$, 524 $[M + Et_3N + H]^+$.

260 : 3-[3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-3-oxopropanoyl]-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$C_{25}H_{24}O_7$

$M = 436.45 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.29$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Yellow powder.

Yield = 25 %.

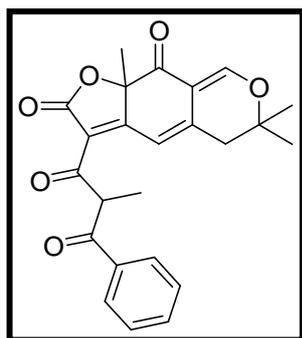
Form the alcohol **164** and the dioxinone **257**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D to give 41 mg (25%) of the analog **260**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.40 (m, 9H, 3 x CH_3), 1.69 (s, 3H, CH_3), 2.70 (d, $J = 3.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, CH_3), 5.47 (q, $J = 7.0$ et 13.7 Hz, 1H, CH), 6.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}), 7.09 (s, 1H, CH), 7.76 (s, 1H, CH), 7.93 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 13.5, 26.3, 26.6, 28.4, 40.0, 52.3, 55.6, 81.6, 86.6, 110.8, 112.8, 114.1, 115.9, 128.7, 131.2, 144.4, 159.7, 163.8, 169.1, 172.9, 189.5, 193.7, 197.1.

MS (ESI, positive mode) : 454 $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$, 538 $[\text{M} + \text{Et}_3\text{N} + \text{H}]^+$, 539 $[\text{M} + \text{Et}_3\text{N} + \text{H}]^+$.

261 : 6,6,9a-trimethyl-3-(2-methyl-3-oxo-3-phenylpropanoyl)-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione



$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_6$

$\text{M} = 406.43 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.48$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Yellow powder.

Yield = 29 %.

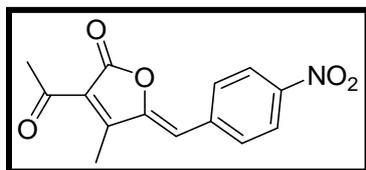
Form the alcohol **164** and the dioxinone **253**, the reaction was performed as detailed in the general procedure D to give 45 mg (29%) of the analog **261**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.40-1.45 (m, 9H, CH_3), 1.69 (d, $J = 3.21$ Hz, 3H, CH_3), 2.72 (s, 2H, CH_2), 5.45-5.61 (m, 1H, CH), 7.09 (s, 1H, CH), 7.45-7.57 (m, 3H, CH_{ar}), 7.76 (s, 1H, CH_{ar}), 7.95-800 (m, 2H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 13.0, 13.3, 26.3, 26.4, 26.5, 28.3, 28.4, 40.0, 52.6, 52.7, 81.58, 81.61, 86.7, 86.8, 110.6, 110.7, 112.8, 113.0, 115.6, 115.9, 128.9, 133.4, 135.7, 135.8, 144.1, 144.6, 159.6, 159.8, 169.15, 169.21, 172.7, 173.1, 189.5, 189.7, 193.5, 193.6, 198.7, 199.2.

MS (ESI, positive mode) : 424 $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$, 508 $[\text{M} + \text{Et}_3\text{N} + \text{H}]^+$, 509 $[\text{M} + \text{Et}_3\text{N} + 2\text{H}]^+$.

271 : (5Z)-3-acetyl-4-methyl-5-(4-nitrobenzylidene)furan-2(5H)-one



$C_{14}H_{11}NO_5$

$M = 273.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.52$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Yellow powder. $M_p = 200^\circ\text{C}$.

Yield = 15 %.

In a RB flask flushed with Argon, 56 μL (0.4 mmol, 0.2 eq) of Et_3N , 0.29 mL (2 mmol, 1 eq) of dioxinone **181** were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.12 mL (2 mmol, 1 eq) of hydroxyacetone. 0.3 g of *p*-nitrobenzaldehyde was added and the mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a gradient (from 90:10 to 70:30) mixture of Cy/EtOAc to give 82 mg (15 %) of compound **271**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.61 (s, 3H, CH_3), 6.42 (s, 2H, CH_2), 7.98 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 2 x CH_{ar}), 8.24 (d, 8.9 Hz, 2H, CH_{ar}).

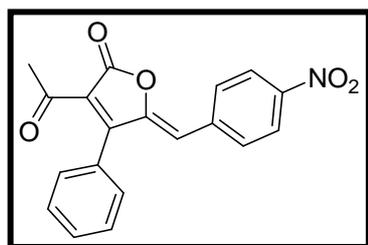
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 12.2, 30.8, 112.1, 123.4, 124.4, 132.0, 138.7, 148.0, 150.4, 161.6, 166.9, 194.5.

IR : 1171, 1683, 1579, 1513, 1335, 986 cm^{-1} .

MS (ESI, negative mode) : $m/z = 272$ $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Analysis calculated for $C_{14}H_{11}NO_5$: C, 61.54 ; H, 4.06. Obtained : C, 61.56 ; H, 4.07.

272 : (5Z)-3-acetyl-5-(4-nitrobenzylidene)-4-phenylfuran-2(5H)-one



$C_{19}H_{13}NO_5$

$M = 335.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.55$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Yellow powder. $M_p = 146^\circ\text{C}$.

Yield = 30 %

In a RB flask flushed with Argon, 14 μL (0.1 mmol, 0.05 eq) of Et_3N , 0.58 mL (2 mmol, 2 eq) of dioxinone **181** were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.12 mL (2 mmol, 1 eq) of hydroxyacetone. 0.3 g of *p*-nitrobenzaldehyde was added and the mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a (75:25) mixture of Cy/EtOAc to give 200 mg (30 %) of compound **272**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 2.50 (s, 3H, CH_3), 6.14 (s, 1H, CH), 7.43 (d, $J = 9.42$ Hz, 1H, 2 x CH_{ar}), 7.51-7.58 (m, 3H, 3 x CH_{ar}), 7.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2 x CH_{ar}), 8.24 (d, 8.9 Hz, 2H, 2 x CH_{ar}).

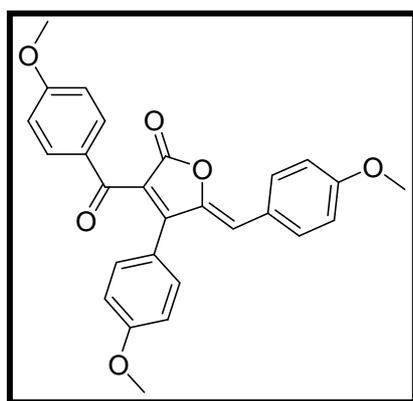
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 30.8, 115.8, 123.8, 124.3, 128.6, 129.0, 129.4, 131.2, 132.0, 138.8, 148.0, 150.2, 160.1, 166.2, 193.1.

IR : 1775, 1681, 1517, 1342, 978, 830, 730, 606 cm^{-1} .

MS (ESI, negative mode) : $m/z = 334$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$.

Analysis calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NO}_5$: C, 68.06 ; H, 3.91. **Obtained** : C, 67.68 ; H, 3.93.

275 : (5Z)-3-(4-methoxybenzoyl)-5-(4-methoxybenzylidene)-4-(4-methoxyphenyl)furan-2(5H)-one



$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_6$

$M = 442.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.64$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Red oil.

Yield = 41 %.

In a RB flask flushed with Argon, 140 μL (0.1 mmol, 0.05 eq) of Et_3N , 176 mg (0.75 mmol, 1.5 eq) of compound **219** were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 83 mg (0.5 mmol, 1 eq) of hydroxyacetone **270**. 60 μL (1 mmol, 1 eq) of *p*-methoxybenzaldehyde was added and the mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate.

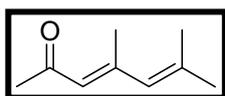
The combined organic layers were then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a (80:20) mixture of Cy/EtOAc to give 90 mg (41 %) of compound **190**.

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 3.71 (s, 3H, CH₃), 6.15 (s, 1H, CH), 6.74 (d, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 6.80 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 6.84 (d, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 7.26 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH₂), 6.71 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH₂).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 55.8, 55.8, 55.9, 114.2, 114.7, 114.9, 117.4, 121.8, 123.1, 126.1, 129.6, 131.2, 132.5, 133.4, 146.1, 157.4, 161.4, 161.7, 164.6, 167.2, 188.7.

IR : 2934, 2840, 1755, 1655, 1639, 1600, 1511, 1460, 1425, 1377, 1305, 1259, 1175, 1028, 973, 919, 838, 732 cm⁻¹.

280 : (3E)-4,6-dimethylhepta-3,5-dien-2-one



C₉H₁₄O

M = 138.21 g.mol⁻¹

R_f = 0.85 (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Uncolored oil

Yield = 32 %

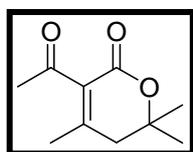
In a RB flask flushed with Argon, 0.30 mL (2 mmol, 0.1 eq) of 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) and 0.42 mL (3 mmol, 1.5 eq) of 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one (95%) were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.26 mL (1 mmol, 1 eq) of 4-methyl-4-hydroxypentan-2-one. The mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with NH₄Cl_{sat} and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a gradient (from 95:5 to 85:15) mixture of Cy/EtOAc to give 88 mg (32 %) of compound **280**.

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.83 (s, 3H, CH₃), 1.85 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 2H, 2 x CH₃), 5.73 (s, 1H, CH), 6.05 (s, 1H, CH).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 20.20, 20.41, 27.6, 32.3, 125.3, 129.1, 139.7, 153.0, 199.2.

IR : 2926, 2854, 1741, 1126 cm⁻¹.

284 : 3-acetyl-4,6,6-trimethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one



$C_{10}H_{14}O_3$

$M = 182.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.36$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

White powder. $M_p = 48^\circ\text{C}$.

Yield = 95 %.

In a RB flask flushed with Argon, 33 mg (0.1 mmol, 0.1 eq) of cesium carbonate, 12 mg (0.1 mmol, 0.1 eq) of DMAP and 0.22 mL (1.5 mmol, 1.5 eq) of 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one (95%) were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.13 mL (1 mmol, 1 eq) of 4-methyl-4-hydroxypentan-2-one. The mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 173 mg (95 %) of compound **284** was obtained without further purification.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.40 (s, 6H, 2 x CH_3), 1.98 (s, 3H, CH_3), 2.37 (s, 3H, CH_3), 2.42 (s, 2H, CH_2).

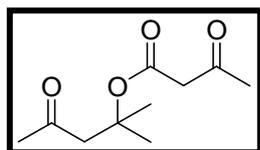
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 21.5, 27.6, 31.4, 42.5, 79.2, 129.7, 155.8, 162.8, 200.8.

IR : 1689, 1362, 1319, 1183, 1125 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 189$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

Analysis calculated for $C_{10}H_{14}O_3$: C, 65.91 ; H, 7.74. Obtained : C, 65.54 ; H, 7.82.

285 : 1,1-dimethyl-3-oxobutyl 3-oxobutanoate



$C_{10}H_{16}O_4$

$M = 200.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.53$ (Cyclohexane/EtOAc– 60/40)

Uncolored oil

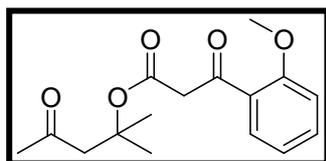
Yield = 62 %

In a RB flask flushed with Argon, 140 μL (1 mmol, 0.5 eq) of Et_3N , 0.42 mL (3 mmol, 1.5 eq) of 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one (95%) were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.28 mL (2 mmol, 1 eq) of 4-methyl-4-hydroxypentan-2-one. The mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a mixture (80:20) of Cy/EtOAc to give 246 mg (62 %) of compound **285**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.44 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.16 (s, 3H, CH_3), 2.95 (s, 2H, CH_2), 3.3 (s, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 26.5, 30.3, 31.9, 51.4, 52.0, 81.8, 166.6, 201.1, 205.8.

286 : 1,1-dimethyl-3-oxobutyl 3-(2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate



$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5$

$M = 292.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.45$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Unocolored oil.

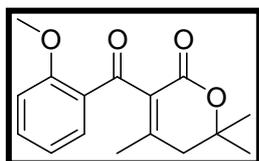
Yield = 100 %.

In a RB flask flushed with Argon, 35 μL (0.25 mmol, 0.5 eq) of Et_3N , 117 mg (0.68 mmol, 1.5 eq) of compound **218** were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 0.63 mL (0.45 mmol, 1 eq) of 4-methyl-4-hydroxypentan-2-one. The mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 130 mg (100%) of compound **286** without further purification.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.47 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.90 (s, 2H, CH_2), 3.87 (s, 3H, CH_3), 3.88 (s, 2H, CH_2), 6.93-7.01 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.48 (td, $J = 1.7$ et 7.7 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.82 (d, $J = 1.71$ et 7.7 Hz, 1H, CH_{ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 26.3, 32.0, 52.0, 52.8, 55.6, 81.6, 111.7, 121.0, 126.5, 131.2, 134.9, 159.3, 167.6, 193.5, 206.2.

287 : 3-(2-methoxybenzoyl)-4,6,6-trimethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one



$C_{16}H_{18}O_4$

$M = 274.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.31$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

White powder. $M_p = 97^\circ\text{C}$.

Yield = 80 %.

In a RB flask flushed with Argon, 77 mg (1.5 mmol, 3 eq) of MeONa were added at RT to a 10 mL ethanol solution containing 130 mg (0.45 mmol, 1 eq) of the compound **286**. The mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. 97 mg (80%) of compound **287** was obtained without further purification.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.51 (s, 6H, 2 x CH_3), 1.96 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, CH_3), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_{ar}), 6.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.43 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH_{ar}), 7.83 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH_{ar}).

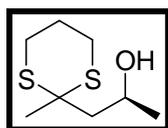
$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 21.4, 27.9, 42.5, 56.2, 79.2, 112.1, 121.0, 127.7, 130.9, 131.4, 134.8, 152.7, 159.2, 162.7, 192.3.

IR : 2980, 2938, 1704, 1652, 1596, 1486, 1436, 1381, 1362, 1319, 1246, 1182, 1124, 1098, 1051, 1018, 969, 878, 764 cm^{-1} .

MS (ESI, positive mode) : $m/z = 275$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (100). 358 [$\text{M} + 2\text{Na} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}$] $^+$ (85).

Analysis calculated for $C_{16}H_{18}O_4$: C, 70.06 ; H, 6.61. **Obtained** : C, 69.97 ; H, 6.69.

288 : (2R)-1-(2-methyl-1,3-dithian-2-yl)propan-2-ol



$C_8H_{16}OS_2$

$M = 192.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.32$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

Uncolored oil

Yield = 96 %.

$\alpha_D = 48$ (C = 1.2 g/100 mL)

In a RB flask flushed with Argon, 10.0 mL (20.8 mmol, 2.1 eq) of *n*-butyllithium (*n*-BuLi, 2.08M in hexane) were added at -78°C to a 250 mL THF solution containing 2.2 mL (18.4 mmol, 1.8 eq) of 2-methyl-1,3-dithiane. After 2 h at -40°C, the media was warm to RT for 10 min. 0.7 mL (10.0 mmol, 1 eq) of *S*-propylene oxide were finally added at -78°C. After 1h at -60°C, the mixture was allowed to warm to RT over 2h. the reaction was finally quenched by 10 mL NH₄Cl_{sat} and extracted twice with EtOAc. The organic layer was then washed with NaCl_{sat}. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a (80:20) mixture of Cy/EtOAc to give 1.885 g (96%) of compound **288**.

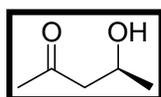
¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.19 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃), 1.65 (s, 3H, CH₃), 1.83 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH), 1.84-1.95 (m, 1H, CH), 2.0-2.14 (m, 1H, CH), 2.41 (dd, *J* = 9.6 et 15.0 Hz, CH), 2.70-2.87 (m, 2H, CH₂), 2.94-3.11 (m, 2H, CH₂), 3.53 (s, 1H, OH), 3.94-4.11 (m, 1H, CH).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ ppm : 24.2, 24.9, 26.8, 27.0, 28.7, 47.9, 49.1, 65.3.

IR : 3451, 2963, 2934, 2906, 1126 cm⁻¹.

Chiral HPLC : hept/iPrOH 95/5. 1mL.min⁻¹ (chiracel) r.t. = 7.19 min.

289 : (4*R*)-4-hydroxypentan-2-one



C₅H₁₀O₂

M = 102.13 g.mol⁻¹

R_f = 0.45 (Et₂O)

Uncolored oil

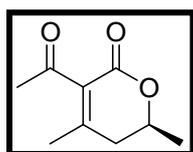
Yield = 100 %.

In a RB flask, 864 mg (3.2 mmol, 2.5 eq) of mercury chloride and 437 mg (4.4 mmol, 3.5 eq) of calcium carbonate were added at RT to a 62 mL mixture of CH₃CN/H₂O (8:2) solution containing 240 mg (1.25 mmol, 1 eq) of compound **292**. After 2 h at 65°C, the reaction was quenched by 100 mL H₂O and extracted twice with Et₂O. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then filtrate on silica gel using Et₂O as eluant to give 128 mg (100%) of coumpound **289**. This compound has shown an unstability. It was then engaged on the following reaction during the day of its synthesis.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.17 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 2.16 (s, 3H, CH_3), 2.54 (dd, $J = 8.5$ et 17.7 Hz, 1H, CH), 2.62 (dd, $J = 3.4$ et 17.7 Hz, 1H, CH), 3.47 (s, 1H, OH), 4.18-4.24 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 22.7, 31.1, 51.8, 64.3.

290 : 3-acetyl-4,6-dimethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one



$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$ e.r. **96/4**

$M = 168.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.32$ (Cyclohexane/EtOAc– 70/30)

White powder

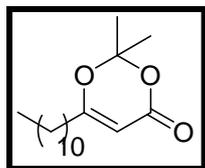
Yield = 80 %.

In a RB flask flushed with Argon, 0.21 mL (1.6 mmol, 2.5 eq) of 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 128 mg (1.25 mmol, 1 eq) of compound **293**. After 2 h at 110°C, the reaction was quenched by 10 mL H_2O and the product extracted twice with Et_2O . The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. A complete conversion was then observed on the NMR and an analysis on chiral HPLC has shown only one enantiomer. 20 mL of ethanol was then introduced followed by 210 mg of EtONa. After 12h, the reaction was quenched by NH_4Cl sat and the product extracted twice with Et_2O . The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a mixture (80:20) of Cy/EtOAc to give 168 mg (80%) of compound **290**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.43 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.30 (dd, $J = 4.0$ et 18.1 Hz, 1H, CH), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.46 (dd, $J = 10.5$ et 18.1 Hz, 1H, CH), 4.50-4.58 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 20.3, 20.8, 31.1, 37.9, 72.9, 130.0, 157.3, 163.1, 200.2.

291 : 2,2-dimethyl-6-undecyl-4H-1,3-dioxin-4-one



$C_{17}H_{30}O_3$

$M = 282.42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.65$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

White powder

Yield = 85 %.

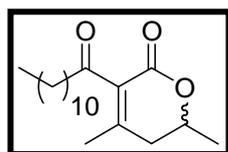
Form the dodecanoic acid, the reaction was performed as detailed in the general procedure A, B, and C to give 750 mg (85% last step) of dioxinone **291**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0.85 (t, $J = 5.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (s, 16H, 8 x CH_2), 1.51 (m, 2H, CH_2), 1.66 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.18 (t, $J = 9.5$ Hz, 2H, CH_2), 5.20 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 14.6, 23.1, 25.4, 26.2, 29.4, 29.7, 29.8, 29.9, 30.0, 30.07, 30.09, 32.3, 34.0, 93.5, 106.7, 161.9, 172.6.

IR : 2926, 2854, 1752, 1735, 1560.3 cm^{-1} .

292 : (6R)-3-dodecanoyl-4,6-dimethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one



$C_{19}H_{32}O_3$ e.r. 50/50

$M = 308.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.51$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

White powder

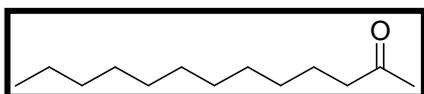
Yield = 30 %.

In a RB flask flushed with Argon, 20 mg (0.06 mmol, 0.1 eq) of cesium carbonate and 290 mg (1.0 mmol, 1.5 eq) of compound **295** were added at RT to a 10 mL toluene solution containing 63 mg (0.6 mmol, 1 eq) compound **293**. The mixture was then heated at reflux. After 3h, the reaction was quenched at RT with NH_4Cl_{sat} and extracted with EtOAc. The aqueous layer was then extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were then dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The crude was then chromatographed on silica gel using a (80:20) mixture of Cy/EtOAc to give 93 mg (30%) of compound **292**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (s, 16H, 8 x CH_2), 1.43 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.58-1.62 (m, 2H, CH_2), 2.00 (s, 3H, CH_3), 1.43 (dd, $J = 4.0$ et 18.1 Hz, 1H, CH_2), 2.44 (dd, $J = 11.5$ et 17.9 Hz, 1H, CH_2), 2.73 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 4.50-4.60 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 14.5, 20.8, 21.3, 23.0, 24.1, 29.5, 29.7, 29.8, 29.95, 29.99, 30.02, 32.3, 38.1, 43.8, 73.4, 130.4, 156.5, 163.6, 203.9.

293 : tridecan-2-one :



$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$

$M = 198.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$R_f = 0.81$ (Cyclohexane/EtOAc– 80/20)

White powder.

Yield = 32%

Isolated along with the compound **292** to give 64 mg (32%) of the ketone **293**.

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ ppm : 0.86 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (s, 16H, CH_2), 1.53 (m, 2H, CH_2), 2.12 (s, 3H, CH_3), 2.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_3).

$^{13}\text{C RMN}$ (75MHz, CDCl_3) δ ppm : 14.6, 23.2, 24.3, 29.6, 29.8, 29.86, 29.93, 30.07, 30.10, 30.13, 30.3, 32.4, 44.3.

$\text{IR} : 2954, 2917, 2849, 1709 \text{ cm}^{-1}$.

6. 5. Mode opératoire pour la détermination des propriétés physicochimiques des analogues en solution.

6. 5. 1. Appareillage.

Acétonitrile	: VWR qualité HPLC
Micropipette	: 5 μ L, 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L,
Eppendorf :	: Safe lock tube PCR
Cuve UV	: Varian – Quartz 10 mm d'épaisseur
Cuve Fluorescence	: Hellma – Quartz 10 mm d'épaisseur
Vortex	: Bender & Hobein – Genie 2
Centrifugeuse	: Baky Bug
Spectrophotomètre d'absorbance	: Varian – Cary 50 scan
Spectrophotomètre de fluorescence	: Varian – Cary Eclipse
Bain thermostaté	: Varian – Cary single cell peltier accesory

6. 5. 2. Solution mère

Environ exactement 1 à 2 mg de composé sont pesés dans un eppendorf de 1,5 mL. Les solutions mères sont alors préparées par addition de 1 mL exactement d'acétonitrile et les eppendorf sont alors conservés à l'abri de la lumière.

6. 5. 3. Absorbance et fluorescence sans butylamine.

- Absorbance :

30 μ L de solution mère sont ajoutés dans un eppendorf de 1.5 mL et sont dilués à 1 mL d'acétonitrile. Après agitation par vortex et centrifugation, la solution limpide est transférée dans une cuvette UV et complétée par 2 mL d'acétonitrile. L'analyse est alors effectuée après étalonnage du spectrophotomètre par une solution d'acétonitrile.

- Fluorescence :

Deux protocoles ont été mis en place pour les test de fluorescence

- Pour les composés dicétoniques : 125 μL de la solution précédente (absorbance) sont dilués à 1250 μL par ajout de 1125 μL d'acétonitrile dans un cuvette de fluorescence. L'analyse est alors effectuée sur le spectrophotomètre de fluorescence par excitation aux longueurs d'onde respectives maximales d'absorption.
- Pour les composés non-dicétoniques : 1250 μL de la solution précédente (absorbance) sont placés dans une cuvette de fluorescence. L'analyse est alors effectuée sur le spectrophotomètre de fluorescence par excitation aux longueurs d'onde respectives maximales d'absorption.

6. 5. 4 Absorbance et fluorescence avec butylamine.

- Absorbance :

30 μL de solution mère sont placés dans un eppendorf de 1.5 mL. A température ambiante, 10 μL (ou 30 μL dans le cas de PP841) d'une solution de butylamine à 0.15 M sont ajoutés et le milieu est agité par vortex puis centrifugé. Après dilution à 1 mL par ajout de 960 μL d'acétonitrile, la solution limpide est transférée dans une cuvette UV puis complétée par 2 mL d'acétonitrile. L'analyse est alors effectuée après étalonnage du spectrophotomètre par une solution d'acétonitrile.

- Fluorescence :

Deux protocoles ont été mis en place pour les tests de fluorescence

- Pour les composés dicétoniques : 125 μL de la solution précédente (solution d'absorbance) sont dilués à 1.25 mL par ajout de 1125 μL d'acétonitrile dans une cuvette de fluorescence. L'analyse est alors effectuée sur le spectrophotomètre de fluorescence par excitation aux longueurs d'onde respectives maximales d'absorption.
- Pour les composés non-dicétoniques : 1250 μL de la solution précédente (absorbance) sont placés dans une cuvette de fluorescence. L'analyse est alors effectuée sur le spectrophotomètre de fluorescence par excitation aux longueurs d'onde maximales respectives d'absorption.

6. 5. Mode opératoire pour l'évaluation des analogues sur gel SDS-PAGE.

1. Dry stocks (epicocconone's solutions) were dissolved to a concentration of 10 mg.mL^{-1} in DMSO.
2. Those stocks were further diluted to 0.89 mg.mL^{-1} .
3. The solutions were then stored at -80°C in 100 μL aliquots.
4. Proteins samples prepared (200 $\mu\text{g/mL}$ in LDS buffer) were heated to 70°C for 10 minutes and then centrifugated at 14000 x g for 5 minutes before being loaded on gels to a concentration of 125 ng/band and treated as for step 5.
5. An aliquots of GE low molecular weight standards prepared for Lavapurple QC testing was diluted into 1 x LDS buffer

6. 12% Bis-Tris, 1 mm thick 12 well mini-gels (Invitrogen) were loaded with standards (5 μL) and protein solutions (2 μL) as follows:

Well:	Sample:
1	Standards
2	Porcine IgG
3	Lysozyme
4	Transferrin
5	Ovalbumin
6	β -lactoglobulin
7	Carbonic anhydrase
8	Alkaline phosphatase
9	Soybean trypsin inhibitor
10	Creatinase
11	Bovine plasma
12	RNase B

7. The gels were run at 150-200V for 60 minutes (buffer front just on edge of gel).

8. The gels were fixed in 15% EtOH, 1% citric acid (100 mL) for 1 hr.

9. One gel for epicocconone was stained as follows

- Stained in 100 mM sodium borate pH 10.9 (50 mL) containing \acute{e} picocconone (50 μL at $0.89 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 1h.
- De-stained in 15% EtOH (100 mL) for 30 minutes
- Acidified in 15% EtOH, 1% citric acid (100 mL) for 30 minutes.

10. Gels for the analogs was stained as follows:

- Stained in 100 mM sodium borate buffer pH 10.9 (50 mL) containing the analogs (50 μL of a 1 mg/mL solution) for 1 hr.
- De-stained in 15% EtOH (100 mL) for 30 minutes
- Acidified in 15% EtOH, 1% citric acid (100 mL) for 30 minutes.

11. The gels were imaged using a Typhoon 9400 (488 nm laser, 540 PMT, 560LP or 580BP30 filters, 100 μm resolution, and normal sensitivity).

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIES.

- (1) Miller, I. ; Crawford, J. ; Gianazza, E. *Proteomics*, **2006** , 6, 5385-5408.
- (2) Switzer, R. C. 3rd, Merrill, C. R., Shifrin, S., *Anal. Biochem.* **1979**, 98, 231–237.
- (3) Oakley, B. R. , Kirsch, D. R. , Morris, N. R., *Anal. Biochem.* **1980**, 105, 361–363.
- (4) Merrill, C. R., Switzer, R. C., Van Keuren, M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 4335–4339.
- (5) Hochstrasser, D. F. ; Harrington, M. G. ; Hochstrasser, A. C. ; Miller, M. J. ; Merrill, C. R. *Anal. Biochem.* **1988**, 173, 424–435.
- (6) Heukeshoven, J. ; Dernick, R. *Electrophoresis* **1985**, 6, 103–112.
- (7) Heukeshoven, J. ; Dernick, R. *Elektrophorese Forum '86*, **1986**, Radola, B. J. (Ed.) , VCH, Weinheim, 22–27.
- (8) Blum, H., Beier, H. ; Gross, H. J. *Electrophoresis* **1987**, 8, 93–99.
- (9) Rabilloud, T. ; *Electrophoresis* **1990**, 11, 785–794.
- (10) Tzeng, M., C., *et al. Analytical biochemistry*, **1983**, 128, 412-414.
- (11) Kazmin, D.; Edwards, R., A.; Turner, R., J.; Larson, E.; Starkey, J. *Anal. Biochem.* **2002**, 301, 91–96.
- (12) Edwards, R., A.; Jickling, G.; Turner, R., *J. Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 362–368.
- (13) Ladner, C., L ; Yang, J. ; Turner, R., J.; Edwards, R., A. *Anal. Biochem.* **2004**, 326, 13-20.
- (14) Fazekas de St Groth, S. ; Webster, R. G. ; Datyner, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, 71, 377–391.
- (15) Weber, K. ; Osborn, M. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 4406–4412.
- (16) Poland, J. ; Rabilloud, T. ; Sinha, P. *The Proteomics Handbook*, **2005**, Walker, J.M., Humana Press, Totowa.
- (17) Patton, W. F. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2002**, 771, 3–31.
- (18) Diezel, W., Kopperschlager, G., Hofmann, E., *Anal. Biochem.* **1972**, 48, 617–620.
- (19) Smejkal, G. B. ; Robinson, M. H. ; Lazarev A. *Electrophoresis* **2004**, 25, 2511–2519.
- (20) Gorovsky, M. A. ; Carlson, K. ; Rosenbaum, J. L. *Anal. Biochem.* **1970**, 35, 359–370.
- (21) Allen, R. E. ; Masak, K. C. ; McAllister, P. K. *Anal. Biochem.* **1980**, 104, 494–498.
- (22) Srovy, I. ; Hodny, Z. ; *J. Chromatogr.* **1991**, 569, 175–196.
- (23) Valeur ; B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*, **2004** , De Boeck., Bruxelles, 9-21.
- (24) Barger, B. O. ; White, R. C. ; Pace, J. L. ; Kemper, D. L. ; Ragland, W. L. *Anal. Biochem.* **1976**, 70, 327–335.
- (25) Jackson, P. ; Urwin, V. E. ; Mackay, C. D. *Electrophoresis* **1988**, 9, 330–339.
- (26) Jackowski, G. ; Liew, C. C. *Anal. Biochem.* **1980**, 102, 321–325.
- (27) Liu, J.; Hsieh, Y., Z. ; Wiesler, D.; Novotny, M. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 408-412.
- (28) Urwin, V., E.; Jackson, P. *Anal. Biochem.* **1993**, 209, 57-62.
- (29) Ünlü, M.; Morgan, M., E.; Minden, J., S.; *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2071-2077.
- (30) Weltz, B., K.; Yarmoluck, S., M.; Craig, D., B.; Wolfbeis, O., S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5400-5402

- (31) Steinberg, T. H. ; Haugland, R. P. ; Singer, V. L. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 238–245.
- (32) Steinberg, T. H., Jones, L. J. ; Haugland, R. P. ; Singer, V. L. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 223–237.
- (33) Beggren, K.; Chernokalskaya, E.; Steinberg, T., H.; Kemper, C.; Lopez, M., F.; Diwu, Z.; Haugland, R., P.; Patton, W., F. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 2509-2521.
- (34) Rabillout, T.; Strub, J.-M.; Luche, S.; Girardet, J.-L.; Van Dorsselaer, A.; Lunardi, J. *Proteome*, **2000**, *1*, 1-14.
- (35) Tsangaris, G. ; Weitzdoerfer, R. ; Pollak, D. ; Lubec, G. ; Fountoulakis, M. ; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1168–1173.
- (36) Tokarski, C. ; Cren-Olivé C. ; Fillet, M. ; Rolando, C.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1407–1416.
- (37) Berlman, I. B. *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Press, New Yrk **1971**.
- (38) Dutta, A. K. ; Salesse, C. *Langmuir* **1997**, *13*, 5401–5408.
- (39) Stepanek, M., Podhajecka, K., Prochazka, K., *Langmuir* **1999**, *15*, 4185–4193.
- (40) Kang, C. ; Kim, H. ; Kang, D. ; Jung, D., Y.; Suh, M. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3297-3304.
- (41) Suzuki, Y.; Yokoyama, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17799-17802.
- (42) Wenzel, M. ; Czerney, P. ; Schweder, B. ; Lehmann, F. Protein identifying and quantifying method. WO2006/079334 Aug. 3 2006, Dyomics GMBH.
- (43) Harris, L. R. ; Churchward, M. A. ; Butt, R. H. ; Coorsen J. R. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (4), 1418-1425.
- (44) Wolf, B. D. ; Desai, S. ; Shiflett, S. ; Bell, P. A. Krypton A : sensitive fluorescent protein stain for protein detection in polyacrylamide gels. 20th Annual Symposium of The Protein Society, San Diego, CA, August 5-9, 2006.
- (45) Berkelman, T. Detection and quantitation of proteins using a novel fluorescent dye. BioRad technical bulletin 5352,
http://www.biorad.com/cmuc_upload/Literature/194338/Bulletin_5352.pdf
- (46) Roegerer, J.; Lutter, P.; Reinhart, R.; Bluggel, M.; Meyer, H., E.; Anselmitti, D. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 157-159.
- (47) Bell, P. J. ; Karuso, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, (31), 9304-9305.
- (48) Mackintosh, J. A. ; Choi, H.-Y. ; Bae, S. H. ; Veal, D. A. ; Bell, P. J. ; Ferrari, B. C. ; Van Dyk, D. D. ; Verrills, N. M. ; Paik, Y. K. ; Karuso P. *Proteomics* **2003**, *3* (12), 2273-2288.
- (49) Crawford, A., S.; Veal, D., A., Scott, G., B., I.; Choi, H., Y., Karuso, P. *J. Prot. Res.* , **2008**, *7*, 361-366.
- (50) Coghlan, D. R. ; Mackintosh, J.A. ; Karuso, P. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 2401-2404.
- (51) Svensson, E. ; Hedberg, J. J. ; Malmport, E. ; Bjellqvist, B. *Anal. Biochem.* **2006**, *355* (2), 304-306.
- (52) Choi, H. Y. ; Veal, H.Y. ; Karuso, P. *J. Fluorescence*, **2006**, *15*, 475-482.
- (53) Smejkal, G. B. ; Robinson, M. H. ; Lazarev, A. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2511–2519.
- (54) Kumasaki, S.; Nakanishi, K.; Nishikawa, E.; Ohashi, M. *Tetrahedron*, **1962**, *18*, 1171.

- (55) Haws, E., J.; Holker, J., S., E.; Kelly, A.; Powell, A., D., G.; Robertson, A. *J. Chem. Soc.* **1959**, 3598.
- (56) [a] Eade, R. A.; Page, H.; Robertson, A.; Turner, K.; Whalley, W., B. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 4913.
[b] Whalley, W., B.; Ferguson, G.; Marsh W., C.; Restivo, R., J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **1976** 1366.
- (57) Büchi, G.; White, J., D.; Wogan, G., N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 3484.
- (58) Hashimoto, T.; Tahara, S.; Takaoka, S.; Tori, M.; Asakawa, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, 42, 2397.
- (59) Juzlová, P.; Martínková, L.; Kroen, V. *J. Ind. Microbiology*, **1996**, 16, 163.
- (60) Kurono, K. ; Nakanishi, K. ; Shindo, K. ; Tada, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **1963**, 11, 359 (
- (61) Vleggaar, R. ; Steyn, P., S. ; Nagel, W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **1974**, 45.
- (62) Hetherington, A., C. ; Raistrick, H. *Phil. Trans. Roy. Soc. (London), Ser. B*, **1931**, 220, 269.
- (63) Pollock, A. V. *Nature (London)*, **1947**, 160, 331.
- (64) Oku, H. ; Nakanishi, T. *Phytopathology*, **1963**, 53, 1321.
- (65) Nukina, M.; Marumo, S. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 2603.
- (66) Haraguchi, H.; Taniguchi, M.; Motoba, K.; Shibata, K. Oi, S.; Hashimoto K. *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, 54, 2167.
- (67) Takahashi, M.; Koyama, K. Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, 38, 625.
- (68) Matsuzaki, M.; Tahara, H.; Inokoshi, J.; Tanaka, H. *J. Antibiotics*, **1998**, 51,1004.;
- (69) Da-Jun Yang, D.; Tomoda, H.; Tabata, N.; Masuma, R.; Omura, S. *J. Antibiotics*, **1996**, 49, 223.
- (70) Chong, R.; King, R., R.; Whalley, W., B. *J. Chem. Soc.,Chem. Commun.*, **1969**, 1512.
- (71) Birchall, G.; Galbraith, M.; Gray, R. W.; King, R. R.; Whalley, W. B. *J. Chem. Soc., (C)*, **1971**, 3559.
- (72) Suzuki, T.; Okada, C.; Arai, K.; Awall, A.; Shimizu, T.; Tanemura, K.; Horaguchi, T. *J. Heterocycl. Chem.*, **2001**,38, 1409 – 1418
- (73) Zhu, J.; Germain, A. R.; Porco, J. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 1239-1243.
- (74) Zhu, J.; Grigoriadis, N. P.; Lee, J. P.; Porco, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9342 -9343.
- (75) Zhu, J.; Porco, J. A. *Org. Lett.* **2006**, 22, 5169-5171.
- (76) Wei, W.-G.; Yao, Z.-J. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4585-4590.
- (77) [a] Wei, W.-G.; Qian, W.-J.; Zhang, Y.-X.; Yao, Z.-J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 4171-4174.
[b] Wei, W.-G., Zhang, Y.-X.; Yao, Z.-J. *Tetrahedron* **2005**, 61, 11882-11886.
- (78) Marsini, M., A.; Gowin, K., M. ; Pettus, T., R., R., R. *Org. Lett.* **2006**, 8, 3481-3483.
- (79) Dobler, M., R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 963-964.
- (80) Snieckus, V. ; Beak, P. *Acc. Chem. Res.*, **1982**, 15, 306-312.
- (81) Choukchou-Braham, N.; Asakawa, Y.; Lepoittevin, J. P.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3949-3952.
- (82) Tae, J.; Gray, D ; Nicolaou, K. C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 3675-3678.
- (83) Clayden, J. ; Stimson, C., C. ; Hellinwell, M.; Keenan, M. *Synlett* **2006**, 6, 873-876.

- (84) Huang, W-H. ;Chien, P-Y. ;Yang, C-H. ; Lee, A-R. *Chem. Pharm. Bull.*, **2003**, *5*, 339-340
- (85) Malamas, M.S. ; Manas, E.S. ; McDevitt, R.E. ; Gunawan, I. ; Xu, Z.B. ; Collini, M.D. ; Miller, C.P. ; Dinh, T. ; Henderson, R.A. ; Keith, .C. ; Harris, H.A. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5021-5040.
- (86) Demyttenaere, J. ; Vervisch, S. ; Debenedetti, S. ; Coussio, J.; Maes, D.; De Kimpe, N. *Synthesis*, **2004**, *11*, 1844-1848.
- (87) Park, J.H.; Kim, S. *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 3111-3113.
- (88) Nayak, M.K.; Sharma, L.;Chakraborti, A.K. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 6406-6414.
- (89) Quideau, S. ; Pouységou, L. ; Deffieux, D. *Synlett*, **2008**, *4*, 467-495.
- (90) Magdziak, D. ; Meek, S. J. ; Pettus, T. R. R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1383-1429.
- (91) Siegel, A.; Wessely, F.; Stockhammer, P.; Antony, F.; Klezl, P. *Tetrahedron* **1958**, *4*, 49.
- (92) Carman, R. M.; Van Dongen, J. M. A. M. *Aust. J. Chem.* **1986**, *39*, 2171.
- (93) Eley, K. L.; Crowley, P. J.; Bugg, T. D. H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2091.
- (94) Nishinaga, A.; Nishizawa, K.; Tomita, H.; Matsuura, T. *Synthesis* **1977**, 270.
- (95) Mandal, S.; Macikenas, D.; Protasiewicz, J. D.; Sayre, L. M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4804.
- (96) Greenland, H.; Pinhey, J. T.; Sternhell, S. *Aust. J. Chem.* **1986**, *39*, 2067.
- (97) Lethbridge, A.; Norman, R. O.; Thomas, C. B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 2464.
- (98) [a] Wessely, F.; Sinwel, S.; *Monatsh. Chem.* **1950**, *81*, 1055.
 [b] Wessely, F.; Holzer, L.; Vilcsek, H. *Monatsh. Chem.* **1952**, *83*, 1253.
 [c] Wessely, F.; Holzer, L.; Langer, F.; Schinezel, E.; Vilcsek, H. *Monatsh. Chem.* **1955**, *86*, 831.
 [d] Wessely, F.; Zbiral, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1957**, *605*, 98.
 [e] Wessely, F.; Leitich, J. *Monatsh. Chem.* **1961**, *92*, 1004.
- (99) Perumal, P. Th.; Bhatt, M. V. *Synthesis* **1980**, *11*, 943.
- (100) Barton, D. H. R.; Brewster, A. G.; Ley, S. V.; Read, C. M.;Rosenfeld, M. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 567.
- (101) Jeffs, P. W.; Lynn, D. G. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1617.
- (102) Gant, T. G.; Meyers, A. I. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3707.
- (103) McClure, J. D. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 69.
- (104) [a] Matsuo, M.; Matsumoto, S.; Iitaka, Y. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3514.
 [b] Matsumoto, S.; Matsuo, M.; Iitaka, Y. *J. Chem.Res.* **1987**, 58
- (105) Matsumoto, S.; Matsuo, M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1435.
- (106) Krohn, K.; Brueggmann, K.; Doering, D.; Jones, P. G. *Chem. Ber.* **1992**, *125*, 2439.
- (107) Kende, A. S.; MacGregor, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*,4197.
- (108) Drutu, I.; Njardarson, J. T.; Wood, J. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 493.
- (109) [a] Murakata, M.; Yamada, K.; Hoshino, O. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14713.
 [b] Murakata, M.; Yamada, K.; Hoshino, O. *Hetereocycles* **1998**, *47*, 921.
 [c] Murakata, M.; Yamada, K.; Hoshino, O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**,443.
- (110) Boehlow, T. R.; Harburn, J. J.; Spilling, C. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3111.
- (111) Becker, H.-D.; Bremholt, T.; Adler, E. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 4205.

- (112) Magdziak, D.; Rodriguez, A. A.; Van De Water, R. W.; Pettus, T. R. R. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 285.
- (113) Gagnepain, J.; Mereau, R.; Dejugnac, D.; Leger, J.-M.; Castet, F.; Deffieux, D.; Pouysegu, L.; Quideau, S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6493.
- (114) Lebrasseur, N.; Gagnepain, J.; Ozanne-Beaudenon, A.; Leger, J.-M.; Quideau, S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6280.
- (115) Gagnepain, J.; Castet, F.; Quideau, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1533
- (116) Gagnepain, J.; Castet, F.; Quideau, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 628.
- (117) Quideau, S.; Pouysegu, L.; Deffieux, D.; Ozanne, A.; Gagnepain, J.; Fabre, I.; Oxoby, M. *Arkivoc* **2003**, *6*, 106.
- (118) T. Dohi, A. Maruyama, N. Takenaga, K. Senami, Y. Minamitsuji, H. Fujioka, S. B. Caemmerer, Y. Kita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *120*, 3847.
- (119) Quideau, S. ; Lyvinec, G. ; Marguerit, M. ; Bathany, K. ; Ozanne-Beaudenon, A. ; Buffeteau, T. ; Cavagnat, D. ; Chénéde, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4605.
- (120) Nicolau, K., C.; Montagnon, T. ; Baran, P., S. ; Zhong, Y., -L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, **2245**
- (121) Ley, S., V.; Clase, J., A.; Mansfield, D., J.; Osbom, H., M., I., *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, *33*, 1533-1544
- (122) Tsuchida, T.; Iinuma, H.; Nishida, C.; Kinoshita, N.; Sawa, T.; Amada, M.; Takenchi, T. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1104-1109
- (123) Werner, A.; Hadacek, F. *Phytochem. Anal.* **1995**, *6*, 218-223.
- (124) Hung, H.; Comins, D., L., . *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 391-392
- (125) Monde, I. , C. ; Takasugi, M. ; Katsui, N. ; Masamune, T. *Chem. Lett.* **1990**, 1283-1285
- (126) Yokota, M.; Masayuki, Y.; Yanagisawa, T.; Kosakai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 865-871.
- (127) Pshenichnyj, G.V.; Mashenkov, V.A.; Hevskii, L.S. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1986**, 1371-1374.
- (128) Koggo, B.E., Hug, P., Moss, S.; Laschdo, F. ; Peter, H., H., *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 143-147.
- (129) Schiehser, G.A.; Cautield, C.E., Senko, N.A.; Von Burg, G.F. *US 5,366,1993* 1994
- (130) Rao, Y.S. *Chem. Rev.* **1976**, *76*, 625-693
- (131) Oraziano, M., L.; Iesce, M., I. *Synthesis* **1985**, 1151-1153.
- (132) Honda, T.; Mizutani, K; Kanai, I., C., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9374-9378.
- (133) Matsuo, K., Arase, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 2091-2094.
- (134) Matsuo, IC, Hasuike, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2803-2806.
- (135) Lacey, R., N., *J. Chem. Soc.* **1954**, 816-822
- (136) Ager, D.J.; Mole, S.J. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1807-1810.
- (137) Tyvorskii, V., I.; Kukharev, A., S.; Kulinkovich, O., G. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 1801-1808.
- (138) Bell, K.; Sadasivam, D., V.; Gudipati, I., R.; Ji, H.; Birney, J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1295-1297.
- (139) Clemens, R. J.; Hyatt, J. A. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2431-2435.
- (140) Wentrup, C.; Heilmayer, W.; Kollenz, G. *Synthesis* **1994**, 1219-1248.

- (141) Sato, M.; Ogasawara, K.; OI, K.; Kato, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 1896.
- (142) Heneger, K., E.; Winkler, J., D. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1051.
- (143) Sato, M.; Sekigushi, K.; Osagawara, H.; Kaneko, C. *Synthesis* **1985**, 224.
- (144) Gebauer, J.; Blechert, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2021-2025
- (145) Loudet, A. ; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.
- (146) Ireland, C. M. & Al *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4147
- (147) Patrick D. & Al *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *9*, 1773
- (148) Boukouvalas, J.; Pouliot, M. *Synlett* **2005**, *2*, 343-345
- (149) Jas, G. *Synthesis* **1991**, 965-966.
- (150) Takaya, Y.; Kikuchi, H.; Terui, Y.; Komiya, J.; Furukawa, K.; Sekiya, K.; Motomura, S.; Ito, A.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 985-989.
- (151) Kikuchi, H. ;Sasaki, K. ; Sekiya, J. ;Maeda, Y. ; Amagai, A. ; Kubohara, Y. ; Oshima, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3203-3214.
- (152) Kulkarni, B., A.; Roth, P., A.; Lobkovsky, E.; Porco, J., A., Jr. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 56-72

8. Annexe

Première page du brevet sur le procédé de synthèse de l'épicocconone



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08
Pour vous informer : INPI Direct 0920 210 211
Pour déposer par télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)

Vos références pour ce dossier	BFF90330LM/SSO
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
Titre	PROCÉDÉ DE SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE L'ÉPICOCCONONE
LE(S) DEMANDEUR(S)	UNIVERSITE DE ROUEN, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS -, INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE ROUEN
DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)	
INVENTEUR 1	
Nom	FRANCK
Prénom	Xavier
Rue	35 allée Mercure
Code postal et ville	76230 BOIS GUILLAUME
Pays	FR
INVENTEUR 2	
Nom	PEIXOTO
Prénom	Philippe
Rue	65 rue d'Elbeuf
Code postal et ville	76100 ROUEN
Pays	FR
DATE ET SIGNATURE	
Signé numériquement par	
Date	
Signataire	

Deuxième page du brevet sur le procédé de synthèse de l'épicoconone

1

Procédé de synthèse d'analogues de l'épicoconone

DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION

5

La présente invention concerne un procédé de synthèse d'analogues de l'épicoconone.

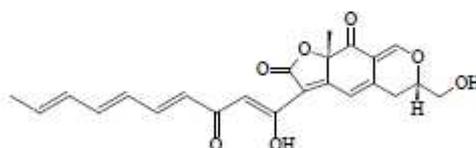
ART ANTERIEUR

10

L'épicoconone, ou 5,6-dihydro-3-[(1Z,4E,6E,8E)-1-hydroxy-3-oxo-1,4,6,8-décatétraényl]-6-hydroxyméthyl-9a-méthyl-2H-furo[3,2g][2]benzopyran-2,9-(9aH)-dione, est un composé chimique, qui a été isolé du champignon *Epicoccum nigrum* et résolu chimiquement en 2003 par P.J. Bell et P. Karuso (« Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *epicoccum nigrum* » *J Am Chem Soc.* (2003), 125(31), 9304-5). La formule chimique de l'épicoconone est la suivante :

15

20



Epicocconone

25

Ce produit naturel s'est révélé avoir des propriétés remarquables : sa structure chimique originale lui permet de se lier de façon covalente aux fonctions amines, formant un adduit énaminique qui fluoresce dans le rouge, plus précisément autour de 600 nm, quand il est soumis à un rayonnement UV, par exemple à 395 nm ou 520 nm. Cette molécule possède donc un déplacement de Stokes (différence entre la longueur d'onde d'absorption et la

30

- Résumé -

La détection et l'identification des protéines sur gel d'électrophorèse dépend aussi bien du marqueur des protéines utilisés (généralement un marqueur fluorescent) que de ses propriétés physicochimiques propres (rendement quantique, Stokes' shift et recouvrement des bandes d'absorption et d'émission, photoblanchiment), de sa stabilité (chimique et photochimique), et de son accessibilité. Créer une gamme de nouveaux fluorophores dont les propriétés physicochimiques peuvent être modulées en partant d'une structure bien connue et très avantageux dans l'optique d'anticiper les caractéristiques supposées des composées envisagés. Cependant, même si de nombreux fluorophores sont disponibles commercialement, ils souffrent généralement de différentes contraintes telles que leurs prix prohibitifs, leur manque de sensibilité, leur Stokes' shift trop faible ou bien encore leur stabilité. L'accès à une famille de fluorophores résolvant l'ensemble de ces contraintes pour la détection de protéines sur gel d'électrophorèse représenterait donc un réel défi.

L'épicoconone, isolée du champignon *Epicoccum Nigrum*, se lie de façon covalente aux amines (et donc également aux protéines) en conduisant à un adduit énaminique qui est très fluorescent. Cet adduit émet dans le rouge (610 nm) lorsqu'irradié dans l'UV (395 nm) ou le visible (520 nm). Ces propriétés ont donc conduit à l'utilisation de ce produit naturel comme marqueur fluorescent de protéines sur gel d'électrophorèse menant à une sensibilité de détection rarement atteinte et à une gamme de linéarité très importante (10^4). La première synthèse de l'épicoconone a alors été engagée au sein de notre laboratoire. Elle a finalement conduit à une chimiothèque d'analogues encore plus efficace ayant permis d'établir une véritable relation structure-fluorescence.

- Abstract -

Detection and identification of proteins either in 2D electrophoresis gels or in biological media depends largely on the quality of protein sensitive dye used (generally a fluorescent dye) as well on the efficiency of their fluorescent properties (quantum yield, Stokes' shift and overlap of excitation frequency with common laser sources), their stability (chemical and photophysical) and their accessibility. To be able to create a range of new fluorescent dyes whose profiles can be modulated starting from a proven scaffold is advantageous in terms of predicting the properties of the final products. Even if many fluorescent dyes are available on the market, they suffer from a prohibitive price, a lack of sensitivity or a restricted wavelength range (absorption/emission) or limited stability. Access to a family of fluorophores displaying similar physicochemical properties, but shifted excitation and emission wavelengths constitutes an invaluable tool

Epicocconone, isolated from the fungus *Epicoccum nigrum*, covalently binds to primary amines (e.g. lysine of proteins), leading to a protein linked conjugate which is strongly fluorescent, emitting light in the red (610 nm) when submitted to UV-visible light (395 or 520 nm). This is a novel pro-fluorophore that allows protein quantification with unprecedented sensitivity and with an excellent linearity on a broad range of concentrations. A program of synthesis of epicocconone and analogues in order to provide a library of complementary fluorophores has been undertaken. The results concerning either the better efficiency of the analogs and the structure-fluorescence relation are presented in this dissertation.