



HAL
open science

Extraction de l'éponge marine *Axinella donnani* et synthèse d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A

Julie Munoz

► **To cite this version:**

Julie Munoz. Extraction de l'éponge marine *Axinella donnani* et synthèse d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112245 . tel-00919535

HAL Id: tel-00919535

<https://theses.hal.science/tel-00919535v1>

Submitted on 17 Dec 2013

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.



ORSAY

N°ORDRE

UNIVERSITÉ PARIS SUD XI

Faculté des Sciences d'Orsay

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Organique

Présentée pour obtenir le

GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD XI

par **Julie Muñoz**

Extraction de l'éponge marine *Axinella donnani* et synthèse d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A

Le 16 décembre 2011 devant la commission d'examen :

Professeur Catherine LAVAUD, rapporteur

Professeur Anne ZAPARUCHA, rapporteur

Professeur Giang VO-THANH, président du jury

Docteur Eykmar FETT, examinateur

Docteur Ali AL-MOURABIT, directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée entre octobre 2008 et décembre 2011 à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) dans le laboratoire du Dr. Ali Al-Mourabit.

Je remercie tout d'abord l'ICSN pour son appui financier.

Je tiens à remercier le Prof. David Crich, Directeur de l'ICSN (2009-2011), pour son accueil, ses conseils scientifiques et son soutien. Je remercie aussi le Prof. Malacria, directeur de l'ICSN (à partir de 2011).

Je remercie le Dr. Ali Al-Mourabit pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je tiens à remercier également le Dr. Pierre Daniel Marie pour sa collaboration et pour nous avoir fourni les deux lots d'éponge *Axinella donnani* étudiés lors de cette thèse.

Je remercie les Prof. Anne Zaparucha et Catherine Lavaud pour avoir bien voulu examiner et rapporter ce travail de thèse. Je remercie aussi le Prof. Giang Vo-Thanh et le Dr. Eykmar Fett d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je tiens à remercier tous les membres du jury pour les riches discussions scientifiques le jour de ma soutenance.

Je remercie chaleureusement le Dr. Matthias Köck pour les analyses RMN du donnazole C et les calculs r-fcDG/DDD de stéréochimie réalisés sur cette même molécule, ainsi que pour sa formidable volonté à vouloir publier ces résultats.

Je remercie le Dr. Ludmila Ermalenko et le Dr. Thanh-binh Nguyen pour leur encadrement et les discussions scientifiques fructueuses en synthèse organique.

Je tiens particulièrement à remercier Mme Céline Moriou, pour son aide précieuse, sa bonne humeur et l'excellente formation qu'elle m'a prodiguée en HPLC et en techniques de laboratoire.

M. Jean François Gallard et Mme Marie Thérèse Martin m'ont initié à ce magnifique outil qu'est la RMN, je les en remercie grandement.

Je remercie le Dr. Kirti Patel, M. Jonathan Sorres, le Dr. Rémi Laville, le Dr. Damien Lacroix et M^{lle} Emmanuelle Gros pour leur compagnie quotidienne au laboratoire, leurs bons conseils, leur soutien sans faille et les merveilleux moments passés ensemble.

Je remercie bien sûr les « forces vives » de l'ICSN. L'ensemble de mes collègues doctorants, post-doctorants, ITA ou chercheurs devenus amis avec lesquels j'ai partagé plus d'un bon moment. Je pense principalement à Ronan, Arnaud, Victor, Leslie, Damien, Cécile, Mathilde, Camille, Guillaume M., Gabriel, Olivier, Guillaume L., Jean-François, Xavier, Sébastien mais aussi particulièrement à François-Didier et Stéphanie pour m'avoir accueilli à bras ouvert dans leur équipe chaque midi.

Enfin, j'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance à Mme. Laurence Stephen, au Prof. Patrick Berthet, au Prof. Cyrille Kouklovsky, au Prof. Jean-Marie Beau et au Dr. Mamy pour m'avoir toujours soutenu et m'avoir donné le courage et la possibilité de terminer ma thèse en temps et en heure.

Je tiens finalement à exprimer ma sympathie à l'ensemble du personnel de l'ICSN avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, de discuter ou de partager un sourire.

ABRÉVIATIONS

ACN	Acétonitrile
$[\alpha_D]$	Pouvoir rotatoire
Boc	Tert-butoxycarbonyle
C ₁₈	Silice greffée par des groupements octadécyles
cat.	Catalytique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
DCM	Dichlorométhane
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDCI	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
eq. /equiv.	Equivalent
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IR	Infrarouge
<i>J</i>	constante de couplage
nOe	Nuclear Overhauser effect
P-2-AI	Pyrrole-2-AminoImidazole
PM	Poids moléculaire
R _f	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
sat.	Saturé
TA	Température ambiante
SM (ESI)	Spectre de masse (ionisation électrospray)
SMHR	Spectre de masse haute résolution
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultraviolet

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
CHAPITRE I Généralités sur les métabolites secondaires et les éponges marines	9
I.1. Les éponges marines.....	9
I.2. Les métabolites secondaires.....	12
I.2.1. Origine et diversité.....	12
I.2.2. Intérêts pharmacologiques, écologiques et chimiotaxonomiques	14
CHAPITRE II Étude bibliographique des pyrrole-2-aminoimidazoles (P-2-AIs)	21
II.1. Diversité structurale des pyrroles-2-aminoimidazoles.....	21
II.1.1. Les monomères linéaires	22
II.1.2. Les monomères cyclisés	25
II.1.3. Les dimères simples	31
II.1.4. Les dimères complexes polycycliques.....	34
II.2. Intérêts biologique, pharmacologique et écologique des pyrroles-2- aminoimidazoles	39
II.2.1. Rôle écologique : Les P-2-AIs antiappétants	39
II.2.2. Les P-2-AIs antibiotiques/antifouling	40
II.2.3. Les P-2-AIs cytotoxiques	42
II.2.4. Les P-2-AIs inhibiteurs de kinases	43
II.2.5. Les autres activités des P-2-AIs.....	45
CHAPITRE III Étude chimique de deux lots d'éponges <i>Axinella donnani</i> (Bowerbank, 1873)	49
III.1. Rappels bibliographiques sur les produits isolés du genre <i>Axinella</i>.....	49
III.1.1. Les stéroïdes.....	50
III.1.2. Les sesquiterpènes azotés	51
III.1.3. Les sodwanones	52
III.1.4. Les polyéthers.....	53
III.1.5. Les céramides et lipopolysaccharides	53
III.1.6. Les peptides cycliques.....	54
III.1.7. Les composés pyrroliques et indoliques.....	55

III.2. Collecte et extraction de l'éponge <i>Axinella donnani</i> (1^{er} lot), fractionnement des extraits et purification des produits	55
III.3. Éluclidation structurale des composés isolés de l'éponge <i>Axinella donnani</i> (1^{er} lot) 57	
III.3.1. Éluclidation structurale des monomères.....	57
III.3.2. Éluclidation structurale des dimères connus.....	63
III.3.3. Éluclidation structurale des dimères nouveaux	68
III.4. Collecte et extraction de l'éponge <i>Axinella donnani</i> (2nd lot): fractionnement et purification des extraits	100
III.5. Éluclidation structurale des composés isolés de l'éponge <i>Axinella donnani</i> (2nd lot) 102	
III.5.1. Composés P-2-AIs isolés de l'éponge <i>Axinella donnani</i> (2 nd lot).....	102
III.5.2. Composés 3,5-dibromotyrosiniques	103
III.6. Bilan du chapitre.....	109
CHAPITRE IV Synthèse d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A.....	115
IV.1. Étude bibliographique des différentes stratégies de synthèse du dispacamide A 115	
IV.1.1. État de l'art des différentes stratégies d'obtention du dispacamide A.....	115
IV.1.2. Approche utilisant un noyau imidazole déjà formé : la première synthèse de Lindel 118	
IV.1.3. Approches utilisant un précurseur linéaire	119
IV.1.4. Synthèse de notre laboratoire à partir des dicétopipérazines	124
IV.2. Synthèse d'analogues du dispacamide A.....	132
IV.2.1. Obtention du précurseur 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline.....	133
IV.2.2. Modifications apportées à la partie imidazolique.....	135
IV.2.3. Modification de la partie pyrrolique : Bromation de composés sélectionnés.....	147
IV.2.4. Modulation de la chaîne : les tentatives de déshydratation des dérivés de type dispacamide.....	150
IV.3. Bilan du Chapitre	154
CHAPITRE V Résultats des évaluations biologiques.....	157
V.1. Résultat de l'évaluation des tests de cytotoxicité	159
V.2. Résultat de l'évaluation des tests sur les kinases	159
V.2.1. Rappels sur les kinases	159
V.2.2. Évaluation et interprétation	160
V.3. Conclusion	161

CONCLUSION GÉNÉRALE	165
EXPERIMENTAL SECTION : GENERAL TECHNIQUES	169
EXPERIMENTAL SECTION : EXTRACTION.....	172
EXPERIMENTAL SECTION : SYNTHESIS	206
BIBLIOGRAPHIE	239
ANNEXES.....	251

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les produits naturels sont une source importante de nouvelles molécules chimiques. En effet, leurs structures complexes (centres chiraux, substituants variés, structures polycycliques...), souvent absentes des librairies de composés obtenus par la chimie combinatoire, répondent à un besoin physiologique précis et possèdent donc des activités biologiques intéressantes.¹ Une étude récente a montré que 70% des nouvelles molécules introduites comme médicaments entre 1981 et 2006 étaient soit des produits naturels, soit des mimes de produits naturels.² Ainsi, l'étude chimique à partir de sources naturelles permet non seulement de découvrir de nouveaux médicaments, mais aussi, et surtout, de rechercher des outils en chimie, biochimie et biologie moléculaire indispensables à la compréhension de nouvelles voies biosynthétiques et de modèles pharmacologiques.³

Les produits marins sont utilisés en médecine depuis l'Antiquité, mais leur étude est restée très limitée jusqu'à la seconde moitié du XX^{ème} siècle. Les progrès fulgurants de la plongée sous-marine et les premières extractions systématiques de Paul Scheuer ont marqué le début de l'étude approfondie de la biodiversité marine. Cette explosion de la recherche, concernant les produits naturels marins ces quarante dernières années, est illustrée dans la *Figure 1*.⁴

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Lew, M.; Hung-Wen, L. *Comp. Nat. Prod. II.* **2010**, *2*, 623-650.

² Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.

³ A. Al-Mourabit, M. A. Zancanella, S. Tilvi, D. Romo, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 1229-1260.

⁴ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170-244.

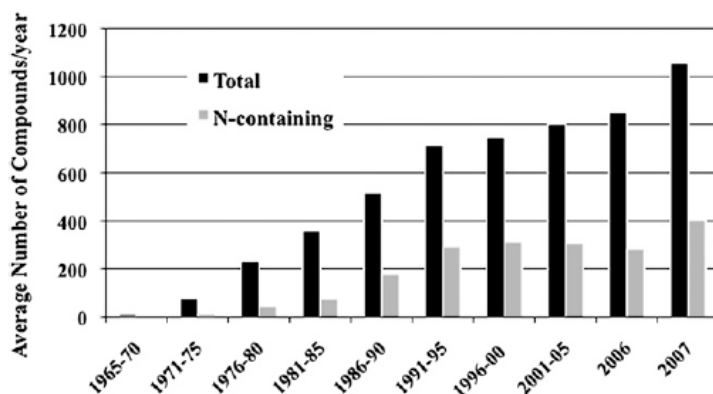


Figure 1 : Nombre de produits naturels marins découverts de 1965 à 2007

L'étude des produits marins par les chimistes et les pharmacologues a permis de mettre en évidence leurs activités biologiques variées (antibiotiques, antitumorales, anti-inflammatoires, analgésiques, anti-allergiques, anti-virales...) et leurs structures originales, souvent sans antécédents terrestres. Cependant ce potentiel reste sous-exploité puisque seulement 10 des 71 molécules naturelles en phase clinique en oncologie fin 2007 étaient d'origine marine, contre 36 molécules isolées de plantes et 25 de microorganismes.⁵

Récemment de nouvelles molécules d'origine marine ont reçu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Le ziconitide (Prialt)⁶ (**1**) en 2005, isolé du venin du mollusque *Conus magus*, est utilisé pour le traitement des douleurs chroniques liées au SIDA et aux cancers. L'ecteinascidine 743, ET 743 ou Trabectedine (Yondelis)⁷ (**2**) en 2007, isolé de l'ascidie *Ecteinascidia turbinata*, est utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancers. L'éribuline (E7389) (**3**), dérivé simplifié de l'halichondrine B (isolé de l'éponge marine *Halichondra okadai*) a été commercialisé en novembre 2010 et est utilisé dans le traitement du cancer du sein métastasé⁸ (Figure 2).

⁵ Butler, M. S. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 475-516.

⁶ Snutch, T. P. *NeuroRX* **2005**, *2*, 662-670.

⁷ Roylance, R.; Seddon, B.; McTiernan, A.; Sykes, K.; Daniels, S.; Whelan, J. *Clin. Oncol.* **2007**, *19*, 572-576.

⁸ Cortes, J.; Vahdat, L.; Blum, J. L.; Twelves, C.; Campone, M.; Roch[√]©, H.; Bachelot, T.; Awada, A.; Paridaens, R.; Goncalves, A.; Shuster, D. E.; Wanders, J.; Fang, F.; Gurnani, R.; Richmond, E.; Cole, P. E.; Ashworth, S.; Allison, M. A. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3922-3928.

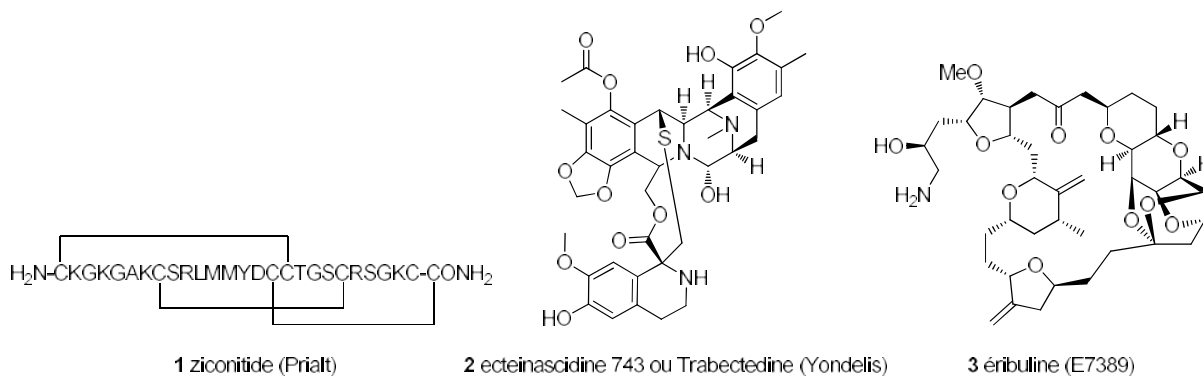


Figure 2 : Structures du ziconitide, de l'ecteinascidine 743 et de l'éribuline

Parmi les organismes marins producteurs de métabolites intéressants figurent les spongiaires. Ils fournissent à eux seuls plus du tiers des molécules isolées du milieu marin. Malgré cette diversité moléculaire intéressante, l'attrait pour les micro-organismes a considérablement augmenté ces dernières années, notamment car la culture des microorganismes est de plus en plus maîtrisée. (Figure 3).⁴ Les éponges ont réussi à coloniser de nombreux habitats aquatiques à différentes profondeurs ce qui met en évidence le succès de leur mode d'adaptation et leur diversité. Ces animaux sessiles (qui vivent accrochés à un substrat dur) ont développé des stratégies de défense et de communication chimique riches et complexes, produisant un grand nombre de composés actifs.

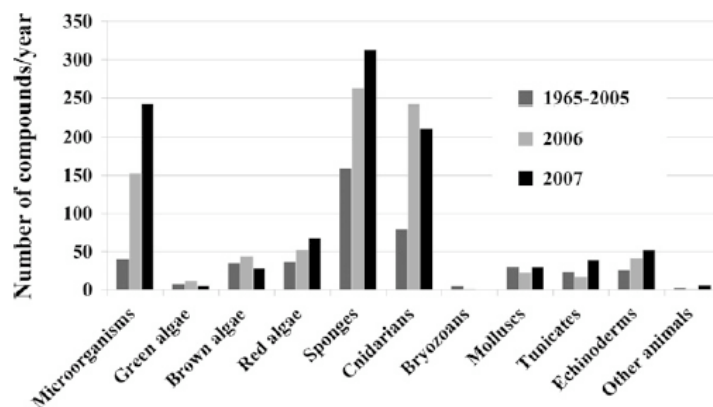


Figure 3 : Distribution des produits naturels marins par phylum

Les métabolites isolés d'éponges sont extrêmement variés.^{4,9} Parmi eux les pyrrole-2-aminoimidazoles (P-2-AIs) que l'on trouve dans les familles d'éponges Agelasidae, Halichondridae et Axinellidae représentent un groupe de plus de 150 molécules, dont les

⁹ Fattorusso, E. ; Tagliatela-Scafati, O. *Modern Alkaloids* 2008, Ed. Wiley-VCH.

activités biologiques et les structures complexes suscitent beaucoup d'intérêt. Dans ce contexte, il est intéressant d'étudier chimiquement les éponges marines phylogénétiquement liées, appartenant aux familles citées ci-dessus et de synthétiser de façon biomimétique les composés isolés de ces éponges (majoritairement P-2-AIs), dans le but de mieux connaître le fonctionnement de ces organismes, mais aussi, de générer des bibliothèques de molécules afin de tester leurs activités. Ce travail de thèse s'inscrit ainsi dans cette double perspective avec pour objectifs d'approfondir la connaissance des éponges marines en effectuant l'extraction chimique d'une éponge dont la famille intéresse le laboratoire depuis une dizaine d'années. La deuxième partie de mon travail exploite une méthodologie de synthèse de 2-aminoimidazolone mise au point dans notre équipe afin de synthétiser une chimiothèque d'analogues de produits naturels.

Le premier chapitre, présentera quelques généralités sur les éponges marines et les métabolites secondaires constituant la base de cette étude.

Dans le second chapitre, la diversité des P-2-AIs décrits dans la littérature, leurs structures et leurs activités biologiques seront examinées.

Après une introduction sur les composés précédemment isolés de la famille d'éponges Axinellidae, le troisième chapitre sera consacré à l'étude chimique de deux lots d'éponge *Axinella donnani*. La détermination structurale des métabolites isolés sera présentée et la réactivité des nouveaux composés sera proposée.

Le quatrième chapitre présentera d'une part, l'état de l'art en ce qui concerne les différentes synthèses du dispacamide A et de ses dérivés, d'autre part, la réalisation d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A dans le but de tester ces analogues sur de nombreuses cibles biologiques à l'ICSN (cytotoxicité, Geneviève Aubert) ou en collaboration avec des équipes extérieures (kinases, Laurent Meijer, Roscoff).

Les résultats des tests biologiques réalisés sur une partie des molécules synthétisées seront présentés dans un cinquième chapitre.

CHAPITRE I
GÉNÉRALITÉS SUR LES MÉTABOLITES
SECONDAIRES ET LES ÉPONGES MARINES

CHAPITRE I Généralités sur les métabolites secondaires et les éponges marines

Les éponges marines sont des organismes sessiles filtrant l'eau et pouvant produire des métabolites très divers. Parmi eux, les métabolites secondaires sont de petites molécules organiques qui sont souvent issues, voir liées aux métabolites primaires. Bien que non essentielles à la vie, le rôle de ces molécules peut être important dans la régulation des fonctions vitales, la communication entre espèces ou la défense contre les prédateurs. Au sein des éponges, les métabolites secondaires présentent une grande diversité chimique (terpènes, alcaloïdes, polycétides...) et une certaine spécificité.

Ce chapitre présente d'une part, le fonctionnement, la structure et certaines caractéristiques biologiques et phylogénétiques des éponges marines, et d'autre part, les différents facteurs contribuant à l'extraordinaire diversité des métabolites secondaires présents dans les organismes marins, et dans les éponges marines en particulier.

1.1. Les éponges marines

Pendant longtemps la place des éponges et donc du phylum Porifera dans l'arbre généalogique du vivant est restée obscure, au point de ne pas savoir exactement si une éponge pouvait être considérée comme un individu, une colonie ou une société de cellules. Plusieurs zoologistes avaient donc créé pour le phylum Porifera un groupe intermédiaire, le « Parazoa » maintenant abandonné. En effet, on sait maintenant que les éponges sont des vrais métazoaires (animal ou organisme pluricellulaire), organisés comme des protozoaires (petits organismes unicellulaires de moins d'1 mm pouvant s'associer en colonies).¹⁰

Les éponges sont apparues avant la période Cambrienne, entre -550 et -500 millions d'années. Ces animaux très primitifs évoluent continuellement. En effet, la composition de la membrane

¹⁰ Kornprobst, J. M. *Encyclopedia of marine natural products*; WILEY-BLACKWELL, 2010; Vol. 2.

de leurs cellules est une combinaison complexe de phospholipides et de stérols, dont la plupart sont absents de la membrane cellulaire d'autres animaux.¹⁰

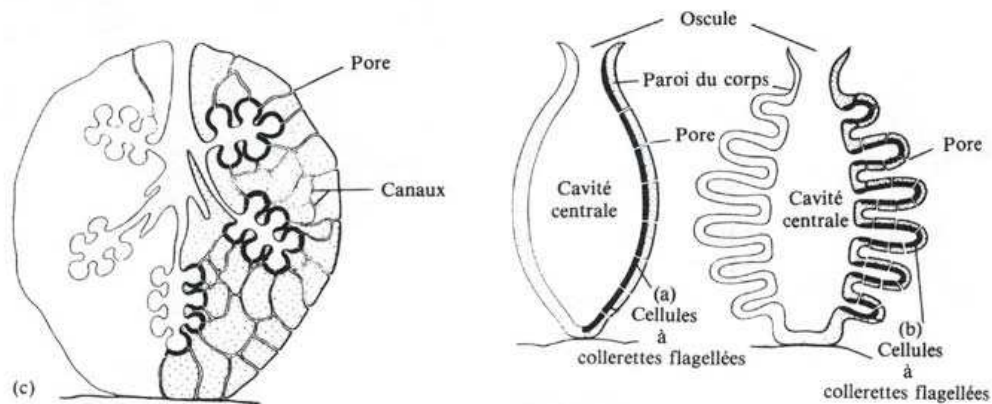


Figure 4 : Schéma simplifié d'une éponge

Les éponges sont constituées d'une double paroi de cellules percée d'une multitude de petits pores (les ostioles) (Figure 4). Le mouvement continu des cellules à collerettes flagellées, qui tapissent la paroi intérieure de l'éponge appelées choanocytes, permet de diriger l'eau, les nutriments et l'oxygène à l'intérieur du réseau inhalant de l'organisme. Ce réseau constitué de canaux de plus en plus fins, emporte l'eau de mer jusqu'aux chambres choanocytaires où elle est filtrée. A la sortie de ces chambres, l'eau est ensuite collectée par un réseau de canaux exhalants qui se rejoignent en une ouverture plus large, l'oscule, par où elle est rejetée. Ainsi, une éponge est capable de filtrer son propre volume d'eau en quelques secondes. Cette filtration dépend du rythme biologique de l'éponge, de la température et de la profondeur à laquelle elle vit. Entre le pinacoderme (à l'extérieur de l'éponge) et le choanoderme (à l'intérieur de l'éponge) se trouve le mésohyle. Ce mésohyle est constitué d'une matrice de fibres de collagène ainsi que de différents types de cellules qui peuvent se différencier pour produire les éléments minéraux du squelette de l'éponge appelés spicules.¹⁰

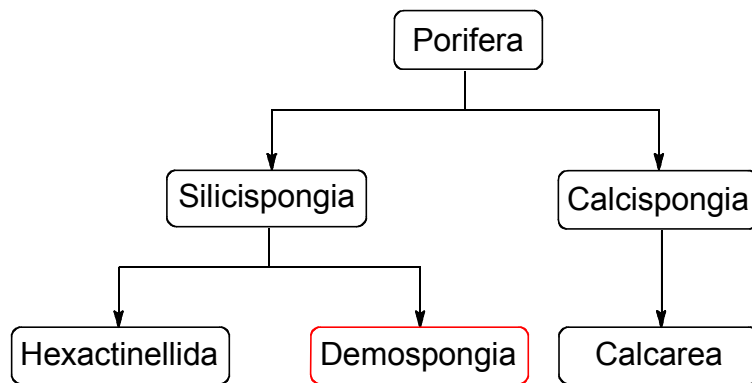


Figure 5 : Organisation du phylum Porifera

Le phylum Porifera est traditionnellement divisé en deux sous-phylum : Silicispongia et Calcispongia (Figure 5). Le sous-phylum Silicispongia est ensuite divisé entre les hexactinellides et les demosponges et forme un groupe paraphylétique, c'est à dire, tous les descendants de ce groupe n'ont pas le même ancêtre commun. En effet, la dénomination des ancêtres des demosponges reste problématique.¹¹ Le groupe Calcispongia, lui, ne contient que les éponges calcaires (Calcarea) et constitue un groupe monophylétique, c'est à dire, tous les descendants du groupe ont le même ancêtre commun. Les organismes peuplant les trois sous-phylum précédemment décrits se distinguent par la nature de leur squelette. En effet, les éponges calcaires secrètent uniquement des spicules de calcaire et les hexactinellides ne contiennent que des spicules de silice. Cependant, les demosponges, groupe auquel appartient l'éponge étudiée lors de cette thèse, constituent la plus grande classe du phylum Porifera (environ 95% des espèces) et possèdent des squelettes extrêmement diversifiés, constitués de silice et/ou de spongine (protéine fibreuse similaire à la kératine) ; mais les demosponges peuvent aussi être complètement dépourvues de squelette (Oscarellidae).^{11a}

Exclusivement aquatiques, la plupart des éponges sont marines comme toutes les espèces d'hexactinellides et d'éponges calcaires, mais une cinquantaine d'espèces de demosponges qui vivent dans les eaux douces (rivières et lacs) ont été décrites. Les éponges peuvent vivre à toutes les profondeurs, du niveau de la mer jusqu'aux profondeurs abyssales, mais leur répartition se fait en fonction de la nature de leur squelette. En effet, l'éponge a besoin de silice ou de calcaire pour former son squelette, elle est donc dépendante des concentrations de

¹¹ a) Borchiellini, C.; Chombard, C.; Manuel, M.; Alivon, E.; Vacelet, J.; Boury-Esnault, N. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2004**, 32, 823-837. b) Boury-Esnault, N. *Can. J. Zool.* **2006**, 84, 205-224.

silice et de calcium présentes dans l'eau de mer.¹² Ainsi, on trouve majoritairement les éponges à squelette de silice dans les grandes profondeurs et les mers polaires, tandis que l'abondance des espèces calcaires diminue lorsque la profondeur augmente.¹⁰

La classification des éponges est en constant changement tant les formes et les dimensions des éponges peuvent être différentes au sein même d'une espèce. Les identifications d'éponges que nous étudions sont basées sur la classification de 2002 de Hooper et van Soest.¹³ Il existe environ 10 000 espèces déjà décrites, mais bien d'autres sont encore à découvrir puisque la biodiversité marine n'a été que peu étudiée.

1.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires isolés d'éponges marines présentent une grande diversité grâce à l'origine très lointaine des éponges. L'étude de cette diversité peut être mise au service de l'écologie, de la pharmacologie et de la chimiotaxonomie, lors de l'étude d'écosystèmes marins ou de la recherche de nouveaux médicaments par exemple.

1.2.1. Origine et diversité

Toutes les formes de vie sont apparues pour la première fois dans l'eau, y ont évolué et certaines y vivent toujours, des premières bactéries aux mammifères, ce qui explique pourquoi la biodiversité marine soit si riche en comparaison avec la biodiversité terrestre. La biodiversité marine est la source d'une formidable diversité chimique qui attire un nombre croissant d'équipes de recherche aussi bien académiques qu'industrielles.

Environ 37% de ces métabolites secondaires ont été isolés d'éponges marines, 19% d'algues, 18% de cnidaires, 7% de mollusques et 3% de cyanobactéries.¹⁴ L'analyse de toutes ces

¹² Shimizu, K.; Cha, J.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 6234-6238.

¹³ A., H. J. N.; van Soest, R. W. M. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of the Sponges*; Klumer Academic / Plenum Publishers: New York, 2002.

¹⁴ Kornprobst, J. M. **2005**, *Substances d'Origines Marine* (en 2 volumes) Editions TEC & DOC, Paris, 1-1830

données, notamment grâce à la base de données Marinlit, révèle une augmentation de 24% dans la découverte de nouveaux composés marins de 2006 à 2007.¹⁵

Il n'est pas surprenant que les organismes marins, tels que les éponges, incorporent dans leurs métabolites du chlore, du soufre tel que les composés **4** et **5**, ou du brome, tel que les composés **5** et **6** (Figure 6) compte tenu de la composition de l'eau de mer (Tableau 1). Ces éléments sont cependant rarement présents dans les métabolites isolés d'organismes terrestres.

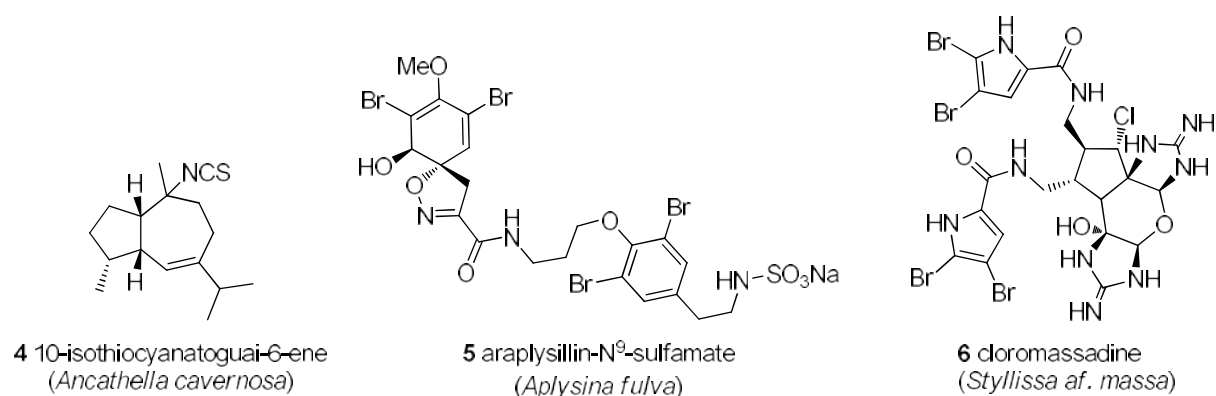


Figure 6 : Exemples de métabolites secondaires isolés de trois éponges marines¹⁵

On peut noter que tous les halogènes présents sous forme d'ions halogénures dans l'eau de mer, le sont à différentes concentrations (Tableau 1). Par ordre d'abondance, on trouve successivement : Cl>Br>F>I. Cependant les composés halogénés naturels isolés d'organismes sont trouvés, par ordre d'abondance, dans un ordre différent : Br>Cl>I>>F.

¹⁵ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 170-244.

Ordres de grandeur	Eléments	ppm	Ordres de grandeur	Eléments	ppm
>10 ³	Cl	18980	De 10 à 1	B	5,00
	Na	10560		Si	4,00
	Mg	1275		F	1,50
De 10 ³ à 10 ²	S	885	De 1 à 10 ⁻¹	N	0,70
	Ca	400		Al	0,50
	K	380		Rb	0,20
De 10 ² à 10	Br	65	De 10 ⁻¹ à 10 ⁻²	Li, P	0,10
	C	30		Ba, I	0,05
	Sr	15		As	0,02

Tableau 1 : Concentration (en ppm) des vingt éléments les plus abondants dans l'eau de mer.
Les éléments oxygène et hydrogène n'y sont pas représentés.

I.2.2. Intérêts pharmacologiques, écologiques et chimiotaxonomiques

Ces dix dernières années, les équipes de recherche se concentrent de plus en plus sur l'étude de microorganismes et d'invertébrés. En effet, ces organismes lents ou sessiles, sans aucune défense physique, ou presque,¹⁶ ont une grande capacité à développer une défense chimique remarquable. De plus, largués dans l'océan les composés de défense sont rapidement dilués et doivent donc être très puissants pour pénétrer rapidement les parois cellulaires du prédateur et ainsi avoir une activité. La mise en évidence de ces mécanismes de défense ainsi que d'autres comportements, comme les partenariats chimiques entre différents organismes, est réalisée par l'étude des métabolites secondaires de ces organismes.

La co-évolution entre organismes vivants a donné lieu à une grande diversification des métabolites secondaires. Cette gamme de composés, est utilisée comme vecteurs de communication chimique entre les organismes et constitue un moyen de lutte contre des concurrents écologiques ; ainsi certaines éponges secrètent des composés anti-adhérents ou

¹⁶ Des études montrent qu'il existe une certaine synergie entre l'utilisation des métabolites secondaires et des spicules en tant que moyen de défense des éponges. Voir : Jones, A. C.; Blum, J. E.; Pawlik, J. R. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2005**, 322, 67-81.

antifouling¹⁷ qui empêchent d'autres organismes de coloniser le même rocher, tels que les composés **7**, **8**, et **9** (Figure 7).

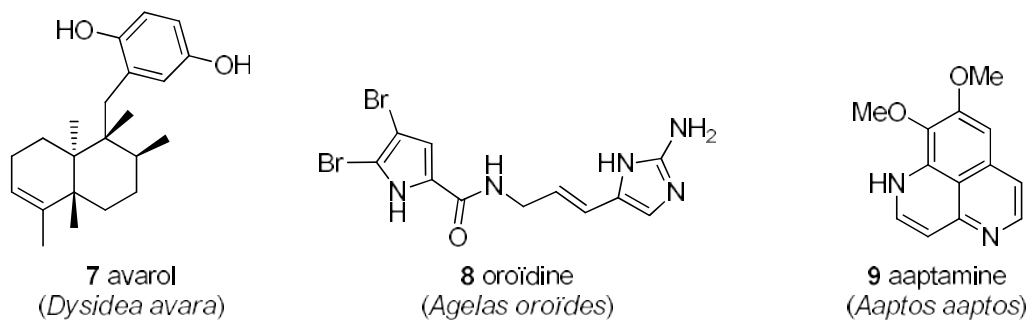


Figure 7 : Exemple de composés isolés d'éponges marines possédant des propriétés antifouling

Les métabolites secondaires peuvent aussi être un moyen de défense contre les prédateurs, comme de nombreux poissons qui se nourrissent d'éponges. L'éponge peut ainsi contenir des substances toxiques ou antiappétantes (**8**) (Figure 7) dissuadant ainsi son prédateur (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).¹⁸

La production de métabolites secondaires peut aussi donner naissance à un réel partenariat entre différentes espèces et/ou différents organismes entraînant la production de facteurs symbiotiques qui permettent communication et reconnaissance de l'hôte, ou la production de métabolites communs utiles aux deux organismes.

En effet, les relations entre les éponges et leurs voisins ne sont pas forcément conflictuelles. Il existe de nombreuses associations de type mutualiste, dans lesquelles chaque partenaire vit en harmonie avec l'autre. De nombreuses éponges servent d'environnement protecteur pour une multitude de petits organismes rassemblés sous le nom de mésosofaune. Ainsi l'éponge tropicale commune *Amphimedon viridis* contribue de façon chimique (grâce à la production de substances toxiques) et, d'une façon moins importante, physique (grâce à ses spicules) à la protection de la mésosofaune qui lui est associée (mesocrustacés, amphipodes...).¹⁹

¹⁷ Fusetani, N. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 400-410.

¹⁸ Duque, C.; Bonilla, A.; Bautista, E.; Zea, S. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 459-467.

¹⁹ Huang, J. P.; McClintock, J. B.; Amsler, C. D.; Huang, Y. M. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2008**, *362*, 95-100.

Le rôle joué par les micro-organismes, en symbiose avec les éponges, fait l'objet de nombreuses études²⁰ en raison de la possibilité ainsi offerte de produire ces métabolites par voie biotechnologique.^{14,21} Les organismes associés utilisent la production de l'éponge et son énergie pour synthétiser des produits qu'ils n'auraient pu synthétiser seuls, de son côté l'éponge tire également profit de leurs présences pour en synthétiser d'autres. Les composés isolés d'éponges sont donc très souvent le fruit d'une chaîne biosynthétique résultant des métabolismes des deux symbiontes. Ceci explique les difficultés rencontrées pour établir l'origine exacte des produits naturels marins d'une part,²² et les difficultés rencontrées pour les faire produire par les microorganismes seuls, d'autre part.

La présence de prédateurs et l'association mutualiste d'organismes ne sont pas les seuls facteurs qui influencent la production de métabolites secondaires. D'autres facteurs externes tels que, la température et la salinité de l'eau, la nature du substrat sur lequel l'éponge s'accroche, la profondeur et le courant, la lumière, la quantité et la qualité des nutriments joue également un rôle important dans cette production.²³

Il est à noter qu'une grande diversité naturelle, telle qu'elle se présente sous les tropiques par exemple, a pour conséquence une compétition plus intense pour la nourriture et donc une sélection naturelle importante, particulièrement pour les espèces les moins bien protégées chimiquement. Ainsi dans les eaux tropicales, 60 à 75% des espèces d'éponges sont toxiques pour les poissons, alors que seulement 9% le sont dans les latitudes plus élevées.²⁴

En prenant en compte leur diversité biologique (éponges calcaires, demosponges, hexactinellides) et leur diversité écologique (les éponges sont présentes dans tous les biotopes aquatiques) il n'est alors pas surprenant que les éponges marines contiennent de nombreuses

²⁰ a) Webster, N. S.; Wilson, K. J.; L., B. L.; Hill, R. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 434-444. b) Wang, G. J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 545-551.

²¹ a) Bell, J. J. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **2008**, *79*, 341-353. b) Piel, J.; Lew, M.; Hung-Wen, L. *Comp. Nat. Prod. II* **2010**, 475-510.

²² Faulkner, D. J.; Unson, M. D.; Bewley, C. A. *Pure Appl. Chem* **1994**, *66*, 1983-1990.

²³ a) Witte, U.; Barthel, D.; Tendal, O. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1994**, *183*, 41-52. b) Duckworth, A. R.; Wolff, C. *W. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2011**, *In Press, Corrected Proof*. c) Duckworth, A. R.; Battershill, C. N.; Schiel, D. *R. Aquaculture* **2004**, *242*, 237-250. d) Wilkinson, C. R.; Vacelet, J. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1979**, *37*, 91-104. e) de Voogd, N. J. *Aquaculture* **2007**, *262*, 54-64.

²⁴ Braekman, J. C.; Daloz, D. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 357-364.

classes chimiques de substances naturelles et ainsi, combinent une formidable chimiodiversité et pharmacodiversité. Cette diversité a conduit les chimistes et les biologistes à chercher un lien entre la nature des métabolites (primaires et secondaires) et leur taxonomie (ordre, famille ou genre). En effet, l'identification biologique des éponges est complexe, et dans ce cas, l'analyse chimique de l'extrait peut permettre plus aisément son identification.

Enfin, les métabolites secondaires isolés d'éponges marines sont très variés et souvent valorisés en biologie et en synthèse. C'est le cas, entre autres, des axinellamines, massadines et de la palau'amine.²⁵ La recherche du rôle écologique de ces intermédiaires est d'une grande importance²⁶ car les études chimiques d'organismes marins peuvent ouvrir la voie à l'étude de marqueurs environnementaux pouvant être suivis en fonction du temps, de l'espace et des conditions climatiques.²⁷ Ces informations peuvent s'avérer capitales pour le diagnostic des effets environnementaux sur les écosystèmes.

²⁵ I. B. Seiple, S. Su, I. S. Young, A. Nakamura, J. Yamaguchi, L. Jorgensen, R. A. Rodriguez, D. P. O'Malley, T. Gaich, M. Köck, P. S. Baran, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14710-14726.

²⁶ Erpenbeck, D.; van Soest, R. W. M. *Mar. Biotechnology* **2007**, *9*, 2-19.

²⁷ Chanas, B.; Pawlik, J. R.; Lindel, T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1997**, *208*, 185-196.

CHAPITRE II
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES PYRROLE-2-
AMINOIMIDAZOLES

CHAPITRE II Étude bibliographique des pyrrole-2-aminoimidazoles (P-2-AIs)

Les pyrrole-2-aminoimidazoles (notés P-2-AIs par la suite) sont une famille d'alkaloïdes marins. Ils ont été jusqu'ici uniquement isolés d'éponges marines et est rencontrée dans les familles d'éponges Agelasidae, Halichondridae et Axinellidae. Environ deux cent molécules de cette grande famille de produits marins sont connues à ce jour. L'étude de la famille des P-2-AIs est un sujet de recherche de première importance pour de multiples raisons :

- Elle constitue une famille très diversifiée, constituée de structures complexes et originales (structures polycycliques, présence de nombreux centres chiraux) ;
- Ces structures posent des questions biosynthétiques intéressantes et sont de véritables challenges synthétiques pour les chimistes organiciens ;
- Les P-2-AIs présentent un grand intérêt pharmacologique grâce à leurs activités biologiques intéressantes et variées.^{3,9,28}

Une première partie présentera la diversité structurale des P-2-AIs puis, une seconde partie traitera de leurs intérêts biologiques, pharmacologiques et écologiques.

II.1. Diversité structurale des pyrroles-2-aminoimidazoles

Les P-2-AIs forment une famille de composés dont le motif structural de base est représenté par l'oroïdine (**8**) (*Figure 8*) et présentent une formule brute en $C_{11}N_5$ pour les monomères centraux de la famille. Ils comprennent un noyau 2-aminoimidazole lié par une chaîne allylique centrale à un motif pyrrole-2-carboxamide. La numérotation utilisée tout au long de ce mémoire sera celle présentée dans la *Figure 8*. Cette numérotation, bien que peu utilisée dans la littérature, suit les règles de l'IUPAC et se révèle très commode aussi bien pour décrire les monomères que les dimères de la famille.

²⁸ a) Köck, M.; Grube, A.; Seiple, I. B.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6586-6594. b) Forte, B.; Malgesini, B.; Piutti, C.; Quartieri, F.; Scolaro, A.; Papeo, G. *Marine Drugs* **2009**, *7*, 705-753. c) Feldman, K. S.; Fodor, M. *Synthesis*. **2009**. 3162-3173 d) Seiple, I. B.; S, S.; Young, I. S.; Lewis, C. A.; Yamaguchi, J.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1095-1098.

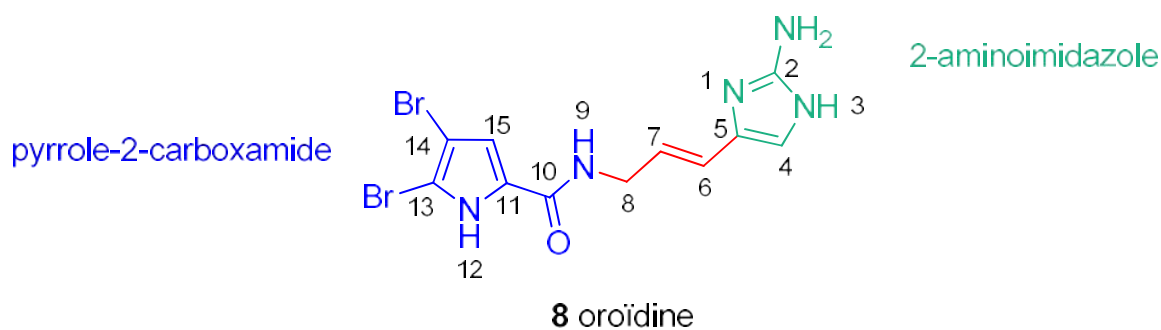


Figure 8 : Numérotation de l'unité de base des P-2-AIs en $C_{11}N_5$ (exemple de l'oroïdine)

La particularité de cette famille de composés réside dans le fait que chaque membre peut être considéré comme un dérivé du monomère oroïdine. On rencontre donc des dérivés oxydés, méthylés, hydratés ou présentant différents degrés de bromation sur le pyrrole. On trouve aussi des molécules plus complexes, polycyclisées et/ou dimérisées qui contribuent à la diversité moléculaire de la famille. Quelques tétramères de cette même famille ont aussi été isolés récemment.²⁹ Tous ces types de composés peuvent être regroupés selon 5 classes de P-2-AIs : Les monomères linéaires, les monomères cyclisés, les dimères simples non cyclisés, les dimères complexes cyclisés et les tétramères.

II.1.1. Les monomères linéaires

Il existe trois types de monomères que l'on considère comme simples :

- Certains composés très simples constitués d'un unique noyau (2-aminoimidazole, pyrrolique ou autre) ;
- Les monomères simples de type oroïdine ;
- Les monomères simples de type dispacamide.

Des métabolites à structure très simple ont été isolés d'éponges marines (**Figure 9**). C'est le cas du 4,5-dibromopyrrole-2-carboxamide (**12**) présent dans de nombreuses éponges du genre *Agelas*, et provenant certainement de la dégradation de P-2-AIs plus complexes.³⁰ Des composés ne possédant qu'un noyau 2-aminoimidazole sont aussi souvent rencontrés. Par

²⁹ Grube, A.; Köck, M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4675-4678.

³⁰ Tada, H.; Tozyo, T. *Chem. Lett.* **1998**, 803-804.

exemple, le 2-aminoimidazole (**13**) isolé d'*Axinella polypoïdes*³¹ et la girolline (**14**) isolée de l'éponge *Cymbastela cantharella*.³² Enfin, des métabolites secondaires ne présentant aucun de ces deux noyaux sont aussi présents. C'est le cas de la pyraxinine (**15**) ; ce composé pourrait néanmoins être relié biogénétiquement aux P-2-AIs.³³

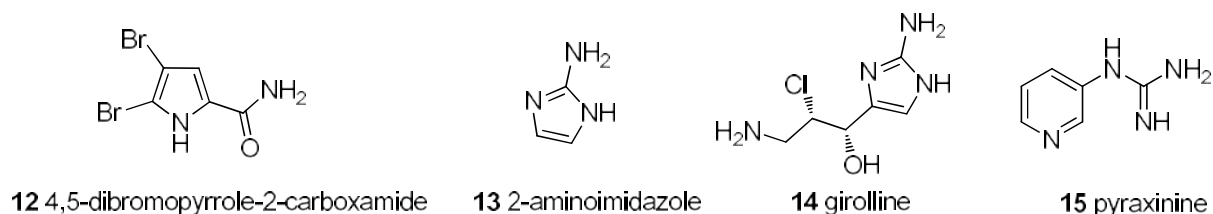


Figure 9 : Structures de métabolites très simples **12**, **13**, **14** et **15** qui seraient biogénétiquement liés aux P-2-AIs

Cependant, le représentant principal des monomères simples de P-2-AIs est l'oroïdine, isolé pour la première fois d'*Agelas Oroides* en 1971.³⁴ C'est le plus abondant des P-2-AIs et le plus fréquemment rencontré dans les éponges. L'oroïdine (**8**) et ses dérivés plus ou moins bromés sont très probablement à l'origine, de la formation des P-2-AIs dimères.³⁵

Des analogues débromés de **8**, tels que l'hyménidine (**16**) et la clathrodine (**17**) ont été isolés respectivement des éponges *Hymeniacidon sp*³⁶ et *Agelas clathrodes*³⁷ (Figure 10). Un analogue méthylé en N12, la sventrine (**18**), a été isolé d'*Agelas sventres*³⁸. Le cas de la kéramadine (**19**) est plus particulier car cette molécule présente une isomérisation Z au niveau de l'oléfine ainsi qu'un noyau imidazole méthylé en N1. Elle a été isolée pour la première fois en 1984 par Nakamura *et coll.* d'une éponge d'Okinawa (*Agelas sp.*) (Figure 10).³⁹

³¹ Cimino, G.; De Stéphano, S.; Minale, L. *Comp. Biochem. Physiol.* **1974**, *47*, 895-897.

³² Ahond, A.; Bedoya-Zurita, M.; Colin, M.; Fizames, C.; Ladoute, P.; Lavelle, F.; Laurent, D.; Poupat, E.; Pusset, J.; Thoison, O.; Potier, P. *C. R. Acad. Sci. Paris, série II* **1981**, *307*, 145-148.

³³ Abou-Jneid, R.; Ghoulami, S.; Martin, M.-T.; Dau, E. T. H.; Travert, N.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3933-3936.

³⁴ Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Fattorusso, E. *J. Chem. Soc. D* **1971**, 1129-1130.

³⁵ Al Mourabit, A.; Potier, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 237-243.

³⁶ Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y. *Experientia* **1986**, *42*, 1176-1177.

³⁷ Morales, J. J.; Rodriguez, A. D. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 629-631.

³⁸ Assman, M.; Zea, S.; Köck, M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1593-1595.

³⁹ Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Kobayashi, J.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2475-2478.

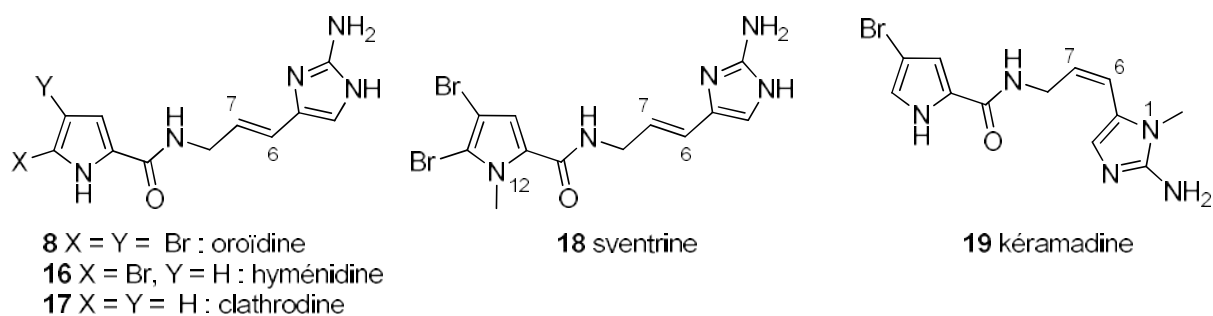


Figure 10 : Structures de P-2-AIs monomères linéaires **16**, **17**, **18** et **19** dérivés de l'oroïdine

Un autre sous-groupe de monomères linéaires est représenté par le dispacamide A (**20**) (Figure 11). Il a été isolé pour la première fois par Fattorusso *et coll.* en 1996 d'*Agelas sp* avec son analogue débromé, le dispacamide B (**21**).⁴⁰ Les composés de ce sous-groupe ont la particularité de posséder une insaturation en position 5-6 et présentent une oxydation supplémentaire sur le noyau imidazole en C4, portant ainsi un noyau imidazolone.

Les dispacamides C (**23**) et D (**24**), portant une fonction hydroxyle en C7 ont aussi été isolés.⁴¹ Notons que le dispacamide C (**23**) n'a pas été isolé énantiomériquement pur mais dans un ratio (7*R*) : (7*S*) 7 : 3 ; le dispacamide D (**24**) ayant été isolé sous forme d'un mélange racémique, la stéréochimie n'est pas précisée dans la Figure 11. Enfin, les débromodispacamides B (**22**) et D (**25**) ont été isolés de l'éponge marine *Agelas mauritiana* au laboratoire.⁴²

Les analogues mukaniidines B (**26**) et D (**27**) comportant un noyau imidazolidine-dione à la place d'un noyau 2-aminoimidazolone ont été isolés respectivement d'*Agelas nakamura*⁴³ et de *Didiscus oxeata*.⁴⁴ En 2000 Fattorusso *et coll.* isolent le taurodispacamide (**28**), présentant un motif taurine en C4.⁴⁵

⁴⁰ Carieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3587-3590.

⁴¹ Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatalata-Scafati, O.; Vallefuoco, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2283-2288.

⁴² Vergne, C.; Appenzeller, J.; Ratinaud, C.; Martin, M.-T.; Debitus, C.; Zapparucha, A.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 493-496.

⁴³ Uemoto, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1581-1583.

⁴⁴ Hu, J. F.; Peng, J.; Kasi, A. B.; Hamann, M. T. *J. Chem. Res.* **2005**, 427-428.

⁴⁵ Fattorusso, E.; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9917-9922.

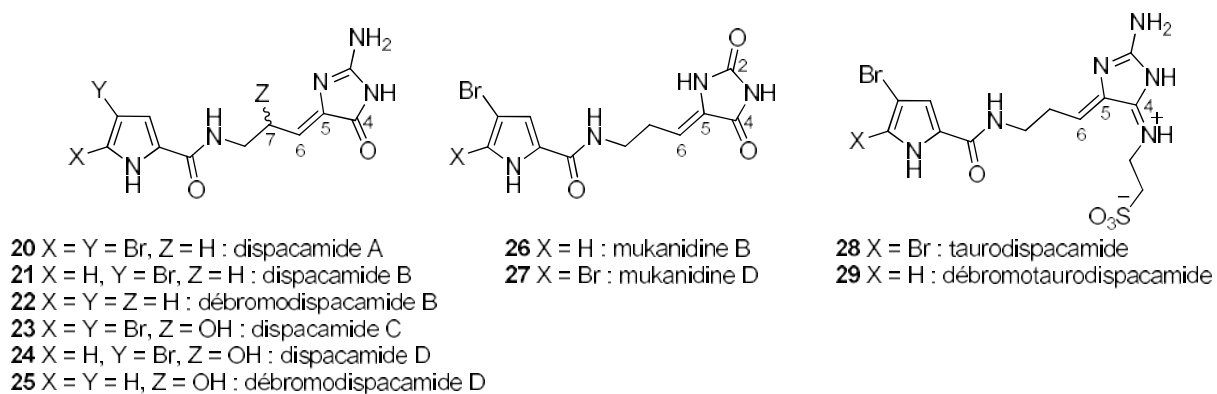


Figure 11 : Structures de P-2-AIs monomères linéaires analogues du dispacamide A

II.1.2. Les monomères cyclisés

Comme indiqué précédemment, chaque membre de cette famille peut être considéré comme un dérivé de monomères simples tels que l'oroidine. En effet, la réactivité ambivalente du motif 2-aminoimidazole permet une grande variété de modes de cyclisation (*Schéma 12*).³⁵

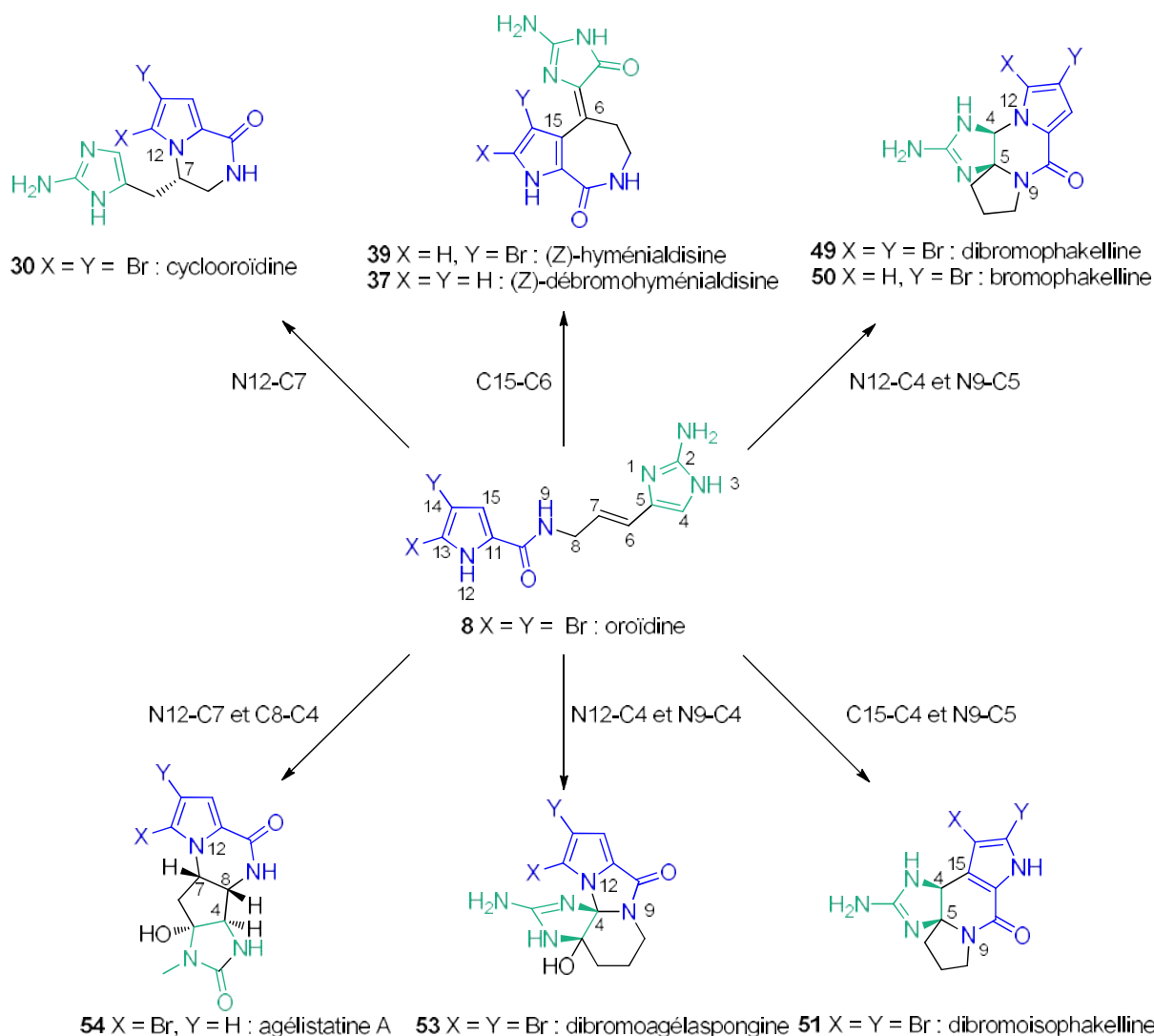


Schéma 12 : Différents modes de cyclisation de l'oroïdine conduisant à des structures non dimériques

➤ Cyclisation en N12-C7

La cyclooroïdine (**30**) isolée d'*Agelas Oroides* en 2000 par Fattorusso *et coll.*⁴⁶ et les agésamides A et B, isolées d'éponges d'Okinawan *Agelas sp* présentent une cyclisation en N12-C7 (*Figure 13*).⁴⁷

De façon différente, la cyclooroïdine, les agésamides (**31** et **32**) comportent un noyau imidazole-2,4-dione au lieu de 2-aminoimidazole.

⁴⁶ Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9917-9922.

⁴⁷ Tsuda, M.; Yasuda, T.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Sekiguchi, M.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4235-4238.

Des dérivés plus simples, tels que les longamides A (**33**) et B (**34**) isolés respectivement d'*Agelas longissima*⁴⁸ et d'*Agelas dispar*⁴⁹, ne présentent pas de noyau 2-aminoimidazole. Ils présentent respectivement une fonction alcool en C7 ou une fonction carboxylate en C6.

La muknanadine C (**35**), analogue bromé du composé **33** a été isolée d'*Axinella carteri*⁵⁰ et l'hanishine (**36**), analogue estérifié de **34** a été isolé d'*Acanthella carteri*.⁵¹ Il est à noter que le longamide B (**34**) et l'hanishine (**36**) ont été isolés en mélange des deux énantiomères.

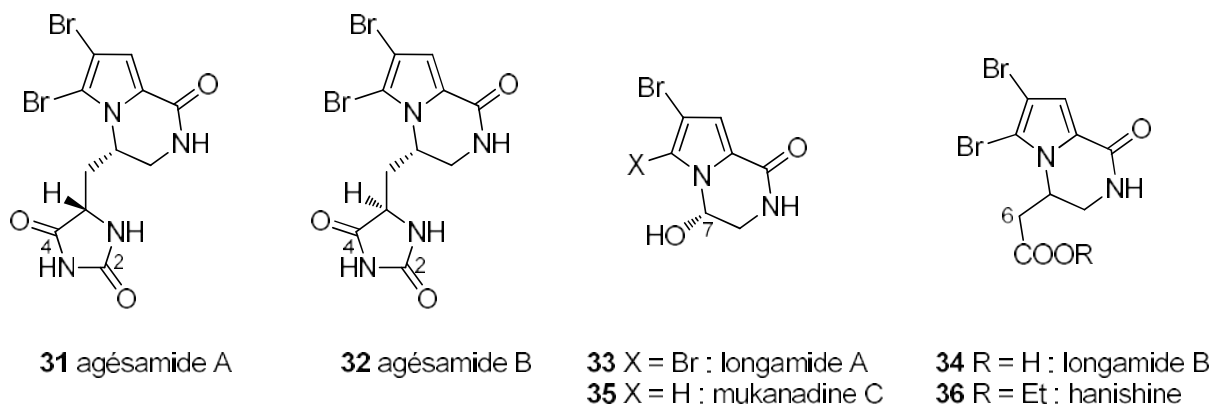


Figure 13 : Structures de P-2-AIs monomères analogues de la cyclooroidine

➤ Cyclisation en C15-C6

Le composé le plus abondant, cyclisé en C15-C6, est la (*Z*)-débromohyménialdisine (**37**) (*Figure 14*). Cette molécule présente une double liaison en 5-6 avec les deux géométries (*Z*) et (*E*) (**38**). Les deux composés (*Z*)-hyménialdisine (**39**) et (*E*)-hyménialdisine (**40**) ont été isolés de nombreuses éponges des familles Agelasidae et Axinellidae.⁵² La conversion de (*E*) en (*Z*) est très souvent observée et est dépendante du pH et de la concentration ; la (*Z*)-hyménialdisine (**39**) est la plus abondante car plus stable thermodynamiquement.⁵³

Quatre analogues structurellement reliés aux hyménialdisines mais possédant un noyau imidazolidine-2,4-dione (ou hydantoïne) au lieu du noyau 2-aminoimidazolinone ont aussi été découverts. Les (*E*)-axinohydantoïnes (**41**) et (*E*)-débromoaxinohydantoïnes (**42**) ont été

⁴⁸ Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7893-7896.

⁴⁹ Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Tagliatalata-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **1998**, *38*, 6271-6274.

⁵⁰ Li, C.-J.; Schmidz, F. J.; Kelly-Borges, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 387-389.

⁵¹ Mancini, I.; Guella, G.; Amade, P.; Roussakis, C.; Pietra, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6271-6274.

⁵² Voir par exemple : Kitawaga, I.; Kobayashi, J.; Kitanaka, K.; Kido, K.; Kyogoku, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2321-2328.

⁵³ Williams, D. H.; Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Lett.* **1996**, *9*, 57-64.

isolées d'une *Axinella sp.*⁵⁴ et de *Monanchora sp.* (Figure 14).⁵⁵ Deux années plus tard, les (*Z*)-axinohydantoïne (**43**) et (*Z*)-débromoaxinohydantoïne (**44**) ont été isolées de l'éponge *Stylotella aurantium* et d'une *Hymeniacion sp.*⁵⁶

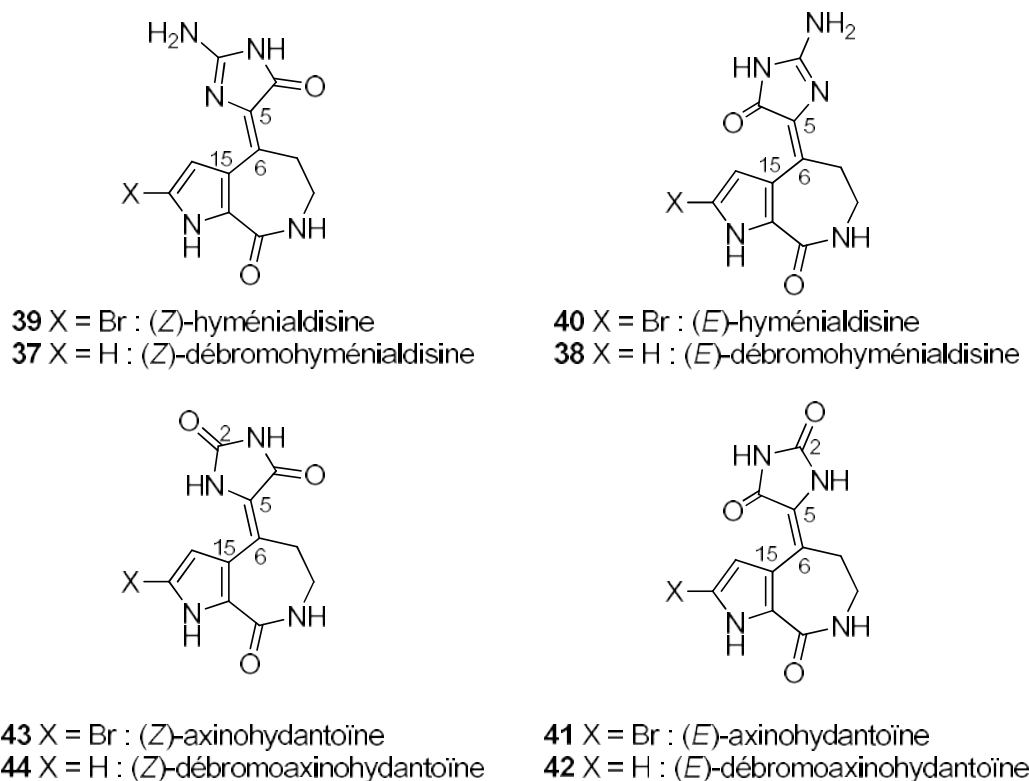


Figure 14 : Structures de P-2-AIs cyclisés **37** à **44** en C15-C6 analogues de l'hyménialdisine

Enfin, d'autres monomères comportant la cyclisation C15-C6 ont été isolés. C'est le cas de l'odiline (**45**) (ou stevensine) (Figure 15) décrite simultanément par Potier⁵⁷ et Faulkner⁵⁸. Cette molécule présente une insaturation en 6-7 (au lieu de 5-6 pour les analogues de

⁵⁴ Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Leet, J. E.; Gupta, R.; Schaufelberger, D. E.; Bates, R. B.; Clewlow, P. J.; Doubek, D. L.; Manfredi, K. P.; Rützler, K.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P.; Ward, F. B.; Bruck, M.; Camou, F. *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1621-1624.

⁵⁵ Groszek, G.; Kantoci, D.; Pettit, G. R. *Liebigs Ann.* **1995**, *1995*, 715-716.

⁵⁶ a) Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Killmer, L.; Hofmann, G.; Johnson, R. K. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *9*, 201-207. b) Inaba, K.; Sato, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 693-695.

⁵⁷ de Nanteuil, G.; Ahond, A.; Guilhem, J.; Poupat, C.; Dau, E. T. H.; Potier, P.; Pusset, M.; Pusset, J.; Laboute, P. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 6019-6033.

⁵⁸ Albizati, K. F.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4163-4164.

l'hyménialdisine). L'aldisine (**46**) et la 2-bromoaldisine (**47**) ne possèdent qu'une fonction cétone au lieu du noyau 2-aminoimidazolinone.⁵⁹

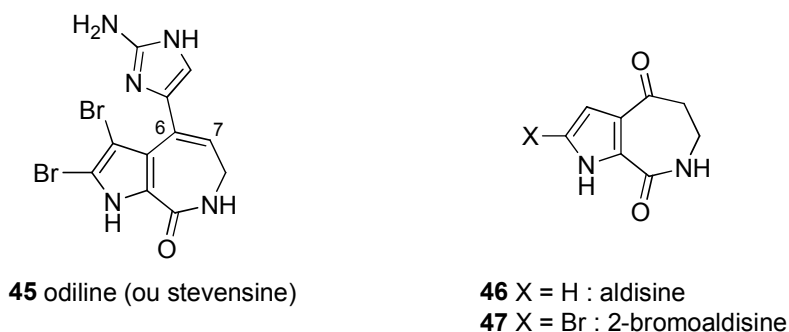


Figure 15 : Structures de P-2-AIs **45** à **47** cyclisés en C15-C6 : l'odiline et les aldisines

➤ Cyclisation en N12-C4/N9-C5 et N15-C4/N9-C5 : les phakellines

Parmi ces P-2-AIs monomères tétracycliques, on trouve la (-)-dibromophakellstatine (**48**) (Figure 16) isolée de l'éponge *Phakellia mauritiana* dans l'océan Indien par Pettit *et al.*⁶⁰ Elle comporte un noyau imidazolidinone au lieu du noyau 2-aminoimidazole des (-)-dibromophakelline (**49**) et (-)-bromophakelline (**50**) isolées de l'éponge *Phakellia flabellata*.⁶¹

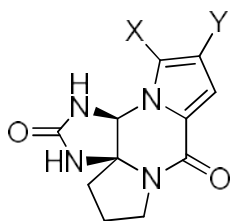
Leur isomère de position, la (-)-dibromoisophakelline (**51**) cyclisée en C15-C4/N9-C5, a été isolé de l'éponge *Acanthella carteri*.⁶² Le stéréoisomère (+)-dibromocantharelline (**52**) de la (-)-dibromophakelline a été isolé de l'éponge *Pseudaxynissa cantharella*.⁵⁷

⁵⁹ Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Lakshmi, V.; Tillekeratne, L. M. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 47-53.

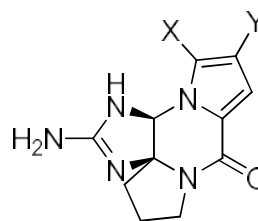
⁶⁰ Boyd, M. R.; Pettit, G. R.; Mc Nulty, J.; Herald, D. L.; Doubek, D. L.; Chapuis, J.-C.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 180-183.

⁶¹ Sharma, G.; Magdoff-Fairchild, B. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 4118-4124.

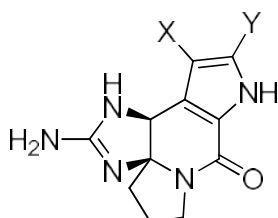
⁶² Fedoreyev, S. A.; Utkina, N. K.; Ilyin, S. G.; Reshetnyak, M. V.; Maximov, O. B. *Tetrahedron. Lett.* **1986**, *27*, 3177-3180.



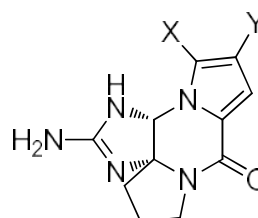
48 X = Y = Br : (-)-dibromophakellstatine



49 X = Y = Br : (-)-dibromophakelline
50 X = H, Y = Br : (-)-bromophakelline



51 X = Y = Br : (-)-dibromoisophakelline



52 X = Y = Br : (+)-dibromocantharelline

Figure 16 : Structures de P-2-AIs **48** à **52** tétracycliques analogues de la dibromophakellstatine

➤ Cyclisation en N12-C4/N9-C4 et N12-C7/C8-C4

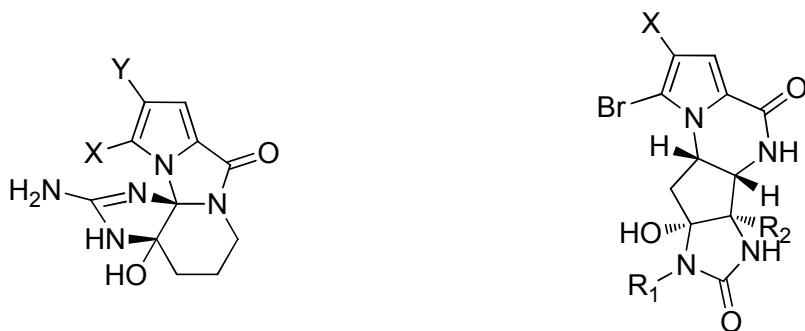
Une cyclisation en N12-C4/N9-C4 conduit à la dibromoagelaspongine (**53**) (Figure 17). Elle est l'unique représentant de ce type de composé et a été isolée d'*Agelas sp.*⁶³ Elle possède un cycle unique à cinq chaînons accolés au noyau pyrrole.

La famille des agélastatines (Figure 17), quant à elle, compte 4 congénères différemment bromés, méthylés et hydroxylés, les composés **54** à **57**. Ces composés comportant une cyclisation en N12-C7/C8-C4 ont été isolés de plusieurs éponges dont *Agelas dendromorpha*.^{64,65}

⁶³ Fedoreyev, S. A.; Ilyin, S. G.; Utkina, N. K.; Maximov, O. B.; Reshetnyak, M. V.; Antipin, M. Y.; Struchkov, Y. T. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3487-3492.

⁶⁴ a) D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Debitus, C.; Ribes, O.; Pusset, J.; Leroy, S.; Pietra, F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1305-1306. b) Hong, T. W.; Jimenez, D. R.; Molinski, T. F. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 158-161.

⁶⁵ S. Tilvi, C. Moriou, M.-T. Martin, J.-F. Gallard, J. Sorres, K. Patel, S. Petek, C. Debitus, L. Ermolenko and A. Al-Mourabit, *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 720-723.



- 53** X = Y = Br : dibromoagélaspongine **54** X = R₂ = H, R₁ = Me : agélastatine A
55 X = Br, R₁ = Me, R₂ = H : agélastatine B
56 X = H, R₁ = Me, R₂ = OH : agélastatine C
57 X = R₁ = R₂ = H : agélastatine D

Figure 17 : Structures de P-2-AIs tétracycliques **53** à **57** : l'agélaspongine et les agélastatines

Enfin, les structures tétrahydrofuro-imidazolidinones des slagénines A à C, composés **58** à **60** (Figure 18), ont été isolées d'*Agelas nakamurai*.⁶⁶ On peut noter l'inversion de stéréochimie des positions 4 et 5 entre les slagénines A (**58**) et B (**59**) et la slagénine C (**60**).

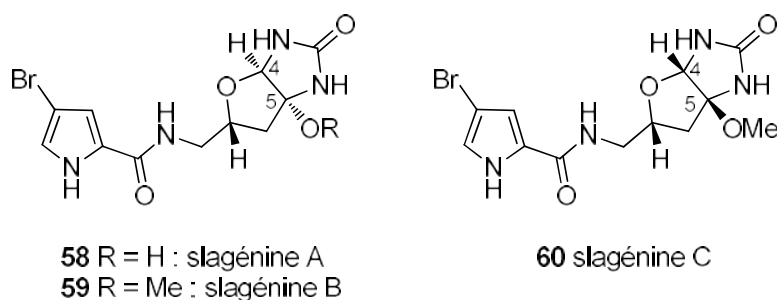


Figure 18 : Structures de P-2-AIs cyclisés **58** à **60** : les slagénines

II.1.3. Les dimères simples

La réactivité ambivalente du motif 2-aminoimidazole de l'oroïdine rend aussi possible des réactions intermoléculaires, donnant ainsi naissance aux dimères simples ou, après des cyclisations supplémentaires, aux dimères complexes polycyclisés.

⁶⁶ Tsuda, M.; Uemoto, H.; Kobayashi, J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5709-5712.

Les dimères simples résultent d'une simple dimérisation entre deux motifs monomères, c. à d. les deux motifs monomères sont reliés entre eux par une ou deux liaisons maximum. Cette dimérisation peut cependant s'effectuer à différents endroits de la structure du monomère.

Ainsi, il existe des dimères formés par liaison C-C et d'autres, isolés récemment, formés par liaison C-N. Il est important de noter que cette considération purement structurale est donnée afin d'améliorer la lisibilité globale des P-2-AIs dimériques. Il existe une grande variété de ces dimères. Nous allons passer en revue certains d'entre eux qui illustrent particulièrement la diversité de la famille.

➤ Dimères simples formés par liaison C-C

La mauritiamine (**61**) isolée par Fusetani *et coll.*⁶⁷ d'*Agelas mauritiana* apparaît comme un dimère de l'oroïdine et du dispacamide. Ces deux motifs sont reliés entre eux, respectivement par les positions 4 et 5' (*Figure 19*). La mauritiamine a été isolée en mélange racémique. Kobayashi a, lui, isolé les nagélamides B (**62**) et D (**63**) de l'éponge *Agelas sp.*⁶⁸ récoltée à Okinawa. Ces composés proviennent de la dimérisation directe de l'oroïdine par création de la liaison 4-6'.

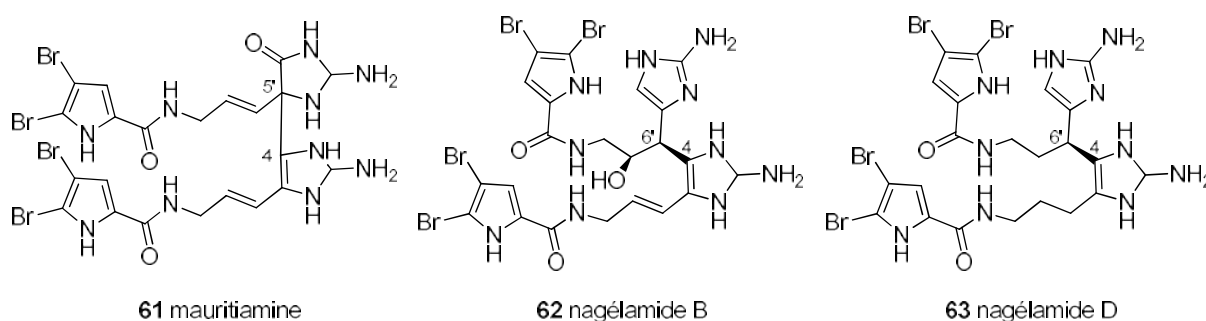


Figure 19 : Structures de la mauritiamine (**61**) et des nagélamides B (**62**) et D (**63**)

D'autres nagélamides résultent d'une dimérisation simple entre deux motifs monomères, mais certains de ces motifs ont subi des transformations. C'est le cas des nagélamides J (**64**), L (**65**) et T (**66**) (*Figure 20*). Le nagélamide J (**64**), possédant un cyclopentane *cis*-fusionné au cycle 2-aminoimidazole adjacent a été isolé d'*Agelas sp.* par Kobayashi.⁶⁹ Le nagélamide L (**65**)

⁶⁷ Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501-503.

⁶⁸ Endo, T.; Tsuda, M.; Okada, T.; Mitsuhashi, S.; Shima, H.; Kikuchi, K.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1262-1267.

⁶⁹ Araki, A.; Tsuda, M.; Kubota, T.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2369-2371.

pourrait provenir du nagélamide B.⁷⁰ Enfin, le nagélamide T (**66**), entièrement débromé, isolé d'*Agelas sp.* présente une oxazoline au lieu de la chaîne linéaire centrale.⁷¹

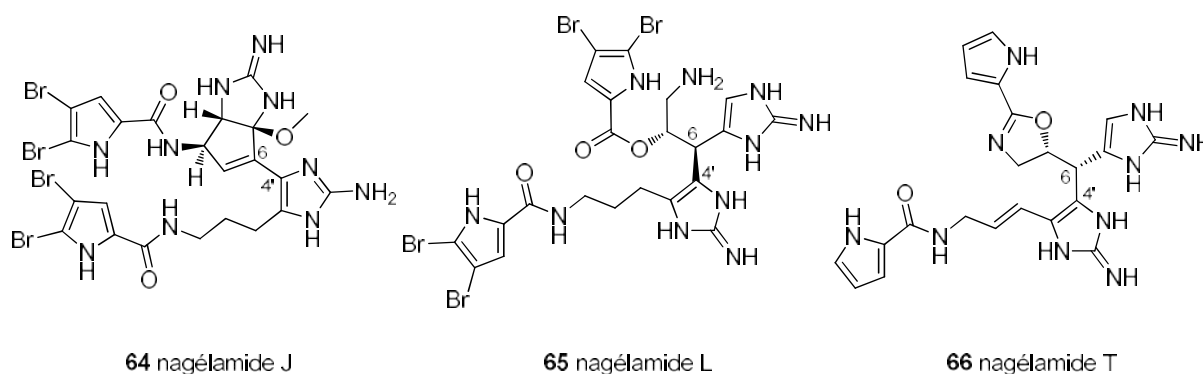


Figure 20 : Structures de P-2-AIs dimériques simples : les nagélamides J, L et T

Un autre composé, tout à fait différent des précédents, la sceptrine (**67**), est aussi considéré comme un dimère simple car il provient de la condensation de deux motifs hyménidine (**16**) en C7-C7' et C6-C6' (Figure 21). Cette structure a été isolée pour la première fois par Faulkner et Clardy en 1981 d'*Agelas sceptrum*.⁷² C'est un P-2-AIs dimérique, de symétrie C2. Il peut être considéré comme la forme stable du dimère simple C7-C7' qui n'a, jusqu'à aujourd'hui, jamais encore été isolé, Ceci alors que la grande majorité des P-2-AIs dimères complexes comportent cette liaison C7-C7'.

Dérivées de la sceptrine, les benzosceptrines A (**68**), B (**69**) et C (**70**)^{71,73} ont été découvertes au laboratoire et présentent des structures réellement originales par la présence d'un squelette benzocyclobutane.

⁷⁰ Araki, A.; Kubota, T.; Tsuda, M.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2099-2102.

⁷¹ Appenzeller, J.; Tilvi, S.; Martin, M.-T.; Gallard, J.-F.; El-bitar, H.; Dau, E. T. H.; Debitus, C.; Laurent, D.; Moriou, C.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4874-4877.

⁷² Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; Van Engen, D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6772-6773.

⁷³ Tilvi, S.; Moriou, C.; Martin, M.-T.; Gallard, J.-F.; Sorres, J.; Patel, K.; Petek, S.; Debitus, C.; Ermolenko, L.; Al-Mourabit, A. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 720-723.

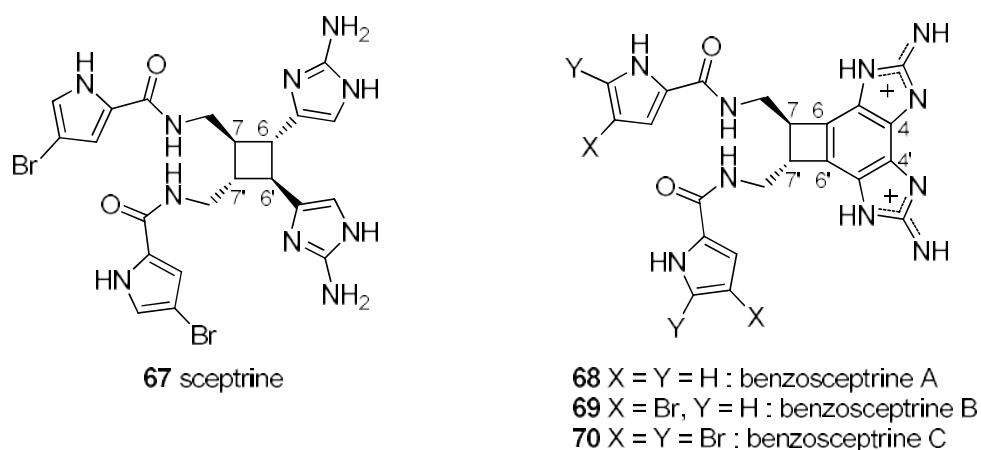
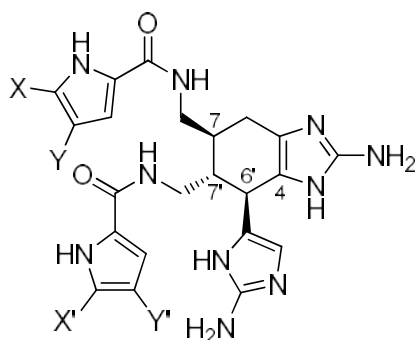


Figure 21 : Structure de la scepтрine (67) et des benzoscepтрines a, B et C (68 à 70)

Enfin, les agéliférines (71 à 73) (Figure 22) sont des composés isolés de l'éponge *Agelas conifera* et qui comportent un cyclohexène central fusionné avec l'un des noyau 2-aminoimidazole obtenu par deux cyclisations 7-7' et 4-6'.⁷⁴



71 Y = Y' = Br, X = X' = H : agéliférine
 72 Y = X' = Y' = Br, X = H : bromoagéliférine
 73 X = Y = X' = Y' = Br : dibromoagéliférine

Figure 22 : Structures des P-2-AIs dimère simples : les agéliférines

II.1.4. Les dimères complexes polycycliques

Comme indiqué précédemment, les dimères complexes polycycliques proviennent d'une dimérisation simple de deux motifs oroïdine, pour former la liaison 7-7', suivie d'une ou de

⁷⁴ a) Keifer, P. A.; Schwartz, R. E.; Koker, M. E. S.; Hughes, R. G.; Rittschof, D.; Rinehart, K. L. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2965-2975. b) Rinehart, K. L. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 525-528.

plusieurs cyclisations. La grande majorité de ces structures polycycliques possèdent un cyclopentane central, exception faite des stylissazoles (**74** à **76**).⁷⁵

Ces composés, récemment isolés de l'éponge *Stylissa Carteri*, présentent différents types de liaisons C-N (Figure 23). Le stylissazole A (**74**) présente une liaison C4-N3' entre un motif hyménidine et un motif (Z)-débromohyménialdisine. Le stylissazole B (**75**) présente une liaison C7-N3' entre ces deux mêmes motifs. Il est à noter que la stéréochimie du centre C7 n'a pas été déterminée. Enfin, le stylissazole C (**76**), présente une complexité supplémentaire de par une attache double entre les deux motifs en 2'-NH₂-C6 et N3'-C7.

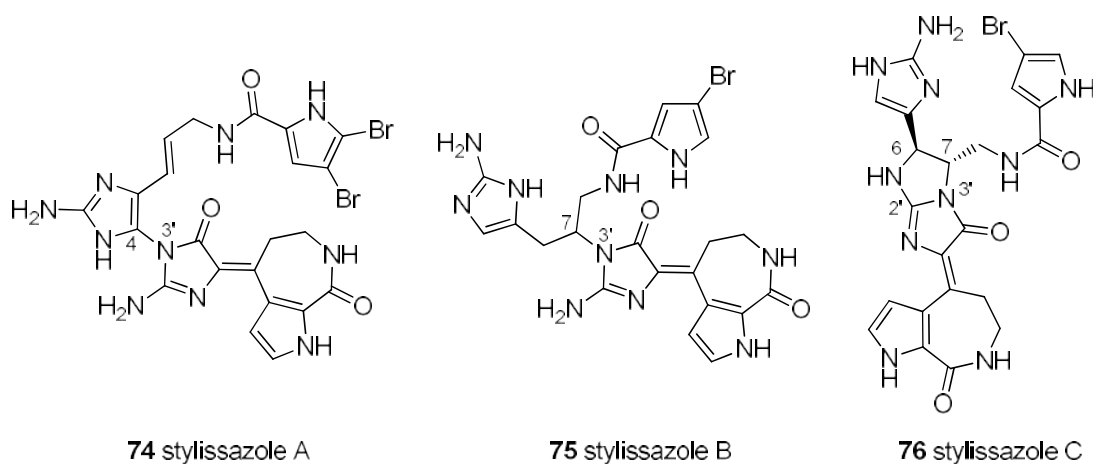


Figure 23 : Structures des stylissazoles A (**74**), B (**75**) et C (**76**)

Tous les P-2-AIs dimériques qui seront présentés dans la suite de cette section présentent un très haut degré de complexité moléculaire (environ 8 centres asymétriques) et peuvent être considérés comme reliés structurellement à un précurseur commun.³⁵ En effet, les massadines (**6** et **77**), palau'amines (**78**), axinellamines (**79** à **83**) et autres possèdent tous un cyclopentane central (Schéma 24).

⁷⁵ Patel, K.; Laville, R.; Martin, M.-T.; Tilvi, S.; Moriou, C.; Gallard, J.-F.; Ermolenko, L.; Debitus, C.; Al-Mourabit, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4775-4779.

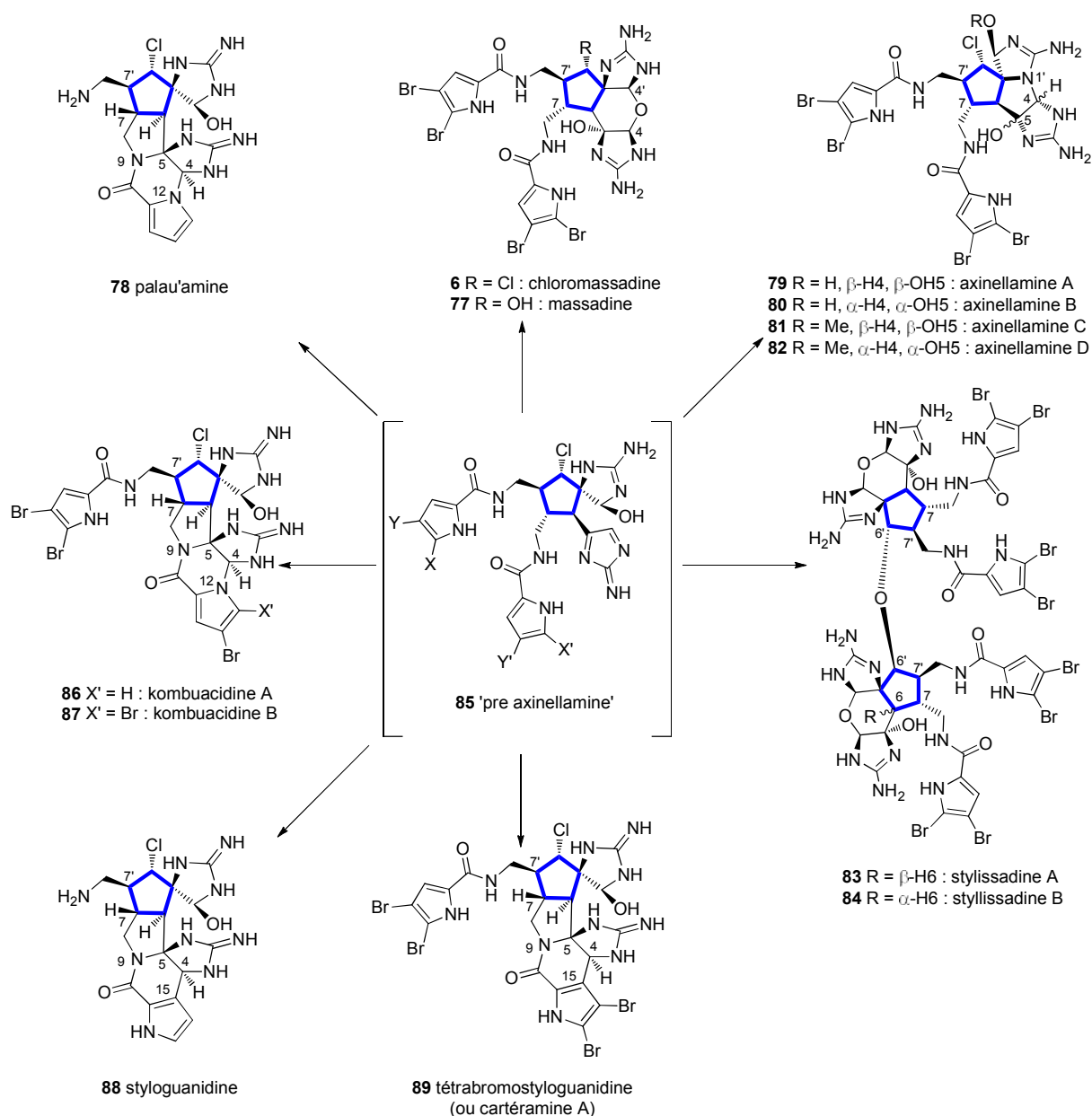


Schéma 24 : P-2-AIs dimères complexes structurellement reliés

➤ Les dérivés de la massadine

La massadine (**77**), le seul dimère complexe de P-2-AI hydroxylé en position 6, a été isolé pour la première fois en 2003 par Fusetani *et coll.* de l'éponge *Stylissa* aff. *Massa*.⁷⁶

Son analogue chloré, la chloromassadine (**6**), a été isolé quatre années plus tard par Köck et Baran en 2007 et s'est révélé être le précurseur de la massadine.⁷⁷ Romo avait déjà prédit en

⁷⁶ Nishimura, S.; Matsunaga, S.; Shibasaki, M.; Suzuki, K.; Furihata, K.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *Org. Lett.* **2003**, 5, 2255-2257.

⁷⁷ Grube, A.; Immel, S.; Baran, P. S.; Köck, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6721-6724.

2006 le rôle précurseur de la chloromassadine pour la massadine.⁷⁸ Ces deux dimères se composent en plus du cyclopentane central, d'un motif tétrahydropyrane provenant d'une cyclisation supplémentaire par une fonction oxygénée en C4-C4'.

Franchissant un degré de complexité supplémentaire, les stylissadines (**83** et **84**) sont les uniques membres tétramères de la famille des P-2-AIs isolés jusqu'ici. Ils sont constitués de deux unités de type « massadine » liées entre elles par une liaison éther entre leurs deux positions 6'. La stylissadine A (**83**) (Schéma 24) provient d'une condensation formelle entre deux massadines et possède une symétrie C_2 . La stylissadine B (**84**), par contre, n'a pas de symétrie C_2 car le centre C6 de sa deuxième unité « massadine » a la configuration opposée.^{79,29}

➤ Les axinellamines

Les axinellamines A-D (**79** à **83**) ont été isolées en 1999 d'*Axinella* sp.⁸⁰ Leurs structures tétracycliques sont composées du cyclopentane central fusionné à un noyau pyrrolidinique provenant d'une cyclisation en N1'-C4.

➤ La palau'amine et ses proches congénères

Le composé hexacyclique palau'amine (**78**) a été isolé pour la première fois par Scheuer *et coll.* de l'éponge *Stylotella agminata*.⁸¹ Il possède deux cyclisations supplémentaires en N9-C5 et N12-C4 par rapport à l'intermédiaire encore non isolé pré-axinellamine (**85**) et est dépourvu d'un groupement pyrrole-2-carboxyle. Sa configuration initiale, décrite par Scheuer, impliquait une jonction de cycle *cis* azabicyclo[3.3.0]octane ainsi qu'une relation *cis* entre l'atome de chlore en C6' et la chaîne aminométhyle en C7'.

⁷⁸ Wang, S.; Dilley, A. S.; Poullennec, K. G.; Romo, D. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7155-7161.

⁷⁹ Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2309-2317.

⁸⁰ Urban, S.; de Almeida Leone, P.; Carroll, A. R.; Fechner, G. A.; Smith, J.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 731-735.

⁸¹ Kinnel, R. B.; Gehrken, H. P.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3376-3377.

Cependant, après isolement de la cartéramine A, Kobayashi *et coll.*⁸² ont envisagé de réviser la stéréochimie de cette structure. Par la suite, Köck *et coll.*, à l'aide de calculs (rDG/DDD)⁸³ sur un congénère proche, la tétrastyloguanidine, et enfin Quinn *et coll.*⁸⁴, qui a résolu la palau'amine, ont confirmé cette révision. Ainsi, on a finalement attribué à la paulau'amine une jonction de cycle *trans*, moins favorable thermodynamiquement, ainsi qu'une relation *trans* entre l'atome de chlore en C6' et la chaîne aminométhyle en C7'.

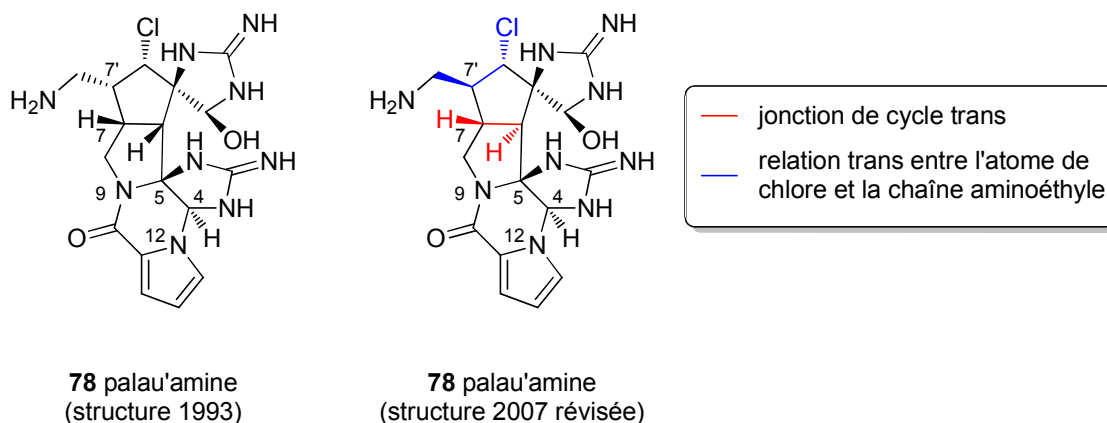


Figure 25 : Structure ancienne (1993) et révisée (2007) du composé **78**

Les congénères de type kombuacidines A (**86**) et B (**87**) (Schéma 24) sont issus des mêmes cyclisations que pour la palau'amine mais comportent la chaîne pyrrolocarboxamide. La kombu'acidine A (**86**) a été isolée d'*Hymeniacidon* sp.⁸⁵

Enfin, les styloguanidines (**88**) (non bromées, mono- et dibromées)⁸⁶ et la tétrabromostyloguanidine (**89**) (ou cartéramine A),⁸⁷ présentant une cyclisation C15-C4 au lieu de N12-C4 ont été isolées respectivement des éponges *Stylorella aurantium* et *Stylissa carteri*.

⁸² Kobayashi, H.; Kitamura, K.; Nagai, K.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2127-2129.

⁸³ Grube, A.; Köck, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2320-2324.

⁸⁴ Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Quinn, R. J. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4573-4574.

⁸⁵ Kobayashi, J.; Suzuki, M.; Tsuda, M. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15681-15684.

⁸⁶ Kato, T.; Shizuri, Y.; Izumida, H.; Yokoyama, A.; Endo, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2133-2136.

⁸⁷ Kobayashi, H.; Kitamura, K.; Nagai, K.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2127-2129.

II.2. Intérêts biologique, pharmacologique et écologique des pyrroles-2-aminoimidazoles

Les activités biologiques des P-2-AIs sont très variées. En règle générale, que les différentes équipes de recherche suivent un fractionnement bioguidé ou non, les nouveaux composés isolés sont testés après avoir été caractérisés. Il ne résulte pas de tendance générale pour la famille des P-2-AIs.^{88,3} Les activités les plus communes de ces molécules sont énoncées dans les paragraphes suivants. Il est à noter que seules les activités des produits naturels (sans prendre en compte leurs analogues synthétiques) seront présentées ci-dessous.

II.2.1. Rôle écologique : Les P-2-AIs antiappétants

Le rôle écologique des P-2-AIs a commencé à être étudié dans les années 90 quand il a été compris que les défenses physiques des éponges, notamment les spicules, n'étaient pas assez efficaces pour dissuader les prédateurs de s'en nourrir. La première étude date de 1996,⁸⁹ quand l'oroïdine (**8**) et l'acide 4,5-bromopyrrole-2-carboxylique (**90**), (composants majoritaires d'éponges du genre *Agelas*) ont été étudiés et leur effet inhibiteur, sur la prise de nourriture des poissons prédateurs d'éponges (notamment les poissons de récifs dont le *Thalassomia bifasciatum*), a été mis en évidence. De même, l'odiline (**45**), présente en grande quantité dans l'éponge *Axinella corrugata*⁹⁰, possède les mêmes propriétés de dissuasion (*Figure 26*).

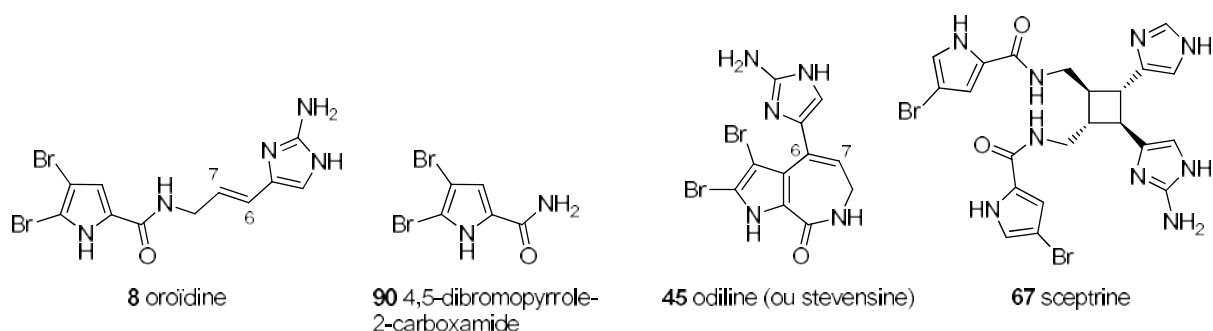


Figure 26 : Exemple de P-2-AIs inhibiteurs de la prise de nourriture

⁸⁸ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 1-49.

⁸⁹ Chanas, B.; Pawlik, J. R.; Lindel, T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1997**, *208*, 185-196.

⁹⁰ Wilson, D. M.; Puyana, M.; Fenical, W.; Pawlik, J. R. *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 2811-2823-2823.

Une autre étude a montré que plus la molécule comporte un nombre important d'atomes de brome, plus l'effet inhibiteur sur la prise de nourriture des prédateurs est important.⁹¹ De ces quelques informations, il est clair que les P-2-AIs jouent un rôle de défense chimique au sein de l'éponge ; cependant il reste une zone d'ombre. En effet, il a été montré que la combinaison de plusieurs P-2-AIs n'a aucun effet synergique sur l'activité défensive de ces molécules ;⁹² de plus, certains P-2-AIs sont biosynthétisés en quantité extrêmement faible. Ainsi, la question se pose d'elle-même : pourquoi les éponges produisent-elles une si grande variété de P-2-AIs?

II.2.2. Les P-2-AIs antibiotiques/antifouling

Parmi les P-2-AIs, nombre d'entre eux montrent des activités antibactériennes et antimicrobiennes qui impliquent souvent des activités antibiofilm et antifouling. Une sélection des P-2-AIs les plus actifs est présentée dans cette section.

L'oroïdine (**8**) inhibe la métamorphose de la larve de barnacle *Balanus amphitrite* ($DE_{50} = 19 \mu\text{g/mL}$)⁶⁷ et possède une activité antibiofilm contre l' α -protéobactérie marine adhérente *Rhodospirillum salexigens* avec un $CI_{50} = 63 \mu\text{g.cm}^{-2}$,⁹³ et contre la γ -protéobactérie *Pseudomonas aeruginosa* ($CI_{50} = 190 \mu\text{M}$ pour PA01, $CI_{50} = 166 \mu\text{M}$ pour PA14) responsable de la mort des patients atteints de mucoviscidose.⁹⁴

Les agéliférines (**71**, **72**, **73**) (différemment bromées) possèdent des activités antibiotiques et inhibitrices de biofilms, notamment sur *R. salexigens* avec un $CI_{50} = 1,7 \mu\text{g.cm}^{-2}$ pour la bromoagéliférine.^{74b,93}

La sceptrine (**67**) a montré en 1991 une inhibition du développement de *Bacillus subtilis* et *Escherichia Coli* ainsi qu'une inhibition modérée de l'accrochage du barnacle *Balanus amphitrite* à $44 \mu\text{g/mL}$.^{74a} Puis elle a été testée de nouveau sur *B. subtilis* avec l'agéliférine (**71**) en 1999, lors de l'isolement de l'acide nakamurique (**91**) et de son ester associé (**92**). À

⁹¹ Assman, M.; Lichte, E.; Pawlik, J. R.; Köck, M. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, *207*, 255-262.

⁹² Lindel, T.; Hoffmann, H.; Hochgürtel, M.; Pawlik, J. R. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1477-1496-1496.

⁹³ Yamada, A.; Kitamura, H.; Yamaguchi, K.; Fukuzawa, S.; Kamijima, C.; Yazawa, K.; Kuramoto, M.; Wang, G.-Y.-S.; Fujitani, Y.; Uemura, D. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 3061-3069.

⁹⁴ Richards, J. J.; Huigens Iii, R. W.; Ballard, T. E.; Basso, A.; Cavanagh, J.; Melander, C. *Chem. Commun.* **2008**, 1698-1700.

une concentration de 0,2 μmol , la sceptrine (**67**) et l'agéliférine (**71**) sont alors décrites avec des activités respectives de 16 et 14 mm de zones d'inhibition tandis que l'acide nakamurique (**91**) et son ester associé présentent chacun 9 mm de zone d'inhibition.⁹⁵

Certains dimères complexes, comme la palau'amine (**78**), les styloguanidines (**88**, **89**) et les axinellamines B (**80**) et D (**82**), montrent eux aussi de bonnes activités. La palau'amine (**78**) possède une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* ainsi qu'une activité antifongique, avec 24 mm de zone d'inhibition, à 50 $\mu\text{g}/\text{disque}$, contre *Penicillium notatum*.⁸¹

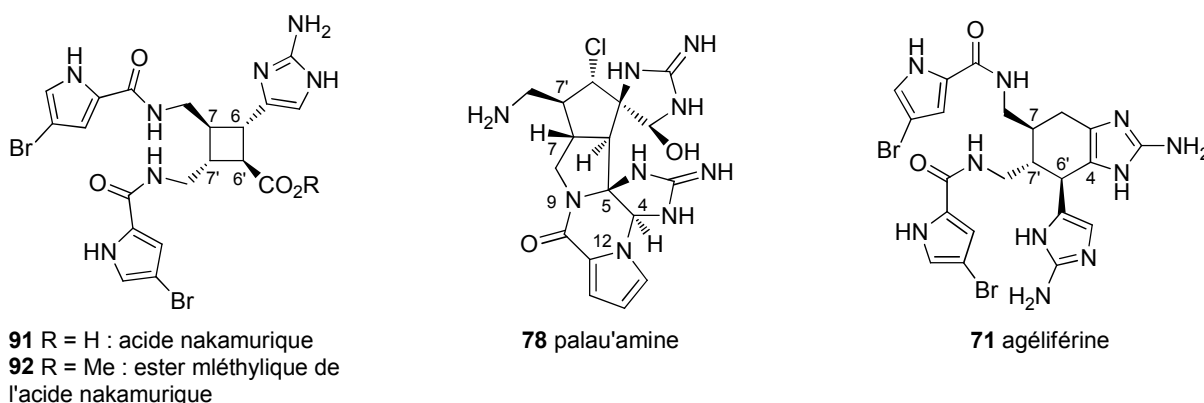


Figure 27 : Exemples de P-2-AIs antibiotiques

Les axinellamines B (**80**) et D (**82**) sont actives contre *Helicobacter pylori*, une bactérie impliquée dans le cancer de l'estomac.⁸⁰

Les styloguanidines (**88**, **89**) (non bromées, mono- et dibromées) montrent une inhibition de la chitinase à 2,5 $\mu\text{g}/\text{disque}$. Cette enzyme est responsable de l'hydrolyse de la chitine, jouant un rôle important dans le développement des crustacés et des organismes sessiles comme les barnacles, ce qui confère aux styloguanidines des propriétés antifouling.⁸⁶

Enfin, des dimères plus simples tels que les nagélamides montrent de bonnes activités antibactériennes. La nagélamide D (**63**), par exemple, qui présente une activité contre *Micrococcus luteus*, avec une CMI de 4,17 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mais aussi *Bacillus subtilis* (CMI, 33,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et *Escherichia coli* (CMI, 33,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$).⁶⁸ Le dimère d'oroïdine, mauritamine (**61**), est décrit avec une activité contre *Flavobacterium marinotypicum* avec une zone d'inhibition de

⁹⁵ Eder, C.; Proksch, P.; Wray, V.; Van Soest, R. W. M.; Ferdinandus, E.; Pattisina, L. A.; Sudarsono *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1295-1297.

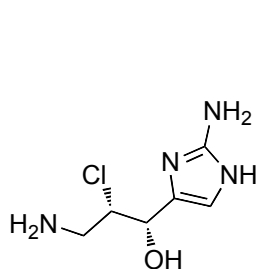
10 mm à 10 µg/disque et inhibe la métamorphose de la larve du barnacle *Balanus amphitrite* avec un DE₅₀ de 15 µg/ml.⁶⁷

On peut noter qu'un grand nombre de P-2-AIs présentent des activités antibactériennes. Ceci peut sûrement s'expliquer par la nécessité pour les éponges de combattre, dans leur environnement naturel, de nombreuses bactéries marines.

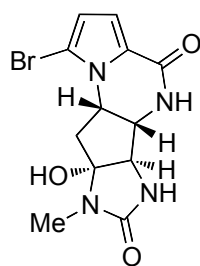
II.2.3. Les P-2-AIs cytotoxiques

La girolline (**14**), aussi appelée girodazole, a été reconnue comme agent antitumoral efficace montrant une cytotoxicité importante *in vitro* ainsi qu'*in vivo* contre des tumeurs de souris greffées telles que les tumeurs leucémiques P-388 et L-1210, les adénocarcinomes mammaires MA 16/C et l'histiocytosarcoma M5076.⁹⁶ Ce composé a atteint la phase clinique 1 et c'est l'un des seuls P-2-AIs pour lequel le mode d'action a été élucidé. Il implique *in vivo* l'inhibition de l'étape de terminaison de la synthèse de certaines protéines.⁹⁷

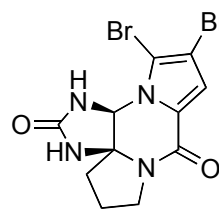
Un autre composé montrant une activité remarquable est l'agelastatine A (**54**). En effet, lors de son isolement, ce composé a été reconnu comme cytotoxique contre les cellules KB à une concentration inférieure à 1 µg/ml.⁶⁴ Puis le groupe de Pietra et Pettit ont montré qu'il se révélait actif contre de nombreuses lignées de cellules telles que les cellules humaines KB cancéreuses nasopharyngales, les cellules murines tumorales L1210, les cellules carcinomes de la vessie RT112/84, les mélanomes SK-MEL-5, les cellules du carcinomes du colon HCT-116 et les cellules cancéreuses du poumon MDA-MB-435s.⁹⁸



14 girolline



54 ag lastatine A



48 (-)-dibromophakellstatine

⁹⁶ Lavelle, F.; Zerial, A.; Fizames, C.; Rabault, B.; Curaudeau, A. *Invest. New Drugs* **1991**, *9*, 233-244-244.

⁹⁷ Colson, G.; Rabault, B.; Lavelle, F.; Zerial, A. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1717-1723.

⁹⁸ D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Pietra, F.; Ripamonti, M.; Debitus, C.; Waikedre, J. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 727-735

Figure 28 : Exemple de P-2-AIs cytotoxiques

Un autre monomère cyclisé cytotoxique est la (-)-dibromophakellstatine (**48**). Elle montre une activité inhibitrice intéressante sur un panel de lignées cancéreuses humaines.⁶⁰

La palau'amine **78** est en général non cytotoxique à part sur les lignées de cellules murines leucémiques P-388 et les cellules humaines cancéreuses du poumon A459.⁸¹

II.2.4. Les P-2-AIs inhibiteurs de kinases

La (*Z*)-hyménialdisine (**39**) est le seul P-2-AI extrêmement actif et sélectif de certaines kinases en particulier regroupées dans le *Tableau 2*. C'est ainsi un candidat potentiel, non seulement pour le traitement du cancer mais aussi pour le traitement de maladies telles que celle d'Alzheimer et le diabète de type 2. Les kinases sur lesquelles la (*Z*)-hyménialdisine est la plus active sont regroupées ci-dessous (*Tableau 2*).⁹⁹

Enzyme	IC ₅₀ (nM)	
	(<i>Z</i>)-hyménialdisine	(<i>Z</i>)-axinohydantoine
CDK1/cycline B	22	4000
CDK2/cycline A	70	/
CDK2/cycline E	40	/
CDK5/p25	28	7000
GSK3-β	10	3000
ASK-g (plant GSK-3)	80	/
PKC α	700	9000
CK1	35	4500

Tableau 2 : Les inhibiteurs de kinases : (*Z*)-hyménialdisine et (*Z*)-axinohydantoine

⁹⁹ Meijer, L.; Thunnissen, A. M.; White, A. W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L. H.; Walter, J.; Cleverley, K. E.; Salinas, P. C.; Wu, Y. Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Kim, S. H.; Pettit, G. R. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.

Pettit et Meijer ont montré que la (Z)-hyménialdisine (**39**) (Figure 29) inhibait *in vivo* la phosphorylation de la protéine humaine tau23 exprimée dans les cellules Sf9, réaction impliquée spécifiquement dans la maladie d'Alzheimer.⁹⁹

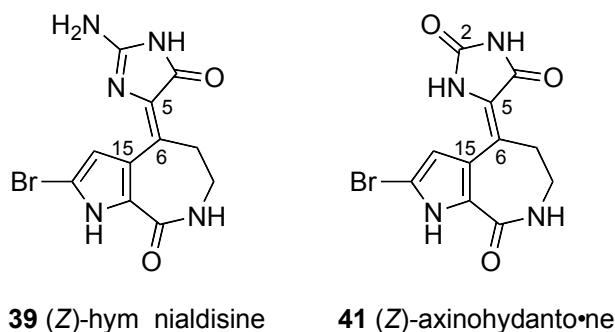
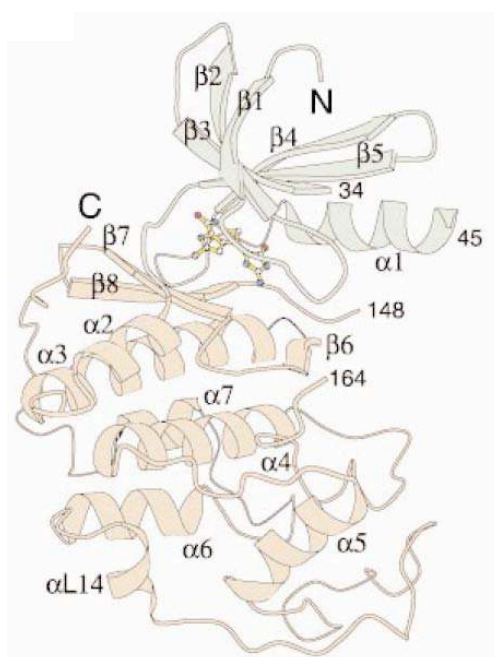


Figure 29 : Structures de la (Z)-hyménialdisine (**39**) et de la (Z)-axinohydantoïne (**41**)

Des congénères de l'hyménialdisine, comme la (Z)-axinohydantoïne (**41**) montre aussi des activités intéressantes, micromolaires cette fois, en tant qu'inhibiteurs de kinases (Tableau 2).^{100,56a}

Enfin, Pettit et Meijer ont caractérisé les interactions moléculaires de la (Z)-hyménialdisine avec la kinase CDK2 par cristallisation. Ils ont ainsi montré que cet inhibiteur se lie à la poche de l'ATP, ce qui empêche la phosphorylation des protéines par la kinase.



¹⁰⁰ Nakao, Y.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 689-710.

Figure 30 : Site de fixation de la (Z)-hyménialdisine sur l'enzyme CDK2

Enfin, l'agelastatine A a aussi été étudiée en tant qu'inhibitrice de la kinase GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) impliquée dans la tauopathie (dégénérescence) de la maladie d'Alzheimer.¹⁰¹

II.2.5. Les autres activités des P-2-AIs

Les P-2-AIs peuvent aussi se révéler actifs notamment comme antiviraux, agonistes de récepteurs particuliers et immunosuppresseurs. Ces activités sont développées dans les paragraphes suivants.

➤ Antiviraux

Deux composés principaux ont été reportés comme ayant des propriétés antivirales. Il s'agit de la sceptrine (**67**) et de l'agéliférine (**71**). Elles sont toutes deux actives contre le virus *Herpes simplex* de type 1, responsable des « boutons de fièvre », à 20 µg/disque et contre le virus *Vesicular stomatitis*, ou virus de la stomatite vésiculaire de la même famille que le virus de la rage, à 100 µg/disque.^{74a}

➤ Antagonistes de récepteurs particuliers

Les P-2-AIs tétramères, styllissadines A et B (**83**, **84**), sont antagonistes du récepteur P2X7 (CI₅₀ = 0,7 µM et CI₅₀ = 1,8 µM) impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires. Cependant, il est à noter que leur extrême complexité moléculaire n'en fait pas de bons candidats médicaments.⁷⁹

Plus récemment, Quinn *et coll.* ont résolu la dibromophakelline (**49**) et décrit une activité d'agoniste de l'adrénorécepteur α_{2B} (α_{2B}-ARs) impliqué dans les effets analgésiques, sédatifs,

¹⁰¹ Hale, K. J.; Domostoj, M. M.; Tocher, D. A.; Irving, E.; Scheinmann, F. *Org. Lett.* **2003**, 5, 2927-2930.

mais aussi dans l'hypotension, la régulation de l'hypothermie, la mobilité et la protection gastrique.¹⁰²

➤ Immunosuppresseur

La palau'amine (**78**) est le seul P-2-AI à avoir été reporté avec une excellente activité immunosuppressive. Elle montre, dans la réaction des lymphocytes mélangés, une $CI_{50} < 18$ nM tout en possédant une faible cytotoxicité.¹⁰³

➤ Inhibiteur de la géranyltransférase

La massadine (**77**) montre une inhibition de l'enzyme géranyltransférase de type 1 (GGTase I), une métalloenzyme à Zn(II) impliquée dans la prénylation de protéines de *Candida albicans* avec une CI_{50} de 3,9 μ M.⁷⁶

La famille des P-2-AIs présente des structures très variées, pourtant originaires d'un unique précurseur. On peut en effet rencontrer des structures monomériques, dimériques et tétramériques comportant de nombreuses cyclisations. Cette grande diversité structurale permet une grande variété d'activités biologiques (antibiotiques, cytotoxiques etc...) qu'il reste encore à découvrir.

¹⁰² Davis, R. A.; Fechner, G. A.; Sykes, M.; Garavelas, A.; Pass, D. M.; Carroll, A. R.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2497-2500.

¹⁰³ Kinnel, R. B.; Gehrken, H.-P.; Swali, R.; Skoropowski, G.; Scheuer, P. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3281-3286.

CHAPITRE III
ÉTUDE CHIMIQUE DE DEUX LOTS D'ÉPONGE
AXINELLA DONNANI

CHAPITRE III Étude chimique de deux lots d'éponges *Axinella donnani* (Bowerbank, 1873)

L'espèce *Axinella donnani* a été identifiée pour la première fois par Bowerbank en 1873. Deux taxonomies synonymes lui correspondent : *Isodictya donnani* et *Phakellia donnani*. L'espèce d'éponge *Axinella donnani* n'avait jamais fait l'objet d'étude chimique avant son extraction au laboratoire pour ce travail de thèse. La seule publication qui traite d'*Axinella donnani* s'est concentrée sur les effets toxiques de son extrait brut sans mentionner l'isolement de composés. Ce dernier s'est en effet révélé très toxique pour les jeunes saumons et présente une activité antibactérienne intéressante.¹⁰⁴

Une première partie de ce chapitre sera réservée à un état de l'art succinct sur les composés déjà isolés du genre *Axinella*. La seconde partie concerne les travaux personnels effectués sur l'éponge *Axinella donnani* et sera suivie d'un bilan de l'extraction.

III.1. Rappels bibliographiques sur les produits isolés du genre *Axinella*

La famille Axinellidae (*Figure 31*) a été identifiée par Carter en 1875.¹⁰⁵ Elle contient 10 genres valides dont le genre *Axinella* et approximativement 300 espèces décrites à ce jour.

¹⁰⁴ Selvin, J.; Lipton, A. P. *Hydrobiologia* **2004**, 513, 231-238

¹⁰⁵ Hooper, J. N. A.; van Soest, R. W. M. *Sytem Porifera: A Guide to the Classification of the Sponges*; Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York, 2002.

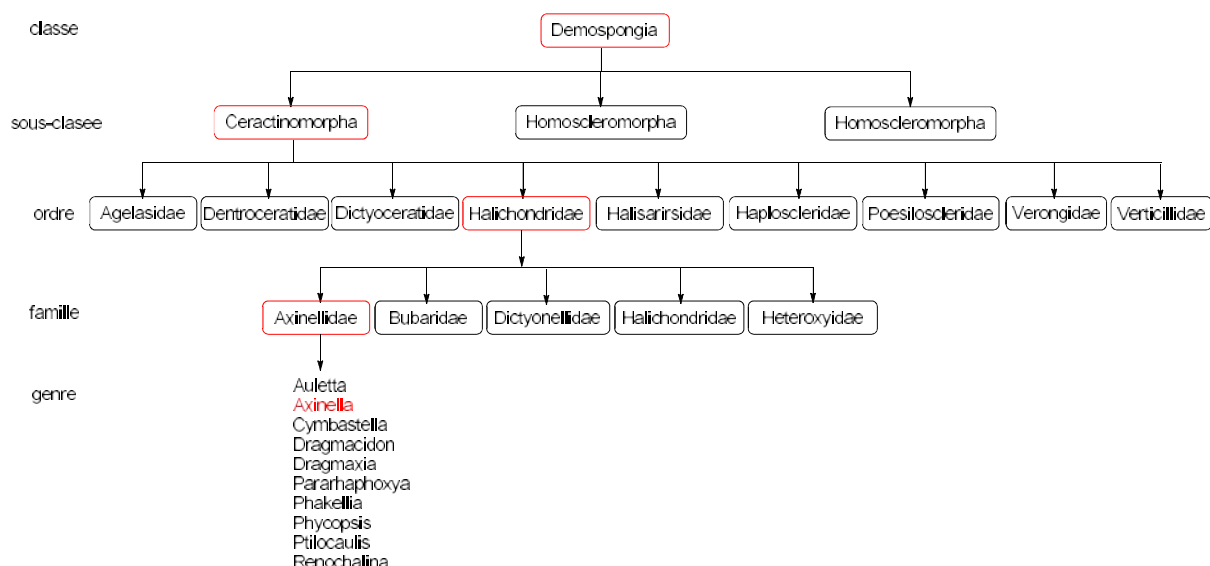


Figure 31 : Arbre phylogénétique de l'éponge étudiée (*A. donnani*)

Cette famille a une large distribution dans les océans. Elle peut vivre à la surface de la mer et jusqu'à 1800 m de profondeur. Les espèces du genre *Axinella* sont généralement encroûtantes, massives, ramifiées, en forme d'éventail ou tubulaires. Leurs couleurs sont souvent vives et attractives (rouge, orange, jaune). Cette famille d'éponges est connue pour contenir des P-2-AIs.

En plus des P-2-AIs, les principales classes de composés qui ont jusqu'alors été isolées des éponges du genre *Axinella* sont les stanols et stérols, les terpènes azotés (-NC, -NCS, -NHCHO), de nombreuses sodwanones, les polyéthers et les lipides ainsi que des composés pyrroliques et indoliques et des peptides cycliques. Une liste non exhaustive de la variété des composés isolés du genre *Axinella* sera présentée dans les paragraphes suivants, uniquement dans le but de rendre compte de la diversité moléculaire de ces éponges.

III.1.1. Les stérols

Dans la famille des stérols et stanols, il existe des stérols non conventionnels dont le système tétracyclique a été modifié, comme les 19-*nor* stanols (dont la position 10 est déméthylée) et comme les *A-nor* stérols (dont le cyclohexane A normalement rencontré est contracté en

cyclopentane méthylé). Une grande variété de 19-*nor* stanols (**91**) a été isolée d'*Axinella polypoides* (Figure 32).¹⁰⁶

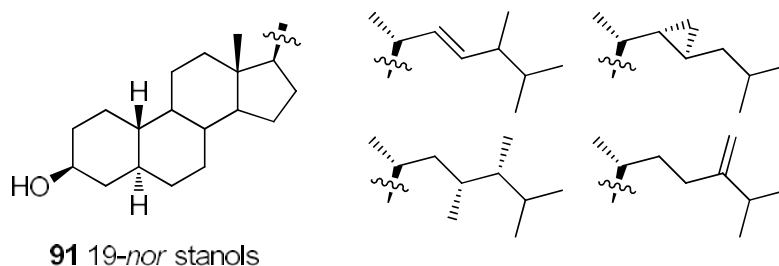


Figure 32 : Exemples de 19-*nor* stanols isolés d'*Axinella polypoides*

Les A-*nor* sterols différemment substitués en position 17 (**92**) ont été majoritairement isolés des éponges *Axinella proliferans*¹⁰⁷ et *Axinella verrucosa* (Figure 33).¹⁰⁸ Il est à noter que la stéréochimie de certains centres asymétriques des stérols n'a pas été précisée.

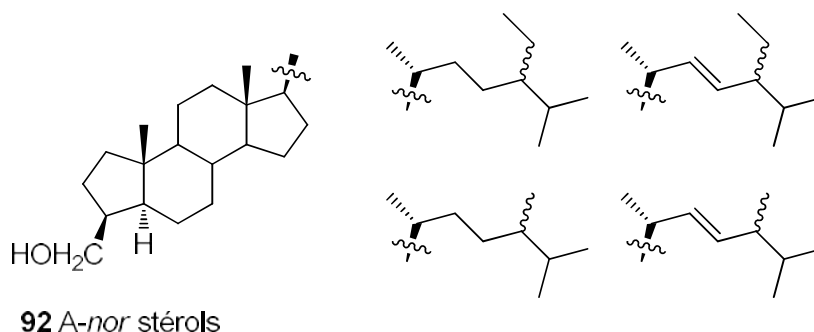


Figure 33 : Exemples de A-*nor* sterols isolés d'*A. proliferans* et d'*A. verrucosa*

III.1.2. Les sesquiterpènes azotés

Fattorusso *et. al.* ont isolé d'*Axinella cannabina* les premiers terpènes azotés axisonitriles-1 (**93**) et axisothiocyanate-1 (**94**)¹⁰⁹ en 1973, puis les axamides-1 (**95**) et -2, axisonitrile-2 (**96**)

¹⁰⁶ a) Minale, L.; Sodano, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 1888-1892. b) Crist, B. V.; Djerassi, C. *Steroids* **1983**, 42, 331-343.

¹⁰⁷ Akinin, M.; Gaydou, E. M.; Boury-Esnault, N.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A. *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**, 113, 845-848.

¹⁰⁸ Minale, L.; Sodano, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1974**, 1, 2380-2384.

¹⁰⁹ Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Santacrose, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1973**, 29, 4259-4262.

et axisothiocyanate-2 (**97**) dans les mêmes éponges quelques années plus tard.¹¹⁰ Enfin en 1976, les axisonitrile-3 (**99**) et axisothiocyanate-3 (**100**) sont isolés par Di Blasio *et. al.* de l'éponge *A. cannabina* (Figure 34).¹¹¹

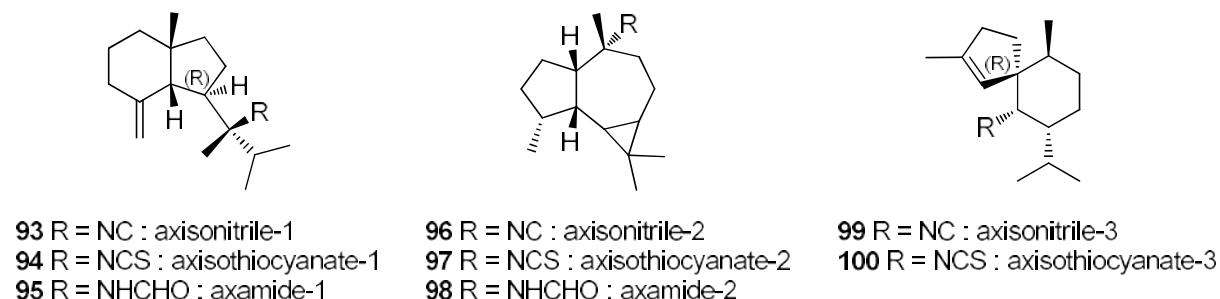


Figure 34 : Structures des sesquiterpènes azotés isolés du genre *Axinella*

III.1.3. Les sodwanones

Les sodwanones A (**101**) à I ont été isolées de différentes éponges de l'espèce *Axinella weltneri* récoltées dans la baie de Sodwana en Afrique du Sud¹¹² et dans le lagon de Mayotte par Kashman *et. coll* (Figure 35).¹¹³ La sodwanone V (**102**) isolée d'*Axinella sp.* présente une activité anticancéreuse en inhibant le facteur HIF-1 des cellules T47D (cancer du sein) et PC-3 (cancer de la prostate) avec un CI₅₀ de 15 µM.

¹¹⁰ a) Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 3911-3913. b) Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 269-270.

¹¹¹ Di Blasio, B.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Pedone, C.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 473-478.

¹¹² a) Rudi, A.; Goldberg, I.; Stein, Z.; Benayahu, Y.; Schleyer, M.; Kashman, Y. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3943-3944. b) Rudi, A.; Kashman, Y.; Benayahu, Y.; Schleyer, M. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1416-1423. c) Rudi, A.; Goldberg, I.; Stein, Z.; Kashman, Y.; Benayahu, Y.; Schleyer, M.; Gravalos, M. D. G. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1702-1712.

¹¹³ Rudi, A.; Akinin, M.; Gaydou, E. M.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 700-703.

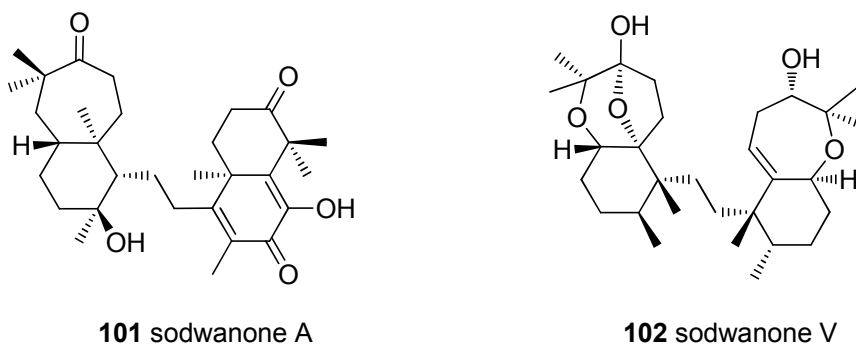


Figure 35 : Deux sodwanones A et V isolées d'*Axinella* sp.

III.1.4. Les polyéthers

Parmi les polyéthers les plus remarquables isolés du genre *Axinella*, on trouve l'halichondrine B (**103**) et l'homohalichondrine B (**104**) (Figure 36). Ces deux molécules extrêmement actives sur les cellules leucémiques P388 présentent respectivement des CI_{50} de 0,093 ng/ml et 0,1 ng/ml.¹¹⁴

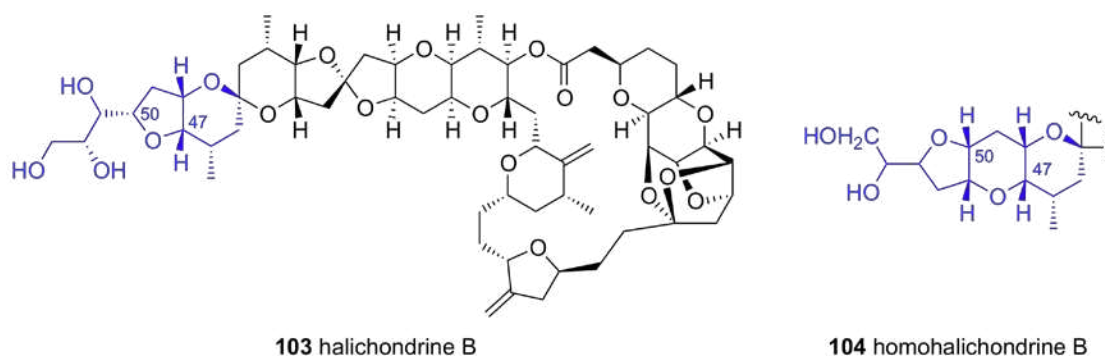


Figure 36 : Structures des halichondrine B et homohalichondrine B isolées d'*Axinella* sp.

III.1.5. Les céramides et lipopolysaccharides

Les axicéramides A et B (**105**), premiers triglycocéramides à être découverts, ont été isolés en 1994 d'*Axinella* sp. de la Réunion (Océan Indien). Ce sont des mélanges complexes d' α -

¹¹⁴ Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Boyd, M. R.; Leet, J. E.; Dufresne, C.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M.; Cerny, R. L.; Hooper, J. N. A.; Rutzler, K. C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3339-3340.

hydroxyacides et de sphingamines.¹¹⁵ L'axinelloside A (**106**), isolé de l'éponge *Axinella infundibula* en 2005 est un liposaccharide sulfaté très complexe (Figure 37). Il possède une activité intéressante sur la télomerase humaine avec un CI_{50} de 2 $\mu\text{g/ml}$, ce qui en fait un agent anticancéreux potentiel.¹¹⁶

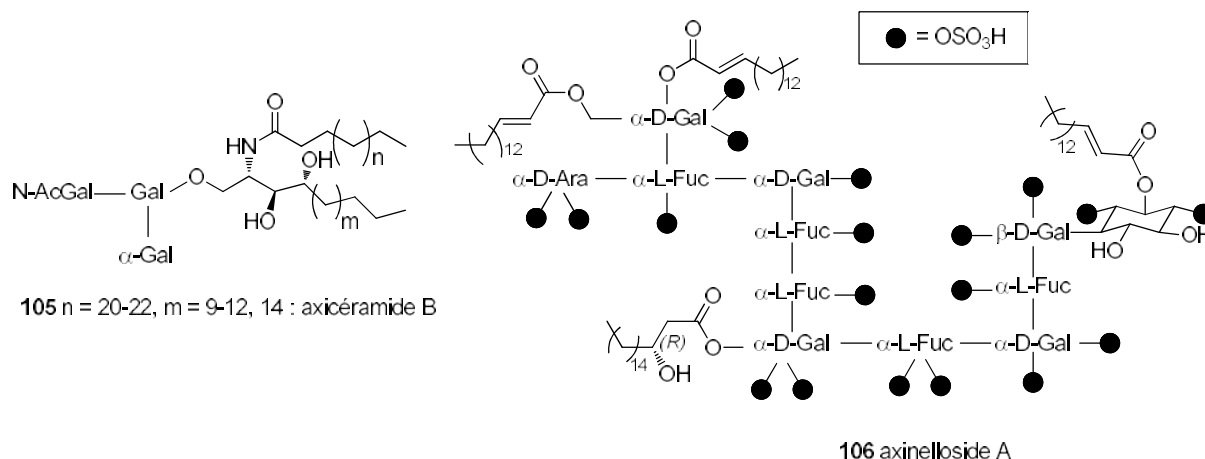


Figure 37 : Structures des axicéramide B et axinelloside A isolés d'*Axinella* sp.

III.1.6. Les peptides cycliques

On retrouve dans les éponges du genre *Axinella* des peptides principalement cycliques. Ce sont des peptides classiques souvent riches en proline. Ils possèdent généralement des activités cytotoxiques et antiprolifératives *in vitro*, et, malgré leurs présences en faible quantité dans les éponges, ils peuvent être utilisés comme marqueur chimiotaxonomiques.¹¹⁷ De nombreux peptides cycliques ont été isolés comme l'axinelline A (*cyclo*(Phe-Thr-Ile-Phe-Pro-Asn-Pro))¹¹⁸ isolé par Randazzo *et. al.* en 1998 et de l'axinastine 1 (*cyclo*(Pro-Val-Asn-Pro-Phe-Val-Val))¹¹⁹ isolé par Petit *et. al.* en 1991.

¹¹⁵ Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Akinin, M.; Gaydou, E. M. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 1994, 1181-1185.

¹¹⁶ Warabi, K.; Hamada, T.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Hirota, H.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13262-13270.

¹¹⁷ Kornprobst, J. M. *Encyclopedia of marine natural products*; WILEY-BLACKWELL, 2010; Vol. 2.

¹¹⁸ Randazzo, A.; Dal Piaz, F.; Orrù, S.; Debitus, C.; Roussakis, C.; Pucci, P.; Gomez-Paloma, L. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1998, 2659-2665.

¹¹⁹ Krohn, A.; Redshaw, S.; Ritchie, J. C.; Graves, B. J.; Hatada, M. H. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 3340-3342

III.1.7. Les composés pyrroliques et indoliques

Le genre *Axinella* peut aussi produire de nombreux composés pyrroliques et indoliques autres que les pyrroles-2-aminoimidazoles (cf. Chap II). Parmi les nombreux composés pyrroliques, on trouve les axinellamines A (107) et B (108) isolées d'*Axinella sp*¹²⁰ et comportant respectivement une et deux chaînes linéaires insaturées (Figure 38). Enfin, on trouve aussi des composés indoliques comme les cyclopentindoles A (109) et C (110) par exemple.¹²¹

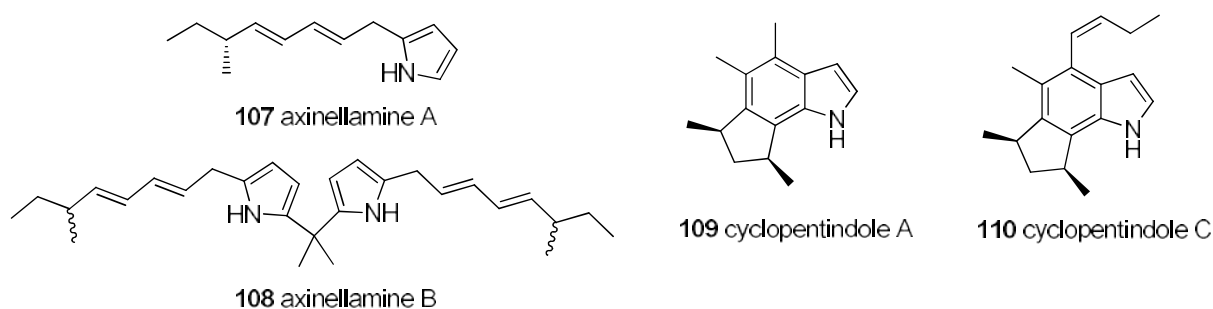


Figure 38 : Structures de composés pyrroliques et indoliques isolés d'*Axinella sp*.

III.2. Collecte et extraction de l'éponge *Axinella donnani* (1^{er} lot), fractionnement des extraits et purification des produits

L'éponge *Axinella donnani* (1^{er} lot) a été récoltée en juillet 2008 au large de l'île Maurice dans l'océan Indien à 37 m de profondeur. Cette éponge présentait une forme compacte ovale de couleur rouge/orangé, les oscules étant apparents. L'éponge lyophilisée (140g) a été reçue et a été immédiatement congelée à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis conservée telle quelle jusqu'à son extraction.

¹²⁰ Bascombe, K. C.; Peter, S. R.; Tinto, W. F.; Bissada, S. M.; McLean, S.; Reynolds, W. F. **1998**, *48*, 1461-1464

¹²¹ Herb, R.; Carroll, A. R.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J.; Paul, V. J. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3089-3092.

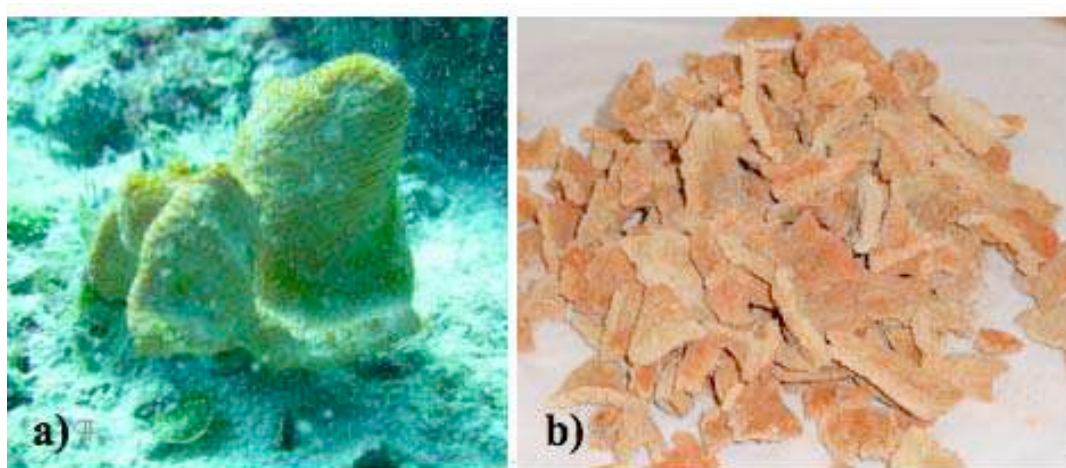


Figure 39 : Photographie de l'éponge, a) juste avant la récolte et b) juste avant son extraction

Des schémas d'extraction complets et détaillés ont été rassemblés dans la partie expérimentale.

La totalité de l'éponge congelée (140g) a été extraite à température ambiante avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7 : 3 pour donner 29,7 g d'extrait brut. Son profil chromatographique (*Figure 40*) montre une grande prédominance des P-2-AIs avec des masses correspondantes aux dérivés de l'oroïdine (**8**) et de l'agéliférine (**71**). Cet extrait a ensuite été trituré dans le dichlorométhane pour donner 1,2 g d'extrait dichlorométhylénique d'une part, et 28,7 g d'insolubles d'autre part. Cette partie insoluble a ensuite été soumise à une partition eau butanol afin d'éliminer au maximum les sels minéraux qui s'y trouvaient. Ainsi 9,6 g d'extrait butanolique ont été récupérés.

Étant donné que l'isolement de métabolites secondaires de type P-2-AIs était l'objectif principal de cette thèse, l'extrait butanolique a été étudié en priorité. L'extrait dichlorométhylénique a tout de même été fractionné avec une colonne de silice et a donné majoritairement des stérols et lipides qui n'ont pas été étudiés. L'analyse de l'extrait butanolique a été réalisée par des colonnes chromatographiques de silice en phase normale et de C18 en phase inverse. Ces méthodes de fractionnement ont ensuite été complétées par l'utilisation d'HPLC préparatives et analytiques, la plupart du temps en phase inverse avec la colonne C18 Sunfire (cf. partie expérimentale).

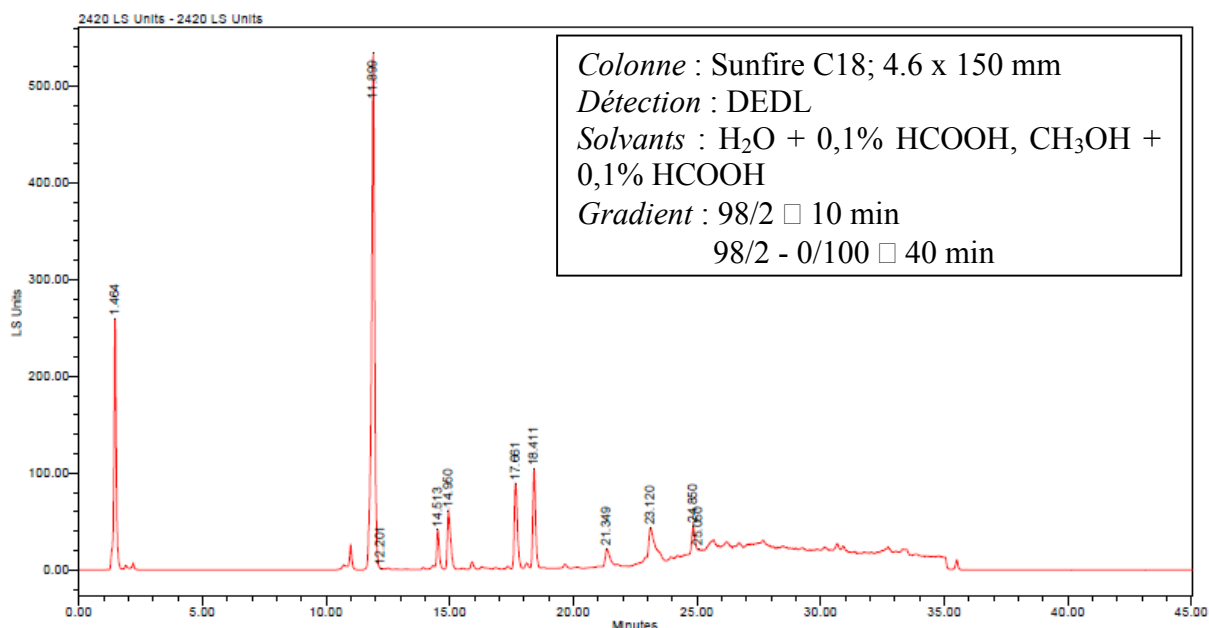


Figure 40 : Chromatogramme HPLC-DEDL de l'extrait brut d'*A. donnani*

III.3. Éluclation structurale des composés isolés de l'éponge *Axinella donnani* (1^{er} lot)

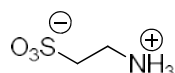
27 composés ont été identifiés de l'extrait butanolique de l'éponge *A. donnani*. Cette éponge a montré une très grande diversité de P-2-AIs, aussi bien pour les monomères que pour les dimères de la famille. Nous allons tout d'abord présenter l'éluclation structurale des métabolites secondaires connus isolés de l'éponge *A. donnani*, c'est à dire déjà décrits dans la littérature. Ensuite nous exposerons l'éluclation structurale des métabolites nouveaux isolés de cette éponge ainsi que certains éléments de biogenèse qui viendront compléter l'analyse.

III.3.1. Éluclation structurale des monomères

➤ Éluclation structurale du composé connu **111**

Le composé **111** a été identifié comme étant la taurine d'après ses spectres ¹H et ¹³C dans D₂O extrêmement simples. Le spectre ¹H présente deux triplets à 3,47 ppm et 3,33 ppm et le spectre ¹³C présente 2 signaux à 35,9 ppm et 48,0 ppm. La masse basse résolution donne *m/z* 126,1 ([M+H⁺]) qui correspond à la masse de la taurine. Le fait troublant de l'isolement de ce

composé est qu'il est présent en très grande quantité dans l'éponge. En effet, il représente à lui seul, 1,4 g de l'extrait butanolique (9,6 g), soit 15 % de cet extrait alors qu'aucune molécule isolée de cette éponge ne comporte de motif taurine additionné. Il est cependant possible, qu'en si grande quantité, ce neurotransmetteur puisse servir d'arme chimique toxique contre les poissons qui voudraient se nourrir de l'éponge car consommée en grandes quantités, la taurine peut-être mortelle pour les poissons.¹²²



111 taurine

Figure 41 : Structure du composé 111.

➤ Éluclation structurale des dérivés monomériques connus **8**, **16** et **19**

Le spectre de masse du composé **16** présente deux pics d'ions pseudomoléculaire à 310,0 et 312,0 de même intensité, correspondant à la présence d'un atome de brome sur la molécule. Le spectre de masse du composé **8** présente trois pics d'ions pseudomoléculaires à 387,8, 389,8 et 391,8 d'intensités respectives 1 / 2 / 1 et correspondant à la présence de 2 atomes de bromes sur la molécule. Les composés **16** et **8** présentent respectivement des masses m/z 310,0 ($[M+H^+]$) et m/z 387,8 ($[M+H^+]$). Il s'agit de P-2-AIs monomères linéaires présentant une double liaison comme le révèlent les signaux RMN caractéristiques des deux spectres 1H (CD_3OD , 500 MHz) : Pour le composé **16** on observe un signal à 6,31 ppm (d, $J = 15,9$ Hz) et un autre à 6,05 ppm (m) et pour le composé **8**, on observe un signal à 6,30 (d, $J = 16,2$ Hz) ppm et autre à 6,07 ppm (m). Les constantes de couplages indiquent une double liaison de stéréochimie (*E*). Après comparaison avec les données de la littérature, le composé **16** a été identifié comme étant l'hyménidine, isolée pour la première fois par Kobayashi en 1986 d'*Hymeniacidon sp.*³⁶ De même le composé **8** a été identifié comme étant l'oroïdine par comparaison de ses données spectrales avec celles de la littérature, déjà isolée d'*Agelas oroides* par Fattorusso en 1971.³⁴ Le composé **19**, monobromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (324,0 / 326,0), présente une masse de m/z 324,0 ($[M+H^+]$). Les signaux RMN caractéristiques du spectre 1H (CD_3OD , 500 MHz), un signal à 6,24 ppm (d, $J = 11,6$ Hz) et un autre à 5,62 ppm (m), révèlent une double liaison de stéréochimie *Z*. De

¹²² Xu, H.; Wang, W.; Tang, Z.-Q.; Xu, T.-L.; Chen, L. *Hearing Research* **2006**, 220, 95-105.

plus un signal de groupement méthyle est visible à 3,33 ppm sous forme de singulet. Après comparaison des données spectrales avec celles de la littérature,³⁹ le composé **19** a été identifié comme étant la kéramadine isolée pour la première fois d'*Agelas sp.* par Kobayashi *et. coll.* en 1984.

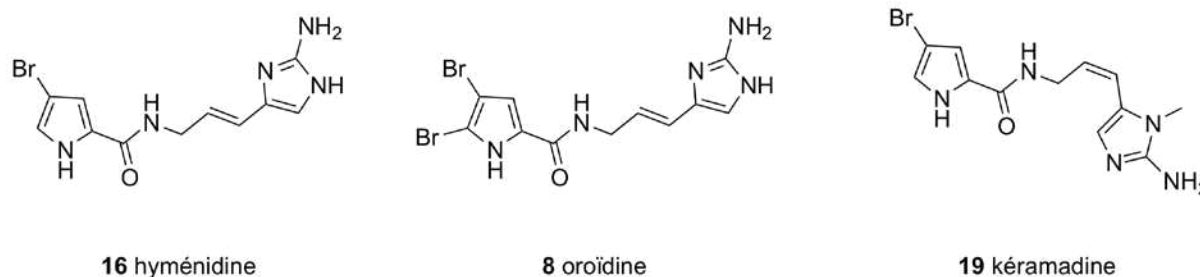


Figure 42 : Structure des composés **16**, **8** et **19**.

➤ Élucidation structurale des dérivés monomériques connus **37**, **38**, **45** et **112**

Les composés **38** et **37** ne comportent pas de brome d'après leur massif isotopique et présentent une même masse de m/z 246.0 ($[M+H^+]$). Après comparaison avec les données de la littérature,⁵² les composés **38** et **37** ont été identifiés comme étant respectivement les (*E*)- et (*Z*)-débromohyménialdisine isolées pour la première fois d'*Hymeniacidon aldis* par Kobayashi *et. coll.* en 1983. Ces composés ont été trouvés en grande quantité dans l'éponge, à raison d'environ 675 mg pour l'isomère (*Z*) et 30 mg pour l'isomère (*E*). Cette différence d'abondance s'explique aisément par l'équilibre thermodynamique existant entre les deux isomères et favorisant la formation de la (*Z*)-débromohyménialdisine.⁵³

Les deux composés **45** et **112**, tous deux dibromés d'après la distribution isotopique de leurs pics de masse, resp. (385,9 / 387,9 / 389,9) et (386,9 / 388,9 / 390,9), présentent respectivement des masses m/z 385,9 ($[M+H^+]$) et m/z 386,9 ($[M+H^+]$). La présence de deux atomes de brome et l'absence totale de signaux pyrroliques sur le spectre 1H (CD_3OD , 500 MHz) du composé **45** impliquent une même cyclisation en position 15 sur le noyau pyrrole ; de plus la présence d'un signal à 6,72 ppm (s) pourrait correspondre à la présence d'un noyau 2-aminoimidazole. Après comparaison avec les données spectrales de la littérature, le composé **45** a été identifié comme étant l'odiline isolé pour la première fois de *Pseudaxynissa cantharella* par Potier *et. coll.* en 1985.⁵⁷ Le composé **112** correspond à l'hyménine déjà isolé d'*Hymeniacydon sp.* par Kobayashi *et. al.* en 1986.¹²³

¹²³ Kobayashi, J.; Y., O.; H., N.; Hirata, Y.; Wakamatsu, K.; Miyazawa, T. *Experientia* **1986**, *42*, 1064.

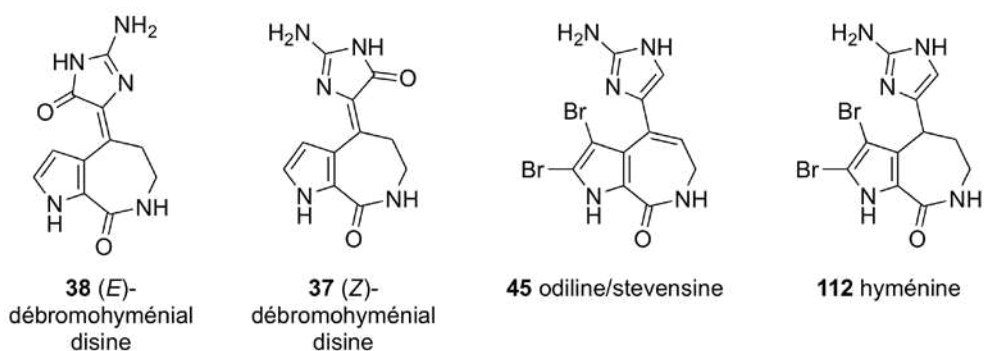


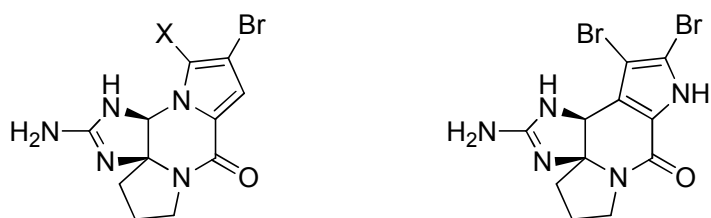
Figure 43 : Structures des composés 37, 38, 45 et 112.

➤ Éluclidation structurale des dérivés monomériques connus 49, 50 et 51

D'après la distribution isotopique de leurs pics de masse, les deux composés 50 et 49, sont respectivement monobromé (310,0 / 312,0) et dibromé (387,8 / 389,8 / 391,8) et présentent respectivement des masses m/z 310,0 ($[M+H^+]$) et m/z 387,9 ($[M+H^+]$). Ces deux composés présentent un spectre 1H typique de composés cyclisés avec les protons des méthylènes en 6 et 7, non équivalents. Pour 50, on observe dans CD_3OD (500 MHz) H6a (2,05 ppm, m), H6b (2,12 ppm, m), H7a (2,22 ppm, m) et H7b (2,25 ppm, m). Après comparaison des données spectrales avec celles de la littérature⁶¹ les composés 50 et 49 ont été identifiés comme étant respectivement la monobromophakelline et la dibromophakelline déjà isolées de *Phakellia flabellata* par Sharma *et. coll.* en 1976. Les pouvoirs rotatoires de ces deux composés ont été mesurés et comparés à ceux de la littérature afin de s'assurer de la stéréochimie absolue des isomères isolés. Pour la (-)-monobromophakelline (50) la littérature donne $[\alpha]_D^{25}$ -123 (c 3,015, MeOH) et nous avons relevé $[\alpha]_D^{28}$ -25 (c 0,66, MeOH). Dans le cas de la (-)-dibromophakelline (49) la littérature donne $[\alpha]_D^{25}$ -205 (c 2,875, MeOH), alors que nous avons relevé $[\alpha]_D^{28}$ -54 (c 0,47, MeOH).

Le composé 51, dibromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (387,9 / 389,8 / 391,8) présente une masse de m/z 387,9 ($[M+H^+]$). Aucun signal pyrrolique n'est visible sur le spectre 1H (CD_3OD , 500 MHz), ce qui pourrait impliquer une cyclisation en C15. Après comparaison des données spectrales avec celles de la littérature⁶² le composé 51 a été identifié comme étant la dibromoisophakelline déjà isolée d'*Acanthella carteri* par Fedoreyev en 1986. Son pouvoir rotatoire a été mesuré. On obtient alors $[\alpha]_D^{28}$ -60 (c 0,28, MeOH) alors que la littérature reporte $[\alpha]_D^{26}$ -101 (c 0,56, MeOH). Malheureusement, les disparités au niveau des

valeurs des pouvoirs rotatoires ne permettent pas de conclure quant à la stéréochimie absolue de ces composés connus.



50 X = H : (-)-monobromophakelline

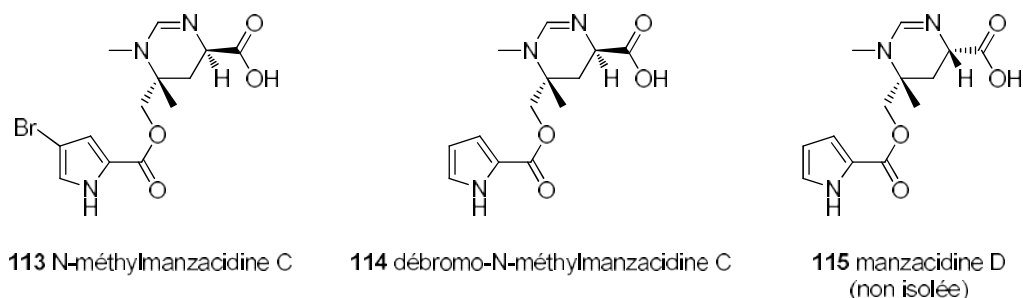
49 X = Br : (-)-dibromophakelline

51 (-)-dibromoisophakelline

Figure 44 : Structures des composés **49** à **51**.

➤ Éluclation structurale des dérivés monomériques connu **113** et nouveau **114**

Le spectre de masse du composé **113**, présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à 358,0 et 360,0 de même intensité, indiquant la présence d'un atome de brome sur la molécule. Il présente une masse de m/z 358,0 ($[M+H^+]$). Son spectre 1H (CD_3OD , 500 MHz) indique la présence d'un noyau pyrrolique à 7,05 ppm (s) et 6,87 ppm (s) et de deux groupements méthyle à 1,49 ppm (s) et 3,25 ppm (s). On observe aussi un signal particulièrement déblindé à 7,99 ppm (s). Après comparaison avec les données spectrales de la littérature, le composé **113** a été identifié comme étant la *N*-méthyl-manzacidine C, isolée pour la première fois d'*Axinella brevistyla* par Fusetani en 2001.¹²⁴



113 N-méthylmanzacidine C

114 débromo-N-méthylmanzacidine C

115 manzacidine D
(non isolée)

Figure 45 : Structures des composés **113** et **114** isolés de l'éponge *Axinella donnani* et de la manzacidine D (**115**)

¹²⁴ Tsukamoto, S.; Tane, K.; Ohta, T.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1576-1578.

Le composé **114**, non bromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse, présente une masse de m/z 280.1 ($[M+H]^+$). Après comparaison des données avec celles de la littérature, le composé **114**, de masse identique à celle de la manzacidine D (**115**) (Figure 45), présente un spectre 1H (CD_3OD , 500 MHz) légèrement différent, notamment par les déplacements chimiques (en ppm) pour H_{10eq} (litt. 2.37 ; obs. 2.67) et H_{10ax} (litt. 2.30 ; obs. 1.94).¹²⁵ Cependant, on observe des constantes de couplage entre les protons $H_{10ax-eq}$ et H_{11} similaires. Les constantes de couplage reportées pour la manzacidine D (**115**) sont $J_{H10ax-H10eq} = 12.9$ Hz, $J_{H11-H10eq} = 5.7$ Hz et $J_{H11-H10ax} = 10.5$ Hz contre $J_{H10ax-H10eq} = 14.3$ Hz, $J_{H11-H10eq} = 4.9$ Hz et $J_{H11-H10ax} = 11.3$ Hz pour le composé **114** (Figure 46). Cependant, une analyse du spectre NOESY de la molécule a montré une inversion de configuration du centre C11 par rapport à celui de la manzacidine D. En effet, on observe pour le composé **114** des effets NOE entre H11/H8a et H11/H8b et aucun effet NOE entre H11 et H17 alors que la littérature décrit une corrélation H11/17 pour la manzacidine D (**115**).¹²⁵ On se trouve donc dans le cas d'une débromo-*N*-méthylmanzacidine C encore non décrite dans la littérature. Afin de déterminer si la stéréochimie absolue de ce nouveau composé est la même que celle de la *N*-méthylmanzacidine C (**113**) déjà connue, une mesure des pouvoirs rotatoires des deux composés a été effectuée. On trouve, pour **113**, $[\alpha]_D^{28} +69$ (c 0.45, MeOH) et, pour **114**, $[\alpha]_D^{28} +30.6$ (c 0.45, MeOH) qui indique donc finalement une même configuration absolue.

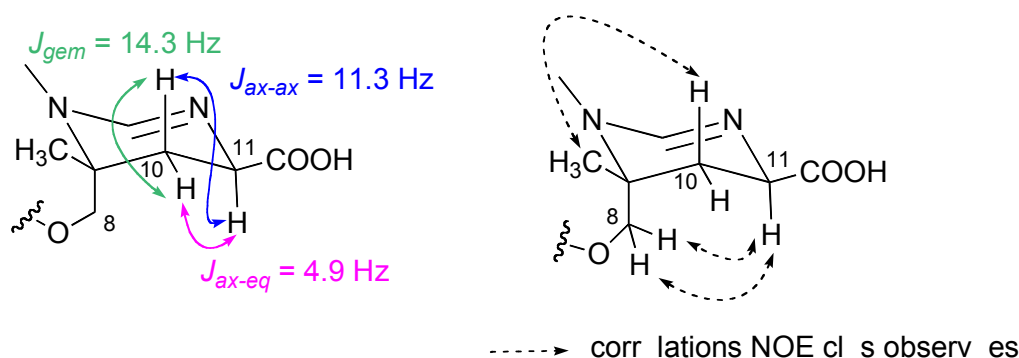


Figure 46 : Constantes de couplages et corrélations NOEs clés observées pour la débromo *N*-méthylmanzacidine C (**114**).

L'élucidation structurale du nouveau composé **114** a permis de mettre en évidence l'importance des méthodes de purification sur les données spectroscopiques finales. En effet, comme la nature des éluants de purification utilisés n'y est pas précisée, les molécules

¹²⁵ Jahn, T.; König, G. M.; Wright, A. D.; Werheide, G.; Reitner, J. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 3883-3884.

décrites dans la littérature peuvent très bien se trouver sous forme de sel d'acide formique ou bien de sel de TFA (car ce sont les acides les plus couramment utilisés en tant qu'additifs dans les éluants, lors des purifications de produits naturels). Ainsi le spectre du composé **114** a été enregistré, d'une part avec **114** sous forme de sel d'acide formique et d'autre part sous forme de sel de TFA (*Figure 47*). On note pour le même composé, une différence de 0,41 ppm entre les déplacements chimiques du proton H₁₁ dans ces deux conditions. Ceci s'explique par la position de ce proton H₁₁, en α d'un groupement acide et surtout d'une fonction amidine. Le TFA étant un acide plus fort que l'acide formique, ceci entraîne une modification de densité électronique autour de H₁₁ qui se traduit par une différence de déplacement chimique pour ce dernier. Le contre-ion, ici TFA⁻ joue aussi un rôle important car il existe des interactions électrostatiques fortes entre l'amidinium et le contre-ion trifluoroacétate.

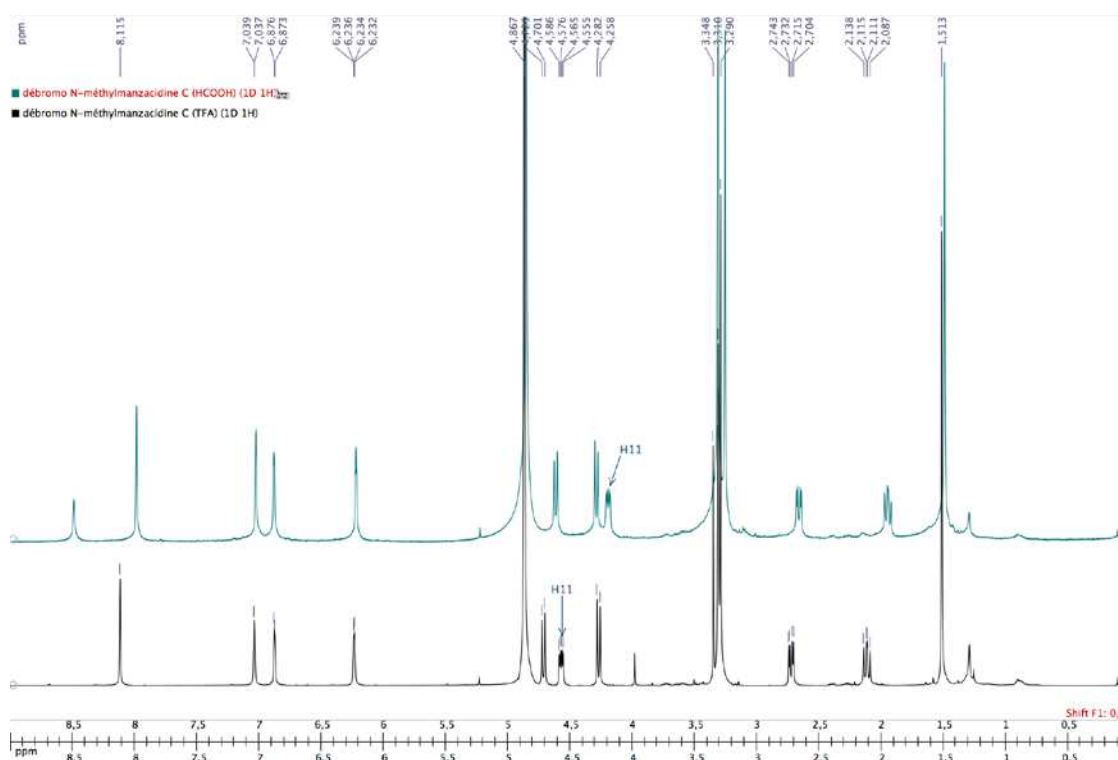
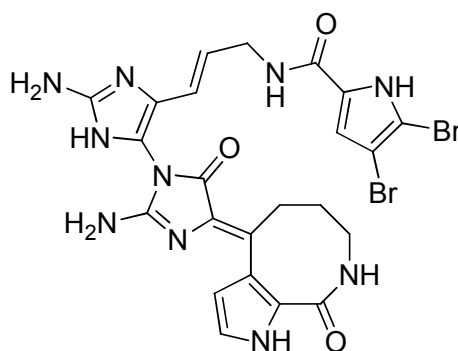


Figure 47 : Spectres ¹H de la débromo N-méthylmanzacidine C (**114**) sous forme de sel d'acide formique (en vert) et de TFA (en noir), CD₃OD, 500 MHz.

III.3.2. Éluclation structurale des dimères connus

- Éluclation structurale du composé dimérique connu **116**

Le composé **116**, dibromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (631,0 / 633,0 / 635,0), présente une masse de m/z 631,0 ($[M+H^+]$). Le spectre 1H (CD_3OD , 500 MHz) du composé présente les signaux caractéristiques du monomère oroïdine (**8**) ainsi que ceux du monomère (*Z*)-débromohyménialdisine (**37**). Le composé **116** ayant été collecté en mode isocratique en HPLC (un seul pic) et, les deux monomères ayant des temps de rétention assez différents, il s'agit donc là d'un dimère composé de ces deux sous-unités. Les données spectrales ont été comparées à celles des molécules isolées au laboratoire et le composé **116** correspond au stylissazole D isolé par Kirti Patel au laboratoire (travail non publié).¹²⁶ Le stylissazole D (**116**) présente la particularité de posséder une connection N3'-C4 et d'être dibromé sur le motif monomère linéaire, contrairement aux autres stylissazoles déjà décrits dans la littérature.⁷⁵



116 stylissazole D

Figure 48 : Structure du composé **116**.

➤ Éluclation structurale des composés dimériques connus **67** et **71**

Le composé **67**, dibromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (619,0 / 621,0 / 623,0), présente une masse de m/z 619,0 ($[M+H^+]$). Il présente un spectre RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz) correspondant à une structure symétrique, caractéristique des composés cyclobutaniques de la série dimérique des P-2-AIs. Après comparaison de ses données spectrales avec celles de la littérature, le composé **67** a été identifié comme étant la sceptrine isolée pour la première fois d'*Agelas sceptrum* par Faulkner *et. coll.* en 1981.⁷²

¹²⁶ Patel, K. Thèse de docteur en science, Université Paris-Sud Orsay, 20 Avril 2010.

Le composé **71**, dibromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (621,0 / 623,0 / 625,0), présente une masse de m/z 621,0 ($[M+H^+]$). Après comparaison directe de ses données spectrales avec celles de la littérature, le composé **71** a été identifié comme étant l'agéliférine isolée pour la première fois d'*Agelas sp.* par Kobayasi *et. coll.* en 1990.⁷⁴ Ce dimère de P-2-AIs a été trouvé en relativement grande quantité dans cette éponge (97 mg), il est donc possible que l'éponge le synthétise afin de combattre les bactéries grâce à sa bonne activité antibiotique.⁷⁴

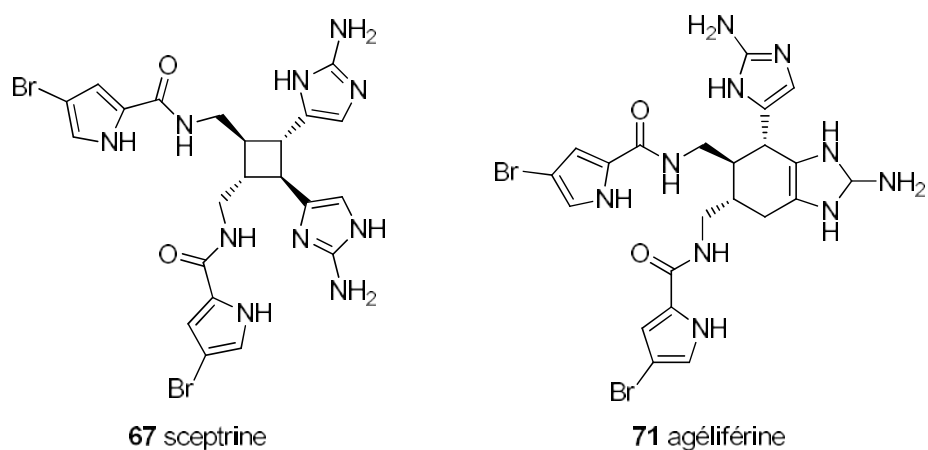
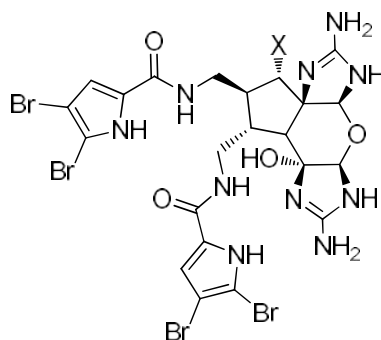


Figure 49 : Structure des composés **67** et **71**.

➤ Éluclidation structurale des composés dimériques connus **6** et **77**

Les deux composés **77** et **6**, présentent respectivement cinq pics d'ions pseudomoléculaires à 824,8 / 826,8 / 828,8 / 830,8 / 832,8 d'intensités 1 / 4 / 6 / 4 / 1 indiquant la présence de quatre atomes de brome et six pics d'ions pseudomoléculaires à 842,8 / 844,8 / 846,8 / 848,8 / 850,8 / 852,8 d'intensité 15 / 60 / 100 / 80 / 30 / 4 indiquant la présence de quatre atomes de brome et un atome de chlore. Ils présentent respectivement des masses de m/z 824.8 ($[M+H^+]$) et m/z 842.8 ($[M+H^+]$). Les spectres RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz) de ces deux dimères sont assez similaires : ils présentent tous deux, deux signaux pyrroliques à 6,91 ppm (s) et 6,85 ppm (s) pour **77** et et 6,91 ppm (s) et 6,82 ppm (s) pour **6**. On observe aussi deux signaux caractéristiques *O*-méthyléniques à 6,65 ppm (s) / 5,41 ppm (s) pour **77** et 5,79 ppm (s) / 5,42 ppm (s) pour **6**. Ces deux spectres peuvent cependant nettement se différencier par le déplacement chimique du singulet à 3.69 ppm pour **77** et 4.19 ppm pour **6** correspondant respectivement au proton H6' de la massadine et chloromassadine. Après comparaison des données spectrales avec celles de la littérature, le composé **77** a donc été identifié comme

étant la massadine isolée pour la première fois de *Stylissa massa* par Fusetani *et. coll.* en 2003.⁷⁶ et le composé **6** comme la chloromassadine déjà isolée de la même éponge par Köck *et. coll.* en 2007.⁷⁷ De façon singulière et pour les deux dimères, le proton H6' sort sous la forme d'un singulet, ce qui est sûrement dû à la valeur de l'angle dièdre voisin de 90 ° entre les protons H6' et H7'.



6 X = Cl : chloromassadine
77 X = OH : massadine

Figure 50 : Structures des composés **6** et **77**.

En 2006, Romo *et. coll.*⁷⁸ ont émis l'hypothèse selon laquelle la massadine (**77**) pourrait provenir d'un analogue chloré en position 6' de même configuration. La transformation de l'analogue chloré en massadine pourrait alors survenir par la formation d'un intermédiaire aziridine. En 2007, Köck et Baran isolent le produit naturel, chloromassadine (**6**). Ils démontrent alors, que chauffée à 60° C dans l'eau pendant 4h, la chloromassadine (**6**) se transforme totalement en massadine (**77**). L'hypothèse de Romo était ainsi vérifiée (*Schéma 51*).

La position 6' chlorée pourrait subir une attaque nucléophile de l'atome N1' afin de former un intermédiaire aziridinium et provoquer le départ du chlore, puis l'attaque de l'eau sur cette espèce activée permettrait d'obtenir la position hydroxylée 6' de la massadine (**77**) avec rétention de configuration.⁷⁷

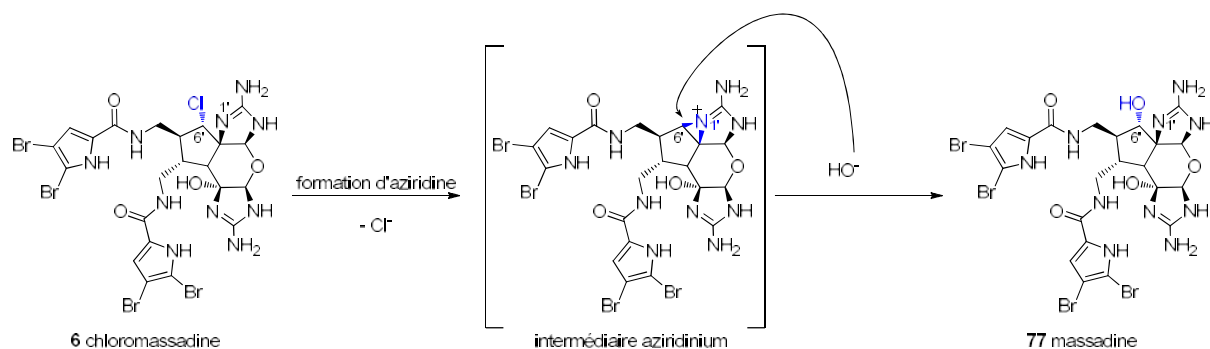


Schéma 51 : Mécanisme de transformation de la chloromassadine (6) en massadine (77).

Lors de l'étude spectrale des composés **6** et **77**, ce phénomène a aussi été observé à température ambiante dans CH₃OH. On observe en effet, l'apparition de signaux correspondant à la massadine (**77**), et notamment le signal caractéristique du proton H6' (Figure 52).

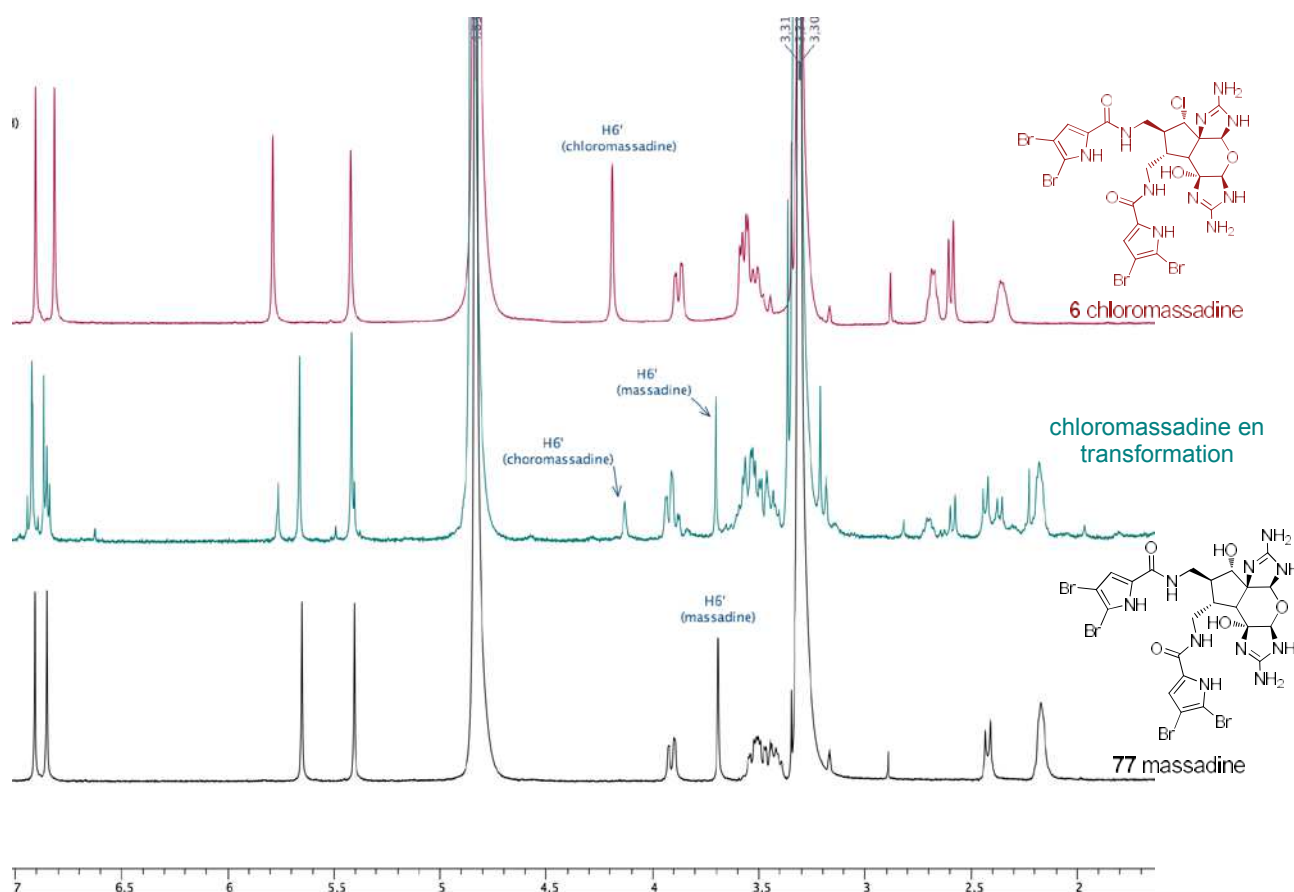


Figure 52 : Spectres RMN ¹H, 500 MHz, de la transformation de la chloromassadine (6) en massadine (77).

III.3.3. Éluclidation structurale des dimères nouveaux

➤ Éluclidation structurale des composés dimériques nouveaux **117** et **118**

Les deux composés **117** et **118**, tous deux tétrabromés d'après la distribution isotopique de leurs pics de masse (824,8 / 826,8 / 828,8 / 830,8 / 832,8) pour **118**, et (842,8 / 844,8 / 846,8 / 848,8 / 850,8 / 852,8) pour **117**, présentent respectivement des masses à haute résolution de m/z 828.8730 ($[M+H^+]$) correspondant à la formule brute $C_{22}H_{25}^{79}Br_2^{81}Br_2N_{10}O_5$, et m/z 842.8517 ($[M+H^+]$) correspondant à la formule brute $C_{22}H_{25}^{79}Br_4ClN_{10}O_4$. On remarque que leurs masses respectives sont identiques à celles de la massadine (**77**) et de la chloromassadine (**6**) mais que les spectres RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz) sont différents (Figure 53).

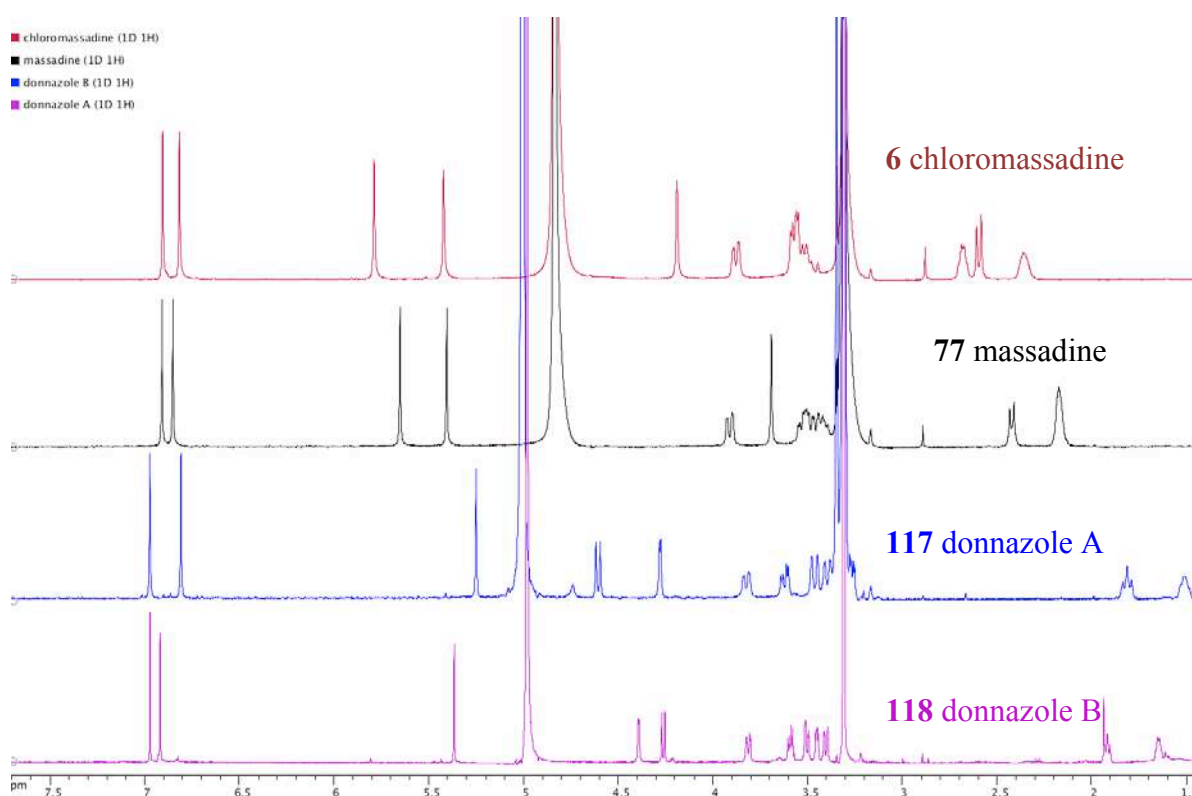


Figure 53 : Spectres RMN 1H , 500 MHz, des composés **6**, **77**, **117** et **118**.

Des analyses COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY dans le CD_3OD et le $DMF-d_7$ ont été réalisées pour les deux composés, et, pour le composé **118**, une expérience supplémentaire 1H - ^{15}N HMQC a été réalisée (voir Annexe 1).

Le composé **118** présente une connection COSY (DMF-*d*₇, 600 MHz) du 9'-NH (8,51 ppm) au 9-NH (8,76 ppm) et du H6' (4,62 ppm) au H5 (4,85 ppm) (Figure 54). Les corrélations HMBC H8 (3,50/3,57 ppm) / C10 (160,4 ppm), 9-NH (8,76 ppm) / C10 (160,4 ppm) ainsi que 12-NH (13,18 ppm) / C11 (128,9 ppm), C13 (98,7 ppm) C14 (105,0 ppm) et H15 (7,14 ppm) /C11 (128,9 ppm), C13 (98,7 ppm) et C14 (105,0 ppm) ont permis de mettre en évidence la partie 2-pyrrole carboxamide à partir de la position 7. Les mêmes corrélations sont observées à partir de la position 7'. Les corrélations HMBC H6 (3,45 ppm) / C6' (82,7 ppm) et H6' (4,62 ppm) / C6 (39,4 ppm) ainsi que H6' (4,62 ppm) / C5' (71,5 ppm) et H6 (3,45 ppm) / C5' (71,5 ppm) ont permis de révéler, en accord avec la connectivité COSY décrite précédemment, le cyclopentane central de la molécule fermé par le carbone quaternaire C5'. Le noyau 4'-hydroxyimidazole a été mis en évidence par les corrélations HMBC 3'-NH (9,77 ppm) / C2' (159,9 ppm), C4' (81,7 ppm) et C5' (71,5 ppm) ainsi que par les corrélations H4' (5,51 ppm) / C2' (159,9 ppm) et H6 (3,45 ppm) / C4' (81,7 ppm). Par ailleurs, les deux sets de corrélations énoncés plus haut ont permis de révéler l'existence du carbone spiro C5', liant la partie cyclopentanique centrale au cycle 4'-hydroxyimidazole et caractéristique des structures dimériques cyclopentaniques des P-2-AIs. La présence du noyau imidazolinone n'a pu être mis en évidence que par la connectivité COSY H6 (3,45 ppm) / H5 (4,85 ppm) et la corrélation HMBC H6 (3,45 ppm) / C4 (191,3 ppm). La valeur du déplacement chimique du carbone C4 semble élevée mais des déplacements chimiques similaires ont déjà été observés dans la littérature, notamment dans le cas des noyaux 2-aminoimidazolone des oxysceptrines¹²⁷ et de la mauritiamine.¹²⁸ La présence de cette fonction carbonyle et l'absence de corrélations entre les noyaux 2-aminoimidazolone et 2-aminoimidazole impliquent la présence d'une structure ouverte, non cyclisée en tétrahydropyrane, comme pour la massadine. Les corrélations ¹H-¹H COSY et ¹H-¹³C HMBC clés indispensables à l'élucidation structurale des donnazoles A et B sont données dans la figure suivante.

¹²⁷ Keifer, P. A.; Schwartz, R. E.; Koker, M. E. S.; Hughes, R. G.; Rittschof, D.; Rinehart, K. L. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2965-2975.

¹²⁸ Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501-503.

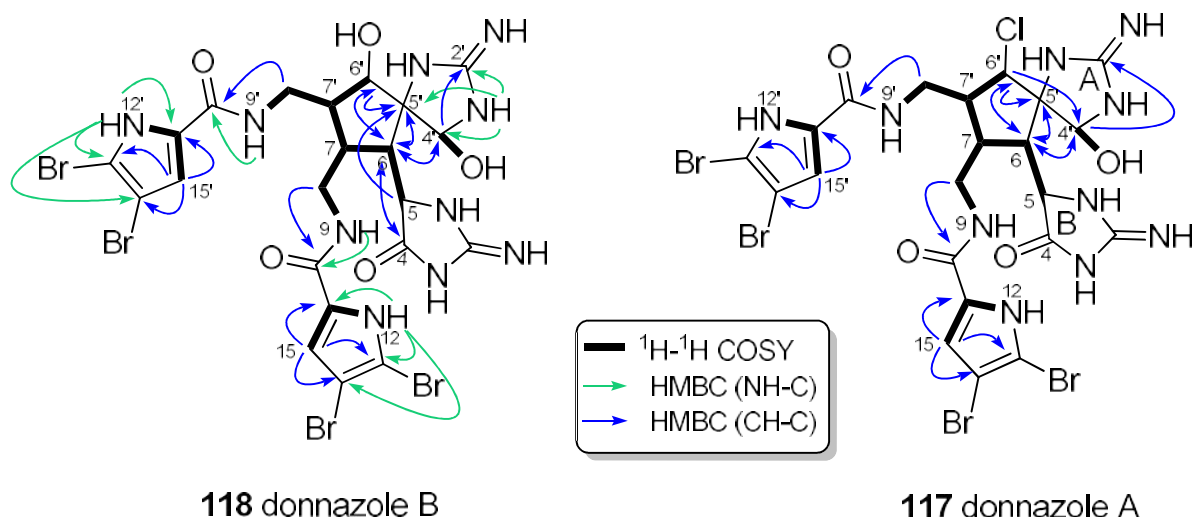


Figure 54 : Corrélations ^1H - ^1H COSY et ^1H - ^{13}C HMBC clés observées dans le DMF-d_7 pour les composés **117** et **118**.

Afin de compenser l'observation d'une seule corrélation HMBC pour la partie imidazolinone de la molécule, les déplacements chimiques des azotes ont été déterminés grâce à une analyse $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC. Ces analyses RMN complémentaires faisant intervenir l'atome d'azote sont de plus en plus utilisées pour la détermination structurale des P-2-AIs. Le ratio N/C pour ces molécules étant élevé, l'étude des déplacements chimiques ^{15}N de la molécule permet d'accéder à des informations importantes sur la structure des molécules. Cela permet aussi de former, au fur et à mesure, une base de données de déplacements chimiques ^{15}N , qui pourra rendre la détermination structurale de ce type de molécules plus simple et plus rapide. Köck *et.al.* ont déjà montré l'importance des expériences ^1H - ^{15}N pour réduire drastiquement le nombre de structures possibles lors de l'élucidation structurale des composés oroïdine et manzacidine.¹²⁹ Les déplacements chimiques des azotes du donnazole B sont donnés dans la *Figure 56* pour des raisons de clarté des schémas (Voir aussi Annexe 1). Un tableau regroupant les déplacements chimiques ^1H , ^{13}C et ^{15}N est donné dans la partie expérimentale de ce mémoire.

Étant donné la faible quantité de composé **117** (1,1 mg) récupéré, et malgré des temps d'accumulation importants en RMN, nous n'avons pu observer qu'un nombre réduit de corrélations ^1H - ^{13}C HMBC (*Figure 54*). Nous observons cependant la connectivité COSY (DMF-d_7 , 850 MHz) du 9'-NH (8,52 ppm) au 9-NH (8,71 ppm) et du H6' (4,29 ppm) au H5 (4,36 ppm). Ici, la valeur du proton H6' corroborée à la distribution isotopique du pic de

¹²⁹ Köck, M.; Junker, J.; Lindel, T. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2041-2044.

masse, permet de révéler la substitution d'un atome de chlore au lieu de la fonction hydroxyle présente sur la position 6' du donnazole B. Les corrélations HMBC, qui ont permis de mettre en évidence les deux parties 2-pyrrolocarboxamides sont H8 (3,52/3,67 ppm) / C10 (162,5 ppm) et H15 (7,13 ppm) / C11 (128,8 ppm), C13 (105,2 ppm) et C14 (98,7 ppm). La fermeture en cyclopentane au niveau de la position 5' a été révélée par les corrélations HMBC H6' (4,29 ppm) / C6 (39,2 ppm), H6' (4,29 ppm) / C5' (72,2 ppm) et H6 (3,56 ppm) / C4' (82,5 ppm). Les corrélations HMBC H6 (3,56 ppm) / C4' (82,5 ppm), H6' (4,29 ppm) / C4' (82,5 ppm) et H4' (5,44 ppm) / C2' (159,2 ppm) ont permis de mettre en évidence la présence du même 4'-hydroxyimidazole que pour le donnazole B. Enfin, aucune corrélation HMBC n'a permis de mettre en évidence la présence du noyau imidazolone. Toutes les corrélations indispensables à l'élucidation structurale du donnazole A sont données *Figure 54*. Cependant l'extrême similitude des déplacements chimiques ^{13}C du donnazole A (**117**) avec ceux du donnazole B (**118**), ajoutée à la différence de masse entre les deux molécules, qui correspond à la substitution formelle d'un groupement OH par un groupement Cl, nous a orientés vers le même type de structure que celle du donnazole B (**118**).

Une comparaison formelle des déplacements chimiques ^{13}C des deux donnazoles a été réalisée (*Tableau 3*) et illustrée sous forme d'un graphique très parlant (*Figure 55*).

Position	Donnazole A (117)	Donnazole B (118)
1-NH	-	-
2	155,5	159,7
3-NH	-	-
4	Nd	191,3
5	62,5	63,1
6	39,9	38,6
7	40,0	38,6
8a	42,5	41,2
8b		
9-NH	-	-
10	162,5	162,7
11	128,8	128,5
12-NH	-	-
13	106,4	106,3
14	100,1	100,0
15	114,9	114,5
1'-NH	-	-
2'	159,2	159,6
3'-NH	-	-
4'	82,9	82,0
5'	73,1	71,8
6'	67,9	84,8
7'	46,5	44,3
8'a	37,8	36,9
8'b		
9'-NH	-	-
10'	163,1	161,9
11'	128,5	128,4
12'-NH	-	-
13'	106,5	106,4
14'	100,1	100,1
15'	114,8	114,7

Tableau 3 : valeurs de déplacement chimique ^{13}C des composés 117 et 118 CD_3OD , 500 MHz

Cette comparaison a permis de mettre en évidence la grande similitude des déplacements chimiques ^{13}C entre les deux molécules, excepté pour la position 6', qui est hydroxylée dans le cas du donnazole B (**118**) et chlorée dans le cas du donnazole A (**117**). Cette grande similitude des déplacements chimiques ^{13}C permet d'accéder à deux informations importantes :

- Les structures des donnazoles A et B seraient très similaires ou même identiques, excepté en position 6' ;
- Les centres stéréogènes C4', C5, C5', C6, C7, C7' possèderaient la même configuration relative pour les deux composés.

Il est à rappeler que cette méthode de comparaison des déplacements chimiques ^{13}C des carbones stéréogènes a été utilisée lors de l'élucidation structurale de la chloromassadine et des stylissadines.^{77,130}

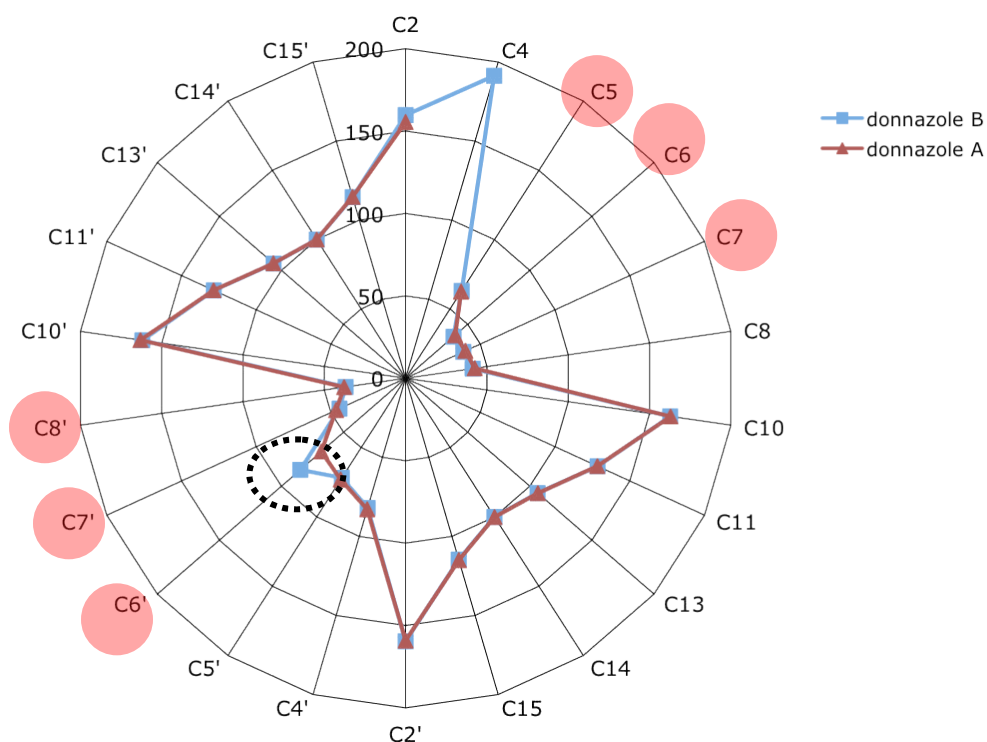


Figure 55 : Comparaison des déplacements chimiques ^{13}C des donnazoles A (**117**) (rouge) et B (**118**) (bleu) dans CD_3OD . Surlignés en rouge, les centres stéréogènes des deux composés

¹³⁰ Grube, A.; Köck, M. *Org. Lett.* **2006**, 8, 4675-4678.

La stéréochimie relative des deux composés a cependant été confirmée grâce à l'analyse de leurs spectres NOESY et ROESY. De nouveau, le nombre de corrélations NOE et ROE observées est bien moindre pour **117** que pour **118** (cf. partie expérimentale). Les corrélations ROE observées pour le donnazole B (**118**) sont données dans la figure ci-dessous.

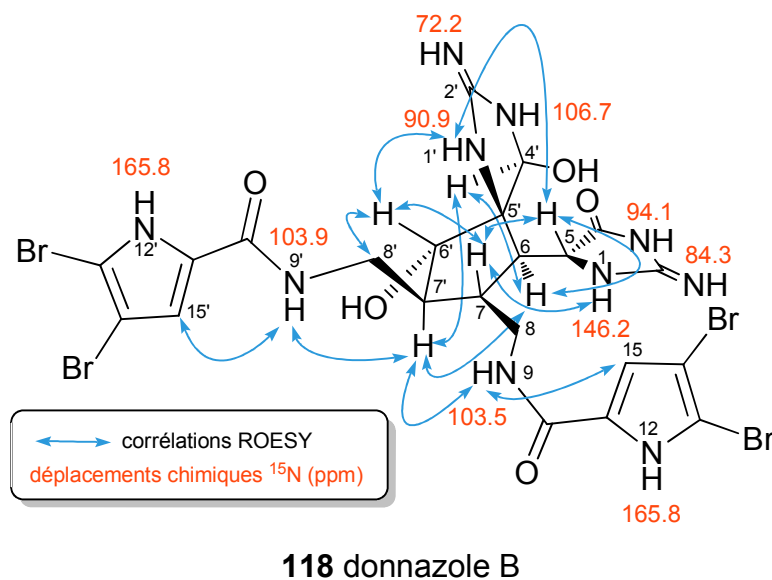


Figure 56 : Corrélations ROESY observées pour le donnazole B (**118**) et déplacements chimiques ^{15}N

Toutes les corrélations ROESY et NOESY suggèrent la même configuration relative pour les donnazole A (**117**) et B (**118**).

Afin d'étudier la stéréochimie absolue des donnazoles A (**117**) et B (**118**), nous avons effectué des mesures de dichroïsme circulaire.

Note 1 : Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est un phénomène qui a été découvert par Jean-Baptiste Biot, Augustin Fresnel et Aimé Cotton dans la première moitié du 19^{ème} siècle. Il repose sur la capacité d'un échantillon possédant un chromophore chiral ou placé dans un environnement asymétrique, d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement droite et la lumière polarisée circulairement gauche. Le spectre dichroïque correspond à la différence d'absorbance entre ces deux types de lumières, pour chaque longueur d'onde.

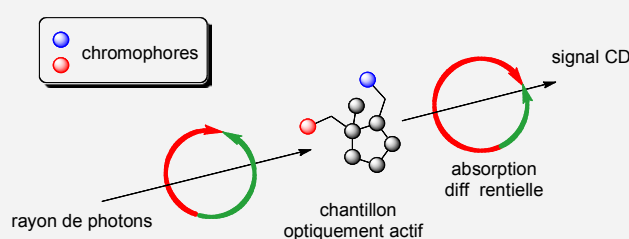


Figure 57 : Principe du dichroïsme circulaire

Cette technique est principalement utilisée dans le cas des protéines, dans l'UV lointain (180 - 260 nm, zone d'absorption de la liaison peptidique) pour déterminer la structure secondaire des protéines. Cette méthode est sensible au pH, à la température, aux effets de ligand et aux interactions moléculaires. Mais elle peut aussi bien être utilisée dans le cas des petites molécules organiques. Elle a tout d'abord été utilisée dans le cas des stéroïdes en utilisant la liaison C=O comme chromophore dans le cas du cafestol.^{131,132} Le dichroïsme circulaire est utilisé maintenant dans de nombreux cas, notamment grâce à la méthode de l'« exciton split chirality » qui permet de déterminer sans ambiguïté la stéréochimie absolue de molécules organiques.¹³³ La facilité d'utilisation du CD et la quantité infime de composé nécessaire pour obtenir un spectre en fait une méthode de choix pour l'étude de la stéréochimie absolue des produits naturels portant des chromophores, tels que les P-2-AIs^{134,135,136}.

¹³¹ Djerassi, C.; Riniker, R.; Riniker, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 6362-6377.

¹³² Djerassi, C.; Cais, M.; Mitscher, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 2386-2398.

¹³³ Harada, N.; Nakanishi, K. *Oxford University Press: Sendai, Japan*, **1983**.

¹³⁴ Lindel, T.; Jacquot, D. E. N.; Zoellinger, M.; Kinnel, R. B.; McHugh, S.; Köck, M. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 6353-6355.

Deux éléments de la littérature nous permettaient, en effet, de comparer nos résultats de dichroïsme circulaire :

Le dichroïsme circulaire (CD) de la massadine a été publié en 2003 lors de son isolement.⁷⁶

Les auteurs ont synthétisé un analogue simplifié, de stéréochimie absolue connue et mimant la liaison C7-C7' (**Figure 58**) en y attachant deux chromophores pyrroliques. Ils ont pu comparer la mesure du CD de l'analogue avec celui de la massadine, déterminant ainsi la stéréochimie absolue au niveau de la liaison C7-C7' de la massadine, et donc, celle du composé entier, avec l'appui d'analyses ROESY.

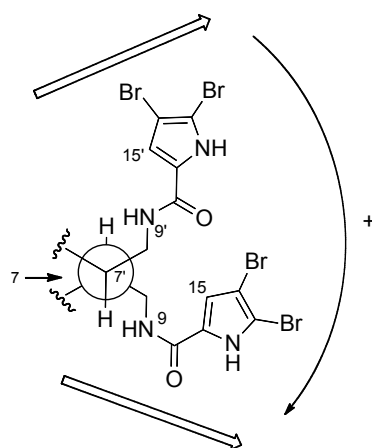


Figure 58 : Schéma de la liaison C7-C7' impliquant un effet Cotton positif (cas de la massadine)

Une autre étude a été réalisée sur la sceptrine (**67**). La stéréochimie relative de la sceptrine naturelle est la seule à avoir été déterminée par diffraction des rayons X⁷². Les CD des (-)-sceptrines naturelle et synthétique et de la (+)-sceptrine synthétique ont ensuite été comparés.

137

Nous avons donc mesuré les CD de nos donnazoles A (**117**) et B (**118**) et de la sceptrine isolée et les avons comparés à ceux de la massadine (**77**)⁷⁶ et de la sceptrine (**67**)⁷² pour en déduire leur stéréochimie absolue.

¹³⁵ Yasuda, T.; Araki, A.; Kubota, T.; Ito, J.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 488-491.

¹³⁶ Jacquot, D. E. N.; Mayer, P.; Lindel, T. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1141-1148.

¹³⁷ Baran, P. S.; Li, K.; O'Malley, D. P.; Mitsos, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 249-252.

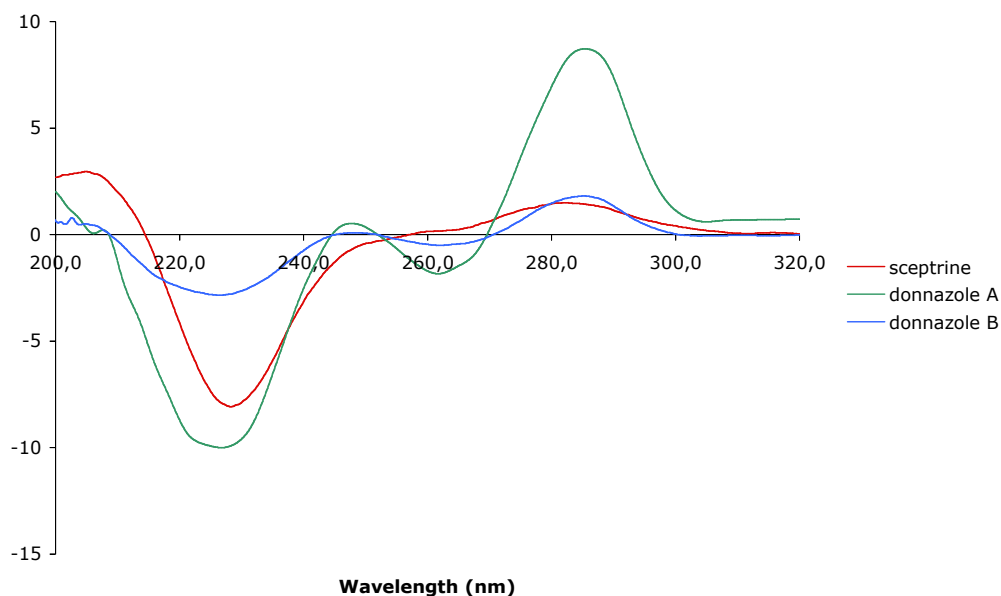


Figure 59 : Dichroïsmes circulaires (CD) de la sceptrine (**67**) (rouge), du donnazole A (**117**) (vert) et B (**118**) (bleu)

Les CD des donnazoles A (**117**) et B (**118**) et celui de la sceptrine isolée sont très similaires (*Figure 59*), Ils montrent un effet Cotton positif à 280 nm. De plus, la comparaison avec les données de la littérature⁷⁶ met en évidence une stéréochimie absolue identique pour les donnazoles A (**117**), B (**118**), la sceptrine (**67**) et la massadine (**77**). La stéréochimie absolue de ces molécules est celle représentée dans la *Figure 56*. De plus, ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de biogenèse universelle des P-2-AIs énoncée au laboratoire.

Hypothèse de formation des donnazoles A et B et essais d'hémisynthèse

En 2001, le laboratoire a émis une hypothèse universelle de biogenèse pour expliquer la provenance de chaque monomère et dimère de la famille P-2-AIs.³⁵ Köck et Baran ont ensuite utilisé cette réactivité pour l'étendre à la formation des massadines nouvellement isolées.²⁸ Cette hypothèse est basée sur la réactivité ambivalente de l'oroïdine. En effet, la présence du noyau 2-aminoimidazole conjugué de l'oroïdine permet d'écrire plusieurs formes tautomères, chaque tautomère présentant des positions électrophiles ou nucléophiles (*Schéma 60*).

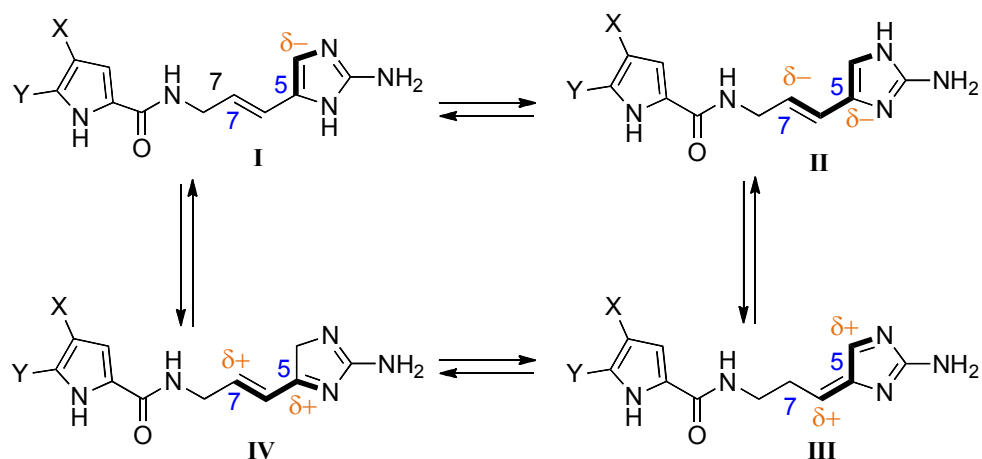


Schéma 60 : Réactivité ambivalente du motif oroïdine

Une réaction de dimérisation peut alors avoir lieu lorsque le carbone nucléophile d'un tautomère vient réagir sur le carbone électrophile d'un autre tautomère, donnant ainsi naissance à une liaison C-C. Dans le cas des dimères complexes, famille dont font partie les nouveaux composés **117** et **118**, la première liaison C-C formée lors de la dimérisation de l'oroïdine conduirait au composé de type thréo (*Schéma 61*).

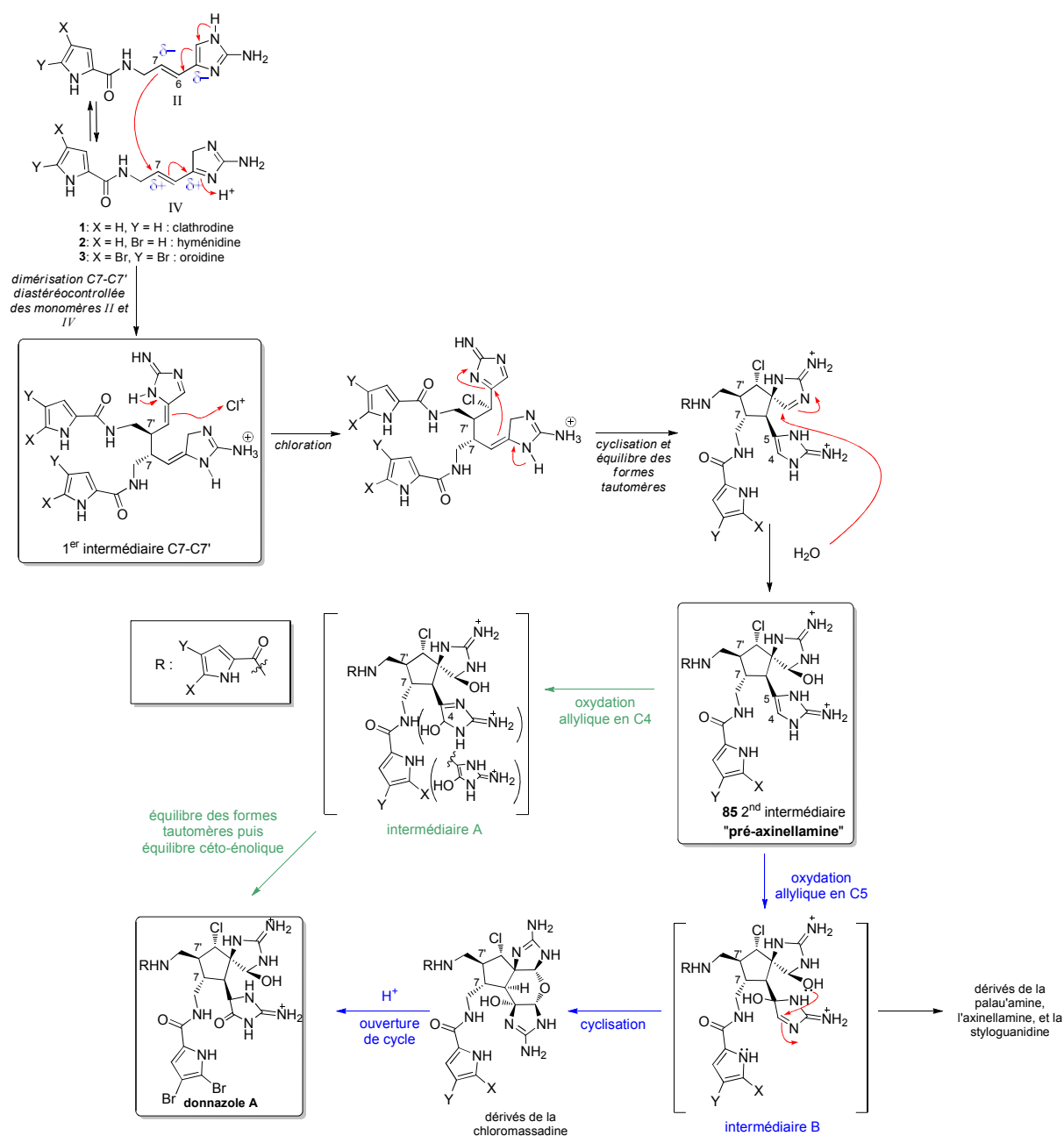


Schéma 61 : Hypothèse de formation du donnazole A (117)

Une dimérisation diastéréocontrôlée via les tautomères II et IV mènerait à la formation du premier intermédiaire C7-C7'. Par la suite, cet intermédiaire pourrait subir une chloration, une cyclisation puis une hydratation afin d'obtenir le second intermédiaire cyclopentanique **85**, nommé dans la littérature « pré-axinellamine ». ²⁸ Après une oxydation et une ou plusieurs cyclisations, la « pré-axinellamine » pourrait être à l'origine de tous les P-2-AIs dimères cyclopentaniques isolés jusqu'ici (Schéma 61). ³ Il est à noter que ces deux intermédiaires principaux (**119** et **85**) n'ont, jusqu'à maintenant, jamais encore été isolés.

A ce stade, il existe deux chemins possibles pour expliquer la formation de **117**. Soit, en suivant la voie verte (*Schéma 61*), la pré-axinellamine subirait oxydation allylique en C4 pour donner l'intermédiaire A. Ce dernier, après un équilibre des formes tautomères, donnerait l'énol, puis la cétone correspondante, et conduirait donc à **117**. Cette hypothèse inscrirait de façon intéressante le donnazole A (**117**) dans l'hypothèse de biogenèse des P-2-AIs dimères complexes. En effet, grâce à son motif cyclopentane et sans comporter aucune cyclisation supplémentaire, il serait alors l'équivalent stable « isolable » de la pré-axinellamine. Le donnazole A présenterait alors un intérêt particulier en mettant en évidence l'existence de la pré-axinellamine, précurseur commun supposé de tous les dimères complexes de la famille P-2-AIs.

Il existe une seconde voie possible pour la formation de **117**. En suivant la voie bleue (*Schéma 61*) la pré-axinellamine (**85**) pourrait cette fois, subir oxydation allylique en C5, afin de donner l'intermédiaire B. Ce dernier, par cyclisation intramoléculaire de l'hydroxyle en position 4', permettrait la formation du tétrahydropyrane de la chloromassadine. Une fois formée, la chloromassadine pourrait alors subir une ouverture de cycle, en milieu acide par exemple, pour conduire à **117**.

En suivant le même raisonnement, la provenance de **118** est ambiguë.

En effet, **118** pourrait provenir, par la voie verte, de **117** (*Schéma 62*). Après substitution nucléophile du N1' sur la position C6' entraînant la formation de l'aziridine, le donnazole A (**117**) subirait alors l'attaque nucléophile de l'eau pour donner, avec rétention de configuration, le donnazole B. (**118**)

En suivant la voie bleue (*Schéma 62*), la massadine (**77**), pourrait ensuite subir une ouverture de cycle en milieu acide, par hydrolyse de l'aminocarbinoil afin d'obtenir **118**.

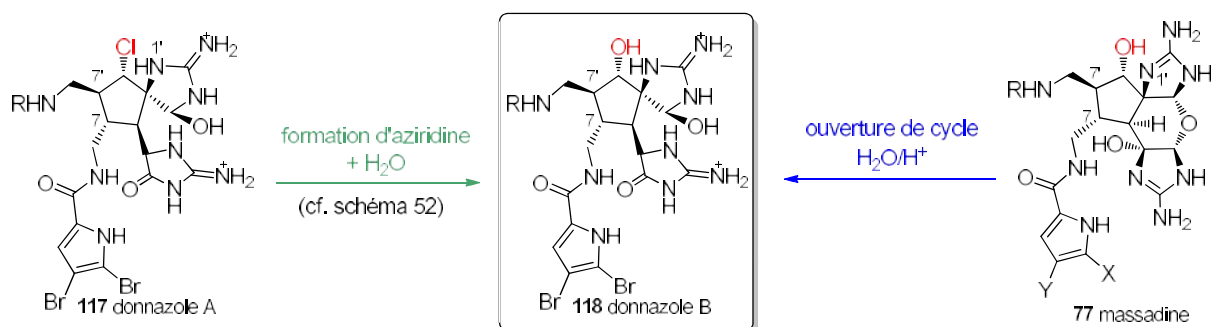
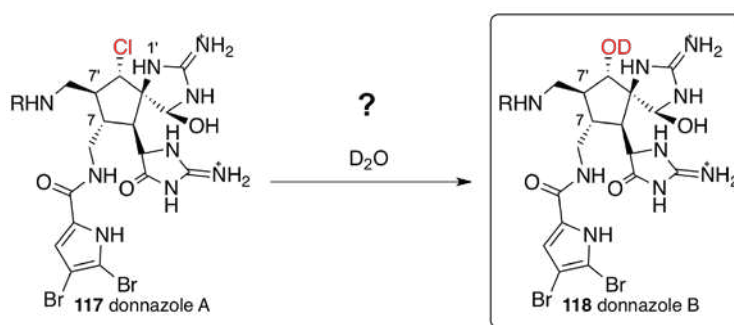


Schéma 62 : Hypothèses de formation de **118**.

Afin de découvrir la provenance du donnazole B, nous avons donc réalisé deux expériences d'hémisynthèse. Il est à noter que les très faibles quantités à notre disposition (0.8 mg pour le donnazole A, 3 mg pour le donnazole B), ne nous ont pas permis de réaliser tous les essais désirés.

Essai de conversion du donnazole A en donnazole B



Cette expérience a été réalisée sur 0.8 mg de donnazole A. Le composé a été solubilisé dans D₂O dans un tube RMN. Une RMN ¹H du composé de départ dans D₂O a été réalisée, puis le tube a été chauffé sans agitation à 40 °C pendant 1 h puis 1,5 h (*Figure 63*).

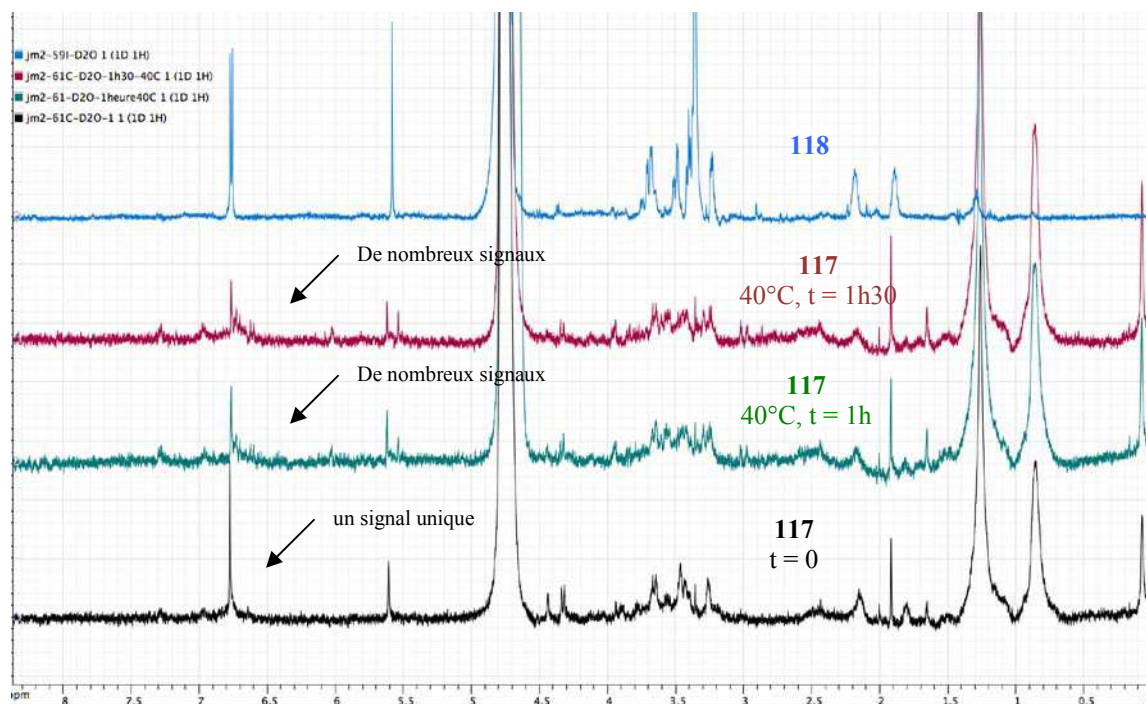


Figure 63 : Spectres RMN ^1H , 500 MHz, dans D_2O du composé **117** pendant la transformation et de **118**.

On observe au bout d'une heure, une complexification du spectre ^1H , notamment au niveau des signaux pyrroliques, avec cependant une persistance du composé de départ. Au bout d'1,5 h, la complexification augmente encore un peu plus. Nous avons donc décidé, afin d'avoir une meilleure visibilité des espèces formées, d'échanger les deutériums avec de l'eau, H_2O , puis d'évaporer l'échantillon et de réaliser un contrôle UPLC.

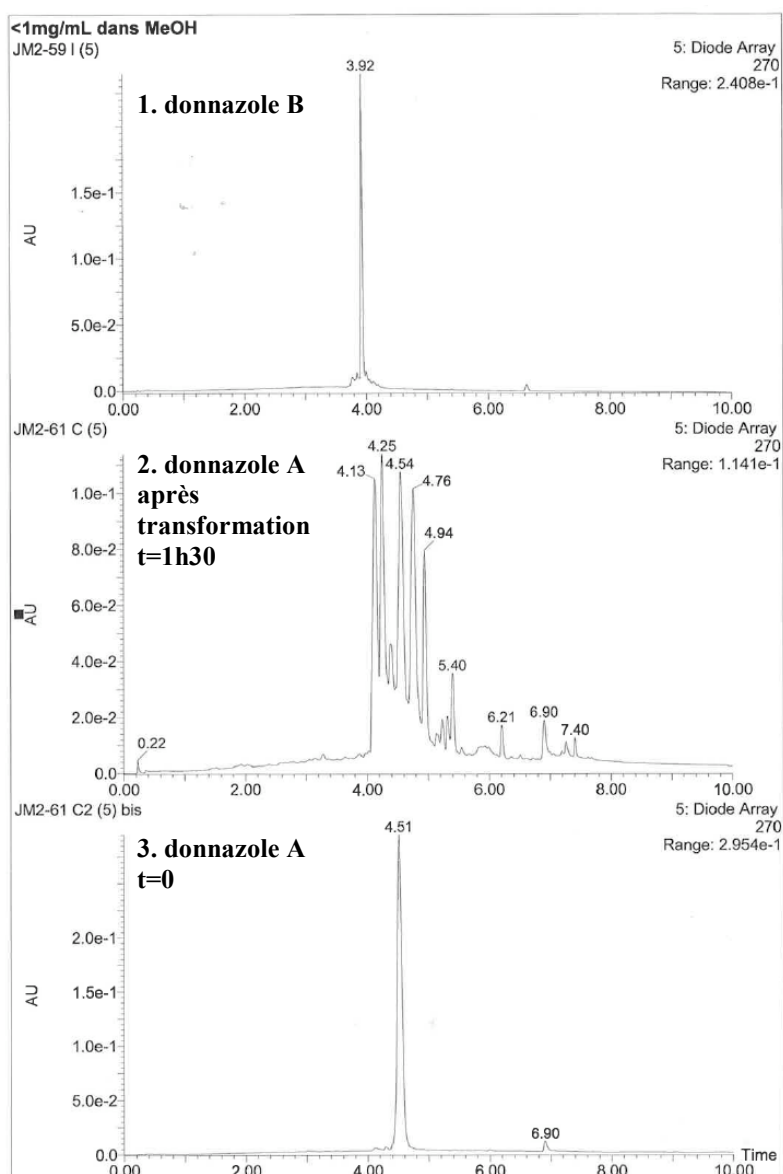


Figure 64 : Chromatogrammes UPLC-UV du donnazole B (1), du donnazole A après transformation (2), du donnazole A à $t = 0$ (3) dans les mêmes conditions UPLC.

L'hydrolyse du donnazole A a donné de nombreux composés parmi lesquels il est difficile de reconnaître la masse et le temps de rétention du donnazole B. De plus, la différence de distribution isotopique entre des massifs de masse correspondant à 4Br et ceux correspondant à 4BrCl est difficile à observer à cause de la présence de deutérium résiduel. Cependant après analyse des chromatogrammes de masse UPLC, on remarque que les composés issus de cette hydrolyse ont majoritairement une masse comprise entre 780 et 850 et comptent tous au moins 4 atomes de brome. Les composés formés pourraient donc correspondre à d'autres dimères de P-2-AIs. Ainsi, les conditions non optimisées dans lesquelles a été réalisée la transformation n'ont pas permis de statuer quant au passage du donnazole A en donnazole B.

Note 2 : L'UPLC

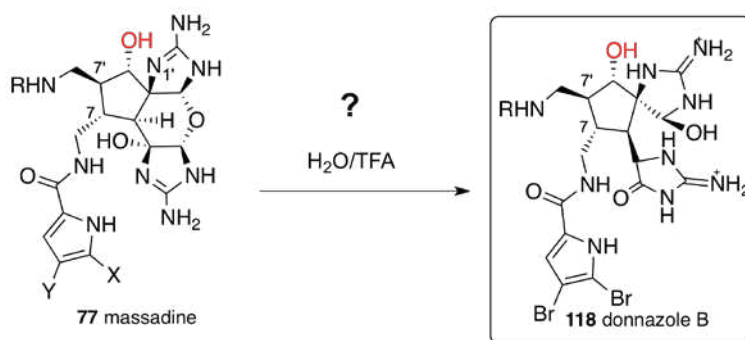
L'UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) est une marque déposée par Waters pour désigner des systèmes chromatographiques en phase liquide à haute pression. Cette nouvelle méthode a été introduite en 2004 afin de pallier les limites de l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography). En effet, les limitations de l'HPLC viennent du fait que les coefficients de diffusion sont plus faibles en phase liquide qu'en phase gazeuse, ce qui implique que la diffusion des analytes est plus lente dans la phase stationnaire, entraînant ainsi une moins bonne séparation. Une des solutions à cette limitation est l'utilisation de particules au diamètre plus petit, qui va cependant entraîner une augmentation rapide de la perte de charge et donc nécessitera une pression plus élevée.



Figure 65 : Appareillage UPLC utilisé à l'ICSN

C'est pourquoi l'UPLC repose sur l'emploi de phases stationnaires composées de particules de diamètre $< 2\mu\text{m}$ (alors que les colonnes HPLC sont habituellement remplies de particules de 3 à 5 μm) et fonctionne à des pressions de l'ordre de 550 à 1000 bar (alors qu'une HPLC classique fonctionne avec des pressions de 170 à 400 bar). Ainsi l'UPLC permet, grâce à des colonnes plus courtes, d'obtenir une séparation plus rapide, plus fine et très reproductible. De plus, des quantités extrêmement faibles d'analytes peuvent être détectées.

Essai de conversion de la massadine en donnazole B



Cette expérience a été réalisée sur 1 mg de massadine solubilisée dans un mélange 1/1 (H₂O/TFA) 1 : 1 de 400 μ l. Le mélange réactionnel a été chauffé progressivement et suivi étape par étape par UPLC selon le schéma suivant : 2 h à 30 °C, 2 h à 40 °C, 1,5 h à 60 °C, 1,5 à 70 °C puis 9,5 h à 80 °C.

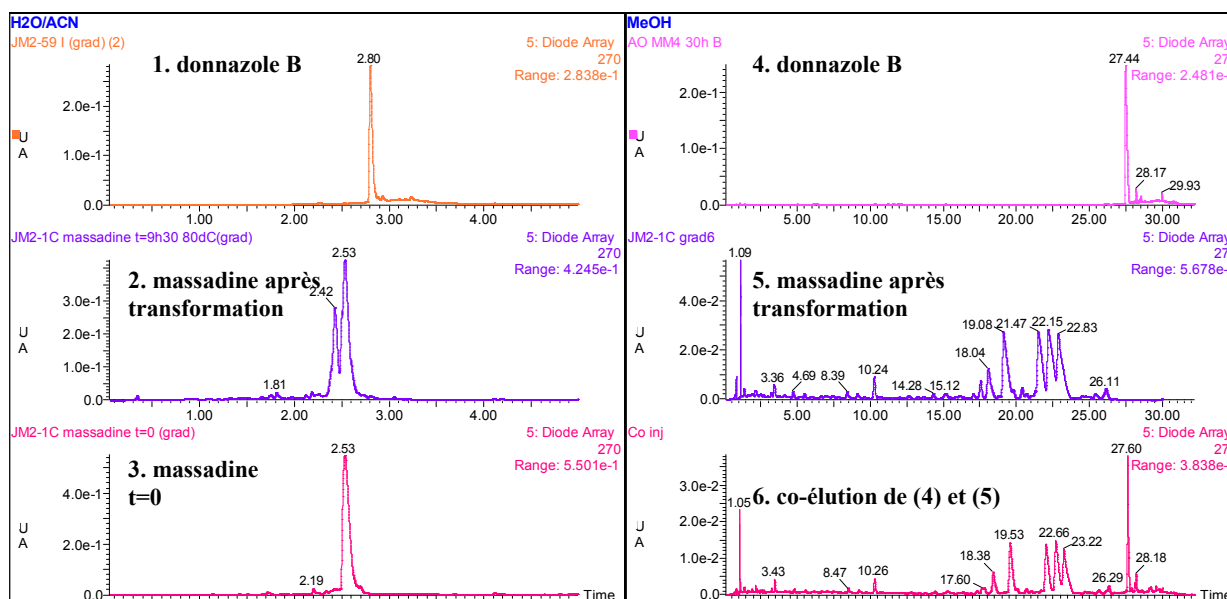


Figure 66 : Chromatogrammes UPLC-UV du donnazole B (1), de la massadine après transformation (2) et de la massadine à $t = 0$ (3) dans des conditions UPLC non optimisées. Chromatogrammes UPLC-UV du donnazole B (4), de la massadine après transformation (5) et co-élution du donnazole B et de la massadine transformée (6) dans des conditions UPLC optimisées.

La tentative d'ouverture du tétrahydropyrane de la massadine a conduit à la formation de nombreux composés parmi lesquels le donnazole B est clairement non identifié. Cependant après analyse des chromatogrammes de masse UPLC, les composés issus de cette hydrolyse ont majoritairement une masse m/z 824.1 ($[M+H^+]$) correspondant à celle de la massadine et du donnazole B. De plus, la distribution isotopique du motif de masse correspondant à 4 bromes a été conservée. Ainsi, d'autres isomères de la massadine ont été formés. Étant donné la complexité de la structure de la massadine, de nombreuses possibilités de transformation sont possibles en milieu acide. Malheureusement, les conditions non optimisées dans lesquelles a été réalisée cette transformation n'ont pas permis non plus, de statuer quant à l'éventuel passage de la massadine en donnazole B.

Conclusion générale sur les deux essais

Les deux essais d'hémisynthèse réalisés n'ont pas permis de révéler avec certitude une filiation entre le donnazole B et deux précurseurs possibles; la trop faible quantité de substrat disponible nous ont limités dans le nombre d'essais exploratoires. Cependant, de nombreuses informations ont été collectées.

Il a été découvert que dans certaines conditions (chauffage, milieu acide) les dimères tels que les donnazoles et les massadines possèdent une capacité intéressante à se transformer en de nombreux autres dimères complexes sans pour autant conduire à une dégradation impliquant le morcellement de la molécule.

Dans la littérature, il est signifié que la transformation spécifique de la chloromassadine en massadine par le mécanisme de formation d'aziridine est possible car la valeur de l'angle dièdre entre $N1'-C5'-C6'-Cl$ est de 152° .⁷⁷ Pour tous les autres congénères chlorés de la famille, pour lesquels il n'existe pas d'homologues hydroxylés (palau'amine, styloguanidine etc...), cet angle dièdre est compris entre 79° et 99° . Ainsi, il serait intéressant d'évaluer par un calcul DFT (Density Functional Theory) analogue, la valeur de cet angle dièdre pour le donnazole A. On pourrait ainsi avoir une idée sur la provenance du donnazole B. En effet, si l'angle dièdre est de l'ordre de celui observé pour la chloromassadine, on aurait alors un passage possible du donnazole A au donnazole B par le mécanisme de formation d'aziridine, les conditions expérimentales restant à optimiser. Par contre si la valeur de cet angle est comprise approximativement entre 79° et 99° , on aurait alors une difficulté de formation de l'aziridine, et donc, plus probablement, un autre mécanisme pourrait conduire de la massadine au donnazole B.

➤ Éluclidation structurale du composé dimérique nouveau **120**

Le composé **120**, tétrabromé et monochloré d'après la distribution isotopique de son pic de masse (799,8 / 801,8 / 803,8 / 805,8 / 807,8 / 809,8), présente une masse haute résolution de m/z 799.7847 ($[M-H]^+$) correspondant à la formule brute $C_{21}H_{19}^{79}Br_4ClN_7O_5$ ³⁵ encore inconnue dans la famille des P-2-AIs. Cependant la comparaison de sa formule brute avec celle de la chloromassadine indique une différence d'un atome de carbone et de trois atomes d'azote, pouvant correspondre à un motif guanidine.

On observe une connectivité COSY (DMF- d_7) du 9'-NH (8,44 ppm) au H8 (3,43/4,38 ppm) et du H6' (4,52 ppm) au H6 (3,02 ppm). Les corrélations HMBC 9'-NH (8,44 ppm) / C10' (160,4 ppm), 12'-NH (12,96 ppm) / C14' (98,6 ppm) et H15' (7,14 ppm) / C13' (105,2 ppm) ont permis de mettre en évidence une des partie 2-pyrrolocarboxamide. La seconde partie a été révélée par les corrélations HMBC H8 (3,43/4,38 ppm) / C10 (161,6 ppm), 12-NH (12,90 ppm) / C14 (98,2 ppm) et H15 (6,84 ppm) / C13 (104,8 ppm). Cependant on n'observe pas de signal correspondant au proton 9-NH ce qui indique une cyclisation de l'azote N9. Le coeur pentacyclique de la molécule a été mis en évidence par la connectivité COSY énoncée plus haut ainsi que les corrélations HMBC H6' (4,52 ppm) / C5' (81,7 ppm) et H6 (3,02 ppm) / C5' (81,7 ppm). Les corrélations 1H - ^{13}C HMBC H6' (4,52 ppm) / C4' (92,8 ppm) , H4' (5,87 ppm) / C2' (159,1 ppm) et 1H - ^{15}N HMBC H6' (4,52 ppm) / N1' (93 ppm) et H4' (5,87 ppm) / N3' (102 ppm) ont permis de mettre en évidence le noyau 2-aminoimidazole attaché par le carbone spiro C5' (81,7 ppm) au cyclopentane central, de la même façon que pour les donnazoles A et B. Enfin, la corrélation HMBC H4' (5,87 ppm) / C5 (107,2 ppm) a permis de mettre en évidence une cyclisation originale en tétrahydrofurane, jamais encore rencontrée dans la famille des P-2-AIs. Le noyau pipéridine qui lui est attaché, déjà rencontré dans les structures de type agélaspongine,¹³⁸ a été révélé par les corrélations HMBC H8 (3,43/4,38 ppm) / C4 (80,4 ppm) et H4 (5,84 ppm) / C8 (34,8 ppm) et H7 (2,27 ppm) / N9 (125 ppm). La présence des deux groupements hydroxyles situés en position 4 et 5 ont été mis en évidence par la corrélation 5-OH (7,02 ppm) / C5 (107,2 ppm), la formule brute donnée par la HRMS qui compte 5 oxygènes et le déplacement chimique de C4 (80,4 ppm). Les corrélations 1H - 1H

¹³⁸ Fedoreyev, S. A.; Ilyin, S. G.; Utkina, N. K.; Maximov, O. B.; Reshetnyak, M. V.; Antipin, M. Y.; Struchkov, Y. T. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3487-3492.

COSY et ^1H - ^{13}C et ^1H - ^{15}N HMBC clés indispensables à l'élucidation structurale du donnazole C sont données dans la *Figure 67* (voir aussi Annexe 1).

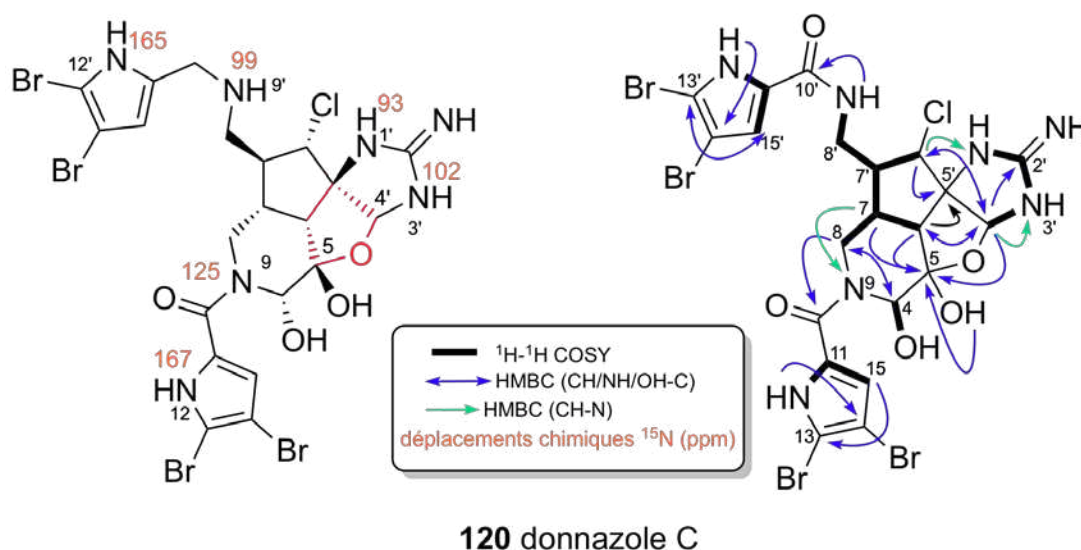


Figure 67 : Structure et corrélations ^1H - ^1H COSY et ^1H - ^{13}C et ^1H - ^{15}N HMBC clé observées et déplacements chimiques ^{15}N pour le composé **120**.

Deux analyses supplémentaires ^1H - ^{15}N HMQC et HMBC ont permis de déterminer les déplacements chimiques de la plupart des azotes présents sur la molécule, ainsi que de mettre en évidence certaines corrélations utiles pour la détermination structurale (*Figure 67*).

La stéréochimie du composé **120** a aussi été déterminée par l'analyse des spectres NOESY et ROESY dans le $\text{DMF-}d_7$ (*Figure 68*). La structure tétracyclique du composé permet la formation d'une forme cage sous le plan moyen du cyclopentane. En effet, les protons $\text{H}7'$, $\text{H}4'$ et $\text{H}8$ sont situés sous le plan médian de la molécule et les protons $\text{H}7$, $\text{H}8'$, $\text{H}6$, $\text{H}6'$ et $1'$ -NH sont situés au dessus du plan médian de la molécule. On observe aussi une corrélation intéressante entre 5-OH et $\text{H}4$ qui implique une stéréochimie *trans* pour les deux groupements hydroxyles en position 4 et 5.

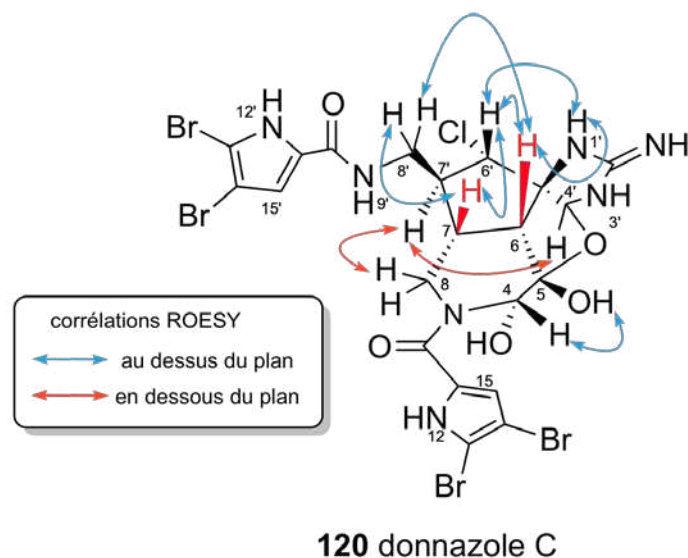


Figure 68 : Corrélations ROESY observées pour **120**.

Cette stéréochimie relative présente un intérêt particulier de part sa stéréochimie *cis* des protons H7 et H6. Cette stéréochimie a été rencontrée jusqu'ici qu'une seule fois dans les dimères de P-2-AIs, dans la partie B' de la stylissadines B.¹³⁹ Toutes les autres molécules dimériques cyclopentaniques de la famille présentent une stéréochimie *trans* pour ces deux protons.

Ce résultat expérimental a été confirmé par les calculs fc-rDG/DDD⁸³ effectués par M. Köck (Bremerhaven, Allemagne) lors d'une collaboration avec notre laboratoire. Ce sont en effet ces mêmes calculs qui ont permis de réviser la stéréochimie relative de la palau'amine en 2007, et donc de lui attribuer la stéréochimie *trans*, alors qu'elle avait été décrite comme *cis* au préalable (cf. Chap. II).

La superposition des 70 structures possibles du donnazole C déterminées par le programme pour le cœur tétracyclique de ce dernier et correspondant à la stéréochimie présentée *Figure 68* sont présentées ci-dessous (*Figure 69*). Cette modélisation nous a permis de confirmer les résultats obtenu par analyse des corrélations NOE c'est à dire la position *cis* des protons 6 et 7.

¹³⁹ Grube, A.; Köck, M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4675-4678.

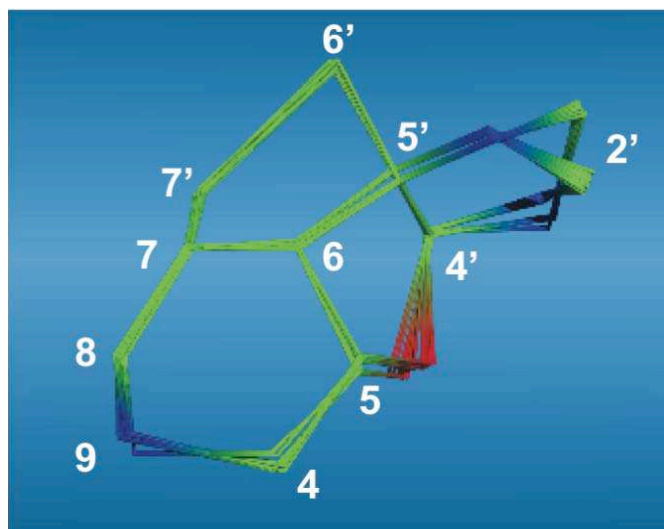


Figure 69 : Modélisation du cœur tétracyclique du donnazole C après calculs *fc-rDG/DDD* réalisés par M. Köck

Le dichroïsme circulaire du donnazole C a aussi été mesuré et comparé à ceux des donnazoles A et B. (Figure 70). Des allures de courbes similaires indiquent une stéréochimie absolue au niveau de la liaison C7-C7' identique pour les trois composés. Cela reste en effet cohérent avec l'hypothèse de biogenèse universelle proposée par notre laboratoire.

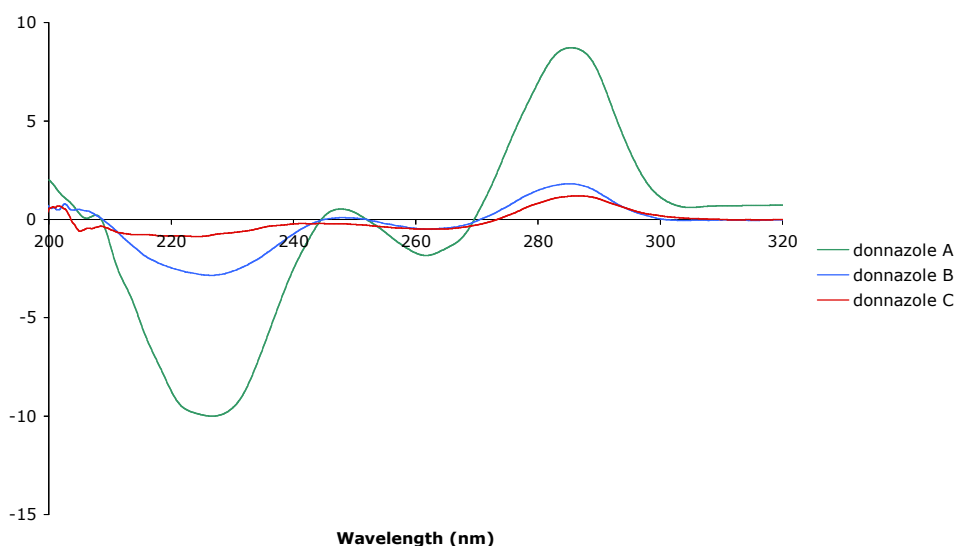


Figure 70 : Dichroïsme circulaire (CD) du donnazole C (rouge), du donnazole A (vert) et du donnazole B (bleu)

Une hypothèse de formation du donnazole C a été élaborée (Schéma 71). En partant du 1^{er} intermédiaire C7-C7', provenant de la dimérisation de deux motifs oroïdine (Schéma 61), on obtiendrait après une hydrochloration, un second intermédiaire, différent de la pré-axinellamine rencontrée précédemment, avec la liaison C6-C5 dirigée vers l'arrière. Ce second intermédiaire pourrait à son tour subir une hydrolyse du noyau 2-aminoimidazole en position 4 et 5 entraînant l'élimination d'un motif guanidine et la formation de deux gem-diols. L'un pourrait donner un aldéhyde en position 4 et l'autre une cétone en position 5. L'espèce obtenue pourrait ensuite être cyclisée en position 4 par l'azote 9 et en position 5 par l'oxygène 4' pour finalement donner le donnazole C. Il est important de noter qu'on ne peut expliquer l'origine du donnazole C par la formation de la pré-axinellamine classique (liaison C6-C5 dirigée vers l'avant), contrairement à tous les autres P-2-AIs dimères de la famille.

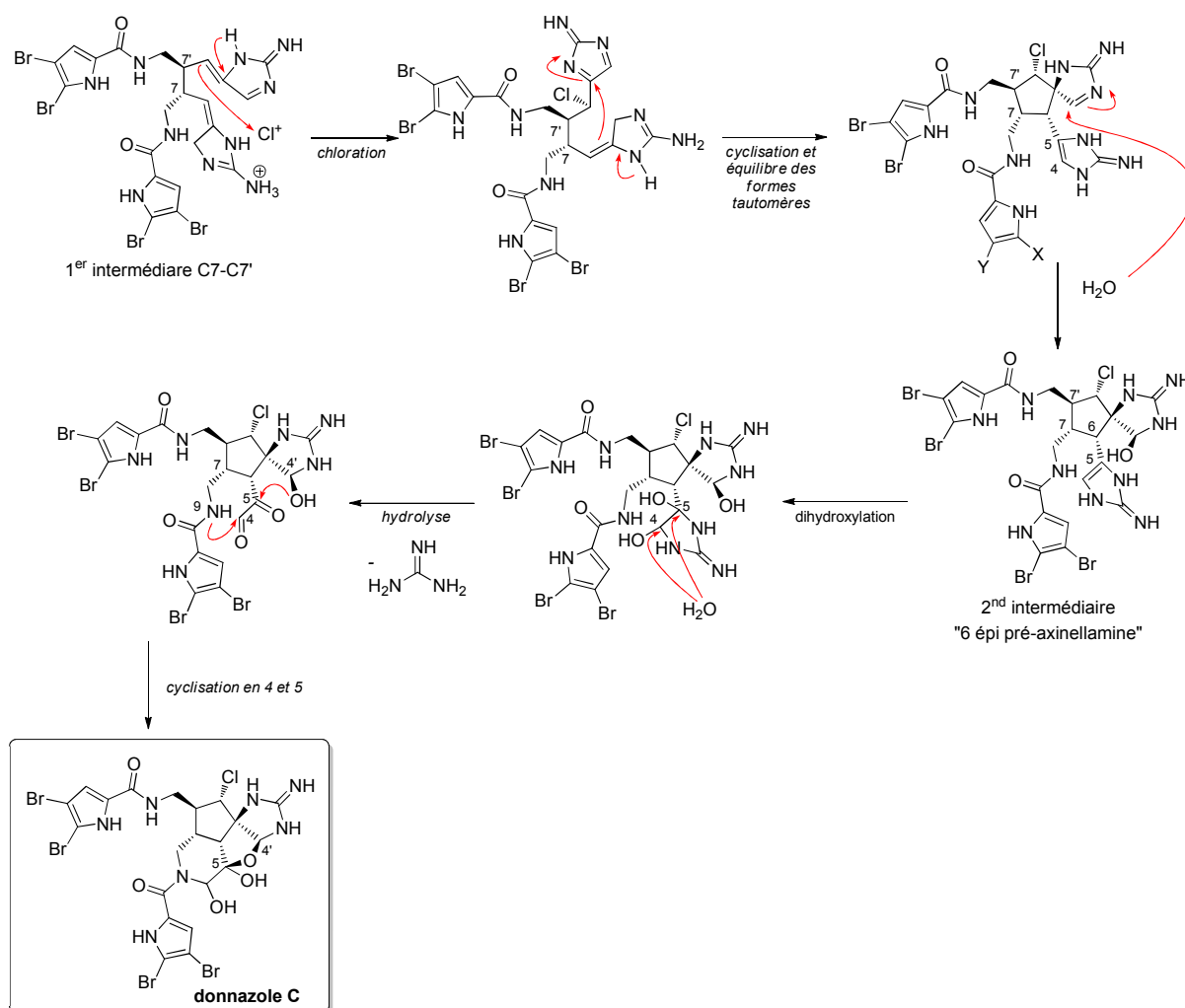


Schéma 71 : Hypothèse de formation du donnazole C

L'existence du tétrahydrofurane en C5-C4', jamais encore rencontré dans la famille des P-2-AIs dimères, pose la question intéressante de l'existence d'autres composés portant cette même cyclisation.

➤ Éluclidation structurale du composé dimérique nouveau **121**

Le composé **121**, tétrabromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (792,8 / 794,8 / 796,8 / 798,8 / 800,8), présente une masse haute résolution de m/z 792.8774 ($[M-H]^+$) correspondant à la formule brute $C_{22}H_{25}^{79}Br_4N_{10}O_3$ encore inconnue dans la famille des P-2-AIs.

Un examen des spectres 1D et 2D (CD_3OD et CD_3OH , 600 MHz) du composé (*Figure 72*) (voir aussi Annexe 1) a montré une connectivité COSY entre H6' (4,15 ppm), H8 (3,27/3,69 ppm) et H8' (3,24/3,33 ppm). La partie 2-pyrrolocarboxamide ont été mise en évidence par les corrélations 1H - ^{13}C HMBC H8 (3,27/3,69 ppm) / C10 (163,2 ppm), 9-NH (8,36 ppm) / C10 (163,2 ppm), H15 (6,70 ppm) / C11 (128,4 ppm) et H15 (6,70 ppm) / C14 (160,3 ppm) et les corrélations 1H - ^{15}N HMBC H7 (2,98 ppm) / N9 (106 ppm) et H15 (6,70 ppm) / N12 (162 ppm). Des corrélations identiques ont été observées pour décrire la seconde partie 2-pyrrolocarboxamide. La présence du cyclopentène méthoxylé original, jamais encore rencontré dans la famille des P-2-AIs, a été révélée par les corrélations HMBC H7 (2,98 ppm) / C5' (129,3 ppm), H7' (2,53 ppm) / C6 (127,5 ppm), H7' (2,53 ppm) / C5' (129,3 ppm), H6' (4,15 ppm) / C5' (129,3 ppm) et H6' (4,15 ppm) / C6 (127,5 ppm). L'absence de proton en 6 et la valeur des déplacements chimiques de C6 (127,5 ppm) et C5' (129,3 ppm) a mis en évidence la double liaison C6-C5'. La corrélation HMBC H16' (3,41 ppm) / C6' (88,6 ppm) a permis de placer le groupement *O*-méthyle. La présence d'un cycle 2-aminoimidazole, attaché au cyclopentène par la position C6, a été révélée par les corrélations 1H - ^{13}C HMBC H4 (7,12 ppm) / C6 (127,5 ppm), H4 (7,12 ppm) / C5 (121,1 ppm), H4 (7,12 ppm) / C2 (150,4 ppm) et 1H - ^{15}N HMBC H4 (7,12 ppm) / N3 (132 ppm). La présence d'un second noyau 2-aminoimidazole, généralement rencontré dans ce genre de structure, n'a pas été observée. Malheureusement, aucune donnée RMN n'a permis de déterminer la nature du groupement attaché en position 5'. Cependant, la HRMS indique une différence d'un carbone et de trois azotes, ce qui pourrait correspondre à un motif guanidine.

Il a donc été supputé, avec l'appui de la HRMS et de l'origine très probable de ce composé dimérique, la présence d'une guanidine libre attaché au carbone quaternaire C5'. En effet,

malgré les nombreuses tentatives d'obtention, par RMN ^{13}C ou par corrélations ^1H - ^{13}C et ^1H - ^{15}N HMBC, de signaux correspondant au motif guanidine, ils n'ont jamais pu être observés avec certitude.

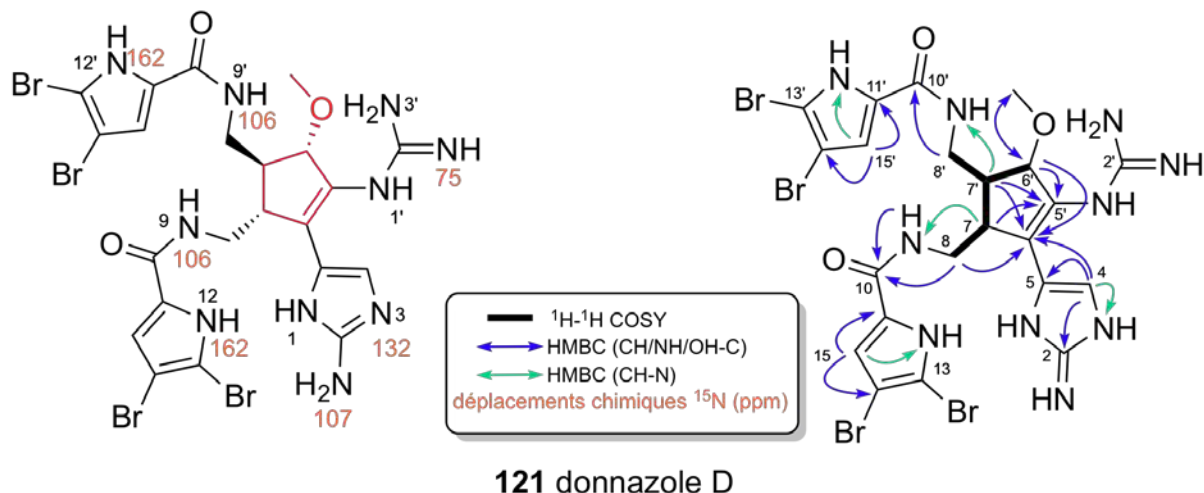


Figure 72 : Structure et corrélations ^1H - ^1H COSY et ^1H - ^{13}C HMBC clé observées et déplacements chimiques ^{15}N pour **121**.

Une étude de la configuration relative de ce composé a été entreprise. Les expériences NOESY et ROESY ont été réalisées dans le CD_3OH et CD_3OD . L'analyse des spectres 1D et 2D a montré des corrélations entre les protons H7, H6', 9'-NH, H8'a,b et 2'-NH situés au-dessus du plan médian de la molécule, et des corrélations entre les protons H8a,b, H7' et H16 situés en dessous du plan médian de la molécule (Figure 73). En particulier, la corrélation H7'/H16 démontre que le groupement 6'-OMe est dirigé vers l'arrière du plan de la feuille. Ainsi la stéréochimie relative du donnazole D reste cohérente avec celle des autres congénères de la famille.

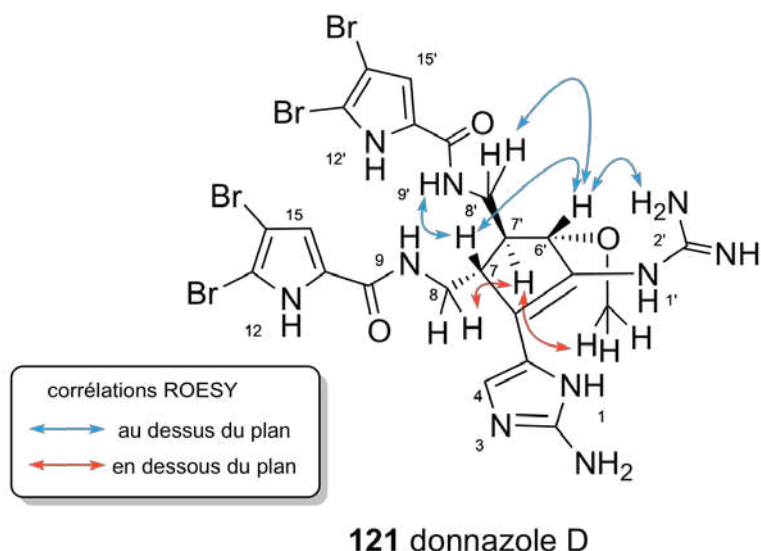


Figure 73 : Corrélations ROESY clés observées pour **121**.

Le spectre de dichroïsme circulaire du donnazole D semble correspondre à ceux de ses congénères, même si, avec sa structure plus simple (trois centres asymétriques au lieu de huit pour les autres), la courbe apparaît légèrement différente (*Figure 74*). Le donnazole D devrait donc posséder la même stéréochimie absolue que ses congénères au niveau de la liaison C7-C7'.

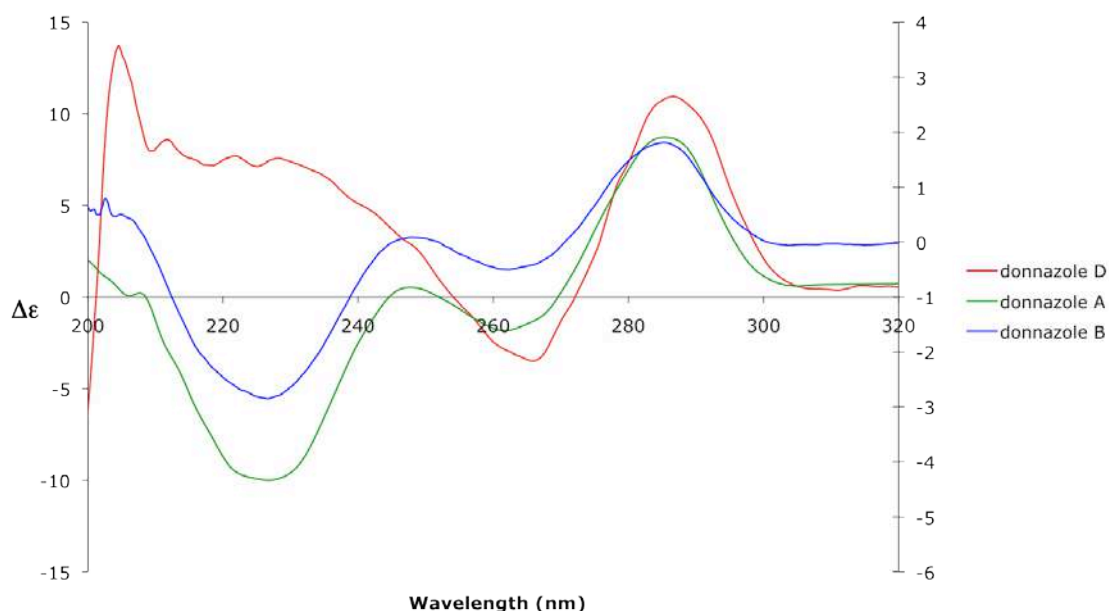


Figure 74 : Dichroïsme circulaire (CD) du donnazole D (**121**) (rouge), donnazole A (**117**) (vert) et donnazole B (**118**) (bleu)

La présence d'un cyclopentène central n'a jamais été observé dans les structures des P-2-AIs dimères jusqu'à présent, cependant un cyclopentène chloré a été obtenu récemment par Baran *et coll.*¹⁴⁰ lors d'une tentative de cyclisation dans le TFA d'un composé de type pré-axinellamine. Ceci supporterait l'hypothèse selon laquelle le donnazole D proviendrait de la dégradation de composés P-2-AIs dimériques, sûrement au cours de l'extraction de l'éponge. C'est principalement pour cette raison qu'aucune hypothèse de formation de cette molécule ne sera discutée.

➤ Éluclidation structurale du composé dimérique nouveau **122**

Le composé **122**, tétrabromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (824,8 / 826,8 / 828,8 / 830,8 / 832,8), présente une masse basse résolution m/z 824.8 ($[M+H]^+$). La masse haute résolution n'a pu être enregistrée à cause d'une dégradation ultérieure du composé. Cette masse correspond à celle de la massadine (**77**) et du donnazole B (**118**).

Après une analyse minutieuse des données spectrales, on retrouve la même structure plane que celle de la massadine (*Figure 75*) (voir aussi Annexe 1). Cependant, les spectres RMN ¹H de la massadine, du donnazole E (**122**) et du donnazole B (**118**), enregistrés dans les mêmes conditions, ne sont pas superposables (*Figure 77*). Ceci indique une différence dans la stéréochimie de la molécule.

¹⁴⁰ Seiple, I. B.; Su, S.; Young, I. S.; Nakamura, A.; Yamaguchi, J.; Jorgensen, L.; Rodriguez, R. A.; O'Malley, D. P.; Gaich, T.; Köck, M.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 14710-14726.

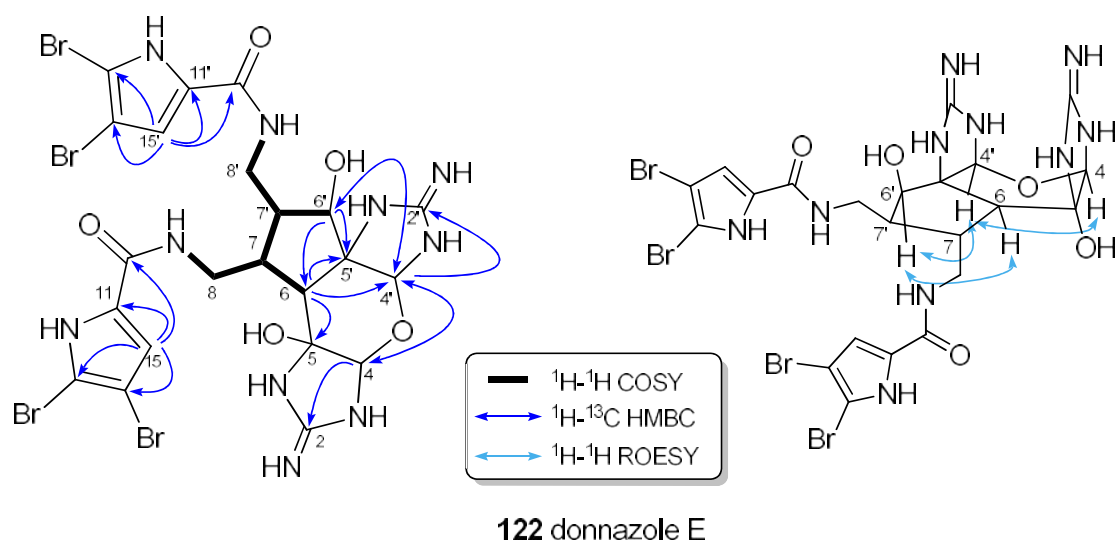


Figure 75 : Structure et corrélations ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC et ^1H - ^1H ROESY clés observées pour **122**.

L'unique composé connu, à ce jour, diastéréoisomère de la massadine est l'*épi*-massadine. Cette molécule a été synthétisée, en tant que produit secondaire, par Baran lors de la synthèse de la massadine.¹⁴¹ Elle n'a encore jamais été trouvée à l'état naturel. De plus, Baran reporte que la formation de l'*épi*-massadine est favorisée dans toutes les conditions de réaction. Cependant, le spectre RMN ^1H du donnazole E n'est pas superposable à celui de l'*épi*-massadine. Le composé **122** est donc un nouveau diastéréoisomère de la massadine.

Une analyse ROESY nous a permis d'élaborer une hypothèse sur la stéréochimie de **122**. En effet, on peut observer une corrélation ROESY entre H6' et H4', ce qui, si on laisse le centre 4' identique à celui de la massadine (**77**), i.e. en dessous du plan, permet de placer le proton H6' au dessous du plan médian de la molécule (*Figure 75*). De façon moins certaine, alors qu'on observe une corrélation ROESY très légère entre H6 et H6', on n'observe aucune corrélation entre H7 et H6' (cf. Spectre ^1H - ^1H ROESY dans l'annexe 1), corrélation que l'on a observée dans le cas des donnazoles A (**117**) et B (**118**) par exemple.

Selon nos hypothèses, la différence de cette structure avec celle de la massadine viendrait donc d'une inversion au niveau du centre 6' portant la fonction hydroxy. Cette hypothèse reste cependant à confirmer par des calculs car la simple observation de la largeur des taches du spectre ROESY ne saurait être une preuve scientifique certaine pour affirmer ceci.

Nous avons cependant postulé une hypothèse de formation pour **122**.

¹⁴¹ Su, S.; Seiple, I. B.; Young, I. S.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16490-16491.

Le mécanisme passant par la formation d'une aziridine semble être exclu car la stéréochimie, par rapport à celle de la chloromassadine, aurait été conservée et non inversée (Schéma 76). Cependant une simple SN2 de l'eau sur le dérivé chloré semble probable. On obtiendrait ainsi **122** avec une stéréochimie inversée par rapport à la chloromassadine (**6**) de départ.

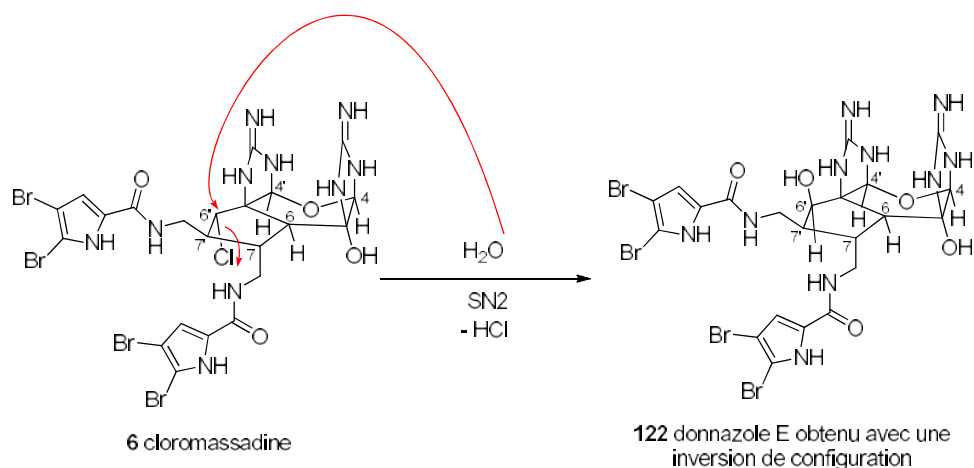


Schéma 76 : Hypothèse de formation de **122**.

➤ Éluclidation structurale du composé dimérique nouveau **123**

Le composé **123**, tétrabromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse, présente une masse haute résolution m/z 828.8702 ($[M+H^+]$) correspondant à la formule brute $C_{22}H_{25}^{79}Br_2^{81}Br_2N_{10}O_4$. Cette formule brute correspond à celle de la massadine, (**77**) de l'épi-massadine et du donnazole B (**118**). Cependant, les spectres RMN 1H des quatre composés ne sont pas superposables (Figure 77).

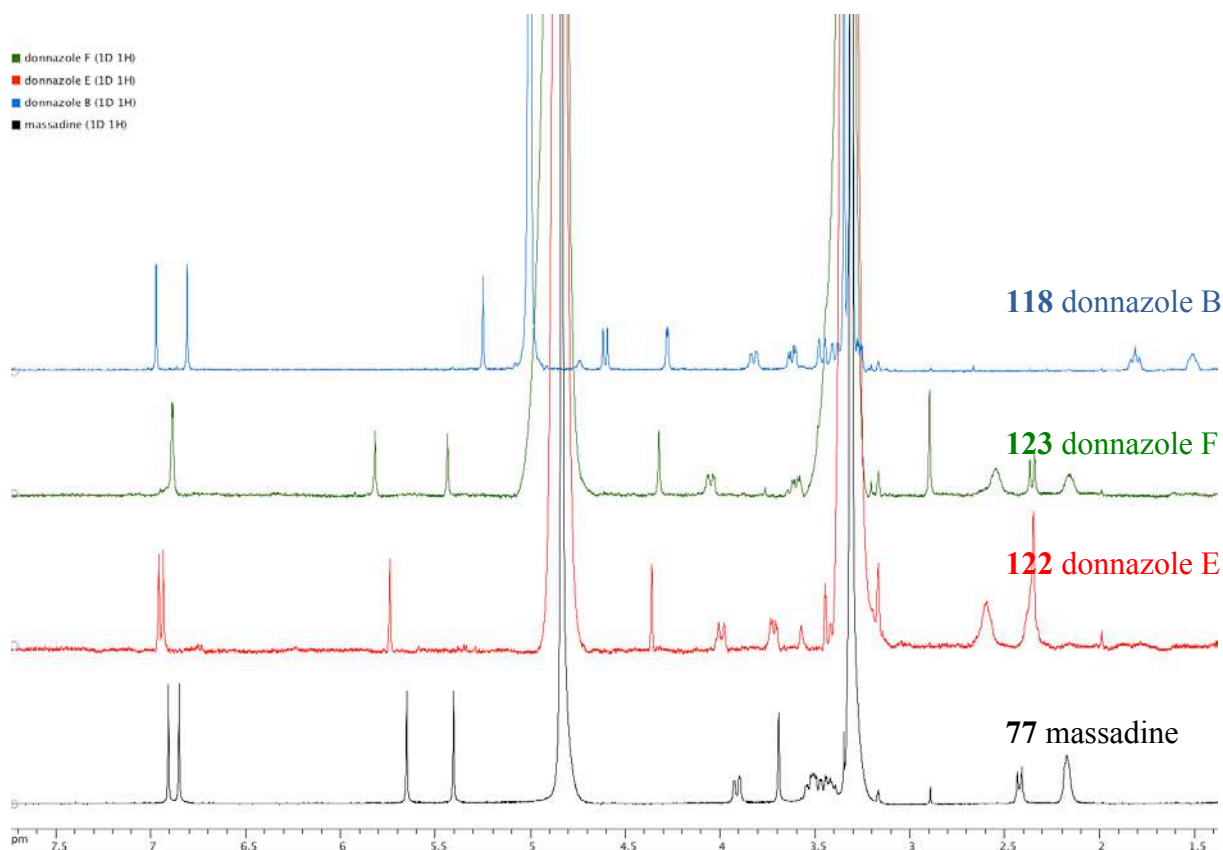


Figure 77 : Spectres RMN ^1H , 500 MHz, CD_3OD , de 77, 118, 122 et 123.

L'analyse des données spectrales RMN ^1H , ^{13}C , ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC révèle la même structure plane que celle de la massadine (77) (Figure 78) (voir aussi Annexe 1).

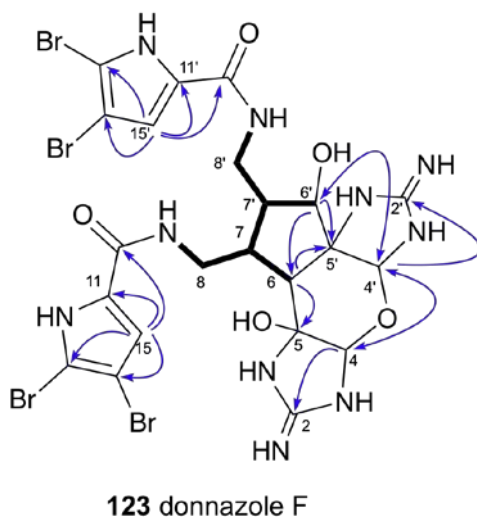


Figure 78 : Structure plane et corrélations ^1H - ^1H COSY et ^1H - ^{13}C HMBC clés observées pour 123.

Cependant, pour cause de dégradation du composé, aucune analyse ROESY/NOESY n'a pu être entreprise ; la stéréochimie relative de **123**, n'a donc pu être déterminée avec certitude.

Cependant, une étude des déplacements chimiques ^{13}C des centres stéréogènes du donnazole F (origine : ^{13}C 1D) a été menée en comparaison avec ceux du donnazole E (origine : ^{13}C 1D et HMBC 2D) (**122**) (Figure 79). Bien que les déplacements chimiques ^{13}C de la massadine (origine littérature) soient donnés dans le CD_3OD , ils ont été affichés comme indication.

La comparaison montre des déplacements chimiques ^{13}C très similaires, à part pour le centre C4 pour lequel on observe une différence de 6 ppm entre les déplacements chimiques pour les donnazoles E (**122**) et F (**123**). Ces deux composés ayant une structure plane absolument identique, ceci laisse à supposer que le centre C4 a une stéréochimie inversée dans le cas du donnazole F, les autres centres portant la même stéréochimie que ceux du donnazole E (**122**) (Figure 79).

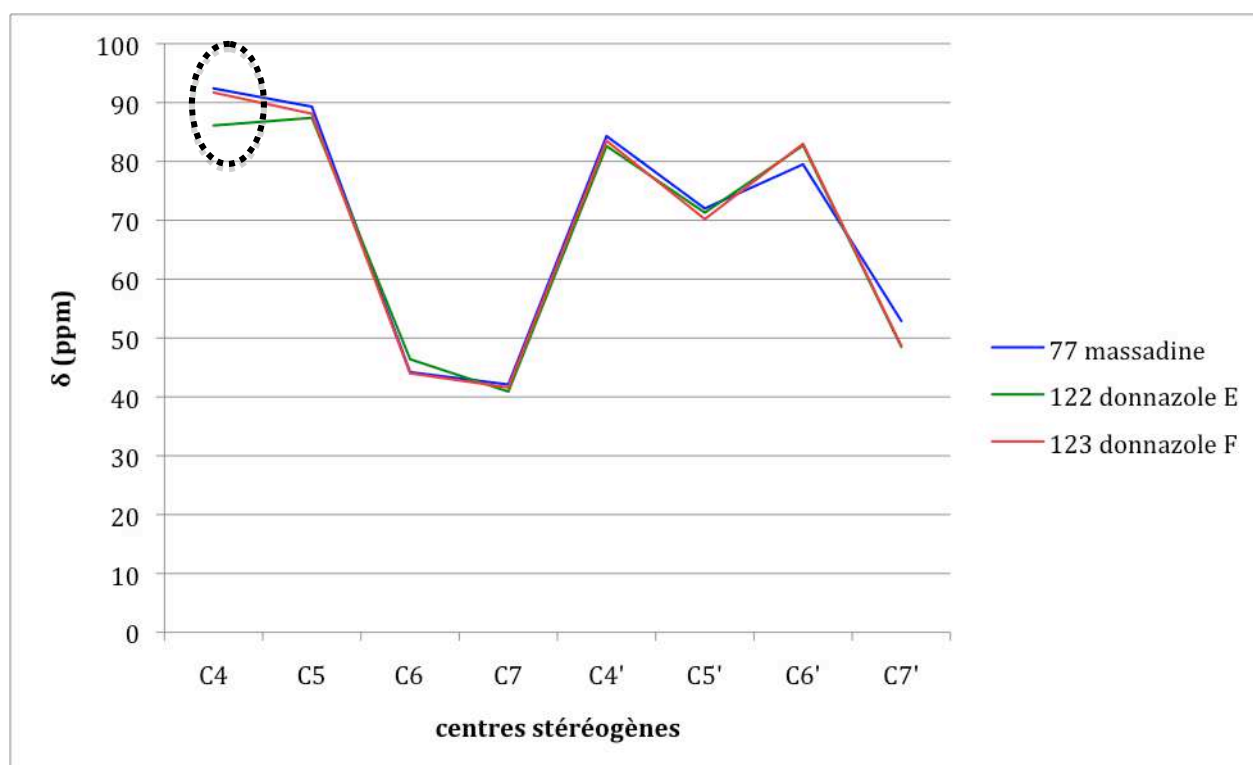


Figure 79 : Comparaison des déplacements chimiques ^{13}C (ppm) des centres stéréogènes des donnazoles E et F dans le DMF-d_7 et de la massadine dans le CD_3OD .

La structure hypothétique du donnazole F comporterait donc la fonction hydroxy 6' du même côté que C5'-N1' et une jonction *trans* de cycle 4-5 sur une des parties 2-aminomidazoliques. Ceci n'est pour l'instant qu'une supposition, une analyse ROESY ou NOESY confortée de calculs de géométrie de la molécule étant dans ce cas absolument nécessaires.

L'isolement des donnazoles E et F met en évidence une variabilité stéréochimique autour de la massadine qu'il reste encore à découvrir. Si l'on parvient un jour, à isoler ces métabolites secondaires en plus grande quantité, ou avec des techniques de RMN adaptées de type micro-sonde, il serait intéressant de déterminer comment et pour quelles raisons les éponges produisent une telle variété de stéréoisomères de la massadine. En effet, des études plus profondes mériteraient d'être menées afin de savoir si la biosynthèse de tous ces métabolites s'effectue de façon spontanée ou bien catalysées par certains enzymes, ou encore si ces composés sont des artefacts d'extraction. Les réactions spontanées semblent cependant permettre cette grande complexité et cette grande variété, que l'on trouve dans la famille des dimères de P-2-AIs.

III.4. Collecte et extraction de l'éponge *Axinella donnani* (2nd lot): fractionnement et purification des extraits

L'éponge *Axinella donnani* (2nd lot) a été récoltée dans les mêmes conditions que l'éponge *Axinell donnani* (1^{er} lot). Cette éponge de couleur rouge/orangé semblait très similaire à l'éponge du 1^{er} lot. L'éponge lyophilisée (213 g) a été reçue et a été immédiatement congelée à -20 °C, puis conservée telle quelle jusqu'à son extraction.

L'intérêt d'étudier une seconde éponge *Axinella donnani* réside dans le fait que de nombreux composés dimériques P-2-AIs isolés de l'éponge R20940 n'ont été obtenus qu'en très petites quantités, certaines élucidations structurales n'ayant alors pu aboutir. Ainsi, le but de cette extraction plus ciblée est de ré-isoler ces composés dimériques intéressants dont l'étude structurale n'a pu être approfondie. La comparaison des profils des extraits bruts des deux éponges ont montré quelques similitudes, notamment la présence de masses correspondant à celles des composés P-2-AIs, cependant, leurs profils n'étaient pas identiques (*Figure 80*).

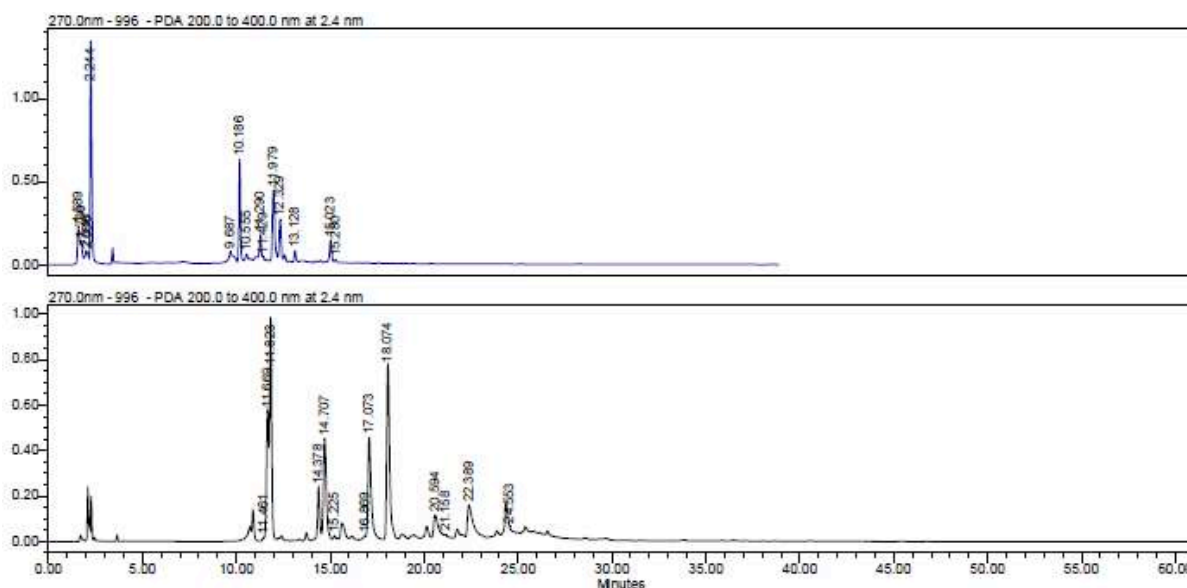


Figure 80 : Comparaison des profils HPLC-UV (270 nm) dans les mêmes conditions HPLC des extraits bruts des deux éponges étudiées (1^{er} lot en noir, 2nd lot en bleu).

Les schémas d'extraction complets ont été rassemblés dans la partie expérimentale.

La totalité de l'éponge congelée (213 g) a été extraite à température ambiante avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5 : 5 afin de faciliter l'extraction des composés polaires. Ainsi 28,9 g d'extrait brut ont été récupérés. Le profil chromatographique de cette nouvelle *Axinella donnani* montre une grande différence avec celui de l'éponge précédente (R20940). On observe tout de même une grande prédominance de masses correspondant à celles de composés P-2-AIs. L'extrait brut a ensuite été soumis à une partition eau butanol afin d'éliminer au maximum les sels minéraux qui s'y trouvaient. Ainsi 12,7 g d'extrait butanolique ont été récupérés.

Étant donné que l'isolement de composés dimériques complexes de type P-2-AIs était l'objectif principal de cette extraction, les fractions d'extrait butanolique présentant des masses de composés dimériques ont été étudiées en priorité. Cette étude a été réalisée à l'aide de colonnes chromatographiques de silice en phase inverse et de colonne LH20. Ces méthodes de fractionnement ont ensuite été complétées par l'utilisation d'HPLC préparatives et analytiques en phase inverse avec la colonne C18 Sunfire (cf. partie expérimentale).

III.5. Élucloration structurale des composés isolés de l'éponge *Axinella donnani* (2nd lot)

6 composés ont été identifiés de l'extrait butanolique de l'éponge *A. donnani* du 2nd lot. Un fractionnement, essentiellement guidé par masse, a permis de cibler les dimères de P-2-AIs. Malheureusement l'éponge n'a pu être étudiée totalement et recèle encore sûrement des composés intéressants et nouveaux.

L'élucidation structurale des composés déjà isolés du 1^{er} lot d'*Axinella donnani* ne sera pas détaillée, seule celle des composés non isolés précédemment fera l'objet d'une étude détaillée.

III.5.1. Composés P-2-AIs isolés de l'éponge *Axinella donnani* (2nd lot)

L'extraction de cette éponge a donc été essentiellement guidée par la masse des composés dimériques recherchés, c'est à dire des masses comprises entre 700 et 1000 Da. Nous nous sommes concentrés sur l'extraction de fractions dont le profil LC-MS présentait ces masses. Malheureusement, seuls les P-2-AIs dimériques **8**, **71**, **6** et **77** ont été isolés. L'oroïdine (**8**) a aussi été identifiée en grande quantité (79,2 mg sur une fraction de 284,0 mg) (Figure 81).

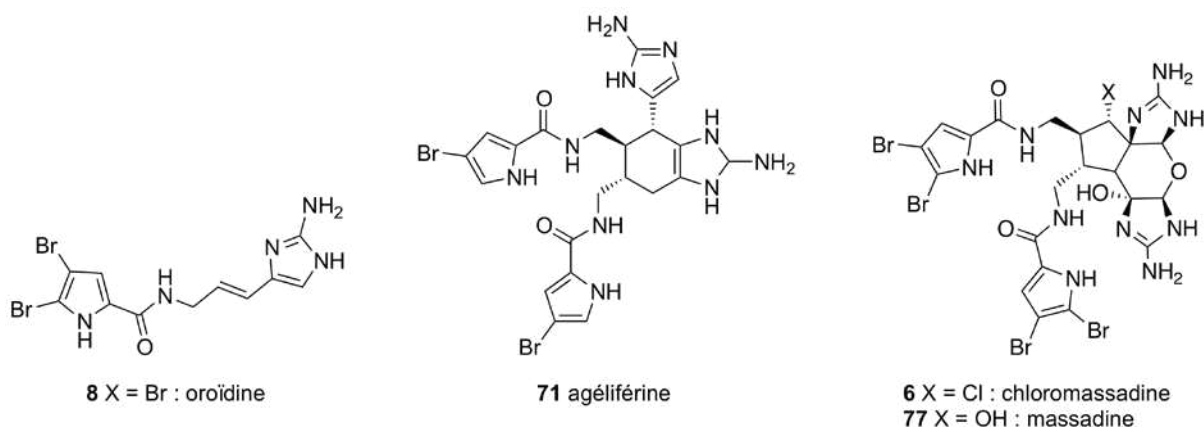


Figure 81 : Structures des P-2-AIs isolés de l'éponge *Axinella donnani* (2nd lot)

III.5.2. Composés 3,5-dibromotyrosiniques

Parmi les composés isolés de l'éponge *Axinella donnani* (2nd lot), des dérivés 3,5-dibromotyrosiniques ont aussi été identifiés. Ces composés, spécifiques de l'ordre Verongidae, sont très minoritaires voire totalement absents des autres ordres, ce qui fait l'originalité de cette découverte. Un bref rappel bibliographique de ces composés sera présenté dans un premier paragraphe, puis dans un second, l'élucidation structurale des deux composés isolés de ce 2nd lot sera développée.

➤ Rappels bibliographiques sur les dérivés 3,5-dibromotyrosiniques

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, les dérivés 3,5-dibromotyrosiniques sont spécifiques de l'ordre Verongidae et constituent 70% des composés isolés de cet ordre. Ces dérivés sont principalement antibiotiques ; ils permettent aux éponges de se défendre contre les bactéries. Il est d'ailleurs possible qu'un certain nombre des composés 3,5-dibromotyrosiniques isolés d'éponges soient des artefacts d'isolement ; ces composés étant très actifs mais instables.¹⁴²

Cette famille comprend de très nombreux congénères que l'on pourrait arbitrairement séparer en deux groupes, les monomères et les dimères de la famille.

Pour exemple, le composé très simple 3,5-dibromoverongiaquinol (**124**)¹⁴³ a été isolé de *Verongia cauliformis* en 1967, le monolipide moloka'iamine (**125**)¹⁴⁴ isolé de *Verongida sp.* est actif contre le HIV-1 (EC₅₀ 52,2 µM)¹⁴⁵ et le dérivé imidazolique aplysinamisine I (**126**)¹⁴⁶ a été isolé de *Aplysina cauliformis* (Figure 82). Ces trois exemples permettent de mettre en lumière la grande variété possible des substituants attachés au motif tyrosine.

¹⁴² Faulkner, D. J. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1421-1443.

¹⁴³ Sharma, G. M.; Burkholder, P. R. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 4147-4150.

¹⁴⁴ Hamann, M. T.; Scheuer, P. J.; Kelly-Borges, M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6565-6569.

¹⁴⁵ Ross, S. A.; Weete, J. D.; Schinazi, R. F.; Wirtz, S. S.; Tharnish, P.; Scheuer, P. J.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 501-503.

¹⁴⁶ Rodriguez, A. D.; Pina, I. C. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 907-914.

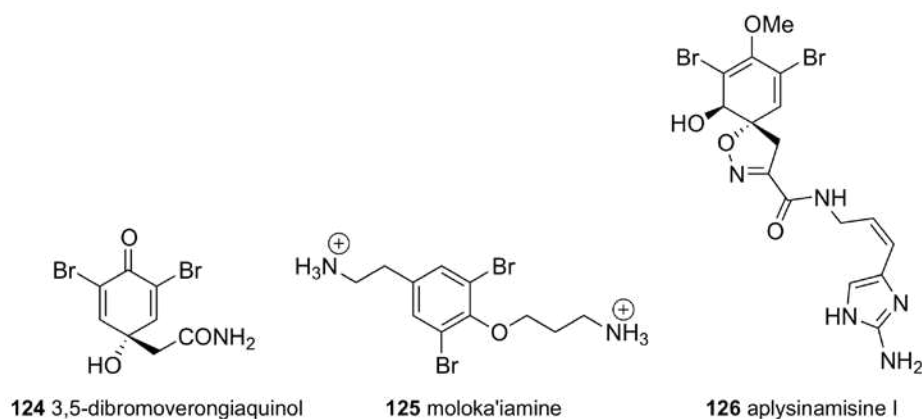


Figure 82 : Exemples des dérivés monomériques 3,5-dibromotyrosiniques **124** à **126**.

De nombreux autres congénères dimériques ont aussi été identifiés, tels que les aplysinones A (**127**) et B (**128**)¹⁴⁷ isolés d'*Aplysina gerardogreeni* en 2007 et le dimère imidazolique archerine (**129**)¹⁴⁸ isolé d'*Aplysina archeri* en 2001 (Figure 83).

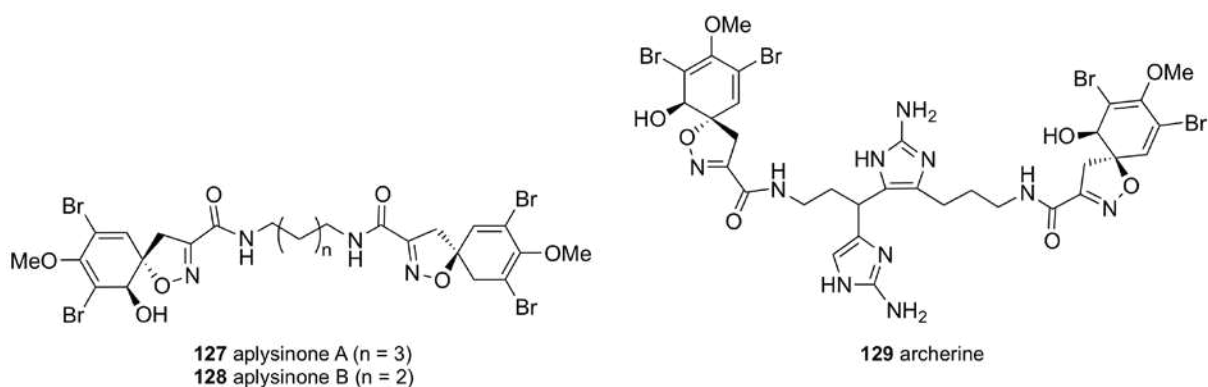


Figure 83 : Exemples des dérivés dimériques 3,5-dibromotyrosiniques **127** à **129**.

Deux dérivés 3,5-dibromotyrosiniques ont donc été isolés de l'éponge *Axinella donnani* (2nd lot) : 13,6 mg de **126** et 14,3 mg de **130**.

➤ Éluclidation structurale du dérivé monomérique connu **126**

Le composé **126**, dibromé d'après la distribution isotopique de son pic de masse (501,9 / 503,9 / 505,9), présente une masse m/z 501,9 ($[M+H]^+$). Il s'agit d'un monomère de la famille des dérivés de 3,5-dibromotyrosine présentant une double liaison comme le révèlent les

¹⁴⁷ Hernandez-Guerrero, C. J.; Zubia, E.; Ortega, M. J.; Carballo, J. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5275-5282.

¹⁴⁸ Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Magno, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 55-60.

signaux RMN caractéristiques du spectre ^1H (CD_3OD , 500 MHz) ; un signal à 6.17 ppm (d, $J = 11,6$ Hz) et un autre à 5,76 ppm (m). La constante de couplage indique une stéréochimie *Z* de la double liaison. De plus, le spectre comporte un signal correspondant au groupement O-méthyl caractéristique de ce type de composés à 3,73 ppm (s), ainsi que deux singulets, dans la région des aromatiques, correspondant à 1 proton imidazolique (6,87 ppm) et 1 proton aromatique (6,42 ppm). Après comparaison des données spectrales avec celles de la littérature, le composé **126** a été identifié comme étant l'aplysinaisine¹⁴⁶ isolée pour la première fois d'*Aplysina cauliformis* par Rodriguez *et. coll.* en 1993.

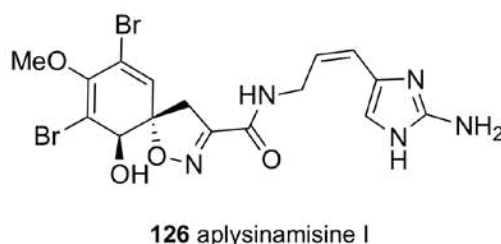


Figure 84 : L'aplysinaisine I (**126**) isolée de l'éponge *Axinella donnani* (2nd lot)

La stéréochimie absolue de l'aplysinaisine (**126**) a été confirmée par la mesure de son dichroïsme circulaire. On observe, en effet, comme pour tous les membres de la famille 3,5-dibromotyrosine un effet Cotton positif du dichroïsme circulaire : (CD $\Delta\epsilon$ 245 (+2,3), 265 (+2,9)).

➤ Éluclidation structurale du dérivé dimérique nouveau **130**

Le composé **130**, tétrabromé d'après la distribution isotopique de son pic de de masse (1014,9 / 1016,9 / 1018,9 / 1020,9 / 1022,9), présente une masse haute résolution de m/z 1014,9386 ($[\text{M}-\text{H}^+]$) correspondant à la formule brute $\text{C}_{33}\text{H}_{35}^{79}\text{Br}_4\text{N}_{10}\text{O}_8$ encore inconnue dans la famille des dérivés 3,5-dibromotyrosiniques. Il semble cependant exister de grandes similarités entre **130** et l'aplysinaisine I (**126**) isolée précédemment, leurs spectres RMN ^1H étant très similaires (Figure 85). On note en effet, sur le spectre RMN ^1H du composé **130**, l'absence de signal imidazolique et la présence d'un singulet à 3,85 ppm. On peut aussi noter que l'extrême simplicité du spectre RMN ^1H de **130** qui démontre l'existence d'un axe de symétrie dans la structure plane de la molécule.

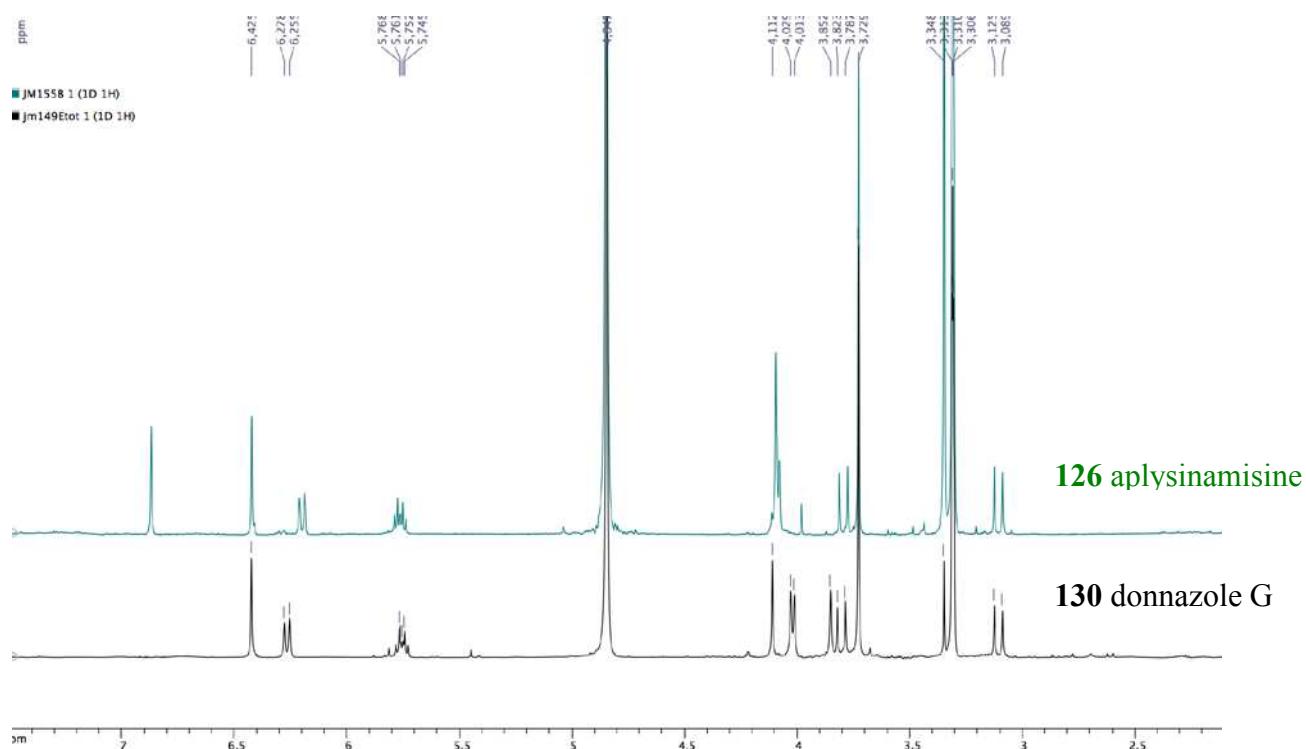


Figure 85 : Comparaison des spectres RMN ^1H (CD_3OD) de **126** et de **130**.

Les expériences RMN 2D usuelles ont donc été réalisées (voir aussi Annexe 1). On observe une connectivité COSY (CD_3OD) du H1 (4,11 ppm) au H5 (6,43 ppm). De plus, les corrélations HMBC H1 (4,11 ppm) / C3 (149,5 ppm), C4 (114,4 ppm), C5 (132,3 ppm) et C6 (93,1 ppm) ; H5 (6,43 ppm) / C4 (114,4 ppm), C6 (93,1 ppm), C7 (40,0 ppm) et C3 (149,5 ppm) ; H7 (3,80 et 3,10 ppm) / C8 (155,1 ppm) et C1 (75,6 ppm) et H20 (3,73 ppm) / C3 (149,5 ppm) ont permis de mettre en évidence la partie bromotyrosine spiro oxazole de la molécule. L'enchaînement 11-13 a principalement été mis en évidence par la connectivité COSY et du H11 (4,02 ppm) au H13 (6,26 ppm) mais aussi par les corrélations HMBC H11 (4,02 ppm) / C13 (117,0 ppm), H13 (6,26 ppm) / C11 (39,4 ppm) et H12 (5,76 ppm) / C11 (39,4 ppm). Cette partie a été reliée à la partie bromotyrosine par une liaison amide grâce aux corrélations HMBC H11 (4,02 ppm) / C9 (162,7 ppm) et H7 (3,80 et 3,10 ppm) / C9 (162,7 ppm), ainsi qu'au déplacement chimique du H11 (4,02 ppm) et du C9 (162,7 ppm). La partie imidazolique a été mise en évidence grâce aux corrélations H12 (5,76 ppm) / C14 (122,0 ppm), H13 (6,26 ppm) / C14 (122,0 ppm). De plus, les déplacements chimiques des carbones C18 (121,3 ppm) et C16 (149,1 ppm) sont caractéristiques du noyau imidazole. Enfin, les deux parties symétriques de la molécule ont été jointes par la position 19 à l'aide des corrélations HMBC H19 (3,85 ppm) / C18 (121,3 ppm) et C14 (122,0 ppm). Les corrélations

clés indispensables à la détermination structurale du donnazole G sont données ci-dessous (Figure 86).

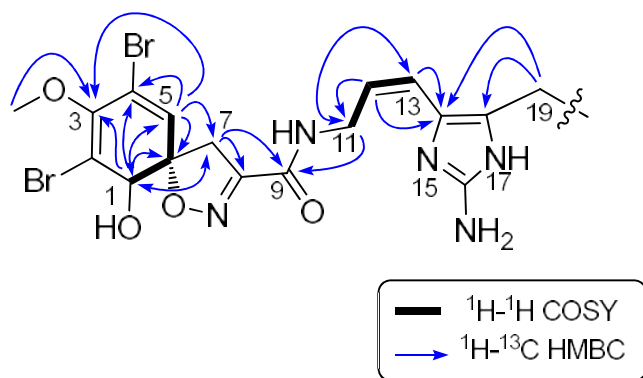


Figure 86 : Structure plane et corrélations ^1H - ^1H COSY et ^1H - ^{13}C HMBC clés observées pour une des deux moitiés identiques de **130**.

Seules quelques rares corrélations ROESY ont été observées entre H13 (6,26 ppm) et H11 (4,02 ppm) ainsi qu'entre H7b (3,10 ppm) et H5 (6,43 ppm). La structure complète du dimère **130** est donnée Figure 87.

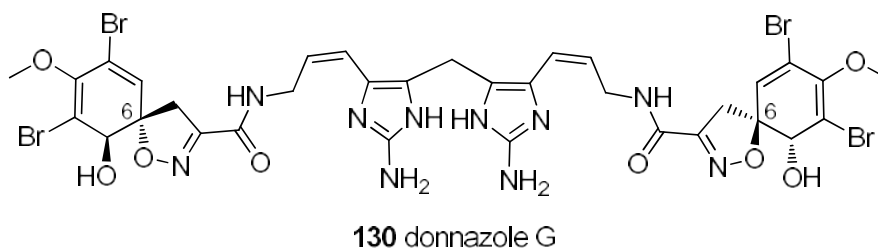


Figure 87 : Structure du donnazole G.

Une étude de la stéréochimie absolue du donnazole G (**130**) par l'intermédiaire du dichroïsme circulaire a permis de mettre en évidence que les deux positions 6 du dimère ont la même stéréochimie absolue. En effet, les dichroïsmes circulaires de l'aplysamisine (**126**) et du donnazole G (**130**) montrent un même effet Cotton positif (Figure 88), cet effet a aussi été observé pour l'archerine (**129**)¹⁴⁸ (CD $\Delta\epsilon$ 245 (+ 60000), 285 (+53000)).

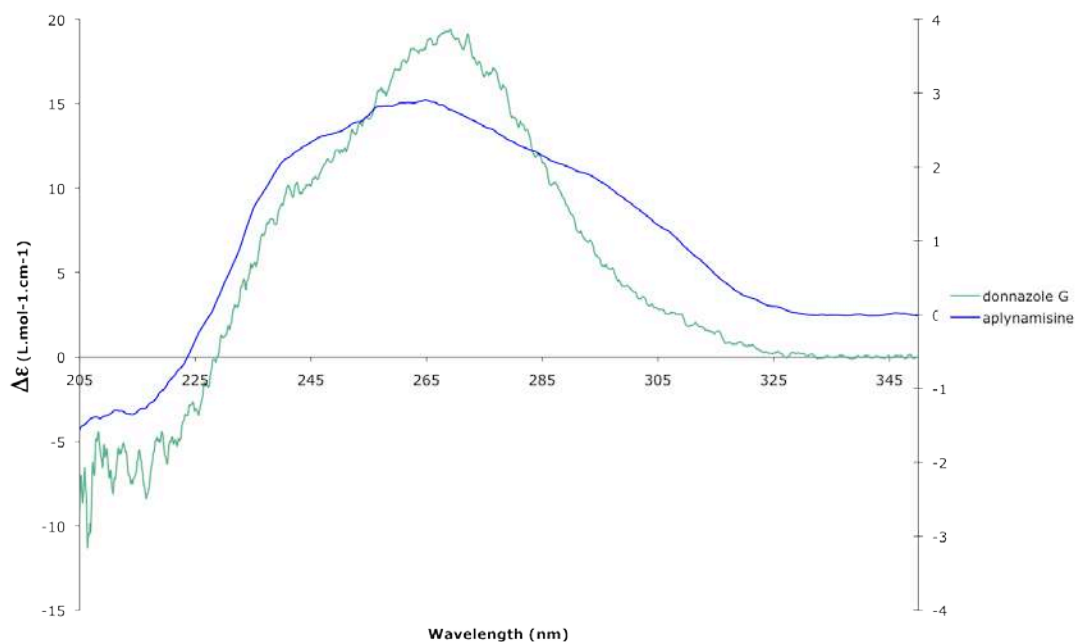


Figure 88 : Dichroïsme circulaire (CD) du donnazole G (**130**) et aplysinamisine I (**126**).

Cette étude de la stéréochimie absolue de l'aplysinamisine I (**126**) et du donnazole G (**130**) permet de formuler une hypothèse de formation de ce nouveau dimère. En effet, **130** pourrait provenir d'une condensation de deux motifs d'aplysinamisine I (**126**) sur une molécule de formaldéhyde (*Figure 31*), via une transformation spontanée. On pourrait alors observer une première attaque de la position 19 du noyau 2-aminoimidazole sur une unité formaldéhyde formant ainsi l'intermédiaire **131**. La fonction alcool de cet intermédiaire pourrait, en milieu acide, subir une substitution nucléophile du deuxième motif aplysinamisine (**126**); le pseudo-carbocation formé par le départ d'H₂O étant stabilisé par la mésomérie du cycle 2-aminoimidazole. Le donnazole G (**130**) serait ainsi formé.

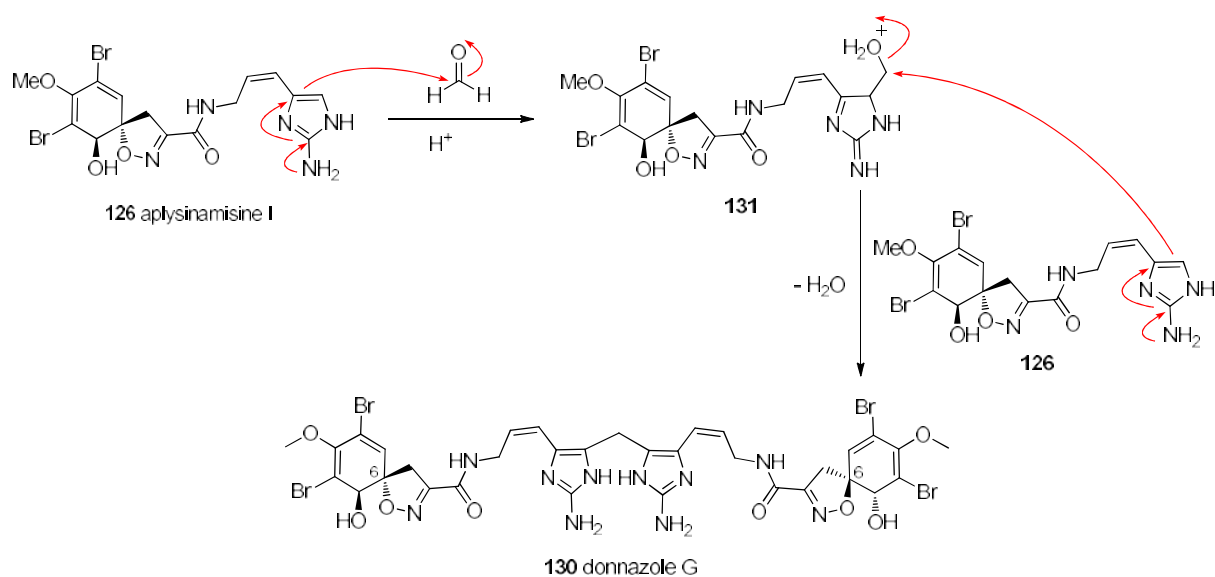


Figure 89 : Hypothèse de biogenèse du donnazole G (130) à partir de l'aplysamisine I (126).

III.6. Bilan du chapitre

L'étude chimique d'*Axinella donnani* (1^{er} lot) a permis l'identification de 16 composés connus et 11 nouveaux (1 monomère manzacidine et 10 dimères P-2-AIs), dont trois n'ont pu être étudiés complètement en raison des faibles quantités d'isolement.

La majorité des métabolites secondaires nouveaux isolés d'*A. donnani* sont des dimères de P-2-AIs.

Les donnazoles A et B sont des structures non originales, car très similaires à celles de la massadine et chloromassadine, mais qui pourraient être d'importance pour l'hypothèse de biogenèse élaborée en 2001 au laboratoire.

Le donnazole C possède une structure originale tétracyclique comportant un noyau tétrahydrofurane et une jonction de cycle C6-C7 *cis* encore jamais rencontrée dans les structures P-2-AIs dimériques.

Le donnazole D présente une structure plus simple, sûrement issue de la dégradation d'autres molécules plus complexes.

Les donnazoles E et F présentent de multiples variations autour de la stéréochimie de la massadine, composés dont on ignorait jusqu'ici l'existence.

Il est à noter que l'éponge *Axinella donnani* (1^{er} lot) présente un exemple remarquable de la diversité de la famille des P-2-AIs, tant au niveau de ses monomères (*Figure 90*) que de ses dimères (*Figure 91*).

Enfin, l'étude chimique partielle du second batch d'*Axinella donnani* (2nd lot) a permis l'isolement de 6 composés, dont 4 P-2-AIs déjà connus ainsi qu'un monomère dérivé de 3,5-dibromotyrosine connu (l'aplysinaïne) et un dimère d'aplysinaïne encore non reporté à ce jour, le donnazole G.

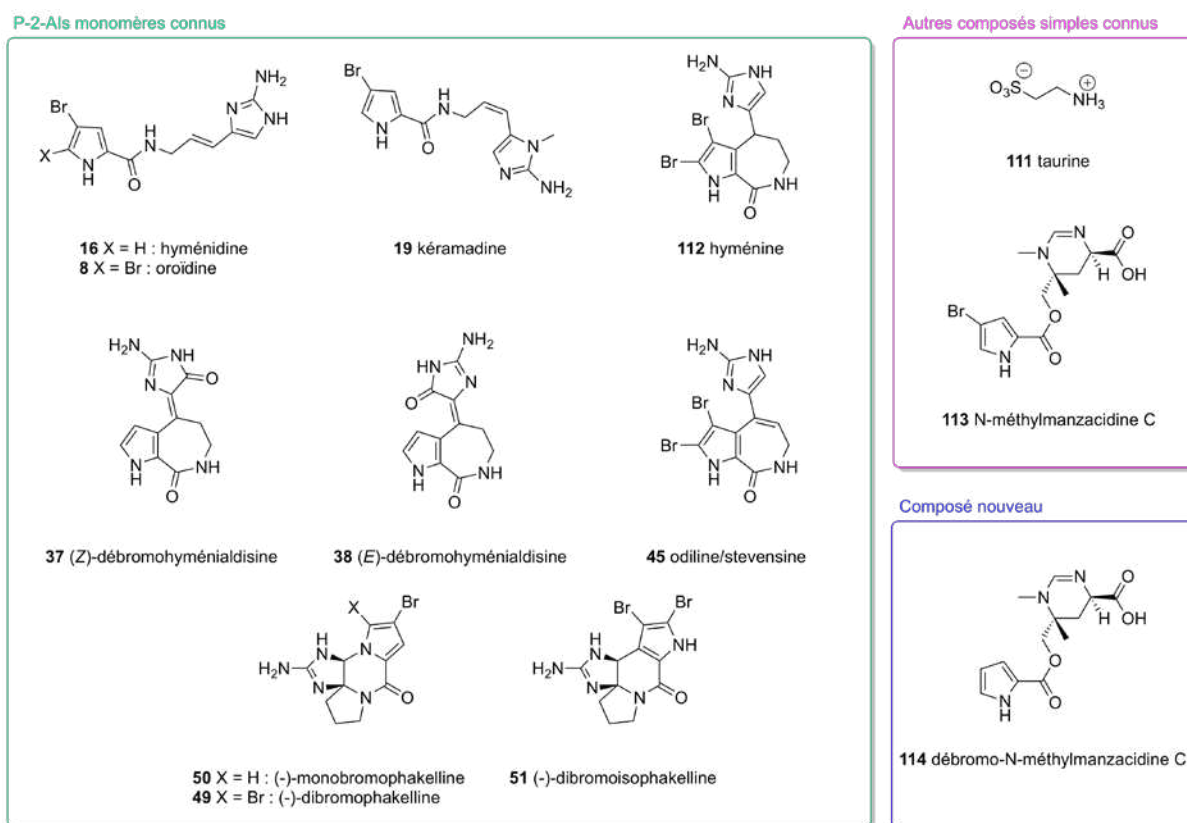
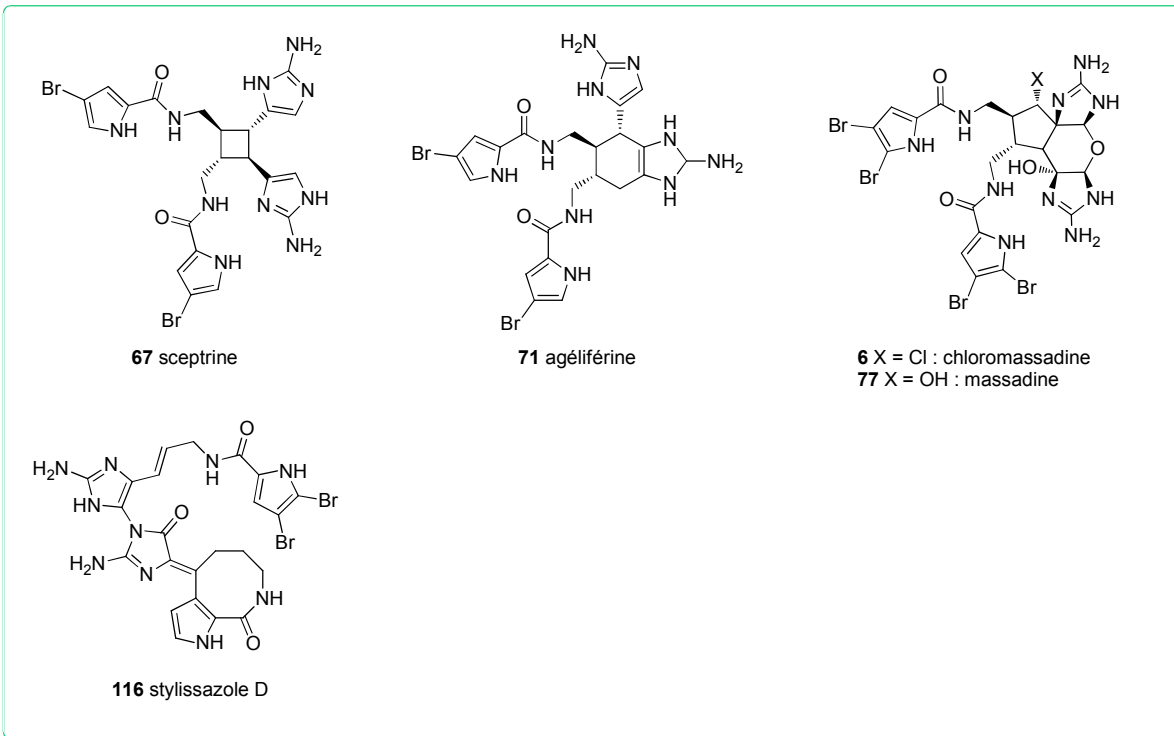


Figure 90 : Structures des composés simples isolés d'*Axinella donnani* (1^{er} lot)

P-2-AIs dimères connus



P-2-AIs dimères nouveaux

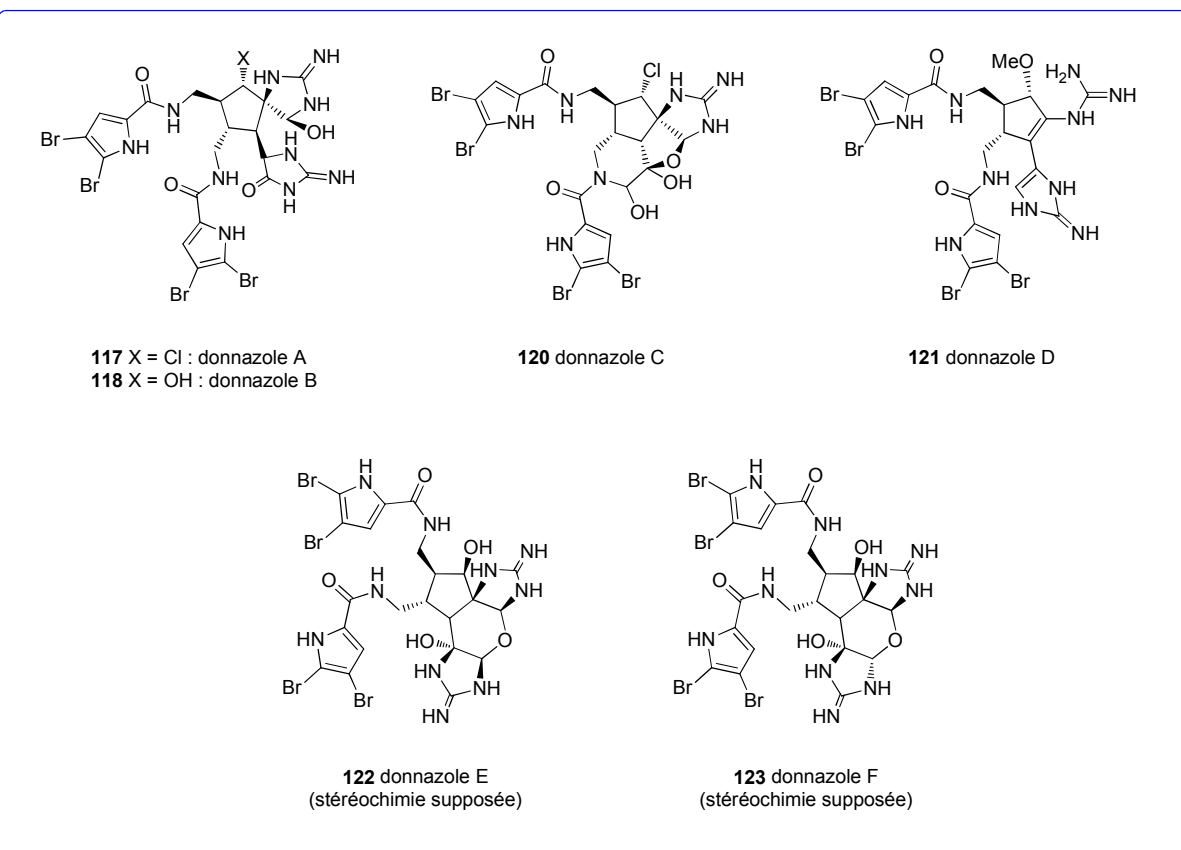


Figure 91 : Structures des dimères de P-2-AIs isolés d'*Axinella donnani* (1^{er} lot)

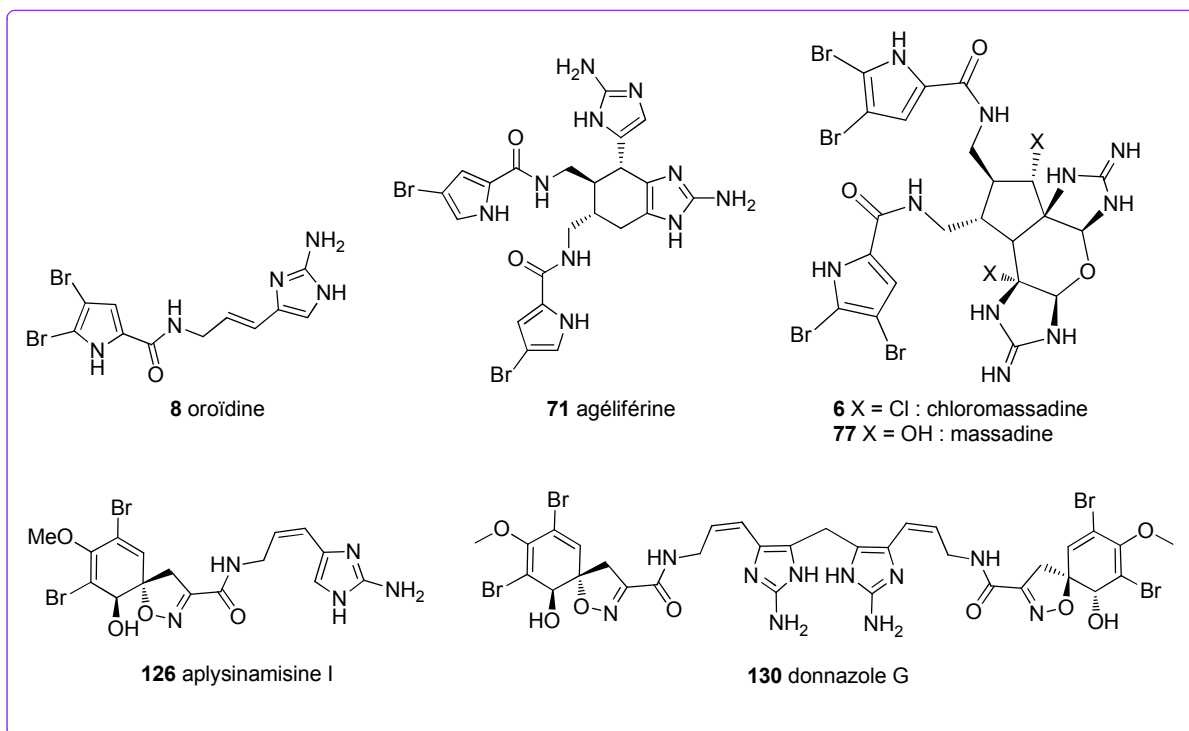


Figure 92 : Structures des composés P-2-AIs et 3,5-bromotyrosiniques isolés d'*Axinella donnani* (2nd lot)

CHAPITRE IV
SYNTHÈSE D'UNE CHIMIOTHÈQUE
D'ANALOGUES DU DISPACAMIDE A

CHAPITRE IV Synthèse d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A

Ce chapitre présentera tout d'abord une étude bibliographique des différentes stratégies d'obtention du dispacamide A, puis les travaux personnels de réalisation d'une chimiothèque d'analogues dans le but de tester cette chimiothèque sur plusieurs cibles biologiques.

IV.1.Étude bibliographique des différentes stratégies de synthèse du dispacamide A

Le dispacamide A **20**, monomère simple de P-2-AI a fait l'objet de plusieurs études synthétique car il présente une activité anti-histaminique intéressante et sa structure est proche de celle l'oroïdine **8** qui possède de bonnes propriétés antifouling. Les dispacamides peuvent donc faire l'objet d'études de relation structure-activité.

Ce chapitre présentera un état de l'art en ce qui concerne les synthèses décrites du dispacamide A **20**. Ces différentes approches seront classées selon leur nature et présentées en veillant à souligner les étapes clés de chaque synthèse. Une attention particulière sera consacrée à la synthèse du dispacamide A élaborée au laboratoire, synthèse qui sera ensuite appliquée à la préparation d'une chimiothèque.

IV.1.1. État de l'art des différentes stratégies d'obtention du dispacamide A

Depuis 1997, de nombreux efforts ont été déployés afin de synthétiser de manière efficace le dispacamide A et ses analogues. Ces différentes synthèses suivent généralement trois stratégies :

- Une première stratégie linéaire permet de commencer la synthèse par la partie pyrrolique, d'y attacher la chaîne linéaire, puis d'y ajouter un noyau imidazole déjà assemblé ;

- Une seconde stratégie permet, à partir d'un précurseur linéaire, de former le noyau 2-aminoimidazolone au cours de la synthèse. Ces synthèses permettent souvent d'obtenir non seulement les dispacamides, mais aussi les analogues de l'oridine ;
- La troisième stratégie est basée sur une approche inspirée de la réactivité des produits naturels de type dicétopipérazine contenant la proline et le pyrrole, développée au laboratoire.

Ces différentes stratégies résumées dans le *Schéma 93* sont développées dans les paragraphes suivants.

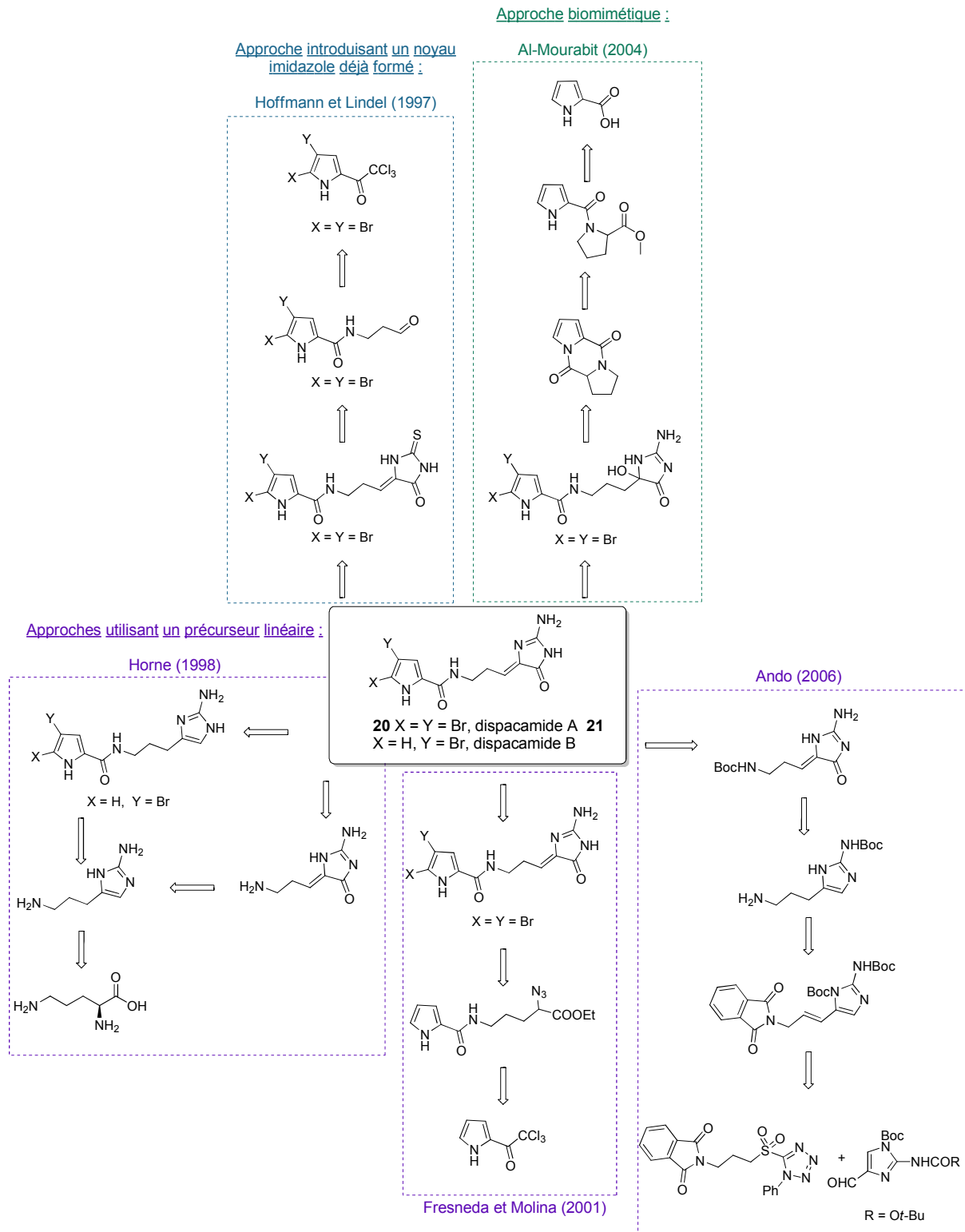


Schéma 93 : Les différentes stratégies d'obtention des dispacamides

IV.1.2. Approche utilisant un noyau imidazole déjà formé : la première synthèse de Lindel

Comme nous l'avons précédemment évoqué dans le chapitre II, le dispacamide A **20** a été isolé pour la première fois par Fattorusso *et. coll.* en 1996 d'*Agelas sp.* avec son analogue débromé, le dispacamide B **21**.⁴⁰ C'est en 1997, que Lindel décrit la première synthèse de ce monomère de P-2-AI (Schéma 94).⁴⁰

La stratégie de synthèse consiste en un couplage de l'aldéhyde aliphatique **132**, comportant déjà la partie pyrrolique bromée des P-2-AIs et dont la synthèse a été décrite précédemment,¹⁴⁹ avec un nucléophile de type glycoxyamidine. Étant donné que la glycoxyamidine, elle-même, n'a pas donné de résultat concluant, elle a été remplacée par la 2-thiohydantoïne (Schéma 94). La 2-thiohydantoïne donne, en présence d'une base (pipéridine), la (*Z*)-thiohydantoïne alkylidène **133**, stéréochimiquement pure, avec un rendement de 80%. Une méthylation chimiosélective, utilisée pour activer la position électrophile C2, va ensuite donner l'imidazolone **134** avec rétention de la stéréochimie *Z*. Finalement, le dispacamide A **20** est obtenu en mélange avec le produit secondaire **135**, après amination en position 2 de **20** par NH₃/NH₄Cl dans des conditions assez dures.¹⁵⁰

Avec cette méthode, le dispacamide A est obtenu en 5 étapes avec un rendement global de 22%, la dernière étape faisant baisser de façon importante le rendement.

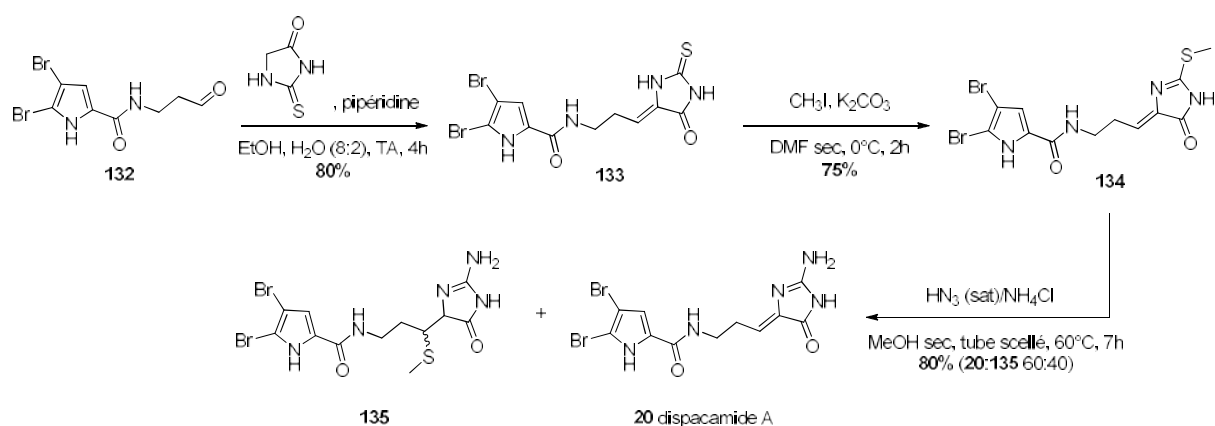


Schéma 94 : Synthèse du dispacamide A **20** par Lindel

¹⁴⁹ Lindel, T.; Hoffmann, H. *Liebigs Ann.* **1997**, 1997, 1525-1528.

¹⁵⁰ Lempert, K.; Breuer, J.; Lempert-Srétén, M. *Chem. Ber.* **1959**, 92, 235-239.

La dernière étape de synthèse étant problématique à cause de la faible sélectivité entre le produit désiré et le produit secondaire, les auteurs ont rendu le C2 électrophile en oxydant la thiohydantoïne **133** (Schéma 95). Cette dernière a donc été mise en présence de TBHP dans le méthanol puis d'ammoniac à température ambiante pendant 12 h pour donner le dispacamide A avec un rendement de 72% sur cette dernière étape. Avec cette amélioration, le dispacamide A est obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 44%.

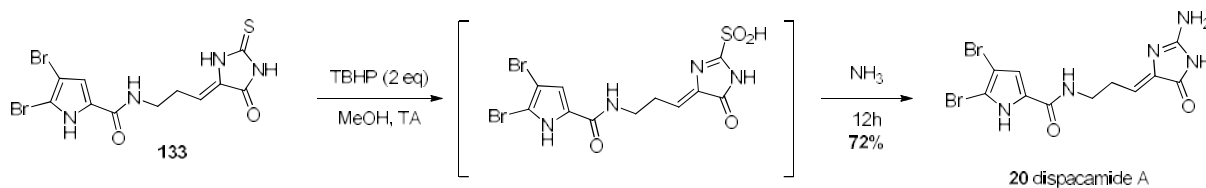


Schéma 95 : Synthèse du dispacamide A **20** améliorée par Lindel

La force de cette première synthèse est l'amination directe, en présence de TBHP, de la 5-alkyldène-2-thiohydantoïne **133** par l'ammoniac, qui permet une synthèse efficace et l'obtention du dispacamide A **20** avec un rendement proche de 50%.

IV.1.3. Approches utilisant un précurseur linéaire

Les trois approches ont la particularité de permettre l'obtention de tous les monomères linéaires de la famille, oroïdine **8** et dispacamides.

➤ La synthèse de Horne, à partir de l'ornithine

En 1998, l'idée de Horne est d'accéder aux monomères simples oroïdine **8**, hyménidine **16** et clathrodine **17** (noyau 2-aminimidazole et insaturation sur la chaîne linéaire en 6-7) ainsi qu'aux dispacamides (noyau imidazolone et insaturation sur la chaîne linéaire en 5-6) en une synthèse simple et efficace. Sa stratégie est basée sur l'utilisation du précurseur de type 2-aminoimidazole **136**, à partir duquel, il va pouvoir oxyder pour accéder aux différentes structures requises.¹⁵¹

¹⁵¹ Olofson, A.; Yakushijin, K.; Horne, D. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1248-1253.

Le précurseur **136** est synthétisé via la méthode de Lancini *et. al.*¹⁵² à partir de l'ester de l'acide aminé ornithine. Ce dernier subit alors une réduction d'Akabori suivie d'une condensation pour donner **136**.

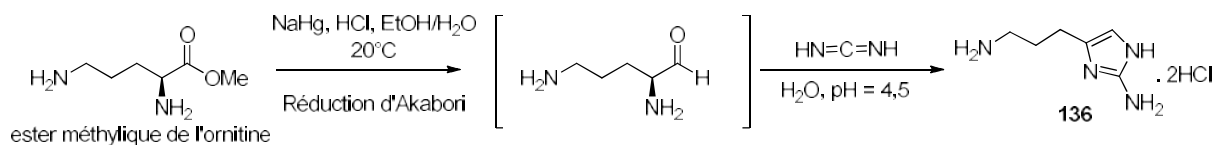


Schéma 96 : Synthèse du précurseur **136** selon la méthode de Lancini *et. al.*

À partir de ce précurseur imidazolique commun, la synthèse des dérivés de type dispacamide et oroïdine **8** est possible. On ne va pas ici décrire la voie d'accès à la clathrodine **17**, même si ces deux synthèses sont étroitement liées (*Schéma 97*).

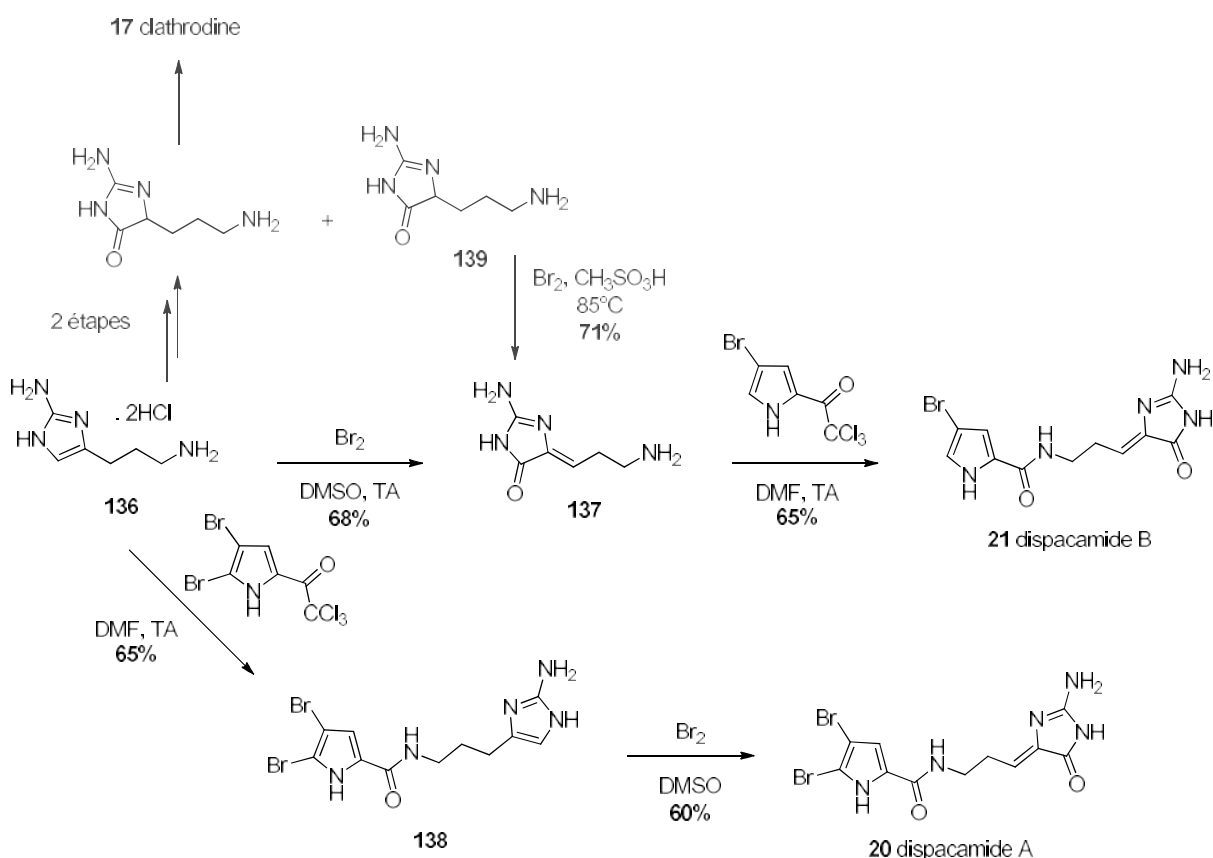


Schéma 97 : Synthèse des dispacamides A **20** et B **21** par Horne *et. coll.*

Les dérivés de type dispacamide sont obtenus en deux étapes interchangeables à partir de l'intermédiaire **136**. Ce dernier peut subir tout d'abord une oxydation par le dibrome dans le

¹⁵² Lancini, G. C.; Lazzari, E.; Arioli, V.; Bellani, P. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 775-780.

DMSO pour donner l'intermédiaire **137** avec un rendement de 68%. Puis, **137** peut subir une acylation avec le 4-bromo-2-(trichloroacétyl)pyrrole afin d'obtenir la dispacamide B **21** avec un rendement de 44% sur les deux étapes. En utilisant la seconde voie, **136** peut tout d'abord réagir avec le 3,4-dibromo-2-(trichloroacétyl)pyrrole pour donner l'intermédiaire **138**. Ce dernier, pourra alors subir une oxydation au dibrome dans le DMSO pour donner le dispacamide A **20** avec des rendements similaires.

Une troisième façon d'obtenir ces dispacamides selon Horne *et. coll.* est d'utiliser un des produits secondaires, l'intermédiaire **139**, obtenu lors de la synthèse de la clathrodine **17**. Cet intermédiaire pourra alors subir une oxydation dans des conditions dures (acide méthanesulfonique, chauffage à 85 °C) pour donner l'intermédiaire **137**, qui conduira en une seule étape à l'obtention du dispacamide B **21**.

Cette seconde synthèse est la première méthode générale qui permet d'obtenir facilement la plupart des monomères linéaires de la famille sans utilisation de groupements protecteurs. On obtient le dispacamide A **20** en 3 étapes avec un bon rendement global. De plus lors de cette synthèse, Horne *et. coll.* ont développé des transformations intéressantes pour passer du noyau imidazole, à imidazolone et vinyl imidazole.

➤ La synthèse de Fresneda et Molina, utilisant un α -azidoester

Cette synthèse permet d'obtenir les monomères dispacamide et midpacamide (Figure 98). Elle est basée sur la formation d'un intermédiaire azoture **140** (Figure 99), qui va ensuite permettre la construction du noyau imidazolone du dispacamide **20** (Figure 99) et imidazolidine-2,4-dione du midpacamide **141** (nous ne détaillerons cependant pas cette partie de la synthèse).¹⁵³

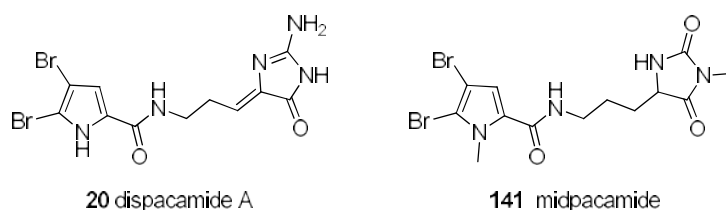


Figure 98 : Structures du dispacamide A **20** et du midpacamide **141**.

¹⁵³ Fresneda, P. M.; Molina, P.; Sanz, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 851-854.

L'intermédiaire **142** est préparé à partir du 2-(trichloroacétyl)pyrrole et du 5-aminovalérate avec un rendement de 90%. Il subit ensuite une azidation à partir d'un énolate comme décrit par Evans¹⁵⁴ pour donner **143** avec un rendement de 90%. L' α -azidoester **143** obtenu a été traité séquentiellement par de la triphénylphosphine, de l'isocyanate de tosyloyle et de l'ammoniac pour obtenir un mélange de la guanidine **144** et du produit cyclisé désiré **145** avec des rendements respectifs de 20 et 40%. Le mélange peut ensuite être déprotégé en présence d'iodure de samarium (II) et la 2-aminoimidazolone **146** est obtenue avec un rendement de 92%. L'intermédiaire **146** est ensuite bromé et oxydé en présence de dibrome dans l'acide méthanesulfonique (étape inspirée de la synthèse de Horne) pour donner le dispacamide A **20** avec un rendement sur les deux étapes de 67%.

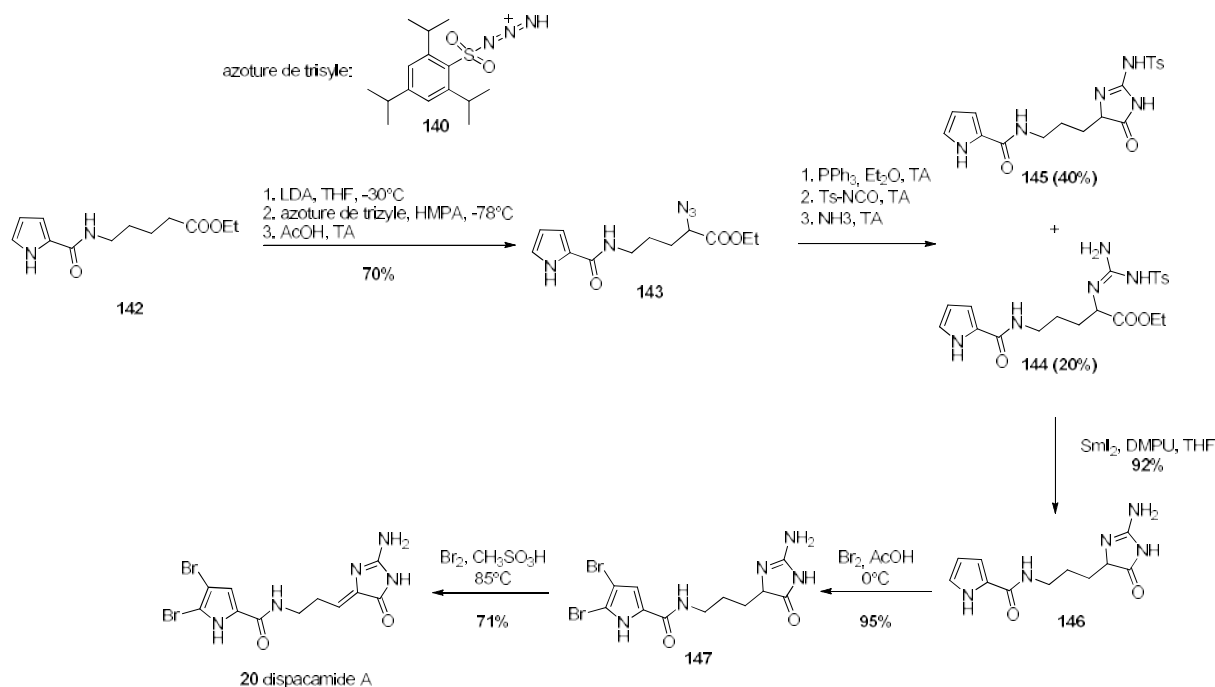


Figure 99 : Synthèse du dispacamide A par Fresneda et Molina

Cette synthèse permet d'obtenir le dispacamide A **20** en 6 étapes avec un rendement global de 23%. L'intérêt de cette synthèse réside dans l'intermédiaire azidoester **143** qui permet de former de façon sélective le noyau 2-aminoimidazolone du dispacamide d'une façon véritablement nouvelle, par comparaison avec les précédentes synthèses. Cette synthèse, bien que plus longue que la précédente, permet, plus aisément, la synthèse d'autres homologues.

¹⁵⁴ Evans, D. A.; Britton, T. C.; Dorow, R. L.; Dellaria, J. F. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5525-5540.

➤ La synthèse convergente d'Ando

La synthèse d'Ando est, à ce jour, la plus récente et la seule synthèse en partie convergente utilisée pour obtenir le dispacamide A. Dans sa stratégie, la partie pyrrolique est introduite assez tardivement dans la synthèse (*Schéma 100*).¹⁵⁵

La partie imidazole est formée à partir de la 3-bromo-1,1-diméthoxypropan-2-one **148** et de la *tert*-butoxycarbonylguanidine **149** pour former le noyau imidazole fonctionnalisé **150**. Ce dernier est ensuite transformé et protégé pour obtenir l'intermédiaire clé **152** avec un rendement global de 49% sur trois étapes.

La partie pyrrolique est préparée par le couplage du bromoéthylphtalimide **153** avec le mercaptotétrazole **154** pour donner, en deux étapes, le second intermédiaire clé **155** avec un rendement de 79%.

Les deux blocs **152** et **155** sont ensuite couplés via une oléfination de Julia pour produire l'oléfine **156** de stéréochimie *E* avec un bon rendement et une bonne sélectivité. Ensuite, le composé **156** est réduit et déprotégé partiellement pour donner le composé imidazolique **157** avec un rendement de 64% sur trois étapes. Ce dernier sera ensuite oxydé pour donner **158** puis acylé avec le 2-(trichloroacétyl)pyrrole pour finalement donner les dispacamides A **20** et B **21** avec des rendements respectifs sur les trois dernières étapes de 34 et 27%.

¹⁵⁵ Ando, N.; Terashima, S. *Synlett* **2006**, 2836-2840.

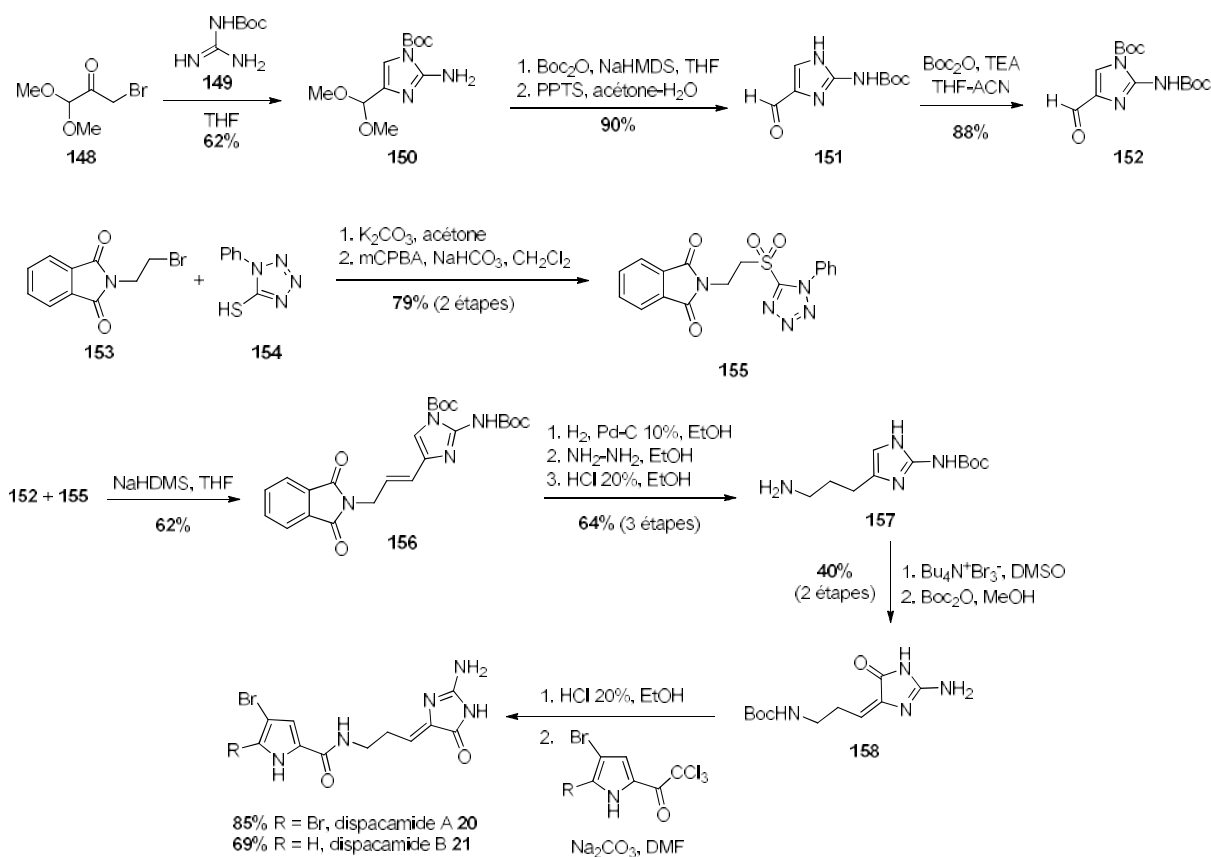


Schéma 100 : Synthèse des dispacamides A 20 et B 21 par Ando et coll.

Cette synthèse permet l'accès à tous les monomères de la famille P-2-AIs ; cependant elle utilise de nombreux groupements protecteurs qui demandent des étapes supplémentaires ce qui fait baisser le rendement de façon importante. En effet, selon cette voie, le dispacamide A 20 est obtenu en 7 étapes avec un rendement global de 6.6%.

IV.1.4. Synthèse de notre laboratoire à partir des dicétopipérazines

Cette dernière approche s'inspire des hypothèses de biogenèse élaborées au laboratoire à partir des intermédiaires P-2-AIs isolés des éponges marines étudiées au laboratoire.

➤ L'origine des dispacamides

L'origine du dispacamide A 20 et de ses analogues monomériques n'a pour l'instant pas été élucidée. C'est pourquoi, différentes hypothèses de biogenèse de ces composés se

confrontent. Kitagawa¹⁵⁶ et Braekman¹⁵⁷ ont proposé que la proline, l'ornithine et la guanidine soient des précurseurs probables des composés monomériques des P-2-AIs (*Schéma 101*).

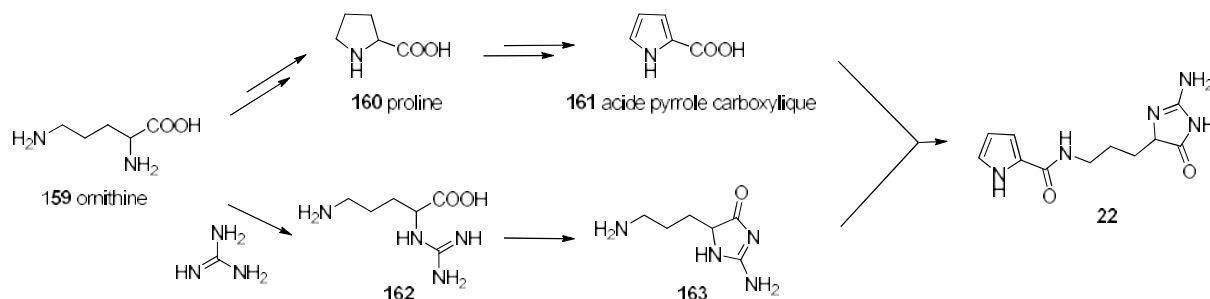


Schéma 101 : Hypothèse de biogenèse des dispacamides à partir de l'ornithine selon Braekman

A ce jour, deux publications relatent de l'incorporation de précurseurs marqués radioactifs dans des composés biosynthétisés par les éponges. En effet, en 1999, Kerr *et. coll.* ont mené une expérience biosynthétique sur des cellules d'éponges d'*Axinella corrugata* qui produisent de la stevensine (ou odiline). La proline, l'ornithine et l'histidine marquées ont ainsi été incorporées à la stevensine. Plus récemment, une expérience d'incorporation de lysine radioactive¹⁵⁸ par l'éponge *Axinella damicornis* a validé l'hypothèse de Lindel et Köck¹⁵⁹ quand à l'origine du P-2-AIs monomère oroïdine.

Le laboratoire a proposé l'hypothèse selon laquelle le pseudo-peptide pyrrole-proline **165** (*Schéma 102*) pourrait être le précurseur de l'entité clé dicétopipérazine **166**, clé qui, elle même, mènerait au squelette en C₁₁N₅ des monomères de P-2-AIs et donc à celui des dispacamides. Ainsi, la première étape de cette biosynthèse serait la formation du peptide Pro1-Pro2 **164**, qui pourrait ensuite subir une oxydation afin de transformer la Pro1 en pyrrole pour donner **165**. Cet intermédiaire subirait ensuite une cyclisation pour donner **166** puis une addition de guanidine afin de donner le composé **22** comportant le noyau 2-aminoimidazolone du dispacamide.¹⁶⁰

¹⁵⁶ Kitawaga, I.; Kobayashi, J.; Kitanaka, K.; Kido, K.; Kyogoku, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2321-2328.

¹⁵⁷ Braekman, J.-C.; Daloze, D.; Stoller, C.; Van Soest, R. W. M. *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 417-431.

¹⁵⁸ Genta-Jouve, G.; Cachet, N.; Holderith, S.; Oberhänsli, F.; Teyssié, J.-L.; Jeffree, R.; Al Mourabit, A.; Thomas, O. P. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2298-2301.

¹⁵⁹ D. E. N. Jacquot, T. Lindel, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 1551 – 1565

¹⁶⁰ Travert, N.; Al-Mourabit, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10252-10253.

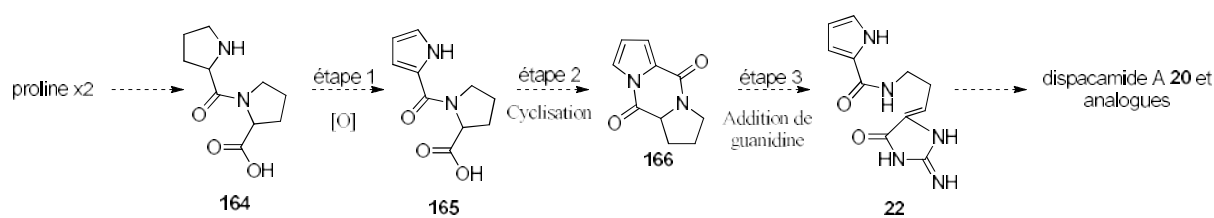


Schéma 102 : Hypothèse de biogénèse des dispacamides à partir de la proline et de la guanidine par formation de dicétopipérazine pyrrole-proline.

➤ La synthèse du laboratoire

En s'inspirant de cette hypothèse de biogénèse, Al-Mourabit *et. coll.* ont élaboré la synthèse du squelette du dispacamide en une seule étape à partir de la dicétopipérazine pyrrole-proline avec le bon degré d'oxydation (Schéma 103).¹⁶⁰

Cette synthèse trouve son originalité dans le réarrangement oxydatif spontané de la proline en présence de l'oxygène de l'air. Le pseudopeptide **167** est obtenu par le couplage peptidique de l'ester méthylique de la proline et de l'acide pyrrolocarboxylique avec un rendement de 90% dans les conditions classiques de couplage peptidique.¹⁶¹ Le composé **167** est ensuite activé par cyclisation en 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline **166** utilisant NaH dans le THF anhydre avec un rendement de 74%. À cette dernière est ajoutée une Boc-guanidine en présence de l'oxygène de l'air pour obtenir le mélange des deux régioisomères **170** et **171** avec un rendement global de 42%. Cette étape passe par la formation des deux intermédiaires hydroperoxyde **168** et dioxétanone **169** résultants de l'oxydation spontanée de la dicétopipérazine **166**. Le mélange des régioisomères **170** et **171** est ensuite bromé puis déprotégé avec un rendement de 74% sur les deux étapes. Puis le composé hydroxylé **172** obtenu est déshydraté dans des conditions assez dures (acide méthanesulfonique et chauffage à 80 °C) pour donner le dispacamide A **20**.

¹⁶¹ McElroy, A. B.; Clegg, S. P.; Deal, M. J.; Ewan, G. B.; Hagan, R. M.; Ireland, S. J.; Jordan, C. C.; Porter, B.; Ross, B. C. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2582-2591.

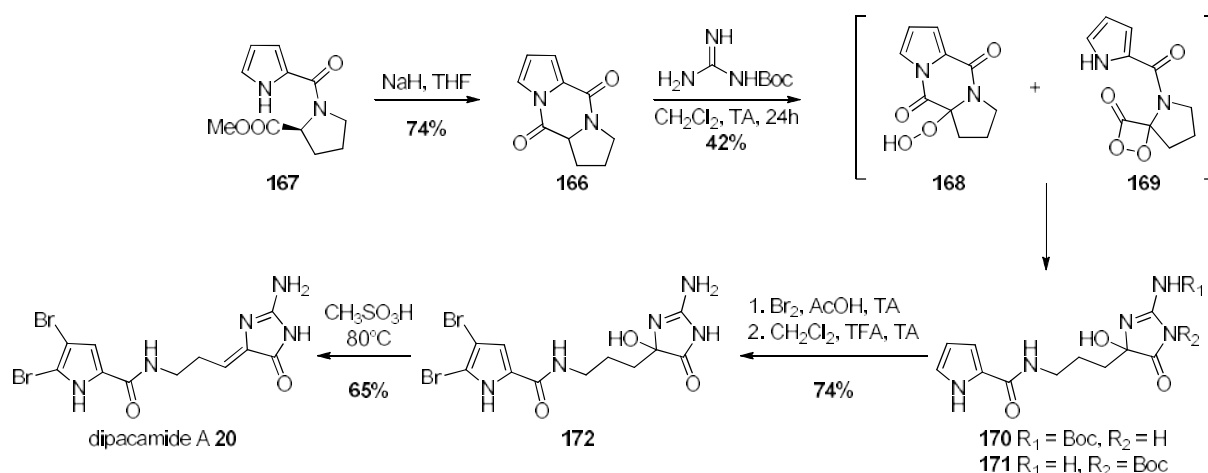


Schéma 103 : Synthèse du dispacamide A **20** en passant par la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline

Cette voie permet d'obtenir le dispacamide A **20** en 5 étapes avec un rendement de global de 13%. Ici, le résultat original et essentiel se trouve dans le fait que l'oxydation spontanée de la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline **166** en présence d'oxygène de l'air conduit rapidement au composé imidazolone en C₁₁N₅ recherché, avec le bon degré d'oxydation.

Cette oxydation spontanée pourrait en effet expliquer la présence des verpacamides dans l'éponge marine *Axinella vaceleti*.¹⁶² Une oxydation du squelette des verpacamides pourrait conduire aux dispacamides.

➤ Les différentes améliorations apportées à la synthèse

La réaction d'oxydation spontanée de la dicétopipérazine suivie de l'addition de guanidine est la clé de cette synthèse. Son mécanisme a donc été étudié au laboratoire afin de mieux le comprendre et trouver les meilleures conditions possibles afin d'augmenter son rendement. Dans un premier temps, les améliorations apportées à la synthèse de la dicétopipérazine seront discutées, puis dans un second temps, celles apportées à l'étape d'oxydation de cette dicétopipérazine seront développées.

¹⁶² Vergne, C.; Boury-Esnault, N.; Perez, T.; Martin, M.-T.; Adeline, M.-T.; Tran Huu Dau, E.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2421-2424.

Optimisation de la transformation du pseudopeptide pyrrole-proline en 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline

L'optimisation de cette étape a été réalisée par M. Gabant¹⁶³ dans notre équipe en agissant principalement sur le traitement de la réaction. En effet, cette réaction de cyclisation est réalisée dans le THF, en condition anhydre et en présence d'un excès de la base NaH. Seules des conditions strictement anhydres permettent la formation de la dicétopipérazine sans observer de dégradation dans le milieu réactionnel. En effet, le composé **166** est extrêmement sensible aux additions nucléophiles et donc à la présence d'eau dans le milieu. Cependant, lors du traitement, la dicétopipérazine est mise en contact avec une phase aqueuse ; cette étape cruciale devait donc être maîtrisée afin d'éviter la dégradation du composé pendant le traitement. M. Gabant et N. Travert¹⁶⁴ ont donc mis au point un traitement rapide sans agitation et utilisant comme phase aqueuse une solution tampon légèrement acide permettant d'obtenir la dicétopipérazine avec des rendements de 90% à l'échelle du gramme.

La 1,4-dicétopipérazine étant préparée avec un très bon rendement, il restait à étudier l'étape d'oxydation spontanée de cette dicétopipérazine afin d'obtenir le dispacamide avec de meilleurs rendements.

Optimisation de l'oxydation spontanée de la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline

La 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline **166** est très oxydable et peut incorporer l'oxygène de l'air pour conduire à la formation d'hydroperoxyde **168**. Ce composé peut évoluer selon deux voies mécanistiques distinctes et compétitives pour conduire aux différents produits **176** et **177**, et **178** de la réaction ci-dessus (*Schéma 104* et *Schéma 105*).

Le composé **168** pourrait conduire à la formation de l'hémiaminal **173** (*Schéma 104*) sur lequel va s'ajouter la guanidine pour donner l'intermédiaire **174**. S'ensuivra une ouverture de l'hémiaminal qui donnera l'intermédiaire **175**, puis une cycloaddition permettra d'obtenir le squelette du dispacamide **176**. Il est à noter que lors de la première attaque du nucléophile, la partie pyrrole carboxamide ne se comporte pas comme un amide car le

¹⁶³ Gabant, M. Thèse de docteur en sciences, Université Paris Sud Orsay, septembre 2008.

¹⁶⁴ Travert, N. Thèse de docteur en sciences, Paris XI-Orsay, Septembre 2003.

carbonyle est beaucoup plus sensible aux attaques nucléophiles. De plus, le pyrrole est ici un bon groupement partant.

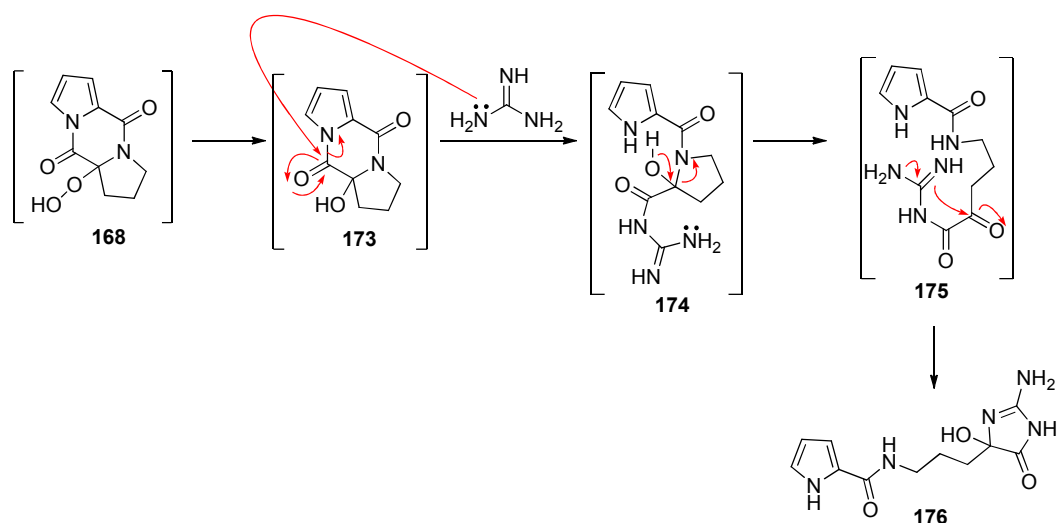


Schéma 104 : Mécanisme possible de formation de **176** après oxydation de la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline

La voie décarboxylative (*Schéma 105*) va entraîner la formation de la dioxétanone et mener à une décarboxylation. Ceci permettra la formation du composé imide **177**. Ce dernier en présence d'eau peut s'hydrolyser en acide **178**.

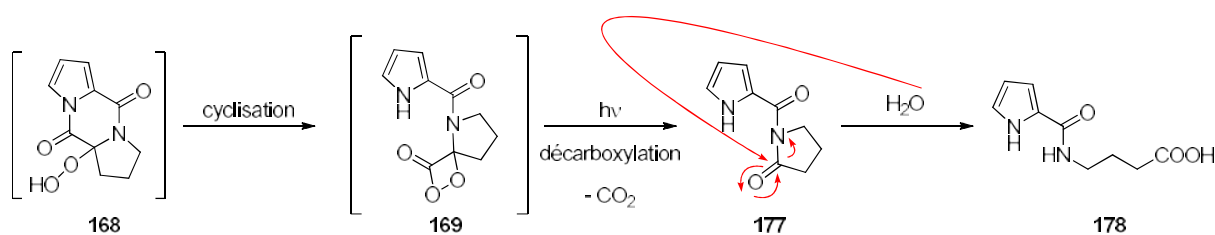


Schéma 105 : Mécanisme possible de formation des composés **45** et **48** après oxydation de la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline

Afin de favoriser la formation de l'alcool **173** et donc la formation du squelette du dispacamide **176**, H. Tian¹⁶⁵ a étudié l'oxydation de différentes dicétopipérazines en présence de différents réducteurs afin de réduire le peroxyde **168** et minimiser la voie de

¹⁶⁵ Tian, H.; Ermolenko, L.; Gabant, M.; Vergne, C.; Moriou, C.; Retailleau, P.; Al-Mourabit, A. *Adv. Synt. Catal.* **2011**, 353, 1525-1533.

décarboxylation. Il a ainsi effectué des expériences avec la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline en l'absence et en présence de sulfure de dibutyle (*Schéma 106*).

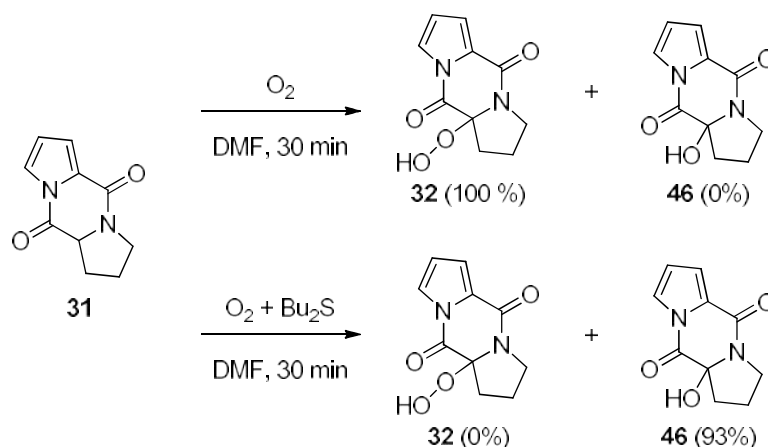


Schéma 106 : Étude de l'oxydation de la dicétopipérazine pyrrole-proline en présence et en absence de réducteur

L'oxydation en présence de Bu_2S de la dicétopipérazine **31** suivie de l'addition de la guanidine a été réalisée sous saturation d'oxygène de façon quantitative par C. Lejeune.¹⁶⁶

Grâce aux différentes améliorations apportées à la formation de la dicétopipérazine **31** et à son oxydation spontanée, effectuée maintenant en présence du réducteur Bu_2S , on parvient à synthétiser le dispacamide A de façon biomimétique avec un rendement global de 52%.

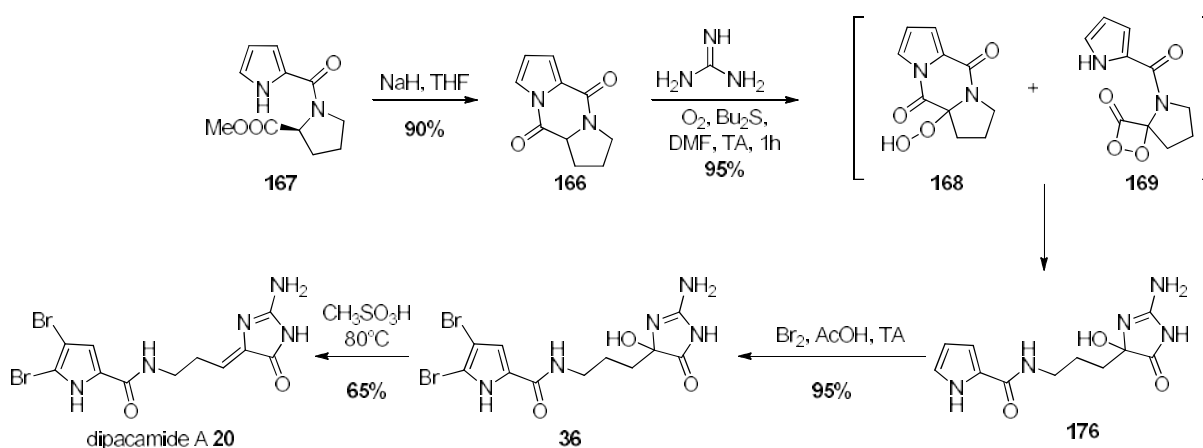


Schéma 107 : Synthèse améliorée du dispacamide A avec passage par la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline.

¹⁶⁶ Lejeune, C. Thèse de docteur en sciences, Université Paris-Sud Orsay, Novembre 2010

- Extension de la réaction aux dinucléophiles types thiourée, éthylènediamine et phénylènediamine

Une fois mise en œuvre, la réaction a été étendue à la synthèse d'analogues non naturels utilisant d'autres dinucléophiles.

C. Vergne¹⁶⁷ a effectué l'addition de la thiourée, dans des conditions non optimisées et a obtenu le composé **179** avec un rendement de 55 % (Figure 108).

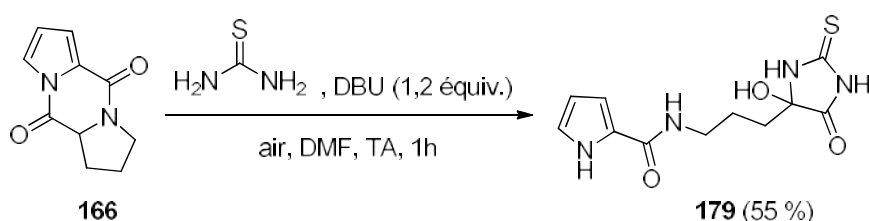


Figure 108 : Addition de la thiourée sur la 1,4-dicétopipérazine **166**

L'éthylène diamine a été additionnée dans les mêmes conditions, mais sans nécessiter l'ajout de base, par C. Vergne¹⁶⁷ et par H. Zhaoyu¹⁶⁸ dans des conditions optimisée (utilisation de Bu₂S) pour obtenir le composé **180**. Ceci a permis une amélioration du rendement de 55 % à 75 % (Figure 109).

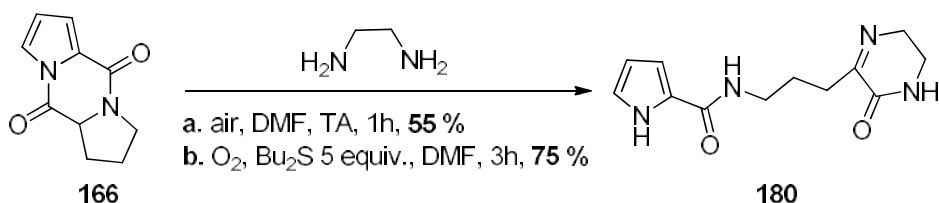


Figure 109 : Addition de l'éthylènediamine sur la 1,4-dicétopipérazine **166** dans les conditions non optimisée (a) et optimisée (b)

Enfin, C. Vergne¹⁶⁷ a effectué l'addition de la phénylènediamine sur **166** dans des conditions plus dures pour obtenir le composé **181** avec un rendement de 35 %.

¹⁶⁷ Vergne, C. Thèse de docteur en sciences, Université Paris-Sud Orsay, Septembre 2006

¹⁶⁸ Zhaoyu H. Rapport de stage M2 recherche, Université Paris-Sud Orsay, Juin 2009

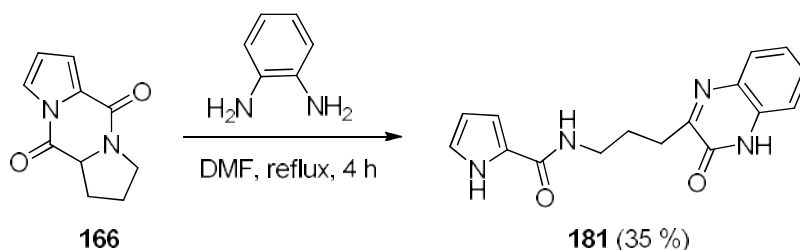


Figure 110 : Addition de la phénylènedimaine sur la 1,4-dicétopipérazine **166**

Étant donné la grande efficacité de cette réaction et l'utilisation possible de nucléophiles, il a été décidé de l'utiliser afin de composer une bibliothèque de composés analogues du dispacamide A. Ces composés pourront être ensuite testés sur différentes cibles biologiques.

IV.2. Synthèse d'analogues du dispacamide A

Comme indiqué dans le chapitre précédent, le laboratoire a mis au point une synthèse efficace et polyvalente qui permet d'obtenir le dispacamide A en 4 étapes avec un rendement global de 56%. Il devient ainsi possible d'utiliser cette synthèse dans le but de réaliser une chimiothèque de composés qui pourront ensuite être testés sur de nombreuses cibles biologiques. Un travail de synthèse d'analogues a donc été entrepris.

Le schéma rétrosynthétique suivant (Schéma 111) nous permettra de moduler les différentes parties de l'analogue final. On pourra en effet modifier la partie rouge en jouant sur la structure des dinucléophiles (guanidine, amidines ou diamines) que l'on additionne. De cette modification, on pourra obtenir des noyaux 2-aminoimidazolone substitués et dihydropirazinone originaux dont on voudrait connaître l'activité biologique. On pourra aussi modifier la partie pyrrolique en jouant sur les différents degrés de bromation du noyau pyrrolique (partie bleue), et finalement modifier la chaîne centrale en déshydratant ou non, l'alcool tertiaire obtenu après addition de la guanidine (partie verte).

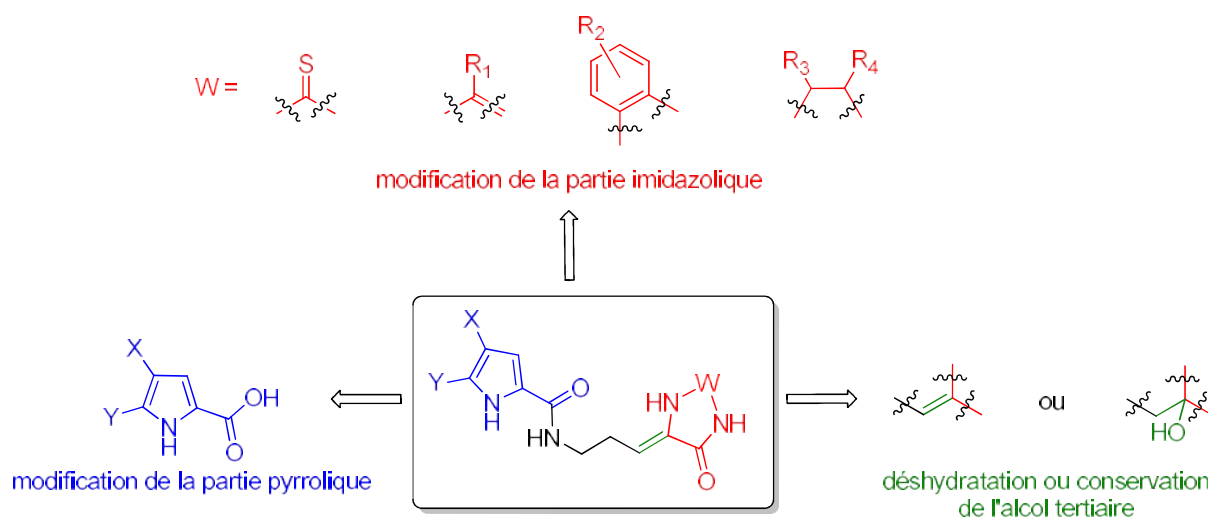


Schéma 111 : Modifications structurales possibles du débromodispacamide A

Une première partie présentera l'obtention du précurseur 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline ainsi que le schéma général d'addition des bis-nucléophiles. Une seconde partie se focalisera sur les modifications structurales apportées à la partie imidazolique, une troisième, sur les modifications apportées à la partie pyrrolique, enfin une quatrième partie où les essais de déshydratation, effectués pour modifier la chaîne liant les deux hétérocycles seront présentés.

IV.2.1. Obtention du précurseur 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline

Le précurseur dicétopipérazine a été obtenu en utilisant les conditions précédemment optimisées au laboratoire (cf. Chap IV).

Le pseudopeptide **167** est ainsi obtenu avec un rendement de 92% à partir de l'acide pyrrole-2-carboxylique **161** et de l'ester méthylique de (L)-proline **183** (*Schéma 112*). Cette réaction a été réalisée sur une échelle de 10 g avec une très bonne efficacité. **167** a ensuite été cyclisé en 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline **166** avec un rendement maximal de 87%. Comme établi précédemment par M. Gabant,¹⁶³ le traitement du brut de réaction a été réalisé le plus rapidement possible avec un tampon acétate (pH = 3.8) (1 mL par mg de NaH) et le composé **166** a été extrait à l'acétate d'éthyle. Cette réaction, efficace sur 1 g, s'est révélée périlleuse à plus grande échelle. En effet, les grandes quantités de solution tampon nécessaires au traitement ainsi que la rapidité d'exécution, indispensable au bon rendement, ne sont pas compatibles avec de grandes quantités de produit. A plus grande échelle, le rendement chute

drastiquement. Au cours de ce travail, la dicétopipérazine **166** a donc toujours été synthétisée par batches de 1 g afin de l'obtenir avec un rendement maximum.

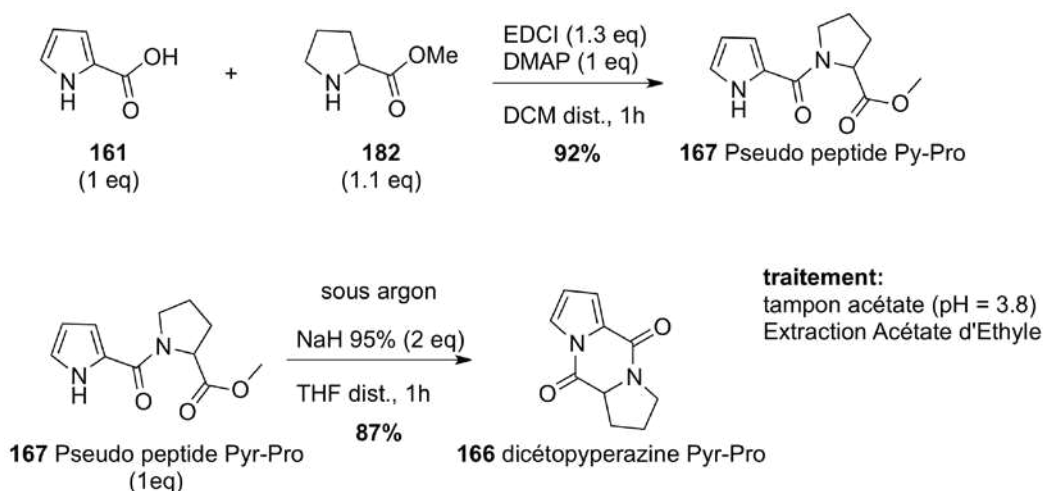


Schéma 112 : Obtention de la dicétopipérazine pyrrole-proline **166**

De manière générale, la dicétopipérazine **166** va ensuite être oxydée en présence du réducteur Bu₂S puis, le bis-nucléophile désiré sera additionné afin d'obtenir l'analogue correspondant (Schéma 113). Différents essais de bases (TEA (pK_a = 10,7 dans l'eau), DBU (pK_a = 24,3 dans ACN), *t*-BuOK (pK_a = 19,0 dans l'eau)) ont permis de d'établir que *t*-BuOK se trouvait être une base de choix pour permettre la libération des nombreux di-nucléophiles conditionnés sous sels de HCl. Les temps de réaction et l'ajout de *t*-BuOK varient donc en fonction du di-nucléophile ajouté. Ces réactions sont généralement réalisées à température ambiante sous atmosphère d'oxygène.

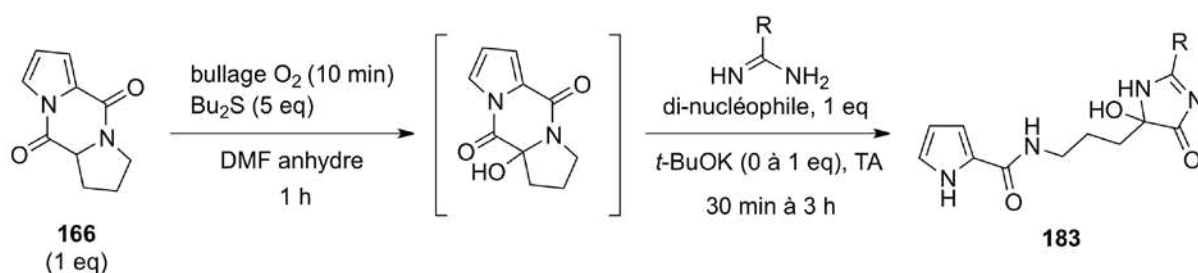


Schéma 113 : Protocole général d'addition sur la dicétopipérazine **166** : Exemple des di-nucléophiles de type amidine

Une fois les réactifs consommés, le brut de réaction est précipité dans un mélange CH₂Cl₂/heptane entre 100 : 0 et 50 : 50 (v/v). Cette étape de précipitation a été mise au point

pour se débarrasser facilement du Bu₂S et de ses sous produits qui polluent généralement les fractions de colonnes et entraînent des séparations par chromatographie sur silice plus longues et plus complexes. Puis le résidu obtenu est souvent purifié par colonne de silice (éluant CH₂Cl₂/MeOH) pour conduire à l'analogue désiré.

IV.2.2. Modifications apportées à la partie imidazolique

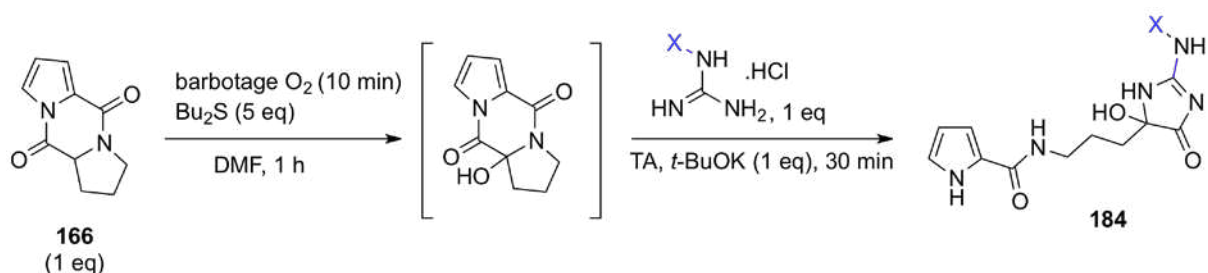
Il existe différents di-nucléophiles théoriquement susceptibles de s'additionner sur la dicétopipérazine **166**. Nous avons donc étudié la réactivité de plusieurs séries de réactifs commerciaux. Les séries : guanidines, thiourées, thioamides, amidines (substituées pas des groupements aryles, hétéroaryles ou alkyles), 1,2-phénylènediamines et 1,2-éthylènediamines ont été étudiées.

- Étude de la série guanidine, thioamide et thiourée

Nous avons étudié plusieurs séries de di-nucléophiles de type guanidine différemment substituées afin de construire une chimiothèque variée de molécules.

Synthèse des produits d'addition 184a-f

La réaction d'addition a tout d'abord été réalisée avec des guanidines mono- et di-substituées symétriques avec des groupements peu encombrants. La nitroguanidine, la cyanoguanidine et l'acétylguanidine ont été utilisées pour obtenir les produits **184a-c**. Puis des groupements plus encombrants tels que le benzimidazole, la pipéridine et le pyrazol ont été utilisés pour obtenir les produits **184d-f** (*Tableau 4*).



Entrée	N°	X	Rendement
1	184 a	NO ₂	98 %
2	184 b	CN	47 %
3	184 c	COCH ₃	0 %
4	184 d	2-benzimidazoyle	20 %
5	184 e	1-pipéridinyle	28 %
6	184 f	1-pyrrazoyle	10 %

Tableau 4 : Synthèse des produits d'addition 184

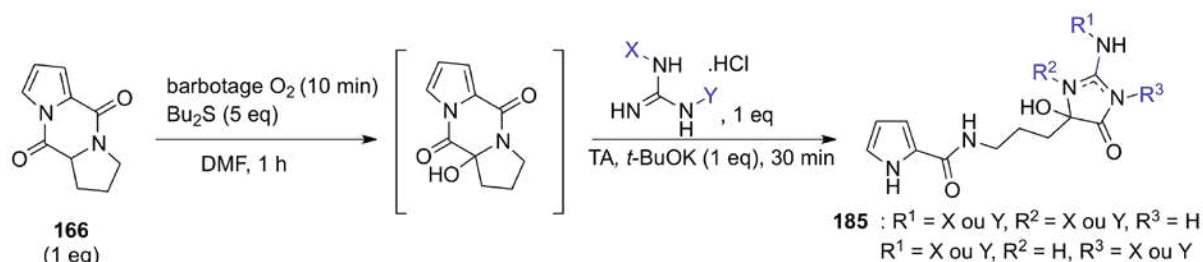
Les produits **184a-b** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 98% et 47%, le composé **184b** ayant nécessité une purification supplémentaire sur silice. Le composé **184c** n'a pas pu être isolé. Ceci est probablement dû au fait que les 3H en α de la fonction carbonyle sont acides et peuvent être facilement déprotonés en présence de base. Ainsi, un carbanion pourrait se former et aboutir à de nombreux produits d'addition.

Les produits d'addition **184d-e** ont été obtenus respectivement avec des rendements de 20% et 28% principalement à cause de problèmes de purification. Le produit **184f** a seulement pu être obtenu avec un rendement faible et une pureté moyenne après 1 h de réaction et une purification sur silice. Un temps plus long de réaction entraîne sa dégradation. Le faible rendement de cette réaction est sûrement due à l'instabilité du composé formé, sensible à l'oxydation et comportant une liaison N-N pyrazolique instable dans les conditions de réaction. De plus, le pyrrazole étant un bon groupement partant, une fois formé, le composé **184f** pourrait être substitué par de l'eau et du méthanol.

Synthèse des produits d'addition 185a-b

Des guanidines di-substituées, susceptibles de s'additionner de deux façon différentes ont aussi été sélectionnées pour réagir avec la dicétopipérazine oxydée afin d'observer la

chimiosélectivité de la réaction. C'est le cas de la 1,3-di-*o*-tolylguanidine et de la *N*-propyl-*N'*-Boc-guanidine pour obtenir les produits **185a-b** (Tableau 5).



Entrée	N°	X, Y	Structure	Rendement
1	185a	<i>o</i> -benzyle, <i>o</i> -benzyle	-	20 % (mélange)
2	185b	<i>n</i> -propyle, Boc		3 %

Tableau 5 : Synthèse des produits d'addition **185**

Concernant la formation du produit **185a**, on observe un faible rendement (20%), sûrement dû au fort encombrement stérique des deux groupements tolyles présents sur la guanidine. De plus, on observe un mélange 60 : 40 de deux isomères. Le mélange obtenu est inséparable sur silice. On peut imaginer la formation des deux régioisomères **185aa** et **185ab** selon le mécanisme suivant (Schéma 114).

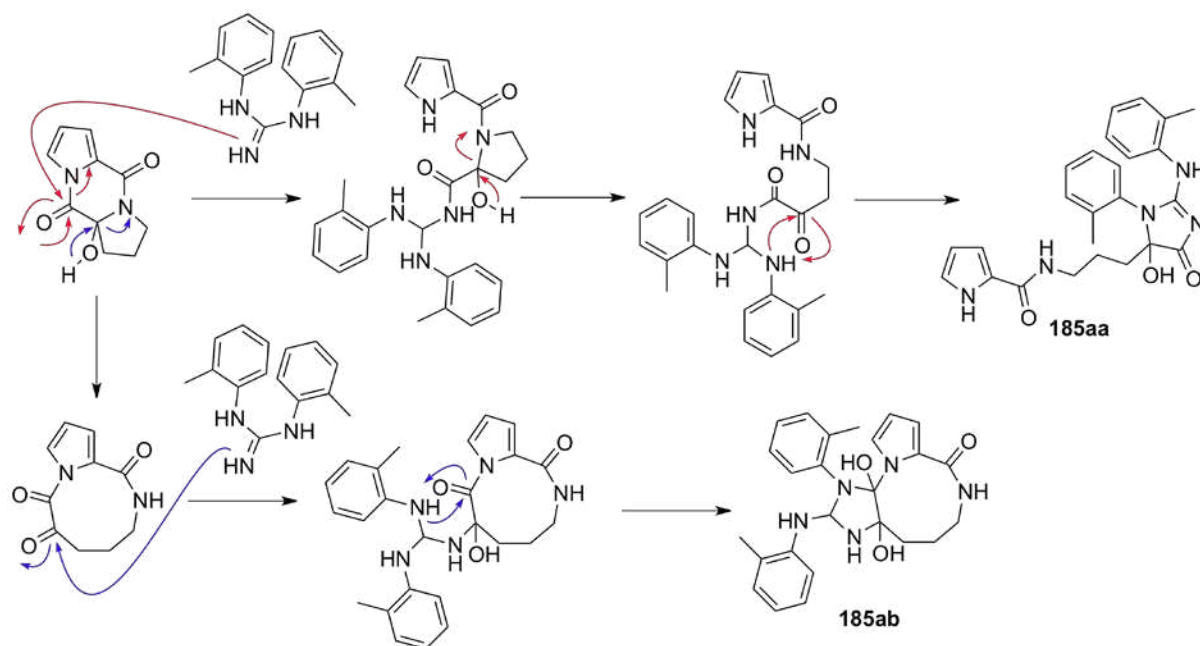


Schéma 114 : Proposition de structure et de mécanisme pour les espèces **185aa** et **185ab**

Ainsi, la première attaque du di-nucléophile est opérée par l'azote non substitué, à cause de sa plus grande nucléophilie.

Le composé **185b** (Tableau 5) provient de l'addition d'une *N*-propyl-*N'*-Boc-guanidine sur la dicétopipérazine oxydée. Cette guanidine a été synthétisée au laboratoire par B. Yu selon une méthode précédemment mise au point au laboratoire.¹⁶⁹

Malheureusement, un rendement convenable pour le composé **185b** n'a pas pu être obtenu malgré les différentes conditions opératoires mises en place (température, utilisation de tamis moléculaire, base, solvant). On observe cependant, lors de cette réaction, une chimiosélectivité car seul un produit a pu être identifié parmi les réactifs de départ ou les composés dégradés. Malgré nos efforts, seule la corrélation ^1H - ^{13}C HMBC H1'/C2 a pu être observée, la position du substituant propyle n'a donc pas pu être prouvée. Cependant des études similaires ont montré qu'une très bonne chimiosélectivité était observée lors de l'addition de *N*-alkyl-*N'*-Boc-guanidines.¹⁷⁰ En effet l'azote libre de la *N*-propyl-*N'*-Boc-guanidine effectue la première attaque sur la dicétopipérazine oxydée car sa nucléophilie est plus grande que celle des azotes sp^2 .

¹⁶⁹ Schroif-Grégoire, C.; Barale, K.; Zaparucha, A.; Al-Mourabit, A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2357-2359.

¹⁷⁰ K. Barale, Thèse de docteur en sciences, Université Paris-Sud Orsay, 10 Octobre 2008.

Synthèse du produit d'addition **186**

Afin d'élargir le domaine des bis-nucléophiles 1-3 additionnés à cette réaction, nous nous sommes intéressés à la réactivité des thiourées vis-à-vis de l'hémi-aminal. Ainsi, la *N*-méthylthiourée a été additionnée afin d'obtenir le produit d'addition **186**.

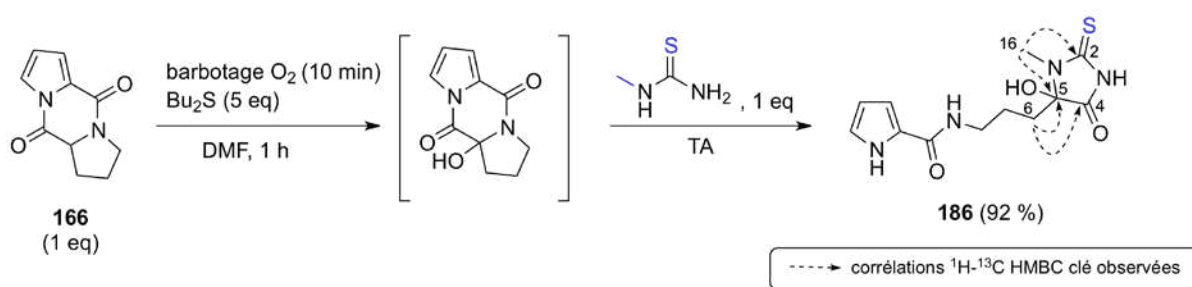


Schéma 115 : Synthèse du produit d'addition **186**

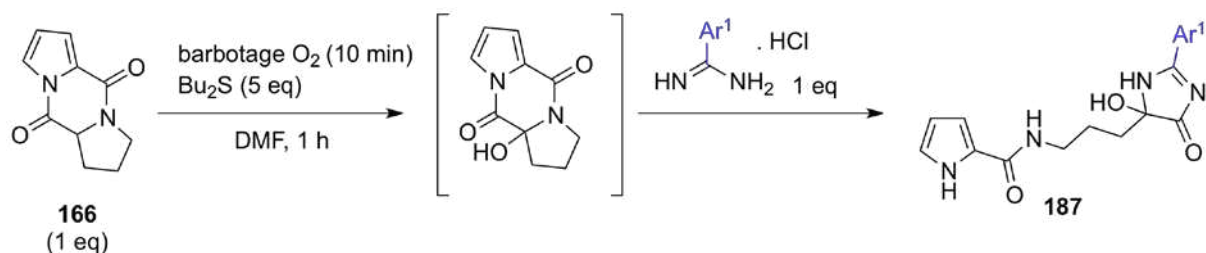
Lors de la réaction avec la *N*-méthylthiourée, on forme le produit **186** avec un très bon rendement (92 %). La structure **186** a été confirmée par les corrélations ¹H-¹³C HMBC H16/C2 et H16/C5 ainsi que H6/C4 et H6/C5 (Schéma 115). Dans une thiourée, le soufre est plus nucléophile que les azotes, cependant, le produit observé est sûrement le plus stable.

➤ Étude des séries aryles ou hétéroarylesamidines

Étant donné le très bon rendement obtenu avec l'addition des différentes guanidines monosubstituées, différentes amidines ont été additionnées sur la dicétopipérazine oxydée.

Synthèse des produits d'addition **187a-c**

Pour permettre la synthèse des produits d'addition **187a-c**, la benzamidine et les chlorures de 4-nitrobenzamidine et de 4-aminobenzamidine ont été additionnées à la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline oxydée dans les conditions ci-dessous (Tableau 6).



Entrée	N°	Conditions	Temps (h)	Ar ¹	Rendement
1	187a	TA	0,5	C ₆ H ₄	65 %
2	187b	TA, <i>t</i> -BuOK, 1 eq.	2	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	58 %
3	187c	TA, <i>t</i> -BuOK, 2 eq.	2	4-NH ₂ -C ₆ H ₄	34 %

Tableau 6 : Synthèse des produits d'additions 187

On obtient les produits désirés **187** avec des rendements moyens pour **187a** et **187b** respectivement de 65% et 58%. En revanche, on observe un rendement plus modeste pour **187c** de 34%. Ceci est en effet dû à la purification difficile, sûrement à cause de la fonction aniline. Une purification sur alumine neutre ne permet pas d'améliorer le rendement.

L'addition de la 4-aminobenzamidine pourrait s'effectuer selon le mécanisme suivant (Schéma 116). Comme expliqué dans le chapitre précédent, C7' est plus électrophile que C1', de plus, le pyrrole est un bon groupe partant.

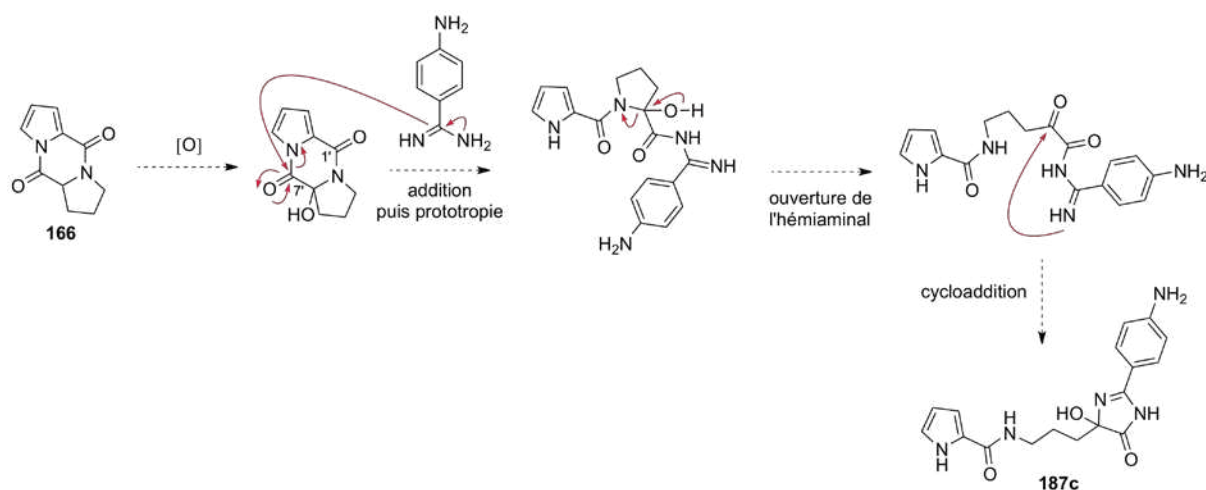


Schéma 116 : Mécanisme proposé pour la formation de 187c

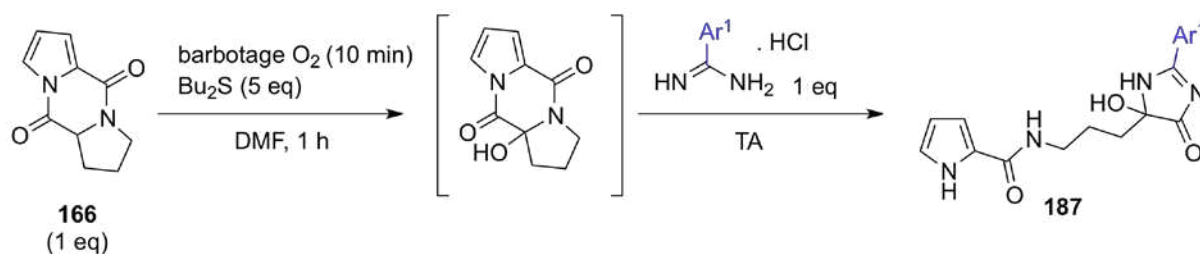
Cette voie (Schéma 116) est favorisée car la nucléophilie de l'amidine aromatique est bien plus grande que celle de l'aniline pour deux raisons principales :

Le doublet de l'azote de l'aniline est pris dans la mésomérie du cycle benzénique, cycle portant une fonction électroattractrice, diminuant ainsi la nucléophilie de l'aniline ;

Le facteur statistique joue en faveur de l'amidine.

Synthèse des produits d'addition 188a-f

Les produits **188a-c** ont été obtenus en utilisant des amidines différemment substituées sur le noyau aromatique (4-chloro-, de 3,5-chloro- et de 4-trifluorométhylphényle-). Puis, une série d'amidines hétérocycliques (3-pyridinyl-, le 2-thiophényle- et le 2-furanyl-) ont aussi été additionnées afin d'obtenir les produits **188d-f** (Tableau 7).



Entrée	N°	Temps (h)	Ar ¹	Rendement
1	188a	2	4-Cl-C ₆ H ₄	48 %
2	188b	2	3,5-Cl-C ₆ H ₄	28 %
3	188c	2	4-CF ₃ -C ₆ H ₄	46 %
4	188d	5	3-pyridinyle	41 %
5	188e	4	2-thiophènyle	56 %
6	188f	1	2-furanyle	47 %

Tableau 7 : Synthèse des produits d'addition **188**

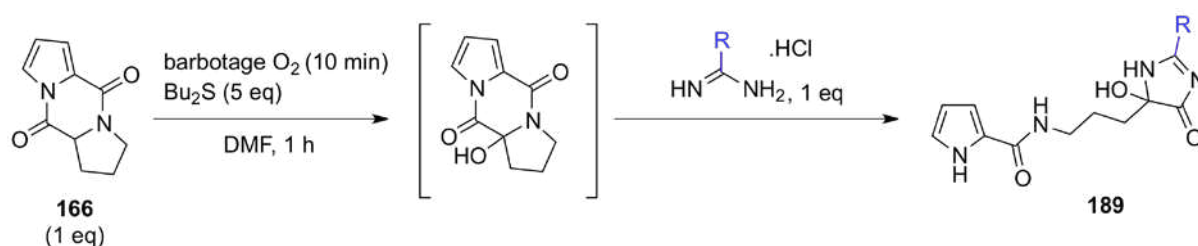
Dans les mêmes conditions de réaction, les produits **188a-c** sont obtenus avec des rendements allant de 28% à 48%. De grandes difficultés ont été rencontrées lors de l'étape de purification des composés **188a** et **188b**. Il faut effectuer une chromatographie très rapide (moins de 30 min) sans quoi, aucun produit n'est récupéré car ces derniers sont dégradés par la silice.

Les produits **188d-f** ont été obtenus avec des rendements moyens allant de 41% à 56%. De même que pour les produits obtenus précédents (**187**), leur polarité importante ne permet pas de bons rendements, dès qu'une étape de purification sur colonne est nécessaire, à cause de leurs trop fortes interactions avec la silice.

Il est à noter qu'une dégradation du produit **188e** est souvent observée dans les jours suivants sa synthèse, notamment lors des analyses RMN dans CD₃OD, faisant de ce produit un composé assez instable et difficile à caractériser.

➤ Étude de la série alkylamidines

La réaction d'addition sur la 1,4-dicétopipérazine pyrrole-proline oxydée a aussi été réalisée avec des chlorhydrates d'alkyle amidinium tels que ceux dérivés de *t*-butyl-, de méthyl-, de chlorométhyl- et d'aminométhylamidines. (Tableau 8).



Entrée	N°	Conditions	Temps (h)	R	Rendement
1	189a	TA, <i>t</i> -BuOK, 1 eq.	0,5	C(CH ₃) ₃	50 %
2	189b	différentes conditions	1	CH ₃	0 %
3	189c	TA, <i>t</i> -BuOK, 1 eq.	48	CH ₂ Cl	0 %
4	189d	différentes conditions	1	CH ₂ NH ₂	0 %

Tableau 8 : Synthèse des produits d'addition **189**

Seul le composé **189a** a été obtenu avec un rendement moyen de 50 %. Il n'a cependant pas été possible d'isoler les composés **189b-d**.

Pour obtenir le composé **189b**, différents essais ont été réalisés:

- i) Le chlorohydrate d'acétaminium et la DIPEA sont ajoutés à la dicétopipérazine oxydée ;
- ii) Le chlorohydrate d'acétaminium est ajouté à la dicétopipérazine oxydée, suivi d'une addition d'un équivalent de *t*-BuOK ;
- iii) Le chlorohydrate d'acétaminium a été préalablement passé sur une résine échangeuse d'ions (Amberlyst 21) avant d'être mis en réaction avec la dicétopipérazine oxydée, puis un équivalent de *t*-BuOK a été ajouté.

Dans le cas i) on observe la persistance des réactifs de départ. Dans les conditions ii) et iii) on obtient un mélange de produits difficilement isolables sur colonne dans lequel seul l'acide

pyrrole carboxylique a pu être identifié. On pourrait peut-être envisager une déprotonation du chlorohydrate d'acétaminium par un petit excès de base qui entraînerait la formation d'un carbanion, même si le proton le plus acide reste celui de l'azote. Cette espèce pourrait alors réagir de façon non contrôlée.

L'échec des réactions réalisées avec le chlorohydrate de chlorométhylamminium visant l'obtention du composé **189c** pourrait s'expliquer par le fait que la chlorométhylamidine doit polymériser quand elle est libérée (Schéma 117).

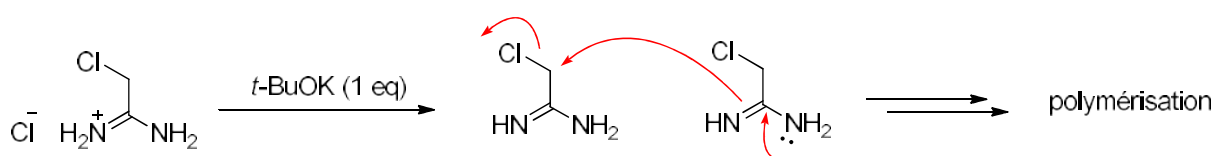


Schéma 117 : Mécanisme proposé pour la polymérisation de la chlorométhylamidine

Enfin, le produit **189d** n'a pu être isolé des réactions faites en présence de chlorohydrate d'aminoacétaminium lors de ces trois essais :

- i) bromohydrate d'aminoacétaminium seul, sans base ;
- ii) bromohydrate d'aminoacétaminium en présence d'un équivalent de *t*-BuOK ;
- iii) bromohydrate d'aminoacétaminium en présence de deux équivalents de *t*-BuOK.

Pour l'essai iii), les conditions ont conduit à la dégradation du substrat. Cependant, lors des essais i) et ii), on observe la formation d'un seul et même produit **189i** avec des rendements respectifs de 0.5 % et 58 % (Schéma 118).

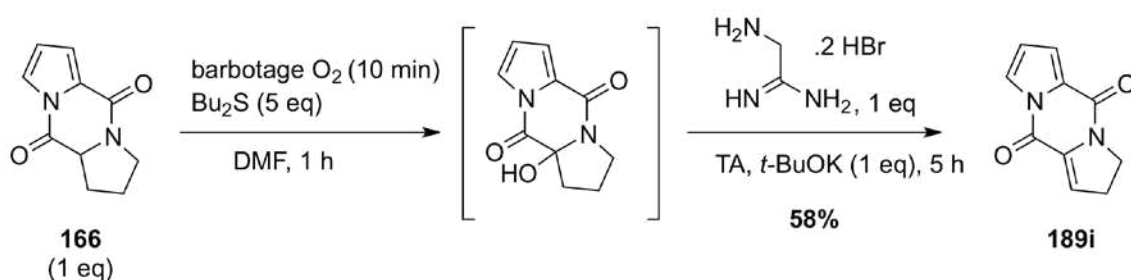


Schéma 118 : Synthèse du produit **189i**

Étant donné que le produit **189i** n'avait jamais été détecté lors des réactions précédentes, on peut supposer que la bifonctionnalité du chlorohydrate d'aminoacétaminium seule, permet la formation de ce composé.

La base étant en défaut lors des essais i) et surtout ii), l'ammonium pourrait jouer le rôle d'acide pour permettre la réaction d'élimination qui conduirait au composé **189i** (Schéma 119).

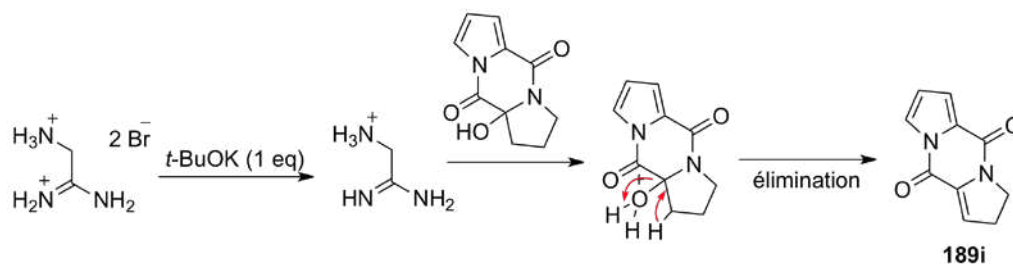


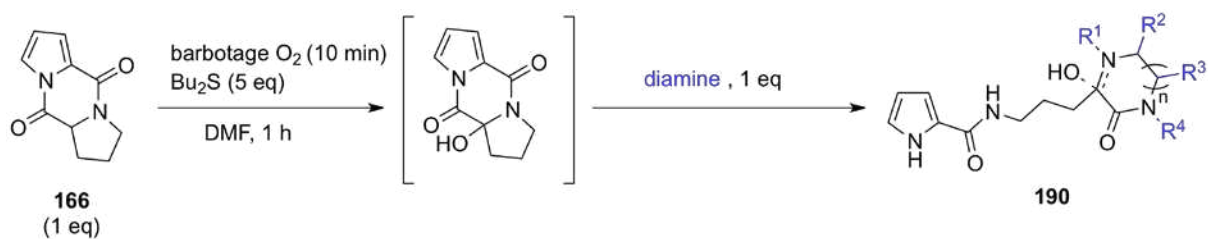
Schéma 119 : Proposition de mécanisme pour la formation de **189i**

Ces quatre tentatives d'addition d'alkylamidines ont permis de mettre en évidence l'importance du carbone quaternaire en alpha de la fonction amidine pour obtenir les analogues désirés. On atteint ici, une des limites de la réaction d'addition de di-nucléophile sur la dicétopipérazine oxydée.

Il serait cependant intéressant de tester l'addition du chlorohydrate d'isopropylacétamidinium qui possède un proton en α de la fonction amidine mais qui est un peu plus encombré.

➤ Étude de la série éthylènediamine et 2-aminobenzylamine

Une série de *di*-nucléophiles 1,2 et 1,3 a aussi été engagée dans la réaction d'addition sur la dicétopipérazine oxydée. La 1,2-bis(4-méthoxyphényl)-1,2-éthylènediamine, la 2-aminobenzylamine, le 1,2-*cis*diaminocyclohexane et la *N,N'*-diméthyl-1,2-bis(3-(trifluorométhyl)phényl)-1,2-éthylènediamine ont notamment été employées afin d'obtenir les composés **190a-d** (Tableau 9).



Entrée	N°	Conditions	Temps (h)	diamine	Structure	Rendement
1	190a	TA	24			56 %
2	190b	TA, <i>t</i> -BuOK, 1 eq.	2			56 % (mélange)
3	190c	TA	1,5			57 %
4	190d	TA	6			57 %

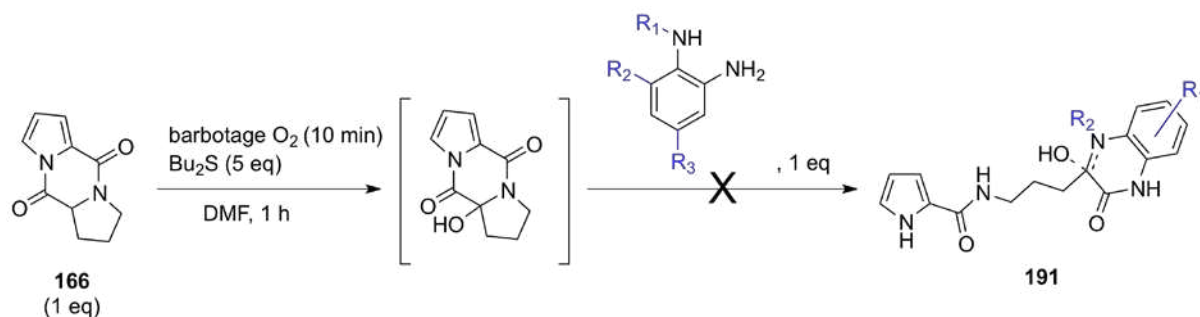
Tableau 9 : Synthèse des produits d'addition 190a-d

Les produits **190a-d** ont été obtenus avec des rendements moyens de 55% environ. La 2-aminobenzylamine possède une fonction aniline peu réactive et ce di-nucléophile ne s'additionne pas en absence de base dans le milieu. De plus, grâce à la présence d'aryles ou d'alkyles, les produits formés sont moins polaires et leur purification plus facile.

Le résultat obtenu pour la formation du produit **190d** est très encourageant.

➤ Étude de la série benzènediamine

Étant donné que l'addition de la 2-aminobenzylamine avait permis l'obtention du mélange de composés désirés avec un rendement moyen, il a été décidé de tester la réactivité des benzènediamines suivantes : la 3-bromo-5-trifluorométhylbenzène-1,2-diamine, la 4-bromo-1,2-diaminobenzène et la *N*-méthyl-1,2-phénylènediamine afin d'obtenir les produits d'addition **191a-c** (Tableau 10). Les benzènediamines ont été ici additionnées dans les conditions douces optimisées d'addition de di-nucléophiles sur la 1,4-dicétopipérazine **166**, Les conditions expérimentales testées précédemment par C. Vergne¹⁶⁷ n'ont pas été appliquées.



Entrée	N°	Conditions	Temps (h)	R ₁ , R ₂ , R ₃	Rendement
1	191a	t-BuOK, 1eq.	1	H, H, Br	0 %
2	191b	150 °C	4	H, CF ₃ , Br	0 %
3	191c	t-BuOK, 1eq.	24	CH ₃ , H, H	0 %

Tableau 10 : Synthèse des produits d'addition **191a-c**

Aucun des produits d'addition n'a été obtenu malgré les différentes conditions testées. On observe soit une dégradation du substrat de départ, dans le cas des essais **191a** et **191b**, soit une absence de réaction dans le cas de **191c**. Ceci est sûrement dû à la faible nucléophilie des fonctions anilines.

L'addition de différents di-nucléophiles sur la dicétopipérazine oxydée a permis d'une part la synthèse d'analogues différemment substitués dans le cadre de la constitution de la chimiothèque, et d'autre part de reconnaître les limites de cette réaction d'addition. En effet, les guanidines et leurs dérivés peu encombrés ainsi que la thiourée sont encore les meilleurs candidats. Les guanidines encombrées, amidines aryliques et 1,2-éthylènediamines, donnent

de leur côté, des résultats satisfaisants. Cependant, les alkylamidines et les benzène-1,2-diamines substituées ne permettent pas d'obtenir, dans les conditions testées, de résultats satisfaisants.

IV.2.3. Modification de la partie pyrrolique : Bromation de composés sélectionnés

Les premiers résultats pharmacologiques (cf. Chap. 5) obtenus sur quelques kinases ont conditionné le choix des molécules à bromer dans le but d'établir des relations structure-activité. De plus, il a été récemment montré que la présence de brome sur le noyau pyrrolique est importante pour obtenir une bonne activité antifouling.¹⁷

Des essais de bromations ont donc été réalisés sur ces six molécules. En effet, l'introduction de brome dans ces molécules très polaires permettrait une augmentation de la lipophilie et de l'encombrement stérique, ce qui pourrait peut-être avoir un effet bénéfique sur leur activité.

➤ Bromation des composés **186** et **187a,c** :

Les produits **186** et **187a,c** ont été dibromés sur le noyau pyrrolique à l'aide de deux équivalents de dibrome. Le DMF est utilisé comme solvant pour sa capacité à dissoudre les substrats (*Tableau 11*).



Entrée	N°	R ₁ , R ₂	Rendement
1	192a	CH ₃ , =S	13 %
2	192b	H, C ₆ H ₄	63 %
3	192c	H, 4-NH ₂ -C ₆ H ₄	82 %

Tableau 11 : Synthèse des produits bromés 192a-c

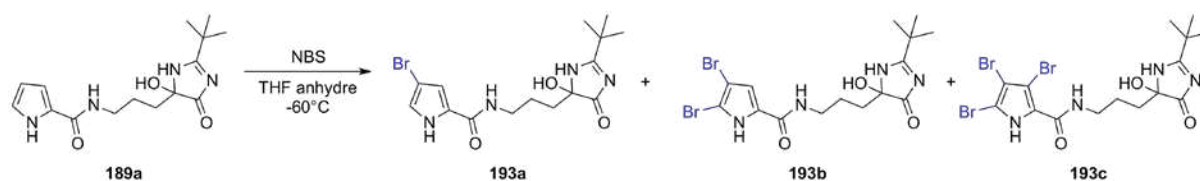
On observe de bons rendements pour les produits **192b-c** et aucune bromation parasite sur les noyaux aromatiques portés par la partie imidazolique. De ceci découle une réactivité plus

forte du pyrrole par rapport aux cycles benzéniques. Le produit **192a** n'a pu être obtenu avec de bons rendements, une dégradation du substrat de départ étant observée lors de la réaction. Peut-être la partie thioimidazolone est-elle plus sensible à l'oxydation dans ces conditions assez dures car le soufre est un élément oxydable.

➤ Bromation des composés **184d**, **188b,e**, et **189a**

Les essais de bromation des composés **184d**, **188b,e** et **189a** ont, tout d'abord, été réalisés en présence de dibrome dans les mêmes conditions que celles indiquées précédemment. Cependant dans ces conditions aucun des composés formés n'a pu être isolé et caractérisé. Il a donc été décidé d'utiliser des conditions plus douces de bromation en utilisant du *N*-bromosuccinimide.¹⁷¹

Les premiers essais réalisés avec le NBS ayant conduit à peu de sélectivité, des conditions optimales ont été mises en place sur 5 mg de substrat **189a** en suivant les différents essais par LC-HRMS (Tableau 12). Le THF a été choisi comme solvant en se basant sur la littérature.¹⁷¹



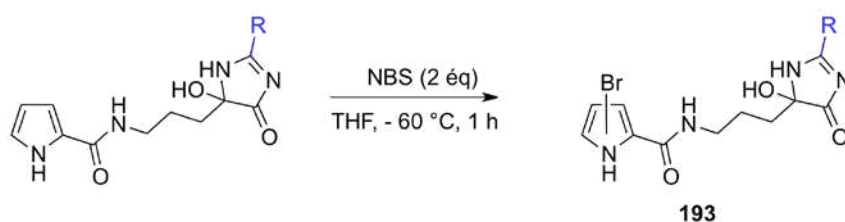
Entrée	Eq NBS	Dilution du milieu	Résultats (intégration du chromatogramme UV)
1	2	C = 0,016 mmol/L	193a : 93%
2	1	C = 0,016 mmol/L	189a : 37% 193a : 10% 193b : 15% 193c : 30%
3	2	C = 0,0016 mmol/L	193b : 33% 193c : 67%
4	2	C = 0,00032 mmol/L	193b : 63% 193c : 32%

Tableau 12 : Différents essais de bromation du composé **189a**

¹⁷¹ Gilow, H. M.; Burton, D. E. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2221-2225.

On remarque qu'un milieu très dilué est nécessaire à une bonne sélectivité entre les composés di et tribromés. Comme expérimentalement il n'était pas possible d'effectuer les réactions avec de si grandes quantités de solvant, il a été décidé d'en utiliser une quantité raisonnable mais d'ajouter une solution de NBS très lentement au milieu réactionnel, pour se placer dans des conditions de forte dilution.

Des essais à plus grande échelle ont donc été réalisés sur les substrats **184d**, **188b,e**, et **189a** en utilisant deux équivalents de NBS additionnés sur 1 h dans le milieu réactionnel à -60 °C (*Tableau 13*).



Entrée	N°	R	Degré de bromation du pyrrole	Rendement
1	193b	C(CH ₃) ₃	Dibromé	0 %
2	193d	3,5-Cl-C ₆ H ₄	Tribromé	traces
3	193e	thiophenyle	Dibromé	7 %
4	193f	2-benzimidazoyle	Tribromé	26 %

Tableau 13 : Synthèse des produits de bromation 193b-f

Malgré la réalisation de la réaction dans les conditions 4 (*Tableau 12*), ni le composé **193b** ni le composé **193c** n'ont pu être isolés. Ceux-ci se sont formés lors de la réaction mais aucune purification sur silice (ni colonne ou plaques préparatives) ou sur phase inverse (HPLC) n'a permis l'isolement des composés désirés. Ces produits sont sûrement instables, car le profil d'HPLC préparative changeait en fonction du temps.

Seules des traces du composé **193d** ont été isolées après purification sur une colonne de silice suivie d'une plaque préparative. Malheureusement, la formation de composé di- et tri-bromés rend le mélange réactionnel difficile à purifier. De plus, les substrats, dont sont issus ces composés, présentaient déjà des tendances à la dégradation sur silice. Le spectre ¹H et la HRMS ont confirmé la structure du composé **193d**.

Pour les mêmes raisons, le composé dibromé **193e** n'a pu être isolé qu'avec un rendement de 7%.

Enfin, le produit tribromé **193f**, produit majoritaire de la réaction, a dû être purifié sur phase inverse par HPLC, la purification sur silice n'ayant pas été fructueuse.

Les tentatives de bromation des premiers composés actifs sur les kinases n'ont pas permis d'obtenir tous les composés désirés. Cependant, les composés **192a-c** et **193e-f** ont été synthétisés, et, malgré leurs rendements modestes, ils ont été testés, afin de comprendre l'effet de deux ou trois bromes sur leur activité inhibitrice de kinases.

IV.2.4. Modulation de la chaîne : les tentatives de déshydratation des dérivés de type dispacamide

Une fois le di-nucléophile additionné, nous avons aussi tenté de modifier la chaîne en effectuant une réaction de déshydratation sur l'alcool tertiaire en position 5. La mise au point de la réaction a été réalisée sur le composé **187a**. Malheureusement de nombreuses conditions de réaction ont été essayées, dont celles utilisées pour la synthèse du dispacamide¹⁶⁰, sans obtenir le produit déshydraté désiré (*Tableau 14*).

Malgré nos efforts, les essais de déshydratation n'ont pas permis d'obtenir le composé **194a** désiré. Le simple chauffage dans un solvant polaire ou dans un acide fort tel que le TFA à différentes températures n'engendre aucune réaction (entrées **1-3**). L'utilisation d'un acide plus fort tel que l'acide méthanesulfonique à TA ne permet pas de réaction. Le chauffage à 80 °C (entrées **4-5**) aboutit à une dégradation du substrat. Ces conditions de réaction, élaborées par N. Travert sont généralement utilisées pour déshydrater les composés de type dispacamide (acide comme solvant) donnent majoritairement le produit déshydraté avec l'acide méthanesulfonique, et le produit *spiro* cyclisé avec l'acide trifluoroacétique (*Schéma 120*).¹⁷² L'utilisation de P₂O₅ en excès avec de la triéthylamine implique directement la dégradation du substrat de départ (entrées **7-8**). De plus l'utilisation d'un faible nombre d'équivalents de P₂O₅ sans triéthylamine ne permet pas de réaction (entrée **6**).¹⁷³

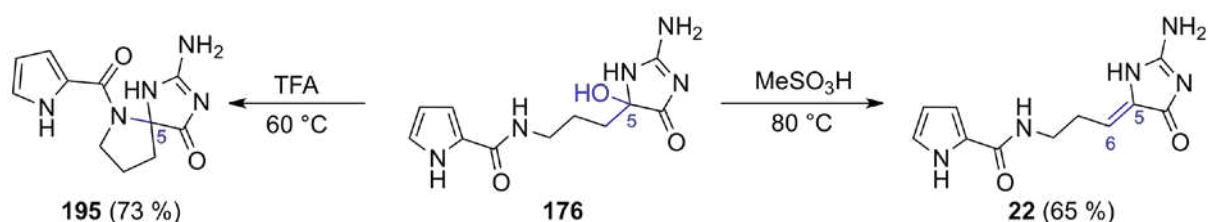


Schéma 120 : Conditions générales de déshydratation et de cyclisation en spiro des dérivés hydroxylés de type dispacamide élaborées par N. Travert

Étant donné l'échec des conditions acides, des essais en conditions plutôt basiques ont été envisagés pour mener à bien à la déshydratation. L'utilisation du chlorure du mésyle, en présence de triéthylamine à différentes températures (- 20 °C et TA) et dans différents solvants (DMF, THF) ne permet aucune réaction ou entraîne la formation d'un mélange complexe à 60 °C dans le DMF (entrée **10-13**). L'utilisation de ce même chlorure de mésyle en présence de *t*-BuOK à température ambiante entraîne la formation d'un mélange complexe de composés impossibles à séparer (entrée **9**) (*Tableau 14*).

L'utilisation de réactifs spécifiques aux réactions de déshydratation tel que le réactif de Burgess (entrée **14**) ne permet pas non plus de réaction. Le réactif de Burgess¹⁷⁴ permet, en règle générale, dans des conditions douces, d'activer spécifiquement les alcools en formant un ester de l'acide méthoxycarbonylsulfamique.

¹⁷² Travert, N. Thèse de docteur en sciences, Paris XI-Orsay, 16 Septembre 2003.

¹⁷³ Sanchez, I.; Pujol, M. D. *Synthesis* **2006**, *11*, 1823-1828.

¹⁷⁴ Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 26-31.

Un second réactif spécifique des déshydratations, le sulfurane de Martin, a été utilisé sans conduire au produit déshydraté désiré (entrée **15**) (Tableau 14). Ce réactif permet une activation de la fonction alcool de telle sorte que l'oxygène de cette fonction devienne part entière du groupement partant Ph_2SO . Appliqué à la déshydratation des alcools tertiaires, le sulfurane de Martins peut impliquer une élimination selon un mécanisme E1 ou E2, alors qu'il est sélectivement E2 pour les alcools secondaires.

Deux autres essais de déshydratation en présence de TFA ont été réalisés sur les composés **186** et **184a** en parallèle avec ceux effectués sur **187a**.

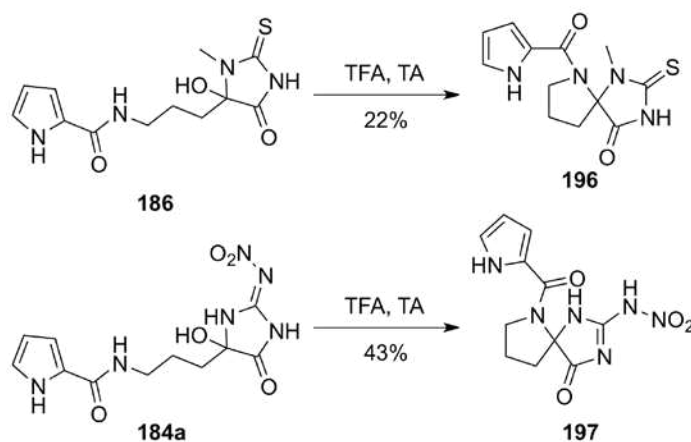


Schéma 121 : Synthèse des composés **196** et **197**

On obtient bien une réaction de la part de ces composés **186** et **184a** pour donner les composés cyclisés *spiro* **196** et **197** correspondants avec des rendements modestes respectifs de 22% pour **196** à cause de problèmes de purification, et de 43% pour **197**.

De ces essais, on peut donc déduire que l'incapacité à obtenir une déshydratation viendrait sûrement du fait de la présence du noyau phenyllimidazolone au lieu du noyau 2-aminoimidazolone présent dans le dispacamide. En effet, il y a élimination quand on est en présence d'un azote ou d'un soufre en position 2' mais on n'observe aucune déshydratation lorsque la position 2' est substituée par un carbone. Des essais sous irradiation micro-onde pourraient être menés afin peut-être d'observer une réactivité différente.

IV.3. Bilan du Chapitre

L'exploitation de la synthèse biomimétique du dispacamide A a permis la synthèse d'une trentaine d'analogues différemment substitués et différemment bromés. Ces analogues, synthétisés pour constituer une chimiothèque, ont été testés sur différentes cibles biologiques, notamment, la lignée de cellules cancéreuse KB et certaines kinases.

De plus, l'exploration de la synthèse du dispacamide A avec des di-nucléophiles variés a permis de mettre en évidence certaines limites de la réaction d'addition notamment lors de l'addition de thioamides, ou de benzylamines substituées. On observe aussi une chimiosélectivité pour les guanidines protégées par Boc, cependant cette chimiosélectivité disparaît lorsque d'autres groupements, tels que les benzyles, sont présents. Enfin, les conditions de l'étape de déshydratation de l'alcool tertiaire en position 5 restent à mettre en place.

CHAPITRE V
RÉSULTAT DES ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES

CHAPITRE V Résultats des évaluations biologiques

L'objectif de la seconde partie de ma thèse étant la constitution d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A, la plupart des composés synthétisés ont été soumis à l'évaluation des activités cytotoxiques sur cellules kB (réalisées à l'ICSN par le Dr. Aubert) et inhibitrices de kinases (réalisée à Roscoff par le Dr. Meijer).

Les produits de la chimiothèque sont présentés dans la *Figure 122*.

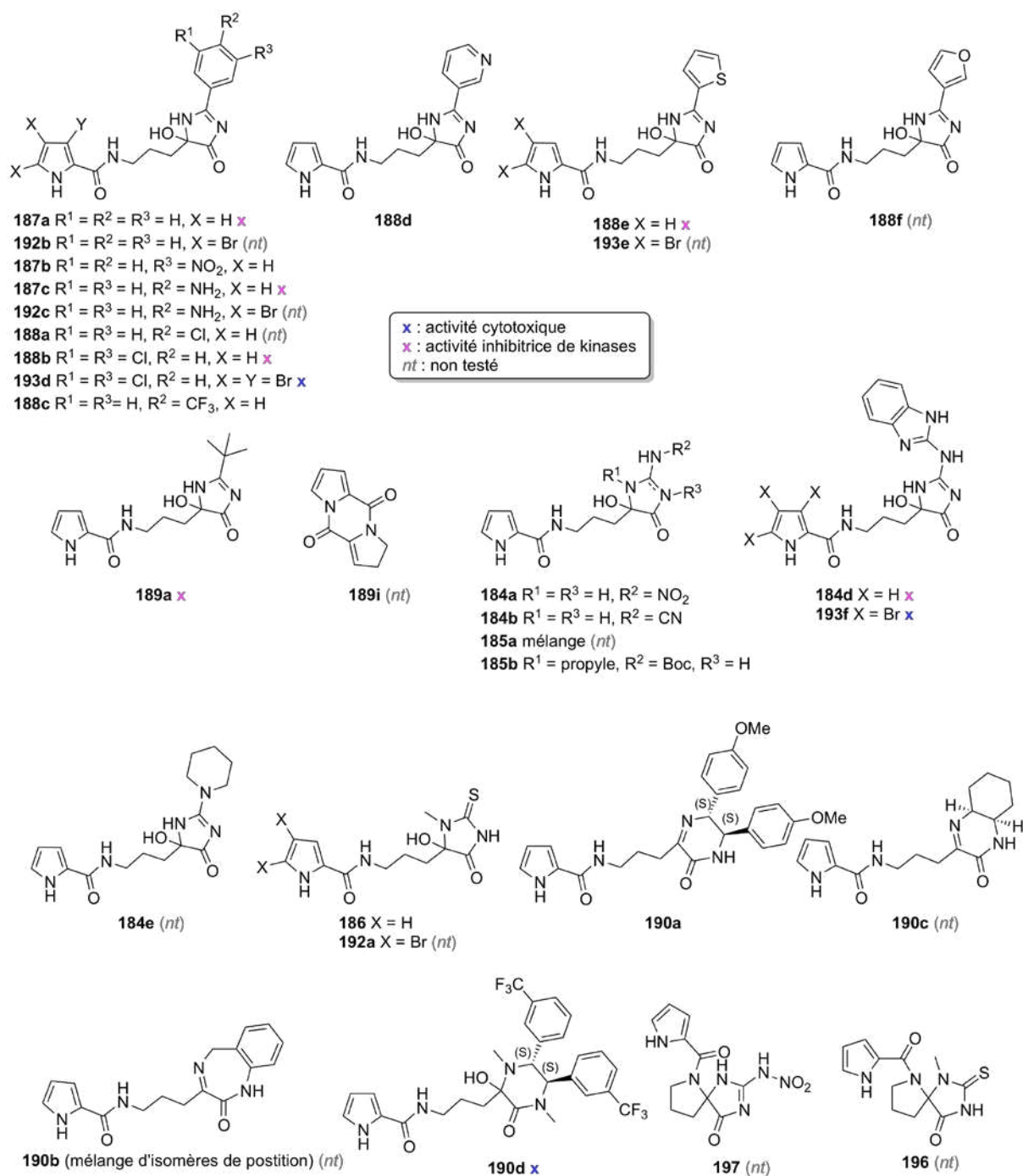


Figure 122 : Chimiothèque de composés synthétisée en vue d'évaluations biologiques

V.1. Résultat de l'évaluation des tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés à l'ICSN par le Dr. Aubert. Les cellules utilisées pour cette étude de cytotoxicité in vitro sont des cellules cancéreuses KB. Le test a été réalisé à une concentration de 10^{-5} M dans le DMSO en triplicat.

Le dispacamide A, testé précédemment notamment par le Dr. Kirti Patel au laboratoire, ne montrait aucune activité cytotoxique.

Parmi tous les composés testés trois de nos composés ont montré une inhibition de la croissance cellulaire à une concentration de 10^{-5} M : **190d** (*Figure 122*) est modérément actif tandis que **193d,f** (*Figure 122*) sont capables de complètement bloquer la prolifération cellulaire. Cependant, testés à 10^{-6} M, ces trois composés perdent toute capacité à inhiber la prolifération cellulaire (*Tableau 15*).

Entrée	N°	% inhibition (10^{-5} M \pm % erreur / 10^{-6} M \pm % erreur)
1	190d	64 \pm 11 / 1 \pm 7
2	193d	100 \pm 1 / 0 \pm 3
3	193f	100 \pm 1 / 0 \pm 13

Tableau 15 : Résultats des tests de cytotoxicité

On remarque ici que ce sont trois grosses molécules de la série, portant des groupements encombrants, dont deux, trois atomes de bromes, qui montrent une activité cytotoxique.

V.2. Résultat de l'évaluation des tests sur les kinases

V.2.1. Rappels sur les kinases

La phosphorylation des protéines est le mécanisme le plus utilisé par la cellule pour moduler l'activité de ses protéines et enzymes. Cette phosphorylation est catalysée par une vaste famille d'enzyme, les protéines kinases.

Ainsi, une grande majorité des pathologies humaines, telles que de nombreux types de cancer ou la maladie neurodégénérative impliquent des anomalies de la phosphorylation souvent associées à des anomalies de régulation de certaines protéines kinases.

Il existe plusieurs familles de protéines kinases. Parmi elles, les CDKs (kinases cyclines dépendantes) attirent un intérêt considérable en raison de leur implication dans de nombreuses maladies telles que les cancers, la polykystose rénale et les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

La kinase DYRK1A est souvent surexprimée lors du développement anormal du cerveau observé pour la trisomie 21, par exemple. DYRK1A semble également très impliquée dans un développement précoce de la maladie d'Alzheimer.¹⁷⁵ Ainsi, l'inhibition conjointe de CDKs, GSK-3, CDK1 et DYRK pourrait constituer un avantage majeur dans le traitement de maladies neurodégénératives.⁹⁹

Le test effectué sur la kinase PfGSK est destiné à identifier de nouveaux composés anti-malaria. En effet, cette kinase est impliquée dans la mise en place des canaux ioniques de *Plasmodium falciparum* dans l'érythrocyte.¹⁷⁶

Enfin, les sérine/thréonine kinases CK2 et PIM-1 sont des suppresseurs d'apoptose et sont surexprimées dans les cellules tumorales, en particulier dans le cancer de la prostate.¹⁷⁷

V.2.2. Évaluation et interprétation

Cette étude a été menée en collaboration avec le Dr. Meijer à Roscoff. Les enzymes étudiés sont les suivants : RnDYRK1A, HsDYRK1a, HsDYRK1B, HsDYRK2, HsDYRK3, CLK1, CLK2, CLK3, CLK4, CDK1, CDK2, CDK5, CDK9, CK1, LmCK1, GSK3, PfGSK3.

¹⁷⁵ Ferrer, I.; Barrachina, M.; Puig, B.; Martinez de Lagran, M.; Marti, E.; Avila, J.; Dierssen, M. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 392-400.

¹⁷⁶ Droucheau, E.; Primot, A.; Thomas, V.; Mattei, D.; Knockaert, M.; Richardson, C.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Jafarshad, A.; Baratte, B.; Kunick, C.; Parzy, D.; Pearl, L.; Doerig, C.; Meijer, L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2004**, *1697*, 181-196.

¹⁷⁷ Baunbaek, D.; Trinkler, N.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Ploypradith, P.; Rucirawat, S.; Ishibashi, F.; Iwao, M.; Meijer, L. *Marine Drugs* **2008**, *6*, 514-527

Seulement une partie des produits synthétisés ont été testés à ce jour, les tests de la seconde partie de la chimiothèque étant en cours.

Dans le **Tableau 16** sont présentées les activités remarquables des produits testés sur ces kinases. Sur 13 produits testés (**184a,b,d, 186, 187a-c, 188b,c,d,e, 189a, 190a**) 6 ont révélés avoir une activité intéressante. Cependant, testé précédemment sur ces mêmes cibles, le dispacamide A s'est révélé inactif.¹⁷⁸

Entrée	N°	Kinase et Activité résiduelle (%)
1	187a	CLK1 28 %
2	187c	CK1 40 %
3	188b	CLK1 29 %
4	188^e	CDK5 30 %
5	189a	CLK4 21 %
6	184d	CK1 34 %

Tableau 16 : Pourcentage d'activité résiduelle donné pour une concentration fixe de 10 μ M pour les produits d'additions les plus actifs sur plusieurs kinases

Ces premiers résultats montrent une bonne activité pour les produits majoritairement issus d'une amidine aromatique ; c'est le cas des produits **187a,c, 188b,e** mais aussi ceux substitués provenant d'une guanidine portant un groupement aromatique, produit **184d**. Les inhibiteurs de kinases se lient principalement à la poche de l'ATP⁹⁹, peut-être l'encombrement d'un noyau aromatique ou d'un groupement tertio-butyle (pour **189a**) pourrait permettre de remplir cette poche et donc inhiber efficacement la kinase. De plus, il est à noter que ces six molécules sont spécifiques des kinases mentionnées c-à-d qu'elles montrent peu ou pas d'activité sur toutes les autres kinases testées.

V.3. Conclusion

L'ensemble des molécules synthétisées ne montre pratiquement pas d'activité sur la prolifération des cellules KB.

¹⁷⁸ Résultats non publiés du laboratoire

Les premiers résultats sur l'activité d'inhibition des kinases ont donné des résultats encourageants. En effet, certains composés inhibent certaines kinases de façon sélective. Cependant il reste à étudier l'effet de la présence de brome sur le squelette des molécules actives, à savoir si l'activité s'en trouve améliorée ou non.

Enfin, de nombreux tests sont encore à réaliser, notamment des tests antifouling (car de nombreux composés de type oroïdine y ont montré de très bonnes activités¹⁷). Il serait aussi intéressant d'étendre la prospection au niveau de l'activité cytotoxique en testant la chimiothèque sur d'autres souches de cellules cancéreuses, mais aussi ouvrir aux activités antibactériennes, les P-2-AIs naturels présentant souvent de bonnes activités antibactériennes (cf. Chap2).

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les objectifs de ce travail de thèse étaient doubles :

- Étudier chimiquement une éponge sélectionnée du genre *Axinella* afin d'en isoler les molécules d'intérêt, dans notre cas les P-2-AIs, afin de mieux connaître la diversité de cette famille et surtout, de tenter d'isoler certains intermédiaires utiles à la meilleure compréhension de la biogenèse de ces composés dans les éponges.
- Exploiter une synthèse biomimétique, mise au point au laboratoire, afin de synthétiser une chimiothèque d'analogues du produit naturel dispacamide A, analogues qui pourront être testés sur différentes cibles biologiques.

L'étude chimique de l'éponge *Axinella donnani* (1^{er} lot) a permis l'isolement et l'identification de 27 composés ; parmi eux, sept P-2-AIs dimères nouveaux dont la structure de quatre d'entre eux a pu être déterminée sans ambiguïté, mais aussi un nouveau composé de la famille des manzacidines.

La particularité des nouveaux dimères dont la stéréochimie mérite confirmation est qu'ils sont des stéréoisomères de la massadine. Cependant, jusqu'ici, encore aucun stéréoisomère naturel de la massadine n'a été isolé. Ceci ouvre donc la voie à une meilleure connaissance de la variété stéréochimique de ces molécules encore inconnues jusqu'alors.

Parmi les nouveaux P-2-AIs dimères qui ont été isolés, et dont la structure a été déterminée, les donnazoles A et B ont des squelettes non originaux mais ils pourraient être d'importance pour l'hypothèse de biogenèse élaborée en 2001 au laboratoire. Les donnazoles C et D présentent des structures plus originales, notamment celle du donnazole C qui comporte un noyau tétrahydrofurane et une jonction de cycle 5-6 *cis* très rarement rencontrés jusque-là dans la famille des P-2-AIs. Pour ces composés, des études de dichroïsme circulaire ont aussi été réalisées afin de déterminer leur stéréochimie absolue. Enfin, pour les dimères nouveaux isolés, des hypothèses de biogenèse reposant sur la tautomérie de l'oroïdine ont été proposées. Enfin, l'étude chimique partielle du second batch d'*Axinella donnani* (2nd lot) a permis l'isolement de 6 composés, dont 4 P-2-AIs déjà connus ainsi qu'un monomère dérivé de 3,5-dibromotyrosine connu (l'aplysine) et un dimère d'aplysine symétrique encore non reporté à ce jour, le donnazole G.

L'exploitation de la synthèse biomimétique du dispacamide A, mise au point au laboratoire, a permis la synthèse de 29 analogues différemment substitués sur la partie imidazolone et différemment bromés sur la partie pyrrolique. Ces analogues constituent une chimiothèque et peuvent être testés sur différentes cibles biologiques (cellules cancéreuses, antifouling, kinases).

De plus, l'exploration de cette synthèse biomimétique a permis de mettre en évidence certaines limites de la réaction d'addition de bisnucléophiles sur la 4-dicétopipérazine pyrrole-proline oxydée, dépendant notamment de la nature du bisnucléophile additionné.

La combinaison de l'étude chimique d'éponges marines et de la synthèse biomimétique a donc montré tout son intérêt pour l'étude de la famille des P-2-AIs. Elle permet l'isolement d'intermédiaires utiles à l'élaboration de synthèses biomimétiques, dans le but d'élargir nos connaissances sur le plan synthétique mais aussi de permettre la synthèse efficace d'analogues actifs dérivés de produits naturels.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

EXPERIMENTAL SECTION : GENERAL TECHNIQUES

Solvents

Common solvents (MeOH, CH₂Cl₂, n-BuOH, MeCN) used for purification were obtained from commercial suppliers and used without further purification.

Spectroscopic grades were used for spectroscopic experiments.

Chromatography

Purifications were monitored by thin layer chromatography with silica gel 60-F₂₅₄ (Merck) and reverse phase RP-18 F_{254s} (Merck) plates. Compounds were visualized under UV lamp (λ = 254 and 365 nm) and were also detected by spraying with a variety of chemical reagents: vanillin/sulphuric acid and heat, ninhydrin.

Preparative thin layer chromatography was performed on TLC plates with silica gel 60-F₂₅₄ (layer thickness 0.5mm and 2mm, Merck).

In this study, three different types of columns were used:

Normal Phase Column Chromatography:

Silica-gel with a particle size of 35-70 μ m or 70-200 μ m (SDS 60 ACC).

Prepacked Versapak column was used (11 g, 23 g, 48 g ou 96 g) on a Supelco VersaFlash system with an ACCU Scilog pump and a Foxy Jr. fraction collector.

Reversed Phase Column Chromatography:

Prepacked Versapak column was used (48 g or 96 g).

Gel Permeation Chromatography on Sephadex LH-20 material:

The in-bulk gel material was suspended in an appropriate solvent and packed into a glass column.

HPLC equipment

Analytical HPLC :

Pump: Alliance Waters 2695

Detectors: PhotoDiode Array Waters 996, DEDL Waters 2420, Mass spectrometer Waters Micromass ZQ 2000

HPLC programm: Empower 2

Columns: Thermo Hypercarb (4.6 x 100 mm, 5 μ), Waters XBridge RP₁₈ (3.0 x 150 mm, 5 μ) and Waters Sunfire (4.6 x 100 mm, 5 μ).

Preparative HPCL (Waters 600 System Controller):

Pump: Waters 600,

Autosampler: Sample Manager Waters 2700

Detector: PhotoDiode Array Waters 2996

HPLC programm: Masslynx Columns: Waters XBridge Prep Shield RP₁₈ (19 x 100 mm, 5 μ) and Waters Sunfire Prep RP₁₈ (19 x 150 mm, 5 μ).

Physical and spectrometric data

- Molecular weights are in g/mol.
- Optical rotations were conducted on Jasco P-1010 Polarimeter at indicated temperatures and concentrations using the indicated solvents.
- Infrared spectra were recorded with a Perkin Elmer Spectrometer BX FT-IR apparatus directly on the Dura Sample IR II apparatus (SensIR Technologies).
- Mass spectra were recorded on the following spectrometers :
Electron Spray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) was measured on a Thermo Finnigan Navigator LC/MS mass spectrometer.
Electronic Impact (EI) : Thermo Finnigan Automass spectrometer
High Resolution Electrospray (HRMS): LCT Micromass spectrometer
LC/MSⁿ ESI: LTQ-orbitrap, Thermo Fisher.
- Proton (¹H) and carbon (¹³C) NMR spectra were recorded on Bruker Ultrashield Advance 300 MHz, Advance 500 MHz or Advance 600 MHz spectrometers.

Deuterated solvents (DMSO-*d*₆, CDCl₃, CD₃OD or DMF-*d*₇) were used for NMR measurement. The spectra were processed using 1D NMR Notebook or 2D NMR Notebook software. They were calibrated using solvent signals of proton and carbon at the following values:

Solvent	δ_H	δ_C
CD ₃ OD	3.30	49.0
DMSO- <i>d</i> ₆	2.49	39.5
CDCl ₃	7.24	77.0
DMF- <i>d</i> ₇	2.74	30.1

The observed chemical shift (δ) values were given in ppm and the coupling constants (J) in Hz. Following abbreviations are used: s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (doublet of doublet).

Remarks

The used nomenclature is consistent with IUPAC rules for almost all described compounds. However, for practical reasons, this numbering is not always respected.

Before purifications on preparative or semi-preparative HPLC, samples were filtered with Whatman system (PTFE syringeless filter, 0.45 μm).

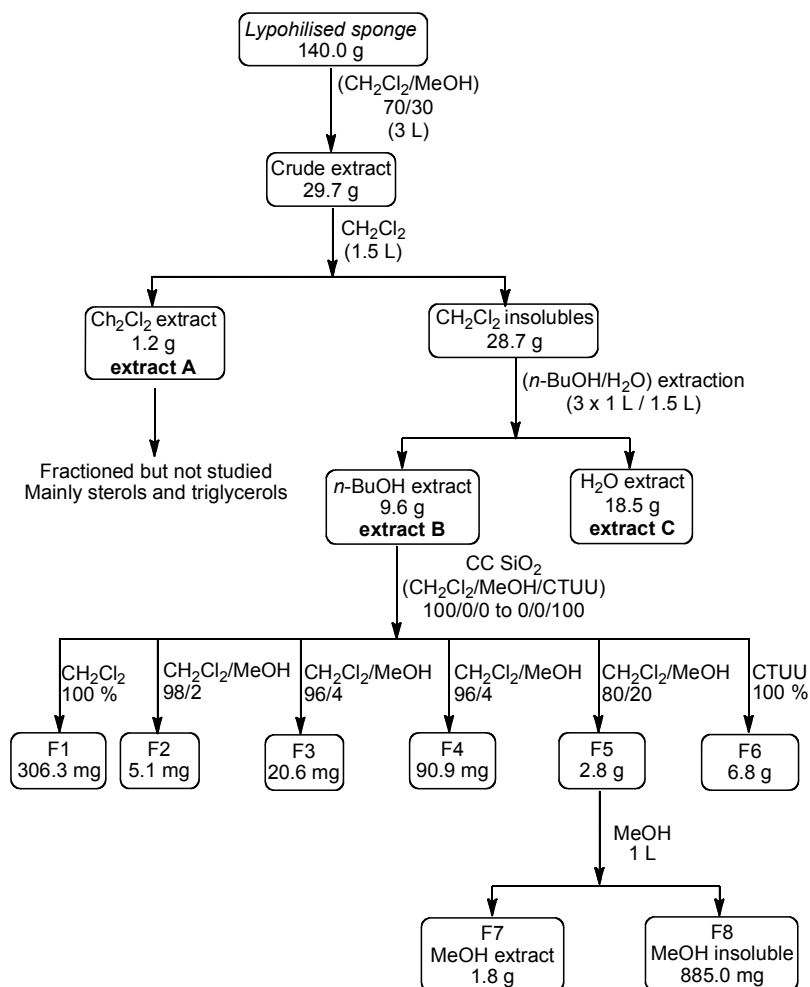
For known natural compounds; the ^1H NMR was compared with literature.

The spectral data (^1H , ^{13}C NMR) for new compounds are present in this experimental section.

EXPERIMENTAL SECTION : EXTRACTION

6. Massadine Chloride.....	184
77. Massadine.....	185
114. N-methyl-debromomanzacidin C.....	186
117. Donnazole A.....	187
118. Donnazole B.....	190
120. Donnazole C.....	194
121. Donnazole D.....	197
122. Donnazole E (proposed stereochemistry).....	200
123. Donnazole F (proposed stereochemistry).....	202
130. Donnazole G.....	204

Extraction, Fractionation and metabolites isolation of the sponge *Axinella donnani* (batch 1)



Scheme 1: Extraction and fractionation of *Axinella donnani* (batch 1)

The freeze-dried sponge samples of *A. donnani* (140.0 g) were extracted at room temperature exhaustively in a 7:3 mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. The red colour crude extract of *A. Donnani* (29.8 g) was triturated with CH_2Cl_2 to give 1.2 g after drying under reduced pressure. The insoluble part (28.8 g) was partitioned between *n*-BuOH (3 x 1 L) and H_2O (1.5 L). The resulting *n*-BuOH fraction (9.6 g) was purified by normal phase Silica-gel chromatography (35-70 μm) using the gradient from 1:0 to a 8:2 mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10 L). The column was finally washed with a mixture of Acetone/Ethyl/Acetate/ H_2O /formic acid : 5/3/1/1 (2L) to afford 6 fractions (F1 to F6) (Scheme 1 and Figure 1).

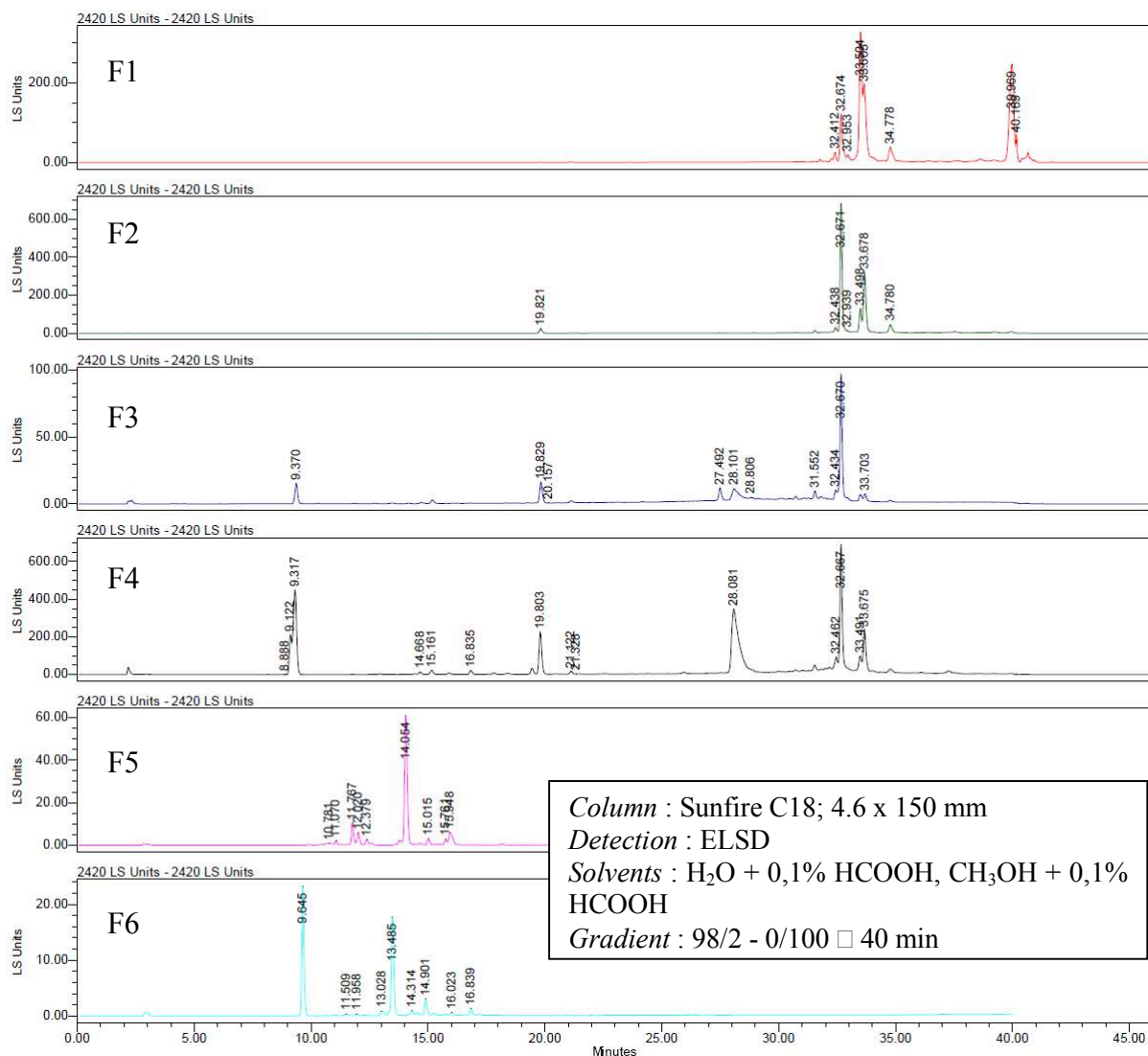
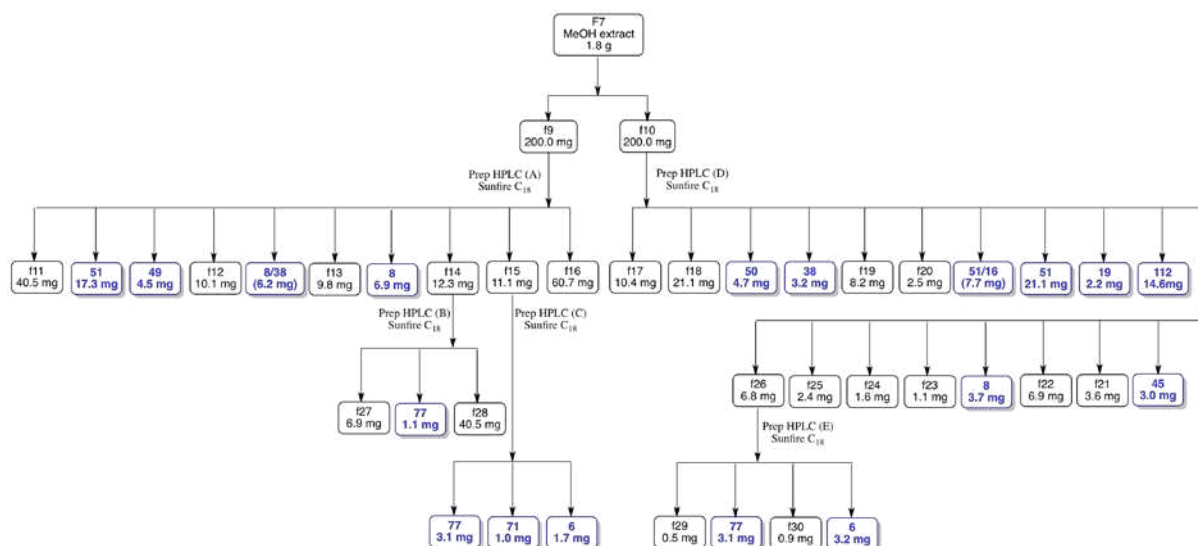


Figure 1: HPLC-ELSD chromatograms for fractions F1-F6

F5 was then partitioned with MeOH to give F7 (the soluble part) and F8 (the insoluble part) (Scheme 1). F7 was then equally divided into sub-fractions f9 (200.0 mg) and f10 (200.0 mg) (Scheme 2).



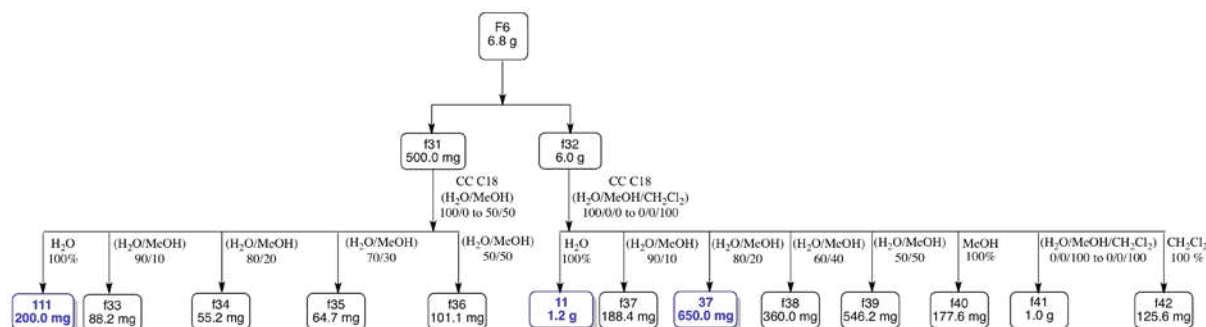
Scheme 2: Fractionation of the methanolic fraction F7

After determining the presence of interesting molecules in the sub-fraction f9, sub-fraction f10 was worked to isolate further more interesting compounds.

Fraction f9 was purified by preparative reversed phase HPLC (A)* (Sunfire C₁₈) to afford 4 compounds: dibromoisophakellin (**51**) ($t_R = 4.36$ min, 17.3 mg, 0.01% yield), dibromophakellin (**49**) ($t_R = 5.11$ min, 4.5 mg, 0.003% yield), oroidine in a mixture with (*E*)-debromohymenialdisin (**8/38**) ($t_R = 6.07$ min, 6.2 mg, 0.004% yield) and oroidin (**8**) ($t_R = 14.10$ min, 6.9 mg, 0.005% yield) as well as fractions f11-16. Massadine (**77**) ($t_R = 4.43$ min, 1.1 mg, 0.0008 % yield) was purified from fraction f14 (12.3 mg) using analytical HPLC (B)* (Sunfire C₁₈) (Scheme 2). Analytical HPLC (C)* purification of fraction f15 (11.1 mg) afforded massadine (**77**) ($t_R = 5.82$ min, 3.1 mg, 0.002% yield), ageliferin (**71**) ($t_R = 10.27$ min, 1.0 mg, 0.0007 % yield) and massadine chloride (**6**) ($t_R = 12.62$ min, 1.7 mg, 0.001% yield) (Scheme 2).

Fraction f10 was purified by preparative reversed phase HPLC (D)* (Sunfire C₁₈) to yield 6 compounds: monobromophakellin (**50**) ($t_R = 8.78$ min, 4.7 mg, 0.003% yield), (*E*)-debromohymenialdisin (**38**) ($t_R = 9.56$ min, 3.2 mg, 0.002% yield), dibromoisophakellin and hymenidin (**51/16**) ($t_R = 14.83$ min, 7.7 mg, 0.006% yield), dibromoisophakellin (**51**) ($t_R = 16.60$ min, 21.1 mg, 0.012% yield), keramadine (**19**) ($t_R = 19.60$ min, 2.2 mg, 0.001% yield), hymenin (**112**) ($t_R = 21.06$ min, 4.6 mg, 0.003% yield), odiline (**45**) ($t_R = 23.23$ min, 3 mg, 0.002% yield) and oroidin (**8**) ($t_R = 25.57$ min, 3.7 mg, 0.021% yield) as well as fractions f17-26. Massadine (**77**) ($t_R = 22.02$ min, 4.2 mg, 0.003% yield) and massadine chloride (**6**) ($t_R =$

27.98 min, 3.2 mg, 0.0008% yield) were purified from fraction f26 (12.3 mg) using preparative HPLC (E)* (Sunfire C₁₈) (Scheme 2).

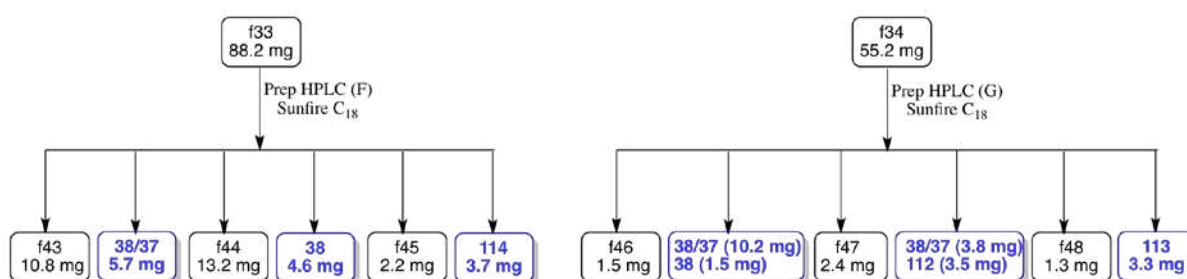


Scheme 3: Fractionation of F6

F6 was divided into two sub-fractions f6-1 (500 mg) and f6-2 (6 g). After determining the presence of interesting molecules in the sub-fraction f6-1, sub-fraction f6-2 was purified to isolate further more interesting compounds.

F6-1 was subjected to C18 chromatography using a gradient from H₂O/MeOH : 100/0 to 50/50 to afford taurine (**111**) (200.0 mg, 0.143% yield) and 4 other fractions (f33 to f36).

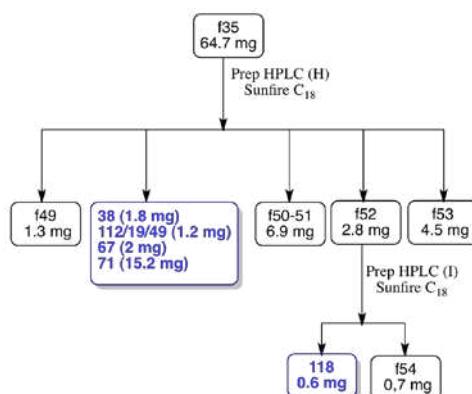
Fraction f6-2 was also subjected to C18 chromatography with a gradient of H₂O/MeOH/CH₂Cl₂ : 100/0/0 to 0/0/100 to afford taurine (**111**) (1.2 g, 0.857% yield), (*Z*)-débromohymenialdisin (**37**) (650.0 mg, 0.464% yield) and 6 other fractions (f37, f38 to f42) (Scheme 3).



Scheme 4: Fractionation of f33 and f34

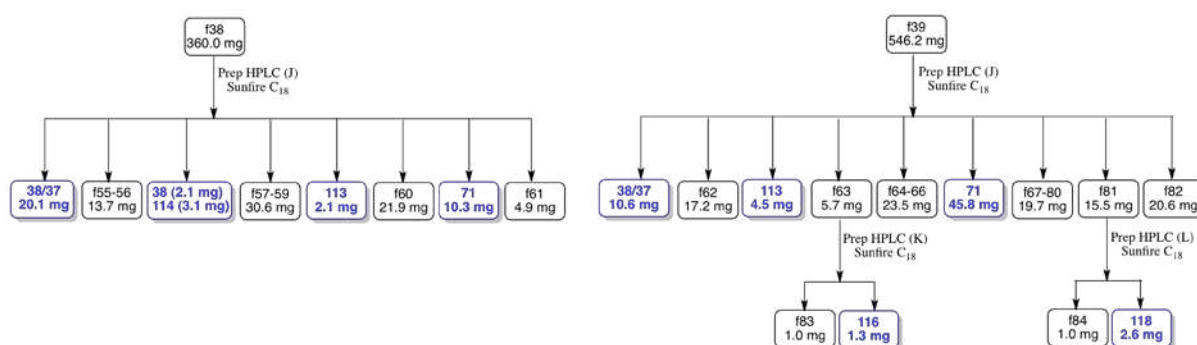
Fraction f33 was purified by preparative reversed phase HPLC (F)* (Sunfire C₁₈) to afford 3 compounds: (*E/Z*)-debromohymenialdisin (**38/37**) (*t_R* = 9.58 min, 5.7 mg, 0.004% yield), (*E*)-debromohymenialdisine (**38**) (*t_R* = 13.28 min, 4.6 mg, 0.003% yield) and manzacidin E (**114**) (*t_R* = 17.97 min, 3.7 mg, 0.002% yield).

Fraction f34 was purified by preparative reversed phase HPLC (G)* (Sunfire C₁₈) to yield 4 compounds: (*E/Z*)-debromohymenialdisine (**38/37**) ($t_R = 7.75$ and 14.59 min, 14.0 mg, 0.010% yield), (*E*)-debromohymenialdisine (**38**) ($t_R = 8.94$ min, 1.5 mg, 0.0001% yield), hymenine (**112**) ($t_R = 17.48$ min, 3.5 mg, 0.002% yield) and *N*-methylmanzacidin C (**113**) ($t_R = 23.94$ min, 3.3 mg, 0.002% yield) (Scheme 4).



Scheme 5: Fractionation of f35

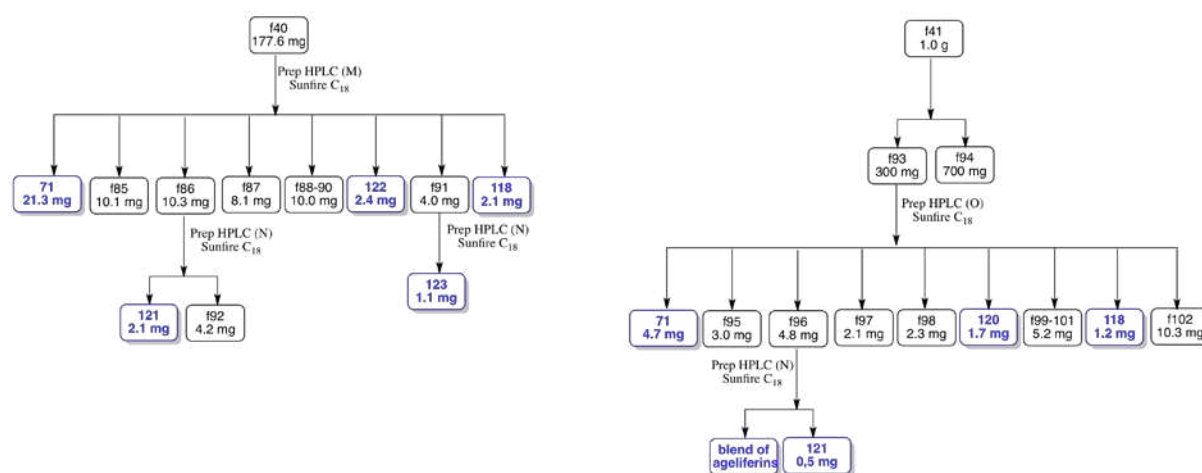
Fraction f35 was purified by preparative reversed phase HPLC (H)* (Sunfire C₁₈) to yield 6 compounds: (*E*)-debromohymenialdisin (**38**) ($t_R = 5.75$ min, 1.8 mg, 0.001% yield), hymenin, keramadine and dibromophakellin (**112/19/49**) ($t_R = 10.51$ min, 1.2 mg, 0.0008% yield), sceptrin (**67**) ($t_R = 13.10$ min, 2 mg, 0.001% yield) and ageliferin (**71**) ($t_R = 14.50$ min, 15.2 mg, 0.01% yield) as well as fractions f49-53. Donnazole B (**118**) ($t_R = 13.22$ min, 1.1 mg, 0.0008% yield) was purified from fraction f52 (2.8 mg) using preparative HPLC (I)* (Sunfire C₁₈).



Scheme 7: Fractionation of f38 and f39

Fraction f38 was purified by preparative reversed phase HPLC (J)* (Sunfire C₁₈) to yield 6 compounds: (*E/Z*)-debromohymenialdisine (**38/37**) ($t_R = 11.49$ min, 20.1 mg, 0.01 % yield), (*E*)-debromohymenialdisin (**38**) ($t_R = 12.56$ min, 2.1 mg, 0.001 % yield), manzacidin E (**114**) ($t_R = 13.48$ min, 3.1 mg, 0.002 % yield), *N*-methylmanzacidin C (**113**) ($t_R = 15.94$ min, 2.1 mg, 0.001 % yield) and ageliferin (**71**) ($t_R = 20.20$ min, 10.3 mg, 0.007 % yield).

Fraction f39 was purified by preparative reversed phase HPLC (J)* (Sunfire C₁₈) to yield 3 compounds: (*E/Z*)-debromohymenialdisin (**38/37**) ($t_R = 11.36$ min, 10.6 mg, 0.01 % yield), *N*-methylmanzacidin C (**113**) ($t_R = 15.83$ min, 4.5 mg, 0.003% yield) and ageliferin (**71**) ($t_R = 19.83$ min, 45.8 mg, 0.03% yield) as well as fractions f62-82. stylissazole D (**116**) ($t_R = 11.10$ min, 1.3 mg, 0.0009% yield) was purified from fraction f63 (5.7 mg) using analytical HPLC (K)* (Sunfire C₁₈). Donnazole B (**118**) ($t_R = 27.55$ min, 2.6 mg, 0.0009% yield) were purified from fraction f81 (15.5 mg) using analytical HPLC (L)* (Sunfire C₁₈).

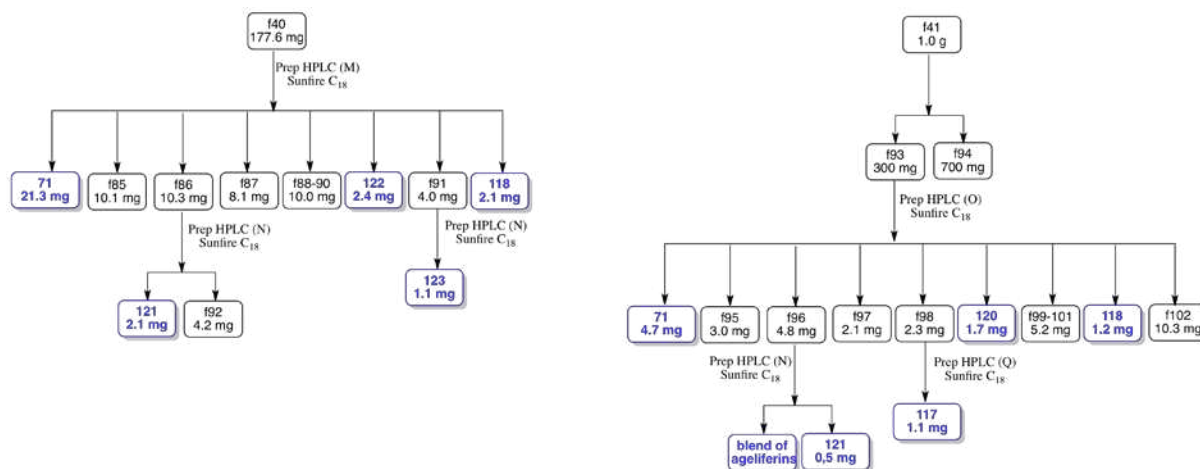


Scheme 8: Fractionation of f40 and f41

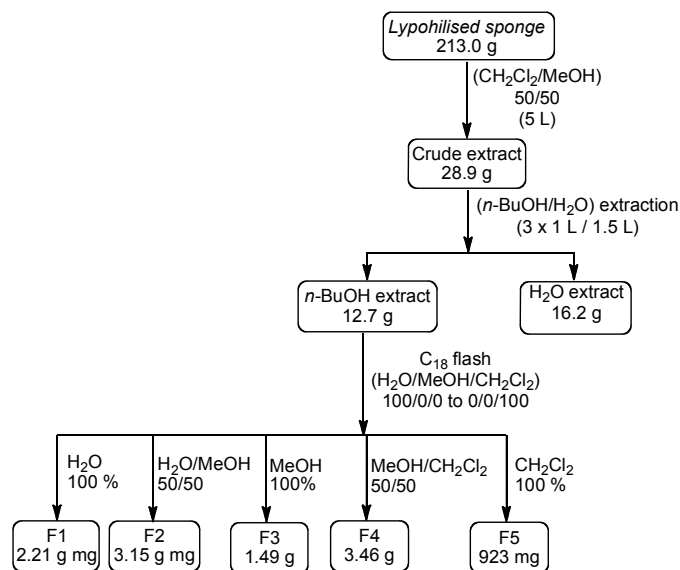
f40 was purified by preparative reversed phase HPLC (M)* (Sunfire C₁₈) to yield 3 compounds: ageliferin (**71**) ($t_R = 13.84$ min, 21.3 mg, 0.01% yield), donnazole E (**122**) ($t_R = 23.40$ min, 2.4 mg, 0.002% yield) and donnazole B (**118**) ($t_R = 26.66$ min, 2.1 mg, 0.002% yield) as well as fractions f85-91. Donnazole D (**121**) ($t_R = 20.99$ min, 2.1 mg, 0.002% yield) was purified from fraction f86 (10.3 mg) using analytical HPLC (N)*. Donnazole F (**123**) was purified from fraction f91 (4.0 mg) using analytical HPLC (N)*.

Fraction f93 was purified by preparative reversed phase HPLC (O)* (Sunfire C₁₈) to yield 3 compounds: ageliferin (**71**) ($t_R = 14.27$ min, 4.7 mg, 0.003% yield), donnazole C (**120**) ($t_R = 23.89$ min, 1.7 mg, 0.001% yield) and donnazole B (**118**) ($t_R = 27.00$ min, 1.2 mg, 0.001% yield) as well as fractions f95-102. Donnazole D (**121**) ($t_R = 21.02$ min, 0,5 mg, 0.0003%

yield) was purified from fraction f96 (4.8 mg) using analytical HPLC (N)*. Donnazole A (t_R = 18.72 min, 1.1 mg, 0.001% yield) (**117**) was purified from fraction f98 (2.3 mg) using analytical HPLC (Q)*.



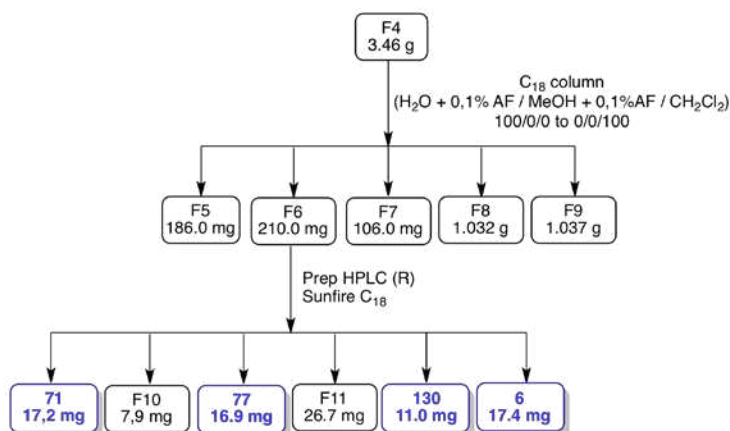
Extraction, Fractionation and metabolites isolation of the sponge *Axinella donnani* (batch 2)



Scheme 9: Extraction and fractionation of *Axinella donnani* (batch 2)

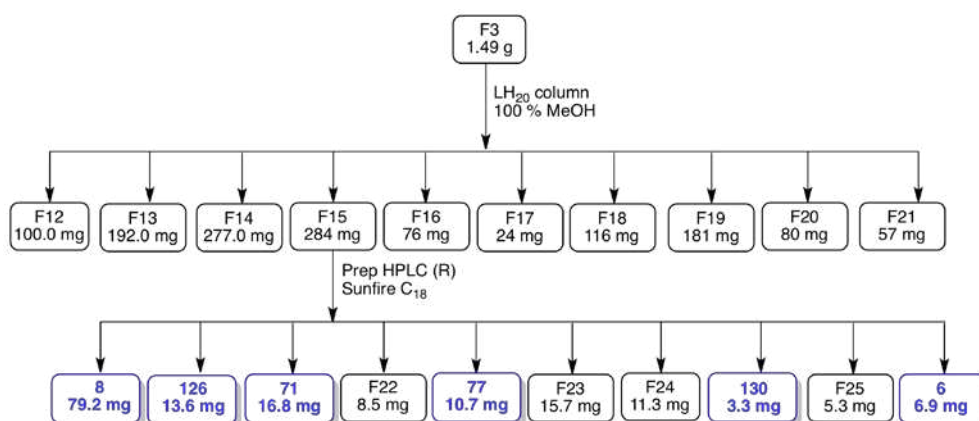
The freeze-dried sponge samples of *A. donnani* (213.0 g) were extracted at room temperature exhaustively in a 5:5 mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. The red colour crude extract of *A. Donnani* (28.9 g) was-partitioned between *n*-BuOH (3 x 1 L) and H_2O (1.5 L). The resulting *n*-BuOH fraction (12.7 g) was purified by reversed phase Silica-gel chromatography (35-70 μm) using

the gradient from 1:0:0 to a 0:0:1 mixture of H₂O/MeOH/CH₂Cl₂ (10 L) to afford 5 fractions (F1 to F5) (Figure 1).



Scheme 10: Fractionation of F4

F4 was subjected to C18 chromatography using a gradient from H₂O + 0.1% AF / MeOH + 0.1% AF / CH₂Cl₂ : 100/0/0 to 0/0/100 to afford fractions F5 to F9. F6 was then purified by preparative reversed phase HPLC (R)* (Sunfire C₁₈) to yield 3 compounds: ageliferin (**71**) (t_R = 24.82 min, 17.2 mg, 0.008% yield), massadine (**77**) (t_R = 28.30 min, 16.9 mg, 0.008% yield), donnazole G (**130**) (t_R = 30.27 min, 11.0 mg, 0.005% yield), massadine chloride (**6**) (t_R = 31.02 min, 17.4 mg, 0.008% yield) as well as fractions F10 and F11.



Scheme 11: Fractionation of F3

F3 was subjected to LH20 column using methanol to afford fractions F12-21. F15 was then purified by preparative reversed phase HPLC (R)* (Sunfire C₁₈) to yield 6 compounds: oroidin (**8**) (t_R = 21.87 min, 79.2 mg, 0.03% yield), aplysinamisin-1 (**126**) (t_R = 23.02 min,

13.6 mg, 0.006% yield), ageliferin (**71**) ($t_R = 24.22$ min, 16.8 mg, 0.008% yield), massadine (**77**) ($t_R = 27.72$ min, 10.7 mg, 0.005% yield), donnazole G (**130**) ($t_R = 30.13$ min, 3.3 mg, 0.002% yield) and massadine chloride (**6**) ($t_R = 30.62$ min, 6.9 mg, 0.003% yield) as well as fractions F22-25.

HPLC (A)	HPLC (B)	HPLC (C)	HPLC (D)																																																															
Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 4.6 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 4.6 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm																																																															
Flow: 26 mL/min	Flow: 1 mL/min	Flow: 1 mL/min	Flow: 17 mL/min																																																															
Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm																																																															
A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)																																																															
Gradient run	Gradient run	Gradient run	Gradient run																																																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>11</td><td>87</td><td>13</td></tr> <tr><td>17</td><td>75</td><td>25</td></tr> <tr><td>21</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>22</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>27</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	98	2	11	87	13	17	75	25	21	60	40	22	0	100	27	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>20</td><td>30</td><td>70</td></tr> <tr><td>21</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>27</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	80	20	20	30	70	21	0	100	27	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>30</td><td>60</td><td>40</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	60	40	30	60	40	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>10</td><td>85</td><td>15</td></tr> <tr><td>15</td><td>85</td><td>15</td></tr> <tr><td>36</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr><td>46</td><td>55</td><td>45</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	98	2	10	85	15	15	85	15	36	55	45	46	55	45
Time (min)	A	B																																																																
0	98	2																																																																
11	87	13																																																																
17	75	25																																																																
21	60	40																																																																
22	0	100																																																																
27	0	100																																																																
Time (min)	A	B																																																																
0	80	20																																																																
20	30	70																																																																
21	0	100																																																																
27	0	100																																																																
Time (min)	A	B																																																																
0	60	40																																																																
30	60	40																																																																
Time (min)	A	B																																																																
0	98	2																																																																
10	85	15																																																																
15	85	15																																																																
36	55	45																																																																
46	55	45																																																																

HPLC (E)	HPLC (F)	HPLC (G)	HPLC (H)																																																															
Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm																																																															
Flow: 17 mL/min	Flow: 17 mL/min	Flow: 17 mL/min	Flow: 17 mL/min																																																															
Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm																																																															
A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)																																																															
Gradient run	Gradient run	Gradient run	Gradient run																																																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>70</td><td>30</td></tr> <tr><td>25</td><td>45</td><td>55</td></tr> <tr><td>40</td><td>15</td><td>85</td></tr> <tr><td>41</td><td>30</td><td>70</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	70	30	25	45	55	40	15	85	41	30	70	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>5</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>20</td><td>70</td><td>30</td></tr> <tr><td>30</td><td>70</td><td>30</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	95	5	5	95	5	20	70	30	30	70	30	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>6</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>20</td><td>70</td><td>30</td></tr> <tr><td>25</td><td>50</td><td>50</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	98	2	6	90	10	20	70	30	25	50	50	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>5</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>30</td><td>30</td><td>70</td></tr> <tr><td>31</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>41</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	95	5	5	80	20	30	30	70	31	0	100	41	0	100
Time (min)	A	B																																																																
0	70	30																																																																
25	45	55																																																																
40	15	85																																																																
41	30	70																																																																
Time (min)	A	B																																																																
0	95	5																																																																
5	95	5																																																																
20	70	30																																																																
30	70	30																																																																
Time (min)	A	B																																																																
0	98	2																																																																
6	90	10																																																																
20	70	30																																																																
25	50	50																																																																
Time (min)	A	B																																																																
0	95	5																																																																
5	80	20																																																																
30	30	70																																																																
31	0	100																																																																
41	0	100																																																																

HPLC (I)	HPLC (J)	HPLC (K)	HPLC (L)																																																			
Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 4.6 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 4.6 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 4.6 x 150 mm																																																			
Flow: 1 mL/min	Flow: 17 mL/min	Flow: 1 mL/min	Flow: 1 mL/min																																																			
Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm																																																			
A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % TFA (v/v) B = MeOH with 0.1 % TFA (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)																																																			
Gradient run	Gradient run	Gradient run	Gradient run																																																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>45</td><td>55</td></tr> <tr><td>30</td><td>45</td><td>55</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	45	55	30	45	55	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>5</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>15</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>20</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>40</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>41</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	98	2	5	98	2	15	50	50	20	50	50	40	20	80	41	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>85</td><td>25</td></tr> <tr><td>30</td><td>85</td><td>25</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	85	25	30	85	25	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>30</td><td>75</td><td>25</td></tr> <tr><td>40</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	98	2	30	75	25	40	0	100
Time (min)	A	B																																																				
0	45	55																																																				
30	45	55																																																				
Time (min)	A	B																																																				
0	98	2																																																				
5	98	2																																																				
15	50	50																																																				
20	50	50																																																				
40	20	80																																																				
41	0	100																																																				
Time (min)	A	B																																																				
0	85	25																																																				
30	85	25																																																				
Time (min)	A	B																																																				
0	98	2																																																				
30	75	25																																																				
40	0	100																																																				

HPLC (M)	HPLC (N)	HPLC (O)	HPLC (P)																																				
Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm	Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm																																				
Flow: 17 mL/min	Flow: 17 mL/min	Flow: 17 mL/min	Flow: 17 mL/min																																				
Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm	Detector: UV –max plot and 270 nm																																				
A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % TFA (v/v) B = MeOH with 0.1 % TFA (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)	A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v)																																				
Gradient run	Gradient run	Gradient run	Gradient run																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>30</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	98	2	30	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>45</td><td>55</td></tr> <tr><td>30</td><td>45</td><td>55</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	45	55	30	45	55	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>40</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	98	2	40	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>20</td><td>30</td><td>70</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	50	50	20	30	70
Time (min)	A	B																																					
0	98	2																																					
30	0	100																																					
Time (min)	A	B																																					
0	45	55																																					
30	45	55																																					
Time (min)	A	B																																					
0	98	2																																					
40	0	100																																					
Time (min)	A	B																																					
0	50	50																																					
20	30	70																																					

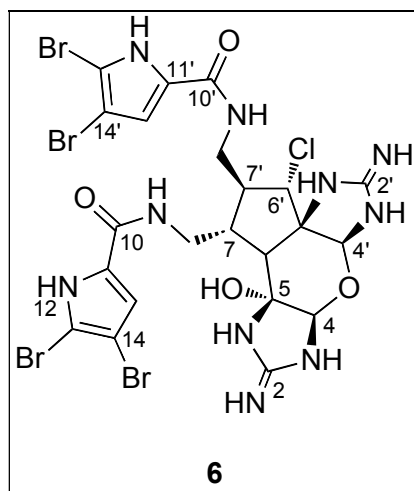
HPLC (Q)			HPLC (R)		
Column: X-Bridge C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm			Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm		
Flow: 17 mL/min			Flow: 17 mL/min		
Detector: UV –max plot and 270 nm			Detector: UV –max plot and 270 nm		
A = H ₂ O with 0.1 % TFA (v/v) B = MeOH with 0.1 % TFA (v/v)			A = H ₂ O with 0.1 % TFA (v/v) B = MeOH with 0.1 % TFA (v/v)		
Gradient run			Gradient run		
Time (min)	A	B	Time (min)	A	B
0	45	55	0	98	2
30	45	55	30	60	40
			35	60	40
			36	0	100

Table 1: Preparative reversed-phase HPLC conditions

Note: All the known structures have been determined by comparison of their spectroscopic data with those from the literature, as mentioned in “experimental techniques”. These known molecules are gathered in the table below (Table 2).

N°	Compound	Molecular weight (g/mol)	N°	Compound	Molecular weight (g/mol)
51	dibromoisophakellin	389.1	45	odiline/stevensine	387.0
49	dibromophakellin	389.1	77	massadine	828.1
8	oroidin	389.1	6	massadine chloride	846.5
38	(<i>E</i>)-debromohymenialdisin	247.3	111	taurine	125.3
37	(<i>Z</i>)-debromohymenialdisin	247.3	113	<i>N</i> -methylmanzacidin C	358.2
50	monobromophakellin	310.2	67	sceptrin	620.3
16	hymenidin	310.2	71	ageliferin	622.3
19	keramadin	324.2	116	stylissazole D	632.3
112	hymenin	391.1	126	aplysynamisine I	503.2

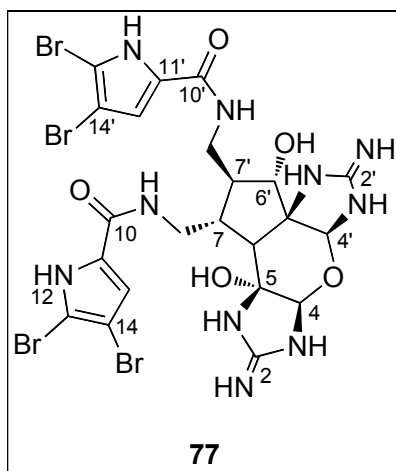
6. Massadine Chloride



Spectroscopic data are of the known massadine chloride are in agreement with the literature data.¹² The ¹H NMR data is given here for comparison with the close isolated new compounds

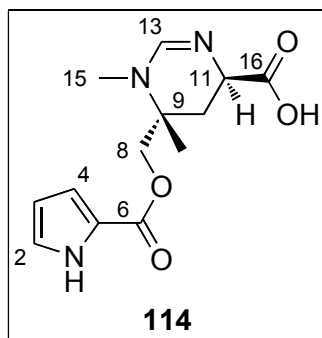
C ₂₂ H ₂₃ Br ₄ N ₁₀ O ₄ Cl (846.5 g.mol ⁻¹)	white solid
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.91 (1H, s, H15'), 6.81 (1H, s, H15), 5.79 (1H, s, H4'), 5.42 (1H, s, H4), 4.19 (1H, m, H6'), 3.89 (1H, m, H8a), 3.59 (1H, m, H8'a), 3.50 (1H, m, H8b), 3.32 (1H, m, H8'b), 2.69 (1H, m, H7'), 2.61 (1H, d, <i>J</i> = 12.2 Hz, H6), 2.36 (1H, m, H7).	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 842,8 / 844,8 / 846,8 / 848,8 / 850,8 / 852,8 [M+H] ⁺	

77. Massadine



Spectroscopic data of the known massadine are in agreement with the literature data ¹¹
They are given here for comparison with the close isolated new compounds

$C_{22}H_{24}Br_4N_{10}O_5$ (828.1 g.mol ⁻¹)	white solid
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.90 (1H, s, H15), 6.84 (1H, s, H15'), 5.65 (1H, s, H4'), 5.41 (1H, s, H4), 3.92 (1H, m, H8a), 3.70 (1H, m, H6'), 3.53 (1H, m, H8'a), 3.48 (1H, m, H8b), 3.37 (1H, m, H8'b), 2.41 (1H, d, J = 12.3 Hz, H6), 2.16 (1H, m, H7'), 2.11 (1H, m, H7).	
Mass (ESI⁺): m/z 824,8 / 826,8 / 828,8 / 830,8 / 832,8 [M+H] ⁺	

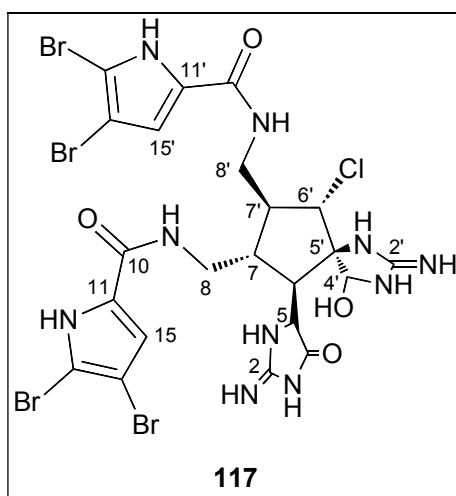
114. *N*-methyl-debromomanzacidin C

$C_{13}H_{17}N_3O_4$ (279.3 g.mol ⁻¹)	white solid
Mass (ESI⁺): m/z 280.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3294 (O-H), 1736 (C=O ester), 1615 et 1428 (C=O carboxylic acid), 1515 et 1459 (C=C pyrrole), 1181 (C-O).	
$[\alpha]_D^{26.1}$ +30.6 (c 0.25, MeOH)	

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	¹ H- ¹ H NOESY
1-NH	-	-	-	-	-
2	7.03, s	126.1	3	3, 4, 5	3
3	6.23, s	111.3	4, 2	2, 5	4, 2
4	6.87, s	117.4	3,	2, 3, 5	3
5	-	122.4	-	-	-
6	-	161.5	-	-	-
8a	4.71, d, 12.3	67.0	8b	17, 10, 9, 6	17, 10eq', 15, 11
8b	4.27, d, 12.3 Hz		8a	17, 10, 9, 6	17, 10eq, 15, 11
9	-	58.5	-	-	-
10eq	2.71, dd, 5.4/14.5 Hz	34.4	10ax, 11	17, 11, 9, 8, 16	17, 8b, 11, 8a
10ax	2.08, br t, 11.3 Hz		10eq, 11	17, 11, 9, 8, 16	17, 11
11	4.57, dd, 4.7/10.7 Hz	50.9	10ax, 10eq	10, 9, 16	-
12	-	-	-	-	-
13	7.98, s	154.8	-	15, 11, 9	-
15	3.28, s	37.3	-	9, 13	-
16	-	171.8	-	-	-
17	1.51, s	21.4	-	10, 9, 8	-

Table 3: ¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HMBC and ¹H-¹H NOESY NMR data for **114** in CD₃OD

117. Donnazole A



$C_{22}H_{23}Br_4ClN_{10}O_4$ (846.6 g.mol ⁻¹)	white solid
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{22}H_{24}N_{10}O_4Br_4Cl$ $[M+H]^+$, 842.8517 ; found, 842.8404	
Mass (ESI⁺): m/z 842.8 / 844.8 / 846.8 / 848.8 / 850.8 . 852.8 $[M+H]^+$	
CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ 285 (+ 8.71), 261 (-1.81)	

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC
1-NH	-	-	-	-
2	-	155.5	-	-
3-NH	-	-	-	-
4	-	nd	-	-
5	4.39, d, 3.8 Hz	62.5	6	C7
6	3.45, m	39.9	7, 5	C8, C5, C6', C5', C4'
7	1.64, m	40.0	7', 6, 8b	
8a	3.50, dd, 2.5, 14.1 Hz	42.5	7, 8b	C7, C7', C10
8b	3.59, dd, 6.5, 14.1 Hz		7, 8a	C7, C7', C10
9-NH	-	-	-	-
10	-	162.5	-	-
11	-	128.3	-	-
12-NH	-	-	-	-
13	-	106.4	-	-
14	-	100.1	-	-
15	6.92, s	114.9	-	C13, C14, C11, C10
1'-NH	-	-	-	-
2'	-	159.2	-	-
3'-NH	-	-	-	-

4'	5.37, s	82.9	-	C6', C2'
5'	-	73.1	-	-
6'	4.26, d, 12.3 Hz	67.9	7'	C8', C7', C5', C4'
7'	1.92, br t, 11.6 Hz	46.5	7', 8'b, 6'	-
8'a	3.40, dd, 2.9, 14.7 Hz	37.8	7', 8'b	C7, C6', C10'
8'b	3.81, dd, 3.8, 14.7 Hz		7', 8'a	C6', C10'
9'-NH	-	-	-	-
10'	-	163.1	-	-
11'	-	128.5	-	-
12'-NH	-	-	-	-
13'	-	106.5	-	-
14'	-	100.1	-	-
15'	6.97, s	114.8	-	C13', C14', C11', C10'

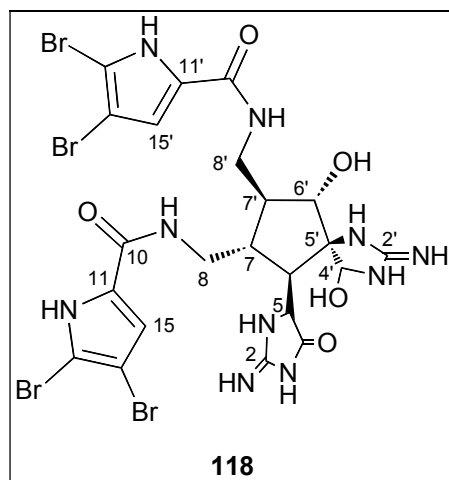
Table 12: ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^{13}C HMBC NMR data for **117** (TFA salt) in CD_3OD

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	^1H - ^1H COSY	^1H - ^{13}C HMBC	^1H - ^1H ROESY
1-NH	-	-	-	-	-
2	-	159.0	-	-	-
3-NH	-	-	-	-	-
4	-	nd	-	-	-
5	4.36, br s	61.8	-	-	6
6	3.56, m	39.2	-	-	7', 5, 4', 4'-OH, 9-NH
7	1.74, m	nd	-	-	7', 6, 6'
8a	3.52, m	41.5	8b, 9-NH	C7', C10	8b, 9-NH
8b	3.67, m		8a, 9-NH	C10	8a, 9-NH
9-NH	8.71, br s	-	8a, 8b	-	7', 8a, 8b, 15, 6
10	-	162.5	-	-	-
11	-	128.8	-	-	-
12-NH	13.0, br s	-	-	C14, C15	-
13	-	105.2	-	-	-
14	-	98.7	-	-	-
15	7.13, s	113.6	12-NH	C11, C13	9-NH
1'-NH	8.92, br s	-	-	-	6'
2'	-	159.2	-	-	-
3'-NH	9.82, br s	-	-	-	4'
4'	5.44, s	82.5	4'-OH	-	7', 6, 4'-OH, 3'-NH
5'	-	72.2	-	-	-
6'	4.29, d, 11.7 Hz	68.2	7'	-	7, 7', 8'a, 8'b, 9'-NH, 1'-NH
7'	2.01, m	45.5	6'	-	7, 8'a, 8'b, 6, 8a, 8b, 4', 9-NH, 9'-NH
8'a	3.43, m	37.4	8'b, 9'-NH	-	8'b, 6', 9'-NH, 7'
8'b	3.86, m		8'a, 9'-NH	-	8'a, 6', 9'-NH, 9-NH
9'-NH	8.52, br s	-	8'a, 8'b	-	7', 8'a, 8'b, 6', 15'
10'	-	160.6	-	-	-
11'	-	128.7	-	-	-

12'-NH	13.0, br s	-	-	C14', C15'	-
13'	-	105.2	-	-	-
14'	-	98.7	-	-	-
15'	7.17, s	113.7	12'-NH	C11', C13'	9'-NH
2-NH ₂ a	-	-	-	-	-
2-NH ₂ b	-	-	-	-	-
2'-NH ₂ a	-	-	-	-	-
2'-NH ₂ b	-	-	-	-	-
C4'-OH	7.47, br s	-	4'	-	6, 4'

Table 12: ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC and ^1H - ^1H ROESY NMR data for **117** (TFA salt) in DMF- d_7

118. Donnazole B



$C_{22}H_{24}N_{10}O_5Br_4$ (828.1 $g \cdot mol^{-1}$)	white solid
^{15}N -NMR (DMF- d_7 , 60.7 MHz, 253K): $\delta = 165.8$ (N12), 156.8 (N12'), 146.2 (N3), 106.7 (N3'), 103.9 (N9'), 103.5 (N9), 94.1 (N1), 90.9 (N1'), 84.3 (NH ₂), 72.2 (NH ₂ ').	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{22}H_{25}^{79}Br_2^{81}Br_2N_{10}O_5$ [M+H] ⁺ , 828.8702 ; found, 828.8730	
Mass (ESI⁺): m/z 824,8 / 826,8 / 828,8 / 830,8 / 832,8 [M+H] ⁺	
UV (DAD) λ_{max} 277 nm	
$[\alpha]_D^{23} = +7.66$ (c 0.09, MeOH)	
CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ 285 (+ 1.81), 262 (-0.49)	

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	1H - 1H COSY	1H - ^{13}C HMBC	1H - 1H ROESY
1-NH	-	-	-	-	-
2	-	159.7	-	-	-
3-NH	-	-	-	-	-
4	-	191.3	-	-	-
5	4.28, d, 3.8 Hz	63.1	6	C6, C7	6
6	3.27, dd, 3.8, 9.5 Hz	38.6	7, 5	C7, C8, C5, C5', C4', C4	7, 5, 7', 4'
7	1.51, m	38.6	7', 6, 8a	-	7', 8a, 8b, 6'
8a	3.46, br d, 15.4 Hz	41.2	7, 8b	C7, C7', C10	7, 8b
8b	3.62, dd, 5.4, 14.8 Hz		7, 8a	C7, C7', C10	7, 8a
9-NH	-	-	-	-	-
10	-	162.7	-	-	-
11	-	128.5	-	-	-
12-NH	-	-	-	-	-
13	-	106.3	-	-	-

14	-	100.0	-	-	-
15	6.81, s	114.5	-	C14, C11	-
1'-NH	-	-	-	-	-
2'	-	159.6	-	-	-
3'-NH	-	-	-	-	-
4'	5.25, s	82.0	-	C6', C2'	7'
5'	-	71.8	-	-	-
6'	4.60, d, 11.7 Hz	84.8	7',	C8', C7', C5', C4'	7, 7', 8'a, 8'b
7'	1.82, m	44.3	7, 8'a, 8'b, 6'	C7, C6'	7, 8'a, 8'b, 4'
8'a	3.39, dd, 3.2, 15.1 Hz	36.9	7', 8'b, 9'-NH	-	7', 8'b
8'b	3.83, dd, 3.2, 15.1 Hz	-	7', 8'a, 9'-NH	-	7', 8'a
9'-NH	-	-	8'a, 8'b	-	-
10'	-	161.9	-	-	-
11'	-	128.4	-	-	-
12'-NH	-	-	-	-	-
13'	-	100.1	-	-	-
14'	-	106.4	-	-	-
15'	6.97, s	114.7	-	C14', C11'	-
2-NH ₂ a	-	-	-	-	-
2-NH ₂ b	-	-	-	-	-
2'-NH ₂ a	-	-	-	-	-
2'-NH ₂ b	-	-	-	-	-
C4'-OH	-	-	-	-	-

Table 4: ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC and ^1H - ^1H ROESY NMR data for **118** (formic acid salt) in CD_3OD

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{N} (ppm)	^1H - ^1H COSY	^1H - ^{13}C HMBC
1-NH	10.54, br s	-	94.1	-	-
2	-	-	-	-	-
3-NH	13.92, br s	-	146.2	-	-
4	-	191.3	-	-	-
5	4.85, s	61.0	-	6, 1-NH	C6, C5'
6	3.45, m	39.4	-	7, 5	C7, C8, C5, C5', C4'
7	2.01, m	38.5	-	7', 6	-
8a	3.50, m	41.2	-	7, 8b, 9-NH	C7, C10
8b	3.57, m	-	-	7, 8a, 9-NH	C7, C10
9-NH	8.76, br s	-	103.5	8a, 8b	C10
10	-	160.4	-	-	-
11	-	128.9	-	-	-
12-NH	13.18, br s	-	165.8	15	C13, C14, C15, C11
13	-	105.0	-	-	-
14	-	98.7	-	-	-
15	7.14, s	113.5	-	12-NH	C14, C11

1'-NH	7.98, br s	-	90.9	3'-NH	-
2'	-	159.9	-	-	-
3'-NH	9.77, br s	-	106.7	4', 1'-NH	C5', C2'
4'	5.51, s,	81.7	-	C4'-OH, 3'-NH	C6', C2'
5'	-	71.5	-	-	-
6'	4.62, d, 10.9 Hz	82.7	-	7'	C8', C7', C5', C4'
7'	1.86, m	43.9	-	7', 8'a, 8'b, 6'	C7, C8, C6'
8'a	3.50, m	38.2	-	7', 8'b, 9'-NH	C7, C7'
8'b	3.71, m	-	-	7', 8'a, 9'-NH	C7, C7', C10'
9'-NH	8.51, br s	-	103.9	8'a, 8'b	C10'
10'	-	159.6	-	-	-
11'	-	129.1	-	-	-
12'-NH	13.21, br s	-	165.8	15'	C13', C14', C15', C11'
13'	-	105.0	-	-	-
14'	-	98.7	-	-	-
15'	6.92, s	112.8	-	12'-NH	C14', C11'
2-NH ₂ a	9.70, br s	-	84.3	-	-
2-NH ₂ b	10.24, br s	-	-	-	-
2'-NH ₂ a	8.17, br s	-	72.2	-	-
2'-NH ₂ b	8.72, br s	-	-	-	-
C4'-OH	7.28, br s	-	-	4'	-

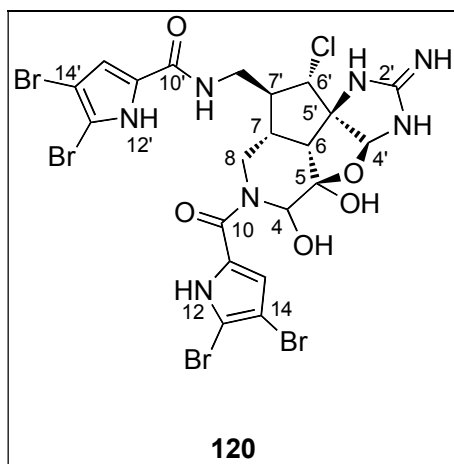
Table 5: ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shifts and ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^{13}C HMBC correlations for **118** (TFA salt) in DMF- d_7

Position	δ_{H} (ppm)	^1H - ^1H NOESY	^1H - ^1H ROESY
1-NH	10.54, br s	7, 8, 5, 2-NH ₂ a	5, 7
2	-	-	-
3-NH	13.92, br s	-	-
4	-	-	-
5	4.85, s	7, 6, 1'-NH, 1-NH	7, 6, 1'NH, 1-NH-
6	3.45, m	7', 5, 9-NH	7', 5, 4', C4'-OH, 9-NH
7	2.01, m	8a, 8b, 6', 5, 9-NH, 1-NH	8a, 6', 5, 9-NH
8a	3.50, m	7, 8b, 9-NH	7, 8b, 9-NH
8b	3.57, m	7, 8a, 9-NH	7, 8a, 9-NH
9-NH	8.76, br s	7, 8a, 8b, 15	7', 7, 8a, 8b, 15
10	-	-	-
11	-	-	-
12-NH	13.18, br s	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	7.14, s	9-NH	9-NH
1'-NH	7.98, br s	6', 2'-NH ₂ b	6', 5

2'	-	-	-
3'-NH	9.77, br s	4', 2'-NH ₂ a, 2'-NH ₂ b	4', 2'-NH ₂ a, 2'-NH ₂ b
4'	5.51, s,	7', 6, C4'-OH, 3'-NH	7', 6, C4'-OH, 3'-NH
5'	-	-	-
6'	4.62, d, 10.9 Hz	7, 8'a, 1'-NH, 9'-NH	7, 8'a, 8'b, 9'-NH
7'	1.86, m	8'a, 8'b, 4', 9-NH, 6'	4', 8'a, 9-NH
8'a	3.50, m	7', 8'b, 6', 9'-NH	7', 8'b, 6', 9'-NH
8'b	3.71, m	7', 8'a, 9'-NH	7', 8'a, 6', 9'-NH
9'-NH	8.51, br s	7', 8'a, 8'b, 6', 15'	8'a, 8'b, 6', 15'
10'	-	-	-
11'	-	-	-
12'-NH	13.21, br s	-	-
13'	-	-	-
14'	-	-	-
15'	6.92, s	9'-NH	9'-NH
2-NH ₂ a	9.70, br s	2-NH ₂ b	2-NH ₂ b
2-NH ₂ b	10.24, br s	2-NH ₂ a	2-NH ₂ a
2'-NH ₂ a	8.17, br s	2'-NH ₂ b, 3'-NH	2'-NH ₂ b
2'-NH ₂ b	8.72, br s	2'-NH ₂ a, 3'-NH	2'-NH ₂ a, 3'-NH
C4'-OH	7.28, br s	4'	-

Table 6: ^1H chemical shifts and ^1H - ^1H ROESY and NOESY correlations for **118** (TFA salt) in DMF-d_7

120. Donnazole C



$C_{21}H_{20}Br_4ClN_7O_5$ (805.5 $g \cdot mol^{-1}$)	white solid
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{21}H_{21}N_7O_5^{79}Br_4Cl$ $[M+H]^+$, 799.7870 ; found, 799.7847	
Mass (ESI⁺): m/z 799,8 / 801,8 / 803,8 / 805,8 / 807,8 / 809,8 $[M+H]^+$	
CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ 287 (+ 10.95), 266 (-3.48)	

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_N (ppm)	1H - 1H COSY	1H - ^{13}C HMBC	1H - ^{15}N HMBC	1H - 1H ROESY
4	5.84, s	80.4	-	4-OH	-	-	15, 4-OH
4-OH	6.97, br s	-	-	4	-	-	4
5	-	107.2	-	-	-	-	-
5-OH	7.02, br s	-	-	-	C5, C6	-	4
6	3.02, d, $J=11.7$ Hz	49.2	-	7	C4', C5', C5, C7, C7'	N1'	7, 8'a, 8'b, 6', 1'-NH
7	2.27, m	32.2	-	7', 8'a, 6	C5, C6, C7', C8	N9	7', 8'a, 8'b, 6'
8a	3.43, m	34.8	-	7, 8b	-	-	7', 8b
8b	4.38, d, $J=14.4$ Hz	-	-	8a	C4, C6, C7, C7', C10	-	7', 8a, 8'b, 9'-NH
9-N	-	-	125	-	-	-	-
10	-	161.6	-	-	-	-	-
11	-	127.6	-	-	-	-	-
12-NH	12.90, br s	-	167	15	C14, C15	-	15
13	-	104.8	-	-	-	-	-
14	-	98.2	-	-	-	-	-
15	6.84, s	114.8	-	12-NH	C11, C13	N12	4, 12-NH
1'-NH	9.20, br s	-	93	4'	C2', C4', C5'	-	6, 6', 2'-NH _{2a} , 2'-NH _{2b}
2'	-	159.1	-	-	-	-	-
2'-NH _{2a}	8.79, br s	nd	-	-	-	-	1'-NH, 3'-NH
2'-NH _{2b}	8.94, br s	-	-	-	-	-	1'-NH, 3'-NH

3'-NH	10.11, br s	-	102	4'	C2', C5'	-	4', 2'-NH ₂ a, 2'-NH ₂ b
4'	5.87, s	92.8	-	3'-NH, 1'-NH	C2', C5, C6, C6'	N1', N3'	7', 3'-NH
5'	-	81.7	-	-	-	-	-
6'	4.52, d, <i>J</i> = 11.7 Hz	63.4	-	7'	C4', C5', C7', C8'	N1'	7', 7, 6, 9'-NH, 1'-NH
7'	1.95, m	46.5	-	7, 8'a, 8'b, 6'	C6', C7	N9'	7, 8a, 8b, 8'b, 6', 4'
8'a	3.43, m	36.2	-	7', 8'b, 9'-NH	-	-	7, 8'b, 9'-NH, 6'
8'b	3.94, m	-	-	8'a, 9'-NH	C6'	-	7', 7, 8'a, 8b, 9'-NH
9'-NH	8.44, br t	-	99	8'a, 8'b	C10'	-	8'a, 8b, 6', 15'
10'	-	160.4	-	-	-	-	-
11'	-	128.9	-	-	-	-	-
12'-NH	12.96	-	165	15'	C14', C15'	-	15'
13'	-	105.2	-	-	-	-	-
14'	-	98.6	-	-	-	-	-
15'	7.14, s	113.4	-	12'-NH	C11', C13'	N12'	9'-NH, 12'-NH

Table 10: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC and ^1H - ^1H ROESY NMR data for **120**

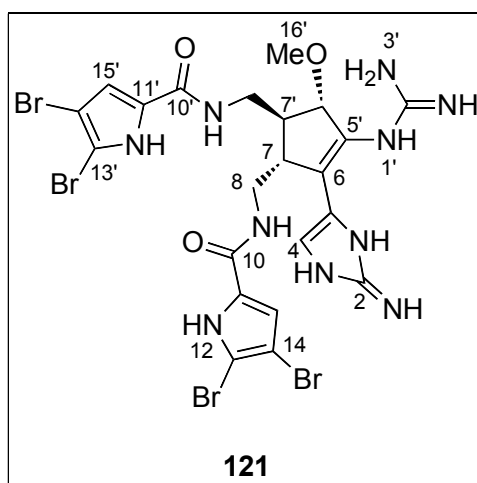
(TFA salt) in DMF-*d*₇

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	^1H - ^{13}C HMBC
4	5.84, s	81.1	C5, C6, C8, C10
4-OH	-	-	-
5	-	106.7	-
5-OH	-	-	-
6	2.91, d, <i>J</i> = 10.7 Hz	51.8	C4, C4', C5, C7, C7'
7	2.21, m	34.1	C5, C6, C7', C8'
8a	3.51, m	34.5	C7, C7'
8b	4.43, d, <i>J</i> = 14.2 Hz	-	C7, C7', C10
9-NH	-	-	-
10	-	162.4	-
11	-	126.4	-
12-NH	-	-	-
13	-	105.0	-
14	-	98.3	-
15	6.86; s	115.3	C10, C11, C13, C14
1'-NH	-	-	-
2'	-	158.5	-
2'-NH ₂ a	-	-	-
2'-NH ₂ b	-	-	-
3'-NH	-	-	-
4'	5.92, s	93.1	C2', C5, C6, C6'
5'	-	81.5	-
6'	4.31, d, <i>J</i> = 11.7 Hz	63.1	C4', C5', C7', C8'
7'	2.01, m	46.6	C6'

8'a	3.53, m	37.0	-
8'b	3.89, m		-
9'-NH	-	-	-
10'	-	160.0	-
11'	-	128.1	-
12'-NH	-	-	-
13'	-	105.2	-
14'	-	96.4	-
15'	6.92, s	113.5	C10', C11', C13', C14'

Table 11: ^1H , ^{13}C , and ^1H - ^{13}C HMBC NMR data for **120** (TFA salt) in CD_3OD

121. Donnazole D



$C_{22}H_{24}N_{10}O_3Br_4$ (796.1 g.mol ⁻¹)	white solid
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{22}H_{25}Br_4N_{10}O_3$ [M+H] ⁺ , 792.8845 ; found, 792.8774	
Mass (ESI⁺): m/z 792,8 / 794,8 / 796,8 / 798,8 / 800,8 [M+H] ⁺	
UV (DAD) λ_{max} 277 nm	
CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ 287 (+ 10.95), 266 (-3.48)	

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	¹ H- ¹ H ROESY
1-NH	-	-	-	-	-
2	-	150.4	-	-	-
3-NH	-	-	-	-	-
4	7.12, s	115.2	-	C2, C5, C6	7, 8a, 8b
5	-	121.1	-	-	-
6	-	127.5	-	-	-
7	2.98, m	48.5	H7', H8a,b	C5', C6', C8, C8'	4, 6', 7', 8a, 8b, 8'a, 8'b
8a	3.27, m	44.8	H7, 9-NH	C6, C10	4, 7, 7', 8a
8b	3.69, m		H7, 9-NH	C6, C10	4, 7, 7', 8b
9-NH	-	-	8a, 8b	C10	-
10	-	163.2	-	-	-
11	-	128.4	-	-	-
12-NH	-	-	-	-	-
13	-	100.1	-	-	-
14	-	106.3	-	-	-
15	6.70, s	114.4	-	C10, C11, C14	-
1'-NH	-	-	-	-	-
2'	-	nd	-	-	-

3'-NH	-	-	-	-	-
5'	-	129.3	-	-	-
6'	4.15, s	88.6	H7'	C5', C6, C7, C8', C16'	7, 8', 16'
7'	2.53, t, $J = 8.1$ Hz	45.9	H6', H8'a,b, H7	C5', C6, C6', C8, C8'	6', 7, 8a, 8b, 8'a, 8'b, 16'
8'a	3.24, m	42.6	H7', 9'-NH	C6', C7', C10'	6', 7, 7'
8'b	3.33, m		H7', 9'-NH	C6', C7', C10'	6', 7, 7'
9'-NH	-	-	8'a, 8'b	C10'	-
10'	-	162.1	-	-	-
11'	-	128.3	-	-	-
12'-NH	-	-	-	-	-
13'	-	100.1	-	-	-
14'	-	106.5	-	-	-
15'	6.66, s	114.2	-	C10', C11', C14'	-
16'	3.41, s	57.2	-	C6'	6', 7'

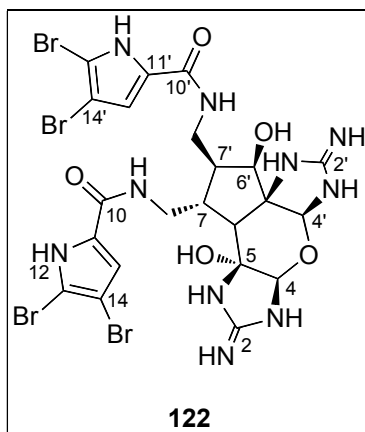
Table 7: ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC and ^1H - ^1H ROESY NMR data for **121** (TFA salt) in CD_3OD

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{N} (ppm)	^1H - ^{13}C HMBC	^1H - ^{15}N HMBC	^1H - ^1H ROESY
1-NH	-	-	-	-	-	-
2	-	149.6	-	-	-	-
2-NH ₂ a	6.73, br s	-	107	-	-	6'
2-NH ₂ b	7.56, br s	-		-	-	
3-NH	-	-	132	-	-	-
4	7.12, s	115.2	-	C2, C5, C6	N3	-
5	-	121.5	-	-	-	-
6	-	128.0	-	-	-	-
7	2.98, m	48.5	-	C5', C6', C8, C8'	N9	7', 8a, 8b, 9-NH, 9'-NH
8a	3.27, m	44.6	-	C6, C6', C10	-	7,7', 8b, 9-NH
8b	3.65, m		-	C6	-	7, 7', 8a, 9-NH
9-NH	8.36, br s	-	106	C8, C10	-	7, 7', 8a, 8b, 15
10	-	162.0	-	-	-	-
11	-	128.0	-	-	-	-
12-NH	12.10, br s	-	162	-	-	-
13	-	100.1	-	-	-	-
14	-	106.2	-	-	-	-
15	6.70, s	114.3	-	C10, C11, C14	N12	9-NH
1'-NH	-	-	-	-	-	-
2'	-	157.8	-	-	-	-
2'-NH ₂	7.46, br s	-	75	-	-	6'
3'-NH	-	-	-	-	-	-
5'	-	129.5	-	-	-	-
6'	4.11, s	88.6	-	C5', C7, C8', C16'	-	7', 8'b, 9'-NH, 16', 2'-NH ₂
7'	2.49, s	45.8	-	C5', C6', C8, C8'	N9'	6', 7, 8a, 9-NH, 9'-NH, 16'

8'a	3.24, m	42.2	-	-	-	-
8'b	3.31, m		-	C10	-	6', 9'-NH
9'-NH	8.36, br s	-	106	C8'	-	6, 7, 7', 8'b
10'	-	161.9	-	-	-	-
11'	-	128.8	-	-	-	-
12'-NH	12.00, br s	-	162	-	-	-
13'	-	100.1	-	-	-	-
14'	-	106.2	-	-	-	-
15'	6.67, s	114.0	-	C10', C11', C14'	N12'	-
16'	3.38, s	57.3	-	C5'	-	6', 7'

Table 8: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC and ^1H - ^1H ROESY NMR data for **121**
(TFA salt) in CD_3OH

122. Donnazole E (proposed stereochemistry)



$C_{22}H_{24}N_{10}O_5Br_4$ (828.1 g.mol ⁻¹)	white solid
¹ H NMR (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.93 (s, 1H, H15), 6.91 (s, 1H, H15'), 5.77 (s, 1H, H4'), 4.38 (s, 1H, H6'), 3.99 (br d, J = 14.6 Hz, 1H, H8'b), 3.68 (m, 2H, H8a,b), 3.36 (br d, J = 14.6 Hz, 1H, H8'a), 2.60 (m, 1H, H7), 2.38 (m, 1H, H7'), 2.38 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H6).	
Mass (ESI⁺): m/z 824.8 / 826.8 / 828.8 / 830.8 / 832.8 [M+H] ⁺	
UV (DAD) λ_{max} 277 nm	

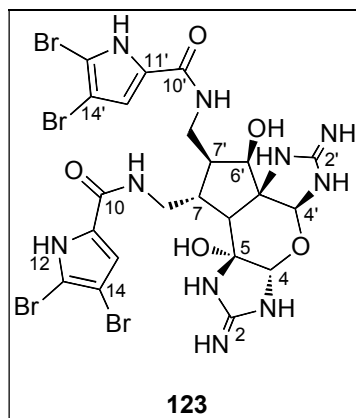
Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	¹ H- ¹ H ROESY	¹ H- ¹ H NOESY
1-NH	nd					
2		160.8				
3-NH	nd					
4	4.86, s	86.1	4'	C4', C2		8a, 8b, 6'
5		87.4				
6	2.28, d, J = 12.3 Hz	46.4	7	C8, C7, C7', C5', C4', C5	8a, 8b, 4'	8a, 8b, 4', 9-NH
7	2.47, m	40.9	7', 8a, 8b, 6	C7'	8'a, 8'b, 8a, 8b	8a, 8, 8'a, 8'b
8a	3.60, m	39.2	7, 8b, 9-NH	C7	7, 8b	7
8b	3.75, m		7, 8a, 9-NH		7, 8a	7
9-NH	8.37, br s		8a, 8b			15'
10*		159.6				
11*		129.2				
12-NH*	nd					
13*		98.6				
14*		104.0				
15*	7.14, s	113.3		C13, C14, C11, C10		8a, 8b, 9'-NH
1'-NH	nd					
2'		159.6				
3'-NH	nd					

4'	5.71, s	82.6	4	C6', C4, C2'		
5'		71.3				
6'	4.26, s	82.7	7'	C7, C6, C5'		4', 9'-NH
7'	2.41, m	48.5	7, 8'a, 8'b, 6'	C7	8'b	8a, 8b, 8'a, 8'b, 6', 9'-NH
8'a	3.50, m		7', 8'b, 9'-NH	C7	7', 7, 8'b, 6'	7', 7
8'b	3.84, m	42.0	7', 8'a, 9'-NH	C7'	7, 7', 8'a	7', 7, 9'-NH
9'-NH	8.95, br s		8'a, 8'b		7', 15	7', 6', 15
10'*		160.8				
11'*		128.8				
12'-NH*	nd					
13'*		98.5				
14'*		104.6				
15'*	7.06, s	113.9		C13', C14', C11', C10'		8a, 8b, 9-N

* Chemical shift values have been attributed thanks to comparison with donnazole B as no correlations have been found between the amidic NH and the pyrrolic moiety.

Table 9: ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H ROESY and ^1H - ^1H NOESY NMR data for **122** (TFA salt) in DMF- d_7

123. Donnazole F (proposed stereochemistry)



$C_{22}H_{24}Br_4N_{10}O_4$ (828.1 g.mol ⁻¹)	white solid
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.89 (s, 1H, H15), 6.89 (s, 1H, H15'), 5.82 (s, 1H, H4'), 5.44 (s, 1H, H4), 4.32 (s, 1H, H6'), 4.04 (dd, J = 3.1/13.7 Hz, 1H, H8a), 3.59 (dd, J = 6.1/14.6 Hz, 1H, H8b), 3.17 (br d, J = 18.9 Hz, 1H, H6), 2.54 (m, 1H, H7'), 2.35 (d, J = 12.5 Hz, 1H, H6), 2.16 (m, 1H, H7).	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{22}H_{25}N_{10}O_4$ ⁷⁹ Br ₂ ⁸¹ Br ₂ [M+H] ⁺ , 828.8759 ; found, 828.8702	
Mass (ESI⁺): m/z 824.8 / 826.8 / 828.8 / 830.8 / 832.8 [M+H] ⁺	

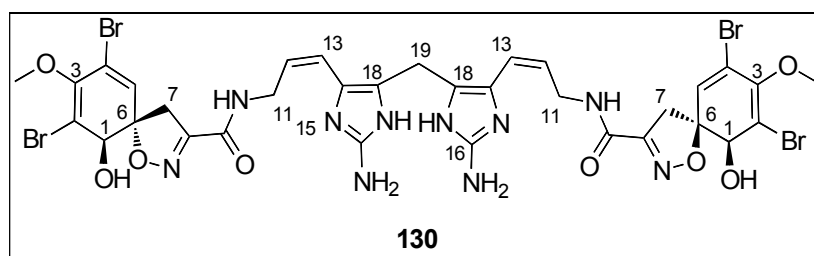
Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC
1-NH	-	-	-	-
2	-	158.3	-	-
3-NH	-	-	-	-
4	5.52, s	91.7	-	C4', C5, C2
5	-	88.1	-	-
6	2.31, d, J = 12.1 Hz	44.0	7	C7, C5', C5
7	2.37, m	41.6	7', 6, 8a, 8b	-
8a	3.75, m	40.6	7, 8b, 9-NH	-
8b	3.82, m	-	7, 8a, 9-NH	-
9-NH	8.56, br s	-	8a, 8b	-
10*	-	?	-	-
11*	-	129.1	-	-
12-NH*	-	-	-	-
13*	-	98.6	-	-
14*	-	104.7	-	-
15*	7.14, s	113.4	-	C14, C11
1'-NH	-	-	-	-

2'	-	158.7	-	-
3'-NH	-	-	-	-
4'	5.79, s	83.5	-	C6', C4, C2'
5'	-	70.2	-	-
6'	4.32, s	83.0	7'	C8', C6, C5'
7'	2.47, m	48.7	7, 8'a, 8'b	-
8'a	3.44, br t, $J = 13.3$ Hz	42.2	7', 8'b, 9'-NH	C7', C6'
8'b	3.68, m	-	7', 8'a, 9'-NH	C6'
9'-NH	8.34, br s	-	8'a, 8'b	-
10'*	-	nd	-	-
11'*	-	128.5	-	-
12'-NH*	-	-	-	-
13'*	-	98.9	-	-
14'*	-	105.6	-	-
15'*	7.12, s	113.8	-	-
NH ₂ a ₁ ^c	-	-	-	C14', C11'
NH ₂ a ₂ ^c	-	-	-	-
NH ₂ b ₁ ^c	-	-	-	-
NH ₂ b ₂ ^c	-	-	-	-

* Chemical shift values have been attributed thanks to comparison with donnazole B as no correlations have been found between the amidic NH and the pyrrolic moiety.

Table 13: ¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY and ¹H-¹³C HMBC NMR data for **123** (TFA salt) in DMF-d₇

130. Donnazole G



$C_{33}H_{34}Br_4N_{10}O_8$ (1018.3 g.mol ⁻¹)	white solid
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{33}H_{35}Br_4N_{10}O_8$ [M+H] ⁺ , 1014.9373 ; found, 1014.9386	
Mass (ESI⁺): m/z 1014.9 / 1016.9 / 1018.9 / 1020.9 / 1022.9 [M+H] ⁺	
UV (DAD) λ_{max} 230 / 260 nm	
CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ 265 (+ 18.9), 241 (+ 10.2)	
$[\alpha]_D^{23}$ = 66.36° (c 0.55 , MeOH)	

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	1H - 1H COSY	1H - ^{13}C HMBC	1H - 1H ROESY
1	4.11, s	75.6	5	7, 6, 4, 5, 3	-
2	-	123.0	-	-	-
3	-	149.5	-	-	-
4	-	114.4	-	-	-
5	6.43, s	132.3	1	7, 1, 6, 4, 2, 3	7b
6	-	93.1	-	-	-
7a	3.80, d, $J = 18$ Hz	40.0	7b	1, 6, 5, 8	7b
7b	3.10, d, $J = 18$ Hz		7a	1, 6, 4, 5, 8, 9	7a, 5
8	-	155.1	-	-	-
9	-	162.7	-	-	-
10-NH	-	-	-	-	-
11	4.02, d, $J = 7.9$ Hz	39.4	12, 13	13, 12, 9	13
12	5.76, m	130.8	11, 13	11, 14	-
13	6.26, d, $J = 11.6$ Hz	117.0	11, 12	11, 14, 12	19, 11
14	-	122.0	-	-	-
15-NH	-	-	-	-	-
16	-	149.1	-	-	-
17-N	-	-	-	-	-
18	-	121.3	-	-	-
19	3.85, s	20.1	-	18, 14	13
20	3.73, s, 3H	60.5	-	3	-

Table 14: 1H , ^{13}C , 1H - 1H COSY, 1H - ^{13}C HMBC and 1H - 1H ROESY NMR data for **130** in CD_3OD

EXPERIMENTAL SECTION : SYNTHESIS

184a. <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-2-(nitroamino)-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	209
184b. <i>N</i> -(3-(2-cyanamido-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	210
184d. <i>N</i> -(3-(2-((1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	211
184e. <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	212
185b. <i>tert</i> -butyl (5-(3-(1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamido)propyl)-5-hydroxy-4-oxo-1-propyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)carbamate.....	213
186. <i>N</i> -(3-(4-hydroxy-3-methyl-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-4-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide.....	214
187a. <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	215
187b. <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-2-(3-nitrophenyl)-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	216
187c. <i>N</i> -(3-(2-(4-aminophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	217
188a. <i>N</i> -(3-(2-(4-chlorophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	218
188b. <i>N</i> -(3-(2-(3,5-dichlorophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	219
188c. <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	220
188d. <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	221

188e. <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	222
188f. <i>N</i> -(3-(2-(furan-3-yl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	224
189a. <i>N</i> -(3-(2-(<i>tert</i> -butyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	225
190a. <i>N</i> -(3-(5,6-bis(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	226
190c. <i>N</i> -(3-(3-oxo-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydroquinoxalin-2-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide.....	227
190d. <i>N</i> -(3-(2-hydroxy-1,4-dimethyl-3-oxo-5,6-bis(3-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-2-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	228
192a. 4,5-dibromo- <i>N</i> -(3-(4-hydroxy-3-methyl-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-4-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	229
192b. 4,5-dibromo- <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	230
192c. <i>N</i> -(3-(2-(4-aminophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide.....	231
193e. 4,5-dibromo- <i>N</i> -(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	232
193f. <i>N</i> -(3-(2-((1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)propyl)-3,4,5-tribromo-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxamide	233
196. 1-methyl-6-(1 <i>H</i> -pyrrole-2-carbonyl)-2-thioxo-1,3,6-triazaspiro[4.4]nonan-4-one. 234	
197. <i>N</i> -(4-oxo-6-(1 <i>H</i> -pyrrole-2-carbonyl)-1,3,6-triazaspiro[4.4]non-2-en-2-yl)nitramide	235

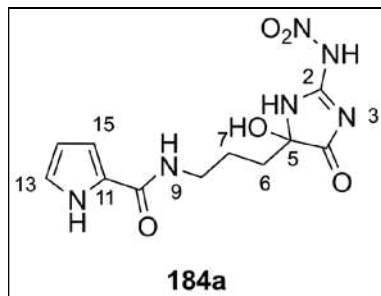
General protocol for the preparation of dispacamide derivatives

A solution of dibutyl sulfide (5 equiv.) in anhydrous DMF was added to the pyrrole-proline diketopiperazine **166** (1 equiv.) previously dried and purged with argon. Then, a flow of O₂ gas was bubbled through the solution for 10 min and the reaction mixture was stirred at room temperature under O₂ atmosphere for 1 h. A dinucleophile (1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min to 12 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was then purified according two different methods :

-1 : by precipitation from CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) and then filtrered, rined and dried under high vacuum.

-2 : by purification on silica gel column chromatography using different eluents.

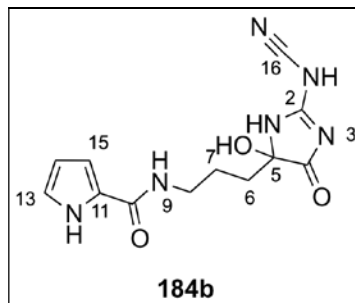
184a. *N*-(3-(5-hydroxy-2-(nitroamino)-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available nitroguanidine (54.1 mg, 0.52 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min. The residue was then purified using purification **1** to afford **184a** (157.3 mg, 0,5 mmol, 98% yield) as an orange solid.

$C_{11}H_{14}N_6O_5$ (310.27 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC R_f = 0.4 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
<p>RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.88 (1H, s, H₁₃), 6.76 (1H, s, H₁₅), 6.14 (1H, s, H₁₄), 3.32 (2H, m, H₈), 1.92 (2H, m, H₆), 1.59 (1H, m, H_{7a}), 1.47 (1H, m, H_{7b}).</p> <p>(DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz, 298K): δ = 11.28 (1H, br s, 12-NH), 7.92 (1H, br s, 9-NH), 6.80 (1H, s, H₁₃), 6.72 (1H, s, H₁₅), 6.04 (1H, s, H₁₄), 3.15 (2H, m, H₈), 1.71 (1H, m, H_{6a}), 1.62 (1H, m, H_{6b}), 1.39 (1H, m, H_{7a}), 1.25 (1H, m, H_{7b}).</p>	
<p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 125 MHz, 298K): δ = 188.8 (C4), 173.9 (C2), 160.5 (C10), 126.4 (C11), 120.9 (C13), 109.7 (C15), 108.4 (C14), 86.1 (C5), 39.2 (C8), 33.8 (C6), 23.8 (C7).</p>	
<p>Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for C₁₁H₁₄N₆NaO₅ [M+Na]⁺, 333.0923; found, 333.0935</p>	
<p>Mass (ESI⁺): m/z 311.1 [M+H]⁺</p>	
<p>IR (ν_{max} cm⁻¹): 3281 (O-H), 3152 (N-H), 1670 (C=O amide), 1609 (C=O amide), 1522 et 1470 (C=C pyrrole), 1522 et 1383 (NO₂), 1094 (C-O).</p>	

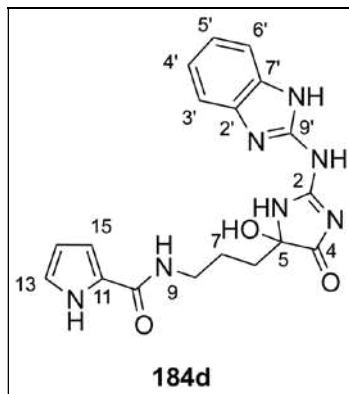
184b. *N*-(3-(2-cyanamido-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.32 mL, 1.84 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (70.0 mg, 0.36 mmol). Then the commercially available cyanoguanidine (30.5 mg, 0.36 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min. The residue was then purified using purifications 1 and 2 (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **184b** (49 mg, 0.16 mmol, 47% yield) as a white solid.

C ₁₂ H ₁₄ N ₆ O ₃ (290.28 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.35 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.89 (1H, s, H ₁₃), 6.76 (1H, s, H ₁₅), 6.15 (1H, s, H ₁₄), 3.32 (2H, m, H ₈), 1.93 (2H, m, H ₆), 1.65 (1H, m, H _{7a}), 1.56 (1H, m, H _{7b}).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 176.6 (C4), 163.9 (C10), 162.6 (C2), 126.8 (C11), 122.8 (C13), 116.3 (C16), 111.7 (C15), 110.2 (C14), 88.2 (C5), 39.8 (C8), 34.6 (C6), 24.5 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₂ H ₁₄ N ₆ NaO ₃ [M+Na] ⁺ , 313.1025; found, 313.1039	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 291.1 [M+H] ⁺	
IR (ν _{max} cm ⁻¹): 3265 (O-H), 3222 (N-H), 2194 (C≡N), 1772 (C=O amide), 1629 (C=O amide), 1555 et 1528 (C=C pyrrole), 1115 (C-O).	

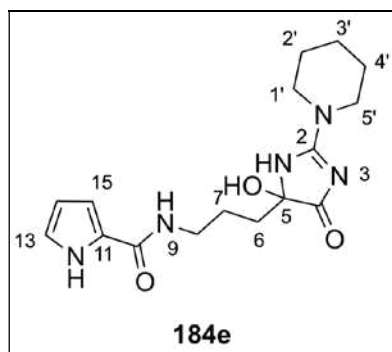
184d. *N*-(3-(2-((1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.32 mL, 1.84 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (61.0 mg, 0.32 mmol). Then the commercially available guanidinebenzimidazole (56.0 mg, 0.32 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min. The residue was then purified using purification **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **184d** (24 mg, 0.06 mmol, 20% yield) as a white solid.

C ₁₈ H ₁₉ N ₇ O ₃ (381.39 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.12 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹H DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz, 298K): δ = 11.77 (1H, br s, 2'-NH), 11.34 (1H, br s, 12-NH), 11.26 (1H, br s, 1-NH), 7.97 (1H, br s, 9-NH), 7.44 (1H, br s, H _{6'}), 7.25 (1H, br s, H _{3'}), 7.04 (2H, br s, H _{4',5'}), 6.80 (1H, s, H ₁₃), 6.71 (1H, s, H ₅), 6.04 (1H, s, H ₁₄), 3.21 (2H, m, H ₈), 1.86 (2H, m, H ₆), 1.56 (1H, m, H _{7a}), 1.37 (1H, m, H _{7b}).	
RMN ¹³C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz, 298K): δ = 174.5 (C ₄), 160.5 (C ₁₀), 156.2 (C _{9'}), 154.2 (C ₂), 142.0 (C _{7'}), 132.2 (C _{2'}), 126.3 (C ₁₁), 121.1 (C ₃), 120.7 (C ₁₃), 120.6 (C _{4',5'}), 116.6 (C _{6'}), 110.0 (C _{3'}), 109.6 (C ₁₅), 108.4 (C ₁₄), 85.6 (C ₅), 38.2 (C ₈), 29.0 (C ₆), 23.7 (C ₇).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₈ H ₂₀ N ₇ O ₃ [M+H] ⁺ , 382.1628; found, 382.1629	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 382.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3130 (O-H), 2932 (N-H), 1665 (C=O amide), 1627 (C=O amide), 1583 et 1562 (C=C phenyl), 1503 et 1425 (C=C pyrrole), 1191 (C-O).	

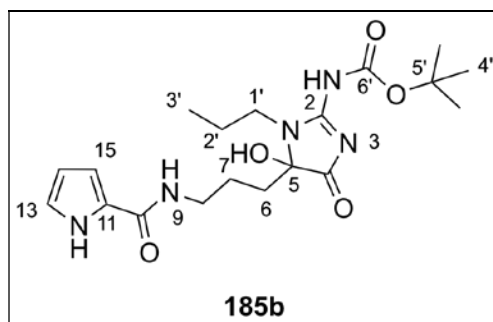
184e. *N*-(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.60 mL, 3.47 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (132.2 mg, 0.69 mmol). Then the commercially available piperidine-1-carboximidamide (143.6 mg, 0.69 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 2 h. The residue was then purified using purification **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **184e** (64.0 mg, 0.19 mmol, 28% yield) as a white solid.

C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₃ (333.39 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.28 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.86 (1H, dd, <i>J</i> = 1.5/2.4 Hz, H13), 6.76 (1H, dd, <i>J</i> = 1.5/3.6 Hz, H15), 6.11 (1H, dd, <i>J</i> = 2.4/3.6 Hz, H14), 3.40 (4H, m, H1',5'), 3.27 (2H, m, H8), 1.86 (2H, m, H6), 1.62 (6H, m, H2',3',4'), 1.43 (2H, m, H7).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 190.7 (C4), 168.6 (C2), 163.9 (C10), 126.9 (C11), 122.9 (C13), 111.8 (C15), 110.3 (C14), 89.8 (C5), 48.0 (C1',5'), 40.0 (C8), 34.8 (C6), 26.8 (C3'), 26.5 (C2',4'), 25.0 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₆ H ₂₄ N ₅ O ₃ [M+H] ⁺ , 334.1879; found, 334.1873	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 334.2 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3190 (O-H), 2904 (N-H), 1713 (C=O amide), 1650 (C=O amide), 1593 et 1522 (C=C pyrrole), 1189 (C-O).	

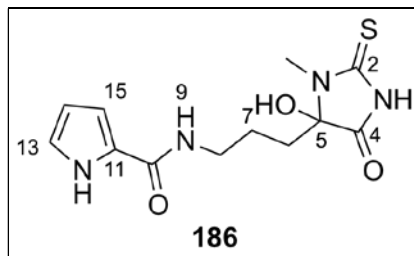
185b. *tert*-butyl (5-(3-(1*H*-pyrrole-2-carboxamido)propyl)-5-hydroxy-4-oxo-1-propyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)carbamate



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.91 mL, 5.25 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) and **166** (200.0 mg, 1.05 mmol). Then the non commercially available propyl-Boc-guanidine (191.0 mg, 0.95 mmol) previously prepared by Bo Yu was added and the reaction mixture was stirred for 4 h. The residue was then purified using purification **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to afford **185b** (10.8 mg, 0.03 mmol, 2.5% yield) as a white solid.

C ₁₉ H ₂₉ N ₅ O ₅ (407.46 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.44 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.9 (1H, s, H13), 6.76 (1H, d, <i>J</i> = 3.1 Hz, H15), 6.15 (1H, t, <i>J</i> = 2.7 Hz, H14), 3.44 (2H, m, H1'), 3.39 (1H, m, H8a), 3.24 (1H, m, H8b), 2.38 (1H, td, <i>J</i> = 4.3/13.1 Hz, H6a), 2.00 (1H, td, <i>J</i> = 4.3/13.1 Hz, H6b), 1.65 (2H, m, H2'), 1.47 (9H, s, H4'), 1.37 (1H, m, H7a), 1.23 (1H, m, H7b), 0.96 (3H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, H3').	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 186.7 (C4), 167.7 (C2), 163.9 (C10), 152.5 (C6'), 127.0 (C11), 122.9 (C13), 111.7 (C15), 110.3 (C14), 91.6 (C5), 86.7 (C5'), 45.8 (C1'), 39.7 (C8), 33.8 (C6), 28.3 (C4'), 25.3 (C7), 23.7 (C2'), 11.4 (C3').	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₃₀ N ₅ O ₅ [M+H] ⁺ , 408.2247; found, 408.2247	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 408.2 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3289 (O-H), 2934 (N-H), 1714 (C=O amide), 1696 (C=O amide), 1603 (C=O amide), 1516 et 1457 (C=C pyrrole), 1143 (C-O).	

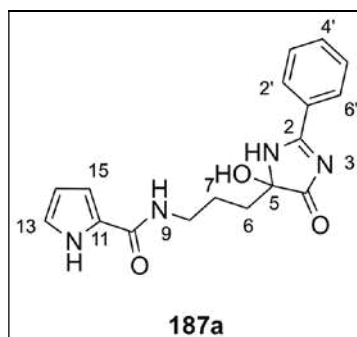
186. *N*-(3-(4-hydroxy-3-methyl-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-4-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (7 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available *N*-methylthiourea (46.9 mg, 0.52 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 2 h. The residue was then purified using purification **1** to yield **186** (140.0 mg, 0.47 mmol, 92% yield) as an orange solid.

$C_{12}H_{16}N_4O_3S$ (296.35 g.mol ⁻¹)	Orange vitreous solid
TLC R_f = 0.2 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 95/5)	Visible UV (254 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.84 (1H, dd, J = 1.4/2.6 Hz, H13), 6.72 (1H, dd, J = 1.4/3.7 Hz, H15), 6.01 (1H, dd, J = 2.6/3.7 Hz, H14), 3.27 (2H, m, H8), 3.05 (3H, s, H16), 1.79 (2H, m, H6), 1.26 (2H, m, H7).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 197.6 (C2), 190.4 (C4), 163.7 (C10), 127.0 (C11), 122.7 (C13), 111.6 (C15), 110.1 (C14), 90.6 (C5), 39.8 (C8), 33.05 (C6), 28.5 (C16), 24.3 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{12}H_{16}N_4NaO_3S$ [M+Na] ⁺ , 319.0841; found, 319.0856	
Mass (ESI⁺): m/z 297.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3281 (O-H), 2952 (N-H), 1619 (C=O amide), 1563 et 1520 (C=C pyrrole), 1294 (C=S), 1197 (C-O).	

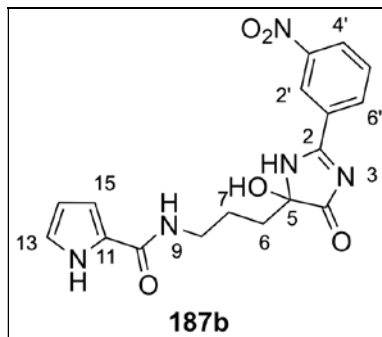
187a. *N*-(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.23 mL, 1.31 mmol) in anhydrous DMF (7 mL) and **166** (50.0 mg, 0.26 mmol). Then the commercially available benzamidine (31.2 mg, 0.26 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 2 h. The residue was then purified using purifications 1 and 2 (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **187a** as a beige powder (55.2 mg, 0.17 mmol, 65% yield).

C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₃ (326.35 g.mol ⁻¹)	Beige solid
TLC R _f = 0,3 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (254 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 500 MHz, 298K): δ = 11.35 (1H, br s, 12-NH), 8.11 (2H, m, H2',6'), 7.96 (1H, br s, 9-NH), 7.63 (1H, br t, H4'), 7.55 (2H, br t, H3',5'), 6.80 (1H, s, H13), 6.70 (1H, s, H15), 6.04 (1H, s, H14), 3.18 (2H, H8), 1.75 (2H, m, H6), 1.45 (2H, m, H7).</p> <p>(CD3OD, 500 MHz, 298K): δ = 8.02 (2H, br d, H2',6'), 7.66 (1H, br d, H4'), 7.57 (2H, br t, H3',5'), 6.90 (1H, s, H13), 6.76 (1H, dd, <i>J</i> = 1.7 and 3.5 Hz, H15), 6.16 (1H, br t, <i>J</i> = 3.5 Hz, H14), 3.35 (2H, m, H8), 1.97 (2H, m, H6), 1.61 (2H, m, H7).</p>	
<p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 125 MHz, 298K): δ = 184.2 (C4), 160.5 (C10), 159.1 (C2), 132.1 (C4'), 128.8 (C3',5'), 128.5 (C1'), 127.1 (C2',6'), 126.4 (C11), 121.0 (C13), 109.6 (C15), 108.4 (C14), 92.2 (C5), 38.4 (C8), 34.7 (C6), 23.3 (C7).</p>	
<p>Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C₁₇H₁₈N₄NaO₃ [M+Na]⁺, 349.1277 ; found, 349.1296</p>	
<p>Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 327.1 [M+H]⁺</p>	
<p>IR (ν_{max} cm⁻¹): 3293 (O-H), 3198 (N-H), 1742 (C=O amide), 1615 (C=O amide), 1569 et 1532 (C=C phenyl), 1504 et 1456 (C=C pyrrole), 1165 (C-O).</p>	

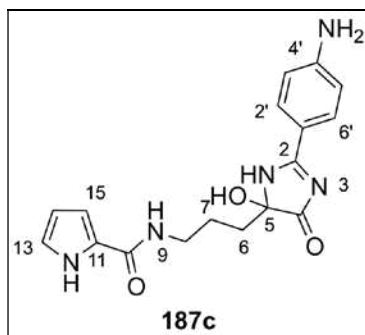
187b. *N*-(3-(5-hydroxy-2-(3-nitrophenyl)-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.23 mL, 1.31 mmol) in anhydrous DMF (7 mL) and **166** (50.0 mg, 0.26 mmol). Then the commercially available 3-nitrobenzamidinium hydrochloride (52.4 mg, 0.26 mmol) was added along with *tert*-butoxide potassium (32.1 mg, 0.29 mmol, 1.1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 2 h. The residue was then purified using purifications **1** and **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **187b** (56.5 mg, 0.15 mmol, 58% yield) as a pale red solid.

C ₁₇ H ₁₇ N ₅ O ₅ (371.35 g.mol ⁻¹)	Pale red solid
TLC R _f = 0.4 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (254 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz, 298K): δ = 11.37 (1H, br s, 12-NH), 8.85 (1H, s, H2'), 8.44 (2H, dd, <i>J</i> = 7.6 Hz, H4',6'), 7.99 (1H, br t, 9-NH), 7.84 (1H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz, H5'), 6.80 (1H, s, H13), 6.70 (1H, s, H15), 6.03 (1H, s, H14), 3.17 (2H, m, H8), 1.79 (1H, m, H6a), 1.67 (1H, m, H6b), 1.47 (1H, m, H7a), 1.41 (1H, m, H7b).	
RMN ¹³C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz, 298K): δ = 207.5 (C4), 160.5 (C10), 148.1 (C3'), 133.6 (C5'), 130.6 (C4'), 129.7 (C1'), 126.7 (C11), 126.4 (C2'), 122.1 (C6'), 121.0 (C15), 109.7 (C13), 108.4 (C14), 92.1 (C5), 38.4 (C8), 34.6 (C6), 23.2 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₇ H ₁₇ N ₅ NaO ₅ [M+Na] ⁺ , 394.1127 ; found, 394.1143	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 372.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3238 (O-H), 3180 (N-H), 1617 (C=O amide), 1563 (amide), 1526 et 1503 (C=C phenyl), 1442 et 1407 (C=C pyrrole), 1526 et 1349 (NO ₂), 1131 (C-O).	

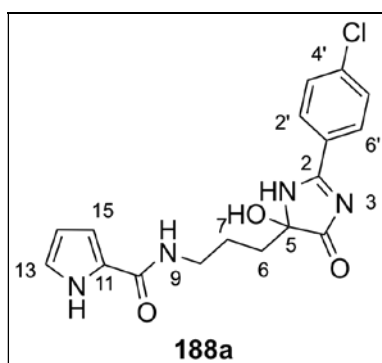
187c. *N*-(3-(2-(4-aminophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.23 mL, 1.31 mmol) in anhydrous DMF (7 mL) and **166** (50.0 mg, 0.26 mmol). Then the commercially available 4-aminobenzamidine dihydrochloride (54.1 mg, 0.26 mmol) was added with *tert*-butoxide potassium (61.3 mg, 0.54 mmol, 2.1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 3 h. The residue was then purified using purification **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to afford **187c** (30.0 mg, 0.09 mmol, 34% yield) as a pale yellow solid.

C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₃ (341.36 g.mol ⁻¹)	Pale yellow solid
TLC <i>R_f</i> = 0,2 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (254 nm) revealed in orange with sulfuric vanilin
RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz, 298K): δ = 11.33 (1H, br s, 12-NH), 9.67 (1H, br s, 1-NH), 7.94 (1H, br t, 9-NH), 7.83 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H2',6'), 6.80 (1H, s, H13), 6.70 (1H, s, H15), 6.61 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H3',5'), 6.39 (1H, s, 5-OH), 6.19 (2H, s, 4'-NH ₂), 6.04 (1H, s, H14), 3.17 (2H, m, H8), 1.71 (2H, m, H6), 1.36 (2H, m, H7).	
RMN ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz, 298K): δ = 190.6 (C4), 176.1 (C2), 160.5 (C10), 154.3 (C4'), 130.9 (C2',6'), 126.3 (C11), 121.0 (C13), 112.9 (C1'), 112.7 (C3',5'), 109.5 (C15), 108.4 (C14), 86,4 (C5), 38.3 (C8), 34.2 (C6), 23.6 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₇ H ₂₀ N ₅ O ₃ [M+H] ⁺ , 342.1566 ; found, 342.1575	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 342.2 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3253 (O-H), 3190 (N-H), 1760 (C=O amide), 1635 (C=O amide), 1580 et 1552 (C=C phenyl), 1533 et 1498 (C=C pyrrole), 1146 (C-O).	

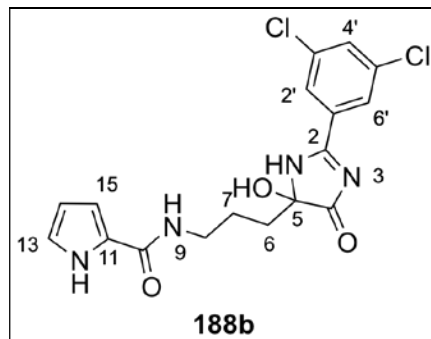
188a. *N*-(3-(2-(4-chlorophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available 4-chlorobenzene-1-carboxamide hydrochloride (104.3 mg, 0.52 mmol) was added along with *tert*-butoxide potassium (64 mg, 0.57 mmol, 1.1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 4 h. The residue was then purified using purifications **1** and **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to afford **188a** (90.0 mg, 0.25 mmol, 48% yield) as a white solid.

C ₁₇ H ₁₇ ClN ₄ O ₃ (360.79 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.4 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 8.04 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H3',5'), 7.41 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H2',6'), 6.87 (1H, s, H13), 6.75 (1H, s, H15), 6.13 (1H, s, H14), 3.33 (2H, m, H8), 1.94 (1H, m, H6a), 1.86 (1H, m, H6b), 1.50 (2H, m, H7).	
RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 201.2 (C4), 179.2 (C2), 163.8 (C10), 137.9 (C4'), 134.1 (C1'), 131.1 (C3',5'), 129.7 (C2',6'), 127.2 (C11), 122.7 (C13), 111.8 (C15), 110.2 (C14), 95.9 (C5), 40.5 (C8), 36.0 (C6), 24.7 (C7).	
Mass (ESI ⁺): <i>m/z</i> 361.1 [M+H] ⁺	
IR (ν _{max} cm ⁻¹): 3301 (O-H), 2920 (N-H), 1748 (C=O amide), 1611 (C=O amide), 1567 et 1528 (C=C phenyl), 1500 et 1452 (C=C pyrrole), 1163 (C-O).	

188b. *N*-(3-(2-(3,5-dichlorophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide

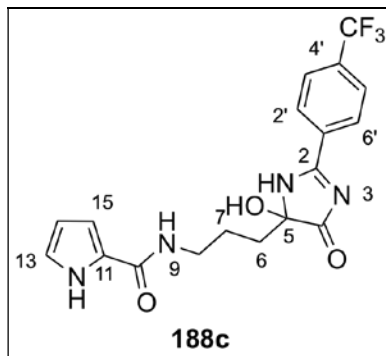


The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available 3,5-dichlorobenzene-1-carboximidamide (117.3 mg, 0.62 mmol) was added along with *tert*-butoxide potassium (64 mg, 0.57 mmol, 1.1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 2 h. The residue was then purified using purifications **1** and **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **188b** (56.4 mg, 0.14 mmol, 28% yield) as a white solid.

C ₁₇ H ₁₆ Cl ₂ N ₄ O ₃ (395.24 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC R _f = 0.55 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz, 298K): δ = 11.34 (1H, br s, 12-NH), 7.99 (2H, s, H _{2',6'}), 7.94 (1H, s, H _{4'}), 6.81 (1H, s, H ₁₃), 6.70 (1H, s, H ₁₅), 6.40 (1H, br s, 5-OH), 6.04 (1H, s, H ₁₄), 3.17 (2H, m, H ₈), 1.17 (1H, m, H _{6a}), 1.68 (1H, m, H _{6b}), 1.46 (1H, m, H _{7a}), 1.40 (1H, m, H _{7b}). (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 7.94 (2H, br s, H _{2',6'}), 7.74 (1H, brs, H _{4'}), 6.88 (1H, s, H ₁₃), 6.74 (1H, s, H ₁₅), 6.14 (1H, s, H ₁₄), 3.36 (2H, m, H ₈), 1.92 (2H, m, H ₆), 1.63 (2H, m, H ₇).	
RMN ¹³C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz, 298K): δ = 199.4 (C4), 183.7 (C2), 160.4 (C10), 134.8 (C3',5'), 131.7 (C1'), 131.4 (C4'), 126.3 (C2',6'), 125.7 (C11), 121.0 (C13), 109.6 (C15), 108.4 (C14), 92.4 (C5), 39.5 (C8), 34.5 (C6), 23.1 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₇ H ₁₆ Cl ₂ N ₄ NaO ₃ [M+Na] ⁺ , 417.0497; found, 417.0510	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 395.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3301 (O-H), 2920 (N-H), 1754 (C=O amide), 1641 (C=O amide), 1570 et	

1532 (C=C phenyl), 1500 et 1452 (C=C pyrrole), 1165 (C-O).

188c. *N*-(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide

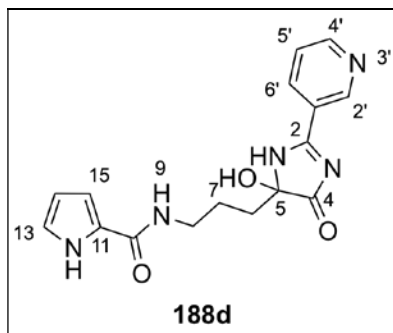


The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available 4-(trifluoromethyl)benzene-1-carboximidamide hydrochloride (139.8 mg, 0.62 mmol) was added along with *tert*-butoxide potassium (58.2 mg, 0.57 mmol, 1.1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 2 h. The residue was then purified using purifications **1** with CH₂Cl₂/heptane 1/1 (3 x 10 mL) and **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15) to yield **188c** (95.3 mg, 0.24 mmol, 46% yield) as a white solid.

C ₁₈ H ₁₇ F ₃ N ₄ O ₃ (394.35 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.27 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 8.11 (2H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H2',6'), 7.82 (2H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H3',6'), 6.84 (1H, dd, <i>J</i> = 1.3/2.4 Hz, H13), 6.70 (1H, dd, <i>J</i> = 1.3/3.8 Hz, H15), 6.09 (1H, dd, <i>J</i> = 2.4/3.8 Hz, H14), 3.27 (2H, m, H8), 1.90 (2H, m, H6), 1.62 (2H, m, H7).	
RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 188.6 (C4), 167.6 (C2), 163.9 (C10), 135.2 (C4', q, ² <i>J</i> _{C-F} = 30.5 Hz), 133.6 (C1'), 129.8 (C2',6'), 127.3 (C11), 127.1 (C3',5'), 125.3 (C7', q, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 272 Hz), 122.8 (C13), 111.8 (C15), 110.3 (C14), 92.7 (C5), 40.2 (C8), 35.1 (C6), 24.4 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₈ H ₁₇ F ₃ N ₄ NaO ₃ [M+Na] ⁺ , 417.1150; found, 417.1168	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 395.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3258 (O-H), 3115 (N-H), 1756 (C=O amide), 1609 (C=O amide), 1563 et	

1518 (C=C phenyl), 1487 et 1433 (C=C pyrrole), 1179 (C-O), 1135 (C-F).

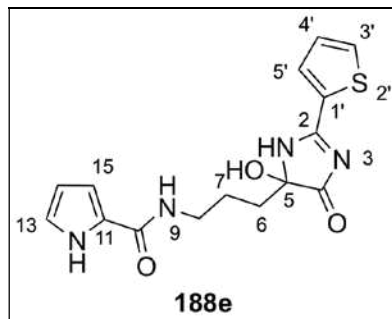
188d. *N*-(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available 3-amidinopyridine hydrochloride (84.1 mg, 0.52 mmol) was added along with *tert*-butoxide potassium (64 mg, 0.57 mmol, 1.1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 5 h. The residue was then purified using purifications **1** and **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **188d** (70.0 mg, 0.21 mmol, 41% yield) as an orange solid.

C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₃ (327.34 g.mol ⁻¹)	Orange solid
TLC <i>R</i> _f = 0.35 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz, 298K): δ = 11.34 (1H, br s, 12-NH), 9.12 (1H, br s, H2'), 8.78 (1H, br s, H4'), 8.32 (1H, br s, H6'), 7.95 (1H, br s, 9-NH), 7.58 (1H, br s, H5'), 6.81 (1H, s, H13), 6.70 (1H, s, H15), 6.37 (1H, br s, H1), 6.04 (1H, s, H14), 3.17 (2H, m, H8), 1.78 (1H, m, H6a), 1.70 (1H, m, H6b), 1.49 (1H, m, H7a), 1.41 (1H, m, H7b).	
RMN ¹³C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz, 298K): δ = 183.9 (C4), 160.5 (C10), 157.6 (C2), 152.7 (C4'), 148.0 (C2'), 134.6 (C6'), 126.3 (C11), 124.5 (C1'), 123.9 (C5'), 121.1 (C13), 109.6 (C15), 108.4 (C14), 92.1 (C5), 38.9 (C8), 34.7 (C6), 23.1 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₆ H ₁₈ N ₅ O ₃ [M+H] ⁺ , 328.1410; found, 328.1415	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 328.1 [M+H] ⁺	
IR (ν _{max} cm ⁻¹): 3261 (O-H), 3156 (N-H), 1730 (C=O amide), 1619 (C=O amide), 1565 (C=N), 1522 et 1503 (C=C phenyl), 1456 et 1423 (C=C pyrrole), 1127 (C-O).	

188e. *N*-(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available thiophene-2-carboximidamide hydrochloride (88.8 mg, 0.52 mmol) was added along with *tert*-butoxide potassium (64 mg, 0.57 mmol, 1.1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 4 h. The residue was then purified using purifications **1** and **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15) to yield **188e** (96.0 mg, 0.29 mmol, 56% yield) as a white solid.

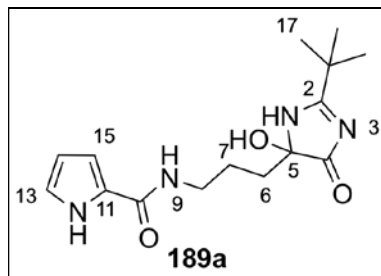
C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₃ S (332.38 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.37 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 500 MHz, 298K): δ = 11.33 (1H, br s, 12-NH), 8.09 (br s, H3'), 7.94 (1H, br s, 9-NH), 7.78 (1H, br s, H5'), 7.23 (1H, br s, H4'), 6.81 (1H, s, H13), 6.71 (1H, br d, <i>J</i> = 3.8 Hz, H15), 6.04 (1H, br t, <i>J</i> = 2.6 Hz, H14), 3.16 (2H, m, H8), 1.73 (2H, m, H6), 1.47 (1H, m, H7a), 1.37 (1H, m, H7b).</p> <p>(CD₃OD, 300 MHz, 298K): δ = 8.01 (1H, br s, H3'), 7.81 (1H, br s, H5'), 7.26 (1H, br s, H4'), 6.87 (1H, s, H13), 6.74 (1H, br d, <i>J</i> = 3.8 Hz, H15), 6.13 (1H, br t, <i>J</i> = 2.6 Hz, H14), 3.31 (2H, m, H8), 1.93 (2H, m, H6), 1.60 (2H, m, H7).</p> <p>(DMF-<i>d</i>₇, 500 MHz, 298K) : δ = 11.6 (1H, br s, 12-NH), 8.3 (2H, br s, H3',5'), 8.11 (1H, br s 9-NH), 7.46 (1H, br s, H4'), 7.14 (1H, s, H13), 7.04 (1H, s, H15), 6.29 (1H, s, H14), 3.51 (2H, br t, <i>J</i> = 6.0 Hz, H8), 2.06 (2H, m, H6), 1.85 (1H, m, H7a), 1.76 (1H, m, H7b).</p>	
<p>RMN ¹³C (DMF-<i>d</i>₇, 125 MHz, 298K): δ = 183.5 (C4), 172.1 (C2), 161.0 (C10), 135.3 (C1'), 131.6 (C3'), 130.8 (C5'), 128.2 (C4'), 126.9 (C11), 121.2 (C13), 109.5 (C15), 108.6 (C14),</p>	

92.6 (C5), 38.9 (C8), 35.2 (C6), 23.6 (C7).

Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $C_{15}H_{16}N_4NaO_3S$ $[M+Na]^+$, 355.0841; found, 355.0850

Mass (ESI⁺): m/z 333.1 $[M+H]^+$

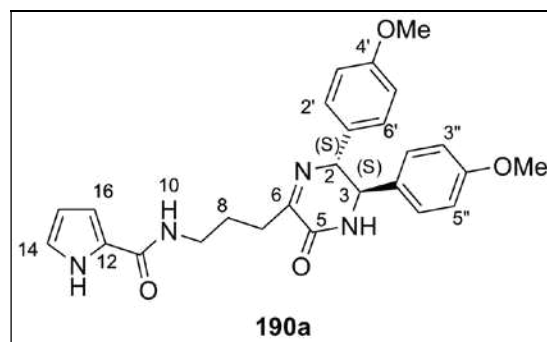
IR (ν_{max} cm^{-1}): 3198 (O-H), 3183 (N-H), 1736 (C=O amide), 1611 (C=O amide), 1561 et 1516 (C=C thiophène), 1495 et 1435 (C=C pyrrole), 1127 (C-O).

189a. *N*-(3-(2-(*tert*-butyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide

The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.29 mL, 1.7 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (65.0 mg, 0.34 mmol). Then the commercially available trimethylacetamide hydrochloride (46.1 mg, 0.34 mmol) was added along with *tert*-butoxide potassium (38.8 mg, 0.34 mmol, 1 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 30 min. The residue was then purified using purifications **1** and **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to afford **189a** (47.0 mg, 0.15 mmol, 45% yield) as a white solid.

C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O ₃ (306.36 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC R _f = 0.25 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz, 298K): δ = 6.89 (1H, dd, <i>J</i> = 1.4/2.4 Hz, H ₁₃), 6.76 (1H, dd, <i>J</i> = 1.4/3.7 Hz H ₁₅), 6.14 (1H, dd, <i>J</i> = 2.4/3.7 Hz H ₁₄), 3.31 (2H, m, H ₈), 1.83 (2H, m, H ₆), 1.48 (1H, m, H _{7a}), 1.42 (1H, m, H _{7b}), 1.26 (9H, s, H ₁₇).	
RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 75 MHz, 298K): δ = 188.0 (C ₄), 179.8 (C ₂), 163.9 (C ₁₀), 127.1 (C ₁₁), 122.8 (C ₁₃), 111.7 (C ₁₅), 110.3 (C ₁₄), 91.8 (C ₅), 40.1 (C ₈), 35.6 (C ₁₆), 35.3 (C ₆), 27.5 (C ₁₇), 24.4 (C ₇).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₅ H ₂₃ N ₄ O ₃ [M+H] ⁺ , 307.1770; found, 307.1768	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 307.2 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3289 (O-H), 2964 (N-H), 1726 (C=O amide), 1615 (C=O amide), 1563 et 1530 (C=C pyrrole), 1151 (C-O).	

190a. *N*-(3-(5,6-bis(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide

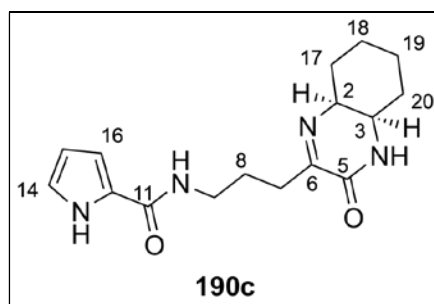


The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available (1*S*,2*S*)bis(4-methoxyphenyl)-1,2-ethanediamine (272.2 mg, 0.52 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 12 h. The residue was then purified using purification **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **190a** (135.0 mg, 0.29 mmol, 56% yield) as a white solid.

C ₂₆ H ₂₈ N ₄ O ₄ (460.52 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.4 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 95/5)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 7.02 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H2',6'), 6.96 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H2'',6''), 6.92 (1H, s, H14), 6.80 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H3'',5''), 6.78 (1H, s, H16), 6.72 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H3',5'), 6.16 (1H, br t, <i>J</i> = 3.1 Hz, H15), 4.68 (1H, d, <i>J</i> = 11.0 Hz, H3), 4.50 (1H, d, <i>J</i> = 11.0 Hz, H2), 3.75 (6H, s, H7',7''), 3.47 (1H, m, H9a), 3.42 (1H, m, H9b), 2.82 (1H, m, H7a), 2.72 (1H, m, H7b), 1.99 (2H, m, H8).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 167.4 (C5), 163.9 (C11), 161.2 (C4''), 160.7 (C4'), 159.7 (C6), 133.1 (C1'), 131.4 (C1''), 130.6 (C2'',6''), 130.2 (C2',6'), 127.2 (C12), 122.9 (C14), 115.0 (C3'',5''), 114.7 (C3',5'), 111.7 (C16), 110.3 (C15), 68.9 (C2), 62.1 (C3), 55.8 (C7',7''), 39.9 (C9), 31.9 (C7), 27.8 (C8).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₂₆ H ₂₉ N ₄ O ₄ [M+H] ⁺ , 461.2189; found, 461.2169	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 461.2 [M+H] ⁺	
[α] _D ²³ = - 48.60° (c 1.0, MeOH)	

IR (ν_{\max} cm^{-1}): 2940 (N-H), 1774 (C=O amide), 1609 (C=O amide), 1575 et 1512 (C=C phenyl), 1479 et 1438 (C=C pyrrole), 1244, 1175 et 1032 (C-O).

190c. *N*-(3-(3-oxo-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydroquinoxalin-2-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide

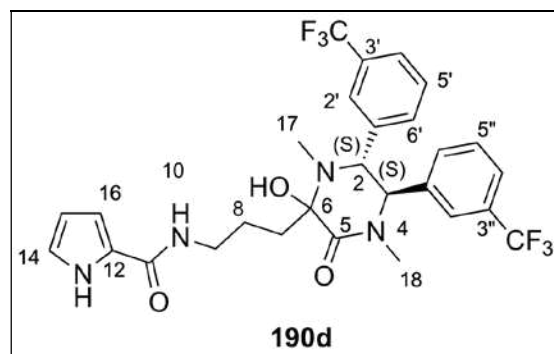


The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.46 mL, 2.60 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (100.0 mg, 0.52 mmol). Then the commercially available *cis*-1,2-diaminocyclohexane (114.2 mg, 0.52 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 h 30 min. The residue was then purified using purification **2** ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10) to afford **190c** (90.1 mg, 0.29 mmol, 57% yield) as a white solid.

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$ (302.37 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	White solid
TLC R_f = 0.53 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz, 298K): δ = 6.89 (1H, dd, J = 1.4/2.6 Hz, H14), 6.76 (1H, dd, J = 1.4/3.6 Hz, H16), 6.14 (1H, dd, J = 2.6/3.6 Hz, H15), 3.73 (1H, m, H2), 3.61 (1H, m, H3), 3.38 (2H, br t, J = 7.0 Hz, H9), 2.62 (2H, m, H7), 1.87 (2H, m, H8), 1.78 (2H, m, H17), 1.67 (2H, m, H20), 1.65 (1H, m, H19a), 1.58 (1H, m, H18a), 1.45 (1H, m, H18b), 1.38 (1H, m, H19b).	
RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz, 298K): δ = 167.0 (C5), 163.9 (C11), 159.7 (C6), 127.2 (C2), 122.8 (C14), 111.7 (C16), 110.3 (C15), 58.3 (C2), 49.8 (C3), 39.9 (C9), 31.9 (C7), 30.8 (C20), 29.5 (C17), 27.9 (C8), 23.8 (C19), 22.3 (C18).	
Mass (HRMS - ESI) : m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_2$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 325.1640; found, 325.1656	
Mass (ESI$^+$) : m/z 303.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$	
IR (ν_{\max} cm^{-1}): 2936 (N-H), 1674 (C=O amide), 1627 (C=O amide), 1567 et 1530 (C=C	

pyrrole), 1129 (C-O).

190d. *N*-(3-(2-hydroxy-1,4-dimethyl-3-oxo-5,6-bis(3-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-2-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



The general protocol was applied with a solution of dibutyl sulfide (0.23 mL, 1.30 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) and **166** (50.0 mg, 0.26 mmol). Then the commercially available (*1S,2S*)-(-)-*N,N'*-dimethyl-1,2-bis[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2-ethanediamine (97.8 mg, 0.26 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 6 h. The residue was then purified using purification **2** (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **190d** (84.3 mg, 0.14 mmol, 57% yield) as a white solid.

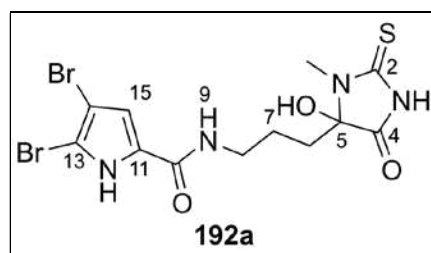
C ₂₈ H ₂₈ F ₆ N ₄ O ₃ (582.54 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R_f</i> = 0.4 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 95/5)	Visible UV (254 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz, 298K): δ = 7.53-7.26 (8H, m, HAr), 6.90 (1H, dd, <i>J</i> = 1.4/2.5 Hz, H14), 6.82 (1H, dd, <i>J</i> = 1.4/3.8 Hz, H16), 6.16 (1H, dd, <i>J</i> = 2.5/3.8 Hz, H15), 4.13 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H2 ou H3), 3.86 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H2 ou H3), 3.47 (2H, m, H9), 2.40, 2.30 (2s, 6H, H17 and H18), 2.16 (2H, m, H7), 2.10 (1H, m, H8a), 1.78 (1H, m, H8b).	
RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 75 MHz, 298K): δ = 178.5 (C5), 164.0 (C11), 142.7 (C1''), 142.2 (C1'), 133.3 (C6''), 133.1 (C6'), 131.9 (C3''), q, ² <i>J</i> _{C-F} = 31.8 Hz), 131.7 (C3', q, ² <i>J</i> _{C-F} = 31.8 Hz), 130.4 (C5''), 130.0 (C5'), 127.3 (C12), 126.5 (C2''), 126.2 (C2'), 125.8 (C4''), 125.6 (C4'), 122.8 (C14), 111.7 (C16), 110.3 (C15), 86.9 (C6), 78.1 (C2 ou C3), 76.7 (C2 ou C3), 40.9 (C9), 33.8 (C18), 32.9 (C17), 31.2 (C7), 26.5 (C8).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₂₈ H ₂₉ F ₆ N ₄ O ₃ [M+H] ⁺ , 583.2144; found, 583.2136	

Mass (ESI⁺): m/z 583.2 [M+H]⁺

[α]_D²³ = - 31.80° (*c* 0.61, MeOH)

IR (ν_{\max} cm⁻¹): 3223 (O-H), 2940 (N-H), 1605 (C=O amide), 1598 (C=O amide), 1565 et 1548 (C=C phenyl), 1486 et 1450 (C=C pyrrole), 1161 (C-O), 1115 et 1070 (C-F).

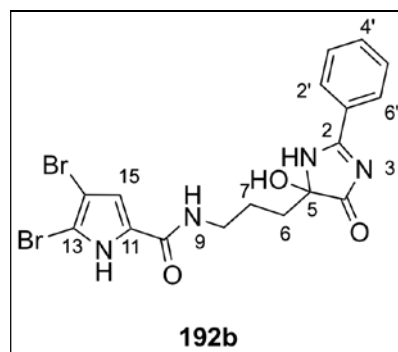
192a. 4,5-dibromo-N-(3-(4-hydroxy-3-methyl-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-4-yl)propyl)-1H-pyrrole-2-carboxamide



A solution of bromine (30 μ L, 0.57 mmol, 2 equiv.) in DMF (4 mL) was added dropwise to a solution of **186** (85.2 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) for 15 min at room temperature. The reaction mixture was then stirred for 15 additional minutes and evaporated under reduced pressure to yield a yellow/orange oil. The residue was then purified on silica gel column chromatography using (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **192a** (16.5 mg, 0.04 mmol, 13% yield) as a white solid.

C ₁₂ H ₁₄ Br ₂ N ₄ O ₃ (454.14 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC <i>R</i> _f = 0.37 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 6.80 (1H, s, H15), 3.80 (3H, s, H16), 3.32 (2H, m, H8), 3.13 (3H, s, H16), 1.96 (2H, m, H6), 1.39 (2H, m, H7).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 182.4 (C4), 176.2 (C2), 161.9 (C10), 128.9 (C11), 114.3 (C15), 106.2 (C13), 100.0 (C14), 90.1 (C5), 39.8 (C8), 33.1 (C6), 28.0 (C16), 24.3 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for C ₁₂ H ₁₃ Br ₂ N ₄ O ₃ S [M-H] ⁻ , 450.9075; found, 450.9093	
Mass (ESI⁺): m/z 450.9 / 452.9 / 454.9 [M-H] ⁺	
IR (ν_{\max} cm⁻¹): 3142 (O-H), 2956 (N-H), 1748 (C=O amide), 1619 (C=O amide), 1561 et 1510 (C=C pyrrole), 1262 (C=S), 1103 (C-O).	

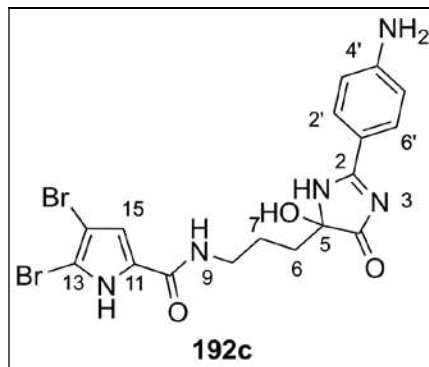
192b. **4,5-dibromo-N-(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-4,5-dihydro-1H-imidazol-5-yl)propyl)-1H-pyrrole-2-carboxamide**



A solution of bromine (24 μ L, 0.46 mmol, 2 equiv.) in DMF (3 mL) was added dropwise to a solution of **187a** (75.4 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.) in DMF (9 mL) for 15 min at room temperature. The reaction mixture was then stirred for 15 additional minutes and evaporated under reduced pressure to yield a yellow/orange oil. The residue was then purified on silica gel column chromatography using ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10) to yield **192b** (69.7 mg, 0.14 mmol, 63% yield) as a white solid.

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_3$ (484.14 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	White solid
TLC R_f = 0.37 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, 298K): δ = 11.34 (1H, br s, 12-NH), 8.12 (2H, m, H2',6'), 7.97 (1H, br s, 9-NH), 7.50 (1H, d, J = 7.5 Hz, H4'), 7.53 (2H, m, H3',5'), 6.86 (1H, s, H15), 3.17 (2H, m, H8), 7.76 (1H, m, H6a), 1.67 (1H, m, H6b), 1.46 (2H, m, H7).	
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz, 298K): δ = 184.2 (C4), 159.3 (C2), 158.8 (C10), 132.3 (C4'), 128.9 (C3',5'), 128.6 (C1'), 128.3 (C11), 127.2 (C2',6'), 112.5 (C15), 104.4 (C13), 97.8 (C14), 92.3 (C5), 39.5 (C8), 34.8 (C6), 23.1 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 482.9667; found, 482.9655	
Mass (ESI$^+$): m/z 482.9 / 484.9 / 486.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$	
IR (ν_{max} cm^{-1}): 3119 (O-H), 2900 (N-H), 1730 (C=O amide), 1621 (C=O amide), 1603 et 1530 (C=C phenyl), 1472 et 1456 (C=C pyrrole), 1135 (C-O).	

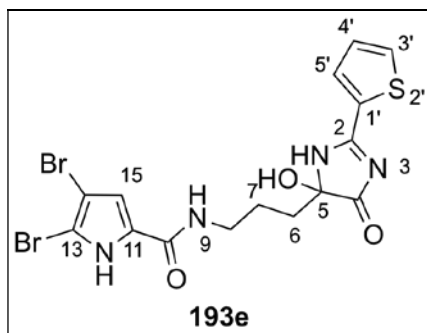
192c. *N*-(3-(2-(4-aminophenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



A solution of bromine (19 μ L, 0.36 mmol, 2 equiv.) in DMF (2 mL) was added dropwise to a solution of **187c** (63.0 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) in DMF (6 mL) for 20 min at room temperature. The reaction mixture was then stirred for 20 additional minutes and evaporated under reduced pressure to yield a yellow/orange oil. The residue was then purified on silica gel column chromatography using ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 80/20) to yield **192c** (74.0 mg, 0.15 mmol, 82% yield) as a white solid.

$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_3$ (499.16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	White solid
TLC R_f = 0.67 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 80/20)	Visible UV (270 nm) revealed in orange with sulfuric vanillin
RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz, 298K): δ = 7.81 (2H, d, J = 8.9 Hz, H2',6'), 6.79 (1H, s, H15), 6.72 (1H, d, J = 8.9 Hz, H3',5'), 3.32 (2H, m, H8), 1.96 (2H, m, H6), 1.61 (1H, m, H7a), 1.52 (1H, m, H7b).	
RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz, 298K): δ = 191.5 (C4), 175.5 (C2), 161.8 (C10), 156.5 (C4'), 132.4 (C2',6'), 130.9 (C1'), 128.9 (C11), 114.8 (C3',5'), 114.3 (C15), 106.1 (C13), 100.1 (C14), 89.3 (C5), 40.2 (C8), 35.2 (C6), 24.5 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 497.9776; found, 497.9774	
Mass (ESI$^+$): m/z 497.9 / 499.8 / 501.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$	
IR (ν_{max} cm^{-1}): 3190 (O-H), 2904 (N-H), 1740 (C=O amide), 1603 (C=O amide), 1551 et 1532 (C=C phenyl), 1478 et 1444 (C=C pyrrole), 1181 (C-O).	

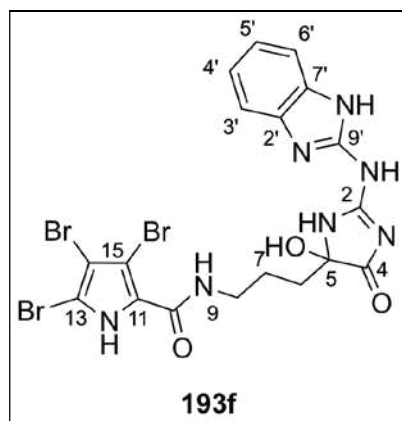
193e. 4,5-dibromo-*N*-(3-(5-hydroxy-4-oxo-2-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



A solution of *N*-bromosuccinimide (106.7 mg, 0,60 mmol, 2 equiv.) in THF (20 mL) was added slowly for 1h to a solution of **188e** (100.0 mg, 0,30 mmol, 1 equiv.) in THF (20 mL) already purged under argon and cooled at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then evaporated under reduced pressure to yield a yellow/orange oil. The residue was purified once on silica gel column chromatography using ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} : 90/10$) and a second time with preparative HPLC using a Sunfire C18 column and a gradient from $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{HCOOH}/\text{ACN} + 0,1\% \text{HCOOH} 98/2$ to $0/100$ for 30 min to yield **193e** (10.2 mg, 0.02 mmol, 7% yield) as a white solid.

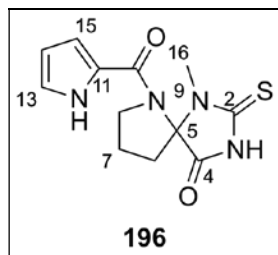
$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ ($487.92\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	White solid
HPLC $r_t = 14.5$ min	Visible UV (270 nm)
RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz, 298K): $\delta = 7.91$ (2H, br s, $\text{H}_{3',5'}$), 7.27 (1H, br s, $\text{H}_{4'}$), 6.78 (1H, s, H_{15}), 3.32 (2H, m, H_8), 1.9 (2H, m, H_6), 1.63 (1H, m, H_{7a}), 1.57 (1H, m, H_{7b}).	
RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz, 298K) missing	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 488.9232; found, 488.9210	
Mass (ESI$^+$): m/z 488.9 / 490.9 / 492.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$	
IR ($\nu_{\text{max}}\text{ cm}^{-1}$): 3115 (O-H), 2932 (N-H), 1714 (C=O amide), 1617 (C=O amide), 1555 et 1516 (C=C thiophene), 1529 et 1409 (C=C pyrrole), 1117 (C-O).	

193f. *N*-(3-(2-((1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)-5-hydroxy-4-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-5-yl)propyl)-3,4,5-tribromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide



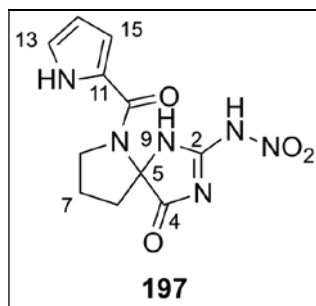
N-bromosuccinimide (17 mg, 0.09 mmol, 1 equiv.) was added slowly to a solution of **184d** (36.5 mg, 0.09 mmol, 1 equiv.) in DMF (1 mL) already purged under argon and cooled at –60°C for 15 min. The reaction mixture was stirred for 1 h 15 at –60 °C and then evaporated under reduced pressure to yield a yellow/orange oil. The residue was then purified on preparative HPLC using a Sunfire C18 column and a gradient from H₂O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH 98/2 to 0/100 for 30 min to yield **193f** (15.0 mg, 0.02 mmol, 26% yield) as a white solid.

C ₁₈ H ₁₆ Br ₃ N ₇ O ₃ (618.08 g.mol ⁻¹)	White solid
HPLC rt = 11.7 min	Visible UV (270 nm)
RMN ¹H (CD ₃ OD, 500 MHz, 298K): δ = 7.52 (2H, m, H3',6'), 7.41 (2H, m, H4',5'), 3.43 (2H, m, H8), 1.99 (2H, m, H6), 1.80 (1H, m, H7a), 1.68 (1H, m, H7b).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 125 MHz, 298K): δ = 174.5 (C4), 161.1 (C10), 157.7 (C9'), 152.2 (C2), 131.7 (C2',7'), 126.3 (C4',5'), 126.2 (C11), 106.5 (C6',3'), 106.5 (C13), 104.1 (C15), 101.4 (C14), 93.0 (C5), 40.4 (C8), 34.8 (C6), 24.3 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): <i>m/z</i> calcd. for C ₁₈ H ₁₇ Br ₃ N ₇ O ₃ [M+H] ⁺ , 615.8943; found, 615.8942	
Mass (ESI⁺): <i>m/z</i> 615.9 / 617.9 / 619.9 / 621.9 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3130 (O-H), 2932 (N-H), 1704 (C=O amide), 1627 (C=O amide), 1583 et 1540 (C=C phenyl), 1505 et 1425 (C=C pyrrole), 1191 (C-O).	

196. 1-methyl-6-(1*H*-pyrrole-2-carbonyl)-2-thioxo-1,3,6-triazaspiro[4.4]nonan-4-one

186 (50 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.) was dissolved in trifluoroacetic acid (0.7 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Finally methanol (5 mL) was added and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure to yield a yellow/green solid. The residue was then purified twice on silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15 to yield **196** (10.0 mg, 0.04 mmol, 22% yield) as a yellow solid.

C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S (278.33 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC R _f = 0.78 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 300 MHz, 298K): δ = 7.00 (1H, s, H13), 6.83 (1H, s, H15), 6.26 (1H, s, H14), 4.12 (1H, m, H8a), 4.05 (1H, m, H8b), 3.09 (3H, s, H16), 2.28 (4H, m, H6,7).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 75 MHz, 298K): δ = 182.8 (C4), 176.1 (C2), 162.5 (C10), 125.3 (C11), 124.5 (C13), 115.7 (C15), 111.0 (C14), 84.7 (C5), 51.1 (C8), 34.9 (C6), 29.1 (C16), 24.9 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ , 279.0916; found, 279.0911	
Mass (ESI⁺): m/z 279.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 3305 (N-H), 1744 (C=O amide), 1597 (C=O amide), 1514 et 1415 (C=C pyrrole), 1268 (C=S), 1137 (C-O).	

197. N-(4-oxo-6-(1H-pyrrole-2-carbonyl)-1,3,6-triazaspiro[4.4]non-2-en-2-yl)nitramide

184a (30 mg, 0.09 mmol, 1 equiv.) was dissolved in trifluoroacetic acid (0.7 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature and then 2 h at 50 °C. Finally methanol (5 mL) was added and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure to yield a yellow/green solid. The residue was then purified on silica gel column chromatography using (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) to yield **197** (12.3 mg, 0.04 mmol, 43% yield) as a yellow solid.

C ₁₁ H ₁₂ N ₆ O ₄ (292.25 g.mol ⁻¹)	White solid
TLC R _f = 0.53 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 90/10)	Visible UV (270 nm) revealed in brown with sulfuric vanillin
RMN ¹H (CD ₃ OD, 300 MHz, 298K): δ = 7.00 (1H, s, H13), 6.81 (1H, s, H15), 6.26 (1H, s, H14), 4.01 (1H, m, H8a), 3.98 (1H, m, H8b), 2.33 (4H, m, H6,7).	
RMN ¹³C (CD ₃ OD, 75 MHz, 298K): δ = 174.9 (C4), 162.5 (C2), 160.9 (C10), 125.4 (C11), 124.6 (C13), 115.6 (C15), 110.9 (C14), 81.4 (C5), 37.7 (C8), 24.9 (C6), 18.5 (C7).	
Mass (HRMS - ESI): m/z calcd. for C ₁₁ H ₁₃ N ₆ O ₄ [M+H] ⁺ , 293.0998; found, 293.0992	
Mass (ESI⁺): m/z 293.1 [M+H] ⁺	
IR (ν_{max} cm⁻¹): 2936 (N-H), 1775 (C=O amide), 1599 (C=O amide), 1417 (C=C pyrrole), 1520 et 1250 (NO ₂), 1171 (C-O).	

Biological testing

1. Cell culture and proliferation assay

The human epidermoid carcinoma KB cell lines were grown in D-MEM medium supplemented with 10 % fetal calf serum, in the presence of penicilline, streptomycine and fungisone in 75 cm³ flask under 5 % CO₂. Cells were collected by using tyrosine, washed with 10 mL PBS, resuspended in 2 mL of trypsin and after 10 minutes the cells were recollected and centrifuged at 1 000 RPM. Cells were plated in 96-well tissue culture microplates at a density of 800 cell/well in 200 µL medium and treated 24 h later with compounds dissolved in DMSO. Controls received the same volume of DMSO. After 72 h exposure 40 µL MTS reagent (Promega) was added and incubated for 2 h: the absorbance was monitored at 490 nm and results expressed as the inhibition of cell proliferation calculates as the ratio [(OD490 treated/OD490 control) x 100].

2. Kinases assay

Test compounds were solubilised in DMSO to a concentration of 10 mM. This solution was diluted to 1 mM in DMSO and then to 0.1 mM in water and 3µL of this final solution is used in the test. The final volume for the reaction is 30 µL (3µL of the compound at 10 µM, 21 µL of the enzyme mixture (different kinase) and 6 µL of γ-[³³P] ATP) After 30 min incubation at 30 °C, aliquots of supernatant were spotted onto 2.5 x 3 cm pieces of Whatman P81 phosphocellulose paper and treated as described below. Kinases activities were tested at a maximum dose of 10 µM and tests were done in duplicated and triplicated for precision.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Lew, M.; Hung-Wen, L. *Comp. Nat. Prod. II.* **2010**, *2*, 623-650.
2. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
3. Al-Mourabit, A.; Zancanella, M. A.; Tilvi, S.; Romo, D. *Nat. Prod. Rep.* **2011**.
4. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170-244.
5. Butler, M. S. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 475-516.
6. Snutch, T. P. *NeuroRX* **2005**, *2*, 662-670.
7. Roylance, R.; Seddon, B.; McTiernan, A.; Sykes, K.; Daniels, S.; Whelan, J. *Clin. Oncol.* **2007**, *19*, 572-576.
8. Cortes, J.; Vahdat, L.; Blum, J. L.; Twelves, C.; Campone, M.; Roch[√]©, H.; Bachelot, T.; Awada, A.; Paridaens, R.; Goncalves, A.; Shuster, D. E.; Wanders, J.; Fang, F.; Gurnani, R.; Richmond, E.; Cole, P. E.; Ashworth, S.; Allison, M. A. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3922-3928.
9. Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *Modern Alkaloids* **2008**, Ed. Wiley-VCH.
10. Kornprobst, J. M. *Encyclopedia of marine natural products*; WILEY-BLACKWELL, **2010**; Vol. 2.
11. a) Borchellini, C.; Chombard, C.; Manuel, M.; Alivon, E.; Vacelet, J.; Boury-Esnault, N. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2004**, *32*, 823-837. b) Boury-Esnault, N. *Can. J. Zool.* **2006**, *84*, 205-224.
12. Shimizu, K.; Cha, J.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 6234-6238.
13. A., H. J. N.; van Soest, R. W. M. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of the Sponges*; Klumer Academic / Plenum Publishers: New York, 2002.
14. http://www.univ-perp.fr/fr/recherche/centres_de_recherche/
15. Kornprobst, J. M. **2005**, Substances d'Origines Marine (en 2 volumes) Editions TEC & DOC, Paris, 1-1830
16. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170-244.
17. Jones, A. C.; Blum, J. E.; Pawlik, J. R. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2005**, *322*, 67-81.

18. Fusetani, N. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *28*, 400-410.
19. Duque, C.; Bonilla, A.; Bautista, E.; Zea, S. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 459-467.
20. Huang, J. P.; McClintock, J. B.; Amsler, C. D.; Huang, Y. M. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2008**, *362*, 95-100.
21. a) Webster, N. S.; Wilson, K. J.; L., B. L.; Hill, R. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 434-444. b) Wang, G. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 545-551.
22. a) Bell, J. J. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **2008**, *79*, 341-353. b) Piel, J.; Lew, M.; Hung-Wen, L. *Comp. Nat. Prod. II* **2010**, 475-510.
23. Faulkner, D. J.; Unson, M. D.; Bewley, C. A. *Pure Appl. Chem* **1994**, *66*, 1983-1990.
24. a) Witte, U.; Barthel, D.; Tendal, O. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1994**, *183*, 41-52. b) Duckworth, A. R.; Wolff, C. W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2011**, *In Press*, *Corrected Proof*. c) Duckworth, A. R.; Battershill, C. N.; Schiel, D. R. *Aquaculture* **2004**, *242*, 237-250. d) Wilkinson, C. R.; Vacelet, J. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1979**, *37*, 91-104. e) de Voogd, N. J. *Aquaculture* **2007**, *262*, 54-64.
25. Braekman, J. C.; Dalozze, D. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 357-364.
26. Erpenbeck, D.; van Soest, R. W. M. *Mar. Biotechnology* **2007**, *9*, 2-19.
27. Chanas, B.; Pawlik, J. R.; Lindel, T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1997**, *208*, 185-196.
28. a) Köck, M.; Grube, A.; Seiple, I. B.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6586-6594. b) Forte, B.; Malgesini, B.; Piutti, C.; Quartieri, F.; Scolaro, A.; Papeo, G. *Marine Drugs* **2009**, *7*, 705-753. c) Feldman, K. S.; Fodor, M. *Synthesis.* **2009**, 3162-3173 d) Seiple, I. B.; S, S.; Young, I. S.; Lewis, C. A.; Yamaguchi, J.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1095-1098.
29. Grube, A.; Köck, M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4675-4678.
30. Tada, H.; Tozyo, T. *Chem. Lett.* **1998**, 803-804.
31. Cimino, G.; De Stéphano, S.; Minale, L. *Comp. Biochem. Physiol.* **1974**, *47*, 895-897.
32. Ahond, A.; Bedoya-Zurita, M.; Colin, M.; Fizames, C.; Ladoute, P.; Lavelle, F.; Laurent, D.; Poupat, E.; Pusset, J.; Thoison, O.; Potier, P. *C. R. Acad. Sci. Paris, série II* **1981**, *307*, 145-148.
33. Abou-Jneid, R.; Ghouami, S.; Martin, M.-T.; Dau, E. T. H.; Travert, N.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3933-3936.
34. Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Fattorusso, E. *J. Chem. Soc. D* **1971**, 1129-1130.
35. Al Mourabit, A.; Potier, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 237-243.

36. Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y. *Experientia* **1986**, *42*, 1176-1177.
37. Morales, J. J.; Rodriguez, A. D. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 629-631.
38. Assman, M.; Zea, S.; Köck, M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1593-1595.
39. Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Kobayashi, J.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2475-2478.
40. Carieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3587-3590.
41. Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; Vallefucio, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2283-2288.
42. Vergne, C.; Appenzeller, J.; Ratinaud, C.; Martin, M.-T.; Debitus, C.; Zaparucha, A.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 493-496.
43. Uemoto, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1581-1583.
44. Hu, J. F.; Peng, J.; Kasi, A. B.; Hamann, M. T. *J. Chem. Res.* **2005**, 427-428.
45. Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9917-9922.
46. Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9917-9922.
47. Tsuda, M.; Yasuda, T.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Sekiguchi, M.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4235-4238.
48. Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7893-7896.
49. Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **1998**, *38*, 6271-6274.
50. Li, C.-J.; Schmidz, F. J.; Kelly-Borges, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 387-389.
51. Mancini, I.; Guella, G.; Amade, P.; Roussakis, C.; Pietra, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6271-6274.
52. Voir par exemple : Kitawaga, I.; Kobayashi, J.; Kitanaka, K.; Kido, K.; Kyogoku, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2321-2328.
53. Williams, D. H.; Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Lett.* **1996**, *9*, 57-64.
54. Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Leet, J. E.; Gupta, R.; Schaufelberger, D. E.; Bates, R. B.; Clewlow, P. J.; Doubek, D. L.; Manfredi, K. P.; Rützler, K.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P.; Ward, F. B.; Bruck, M.; Camou, F. *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1621-1624.
55. Groszek, G.; Kantoci, D.; Pettit, G. R. *Liebigs Ann.* **1995**, *1995*, 715-716.
56. a) Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Killmer, L.; Hofmann, G.; Johnson, R. K. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *9*, 201-207. b) Inaba, K.; Sato, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 693-695.

57. de Nanteuil, G.; Ahond, A.; Guilhem, J.; Poupat, C.; Dau, E. T. H.; Potier, P.; Pusset, M.; Pusset, J.; Laboute, P. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 6019-6033.
58. Albizati, K. F.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4163-4164.
59. Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Lakshmi, V.; Tillekeratne, L. M. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 47-53.
60. Boyd, M. R.; Pettit, G. R.; Mc Nulty, J.; Herald, D. L.; Doubek, D. L.; Chapuis, J.-C.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 180-183.
61. Sharma, G.; Magdoff-Fairchild, B. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 4118-4124.
62. Fedoreyev, S. A.; Utkina, N. K.; Ilyin, S. G.; Reshetnyak, M. V.; Maximov, O. B. *Tetrahedron. Lett.* **1986**, *27*, 3177-3180.
63. Fedoreyev, S. A.; Ilyin, S. G.; Utkina, N. K.; Maximov, O. B.; Reshetnyak, M. V.; Antipin, M. Y.; Struchkov, Y. T. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3487-3492.
64. a) D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Debitus, C.; Ribes, O.; Pusset, J.; Leroy, S.; Pietra, F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1305-1306. b) Hong, T. W.; Jimenez, D. R.; Molinski, T. F. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 158-161.
65. S. Tilvi, C. Moriou, M.-T. Martin, J.-F. Gallard, J. Sorres, K. Patel, S. Petek, C. Debitus, L. Ermolenko and A. Al-Mourabit, *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 720-723.
66. Tsuda, M.; Uemoto, H.; Kobayashi, J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5709-5712.
67. Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501-503.
68. Endo, T.; Tsuda, M.; Okada, T.; Mitsuhashi, S.; Shima, H.; Kikuchi, K.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1262-1267.
69. Araki, A.; Tsuda, M.; Kubota, T.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2369-2371.
70. Araki, A.; Kubota, T.; Tsuda, M.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2099-2102.
71. Appenzeller, J.; Tilvi, S.; Martin, M.-T.; Gallard, J.-F.; El-bitar, H.; Dau, E. T. H.; Debitus, C.; Laurent, D.; Moriou, C.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4874-4877.
72. Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; Van Engen, D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6772-6773.
73. Tilvi, S.; Moriou, C.; Martin, M.-T.; Gallard, J.-F.; Sorres, J.; Patel, K.; Petek, S.; Debitus, C.; Ermolenko, L.; Al-Mourabit, A. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 720-723.
74. a) Keifer, P. A.; Schwartz, R. E.; Koker, M. E. S.; Hughes, R. G.; Rittschof, D.; Rinehart, K. L. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2965-2975. b) Rinehart, K. L. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 525-528.

75. Patel, K.; Laville, R.; Martin, M.-T.; Tilvi, S.; Moriou, C.; Gallard, J.-F.; Ermolenko, L.; Debitus, C.; Al-Mourabit, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4775-4779.
76. Nishimura, S.; Matsunaga, S.; Shibasaki, M.; Suzuki, K.; Furihata, K.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2255-2257.
77. Grube, A.; Immel, S.; Baran, P. S.; Köck, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6721-6724.
78. Wang, S.; Dilley, A. S.; Poullennec, K. G.; Romo, D. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7155-7161.
79. Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2309-2317.
80. Urban, S.; de Almeida Leone, P.; Carroll, A. R.; Fechner, G. A.; Smith, J.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 731-735.
81. Kinnel, R. B.; Gehrken, H. P.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3376-3377.
82. Kobayashi, H.; Kitamura, K.; Nagai, K.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2127-2129.
83. Grube, A.; Köck, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2320-2324.
84. Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Quinn, R. J. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4573-4574.
85. Kobayashi, J.; Suzuki, M.; Tsuda, M. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15681-15684.
86. Kato, T.; Shizuri, Y.; Izumida, H.; Yokoyama, A.; Endo, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2133-2136.
87. Kobayashi, H.; Kitamura, K.; Nagai, K.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2127-2129.
88. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 1-49.
89. Chanas, B.; Pawlik, J. R.; Lindel, T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1997**, *208*, 185-196.
90. Wilson, D. M.; Puyana, M.; Fenical, W.; Pawlik, J. R. *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 2811-2823-2823.
91. Assman, M.; Lichte, E.; Pawlik, J. R.; Köck, M. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, *207*, 255-262.
92. Lindel, T.; Hoffmann, H.; Hochgürtel, M.; Pawlik, J. R. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1477-1496-1496.

93. Yamada, A.; Kitamura, H.; Yamaguchi, K.; Fukuzawa, S.; Kamijima, C.; Yazawa, K.; Kuramoto, M.; Wang, G.-Y.-S.; Fujitani, Y.; Uemura, D. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 3061-3069.
94. Richards, J. J.; Huigens Iii, R. W.; Ballard, T. E.; Basso, A.; Cavanagh, J.; Melander, C. *Chem. Commun.* **2008**, 1698-1700.
95. Eder, C.; Proksch, P.; Wray, V.; Van Soest, R. W. M.; Ferdinandus, E.; Pattisina, L. A.; Sudarsono *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1295-1297.
96. Lavelle, F.; Zerial, A.; Fizames, C.; Rabault, B.; Curaudeau, A. *Invest. New Drugs* **1991**, *9*, 233-244-244.
97. Colson, G.; Rabault, B.; Lavelle, F.; Zerial, A. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1717-1723.
98. D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Pietra, F.; Ripamonti, M.; Debitus, C.; Waikedre, J. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 727-735
99. Meijer, L.; Thunnissen, A. M.; White, A. W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L. H.; Walter, J.; Cleverley, K. E.; Salinas, P. C.; Wu, Y. Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Kim, S. H.; Pettit, G. R. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.
100. Nakao, Y.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 689-710.
101. Hale, K. J.; Domostoj, M. M.; Tocher, D. A.; Irving, E.; Scheinmann, F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2927-2930.
102. Davis, R. A.; Fehner, G. A.; Sykes, M.; Garavelas, A.; Pass, D. M.; Carroll, A. R.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2497-2500.
103. Kinnel, R. B.; Gehrken, H.-P.; Swali, R.; Skoropowski, G.; Scheuer, P. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3281-3286.
104. Selvin, J.; Lipton, A. P. *Hydrobiologia* **2004**, *513*, 231-238
105. Hooper, J. N. A.; van Soest, R. W. M. *Sytem Porifera: A Guide to the Classification of the Sponges*; Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York, 2002.
106. a) Minale, L.; Sodano, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 1888-1892. b) Crist, B. V.; Djerassi, C. *Steroids* **1983**, *42*, 331-343.
107. Aknin, M.; Gaydou, E. M.; Boury-Esnault, N.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A. *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**, *113*, 845-848.
108. Minale, L.; Sodano, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1974**, *1*, 2380-2384.
109. Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 4259-4262.

110. a) Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 3911-3913. b) Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 269-270.
111. Di Blasio, B.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Pedone, C.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 473-478.
112. a) Rudi, A.; Goldberg, I.; Stein, Z.; Benayahu, Y.; Schleyer, M.; Kashman, Y. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3943-3944. b) Rudi, A.; Kashman, Y.; Benayahu, Y.; Schleyer, M. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1416-1423. c) Rudi, A.; Goldberg, I.; Stein, Z.; Kashman, Y.; Benayahu, Y.; Schleyer, M.; Gravalos, M. D. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1702-1712.
113. Rudi, A.; Akinin, M.; Gaydou, E. M.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 700-703.
114. Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Boyd, M. R.; Leet, J. E.; Dufresne, C.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M.; Cerny, R. L.; Hooper, J. N. A.; Rutzler, K. C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3339-3340.
115. Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Akinin, M.; Gaydou, E. M. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, *1994*, 1181-1185.
116. Warabi, K.; Hamada, T.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Hirota, H.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13262-13270.
117. Kornprobst, J. M. *Encyclopedia of marine natural products*; WILEY-BLACKWELL, 2010; Vol. 2.
118. Randazzo, A.; Dal Piaz, F.; Orrù, S.; Debitus, C.; Roussakis, C.; Pucci, P.; Gomez-Paloma, L. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2659-2665.
119. Krohn, A.; Redshaw, S.; Ritchie, J. C.; Graves, B. J.; Hatada, M. H. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3340-3342.
120. Bascombe, K. C.; Peter, S. R.; Tinto, W. F.; Bissada, S. M.; McLean, S.; Reynolds, W. F. **1998**, *48*, 1461-1464.
121. Herb, R.; Carroll, A. R.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J.; Paul, V. J. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3089-3092.
122. Xu, H.; Wang, W.; Tang, Z.-Q.; Xu, T.-L.; Chen, L. *Hearing Research* **2006**, *220*, 95-105.
123. Kobayashi, J.; Y., O.; H., N.; Hirata, Y.; Wakamatsu, K.; Miyazawa, T. *Experientia* **1986**, *42*, 1064.
124. Tsukamoto, S.; Tane, K.; Ohta, T.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1576-1578.

125. Jahn, T.; König, G. M.; Wright, A. D.; Werheide, G.; Reitner, J. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 3883-3884.
126. Patel, K. Thèse de docteur en science, Université Paris-Sud Orsay, 20 Avril 2010.
127. Keifer, P. A.; Schwartz, R. E.; Koker, M. E. S.; Hughes, R. G.; Rittschof, D.; Rinehart, K. L. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2965-2975.
128. Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501-503.
129. Köck, M.; Junker, J.; Lindel, T. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2041-2044.
130. Grube, A.; Köck, M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4675-4678.
131. Djerassi, C.; Riniker, R.; Riniker, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 6362-6377.
132. Djerassi, C.; Cais, M.; Mitscher, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 2386-2398.
133. Harada, N.; Nakanishi, K. *Oxford University Press: Sendai, Japan*, **1983**.
134. Lindel, T.; Jacquot, D. E. N.; Zoellinger, M.; Kinnel, R. B.; McHugh, S.; Köck, M. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6353-6355.
135. Yasuda, T.; Araki, A.; Kubota, T.; Ito, J.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 488-491.
136. Jacquot, D. E. N.; Mayer, P.; Lindel, T. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1141-1148.
137. Baran, P. S.; Li, K.; O'Malley, D. P.; Mitsos, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 249-252.
138. Fedoreyev, S. A.; Ilyin, S. G.; Utkina, N. K.; Maximov, O. B.; Reshetnyak, M. V.; Antipin, M. Y.; Struchkov, Y. T. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3487-3492.
139. Grube, A.; Köck, M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4675-4678.
140. Seiple, I. B.; Su, S.; Young, I. S.; Nakamura, A.; Yamaguchi, J.; Jorgensen, L.; Rodriguez, R. A.; O'Malley, D. P.; Gaich, T.; Köck, M.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.*, *133*, 14710-14726.
141. Su, S.; Seiple, I. B.; Young, I. S.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16490-16491.
142. Faulkner, D. J. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1421-1443.
143. Sharma, G. M.; Burkholder, P. R. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 4147-4150.
144. Hamann, M. T.; Scheuer, P. J.; Kelly-Borges, M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6565-6569.
145. Ross, S. A.; Weete, J. D.; Schinazi, R. F.; Wirtz, S. S.; Tharnish, P.; Scheuer, P. J.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 501-503.
146. Rodriguez, A. D.; Pina, I. C. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 907-914.
147. Hernandez-Guerrero, C. J.; Zubia, E.; Ortega, M. J.; Carballo, J. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5275-5282.

148. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Magno, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 55-60.
149. Lindel, T.; Hoffmann, H. *Liebigs Ann.* **1997**, *1997*, 1525-1528.
150. Lempert, K.; Breuer, J.; Lempert-Sréten, M. *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 235-239.
151. Olofson, A.; Yakushijin, K.; Horne, D. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1248-1253.
152. Lancini, G. C.; Lazzari, E.; Arioli, V.; Bellani, P. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 775-780.
153. Fresneda, P. M.; Molina, P.; Sanz, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 851-854.
154. Evans, D. A.; Britton, T. C.; Dorow, R. L.; Dellaria, J. F. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5525-5540.
155. Ando, N.; Terashima, S. *Synlett* **2006**, 2836-2840.
156. Kitawaga, I.; Kobayashi, J.; Kitanaka, K.; Kido, K.; Kyogoku, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2321-2328.
157. Braekman, J.-C.; Daloz, D.; Stoller, C.; Van Soest, R. W. M. *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 417-431.
158. Genta-Jouve, G.; Cachet, N.; Holderith, S.; Oberhänsli, F.; Teyssié, J.-L.; Jeffree, R.; Al Mourabit, A.; Thomas, O. P. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2298-2301.
159. D. E. N. Jacquot, T. Lindel, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 1551 – 1565
160. Travert, N.; Al-Mourabit, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10252-10253.
161. McElroy, A. B.; Clegg, S. P.; Deal, M. J.; Ewan, G. B.; Hagan, R. M.; Ireland, S. J.; Jordan, C. C.; Porter, B.; Ross, B. C. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2582-2591.
162. Vergne, C.; Boury-Esnault, N.; Perez, T.; Martin, M.-T.; Adeline, M.-T.; Tran Huu Dau, E.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2421-2424.
163. Gabant, M. Thèse de docteur en sciences, Université Paris Sud Orsay, septembre 2008.
164. Travert, N. Thèse de docteur en sciences, Paris XI-Orsay, Septembre 2003.
165. Tian, H.; Ermolenko, L.; Gabant, M.; Vergne, C.; Moriou, C.; Retailleau, P.; Al-Mourabit, A. *Adv. Synt. Catal.* **2011**, *353*, 1525-1533.
166. Lejeune, C. Thèse de docteur en sciences, Université Paris-Sud Orsay, Novembre 2010
167. Vergne, C. Thèse de docteur en sciences, Université Paris-Sud Orsay, Septembre 2006
168. Zhaoyu H. Rapport de stage M2 recherche, Université Paris-Sud Orsay, Juin 2009
169. Schroif-Grégoire, C.; Barale, K.; Zaparucha, A.; Al-Mourabit, A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2357-2359.

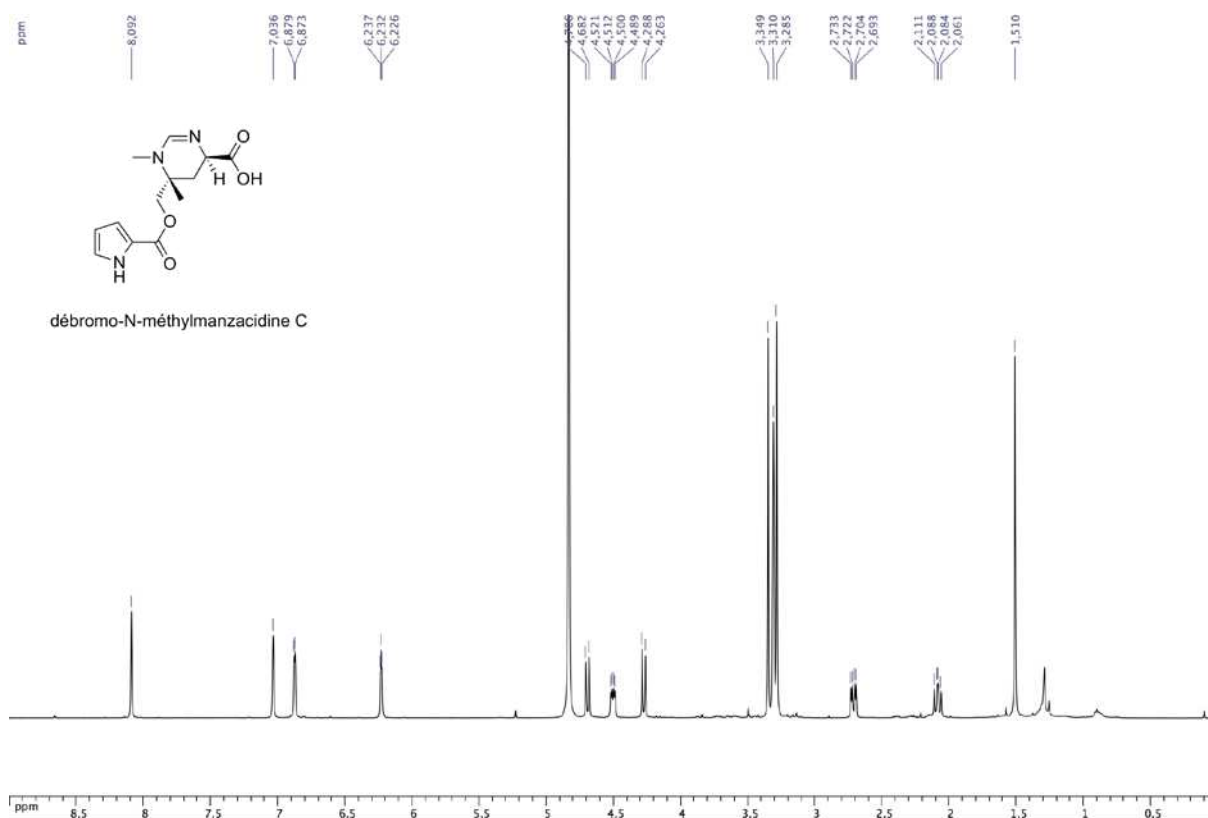
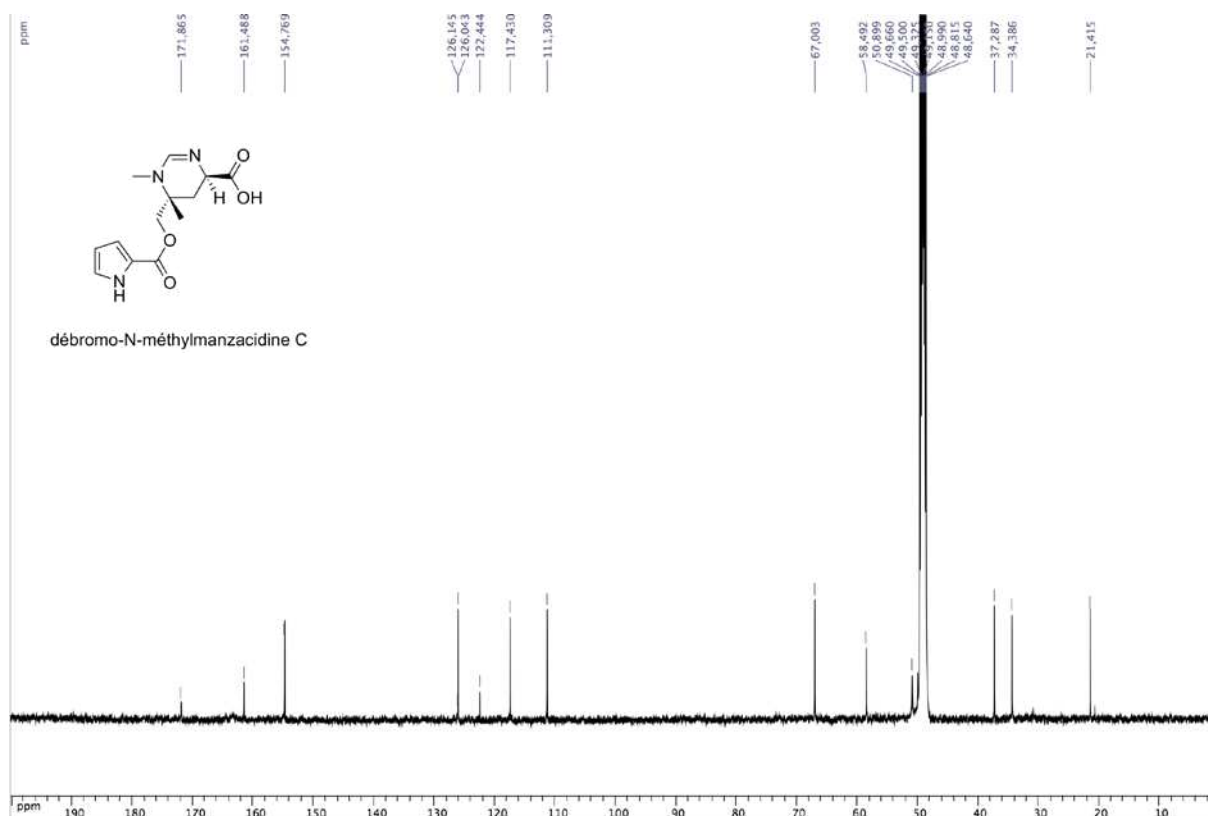
170. K. Barale, Thèse de docteur en sciences, Université Paris-Sud Orsay, 10 Octobre 2008.
171. Gilow, H. M.; Burton, D. E. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2221-2225.
172. Travert, N. Thèse de docteur en sciences, Paris XI-Orsay, 16 Septembre 2003.
173. Sanchez, I.; Pujol, M. D. *Synthesis* **2006**, *11*, 1823-1828.
174. Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 26-31.
175. Ferrer, I.; Barrachina, M.; Puig, B.; Martinez de Lagran, M.; Marti, E.; Avila, J.; Dierssen, M. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 392-400.
176. Droucheau, E.; Primot, A.; Thomas, V.; Mattei, D.; Knockaert, M.; Richardson, C.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Jafarshad, A.; Baratte, B.; Kunick, C.; Parzy, D.; Pearl, L.; Doerig, C.; Meijer, L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2004**, *1697*, 181-196.
177. Baunbaek, D.; Trinkler, N.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Ploypradith, P.; Rucirawat, S.; Ishibashi, F.; Iwao, M.; Meijer, L. *Marine Drugs* **2008**, *6*, 514-527

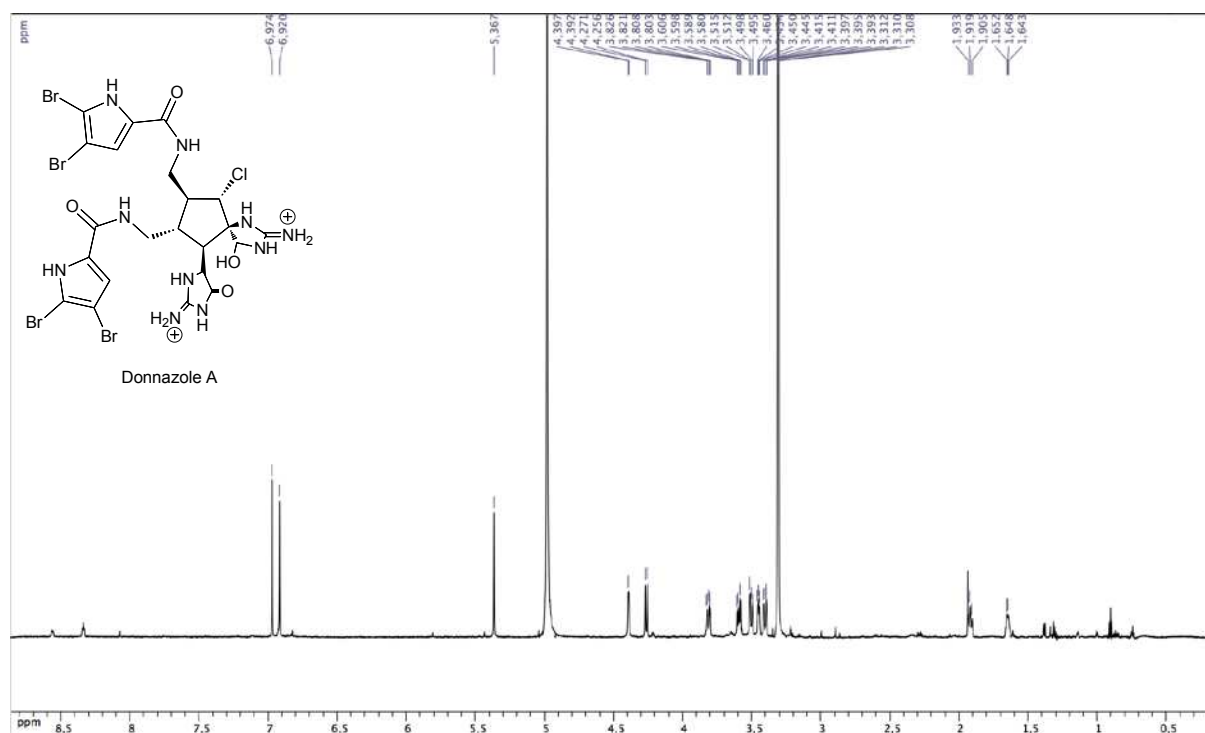
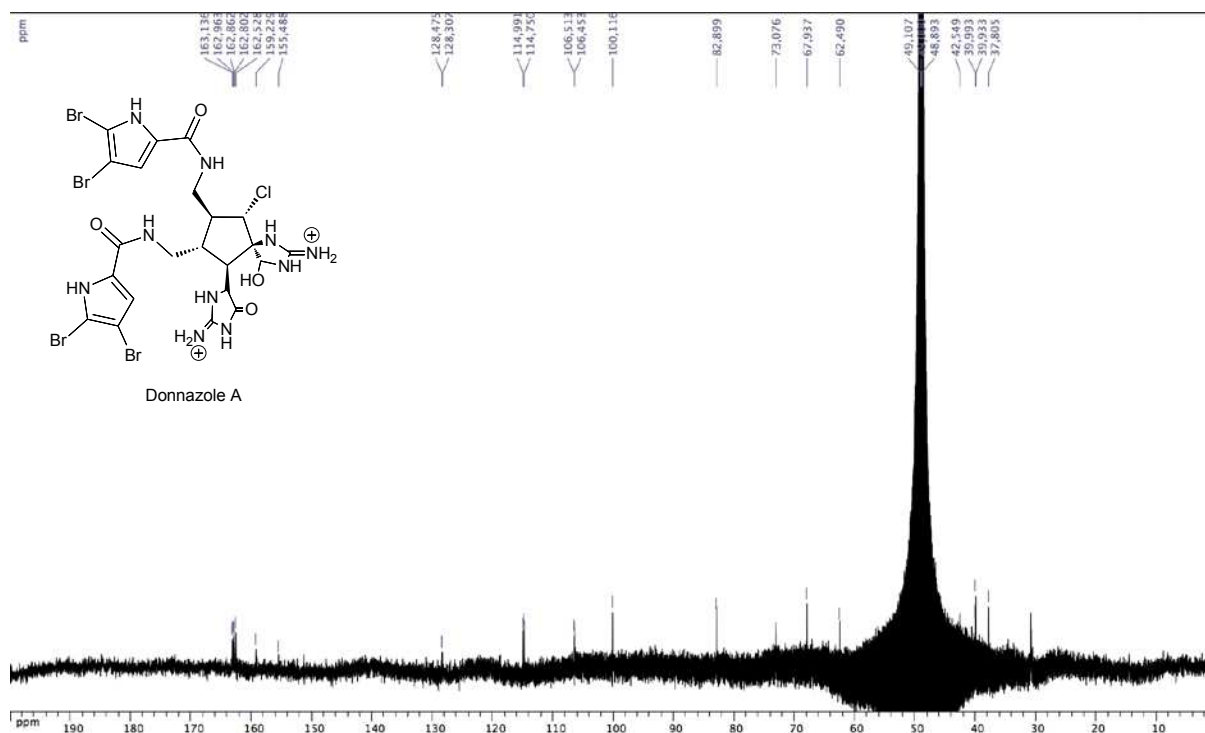
ANNEXES

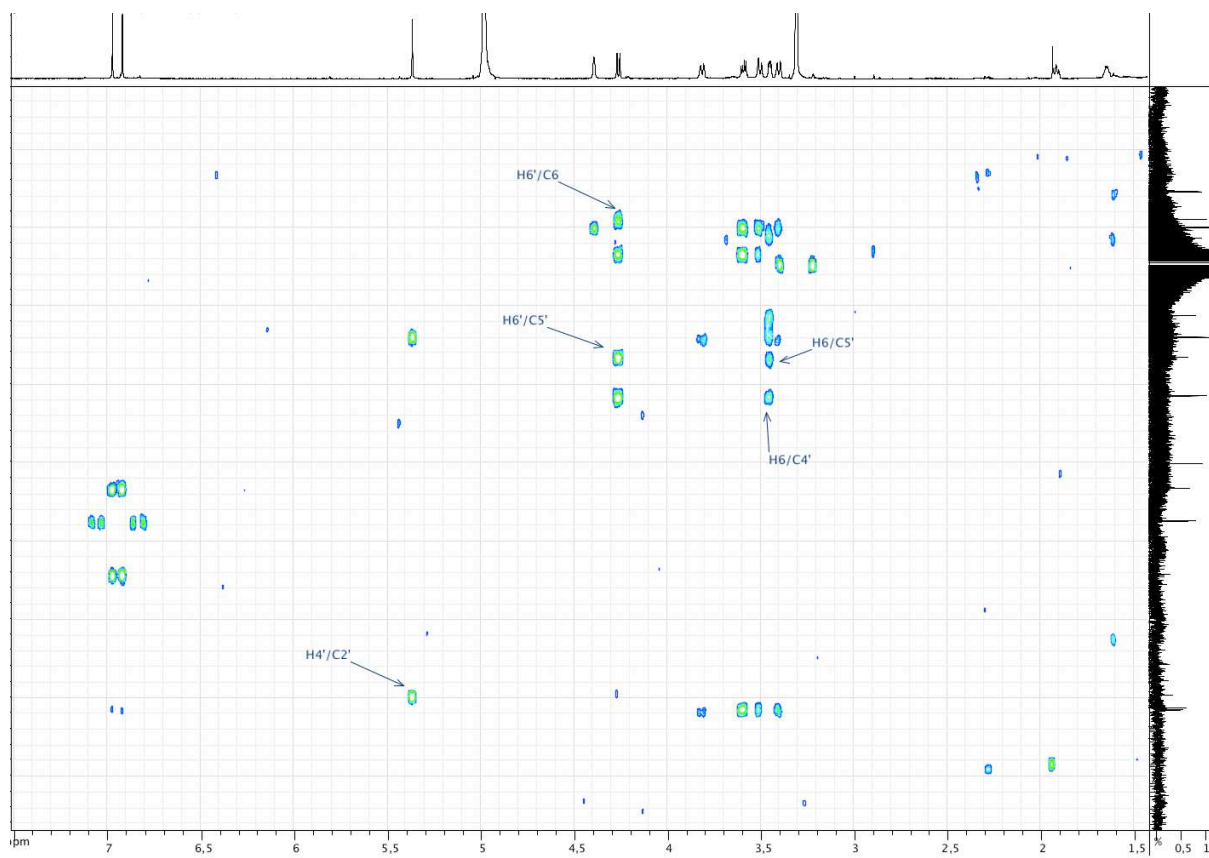
ANNEXES

Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 114 (débromo-N-méthylmanzacidine C).....	253
Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de 114 (débromo-N-méthylmanzacidine C).....	254
Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 117 (donnazole A).....	254
Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de 117 (donnazole A).....	254
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, CD_3OD) de 117 (donnazole A).....	255
Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 118 (donnazole B).....	256
Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 118 (donnazole B).....	256
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, CD_3OD) de 118 (donnazole B).....	257
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 118 (donnazole B).....	257
Zoom du spectre RMN HMQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ (60.7 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 118 (donnazole B).....	258
Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 120 (donnazole C).....	259
Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 120 (donnazole C).....	259
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 120 (donnazole C).....	260
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 120 (donnazole C).....	260
Zoom du spectre RMN ROESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 120 (donnazole C).....	261
Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 121 (donnazole D).....	262
Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de 121 (donnazole D).....	262
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 121 (donnazole D).....	263
Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 122 (donnazole E).....	264
Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 122 (donnazole E).....	264
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 122 (donnazole E).....	265
Zoom du spectre RMN ROESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 122 (donnazole E).....	265
Spectre RMN ^1H (950 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de 123 (Donnazole F).....	266

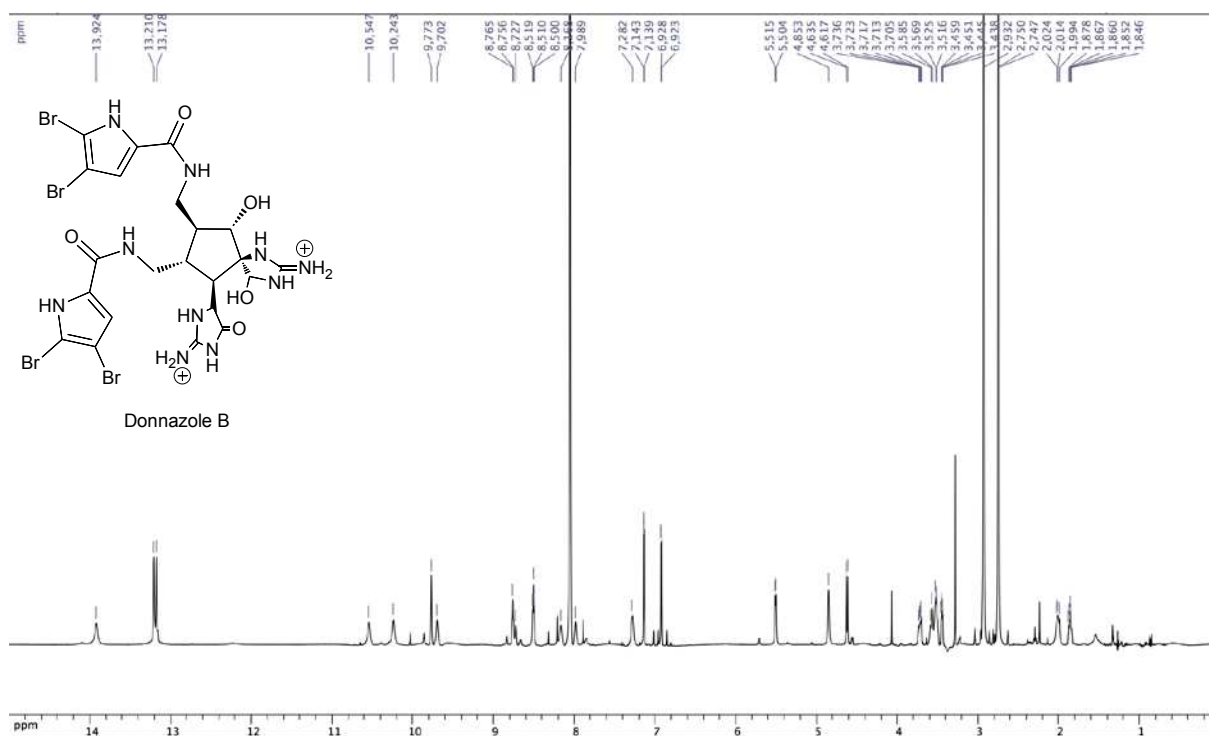
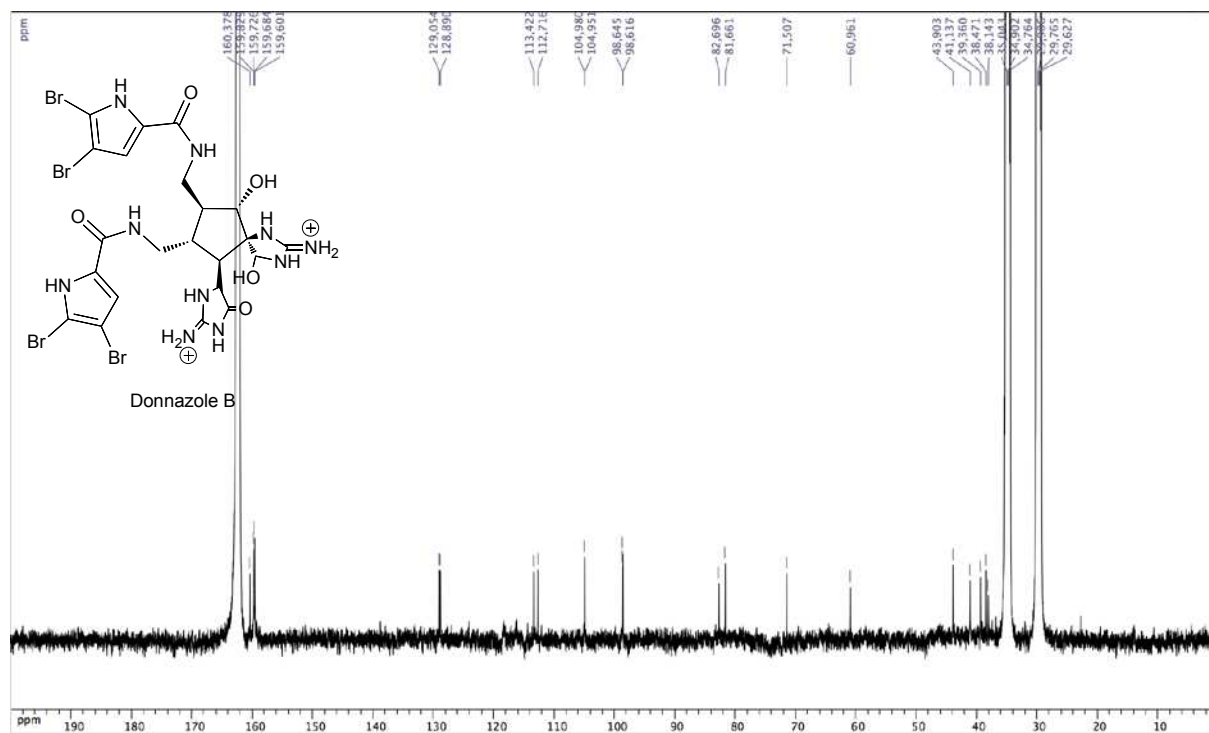
Spectre RMN ^{13}C (237 MHz, DMF-<i>d</i>7) de 123 (donnazole F).....	266
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, DMF-<i>d</i>7) de 123 (donnazole F).....	267
Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 130 (Donnazole G).....	268
Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de 130 (donnazole G)	268
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, CD_3OD) de 130 (donnazole G).....	269

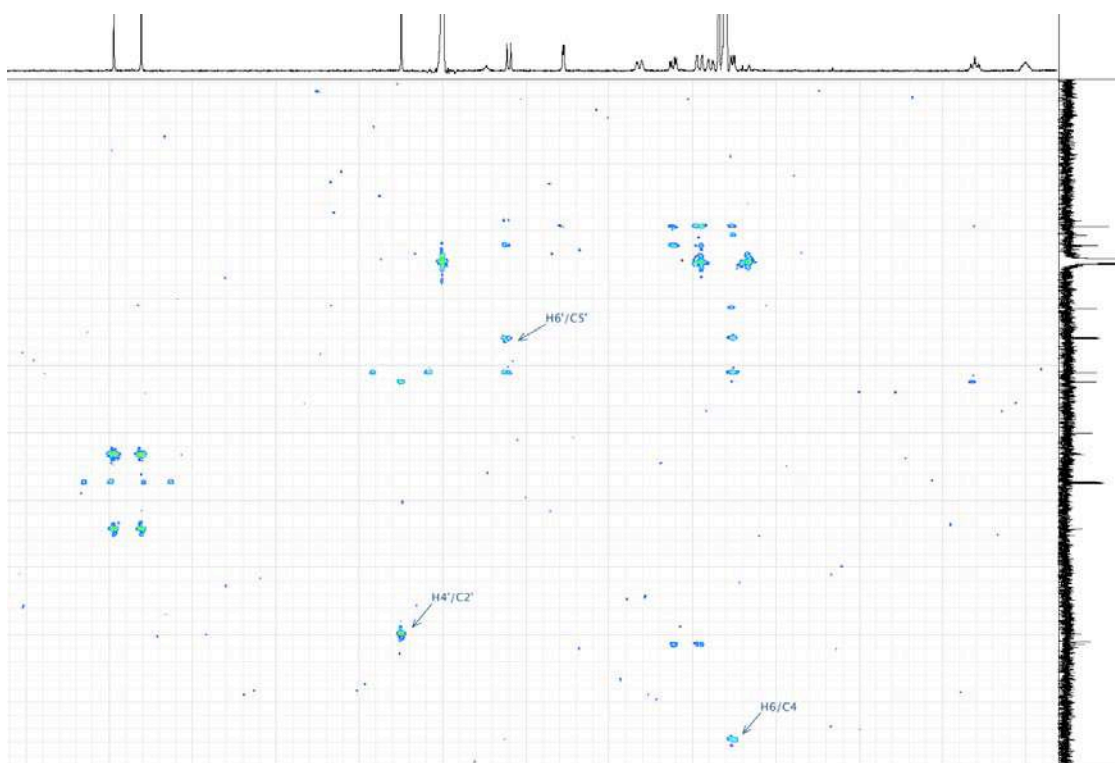
Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 114 (débromo-N-méthylmanzacidine C)

Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **114** (débromo-N-méthylmanzacidine C)Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **117** (donnazole A)Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **117** (donnazole A)

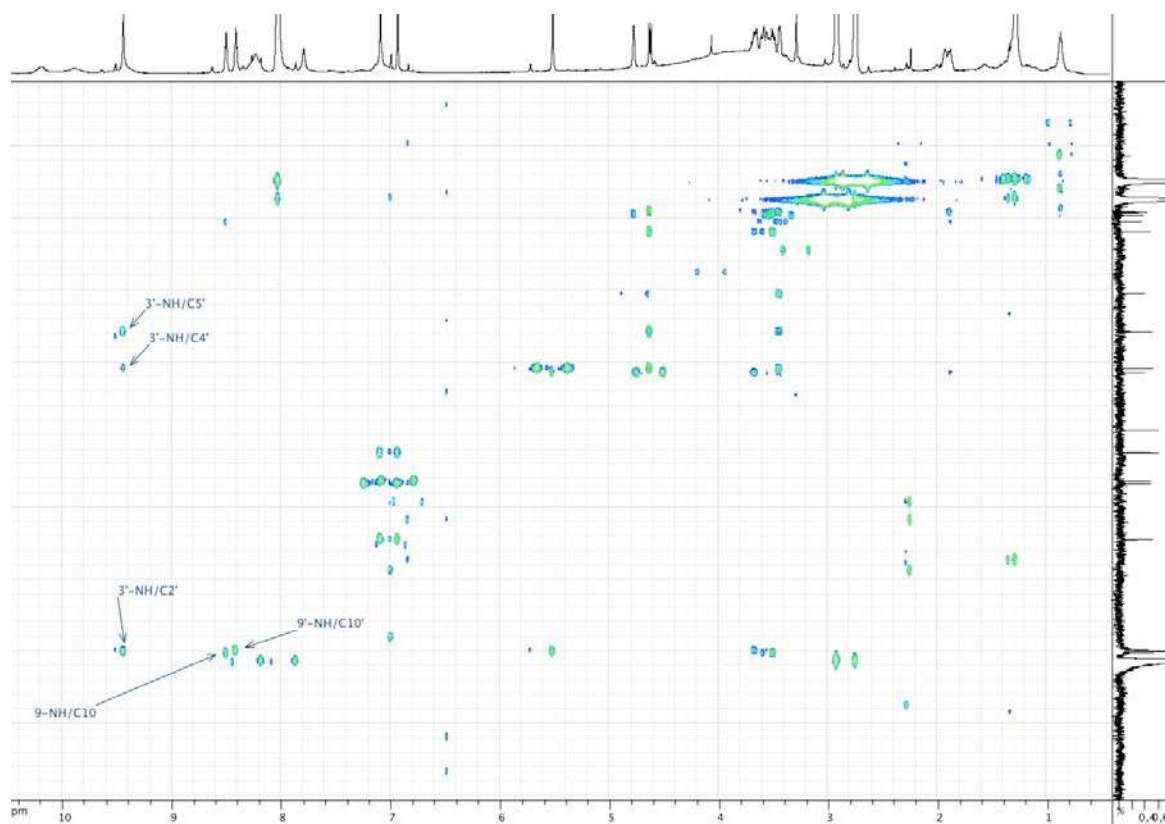


Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, CD_3OD) de **117** (donnazole A)

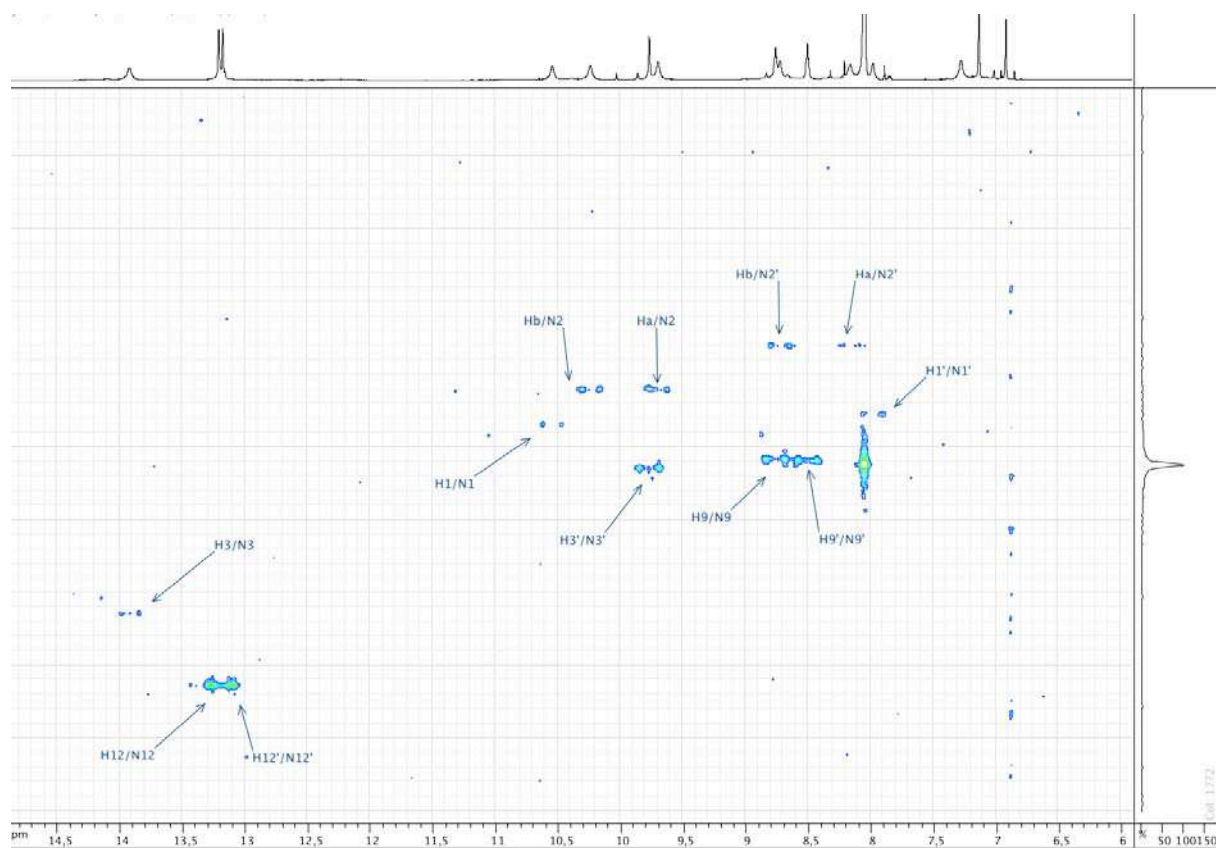
Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMF- d_7) de **118** (donnazole B)Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMF- d_7) de **118** (donnazole B)



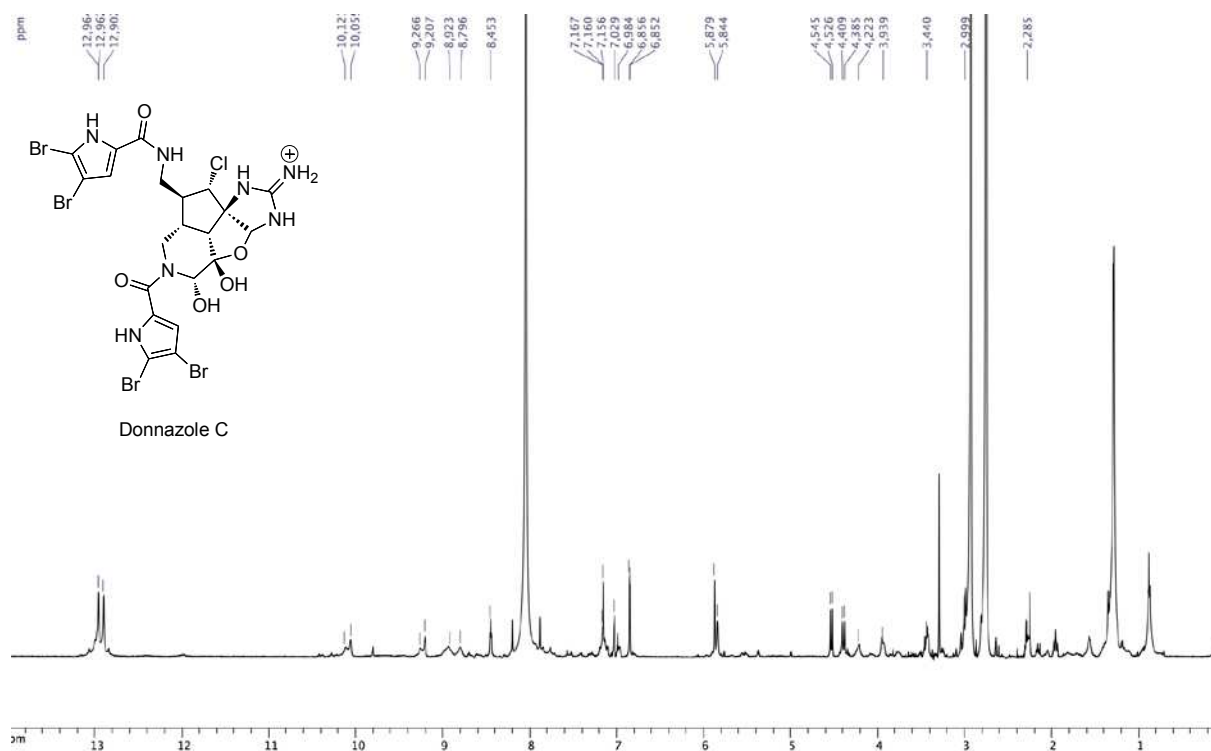
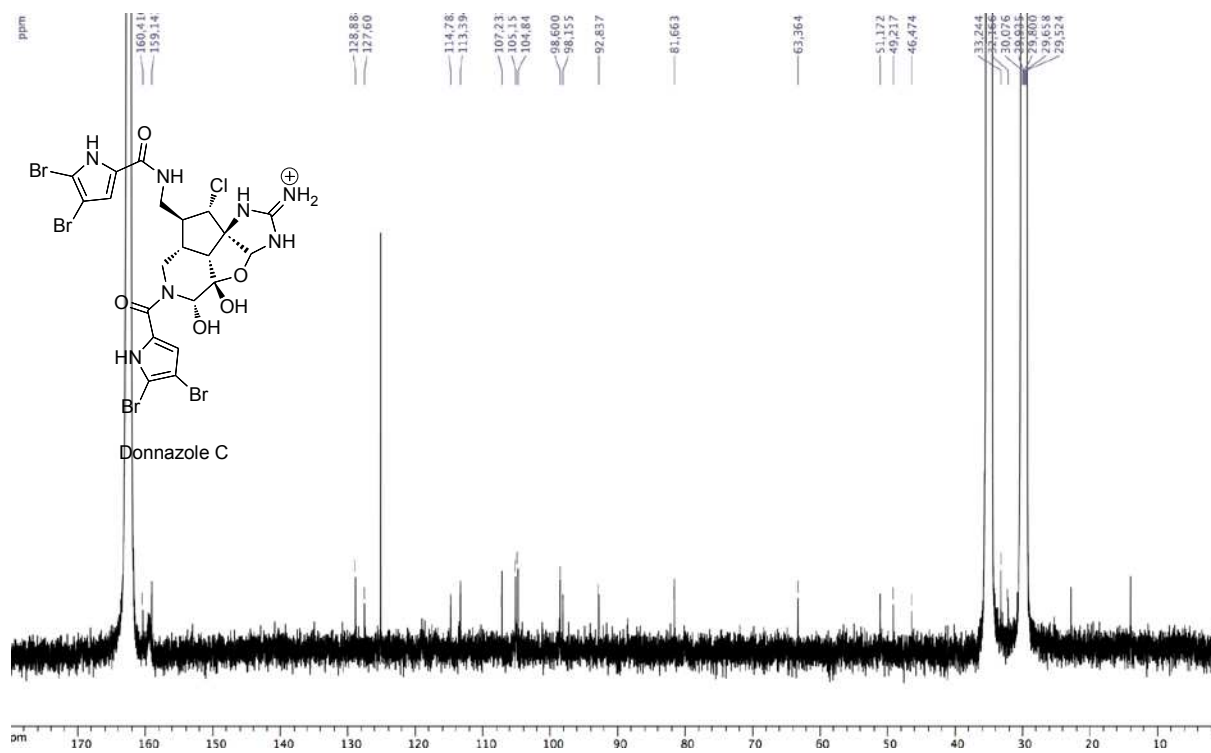
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, CD_3OD) de **118** (donnazole B)

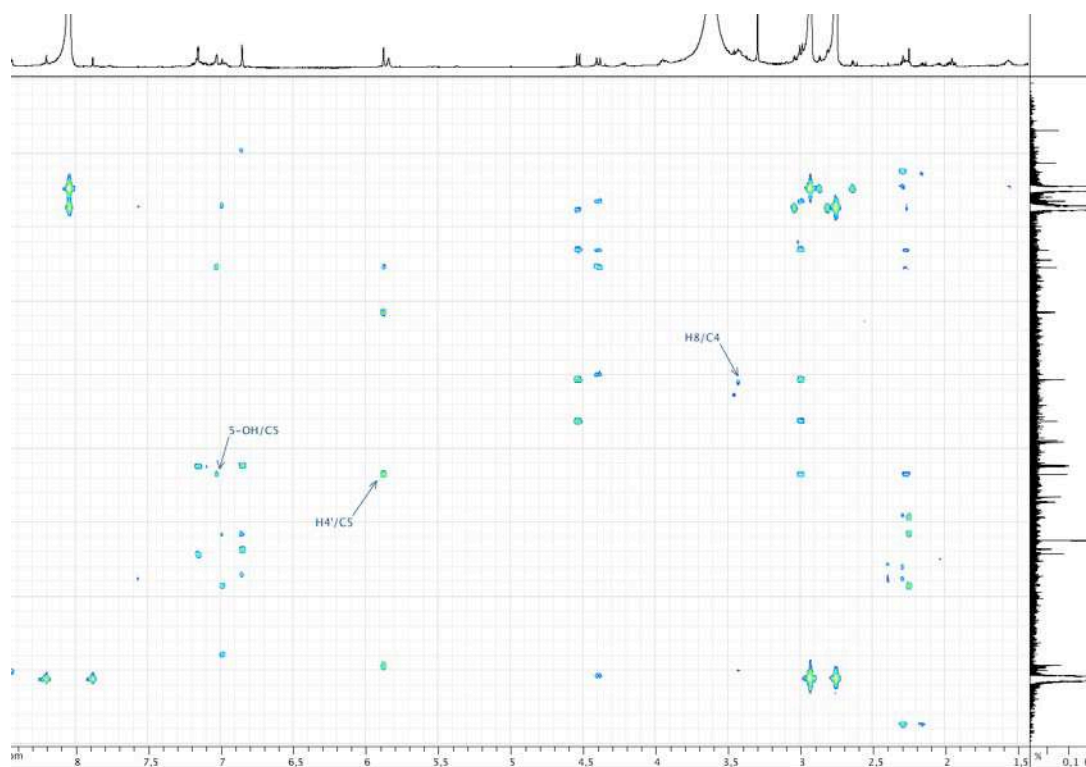


Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de **118** (donnazole B)

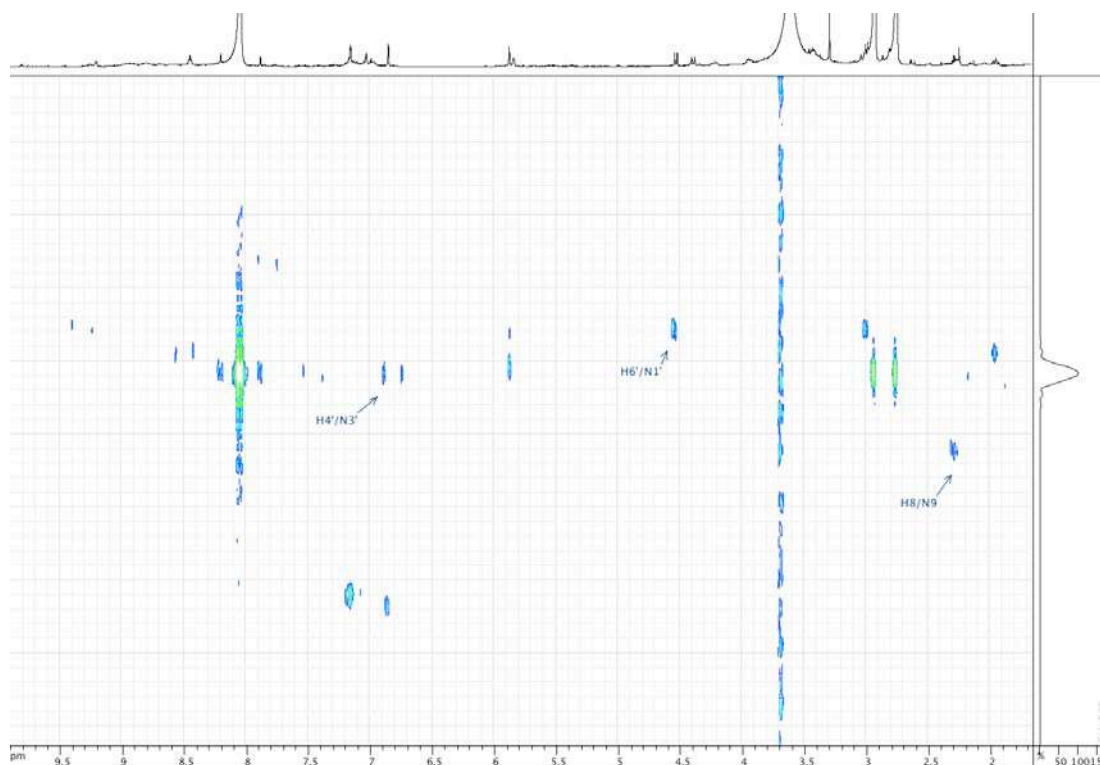


Zoom du spectre RMN HMQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ (60.7 MHz, DMF- d_7) de **118** (donnazole B)

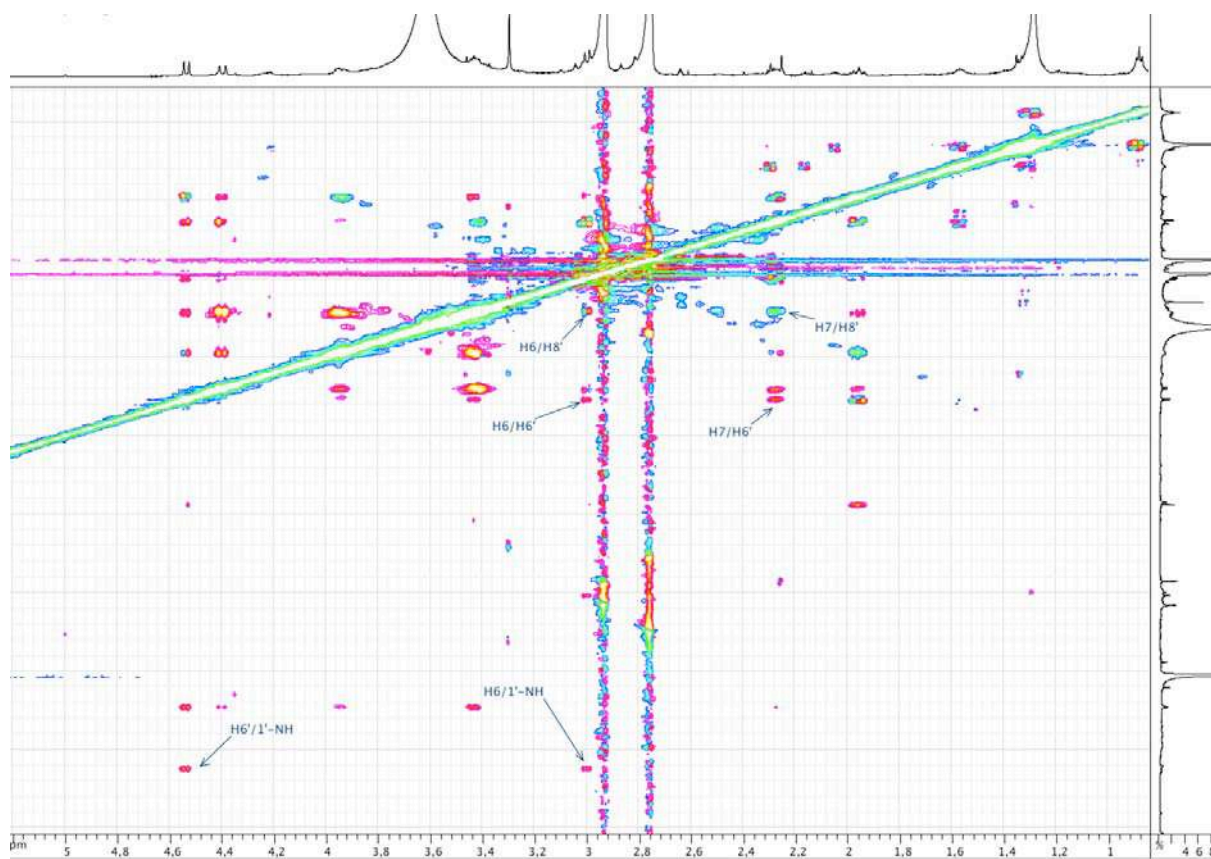
Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMF- d_7) de **120** (donnazole C)Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, DMF- d_7) de **120** (donnazole C)



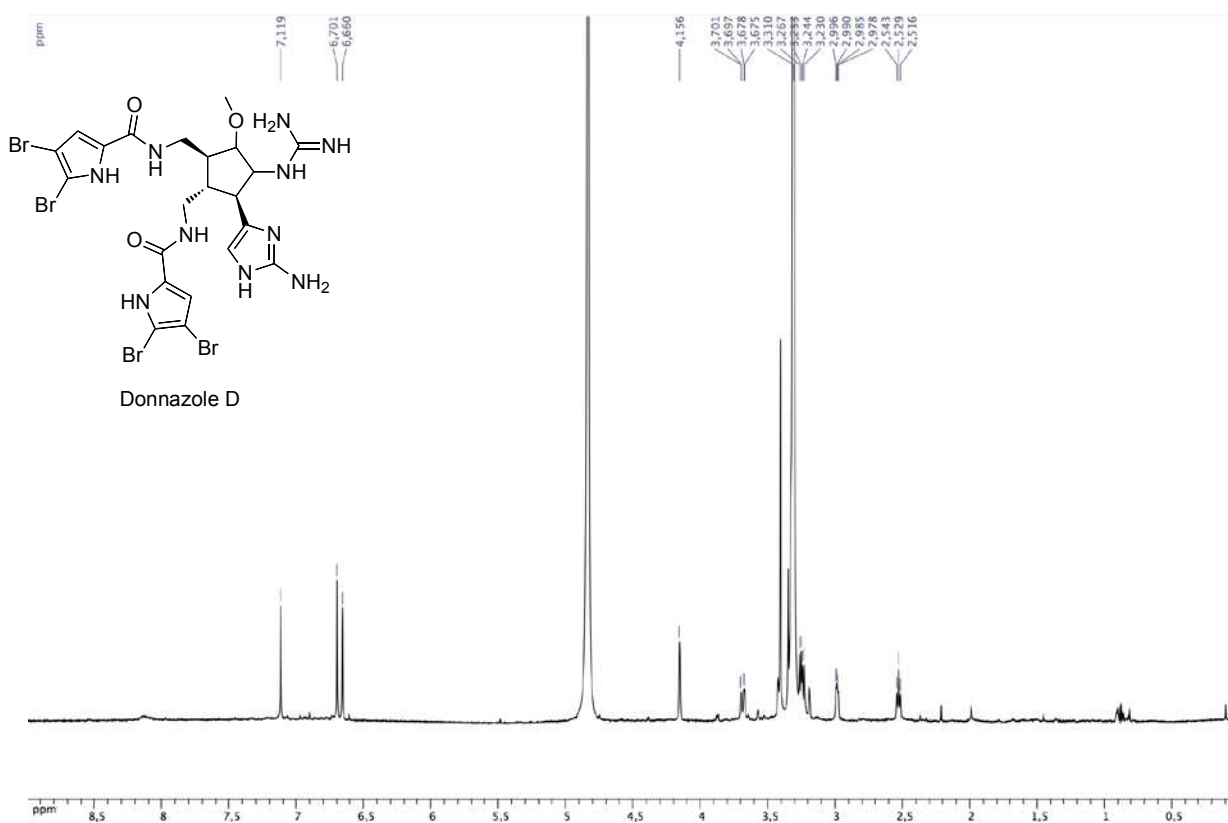
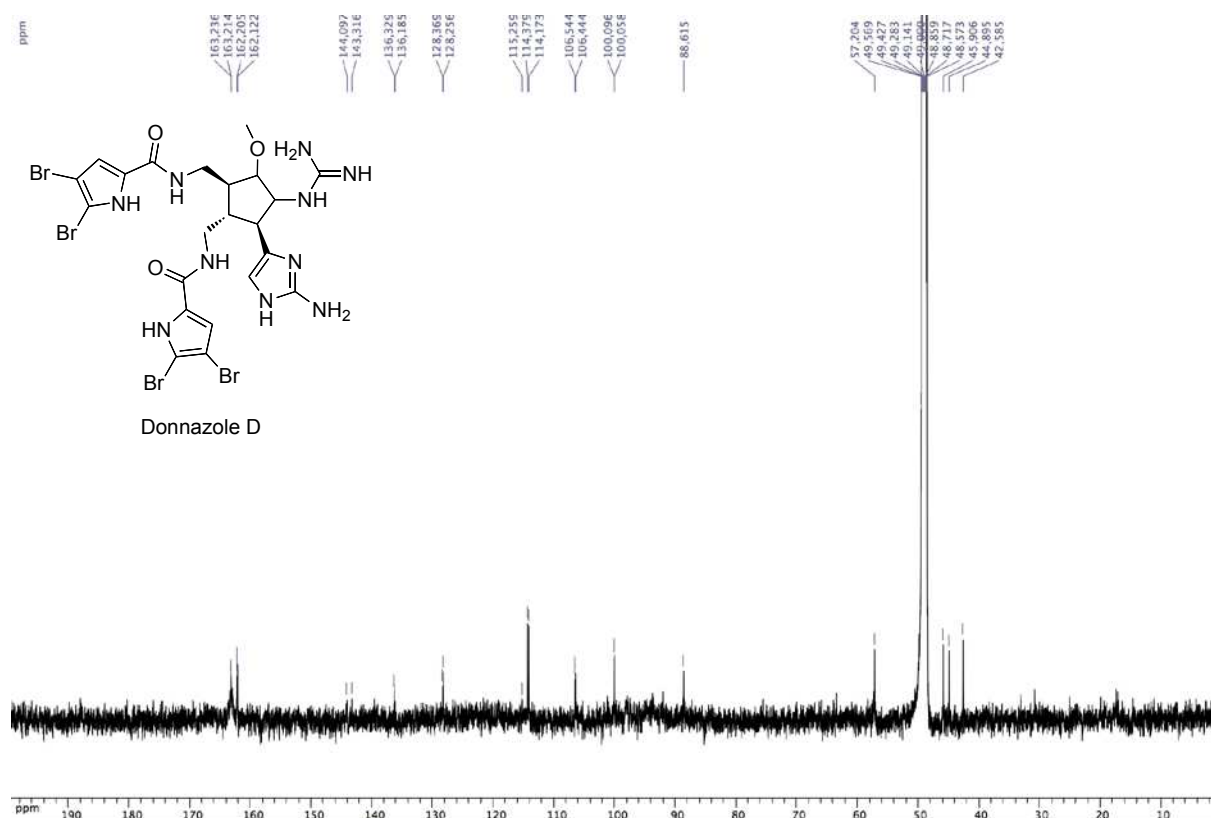
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, DMF- d_7) de **120** (donnazole C)

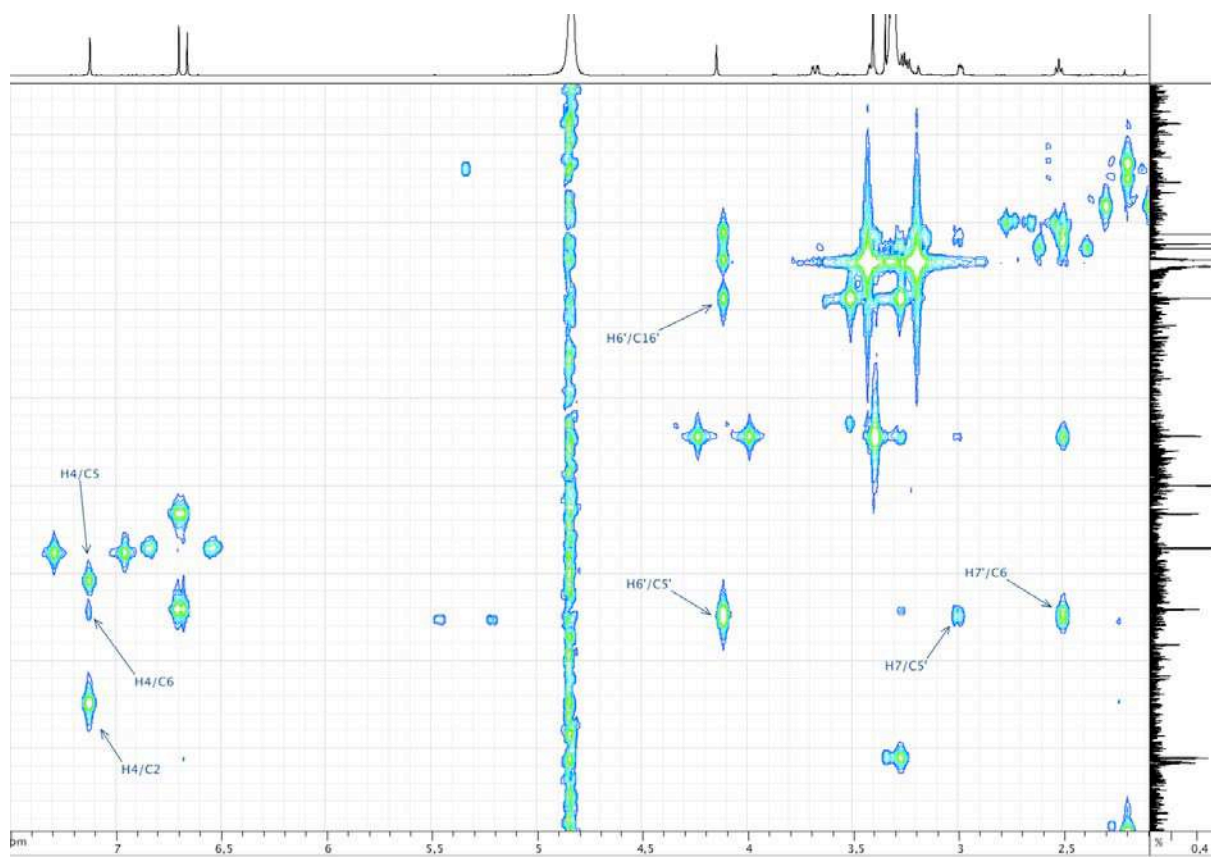


Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ (600 MHz, DMF- d_7) de **120** (donnazole C)

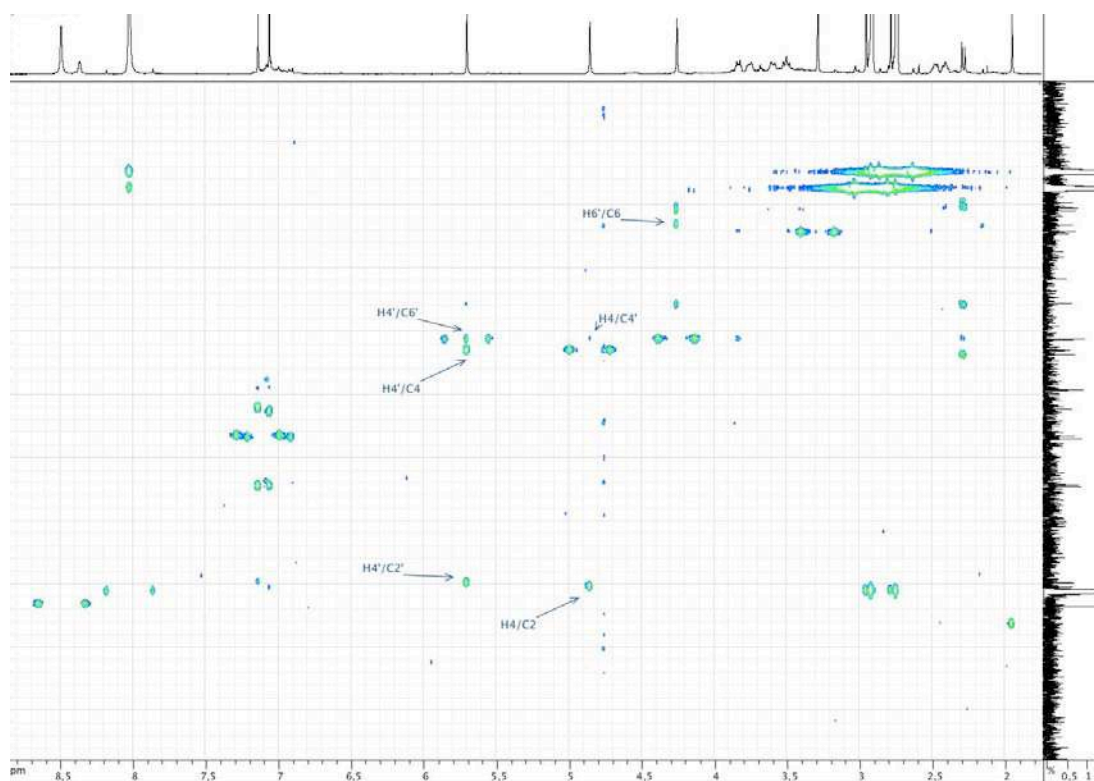


Zoom du spectre RMN ROESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (600 MHz, DMF- d_7) de **120** (donnazole C)

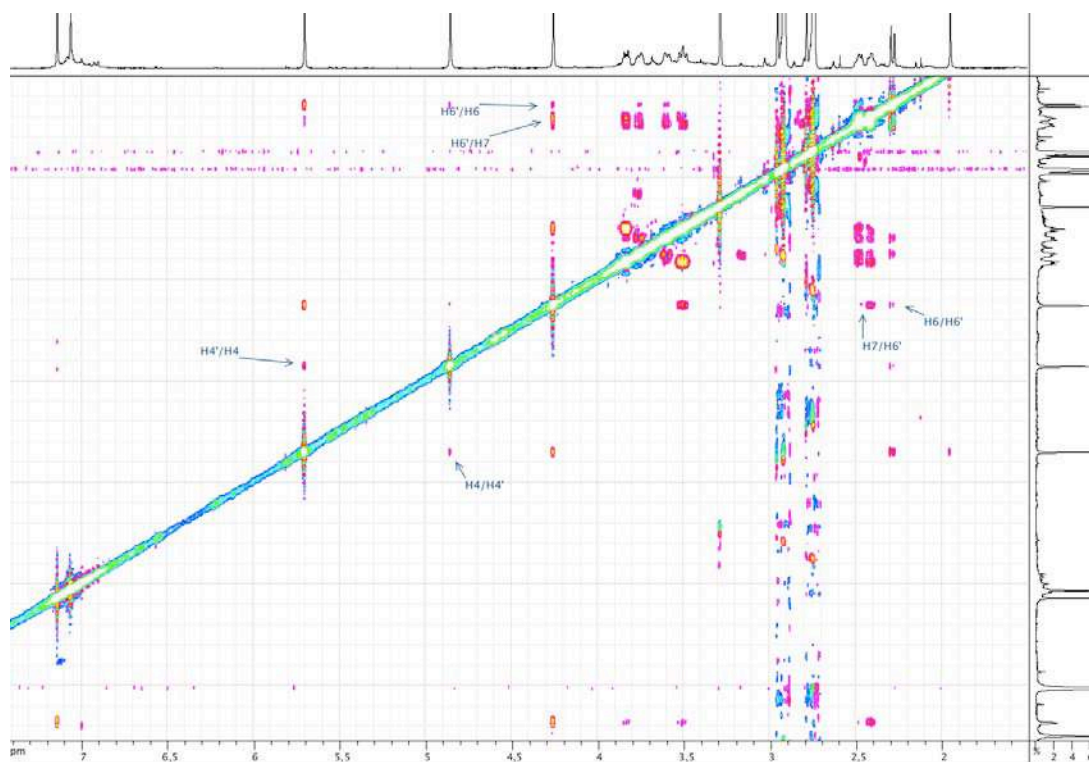
Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **121** (donnazole D)Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **121** (donnazole D)



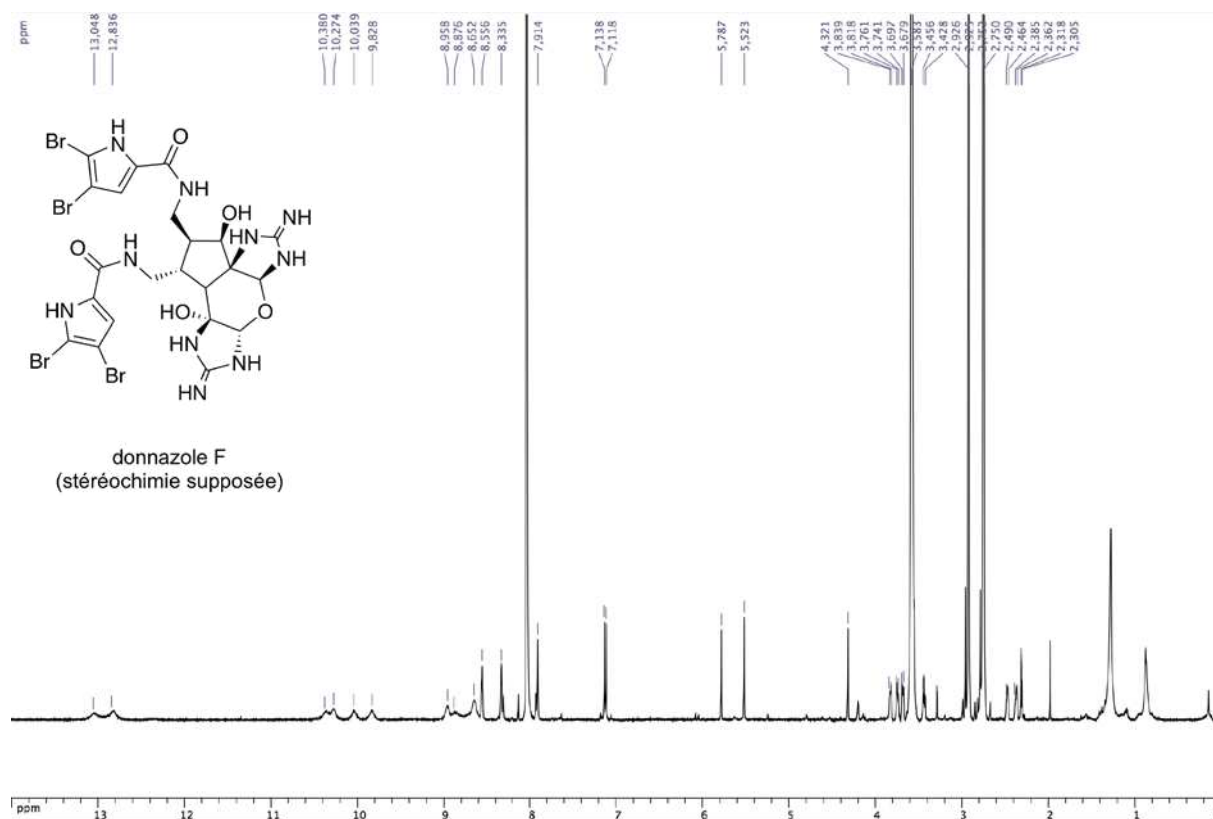
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, DMF-*d*7) de **121** (donnazole D)



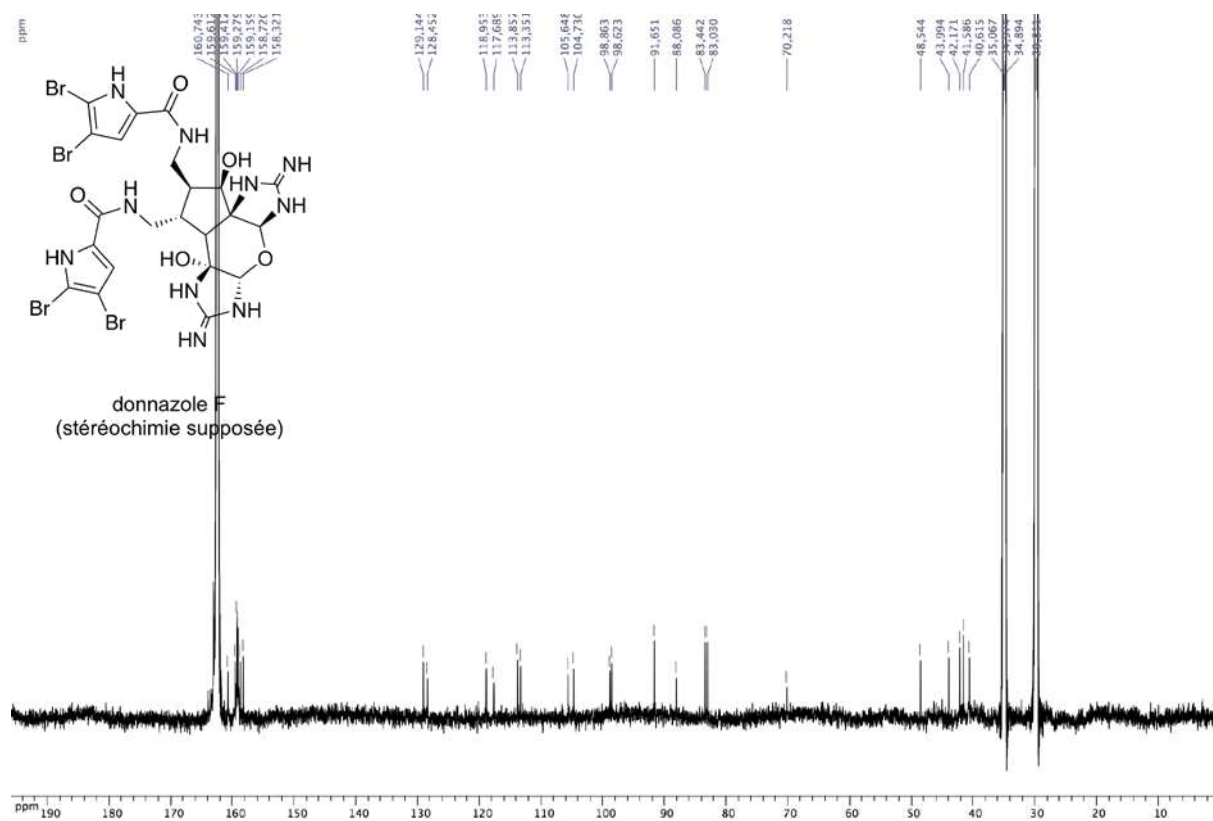
Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, DMF-*d*7) de **122** (donnazole E)



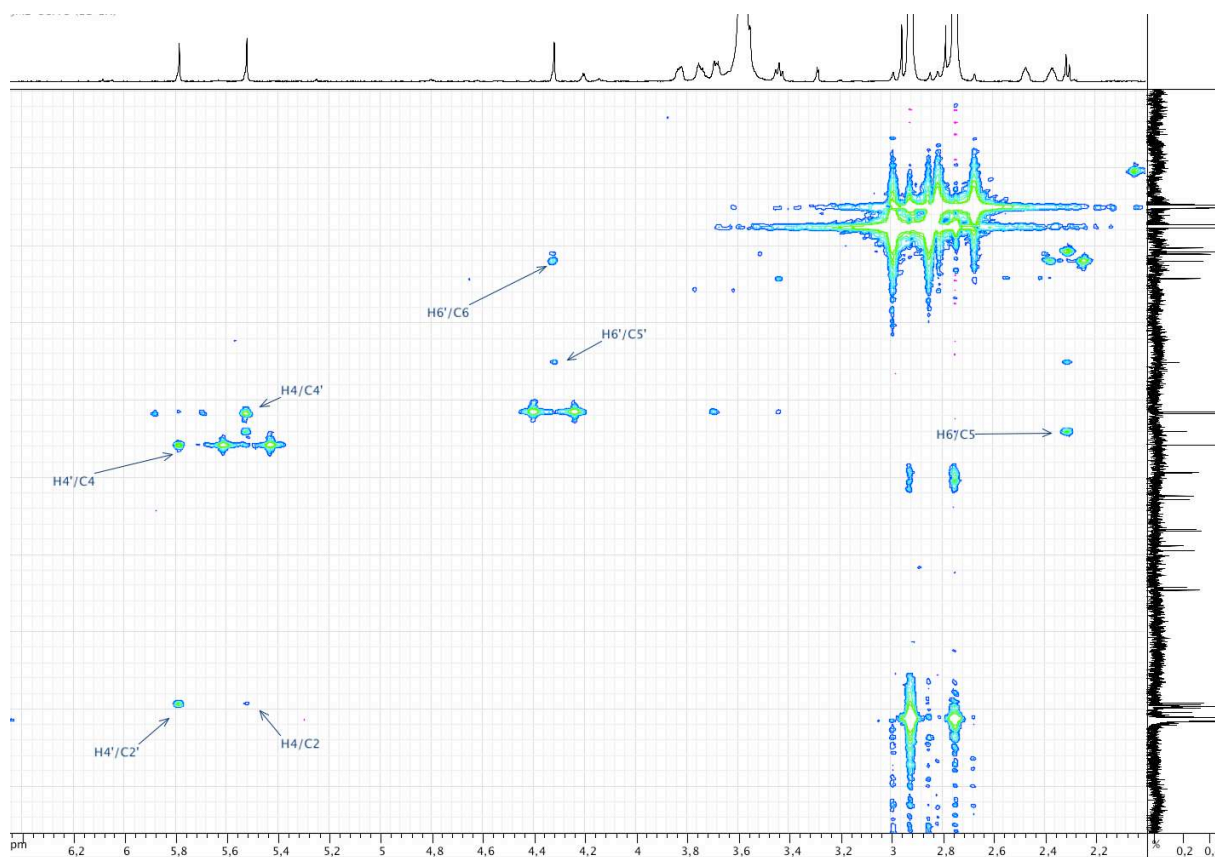
Zoom du spectre RMN ROESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (600 MHz, DMF-*d*7) de **122** (donnazole E)



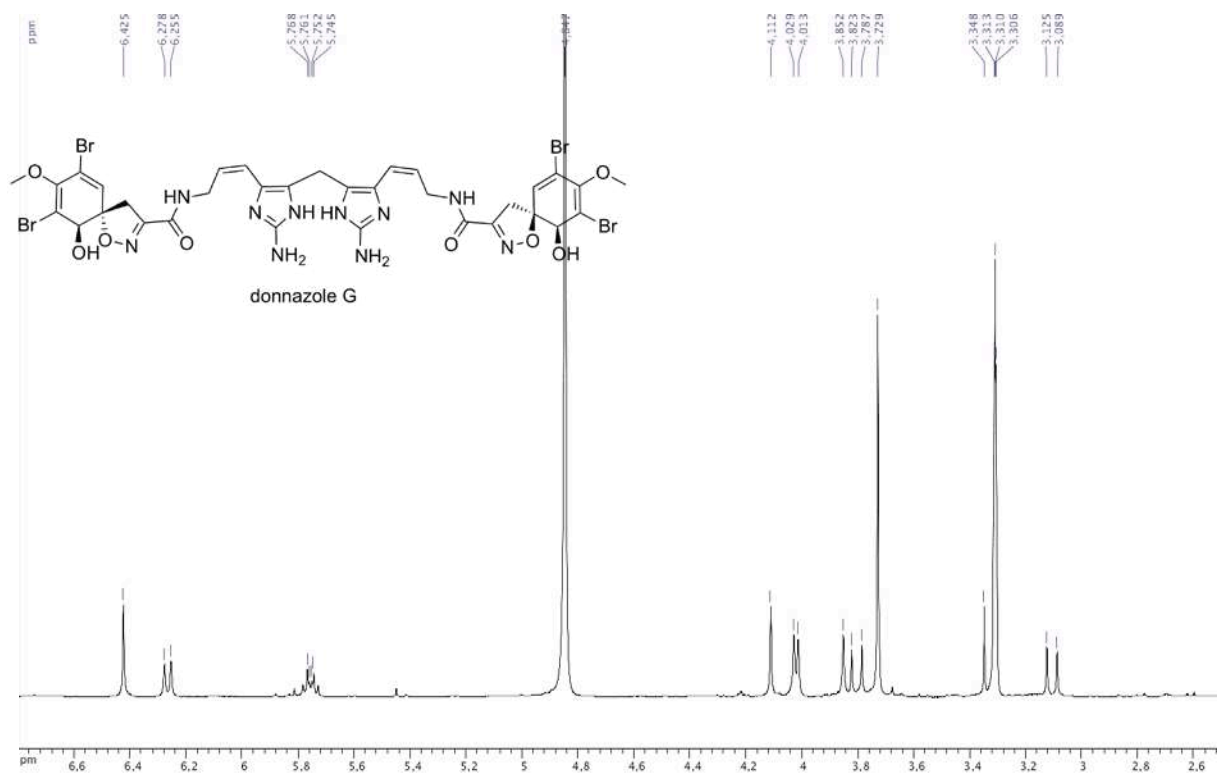
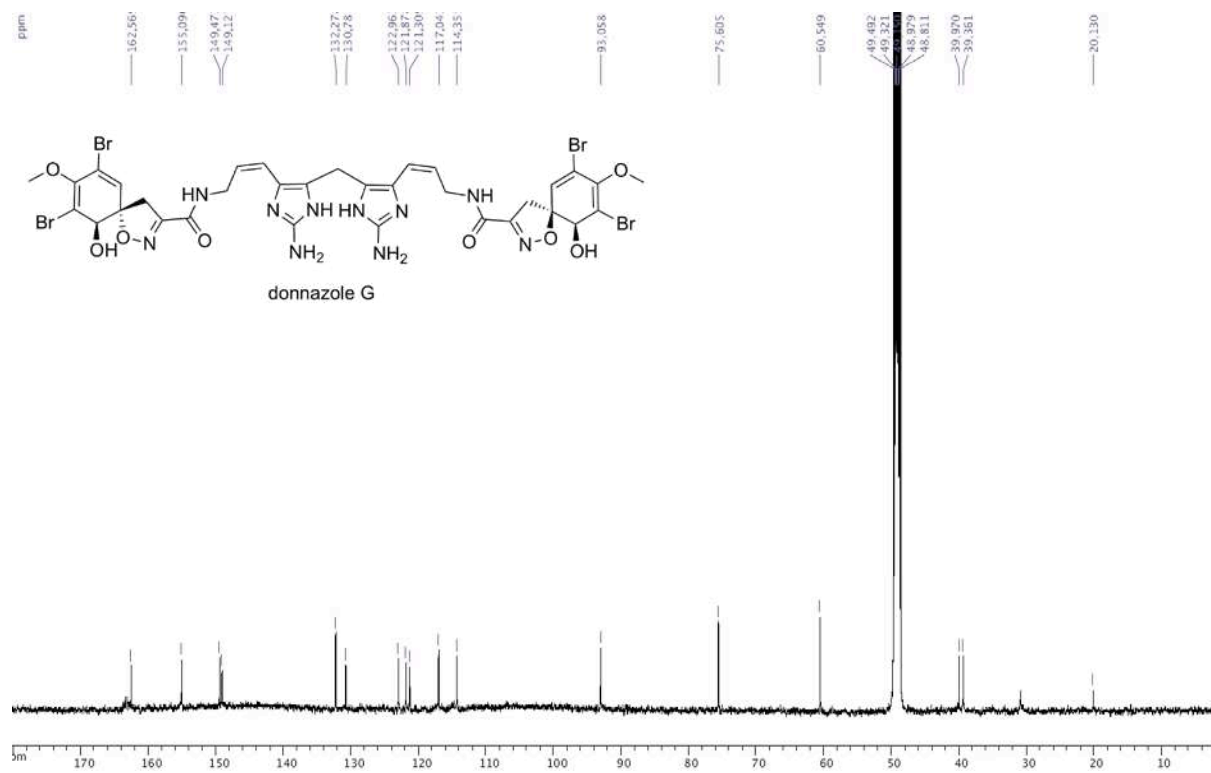
Spectre RMN ^1H (950 MHz, DMF- d_7) de **123** (Donnazole F)

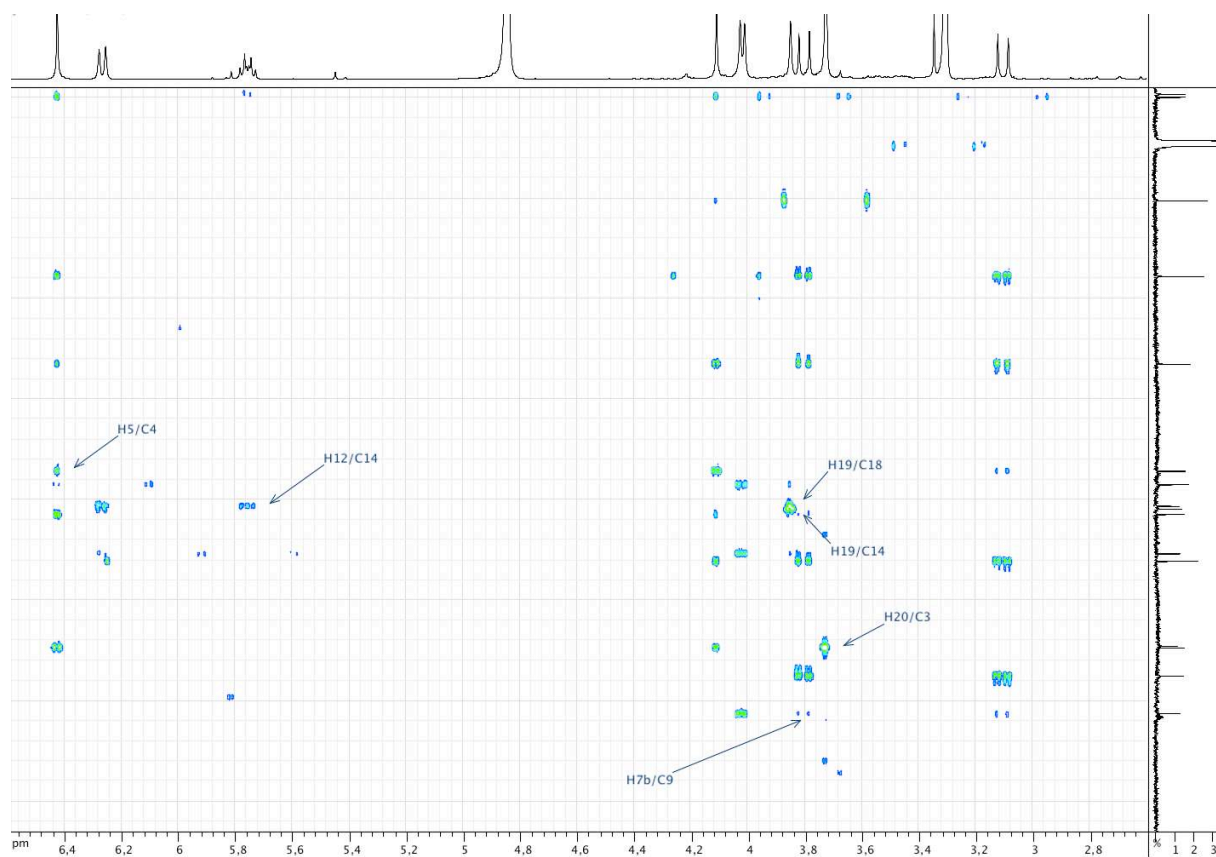


Spectre RMN ^{13}C (237 MHz, DMF- d_7) de **123** (donnazole F)



Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (600 MHz, DMF-*d*7) de **123** (donnazole F)

Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **130** (Donnazole G)Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **130** (donnazole G)



Zoom du spectre RMN HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (500 MHz, CD_3OD) de **130** (donnazole G)

