



HAL
open science

Vers La synthèse totale biomimétique de la lodopyridone et l'étude phytochimique de *Lycopodiella cernua* et de *Nitraria retusa*.

Nicolas Barbahn

► **To cite this version:**

Nicolas Barbahn. Vers La synthèse totale biomimétique de la lodopyridone et l'étude phytochimique de *Lycopodiella cernua* et de *Nitraria retusa*.. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2015. Français. NNT : 2015SACLS130 . tel-01654415

HAL Id: tel-01654415

<https://theses.hal.science/tel-01654415>

Submitted on 3 Dec 2017

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.

NNT : 2015SACLS130

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
Préparée à l'université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat : Chimie des substances naturelles

Par

M. Nicolas BARBAHN

Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone et
étude phytochimique de *Lycopodiella cernua* et *Nitraria retusa*

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 2 décembre 2015 :

Composition du Jury :

M. Pierre Champy	Professeur de l'Université Paris-Sud	Président
Mme. Marie-Christine Lallemand	Professeur de l'Université Paris-Descartes	Rapporteur
Mme. Sophie Tomasi	Professeur de l'Université de Rennes 1	Rapporteur
M. François Senejoux	Maître de Conférences de l'Université d'Auvergne	Examinateur
M. Erwan Poupon	Professeur de l'Université Paris-Sud	Directeur de thèse
M. Laurent Evanno	Maître de Conférences de l'Université Paris-Sud	Co-encadrant



Remerciements

C'est avec un grand plaisir, une certaine émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant ma thèse.

En premier lieu, je remercie sincèrement le Professeur Marie-Christine Lallemand et le professeur Sophie Tomasi pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit et de participer au jury de ma thèse ; de même je remercie sincèrement le Docteur François Senejoux et le Professeur Pierre Champy d'assumer le rôle d'examineur.

Je remercie vivement le Docteur Bruno Figadère pour m'avoir accueilli au sein de BioCIS.

J'aimerais profondément exprimer toute ma reconnaissance et mes sentiments les meilleurs à mon directeur de thèse le Professeur Erwan Poupon. Je le remercie chaleureusement de m'avoir accepté dans son équipe et de m'avoir encadré, aidé et conseillé pendant le stage de Master1, de Master2, et pendant mes quatre années de thèse. Egalement, je le remercie pour sa patience infinie, sa compréhension, ses connaissances et pour m'avoir fait connaître la chimie biomimétique.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes remerciements les plus sincères au Docteur Laurent Evanno, qui m'a guidé dans mon travail et m'a aidé à trouver les solutions pour avancer dans la recherche, pendant le stage de Master 2 et tout au long de ma thèse. Egalement, je le remercie pour ses remarques, ses commentaires, ses critiques positives et son suivi. En fait, ses multiples explications ont apporté beaucoup à ma recherche.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Mehdi Beniddir pour avoir suivi mon travail et m'avoir aidé.

Je remercie tous les membres du laboratoire de pharmacognosie pour leur accueil chaleureux et leurs conseils. En particulière Karine Leblanc et le Docteur Alexandre Maciuk pour leur contribution analytique, Jean-Christophe Jullian et Camille Dejean pour l'analyse des spectres RMN, le Docteur Laurent Ferrié pour ses conseils et son aide, Blandine Séon-Méniel pour sa gentillesse et son aide technique, Christophe Fourneau, François Roblot et Michel Leboeuf.

Je remercie également tous mes collègues du laboratoire, Sara, Adam, Linh, Natacha, Ines et Abha pour la bonne ambiance de ce travail, mais également pour les nombreux bons moments passés ensemble.

Je remercie beaucoup le Docteur Kadiria Ahmada pour son aide, sa gentillesse, et son humour.

Je remercie mes très chers parents, Wdad et Gergi. « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je vous suis redevable d'une éducation dont je suis fier. »

Je remercie avec une grande émotion mes sœurs Latifa, Hala, Ramia et mes deux frères Toni et Rami pour leur soutien et leurs encouragements.

Enfin, je voudrais dire un grand merci à mon pays la Syrie qui' m a financé tout au long de mes études supérieures en France afin d'obtenir le grade de docteur de l'université Paris-Saclay, université Paris-Sud.

Je tiens à remercier l'université Paris-Saclay, université Paris-Sud pour l'accueil, les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes et l'environnement scientifique.

Nicolas Barbahn, Le 2 décembre 2015

SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS UTILISÉS

Solvants :

DCM	dichlorométhane
DME	diméthoxyéthane
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
Pyr	pyridine
TFE	trifluoroéthanol
THF	tétrahydrofurane

Réactifs chimiques et groupements fonctionnels

AcSCoA	acétyl-coenzymeA
APTS	acide <i>para</i> -toluène sulfonique
BHT	3,5-di- <i>tert</i> -4butylhydroxytoluène
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone
DHP	dihydropyrane
DMAP	4-(diméthylamino)pyridine
DMEDA	<i>N,N</i> -diméthyl-éthylènediamine
Dppf	1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocene
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
HOBT	hydroxybenzotriazole
LDA	diisopropylamidure de lithium
MCPBA	acide 3-chloroperbenzoïque
MMPP	monoperoxyde du phtalate de magnésium
MOM	méthoxyméthyle
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NfF	fluorure de nonafluoro-1-butanesulfonyl
PCC	pyridinium chlorochromate
Pin	pinacol
TFA	acide trifluoroacétique
TFAA	anhydride trifluoroacétique
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TES	triéthylsilyle
THP	tétrahydropyrane
TIPS	triisopropylsilyle
Tf	trifluorométhanesulfonyl
TMS	triméthylsilyle

Abréviations

CI ₅₀	concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire
CCM	chromatographie sur couche mince
MWI	irradiation aux micro-ondes
R _f	rapport frontal
R _T	temps de rétention
((o))	irradiation aux ultra-sons

Spectroscopies

RMN	résonance magnétique nucléaire
^1H	proton
^{13}C	carbone 13
COSY	correlated spectroscopy (proton-proton)
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
J	constante de couplage
Hz	hertz
ppm	partie par million
δ	déplacement chimique
s	singulet
d	doublet
t	triplet
q	quadruplet
m	multiplet
HRMS	spectrométrie de masse, haute résolution
ESI+	ionisation par électronébulisation (mode positif)
m/z	rapport masse sur charge
IR	infrarouge
UV	ultraviolet
λ	longueur d'onde

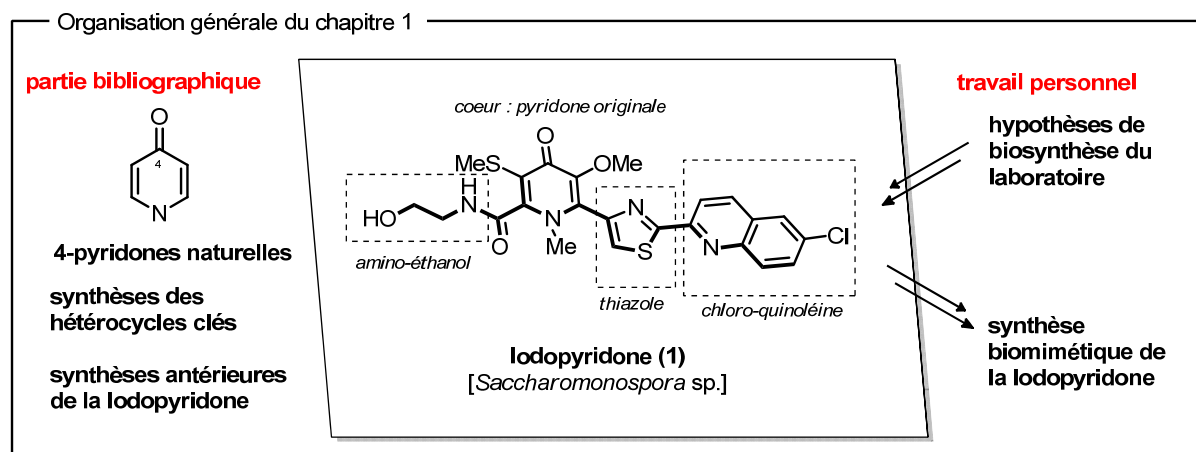
Avant-propos

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de quatre thèmes étudiés de manière indépendante. Le premier chapitre « Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone » traitera de l'approche en synthèse de totale d'une molécule naturelle originale : la Iodopyridone appartenant aux alcaloïdes peptidiques. Les chapitres suivants trouveront leur unité autour du métabolisme de la lysine. Le second chapitre « Étude phytochimique de *Lycopodiella cernua* » présentera une étude bibliographique sur les alcaloïdes de lycopodes et nos travaux phytochimiques préliminaires réalisés sur la plante. Le troisième chapitre « Questions à propos du tramadol naturel » reviendra sur la saga du moment sur la découverte du « tramadol naturel » et notre approche synthétique pour reproduire de manière « biomimétique » la voie de biosynthèse postulée. Le quatrième chapitre « Étude phytochimique de *Nitraria retusa* collectée en Égypte » rédigé « sur article », permettra de resituer le travail réalisé tel qu'il sera soumis pour une expertise par nos pairs.

Ces chapitres sont présentés de manière indépendante et les numérotations des molécules ne sont pas incrémentées. La liste des abréviations est commune aux différents chapitres. Chaque thème est abordé selon quatre axes : *i*) : une section bibliographique ; *ii*) une discussion sur les travaux réalisés ; *iii*) les perspectives ; *iv*) une section expérimentale.

1

Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

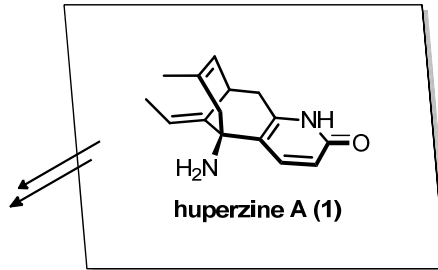


2

Étude phytochimique de *Lycopodiella cernua*

Organisation générale du chapitre 2

partie bibliographique
analyse de la diversité
des alcaloïdes
de lycopodes



travail personnel

étude phytochimique de
Lycopodiella cernua

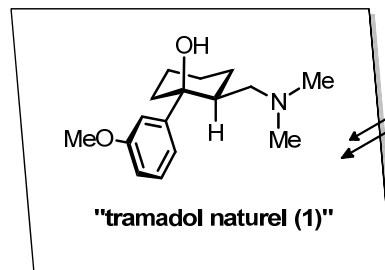


3

Questions à propos du « tramadol naturel »

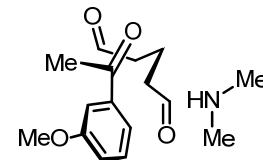
Organisation générale du chapitre 3

partie bibliographique
analyse critique des
travaux autour de la
découverte



travail personnel

approche
biomimétique
"multicomposant"

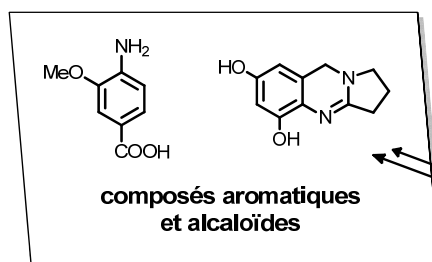


4

Étude phytochimique de *Nitraria retusa* collectée en Égypte

Organisation générale du chapitre 4

partie bibliographique
Nitraria retusa (Nitrariaceae)



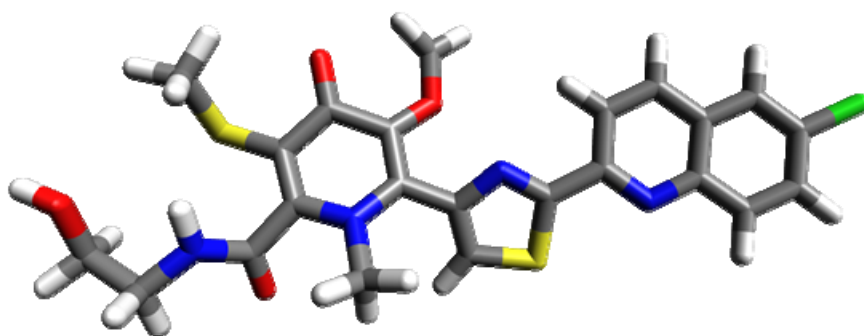
travail personnel

étude phytochimique
de *Nitraria retusa*
collectée en Égypte



1

Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone



Introduction générale.....	5
Partie 1 : Étude bibliographique	8
1.1. Présentation des 4-pyridones naturelles, essai de classification.....	8
1.2. Les antibiotiques thiopeptidiques	13
1.2.1. Activités antibiotiques des thiopeptides.....	15
1.2.2. Biosynthèse des thiopeptides antibiotiques.....	16
1.3. Nos hypothèses de biosynthèse de la lodopyridone.	19
1.4. Approches synthétiques du cœur azoté des tiopetides antibiotiques.....	21
1.4.1. Synthèse du cœur hétérocyclique du GE2270 A.....	21
1.4.2. Synthèse du cœur hétérocyclique de la micrococcine P1.	22
1.4.3. Synthèse du cœur hétérocyclique des amythiamicines et du nosiheptide.....	22
1.4.4. Synthèse du cœur hétérocyclique du thiostepton.	23
1.5. Méthodes d'obtention de déhydroamino-acides.....	24
1.6. La réaction de Povarov.....	26
1.7. Synthèses antérieures des WS75624 A/B et de la lodopyridone.....	28
1.7.1. Synthèses des WS75624 A et B.	28
1.7.2. Synthèse de la lodopyridone de Koert.....	30
1.7.3. Synthèse de la lodopyridone de Moody.....	31
Partie 2 : Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone	34
2.1. Rétrosynthèse de la lodopyridone.	34
2.1.1. Déconnexions clefs.	34
2.1.2. Mécanisme prévu pour l'assemblage du cœur central de la lodopyridone.	35
2.2. Synthèse de l'ester de méthyle de la <i>N,S</i> -diméthyl-déhydrocystéine.	37
2.3. Synthèse du fragment aldéhyde hétérocyclique	40
2.4. Synthèse du 1,3-dioxole	42
2.5. Essais de réactions de Povarov : études modèles	43
2.6. Assemblage d'un pyridinium par électrocyclisation.	44
2.6.1. Étude modèle de la réaction d'électrocyclisation.....	45
2.6.2. Application de la réaction d'électrocyclisation à la lodopyridone.....	46
Partie 3 : Conclusion et perspectives.....	50
Partie 4 : Partie expérimentale	51

Introduction générale

La chimie des alcaloïdes est une source privilégiée de sujets d'étude dans notre laboratoire avec les synthèses totales de près de dix structures réalisées au cours des dix dernières années. En effet, les molécules azotées fournissent une grande part des composés d'intérêt pharmacologique et à titre d'exemple, en 2006 sur les 200 médicaments les plus prescrits sur le marché mondial, 143 sont azotés parmi lesquels 101 sont hétérocycliques. L'extraction de molécules naturelles à partir de plantes, d'animaux ou de microorganismes ainsi que la synthèse de molécules azotées naturelles ou synthétiques constitue une source de travail inépuisable pour les chimistes organiciens, permettant ainsi d'accéder à de nouvelles structures et de développer des méthodes de synthèse afin de constituer des bibliothèques de molécules potentiellement actives. Dans ce premier chapitre de thèse consacré à un travail de synthèse totale, nous allons présenter nos travaux sur la synthèse totale d'un alcaloïde original, la Iodopyridone **1** (figure 1).

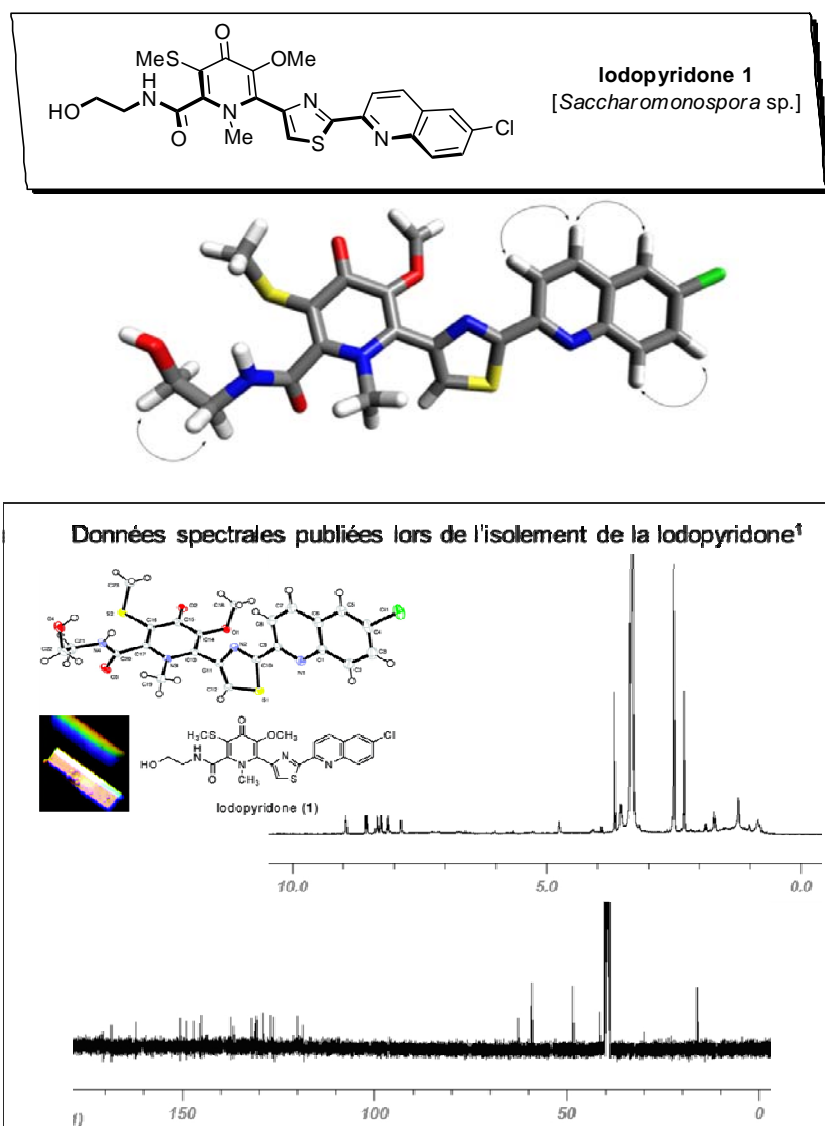


Figure 1 : Structure, spectres RMN de la Iodopyridone naturelle **1** et corrélations HMBC (quinoléine).

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

La lodopyridone est un alcaloïde isolé par William Fenical en 2009 à partir de l'actinomycète marin *Saccharomonospora* sp. CNQ490 présent dans les sédiments du cayon sous-marin de *la Jolla* aux États-Unis.¹ La molécule présente trois hétérocycles azotés : *i-* une quinoléine chlorée, *ii-* un thiazole et *iii-* une pyridone. La molécule comportant 10 carbones quaternaires et 9 hétéroatomes contigus répartis sur les cycles pyridone, thiazole et quinoléine, l'élucidation de sa structure n'a pas pu être réalisée par RMN (*cf.* spectres RMN figure 1). La détermination de sa structure a uniquement pu être réalisée grâce à un cliché de diffraction aux rayons X sur un cristal obtenu par cristallisation dans un mélange eau/acétonitrile/acétate d'éthyle issu d'une purification par HPLC après de longs mois de cristallisation. Parallèlement à l'isolement de la lodopyridone d'autres analogues ont pu être isolés et purifiés, mais eux aussi présentant de nombreux carbones quaternaires et hétéroatomes contigus et en l'absence de clichés de diffractions aux rayons X leurs structures n'ont pas pu être déterminées.² Cette structure polyhétérocyclique, plutôt surprenante de prime abord pour une substance naturelle est en fait probablement un térapeptide modifié. Le cycle 4-pyridone retrouvé dans la lodopyridone est peu présent dans les molécules naturelles, et à ce jour, seule une vingtaine de molécules comportant ce motif ont été décrites.¹ Bien que ce motif soit peu répandu, les 4-pyridones ont attiré l'attention des chimistes organiciens comme en témoigne les nombreuses 4-pyridones de synthèse référencées dans la base de données des chemical abstracts[®]. Spontanément, pour comprendre l'origine du cycle 4-pyridone de la lodopyridone, une analogie avec l'origine biosynthétique des pyridones naturelles peut être faite, mais en réalisant la comparaison on se rend vite compte qu'aucun lien n'existe. Par contre en s'intéressant à la famille des antibiotiques thiopeptidiques tel que le thiostrepton, un lien plus évident apparaît.

Ce chapitre s'organisera de la façon suivante. Dans une première section bibliographique, une comparaison de la lodopyridone avec les 4-pyridones d'origine naturelle puis les antibiotiques thiopeptidiques sera réalisée afin de rationaliser sa biosynthèse. Ensuite, l'accent sera mis sur les approches synthétiques des hétérocycles azotés à 6 chaînons en synthèse totale et notamment le noyau 4-pyridone au cours des synthèses totales antérieures de la lodopyridone. Dans la seconde partie de ce chapitre nos travaux pour réaliser une synthèse biomimétique de la lodopyridone seront traités, ils se basent sur une analyse rétrobiosynthétique fine de la substance naturelle que nous formulerons pour la première fois.

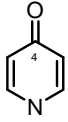
¹K. N. Maloney, J. B. MacMillan, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, A. G. DiPasquale, A. L. Rheingold, W. Fenical, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5422–5424.

² Communication personnelle de William Fenical à Laurent Evanno (*International Congress on Natural Product Research*, New York, USA, août 2012).

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

Organisation générale du chapitre 1

partie bibliographique

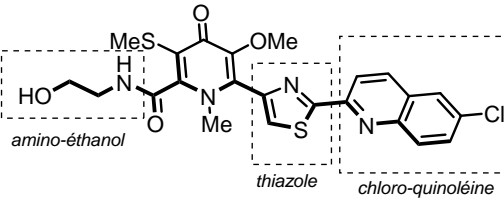


4-pyridones naturelles

synthèses des
hétérocycles clés

synthèses antérieures
de la Iodopyridone

coeur : pyridone originale



Iodopyridone (1)
[*Saccharomonospora* sp.]

travail personnel

hypothèses de
biosynthèses
du laboratoire

synthèse
biomimétique de
la Iodopyridone

Partie 1 : Étude bibliographique

1.1. Présentation des 4-pyridones naturelles, essai de classification

La lodopyridone, possède un cycle 4-pyridone peu présent dans la nature. Les 4-pyridones d'origines naturelles sont peu nombreuses, et à ce jour seul une vingtaine de composés sont rapportés dans la littérature. Parmi les 250 000 pyridones référencées dans la base de données des Chemical Abstracts®, nous avons référencé 16 substances naturelles qui sont présentées dans le Tableau 1. Dans ce tableau, nous avons classé les substances naturelles en redonnant leurs structures, les organismes dont elles sont isolées ainsi que quelques activités biologiques. Hormis la présence d'une 4-pyridone, les molécules sélectionnées ne présentent que peu d'analogie structurale et biosynthétique entre elles, toutefois une ébauche de classification peut être faite sur la base des biosynthèses postulées.

■ Premièrement, la lodopyridone **1** qui nous a intéressés au cours de ce travail de thèse doit être rapprochée des composés WS75624 A et B (**2** et **3**) ainsi que du composé B-90063 (**4**) (donnée dans le tableau 1 à titre de comparaison). Les éléments structuraux que sont le cycle azoté à 6 chaînons (pyridine ou pyridone), les cycles thiazole et oxazole, les positions des oxygénations, la position des soufres pour la molécule B-90063 (**4**) ainsi que la position des substituants carbonylés permettent de proposer que ces molécules doivent avoir des voies de biosynthèse similaires et faisant intervenir une origine peptidique (figure 2).

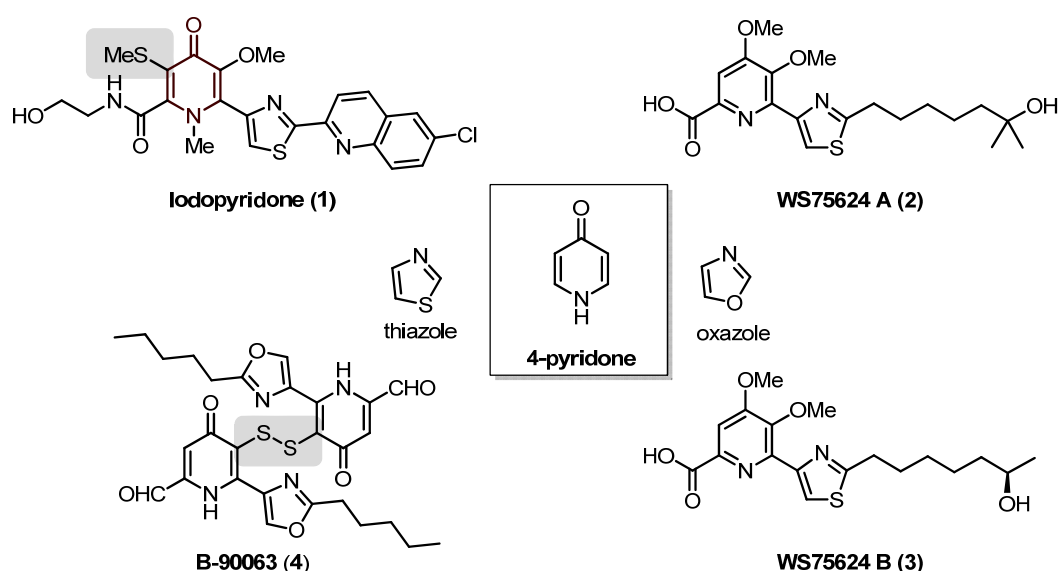


Figure 2 : Structure de la lodopyridone (**1**), des WS75624 A et B (**2** et **3**), et du B-90063 (**4**).

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

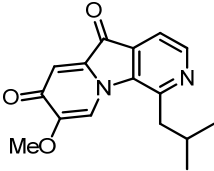
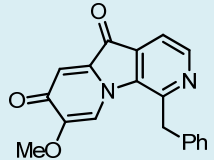
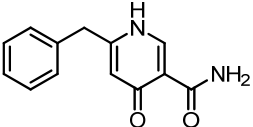
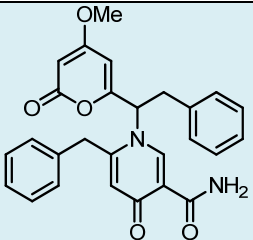
Tableau 1 : Étude bibliographique sur les 4-pyridones d'origine naturelle.

Nom	structure	source	année d'isolement	Activités biologiques
Lodopyridone (1)		<i>Saccharomonospora</i> sp. CNQ490 Actinomycète	2009 ¹	cytotoxique CI ₅₀ =3.6 μM sur cellules HCT-116
WS75624 A (2)		<i>Saccharothrix</i> sp.75624 Actinomycète	1995 ³	
WS75624 B (3)		<i>Saccharothrix</i> sp.75624 Actinomycète	1995 ³	
B-90063 (4)		α-Protéobactérie	1998 ⁴	

³ Y. Tsurumi, H. Ueda, K. Hayashi, S. Takase, M. Nishikawa, S. Kiyoto, M. Okuhara. *J. Antibiot.* **1995**, 48, 1066–1072.

⁴ S. Takaishi, N. Tuchiya, A. Sato, T. Negishi, Y. Takamatsu, Y. Matsushita, T. Watanabe, Y. Iijima, H. Haruyama, T. Kinoshita, M. Tanaka, K. Komada, *J. Antibiot.* **1998**, 51, 805–815.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

Ptérocéline A (5)		<i>Pterocella vesiculosa</i> bryzoaire marin	2003 ⁵	Cytotoxique sur cellules murines P388 CI_{50} = 477 nM et sur cellules simiesques BSC-1 (CI_{50} non précisée). Antifongique sur <i>Tricophyton mentagrophytes</i>
Ptérocéline B (6)		<i>Pterocella vesiculosa</i> bryzoaire marin	2003 ^{6,7}	Cytotoxique sur cellules murines P388 CI_{50} = 323 nM/mL et sur cellules simiesques BSC-1 CI_{50} non précisée. Antibactérien sur <i>Bacillus subtilis</i> . Antifongique sur <i>Tricophyton mentagrophytes</i>
Aspernigrine A (7)		<i>Aspergillus niger</i> Eurotiomycètes	2004 ⁸	Cytotoxique sur cellules JURKAT CI_{50} = 50 μ M.
Aspernigrine B (8)		<i>Aspergillus niger</i> Eurotiomycètes	2004 ⁸	Cytotoxique sur cellules JURKAT CI_{50} = 50 μ M. Activité neuroprotective.

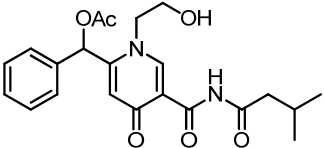
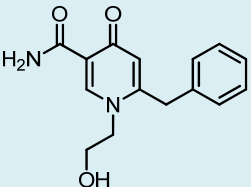
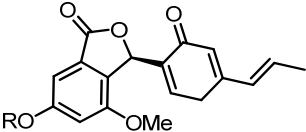
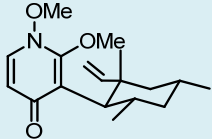
⁵ M. Meaghan, O'Malley, F. Damkaci, T. Ross Kelly, *Org. Lett.*, **2006**, 12, 2651–2652.

⁶ M. R. Prinsep, *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 134–136.

⁷ B. Yao, M. R. Prinsep, B. K. Nicholson, D. P. Gordon, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1074–1077.

⁸ Y. H. Ye, H. L. Zhu, Y. C. Song, J. Y. Liu, R. X. Tan, *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1106–1108.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

Berkeleyamide C (9)		<i>Penicillium rubrum</i> Eurotiomycètes	2008 ⁹	Inhibition du signal de transduction des enzymes métalloprotéinase-3 (MMP-3) et caspase-1. CI ₅₀ non précisées.
Pestalamide C (10)		<i>Pestalotiopsisistheae</i> Actinomycète	2008 ¹⁰	Antifongique sur <i>Aspergillus fumigatus</i> . Inhibition de la réplication HIV-1 dans les cellules C8166.
Pénicidone A (R=Me) : 11 Pénicidone B (R=H) : 12		<i>Penicillium</i> sp. IFB-E022 Eurotiomycète	2007 ¹¹	Cytotoxique sur cellules SW1116, K562, KB et HELA pour la pénicidone A : SW1116(60,1 µM), K562 (54,0 µM), KB (46.5 µM), HELA (41.5 µM) et pour la pénicidone B : SW1116 (54,2 µM), K562(21,1 µM), KB (29,6 µM), HELA (35,1 µM).
13		OS-F61800 Souche fongique non caractérisée	1999 ¹²	

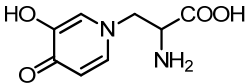
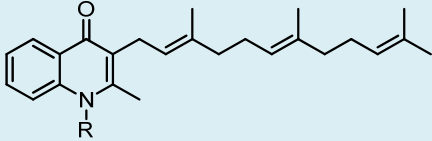
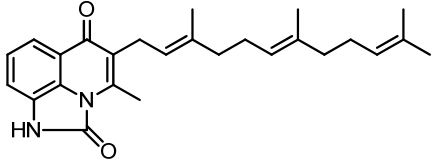
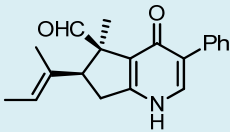
⁹ A. A. Stierle, D. B. Stierle, B. Patacini, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 856–860.

¹⁰ G. Ding, L. Jiang, L. Guo, X. Chen, H. Zhang, Y. Che, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1861–1865.

¹¹ Y. H. Ye, H. L. Zhu, Y. C. Song, J. Y. Liu, R. X. Tan, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1106–1108.

¹² P. Cai, D. Smith, B. Cunningham, S. Brown-Shimer, B. Katz, C. Pearce, D. Venables, D. Houck, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 397–399.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

L-Mimosine (14)		<i>Leucaena</i> sp. Fabaceae	1937 ¹³	Antimitotique, inhibition de la synthèse de l'ADN chez les animaux. Inhibition de la croissance et de la synthèse des protéines.
Aurachine C (R=OH) : 15 Aurachine D (R=H) : 16		<i>Stigmatella aurantica</i> Cystobacteraceae	2008 ¹⁴	Activité anti bactérienne sur les cocci et bacilles à Gram positif. Aurachine C : antipaludique <i>in vitro</i> sur cellules W-2 clone CI ₅₀ = 26 ng/mL et sur cellules D-6 CI ₅₀ = 0,90 ng/mL. Aurachine D : antipaludique <i>in vitro</i> sur cellules W-2-clone CI ₅₀ = 370 ng/mL et sur cellules D-6 CI ₅₀ = 250 ng/mL.
Aurachine E (17)		<i>Stigmatella aurantica</i> Cystobacteraceae	2008 ¹⁴	Activité anti bactérienne sur les cocci et bacilles à Gram positif. Antipaludique <i>in vitro</i> sur cellules W-2 CI ₅₀ = 13 ng/mL et sur cellules D-6 CI ₅₀ = 0,4 ng/mL. Faible cytotoxicité : CI ₅₀ = 25 µg/mL
Cladobotryal (18)		<i>Caldobotrium varium</i> champignon	2003 ¹⁵	Antibactérien. Antifongique.

¹³ a) M. Soedarjo, T. K. Hemscheidt, D. Borthakur, *Am. Soc. Microbiol.*, **1994**, *60*, 4268–4272; b) A. K. Pandey, U. N. Dwivedi, *Enzyme Microbe Tech*, **2007**, *40*, 1059–1066; c) P. J. Reis, R. Puchala, T. Sahlu, S. P. Hart, A. L. Goetsch, *Small Ruminant Re.*, **1999**, *33*, 55–61; d) S. Vestena, A. G. Fett-Neto, R. C. Duarte, *Plant Sci.*, **2001**, *161*, 597–604; e) M. Soedarjo, D. Borthakur, *Soil Biol. Biochem.* **1998**, *30*, 1605–1613; f) M. Mascré, *Compt. Rend. Acad. Sc.*, **1937**, *204*, 890–891.

¹⁴ a) G. H. fle, B. B. hlendorf, T. Fecker, F. Sasse, B. Kunze, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1967–1969; b) K. Gademann, Y. Bethuel, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4707–4710; c) G. H. Fle, B. Kunze, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1843–1849.

¹⁵ a) D. L. J. Clive, X. Huang, *Chem. Commun.* **2003**, 2062–2063; b) D. L. J. Clive, X. Huang, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1872–1879; c) B. B. Snider, Q. Che, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 2877–2880.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

■ Dans un second groupe, on peut rassembler les pénicidones A et B (**5** et **6**), les aspernigrines A et B (**7** et **8**) ainsi que le berkeleyamide C (**9**) qui ont des biosynthèses dérivant assurément de la voie des polyacétates (schéma 1).

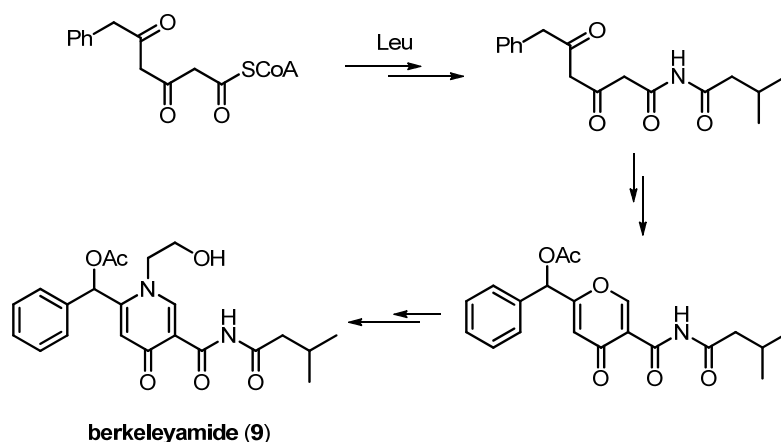


Schéma 1 : Biosynthèse du berkeleyamide C (9).

■ Enfin, le dernier groupe regrouperait les autres composés non apparentés aux deux premiers groupes.

Grâce à cette comparaison entre les 4-pyridones d'origine naturelle, on remarque rapidement que ce motif chimique n'est pas issu d'une voie de biosynthèse unique, et que les molécules présentées dans le Tableau 1 ne possèdent aucun lien biosynthétique entre elles. Afin, de replacer la lodopyridone (**1**) dans son contexte biosynthétique la comparaison avec les antibiotiques thiopeptidiques apportent réellement des éléments de réponse plus solides concernant l'origine de sa biosynthèse. Ce lien biosynthétique justifie la **section 1.2.** dédiée aux antibiotiques thiopeptidiques.

1.2. Les antibiotiques thiopeptidiques

Les antibiotiques thiopeptidiques, *fine appellation* au vu de leurs structures, constituent une famille de peptides modifiés hautement soufrés comportant plus d'une centaine de molécules (figure 3).¹⁶ La majorité de ces molécules ont été isolées de bactéries prélevées dans des sols terrestres et pour quelques membres d'échantillons marins.¹⁷ L'élément structurel commun aux différentes molécules de cette famille, est la présence d'une pyridine à différents degrés d'oxydation substituée par des cycles thiazole sur lesquels s'articulent les macrocycles peptidiques modifiés. Le cycle pyridine, correspond à un point de repliement par électrocyclisation tête à queue de la chaîne principale, ce qui sera explicité dans la partie biosynthèse (page 16). Les autres éléments de structure récurant dans les macrocycles sont la présence de nombreux atomes de soufre retrouvés dans les cycles thiazole, la présence de

¹⁶ X. Just-Baringo, F. Albericio, M. Alvarez, *Marr. Drugs*, **2014**, *12*, 317–351.

¹⁷ M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685–714.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

déhydroamino-acides et la présence fréquente d'oxazoles. Parmi toutes ces molécules, les trois membres les plus emblématiques de cette famille sont : i) la micrococcine (**20**) isolée en 1948 à partir d'un échantillon des eaux d'égouts d'Oxford et constituant le membre historique¹⁸ ; ii) la thiomuracine I (**19**) qui a permis d'élucider l'origine biosynthétique de la famille¹⁹ ; iii) le thiostrepton (**21**)²⁰ magnifique structure illustrant la complexité pour réaliser la synthèse totale de ces molécules.²¹

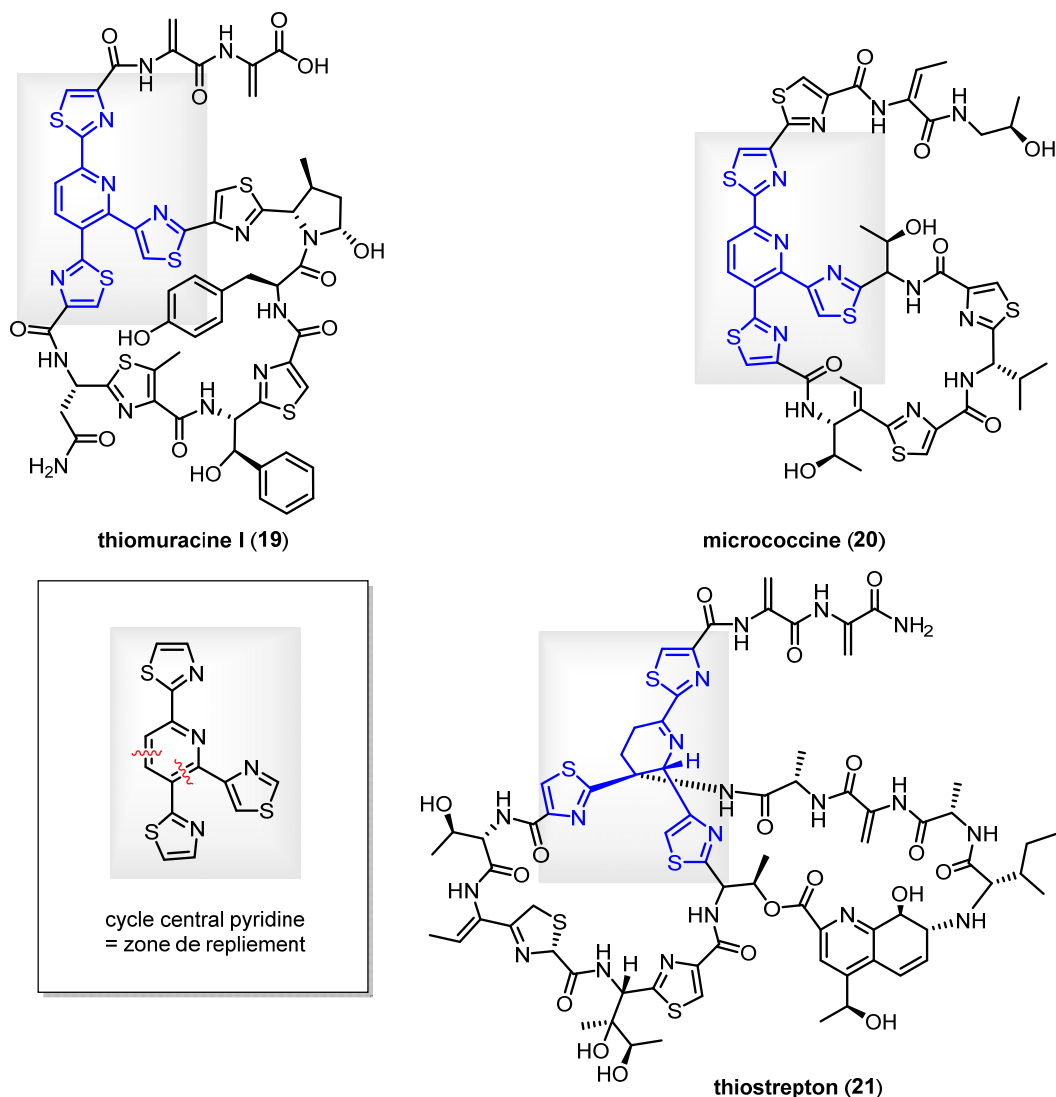


Figure 3 : Exemples d'antibiotiques thiopeptidiques.

¹⁸ T.L. Su, *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, *29*, 473–481.

¹⁹ R. P. Morris, J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946–5955.

²⁰ M. Bodanzky, J. Fried, J. T. Sheehan, N. J. Williams, J. Alicino, A. I. Cohen, B. T. Keeler, C. A. Birkhimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2478–2490.

²¹ a) K. C. Nicolaou, M. Nevalainen, B. S. Safina, M. Zak, S. Bulat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1941–1945; b) K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, S. H. Lee, A. Estrada, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5092–5097; c) K. C. Nicolaou, B. S. Safina, M. Zak, S. H. Lee, M. Nevalainen, M. Bella, A. Estrada, C. Funke, F. J. Zécri, S. Bulat, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11159–11175; d) K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, A. Estrada, S. H. Lee, M. Nevalainen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11176–11183. Cette synthèse totale est aujourd'hui "un classique" commenté dans de nombreux articles et ouvrages notamment par K.C. Nicolaou.

1.2.1. Activités antibiotiques des thiopeptides.

La famille des thiopeptides a suscité un engouement pour ses activités biologiques notamment antibiotiques. Le thiostrepton est d'ailleurs utilisé en médecine vétérinaire par voie topique (Panalog[®]). Les activités antibiotiques de cette famille ont été de loin les plus étudiées, et des modes d'action par inhibition de la synthèse protéique au niveau du ribosome est une constante pour cette classe de produits naturels mais avec des mécanismes différents selon la taille du macrocycle du thiopeptide. Les différents thiopeptides présentent des tailles de cycles à 26, 29 et 35 chaînons en fonction du nombre de résidus présents (figure 4).

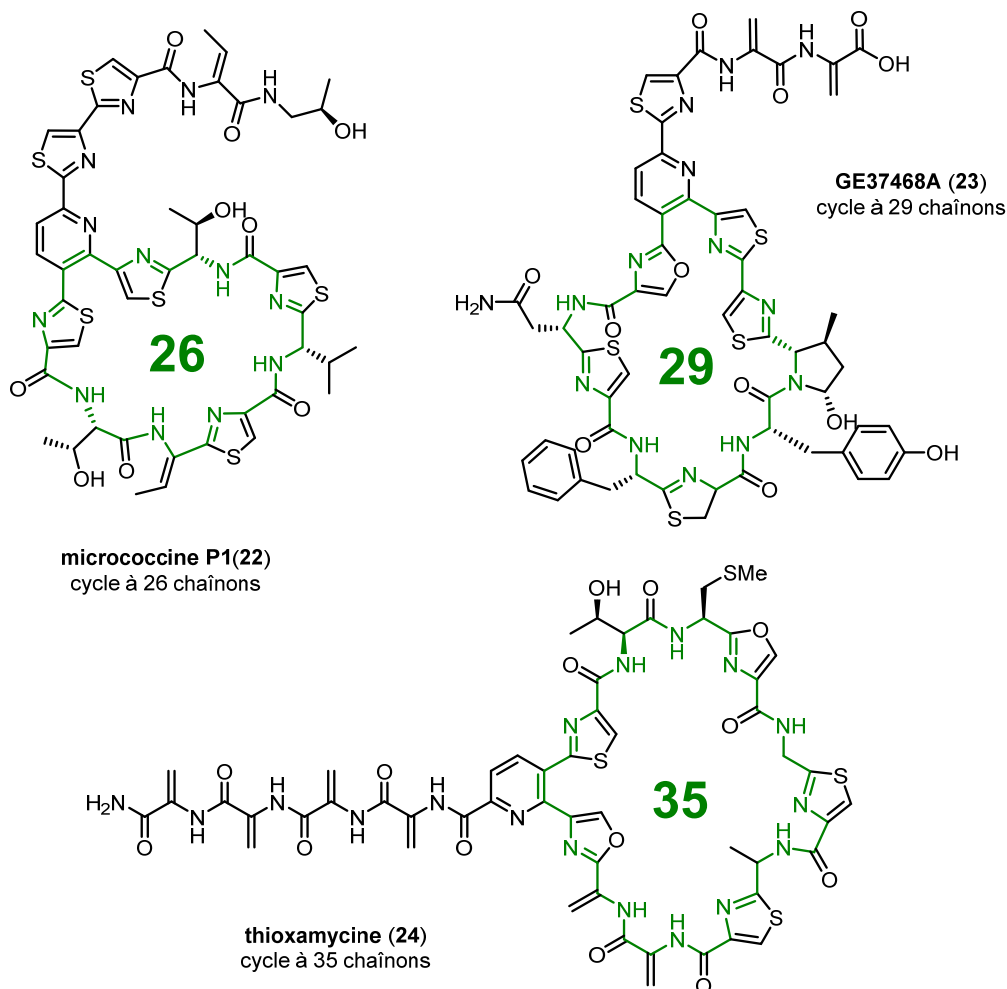


Figure 4 : Antibiotiques thiopeptidiques présentant des macrocycles à 26, 29 et 35 chaînons.

■ Les macrocycles à 26 chaînons comme la micrococcine P1 (22) sont connus pour se lier au domaine GTPase du complexe protéique ribosome/L11 bloquant ainsi le site de fixation du facteur d'élongation G et empêchant ainsi la translocation du complexe peptide/ARNt en élongation dans le ribosome.²²

²² a) S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664–5666; b) J. M. Harms, D. N. Wilson F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. T. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26–38; c) J.D. Walter, M. Hunter, M. Cobb, G. Traeger, P.C. Spiegel, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 360–370.

■ Dans le cas des thiopeptides présentant un macrocycle à 29 chaînons comme le GE37468A (**23**), la molécule antibiotique s'associe au facteur d'élongation EF-Tu bloquant ainsi le site actif du complexe ARNt/amino acyle empêchant son transfert à la chaîne peptidique en élongation.²²

■ Pour les molécules présentant un macrocycle à 35 chaînons comme la thioxamycine (**24**) le mécanisme d'action reste non déterminé. Toutes ces activités antibiotiques semblent être un moyen de défense pour les micro-organismes qui les produisent en relation avec l'écologie chimique.

1.2.2. Biosynthèse des thiopeptides antibiotiques.

Les thiopeptides antibiotiques possèdent des éléments structuraux en commun avec la lodopyridone, la molécule cible de ce travail. Bien que les structures soient très différentes, des éléments de leur biosynthèse apportent des informations sur l'origine biosynthétique de la lodopyridone. En illustrant le propos sur la biosynthèse de thiomuracine I (**19**),¹⁹ le schéma biosynthétique peut être décrit comme suit (Schéma 2, page suivante) :

■ Les thiopeptides antibiotiques comme leur nom l'indique sont issus de chaînes peptidiques génétiquement codées et produites au niveau du ribosome (figure 5).²³ Le gène codant la biosynthèse du peptide précurseur est traduit en un peptide (**25**) constitué de deux domaines : i) un premier domaine constitué de 12 à 17 résidus correspondant au peptide constituant la séquence finale du thiopeptide ; ii) un second domaine constitué de 34 à 55 résidus lié au N-terminal du premier domaine et qui est tronqué au cours de la biosynthèse (Schéma 2, processus A). Pour quelques thiopeptides, la séquence peptidique native contient également un ou deux résidus du côté C-terminal et qui sont ensuite tronqués lors du processus de biosynthèse.²⁴

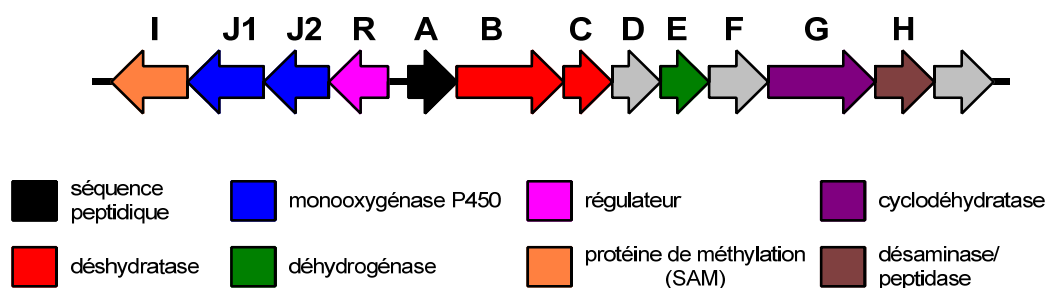


Figure 5 : Cluster de gène codant la biosynthèse de la thiomuracine I (**19**).

²³ Nous sommes ici en présence de peptides ribosomaux (par opposition aux peptides non ribosomaux biosynthétisés par des complexes multienzymatiques "NRPS"), a) L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2549–2553 ; b) R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141–147 ; c) W.L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327–4334.

²⁴ a) Y. Yu, H. Guo, Q. Zhang, L. Duan, Y. Ding, R. Liao, C. Lei, B. Shen, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16324–16326 ; b) R. Liao, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2852–2855.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

■ Il a été démontré que les gènes codant les enzymes nécessaires aux modifications du peptide précurseur entourent le gène le codant, formant ainsi un cluster de gènes (Figure 5).¹⁹

■ Concernant l'ordre des modifications, les cycles thiazole et oxazole seraient les premiers formés par une série de cyclisations, déshydratations et oxydations des résidus cystéine et sérine (Schéma 2, processus B et C).²⁵ Ensuite une phosphorylation et une déshydratation des sérines formeraient les déhydroalanines (Schéma 2, processus D). Enfin, un repliement de la chaîne peptidique sur elle-même entre des résidus éloignés dans la chaîne avec une orientation tête à queue par un processus apparenté à une réaction d'*aza*-Diels-Alder suivi d'une déshydrogénation formerait le cycle azoté central (Schéma 2, processus E). Les modifications tardives des thiopeptides antibiotiques incluent des oxydations, des méthylation et l'incorporation de quinoléines (probablement un des éléments les plus originaux, *vide infra*).

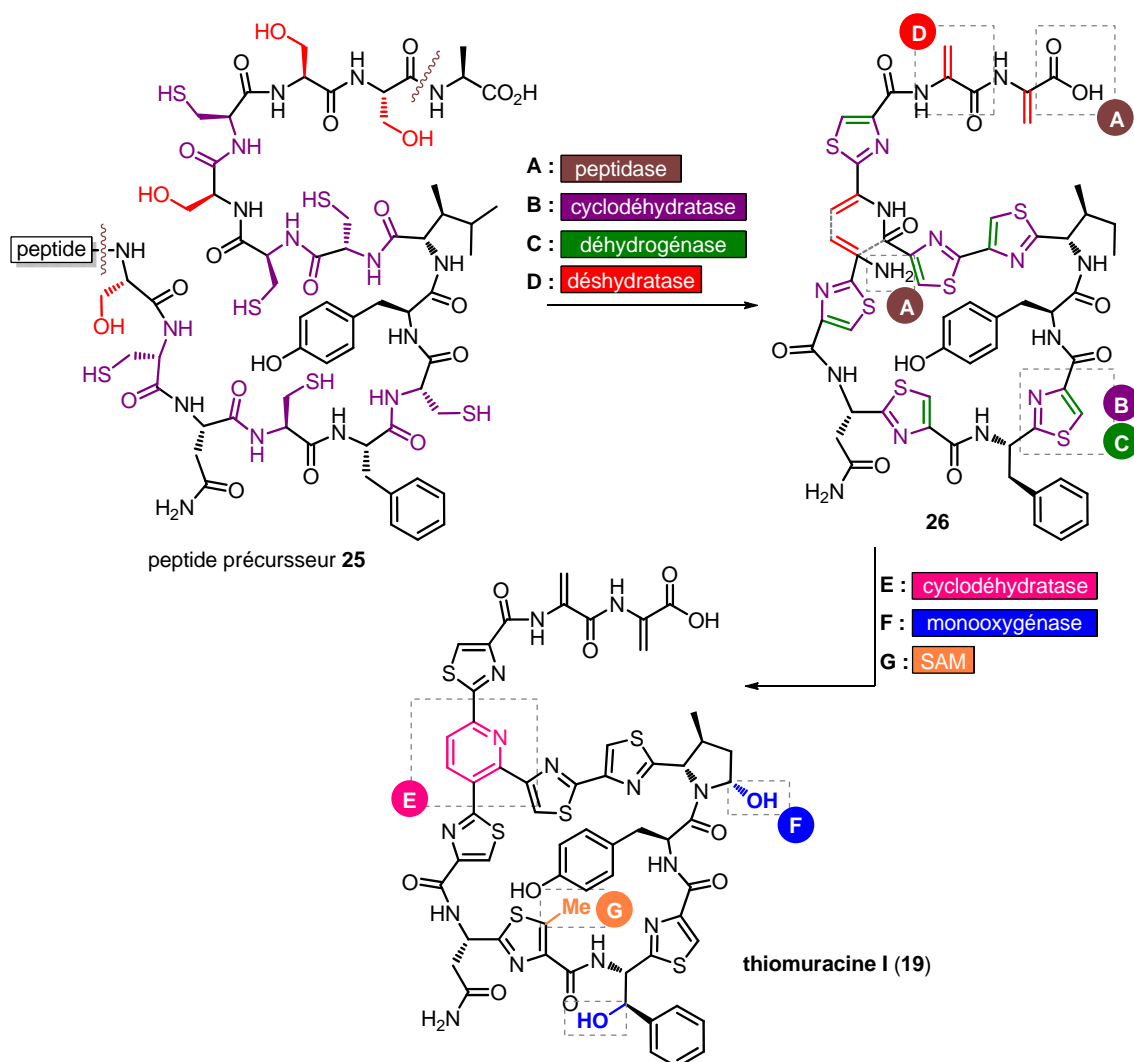


Schéma 2 : biosynthèse de la thiomuracine I (19).

²⁵ a) R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141–147 ; b) Y. Yu, L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt, G. Tang, B. Shen, W. Liu, *ACS Chem Biol.* **2009**, *4*, 855–864 ; c) Y. Ding, Y. Yu, H. Pan, H. Guo, Y. Li, W. Liu, *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 1180–1185.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

■ Concernant les modifications tardives (schéma 3) : les hétérocycles azotés comme la dihydroquinoléine présente dans le thiostrepton (**21**) seraient issus d'une modification du tryptophane (**27**). La séquence biosynthétique la plus surprenante est celle expliquant la formation de la quinoléine. Elle fait intervenir une méthylation du tryptophane et une désamination permettant la formation d'un pyruvate (**28**). L'ouverture du noyau indole suivi d'une refermeture de cycle achève la réorganisation de l'hétérocycle (**30**). Une réduction de cétone et une époxydation sont encore nécessaires avant l'incorporation du fragment acide quinaldédique (**31**) au thiostrepton.²⁶ Notons que cette fonction époxyde est indispensable à la formation du second macrocycle du thiostrepton (**21**).

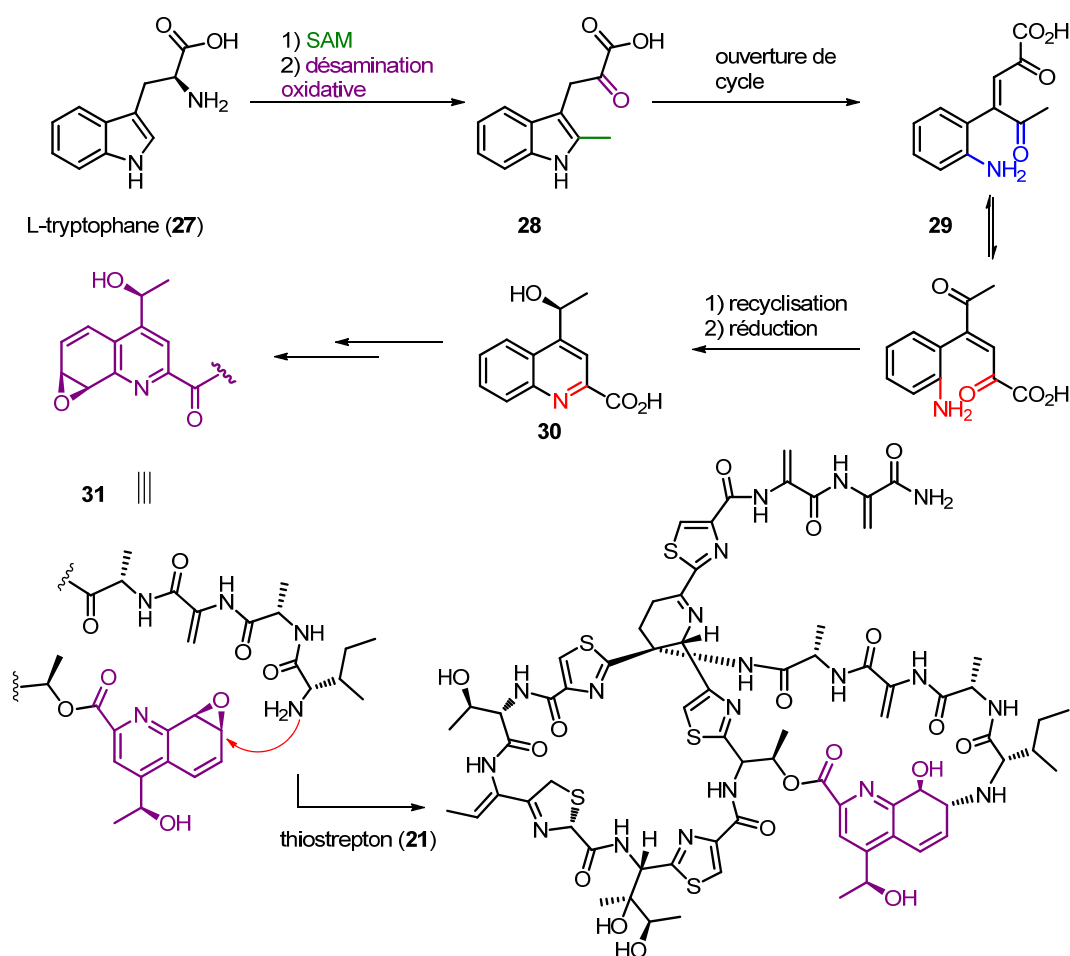


Schéma 3 : Origine biosynthétique de la dihydroquinoléine du thiostrepton.

²⁶ S. Pierre, A. Guillot, A. Benjdia, C. Sandström, P. Langella, O. Berteau. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 957–959.

1.3. Nos hypothèses de biosynthèse de la lodopyridone.

La lodopyridone (**1**, structure rappelée figure 6) possède une structure extrêmement originale pour un produit naturel avec une biosynthèse de l'enchaînement polyhétérocyclique dérivant très probablement, selon nos hypothèses, d'un précurseur peptidique (**33**) constitué d'une glycine, de deux cystéines et d'un tryptophane modifié.

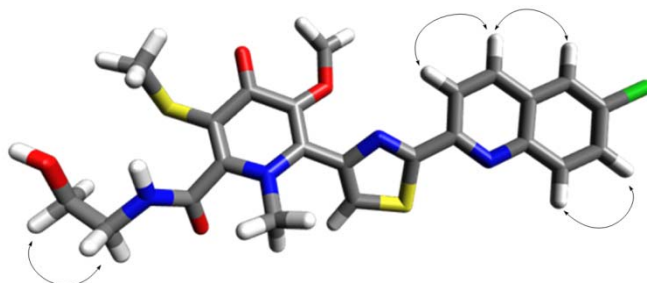


Figure 6 : Structure de la lodopyridone **1** et corrélations HMBC.

En s'inspirant des voies de biosynthèse des thiopeptides antibiotiques, la formation des différents hétérocycles peut être proposée comme suit :

- La partie quinoléine chlorée (**32**) pourrait dériver d'un tryptophane (**27**), en effet, il est admis que le cycle indolique du tryptophane peut subir une oxydation permettant une extension du cycle conduisant à la formation d'une quinoléine.^{27,28}
- Le cycle thiazole (intermédiaire **34**) serait issu de la cyclisation d'une cystéine. Une des origines biosynthétique privilégiée des thiazoles est la condensation d'une cystéine impliquée dans une liaison peptidique.²⁹ Un mécanisme biosynthétique analogue permet également la formation d'oxazole à partir de la sérine.
- Enfin, la 4-pyridone pourrait être issue de la condensation d'un peptide modifié **38** de type *aza*-diène comportant une déhydrocystéine sur une unité à trois carbones provenant du malonyl-CoA (**36**) ou de la déhydroalanine (**37**). La cycloaddition serait suivie d'étapes de décarboxylation, d'oxygénations et de méthylations pour achever la biosynthèse de la lodopyridone (**1**). Le mécanisme réactionnel aboutissant à la 4-pyridone n'a pas été élucidé ; une enzyme spécifique réalisant cette transformation doit certainement intervenir dans le processus de biosynthèse. On insistera particulièrement sur cette unité en C₂ nécessaire pour

²⁷ T. Tanaka, E. J. Behrman, *Anal. Biochem.* **1960**, 181–186.

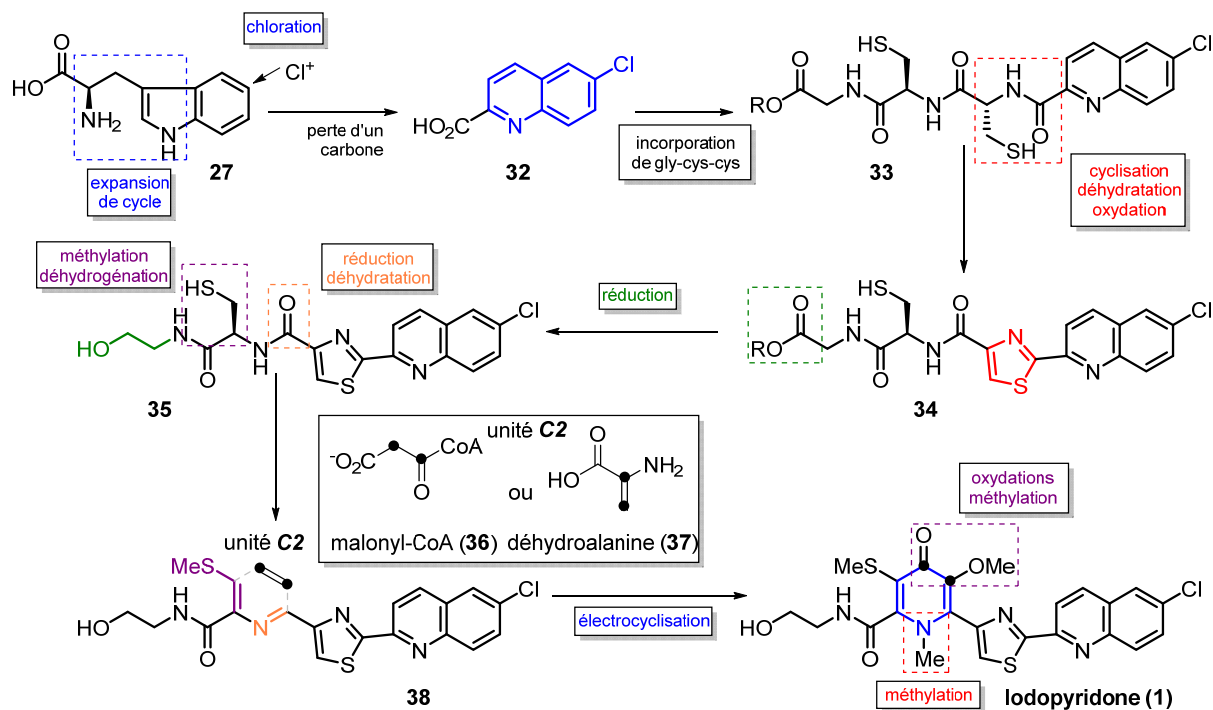
²⁸ C'est par exemple le cas lors de la biosynthèse de la camptothécine, un alcaloïde antitumoral de *Camptotheca acuminata*. Y. Yamazaki, M. Kitajima, M. Arita, H. Takayama, H. Sudo, M. Yamazaki, N. Aimi, K. Saito, *Plant. Physiology*, **2004**, *134*, 161–170.

²⁹ a) R. S. Roy, A. M. Gehring, J. C. Milne, P. J. Belshaw, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, *16*, 294–263 ; b) M. Kriek, F. Martins, R. Leonardi, S. A. Fairhurst, D. J. Lowe, P. L. Roche, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 17413–17422 ; c) C. Ressler, D. K. Kashelkar, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *88*, 2025–2035 ; d) E. Ratti, C. Lauinger, C. Ressler, *J. Org. Chem.*, **1968**, *33*, 1309–1310.

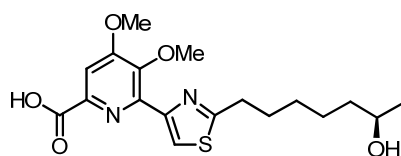
1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

rationaliser la biosynthèse, c'est probablement un des points les plus importants de l'analyse rétrobiosynthétique de la lodopyridone.

■ Les éléments-clés de notre hypothèse sont résumés sur la figure suivante (Figure 7) :



■ La lodopyridone a été isolée à partir de milieu de culture de l'actinomycète, 4 mg ont pu être purifiés à partir de 40 L de milieu de culture. Dans le but d'augmenter les rendements, W. Fenical *et al.* ont enrichi les milieux de cultures en glycine, cystéine, et tryptophane. Cette démarche s'inspire des travaux de M. Okuhara *et al.* sur la molécule WS75624 B (3, figure 8),³ une molécule proche de la lodopyridone isolée de *Saccharothrix* sp. Malheureusement, aucune augmentation de la biosynthèse de lodopyridone dans les milieux de culture de *Saccharomonospora* sp. n'a été observée. La formation du cycle pyridone très original a motivé notre travail de synthèse totale en privilégiant une approche d'inspiration biomimétique.



WS75624 B (3)

Figure 8 : Structure de WS75624 B (3) isolé de *Saccharothrix* sp.

1.4. Approches synthétiques du cœur azoté des tiopetides antibiotiques.

Bien que de nombreuses méthodologies de synthèse d'hétérocycles azotés à 6 chaînons soient décrites dans la littérature dans cette section bibliographique, nous nous focaliserons sur les méthodologies appliquées à la synthèse du cœur azoté des thiopeptides antibiotiques. Une attention plus particulière sera apportée aux méthodes faisant intervenir une construction complète de l'hétérocycle.

1.4.1. Synthèse du cœur hétérocyclique du GE2270 A.

De nombreux travaux de synthèse concernant les thiopeptides antibiotiques ont été réalisés. Dans de nombreux cas, la synthèse du cœur central fait intervenir la fonctionnalisation d'une pyridine préformée (ou d'un autre hétérocycle azoté à 6 chaînons). À titre d'exemple, l'équipe de Bach, pour réaliser la synthèse du cœur central du GE2270 A (**46**, schéma 4), a utilisé une stratégie faisant intervenir la fonctionnalisation d'une *ortho*-pyridone.³⁰

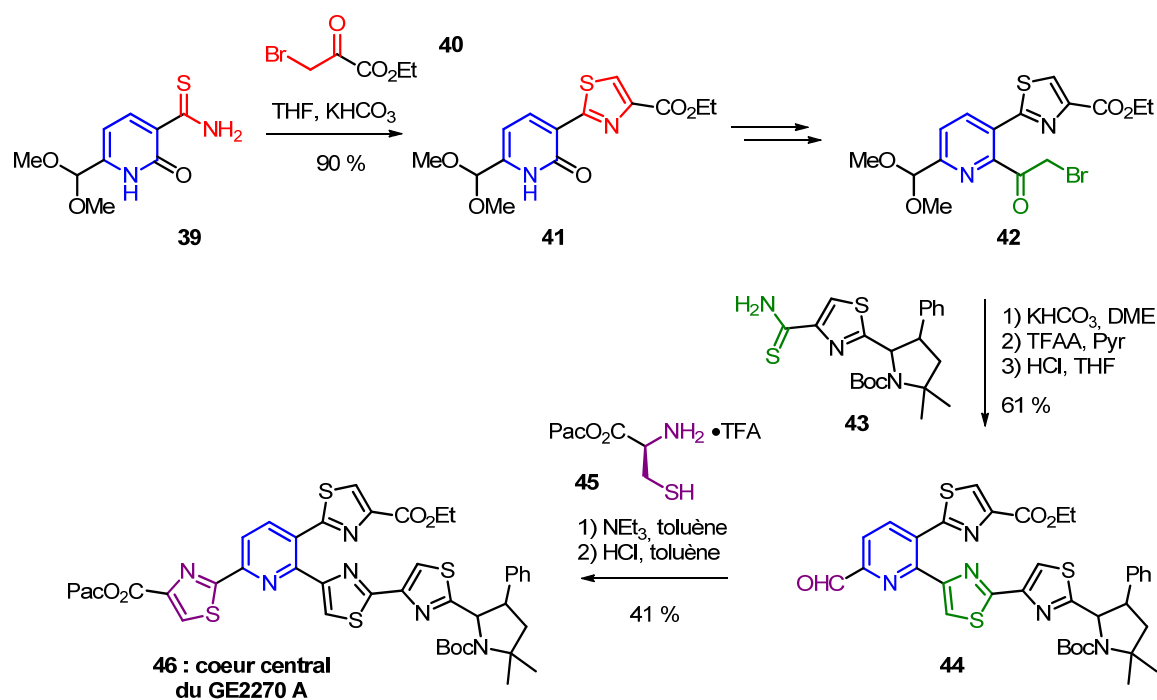


Schéma 4 : Étapes clef de la synthèse du cœur central du GE2270 A (**46**).

Le cœur central du GE2270 A (**46**), comporte une pyridine substituée par trois thiazoles. Avec cette approche synthétique, les cycles thiazoles ont été construits autour d'une pyridine préexistante. Le premier cycle thiazole a été construit par une réaction de Hantzsch consistant en une condensation d'un thioamide **39** sur une α -bromo-cétone **40**. Le second cycle thiazole a été formé par une réaction identique entre les fragments **42** et **43**. Le troisième thiazole

³⁰ a) G. Heckmann, T. Bach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1199–1201; b) H. M. Müller, O. Delgado, T. Bach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4771–4774; c) C. Ammer, T. Bach, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 14083–14093.

présent sur le composé **45** a été formé par une réaction biomimétique de condensation d'une cystéine modifiée **44** sur un aldéhyde **43** suivi d'une oxydation. Les stratégies d'introduction de thiazole sur une pyridine peuvent également être réalisées par des couplages paladocatalysés, cette démarche est assez classiquement utilisée pour la synthèse des molécules de cette famille chimique. Ce type de réaction sera illustré dans la section 1.7 (page 29) en détaillant la synthèse des WS75624 A et B (**2** et **3**). Plus en rapport avec notre travail expérimental, nous allons maintenant nous attarder sur les méthodes de synthèses permettant la construction de l'hétérocycle azoté du cœur central des thiopeptides antibiotiques.

1.4.2. Synthèse du cœur hétérocyclique de la micrococcine P1.

Pour la synthèse du cœur central **48** de la micrococcine P1 (**22**, schéma 5), l'équipe de Ciufolini a utilisé une réaction d'azotation d'une dicétone 1,5 **47**. La synthèse de la dicétone **47** a été réalisée par une réaction de Michael entre une cétone et une énone.³¹ Ensuite, la réaction d'azotation par l'acétate d'ammonium suivie d'une oxydation par le DDQ a permis de former en une étape la pyridine centrale achevant ainsi la synthèse du cœur central **48** de la molécule. Cette méthode a également été valorisée pour la synthèse totale de la thiocilline I par la même équipe.^{31b}

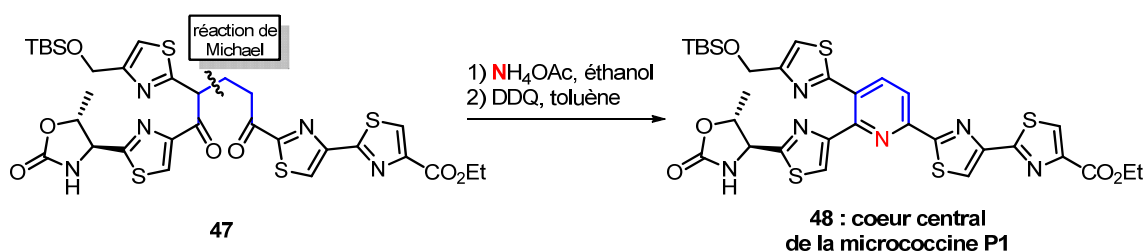


Schéma 5 : Etapes clés de la synthèse du cœur central de la micrococcine P1.

1.4.3. Synthèse du cœur hétérocyclique des amythiamicines et du nosiheptide.

Deux stratégies particulièrement intéressantes et originales font intervenir une construction d'une pyridine par électrocyclisation (schéma 6). Dans le cas de la synthèse du cycle pyridine **51** des amythiamicines, une réaction de Bohlmann-Rahtz entre une cétone propargylique **49** et une énamine **50** permet la formation en une étape de l'hétérocycle.³² Dans une autre approche vers le nosiheptide, la construction du cycle **54** se fait par cycloaddition entre un *aza*-diène **53** et un alcyne **52**.³³ Bien que ces deux méthodes utilisent un fragment cétone propargylique, le mécanisme réactionnel est complètement différent. Ces approches bien que différentes de notre stratégie restent conceptuellement les plus proches du travail réalisé au cours de cette thèse.

³¹ a) M. A. Ciufolini, Y. C. Shen, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3804–3805; b) V. S. Aulakh, M. A. Ciufolini, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5900–5904.

³² a) M. C. Bagley, K. Chapaneri, J. W. Dale, X. Xiong, J. Bower, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1389–1399; b) C. J. Moody, M. C. Bagley, *Synlett* **1998**, *1998*, 361–362; c) M. C. Bagley, J. W. Dale, D. D. Hughes, M. Ohnesorge, N. G. Phillips, J. Bower, *Synlett* **2001**, *2001*, 1523–1526; d) M. C. Bagley, J. W. Dale, R. L. Jenkins, Bower, *J. Chem. Commun.* **2004**, 102–103.

³³ J. -Y. Lu, H. -D. Arndt, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4205–4212.

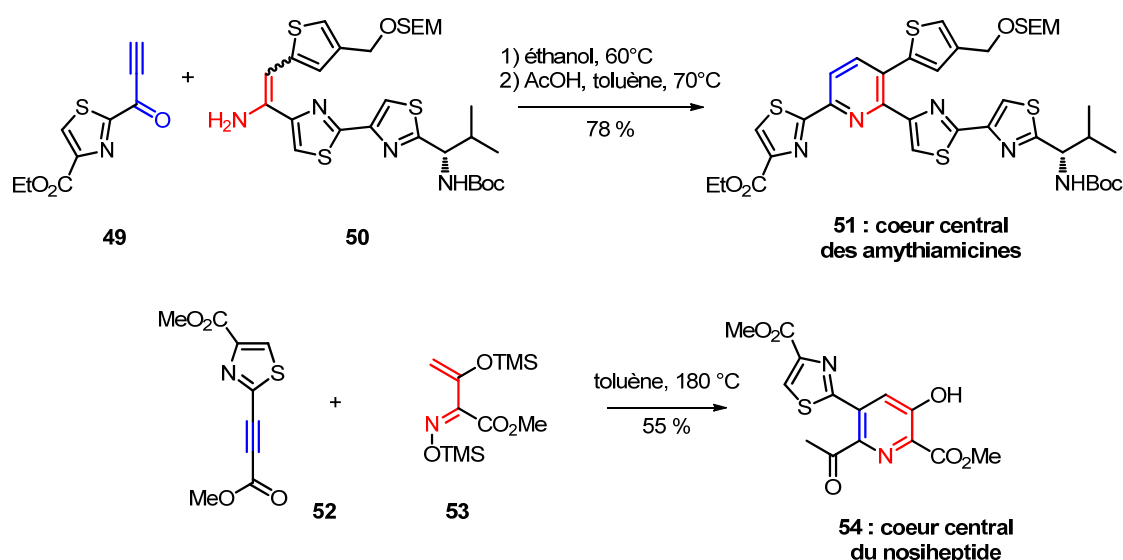
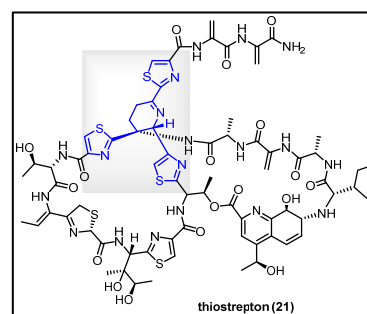


Schéma 6 : Construction d'hétérocycles par électrocyclisation.

1.4.4. Synthèse du cœur hétérocyclique du thiostrepton.

Dans cette famille de molécules, le thiostrepton (**21**) est sans conteste le membre de plus complexe. Il est issu de deux repliements de la chaîne peptidique créant ainsi deux macrocycles. Au cours de sa synthèse totale l'équipe de Nicolaou a préparé l'hétérocycle azoté central (composé **58**) par une cycloaddition biomimétique (Schéma 7A).²¹ Cette réaction a été découverte de manière indépendante par Wulff et Gilchrist au début des années 1990³⁴ puis son implication dans un schéma de biosynthèse a été établie par Nicolaou au cours de sa synthèse totale du thiostrepton. À partir de l'amine **55**, et de l'aldéhyde **56**, une imine transitoire est formée puis *in-situ* elle est stabilisée sous la forme d'une thiazolidine **57** qui correspond formellement à un thioaminal cyclique (Schéma 7B). En condition basiques, (carbonate d'argent, DBU) la forme ouverte peut être régénérée et le bloc cystéine transformé en déhydroalanine par élimination d'un équivalent de H₂S au cours d'un processus analogue à une crotonisation (Schéma 7B). Dans ce cas précis la réaction d'élimination fournit l'*aza*-diène **59**. Cette espèce hautement réactive ne peut être isolée et s'additionne spontanément sur elle-même par une cycloaddition [4+2] formant ainsi le cœur central du thiostrepton (composé **60**). La benzylamine présente dans le milieu réactionnel favorise l'hydrolyse de l'imine résiduelle achevant la synthèse du fragment **58** complexe avec un très bon rendement de 60 % au bout d'une impressionnante cascade de réactions. Les déconnexions de cette réaction de cycloaddition [4+2] sont identiques à celles envisagées au cours de notre stratégie de synthèse du cycle pyridone de la Iodopyridone. Par contre dans notre cas, pour conserver le substituant soufré de l'acide aminé il a été nécessaire de



³⁴ a) G. Wulff, H.T. Klinken, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 5985–5990; b) T. L. Gilchrist, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *35*, 4097–4100

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

développer une méthodologie originale afin de synthétiser une déhydrocystéine et non pas une déhydroalanine.

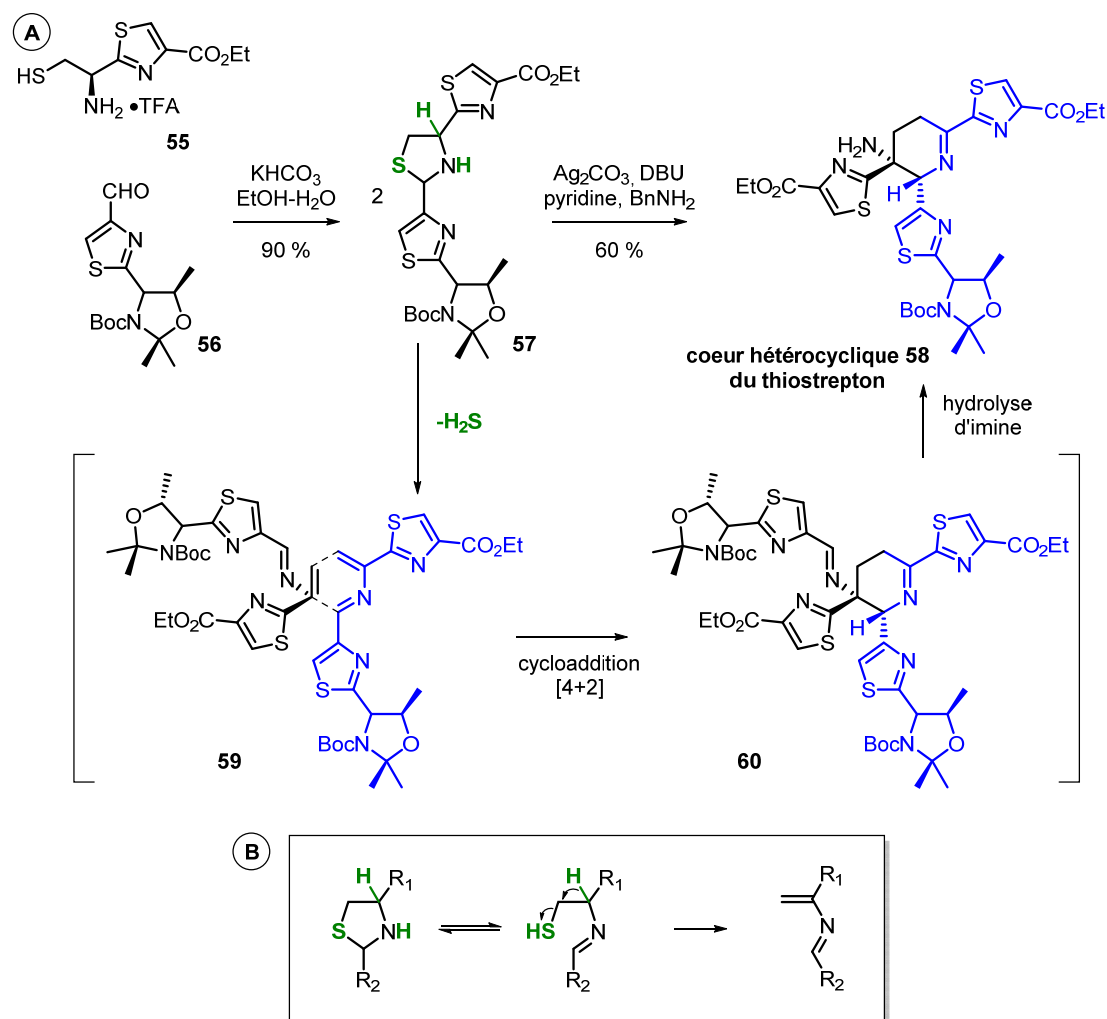


Schéma 7 : Synthèse biomimétique du cœur central 58 du thioestrepton (21).

1.5. Méthodes d'obtention de déhydroamino-acides.

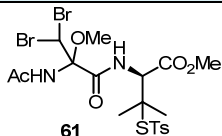
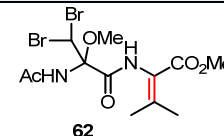
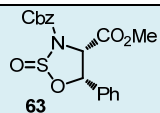
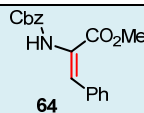
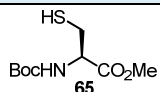
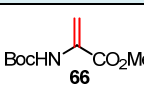
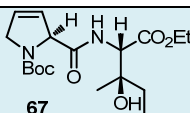
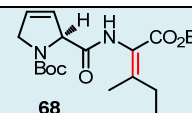
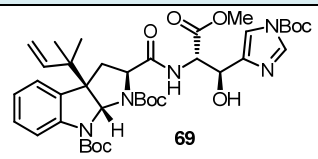
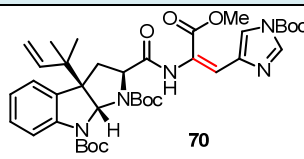
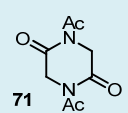
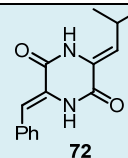
De nombreux peptides comportent des résidus déhydroamino-acides, mais les méthodes de préparation au laboratoire sont peu nombreuses et font généralement appels à des crotonisations réalisées sur des dérivés de la sérine ou de la cystéine.³⁵ Toutefois de nouvelles méthodologies de préparation faisant appel à des couplages organométalliques principalement catalysés au palladium ou au cuivre ont été développées. Quelques méthodes représentatives vont être exposées afin de resituer dans son contexte notre synthèse du fragment déhydrocystéine. La sérine, la thréonine et la cystéine sont des acides aminés essentiels biosynthétisés par des aldols transférases. La sérine et la thréonine peuvent être vues comme des aldols et la cystéine en tant que thioaldol. La réactivité des aldols peut être transposée à ces trois acides aminés et leurs dérivés. Ainsi, la réaction de crotonisation appliquée à ces

³⁵ a) J. Jiang, Z. Ma, S. L. Castle, *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 5431–5451. b) S.; Kotha, V. B.; Bandarugattu, N. G. Krishna, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5361–5384.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

substrats conduit à la formation de déhydroamino-acides en milieu basique par l'élimination d'un groupement partant (Schéma 8). Quelques exemples sont donnés dans le Tableau 2 pour illustrer la démarche. Notons que l'exemple de formation d'une déhydroalanine à partir d'une cystéine (Tableau 2, entrée 3) est à rapprocher de la démarche biomimétique de Nicolaou lors de la synthèse du thioestrepton.

Tableau 2 : Formation de déhydroamino-acides par crotonisation.

entrée	substrat	conditions	produit	rendement
1 ³⁶		triéthylamine		30 %
2 ³⁷		DBU, CH ₂ Cl ₂		90 %
3 ³⁸		K ₂ CO ₃ , DMF, 1,5-diiodopentane		93 %
4 ³⁹		EDC, Cu(OTf) ₂ , THF		73 %
5 ⁴⁰		EDC, CuCl ₂ , toluène		81 %
6 ⁴¹		1) <i>i</i> -PrCHO, <i>t</i> -BuOK, <i>t</i> -BuOH-DMF 2) PhCHO, <i>t</i> -BuOK, <i>t</i> -BuOH-DMF		48 %

³⁶ S. Nakatsuka, H. Tanino, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 5008–5010.

³⁷ M. M. Stohlmeyer, H. Tanaka, T. J. Wandless, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 6100–6101.

³⁸ J. M. Chalker, S. B. Gunnoo, O. Boutureira, S. C. Gerstberger, M. Fernández-González, G. J. L. Bernardes, L. Griffin, H. Hailu, C. J. Schofield, B. G. Davis, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1666–1676.

³⁹ J. S. Grimley, A. M. Sawayama, H. Tanaka, M. M. Stohlmeyer, T. F. Woiwode, T. J. Wandless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8157–8159.

⁴⁰ N. Shanguan, W. J. Hehre, W. S. Ohlinger, M. P. Beavers, M. M. Joullié, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6281–6287.

⁴¹ a) C. Gallina, A. Liberatori, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 1135–1136; b) C. Gallina, A. Liberatori, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 667–673.

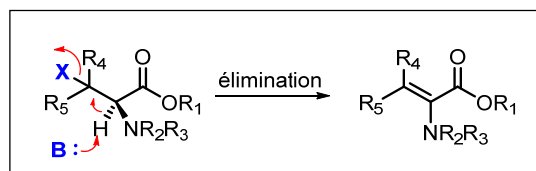


Schéma 8 : Formation de déhydroamino-acides par élimination.

La formation de déhydroamino-acides par élimination d'un groupement est une approche efficace et robuste au vu du nombre d'exemples rapportés dans la littérature (schéma 9). Par contre, pour la synthèse de la Iodopyridone nous avons besoin d'une déhydrocystéine et ce type de méthode par élimination n'est pas adapté pour conserver la fonction soufrée. Une stratégie récente de construction de déhydroamino-acides **76** par un couplage entre un amide **73** et un iodure allylique **74** catalysé par l'iodure de cuivre (I) en présence d'une diamine (DMEDA) correspond à une stratégie innovante.⁴² Par contre, la séquence pour aboutir à la fonction acide carboxylique **76** à partir du produit de couplage **75** est longue et nécessite six étapes supplémentaires. Au cours de ce travail, nous avons pensé et réalisé ce type de couplage avant la publication de cette stratégie. Nos travaux seront présentés dans la **section 2.2**.

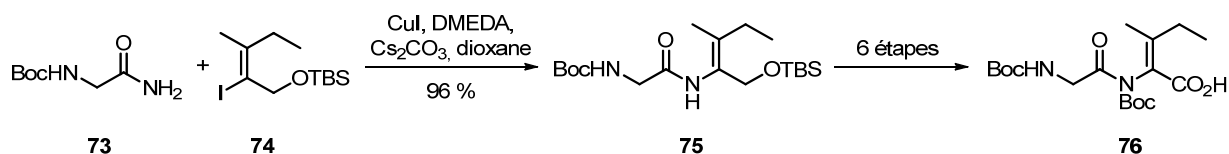


Schéma 9 : Formation de déhydroamino-acide par couplage organométallique.

1.6. La réaction de Povarov.

La réaction de Povarov⁴³ sera la clef de notre stratégie de synthèse, c'est une réaction d'aza-Diels-Alder faisant intervenir un assemblage multicomposant⁴⁴ entre une aniline, un aldéhyde et un éther d'énol. Cette réaction permet la synthèse de quinoléines substituées à partir de fragments simples. Dans la série d'articles décrivant pour la première fois cette réaction par Povarov en 1963 (schéma 10),⁴⁵ la cycloaddition d'un éther de vinyle **80** ou un thioéther de vinyle **81** sur une imine aromatique **79** en présence de $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$ est décrite. Les produits issus des cycloadditions (**82** ou **83**) après aromatisation en milieu acide forment l'aryl-quinoléine **84**.

⁴² T. Kuranaga, Y. Sesoko, K. Sakata, N. Maeda, A. Hayata, M. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5467–5474.

⁴³ V. V. Kouznetsov, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2721–2750.

⁴⁴ K. Narasaka, T. Shibata, *Heterocycles*, **1993**, *35*, 1039–1053.

⁴⁵ a) L. S. Povarov, B. M. Mikhailov, *Izv. Akad. Nauk. SSR, Ser. Khim.* **1963**, 953–956; b) L. S. Povarov, V. I. Grigos, B. M. Mikhailov, *Izv. Akad. Nauk. SSR, Ser. Khim.* **1963**, 2039–2041; c) L. S. Povarov, V. I. Grigos, R. A. Karakhanov, B. M. Mikhailov, *Izv. Akad. Nauk. SSR, Ser. Khim.* **1964**, 179–186; b) V. I. Grigos, L. S. Povarov, B. M. Mikhailov, *Izv. Akad. Nauk. SSR, Ser. Khim.* **1965**, 2163–2171.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

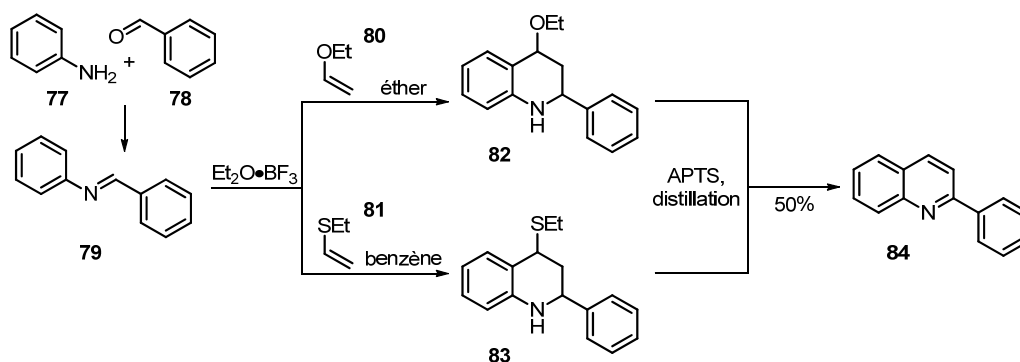


Schéma 10 : Exemples historiques de la réaction de Povarov.

Concernant le mécanisme réactionnel (schéma 11), une séquence faisant intervenir la formation d'espèces cationiques intermédiaires (composé **85**) est postulée pour cette réaction plutôt qu'un mécanisme concerté (état de transition **86**).^{43,46} Dans un premier temps l'acide de Lewis activerait l'imine **79** sur laquelle viendrait s'additionner l'oléfine **80** substituée par un groupement électro-donneur. Ensuite, l'espèce cationique intermédiaire **85** viendrait ensuite réagir de manière intramoléculaire sur le cycle aromatique issu de l'aniline de départ par un mécanisme de substitution électrophile.

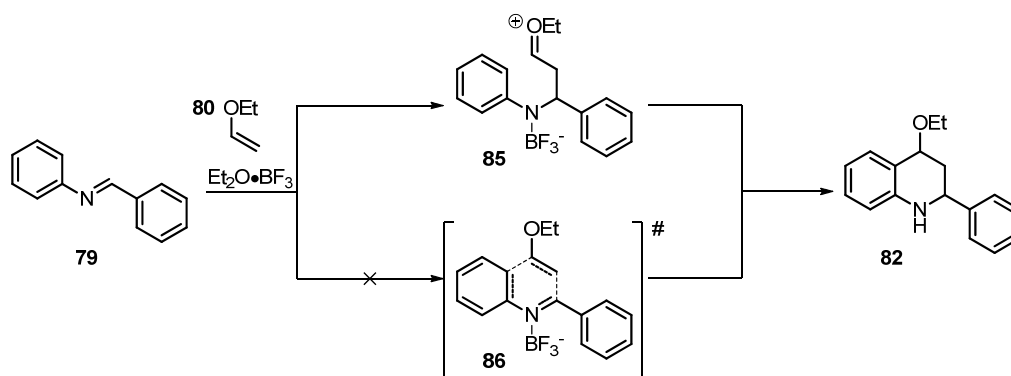


Schéma 11 : Mécanisme de la réaction de Povarov.

La réaction de Povarov, est assez flexible en termes de diversité de substrats et de possibilité dans le choix du catalyseur. La réaction est classiquement catalysée par Et₂O·BF₃, mais il est également possible d'utiliser des sels de terres rares ou des acides de Brønsted (schéma 12).⁴³

Ajoutons que bien que largement utilisée en chimie organique de synthèse, la réaction de Povarov n'est pas à ce jour postulée dans les voies de biosynthèse des métabolites spécialisés.

⁴⁶ P. Buonora, J. -C. Olsen, T. Oh, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 6099–6138.

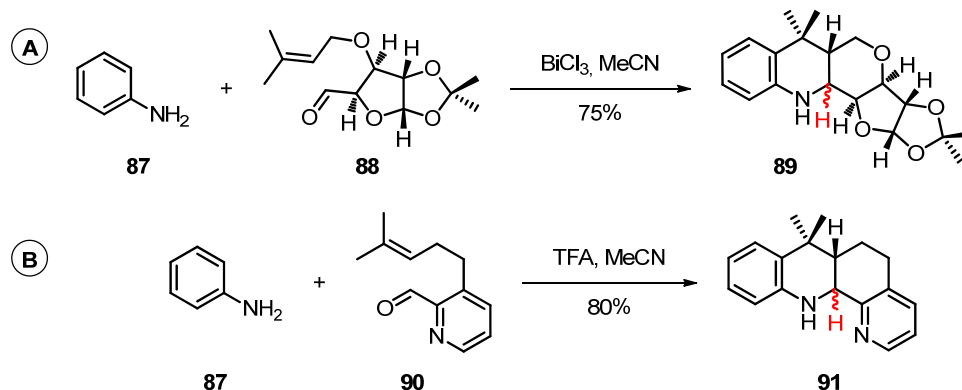


Schéma 12 : Réactions de Povarov catalysée par A : un acide de Lewis ;⁴⁷ B : un acide de Brønsted.⁴⁸

1.7. Synthèses antérieures des WS75624 A/B et de la lodopyridone.

1.7.1. Synthèses des WS75624 A et B.

Les WS75624 A et B (**2** et **3**, figure 9) sont des molécules isolées en 1995 de l'actinomycète *Saccharothrix* sp. et comportant un cycle pyridine et un thiazole substitué par une chaîne latérale aliphatique.³ Ces molécules sont les parents les plus proches de la lodopyridone (**1**) et leur biosynthèse dérivent certainement d'une séquence réactionnelle similaire à celle de la lodopyridone. La synthèse la plus récente correspond à l'approche rapide et élégante de Stellios Arseniyadis et Janine Cossy décrite en 2011.⁴⁹

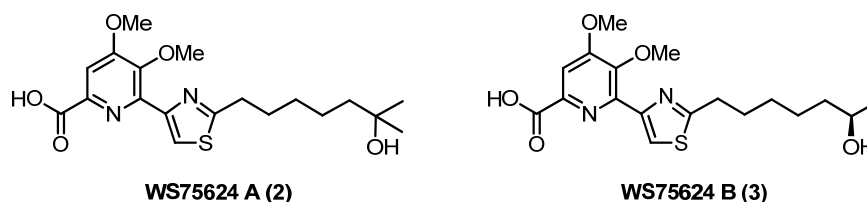


Figure 9 : Structure des WS75624 A et B **2** et **3** isolés de *Saccharothrix* sp.

Dans leur approche (schéma 13), une amorce de chaîne aliphatique a été introduite sur le cycle thiazole par un couplage de Stille entre un stannane allylique et un triflate de thiazole **93**. Le reste de la chaîne a été complétée au cours d'une métathèse croisée réalisée sur l'intermédiaire **94** suivie d'une hydrogénation. Ensuite, la fonction triflate résiduelle présente sur l'intermédiaire **95** a été stannylée et, toujours par un couplage de Stille le stannyl-thiazole **96** a été ancré à l'iodo-pyridine **97**.

⁴⁷ G. Sabitha, V. E. Reddy, J. -S. Yadav, K. V. S. R. Krishna, A. R. Sankar, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4029–4032.

⁴⁸ A. S. Kiselyov, *Synlett*, **2006**, 391–394.

⁴⁹ J. Dash, B. Melillo, S. Arseniyadis, J. Cossy, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2246–2249.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

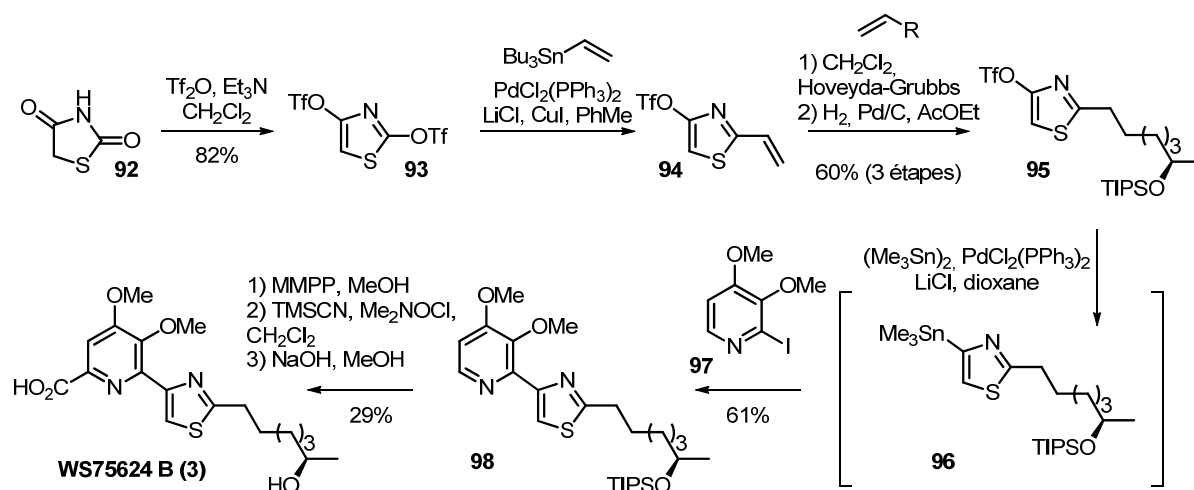


Schéma 13 : Synthèse formelle du WS75624 B (3) par Arseniyadis et Cossy.

■ Cette approche correspond à une synthèse formelle car elle aboutit à un intermédiaire de synthèse **98** commun avec la synthèse de Gordon de 1998.⁵⁰ La méthode d'introduction de l'acide carboxylique développée par Gordon, est réalisée *via* l'introduction d'un cyanure apporté par le TMSCN. Pour ce faire, la pyridine **98** est oxydée en *N*-oxyde par le monoperoxyde du phtalate de magnésium (MMPP) puis ce *N*-oxyde est activé sous la forme d'un groupement partant à l'aide de Me₂NOCl. Cette activation permet l'introduction d'un cyanure sur la position ortho de la pyridine. Enfin la fonction nitrile introduite, est hydrolysée en milieu alcalin. Cette réaction ayant été utilisée au cours de nos travaux un schéma détaillé du mécanisme sera présenté dans la section résultats (page 40).

■ La synthèse d'Arseiyadis et Cossy, correspond à la cinquième approche synthétique des WS75624 A et B (**2** et **3**). Les cinq approches sont similaires par le choix des déconnexions (schéma 14), et pourraient être qualifiées de « synthèses par assemblage de blocs hétérocycliques ». Toutes ces stratégies de synthèse font intervenir une fonctionnalisation d'une pyridine préexistante provenant d'une azotation de l'acide kojique (**100**) dans le cas des synthèses de Patt,⁵¹ Bach⁵² et Sammakia.⁵³ La pyridine et la chaîne latérale sont couplées au thiazole *via* des lithiation/stannilation d'un des hétérocycles suivi un couplage métallocatalysé. Seule la stratégie de Patt se différencie par la formation du thiazole à l'aide d'une réaction de Hantzsch-thiazole. L'originalité des différentes synthèses résident dans le mode de construction de la chaîne aliphatique, mais aucune n'apportent de nouvelle méthode pour la construction d'une pyridine.

⁵⁰ S-T. Huang, D. M. Gordon, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9335–9338.

⁵¹ W. C. Patt, M. A. Massa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1297–1300.

⁵² T. Bach, S. Heuser, *Synlett*, **2002**, 12, 2089–2091.

⁵³ E. T. Stangeland, T. Sammakia, *J.Org. Chem.* **2004**, 69, 2381–2385.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

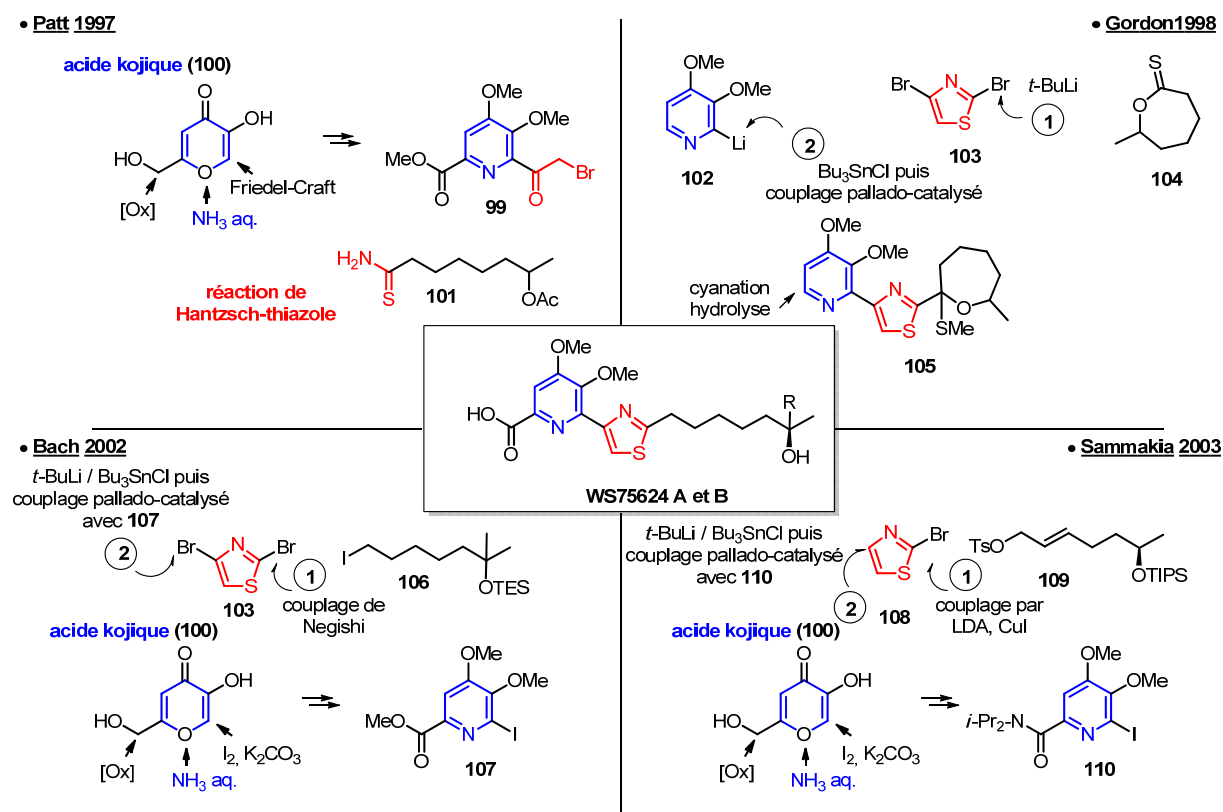


Schéma 14 : Comparaison des synthèses des WS75624 A et B par Patt, Gordon, Bach et Sammakia.

1.7.2. Synthèse de la Iodopyridone de Koert.

La première synthèse totale de la Iodopyridone est publiée en 2012 par Koert.⁵⁴ Cette stratégie fait largement appel aux méthodologies développées pour les synthèses des WS75624 A et B et utilise une approche par assemblage de blocs hétérocycliques par couplages palladocatalysés.

■ Le point de départ a été l'acide kojique **100** sur lequel la chaîne éthanolamine **112** a été introduite par un couplage peptidique intervenant après les étapes de méthylation de l'hydroxyle et d'oxydation de Jones (schéma 15). Le cycle pyranone **113**, a ensuite été azoté par la méthylamine puis bromée par le NBS fournissant la pyridone **114**. L'étape cruciale de cette synthèse fut l'introduction de la fonction *S*-méthyle. Cette étape a été facilement réalisée par un couplage catalysé par l'iodure de cuivre entre la bromo-pyridone **114** et le thiométhylate de sodium. La synthèse du fragment **116** a été achevée par l'introduction d'un atome d'iode nécessaire pour l'ancrage par la suite du cycle thiazole.

⁵⁴ T. Burekhardt, K. Harms, U. Koert, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4674–4677.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

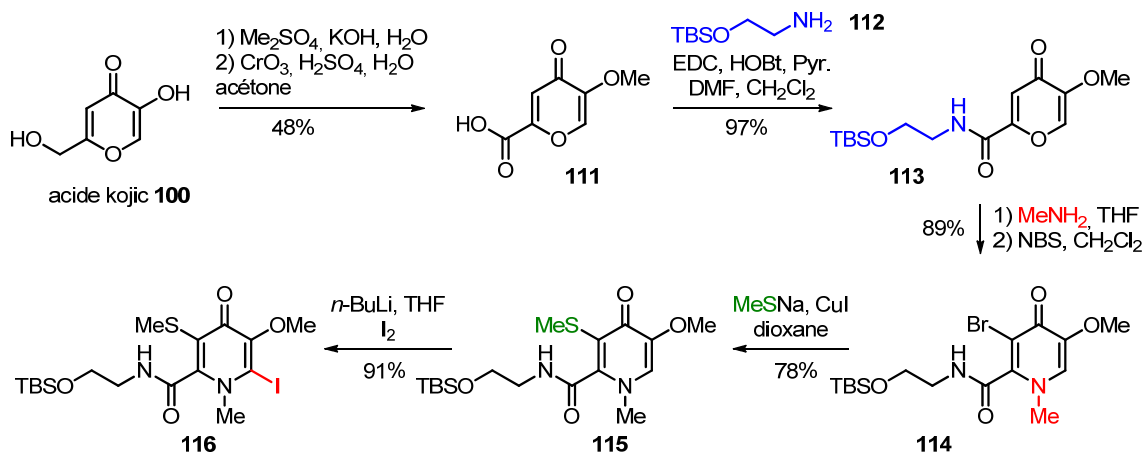


Schéma 15 : Synthèse de la lodopyridone par Koert (synthèse du fragment pyridone).

■ Le second fragment **118** (schéma 16) contenant la quinoléine et le thiazole a été assemblé par un couplage de Negishi entre la bromo-quinoléine **117** et le dibromothiazole **103**. Ce composé a ensuite été converti en stannane **119**. Pour terminer cette synthèse totale, le squelette polyhétéocyclique de la lodopyridone a été achevé par un couplage palladocatalysé entre le stannane **119** et la iodo-pyridone **116** suivi de la déprotection de fonction alcool présente sur la chaîne éthanol amine. Ce dernier couplage est identique à celui employé par Bach au cours de la synthèse du WS75624 A.⁵²

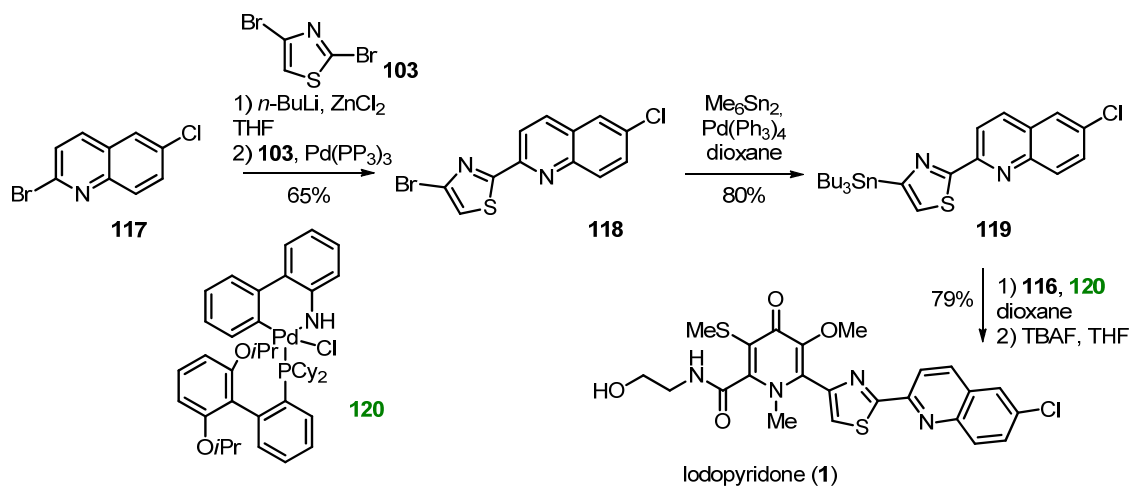


Schéma 16 : Synthèse de la lodopyridone par Koert.

1.7.3. Synthèse de la lodopyridone de Moody.

La seconde synthèse de la lodopyridone par Moody (schéma 17),⁵⁵ est très similaire à celle de Koert avec des déconnexions identiques mais intervenant dans un ordre différent.

⁵⁵ I. R. George, W. Lewis, C. J. Moody, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 8209–8215.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

■ À partir de la quinoléine **121**, une fonction thioamide **123**, a été introduite permettant de construire le cycle thiazole par une réaction de « Hantzsch-thiazole ». Cette étape est la seule différence notable avec la synthèse de Koert. Ensuite après quelques aménagements fonctionnels réalisés sur le cycle thiazole, une fonction borane a été introduite (composé **125**) permettant le couplage pallado-catalysé avec la pyranone **126** elle-même obtenue à partir de l'acide kojique **100**. Là où Koert avait choisi de transformer la pyranone en pyridone et d'introduire le *S*-méthyle de manière précoce avant l'ancrage sur le thiazole, Moody a préféré réaliser ces étapes après la construction du système polycyclique **127**.

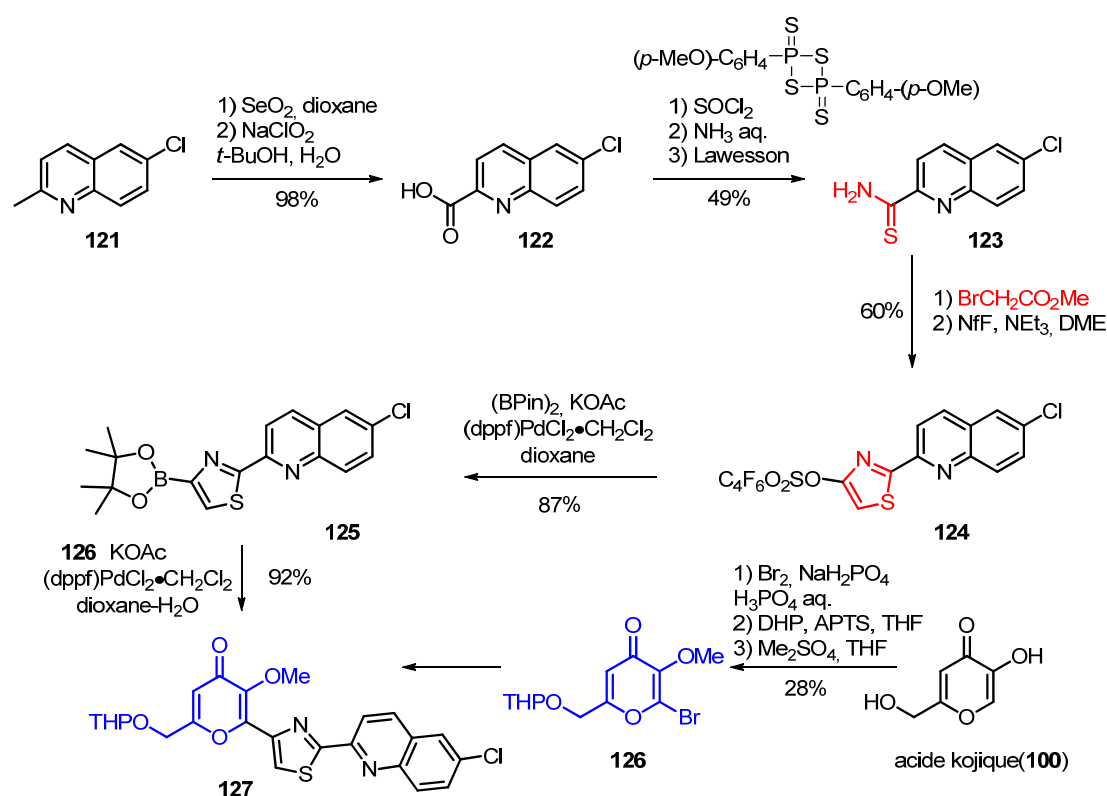


Schéma 17 : Synthèse de la Iodopyridone par Moody (synthèse du fragment tricyclique).

■ À partir du composé **127**, la chaîne éthanolamine **112** a été introduite en conditions oxydante (schéma 18). Puis le cycle pyranone du composé **128** a été convertit en pyridone **129** par la méthylamine. Notons que le rendement de cette réaction réalisée à un stade avancé de la synthèse est beaucoup moins efficace que lors de la synthèse de Koert. Enfin, le *S*-méthyle a été introduit par une séquence similaire faisant intervenir une bromation du cycle pyridone suivie d'une substitution nucléophile de l'atome de brome. Cette étape réalisée en l'absence de sel de cuivre est nettement moins efficace que lors de la synthèse précédente. Pour achever la synthèse totale de la Iodopyridone (**1**) la fonction alcool a été déprotégée.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

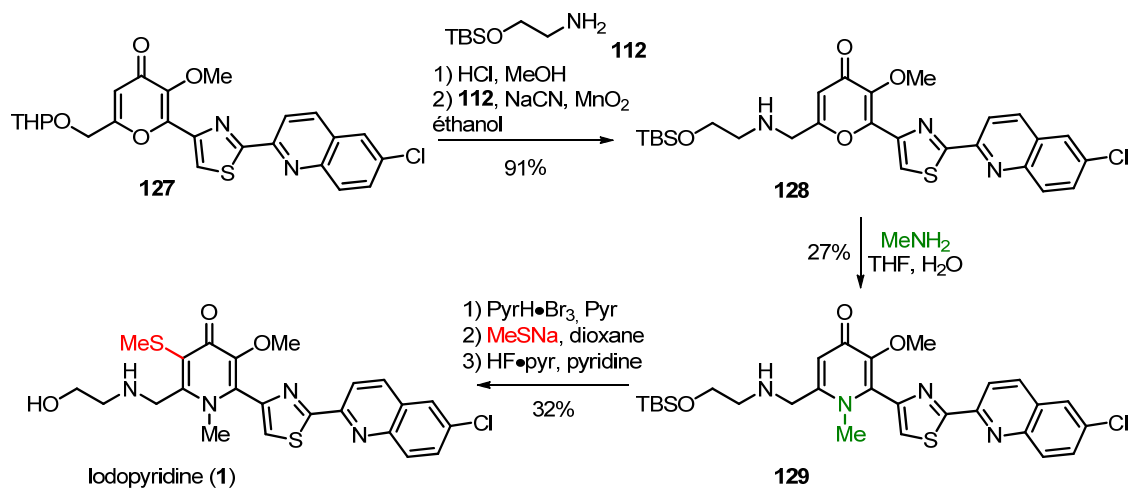


Schéma 18 : Synthèse de la Iodopyridone par Moody.

Les différentes synthèses de la Iodopyridone et des WS75624 A et B sont toutes très élégantes et efficaces. Mais les déconnexions faisant intervenir des couplages métallo-catalysés pour ancrer les différents cycles ainsi que l'utilisation récurrent de l'acide kojique en tant que précurseur de la pyridone les rendent redondantes. Pour nous démarquer de toutes ces synthèses, nous avons imaginé une toute autre approche basée sur la construction de la pyridone en faisant intervenir des déconnexions d'inspiration biomimétique calquées sur nos hypothèses de biosynthèse formulées précédemment.

Partie 2 :

Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

La structure originale de la lodopyridone (figure 10) (en particulier la partie thiométhylpyridone) et dans une moindre mesure les activités cytotoxiques modestes ($CI_{50}=3,6 \mu\text{M}$ sur cellules HCT-116) ont motivé notre travail de synthèse. Au vue de l'analogie de structure avec les thiopeptides antibiotiques, la recherche d'une activité antibiotique pour cette molécule semble plus judicieuse. Afin de nous démarquer des synthèses antérieures et pour développer de nouvelles méthodologies de synthèse, une approche biomimétique a été privilégiée pour la construction du cycle pyridone de la substance naturelle. Bien que la stratégie d'assemblage ait subi des modifications au cours du projet, nous avons choisi de présenter la rétrosynthèse initiale puis de discuter les modifications apportées au cours de la discussion sur les résultats.

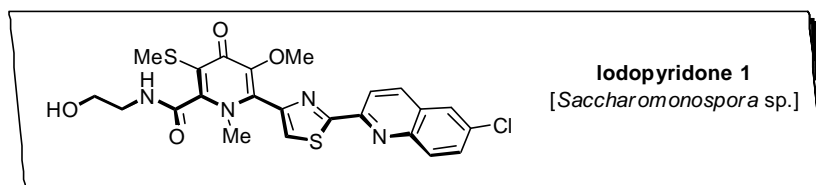


Figure 10 : Structure de la lodopyridone 1 (rappel).

2.1. Rétrosynthèse de la lodopyridone.

2.1.1. Déconnexions clefs.

Les éléments clefs de notre rétrosynthèse biomimétique initiale pour la lodopyridone sont énoncés comme suit (schéma 19) :

■ Selon nos hypothèses de biosynthèse (section 1.3 « Nos hypothèses de biosynthèse de la lodopyridone. » page 19) : le cycle pyridone serait issu d'une cyclo-addition [4+2] entre le peptide modifié **38** et de « l'unité en C_2 » dont nous avons déjà souligné l'originalité (ex : déhydroalanine **37**). Afin de mimer cette étape, notre stratégie de synthèse initiale proposait de construire le cycle azoté de la lodopyridone hautement fonctionnalisé par une réaction de Povarov modifiée⁴³ entre l'aza-diène **132** et le 1,3-dioxole **131** en présence d'un acide de Lewis. Le 1,3-dioxole **131**, intervenant dans cette cyclisation apporterait ainsi les deux carbones supplémentaires non issus du térapeptide au cours de la biosynthèse.

■ Le produit de cycloaddition **130** de type pyridinium, pourrait donner accès à la lodopyridone par une isomérisation en pyridone et l'introduction de la chaîne éthanol amine.

■ L'aza-diène **132** nécessaire pour la réaction de cycloaddition est un équivalent très proche du térapeptide modifié **38** impliqué dans le schéma de biosynthèse. Ce fragment **132** comporte les cycles quinoléine et thiazole ainsi que l'unité déhydrocystéine conjuguée. Selon

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

notre stratégie, il était prévu de générer *in-situ* la fonction *aza*-diène par la formation d'un iminium entre l'aldéhyde **133** et l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthyldéhydrocystéine **134**.

■ La formation de l'aldéhyde hétérocyclique **133**, peut être facilement envisagée par la fonctionnalisation d'une quinoléine et d'une réaction de Hantzsch-thiazole.

■ Pour la synthèse de l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthyldéhydrocystéine **134** la mise au point d'une séquence originale était nécessaire.

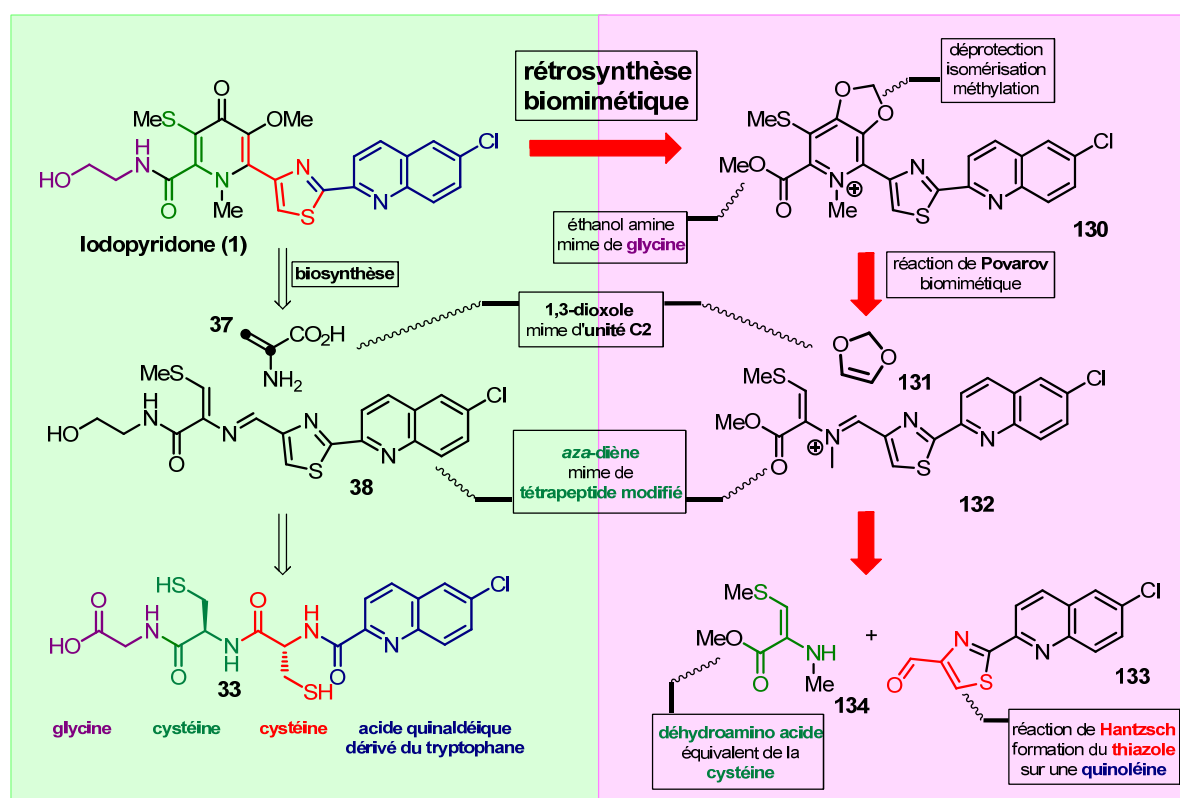


Schéma 19 : Rétrosynthèse de la Iodopyridone.

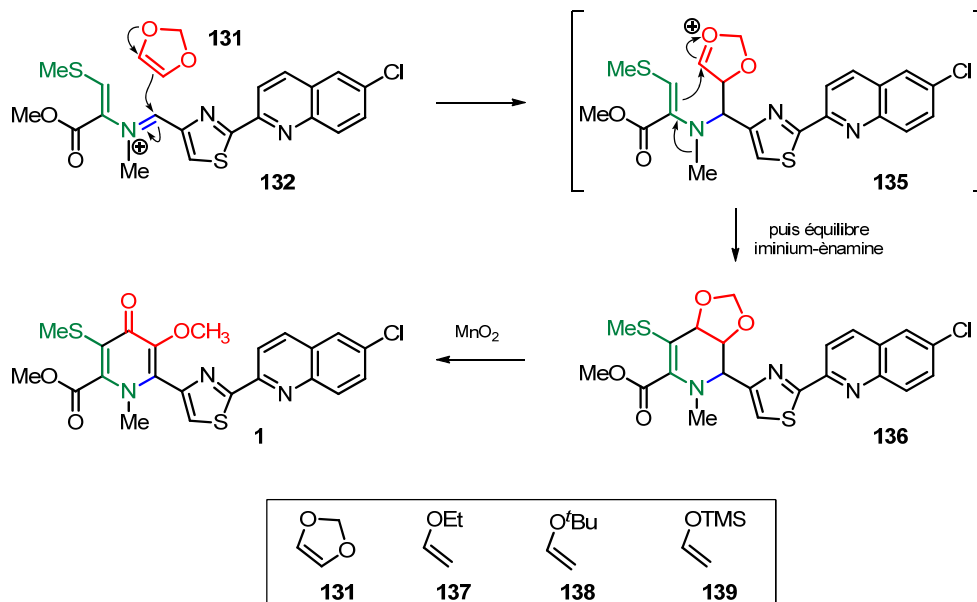
2.1.2. Mécanisme prévu pour l'assemblage du cœur central de la Iodopyridone.

Le but de cette rétrosynthèse (schéma 20), était d'adapter la réaction de Povarov faisant classiquement intervenir une aniline et de la substituer par l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthyldéhydrocystéine **134**. Par cette méthode, il était envisagé de former la pyridone complexe hautement fonctionnalisée de la substance naturelle à partir de précurseurs biomimétiques simples préparés en un nombre limité d'étapes de synthèse.

Le mécanisme envisagé pour l'assemblage multicomposant (schéma 20) faisait intervenir la formation *in-situ* d'un iminium **132** par réaction entre l'amine **134** et l'aldéhyde **133**. La formation de cet iminium favorisé par la présence d'un acide de Lewis, aurait permis au 1,3-dioxole **131** de s'additionner formant l'intermédiaire **135**. Puis le basculement de la double liaison de la partie déhydroamino-acide aurait neutralisé la charge positive et ainsi cyclisé l'hétérocycle **136**. Il était également prévu une étape d'oxydation supplémentaire du composé **136** par l'oxyde de manganèse pour ouvrir le cycle 1,3-dioxolane afin de générer la pyridone

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

présente dans la Iodopyridone. Au cours de cette étape d'oxydation il était également prévu de placer le substituant méthoxyle par la fragmentation de la fonction méthylène-dioxy issue du cycle 1,3-dioxole. Des essais de réaction de Povarov étaient également prévus avec les éthers d'énol **137**, **138** et **139** comme alternatives biomimétiques possibles au composé **131**.

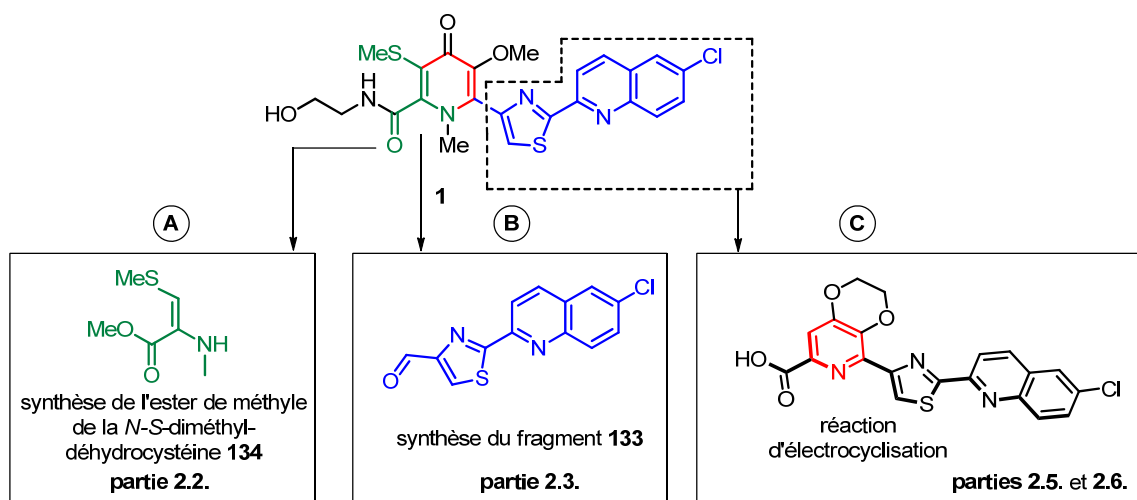


■ Dans ce manuscrit seront abordés les résultats de nos travaux concernant (figure 11) :

A : La synthèse de la *N,S*-diméthyl-déhydrocystéine **134** dans la **section 2.2.** (page 37)

B : La synthèse du fragment **133** dans la **section 2.3.** (page 40).

C : L'étude de l'assemblage du cycle azoté de la Iodopyridone dans **les sections 2.5 / 2.6.** (page 43).



2.2. Synthèse de l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthyldéhydrocystéine.

Afin de former le cycle pyridone de la Iodopyridone (**1**) il était nécessaire de réaliser la synthèse de l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthyldéhydrocystéine **134**. À notre connaissance seules deux méthodes sont décrites dans la littérature pour préparer une *S*-méthyl déhydrocystéine. Dans les articles de la littérature traitant de ces deux méthodes, les séquences réactionnelles sont longues et les conditions opératoires ne sont pas du tout explicitées.⁵⁶ De plus dans l'optique de notre démarche, la réaction de Povarov a été choisie afin de construire efficacement la pyridone poly-substituée de la molécule naturelle avec un nombre limité d'étapes de synthèse. Afin de remplir nos objectifs une méthode originale en deux étapes faisant intervenir un couplage catalysée par un sel de cuivre (I) a été développée au laboratoire (schéma 21). Malgré sa simplicité apparente, cette séquence a été particulièrement difficile à mettre au point.

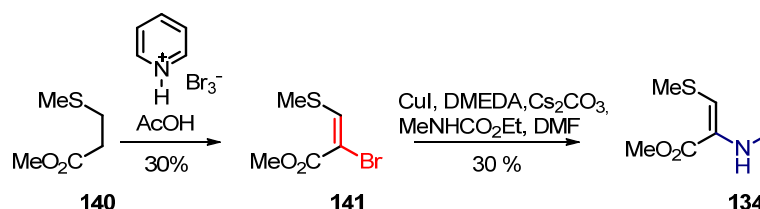


Schéma 21 : Synthèse l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthyldéhydrocystéine **134**.

Pour débiter la synthèse de notre fragment **134**, le 3-(méthylthio)propanoate de méthyle **140**⁵⁷ possédant une fonction *S*-méthyle a été choisi comme substrat de départ (Schéma 21). Dans une première étape, l'ester **140** a été traité par le tribromure de pyridinium dans l'acide acétique fournissant le bromure vinylique **141** avec un rendement de 30 %. Un rendement identique est obtenu en utilisant le dibrome comme agent bromant, mais le tribromure de pyridinium a été choisi en tant qu'alternative au dibrome plus facilement manipulable. D'un point de vue mécanistique, le tribromure dans l'acide acétique réalise une double bromation en α de la fonction ester (Schéma 22 ; composé **142**) puis l'élimination concomitante d'une molécule de HBr conduit à la formation de l'oléfine bromée **141** sous la forme d'un seul isomère. L'analyse par RMN NOESY n'a pas permis de déterminer la stéréochimie de la double liaison, mais un calcul de l'énergie stérique (Tableau 3) des deux rotamères **142a** et **142b** pouvant subir l'élimination, suggèrent que l'interaction stérique entre le *S*-méthyle et les bromes dirige la sélectivité de l'élimination. La fonction *S*-méthyle du rotamère **142a** subit la gêne stérique cumulée de deux atomes de bromes tandis que la fonction *S*-méthyle du rotamère **142b** ne subit la gêne stérique que d'un seul atome de brome. De plus les valeurs d'énergie stérique (Tableau 3) est en faveur d'un encombrement plus

⁵⁶ a) J. D. M. Herscheid, H. P. H. Scholten, M. W. Tjihuis, H. C. J. Ottenheijm, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1981**, *100*, 73–78 ;b) F. Effenberger, J. Kühlwein, C. Baumgartner, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, 1069–1074.

⁵⁷ Le 3-(méthylthio)propanoate de méthyle **19** est utilisé comme additif alimentaire (*cf.* fiche technique Aldrich), son odeur non désagréable s'apparente à celle de l'ananas mais en légèrement plus acidulée.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

faible du rotamère **142b**, permettant ainsi de proposer une stéréochimie *E* pour l'oléfine **141** après l'élimination antipériplanaire d'une molécule de HBr sur le rotamère **142b**.

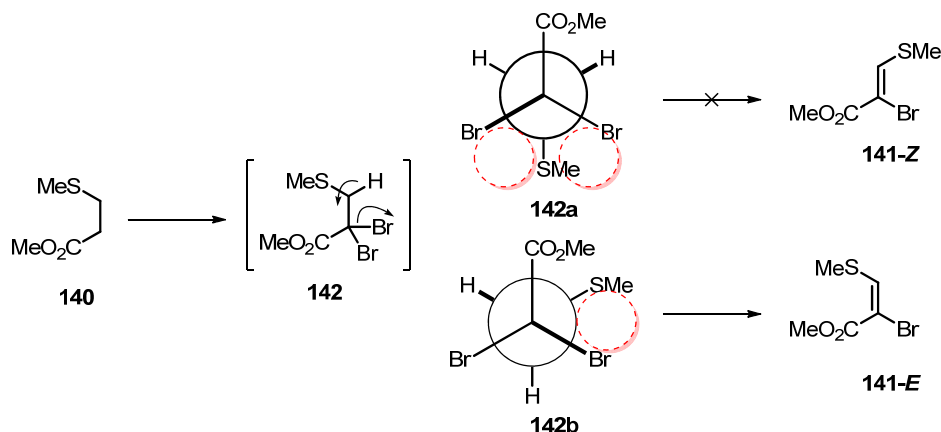


Schéma 22 : Projections de Newman des rotamères **142a** et **142b**.

Tableau 3 : Calculs de l'énergie stérique des intermédiaires formant l'oléfine **141**.

entrée	rotamère	énergie stérique	oléfine
1		23,59 kJ/Mol 5,63 kcal/mol	 isomère <i>Z</i>
2		21,31 kJ/Mol 5,09 kcal/mol	 isomère <i>E</i>

Calculs par la méthode de mécanique moléculaire MM2 réalisés sur Chem3D®.

La première étape vers la synthèse du fragment **134** a ainsi permis de créer l'insaturation de la déhydrocystéine ainsi qu'une fonction bromure vinylique nécessaire à l'introduction de la fonction *N*-méthyle. Pour ce faire (schéma 23), un couplage entre le bromure vinylique **141** et le *N*-méthyluréthane catalysé par l'iodure de cuivre en présence de diméthyléthylène diamine (DMEDA) et de carbonate de césium dans le DMF à 100 °C a été réalisé.⁵⁸ Au cours du cycle catalytique, la chélation du Cu(I) par la diamine forme l'espèce active **I**, permettant ainsi l'insertion du complexe de cuivre sur le bromure vinylique générant le complexe de cuivre (II) **II**. Ensuite en présence de la base, la méthyluréthane **144** remplace un halogénure dans la sphère de coordination du cuivre conduisant au complexe **III**. Enfin, l'élimination réductrice du carbamate **145**, régénère l'espèce catalytique **I**. Avec les

⁵⁸ G. Evano, A. Coste, K. Jouvin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 2840–2859.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

conditions réactionnelles utilisée, le carbamate **145** se déprotège spontanément dans le milieu réactionnel permettant ainsi d'isoler directement le fragment **134**.

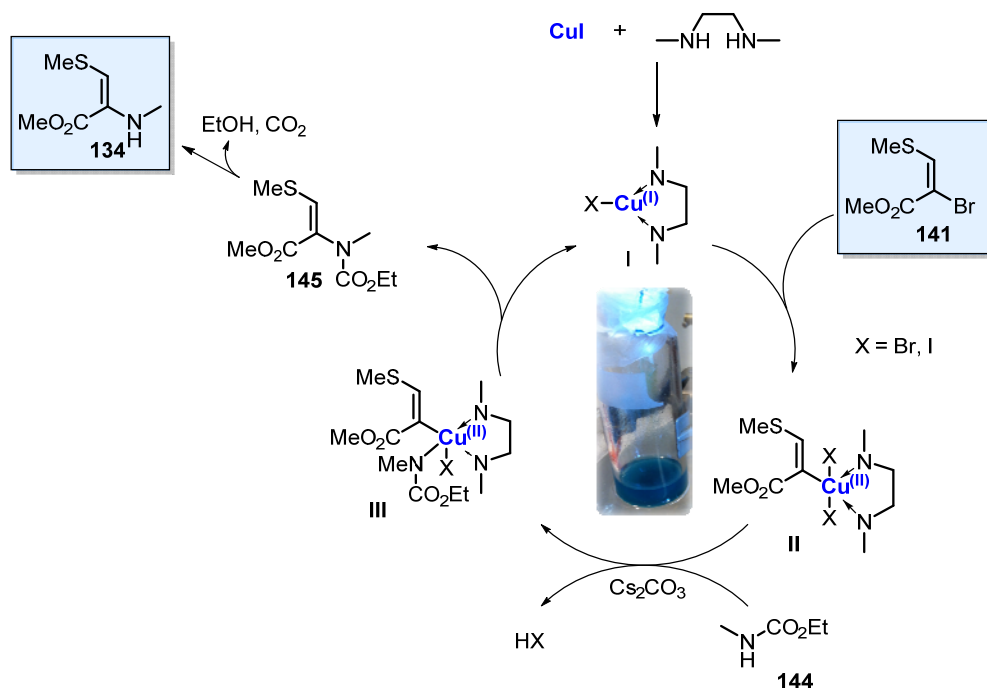


Schéma 23 : Cycle catalytique du couplage catalysé par l'iodure de cuivre.

Cette réaction de couplage s'est montrée extrêmement sensible à la présence d'eau et d'oxygène dans le milieu réactionnel. De nombreuses précautions ont dû être prises notamment concernant le séchage préalable à l'étuve du carbonate de césium, la qualité de l'iodure de cuivre ainsi que le dégazage du milieu réactionnel par de l'argon. La réaction a été réalisée dans un tube scellé étanche destiné aux réactions réalisées dans un réacteur micro-ondes, afin de travailler en conditions strictement inertes. Quelques essais d'optimisations (Tableau 4) ont été réalisés et ont montré que le choix de la base était crucial pour cette réaction. En présence de carbonate de césium l'oléfine **134** pouvait être isolée avec un rendement moyen de 30 % (Tableau 4 ; entrées 1 et 2), par contre en présence de carbonate de potassium (Tableau 4 ; entrées 3 et 4) l'oléfine **134** représentait environ 5 % du mélange réactionnel brut. Dans ces deux derniers cas, l'analyse RMN-¹H a indiqué une importante dégradation du substrat ainsi que la formation majoritaire d'un composé comportant deux méthyles à 3,80 et 2,10 ppm pouvant correspondre à un alcyne **146** issu de l'élimination d'une molécule de HBr du bromure vinylique **141**. Cet alcyne **146** n'ayant pas pu être purifié et l'analyse structurale complète n'a pas pu être réalisée. Le second paramètre étudié a été la méthode de chauffage du milieu réactionnel. La réaction réalisée à 120 °C par irradiation aux micro-ondes pendant 30 minutes ou par voie thermique à 80 °C pendant 16 heures ont donné sensiblement les mêmes résultats (Tableau 4, entrée 1 et 3). Bien que plus lente, la voie thermique a été préférée car permettant de travailler sur des volumes réactionnels plus importants non adaptés à nos réacteurs micro-ondes actuels au laboratoire.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

Tableau 4 : Optimisations du couplage pour préparer **134**.

Entrée	base	température	chauffage	durée	rendement/observation
1	Cs ₂ CO ₃	120°C	micro-ondes	30 min.	~ 30 % ~ 5 %
2	K ₂ CO ₃	120°C	micro-ondes	30 min.	élimination conduisant à un alcyne MeS—≡—CO ₂ Me 146
3	Cs ₂ CO ₃	90°C	thermique	16 hr.	~ 30 % ~ 5 %
4	K ₂ CO ₃	90°C	thermique	16 hr.	élimination conduisant à un alcyne MeS—≡—CO ₂ Me 146

Bromure vinylique **141** (1 éq.), Cul (0,2 éq.), DMEDA (0,5 éq.), base (5 éq.), méthyle uréthane **144** (2 éq.).

Concernant la stéréochimie du produit de couplage **134** la corrélation entre le proton de l'oléfine et le *N*-méthyle observée sur le spectre RMN-NOESY a permis de déterminer une stéréochimie *E* pour l'isomère majoritaire. Avec les conditions décrites dans le Tableau 4 (entrée 1), seul l'isomère *E* est isolé, par contre pour un temps long de réaction (voie thermique 40 heures), le composé **134** est isolé sous la forme d'un mélange d'isomères *E/Z* (ratio 2 : 1) (Schéma 24).

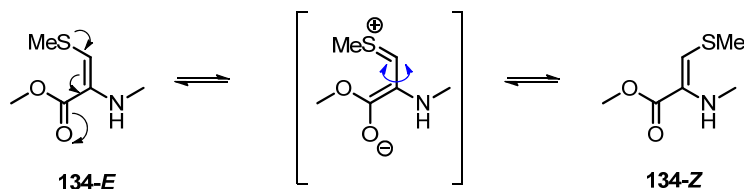


Schéma 24 : Isomérisation de l'oléfine **134**.

2.3. Synthèse du fragment aldéhyde hétérocyclique

Le second fragment nécessaire pour l'étude de la réaction de Povarov était l'aldéhyde hétérocyclique **133**. Ce fragment **133** contenant la quinoléine et le thiazole a été préparé en 5 étapes (Schéma 25) à partir de la 6-chloroquinoléine **147**. Lors de la première étape, un groupement nitrile a été introduit en position 2 de la 6-chloroquinoléine **147**.⁵⁹ Cette réaction se fait séquentiellement (Schéma 26) : dans un premier temps la quinoléine est oxydée en *N*-oxyde **152** par l'acide *meta*-chloroperbenzoïque, puis le *N*-oxyde est estérifié par le chlorure de *N,N*-diméthyle carboxyle. Le carbamate intermédiaire **153**, rend la position 2 de la

⁵⁹ K. Yoshikawa, S. Kobayashi, Y. Nakamoto, N. Haginoya, S. Komoriya, T. Youshino, T. Nagata, A. Mochizuki, K. Watanabe, M. Suzuki, H. Kanno, T. Ohta, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 8221–8233.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

quinoléine électrophile ce qui permet l'introduction d'un cyanure concomitante à l'élimination du groupement carbamate intermédiaire (schéma 26).

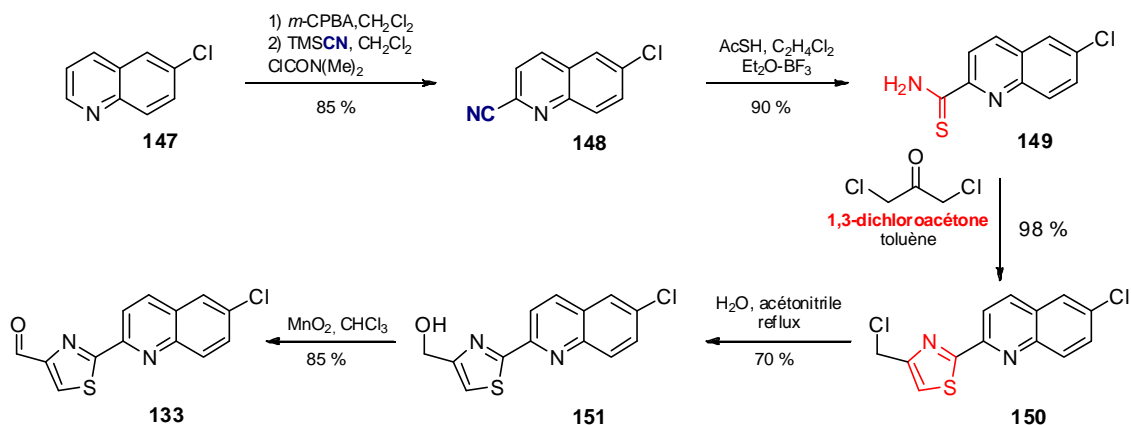


Schéma 25 : Synthèse du fragment 133.

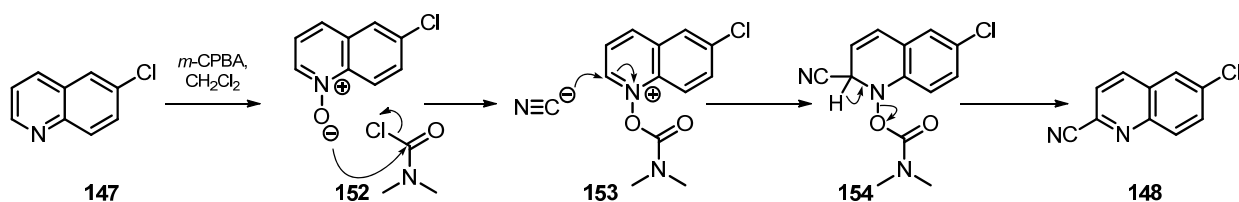


Schéma 26 : Mécanisme de formation du composé 148.

La fonction nitrile nouvellement introduite sur le composé **148** permet ainsi d'installer une amorce servant de point de départ à la construction du cycle thiazole (Schéma 25). L'atome de soufre présent dans le cycle thiazole a été placé en transformant la fonction nitrile en thioamide **149** par l'acide thioacétique en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ dans le dichloroéthane⁶⁰ avec un rendement de 90 %. Des conditions sans solvant s'inspirant des travaux de P. N. Arunachalam⁶¹ ont été également testées mais sans succès. Une fois le thioamide **149** obtenu, le cycle thiazole présent sur la molécule **150** a été construit par une réaction de Hantzsch dans le toluène avec un rendement de 98%.⁶² Cette réaction, a été décrite pour la première fois en 1889⁶³ et reste à ce jour l'une des méthodes les plus efficaces pour construire un cycle thiazole. Pour réaliser cette réaction, un reflux dans le toluène s'est montré nécessaire. Quand la même réaction a été tentée au reflux de l'éthanol, la formation du produit n'a pas été observée. Le thiazole **150** ainsi construit, seul un aménagement fonctionnel était nécessaire pour convertir la fonction chlorométhyle du composé **150** en aldéhyde **133**. Pour cela, le dérivé chlorométhylé **150** a été hydrolysé dans un mélange eau/acétonitrile sous irradiations

⁶⁰ J. Y. Gauthier, H. Lebel, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **1994**, 95, 324–326.

⁶¹ K. A. Mahammed, V. P. Jayashankara, N. PremsaiRai, K. MohanaRaju, P. N. Arunachalam, *Synlett*, **2009**, 2338–2340.

⁶² M. Mahmoodi, A. Aliabadi, S. Emami, M. Safavi, S. Rajabalian, M-A. Mohagheghi, A. Khoshzaban, A. Samzadeh-Kermani, N. Lamei, A. Shafiee, A. Foroumadi, *Arch. Pharm. Chem. Life. Sci.*, **2010**, 343, 411–416.

⁶³ A. Hantzsch, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1889**, 250, 723–724.

aux micro-ondes à 150 °C en 30 minutes donnant l'alcool **151**.⁶⁴ En solution, l'effet thermique des micro-ondes accélère la réaction en chauffant de manière plus homogène la solution. De plus dans un réacteur à micro-ondes, les solvants peuvent être chauffés au-delà de la température d'ébullition et sous pression. La même hydrolyse peut également être réalisée avec 70 % de rendements par voie thermique au reflux d'un mélange eau/acétonitrile 1:1 en 48 heures. La voie thermique a été choisie pour la montée en échelle de la séquence réactionnelle. Pour terminer, la fonction alcool **151** a été oxydée par l'oxyde de manganèse dans le chloroforme avec un rendement de 85 %.⁶² La synthèse du fragment **133** a été réalisée en 5 étapes avec un rendement global de 45 %.

2.4. Synthèse du 1,3-dioxole

Le dernier élément restant à être synthétisé était l'unité à 2 carbones (*vide supra* les hypothèses de biosynthèse) : le 1,3-dioxole **131**. L'unique synthèse décrite est la méthode de N.D. Field développée en 1961⁶⁵ utilisant un très bel artifice de synthèse permettant de transformer la 1,3-dioxol-2-one **155** en 1,3-dioxole **131** (Schéma 27). La subtilité de la méthode est "d'immobiliser" la dioxolone **155** sur l'antracène **156** par une réaction de Diels-Alder, puis de modifier l'hétérocycle et enfin libérer le 1,3-dioxole **131** par un craquage thermique. Les premières étapes de cycloadditions [4+2] dans le dichlorobenzène suivie de l'hydrolyse du carbonate ont pu être très facilement reproduites pour fournir le diol **158** avec de très bons rendements. Par contre, pour former l'acétal **159**, les conditions d'origine employant le paraldéhyde ou le formol se sont montrées non reproductibles. En substituant le paraldéhyde par du chlorure de MOM, l'acétal **159** a été obtenu en conditions douces avec un rendement acceptable de 70 %.

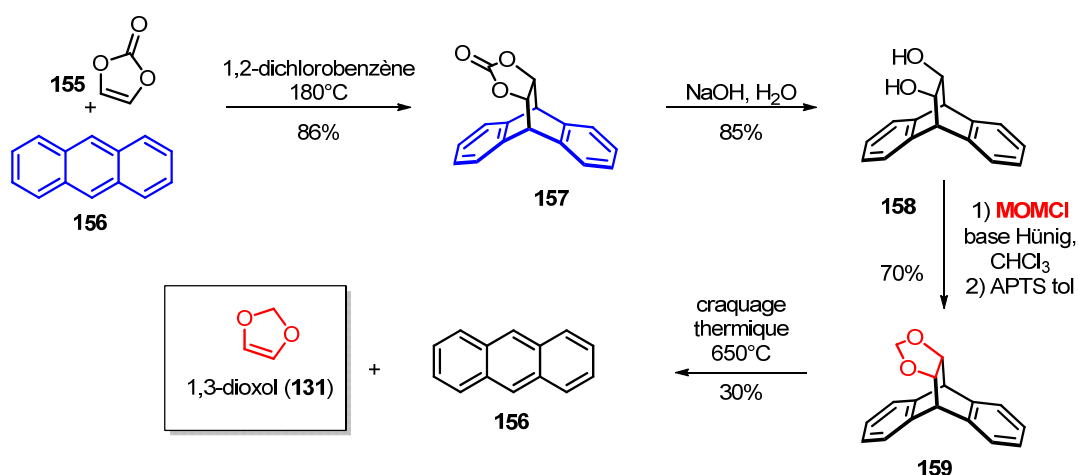


Schéma 27 : Synthèse du 1,3-Dioxole par la méthode de N.D. Field.

Enfin, pour libérer le 1,3-dioxole une dernière réaction de *retro*-Diels-Alder par craquage thermique au bec Bunsen était nécessaire. Cette réaction s'est montrée extrêmement délicate

⁶⁴M. C. Bagley, R. L. Jenkins, M. C. Lubinu, C. Mason, R. Wood, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 7003–7006.

⁶⁵ a) N.D. Field, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 3504–3507 ; b) G. H. Posner, T. D. Nelson, *tetrahedron*, **1990**, *46*, 4573–4586.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

et dangereuse à mettre en œuvre (photo 1). Le chauffage du composé **159** devait se faire de manière progressive et la température maintenue à 650°C. Lorsque la température était trop élevée ou le chauffage trop rapide, des phénomènes de sublimation et de primage⁶⁶ entraînaient de l'antracène dans la colonne de distillation et le distillat. Après quelques optimisations le 1,3-dioxole **131** été obtenu avec un rendement de 30 %. Bien que nous ayons réussi – difficilement – à synthétiser le 1,3-dioxole **131** et pu l'utiliser pour quelque essais de cycloaddition ce composé a été rapidement abandonné et ceci pour plusieurs raisons. L'aldéhyde hétérocyclique **133** et l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthylaldéhydrocystéine **134**, les fragments principaux de cette synthèse totale ont été synthétisés par des séquences courtes respectant le concept d'économie d'atomes. De plus le choix d'une cycloaddition pour construire la pyridone avait été fait pour réaliser un assemblage rapide de la molécule naturelle.



Photo 1 : Résidu à l'issue du craquage thermique.

Avec ces contraintes, la séquence réactionnelle pour préparer le 1,3-dioxole était trop longue et le recyclage de l'antracène restait une notion théorique car au cours du craquage thermique une bonne partie de l'antracène libéré était carbonisé donc non recyclable (Photo 1). De plus l'étape de craquage thermique s'est montrée délicate à réaliser et il a fallu plusieurs essais avant de pouvoir la reproduire ce qui signifie la perte de grande quantités de matière première obtenue après trois étapes. Pour ces raisons il a été décidé de remplacer le 1,3-dioxole **131** par son équivalent 1,4-dioxène⁶⁷ **160** qui n'était pas disponible chez les fournisseurs de réactifs chimiques au démarrage de ce projet (schéma 28).

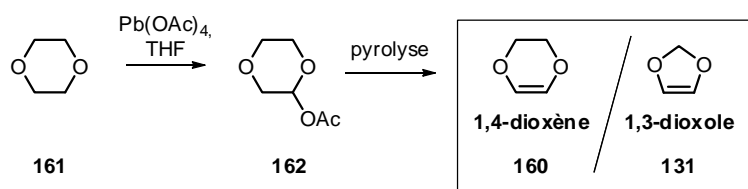


Schéma 28 : Structure et méthode de préparation du 1,4-dioxène **160**.

2.5. Essais de réactions de Povarov : études modèles

Une étude modèle a été entreprise (schéma 29) afin d'étudier les conditions optimum pour former l'hétérocycle azoté de la Iodopyridone par une réaction de Povarov en présence d'un acide de Lewis. La réaction a été testée entre l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthylaldéhydrocystéine **134**, l'aldéhyde commercial **163** et le 1,3-dioxole (ou les éthers vinylique **137-139**) en présence d'un acide de Lewis. De nombreuses variations des conditions opératoires au niveau du choix du solvant, de la nature de l'acide de Lewis et de l'unité apportant les 2 carbones supplémentaires à l'*aza*-diène ont été évaluées. Dans la plupart

⁶⁶ Primage : entraînement de liquide ou de solide par les vapeurs au cours d'une distillation.

⁶⁷ a) R. K. Summerbell, L. N. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 2364–2368, b) M. Kreillein, J. C. Eppich, L. A. Paquette, C. P. Davie, R. L. Danheiser, *Org. Synth.* **2005**, 82, 99.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

des solvants évalués, aucune réaction n'était observée et les réactifs de départ étaient récupérés inchangés. Par contre l'analyse par RMN du proton des mélanges bruts réactionnels des réactions testées dans le trifluoroéthanol, indiquaient une évolution complexe. Dans un seul cas en utilisant l'éthyle vinyle éther **137** en présence de triflate de scandium dans le trifluoroéthanol, un produit supposé d'assemblage a été isolé et le spectre RMN proton pourrait être cohérent avec la formation d'une pyridone. Les faibles quantités de produits isolés n'ont pas permis d'en réaliser l'analyse complète. Malheureusement, cette réaction n'a pu être reproduite et la stratégie globale s'est orientée vers une réaction d'électrocyclisation faisant intervenir l'assemblage de **deux fragments** au lieu de **trois** comme proposé dans la stratégie initiale.

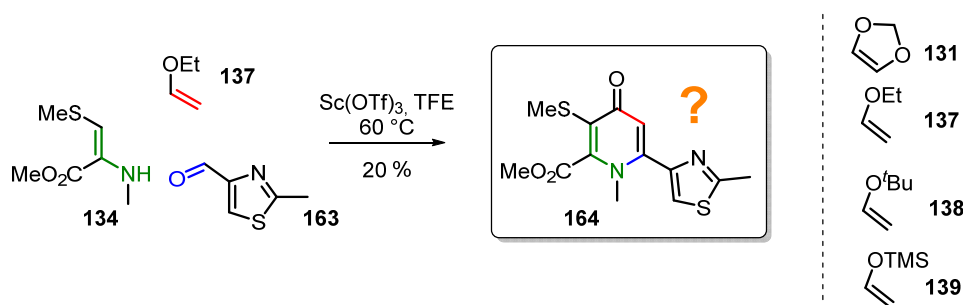


Schéma 29 : Etude modèle de la réaction de Povarov.

2.6. Assemblage d'un pyridinium par électrocyclisation.

Afin de favoriser la formation de l'hétérocycle azoté de la Iodopyridone, la stratégie a subi quelques modifications (schéma 30). En effet, les essais par assemblage de trois éléments ont été peu concluants et il a été décidé d'ancrer une unité dioxène **160** sur l'aldéhyde hétérocyclique **133** afin de former une cétone conjuguée complexe **167**. À l'aide de cette unité et de l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthylaldéhyde **134** il était alors prévu de former le cœur hétérocyclique de la Iodopyridone par une réaction d'électrocyclisation sur l'iminium **166** généré *in-situ*. Le produit d'addition prévu **165** aurait comporté toutes les substitutions présentes sur le cycle pyridone de la Iodopyridone et seuls quelques aménagements fonctionnels aurait été nécessaires pour achever la synthèse totale de la molécule.

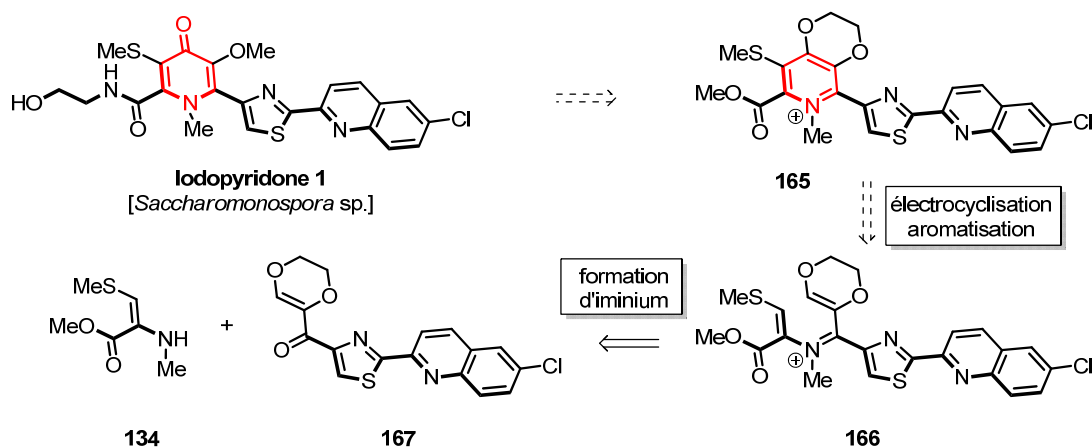


Schéma 30 : Stratégie révisée pour l'assemblage de la Iodopyridone par électrocyclisation.

2.6.1. Étude modèle de la réaction d'électrocyclisation

Au cours d'une étude préliminaire pour préparer un composé modèle **168**, une méthode efficace d'ancrage du 1,4-dioxène **160** a été mise au point (schéma 31). La synthèse du composé modèle **168** est réalisée en deux étapes par l'addition du dioxényl-lithium⁶⁸ obtenu par une réaction d'ortho-lithiation du 1,4-dioxène **160** suivie de son addition sur l'aldéhyde commercial **163**. Puis, l'alcool bis-allylique intermédiaire est rapidement oxydé en cétone **168**. Le composé modèle a été mis en réaction avec et de l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthylaldéhydrocystéine **134** en présence d'un acide le Lewis ($\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$) dans le toluène et chauffé à 80°C pendant 2 heures. Après la purification par HPLC préparative du mélange réactionnel complexe, le produit d'électrocyclisation **171** a pu être isolé avec un rendement de 10 % après purification par HPLC et identifié par les différentes techniques de RMN à deux dimensions.

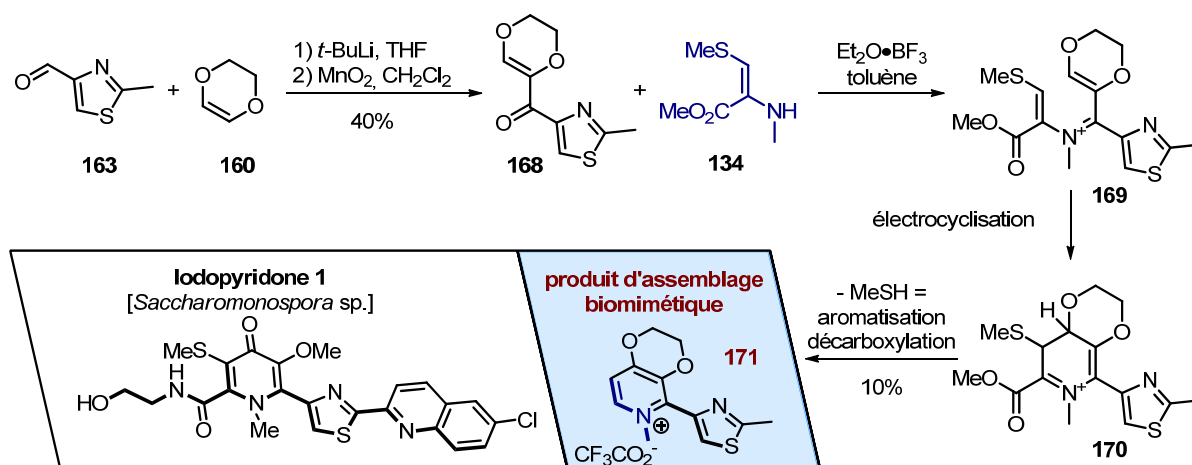


Schéma 31 : Modèle d'assemblage de l'hétérocycle central de la Iodopyridone par électrocyclisation.

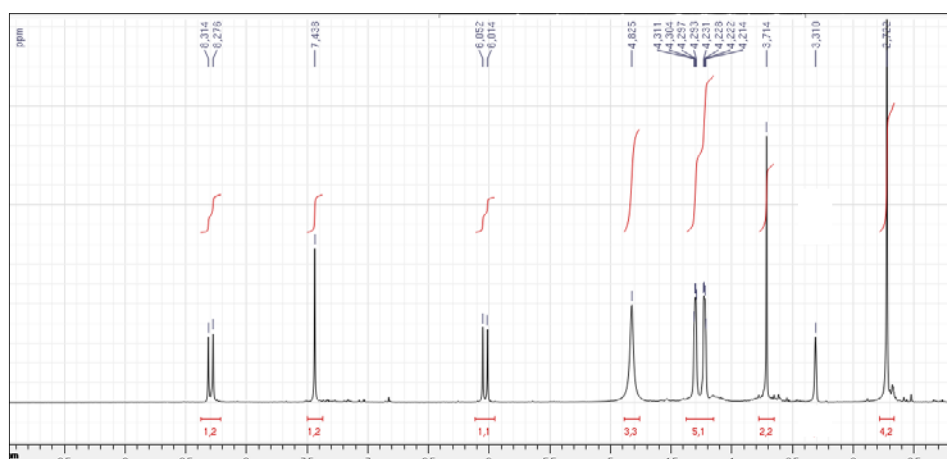


Figure 12 : Spectre RMN ^1H du composé **171** (méthanol- d_4 , 400 MHz).

⁶⁸ a) R. W. Saylor, J. Sebastian, *Synth. Commun.* **1982**, 12, 579–584; b) M. Fétizon, I. Hanna, J. Rens, *Tetrahedron. Lett.* **1985**, 26, 3453–3456.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la lodopyridone

■ Bien que l'assemblage biomimétique du cœur central de la lodopyridone ait pu être réalisé avec un rendement acceptable, deux substituants ont été éliminés. L'aromatisation du cycle pyridinium s'est faite par l'élimination d'une molécule de méthanthiol et une décarboxyméthylation supplémentaire s'est produite dans les conditions thermiques employées. La décarboxylation semble théoriquement contrôlable en modulant la température du milieu réactionnel, par contre la perte de la fonction soufrée semble inévitable car dirigée vers une aromatisation de cycle, force motrice probablement importante de la réaction observée.

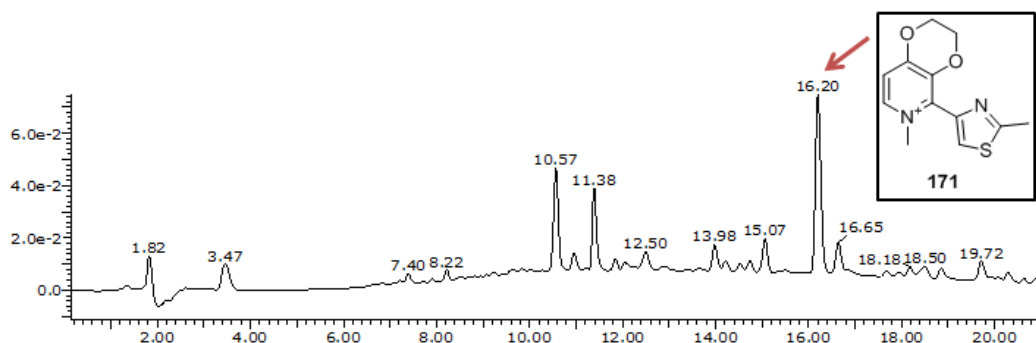


Figure 13 : Chromatogramme HPLC de la réaction modèle d'électrocyclisation (colonne sunfire C18, 2,1x150 mm ; eau / CH₃CN 5 % à 100 % en 20 mn + 0,2 % acide formique ; UV 250 nm).

■ Notre stratégie de synthèse totale avait été pensée et basée sur la préparation de l'ester de méthyle de la *N,S*-diméthyl-déhydrocystéine **134** pour nous démarquer des synthèses antérieures de la lodopyridone. Cette démarche avait deux buts : i) construire le cycle azoté ; ii) placer la fonction *S*-méthyle en évitant une introduction tardive. Notre déhydroamino-acide a bien rempli son rôle en facilitant l'assemblage d'un hétérocycle azoté et justifie ainsi de l'efficacité de notre rétrosynthèse. Par contre une étape de reconstruction de la fonction soufrée devra être prévue.

2.6.2. Application de la réaction d'électrocyclisation à la lodopyridone

La réaction d'électrocyclisation étant très encourageante, elle a été transposée au fragment **167** nécessaire à la synthèse totale de la lodopyridone (schéma 32). Le fragment **167**, contenant les cycles dioxène, thiazole et quinoléine a été obtenu à partir de l'aldéhyde hétérocyclique **133** que nous avons déjà synthétisé. La séquence réactionnelle pour introduire le dioxène est identique à celle utilisée sur le composé modèle **167** et décrite dans la section précédente. L'étape d'addition du dioxényl-lithium obtenu par une réaction d'ortho-lithiation suivie de l'oxydation de l'alcool bis-allylique complète la séquence réactionnelle permettant d'aboutir au fragment **167** avec un rendement global de 40 % pour ces deux étapes supplémentaires.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

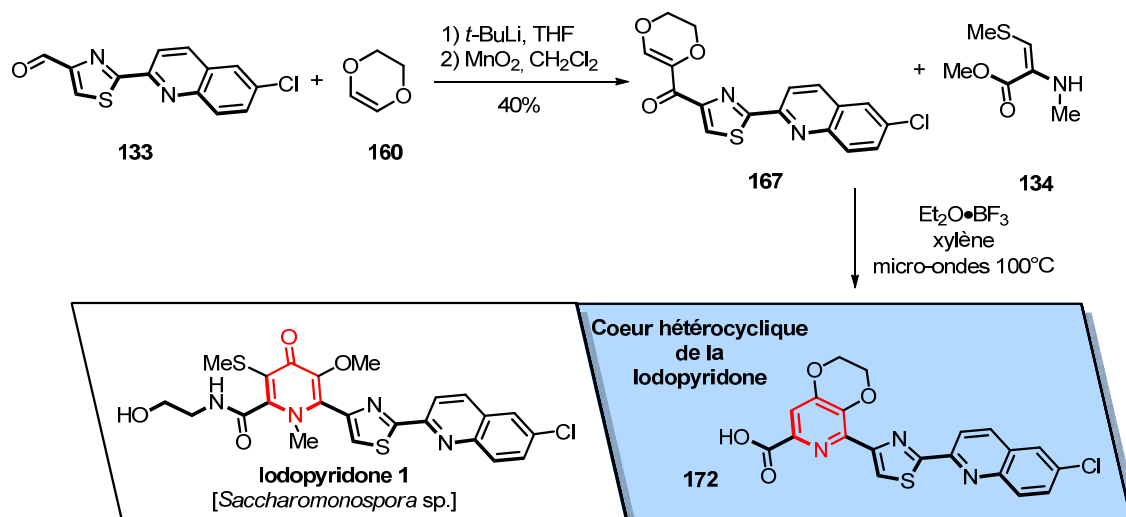


Schéma 32 : Assemblage de l'hétérocycle azoté de la Iodopyridone par électrocyclisation.

Les conditions d'électrocyclisation développées sur le composé modèle **168** (Et₂O·BF₃, toluène (ou THF), 80°) ont été appliquée au fragment **167**. Malheureusement une analyse HPLC-HRMS a montré qu'aucune réaction ne s'était déroulée même au bout de 4 semaines de chauffage. Le fragment **167** est beaucoup moins soluble dans le toluène que le composé modèle **168**, et cette insolubilité pourrait induire une cinétique de réaction plus lente. Au cours de ces travaux de thèse, le chauffage des milieux réactionnels sous irradiation aux micro-ondes plutôt que par la voie thermique conventionnelle s'est montré plusieurs fois efficace pour accélérer de manière significative la cinétique de nos réactions (ex : couplage au cuivre pour synthétiser la déhydrocystéine **134** page 37, hydrolyse du chlorure d'alkyle **150** page 41). Ainsi, la réaction a été répétée en recyclant le mélange de **134** et **167** n'ayant pas réagi. Le mélange recyclé a été repris dans le xylène, toujours en présence d'un acide de Lewis (Et₂O·BF₃) et chauffé à 100°C sous irradiation aux micro-ondes pendant 18 heures. Dans ces conditions nettement plus drastiques les substrats étaient complètement consommés à l'issue de la période de chauffage.

■ L'analyse HPLC-HRMS (Figure 14) a révélé la formation d'un mélange complexe de plusieurs produits, dont certains possèdent des masses molaires élevées pouvant correspondre à des assemblages par électrocyclisation. Un pic en particulier, présentant un temps de rétention de 24,1 min pourrait correspondre à un produit d'électrocyclisation ($m/z = 501$) et ayant conservé tous les substituant. Malheureusement ce produit n'a pas encore pu être isolé. Après une purification par HPLC préparative du mélange réactionnel, huit fractions ont été isolées. Une seule a pu être identifiée comme étant un produit d'assemblage par électrocyclisation et correspond à la structure **172** (figure 12). Les autres fractions (plus ou moins pures) correspondent à des produits de dégradation des substrats ou alors de potentiels produits d'assemblage mais dont l'analyse ne peut être finalisée avec certitude pour le moment.

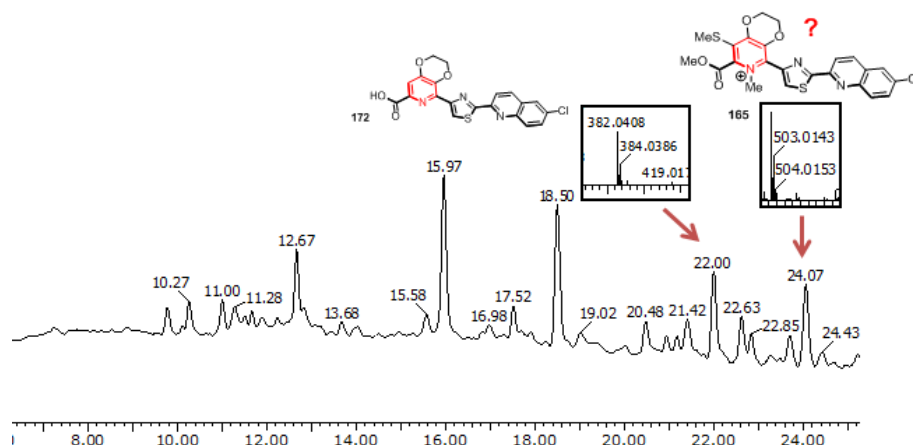


Figure 14 : Chromatogramme HPLC de la réaction d'électrocyclisation (colonne sunfire C18, 2,1x150 mm ; eau / acétonitrile 5 % à 100 % en mn + 0,2 % acide formique ; UV 250 nm).

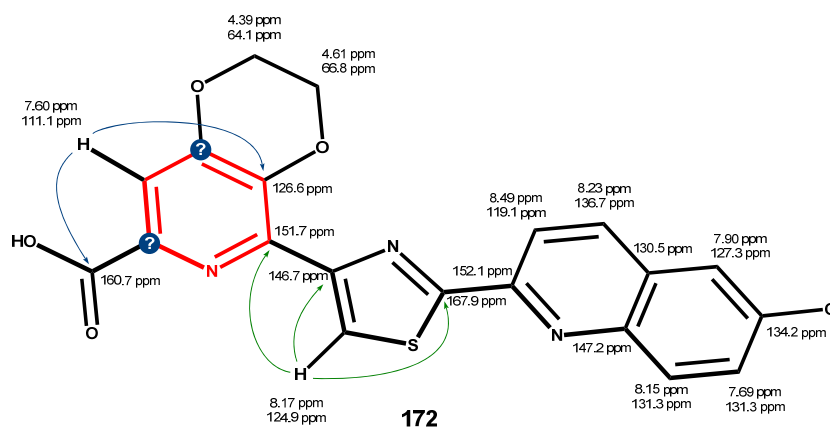


Figure 15 : Structure du produit **172** d'électrocyclisation et corrélations HMBC.

■ Concernant l'analyse structurale de la fraction contenant le produit d'assemblage **172**, elle présente un taux de pureté d'environ 75 % pour une masse de 2,5 mg ce qui est évidemment insuffisant pour une communication scientifique mais suffisant à ce stade du travail pour valider l'identité de la structure.

■ Les cycles thiazole et quinoléine ont été facilement identifiés par les différentes analyses de RMN bidimensionnelles.

■ L'analyse HMBC a révélé une corrélation entre le proton porté par le cycle thiazole et un carbone quaternaire possédant un déplacement chimique de 151,7 ppm. En plus des protons de la quinoléine et du thiazole, un proton aromatique se présentant sous la forme d'un singulet (7.60 ppm – 111.1 ppm) corrèle avec deux carbones quaternaires possédant des déplacements chimiques de 125,6 et 160.7 ppm. Bien que deux carbones quaternaires n'aient pas pu être identifiés, ces données sont en accord avec la formation d'un cycle pyridine.

■ L'absence de l'ester de méthyle et du *N*-méthyle est non ambiguë. Toutes ces données sont cohérentes avec la formation d'un produit **172** issu d'un assemblage par électrocyclisation et

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

d'une aromatisation par élimination d'une molécule de méthane-thiol. Dans les conditions employées, la fonction *N*-méthyl-pyridinium⁶⁹ et l'ester ont également été hydrolysés.

■ Pour ce produit l'analyse de masse confirme l'élucidation structurale avec un pic moléculaire $[M(-CO_2)H^+]$ de rapport m/z de 382,0408 (th : 382,0417). Cette masse indique la formule brute suivante : $C_{19}H_{13}ClN_3O_2S^+$ correspondant à structure proposée mais ayant subi une décarboxylation supplémentaire.

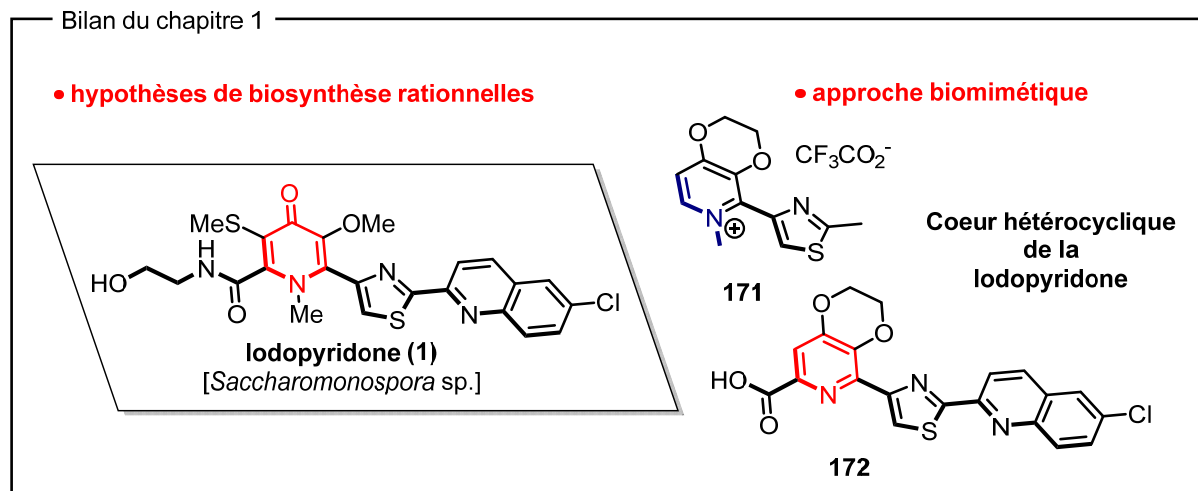
■ Dans une autre fraction, la même structure mais sans hydrolyse de l'ester de méthyle semble avoir été isolée mais la qualité du spectre ne permet pas de l'affirmer ceci avec certitude.

Bien que la fonction soufrée ait été éliminée au cours de cette réaction d'assemblage, le système polyhétérocyclique de la Iodopyridone a pu être formé par une réaction originale. Pour le moment, seule des traces analytiques ont été isolées et caractérisées mais pour rappel le lot sur lequel nous avons travaillé a subi plusieurs cycles de recyclages. Grâce à ces derniers résultats, nous appréhendons mieux la réactivité et la faible solubilité de ces intermédiaires de synthèse. Un travail de remontée de matière des fragments **134** et **167** sera nécessaire afin d'optimiser la réaction d'électrocyclisation. Les éléments à optimiser seront : le temps et la température de chauffage sous micro-ondes pour éviter la dégradation des réactifs ; le broyage du fragment **167** pour améliorer sa solubilisation ; la distillation du xylène pour éviter l'hydrolyse de l'ester de méthyle et du *N*-méthyl-pyridinium. En travaillant avec des réactifs n'ayant pas subi de multiples recyclages, une amélioration des rendements et une caractérisation complète des produits d'assemblages devraient rapidement être obtenus.

⁶⁹ D. Aumann, L. W. Deady, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 2, 32–33.

Partie 3 : Conclusion et perspectives

Nous nous sommes penchés dans ce chapitre sur une structure originale : la Iodopyridone. Aucune synthèse n'était publiée quand nous avons commencé ce projet et la chimie des alcaloïdes peptidiques était toute nouvelle au laboratoire. Nous avons pu proposer des hypothèses de biosynthèse de la substance naturelle et nous avons tenté de mimer les étapes clés (en particulier l'assemblage de la pyridone centrale) par une stratégie bio-inspirée. Nous nous sommes heurtés à la difficulté de préparer les précurseurs et surtout à la difficulté de maîtriser la réaction, assimilée à une réaction de Povarov, permettant d'assembler les sous-unités. Les conditions précises de la réaction (pour éviter les pertes de fragments observés à ce jour) sont actuellement en cours d'étude avec l'espoir de rationaliser la formation des produits et aussi d'apporter des éléments sur la biosynthèse de la Iodopyridone, c'est en effet ce que l'on attend aussi des stratégies biomimétiques en synthèse totale.



Partie 4 : Partie expérimentale

Protocoles généraux :

Toutes les réactions ont été menées sous atmosphère inerte d'argon. La verrerie a été séchée à l'étuve à 120°C si nécessaire. Les solvants anhydres sont distillés sous atmosphère d'azote : l'éther et le THF sur sodium et benzophénone, le toluène, et l'acétonitrile sur hydrure de calcium.

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur gel de silice 60 F254 Geduran/Merck (réf. 1.05554.0001) et révélées par observation sous UV ainsi qu'à la vanilline sulfurique (1 % dans l'éthanol avec 2 % H₂SO₄).

Les purifications par chromatographie (technique dite de la chromatographie flash) ont été effectuées sur gel de silice Merck (réf. 9385.500), de granulométrie 40–60 microns. Les systèmes de solvants pour chromatographie sont notés en rapport volume : volume.

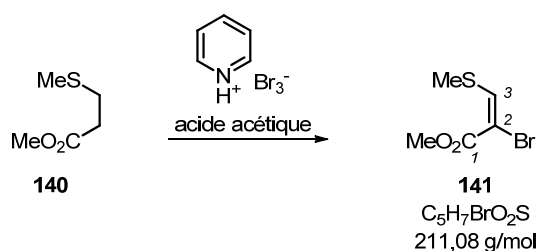
Les spectres d'absorption dans l'infrarouge ont été enregistrés en mode transmittance à l'aide d'un spectromètre Bruker Vector 22 à transformée de Fourier. Les spectres RMN ont été enregistrés à 298 °K sur des appareils Bruker AC 300 MHz ou 400 MHz, sonde Dual 5 mm. Les spectres RMN ont été indexés par étalonnage interne sur le pic résiduel du solvant; le chloroforme deutérié à 7,27 ppm; le benzène deutérié à 7,15 ppm, le méthanol deutérié à 3,31 ppm, le DMSO deutérié à 2,50 ppm et la pyridine deutérié à 7,22 ppm.

Pour l'attribution des signaux des spectres proton et carbone, l'utilisation des techniques de *J*-modulation de l'écho de spin (*J*-module) et de nOe-différence en une dimension a parfois été nécessaire, ainsi que des techniques de corrélations à deux dimensions : COSY, HMBC, HMQC et NOESY. Par commodités et contrairement à l'usage typographique français, les décimales des déplacements chimiques sont indiqués après des points au lieu de virgules.

Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées sur un spectromètre Esquire LC Bruker. Les produits sont dissous dans le méthanol ou l'acétonitrile et sont analysés après ionisation chimique (APCI) ou ionisation électro-spray (ESI).

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

➤ (E)-2-bromo-3-(méthylthio)acrylate de méthyle (141) :



À une solution de 3-(méthylthio)propanoate de méthyle (214 mg, 200 μ L, 1,33 mmol, 1 éq.) dans l'acide acétique (2 mL) est ajouté le tribromure de pyridinium (850 mg, 2,65 mmol, 2 éq.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 jours puis concentré sous pression réduite. Le résidu est dilué dans le dichlorométhane puis la phase organique est lavée par de l'eau et une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (CH₂Cl₂/éther de pétrole 6:4) pour donner le produit désiré (90 mg, 30 %) sous la forme d'une huile incolore.

* Aspect : **huile incolore**

* **IR (huile)** : $\nu_{\text{max}} = 1713, 1533, 1432, 1041 \text{ cm}^{-1}$.

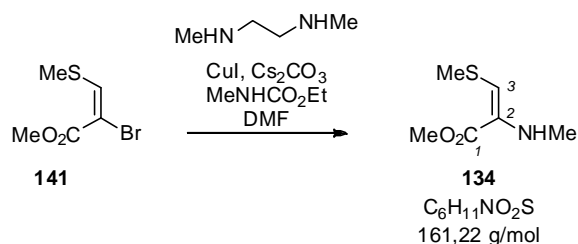
* **HRMS ESI** : $m/z [M+\text{Na}]^+$: 234,9272; calculé pour C₅H₆O₂BrSNa⁺ : 234,9276.

* **¹H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 8.0 (*s*, 1 H), 3.74 (*s*, 3 H), 2.44 (*s*, 3 H).

* **¹³C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 161.5, 149.6, 107.0, 53.1, 17.2.

attribution	¹ H δ (ppm)	intégration	multiplicité	<i>J</i> (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1	-				161.5
2	-				107.0
3	8.0	1	<i>s</i>		149.6
OCH ₃	3.74	3	<i>s</i>		53.1
SCH ₃	2.44	3	<i>s</i>		17.2

➤ (E) Ester de méthyle de la N-S-diméthyl-déhydrocystéine (134) :



1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

L'oléfine bromée **141** (250 mg, 1,18 mmol), le carbonate de césium (500 mg, 1,53 mmol) et le iodure de cuivre (50 mg, 0,26 mmol) et du DMF (4 mL) sont introduits un tube scellé. L'atmosphère du tube et la solution sont dégazées plusieurs fois sous ultra-sons par de l'argon. La *N,N*-diméthyléthylènediamine (50 μ L, 0,46 mmol) puis la méthyluréthane (125 μ L, 1,23 mmol) sont ajoutés. Après 15 minutes sous agitation à température ambiante, le milieu réactionnel devient bleu foncé puis est chauffé à 100°C pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite (bain marie 60°C) puis le résidu est dilué par du dichlorométhane (30 mL) et lavé par de l'eau (15 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentré. Le résidu est purifié sur gel de silice (éther de pétrole : CH₂Cl₂ 7:3 puis 6:4) pour donner le produit désiré (65 mg, 35 %) sous la forme d'une huile jaune pâle.

* Aspect : **huile jaune pâle**

* **IR (huile)** : $\nu_{\max} = 1688, 1525, 1431, 1168 \text{ cm}^{-1}$.

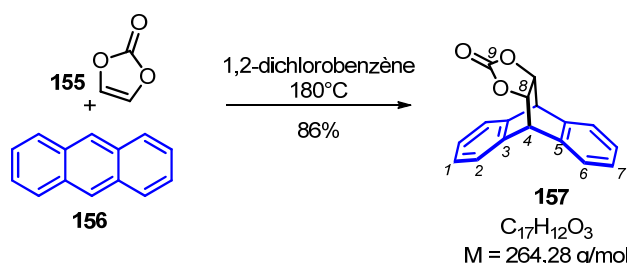
* **HRMS ESI** : m/z [M+H]⁺ : 162,2300; calculé pour C₆H₁₂NO₂S⁺ : 162,2294.

* **¹H RMN (400 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 5.55 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.39 (s, 3H).

* **¹³C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 165.4, 161.8, 104.6, 51.0, 16.9, 14.7.

attribution	¹ H δ (ppm)	intégration	multiplicité	<i>J</i> (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1	-				164.4
2	-				161.8
3	5.55	1	<i>s</i>		104.6
OCH₃	3.68	3	<i>s</i>		51.0
NCH₃	2.39	3	<i>s</i>		16.9
SCH₃	2.47	3	<i>s</i>		14.7

➤ tetrahydro-9,10-[4,5]epidioxoanthracèn-13-one (157):



Une solution d'anthracène (27,3 g, 0,15 Mol) et de carbonate (13,2 g, 0,15 Mol) dans le 1,2-dichlorobenzène (50 mL) est portée au reflux (bain de sable à 250 °C) pendant 2 jours. Après refroidissement, le produit est précipité dans l'éther de pétrole (100 mL) et collecté par filtration pour donner le produit désiré (37,6 g, 86 %) sous la forme d'un solide brun.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

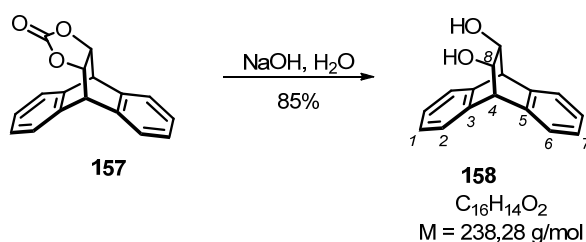
* Aspect : **solide brun**

* ^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 7.40 (m, 4H), 7.27 (m, 4H), 4.90 (s, 2H), 4.73 (s, 2H).

* ^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 154.1, 137.7, 136.3, 127.8, 127.7, 126.6, 125.7, 76.3, 47.8.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	7.27	2	<i>m</i>		126.6 ou 125.7
2	7.40	2	<i>m</i>		127.8 ou 127.7
3	-				137.3 ou 136.3
4	4.73	2	<i>s</i>		47.8
5	-				137.3 ou 136.3
6	7.40	2	<i>m</i>		127.8 ou 127.7
7	7.27	2	<i>m</i>		126.6 ou 125.7
8	4.90	2	<i>s</i>		76.3
9	-				154.1

➤ 9,10-dihydro-9,10-éthanoanthracène-11,12-diol (158):



À une solution de carbonate (37,6 g, 0,143 Mol) dans le méthanol (550 mL) est ajouté de l'eau (80 mL), de la soude (10,7 g 0,26 Mol), puis le milieu réactionnel est porté au reflux pendant 20 heures. Après refroidissement le précipité est récupéré par filtration et lavé par du méthanol (2 x 25 mL) pour donner le produit désiré (28,9 g, 85 %) sous la forme d'un solide blanc.

* Aspect : **solide blanc**

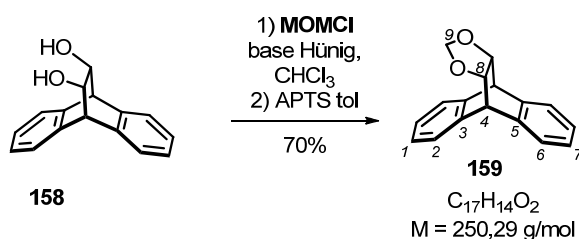
* ^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 7.49 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.25 (m, 2H), 7.15 (m, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 2.23 (s, 2H).

* ^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 139.9, 138.6, 126.7 (4C), 126.5, 124.7, 68.1, 51.4.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	7.25 ou 7.15	2	<i>m</i>		126.7
2	7.49 ou 7.39	2	<i>m</i>		126.5 ou 124.7
3	-				139.9 ou 138.6
4	4.07	2	<i>s</i>		51.4
5	-				137.3 ou 136.3
6	7.49 ou 7.39	2	<i>m</i>		126.5 ou 124.7
7	7.25 ou 7.15	2	<i>m</i>		126.7
8	4.43	2	<i>s</i>		68.1
OH	2.23	2	<i>s</i>		-

➤ tétrahydro-9,10-[4,5]épidioxoanthracène (159):



À une solution de diol (15 g, 63 mMol) dans le chloroforme (200 mL) est ajouté de la base d'Hünig (22,0 mL, 0,126 mL) et du chlorure de MOM (5,3 mL, 70 mMol). Le milieu réactionnel est porté une nuit au reflux nuit puis est extrait par une solution d'acide chlorhydrique 2M (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est repris dans du toluène (100 mL), de l'APTS est ajouté (1,20 g, 7,0 mMol). Le milieu réactionnel est porté une nuit au reflux nuit puis est extrait par de l'eau (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (CH₂Cl₂/éther de pétrole 4:6) pour donner le produit désiré (11 g, 70 %) sous la forme d'un solide blanc.

* Aspect : **solide blanc**

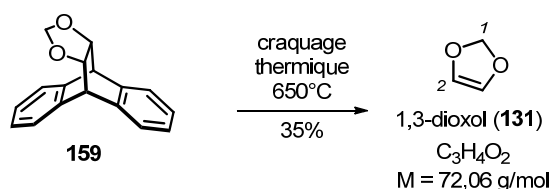
* ^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 7.36 (m, 4H), 7.20 (m, 4H), 4.78 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.01 (s, 1H).

* ^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 140.0, 139.1, 126.8, 126.5, 125.8, 125.2, 97.7, 78.5, 49.3.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	7.20	2	<i>m</i>		126.8 ou 126.5
2	7.36	2	<i>m</i>		125.8 ou 125.2
3	-				140.0 ou 139.1
4	4.49	2	<i>s</i>		49.3
5	-				140.0 ou 139.1
6	7.36	2	<i>m</i>		125.8 ou 125.2
7	7.20	2	<i>m</i>		126.8 ou 126.5
8	4.59	2	<i>s</i>		78.5
9a	4.78	1	<i>s</i>		97.7
9b	4.01	1	<i>s</i>		

➤ 1,3-dioxol (131) :



Dans un ballon équipé d'un montage de distillation est introduit le substrat (11,0 g, 44,0 mMol) et du BHT (100 mg, 0,45 mMol). Le montage est placé derrière un écran anti-déflagration et le craquage thermique est induit par un chauffage à la flamme à 650 °C. Le craquage est régulé sur une période de 45 minutes pour éviter les phénomènes de primage. Le produit est collecté sous la forme d'un liquide incolore (950 mg, 30%) et conservé sur un cristal de K_2CO_3 à -20°C .

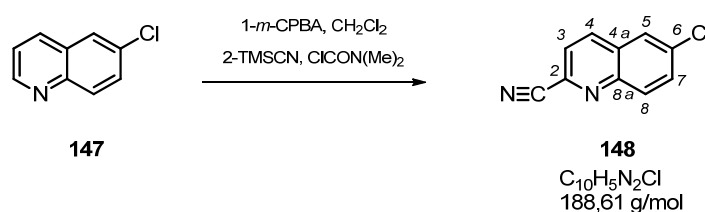
* Aspect : **liquide incolore**

* ^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 6.24 (s, 2H), 5.60 (s, 2H).

* ^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 128.2, 98.2.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	5.60	2	<i>s</i>		98.2
2	6.24	2	<i>s</i>		128.2

➤ 6-Chloroquinoléine-2-carbonitrile (148) :



1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

À une solution de 6-chloroquinoléine (1,50 g, 9,2 mmol) dans le dichloroéthane (92 mL) est ajouté de l'acide *meta*-chloroperoxybenzoïque (2,23 g, 13 mmol, 1,4 équ.). Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant deux heures. Il est ensuite extrait par une solution aqueuse de thiosulfate de sodium puis par une solution aqueuse de soude 1 M. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est dilué dans le dichlorométhane (24 mL), puis, du cyanure de triméthylsilyle (150 mg, 200 µL, 1,5 mmol, 1 équ.) et du chlorure de *N-N*-diméthylcarbonyle (1,05 g, 0,6 mL, 9,8 mmol, 1,1 équ.) sont ajoutés. Le reflux est maintenu 16 heures supplémentaires. Après refroidissement, le milieu réactionnel est filtré donnant une première fraction du produit désiré (970 mg, 56 %). Le filtrat est dilué par CH₂Cl₂ (8 mL) et neutralisé sous agitation pendant 90 min. par une solution saturée de NaHCO₃ (8 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (CH₂Cl₂) donnant une seconde fraction du produit désiré (500 mg, 29 %). Rendement global : 85 %.

* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f**: 0.49 (CH₂Cl₂)

* **IR (solide)** : ν_{\max} = 1581, 1489, 1299, 1071, 877, 830 cm⁻¹.

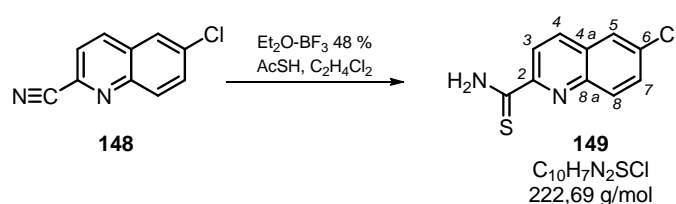
* **HRMS ESI** : m/z [M+H]⁺ : 189.0225 ; calculé pour C₁₀H₅N₂Cl⁺ : 189.0220.

* **¹H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 8.24 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 9.0 Hz, 1H).

* **¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆)**, δ (ppm) : 146.3, 138.3, 134.5, 133.9, 132.6, 131.7, 129.8, 127.5, 125.3, 117.9.

attribution	¹ H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
2	-				133.9
3	8.12	1	<i>d</i>	8.5 Hz	127.5
4	8.24	1	<i>d</i>	8.5 Hz	138.3
4a	-				129.8
5	7.89	1	<i>d</i>	2.2 Hz	125.3
6	-				133.9
7	7.78	1	<i>dd</i>	9.0 – 2.3 Hz	132.6
8	7.73	1	<i>d</i>	9.0 Hz	131.7
8a	-				146.3
CN	-				117.9

➤ **6-Chloroquinoléine-2-carbothioamide (149) :**



1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

À une solution de du nitrile **148** (500 mg, 2,65mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane (27 mL) sont ajoutés de l'acide thioacétique (400 mg, 0,38 mL, 5,3 mmol, 2 éq.) puis $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ 48 % (750 mg, 14 mL, 5,3 mmol, 2 éq.). La réaction est chauffée à 80°C pendant 16 heures puis le milieu réactionnel est dilué dans le dichlorométhane et extrait par une solution aqueuse de HCl 1 %. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (CH_2Cl_2 /éther de pétrole, 6:4) pour donner le produit désiré (530 mg, 90 %) sous la forme de cristaux oranges.

* Aspect : **cristaux oranges**

* **R_f** : 0,52 (CH_2Cl_2)

* **IR (solide)** : ν_{max} = 3339, 327, 3241, 3163, 2917, 1590, 1490, 1301, 1217 cm^{-1} .

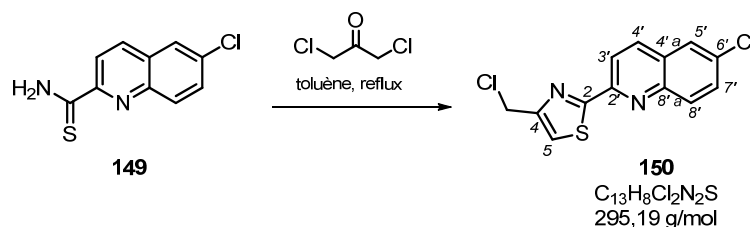
* **HRMS ESI** : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 223,0098 ; calculé pour $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}\text{Cl}^+$: 223,0097.

* **^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 9.65 (*s*, 1H), 8.85 (*d*, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.19 (*d*, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.03 (*d*, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.86 (*d*, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.79 (*s*, 1H), 770 (*dd*, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 1H).

* **^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 195.5, 149.5, 143.8, 135.9, 134.2, 131.5, 131.4, 129.6, 126.4, 122.2.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	-				149.5
3	8.85	1	<i>d</i>	8.7 Hz	122.2
4	8.19	1	<i>d</i>	8.7 Hz	135.9
4a	-				129.6
5	7.86	1	<i>d</i>	2.0 Hz	126.3
6	-				135.9
7	7.70	1	<i>dd</i>	9.0 – 2.0 Hz	131.4 / 131.5
8	8.03	1	<i>d</i>	9.0 Hz	131.4 / 131.5
8a	-				143.8
CS(NH₂)	9.65	1	<i>s large</i>		195.3
	7.79	1	<i>s large</i>		

➤ **4-(Chlorométhyl)-2-(6-chloroquinoléin-2-yl)-thiazole (150) :**



À une solution de thioamide **149** (500 mg, 2,24 mmol, 1 éq.) dans le toluène (2 mL) est ajoutée la dichloroacétone (773 mg, 6,72 mmol, 3 éq.). La réaction est chauffée au reflux pendant 6 heures. Le milieu réactionnel est lavé par de l'eau, séché sur Na_2SO_4 , filtré puis

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (CH₂Cl₂/éther de pétrole, 6:4) pour donner le produit désiré (650 mg, 98 %) sous la forme de cristaux blancs.

* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f** : 0,54 (CH₂Cl₂)

* **IR (solide)** : ν_{\max} = 2962, 2851, 1258, 1072, 1010, 874 cm⁻¹.

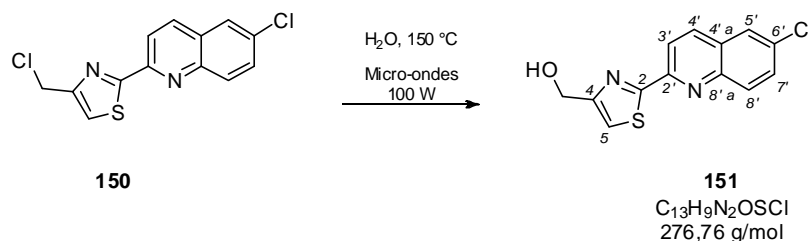
* **HRMS ESI** : m/z [M+H]⁺ : 294,9864; calculé pour C₁₃H₉Cl₂N₂S⁺ : 294,9863.

* **¹H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 8.35 (*d*, J = 8.6 Hz, 1 H), 8.16 (*d*, J = 8.6 Hz, 1 H), 8.06 (*d*, J = 9.0 Hz, 1 H), 7.82 (*d*, J = 2.2 Hz, 1 H), 7.68 (*dd*, J = 9.0, 2.2 Hz, 1 H), 7.48 (*s*, 1 H), 4.79 (*d*, J = 0.5 Hz, 2 H).

* **¹³C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 169.7, 153.7, 151.1, 146.1, 136.1, 133.0, 131.0 (2 C); 129.2, 126.4, 120.7, 118.7, 41.0.

attribution	¹ H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
2	-				169.7
4	-				151.1
5	7.48	1	<i>s</i>		118.7
2'	-				153.7
3'	8.35	1	<i>d</i>	8.6 Hz	120.7
4'	8.16	1	<i>d</i>	8.6 Hz	136.1
4a'	-				129.2
5'	7.82	1	<i>d</i>	2.2 Hz	126.4
6'	-				133.0
7'	7.68	1	<i>dd</i>	9.0 – 2.2 Hz	131.0
8'	8.06	1	<i>d</i>	9.0 Hz	131.0
8a'	-				146.1
CH ₂ Cl	4.79	2	<i>d</i>	0.5 Hz	41.0

➤ 4-(Hydroxyméthyl)-2-(6-chloroquinoléin-2-yl)-thiazole (151)



Une suspension du chlorure d'alkyle **150** (1,95 mg, 6.61 mol) dans un mélange acétonitrile : eau 1:1 (2,0 L) est porté au reflux pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le produit est précipité dans le chloroforme (100 mL) pour donner le produit désiré (800 mg, 46 %) sous la forme de cristaux beige. Les liqueurs contenant le produit de départ sont concentrées, suspendues dans un mélange acétonitrile : eau

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

1:1 (500 mL) puis portées au reflux pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le produit est précipité dans le chloroforme (30 mL) pour donner une seconde fraction du produit désiré (400 mg, 24 %) sous la forme de cristaux beige. Rendement global : 1,20 g ; 70 %.

* Aspect : **cristaux beige**

* **R_f**: 0,21 (CH₂Cl₂/CH₃OH, 99:1)

* **IR (solide)** : ν_{\max} = 3241, 2926, 1590, 1440, 1316, 1186, 1013, 886 cm⁻¹.

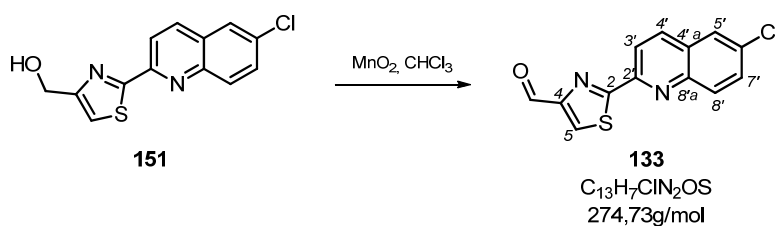
* **HRMS ESI** : m/z [M+Na]⁺ : 299,0028; calculé pour C₁₃H₉N₂OSCINa⁺ : 299,0002.

* **¹H RMN (300 MHz, pyridine-*d*₅)**, δ (ppm) : δ 8.49 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 5.29 (d, J = 1.0 Hz, 2H).

* **¹³C RMN (75 MH, pyridine-*d*₅)**, δ (ppm) : 169.1, 161.3, 152.4, 146.7, 137.0, 132.9, 131.5, 131.4, 129.8, 127.4, 119.3, 118.7, 61.5.

attribution	¹ H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
2					169.1
4					152.4
5	7.88	1	<i>s</i>		118.7
2'					161.3
3'	8.49	1	<i>d</i>	8.6 Hz	119.3
4'	8.15	1	<i>d</i>	8.6 Hz	137.0
4a'					129.8
5'	7.88	1	<i>d</i>	2.4 Hz	127.4
6'					132.9
7'	7.68	1	<i>dd</i>	9.0 – 2.4 Hz	131.5 ou
8'	8.19	1	<i>d</i>	9.3 Hz	131.4
8a'					146.7
CH ₂ O	5.29	2	<i>d</i>	1.0 Hz	61.5
OH	7.35	1	<i>t</i>	1.0 Hz	-

➤ 2-(6-chloroquinoléin-2-yl)-thiazole-4-carbaldéhyde (133) :



1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

À une solution d'alcool (1,20 g, 4,36 mmol) dans le chloroforme (700 mL) est ajouté de l'oxyde de manganèse (10,0 g, 11,5 mol ; divisés en 10 fractions équivalentes) toutes les 30 minutes. 30 après minutes après le dernier ajout le milieu réactionnel est filtré sur gel de silice (lavages $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 90:10, 5 \times 200 mL). Le filtrat est concentré sous pression réduite pour donner le produit désiré (1,00 g, 85 %) sous la forme de cristaux blancs.

* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f** : 0,42 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 99:1)

* **IR (solide)** : ν_{max} = 2917, 1739, 1478, 1030, 704 cm^{-1} .

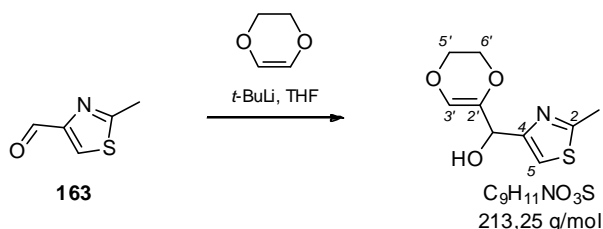
* **HRMS ESI** : m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 296,9869; calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{N}_2\text{OSCINa}^+$: 296,9865.

^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 10.13 (*s*, 1 H). 8.44 (*d*, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 8.33 (*s*, 1 H), 8.22 (*d*, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 8.08 (*d*, $J = 9.0$ Hz, 1 H), 7.85 (*d*, $J = 1.9$ Hz, 1 H), 7.70 (*dd*, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1 H).

* **^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 184.8, 171.8, 156.1, 150.5, 146.1, 136.4, 133.5, 131.3, 131.0, 130.3, 129.5, 126.5, 118.7.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	-				171.8
4	-				156.1
5	8.33	1	<i>s</i>		130.3
2'	-				150.5
3'	8.42	1	<i>d</i>	8.6 Hz	118.7
4'	8.22	1	<i>d</i>	8.6 Hz	136.4
4a'	-				129.5
5'	7.85	1	<i>d</i>	1.9 Hz	126.5
6'	-				133.5
7'	7.70	1	<i>dd</i>	9.0 – 1.9 Hz	131.3
8'	8.08	1	<i>d</i>	9.0 Hz	131.0
8a'	-				146.1
CHO	10.13	1	<i>s</i>		184.8

➤ (1,4-dioxèn-2-yl)(2-méthylthiazol-4-yl)-méthanol



À une solution de 1,4-dioxène (190 μL , 2,40 mmol) dans le THF (10 mL) refroidie à -78°C est ajoutée une solution 1,7 M de *t*-butyllithium dans le pentane (1,41 mL, 2,40 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite agité 2 heures à -40°C jusqu'à la décoloration complète du milieu réactionnel. La solution est ensuite transférée vers une solution d'aldéhyde **163** (150

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

mg, 1,2 mmol) dans le THF (10 mL) refroidie à -78°C . Après 90 minutes d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est neutralisé par de l'eau (1 mL) puis concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 99:1) pour donner le produit désiré (113 mg, 45 %) sous la forme de cristaux blancs.

* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f**: 0,50 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1)

* **IR (solide)** : $\nu_{\text{max}} = 3222, 3118, 1681, 1052, 960 \text{ cm}^{-1}$.

* **HRMS ESI** : m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 236,0359; calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{SNa}^+$: 236,0357.

* **^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 7.04 (*s*, 1H), 6.07 (*s*, 1H), 5.08 (*s*, 1H), 4.04 (*m*, 2H), 3.98 (*m*, 2H), 3.27 (*s*, 1H), 2.62 (*s*, 3H).

* **^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 166.1, 155.4, 137.0, 125.6, 114.4, 69.2, 64.7, 64.2, 19.1.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	<i>J</i> (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	-	-	-	-	166.1
4	-	-	-	-	155.4
5	7.04	1	<i>s</i>	-	114.4
CH ₃	2.62	1	<i>s</i>	-	19.1
2'	-	-	-	-	137.0
3'	6.07	1	<i>s</i>	-	125.6
5'	4.04 ou	2	<i>m</i>	-	64.7 ou
6'	3.98	2	<i>m</i>	-	64.2
CH(OH)	5.08	1	<i>s</i>	-	69.2
OH	2.37	1	<i>s</i>	-	-

➤ (1,4-dioxèn-2-yl)(2-méthylthiazol-4-yl)-cétone (168) :



À une solution d'alcool (72 mg, 0,34 mmol) dans le chloroforme (15 ml) est ajouté de l'oxyde de manganèse (1,80 g, 20,7 mol ; divisés en 10 fractions équivalentes) toutes les 30 minutes. 30 minutes après le dernier ajout, le milieu réactionnel est filtré sur silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1) puis purifié sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2) pour donner le produit désiré (46 mg, 65 %) sous la forme de cristaux blancs.

* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f**: 0,68 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1)

* **IR (solide)** : $\nu_{\text{max}} = 3108, 1723, 1636, 1391, 1124, 899, \text{cm}^{-1}$.

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

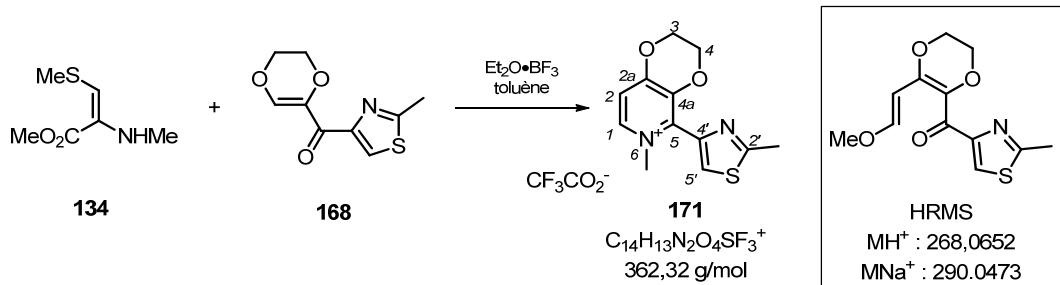
* **HRMS ESI** : m/z $[M+Na]^+$: 234,0201; calculé pour $C_9H_9NO_3SNa^+$: 234,0201.

* **1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 8.41 (*s*, 1H), 8.05 (*s*, 1H), 4.24 (*s*, 4H), 2.74 (*s*, 3H).

* **^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 178.6, 165.7, 152.7, 144.6, 137.0, 126.5, 65.3, 63.7, 19.3.

attribution	1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	-	-	-	-	165.7
4	-	-	-	-	152.7
5	8.05	1	<i>s</i>	-	137.0
CH ₃	2.74	1	<i>s</i>	-	19.1
2'	-	-	-	-	126.5
3'	8.41	1	<i>s</i>	-	144.6
5'	4.24	2	<i>s</i>	-	65.3
6'	4.24	2	<i>s</i>	-	63.7
C=O	-	-	-	-	178.6

➤ Trifluoracétate de 6-méthyl-5-(2-méthylthiazol-4-yl)-2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-*c*]pyridin-6-ium



À une solution de **134** (28 mg, 0,17 mmol) et **168** (37 mg, 0,16 mmol) dans le toluène (2 mL) est ajouté $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ (0,22 mL, 1,78 mmol). Après 24 heures de chauffage à 80°C, le milieu réactionnel est neutralisé par de l'eau (1 mL) puis concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par HPLC préparative [colonne sunfire[®] C18, 150 × 46 mm; eau / acétonitrile 10 à 100 % en 15 min + 0,2 % TFA; 42 mL/min; R_T : 11,2 min] pour donner le produit désiré (6,1 mg, 10 %) sous la forme d'un solide blanc.

* Aspect : **solide blanc**

* **IR (solide)** : ν_{max} = 2959, 2921, 2851, 1738, 1649, 1435 cm^{-1} .

* **HRMS ESI** : m/z $[M+H]^+$: 268,0652 ; calculé pour $C_{12}H_{14}NO_4S^+$: 268,0638.

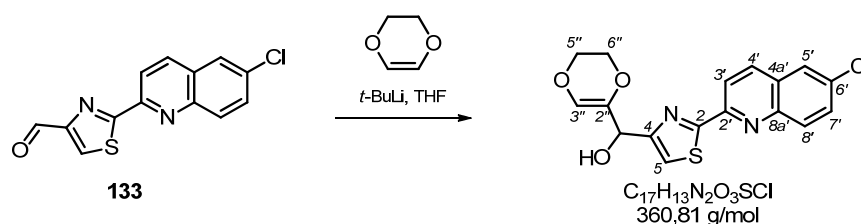
* **1H RMN (400 MHz, méthanol-*d*₄)**, δ (ppm) : 8.29 (*d*, J = 15.3 Hz, 1H), 7.44 (*s*, 1H), 6.03 (*d*, J = 15.3 Hz, 1H), 4.30 (*s*, 2H), 4.22 (*s*, 2H), 3.71 (*s*, 3H), 2.72 (*s*, 3H).

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

* ^{13}C RMN (100 MHz, méthanol- d_4), δ (ppm) : 169.8, 167.7, 149.6, 139.0, 138.7, 134.8, 119.1, 114.1, 51.9, 66.0, 65.0, 19.0.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	8.29	1	<i>d</i>	15.3 Hz	139.0
2	6.03	1	<i>d</i>	15.3 Hz	114.1
2a	-				134.8
3	4.22	2	<i>s</i>		65.0
4	4.30	2	<i>s</i>		66.0
4a					138.7
5					169.8
6-CH ₃	3.71	3	<i>s</i>		51.9
2'					167.7
4'					149.6
5'	7.44	1	<i>s</i>		119.1
2'-CH ₃	2.72	3	<i>s</i>		19.0

➤ (2-(6-chloroquinolin-2-yl)-thiazol-4-yl)-(1,4-dioxène-2-yl)-méthanol



À une solution de 1,4-dioxène (95 μL , 1,14 mmol) dans le THF (5 mL) refroidie à -78°C est ajoutée une solution 1,7 M de *t*-butyllithium dans le pentane (0,70 mL, 1,20mmol). Le milieu réactionnel est ensuite agité 2 heures à -40°C jusqu'à la décoloration complète du milieu réactionnel. La solution est ensuite transférée vers une solution d'aldéhyde **133** (150 mg, 0,55 mmol) dans le THF (5 mL) refroidie à -78°C . Après 90 minutes d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est neutralisé par de l'eau (1 mL) puis concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2) pour donner le produit désiré (115 mg, 59 %) sous la forme de cristaux blancs.

* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f** : 0,33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 8:2)

* **IR (solide)** : ν_{max} = 3300, 2950, 2870, 1682, 1593, 1491, 1189, 1074 cm^{-1} .

* **HRMS ESI** : m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 383,0237 ; calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{SNa}^+$: 383,0233.

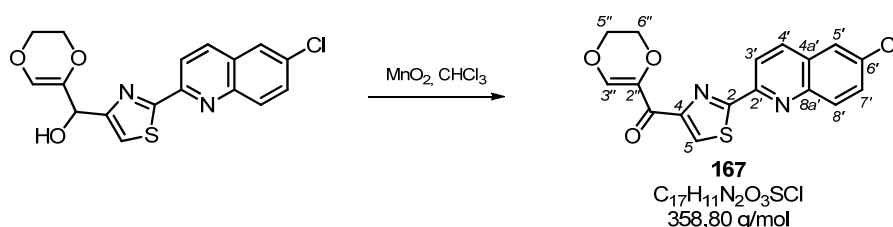
* **^1H RMN (300 MHz, chloroforme- d)**, δ (ppm) : 8.25 (*d*, J = 8.6 Hz, 1H), 8.05 (*dd*, J = 8.6, 0.8 Hz, 1H), 7.97 (*d*, J = 9.0 Hz, 1H), 7.72 (*d*, J = 2.1 Hz, 1H), 7.58 (*dd*, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 7.37 (*s*, 1H), 6.15(*s*, 1H), 5.19 (*d*, J = 4.3 Hz, 1H), 4.08 (*s*, 2H), 4,00 (*s*, 2H), 3.12 (*d* large, J = 4.3 Hz, 1H).

1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

* ^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 157.3, 151.3, 146.4, 136.8, 136.7, 136.0, 132.9, 131.0, 130.9, 129.3, 126.4, 125.8, 118,8, 118.4, 67.4, 64.7, 64.3.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	-				157.3
4	-				136.8
5	7.37	1	<i>s</i>		118.8
2'	-				151.3
3'	8.05	1	<i>dd</i>	8.6 – 0.8 Hz	118.4
4'	8.25	1	<i>d</i>	8.6 Hz	136.0
4a'	-				129.3
5'	7.72	1	<i>d</i>	2.1 Hz	126.4
6'	-				132.9
7'	7.58	1	<i>dd</i>	9.0 – 2.1 Hz	131.0 ou
8'	7.97	1	<i>d</i>	9.0 Hz	130.9
8a'	-				146.4
CH(OH)	5.19	1	<i>d</i>	4.3 Hz	67.4
OH	3.12	1	<i>d large</i>	4.3 Hz	-
2''	-				136.7
3''	6.15	1	<i>s</i>		125.8
5''	4.08 ou	2	<i>s</i>		64.7 ou
6''	4.00	2	<i>s</i>		64.3

➤ (2-(6-chloroquinolin-2-yl)-thiazol-4-yl)-(1,4-dioxèn-2-yl)-cétone



À une solution d'alcool (115 mg, 0,32 mmol) dans le chloroforme (15 ml) est ajouté de l'oxyde de manganèse (2,20 g, 25,3 mol ; divisés en 10 fractions équivalentes) toutes les 30 minutes. 30 minutes après le dernier ajout, le milieu réactionnel est filtré sur silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1) puis purifié sur gel de silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5) pour donner le produit désiré (93 mg, 81 %) sous la forme de cristaux blancs.

* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f** : 0,60 (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8:2)

* **IR (solide)** : ν_{max} = 3105 2924, 2245, 1283, 1137, 1009, 920 cm⁻¹.

* **HRMS ESI** : m/z [M+Na]⁺ : 381,0074 ; calculé pour C₁₇H₁₁N₂O₃SNa⁺ : 381,0077.

* ^1H RMN (300 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 8.58 (*s*, 1H), 8.31 (*s*, 1H), 8.26 (*d*, J = 8.6 Hz, 1H), 8.12 (*d*, J = 8.6 Hz, 1H), 8.00 (*d*, J = 9.0 Hz, 1H), 7.77 (*d*, J = 2.2 Hz, 1H), 7.62 (*dd*, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 4.24 (*s*, 4H).

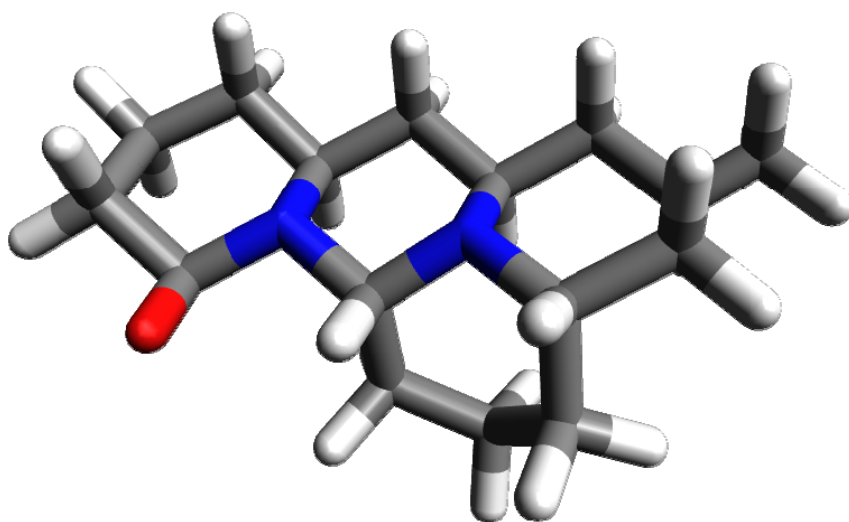
1- Vers la synthèse totale biomimétique de la Iodopyridone

* ^{13}C RMN (75 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 178.4, 168.8, 154.1, 150.7, 146.1, 145.0, 137.0, 136.2, 133.3, 131.2, 131.0, 129.8, 129.3, 118.6, 65.5, 63.8.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	<i>J</i> (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	-				168.8
4	-				154.1
5	8.31	1	<i>s</i>		129.8
2'	-				150.7
3'	8.12	1	<i>d</i>	8.6 Hz	118.6
4'	8.26	1	<i>d</i>	8.6 Hz	136.2
4a'	-				129.3
5'	7.77	1	<i>d</i>	2.2 Hz	126.5
6'	-				133.3
7'	7.62	1	<i>dd</i>	9.0 – 2.2 Hz	131.0 ou
8'	8.00	1	<i>d</i>	9.0 Hz	131.2
8a'	-				146.1
C=O	-				178.4
2''	-				145.0
3''	8.58	1	<i>s</i>		137.0
5''	4.24	2	<i>s</i>		65.5
6''	4.24	2	<i>s</i>		63.8

2

**Étude phytochimique de
Lycopodiella cernua**



Introduction générale.....	69
Partie 1 : Étude bibliographique	70
1.1. Description taxonomique de lycopodes.....	70
1.1.1. Description et historique de la taxonomie des lycopodes	70
1.1.2. Description et synonymes de <i>Lycopodiella cernua</i>	72
1.2. Diversité des alcaloïdes de lycopodes	73
1.3. Biogenèse des alcaloïdes de lycopodes	76
1.3.1. Origine biosynthétique de la pelletièrene	76
1.3.2. Alcaloïdes à deux unités pelletièrene.....	77
1.3.3. Alcaloïdes à trois unités pelletièrene	78
1.3.4. Alcaloïdes à quatre unités pelletièrene	79
1.4. Études phytochimiques antérieures de <i>Lycopodiella Cernua</i>	80
Partie 2 : Étude phytochimique de <i>Lycopodiella cernua</i>	87
2.1. Isolement de la cernuine et de la lycocernuine.....	87
2.2. Détermination des structures de la cernuine et de la lycocernuine.....	88
Partie 3 : Conclusion et perspectives.....	91
Partie 4 : Partie expérimentale	92

Introduction générale

Les lycopodes *lato sensu* sont un genre de plantes vivaces regroupant plus de 500 espèces dont seulement 10 % ont été l'objet d'études phytochimiques. Ce genre est particulièrement connu pour sa très grande diversité d'alcaloïdes issus du métabolisme de la lysine. À ce jour, plus de 200 molécules ont été isolées et au vue de l'originalité de ces structures et de leur complexité, de nombreux travaux de synthèse totale ont été entrepris.^{1,2} Les activités biologiques des alcaloïdes isolés de lycopodes expliquent aussi l'engouement en synthèse totale.³ En effet, l'huperzine A (1) (**Figure 1**) isolée de *Huperzia serrata* présente une activité inhibitrice de l'acétylcholineestérase très prometteuse. Les thématiques du laboratoire couvrent les différents aspects de la chimie des substances naturelles tant par la synthèse totale que par l'isolement de nouvelles structures. Le premier chapitre a été consacré à la synthèse de la lodopyridone, mais cet exercice de synthèse totale n'est rendu possible que par le travail des équipes réalisant l'étude chimique d'organismes vivants permettant d'isoler de nouvelles structures originales. En parallèle du travail de synthèse totale présenté dans le premier chapitre, une étude préliminaire de *Lycopodiella cernua* a été réalisée. Le but de ce travail était d'isoler de nouvelles structures originales mais également de ré-isoler des structures connues qui permettront la synthèse de nouveaux squelettes par des transformations hémi-synthétiques.

Dans ce chapitre, une étude bibliographique des alcaloïdes isolés de lycopodes ainsi que leurs voies de biosynthèse seront présentées. Puis les travaux réalisés sur *Lycopodiella cernua* seront détaillés.

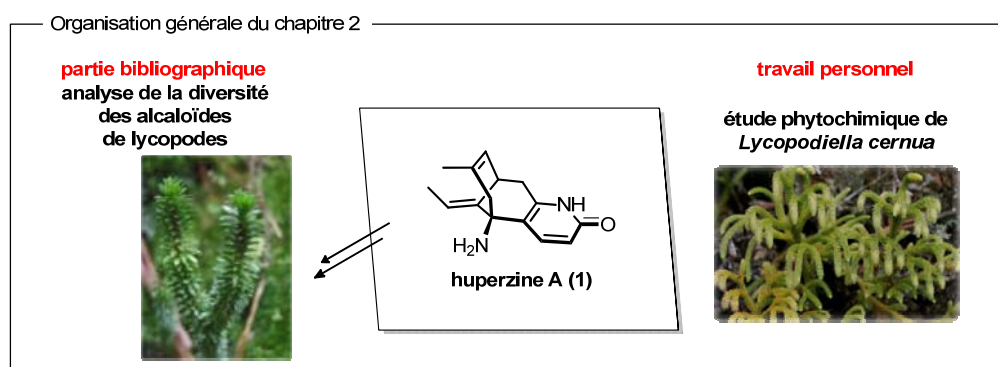


Figure 1 : Huperzine A isolée de *Huperzia serrata* (ordre des Lycopodiales).

¹ X. Ma, D. R. Gang, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 752–772.

² «The Lycopodium alkaloids». W. A. Ayer, L. S. Trifonov, **1994**, in *The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology*, vol 45 (Eds G. A. Cordell, A. Brossi) Academic Press, San Diego, pp 233–266.

³ a) Y. Nishikawa, M. Kitajima, H. Takayama, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 1987–1990 ; b) J. A. Kozak, G. R. Dake, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 4221–4223; c) T. Tanaka, N. Kogure, M. Kitajima, H. Takayama, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 8675–8680 ; d)

K. M. Laemmerhold, B. Breit, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 2367–2370 ; e) A. Chandra, J. A. Pigza, J.-S. Han, D. Mutnick, J. N. Johnston, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3470–3471 ; f) S. M. Canham, D. J. France, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 7876–7877 ; g) Y.-R. Yang, Z.-W. Lai, L. Shen, J.-Z. Huang, X.-D. Wu, J.-L. Yin, K. Wei, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 3430–3433 ; h) V. Bisai, R. Sarpong, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 2551–2553; i) Y. Nakamura, A. M. Burke, S. Kotani, J. W. Ziller, S. D. Rychnovsky, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 72–75.

Partie 1 : Étude bibliographique

1.1. Description taxonomique de lycopodes

1.1.1. Description et historique de la taxonomie des lycopodes

Les lycopodes appartiennent à l'ordre des lycopodiales et regroupent un ensemble de plantes vivaces d'aspect grossièrement similaire aux bryophytes (mousses). Le genre *Lycopodium* a été introduit en 1753⁴ par Linné avec la première description de l'espèce *Lycopodium clavatum*. L'étymologie du genre *Lycopodium* vient du grec (*lukosi et podon*) signifiant « pied de loup » en référence à la ressemblance des pousses de *Lycopodium clavatum* avec des pieds de loup. Ensuite, les différentes espèces de Lycopodiales ont été classées dans le genre *Lycopodium* au sens large, et comportait deux sous-genres, *Lycopodium* et *Phylloglossum*. Le premier genre présente une répartition mondiale mais principalement en zones tropicales tandis que le second genre est présent uniquement dans les îles continentales d'Océanie (Australie, Tasmanie, Nouvelle-Zélande).¹ Depuis cette première attribution, l'ordre des lycopodiales a subi plusieurs réattributions botaniques (notamment l'attribution des différents genres le constituant) devant être prises en compte dans l'étude bibliographique du genre *Lycopodium*. L'historique de la classification taxonomique des lycopodes peut être résumé comme suit :

- Introduction du genre *Lycopodium* par Linné avec *Lycopodium clavatum* en 1753.⁴
- Introduction au genre *Lycopodium* de 4 sous-genres par Baker en 1887.⁵
- Division du genre *Lycopodium* par Herter en genres *Lycopodium* et *Urostachys* en 1908 et 1923.⁶
- Refonte majeure des lycopodiales par Rothmaler en 1944 avec la mise en place de deux familles distinctes⁷ : i) la famille des Lycopodiaceae qui comporte trois genres (*Lycopodium*, *Diphasium* et *Lepidotis*) ; ii) la famille des Urostachyaceae comportant le genre *Huperzia* remplaçant le genre *Urostachys*.
- Proposition de deux nouveaux genres *Lycopodiella* et *Phlegmariurus* par Holub en 1964.⁸
- Proposition par Wilce en 1972⁹ de division du genre *Lycopodium* en deux sous-genres *Urostachys* et *Lycopodium* suite à l'étude des spores de lycopodes.

⁴ *Lycopodium clavatum* Linnaeus, Sp. Pl. 2: 1101, 1753.

⁵ J. G. Baker, *Handbook of fern allies*, Maggs Bros. Ltd., London, 1887, 8.

⁶ a) G. Herter, *Bot. Jahrb.*, 1909, 98, 29; b) G. Herter, *Beihefte zum Botanischen Centralblatt*, 1923, 39, 39.

⁷ W. Rothmaler, *Feddes Repertorium Specierum Novarum*, 1944, 54, 55–82.

⁸ J. Holub, *Preslia*, 1964, 36, 16–22.

⁹ J. H. Wilce, *Am. Fern. J.*, 1972, 62, 65–79.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

■ Proposition par Holub en **1975** d'un système comportant trois familles (Huperziaceae, Lycopodiaceae et Phylloglossaceae) pour décrire l'ordre des lycopodiales.¹⁰ Dans ce système, la famille des Huperziaceae est constituée de deux genres (*Huperzia* et *Phlegmariurus*), et la famille des Lycopodiaceae est constituée de sept genres, et la famille des Phylloglossaceae est constituée du genre unique *Phylloglossum*.

■ En **1978**, Ching a proposé une taxonomie dérivée du système d'Holub de 1975, comportant deux familles (Huperziaceae et Lycopodiaceae).¹¹

■ La troisième classification d'Holub proposée en **1985** est constituée uniquement de deux familles : les Huperziaceae (genre unique *Huperzia*) et les Lycopodiaceae (dix genres).¹²

■ Le dernier système taxonomique proposé est celui d'Øllgaard introduit en **1987** (Figure 2). Øllgaard propose une famille unique des Lycopodiaceae constitué des quatre genres *Huperzia*, *Lycopodium*, *Lycopodiella* et *Phylloglossum*.¹³

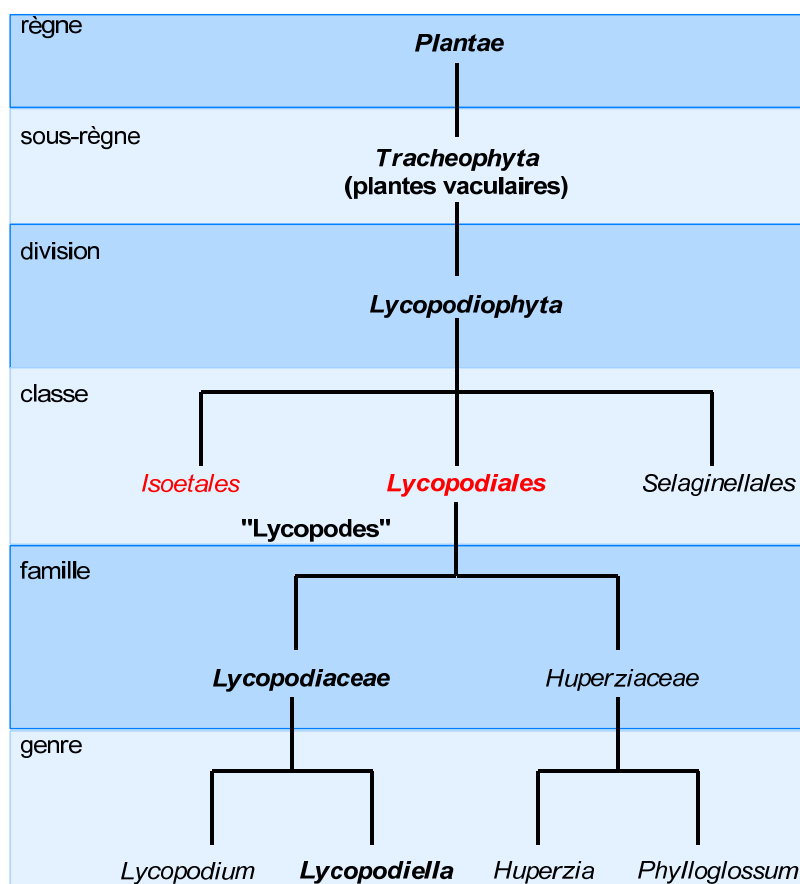


Figure 2 : Classification taxonomique des lycopodes selon Øllgaard.

¹⁰ J. Holub, *Preslia*, **1975**, 47, 103–104.

¹¹ R. C. Ching, *Acta Phytotax. Sin.*, **1978**, 16, 1–9.

¹² J. Holub, *Folia Geobot. Phytotaxon*, **1985**, 20, 67–80.

¹³ B. Ollgaard, *Opera Bot.*, **1987**, 92, 153–178.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

■ Les lycopodes faisant partie du sous-règne des trachéophytes englobant les plantes vasculaires ne produisant ni fleurs ni graines mais des spores comme les *Filicophytes* (fougères), ils ne sont pas inclus dans une classification unifiée telle l'APG-III pour les angiospermes. À ce jour la classification botanique des lycopodes n'est pas complètement fixée mais le système taxonomique de Benjamin Øllgaard est celui retenu par l'« *Integrated Taxonomic Information System* ». Au sens large les lycopodes regroupent la classe des *Lycopodiales* à laquelle on peut associer les *Isoetales*.

1.1.2. Description et synonymes de *Lycopodiella cernua*

Lycopodiella cernua (L.) Pic. Serm. est un lycopode (au sens large du terme) de la famille des Lycopodiaceae et ayant une répartition mondiale dans les zones tropicales d'Amérique du sud, des Antilles, d'Afrique, d'Asie et d'Océanie. La plante fut initialement décrite sous le nom de *Lycopodium Cernuum* par Linné en 1838 puis réassignée par Pichi-Sermolli. En se basant sur la classification d'Øllgaard, le nom de *Lycopodiella cernua* lui est attribué¹⁴ dans l'« *Integrated Taxonomic Information System* » (TSN : 503607).¹⁵ *Lycopodiella cernua* (L.) possède quatre autres noms synonymes : *Lycopodium cernuum*, *Lycopodium curvatum*, *Lepidotis cernua*, *Palhinheae cernua*.



Figure 3 : *Lycopodiella cernua* et répartition géographique.

¹⁴ B. Øllgaard, «*Index of Lycopodiaceae*», *The Royal Danish Academy of Sciences and Letters*, Copenhague – Danemark, 1989, page 135; b) «*Lycopodiaceae*» dans *Flora Mesoamericana*, vol. 1: Psilotaceae a Salviniaceae B. Øllgaard, Editeurs : D. Gerrit, M. Sousa Sánchez, Sandra Knapp, 1995, 3, pages 5– 2.

¹⁵ « *Integrated Taxonomic Information System* » <http://www.itis.gov/>

1.2. Diversité des alcaloïdes de lycopodes

Les alcaloïdes de lycopodes ont pour constante la présence d'un noyau alcaloïdique de type quinolizine, pyridine ou α -pyridone contenu dans un squelette carboné comportant 16 ou 32 atomes de carbone.¹⁶ Cette constante s'explique par des voies de biosynthèse impliquant des multimérisations d'unités à 8 puis 16 atomes de carbone issues du métabolisme de la lysine. Pour classer la diversité de structures, W. A. Ayer avait proposé une classification^{1,17} comportant **4 classes** représentées par 4 molécules chefs de file (Figure 4) : la lycopodine (**2**), la lycodine (**3**), la fawcettimine (**4**) et la phlegmarine (**5**) (ou classe des molécules non apparentées).² Cette classification reste très pratique malgré l'isolement de structures de plus en plus complexes et difficilement intégrables aux 3 premières classes. Cette classification devra dans l'avenir être agrémentée pour éviter sa désuétude.

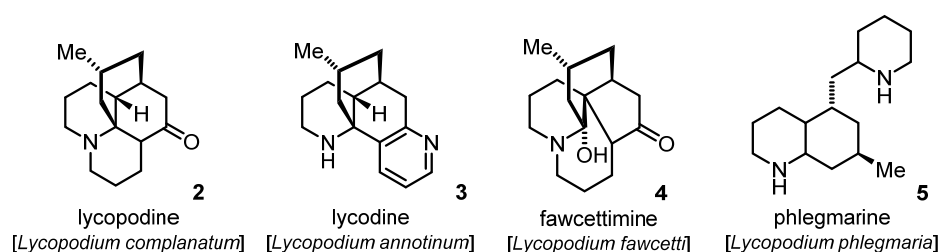


Figure 4 : Chefs de file de la classification de W. A. Ayer.

■ La classe représentée par la lycopodine (**2**), son membre le plus simple a longtemps représenté la moitié des alcaloïdes connus du genre *Lycopodium*. Du fait du faible nombre d'espèces étudiées et avec l'évolution des techniques donnant accès aux composés minoritaires, cette caractéristique a tendance à s'éroder. Les membres de cette famille comportent un squelette tricyclique incluant un noyau alcaloïdique de type quinolizidine et un quatrième cycle pontant les cycles A, B et C. Notons, que la fusion des cycles B et C présente généralement une stéréochimie *cis*. La faible diversité structurale retrouvée dans cette classe réside principalement dans la présence de *N*-oxydes, de fonctions hydroxyles sur les positions C-4, C-5, C-6, C-7, C-12 ou carbonyles sur les carbones C-5 et C-6 et issues de processus d'oxygénation séquentiels de la lycopodine.

¹⁶ a) K. Ishiuchi, T. Kubota, H. Ishiyama, S. Hayashi, T. Shibata, K. Mori, Y. Obara, N. Nakahata, J. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 749–753 ; b) K. Ishiuchi, T. Kubota, H. Ishiyama, S. Hayashi, T. Shibata, J. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 289–292.

¹⁷ a) «*The Lycopodium alkaloids*». J. Kobayashi, H. Morita, **2005**, in *The Alkaloids, Chemistry and Biology*, vol 61 (Ed. G. A. Cordell) Elsevier, San Diego, pp 1–57 ; b) Y. Hirasawa, J. Kobayashi, H. Morita, *Heterocycles*, **2009**, *77*, 679–729.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

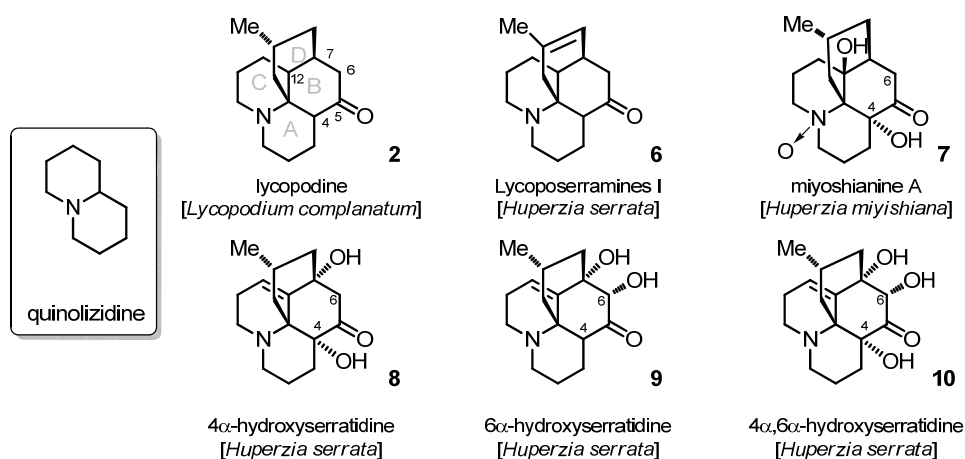


Figure 5 : Alcaloïdes de la classe de la lycopodine.

■ La deuxième classe est représentée par la lycopodine (3) et comporte une trentaine de membres. En comparant la classe de la lycopodine (2) et de la lycopodine (3), cette seconde en conserve les cycles B, C et D tandis que le cycle A est réarrangé en hétérocycle azoté et fusionné avec le cycle B. Cette famille comportant peu de membres et les variations de substituants seront du domaine de l'exemple. Toutefois les rares hydroxylations de cette classe seront toujours présentes sur la position C-12 comme dans le cas de l'huperzine U (13). L'huperzine A (1) isolée de *Huperzia serrata*, molécule emblématique des alcaloïdes du genre *Lycopodium* et présentant une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase est attribué à cette classe.^{18,19} La structure est issue d'un clivage du cycle C de la lycopodine (3) et l'élimination d'un carbone. La fastigiatine (12) présentant un cycle supplémentaire issu d'une cyclisation entre les positions C-4 et C-10 est également inclus à cette classe.

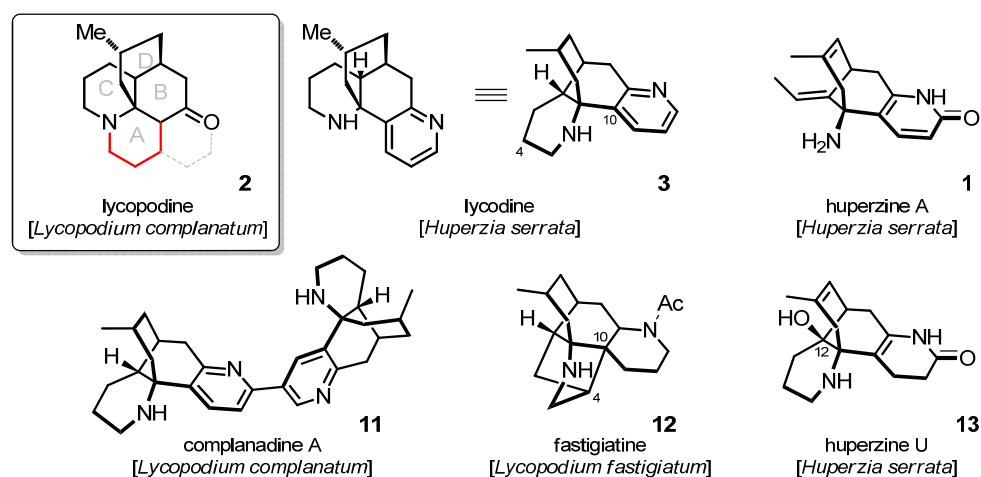


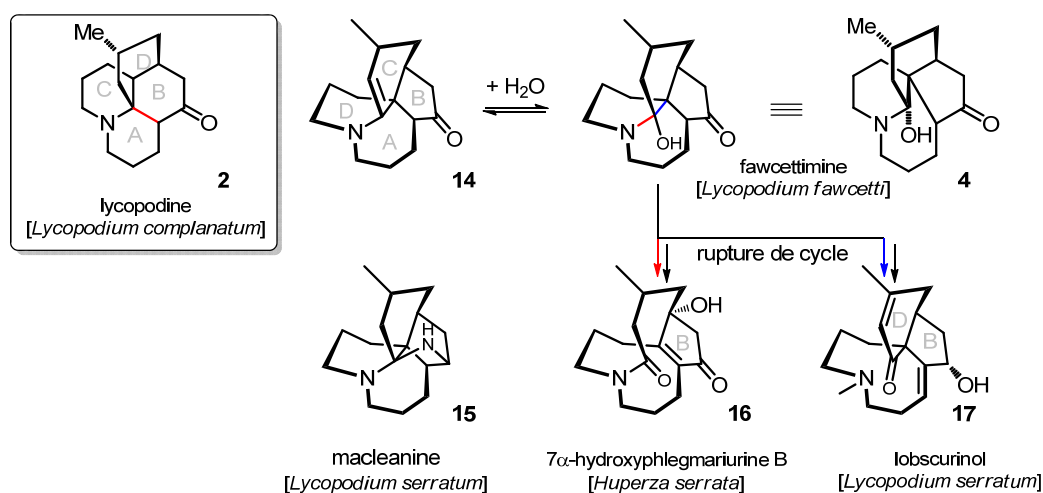
Figure 6 : Alcaloïdes de la classe de la lycopodine.

¹⁸ a) A. Zangara, *Pharm. Bioch. B.* **2003**, *75*, 675–86 ; b) B. S. Wang, H. Wang, Z.H. Wei, Y. Y. Song, L. Zhang, H. Z. Chen, *J. Neur. Trans.* **2009**, *116*, 457–65 ; c) J. S. Liu, C. M. Yu, Y. Z. Zhou, Y. Y. Han, F. W. Wu, B. F. Qi, Y. L. Zhu, *Acta Chim. Sin. (Engl. Ed.)*, **1986**, *44*, 1035–1040 ; d) J. S. Liu, Y. L. Zhu, C. M. Yu, Y. Z. Zhou, Y. Y. Han, F.W. Wu, B. F. Qi, *Can. J. Chem.*, **1986**, *64*, 837–839.

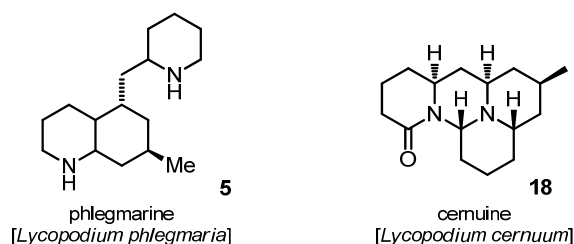
¹⁹ H. F. Chiu, M. Zhang, *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **2000**, *15*, 947–953.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

■ La classe de la fawcettimine comme son nom l'indique est représentée par la fawcettimine (4) comme chef de file et représente environ 30 % des alcaloïdes du genre *Lycopodium* connus. Cette classe conserve les cycles C et D de la lycopodine (2) par contre les cycles A et B ont subi respectivement une extension et une contraction de cycle par le déplacement d'une liaison. Une constante est la présence de nombreuses hydroxylations. Cette classe est semblait-il la plus difficile à entrevoir, en effet la fawcettimine (4) possède une fonction aminal qui peut former des amides en induisant une rupture des jonctions de cycles A/C/D ou A/C. Ces transformations réversibles associées à la présence de fonctions réactives (hydroxyle, cétone, énone) induisent la formation de ponts azotés et oxygénés supplémentaires augmentant rapidement la complexité de ces structures.



■ La classe de la phlegmarine (5) ou des molécules non-apparentées regroupe les molécules ne pouvant pas être incluses dans l'une des trois autres classes. Depuis les 15 dernières années l'isolement de molécules plus complexes et notamment les structures multimériques fait croître cette classe induisant la nécessité d'une mise à jour de la classification. Détailler cette classe fait rapidement tomber dans l'écueil de « l'effet catalogue ». Une description des voies de biosynthèse des alcaloïdes du genre *Lycopodium* apporte une vision plus claire en englobant cette classe.



1.3. Biogenèse des alcaloïdes de lycopodes

En se basant sur les voies de biosynthèse de cette famille d'alcaloïdes, une vision globale des structures s'en dégage. Bien que toutes les voies n'aient pas été prouvées l'implication du métabolisme de la L-lysine la formation de la pelletiérine (**24**) isolée par Charles Tanret (1847-1917) en 1878 à partir de l'écorce du grenadier *Punica granatum* L.²⁰ en tant que monomère constituant a été démontré. En 2011, dans ses travaux de thèse le docteur Lok-Hang Yan a imaginé et conçu une classification basée sur les aspects biosynthétiques.²¹ Elle a classé les alcaloïdes du genre *Lycopodium* en fonction du nombre d'unités pelletiérine retrouvée dans les différentes structures. Ce travail remarquable reste un document de référence pour l'équipe et cette section s'en inspire grandement.

1.3.1. Origine biosynthétique de la pelletiérine

La pelletiérine (**24**) l'unité constituante des alcaloïdes de lycopodes comporte une pipéridine substituée par une chaîne à trois atomes de carbones. La biosynthèse dérive de la L-lysine qui après une décarboxylation conduit à la cadavérine (**20**).²² La désamination oxydative d'une des fonctions amine forme l'aminopentanal (**21**) qui se cyclise en Δ^1 -pipéridéine (**22**). La voie des polyacétates explique l'origine de la chaîne latérale. La condensation de deux unités acétylcoenzyme A suivi d'une décarboxylation génère l'acétoacétylcoenzyme A qui va s'ancrer sur la Δ^1 -pipéridéine **22** hautement réactive. Le résultat de cette condensation est la formation de la pelletiérine (**24**) après une décarboxylation supplémentaire. Une seconde alkylation d'acétoacétylcoenzyme A sur la pelletiérine oxydée induirait la formation de la molécule **26** intervenant également dans la biogenèse d'alcaloïdes de lycopodes.

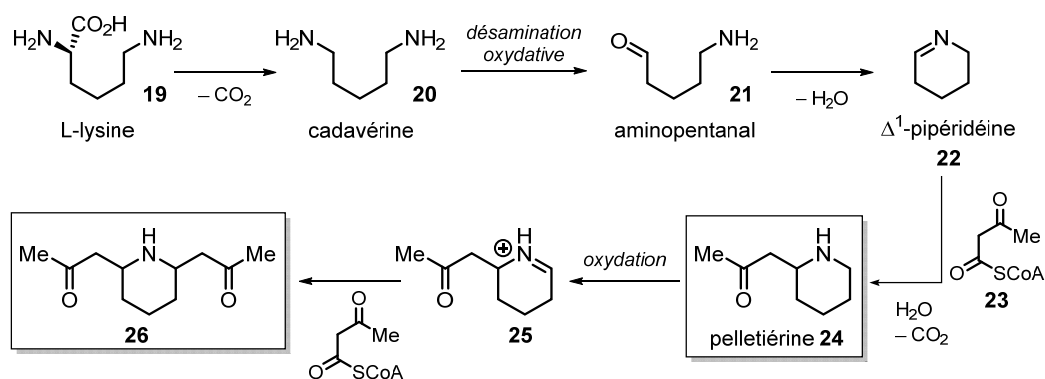


Schéma 1 : Biogenèse de la pelletiérine.

²⁰ a) C. Tanret, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **1878**, 86, 1270–1272 ; b) C. Tanret, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **1880**, 90, 695–698.

²¹ Lok-Hang Yan sous la direction de Erwan Poupon, « *Approche biomimétique des manadomanzamines et préparation d'analogues de la pelletiérine pour la synthèse biomimétique d'alcaloïdes de lycopodes* », soutenue le **30/06/2011**, Université Paris-Sud, numéro national de thèse NNT : 2011PA114812.

²² T. Hemscheidt et I. D. Spenser, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 1799–1800.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

Par l'analyse des enchainements carbonés des alcaloïdes de lycopodes, des sous-unités à huit carbones apparaissent clairement. Ces enchainements sont issus de la multimérisation d'unités pelletiérine (**24**) à différents degrés d'oxydation. En classant les alcaloïdes en fonction du nombre d'unités pelletiérine présentes, une classification correspondant à une extension de celle proposée W. A. Ayer. On retrouve les trois premières classes, mais la classe des molécules non-apparentées sont finalement attribuées dans un schéma global. Cette vision biosynthétique, apporte une hiérarchisation complète affranchie de son aspect purement descriptif.

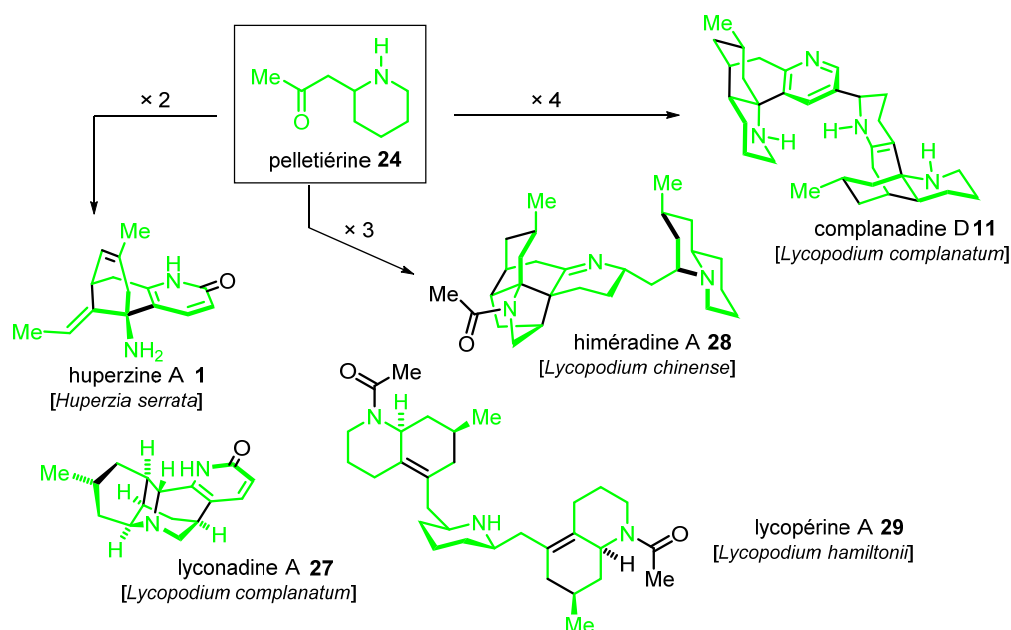


Schéma 2 : Classification suivant le nombre d'unités pelletiérine selon Yan et Poupon.

1.3.2. Alcaloïdes à deux unités pelletiérine

L'hyperzine A (**1**), le membre le plus emblématique des alcaloïdes permettra de détailler les alcaloïdes à deux unités pelletiérine (**24**). En effet, il correspond au point final de la biosynthèse des alcaloïdes de la classe de la lycodine^{23,24} selon la classification de W. A. Ayer. En comptant le nombre de carbone, on note un assemblage probable de deux unités de type pelletiérine (Schéma 3). Une forme oxydée **30** de la pelletiérine pourraient s'auto-assembler par une réaction d'aldolisation-crotonisation. Ensuite, une addition 1,2 d'une énamine sur le carbonyle résiduel suivi d'une réduction, conduirait à un cycle insaturé **32**. L'attaque de l'énamine résiduel sur l'imine conduirait au squelette de base des alcaloïdes de la classe de la lycodine. À ce stade, seule une oxydation d'un des cycles azotés en pyridone est nécessaire pour aboutir à l'hyperzine B (**34**). La fragmentation du dernier cycle pipéridinique par une séquence faisant intervenir : une oxydation en imine, une hydrolyse, une oxydation en

²³ b) M. Castillo, R. N. Gupta, D. B. MacLean, I. D. Spenser, *Can. J. Chem.*, **1970**, *48*, 1893–1903.

²⁴ J. Kobayashi, Y. Hirasawa, N. Yoshida, H. Morita, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 5901–5904.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

acide carboxylique et enfin une décarboxylation rationalise la formation l’huperzine C (**35**). Enfin, une isomérisation de la double liaison terminale conduit à l’huperzine A (**1**).

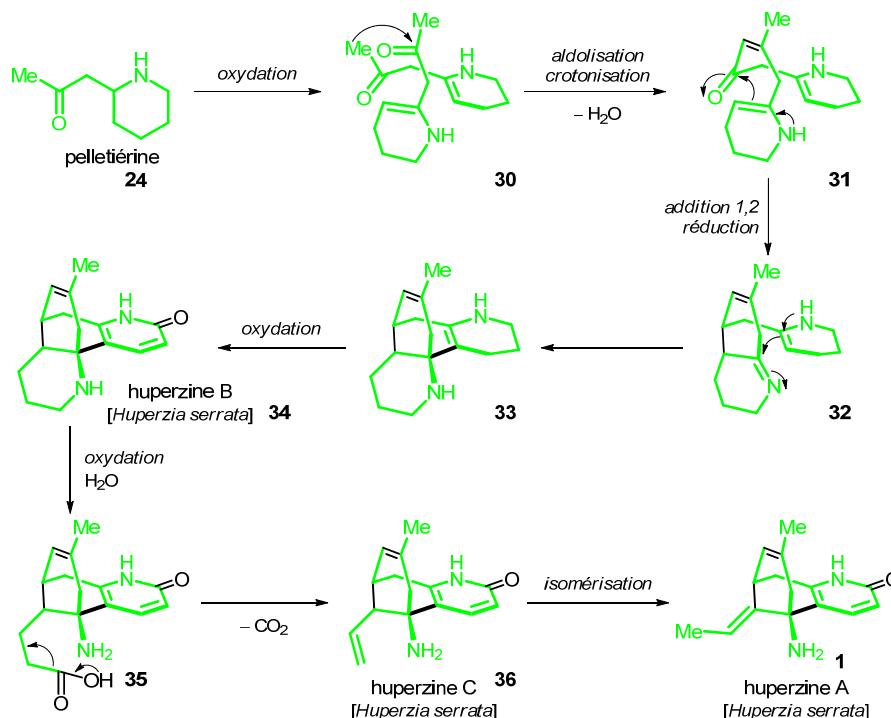


Schéma 3 : Hypothèse de biogenèse de l’huperzine A.

1.3.3. Alcaloïdes à trois unités pelletiérine

L’exemple de la lycopérine A (**29**)²⁵ a été choisi pour illustrer la biogenèse d’alcaloïdes à trois unités de type pelletiérine (Schéma 4). Ceci permet d’apporter une logique à la classification des molécules non-apparentées représentées par la phlegmarine (**5**). Toujours de manière simple, en comptant le nombre d’atomes de carbone présents dans la structure on arrive rapidement à la conclusion que deux pelletiérines et une molécule **26** évoquée au Schéma 1 constituent la molécule de lycopérine A (**29**). La molécule **26** réagirait avec deux molécules de pelletiérine **24** par des réactions d’aldolisation-crotonisation identiques. Suite à des oxydations les deux énamines de la molécule **37** par une addition de type 1,2 attaquerait les deux fonctions carbonyle. Enfin des réductions en des hétérocycles et des *N*-acétylations conduirait à la lycopérine A (**29**). Une biogenèse identique entre deux pelletiérines rationalise également la formation de la phlegmarine (**5**).

²⁵ Hirasawa, J. Kobayashi, H. Morita, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 123–126.

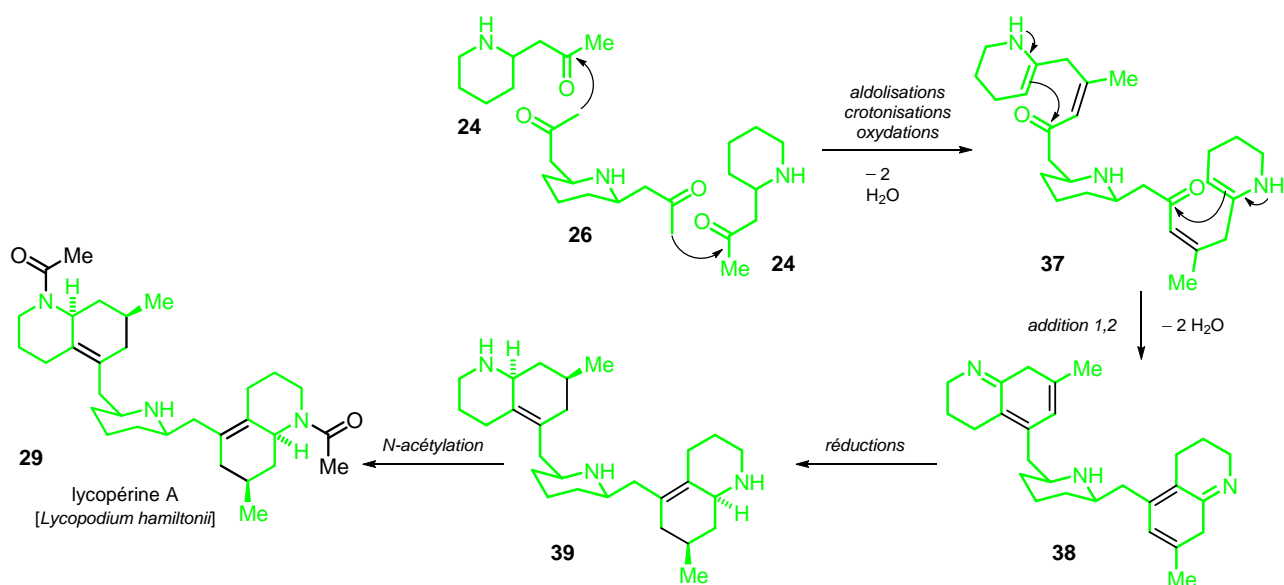


Schéma 4 : Hypothèse de biogenèse de la lycopérine A.

1.3.4. Alcaloïdes à quatre unités pelletiérine

L'exemple de la complanadine A (**11**)²⁶ a été choisi pour illustrer la biogenèse d'alcaloïdes à quatre unités (Schéma 4) dérivées de la pelletiérine (**24**). Cette molécule est un dimère du squelette de type lycodine (**3**) dont la biosynthèse a déjà été détaillée. La réduction du cycle A du squelette de type lycodine (molécule **40**) suivie d'une oxydation formerait une imine/énamine **42/43** en équilibre. Puis l'attaque de l'énamine **43** d'une des sous-unités sur l'imine de la seconde sous-unité **42** permettrait la dimérisation de la molécule. La complanadine A (**11**) serait ensuite obtenue par oxydation du noyau pipéridine en pyridine.

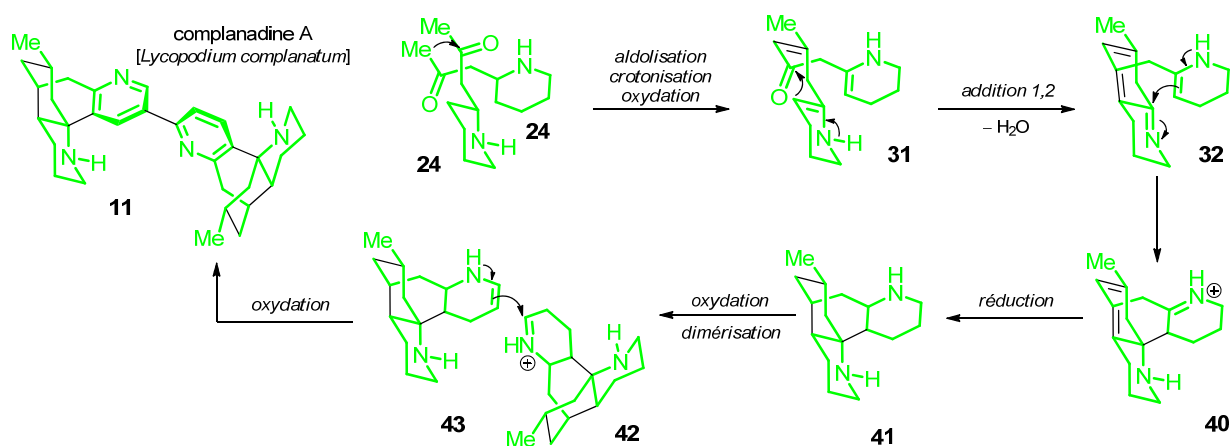


Schéma 5 : Hypothèse de biogenèse de la complanadine A.

²⁶ H. Morita, K. Ishiuchi, A. Haganuma, T. Hoshino, Y. Obara, N. Nakahata, J. Kobayashi, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 1955–1060.

1.4. Études phytochimiques antérieures de *Lycopodiella Cernua*

Les travaux phytochimiques les plus anciens concernant *Lycopodiella Cernua* (synonyme *Lycopodium cernuum*) ont été réalisés par Manske en 1948²⁷. À cette époque, la cernuine (**18**), son *N*-oxyde (**44**) et la lycocernuine (**45**) ont été isolés (Tableau 1). Selon la classification de W. A. Ayer ces molécules font partie de la classe des molécules non apparentées. La cernuine (**18**) est une molécule importante dans l'histoire des alcaloïdes puisque en 1971 Spenser par des expériences de marquage isotopique de la lysine a démontré l'implication du métabolisme de la lysine et de deux unités pelletiérine leur biosynthèses (Figure 9).²⁸ À partir d'une lysine marquée par du carbone 13 et du tritium. Les marquages au carbone 13 ont été retrouvés avec des rendements isotopiques de 50 % sur les quatre positions en *ortho* des azotes de la cernuine.

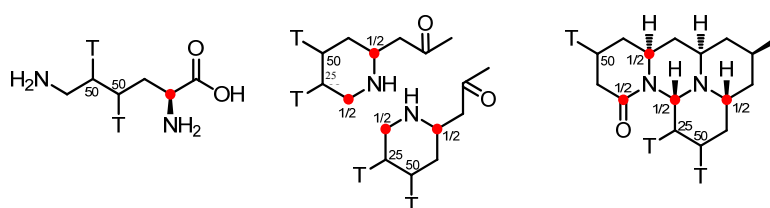


Figure 9 : Étude de la biosynthèse de la cernuine par marquage isotopique.

Cette répartition prouve le passage par la cadavérine, une diamine symétrique pour la formation des cycles pypéridine. Les tritiums quant à eux ont été retrouvés sur trois positions, un marquage étant perdu par tautomérie de la fonction cétone. Ce résultat historique constitue la première preuve expérimentale de la biosynthèse des alcaloïdes des lycopodes selon le mécanisme présenté dans la section 1.2. Le co-isolément avec la cermizine D (**50**)²⁹ permet de postuler la formation du squelette tétracyclique par une réaction d'électrocyclisation.

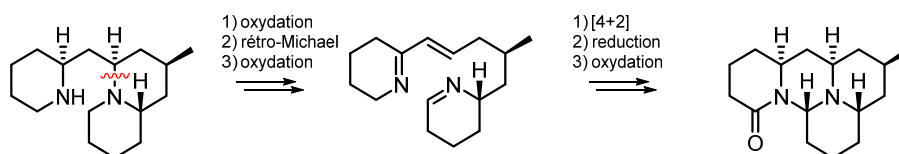


Schéma 6 : Formation du tétracycle de cernuine par électrocyclisation.

²⁷ a) L. Marion, R. H. Manske, *Can. J. Res.* **1948**, 26b, 1–2; b) W. A. Ayer, J. K. Jenkins, S. Valverde-Lopez, *Tetrahedron Lett.* **1964**, 32, 2201–2209; c) W. A. Ayer, J. K. Jenkins, K. Piers, S. Valverde-Lopez, *Can. J. Res.* **1966**, 445–450.

²⁸ Y. K. Ho, R. N. Gupta, D. B. MacLean, I. D. Spenser, *can. J. Res.* **1971**, 3352–3361.

²⁹ H. Morita, Y. Hirasawa, T. Shinzato, J. Kobayashi, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7015–7023.

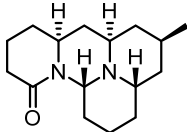
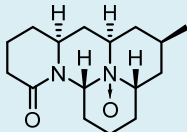
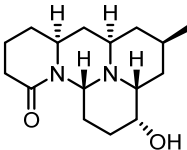
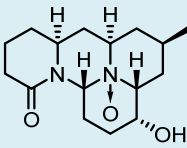
2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

Jusqu'en 2004 avec les travaux de Koboyashi,²⁹ l'étude phytochimique de la plante est complètement tombé en désuétude. Le travail de son équipe a permis de co-isoler le précurseur biosynthétique de la cernuine et quelques molécules apparentées. Depuis 10 ans de nouveaux alcaloïdes ont pu être isolés dont certains comme l'isopalhinine (**57**)³⁰ présentent des structures extrêmement complexes. Les différents alcaloïdes isolés de *Lycopellia cernua* (*Lycopodium cernuum*, *Palhinhaea cernua*) sont présentés dans le Tableau 1.

³⁰ L. B. Dong, X. Gao, F. Liu, J. He, X. D. Wu, Y. Li, Q. S. Zhao, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3570–3573.

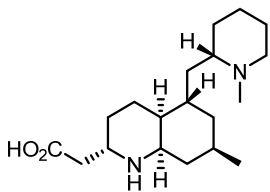
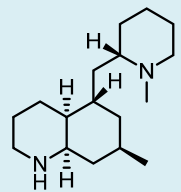
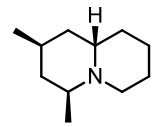
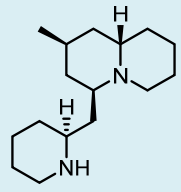
2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

Tableau 1 : Étude bibliographique des alcaloïdes de *Lycopodiella cernua*.

Nom	structure	dénomination utilisée	année d'isolement	Activités biologiques
cernuine 18		<i>Lycopodium cernuum</i>	1948 ^{27,31}	Inhibiteur de l'acétylcholinestérase $CI_{50} = 220 \mu\text{M}$.
cernuine N-oxyde 44		<i>Lycopodium cernuum</i>	1948 ^{27,31,29}	Cytotoxique $CI_{50} = 6,5 \mu\text{g/mL}$ sur cellules L1210. Inhibiteur de l'acétylcholinestérase $CI_{50} = 330 \mu\text{M}$.
lycocernuine 45		<i>Lycopodium cernuum</i>	1948 ^{27,31}	
lycocernuine N-oxyde 46		<i>Lycopodium cernuum</i>	2004 ²⁹	Cytotoxique $CI_{50} = 8,9 \mu\text{g/mL}$ sur cellules L1210 ²³

³¹ Ya. Nishikawa, M. Kitajima, H. Takayama, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1987–1990.

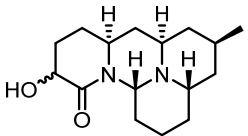
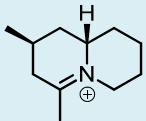
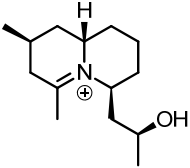
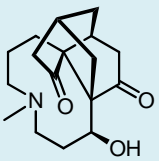
2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

cermizine A 47		<i>Lycopodium cernuum</i>	2004 ²⁹	Cytotoxique CI ₅₀ = 4,9 µg /mL sur cellules L1210
cermizine B 48		<i>Lycopodium cernuum</i>	2004 ²⁹	Cytotoxique CI ₅₀ = 5.5 µg /mL sur cellules L1210
cermizine C 49		<i>Lycopodium cernuum</i>	2004 ^{29,32}	
cermizine D 50		<i>Lycopodium cernuum</i>	2004 ^{29,31,33}	Cytotoxique CI ₅₀ = 7.5 µg/mL sur cellules L1210

³² B. Snider, J. Grabowski, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1039–1042.

³³ N. Veerasamy, E. Carlson, R. Carter, *Org. Lett.* **2008**, 14, 1596–1599.

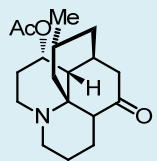
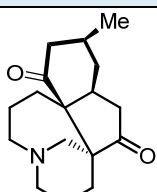
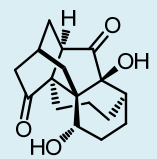
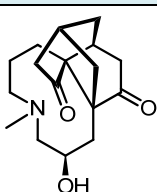
2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

hydroxycernuine 51		<i>Lycopodium cernuum</i>	2007 ³⁴	
sénépodine G 52		<i>Lycopodium cernuum</i>	2004 ²⁹	
sénépodine H 53		<i>Lycopodium cernuum</i>	2004 ²⁹	
palhinine A 54		<i>Palhinhaea cernua</i>	2010 ³⁵	non cytotoxique non inhibiteur de l'acétylcholinestérase

³⁴ S. Morel, I. Kerzaon, V. Roumy, N. Azaroual, S. Sahpaz, H. Joseph, F. Bailleul, T. Hennebelle, *Biochem Sys Ecol.* **2012**, 45, 188–190

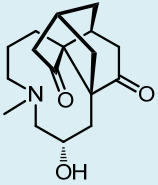
³⁵ F. W. Zhao, Q. Y. Sun, F. M. Yang, G. W. Hu, J. F. Luo, G. H. Tang, Y. H. Wang, C. L. Long, *Org. Lett.* **2010**, 12, 3922–3925.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

acétyle lycoserramine M 55		<i>Palhinhaea cernua</i>	2012 ³⁶	non cytotoxique non inhibiteur de l'acétylcholinestérase
palcérnine A 56		<i>Palhinhaea cernua</i>	2012 ³⁶	non cytotoxique non inhibiteur de l'acétylcholinestérase
isopalhinine 57		<i>Palhinhaea cernua</i>	2013 ³⁰	non cytotoxique non inhibiteur de l'acétylcholinestérase
palhinine B 58		<i>Palhinhaea cernua</i>	2013 ³⁰	non cytotoxique non inhibiteur de l'acétylcholinestérase

³⁶ F. W. Zhao, Q. Y. Sun, F. M. Yang, J. F. Luo, G. W. Hu, F. Liu, C. L. Long, *J. Braz. Soc.* **2012**, 23, 349–354.

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella Cernua*

palhinine C 59		<i>Palhinhaea cernua</i>	2013 ³⁰	non cytotoxique non inhibiteur de l'acétylcholinestérase
autres composés déjà connus	lycodine, lycodyne N-oxide, lycoflexine, obscurine, déshydroisofawcettine, lycopodine, acétyllycofoline, acétylfawcettine	<i>Palhinhaea cernua</i>	2012 ³⁶	

Partie 2 : Étude phytochimique de *Lycopodiella cernua*

2.1. Isolement de la cernuine et de la lycocernuine

Le spécimen de *Lycopodellia cernua* a été collecté et identifié botaniquement en mai 2011 en Côte d'Ivoire dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de chimie organique et bioorganique de l'Université Houphouët Boigny, d'Abidjan. Pour réaliser l'étude des alcaloïdes, nous disposons de 400 grammes de plante broyées et séchées. Un protocole classique d'extraction du *totum* alcaloïdique par un solvant apolaire après alcalinisation de la poudre de plante a été sélectionné (Figure 10).

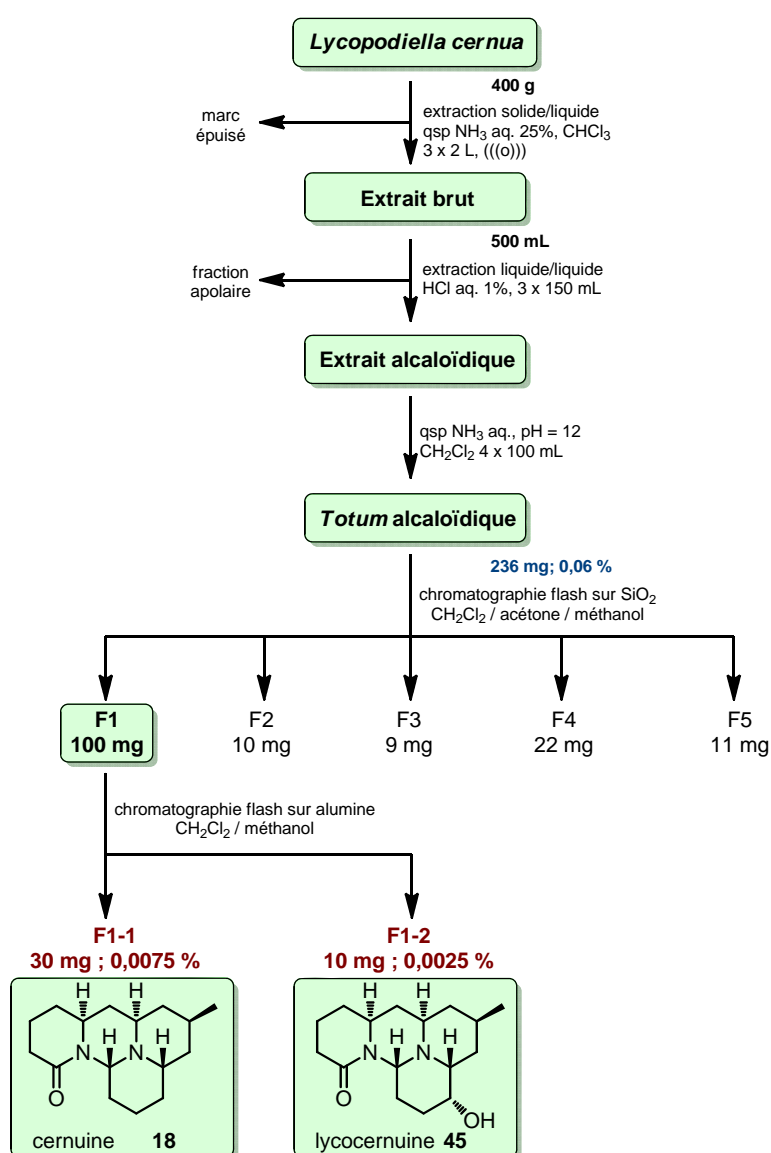


Figure 10 : Protocole d'extraction et de purification des alcaloïdes de *Lycopodellia cernua*.

■ En se basant sur l'étude de la littérature, les structures attendues nous semblaient a priori sensibles. Pour cela, une extraction par macération à froid sous irradiation aux ultra-sons a été

choisie plutôt que les techniques par infusion ou d'extraction en continu par un appareil de Soxhlet. Après une partition acido-basique pour éliminer les composés apolaires et une alcalinisation pour libérer les formes amines libres, un *totum* alcaloïdique de 236 mg (0,06 %) a été obtenu. Par les techniques de la chromatographie sur couche mince de prime abord très rudimentaires, la présence de deux alcaloïdes majoritaire a été démontrée. Toujours par ces mêmes techniques, le choix d'une méthode de purification par chromatographie flash a été fait. Une première chromatographie sur silice permet d'isoler une première fraction F1 contenant les deux alcaloïdes majoritaires ainsi que quatre autres fractions minoritaires nommées F2, F3, F4 et F5 en fonction du gradient de polarité nécessaire pour les éluer. Ensuite la fraction F1 a été purifiée sur alumine neutre permettant d'isoler deux fractions F1-1 et F1-2 correspondant respectivement aux alcaloïdes cernuine (**18**) et lycocernuine (**45**) à l'état pur.

■ Le *totum* alcaloïdique ne représente que 0,06 % de la masse de la plante séchée. Après examen des rendements d'extraction de lycopodes rapportés dans la littérature, on note que ce rendement est la norme. De plus, les deux alcaloïdes majoritaires constituent une grande partie du bilan matière du *totum*. Au final, les fractions minoritaires ne représentent que quelques milligrammes. Du fait des faibles rendements l'étude approfondie des fractions F2, F3, F4 et F5 n'est pas possible. Pour pouvoir étudier ces fractions et accéder à de nouvelles structures, il nous faudrait disposer d'un minimum de 20 kg séché afin de dépasser la valeur du gramme en extrait alcaloïdique total. Pour obtenir ces quantités, la collecte de la matière première se montrerait extrêmement laborieuse au vue de la morphologie de la plante.

■ Au final deux alcaloïdes à l'état pur ont été isolés mais ils correspondent à des structures connues. Mais étant confrontés aux affres du manque de matière première il n'est pas possible de poursuivre en l'état l'étude phytochimique de la plante. Toutefois l'un des objectifs des études phytochimiques est de découvrir de nouvelles structures originales présentant des activités biologiques. Une des autres approches pour obtenir des squelettes originaux, est la modification chimique de squelettes naturels par des transformations héli-synthétiques. En regardant la littérature, on peut considérer la cernuine comme un point final dans les voies de biosynthèse des alcaloïdes de lycopodes. Toutefois des fonctions réactives peuvent être introduites sur la molécule pour induire des réarrangements « inattendus » pour créer de nouveau squelettes originaux.

2.2. Détermination des structures de la cernuine et de la lycocernuine

L'analyse par spectrométrie de masse de la fraction F1-1 a indiqué la formule brute $C_{16}H_{26}N_2O$ pour le premier alcaloïde isolé.

■ L'analyse des spectres de RMN du proton et du carbone ainsi que l'analyse bidimensionnelle HSQC ont indiqué la présence de cinq méthines, neuf méthylènes, d'un méthyle et d'un carbone quaternaire ayant un déplacement chimique de 168,3 ppm pouvant correspondre à une fonction amide (Figure 11).

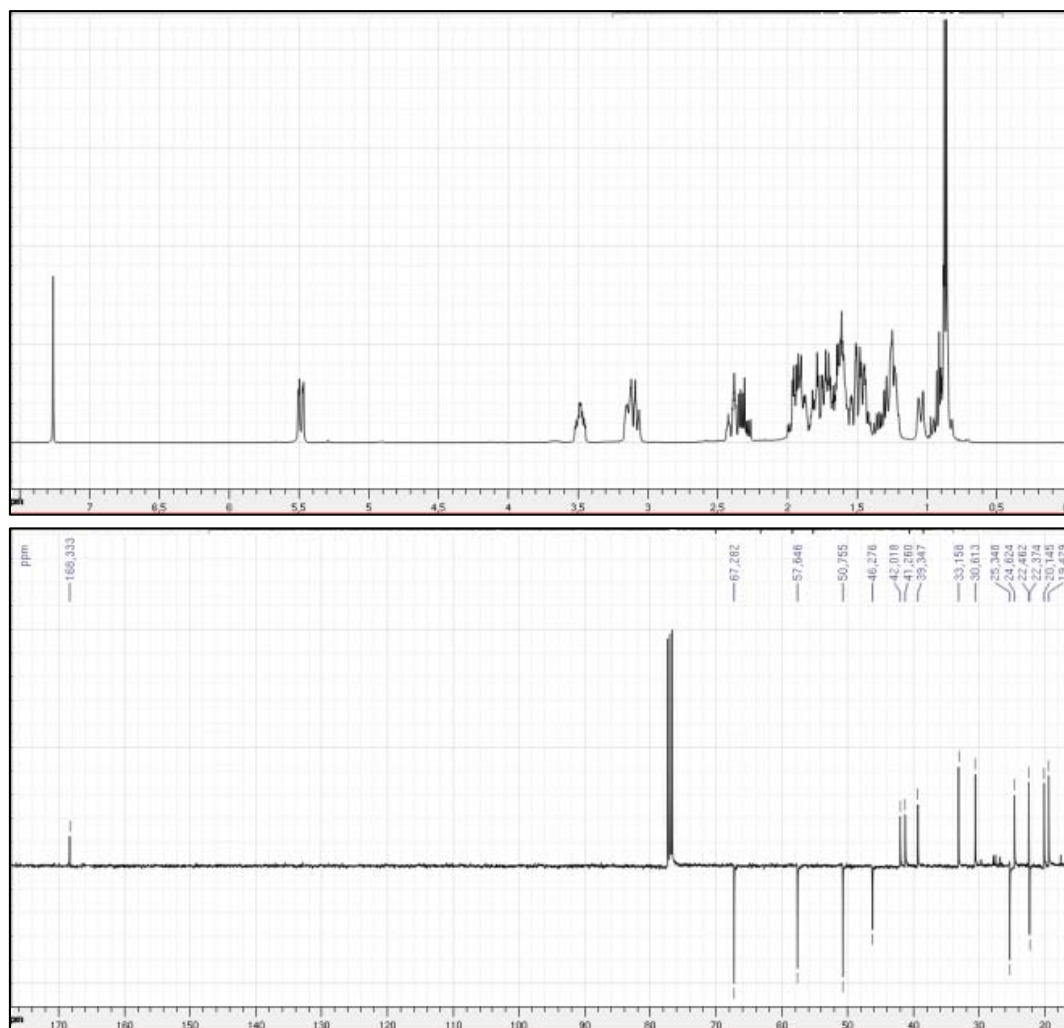
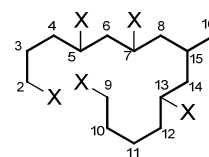


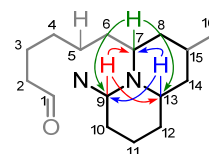
Figure 11 : Spectres RMN proton (CDCl_3 , 400 MHz) et JMod (100 MHz) de la cernuine.

■ L'analyse bidimensionnelle COSY a clairement indiqué une linéarité dans l'enchaînement carboné. L'analyse méticuleuse du spectre COSY indique que quatorze carbones forment une chaîne linéaire substituée par un méthyle.



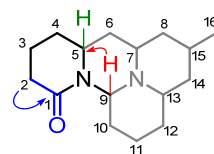
■ En s'appuyant sur la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$, on en déduit que la structure comporte cinq insaturations et/ou cycles. Une seule insaturation de type carbonyle a été identifiée donc la structure comporte quatre cycles.

■ Les méthines C-7, C-13 ont des déplacements chimiques 46,3 et 57,6 indiquant une substitution par un atome d'azote. Le méthine C-9 présente un déplacement chimique de 67,3 suggérant sa substitution par deux atomes d'azote. L'analyse RMN bidimensionnelle HMBC a indiqué des corrélations entre les méthines C-7, C-9 et C-13. Ces données suggèrent que ces trois positions sont liées au même atome d'azote et permet de situer sur la structure un enchaînement de type quinolizidine.



2- Étude phytochimique de *Lycopodiella cernua*

■ Les analyses HMBC ont également indiqué une corrélation entre le proton H9 et C5 ainsi qu'entre le carbone C1 et les protons H2. Avec ces données la structure tétracyclique de la cernuine est déduite pour la fraction F1-1.



■ L'analyse structurale a été achevée par l'analyse des corrélations spatiales nOe, et comparées aux données spectrales fournies par Kobayashi permettant de valider l'identité de la structure. La même démarche analytique a été utilisée pour l'identification de la lycocernuine.

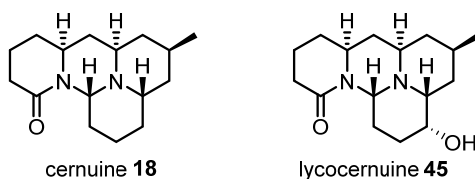


Figure 12 : Bilan de l'étude phytochimique de *Lycopodiella cernua*.

Partie 3 : Conclusion et perspectives

Les alcaloïdes de lycopes de notre point de vue dont partie des plus belles classes de produits naturels de bas poids moléculaires. En effet pour des molécules de moins de 300 Daltons, leur diversité et leur complexité sont fascinante. Mais découvrir de nouvelles molécules dans cette famille n'est pas une chose aisée au vu des faibles teneurs en alcaloïdes totaux. Pour mener à bien une étude d'un lycopode quelques dizaines de kilos de matières premières seraient nécessaires pour accéder aux nouvelles structures minoritaires. Deux molécules connues ont été isolées au cours de cette étude et être en possession de cernuine et de lycocernuine nous permet d'imaginer des transformations hémi-synthétique à partir de ces composés précieux.

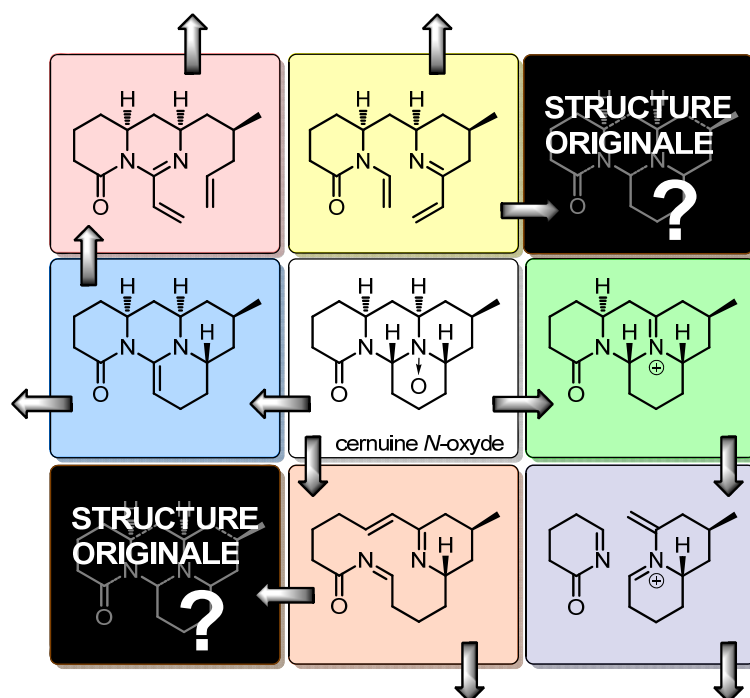


Figure 13 : Possibilité de diversification de la cernuine par une réaction de Polonovski-Potier

■ La cernuine et la lycocernuine ne présentent pas de fonction réactive apparente. Par contre, après la conversion d'un des azotes de ces structures en *N*-oxyde, des réarrangements des structures polycycliques *via* une réaction de Polonovski-Potier seraient possibles (Figure 13). En évaluant les chemins réactionnels vers lesquels les structures pourraient évoluer, nous arrivons à la conclusion que le potentiel est très large. Grâce à la réaction de Polonovski-Potier, il serait possible de former des iminiums en équilibre avec plusieurs formes énamines qui pourraient encore diverger *via* des *rétro*-cycloadditions, des *rétro*-Michael. Il en résulterait des intermédiaires réactifs pouvant se réorganiser vers des structures polycycliques complexes et pourquoi pas une structure correspondant à des produits naturels qui seront découvert dans le futur.

Partie 4 : Partie expérimentale

Protocoles généraux : Cf. Chapitre 1.

Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux de *Lycopodiella cernua* :

■ Extraction solide/liquide : le lot de *Lycopodiella cernua* broyé et séché (400 g) est humecté par le minimum d'une solution ammoniacque au ½ puis extrait par du chloroforme (3 x 2 L / 1 heure) par macération à froid sous irradiations aux ultra-sons jusqu'à épuisement du marc. Après filtration, l'extrait est concentré jusqu'à un volume résiduel de 500 mL.

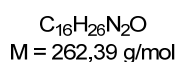
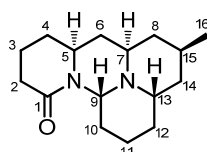
■ *Totum* alcaloïdique : l'extrait organique est extrait par une solution d'acide chlorhydrique à 1 % (3 x 150 mL). Les phases aqueuses combinées sont alcalinisées par une solution ammoniacque au ½ jusqu'à pH = 12 puis extraites par du dichlorométhane (4 x 100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis concentrée sous pression réduite donnant 236 mg d'alcaloïdes totaux.

Purification de la *cernuine* et de la *lycocernuine* :

■ La fraction d'alcaloïdes totaux est chromatographiée sur gel de silice flash et éluee par un gradient d'un mélange dichlorométhane / acétone / méthanol (9:1:0 → 8:2:0 → 7:3:0 → 1:0:0 → 95:0:5 → 9:0:1 / 100 mL pour chaque gradient). Après analyse par CCM cinq fractions F1 (100 mg), F2 (10 mg), F3 (9 mg), F4 (22 mg) et F5 (11 mg) sont constituées.

■ La fraction F1 est chromatographiée sur alumine et éluee par un gradient d'un mélange dichlorométhane / méthanol (95:5 → 9:1 / 100 mL pour chaque gradient). Après analyse par CCM deux fractions F1-1 (30 mg) et F1-2 (10 mg) correspondant respectivement à la *cernuine* et la *lycocernuine* sont constituées.

➤ **Cernuine (18) :**



* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f** : 0,50 (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1)

* **IR (solide)** : ν_{\max} = 2949, 2927, 1647, 1460 cm⁻¹.

* **HRMS ESI** : m/z [MH]⁺ : 263,2117 ; calculé pour C₁₆H₂₇N₂O⁺ : 263,2123.

* **¹H RMN (400 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 5.48 (dd, J = 11.9, 3.0 Hz, 1H), 3.49 (tdd, J = 12.3, 4.8, 3.0 Hz, 1H), 3.18 – 3.04 (m, 2H), 2.40 (ddd, J = 17.1, 5.5, 3.5 Hz, 1H), 2.31

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella cernua*

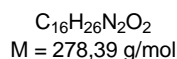
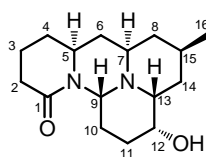
(ddd, $J = 17.1, 11.3, 5.5$ Hz, 1H), 2.01 – 1.85 (m, 3H), 1.84 – 1.56 (m, 7H), 1.56 – 1.39 (m, 3H), 1.39 – 1.18 (m, 2H), 1.05 (m, 1H), 0.90 (m, 1H), 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

* ^{13}C RMN (100 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 168.3, 77.0, 67.3, 57.6, 50.7, 46.3, 42.0, 41.2, 39.3, 33.1, 30.6, 25.3, 24.6, 22.4, 22.4, 20.1, 19.4.

attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	-				168.3
2a	2.31	1			33.1
2b	2.40	1	ddd	17.1 – 5.5 – 3.5 Hz	
3a	1.58	1	ddd	17.1 – 11.3 – 5.5 Hz	19.4
3b	1.79	1			
4a	1.46	1			30.6
4b	1.93	1			
5	3.49	1	tdd	12.3 – 4.8 – 3.0 Hz	50.7
6a	1.25	1			41.2
6b	1.55	1			
7	3.09	1			46.3
8a	0.90	1			42.0
8b	1.62	1			
9	5.48	1	dd	11.9 – 3.0 Hz	67.3
10a	1.22	1			20.1
10b	1.92	1			
11a	1.71	1			24.6
11b	1.88	1			
12a	1.04	1			22.4
12b	1.75	1			
13	3.12	1			57.6
14a	1.44	1			39.3
14b	1.50	1			
15	1.70	1			25.3
16	0.87	3	d	6.5 Hz	22.3

attribution	littérature	ré-isolement	littérature	ré-isolement
	MeOD	CDCl ₃	MeOD	CDCl ₃
	RMN ¹ H δ (ppm)		RMN ¹³ C δ (ppm)	
1	-	-	171.1	168.3
2a	2.35	2.31	33.7	33.1
2b	2.36	2.40		
3a	1.65	1.58	19.9	19.4
3b	1.82	1.79		
4a	1.48	1.46	31.2	30.6
4b	2.02	1.93		
5	3.64	3.49	52.1	50.7
6a	1.20	1.25	41.7	41.2
6b	1.73	1.55		
7	3.24	3.09	47.6	46.3
8a	0.81	0.90	42.5	42.0
8b	1.66	1.62		
9	5.44	5.48	68.7	67.3
10a	1.19	1.22	21.6	20.1
10b	2.12	1.92		
11a	1.66	1.71	25.6	24.6
11b	1.94	1.88		
12a	1.12	1.04	23.5	22.4
12b	1.89	1.75		
13	3.07	3.12	59.2	57.6
14a	1.40	1.44	40.0	39.3
14b	1.58	1.50		
15	1.79	1.70	26.3	25.3
16	0.89	0.87	22.6	22.3

➤ **Lycocernuine (45) :**



* Aspect : **cristaux blancs**

* **R_f** : 0,42 (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1)

* **IR (solide)** : ν_{max} = 3300, 2951, 2360, 1648, 1458, 1071 cm⁻¹.

* **HRMS ESI** : m/z [MH]⁺ : 279,2071 ; calculé pour C₁₆H₂₇N₂O₂⁺ : 279,2073.

* **¹H RMN (400 MHz, chloroforme-*d*)**, δ (ppm) : 5.46 (dd, *J* = 11.9, 2.5 Hz, 1H), 3.81 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.52 (dd, *J* = 8.3, 3.4 Hz, 1H), 2.96 (dt, *J* = 6.9, 1.6 Hz, 1H), 2.42 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.33 (q, *J* = 3.7 Hz, 1H), 2.30 (dd, *J* = 5.3, 2.5 Hz, 1H), 1.98 (ddd, *J* = 10.5, 5.3, 3.4 Hz, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.79 (ddd, *J* = 13.9, 4.2, 2.2 Hz, 1H),

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella cernua*

1.67 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.60 (t, $J = 2.9$ Hz, 1H), 1.51 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.23 (dd, $J = 4.7, 2.5$ Hz, 1H), 1.14 (m, 1H), 0.89 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H).

* ^{13}C RMN (100 MHz, chloroforme-*d*), δ (ppm) : 168.5, 70.7, 67.3, 58.6, 51.0, 49.1, 41.7, 38.0, 33.7, 33.1, 30.5, 26.3, 23.0, 19.3, 16.0.

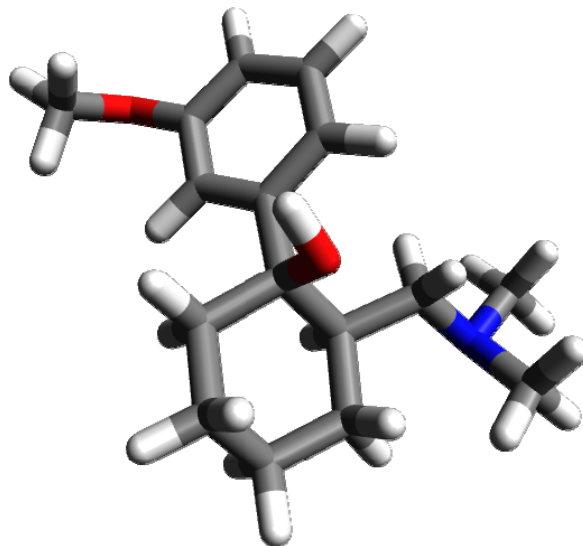
attribution	^1H δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	-	-	-	-	168.5
2a	2.36	1	<i>m</i>		33.7
2b	2.42	1	<i>m</i>		
3a	1.63	1	<i>m</i>		19.3
3b	1.85	1	<i>m</i>		
4a	1.47	1	<i>m</i>		30.5
4b	1.98	1	<i>ddd</i>	10.5 – 5.3 – 3.4 Hz	
5	3.52	1	<i>dd</i>	8.3 – 3.4 Hz	51.0
6a	1.14	1	<i>m</i>		41.7
6b	1.67	1	<i>m</i>		
7	3.55	1	<i>m</i>		49.1
8a	0.82	1	<i>d</i>	12.5 Hz	41.7
8b	1.60	1	<i>t</i>	2.9 Hz	
9	5.46	1	<i>dd</i>	11.9 – 2.5 Hz	67.3
10a	1.23	1	<i>dd</i>	4.7 – 2.5 Hz	16.0
10b	2.33	1	<i>q</i>		
11a	1.92	1	<i>m</i>		33.1
11b	2.30	1	<i>dd</i>	5.3 – 2.5 Hz	
12a	3.81	1	<i>d</i>	2.5 Hz	70.9
13	2.96	1	<i>dt</i>	6.9 – 1.6 Hz	58.6
14a	1.51	1	<i>m</i>		38.0
14b	1.79	1	<i>ddd</i>	13.9 – 4.2 – 2.2 Hz	
15	2.33	1	<i>q</i>	3.7 Hz	26.3
16	0.88	3	<i>d</i>	6.6 Hz	23.0

2- Étude phytochimique de *Lycopodiella cernua*

attribution	ré-isolement		littérature	
	MeOD	CDCl ₃	MeOD	CDCl ₃
	RMN ¹ H δ (ppm)		RMN ¹³ C δ (ppm)	
1	-	-	171.1	168.5
2a	2.35	2.36	33.7	33.7
2b	2.36	2.42		
3a	1.65	1.63	19.7	19.3
3b	1.80	1.85		
4a	1.50	1.47	31.10	30.5
4b	2.04	1.98		
5	3.67	3.52	52.5	51.0
6a	1.16	1.14		41.7
6b	1.72	1.67	41.8	
7	3.76	3.55	51.5	49.1
8a	0.84	0.82	42.0	41.7
8b	1.70	1.60		
9	5.47	5.46	68.7	67.3
10a	1.21	1.23	17.7	16.0
10b	2.42	2.33		
11a	1.90	1.92	33.7	33.1
11b	2.39	2.30		
12a	3.78	3.81	70.3	70.9
13	2.97	2.96	60.6	58.6
14a	1.40	1.51	38.6	38.0
14b	1.79	1.79		
15	2.45	2.33	26.7	26.3
16	0.88	0.88	23.0	23.0

3

Questions à propos du « tramadol naturel »



Introduction générale.....	99
Partie 1 : Étude bibliographique	101
1.1. Le tramadol.....	101
1.2. La saga du « tramadol naturel ».....	102
1.2.1. La découverte du tramadol dans les racines du pêcher d’Afrique	102
1.2.2. Rebondissement en 2014 : de « simples » contaminations ?	104
1.2.3. 2015 : Le « tramadol naturel » vit toujours.....	105
1.3. La voie de biosynthèse proposée pour le tramadol.....	106
1.3.1. Une origine mixte proposée	106
1.3.2. Les questions qui se posent	108
1.3.3. Synthèse « biométique » du tramadol	108
Partie 2 : Une approche « totalement biomimétique » du « tramadol naturel ».....	110
Partie 3 : Conclusion et perspectives.....	115
Partie 4 : Partie expérimentale	116

Introduction générale

Peu de « découvertes » scientifiques dans le domaine des substances naturelles auront suscité autant d'intérêt... et de polémiques que la publication en 2013 de l'isolement de tramadol (1, figure 1) à partir d'une plante africaine utilisée en médecine traditionnelle : le pêcher africain, *Nauclea latifolia* Sm. (Rubiaceae). L'information est vite reprise par l'ensemble de la presse scientifique mais aussi les grands médias d'information. Une année après, une autre publication met à mal l'hypothèse en démontrant clairement des problèmes de contaminations des sols et l'accumulation du principe actif dans la plante. De multiples questions se posent avec cette découverte du « tramadol naturel » et devraient inciter les chimistes des substances naturelles à la plus grande des prudenances : quelle est la pertinence chimiotaxonomique d'une telle affirmation ? quelle est la voie de biosynthèse du tramadol à ce moment –là ? est-elle rationnelle ? Nous nous sommes penchés sur la question, intrigués par les hypothèses de biosynthèse proposées par les auteurs : nos premiers résultats d'une approche bio-inspirée originale seront présentés dans ce chapitre (figure 2).

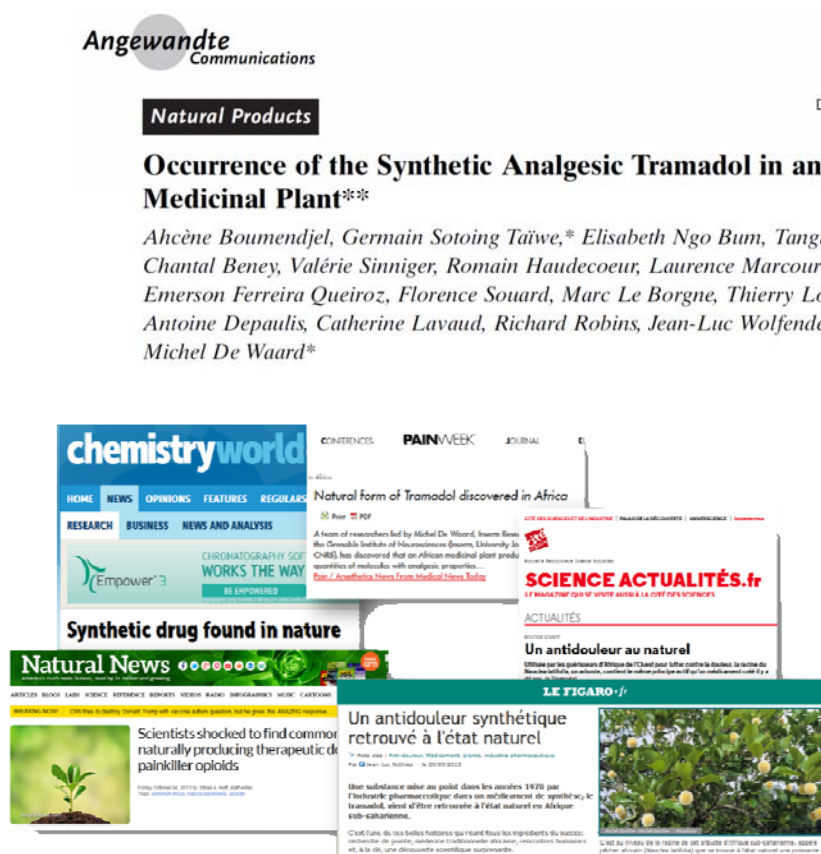


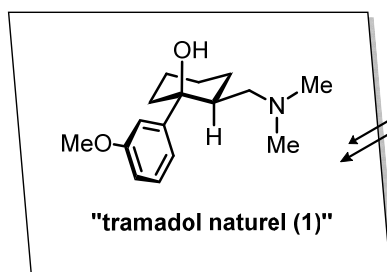
Figure 1 : Découverte du « tramadol naturel ».

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

Organisation générale du chapitre 3

partie bibliographique

analyse critique des travaux autour de la découverte



travail personnel

approche biomimétique "multicomposant"

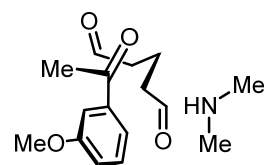


Figure 2.

Partie 1 : Étude bibliographique

1.1. Le tramadol

■ Le tramadol (**1**, figure 3) est commercialisé dans plus de 80 pays, c'est un antalgique opiacé de synthèse (palier 2) largement utilisé à travers le monde pour le traitement des douleurs modérées à intenses de l'adulte et ce malgré un profil d'effets indésirables peu favorable (dépendance, sevrage, utilisation détournée à des fins de toxicomanie en particulier au Moyen Orient, allergie, troubles psychiatriques, hypoglycémie, hyponatrémie...).¹ Il figure depuis 2011 sur la liste des principes actifs sous surveillance par l'ANSM. Le tramadol, tel qu'il est utilisé en thérapeutique, est racémique, nous verrons l'importance de cette donnée par la suite.

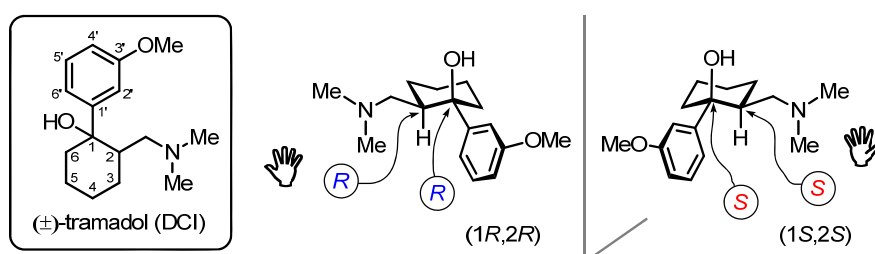


Figure 3 : structure du *cis*-tramadol, structure des deux énantiomères.

■ La voie de synthèse industrielle telle qu'on peut la comprendre à travers la consultation de brevets² semble faire appel à une stratégie en deux temps (schéma 1) : une réaction de Mannich entre le formaldéhyde, la cyclohexanone et la diméthylamine puis une addition d'un organomagnésien mixte sur le produit de la réaction précédente conduisant au *cis*-tramadol accompagné de *circa* 20 % du diastéréoisomère *trans*-tramadol.³

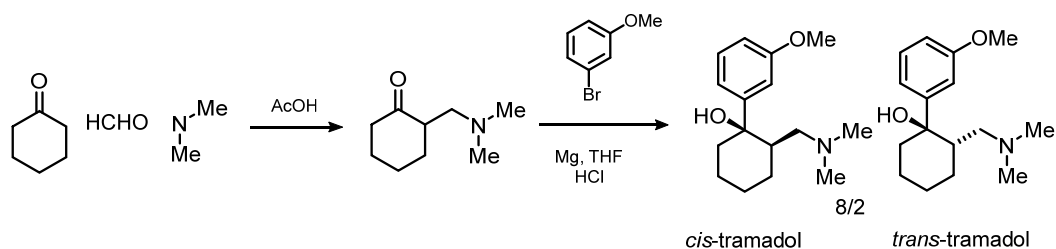


Schéma 1 : Synthèse industrielle du tramadol.

¹ Voir par exemple les nombreuses mises en garde de La Revue Prescrire (*inter alia* : La Revue Prescrire **2015**, 35, 665).

² K. Flick, E. Frankus, *U.S. Patent* 3652589, **1972** ; N. Angelo, S. Helmut, WO 1999003820 A1, **1999**.

³ Notons au passage qu'il aurait été intéressant de soumettre ce type d'intermédiaire à l'analyse des ratios isotopiques qui sera évoquée plus loin.

1.2. La saga du « tramadol naturel »⁴

1.2.1. La découverte du tramadol dans les racines du pêcher d'Afrique

■ Contexte et découverte.

C'est une des publications scientifiques les plus retentissantes de l'année 2013,⁵ dépassant de loin le monde de la chimie des substances naturelles. C'est à la faculté de pharmacie de Grenoble qu'est faite la découverte. Dans le cadre de l'étude des plantes médicinales employées traditionnellement au nord du Cameroun, les chercheurs s'intéressent à une espèce indiquée dans le traitement des douleurs (mais aussi de la fièvre ou encore des convulsions chez l'enfant). Il s'agit de *Nauclea latifolia* Sm. (Rubiaceae), dont les écorces sont consommées en décoction. La plante semble un bon candidat à la recherche de nouveaux principes actifs médicamenteux. C'est une Rubiaceae, famille caractérisée par la présence d'alcaloïdes indolomonoterpéniques tels que le nacléamide C (**2**, figure 4) ou le nacléamide E (**3**).⁶ Beaucoup de représentants de ce vaste groupe présentent un intérêt thérapeutique, mais tendent à être retirés du marché en raison de marges thérapeutiques étroites. Ces alcaloïdes, molécules hydrosolubles, déjà identifiées dans l'espèce, sont susceptibles de justifier ses emplois traditionnels.

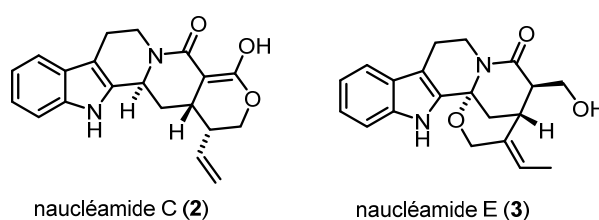


Figure 4 : Exemples de structures précédemment isolées de *N. latifolia*.

Le travail expérimental est entrepris : le caractère prometteur de *N. latifolia* se voit confirmé par la forte activité de l'extrait méthanolique d'écorces dans un modèle de douleur chez le Rat. La purification des molécules responsables, par un fractionnement bioguidé, mène à un composé très actif dont l'évaluation pharmacologique indique une activité centrale, antagonisée par la naloxone : les chercheurs sont en présence d'un agoniste opioïde, comme la morphine.⁷ Les indolomonoterpènes présentent souvent une activité marquée sur le système

⁴ Nous remercions tout particulièrement le Pr Pierre Champy pour son aide à la rédaction de cette partie.

⁵ A. Boumendjel, G. Sotoing Taïwe, E. Ngo Bum, T. Chabrol, C. Beney, V. Sinniger, R. Haudecoeur, L. Marcourt, S. Challal, E. Ferreira Queiroz, F. Souard, M. Le Borgne, T. Lomberget, A. Depaulis, C. Lavaud, R. Robins, J.-L. Wolfender, B. Bonaz, M. De Waard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11780–11784.

⁶ qui sont également l'apanage de taxons proches : les Loganiaceae (*Strychnos*, etc.) et les Apocynaceae (*Vinca* spp., *Catharanthus* spp., etc.), voir : H. Shigemori, T. Kagata, H. Ishiyama, F. Morah, A. Ohsaki, J. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **2003**, *51*, 58–61.

⁷ Alcaloïde isoquinoléique de Papaveraceae (Ranunculales) très différent des alcaloïdes de Rubiaceae (Gentianales).

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

nerveux central⁸ mais peu sont connus pour avoir une affinité importante pour des récepteurs opioïdes.⁹ Est-on en présence d'un nouveau représentant de cette classe moléculaire ? L'analyse spectroscopique du composé obtenu et sa détermination structurale s'avèrent pleines de surprises : on est en présence du tramadol qui apparaît ici « redécouvert » par la médecine traditionnelle et la pharmacognosie.

L'origine naturelle de ce tramadol issu d'une écorce a évidemment été mise à l'épreuve par l'équipe. Sa structure n'est en rien évocatrice des voies usuelles de biosynthèse chez le végétal – et encore moins chez les Rubiaceae : les spécialistes de chimiotaxonomie sont au mieux stupéfaits.

■ Caractéristique chimique du « tramadol naturel »

Comme le tramadol synthétique, le produit obtenu ne dévie pas la lumière polarisée, ce qui est rare pour une molécule naturelle. L'analyse cristallographique révèle que cette inactivité optique est liée à la présence des deux molécules énantiomères en proportions égales (figure 3). Il est exceptionnel que le vivant fabrique de tels mélanges racémiques. Par contre le phénomène de racémisation spontanée est parfois observé.¹⁰ Les chercheurs ont purifié chacun des énantiomères afin d'évaluer ce phénomène, sans parvenir à le provoquer (aucun des carbones stéréogènes n'étant a priori épimérisable facilement), suggérant une biosynthèse racémique, potentiellement non enzymatique.

Une analyse isotopique (ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) a donné des résultats ambigus, n'infirant pas l'origine naturelle du tramadol obtenu, par rapport à des échantillons commerciaux de la molécule. Afin d'exclure une contamination sur la surface de la plante, un extrait de bois de cœur a été analysé, confirmant la présence de la molécule. D'autres échantillons de l'espèce ont ensuite été récoltés de manière indépendante et étudiés dans trois laboratoires différents suivant un protocole identique : toutes les analyses se sont avérées positives. *Nauclea latifolia* apparaissait donc comme une assez bonne source (0,4 % *m/m*) d'un tramadol naturel, racémique, issu d'opérations biosynthétiques inconnues. Les perspectives relatives à la prise en charge de la douleur dans des aires à faible accès aux soins apparaissaient comme particulièrement prometteuses. L'examen des autres espèces du genre était envisagé par les auteurs.

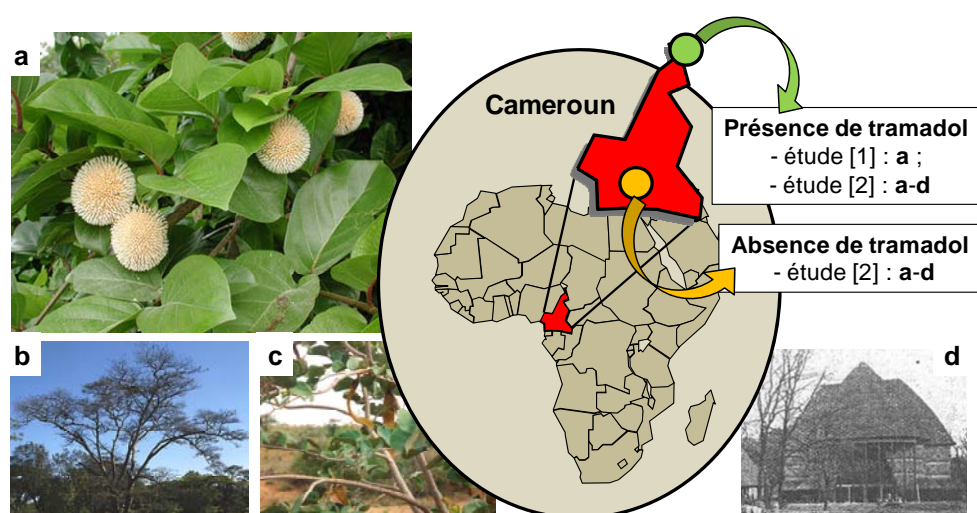
⁸ La réserpine ou l'ibogaïne, par exemple.

⁹ Par exemple la myraginine du kratom, *Myragina speciosa*, une autre Rubiaceae ou l'akuamine isolée de *Picralima nitida* : G. Lewin, P. Le Ménez, Y. Rolland, A. Renouard, E. Griesen-Crousse, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 380–384.

¹⁰ Par exemple l'atropine, mélange d'énantiomères issu de l'hyoscyamine, formée lors du séchage des Solanaceae mydriatiques (belladones, jusquiames...) ou l'akuammicine connue pour se racémiser : A. I. Scott, C. L. Yeh, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2273–2274.

1.2.2. Rebondissement en 2014 : de « simples » contaminations ?

Suite à la publication de ce travail, un laboratoire académique allemand s'est également intéressé au *Nauclea latifolia* camerounais, retrouvant bien la molécule dans des écorces récoltées au nord du pays (figure 5).¹¹ Mieux, au cours de l'analyse, trois analogues ont été détectés, identiques aux principaux métabolites du tramadol chez les mammifères (4, 5, 6, figure 6). Par contre, aucune de ces molécules n'a pu être retrouvée dans des écorces récoltées au sud du pays. L'équipe a émis l'hypothèse d'une production par des bactéries ou des champignons endophytes (*i.e.* ayant le végétal pour hôte), qui pourrait justifier cette différence de composition chimique relative à la distribution géographique.¹² La mise en culture de populations de micro-organismes issus de différents échantillons de *N. latifolia* n'a pas permis la mise en évidence du composé. Afin de réévaluer l'hypothèse d'une contamination d'origine humaine avec du tramadol synthétique, plusieurs campagnes de collecte d'éléments de l'environnement ont été réalisées, au nord et au sud du Cameroun. Pour le nord, l'analyse a indiqué la présence du tramadol et de ses métabolites dans des échantillons de sol, d'eau de puits (35 à 550 ng/L), ainsi que dans cinq autres arbres sans rapport taxonomique avec *N. latifolia* (*Acacia polyacantha*, *Acacia sieberiana*, *Andira inermis*, *Piliostigma reticulatum*, *Ficus sycomorus* ; 10 à 50 ng/g). Par contre, aucun des échantillons du Sud n'a révélé la présence de tramadol (figure 5).



¹¹ S. Kusari, S. J. Tatsimo, S. Zühlke, F. M. Talonsi, S. F. Kouam, M. Spiteller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12073–12076.

¹² De plus, une origine microbienne semble plus compatible avec la structure de la molécule et avec les données chimiotaxonomiques que l'origine végétale.

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

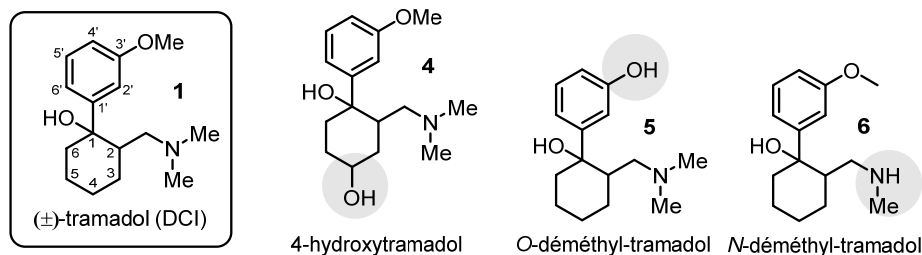


Figure 6 : Métabolites principaux du tramadol... retrouvés dans les échantillons de *N. latifolia*.

Une enquête auprès des habitants des zones de collecte a mis en évidence, au nord, la vente importante de tramadol sur les marchés. Le médicament apparaît couramment consommé à forte dose, notamment le matin avec le thé, afin de mieux supporter la journée de travail. De plus, les comprimés sont largement administrés aux chevaux avant les courses hippiques et surtout aux bovins, dans le cadre des travaux aux champs et des longs trajets. Ces animaux privilégient l'ombre des arbres, où leurs rejets sont a priori plus abondants et susceptibles d'engendrer une contamination importante, notamment par voie racinaire. Au Sud, par contre, les éleveurs ne connaissent pas l'emploi du tramadol.

1.2.3. 2015 : Le « tramadol naturel » vit toujours...

Une troisième étude par une partie des premiers auteurs est publiée en 2015 (figure 7):¹³ elle propose une étude de répartition isotopique intramoléculaire, menée sur un échantillon isolé de *N. latifolia*. Une potentielle voie de biosynthèse dans le vivant peut être confortée par une analyse « rétrobiosynthétique » combinée à une évaluation du fractionnement isotopique naturel par RMN ¹³C (*isotope ratio monitoring by ¹³C NMR* : irm-¹³CNMR), technique sensible qui permet de quantifier les différences de teneurs isotopiques (ici le ratio ¹³C/¹²C) sur chacun des atomes d'une molécule et donc de mesurer le fractionnement isotopique naturel spécifique correspondant à chaque atome de la molécule et de les corréler avec les mêmes analyses sur des structures à biosynthèse connue.¹⁴ L'étude est complétée par une mesure des ratios ¹⁸O/¹⁶O mesurés par spectrométrie de masse. Nous ne ferons pas une analyse détaillée de cette publication ici, elle vise essentiellement à montrer l'intérêt de la méthode et à essayer d'apporter des éléments venant conforter la voie de biosynthèse proposée et qui sera, elle, détaillée ci-dessous. Les auteurs concluent à la validité de leur hypothèse de biosynthèse au regard des résultats des motifs isotopiques appréciés par les deux techniques (RMN et spectrométrie de masse). Certains ne manqueront pas de critiquer ces résultats « auxquels on fait dire ce que l'on veut », une analyse manque cruellement pour

¹³ a) K. M. Romek, P. Nun, G. S. Remaud, V. Silvestre, G. Sotoing Taiwe, F. Lecerf-Schmidt, A. Boumendjel, M. De Waard, R. J. Robins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 8296–8301 ; b) S. Kusari, S. J. N. Tatsimo, S. Zühlke, M. Spiteller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 240–243.

¹⁴ La technique sert aujourd'hui à confirmer l'authenticité de certains produits en agro-alimentaire (vins, sirop d'érable, miels...)

donner, peut-être, une réponse claire : une analyse au ^{14}C qui seule pourrait révéler si le « tramadol naturel » provient de voies de biosynthèse contemporaines ou de la chimie du pétrole.



A retro-biosynthetic approach to the prediction of biosynthetic pathways from position-specific isotope analysis as shown for tramadol

Katarzyna M. Romek^{a,b}, Pierrick Nun^a, Gérald S. Remaud^a, Virginie Silvestre^a, Germain Sotoing Taiwe^c, Florine Lecerf-Schmidt^d, Ahcène Boumendjel^d, Michel De Waard^{e,f}, and Richard J. Robins^{a,1}

^aElucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, Interdisciplinary Chemistry: Synthesis, Analysis, Modeling, CNRS–University of Nantes Unité Mixte de Recherche 6230, F-44322 Nantes, France; ^bLaboratory for Isotope Effects Studies, Department of Chemistry, Institute of Applied Radiation Chemistry, Lodz University of Technology, 90-924 Lodz, Poland; ^cDepartment of Zoology and Animal Physiology, University of Buea, Buea, Cameroon; ^dDepartment of Medicinal Chemistry, University Grenoble Alpes–CNRS Unité Mixte de Recherche 5063, F-38041 Grenoble, France; ^eGrenoble Institute of Neuroscience, Unit Inserm U836, F-38700 La Tronche, France; and ^fUniversity Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France

Tramadol, previously only known as a synthetic analgesic, has now been found in the bark and wood of roots of the African medicinal tree *Nauclea latifolia*. At present, no direct evidence is available as to the biosynthetic pathway of its unusual skeleton. To provide guidance as to possible biosynthetic precursors, we have adopted a novel approach of retro-biosynthesis based on the position-specific distribution of isotopes in the extracted compound. Relatively recent developments in isotope ratio monitoring by ^{13}C NMR spectrometry make possible the measurement of the nonstatistical position-specific natural abundance distribution of ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) within the molecule with better than 1‰ precision. Very substantial variation in the ^{13}C positional distribution is found: between $\delta^{13}\text{C}_i = -11$ and -53% . Distribution is not random and it is argued that the pattern observed can substantially be interpreted in relation to known causes of isotope fractionation in natural products. Thus, a plausible biosynthetic scheme based on sound biosynthetic principals of precursor-substrate relationships can be proposed. In addition, data obtained from the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios in the oxygen atoms of the compound add support to the deductions made from the carbon isotope analysis. This paper shows how the use of ^{13}C NMR at natural abundance can help with proposing a biosynthetic route to compounds newly found in nature or those difficult to tackle by conventional means.

Significance

The extraction of tramadol from the roots of *Nauclea latifolia* excited great interest worldwide. This was the first time that a widely marketed synthetic drug was found as an apparently natural product at high abundance. In this article, we describe the position-specific distribution of ^{13}C in this tramadol. As a conventional approach to study its probable biosynthetic precursors, enzymatic steps, and intermediate metabolites is not currently feasible, we herein propose the concept of a retro-biosynthesis by examining the position-specific isotope distribution within the molecule and rationally interpreting the data in terms of known plant biochemical processes that may be involved in a biosynthesis of tramadol. Thus, clear guidance is given for future labeling studies.

Figure 7.

1.3. La voie de biosynthèse proposée pour le tramadol

1.3.1. Une origine mixte proposée

La voie de biosynthèse proposée est singulière, sans logique chimiotaxonomique évidente, et fait appel au métabolisme de la L-lysine interconnecté avec le métabolisme de l'acide shikimique, le tout dans une voie de biosynthèse n'assurant pas de contrôle de la chiralité puisque le « tramadol naturel » est racémique.

Les auteurs proposent donc une voie de biosynthèse mixte pour le tramadol.¹³ La partie cyclohexanique serait issue pour partie du métabolisme de la lysine cependant que deux des carbones seraient apporter par une unité en $\text{C}_6\text{-C}_2$ issue de la voie shikimique et apportant aussi par conséquent le cycle aromatique (schéma 2).

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

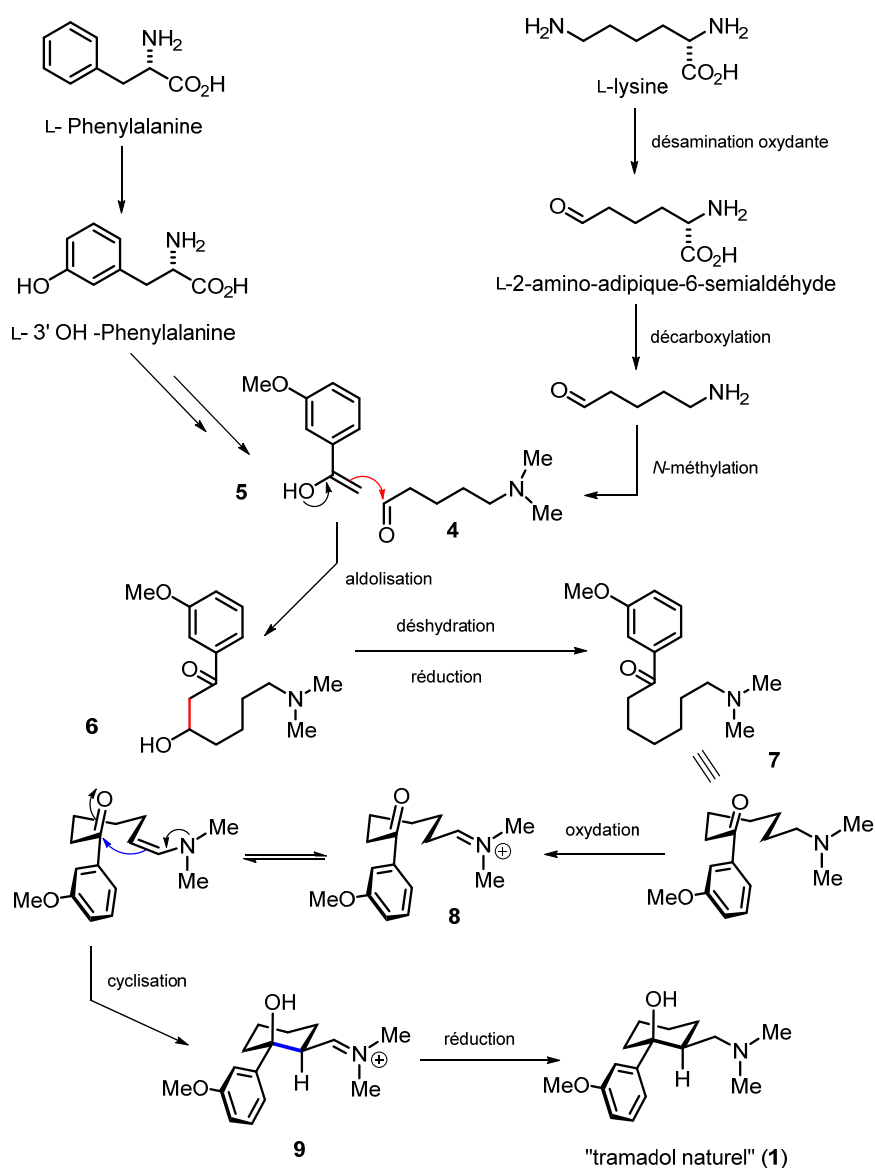


Schéma 2 : Biosynthèse proposée pour le « tramadol naturel »

La voie classique de modification de la L-lysine conduirait au l'aminopentanal qui serait diméthylé sur sa fonction amine primaire (peu fréquent) pour conduire à 4.

Une hydroxylation de la L-phénylalanine en position *meta* aurait lieu (c'est cependant rare dans la nature) puis un raccourcissement de la chaîne en C₆-C₃ pour conduire à l'acétophénone 5 (C₆-C₂). C'est alors que cette dernière se condenserait sur le diméthylaminopentanal 4 par aldolisation : la fonction alcool secondaire résultante de 6 serait éliminée par une séquence déshydratation/réduction pour conduire au précurseur fondamental 7. Après une oxydation conduisant à un iminium 8, le jeu des équilibres iminium/enamine expliquerait la cyclisation. Une fonction iminium résiduelle doit être réduite sur l'intermédiaire 9 pour expliquer la biosynthèse du « tramadol naturel ».

1.3.2. Les questions qui se posent

Les éléments les plus troublants sont résumés ici :

- la substance « naturelle » est racémique ;
- un motif cyclohexanol peu fréquent ;
- un cycle aromatique *meta* substitué peu fréquent dans la voie de l'acide shikimique
- des liaisons d'interconnexion des deux types de métabolisme également peu fréquentes dans la nature ;
- un motif CH₂N(Me)₂ également rare dans la nature ;

■ cette « substance naturelle » renfermerait donc un *concentré d'originalité* structurale et géométrique peu orthodoxe et raisonnable si on considère le principe de cohérence du métabolome.

1.3.3. Synthèse « biomimétique » du tramadol

Au cours de nos travaux, nous avons eu connaissance d'une synthèse du tramadol par une des équipes partenaires de la première étude.¹⁵ Cette étude vient d'être publiée en 2015 (schéma 3).¹⁶ C'est un équivalent biomimétique **10** de l'intermédiaire **8** que les auteurs ont ciblé et ont synthétisé en 4 étapes à partir de produits disponibles dans le commerce. Mis en présence de diméthylamine dans des conditions réductrices (pour assurer la réduction de l'iminium final **9** qui doit être généré dans le milieu), le tramadol a pu être obtenu sous forme d'un mélange (7/3) des isomères *cis* et *trans* avec un rendement de l'ordre de 10 % après purification par CLHP. Les composés **11**, **12** et **13** ont également été isolés et caractérisés de la réaction, ils témoignent du faible niveau de contrôle de la chimiosélectivité lors de l'étape « biomimétique » clef.

¹⁵ Communication orale d'Ahcène Boumendjel, École d'été SubNat 2014, Aussois, Juin 2014.

¹⁶ F. Lecerf-Schmidt, R. Haudecoeur, B. Peres, M. M. Ferreira Queiroz, L. Marcourt, S. Challal, E. Ferreira Queiroz, G. Sotoing Taiwe, T. Lomberget, M. Le Borgne, J.-L. Wolfender, M. De Waard, R. J. Robins, A. Boumendjel, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 14451–14453.



Cite this: *Chem. Commun.*, 2015, 51, 14451

Received 17th July 2015,
Accepted 5th August 2015

DOI: 10.1039/c5cc05948h

Biomimetic synthesis of Tramadol†

Florine Lecerf-Schmidt,^{a,b} Romain Haudecoeur,^{a,b} Basile Peres,^{a,b}
Marcos Marçal Ferreira Queiroz,^c Laurence Marcourt,^c Soura Challal,^c
Emerson Ferreira Queiroz,^c Germain Sotoing Taiwe,^d Thierry Lomberget,^e
Marc Le Borgne,^e Jean-Luc Wolfender,^c Michel De Waard,^f Richard J. Robins^g and
Ahcène Boumendjel^{a,b}

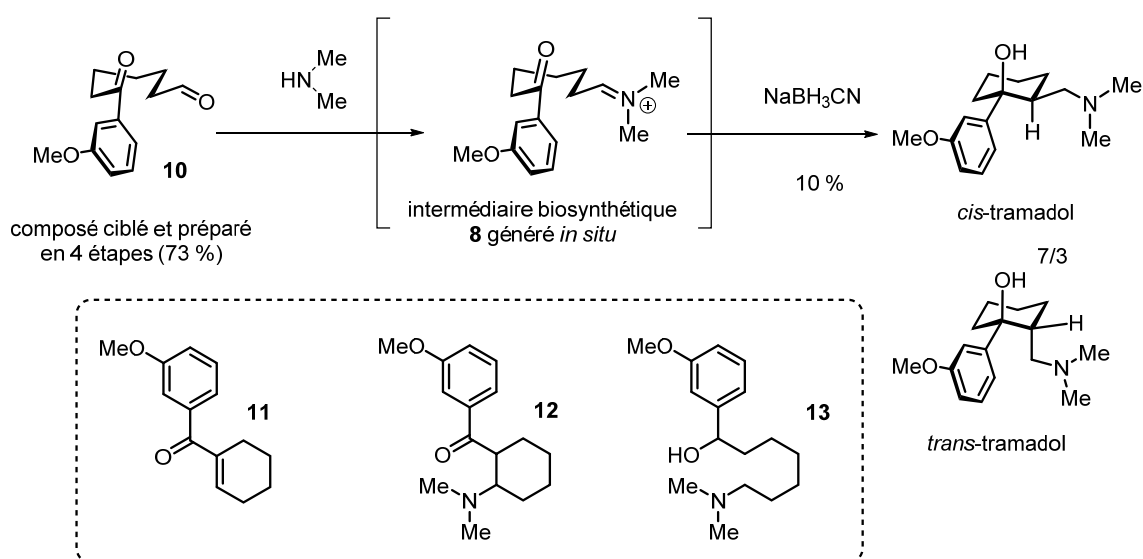


Schéma 3 : synthèse « biomimétique » du « tramadol naturel »

Partie 2 : Une approche « totalement biomimétique » du « tramadol naturel »

■ Ambitions de nos travaux.

L'expertise du laboratoire dans la manipulation des unités en C₅ présumées dérivées de la lysine dans la nature a conduit dans les dernières années à la synthèse « totalement biomimétique » de plusieurs alcaloïdes polycycliques. En effet, dans une stratégie dénommée au laboratoire « chimie des mélanges biomimétiques complexes »,¹⁷ il a été montré que des structures telles que la nitraramine,¹⁸ la nitrarine¹⁹ et également la tangutorine²⁰ et le cœur central de l'halichonadine L²¹ pouvaient se former avec un degré de spontanéité important (schéma 4). Ce dernier est tel que le simple mélange de précurseurs réactifs pouvait conduire directement aux substances naturelles (nitraramine, nitrarine) ou à des précurseurs avancés (dans le cas de la tangutorine). Nous avons pensé qu'une stratégie similaire bio-inspirée par les propositions de biosynthèse du « tramadol naturel » pourraient permettre de cerner la réactivité intrinsèque des précurseurs proposés par les auteurs voire d'apporter des éléments supplémentaires sur la plausibilité (bien mince) de l'existence du tramadol à l'état naturel.

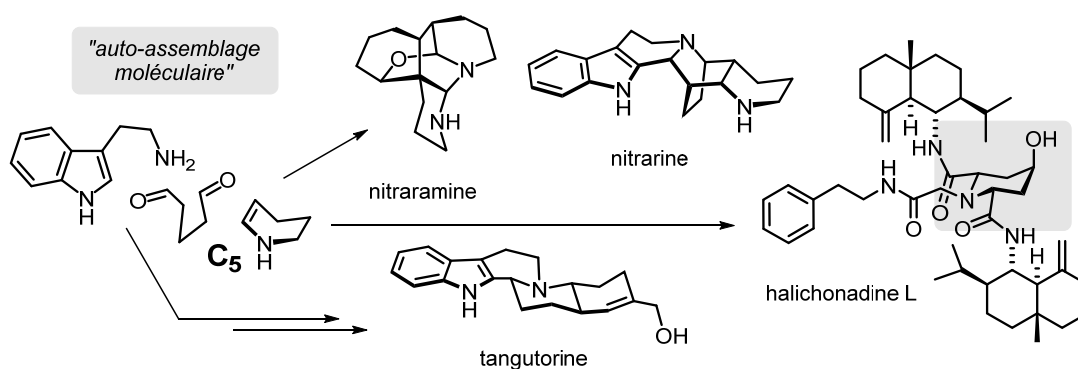


Schéma 4 : Synthèse « biomimétique » du « tramadol naturel ».

■ Analyse rétro(bio)synthétique et choix des réactifs

¹⁷ E. Poupon, E. Gravel, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10604–10615.

¹⁸ a) E. Gravel, E. Poupon, R. Hocquemiller, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2497–2499 ; b) E. Gravel, E. Poupon, R. Hocquemiller, *Tetrahedron, Symposium in Print* 2006, *62*, 5248–5253.

¹⁹ E. Gravel, A. Harfouche, R. Salame, K. Leblanc, A. Maciuk, E. Poupon, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14515–14519.

²⁰ R. Salame, E. Gravel, K. Leblanc, E. Poupon, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1891–1894.

²¹ F. Senejoux, L. Evanno, E. Poupon, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 453–455.

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

Notre analyse s'est basée essentiellement sur les hypothèses de biosynthèses telles qu'elles ont été exposées précédemment (schéma 2). Notre choix s'est porté sur le glutaraldéhyde, un dialdéhyde en C₅, comme équivalent biomimétique des 5 carbones apportés par la L-lysine dans la voie de biosynthèse (schéma 5).²² Logiquement, l'acétophénone **5** a été également sélectionnée ainsi que la diméthylamine pour les engager dans une véritable réaction à composants multiples (« 3-MCR » *type 3 multicomponent reaction*). La séquence pour assembler de manière « biomimétique » le « tramadol naturel » nécessite : *i*) une aldolisation/crotonisation entre l'acétophénone et le glutaraldéhyde ; *ii*) une réduction de la double liaison formée ; *iii*) une cyclisation par aldolisation intramoléculaire ; *iv*) une amination réductrice avec la diméthylamine. Pour gérer convenablement les états d'oxydation du système, un réducteur doit être ajouté au milieu.

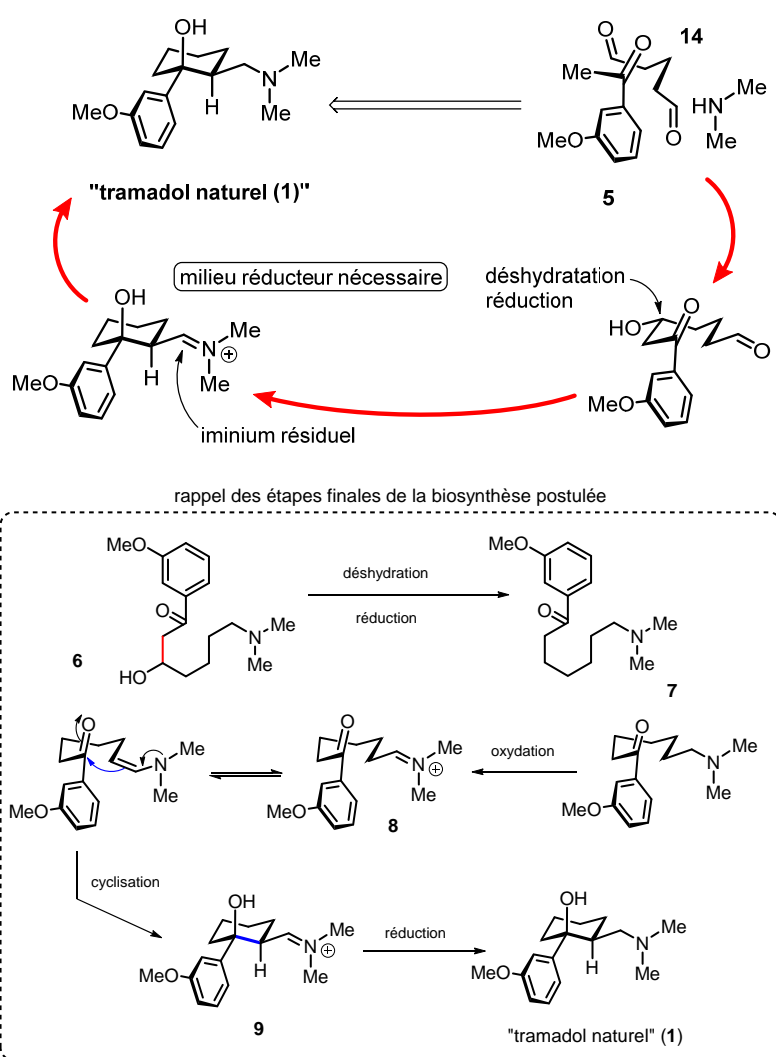


Schéma 5 : Conception des mélanges biomimétiques et rappels des hypothèses de biosynthèse.

²² R. Salame, E. Gravel, P. Retailleau, E. Poupon, *Org. Bioorg. Chem.* **2010**, 8, 2522–2528.

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

■ La démarche expérimentale est une approche muticomposant de « *chimie des mélanges biomimétiques complexes* » que nous-mêmes qualifions volontiers de manière ironique de « *soupes infâmes* ». Plus le nombre d'entités réactives et de réactifs additionnels sont ajoutés au milieu, plus les mélanges évoluent de manière divergente et complexifie le système. La cible au cours de ce travail est le tramadol nécessitant obligatoirement trois unités réactives (glutaraldéhyde, méthoxy-acétophénone, diméthylamine) et deux étapes de réduction. En amont, il a fallu planifier le mélange et sélectionner un réducteur unique pour ne pas trop « *pimenter la soupe* ». L'hydrogénation a été choisie comme méthode de réduction pour à la fois hydrogéner la double liaison issue de la première aldolisation mais régalement assurer l'amination réductrice à la fin de la cascade réactionnelle.

Différents mélanges des unités choisies ont été réalisés dans différentes conditions expérimentales (tableau 1, entrées 1 à 9). Les mélanges bruts réactionnels ont ensuite été soumis à une analyse par CLHP couplée à la spectrométrie de masse.

En première approximation pour juger de la diversité de nos mélanges, nous nous sommes focalisés sur les pics de chromatogramme ayant intégré une unité acétophénone (c'est-à-dire les pics absorbant dans l'UV sur les chromatogrammes). Les résultats ne se sont pas avérés très concluants, le précurseur **5** apparaissant comme le produit majoritaire de la plupart des réactions menées sous atmosphère d'hydrogène en présence de palladium sur charbon. Par contre, en utilisant une atmosphère d'hydrogène, de l'oxyde de platine et de l'acide acétique comme solvant de réaction, une évolution très significative du mélange réactionnel a été observée. Ce résultat semble logique, puisque l'acide acétique favorise les équilibres cétonolique et imine/énamine indispensables à la cascade réactionnelle. Des pics de hautes masses moléculaire ayant incorporé deux acétophénones, deux glutaraldéhyde et mono-azotés ont été observés. De plus, un pic de masse visiblement intéressante (262,1804) a été repéré minoritairement sur un des chromatogrammes correspondant à des conditions expérimentales de type entrée 8.

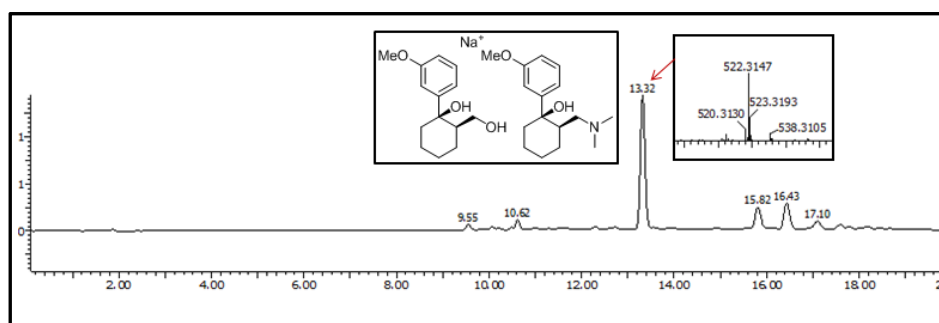
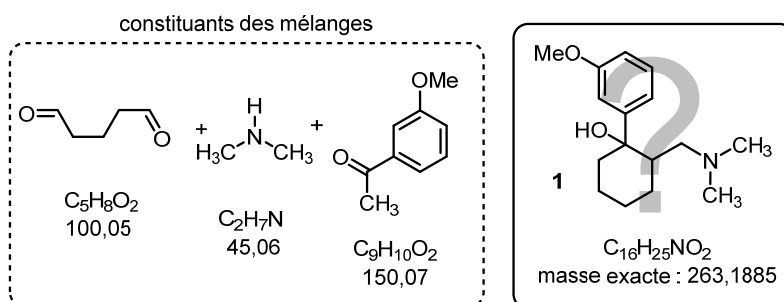


Figure 2 : Chromatogramme CLHP ; conditions tableau 1, entrée 8 (XBridge C18, 2,1x150 mm ; eau / acétonitrile 5 % à 100 % en 20 mn + 0,2 % acide formique ; UV 250 nm) ; structure indicative de stœchiométrie postulée

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

Tableau 1 : conditions des mélanges biomimétiques à 3 composants



Entrée	solvant	température	réduction	durée
1	AcOEt	t.a.	H ₂ /Pd/C	1 jour
2	AcOH	t.a.	H ₂ /PtO ₂	1 jour
3	AcOEt	50 °C	H ₂ /Pd/C	1 jour
4	AcOEt	33 °C	H ₂ /Pd/C	4 jours
5	AcOEt	35 °C	H ₂ /Pd/C	4 jours
6	AcOEt	35 °C	H ₂ /Pd/C	3 jours
7	AcOH	ta	H ₂ /PtO ₂	5 jours
8	AcOH	ta	H ₂ /PtO ₂	5 jours
9	AcOH	40 °C	-	5 jours

Glutaraldéhyde (10 éq.) ; diméthylamine (10 éq.).

■ Cette réaction a été sélectionnée et répétée à l'échelle du gramme avec (entrée 8) et sans agent réducteur (entrée 9) ce qui a conduit à des profils similaires en CLHP mais avec un taux de conversion plus important de la méthoxy-acétophénone. Toutefois, l'absence de réducteur nous laisse dubitatifs quant au degré d'oxydation des produits formés et pouvant être des intermédiaires importants à caractériser. Nous nous sommes attelés à la purification de quelques-uns des produits formés dans cette réaction « 3-MCR » originale. Ces études sont malheureusement encore en cours à l'heure de boucler la rédaction de ce manuscrit, des « problèmes » d'évaporation d'eau des échantillons ayant entraînés une mauvaise séparation des produits dans les conditions de CLHP préparative testées récemment. Les profils CLHP des fractions isolées (Figure 3) ne nous permettent pas à ce jour de rationaliser les structures des produits formés et les profils RMN se sont montrés très complexes. Les séparations se sont faites sur un mode de détections UV et des entités non-visibles en UV semblent

3- Questions à propos du « tramadol naturel »

présentent dans les fractions. De plus nous nous posons des questions si les produits isolés sont stables, et s'ils sont diastéréoisomériquement purs.

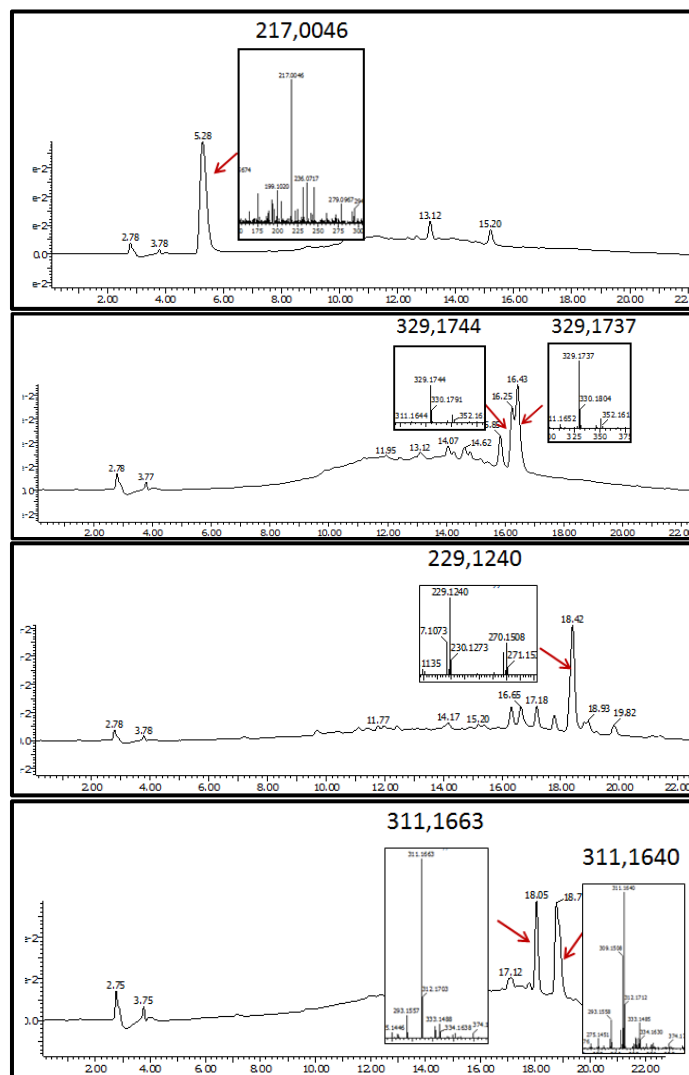
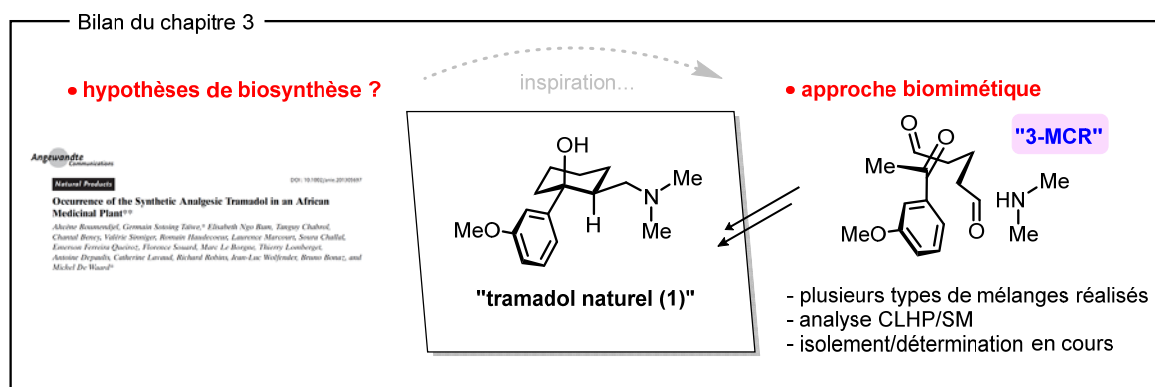


Figure 3 : Chromatogramme CLHP des fractions isolées; conditions tableau 1, entrée 8 (Sunfire C18, 2,1x150 mm ; eau / acétonitrile 5 % à 100 % en 20 mn + 0,2 % acide formique ; UV 250 nm) ; structure indicative de stœchiométrie postulée

Partie 3 : Conclusion et perspectives

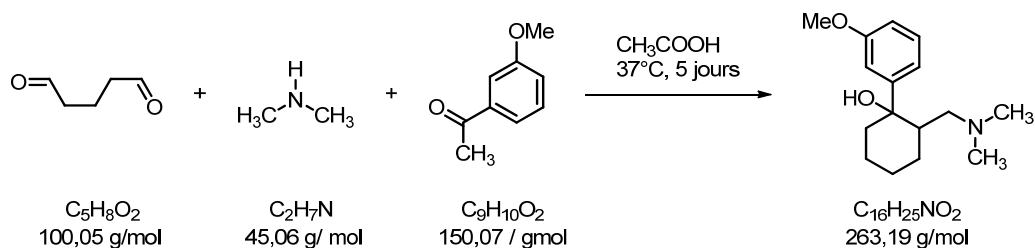
En prenant le prétexte de la saga de la découverte du « tramadol naturel », ce chapitre visait à évaluer la réactivité spontanée de trois partenaires d'une nouvelle association multicomposant originale directement inspirée des hypothèses de biosynthèse du « tramadol naturel ». Après une analyse critique de l'état de la littérature sur ce sujet médiatique, nous avons amorcé notre travail qui malheureusement n'a pas été mené aussi loin que nous aurions voulu. La thématique sera poursuivie notamment dans le cadre de nouveaux projets dédiés à l'étude de réactions bio-inspirées en milieux confinés.



Partie 4 : Partie expérimentale

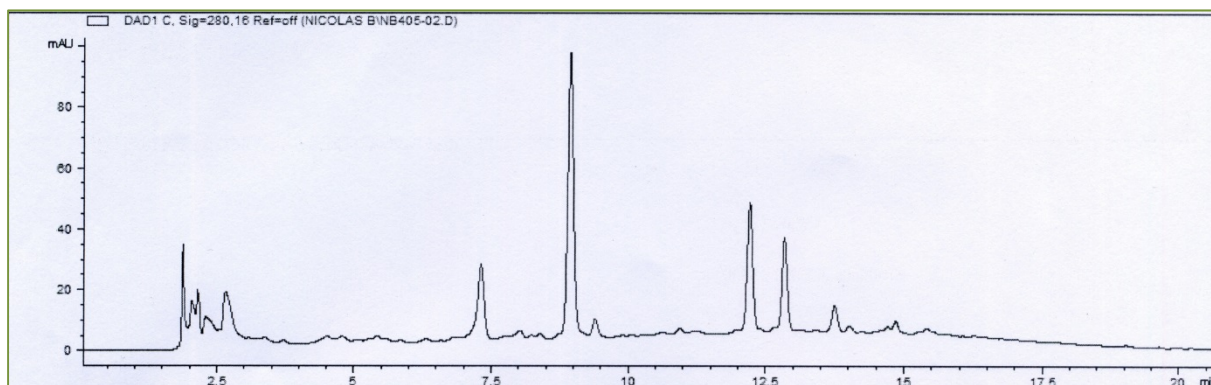
Protocoles généraux : voir chapitre 1

Protocole expérimentale (« 3-MCR » type 3 multicomponent reaction) :



Un mélange composé de 3- méthoxyacétophenone (900 µL, 6,66mmol, 1 éq.), d'une solution de glutaraldéhyde à 50 % dans l'eau (17,2 mL, 100 mmol, 15 éq.) d'une solution de diméthylamine à 33 % dans l'eau (13,5 mL, 66,6 mmol, 10 éq.) dans l'acide acétique (60 mL) est agitée à 37 °C pendant 5 jours. À l'issue de cette durée, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite afin d'éliminer l'eau, l'acide acétique et la diméthylamine.

Le résidu est purifié par CLHP préparative [colonne Xbridge[®] C18, 150 × 46 mm, 5 µm ; eau / méthanol 30 à 100 % en 20 min + 0,2 % acide formique; 42 mL/min ; R_T : 11,2 min] fournissant quatre fractions principales : F₁ (R_T : 7,46 min) :14.5 mg ; F₂ (R_T : 8,8 min) :19 mg, F₃ (R_T : 12,3 min) : 33 mg ; F₄ (R_T : 12,9 min) : 14 mg.



L'analyse des fractions et les purifications supplémentaires sont en cours.

4

Étude phytochimique de *Nitraria retusa* collectée en Égypte

La quatrième partie de ce travail de thèse est consacrée à une étude phytochimique d'une plante du genre *Nitraria*. Le genre *Nitraria* (Nitrariaceae) a constitué pendant dix ans une source d'inspiration au laboratoire pour la réalisation de travaux de synthèse biomimétique comme précédemment évoqué (partie 3). L'équipe était cependant assez frustré de ne jamais avoir pu « toucher » les plantes de ce genre pour les étudier. La mise en place d'une collaboration avec un laboratoire égyptien du Caire (National Research Center) a permis de pouvoir assurer un approvisionnement en *Nitraria retusa* Asch., plante qui de surcroit n'avait jamais été étudiée pour son contenu en alcaloïdes. Des échantillons de plante entière broyée et différents extraits d'échantillons collectés à différents endroits nous sont parvenus pour des études phytochimiques et de l'évaluation biologique. À notre grand regret, *Nitraria retusa* ne contient pas d'alcaloïdes tels que ceux décrits dans les autres espèces étudiés classiquement. Des alcaloïdes de types quinazolines ont pu être repérés par CLHP couplé à la spectrométrie de masse mais en trop faibles quantités pour une caractérisation, l'approvisionnement en échantillons est devenu alors très difficile pour des raisons politiques internes à l'Égypte. Cependant une molécule originale a pu être isolée pour la première fois dans la nature à partir des échantillons dont nous disposions.

La phytochimie des alcaloïdes de *Nitraria*, leur biosynthèse singulière par un métabolisme à part de la lysine ont été commentées à plusieurs reprises notamment par notre équipe¹ et le lecteur intéressé se reportera à ces publications et articles de revue. Ce chapitre est donc constitué du manuscrit de la publication que nous allons soumettre prochainement à la revue *Biochemical Systematics and Ecology*.



¹ E. Gravel, E. Poupon, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 32–56

Chemical constituents from *Nitraria retusa* Asch. (Nitrariaceae) grown in Egypt

Nicolas Barbhan^{a†}, Ines Miladi^{a†}, Sami I. Ali^b, Erwan Poupon^a, Amal A. Mohamed^{b,c}, Mehdi A. Beniddir^{a,*}

^aLaboratoire de pharmacognosie associé au CNRS, UMR 8076 BioCIS, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

^bPlant Biochemistry Dept., National Research Centre, 33 El Bohouth St., Dokki, Giza, Egypt. P.O. 12622, ID: 60014618

^cCurrent adress: University College of Al-Leith, Umm Al-Qura University, Saudi Arabia.

* Corresponding author. Tel.: + 33 1 46 83 55 87

E-mail: mehdi.beniddir@u-psud.fr (M. BENIDDIR)

[†] These authors contributed equally to this work

Abstract

The present work reports the isolation and identification of two aminobenzoic acids (**1-2**) and one lignan (**3**) from the aerial parts of *Nitraria retusa* (Nitrariaceae). The structures were elucidated by a combination of spectroscopic analysis and comparison with data reported in the literature. All isolated compounds are described here for the first time in the genus *Nitraria*. Additionally, to the best of our knowledge, compound **1** is reported for the first time from a natural source. Finally, the chemotaxonomic significance of these compounds, as well as the putative detection of alkaloids in the methanolic extract of *N. retusa* are also discussed.

Keywords: *Nitraria retusa*, Nitrariaceae, Lignan, PABA, Aromatics

1. Subject and source

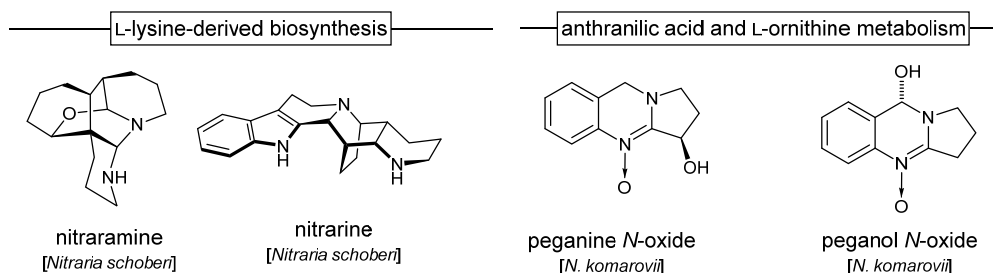
N. retusa Asch. is one of the native perennial species that belongs to the botanical family Nitrariaceae. It's a resistant shrub which grows in steppes and saline deserts (Boulos, 2000; Täckholm, 1974). The aerial parts of *N. retusa* were collected in May 2009, from Wadi Rishrash along the Korymat road (Beni Suef Governorate - Egypt). A voucher specimen was deposited in the herbarium of the National Research Center (NRC). The sample was identified by Prof. A.K. Hegazy, Botany Department, Faculty of Science, Cairo University, Egypt.

In our continuing interest in the chemical diversity of plants belonging to the *Nitraria* genus (Gravel and Poupon, 2010; Poupon and Gravel, 2015), we report the isolation and structural elucidation of compounds from *N. retusa* growing in Egypt for the first time. We focused at first sight our attention on alkaloids. These latter in the *Nitraria* genus usually arise from two main distinct biosynthetic pathways: i) alkaloids derived from anthranilic acid and L-ornithine (quinazolines such as peganine and peganol *N*-oxides) and ii) alkaloids from a particular L-lysine pathway (such as nitrarine or nitramine) as presented in Figure 1.

2. Previous work

Previous phytochemical studies on *N. retusa* have led to the identifications of a variety of compounds which mainly include flavonoids and their corresponding glucosides (Boubaker et al., 2011; Boubaker et al., 2012; Hadj Salem et al., 2011; Halim et al., 1995; Mohamed et al., 2015). Recently, the phytochemical study of a Jordanian *Nitraria retusa* led to the isolation of two new quinazoline alkaloids, namely 5,7-dihydroxy-3-deoxy vasicine and 7-hydroxy-3-deoxy-1-vasiciene together with the known *O*-acetyl nitrarine (El-Alali et al., 2012) as depicted in Figure 1.

• Representative alkaloids from the *Nitraria* genus



• Known alkaloids from *Nitraria retusa* [El-Alali et al., 2012]

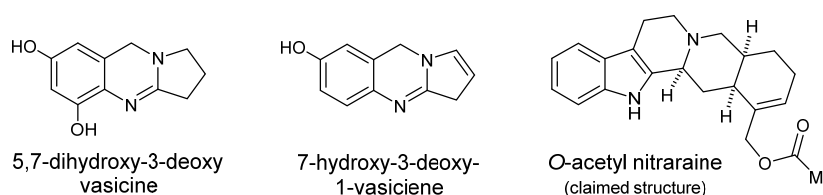


Figure 1. Main classes of *Nitraria* alkaloids and known alkaloids from *N. retusa*.

3. Present study

3.1. Extraction, isolation and structure elucidation

Air-dried, powdered aerial parts of *Nitraria retusa* (420 g) were extracted with MeOH. A part of this concentrated extract was dissolved in 10 % HCl, and then de-fated with CH₂Cl₂, after which the aqueous phase was basified (pH 10) with 10 % NH₄OH solution and extracted with CH₂Cl₂ to give a presumed “alkaloidic extract” (125 mg). The aqueous alkaline phase was further partitioned with *n*-BuOH to afford the butanolic extract (330 mg).

The alkaloidic extract (125 mg) was subjected to silica gel column chromatography, eluted with CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (100/0/0.01-17/3/0.01, v/v/v) to afford 10 fractions (Fr.1-10) based on TLC analysis. Fr.5 (8.2 mg) was submitted to reverse phase analytical HPLC by using the isocratic mobile phase H₂O + 0.2% formic acid/CH₃CN (75:25) over 20 min at 1 ml/min to afford (+)-*epi*-syringaresinol (**3**, *t_R* 17.94 min, 6.5 mg, 0.015 %).

Although the *Nitraria* genus is known to be rich in terms of diversity of alkaloids if not amounts, the alkaloidic extraction of the Egyptian *N. retusa* afforded only a small amount of material comparing to its Jordanian congener. Furthermore, when the alkaloidic extract was

4- Étude phytochimique de *Nitraria retusa* collectée en Égypte

tested for the presence of alkaloids using Mayer's and Dragendorff's reagents, the tests were negative.

The absence of alkaloids in the so-called "alkaloidic extract" caught our attention and led us to analyze the methanolic one. Indeed the LC-DAD-TOF-MS analysis of the crude methanolic extract (see S2 in the supporting information) allowed not only the detection of the previously described isorhamnetin 3-*O*-rutinoside at $t_R = 9.62$ min, m/z $[M+H]^+ = 625.1760$, (calculated for $C_{28}H_{33}O_{16}$, 625.1769) (Boubaker et al., 2011; Boubaker et al., 2012; Hadj Salem et al., 2011; Halim et al., 1995; Hussein et al., 2009), but also the minor alkaloid 5,7-dihydroxy-3-deoxy vasicine, described in the Jordanian *N. retusa* (El-Alali et al., 2012) at $t_R = 6.23$ min, m/z $[M+H]^+ = 205.0968$ (calculated for $C_{11}H_{13}N_2O_2$, 205.0972). Its extracted UV and MS data indicated characteristic evidences reminiscent of tricyclic quinazoline alkaloids (D'Yakonov and Telezhenetskaya, 1997). In order to confirm these observations, the phytochemical investigation of the methanolic extract is currently underway in order to isolate these presumed alkaloids. Finally, the putative detection of alkaloids in the methanolic extract may explain their absence in the alkaloidic one. Indeed, due to their low basicity, alkaloids of the Egyptian *N. retusa* couldn't be extracted by the classical alkaloidic extraction.

The butanolic extract (330 mg) was subjected to silica gel column chromatography, eluted with $CH_2Cl_2/MeOH/NEt_3$ (100/0/0.01-4/1/0.01, v/v/v) which gave 10 fractions (Fr.1'-10') on the basis of TLC analysis. Fr.7' (20 mg) was subjected to reverse phase semi-preparative HPLC by using the mobile phase $H_2O + 0.2\%$ formic acid/ CH_3CN (98/2 over 3 min - 98/2:65/35 over 9 min - 65/35 over 13 min) at 17 mL/min to give 4-aminobenzoic acid (**2**, t_R 7.53 min, 2 mg, 0.0048 %) and 4-amino-3-methoxybenzoic acid (**1**, t_R 8.58 min, 2.3 mg, 0.007 %).

The structures of the isolated metabolites (compounds **1-3**, Fig.2) were fully identified on the basis of extensive spectroscopic data (MS, 1H , ^{13}C NMR and 2D NMR) and by comparison of those of the literature. The compounds were identified as one new aromatic compound, 4-amino-3-methoxybenzoic acid (**1**), together with two known ones, *i.e.*, 4-aminobenzoic acid (PABA) (**2**) (Chen et al., 2014; Küçükosmanoğlu Bahçeevli et al., 2005; Mikolasch et al., 2002) and (+)-*epi*-syringaresinol (**3**) (Chen et al., 1998). Noteworthy, (+)-*epi*-syringaresinol (**3**) is reported for the first time from this genus.

4- Étude phytochimique de *Nitraria retusa* collectée en Égypte

Compound **1** was obtained as an amorphous solid. HR-ESI-MS indicated a $[M+H]^+$ ion peak at m/z 168.0660, which suggested a molecular formula of $C_8H_9NO_3$, indicating five double-bond equivalents accounted by one aromatic ring and one carbonyl. The UV spectrum absorption at 278 nm indicated the existence of an aromatic system. The IR spectrum showed a carbonyl group at 1694 cm^{-1} , aromatic bands at $777, 1502\text{ cm}^{-1}$ and an amine band at 3498 cm^{-1} . The ^1H NMR spectrum of **1** shows aromatic signals for a 1,3,4-trisubstituted aromatic ring protons [δ_{H} 7.01 (d, $J = 8.3\text{ Hz}$), 7.48 (d, $J = 2\text{ Hz}$) and 7.43 (dd, $J = 8.3, 2\text{ Hz}$)] along with a signal for a methoxy group at δ_{H} 3.94. The location of the latter at C-3 was deduced from HMBC correlation between the methoxy protons and C-3. In the same manner, the carboxylic group was attached at C-1 by the HMBC correlation observed between H-6 and the carbonyl of the carboxylic group. A thorough analysis of COSY, HSQC and HMBC data confirmed the assignment of the entire structure of **1**. Consequently, **1** was identified as 4-amino-3-methoxybenzoic acid. To the best of our knowledge, compound **1** is reported for the first time from a natural source.

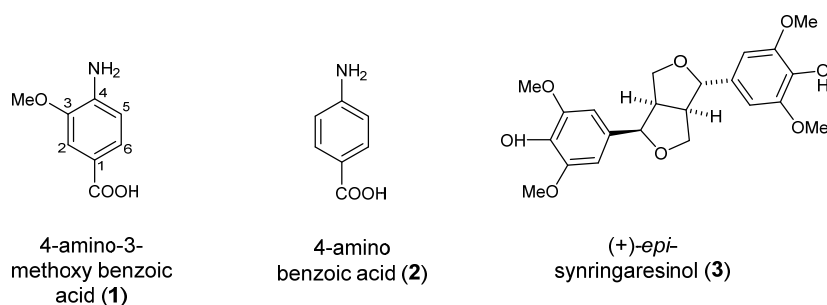


Figure 2. Structure of the compounds isolated from the Egyptian *N. retusa*

3.2. Spectroscopic data of isolated compounds

4-Amino-3-methoxybenzoic acid (**1**). Amorphous solid; UV (MeOH) λ_{max} ($\log\epsilon$) 278 (4.5); IR ν_{max} 777, 1694, 3406, 3498 HR-ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 168.0660 (calcd for $C_8H_{10}NO_3$, 168.0655). ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ_{H} 3.94 (s, 3 H, 3-OMe), 7.01 (d, $J = 8.3\text{ Hz}$, 1 H, H-5), 7.43 (dd, $J = 8.3, 2\text{ Hz}$, 1 H, H-6), 7.48 (d, $J = 2\text{ Hz}$, 1 H, H-2). ^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz): δ_{C} 56.0 (OCH₃), 111.6 (C-2), 115.2 (C-5), 121.7 (C-6), 125.8 (C-4), 147.9 (C-3), 149.3 (C-1), 173.6 (COOH).

4. Chemotaxonomic significance

The present work reports the isolation and identification of three compounds, two aminobenzoic acids (**1-2**) and one lignan (**3**) from the aerial parts of *N. retusa*. All isolated compounds are described here for the first time in the genus *Nitraria*. Additionally, to the best of our knowledge, compound **1** is reported for the first time from a natural source. Thus, the description of the above mentioned compounds is noteworthy, as they have never been hitherto encountered in *Nitraria* species.

On the other hand, the putative detection based on MS spectra data of the aforementioned tricyclic quinazoline alkaloids in the methanolic extract of *N. retusa* is not an unexpected feature, because they were also identified in *N. schoberi* (Tulyaganov and Nazarov, 2000), *N. sibirica* (Osmanov et al., 1982) and *N. komarovii* (Tulyaganov, 1993a, 1993b, 1994; Tulyaganov and Makhmudov, 2000). Moreover, the distribution in Nature of the tricyclic quinazoline alkaloids, biosynthetically derived from anthranilic acid, is not restricted by the frameworks of any one or more taxonomic units. They are found most often in plants of the genera *Peganum*, *Galega*, *Adhadota*, *Nitraria*, *Mackinlaya*, etc (Shakhidoyatov and Elmuradov, 2014).

Finally, it should be pointed out that significant differences exist in terms of alkaloid amounts, according to the geographic location. Indeed, our study clearly indicated that the Egyptian *N. retusa* didn't possess the same amount of alkaloids than its Jordanian congener. In addition, the putative presence of *O*-acetyl nitraraine in *N. retusa* from Jordania (El-Alali et al., 2012) as the sole (with no characterization data reported) representative of the lysine-based metabolism must be questioned, having also in mind that its “real” structure has also been shown wrong (Salame et al., 2011).

In conclusion, this phytochemical investigation of *N. retusa* has shown that its chemistry differs from other species of *Nitraria* genus and further work is needed to evaluate the importance of the isolated compounds in understanding the relationships between the species, our work acts as foundation for further chemotaxonomic studies. In addition, evaluated for their cytotoxic activities against HeLa, MES-SA, PC-3 and HEK-293 cell lines, none of the *N. retusa* extracts (methanolic, butanolic and “alkaloidic”) shown significant bioactivities.

Acknowledgement

This project was supported and funded by the IRD/STDF Joint Research Project. We wish to thank Dr. Caroline Barette (CEA-CMBA) who performed the cytotoxic assays. We thank Jean-Christophe Jullian and Camille Dejean for their assistance with the NMR spectroscopy.

Appendix A. supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at
xxx

References

- Boubaker, J., Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Ghedira, K., Dijoux Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L., 2011. *Cell Proliferat.* 44, 453.
- Boubaker, J., Wissem, B., Mohammed, B.S., Ines, B., Mounira, K., Ines, S., Genviève, D.F.M., Kamel, G., Leila, C.-G., 2012. *Nutri. Cancer* 64, 1095.
- Boulos, L., 2000. *Flora of Egypt*, vol. 2 Al Hadara Publishing, Cairo. pp. 352.
- Chen, C.Y., Wu, T.Y., Chang, F.R., Wu, Y.C., 1998. *J. Chin. Chem. Soc.* 45, 629.
- Chen, G.-F., Yang, M.-L., Kuo, P.-C., Lin, M.-C., Liao, M.-Y., 2014. *Chem. Nat. Compd.* 50, 175.
- D'Yakonov, A.L., Telezhenetskaya, M.V., 1997. *Chem. Nat. Compd.* 33, 221.
- El-Alali, A., AlZoubi, A., Gharaibeh, M., Tawaha, K., Alali, F.Q., 2012. *Jordan J. Pharm. Sci.* 5, 155.
- Gravel, E., Poupon, E., 2010. *Nat. Prod. Rep.* 27, 32.
- Hadj Salem, J., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Paris, C., Fick, M., Humeau, C., 2011. *Food Chem.* 124, 486.
- Halim, A.F., Saad, H.-E.A., Hashish, N.E., 1995. *Phytochemistry* 40, 349.
- Hussein, S., Kawashty, S., Tantawy, M., Saleh, N.M., 2009. *Plant Syst Evol* 277, 251.
- Küçükosmanoğlu Bahçeevli, A., Kurucu, S., Kolak, U., Topçu, G., Adou, E., Kingston, D.G.I., 2005. *J. Nat. Prod.* 68, 956.
- Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stielow, A., Schauer, F., 2002. *Tetrahedron* 58, 7589.
- Mohamed, A.A., Ali, S.I., Darwesh, O.M., El-Hallouty, S.M., Sameeh, M.Y., 2015. *Int. J. Toxicol. Pharm. Res.* *in press*.
- Osmanov, Z., Ibragimov, A.A., Yunusov, S.Y., 1982. *Chem. Nat. Compd.* 18, 121.
- Poupon, E., Gravel, E., 2015. *Chem. Eur. J.* *in press*, (DOI: 10.1002/chem.201500366).
- Salame, R., Gravel, E., Poupon, E., 2011. *Tetrahedron Lett.* 52, 6453.
- Shakhidoyatov, K.M., Elmuradov, B.Z., 2014. *Chem. Nat. Compd.* 50, 781.

4- Étude phytochimique de *Nitraria retusa* collectée en Égypte

Täckholm, V., 1974. Student's Flora of Egypt, Cairo University Press, Beirut. pp. 300.

Tulyaganov, T.S., 1993a. Chem. Nat. Compd. 29, 31.

Tulyaganov, T.S., 1993b. Chem. Nat. Compd. 29, 73.

Tulyaganov, T.S., 1994. Chem. Nat. Compd. 30, 727.

Tulyaganov, T.S., Makhmudov, O.E., 2000. Chem. Nat. Compd. 36, 76.

Tulyaganov, T.S., Nazarov, O.M., 2000. Chem. Nat. Compd. 36, 393.

Titre : Vers La synthèse totale biomimétique de la lodopyridone et étude phytochimique de *Lycopodiella cernua* et de *Nitraria retusa*.

Mots clés : substances naturelles ; alcaloïdes ; peptides ; lodopyridone ; déhydrocystéine ; chimie hétérocyclique ; électrocyclisation ; synthèse totale ; chimie biomimétique ; lycopode ; Nitraria ; tramadol

Résumé : La lodopyridone est un alcaloïde isolé par William Fenical en 2009 à partir de l'actinomyète marin *Saccharomonospora* sp. CNQ490 présent dans les sédiments du cayon sous-marin de La Jolla aux États-Unis. Cette structure polyhétérocyclique, plutôt surprenante de prime abord pour une substance naturelle, est en fait un térapeptide modifié. Pour réaliser la synthèse totale de la molécule et nous démarquer des synthèses antérieures, nous avons imaginé une approche basée sur la construction de la pyridone centrale en faisant intervenir une réaction d'électrocyclisation originale et d'inspiration biomimétique.

Les fragments nécessaires pour la réalisation de l'étape clé ont été préparés par des méthodes courtes et originales développées au laboratoire. Intrigués par l'histoire récente du « tramadol naturel », nous nous sommes aussi penchés sur les hypothèses de biosynthèse en essayant, au laboratoire, de mimer les cascades de condensation des précurseurs proposés. En parallèle, une étude phytochimique du lycopode *Lycopodium cernuum* et de la plante *Nitraria retusa* a été réalisée.

Title : Toward the biomimetic total synthesis of lodopyridone and phytochemical study of *Lycopodiella cernua* and *Nitraria retusa*.

Keywords: lodopyridone ; dehydrocysteine; heterocycles ; electrocyclisation ; totalsynthesis ; biomimetic chemistry ; lycopode ; nitraria ; alkaloid ; tramadol.

Abstract: Lodopyridone is an alkaloid isolated by William Fenical in 2009 from the marine actinomyete *Saccharomonospora* sp. CNQ490 found in the sediments of the submarine cayon of La Jolla (United States). This polyheterocyclic structure, rather surprising at first for a natural substance, is actually a modified tetrapeptide. To achieve the total synthesis of the molecule and differentiate ourselves from the previous syntheses, we imagined an approach based on the construction of the central pyridone ring by an

original pericyclic reaction Inspired from the proposed biosynthetic route. The two fragments necessary for the key step Were prepared by short and original methods developed in our laboratory. Intrigued by the recent "natural tramadol" story, we also envisaged its synthesis exploiting the proposed biosynthetic pathway. In parallel, a phytochemical study of the moss *Lycopodium cernuum* and the plant *Nitraria retusa* were performed.