

# De l'étude d'éponges du genre Dactylospongia aux particularités chimiques des ilimaquinones

Asmaa Boufridi

#### ▶ To cite this version:

Asmaa Boufridi. De l'étude d'éponges du genre Dactylospongia aux particularités chimiques des ilimaquinones. Chimie organique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT: 2014PA114848. tel-01967608

# HAL Id: tel-01967608 https://theses.hal.science/tel-01967608

Submitted on 1 Jan 2019

**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.



### **UNIVERSITÉ PARIS-SUD**

#### **ÉCOLE DOCTORALE:**

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

**DISCIPLINE: Pharmacognosie** 

ANNÉE 2014 - 2015 SÉRIE DOCTORAT N° 01306

#### THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 10/12/2014

par

#### **Asmaa BOUFRIDI**

# De l'étude d'éponges du genre *Dactylospongia* aux particularités chimiques des ilimaquinones

**Directeur de thèse :** Erwan POUPON Professeur des Universités (Université Paris-Sud)

**Composition du jury:** 

Président du jury : Pierre CHAMPY Professeur des Universités

(Université Paris-Sud)

Rapporteurs : Soizic PRADO Professeur des Universités

(Muséum National d'Histoire Naturelle)

Olivier THOMAS Professeur des Universités

(Université de Nice-Sophia Antipolis)

Examinateurs : Olivier GROVEL Maître de Conférences

(Université de Nantes)

#### **Remerciements**

Tout d'abord, j'exprime mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont permis d'être là aujourd'hui, qui m'ont soutenue et épaulée pendant mes études, en particulier ces trois dernières années et qui n'ont jamais cessé de croire en moi, à **Maman** et **Papa**.

Mes plus grands remerciements vont à notre père scientifique **Erwan**, pour son soutien, sa disponibilité au quotidien, et ses conseils. Chef, votre souci du travail bien fait m'a beaucoup marquée. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces trois années de thèse, de m'avoir appris énormément de choses et surtout, merci d'avoir supporté mes larmes. Gloire à Vous Chef!!

J'adresse mes remerciements les plus sincères aux membres du jury : **Pr Soizic PRADO**, **Pr Olivier THOMAS** et **Dr Olivier GROVEL** pour avoir accepté de juger mon travail et pour les discussions scientifiques enrichissantes, ainsi qu'au **Pr Pierre CHAMPY**, je suis moi aussi flattée que tu présides mon jury de thèse, Pierre.

C'est un honneur pour moi de vous avoir eus comme jury de thèse.

Je remercie également le **Dr Bruno FIGADÈRE** de m'avoir acceptée au sein de son laboratoire pendant ces trois années.

Je tiens à remercier chaleureusement le **Dr Didier BUISSON** d'avoir accepté de travailler avec nous, j'ai appris énormément de choses dans un domaine qui m'était inconnu, merci de m'avoir fait confiance tout au long de cette jolie collaboration, grâce à la persévérance, on a réussi!!

Un grand merci à **Alexandre** pour toutes les discussions scientifiques qu'on a eues et surtout pour la partie analytique, et à **Laurent** (**LEV**) pour son aide, sa bonne humeur au quotidien et son soutien, sans oublier son humour !!

Je remercie également **Karine** pour toutes les analyses analytiques, **Jean-Christophe**, **Claire** et **Estelle** pour la RMN et les bons moments passés avec eux.

Je n'ai pas de mots pour remercier deux personnes qui me sont très chères, qui vont énormément me manquer et que j'aime beaucoup :

- Ma Blandinette, j'ai trouvé la complicité et l'instinct protecteur d'une grande sœur et d'une très bonne amie auprès de toi, sache que tu es indispensable au labo, ta joie, ta bonne humeur, ton optimisme, tes encouragements et ton écoute m'ont énormément marquée et vont beaucoup me manquer, mais pas que, nos pauses biscotte-Nutella, nos blabla dans notre cachette et nos sorties hors labo aussi, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. MERCI
- **Agnès**, j'ai trouvé la tendresse d'une maman auprès de toi, tu m'as beaucoup encouragée, écoutée, aidée, je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi. Merci pour tout. Je t'attends à Brisbane!!

Je remercie **M. LEBOEUF** : l'élégance incarnée et le charme personnifié (tous les jeunes devraient en prendre de la graine !!), vous allez particulièrement me manquer, merci pour votre bonne humeur, pour l'attention que vous me portiez et pour les chocolats aussi, c'est un honneur pour moi de vous connaître.

Je remercie également et chaleureusement **François ROBLOT**, pour son aide dans l'interprétation de mes spectres RMN, mais aussi pour son écoute, son aide pendant les TP-

gnosie et ses conseils (professionnels et personnels), j'ai trouvé la patience d'un père en vous. Merci (et oui même Dr je n'arrive toujours pas à vous tutoyer !!)

Un grand Merci aux Mecs, Adam et Mehdi:

- **Adam**, ou devrais-je dire « Petit », d'un stagiaire à un collègue de paillasse, merci pour tous les moments qu'on a passé au labo, pour ton soutien, ta bonne humeur, tes conseils, les fou rires, ainsi que les discussion scientifique qu'on a eu, sans oublier ton humour. Je te souhaite une bonne continuation et un avenir glorieux comme tu le souhaite.
- **Mehdi**, un grand frère, merci de m'avoir soutenue, de m'avoir encouragée jusqu'à la fin, merci pour les discussions scientifiques et non scientifiques qu'on a eues, je n'oublierai pas nos séances de TP. Merci pour tout.

Je remercie toute l'équipe de gnosie pour leur accueil chaleureux, principalement **Christophe** pour ses taquineries, **Laurent FERRIE** pour son aide en chimie organique, **Delphine** pour ses conseils en cristallisation des produits et pour sa bonne humeur. Je remercie particulièrement les anciens et présents thésards pour les moments que j'ai passés avec eux ainsi que la bonne ambiance au laboratoire et leur gentillesse, je souhaite beaucoup de courage à **Johan**, **Natacha**, **Nicolas**, **Abha** et **Pierre-Étienne** qui seront très prochainement Docteurs. Sans oublier **David** pour le début de son post doc au labo qui continuera mon travail sur l'ilimaquinone, ainsi que mes stagiaires : Meriem, Florence et Klervi.

Je remercie toute l'équipe de chimie des associations fongiques du Muséum pour les bons moments passés avec eux, je remercie particulièrement **Caroline** pour m'avoir appris à travailler sous conditions stériles, merci pour ton implication dans mes manips, pour ta bonne humeur et ta joie de vivre.

Un grand merci à tout le team Starbucks Odéon, où j'ai rédigé les ¾ de ma thèse avec un caramel macchiato, merci à toute l'équipe pour sa bonne humeur au quotidien, particulièrement à **Amine** pour ses encouragements, et à **Lucas** pour son sourire motivant et encourageant.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux à mes amis pour leur soutien, leur encouragement et les bons moments que j'ai passés avec eux, particulièrement au Dr Wafaa (les Wasma ont réussies !! Yeah), Sadikati Latifa, Natila, Amine B., Empar et Gerardo.

Un tendre et chaleureux merci à ma sœur **Aicha** et mon p'ti bonheur **Zakaria**, vous m'avez beaucoup encouragée pendant ces trois années loin de vous, je vous remercie pour tout. J'espère que vous suivrez les pas de votre grande sœur.

Je remercie le MESRS pour le financement de ma thèse.

# Table des matières

1	Abréviations	1
]	Introduction générale	5
	Chapitre I : données bibliographiques sur les éponges <i>Dactylospongia</i>	9
1.	Introduction	
2.	Généralités sur le genre Dactylospongia, BERGQUIST, 1965	
	2. 1. Taxonomie et description	
	2.1.1. Dactylospongia metachromia	
	2.1.2. Dactylospongia elegans	13
	2.2. Écologie et distribution	13
3.	Composition chimique	16
	3.1. Composés terpéniques	14
	3.1.1. Sesquiterpènes	14
	a. Sesquiterpènes quinoniques	15
	b. Sesquiterpènes phénoliques	18
	c. Sesquiterpènes aminoquinoniques	19
	d. Cas particulier de sesquiterpènes	20
	e. Sesquiterpènes monocycliques	21
	3.1.2. Sesterterpènes	22
	a. Sesterterpènes lactoniques	22
	b. Sesterterpènes sulfatés	23
	c. Furanoterpènes	23
	3.2. Macrolides	23
4.	Conclusion	24
	Chapitre II : les ilimaquinones de <i>D. metachromia</i> : extraction, séparation et hypoth	
1.	biosynthèse	
1. 2.		
۷.	Nos hypothèses de biosynthèse des sesquiterpènes de <i>Dactylospongia</i>	
	1. Précurseur biosynthétique des sesquiterpènes	
3.	Étude biobliographiques des ilimaquinones	
J.	3.1. Introduction	
	3.2. Activités biologiques de l'ilimaquinone	
	J. L. LICH THOU DIDIDGIQUED UP I HIHHAQUIHUHE	

	3.3. Synthèses totales de l'ilimaquinone	37
4.	Travail personnel	39
	4.1. Récolte et identification des éponges <i>D. metachromia</i> et <i>D. elegans</i>	39
	4.2. Extraction et purification	41
	Identification de la furospinosuline 1 (46)	42
	Séparation et identification des ilimaquinones (1) et (2)	42
	4.3. Étude du ratio ilimaquinone/5- <i>epi</i> -ilimaquinone	46
	4.3.1. Dactylospongia metachromia	46
	a. hypothèses de biosynthèse des ilimaquinones (1) et (2) et modélisation moléculaire	50
	Hypothèses de biosynthèse	50
	Modélisation moléculaire	50
	b. Étude génétique	52
	c. Discussion autour de ce ratio	53
	4.3.2. Dactylospongia elegans	55
	a. Évaluation du métabolite majoritaire de D. elegans	55
	b. hypothèses de biosynthèse de l'ilimaquinone (1) et l'isospongiaquinone (7)	56
	c. Étude génétique	56
5.	Conclusion	57
1. 2.	Introduction	64
3.	Travail personnel	
٥.	3.1. Réarrangements en milieu acide des ilimaquinones	
	3.2. Réactions d'époxydation	
	3.2.1. Époxydation de la néomamanuthaquinone (4)	
	3.2.2. Époxydation de l'ilimaquinone (1) et la 5-epi-ilimaquinone (2)	
	a. Époxydation de l'ilimaquinone	
	b. Époxydation de la 5- <i>epi</i> -ilimaquinone	
4.	Conclusion	
		-
	Chapitre IV : étude de réactivité chimique et électrochimie de la quinone des ilimaquinones	s
1.	Introduction	
1. 2.	Vers la synthèse des dactylospongénones	
4-	V V 15 10 5 V H H V NE UEN UACH V I UNDUH PEH UHEN	. 02

	2.1. Introduction	83
	2.2. Données bibliographiques	83
	2.2.1. Désaromatisation oxydante et contraction de cycle	83
	2.2.2. Réactifs à l'iode hypervalent	85
	2.3. Stratégie envisagée	86
	2.4. Travail personnel	87
	2.4.1. Réduction puis méthylation de l'ilimaquinone	87
	2.4.2. Étude du précurseur acétyilimaquinone (125)	88
	> Acéthylation de l'ilimaquinone	88
	Éssais de méthylation	89
	2.4.3. Étude du précurseur (132)	90
	➤ Méthylation de l'ilimaquinone	90
	> Essais de désaromatisation oxydante	91
	> Essais de cyclisation	91
	2.4.4. Étude du précurseur <b>5-epi-135</b>	92
	2.4.5. Étude du précurseur 137	94
	> Formation du carbonate	94
	> Essais de désaromatisation oxydante	95
	2.5. Nouvelle stratégie envisagée	97
	2.5.1. Généralités	97
	2.5.2. Travail personnel	98
	2.5.2.1. Réaction de contraction de cycle sur les ilimaquinones	98
	2.5.2.2. Analyse cristalographique et proposition de mécanisme	99
	a. Analyse cristallographique	99
	b. Proposition de mécanisme	100
	c. Le rôle du méthanol	102
	d. Comparaison des données RMN et cristallographiques	103
3.	Étude des aminobenzoquinones	104
	3.1. Généralités	104
	3.2. Travail personnel	104
4.	Électrochimie des ilimaquinones	1046
	4.1. Généralités	106
	4.2. Travail personnel	107
5.	Conclusion.	10410

Chapitre V: biotransformation de l'ilimaquinone		113
1.	Introduction	115
2.	Données bibliographiques	116
3.	Travail personnel	119
	3.1. Criblage des micro-organismes	119
	3.2. Biotransformation par <i>Mucor circinelloides</i>	123
	3.1.1. Détermination structurale du produit 113	123
	3.1.2. Détermination structurale du produit <b>156</b>	127
	♥ Position des hydroxyles	128
	3.1.3. Détermination structurale du produit <b>157</b>	129
	☼ Origine de l'éthanolamine	131
4.	Conclusion	133
	Conclusion générale	135
	Partie Expérimentale	140
	Annexes	190

**Abréviations** 

CCM Chromatographie sur couche mince

CLHP Chromatographie liquide haute performance

DFT Density Functional Theory
DMAP 4-diméthylaminopyridine
DMF Diméthylformamide

EDCl 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EP Éther de pétrole éq. Équivalent

HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC Heteronuclear Single Quantum Correlation

IBX Acide iodobenzoïque

IR Infrarouge

Jmod <sup>13</sup>C J-modulation experiments *m*-CPBA Acide métachloroperbenzoïque

MHz Mégahertz

MOM-Cl Chlorométhyle méthyle éther

M.W. Microonde

NOESY Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange SpectroscopY

PIDA Diacétoxyiodobenzène

PIFA Bis(trifluoroacétoxyiodobenzène)

ppm Partie par million

PSM Poste de Sécurité Microbiologique

QSP Quantité suffisante pour

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

SM Spectrométrie de Masse

SMHR Spectrométrie de Masse Haute Résolution

 $\begin{array}{ll} t_a & & Temp\'{e}rature \ ambiante \\ t_R & & Temps \ de \ r\'{e}tention \\ THF & & T\'{e}trahydrofurane \end{array}$ 

uma Unité de masse atomique

U.S. Ultrasons

YMS Yeast Malt extract Soybean

Introduction générale

Notre équipe de recherche « chimie des substances naturelles » fait partie du projet ANR PoMaRé « Invertébrés benthiques de <u>Po</u>lynésie, <u>Martinique et Réunion</u>: interactions et évaluation de la chimiodiversité pour un usage durable de la biodiversité » sélectionné lors de l'appel d'offre international NetBiome. Notre travail de recherche est réalisé en collaboration avec l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Polynésie française et sera consacré à l'étude d'éponges marines du même lieu.

Depuis ces 50 dernières années, les spongiaires ont attiré l'attention des chimistes des substances naturelles grâce à leur richesse et leur abondance en métabolites spéacialisés originaux, ce qui fait d'eux des candidats de choix pour la recherche de nouvelles molécules actives, en effet, un tiers des 25 000 molécules d'origine marine sont isolés des spongiaires.<sup>1,2</sup>

Leur mode de vie sédentaire les rend particulièrement vulnérables à la prédation, la concurrence et aux changements environnementaux, d'où la « nécessité évolutive » de développer diverses voies de biosynthèse et de produire des métabolites qui présentent des fonctions défensives, de communication et qui leur assurent une protection et une survie dans leur milieu.

Les diverses fonctions de ces métabolites spécialisés peuvent être classées selon le type de communications existantes dans le milieu<sup>1</sup> nous notons :

- <u>Une communication entre l'organisme (l'éponge) et son environnement</u>: où nous trouvons des molécules anti-appétantes (*feeding deterrent*), des molécules induisant la fixation des larves, des molécules photoprotectrices et antioxydantes, des molécules anti-salissures (*antifouling*) et des molécules antimicrobiennes.
- <u>Une communication intermédiaire entre l'hôte (l'éponge) et les associations microbiennes</u>: qui implique : un contrôle chimique de l'hôte de ses partenaires microbiens, une résistance chimique des partenaires microbiens envers la digestion de l'hôte, une défense chimique de l'hôte par rapport aux microorganismes associés.
- <u>Une communication chimique entre les différentes associations microbiennes de l'hôte entre elles</u>: nous comptons des molécules impliquées dans la détection du quorum (*quorum sensing*) et dans l'antagonisme bactérien.

<sup>2</sup> J.-M. Kornprobst, **2014**, in *Encyclopedia of Marine Natural Products*, (Eds J.-M. Kornprobst) John Wiley and Sons, pp 521–523.

7

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> E. Quévrain, I. Domart-Coulon, M.-L. Bourguet-Kondracki, **2014**, in *Natural Products: Discourse, Diversity, and Design*, (Eds A. Osbourn, R. Goss, G. T. Carter) Wiley-Blackwell, pp 39–60.

En collaboration avec le Dr Cécile Debitus, notre laboratoire s'est intéressé à l'étude des éponges *Dactylospongia metachromia* et *D. elegans*, des éponges très fréquentes en Polynésie. Les études chimiques de ces éponges reportées par la littérature, montrent la présence d'un métabolite secondaire de façon majoritaire : l'**ilimaquinone**, un sesquiterpènes quinonique.

Le but de notre travail consiste à isoler ce sesquiterpène, de cerner sa réactivité, et d'aporter des modifications originales sur son squelette par voies chimique et enzymatiques.

Après une étude bibliographique (chapitre I), trois grands axes seront abordés (schéma 1) :

- Une partie « extraction » : où nous décrirons l'extraction et la séparation des ilimaquinones, les métabolites majoritaires de nos échantillons (chapitre II) ;
- Une partie « variabilité moléculaire » : nous nous intéresserons dans cette partie à des observations troublantes de variation de stéréochimie lors d'une étude à très grande échelle d'échantillons d'éponges (chapitre II) ;
- Une partie « modifications structurales » : des modifications structurales seront réalisées par voies chimique et enzymatique sur les ilimaquinones dans le but de cerner la réactivité particulière de ces structures (chapitre III-V);

Une conclusion générale synthétisera le travail réalisé et proposera les nombreuses perspectives de cette recherche.

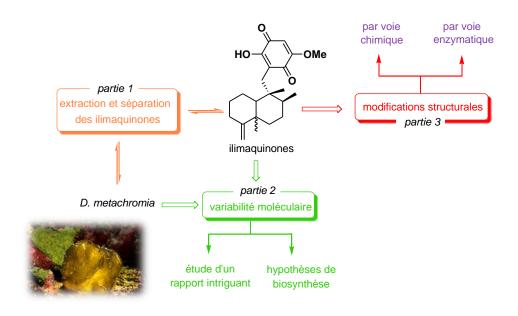


Schéma 1 : résumé des divers axes abordés lors de ma thèse

# Chapitre I Données bibliographiques sur les éponges *Dactylospongia*

#### 1. Introduction

lus de 1000 substances ont été isolées de l'ordre des *Dictyoceratida* depuis 1970. Cet ordre est l'un des plus étudiés de la classe des Demospongiae. Il est caractérisé chimiquement par son contenu en dérivés terpéniques.

La famille des *Thorectidae* Bergquist 1978 appartient à l'ordre des Dictyoceratida, elle est divisée en deux sous-familles : les *Thorectinae* et les *Phyllospongiinae*, puis en 23 genres et 129 espèces à travers le monde, principalement dans les océans tropicaux et tempérés. Le genre *Dactylospongia* fait partie de ces 23 genres. Deux espèces (*D. metachromia* et *D. elegans*) lui appartenant ont été étudiées pendant ma thèse.

Ce chapitre consacré aux études bibliographiques résume les différents métabolites isolés du genre *Dactylospongia*.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> S. de C. Cook, P. R. Bergquist, **2002**, in *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges* (Eds J. N. A. Hooper, R. W. M. van Soest), Springer, pp 1037–1038. (Voir aussi: www.marinespecies.org)

#### 2. Généralités sur le genre Dactylospongia, BERGQUIST, 1965

Le genre *Dactylospongia* faisait, à l'origine, partie de la famille des *Spongiidae*. Mais depuis 1965, il est assigné à la famille des *Thorectidae*, en raison de similitudes d'apparence avec le genre *Smenospongia*, ainsi que de la présence de fibres stratifiées.<sup>3</sup>

Les éponges appartenant à ce genre sont jaunes à l'extérieur. Après la collecte, un changement de couleur vers le violet foncé ou le rouge brun est observé. Cette coloration jaune et ce phénomène de changement de couleur sont inhabituels chez les Dictyoceratida, en revanche, ils sont caractéristiques des éponges de l'ordre des Verongida et de certaines Dendroceratida.

Deux espèces sont particulièrement connues de ce genre : D. metachromia et D. elegans.

#### 2.1. Taxonomie et description



#### 2.1.1. Dactylospongia metachromia



Photographie 1 : Dactylospongia metachromia (photo prise par Eric FOLCHER)

L'éponge *Dactylospongia metachromia* (photographie 1) était autrefois connue comme étant *Hippospongia metachromia*, les deux dénominations étaient considérées comme synonymes. Même si l'espèce *H. metachromia* n'est plus considérée en taxonomie (devenue *D. metachromia*), nous trouvons toujours cette appellation. Il est à noter aussi qu'une autre dénomination synonyme est trouvée, à savoir

Petrosaspongia metachromia.<sup>4</sup>

D. metachromia se présente sous forme d'un coussin compact. Le squelette fibreux est un réseau dense de branchements et d'interconnexions de fibres solides sans noyau, sans distinction claire entre l'ordre croissant primaire et les fibres de liaison secondaire. Ces caractéristiques sont typiques des *Thorectidae*, où les fibres primaires peuvent être identifiées par rapport à leur orientation à la surface ou par la présence d'un noyau de débris.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> J. H. Kwak, F. J. Schmitz, M. Kelly, J. Nat. Prod., **2000**, 63, 1153–1156

Les conules<sup>5</sup> sont formés par une masse dense de fibres, qui sont plus petits en diamètre et plus dichotomiques ou fasciculaires. Les conules sont séparés par des lacunes et couverts par le pinacoderme.<sup>6</sup> Cette éponge est ferme et peu compressible.<sup>3</sup>

#### 2.1.2. Dactylospongia elegans



Photographie 2 : Dactylospongia elegans (photo prise par Sylvain PETEK)

Décrite pour la première fois comme *Luffariella elegans* Thiele 1899, sa taxonomie est révisée en 1965 par Bergquist en *Dactylospongia elegans* (photographie 2). Les branches de cette éponge ont entre 0,5 et 1,5 cm de large, et 32 cm de long et peuvent s'anastomoser plusieurs fois sur leur longueur. Les oscules<sup>7</sup> sont dispersés sur la surface des branches.

Le squelette est constitué d'une réticulation irrégulière de fibres jaunes à brun clair. Les fibres primaires ou ascendantes sont perceptibles immédiatement en dessous de la surface. Les fibres font 20-54 µm de diamètre et montrent des signes de stratification concentrique. Une moëlle diffuse est observée de temps en temps. Des inclusions étrangères isolées peuvent aussi être vues, mais les fibres sont essentiellement sans noyau. La surface de la fibre est caractéristiquement granulée. Les petites chambres choanocytaires sphériques font 24-30 µm de diamètre. Cette éponge est extrêmement résistante et élastique.<sup>3</sup>

## 2.2. Écologie et distribution

Hooper décrit les éponges du genre *Dactylospongia* comme étant des éponges présentent particulièrement aux îles Célèbes (Indonésie) et aux îles Palaos.<sup>3</sup> Cependant, lors des recherches bibliographiques, on note que plusieurs spécimens ont été collectés en Nouvelle Calédonie, aux îles Fidji, à l'Est de l'Australie, au Vanuatu et autres.

13

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Conule : protubérance conique du tégument des éponges.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Pinacoderme : une des deux couches de cellules qui constitue l'éponge.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Oscule : orifice exhalant de l'éponge.

#### 3. Composition chimique

Les recherches bibliographiques qui seront présentées par la suite portent sur l'espèce D. metachromia et son ancienne dénomination (H. metachromia), ainsi que sur les espèces D. elegans et d'autres espèces non précisées de Dactylospongia.

Beaucoup d'études sur les espèces du genre *Dactylospongia* montrent la forte présence de **composés terpéniques**, principalement des sesquiterpènes. Nous retrouvons également des sesterterpènes et des macrolides d'origine polyacétique.

#### 3.1. Composés terpéniques

Par la diversité structurale et les propriétés biologiques qu'ils présentent, les composés terpéniques font partie d'une des classes de métabolites marins qui a reçu la plus grande attention. Ils représentent les principaux métabolites secondaires isolés du genre *Dactylospongia*. Dans cette partie, ces métabolites sont présentés par rapport à la nature du squelette terpénique.

#### 3.1.1. Sesquiterpènes

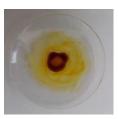
Les sesquiterpènes sont les principaux composés terpéniques isolés des éponges du genre *Dactylospongia*. Ils se présentent sous forme monocyclique ou bicyclique, couplés, le plus souvent, à des quinones, hydroquinones et/ou des aminoquinones. Nous retrouvons fondamentalement quatre types de squelettes terpéniques : monocylique, clérodane, halimane et labdane (figure 2).

Figure 1 : squelettes sesquiterpéniques retrouvés chez les Dactylospongia

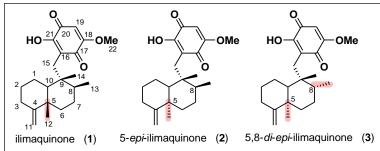
#### a. Sesquiterpènes quinoniques

Un des chefs de file des sesquiterpènes isolés du genre *Dactylospongia* est l'ilimaquinone (1) (figure 2). Elle est isolée pour la première fois de l'éponge *Hippiospongia* [sic] metachromia<sup>8</sup> collectée à Lunai, Oahu. Elle présente un diastéréoisomère en C-5 : la 5-epi-ilimaquinone (2), isolée pour la première fois de l'éponge *Fenestraspongia* sp. (Palaos) en mélange avec l'ilimaquinone (1).

L'origine du nom « ilimaquinone » provient de sa couleur jaune doré (photographie 3), qui rappelle une fleur d'origine hawaïenne (Oahu) : "ilima" (*Sida fallax* (Malvaceae), photographie 4), très appréciée pour fabriquer les *leis*.



Photographie 3: ilimaquinones 1 et 2





Photographie 4 : Sida fallax

Figure 2 : structure chimique des ilimaquinones 1, 2 et 3

La 5-epi-ilimaquinone (2) a, elle aussi, un diastéréosiomère en C-8, la 5,8-di-epi-ilimaquinone (3)<sup>10</sup> isolée récemment de *D. elegans*. (Une partie détaillée consacrée aux ilimaquinones 1 et 2 sera présentée dans le chapitre II).

Plusieurs composés (**4-7**), isomères de l'ilimaquinone, sont isolés du genre *Dactylospongia*. Ils diffèrent de l'ilimaquinone par la position de la double liaison et la stéréochimie des carbones C-5, C-8 et C-10, mais aussi par la nature du squelette terpénique. Nous y trouvons des squelettes de type halimane (**4**), labdane (**5, 6**) ou clérodane (**7**).

Les métabolites néomamanuthaquinone  $(4)^{11}$  et isohyatellaquinone (5) (et *ent-5*)<sup>11,12</sup> sont isolés pour la première fois de *Dactylospongia* en 2008, contrairement à la spongiaquinone  $(6)^{11,13}$ 

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> R. T. Luibrand, T. R. Erdman, J. J. Vollmer, P. J. Scheuer, J. Finer, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1979**, *35*, 609–612.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> B. Carté, C. B. Rose, J. D. Faulkner, J. Org. Chem., 1985, 50, 2785–2787.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> L. Du, Y.-D. Zhou, D. G. Nagle, J. Nat. Prod., **2013**, 76, 1175–1181.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> K. W. L. Yong, A. Jankam, J. N. A. Hooper, A. Suksamrarn, M. J. Garson, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6341–6348.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Le composé (5) et son énantiomère *ent*-(5) sont isolés de deux spécimens différents de *Dactylospongia*.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup>A. Jankam, M. J. Somerville, J. N. A. Hooper, D. J. Brecknell, A. Suksamrarn, M. J. Garson, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 1577–1582.

et l'isospongiaquinone<sup>14</sup> (7) déjà connues et précédemment isolées de *Fascispongia* sp. <sup>15</sup> et *Stelospongia conulata* <sup>16</sup> respectivement (figure 3).

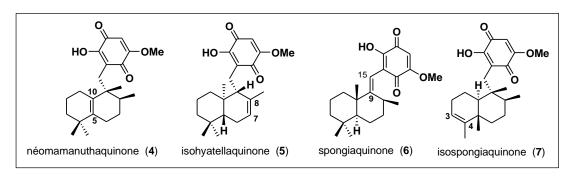


Figure 3 : structure chimique des isomères (4, 5, 6, 7) de l'ilimaquinone

D'autres études sur le genre *Dactylospongia* ont permis d'isoler des composés présentant un cyclopropane sur la partie terpénique, tels que : la dictyocératidaquinone (**8**)<sup>11</sup> et la dactylospongiaquinone (**9**) (figure 4).<sup>13</sup>

Figure 4 : structure chimique des métabolites 8 et 9

Plusieurs composés présentant un quatrième cycle (dihydropyrane ou dihydrofurane) (figure 5) entre la décaline et la quinone sont isolés. Les dactyloquinones A (**10**) et B (**11**),<sup>17</sup> isolées pour la première fois par l'équipe de Soest, d'un spécimèn de l'éponge *D. elegans* d'Okinawa, présentent un squelette terpénique type clérodane contenant un dihydropyrane cyclisé entre le C-10 et C-21. Le composé **11** est isolé de *D. elegans*, sous forme d'un seul diastéréoisomère, en 2011.<sup>18</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> M. Ishibashi, Y. Ohizumi, J.-F. Cheng, H. Nakamura, Y. Hirata, T. Sasaki, J. I. Kobayashi, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 2855–2858.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> J. C. Swersey, L. R. Barrows, C. M. Ireland, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 6687–6690.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. G. Warren, R. J. Wells, J. F. Blount, Aust. J. Chem., **1978**, 31, 2685–2697.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1506–1508.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> S. P. B. Ovenden, J. L. Nielson, C. H. Liptrot, R. H. Willis, D. M. Tapiolas, A. D. Wrigh, C. A. Motti, *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 65–68.

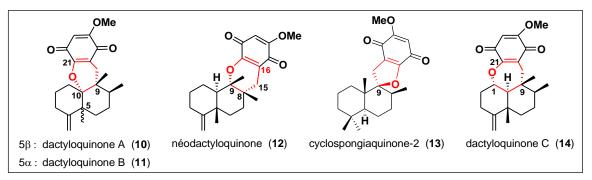


Figure 5 : structure chimique des métabolites **10, 11, 12, 13** et **14** présentant (en rouge) des motifs dihydropyrane, dihydrofurane et déhydrooxépane

En 2003, la même équipe isole la néodactyloquinone (**12**)<sup>19</sup> pour la première fois. Ce composé présente un réarrangement original au niveau du clérodane et diffère des autres métabolites isolés, nous remarquons que le pont méthylène y relit la quinone en C-16 et le clérodane en C-8 (figure 6). Ce réarrangement a déjà été observé chez des espèces du genre *Dysidea*.<sup>20</sup>

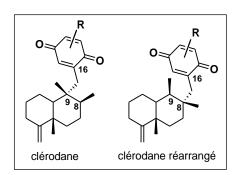


Figure 6 : structure chimique d'un clérodane et d'un clérodane réarrangé

D'autres métabolites sont isolés du genre *Dactylospongia* présentant un dihydrofurane cyclisé principalement en C-9, tels que la cyclospongiaquinone-2 (13).

Contrairement à ces composés, la dactyloquinone C (**14**) est le seul métabolite isolé de *Dactylospongia* qui présente un déhydrooxépane cyclisé entre le C-1 et C-21.<sup>21</sup>

Dans le but d'alléger cette partie bibliographique, les structures et activités biologiques des sesquiterpènes quinoniques isolées du genre Dactylospongia sont récapitulées en annexe 1.

17

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. Van Soest, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 46–50.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> C. Giannini, C. Debitus, R. Lucas, A. Ubeda, M. Payá, J. N. A. Hooper, M. V. D'Auria, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 612–615.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. Van Soest, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 1693–1696.

#### b. Sesquiterpènes phénoliques

Différentes études sur les espèces du genre *Dactylospongia* ont montré la présence de sesquiterpènes phénols (autrement dit des hydroquinones ou des quinols) (figure 7). Ainsi, les composés dictyocératine A (**15**) et C (**16**) sont isolés d'une éponge *Dactylospongia* sp. par l'équipe de Kushlan<sup>22</sup> en 1989, le composé **16** est également isolé en 1994 de *D. elegans*.<sup>23</sup>

D'autres composés (présentant une partie terpénique de type labdane et des oxydations du phénol différentes les unes des autres) sont isolés, tels que : le dactylosponol (17) et le dactylospontriol (18) isolés pour la première fois de *D. elegans* collectée en Thaïlande,<sup>21</sup> ainsi que le composé déjà connu sménodiol (19), isolé d'une éponge du genre *Smenospongia* mais aussi de *D. elegans*.<sup>24</sup>

Le dernier sesquiterpène phénolique décrit à ce jour, est le 18-hydroxy-5-*epi*-hyrtiophénol (**20**), isolé en 2014 par Proksch et ses collaborateurs de *D. metachromia*.<sup>25</sup>

Un sesquiterpène aromatique est isolé de l'éponge *D. elegans* collectée en Australie (île Pelorus) : le pélorol (21),<sup>26</sup> il présente une structure en commun avec le sménodiol (19).

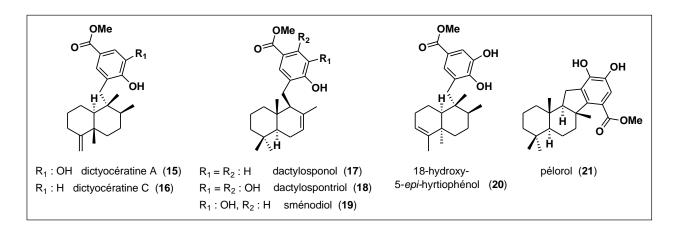


Figure 7 : structure chimique de certains sesquiterpènes phénoliques

(L'annexe 2, résume les structures chimiques des sesquiterpènes phénoliques ainsi que leurs activités biologiques).

18

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> D. M. Kushlan, J. D. Faulkner, L. Parka, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 3307–3312.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> D. Lopez, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 992–996.

 <sup>&</sup>lt;sup>24</sup> J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 6667–6680.
 <sup>25</sup> G. Daletos, N. J. de Voogd, W. E. G. Müller, V. Wray, W. Lin, D. Feger, M. Kubbutat, A. H. Aly, P. Proksch, *J. Nat. Prod.*, **2014**, *77*, 218–226.

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> E. Goclik, G. M. König, A. D. Wright, R. Kaminsky, J. Nat. Prod., **2000**, 63, 1150–1152.

#### c. Sesquiterpènes aminoquinoniques

Des sesquiterpènes aminoquinones (figure 8) présentant d'intéressantes activités cytotoxiques sont isolées de *D. elegans*, nous pouvons citer la sménospongine (22), <sup>17,21,24</sup> la sménospongidine (23), ainsi que son épimère la 5-*epi*-sménospongidine (24).

Le premier sesquiterpène benzoxazole des éponges *Dactylospongia* : le nakijinol B (**25**), est isolé en 2011 par Motti et ses collaborateurs. <sup>18</sup>

Récemment, l'équipe d'Aly et Proksch travaillait sur l'éponge *D. metachromia* afin d'isoler de nouvelles molécules actives. Lors de leur recherche, des composés présentant une partie terpénique de type clérodane sont isolés pour la première fois, tels que : le 5-*epi*-nakijinol C (26), la 5-*epi*-nakijiquinone Q (27) et la 5-*epi*-nakijiquinone U (28).

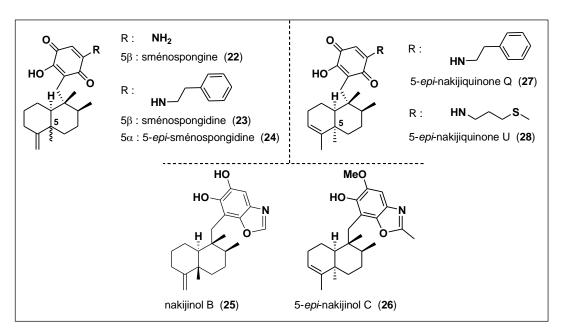


Figure 8 : structure chimique de certains sesquiterpènes aminoquinoniques

(Voir l'annexe 3, pour les structures et activités biologiques de ces métabolites).

#### d. Cas particuliers de sesquiterpènes

Dans certains cas, le motif quinonique est remplacé par une cyclopenténone, un acide tétronique ou une lactone (figure 9).

- En 1989, les dactylospongénones A-D (**29-32**) sont isolées pour la première fois d'une éponge *Dactylospongia* sp. collectée à Palaos, ils présentent le même squelette terpénique que l'ilimaquinone avec une cyclopenténone à la place de la quinone.<sup>22</sup>

Faulkner et Clardy suggéraient que ces composés étaient des artéfacts d'extraction. Des essais de conversion de l'ilimaquinone (1) en ces métabolites ont été réalisés dans des milieux acides ou basiques mais en vain.

Ces composés sont isolés par la suite par l'équipe de Rodriguez<sup>24</sup> et de Riguera.<sup>23</sup>

- Cette dernière équipe isole deux nouveaux sesquiterpènes à acide tétronique (acides dactyltroniques (33)) de l'éponge *D. elegans* (Pulan, Malaisie) sous forme de deux diastéréoisomères (1:1).
- les composés dactylolactones A-D (**34-37**) isolés pour la première fois en 2003<sup>19</sup> possèdent une γ-lactone, cette dernière est reliée au clérodane par un dihydropyrane.
- L'acide sménospongique (**38**) est isolé de plusieurs échantillons de *D. elegans* collectée aux Fidji<sup>24</sup> ou en Malaisie.<sup>23</sup>

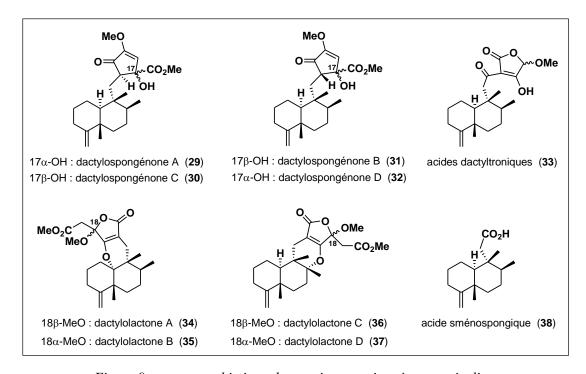


Figure 9 : structure chimique de certains sesquiterpènes particuliers

#### e. Sesquiterpènes monocycliques

Durant leur étude sur les métabolites actifs d'éponges marines, en particulier sur l'éponge *Hippospongia metachromia* (d'Okinawa), l'équipe de Kobayashi a isolé la plupart de ces sesquiterpènes. Prenons comme exemple la métachromine A (**39**)<sup>14</sup> (sesquiterpène quinonique), la métachromine G (**40**)<sup>27</sup> (sesquiterpène aminoquinonique) ou encore la métachromine B (**41**)<sup>14</sup> qui présente un noyau type chromène (figure 10).

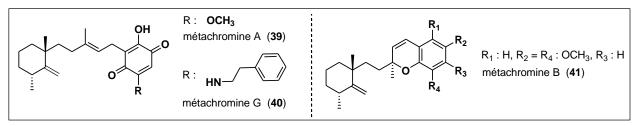


Figure 10 : exemples de sesquiterpènes monocycliques

L'annexe 5 résume les structures et activités biologiques de ces métabolites.

L'hypothèse de biosynthèse des sesquiterpènes du genre *Dactylospongia* sera étudiée plus en détails dans le chapitre II. Elle regroupera tous les sesquiterpènes isolés de ce genre.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> J. Kobayashi, K. Naitoh, T. Sasaki, H. Shigemori, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 5773–5776.

#### 3.1.2. Sesterterpènes

#### a. Sesterpènes lactoniques

Les sesterpènes représentent un cas inhabituel de terpènes avec cinq unités isopréniques.

Deux sesterpènes lactoniques (**42**, **43**) (figure 11) ayant un squelette cheïlanthane<sup>28</sup> sont isolés d'une nouvelle espèce du genre *Dactylospongia* collectée en Nouvelle Calédonie.<sup>29</sup>

Figure 11 : structure chimique des composés 42 et 43

Le schéma 2 présente l'hypothèse de biogenèse proposée par Bergquist :

Schéma 2 : hypothèse de biosynthèse des composés 42 et 43

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Squelette cheïlanthane :

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> A. R. Lal, R. C. Cambie, C. E. F. Rickard, P. R. Bergquist, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 2603–2606.

#### b. Sesterterpènes sulfatés

Les hipposulfates A (**44**) et B (**45**), sont isolés de l'éponge *Hippospongia cf. metachromia* au cours des années 80, leurs structures ne sont établies qu'en 2001 (figure 12).<sup>30</sup>

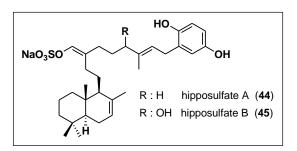


Figure 12 : structure chimique des hipposulfates 44 et 45

#### c. Furanoterpènes

Isolée pour la première fois en 1972 de l'éponge *Ircina spinosula*,  $^{31}$  la furospinosuline  $^{32}$  (**46**) (figure 13) fait partie de la famille des furanoterpènes. Elle est isolée de l'éponge D.  $elegans^{11,33}$  et a fait l'objet de toute une étude biologique, de synthèse, et de modulations structurales.  $^{33}$ 

Figure 13 : structure chimique de la furospinosuline 1

#### 3.2. Macrolides

En 2001, Cutignano et ses collaborateurs<sup>34</sup> isolent d'une *Dactylospongia* sp. le dactylolide (47) (figure 14). Deux synthèses totales de ce macrolide cytotoxique sont publiées par la suite.<sup>35,36</sup>

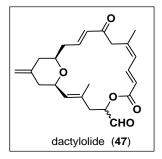


Figure 14: structure chimique du dactylolide

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> M. Musman, I. I. Ohtani, D. Nagaoka, J. Tanaka, T. Higa, J. Nat. Prod., **2001**, 64, 350–352.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> G. Cimino, S. De Stefano, L. Minale, *Tetrahedron*, **1972**, 28, 1315–1324.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Le métabolite **furospinosuline 1** est retrouvé dans la littérature plusieurs fois sous le nom de furospinulosine 1, cette dernière dénomination est incorrecte.

<sup>33</sup> N. Kotoku, S. Fujioka, C. Nakoto, M. Verrada, W. C. Ville, T. W. C.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> N. Kotoku, S. Fujioka, C. Nakata, M. Yamada, Y. Sumii, T. Kawachi, M. Arai, M. Kobayashi, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 6673–6678.

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> A. Cutignano, I. Bruno, G. Bifulco, A. Casapullo, C. Debitus, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 775–778.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> C. C. Sanchez, G. E. Keck, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 3053–3056.

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> L. Kiyoun, K. Hyoungsu, H. Jiyong, Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 124, 5833–5836.

# 4. Conclusion : récapitulatif des substances naturelles par types structuraux

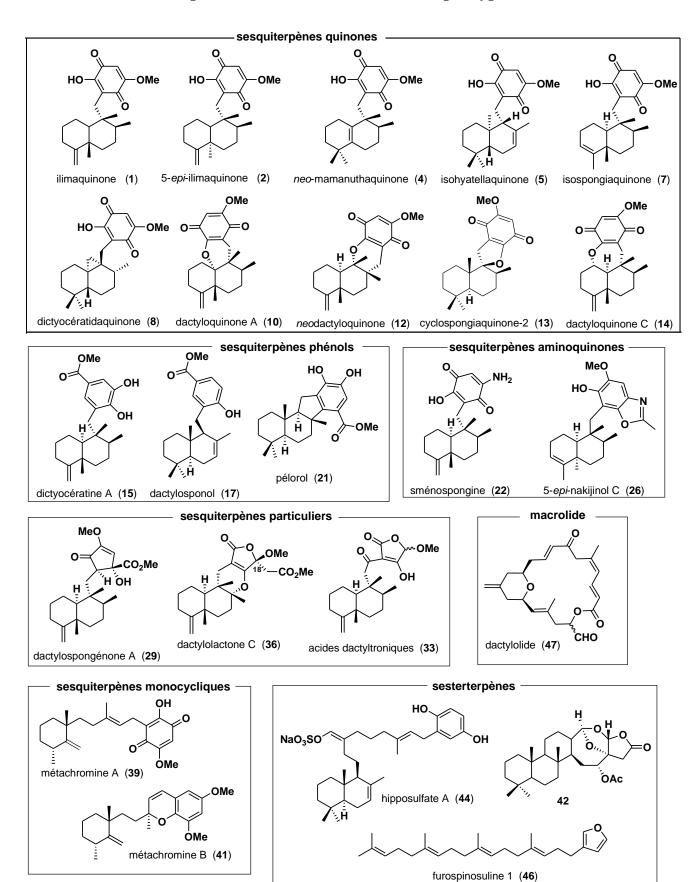


Figure 15 : récapitulatif des métabolites secondaires isolés des éponges du genre Dactylospongia

#### Bibliographie et notes de l'introduction générale et du chapitre I

- E. Quévrain, I. Domart-Coulon, M.-L. Bourguet-Kondracki, **2014**, in *Natural Products: Discourse, dievrsity, and Design*, (Eds A. Osbourn, R. Goss, G. T. Carter) Wiley-Blackwell, pp 39–60.
- J.-M. Kornprobst, **2014**, in *Encyclopedia of Marine Natural Products*, (Eds J.-M. Kornprobst) John Wiley and Sons, pp 521–523.
- S. de C. Cook, P. R. Bergquist, **2002**, in *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges* (Eds J. N. A. Hooper, R. W. M. van Soest), Springer, pp 1037–1038.
- <sup>4</sup> J. H. Kwak, F. J. Schmitz, M. Kelly, J. N. Prod., **2000**, 63, 1153–1156.
- <sup>5</sup> Conule : protubérance conique du tégument des éponges.
- <sup>6</sup> Pinacoderme : une des deux couches de cellules qui constitue l'éponge.
- Oscule : orifice exhalant de l'éponge.
- <sup>8</sup> R. T. Luibrand, T. R. Erdman, J. J. Vollmer, P. J. Scheuer, J. Finer, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1979**, *35*, 609–612.
- <sup>9</sup> B. Carté, C. B. Rose, J. D. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2785–2787.
- <sup>10</sup> L. Du, Y.-D. Zhou, D. G. Nagle, J. Nat. Prod., **2013**, 76, 1175–1181.
- K. W. L. Yong, A. Jankam, J. N. A. Hooper, A. Suksamrarn, M. J. Garson, *Tetrahedron*, 2008, 64, 6341–6348.
- Le composé (5) et son énantiomère *ent*-(5) sont isolés de deux spécimens différents de *Dactylospongia*.
- A. Jankam, M. J. Somerville, J. N. A. Hooper, D. J. Brecknell, A. Suksamrarn, M. J. Garson, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 1577–1582.
- M. Ishibashi, Y. Ohizumi, J.-F. Cheng, H. Nakamura, Y. Hirata, T. Sasaki, J. I. Kobayashi, J. Org. Chem., 1988, 53, 2855–2858.
- <sup>15</sup> J. C. Swersey, L. R. Barrows, C. M. Ireland, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 6687–6690.
- <sup>16</sup> R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. G. Warren, R. J. Wells, J. F. Blount, *Aust. J. Chem.*, **1978**, *31*, 2685–2697.
- H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, J. Nat. Prod., 2001, 64, 1506–1508.
- S. P. B. Ovenden, J. L. Nielson, C. H. Liptrot, R. H. Willis, D. M. Tapiolas, A. D. Wrigh, C. A. Motti, *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 65–68.
- H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, J. Nat. Prod., 2003, 66, 46–50.
- <sup>20</sup> C. Giannini, C. Debitus, R. Lucas, A. Ubeda, M. Payá, J. N. A. Hooper, M. V. D'Auria, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 612–615.
- H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, *Tetrahedron*, 2002, 58, 1693–1696.
- <sup>22</sup> D. M. Kushlan, J. D. Faulkner, L. Parka, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 3307–3312.
- D. Lopez, E. Quinoa, R. Riguera, J. Nat. Prod., **1994**, 57, 992–996.
- J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, 1992, 48, 6667–6680.
- <sup>25</sup> G. Daletos, N. J. de Voogd, W. E. G. Müller, V. Wray, W. Lin, D. Feger, M. Kubbutat, A. H. Aly, P. Proksch, *J. Nat. Prod.*, **2014**, *77*, 218–226.
- <sup>26</sup> E. Goclik, G. M. König, A. D. Wright, R. Kaminsky, J. Nat. Prod., **2000**, 63, 1150–1152.
- <sup>27</sup> J. Kobayashi, K. Naitoh, T. Sasaki, H. Shigemori, J. Org. Chem., **1992**, 57, 5773–5776.

Squelette cheïlanthane :

- <sup>29</sup> A. R. Lal, R. C. Cambie, C. E. F. Rickard, P. R. Bergquist, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 2603–2606
- <sup>30</sup> M. Musman, I. I. Ohtani, D. Nagaoka, J. Tanaka, T. Higa, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 350–352.
- <sup>31</sup> G. Cimino, S. De Stefano, L. Minale, *Tetrahedron*, **1972**, 28, 1315–1324.
- Le métabolite **furospinosuline 1** est retrouvé dans la littérature plusieurs fois sous le nom de furospinulosine 1, cette dernière dénomination est incorrecte.
- N. Kotoku, S. Fujioka, C. Nakata, M. Yamada, Y. Sumii, T. Kawachi, M. Arai, M. Kobayashi, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 6673–6678
- A. Cutignano, I. Bruno, G. Bifulco, A. Casapullo, C. Debitus, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 775–778.
- <sup>35</sup> C. C. Sanchez, G. E. Keck, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 3053–3056.
- <sup>36</sup> L. Kiyoun, K. Hyoungsu, H. Jiyong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *124*, 5833–5836.

# **Chapitre II**

Les ilimaquinones de *Dactylospongia*metachromia: extraction, séparation et
hypothèse de biosynthèse

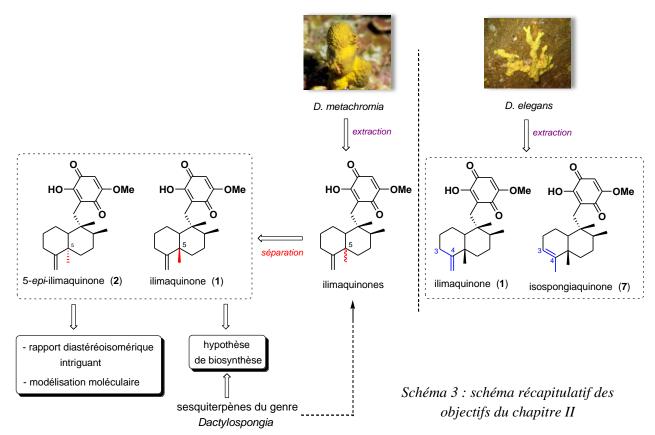
# 1. Introduction

ans la littérature de la chimie marine, de nombreux sesquiterpènes quinones/quinols sont décrits à partir des éponges, en particulier des éponges des familles *Dysideae*, *Thorectidae* et *Spongidae* (ordre des *Dictyoceratidae*). En plus de leurs diverses activités biologiques, ils présentent une grande et impressionnante diversité structurale. Ceci a attiré notre attention sur leur voie de biosynthèse, en particulier sur celle des sesquiterpènes du genre *Dactylospongia*.

Dans ce chapitre (schéma 3), nous décrirons, dans un premier temps, les hypothèses de biogenèse de ces métabolites, puis, dans un second temps, nous nous focaliserons sur les métabolites majoritaires de l'éponge *D. metachromia* : les **ilimaquinones**, pour lesquelles divers points seront abordés :

- extraction et séparations ;
- étude d'un rapport diastéréoisomérique intriguant ;
- hypothèses de biosynthèse et étude de modélisation moléculaire.

De plus, l'éponge *D. elegans* sera, elle aussi, étudiée pour déterminer son métabolite majoritaire.



# 2. Nos hypothèses de biosynthèse des sesquiterpènes de Dactylospongia

#### 2.1. Précurseur biosynthétique des sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont généralement biosynthétisés *via* la voie du mévalonate, plutôt que celle du méthylérythritol phosphate. Après addition d'une unité de diphosphate d'isopentényle (IPP) au diphosphate de géranyle (GPP) *via* un assemblage de type « têtequeue », le diphosphate de farnésyle (FPP) est obtenu (schéma 4).

Schéma 4 : schéma biosynthétique du diphosphate de farnésyle

Le précurseur biosynthétique des sesquiterpènes quinones/quinols (48) est obtenu après alkylation du FPP avec un substrat aromatique précurseur des futures quinones *via* l'action de prényltransférases aromatiques (figure 16).

Figure 16 : précurseur biosynthétique typique des sesquiterpènes quinones/quinols (48)

Ce précurseur acyclique et achiral donne naissance à des sesquiterpènes linéaires et/ou cycliques (mono- ou bi-cycliques) avec des configurations des cycles et des stéréochimies des carbones asymétriques très variées. Cette diversité est dépendante de la géométrie tridimensionnelle du site actif de l'enzyme terpène cyclase.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, *19*, 181–222.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> P. M. Dewick, Nat. Prod. Rep., 2002, 19, 181–222.

La cyclisation cationique du précurseur biosynthétique (48) permettrait d'obtenir trois intermédiaires carbocationiques (A-C) (schéma 5), la stéréochimie de leurs centres asymétriques dépend de la conformation initiale du précurseur en question, <sup>2</sup> en effet :

- une conformation initiale type "chaise/chaise" du précurseur (48), permet d'obtenir l'intermédiaires A;
- une conformation type "chaise/bateau" donne l'intermédiaire **B**;
- une conformation initiale type "chaise/chaise" et une seule cyclisation de (48) donne l'intermédiaire C.

Ces quatre intermédiaires carbocationiques (**A-C**) peuvent expliquer les squelettes des sesquiterpènes isolés du genre *Dactylospongia* (schéma 5).

Schéma 5 : hypothèse de biosynthèse des intermédiaires carbocationiques A-C

#### 2.2. Hypothèse de biosynthèse à partir des intermédiaires A-C

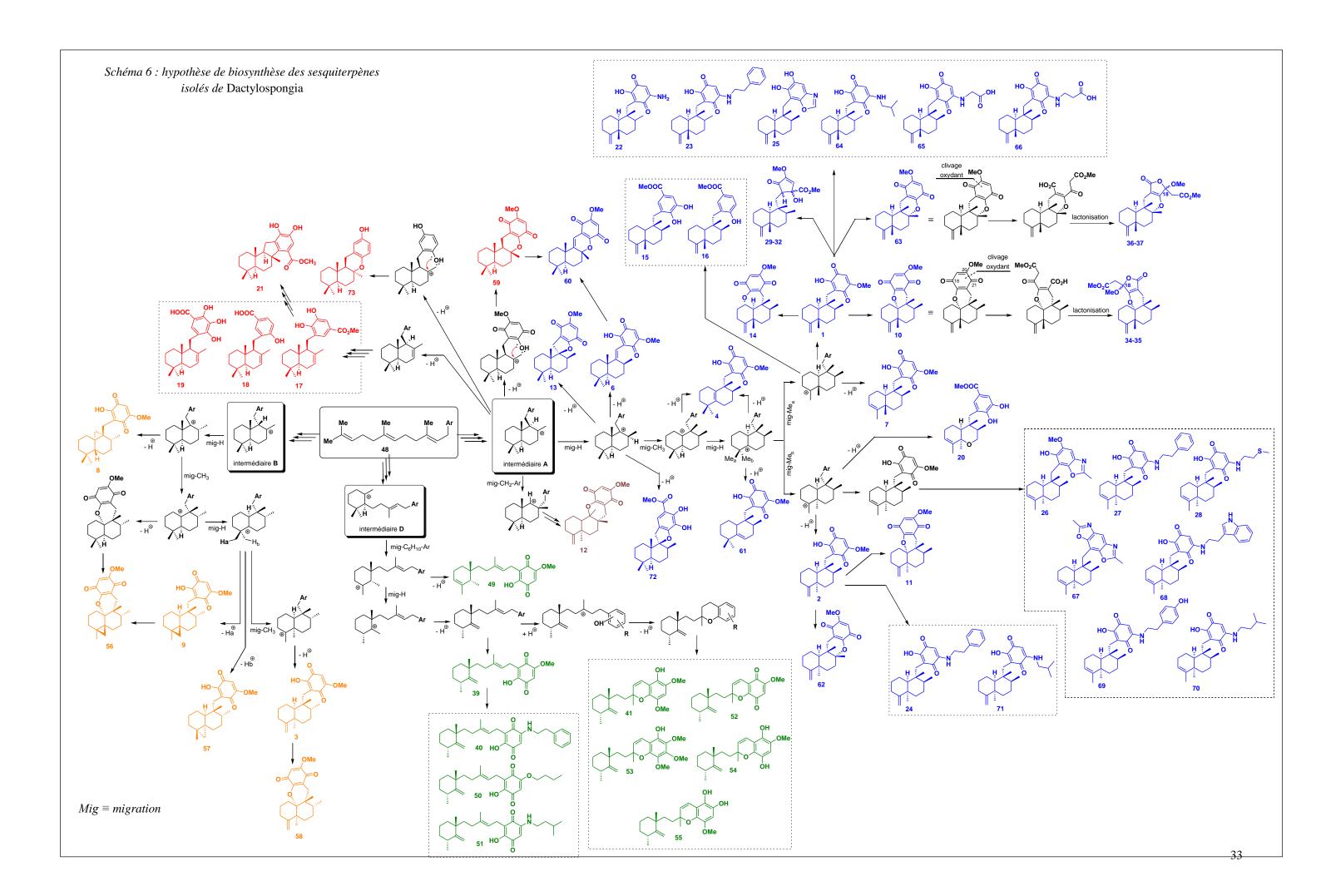
Le schéma 6 illustre l'hypothèse de biosynthèse des sesquiterpènes dans le genre Dactylospongia en partant des trois intermédiaires mentionnés ci-dessus.

Prenons l'exemple de l'intermédiaire **A**, qui explique à lui seul la biosynthèse de la majorité de ces sesquiterpènes, suite à différentes combinaisons de migrations d'hydrures et/ou de méthyles (réarrangement de Wagner-Meerwein) (partie bleu du schéma 6).

- Nous pouvons remarquer que l'ilimaquinone (1) peut être considérée comme le précurseur de certains de ces composés, tels que :
- Les composés **29-32** : Kushlan suggère qu'ils sont obtenus par contraction de cycle de l'ilimaquinone (1).<sup>3</sup>
- Une substitution nucléophile du méthoxyle par des groupements amine donne les composés aminoquinoniques.
- Les composés 10, 14 et 63, qui, par une cyclisation électrophile, sont obtenus.
- L'hypothèse de voie de biosynthèse des dactylolactones A (34) et B (35) (dactylolactones C (36) et D (37)) proposée implique un clivage oxydant entre les carbones C-20 et C-21 de la dactyloquinone A (10) (dactyloquinone D (63)), l'acide céto-carboxylique obtenu subit une lactonisation donnant naissance aux composés 34 et 35 (36 ou 37).

<sup>4</sup> H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. Van Soest, J. Nat. Prod., 2003, 66, 46–50.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> D. M. Kushlan, D. J. Faulkner, L. Parka, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 3307–3312.



- L'intermédiaire C permet la formation des sesquiterpènes monocycliques (partie verte du schéma 6) après une migration d'une unité CH<sub>2</sub>-isopentyle *via* un réarrangement de Wagner-Meerwein. Nous remarquons que ces composés sont isolés d'une éponge qui est collectée uniquement d'Okinawa, ils peuvent, peut-être, être considérés comme des marqueurs chimio-taxonomiques.
- L'intermédiaire *ent-*A explique la formation des composés **74**, **75**, **76** et **77** (schéma 7).

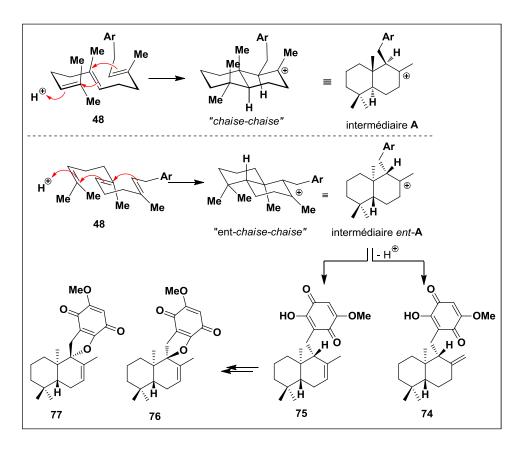


Schéma 7 : hypothèses de biosynthèse des sesquiterpènes **74-77** à partir de l'intermédiaire ent-**A** 

La présence de composés sesquiterpénoides énantiomères au sein du même genre d'organismes marins est très rare et intéressante.<sup>5</sup>

Dans le but de comprendre la biosynthèse des métabolites énantiomères de manière générale, beaucoup d'études sont entreprises, principalement sur les monoterpènes, où les recherches montrent la présence de deux terpènes cyclases énantiomères, soit dans la même espèce ou dans le même genre.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> K. W. L. Yong, A. Jankam, J. N. A. Hooper, A. Suksamrarn, M. J. Garson, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6341–6348.

Mais de manière intérrésante, on peut remarquer la présence de substances énantiomères dans des sources différentes. En effet, des sesquiterpènes sont isolés de sources terrestres alors que leurs énantiomères de sources marines. L'article de revue de Williams résume les substances naturelles énantiomères par rapport à leur voie de biosynthèse.<sup>6</sup>

# 3. Étude biobliographique des ilimaquinones

#### 3.1. Introduction

L'ilimaquinone (1) est une molécule présente dans la majorité des spécimens de *Dactylospongia*. Elle représente le métabolite secondaire majoritaire dans les extraits de ces derniers.

Sa structure est décrite pour la première fois en 1979 par Luibrand *et al.*<sup>7</sup> à partir de l'éponge *Hippiospongia [sic] metachromia* collectée à Ohau, sauf que sa stéréochimie absolue attribuée alors sur la base d'analyse du dichroïsme circulaire est incorrecte. Il faut attendre 1987 pour que Capon attribue la bonne stéréochimie absolue par dégradation chimique de l'auréol.<sup>8</sup>

D'un point de vue structural, l'ilimaquinone (1) est un sesquiterpène quinonique présentant une partie terpénique de type clérodane "décorée" par une *para*-quinone fonctionnalisée, elle est connue pour sa couleur dépendante du pH (jaune en milieu acide et violette en milieu basique) et incolore en milieu réducteur. Par ailleurs, comme précédemment évoqué (page 14), deux diastéréoisomères de l'ilimaquinone sont décrits, à savoir : la 5-*epi*-ilimaquinone (2) et la 5,8-*di-epi*-ilimaquinone (3) (schéma 8).

<sup>8</sup> R. J. Capon, J. K. MacLeod, *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 5059–5060.

35

J. M. Finefield, D. H. Sherman, M. Kreitman, R. M. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 4802–4836.
 R. T. Luibrand, T. R. Erdman, J. J. Vollmer, P. J. Scheuer, J. Finer, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1979**, *35*, 609–612.

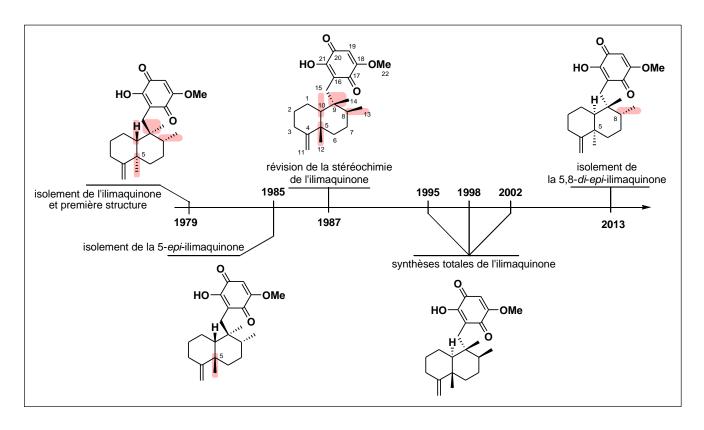


Schéma 8 : résumé chronologique des découvertes autour des ilimaquinones

#### 3.2. Activités biologiques de l'ilimaquinone

L'ilimaquinone (1) présente de nombreuses activités biologiques et est largement étudiée pour son fort pouvoir de fragmentation du système de Golgi, son interférence sur le trafic intracellulaire des protéines, <sup>9-18</sup> ainsi que son activité anti-VIH. <sup>19-20</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> P. A. Takizawa, J. K. Yucel, B. Veit, D. J. Faulkner, T. Deerinck, G. Soto, M. Ellisman, V. Mlahotra, *Cell*, **1993**, *73*, 1079–1090.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> B. Veit, J. Yucel, V. Malhotra, *J. Cell Biol.*, **1993**, *122*, 1197–1206.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> C. Jamora, P. A. Takizawa, R. F. Zaarour, C. Denesvre, D. J. Faulkner, V. Malhotra, *Cell*, **1997**, *91*, 617–626.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> R. L. Casaubon, M. L. Snapper, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 133–136.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> V. Cruciani, E. Leithe, S.-O. Mikalsen, *Exp. Cell Res.*, **2003**, 287, 130–142.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> H. Sonoda, T. Okada, S. Jahangeer, S.-I. Nakamura, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 34085–34092.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> H.-J. Wang, N. Benlimame, I. R. Nabi, *J. Cell Sci.*, **1997**, *110*, 3043–3053.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> C. Poüs, K. Chabin, A. Drechou, L. Barbot, T. Phung-Koskas, C. Settegrana, M.-L. Bourguet-Kondracki, M. Maurice, D. Cassio, M. Guyot, G. Durand, *J. Cell Biol.*, **1998**, *142*, 153–165.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> H.S. Radeke, C. A. Digits, R. L. Casaubon, M. L. Snapper, *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, 639–647.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> P. A. Feldman, J. Kim, D. W. Laird, *J. Membrane Biol.*, **1997**, 155, 275–287.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> S. Loya, R. Tal, Y. Kashman, A. Hizi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, *34*, 2009–2012.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> S. Loya, A. Hizi, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 9323–9328.

Des analogues de l'ilimaquinone ont été préparés et utilisés pour l'étude de la photo-affinité des interactions cellulaires de l'ilimaquinone<sup>21</sup> et contre l'inhibition des *S*-adénosylhomocystéine hydrolases.<sup>22</sup> Elle inhibe également la cytotoxicité de toxines telles que la ricine ou la toxine diphtérique et d'autres.<sup>23</sup> Elle montre aussi un effet antiprolifératif sur plusieurs lignées cancéreuses. Pour ne pas surcharger cette partie, les résultats bibliographiques obtenus sont résumés en annexe 2.<sup>24</sup>

#### 3.3. Synthèses totales de l'ilimaquinone

Par son large éventail d'activités biologiques que nous venons d'évoquer, l'ilimaquinone (1) a attiré l'attention des chimistes organiciens et a fait l'objet de trois synthèses totales réalisées à ce jour (schéma 9).

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> H. S. Radeke, M. L. Snapper, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 1227–1232.

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> B. G. Kim, T. G. Chun, H.-Y. Lee, M. L. Snapper, *Bioorg, Med. Chem.*, **2009**, *17*, 6707–6714.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> M. P. Nambiar, H. C. Wu, *Exp. Cell Res.*, **1995**, *219*, 671–678.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Vu le large panel d'activités qu'elle présente, elle est commercialisée chez « *Santa Cruz Biotechnology* » à 134 euros les 100 μg. http://www.scbt.com/fr/datasheet-200864-ilimaquinone.html

Le schéma rétrosynthétique de ces synthèses totales est illustré ci-après :

Schéma 9 : rétrosynthétique des synthèses totales de l'ilimaquinone (1) (a) : stratégie de Snapper<sup>26</sup> (b) : stratégie de Samadi,<sup>27</sup> (c) : stratégie de Theodorakis.<sup>28</sup>

Ces synthèses sont détaillées dans des articles de revues auxquels on peut se rapporter.<sup>25</sup>

Après alkylation réductrice du composé de départ (une cétone dite de "Wieland-Miescher")

(78) avec une quinone masquée (79-80) les intermédiaires 71 et 72 sont obtenus

\_

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> M. Gordaliza, *Mar. Drugs*, **2012**, *10*, 358–402.

respectivement. Une fonctionnalisation par la suite de la décaline et une oxydation de la quinone masquée permettent d'obtenir l'ilimaquinone (1).<sup>26,27</sup>

Contrairement à ces deux équipes, l'équipe de Theodorakis a opté pour une stratégie plus originale : après fonctionnalisation du point de départ (78), une décarboxylation photochimique de l'intermédiaire 83 et une addition d'une benzoquinone sont réalisées. La fonctionnalisation de cette dernière permet l'obtention de l'ilimaquinone (1).<sup>28</sup>

# 4. Travail personnel

# 4.1. Récolte et identification des éponges D. metachromia et D. elegans

102 échantillons de *D. metachromia* ont été collectés par le Dr Cécile Debitus de l'IRD de différentes localisations en Polynésie française. Nous en comptons neuf : Tetiaroa de l'archipel de la Société, Tikehau, Rangiroa, Toau, Tematangi, Fakarava, Hereheretue et Anuanurano de l'archipel des Tuamotu (collectés entre le 28 avril et le 1 juin 2011) et l'archipel des Gambiers (collectés entre le 29 septembre et le 7 octobre 2010). En superficie de prélèvements couverte et en nombre d'échantillons prélevés, c'est probablement une des plus grandes études menées à ce jour pour une même éponge et par une même équipe. Concernant l'éponge *D. elegans*, des échantillons sont collectés entre le 29 août 2009 et le 12 septembre 2009 dans l'archipel des Marquises, sur trois atolls : Nuku Hiva, Tahuata et Fatu Hiva (carte 1).

39

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> S. D. Bruner, H. S. Radeke, J. A. Tallarico, M. L. Snapper, J. Org. Chem., **1995**, 60, 1114–1115.

S. Poigny, M. Guyot, M. Samadi, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 5890–5894.
 T. Ling, E. Poupon, E. J. Rueden, E. A. Theodorakis, *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 819–822.



Carte 1 : sites de collecte des éponges D. metachromia et D. elegans (en fond, la superficie correspondante sur la carte de l'Europe)

# 4.2. Extraction et purification

Une des éponges *D. metachromia* collectées à Tematangi est coupée en petits morceaux d'environ 1 cm, puis extraite trois fois avec un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:1). Les extraits bruts obtenus sont rassemblés et concentrés, puis une extraction liquide-liquide « H<sub>2</sub>O-AcOEt » est réalisée afin d'éliminer le maximum de sels. Le contre-extrait à l'AcOEt est concentré puis fractionné par chromatographie sur gel de silice, en éluant avec un gradient de solvant de 100 % EP à 100 % AcOEt, puis à (9:1, v:v) AcOEt-MeOH, pour récupérer 4 fractions (F-I, -II, -III, -IV) réunies selon leur profil CCM (schéma 10).

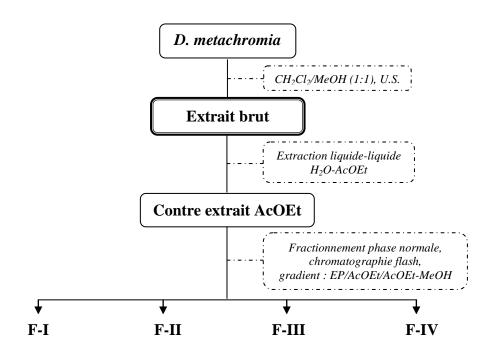


Schéma 10 : schéma général d'extraction et de fractionnement de l'extrait brut de D. metachromia

#### **♦ Identification de la furospinosuline 1 (46)**

La fraction F-I correspond à la furospinosuline 1 (figure 17). Cette dernière est isolée sous forme d'une huile jaunâtre optiquement inactive.

L'étude du spectre RMN-<sup>1</sup>H, -<sup>13</sup>C et la RMN bidimensionnelle du composé **46** a permis de confirmer sa structure, en distinguant les différents signaux suivants :

- les signaux typiques des protons d'un cycle furane avec : un singulet élargi à 7,20 ppm (1 H, **H**-4) et un triplet à 7,33 ppm (1 H, **H**-1, 1,5 Hz) attribués au deux hydrogènes en  $\alpha$  de l'éther, et un singulet élargi à 6,28 ppm attribué à un hydrogène en  $\beta$  de l'éther, correspondant à l'hydrogène **H**-2 ;
- le signal à 2,45 ppm (t, 7,32 Hz), intégrant pour 2 H correspond au méthylène relié directement au cycle furane ( $\mathbf{H}_2$ -5);
- un multiplet large intégrant pour 3 H à 5,11 ppm correspondant au CH=C (H-12, -17, -22);
- un multiplet à 2,08 ppm intégrant pour 6 H et correspondant au méthylène en  $\alpha$  de la double liaison ( $\mathbf{H}_2$ -11, -16, -21) ;
- un singulet à 1,7 ppm intégrant pour 3 H correspond au méthyle terminal d'une unité isoprène ( $\mathbf{H}_3$ -25);
- un singulet large à 1,6 *ppm*, intégrant pour 12 H correspond au méthyle en *trans* d'une double liaison (**H**<sub>3</sub>-9, -14, -19, -24) ;
- le multiplet à 1,99 ppm intègre pour 6 H et correspond aux méthylènes en  $\beta$  de la double liaison ( $\mathbf{H}_2$ -10, -15, -20) ;
- le signal à 5,18 ppm (td, 7;  $\approx$  1 Hz), correspond à l'hydrogène en position 7, ce dernier corrèle en COSY avec le signal à 2,25 ppm, et en HMBC avec les carbones C-9, C-6 et C-10;
- le signal à 2,25 ppm, correspond au méthylène en position 6.

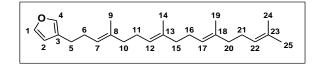


Figure 17 : structure de la furospinosuline 1 (46) isolée

#### **♦** Séparation et identification des ilimaquinones (1) et (2)

La fraction F-III présente le même profil CCM (couleur de la tache, rapport frontal) avec le témoin d'ilimaquinone (obtenu par Cécile Debitus), cette fraction est obtenue sous forme

d'une laque jaune orangée, avec un rendement de 3,6 % par rapport à la masse sèche de l'éponge.

Le spectre de masse haute résolution de cette fraction a montré un ion moléculaire m/z de  $381,2223 \, [\text{M+Na}]^+$  correspondant à la formule brute de l'ilimaquinone ( $C_{22}H_{30}O_4+\text{Na}$ ).

Cependant, le spectre RMN-<sup>1</sup>H de cette fraction a montré un dédoublement des signaux (figure 19). Une analyse CLHP-SM de cette fraction n'a montré la présence que d'un seul pic avec une masse de 381.

Des travaux antérieurs ont déjà montrés le co-isolement de l'ilimaquinone avec son épimère : la 5-*epi*-ilimaquinone. D'après les données RMN fournies par la littérature, la différence est nettement marquée au niveau des signaux des deux singulets à 4,42 et 4,44 *ppm* pour l'ilimaquinone (1) et à 4,67 et 4,70 *ppm* pour la 5-*epi*-ilimaquinone (2) (Figure 18).

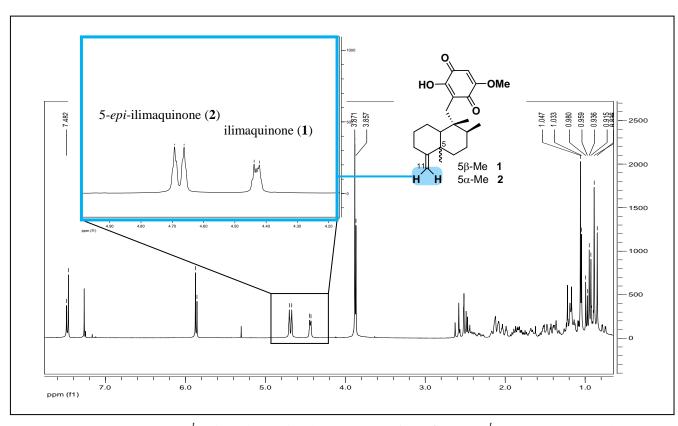


Figure 18: spectre RMN-<sup>1</sup>H du mélange des ilimaquinones (1) et (2) (RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz), CDCl<sub>3</sub>)

La séparation du mélange ilimaquinone (1) / 5-epi-ilimaquinone (2) (que l'on nommera « mélange M ») n'a pas pu être réalisée sans l'utilisation de nitrate d'argent.

Une chromatographie de gel de silice imprégnée au nitrate d'argent a préalablement permis à Garson<sup>4</sup> de séparer des sesquiterpènes quinones isolés de l'éponge *D. elegans*, dont le composé 7,8-déhydro-cyclospongiaquinone-2 (**84**) et son épimère en position 9 (**85**) (figure 19).

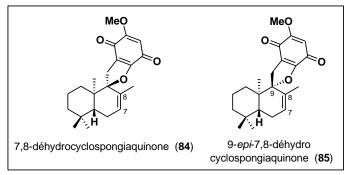


Figure 19 : structure chimique des composés 84 et 85

Cette méthode est utilisée pour la séparation d'oléfines substituées, en particulier les lipides, en formant des complexes avec les liaisons  $\pi$ . 29,30

Pour ce qui nous concerne, la figure 20 montre une CCM sur silice du mélange **M** et une CCM imprégnée au nitrate d'argent du même mélange, où l'on remarque désormais **une parfaite résolution**.

Des colonnes « flash » de silice imprégnée au nitrate d'argent ont donc été réalisées afin de séparer de plus grandes quantités, le seul inconvénient avec cette méthode, est la

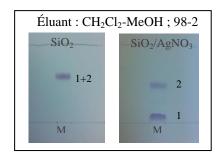


Figure 20 : profil CCM du mélange **M** 

perte en masse des deux métabolites à cause de leur complexation avec le nitrate d'argent.

Après séparation de l'ilimaquinone de son épimère en position 5, leurs données spectroscopiques sont comparables en tout point avec celles des données bibliographiques. Le tableau 1 résume les données RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C de ces deux molécules. Comme cité précédemment, une nette différence est observée au niveau du déplacement chimique des hydrogènes portés par le C-11, et du déplacement chimique du carbone C-12 (20,5 *ppm* pour l'ilimaquinone et 33,1 pour la 5-*epi*-ilimaquinone).

<sup>30</sup> R. Wilson, J. R. Sargent, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 905, 251–257.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> J. Y.-K. Hsieh, D. K. Welch, J. G. Turcotte, *Anal. Chim. Acta*, **1981**, *123*, 41–44.

Tableau 1 : comparaison des données RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C des composés 1 et 2\*

ilimaquinone (1)		5-epi-ilimaquinone (2)		
numéro du carbone	HO $\frac{21}{20}$ $\frac{19}{17}$ $\frac{18}{18}$ OMe $\frac{15}{16}$ $\frac{1}{16}$		HO $\frac{21}{20}$ $\frac{19}{18}$ OMe $\frac{15}{16}$ $\frac{16}{16}$ $\frac{1}{16}$	
	$\delta$ C	$\delta$ H	δC	$\delta$ H
1	23,1	1,42 2,07	22,4	1,84 2,15
2	28,6	1,14 1,84	24,9	1,66
3	32,9	2,04 2,3	32,0	2,1 2,42
4	160,4	-	153,3	-
5	40,4	-	39,5	-
6	36,6	1,32 1,5	37,9	1,1; dd; ${}^{3}J = 13.9$ ; 3,2 2,0
7	27,9	1,37	27,8	1,19 1,50
8	38,0	1,14	39,5	1,18
9	43,2	-	44,9	-
10	50,0	$0.75$ ; dd; ${}^{3}J = 12$ ; $1.8$ Hz	48,5	1,17
11	102,4	4,40 ; s élargi 4,42 ; s élargi	105,7	4,66 ; s élargi 4,69 ; s élargi
12	20,5	1,02	33,1	1,05
13	17,8	$0.95 ; d; ^3J = 6.4 Hz$	18,6	$0.92 ; d; {}^{3}J = 6.2 Hz$
14	17,3	0,82	18,2	0,87
15	32,3	2,45; d; ${}^{2}J = 13,7 \text{ Hz}$ 2,52; d; ${}^{2}J = 13,7 \text{ Hz}$	32,7	2,49; d; ${}^{2}J = 13,7 \text{ Hz}$ 2,59; d; ${}^{2}J = 13,7 \text{ Hz}$
16	117,3	-	117,6	-
17	182,3	-	182	-
18	161,6	-	161,7	-
19	102,4	5,83	102	5,88
20	182	-	182	-
21	153,3	-	153,3	-
22 (OMe)	56,8	3,84	56,8	3,87
ОН	-	7,51	-	7,45

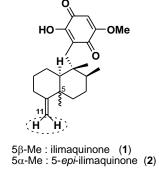
<sup>\*</sup> RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) et -<sup>13</sup>C (100 MHz), CDCl<sub>3</sub>, δ en *ppm* 

Le rendement d'extraction du mélange **M** est supérieur à 3 %, c'est un résultat assez exceptionnel pour un métabolite spécialisé d'éponges marines. Les composés **1** et **2** sont les produits majoritaires de cette éponge, ils sont extraits à l'échelle du gramme au laboratoire. Lors de nos extractions, nous remarquons que le rendement des deux épimères change d'un extrait à un autre, ce résultat très intriguant nous a conduits à une étude plus approfondie et qui est présentée ci-après.

# 4.3. Étude du ratio ilimaquinone/5-epi-ilimaquinone

Afin de déterminer le rapport diastéréoisomérique ilimaquinone/5-epi-ilimaquinone, les deux éponges du genre *Dactylospongia* sont étudiées : *D. metachromia* et *D. elegans*, collectées en Polynésie française.

Dans la pratique, ce rapport diastéréoisomérique est évalué rapidement par analyse RMN-<sup>1</sup>H sur l'extrait brut réalisé par extraction à l'éther diéthylique, l'intégration des deux hydrogènes portés par le carbone C-11 (CH<sub>2</sub>-11; **1** : 4,40 et 4,42 *ppm*; **2** : 4,66 et 4,69 *ppm*) nous permet de calculer le pourcentage relatif de chaque épimère.



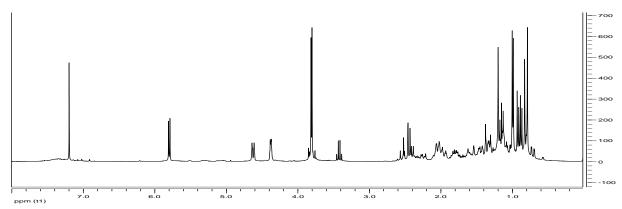


Figure 21 : spectre RMN-<sup>1</sup>H de l'extrait brut à l'éther diéthylique d'un échantillon de D. metachromia

#### 4.3.1. Dactylospongia metachromia

Les 102 échantillons de *D. metachromia* cités précédemment sont étudiés.

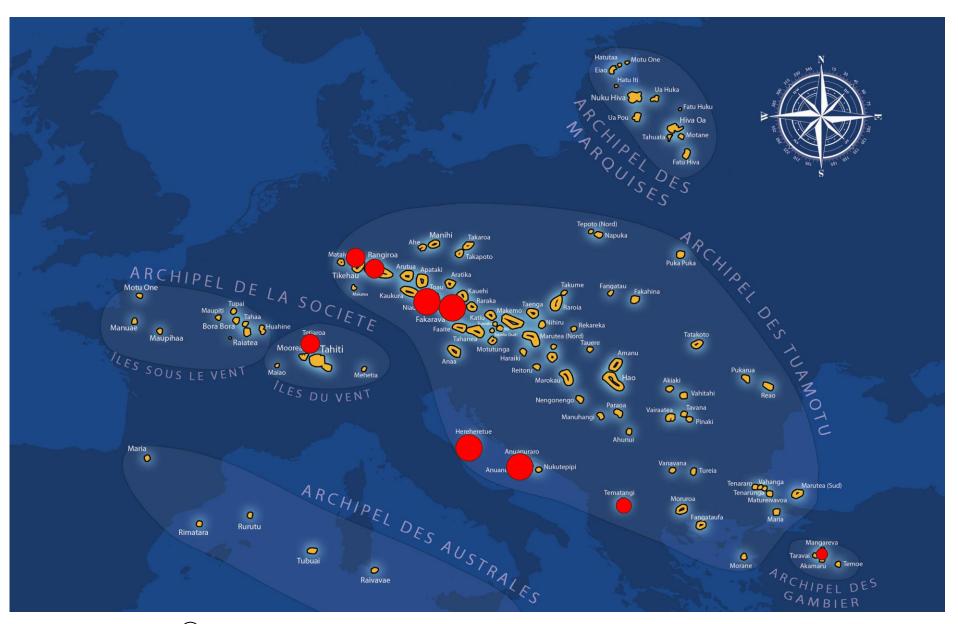
Après analyse des différents extraits par RMN-<sup>1</sup>H, nous remarquons une nette différence entre les différentes localisations, allant de 100 % d'ilimaquinone pour les échantillons de Toau, Hereheretue et Anuanurano à 10 % pour ceux de l'archipel de Gambiers. Pour une même

localisation, des variations entre les spécimens sont également observées. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : résultat de l'étude du ratio diastéréoisomérique entre 1 et 2 des éponges D. metachromia

Localisation	nombre d'échantillons	% ilimaquinone*	% 5-epi-ilimaquinone*
Tetiaroa	15	$61,5 \pm 6,2$	$38,5 \pm 6,2$
Tikehau	18	$77,7 \pm 5,2$	$22,3 \pm 5,2$
Rangiroa	10	$76,7 \pm 2,1$	$23,3 \pm 2,1$
Toau	8	$100 \pm 0$	$0\pm0$
Fakarava	16	$87,6 \pm 10,8$	$12,4 \pm 10,8$
Hereheretue	5	$100 \pm 0$	$0\pm0$
Anuanurano	4	$100 \pm 0$	$0\pm0$
Tematangi	19	$43,4 \pm 6$	$56,5 \pm 6$
Gambiers	7	$10,6 \pm 1,7$	$89,4 \pm 1,7$

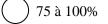
<sup>\*</sup>Les valeurs reportées dans le tableau représentent le pourcentage moyen de l'épimère  $\pm$  écart-type de chaque valeur. (Évaluation par RMN- $^{1}$ H (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  en ppm)



O 0 à 25%

Carte 2 : variation du pourcentage de l'ilimaquinone en fonction de la localisation géographique

O 25 à 50%



• ilimaquinone (1)

<sup>50</sup> à 75 %

Sur la carte 2, seuls les pourcentages de l'ilimaquinone (1) sont représentés. Comme déjà évoqué, c'est la première fois qu'une étude d'une telle ampleur est entreprise impliquant un tel nombre d'échantillons. À vrai dire, plusieurs paramètres peuvent entrer en jeu et influencer cette distribution.

L'influence de la profondeur a été envisagée. Pour cela, une autre collecte a été réalisée à notre demande par Cécile Debitus. Des échantillons de D. metachromia sont collectés à Rangiroa, sur deux sites différents (que l'on nommera R1 et R2, distants d'environ 10 km), à plusieurs profondeurs. Pour une profondeur donnée, deux spécimens sont collectés (sauf à -47 m).

Les résultats RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) des extraits bruts à l'éther diéthylique, résumés dans la figure 22, ne montrent pas de corrélation entre la profondeur de prélèvement et le rapport diastéréoisomérique, les valeurs de ce dernier semblent même assez aléatoires.

Localisa	ation R1		Localisation R2		
76/24	79/21	- 7 m	87/13	24/76	
75/25	75/25	- 17 m	75/25	84/16	
64/36	83/17	- 27 m	85/15	79/21	
83/17	41/59	- 37 m	89/11	89/11	
-		- 47 m	74/26	-	
	-	- 57 m	89/11	70/30	

Les résultats sont exprimés en : % ilimaquinone (1) /5-epi-ilimaquinone % (2)

Figure 22 : représentation des résultats de l'étude du ratio diastéréoisomérique en fonction la pronfondeur

Prenons l'exemple de la localisation R2, à -7 m, nous retrouvons dans le premier échantillon 87 % d'ilimaquinone contre 24 % dans le deuxième.

Afin de comprendre s'il y a une préférence énergétique de formation de l'un ou l'autre des épimères, une étude de modélisation moléculaire est réalisée (en collaboration avec Patricio Gonzalez-Navarrete, Université Jaume I, Castellón, Espagne) pour calculer l'énergie de formations de ces deux molécules.

#### a. Hypothèse de biosynthèse des ilimaquinones 1 et 2 et modélisation moléculaire

Hypothèse de biosynthèse: La biosynthèse de ces deux épimères implique une série de réarrangement de Wagner-Meerwein à partir du composé **48**, donnant l'intermédiaire carbocationique **D**, un dernier transfert du groupement méthyle en position C-4 permet d'obtenir, après une perte d'un proton, soit l'ilimaquinone (**1**) (chemin a, schéma 11) ou la 5-epi-ilimaquinone (**2**) (chemin b, schéma 11).

Une étude de modélisation moléculaire est réalisée à partir de cette hypothèse de biosynthèse afin de calculer l'énergie de formation de l'ilimaquinone et son épimère en position 5.

Modélisation moléculaire: pour les calculs réalisés dans cette étude, *la théorie de la fonctionnelle de la densité* (DFT: *density functional theory*)<sup>31</sup> a été utilisée. Pour cela, nous prenons comme référence et point de départ l'intermédiaire **D**, deux chemins possibles donnant l'ilimaquinone et la 5-*epi*-ilimaquinone sont alors analysés (schéma 11).

Les profils énergétiques de la formation des deux métabolites (ilimaquinone : chemin a, 5-epiilimaquinone : chemin b) sont représentés sur le schéma 11. Les états de transition **ET1** et **ET2** sont associés au transfert du groupement méthyle de la position C-4 à la position

C-5 à partir de l'intermédiaire **D**. De plus, la formation des espèces cationiques **E** et **F** à partir

de **ET1** et **ET2** respectivement, montre que le processus est exothermique. Nous remarquons

une légère différence entre les deux voies, le transfert du groupement méthyle montre que la

formation de **F** est plus favorable de 1,3 kcal/mol par rapport à **E**; il semblerait donc que le

chemin b est un peu plus favorable que le chemin a.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Un article de revue traite les études théoriques sur la formation des terpènes : D. J. Tantillo, *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28, 1035–1053.

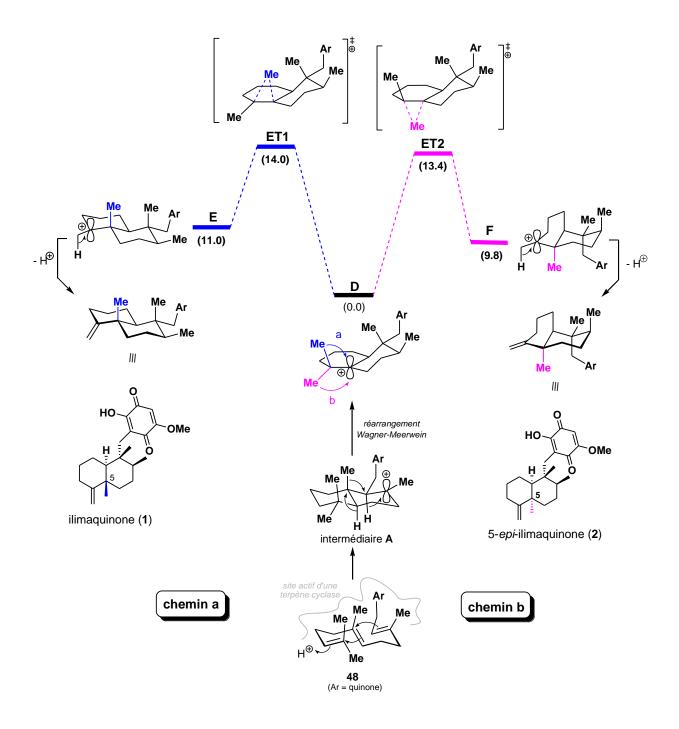


Schéma 11 : hypothèse de biosynthèse et profil énergétique des ilimaquinones (1) et (2)

Les structures et les énergies des intermédiaires ainsi que les états de transitions sont calculés par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT : density functional theory) au niveau B3P86/6-311+G(d,p). ET : état de transition. Énergies exprimées en Kcal.

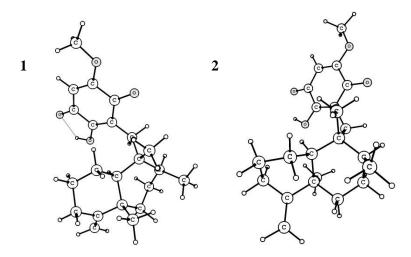


Figure 23 : structure de l'ilimaquinone (1) et la 5-epi-ilimaquinone (2) optimisée au niveau B3P86/6-311+G(d,p)

Les structures de l'ilimaquinone et la 5-*epi*-ilimaquinone ont été optimisées (figure 23), par la même méthode que précedemment. L'évaluation de l'énergie de leur structure optimisée a révélé une différence de 1,7 kcal/mol entre les deux, en faveur de la 5-*epi*-ilimaquinone.

En plus de cette étude de modélisation, une étude génétique sur les différents échantillons de *D. metachromia* a été réalisée (collaboration avec le Dr Cécile Debitus), afin de corréler les résultats de cette variation géographique avec une éventuelle variabilité génétique s'il ya eu.

# b. Étude génétique :

Les séquences ADN des différents échantillons des éponges *D. metachromia* étudiées ont montré une homologie entre eux, autrement dit, peu de variation génétique entre les différents échantillons sont observées. Nous pouvons donc dire que la variation des pourcentages composés 1 et 2 n'est pas due à la variation génétique.

#### c. Discussion autour de ce ratio :

La raison ou les raisons de ces observations restent mystérieuses à ce jour. Parmi les questions qui se posent, figure évidemment la place centrale que prend la terpène cyclase dans le processus. Les choses peuvent se résumer de la façon suivante en deux hypothèses :

- Soit deux terpènes cyclases entrent en jeu : l'une conduisant à l'ilimaquinone, l'autre à la 5-epi-ilimaquinone. Dans ce cas, le niveau d'expression de ces enzymes varierait d'un échantillon à l'autre. Des contrôles épigénétiques (dont les rôles sont maintenant bien appréhendés dans l'acquisition de phénotypes chez les êtres vivants) fonction des conditions de l'environnement expliqueraient les observations et les différences (bien que souvent pas très nettes) du ratio évalué.
- L'autre hypothèse, essentiellement basée sur la faible différence énergétique dans la promotion des deux composés, impliquerait un manque de sélectivité d'une seule et unique terpène cyclase. Les études récentes de nombreuses terpènes cyclases ont mis en avant le manque de sélectivité de certaines d'entre elles. De façon passionnante, le manque de sélectivité est (dans le cas des terpènes cyclases) étroitement lié au degré de liberté que peut avoir le précurseur dans le site actif de l'enzyme.<sup>32</sup>

La pression, la température ou d'autres facteurs physicochimiques pourraient-ils alors influencer ce rapport. C'est, en conclusion, **une des seules observations** de ce type à ce jour, dans le monde des substances naturelles.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, *Nature*, **2011**, *469*, 116–120.

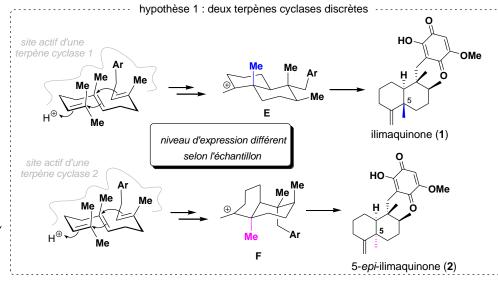
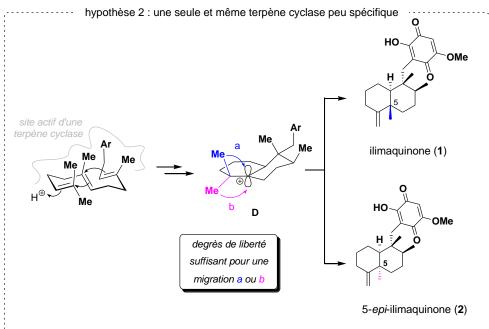


Schéma 12 : deux hypothèses pour l'origine de l'ilimaquinone et son épimère



#### 4.3.2. Dactylospongia elegans

En plus de l'éponge D. *metachromia*, l'éponge D. *elegans* a fait elle aussi l'objet de cette même étude de ratio, sachant que les composés **1** et **2** avaient déjà été isolés de cette espèce. <sup>33-35</sup> Pour cela, des extraits à l'éther diéthylique de tous les échantillons sont préparés et analysés en RMN-<sup>1</sup>H.

### a. Évaluation du métabolite majoritaire de D. elegans

À notre grande surprise, pour les échantillons collectés à Tahuata et Fatu Hiva, les analyses RMN-<sup>1</sup>H montrent la présence de l'ilimaquinone (1) à 100 %, en revanche, les extraits des éponges collectés à Nuku Hiva ne présentent aucune trace de l'ilimaquinone (1) et/ou de la 5-epi-ilimaquinone (2), mais la présence d'un autre sesquiterpène quinone : l'isospongiaquinone (7). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 3 et la carte 3

Tableau 3 : résultat de l'étude chimique de l'éponge D. elegans (seul le produit majoritaire de l'extrait est présenté)

Atoll	nombre d'échantillons	résultats <sup>*</sup>
Nuku Hiva	3	isospongiaquinone (7)
Tahuata	2	ilimaquinone (1)
Fatu Hiva	1	ilimaquinone (1)

<sup>\*</sup>Obtenus par analyse RMN-1H (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>



Carte 3 : variation du métabolite majoritaire de D. elegans en fonction de la localisation géographique

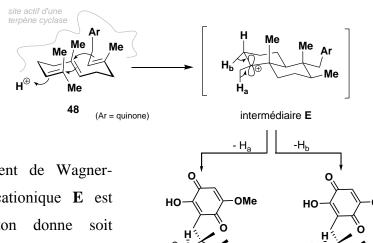
<sup>33</sup> J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 6667–6680. <sup>34</sup> H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 1693–1696.

55

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> S. P. B. Ovenden, J. L. Nielson, C. H. Liptrot, R. H. Willis, D. M. Tapiolas, A. D. Wrigh, C. A. Motti. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 65–68.

C'est la première fois que l'isospongiaquinone (7) est isolée de D. elegans, le seul sesquiterpène type clérodane avec une insaturation  $\Delta^{3,4}$  (le lecteur peut se référer aux annexes 2-5 pour les métabolites isolés de D. elegans).

#### b. Biosynthèses de l'ilimaquinone (1) et l'isospongiaquinone (7)



Après une série de réarrangement de Wagner-Meerwein, l'intermédiaire carbocationique  $\mathbf{E}$  est obtenu. Une perte d'un proton donne soit l'ilimaquinone (1) (- $H_a$ ) ou l'isospongiaquinone (7) (- $H_b$ ) (schéma 13).

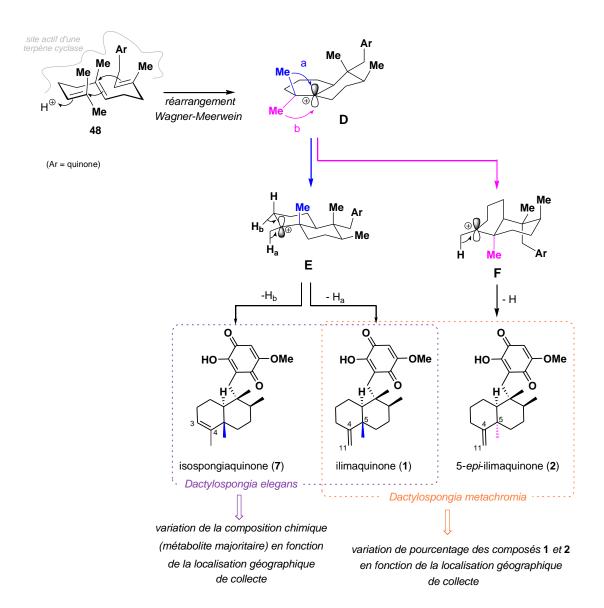
Schéma 13 : hypothèse de biosynthèse des composés 1 et 7

# c. Étude génétique

Comme pour les échantillons de *D. metachromia*, les éponges *D. elegans* ont fait eux aussi l'objet d'une étude génétique. Les résultats obtenus montrent une variabilité génétique non significative entre les différents échantillons de l'éponge, donc il se pourrait qu'il n'y ait pas de relation entre la faible variabilité génétique observée et la composition chimique (métabolite majoritaire dans ce cas) de l'éponge.

#### 5. Conclusion

- Une hypothèse de biosynthèse de tous les sesquiterpènes des éponges *Dactylospongia* a été établie.
- La séparation des ilimaquinones 1 et 2 a été réalisée en utilisant une méthode simple et facile, une silice imprégnée au nitrate d'argent nous a permis de séparer des quantités de l'ordre du gramme, cependant, l'inconvénient de cette méthode est la complexation des composés avec le nitrate d'argent, ce qui entraine une perte de la matière.
- Pour la première fois, une étude d'un rapport diastéréoisomérique impliquant une centaine d'échantillons de la même éponge a été réalisée, des hypothèses autour des terpènes cyclases sont envisagées.
- Pour la première fois, une étude de modélisation moléculaire a été réalisée sur les ilimaquinones, afin de calculer leur énergie de formation, il semblerait qu'il y a une faible préférence énergétique pour la formation de la 5-epi-ilimaquinone (2).
- L'éponge *D. elegans* a fait, elle aussi, l'objet d'une étude chimique pour déterminer le métabolite majoritaire, à notre grande surprise cette espèce ne présente pas de 5-epi-ilimaquinone, nous retrouvons soit l'ilimaquinone, soit l'isospongiaquinone, cette dernière est isolée pour la première fois de l'éponge *D. elegans*.



# Bibliographie et notes du chapitre II

- <sup>1</sup> P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, *19*, 181–222.
- <sup>2</sup> J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28, 1917–1936.
- D. M. Kushlan, D. J. Faulkner, L. Parkanyi, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 3307–3312.
- <sup>4</sup> H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. Van Soest, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 46–50.
- K. W. L. Yong, A. Jankam, J. N. A. Hooper, A. Suksamrarn, M. J. Garson, *Tetrahedron*, 2008, 64, 6341–6348.
- <sup>6</sup> J. M. Finefield, D. H. Sherman, M. Kreitman, R. M. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 4802–4836.
- <sup>7</sup> R. T. Luibrand, T. R. Erdman, J. J. Vollmer, P. J. Scheuer, J. Finer, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1979**, *35*, 609–612.
- <sup>8</sup> R. J. Capon, J. K. MacLeod, J. Org. Chem., **1987**, 52, 5059–5060.
- P. A. Takizawa, J. K. Yucel, B. Veit, D. J. Faulkner, T. Deerinck, G. Soto, M. Ellisman, V. Mlahotra, Cell, 1993, 73, 1079–1090.
- <sup>10</sup> B. Veit, J. Yucel, V. Malhotra, *J. Cell Biol.*, **1993**, *122*, 1197–1206.
- C. Jamora, P. A. Takizawa, R. F. Zaarour, C. Denesvre, D. J. Faulkner, V. Malhotra, *Cell*, **1997**, 91, 617–626.
- <sup>12</sup> R. L. Casaubon, M. L. Snapper, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 133–136.
- <sup>13</sup> V. Cruciani, E. Leithe, S.-O. Mikalsen, *Exp. Cell Res.*, **2003**, 287, 130–142.
- H. Sonoda, T. Okada, S. Jahangeer, S.-I. Nakamura, J. Biol. Chem., **2007**, 282, 34085–34092.
- <sup>15</sup> H. J. Wang, N. Benlimame, I. R. Nabi, *J. Cell Sci.*, **1997**, *110*, 3043–3053.
- C. Poüs, K. Chabin, A. Drechou, L. Barbot, T. Phung-Koskas, C. Settegrana, M.-L. Bourguet-Kondracki, M. Maurice, D. Cassio, M. Guyot, G. Durand, *J. Cell Biol.*, **1998**, *142*, 153–165.
- <sup>17</sup> H. S. Radeke, C. A. Digits, R. L. Casaubon, M. L. Snapper, *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, 639–647.
- <sup>18</sup> P. A. Feldman, J. Kim, D. W. Laird, *J. Membrane Biol.*, **1997**, 155, 275–287.
- <sup>19</sup> S. Loya, R. Tal, Y. Kashman, A. Hizi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, *34*, 2009–2012.
- <sup>20</sup> S. Loya, A. Hizi, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 9323–9328.
- <sup>21</sup> H. S. Radeke, M. L. Snapper, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 1227–1232.
- <sup>22</sup> B. G. Kim, T. G. Chun, H.-Y. Lee, M. L. Snapper, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 6707–6714.
- <sup>23</sup> M. P. Nambiar, H. C. Wu, *Exp. Cell Res.*, **1995**, 219, 671–678.
- Vu le large panel d'activités qu'elle présente, elle est commercialisée chez « Santa Cruz Biotechnology » à 134 euros les 100 μg. http://www.scbt.com/fr/datasheet-200864-ilimaquinone.html
- <sup>25</sup> M. Gordaliza, *Mar. Drugs*, **2012**, *10*, 358–402.
- <sup>26</sup> S. D. Bruner, H. S. Radeke, J. A. Tallarico, M. L. Snapper, J. Org. Chem., **1995**, 60, 1114–1115.
- <sup>27</sup> S. Poigny, M. Guyot, M. Samadi, J. Org. Chem., **1998**, 63, 5890–5894.
- <sup>28</sup> T. Ling, E. Poupon, E. J. Rueden, E. A. Theodorakis, *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 819–822.
- <sup>29</sup> J. Y.-K. Hsieh, D. K. Welch, J. G. Turcotte, *Anal. Chim. Acta*, **1981**, *123*, 41–44.
- <sup>30</sup> R. Wilson, J. R. Sargent, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 905, 251–257.
- Un article de revue qui traite les études théoriques sur la formation des terpènes : D. J. Tantillo, *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, *28*, 1035-1053.

- <sup>32</sup> M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, *Nature*, **2011**, 469, 116–120.
- J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, 1992, 48, 6667–6680.
- <sup>34</sup> H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 1693–1696.
- S. P. B. Ovenden, J. L. Nielson, C. H. Liptrot, R. H. Willis, D. M. Tapiolas, A. D. Wrigh, C. A. Motti. *J. Nat. Prod.*, 2011, 74, 65–68.

# **Chapitre III**

# Étude de réactivité chimique autour de la décaline des ilimaquinones

#### 1. Introduction

es substances naturelles ont longtemps inspiré les chimistes ce qui s'est traduit par la synthèse de nouveaux produits ou l'hémisynthèse à partir de produits naturels déjà connus, à des fins, bien souvent thérapeutiques. Entre 1940 et 2010, 65 % des molécules antibactériennes et 41 % des anticancéreux sont soit des produits naturels soit leurs dérivés. <sup>1</sup>

En utilisant "l'art de la synthèse organique" et en surmontant les défis de celle-ci, plusieurs équipes se sont focalisées sur la création de bibliothèques par modifications chimiques.<sup>2,3</sup>

Ainsi, Hergenrother et son équipe ont travaillé sur l'acide abiétique (86). Ce diterpène est le produit majoritaire de la résine de plusieurs conifères (particulièrement les espèces du genre *Pinus*), en raison de son abondance, il a été utilisé comme point de départ dans la construction et la synthèse de 84 composés dont 77 nouveaux, par des réactions d'expansion (87) et de contraction (88), de réarrangement (89), de clivage (90) et d'aromatisation (91) de cycle (schéma 14).<sup>4</sup>

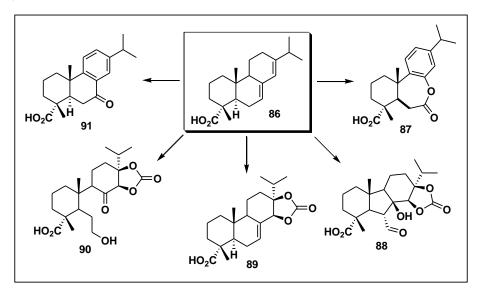


Schéma 14 : diversification chimique de l'acide abiétique

<sup>2</sup> B. R. Balthaser, M. C. Maloney, A. B. Beeler, J. A. Porco Jr, J. K. Snyder, *Nature chem.*, **2011**, *3*, 969–973.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> K. C. Morrison, P. J. Hergenrother, *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 6–14.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> R. W. Huigens III, K. C. Morrison, R. W. Hicklin, T. A. Flood Jr, M. F. Richter, P. J. Hergenrother, *Nature Chem.*, **2013**, *5*, 195–202.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> R. J. Rafferty, R. W. Hicklin, K. A. Maloof, P. J. Hergenrother, Angew. Chem. Int. Ed., 2013, 52, 1–6.

Notre but est de cerner la réactivité chimique de l'ilimaquinone (1) et la 5-*epi*-ilimaquinone (2) notamment au niveau de la décaline dans le but de préparer des analogues et préparer le terrain à un travail de diversification chimique qui va débuter au laboratoire début 2015, selon les concepts de la synthèse orientée vers la diversité ("DOS").<sup>5</sup>

# 2. Données bibliographiques sur les modifications chimiques de l'ilimaquinone

• Lors de ses travaux sur l'étude du trafic vésiculaire des protéines, l'équipe de Snapper a synthétisé l'analogue 99 à partir de l'ilimaquinone (1) (schéma 15). En manque d'ilimaquinone pour poursuivre ses études. Elle en a réalisé la synthèse totale, ce qui lui a permis d'accéder à plusieurs autres analogues, tels que les composés 92-97 (figure 26).

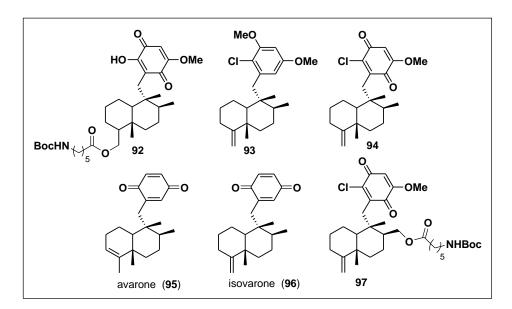


Figure 24 : exemples d'analogues de l'ilimaquinone (1)

Lors de ces travaux, le composé **98** a subit une hydroxylation sélective de l'ilimaquinone sur le carbone C-3 par utilisation du système SeO<sub>2</sub>/t-BuOOH (schéma 15).

.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> D. S. Tan, Nat. Chem. Biol., **2005**, 1, 74–84.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> H. S. Radeke, C. A. Digits, S. D. Bruner, M. L. Snapper, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 2823–2831.

Schéma 15 : synthèse du composé 99 via l'intermédiaire clé hydroxylé 98

Le mécanisme d'une oxydation allylique avec le dioxyde de sélénium<sup>7</sup> (SeO<sub>2</sub>) est proposé pour l'hydroxylation de l'ilimaquinone (schéma 16), il procède *via* une réaction initiale de type "ène", suivie d'un réarrangement sigmatropique [2,3] pour donner le composé **100**. L'hydrolyse du composé **100** donne l'alcool allylique correspondant (composé **98**).

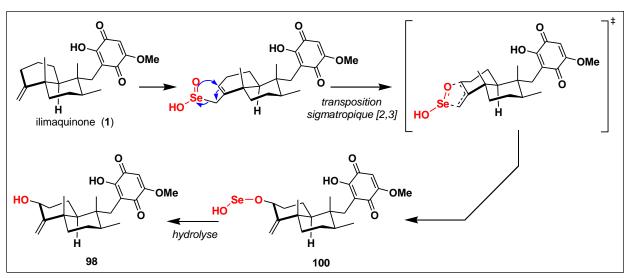


Schéma 16 : mécanisme envisagé de l'hydroxylation au SeO<sub>2</sub> de l'ilimaquinone

 $<sup>^{7}</sup>$  Le dioxyde de sélénium est aussi utilisé pour l'oxydation du ou des méthylènes en  $\alpha$  du carbonyle des aldéhydes ou des cétones, cette réaction est connue sous le nom d'"oxydation de Riley".

• L'équipe de Makarchenko a établi la stéréochimie de la cyclosménospongine (101) en utilisant les corrélations chimiques. Pour cela, l'ilimaquinone (1) est utilisée comme point de départ, le réarrangement en milieu acide de 1 donne plusieurs composés, dont les composés naturels isospongiaquinone (7) et néomamanuthaquinone (4), ainsi que le composé 102 qui par substitution nucléophile du méthoxyle donne la cyclosménospongine (101) (schéma 17).

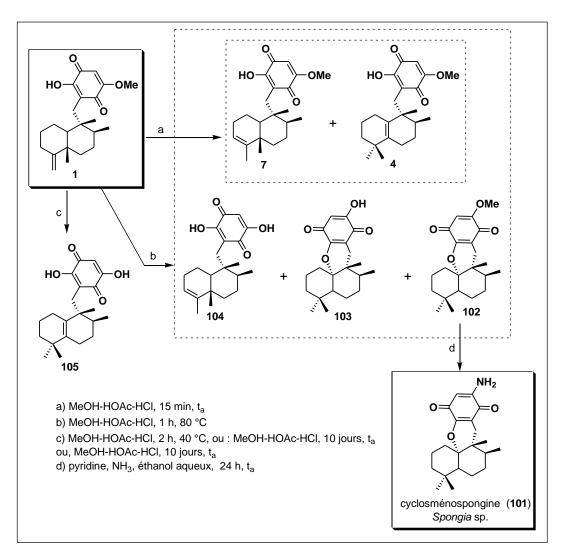


Schéma 17 : synthèse du composé 101 à partir de l'ilimaquinone

L'isospongiaquinone (7) est obtenue après protonation de la double liaison exocyclique de l'ilimaquinone (1) puis la perte de l'hydrogène en position C-3, pour former la double liaison  $\Delta^{3,4}$  (le même mécanisme est observé pour le composé 104, avec une substitution du méthoxyle par un hydroxyle).

\_

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> N. K. Utkina, V. A. Denisenko, O. V. Scholokova, A. E. Makarchenko, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1263–1265.

À partir de l'intermédiaire **E**, une migration du méthyle C-12 sur la position C-4 *via* un réarrangement de Wagner Meervein donne l'intermédiaire carbocationique **D**, ce dernier, après la perte d'un hydrogène donne les composés néomamanuthaquinone (**4**) ou mamanuthaquinone (**61**). Cependant le composé **61** ne peut être obtenu par voie chimique, car à partir de l'intermédiaire **D**, seule l'oléfine la plus substituée est obtenue.

La migration du proton  $H_a$  à partir de l'intermédiaire  $\mathbf{D}$ , puis l'attaque nucléophile de l'oxygène ( $\mathbf{O}$ -H) permet la formation du cycle dihydropyrane des composés  $\mathbf{102}$  et  $\mathbf{103}$ . Le mécanisme de ce réarrangement en milieu acide est illustré sur le schéma  $\mathbf{18}$ .

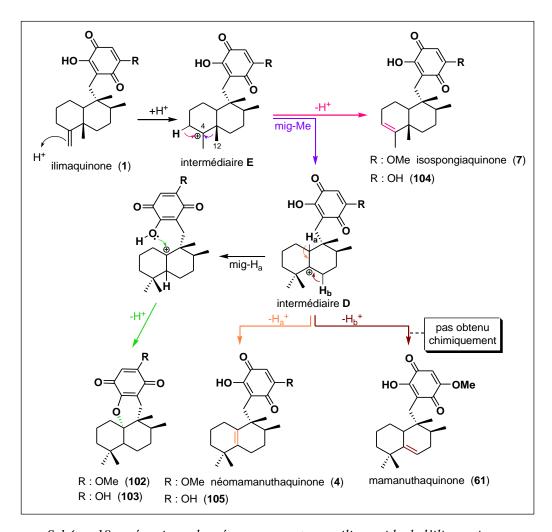


Schéma 18 : mécanisme des réarrangements en milieu acide de l'ilimaquinone (Mig-Me = migration d'un méthyle)

#### 3. Travail personnel

#### 3.1. Réarrangements en milieu acide des ilimaquinones

Afin de cerner la réactivité de la décaline, nous avons réalisé le même réarrangement acide cité précédemment sur les ilimaquinones (1) et (2). Un milieu fortement acide composé d'acide chlorhydrique et d'acide acétique glacial est utilisé pendant 15 minutes, les substances naturelles isospongiaquinone (7), son épimère en C-5 (106) et la néomamanuthaquinone (4) sont ainsi obtenues (schéma 19).

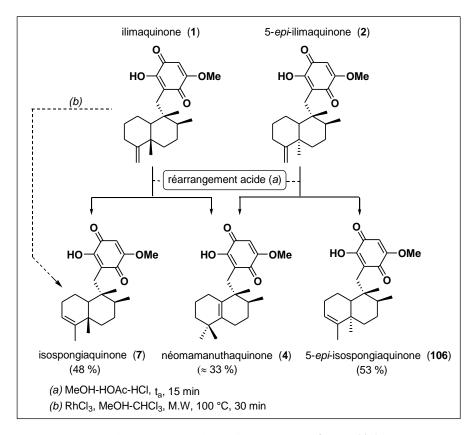


Schéma 19 : synthèse des composés 4, 7 et 106

Ces composés sont inséparables sur silice, cependant ils le sont par CLHP et sur silice imprégnée au nitrate d'argent. Afin de séparer de grandes quantités nous avons avantagé l'utilisation de la silice.

Après séparation des produits, ils sont analysés en RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C, ils sont comparables en tout point avec les substances naturelles décrites dans la littérature.<sup>9-11</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> R. J. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. G. Warren, R. J. Wells, J. F. Blount, Aust. J. Chem., 1978, 31, 2685–2697.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> J. C. Swersey, L. R. Barrows, C. M. Ireland, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 6687–6690.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> S. Urban, R. J. Capon, J. Nat. Prod., **1992**, 55, 1638–1642.

Notons que l'isospongiaquinone (7) peut être obtenue comme produit unique en utilisant le trichlorure de rhodium (RhCl<sub>3</sub>) avec un rendement de 80 % (schéma 19, tableau 4).

Tableau 4 : essais d'isomérisation de la double liaison  $\Delta^{4,11}$  avec le RhCl<sub>3</sub>

réactif	solvant	produit obter	analyses	
RhCl <sub>3</sub>	éthanol	<i>O</i> -18-éthyl- isospongiaquinone ( <b>107</b> )	0 HO—18 OEt	RMN- $^{1}$ H SM: $m/z$ [M+Na] $^{+}$ 395
RhCl <sub>3</sub>	méthanol	isospongiaquinone (7)	HO—OMe	RMN bidimensionnelle SM : $m/z$ [M+Na] <sup>+</sup> 381

Le trichlorure de rhodium (le plus souvent sous forme de complexes) est souvent employé pour isomériser une double liaison. 12

Étant en possession de ces produits d'isomérisation, nous avons voulu réaliser un clivage de cycle par ozonolyse, pour obtenir les produits 108 et 109 (schéma 20).

En utilisant une ozonolyse classique (milieu riche en O<sub>3</sub>), il y a risque de clivage de la partie quinonique, comme déjà observé dans la littérature lors de l'ozonolyse de l'ilimaquinone **(1)**.<sup>13</sup>

Schéma 20 : stratégie de formation des composés 108 et 109

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> R. Cramer, Acc. Chem, Res., **1968**, 1, 186–191.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 6667–6680.

HO OME
$$CO_2Me$$

$$0$$

$$1$$

$$0$$

$$110$$

a) O<sub>3</sub>, acétone, - 78 °C, 1 h b) réactif de Jones, 0 °C, 1,5 h c) CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (excès), 10 % éther méthanolique, t<sub>a</sub>, 2 h Dans ces études, l'utilisation de réactions fortement oxydantes (ozonolyse suivie de l'oxydation de Jones) a donné un mélange d'acides. La méthylation de ce mélange au diazométhane a permis aux auteurs d'avoir le composé **110** à 43 % (rendement sur trois étapes) (schéma 21).

Schéma 21 : ozonolyse de l'ilimaquinone (1) selon les travaux de Rodrigues<sup>13</sup>

#### 3.2. Réactions d'époxydation

#### 3.2.1. Époxydation de la néomamanuthaquinone (4)

Afin d'éviter dans un premier temps le clivage de la partie quinonique, un équivalent d'ozone est utilisé pour réaliser uniquement la coupure de la double liaison du composé **4**. Cependant cette réaction n'a pas donné le composé dicétonique attendu (schéma 22).

Après purification, l'analyse en RMN-<sup>13</sup>C, a montré le signal de carbones quaternaires à 69,1 et 68,9 *ppm*, ce qui laisse à penser à la formation d'un époxyde. L'analyse en spectrométrie de masse a montré un pic moléculaire de 374, correspondant à la masse moléculaire du composé **4** (358) plus 16 uma.

a) O $_3$  (1 éq.),  $\rm CH_2CI_{2,}$  –78 °C, 5 min b) thiocarbamide (20 éq.), MeOH, –78 à 0 °C, 17 h, 15 %

Schéma 22 : époxydation du composé 4 par O<sub>3</sub>

La formation du produit 111 est inattendue, ceci peut être expliqué du fait que la double liaison du composé 4 est très encombrée. L'ozonide primaire n'est donc pas obtenu. Nous pouvons considérer l'ozone ici comme donneur d'un seul oxygène, après la transition

cyclique dans laquelle l'oxygène s'additionne à la liaison  $\pi$ , une molécule  $O_2$  est libérée (schéma 23).

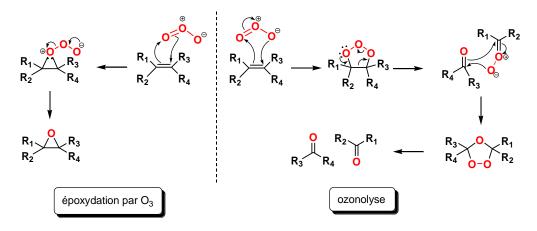


Schéma 23 : mécanisme d'ozonolyse et d'une époxydation par O<sub>3</sub>

Les deux mécanismes présentés sur le schéma 23 impliquent une attaque initiale de la liaison  $\pi$  par l'agent oxydant qui est électrophile, suivie de la rupture de cette liaison. La seule différence est que l'ozonolyse implique une rupture à la fois de liaison  $\pi$  et  $\sigma$ .

Ce type d'époxydation à l'ozone a déjà été observé dans la littérature, lors des travaux d'Adlington<sup>14</sup> sur les réarrangements biomimétiques de diterpène en série labdane.

Suite à notre travail, l'époxydation par l'acide *meta*-chlorobenzoïque (*m*-CPBA) est réalisée sur la néomamanuthaquinone (4) afin d'avoir des masses plus importantes de produit. Lors de cette expérience, le bicarbonate de sodium est utilisé pour neutralisé le milieu, après purification le produit 112 est obtenu (schéma 24). L'utilisation de la base a entrainé l'ouverture intramoléculaire *in situ* de l'époxyde formé (schéma 25).

Schéma 24 : formation du composé 112

\_

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> J. H. George, M. McArdle, J. E. Bladwin, R. M. Adlington, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 6321–6330.

Schéma 25 : mécanisme de formation du composé 112

Continuons avec les réactions d'époxydation, cette fois-ci elles sont réalisées sur l'ilimaquinone (1) et la 5-*epi*-ilimaquinone (2) séparément, tout en laissant de coté pour l'instant les possibilités d'ozonolyse.

#### 3.2.2. Étude de l'époxydation de l'ilimaquinone et la 5-epi-ilimaquinone

L'époxydation de l'éthylène exocyclique des ilimaquinones **1** et **2** est réalisée en utilisant *m*-CPBA. Les mélanges bruts réactionnels sont analysés en RMN avant purification.

#### a. Époxydation de l'ilimaquinone (1)

L'analyse du mélange brut réactionnel de l'époxydation de l'ilimaquinone (1) (par CLHP et RMN-<sup>1</sup>H) montre la présence de deux produits avec un ratio de 93 et 7 % (ratio exprimé de manière relative par CLHP) (schéma 26).

HO

OMe

HO

OMe

HO

OMe

HO

OMe

HO

OMe

$$m$$
-CPBA,  $CH_2CI_2$ ,  $t_a$ 
 $n$ -époxy-ilimaquinone

 $n$ -époxy-ilimaquinone

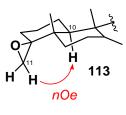
 $n$ -époxy-ilimaquinone

 $n$ -époxy-ilimaquinone

Schéma 26 : réaction d'époxydation sur l'ilimaquinone et formation des produits 113 et 114

Après purification par CLHP, les deux produits sont identifiés comme étant les  $\alpha$  et  $\beta$ -4,11-époxy-ilimaquinones (114) et (113) respectivement, le composé 114 étant le majoritaire.

La configuration de l'époxyde des composés **113** et **114** a été confirmée par analyse NOESY (figure 25). En effet, une configuration  $\beta$  de l'époxyde nous permet d'avoir une corrélation entre les protons H-11<sub>a</sub> et H-10 comme observé pour le composé **113** et qui est absente pour le composé **114**.



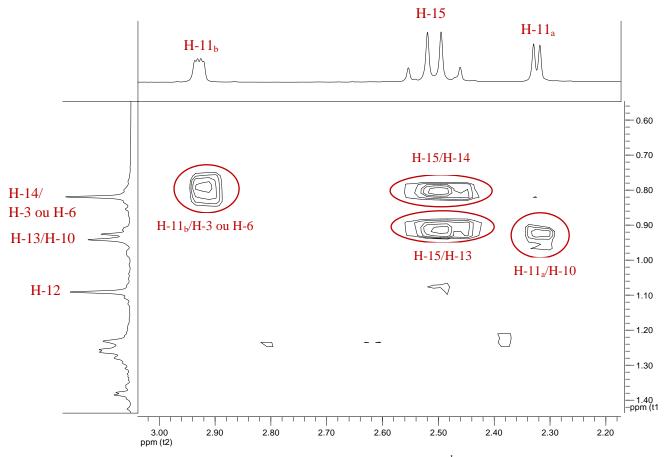
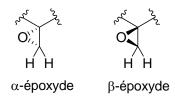


Figure 25: spectre NOESY du composé 113 (RMN-1H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Nous pouvons appuyer ces résultats avec le travail de l'équipe de Kobayashi sur



l'époxydation d'un méthylène exocyclique, elle a démontré qu'une grande différence de déplacement chimique entre les deux protons implique que l'époxyde est en position  $\beta$ , alors qu'une faible différence de déplacements chimiques implique que l'époxyde est en position  $\alpha$ . <sup>15</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> H. Hosoyama, H. Shigemori, Y. In, T. Ishida, J. Kobayashi, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 2521–2528.

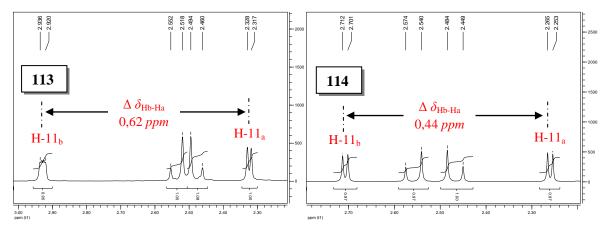


Figure 26 : comparaison des déplacements chimiques des protons H-11 des composés **113** et **114** (RMN-¹H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Dans notre cas, et comme montré sur la figure 26, nous avons les protons portés par le carbone C-11 du composé **113** ( $\delta H_{11a} = 2,32~ppm$ , d, 4,5 Hz;  $\delta H_{11b} = 2,93~ppm$ , dd, 4,5; 2 Hz) qui présentent une plus grande différence de déplacement chimique comparés à ceux du composé **114** ( $\delta H_{11a} = 2,26~ppm$ , d, 4,5 Hz;  $\delta H_{11b} = 2,70~ppm$ , d, 4,5 Hz). Ceci allant dans le sens de nos résultats.

Dans la littérature, l'époxydation de la double liaison  $\Delta^{4,11}$  de l'ilimaquinone (1) et du mélange **M** (ilimaquinone (1) et 5-*epi*-ilimaquinone (2)) a été réalisée par Hsieh<sup>16</sup> et a donné les composés époxydes 114 et 115 respectivement (schéma 27).

OMe
HO
OMe

5β-Me 1
$$5\alpha$$
-Me 2

 $5\beta$ -Me 114
 $5\alpha$ -Me 115

a) m-CPBA,  $t_a$ , 30 min

Schéma 27 : réaction d'époxydation sur l'ilimaquinone et le mélange  $\mathbf{M}^{15}$ 

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Y.-C. Shen, P.-W. Hsieh, J. Nat. Prod., 1997, 60, 93–97.

Une comparaison des données RMN-<sup>13</sup>C entre le composé **114** obtenu lors de notre étude et celui décrit dans la littérature ainsi que le composé **113** est résumée dans le tableau 5 :

	$\delta_{\mathbb{C}}\left(ppm\right)$			
numéro de carbone	HO—OMe	HO—OMe	HO————————————————————————————————————	
	113*	notre <b>114</b> *	114** (bibliographie) <sup>16</sup>	
3	31,5 ou 31,6	30,8	29,7	
4	66,5	65,3	65,4	
5	38,2	37,9	37,9	
11	52,6	49,8	49,9	
12	17,3	19,6	19,7	

Tableau 5 : comparaison des données RMN-13C des composés 113 et 114

\* RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>); \*\* RMN-<sup>13</sup>C (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

À l'issu de cette comparaison, la configuration des époxydes des composés 113 et 114 est bien  $\beta$  et  $\alpha$  respectivement.

#### b. Époxydation de la 5-epi-ilimaquinone

L'analyse en RMN-<sup>1</sup>H du mélange brut réactionnel de cette réaction montre la présence d'un seul produit époxydé (un seul diastéréoisomère est obtenu).

HO—OMe
HO—OMe
HO—OMe
HO—OMe
HO—OMe
HO—OMe
HO—OMe
HO—OMe

Cependant lors de la purification du composé **115** dans le but d'éliminer l'acide 3-chlorobenzoïque résiduel, le composé **116** est obtenu (schéma 28).

Schéma 28 : formation du composé 116

L'analyse RMN- $^{1}$ H de ce nouveau produit montre deux systèmes AB, le premier correspond au CH<sub>2</sub>-15 ( $\delta$ H<sub>15a</sub> = 2,49 ppm, d, 13,6 Hz;  $\delta$ H<sub>15b</sub> = 2,63 ppm, d, 13,6 Hz) et le second au CH<sub>2</sub>-11 ( $\delta$ H<sub>11a</sub> = 4,07 ppm, d, 12 Hz;  $\delta$ H<sub>11b</sub> = 4,19 ppm, d, 12 Hz) ainsi que le signal du proton CH-3 (5,67 ppm). Ce qui correspond à l'ouverture de l'époxyde sous l'effet acide de la silice. Il semblerait que le composé **115** n'est pas aussi stable sous l'effet d'un milieu acide que les composés **113** et **114**.

# 4. Conclusion

- Dans le but de générer des analogues des ilimaquinones (1) et (2), nous nous sommes focalisés dans ce chapitre sur la partie décaline.
- Les composés naturels néomamanuthaquinone (4), isospongiaquinone (7) et 5-epiisospongiaquinone (106) sont obtenus par réarrangement en milieu acide des ilimaquinones (1) et (2).
- L'époxydation des composés 1, 2 et 4 a permis d'avoir les composés 111-114 et 116 une réactivité différente des composés 1 et 2 vis-à-vis de cette réaction est observée.

Figure 27 : résumé des résultats obtenus

## Bibliographie et notes du chapitre III

- <sup>1</sup> K. C. Morrison, P. J. Hergenrother, *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 6–14.
- B. R. Balthaser, M. C. Maloney, A. B. Beeler, J. A. Porco Jr, J. K. Snyder, *Nature Chem.*, 2011, 3, 969–973.
- R. W. Huigens III, K. C. Morrison, R. W. Hicklin, T. A. Flood Jr, M. F. Richter, P. J. Hergenrother, *Nature Chem.*, **2013**, *5*, 195–202.
- <sup>4</sup> R. J. Rafferty, R. W. Hicklin, K. A. Maloof, P. J. Hergenrother, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 1–6.
- <sup>5</sup> D. S. Tan, *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 74–84.
- <sup>6</sup> H. S. Radeke, C. A. Digits, S. D. Bruner, M. L. Snapper, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 2823–2831.
- Le dioxyde de sélénium est aussi utilisé pour l'oxydation du ou des méthylènes en du carbonyle des aldéhydes des ou cétones, réaction est connue 1e nom sous d'oxydation de Riley.

- N. K. Utkina, V. A. Denisenko, O. V. Scholokova, A. E. Makarchenko, J. Nat. Prod., 2003, 66, 1263–1265.
- <sup>9</sup> R. J. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. G. Warren, R. J. Wells, J. F. Blount, *Aust. J. Chem.*, **1978**, *31*, 2685–2697.
- <sup>10</sup> J. C. Swersey, L. R. Barrows, C. M. Ireland, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 6687–6690.
- <sup>11</sup> S. Urban, R. J. Capon, J. Nat. Prod., **1992**, 55, 1638–1642.
- <sup>12</sup> R. Cramer, Acc. Chem, Res., **1968**, 1, 186–191.
- J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 6667–6680.
- <sup>14</sup> J. H. George, M. McArdle, J. E. Bladwin, R. M. Adlington, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 6321–6330.
- <sup>15</sup> H. Hosoyama, H. Shigemori, Y. In, T. Ishida, J. Kobayashi, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 2521–2528.
- <sup>16</sup> Y.-C. Shen, P.-W. Hsieh, J. Nat. Prod., **1997**, 60, 93–97.

# **Chapitre IV**

Étude de réactivité chimique et électrochimie de la quinone des ilimaquinones

#### 1. Introduction

es quinones représentent une large famille de composés, très connus pour leurs applications dans le domaine de la chimie médicinale, dans la photochimie ainsi que dans les systèmes rédox.

Nous décrirons dans ce chapitre deux parties distinctes : la première concerne les modifications chimiques apportées sur la quinone :

- une nouvelle réactivité, non encore décrite, de cette dernière est observée lors des essais d'hémisynthèse des dactylospongénones A-D.
- des analogues aminoquinoniques ont été synthétisés dans le but d'évaluer les relations structure-activité.

La seconde partie de ce chapitre est consacrée aux études d'électrochimie réalisée sur l'ilimaquinone (1) et son épimère en position 5 (2), afin d'évaluer le potentiel rédox des deux composés.

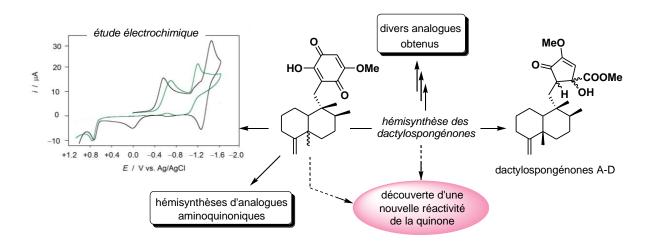


Schéma 29 : schéma récapitulatif des objectifs du chapitre IV

#### 2. Vers la synthèse des dactylospongénones

#### 2.1. Introduction

Les dactylospongénones A-D (**29-32**) ont été isolées pour la première fois d'une éponge *Dactylospongia* sp. en 1989 sous forme de quatre diastéréoisomères. L'hypothèse de biosynthèse suggérée implique une contraction de cycle de la partie quinonique de l'ilimaquinone (**1**) (schéma 30).

Schéma 30 : hypothèse de biosynthèse des dactylospongénones 29-32

Très intéressés par cette réaction, nous avons utilisé l'ilimaquinone (1) et la 5-epiilimaquinone (2) comme point de départ pour essayer d'arriver à ces métabolites par voie chimique tout en essayant de cerner au mieux la réactivité de la quinone.

#### 2.2. Données bibliographiques

#### 2.2.1. Désaromatisation oxydante et contraction de cycle

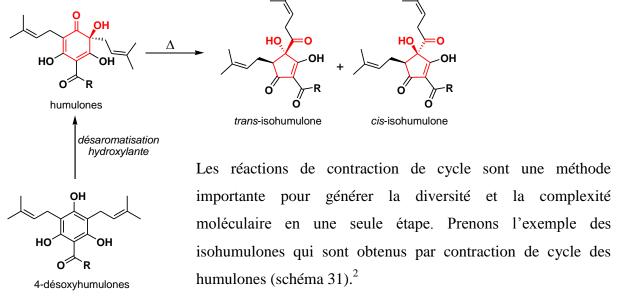


Schéma 31 : contraction de cycle des humulones en isohumulones

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> D. M. Kushlan, D. J. Faulkner, L. Parkanyi, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 3307–3312.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> D. De Keukeleire, *Quim. Nova*, **2000**, *23*, 108–112.

Les humulones font partie de la famille des *ortho*-quinols, avec les wasabidiénones (figure 28) ils représentent les seules familles de produits naturels qui ne se dimérisent pas.<sup>2</sup> En effet, les *ortho*-quinols issus de désaromatisation oxydante se dimérisent facilement, comme nous pouvons le remarquer lors de la synthèse de l'asatone (119)<sup>3</sup> (schéma 32):

Figure 28 : structure chimique des humulones et des wasabidiénones

La cyclohexa-2,4-diénone (118) est un intermédiaire réactif obtenu par désaromatisation oxydante de l'*ortho*-méthoxyphénol (117) en utilisant un réactif à l'iode hypervalent, cette diénone se dimérise rapidement pour donner le complexe naturel tricyclique l'asatone (119) en une seule étape.

L'article de revue récent de Porco<sup>4</sup> résume les travaux réalisés sur les stratégies de désaromatisation oxydante lors des synthèses totales de molécules naturelles

complexes. Le lecteur peut s'y référer avec intérêt.

OMe 2 2 117 118 cycloaddition intermoléculaire a) PIDA, MeOH, 22 % type Diels-Alder AcO-I-OAc MeQ **0** = **OMe** PIDA (PhI(OAc)<sub>2</sub>) OMe MeÓ ОМе asatone (119)

Schéma 32 : synthèse de l'asatone

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> L. Kürti, L. Szilagyi, S. Antus, M. Nógrádi, Eur. J. Org. Chem., **1999**, 2579–2581.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> S. P. Roche, J. A. Porco Jr., Angew. Chem. Int. Ed., **2011**, 50, 4068–4093.

Dans cette partie de ma thèse, nous nous focaliserons sur la désaromatisation oxydante des phénols.

Cette dernière est une réaction qui est assimilée à une étape d'oxydation suivie d'une attaque nucléophile. Plusieurs réactifs sont utilisés pour ce type de réaction :

- réactifs à base de métaux : le plomb Pb(IV), le bismuth Bi(III), l'argent Ag(I); <sup>5,6</sup>
- réactifs à base de métaux de transition : le molybdène Mo(VI), le titane Ti(IV);
- oxydant organique neutre : DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone); 8
- réactifs à l'iode hypervalent : une classe de réactifs plus récente que les précédentes à laquelle nous allons nous intéresser. 9

#### 2.2.2. Réactifs à l'iode hypervalent

Ces dernières années, les réactifs à l'iode hypervalent sont devenus un outil essentiel en synthèse organique,<sup>9</sup> parmi leurs grandes applications, la désaromatisation oxydante est particulièrement populaire.

L'iode est un halogène peu électronégatif, il a un caractère monovalent dû à son degré d'oxydation de –1. Cependant, des dérivés iodés avec un iode à des degrés d'oxydations de 3, 5 ou 7 peuvent être retrouvés, dans ce cas là l'iode est **hypervalent**.

Les réactifs iodés hypervalents ont reçu une attention considérable ces dernières années, ils présentent de nombreux avantages ce qui a favorisé leur développement.

En effet, ils posent moins de problèmes de toxicité et de respect de l'environnement contrairement à leurs analogues à base de métaux lourds, tout en montrant une réactivité souvent tout aussi efficace. Ils sont inodores et faciles à manipuler, les conditions de réaction sont douces, la réactivité est variée et des rendements généralement bons sont obtenus. De plus, la commercialisation depuis les années 1980 de plusieurs de ces réactifs hypervalents a contribué à l'émergence de la chimie de l'iode hypervalent. 10

<sup>7</sup> K. Krohn, K. Brügmann, D. Döring, P. G. Jones, *Chem. Ber.*, **1992**, *125*, 2439–2442.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> I. F. Wessely, G. Lauterbach-Keil, F. Sinwel, *Monatsh. Chem.*, **1950**, *81*, 811–818.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> H. D. Becker, *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 2027–2029.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> H. D. Becker, A. Bjoerk, E. Adler, *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 1596–1600.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Un article de revue sur la chimie de l'iode hypervalent : V. V. Zhdankin, P. J. Stang, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 5299–5358.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Désaromatisation Hydroxylante de Phénols par des Réactifs Iodés Hypervalents : Application à la Synthèse de Substances Naturelles, M. Marguerit, thèse de doctorat, **2009**, Université Bordeaux 1.

# La figure 29 présente les iodanes<sup>11</sup> les plus courants :

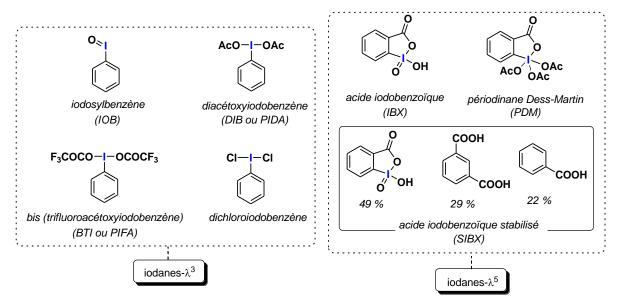


Figure 29: exemples d'iodanes courants

#### 2.3. Stratégie envisagée

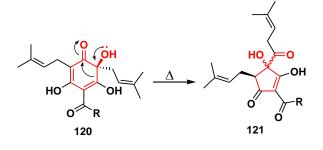


Schéma 33 : contraction de cycle des humulones

En s'inspirant de la réaction de contraction de cycle des humulones (120) en isohumulones (121) (schéma 33), nous essaierons de réaliser une désaromatisation oxydante sur l'ilimaquinone réduite en diphénol (122) en utilisant des réactifs à l'iode hypervalent, puis d'envisager une contraction de cycle vers les dactylospongénones A-D (29-32) (schéma 34).

<sup>11</sup> Iodanes: réactifs à l'iode hypervalent, souvent cette notion d'« iodane » est suivie du symbole «  $\lambda$  », cette lettre *lambda* ( $\lambda$ ) est utilisée lorsque les composés ont une valence non standarde. (définition et notation selon les recommandations IUPAC).

Schéma 34 : schéma rétrosynthétique de l'hémisynthèse des dactylospongénones envisagée

#### 2.4. Travail personnel

La première étape de notre stratégie est illustrée sur le schéma 35. Elle consiste en : i- la réduction de l'ilimaquinone puis la méthylation de l'hydroxyle porté par le carbone C-20 (c'est une étape qui est censée être facile), ensuite, ii- commencer les essais de désaromatisation oxydante sur le composé 122 en testant plusieurs réactifs à l'iode hypervalent.

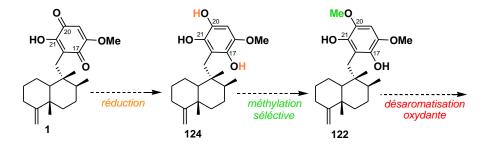


Schéma 35 : stratégie d'obtention du composé 122

#### 2.4.1. Réduction puis méthylation de l'ilimaquinone

La réduction de l'ilimaquinone (1) est réalisée en utilisant le dithionite de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) dans un mélange méthanol-eau pour obtenir le triphénol 124. Cette réduction est observée par un changement de couleur du jaune à l'incolore du milieu réactionnel. Ensuite, une *ortho*-

méthylation du triphénol est envisagée, cependant, le composé **124** se ré-oxyde très rapidement à l'air en ilimaquinone, l'*ortho*-méthylation n'a donc pas pu être réalisée (schéma 36).

Schéma 36 : réduction de l'ilimaquinone

Afin d'éviter cette réaction de ré-oxydation, divers précurseurs de l'ilimaquinone porteurs de groupements désactivants sont envisagés.

Après réduction de ces précurseurs, les diphénols obtenus seront légèrement appauvris en électrons par rapport au triphénol **124**, et donc nous espérons, un peu moins prompts à se réoxyder.

# 2.4.2. Étude du précurseur acétyl-ilimaquinone 125

#### > Acétylation de la 5-epi-ilimaquinone

L'acétylation de la 5-*epi*-ilimaquinone est réalisée en présence d'anhydride acétique et de DMAP (4-diméthylaminopyridine) comme catalyseur, pour obtenir le composé **125**. Une réduction avec le Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> est réalisée sur ce composé pour obtenir le diphénol **126** stable à l'air (schéma 37).

a)  $Ac_2O$  (excès), DMAP (cat.),  $t_a$ , 48 h, 85 % b)  $Na_2S_2O_4$  (excès),  $H_2O$ -AcOEt, reflux 50 °C, 15 h, 83 %

Schéma 37 : hémisynthèse du composé 126

#### > Essais de méthylation

La méthylation du composé **126** est envisagée par la suite (schéma 38), c'est une étape importante, car le composé issu de cette réaction nous permettra d'avoir une forme aromatique sans retour immédiat possible à la forme oxydée (quinonique), sauf dans le cas où la méthylation se fait sur le OH porté par le carbone C-17, car après saponification de l'acétyle, l'*ortho*-quinone (**127**) pourrait obtenue.

Si cette méthylation se fait sur le OH porté par le carbone C-20, cela nous permettra d'avoir le composé **128**, qui même après saponification de l'acétyle, ne pourra pas se réoxyder, et sera l'intermédiaire idéal (composé **122**) pour la suite de l'hémisynthèse.

Une diméthylation est envisageable sur les OH portés par les carbones C-17 et C-20 (composé **129**), le composé obtenu **130** après saponification de l'acétyle pourra être utilisé pour la suite du travail.

Schéma 38 : stratégie de méthylation du composé 126

Les essais de méthylation réalisés, ainsi que les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 6.

Tableau 6 : essais de méthylation du composé 126

réactifs	base	solvant	température	résultats
iodure de méthyle	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> NaH	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	t <sub>a</sub>	5-epi-ilimaquinone
sulfate de diméthyle	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> CsCO <sub>3</sub>	$ ext{CH}_2 ext{Cl}_2$ $ ext{THF}$	$t_{\mathrm{a}}$	5-epi-ilimaquinone
triflate de méthyle	$K_2CO_3$	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> THF	$t_{\mathrm{a}}$	5-epi-ilimaquinone
TMS-diazométhane	-	МеОН	0 °C	mélange de produits dont la séparation n'a pas été réalisée
tétrafluoroborate de triméthyloxonium <sup>12</sup>	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0 °C- t <sub>a</sub>	mélange de produits dont la séparation n'a pas été réalisée

Nous pouvons remarquer, en présence de base, que la saponification de l'acétyle est observée de façon logique, ce qui entraine une ré-oxydation rapide en 5-epi-ilimaquinone (1).

Cependant l'utilisation de forts agents méthylants sans avoir recours aux bases a donné un mélange de produits que nous n'avons pas séparé.

Avec toutes ces conditions de méthylation nous n'avons pas réussi à méthyler un des hydroxyles phénoliques du composé **126**. D'autres précurseurs ont donc dûs être synthétisés.

# 2.4.3. Étude du précurseur 132

#### ➤ Méthylation de l'ilimaquinone

La méthylation de l'ilimaquinone est réalisée en présence de l'iodure de méthyle et de carbonate de potassium à reflux pour obtenir le composé **131** avec 98 % de rendement. Une réduction avec le dithionite de sodium est réalisée sur ce composé pour obtenir le diphénol **132** (schéma 39).

 $<sup>^{12}</sup>$  Tétrafluoroborate de triméthyloxonium,  $Me_3O(BF_4)$ ,  $O(BF_4)$ ,  $O(BF_4)$ 

*a)* MeI (5 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 éq.), reflux 50 °C, 2 h, 98 % *b)* Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (excès), H<sub>2</sub>O-AcOEt, reflux 50 °C, 15 h, 83 %

Schéma 39 : synthèse du composé 132

#### > Essais de désaromatisation oxydante

Quelques essais de désaromatisation sont réalisés sur le composé **132**, divers agents oxydants (PIDA, PIFA, PhI(OAc)<sub>4</sub>) sont testés, un retour au **131** est rapidement obtenu.

#### > Essais de cyclisation

Afin d'éviter le retour à la forme quinonique lors des essais de désaromatisation, nous avons envisagé de former un pont méthylène entre les deux oxygènes portés par les carbones C-20 et C-21 (schéma 41).

Pour cela, nous avons souhaité nous baser sur des travaux de la littérature. Dans les travaux de Gademann, l'exposition d'une solution de la (–)-taiwaniaquinone F à la lumière du soleil a permis d'avoir le (+)-taiwaniaquinol A à 30 % (schéma 40). Cette réaction originale, nous paraissait idéale.

a) lumière du soleil, Et<sub>2</sub>O, t<sub>a</sub>, 15 min, 30 %

Schéma 40 : synthèse du (+)-taiwaniaquinol A à partir de la (-)-taiwaniaquinone F

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> C. Thommen, C. K. Jana, M. Neuburger, K. Gademann, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 1390–1393.

Nous avons essayé les même conditions sur l'ilimaquinone (schéma 41) pour tenter d'obtenir le composé **133**, et sur le produit **131** pour avoir soit le composé **134** ou **135**, mais en vain. Aucun changement n'a été observé.

Schéma 41 : essais de synthèse des composés 133-135

## 2.4.4. Étude du précurseur 5-epi-135

Toujours partis dans cette optique pour avoir le phénol 135 (5-epi-135, figure 30), divers réactifs sont testés pour former le pont méthylène  $C_{23}$ - $H_2$ .

Le composé **135** (5-*epi*-**135**) pourrait être considéré comme un intermédiaire très intéressant pour la suite du travail.

Trois réactifs sont testés pour avoir le composé 5-epi-135 in situ (tableau 7). Ce dernier n'a pas été obtenu, cependant, avec le chlorométhyle méthyle éther (MOM-Cl) on remarque la formation du composé 136 (schéma 42).

Figure 30 : structure chimique du composé 5-epi-135

Tableau 7 : essais de formation du composé 5-epi-135

solvant	Réactifs	base	température	résultat
DMF	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /dibromométhane	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	120 °C	5- <i>epi</i> -ilimaquinone
acétone	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /diiodométhane	$K_2CO_3$	70 °C	5-epi-ilimaquinone
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /MOM-Cl	base d'Hünig	reflux 50 °C	composé 136

Schéma 42 : synthèse du composé 136 et essais de formation du composé 5-epi-135

Après avoir produit une quantité nécessaire du composé **136** pour poursuivre cette étude, la cyclisation en pont méthylène du composé **137** est envisagée. Après plusieurs conditions (tableau 8), cette réaction n'a pas donné le résultat espéré.

Tableau 8 : essais de formation du composé 5-epi-135

entité	solvant	réactifs	base	température	résultat
Composé 136	DMF	H <sub>2</sub> O saturée en Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	140 °C	5-epi-ilimaquinone + composé <b>136</b>
Composé 136	AcOEt	H <sub>2</sub> O saturée en Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	base d'Hünig	50 °C	5- <i>epi</i> -ilimaquinone + composé <b>136</b>
Composé 136	toluène	H <sub>2</sub> O saturée en Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	base d'Hünig	150-180 °C	5- <i>epi</i> -ilimaquinone + composé <b>136</b>
Composé 137	toluène	$Na_2S_2O_4$	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	50 °C 100 °C	5- <i>epi</i> -ilimaquinone + composé <b>136</b>
Composé 137	DMF	-	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	110 °C	5- <i>epi</i> -ilimaquinone + composé <b>136</b>

Les différents essais pour avoir le composé 5-*epi*-135 ont conduit systématiquement au retour à l'ilimaquinone et/ou au composé 136. Cette réaction n'a pas conduit au résultat voulu, par conséquent, nous avons envisagé la synthèse du carbonate d'ilimaquinone 137.

# 2.4.5. Étude du précurseur 137

#### > Formation du carbonate

Cette réaction est réalisée en deux étapes (schéma 43):

- i) la première consiste en la protection du OH en position C-21 par le chloroformiate de méthyle, afin d'avoir le composé **138**, puis réduire ce dernier en le diphénol **139**;
- ii) la deuxième consiste en une cyclisation intramoléculaire pour avoir le carbonate 137.

La cyclisation intramoléculaire est réalisée *in situ* en milieu basique et à reflux : le composé **137** est synthétisé avec succès. Les conditions de la cyclisation ont été optimisées pour avoir au final un rendement allant jusqu'à 70 %, et une quantité produite d'environ un gramme.

Schéma 43 : formation du carbonate 137

Tableau 9 : essais de cyclisation du carbonate 137

solvant	réducteur	base	température	rendement
EtOAc-H <sub>2</sub> O (1:1)	$Na_2S_2O_4$	base d'Hünig	t <sub>a</sub>	~ 20 %
toluène-H <sub>2</sub> O (10:1)	$Na_2S_2O_4$	base d'Hünig	reflux 110 °C	30 %
toluène-H <sub>2</sub> O (10:1)	$Na_2S_2O_4$	base d'Hünig	reflux 50 °C	60-70 %

Le composé carbonaté **137** étant disponible, des essais de désaromatisation oxydante ont pu être réalisés.

#### > Essais de désaromatisation oxydante

Plusieurs expériences sont testées à température ambiante ou à 0 °C, avec différents réactifs à l'iode hypervalent. Ces expériences sont résumées dans le tableau 10.

Tableau 10 : essais de désaromatisation oxydante du composé 137

solvant	réactifs	température	résultat (suivi CCM)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Pb(OAc) <sub>4</sub>	$t_a$	ilimaquinone
$CH_2Cl_2$	PIDA	$t_a$	ilimaquinone
Toluène	PIFA	$\mathbf{t}_{\mathrm{a}}$	ilimaquinone
THF	IBX	$t_a$	ilimaquinone
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PIFA	$\mathbf{t_a}$	ilimaquinone + isospongiaquinone + un nouveau produit
$CH_2Cl_2$	PIFA	0 °C	ilimaquinone

Les conditions utilisant PIFA dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à température ambiante ont été retenues, et ont été testées sur une quantité d'un gramme du produit **137**, après purification, les composés ilimaquinone (**1**), isospongiaquinone (**7**) ainsi qu'un nouveau produit instable (analyse en RMN-<sup>1</sup>H) ont été obtenus.

Schéma 44 : désaromatisation oxydante du composé 137

Le retour à l'ilimaquinone (1) et l'obtention de l'isospongiaquinone (7) sont explicable par la génération d'acide trifluoroacétique. L'effet de l'acide fort généré implique une migration de la double liaison  $\Delta^{4,11}$  en  $\Delta^{3,4}$  pour l'isospongiaquinone (7).

A priori, le retour à l'ilimaquinone est inévitable, arrivé à ce stade il a fallu penser à une nouvelle stratégie.

#### 2.5. Nouvelle stratégie envisagée

#### 2.5.1. Généralités

Il est à noter que les contractions de cycle peuvent être obtenues en utilisant des réarrangements oxydants de cyclo-alcènes ou cyclo-alcanones, parmi les réactifs les plus utilisés nous trouvons ceux à l'iode hypervalent.

La revue de Silva résume les travaux réalisés sur les contractions de cycle en utilisant les réactifs à l'iode hypervalent<sup>14</sup> quelques exemples sont présentés sur la figure 31.

Figure 31 : exemples de contractions de cycle grâce à des réactifs à l'iode hypervalent

Dans cette optique, la contraction de cycle en utilisant les réactifs à l'iode hypervalent directement sur l'ilimaquinone (1) a été envisagée.

Lors de son travail, Iglesias-Arteage a réalisé la contraction de cycle de l'acétate d'hécogénine (**140**) en présence de PIDA et KOH, cette réaction est réalisée à reflux dans le méthanol. Elle a permis d'obtenir le composé (**141**) en une seule étape. <sup>15</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> L. F. Silva Jr, *Molecules*, **2006**, *11*, 421–434.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> J. Sánchez-Flores, V. G. Pelayo-González, M. Romero-Ávila, B. Flores-Pérez, M. Flores-Álamo, M. A. Iglesias-Arteaga, *Steroids*, **2013**, *78*, 234–240.

a) PIDA (5 éq.), KOH (40 éq.), MeOH, reflux, 24 h, 58 %

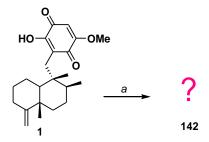
Schéma 45: synthèse du composé 141

Cette réaction sera réalisée dans notre étude dans les mêmes conditions, dans l'espoir de contracter la quinone, c'est un vrai défi vu la stabilité des ilimaquinones (1) et (2).

#### 2.5.2. Travail personnel

#### 2.5.2.1. Réaction de contraction de cycle sur les ilimaquinones

L'ilimaquinone (1) est mise en solution dans le méthanol avec KOH et PIDA à reflux. Cette réaction est suivie par CCM, après deux heures de reflux, on ne remarque plus de produit de départ mais la formation d'un nouveau produit majoritaire 142.



a) PhI(OAc)<sub>2</sub> (5 éq.), KOH (40 éq.), MeOH, reflux, 2 h

Schéma 46 : synthèse du composé 142

Après purification, l'analyse SMHR a montré un pic moléculaire à 405,2273 ([M+H]<sup>+</sup>) correspondant à une formule brute de  $C_{23}H_{32}O_6$ . L'analyse RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C montre les signaux de la partie décaline inchangée, la modification a donc bien lieu au niveau de la quinone. En effet, le spectre RMN-<sup>1</sup>H montre un seul signal à  $\delta_H$  14,48 ppm correspondant probablement à un hydrogène impliqué dans une liaison d'hydrogène avec un carbonyle, et deux méthoxyles à  $\delta_H$  4,00 ppm et  $\delta_H$  3,94 ppm.

Le spectre RMN-<sup>13</sup>C montre 23 signaux, dont les 15 signaux de la décaline, les signaux de deux méthoxyles et les signaux de six carbones quaternaires.

La partie changée de la quinone est difficile à déterminer sur la base d'analyse RMN, d'où la nécessité de cristalliser ce produit **142**.

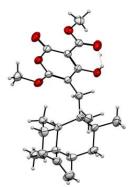
La réaction est refaite avec la 5-epi-ilimaquinone (2), le même réarrangement quinonique est obtenu, et le composé **143** est obtenu avec un rendement de 47 %.

#### 2.5.2.2. Analyse cristallographique et proposition de mécanisme

#### a. Analyse cristallographique:

Divers systèmes de solvants pour l'étude cristallographique du composé **143** ont été étudiés : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (5 : 5) ; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (0,5 : 9,5).

Le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (0,5 : 9,5) a permis d'avoir une très belle cristallisation du produit, une analyse en collaboration avec Pascal Retailleau (ICSN, Gif-Sur-Yvette) nous a permis d'avoir la structure du produit **143** (figure 32). Le résultat obtenu est totalement inattendu. La quinone est réarrangée du tout au tout.



Le bilan de la réaction est le suivant :

Figure 32 : structure du cristal du composé **143** 

a) PhI(OAc)2 (5 éq.), KOH (40 éq.), MeOH, reflux, 2h

Schéma 47 : synthèse des composés **142** et **143** à partir de **1** et **2** respectivement

Nous avons démontré que l'action seule de la soude sans oxydant n'était pas responsable de la formation de ces produits, et seul le composé **144** est obtenu (schéma 48).

a) NaOH 2 M, EtOH, reflux 70 °C, 2 h, 87 %

Schéma 48 : formation du produit 144

#### b. Proposition de mécanisme

En s'appuyant sur les travaux de Iglesias-Arteage, <sup>15</sup> la première partie du mécanisme (une partie du schéma 49) de formation des produits **142** (**143**) est proposée sur les schémas 49, 50 et 51 :

- comme démontrer précédemment, l'utilisation d'une base forte telle que la potasse permettrait la formation du produit **144**, après déprotonation de ce dernier et la formation de l'énolate **145**, une approche axiale du PhI(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> permet d'avoir l'intermédiaire **146**.
- ce dernier subit une attaque nucléophile du méthanolate sur le carbone C-20, puis un réarrangement type quasi-Favorskii est soupçonné pour donner l'intermédiaire **147**.
- une deuxième molécule PhI(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> réagit avec l'intermédiaire **147** et permet la formation de **148**.
- l'intermédiaire **149** est obtenu après coupure oxydante de **148**.

Schéma 49 : proposition de mécanisme de formation de l'intermédiaire 149

À partir de l'intermédiaire **149**, nous pouvons envisager deux chemins réactionnels différents :

 Le premier consiste en l'attaque nucléophile du méthanolate sur le cétène, conduisant à l'entité 150, après cyclisation nucléophile intramoléculaire, le composé 151 peut être obtenu (schéma 50).

Schéma 50 : proposition de mécanisme de formation du composé 151

- Pour le deuxième chemin, l'attaque nucléophile du méthanolate se fait sur le carbonyle C-20 de l'intermédiaire **149**, conduisant à l'entité **152**, le composé **142** (**143**) peut être obtenu après cyclisation nucléophile intramoléculaire (schéma 51).

Schéma 51 : proposition de mécanisme de formation du composé 142 (143)

#### c. Le rôle du méthanol

Pour mettre en évidence le rôle du méthanol dans cette réaction, le même protocole (PIDA, KOH, reflux) a été mis en place avec :

- i) le dichlorométhane, afin de solubiliser l'ilimaquinone, aucun nouveau produit ne s'est formé, et le produit de départ n'a pas bougé.
- ii) le méthanol deutéré, ce qui a démontré que les deux méthoxyles du composé **153** provenaient du méthanol de la réaction.

HOOME 
$$D_3CO$$
 OCD<sub>3</sub> OH OH  $D_3CO$  OCD<sub>3</sub> OH  $D_3CO$  OCD<sub>3</sub> OC

a) PhI(OAc)<sub>2</sub> (5 éq.), KOH (40 éq.), CD<sub>3</sub>OD, reflux, 2 h

Schéma 52 : synthèse du composé 153

#### d. Comparaison entre les données RMN et cristallographiques :

Ayant la structure par cristallographie, nous avons attribué les déplacements chimiques des carbones C-16 à C-23. Cependant certains d'entre eux sont incohérents avec la structure obtenue par cristallographie. Prenons l'exemple du  $\delta_{\rm C}$  181,4 ppm, qui ne peut correspondre au déplacement chimique du C=O d'une lactone, car ce dernier est généralement à 172 ppm. Nous pouvons donc penser à une tautomérie céto-énolique d'un système béta-dicétonique, qui dépend probablement de la forme du produit (solide ou liquide) et/ou de l'effet acide du CDCl<sub>3</sub> (schéma 53).

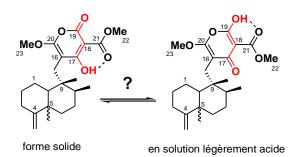


Schéma 53 : possibilité de préférence structurale par rapport à la forme du produit

Cette réaction *one-pot* est typiquement le genre de réaction que nous recherchions, visant à modifier rapidement et du tout au tout une partie des ilimaquinones, en l'occurrence ici la quinone. De plus, c'est la première fois qu'une telle réactivité est observée sur les benzoquinones.

Une étude de méthodologie, testant plusieurs composés benzoquinoniques et oxydants (iodanes- $\lambda^3$  et - $\lambda^5$ ), sera entreprise lors d'un travail qui débutera début 2015.

# 3. Étude des aminobenzoquinones

#### 3.1. Généralités

Plusieurs sesquiterpènes aminoquinoniques isolés d'éponges marines, en particulier de la famille des *Thorectidae* montrent des activités biologiques plus importantes que de simple benzoquinones. La figure 33 montre quelques uns de ces composés déjà évoqués dans le chapitre 1.

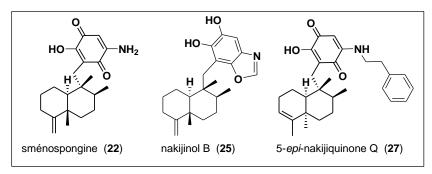


Figure 33 : quelques exemples de sesquiterpènes aminoquinoniques

Dans cette partie de ma thèse, des analogues aminés principalement avec la benzylamine sont synthétisés.

## 3.2. Travail personnel

Pour cette partie, la 5-epi-ilimaquinone (2) est utilisée comme substrat à modifier.

Elle est mise en solution dans l'acétonitrile avec la benzylamine (schéma 54), les composés rouge sang **154** et bleu vert **155** (figure 34) sont obtenus avec des rendements qui varient selon les conditions opérationnelles utilisées (tableau 11).

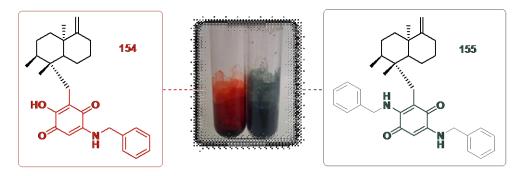


Figure 34 : structure chimique des composés 154 et 155

Schéma 54 : formation des composés **154** et **155** 

Tableau 11 : conditions et rendements de la synthèse des composés 154 et 155

substrat	nombre	temps de	température	rendement 154	rendement 155		
	d'équivalent	réaction					
benzylamine	1,2	15 min	t <sub>a</sub>	30 %	36 %		
benzylamine	1,2	48 h	t <sub>a</sub>	75 %	5 %		
benzylamine	1	30 min	0 °C	71 %	10 %		
benzylamine	1	2 h	50 °C	84 %	7 %		

# 4. Électrochimie

#### 4.1. Introduction

Les quinones sont constamment étudiées pour leur potentiel rédox. Elles jouent un rôle important dans les processus physiologiques et biochimiques. À ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur les ilimaquinones. Ce qui nous a conduits à évaluer leur potentiel rédox en collaboration avec le Pr Antonio Domenech et le Dr Gerardo Cebrián de l'université de Valencia (Espagne).

De nombreuses études d'électrochimie ont été réalisées sur des quinones dans des milieux aqueux  $^{16}$  et non aqueux  $^{16,17}$ . Ceci a permis de montrer que la réduction électrochimique de quinones non substituées (Q) dans des solvants aprotiques procède généralement par deux transferts successifs "quasi-réversibles" d'un électron, donnant successivement l'anion radical semi-quinone ( $Q^-$ ) et le di-anion  $Q^{2-,18}$ 

En revanche, en présence d'un donneur de protons, les quinones sont directement réduites en hydroquinones QH<sub>2</sub>. <sup>16</sup>

Dans notre cas, l'étude électrochimique a été réalisée dans un solvant aprotique (DMSO).

106

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> M. Quan, D. Sanchez, M. F. Wasylkiw, D. K. Smith, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 12847–12856.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> M. Aguilar-Martínez, N. A. Macías-Ruvalcaba, J. A. Bautista-Martínez, M. Gómez, F. J.González, I. González, *Curr. Org. Chem.*, **2004**, *8*, 1721–1738.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> C. Ruessel, W. Jaenicke, J. Electroanal, Chem., **1986**, 199, 139–151.

## 4.2. Travail personnel

Dans cette partie, une étude d'électrochimie classique en solution dans le DMSO a été menée sur l'ilimaquinone (1) et la 5-*epi*-ilimaquinone (2) séparément (figure 35), dans le but de déterminer leurs données électrochimiques.

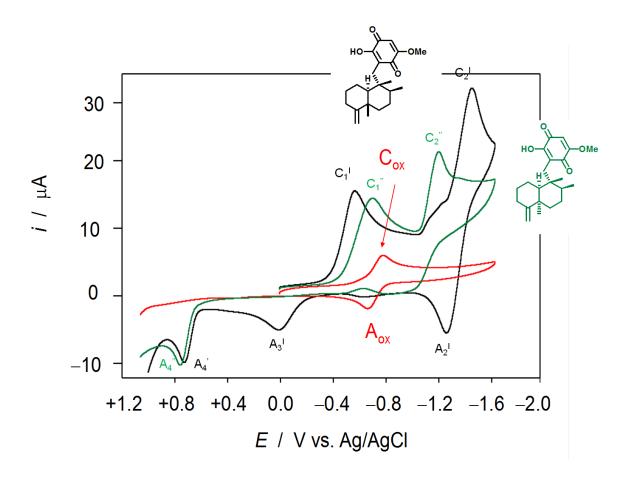


Figure 35 : voltamogramme cyclique d'une solution à 2 mg/mL de 1 (noir) et 2 (vert) dans une solution désaérée de 0,10 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>/DMSO superposé au voltamogramme enregistré d'une solution de 0,10 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>/DMSO saturée en air (rouge).

L'ilimaquinone (1) présente des signaux cathodiques à -0.55 (C1) et -1.35 V (C2), correspondant à la semi-quinone et au di-anion respectivement. Le signal cathodique C2 est couplé à un pic anodique à -1.3 V (A2), qui correspond à l'oxydation du di-anion en semi-quinone, tandis que le pic anodique A1 correspondant à la première réduction C1, est entièrement absent, mais nous remarquons deux signaux qui apparaissent à +0.05 (A3) et +0.72 V (A4).

Le pic A3 peut être attribué à l'oxydation d'un produit résultant d'un processus de réduction impliquant une réaction rapide de transfert post-électron.

Concernant le pic anodique à + 0,72 V (A4), il peut être attribué à une oxydation irréversible (vu l'absence du pic cathodique) de l'unité phénol (-OH) de l'ilimaquinone (1).

Pour la 5-epi-ilimaquinone (2), on remarque deux pics cathodiques à -0.70 (C1) et -1.25 V (C2). Les pics anodiques correspondants sont cependant mal définis, notons que le pic anodique A3 est entièrement absent pour la 5-epi-ilimaquinone et que le pic A4 apparait à +0.74 V.

Même si la quinone est "loin" du centre stéréogène qui différencie l'ilimaquinone de la 5-*epi*ilimaquinone (le carbone C-5), on remarque une différence nette entre les données
électrochimiques de ces deux produits naturels. Le tableau 12 résume les résultats obtenus
lors cette étude en comparaison avec les données bibliographiques<sup>19</sup> de certains composés
décrits (figure 36).

Tableau 12 : paramètres électrochimiques des composés 1 et 2 (dans 0.10 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>/DMSO) en comparaison avec d'autres composés de la bilbiographie (dans 50 mM Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub>/DMF)

7 7							
composé	Q/Q'(mV)	$Q'/Q^{2-}(mV)$					
ilimaquinone (1)	-550	-1350					
5-epi-ilimaquinone (2)	-700	-1250					
1,4-benzoquinone <sup>19</sup>	-401	-1155					
méthoxy-1,4-benzoquinone <sup>19</sup>	-509	-1213					
ubiquinone-0 <sup>19</sup>	-645	-1303					
1,4-naphthoquinone <sup>19</sup>	-581	-1310					

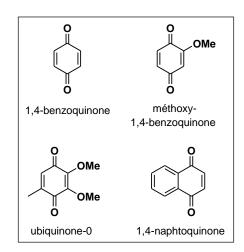


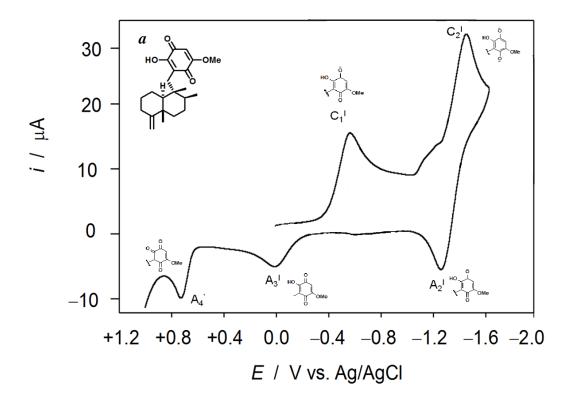
Figure 36 : structures chimiques de certaines benzoquinones de la littérature

Les ilimaquinones présentent un potentiel rédox fortement négatif, ce qui signifie que la forme oxydée est un faible accepteur d'électrons, ceci explique la stabilité particulière à laquelle nous avons été confrontés dans la partie consacrée aux modifications chimiques (la première partie de ce chapitre).

\_

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> R.C. Prince, P. L. Dutton, J. M. Bruce, *FEBS Lett.*, **1983**, *160*, 273–276.

Les figures 39(a) et 39(b) représentent les voltamogrammes cycliques obtenus de l'ilimaquinone (1) et la 5-*epi*-ilimaquinone (2) respectivement (figure 37 simplifiée), où l'on peut remarquer les différentes entités correspondant aux différents processus.



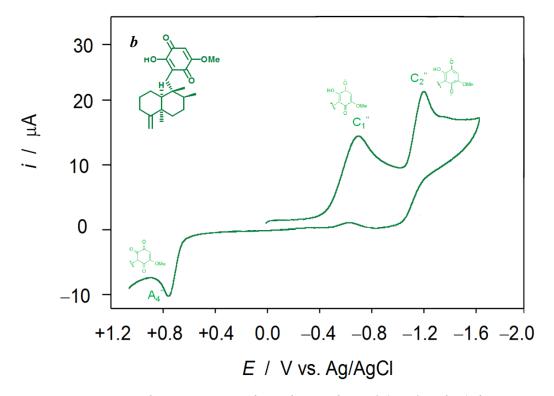


Figure 37 : voltamogramme cyclique d'une solution à 2 mg/mL de a) ilimaquinone, et b) 5-epi-ilimaquinone, dans une solution désaérée de 0,10 M  $Bu_4NPF_6/DMSO$ 

#### 5. Conclusion

Concernant ce chapitre dédié aux études autour de la quinone, deux parties distinctes ont été abordées :

- la première concerne les modifications chimiques de la quinone :
  - lors des essais d'hémisynthèse des dactylospongénones *via* des réactions de désaromatisation oxydante et de contraction de cycle, divers analogues sont obtenus, sans pour autant arriver au résultat voulu, cependant ces essais ont permis de mettre en évidence une nouvelle réactivité de la quinone non encore décrite. En effet, en utilisant des réactifs à l'iode hypervalent en milieu fortement basique la quinone est totalement modifiée.
  - 🔖 deux analogues aminoquinoniques ont été synthétisés.
- la seconde partie de ce chapitre concerne les études d'électrochimie réalisée sur l'ilimaquinone (1) et la 5-epi-ilimaquinone (2). Le potentiel rédox des deux composés a été évalué pour la première fois.

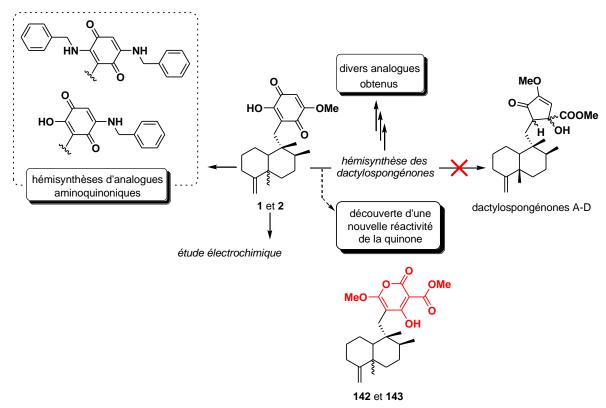


Schéma 54 : Récapitulatif des études réalisées dans le chapitre IV

## Bibliographie et notes du chapitre IV

- D. M. Kushlan, D. J. Faulkner, L. Parkanyi, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 3307–3312.
- D. De Keukeleire, *Quim. Nova*, **2000**, 23, 108–112.
- <sup>3</sup> L. Kürti, L. Szilagyi, S. Antus, M. Nógrádi, Eur. J. Org. Chem., **1999**, 2579–2581.
- <sup>4</sup> S. P. Roche, J. A. Proco Jr., Angew. Chem. Int. Ed., **2011**, 50, 4068–4093.
- <sup>5</sup> I. F. Wessely, G. Lauterbach-Keil, F. Sinwel, *Monatsh. Chem.*, **1950**, *81*, 811–818.
- <sup>6</sup> H. D. Becker, J. Org. Chem., **1969**,34, 2027–2029.
- <sup>7</sup> K. Krohn, K. Brügmann, D. Döring, P. G. Jones, *Chem. Ber.*, **1992**, *125*, 2439–2442.
- <sup>8</sup> H. D. Becker, A. Bjoerk, E. Adler, *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 1596–1600.
- Un article de revue sur la chimie de l'iode hypervalent : V. V. Zhdankin, P. J. Stang, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 5299–5358.
- Désaromatisation Hydroxylante de Phénols par des Réactifs Iodés Hypervalents : Application à la Synthèse de Substances Naturelles, M. Marguerit, thèse, **2009**, Université Bordeaux 1.
- Il Iodanes: réactifs à l'iode hypervalent, souvent cette notion d'« iodane » est suivi du symbole « λ », cette notation lambda (λ) est utilisée lorsque les composés ont une valence non standard. (Définition et notation selon les recommandations IUPAC).
- Triméthyloxonium tétrafluoroborate,  $Me_3O(BF_4)$ ,  $O BF_4$
- <sup>13</sup> C. Thommen, C. K. Jana, M. Neuburger, K. Gademann, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 1390–1393.
- <sup>14</sup> L. F. Silva Jr, *Molecules*, **2006**, *11*, 421–434.
- J. Sánchez-Flores, V. G. Pelayo-González, M. Romero-Ávila, B. Flores-Pérez, M. Flores-Álamo, M. A. Iglesias-Arteaga, *Steroids*, 2013, 78, 234–240.
- M. Quan, D. Sanchez, M. F. Wasylkiw, D. K. Smith, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 12847–12856.
- M. Aguilar-Martínez, N. A. Macías-Ruvalcaba, J. A. Bautista-Martínez, M. Gómez, F. J.González, I. González, *Curr. Org. Chem.*, **2004**, *8*, 1721–1738.
- <sup>18</sup> C. Ruessel, W. Jaenicke, *J. Electroanal. Chem.*, **1986**, 199, 139–151.
- <sup>19</sup> R.C. Prince, P. L. Dutton, J. M. Bruce, *FEBS Lett.*, **1983**, *160*, 273–276.

# **Chapitre V**

Biotransformation de l'ilimaquinone

# 1. Introduction

uite aux travaux de modifications chimiques, des modifications par voie enzymatique ont été entreprises, en utilisant des champignons et des bactéries. Une nouvelle approche de criblage des microorganismes a été mise en œuvre. Les modifications structurales ont porté principalement sur la partie décaline, mais une modification inattendue sur la quinone a aussi été observée.

## 2. Données bibliographiques

La naissance des biotechnologies est annoncée avec l'utilisation empirique des microorganismes pour la conservation des aliments lors de la production d'aliments fermentés. Depuis, l'utilisation des biotechnologies s'intègrent de plus en plus dans les procédés industriels de transformation de la matière et de la synthèse chimique.<sup>1,2</sup>

L'utilisation des systèmes biologiques dans le domaine de la chimie n'arrête pas de croître, ils permettent souvent une catalyse sélective de réactions chimiques par voie enzymatique.

En effet, les bioconversions, que se soit la biocatalyse par la mise en œuvre d'enzymes plus au moins purifiées ou les biotransformations par la mise en œuvre de micro-organismes, peuvent être particulièrement efficaces en chimie. Elles présentent de nombreux avantages, dont l'utilisation de conditions douces (température :  $20\text{-}40^{\circ}\text{C}$ , pH  $\approx$  7), ce qui minimise les réactions secondaires telles que les réarrangements. Elles sont aussi connues pour leur chimio, régio-, diastéréo- et énantio-séléctivités : il est possible d'introduire des centres chiraux<sup>3</sup>, de réaliser des conversions sélectives d'un groupement fonctionnel, de fonctionnaliser régiosélectivement un carbone peu activé<sup>4</sup> : leur champ d'application est donc très vaste.

À titre d'exemple, en 1952, la première hydroxylation de la progestérone (**151**) en position C-11 est réalisée par Murray et Peterson, en utilisant un champignon du genre *Rhizopus* pour obtenir la 11-α-hydroxprogestérone (**152**)<sup>5</sup>. Cette hormone stéroïdienne a fait récemment l'objet d'une étude de biotransformation par deux micro-algues : neuf produits sont obtenus<sup>6</sup> (schéma 55).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> S. Sanchez, A. L. Demain, Org. Process Res. Dev., **2011**, 15, 224–230

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> R.-C. Zheng, Z.-Y. Yang, C.-C. Li, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen, J. Mol. Catal. B Enzym., 2014, 102, 161–166.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> R. M. de Padua, N. Meitinger, J. D. de Souza Filho, R. Waibel, P. Gmeiner, F. C. Braga, W. Kreis, *Steroids*, **2012**, *77*, 1373–1380.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> A. D. Rocha, G. C. dos Santos, N. G. Fernandes, L. H. Pfenning, J. A. Takahashi, M. A. D. Boaventura, *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 1431–1433.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> D. H. Peterson, H. C. Murray, S. H. Eppstein, L. M. Reineke, A. Weintraub, P. D. Meister, H. M. Leigh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, *74*, 5933–5936.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> F. Q. Peng, G. G. Ying, B. Yang, S. Liu, H. J. Lai, Y. S. Liu, Z. F. Chen, G. J. Zhou, *Chemosphere*, **2014**, *95*, 581–588.

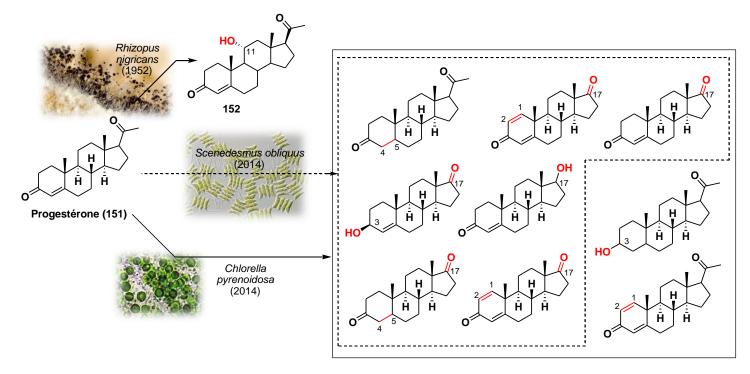


Schéma 55 : produits obtenus par biotransformation de la progestérone

Il semblerait que le nombre de produits résultant des biotransformations varie avec le microorganisme utilisé. L'utilisation des champignons et bactéries pour réaliser des oxydations est très appréciée, en particulier sur les composés terpéniques, pour générer des fonctionnalisations et réaliser tout particulièrement des hydroxylations sélectives, <sup>7,8</sup> sachant que ces dernières sont souvent difficiles à obtenir par voie chimique.

Ces oxydations sont obtenues par plusieurs enzymes oxygénases (mono- ou di-oxygénases). Les di-oxygénases introduisent les deux atomes de l'oxygène dans le substrat, le plus souvent, un clivage de la liaison C-C s'en suit par rupture des formes intermédiaires instables. Par contre les mono-oxygénases introduisent un seul atome d'oxygène sur le substrat (figure 38), le second est réduit en une molécule d'eau par un donneur d'hydrogènes (NADH, NADPH...). Des mono-oxygénases, parmi les plus connues, sont les mono-oxygénases à hème, telles que les cytochromes P-450, connues pour leur catalyse d'hydroxylations notamment.

-

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> B. M. Fraga, L. Alvarez, S. Suarez, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 327–331.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> M. Hosny, H. A. Johnson, A. K. Ueltshy, J. P. N. Rosazza, J. Nat. Prod., **2002**, 65, 1266–1269.

Figure 38 : diverses oxydations catalysées par les mono-oxygénases

Souvent, la position des hydroxylations sur la molécule dépend du substrat et du microorganisme, ceci est dû à la présence de différentes enzymes ayant des spécificités différentes par rapport au substrat. On peut remarquer que certains champignons hydroxylent certaines positions des squelettes terpéniques de manière préférentielle, nous développerons ce point un peu plus tard dans ce chapitre.

#### Nos objectifs lors de ce travail :

Des biotransformations seront menées sur l'ilimaquinone afin d'obtenir des modifications sélectives, dans l'espoir de fonctionnaliser les carbones non activés (C-H) de la décaline, par éventuellement des hydroxylations stéréospécifiques.

En comparaison, et comme cité précédemment (page 62), une hydroxylation sur la position C-3 de l'ilimaquinone est obtenue par voie chimique (composé **98**), en utilisant le système SeO<sub>2</sub>/*t*-BuOOH avec un rendement de 94 % (schéma 56).

a) SeO<sub>2</sub>, t-BuOOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6h, 25°C (94 %)

Schéma 56 : synthèse du composé 98 (rappels)

<sup>9</sup> H. S. Radeke, C. A. Digits, S. D. Bruner, M. L. Snapper, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 2823–2831.

\_

#### 3. Travail personnel

#### 3.1. Criblage des micro-organismes

Afin de trouver le, ou les, microorganisme(s) capable(s) de réaliser les réactions souhaitées, plusieurs approches sont utilisées :

- des approches traditionnelles de criblage qui consistent en la culture du microorganisme puis son incubation en présence du produit à transformer ;
- des approches génomiques ;
- des approches utilisant des microplaques.

Les biotransformations réalisées par un criblage traditionnel sont suivies par des analyses chromatographiques au cours du temps. Cependant, cette technique de criblage « microorganisme par microorganisme » est très laborieuse et le nombre d'essais réalisés correspond au nombre de microorganismes testés.

Le Dr Buisson a développé une technique de criblage originale : **le criblage combinatoire**, utilisé pour la première fois lors de ses travaux sur la sinoménine <sup>10</sup> et la guttiférone A<sup>11</sup>. Cette technique fait gagner du temps de travail et d'analyse en diminuant le nombre d'essais, tout en gardant les bénéfices d'un criblage traditionnel.

Le criblage combinatoire consiste en l'incubation de plusieurs microorganismes dans le même flacon avec le produit à transformer. Les mélanges sont effectués après croissance des microorganismes (tableau 13) :

flacon 2 flacon 1 flacon 3 flacon 4 d k b h f i 1 c d j a g k h b e

Tableau 13 : mélange combinatoire

microorganismes

Le criblage est effectué sur des séries de 12 microorganismes, des mélanges de cinq microorganismes sont réalisés dans quatre flacons différents, avec, dans chaque flacon, un

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> R. Joyeau, M. Planchon, J. Abessolo, K. Aissa, C. Bance, D. Buisson, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2012**, 85-86, 65–70.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Y. Fromentin, P. Grellier, J. D. Wansi, M.-C. Lallemand, D. Buisson. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5054–5057.

microorganisme singulier (microorganismes c, f, i, l), les huit autres microorganismes sont présents deux à deux dans les différents flacons (par exemple, les microorganismes a et b sont présents dans les flacons 1 et 4).

Cette technique de criblage combinatoire a été appliquée à nos bioconversions de l'ilimaquinone en utilisant des champignons et des bactéries.

Pour cela, les microorganismes conservés à 4°C sur gélose inclinée ont été mis en suspension dans du glycérol, puis le milieu de culture YMS<sup>12</sup> (avec du glucose) a été inoculé avec la suspension de microorganismes et incubé à 27°C pendant 65 h.

Au bout de ces 72 h, les champignons sont filtrés et les bactéries centrifugées. Les biomasses sont mises en suspension dans un tampon phosphate à pH 7,2 et réparties dans les flacons selon le tableau 3. L'ilimaquinone (1) est solubilisée dans le DMF puis ajoutée dans chaque flacon à une concentration de 0,15 mg/mL. Les mélanges sont alors incubés à 27°C sous agitation, le suivi des bioconversions est réalisé par analyse par CLHP-SMHR des prélèvements effectués après 24 h, 48 h, et jusqu'à cinq jours d'incubation. Le schéma 46 résume la procédure employée lors de notre criblage combinatoire.

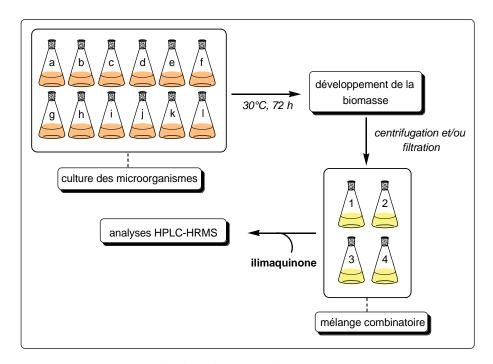


Schéma 57 : protocole du criblage combinatoire des microorganismes

.

<sup>12</sup> YMS : Yeast Malt extract Soybean

Nous avons effectué un test sur deux séries de 12 microorganismes (champignons et bactéries (tableau 14)), ces derniers sont choisis par rapport à leur capacité d'oxydation reportée par la littérature :

Tableau 14: Criblage combinatoire de 2 séries de 12 microorganismes

		genre	espèce	code	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4	lot 5	lot 6	lot 7	lot 8
série 1	1	Absidia <sup>C</sup>	corymbifera	LCP 63 1800	×			×				
	2	Mortierella <sup>C</sup>	isabellina	LCP 52108	×			×				
	3	Absidia <sup>C</sup>	atrospora	ATCC 22617	×							
	4	$Rhodococcus^B$	globerolus	DSM 44519	×	×						
	5	Streptomyces <sup>B</sup>	antibioticus	NRRL 8167	×	×						
	8	$Cunninghamella^C$	echinulata var. elegans	ATCC 9245		×						
	6	Rhizopus <sup>C</sup>	oryzae (arrhizus)	ATCC 11145		×	×					
	7	$Mucor^{C}$	plumbeus	CBS 110 16		×	×					
	9	$Cunninghamella^C$	elegans	ATCC 36112			×					
	10	$Rhodococcus^{B}$	erythropolis	ATCC 4277			×	×				
	11	$Bacillus^B$	-	-			×	×				
	12	$Mucor^{C}$	racemosus	ВО				×				
série 2	1	Absidia <sup>C</sup>	corymbifera	LCP 86 3480					×			×
	2	${\it Mortierella}^{\it C}$	isabellina	NRRL 1757					×			×
	3	Absidia <sup>C</sup>	pseudocylindrospora	BCS					×			
	4	$Rhodococcus^{B}$	rhodochrous	DSM 43198					×	×		
	5	Streptomyces <sup>B</sup>	argenteolus	LMG 5967					×	×		
	8	Syncephalastrum <sup>C</sup>	racemosum	<b>TISTR 3457</b>						×		
	6	Rhizopus <sup>C</sup>	stolonifer	ATCC 6227b						×	×	
	7	$Mucor^{C}$	plumbeus	MMP 430						×	×	
	9	$Mucor^{C}$	circineloides	ATCC 8541							×	
	10	$Rhodococcus^{B}$	erythropolis	BTS 1							×	×
	11	$Bacillus^{B}$	megaterium	NRRL B938							×	×
	12	Mucor <sup>C</sup>	racemosus	ВО								×

C : champignon, B : bactérie

Ce criblage qualitatif a montré que tous les lots n'ont pas donné de nouveaux composés mais de façon étonnante, l'ilimaquinone disparait au bout de 24 h (pas de pic en CLHP) sans l'apparition de nouveaux pics sur les chromatogrammes dans tous les essais.

Nous avons travaillé à une faible concentration en ilimaquinone, ce qui est généralement le cas lorsque l'on cherche à obtenir des hydroxylations. En effet, généralement, cette réaction intervient comme une détoxification pour augmenter l'hydrosolubilité. La disparition de l'ilimaquinone par métabolisation semble indiquée qu'elle n'est pas toxique pour les microorganismes, et nous avons décidé de travailler à plus forte concentration :

- 1- en doublant la concentration en ilimaquinone (ajoutée en deux fois) ;
- 2- en multipliant par 5 la concentration au temps t = 0.

Les résultats pour ces deux expériences sont identiques. Les suivis par CLHP-SMHR ont montré qu'aucun produit ne s'est formé pour les lots 1 à 6 et pour le lot 8, on retrouve l'ilimaquinone. Par contre, le lot 7 a répondu positivement à nos attentes, avec une transformation de l'ilimaquinone en plusieurs composés.

Le champignon *Mucor circinelloides* (photographie 5) étant présent uniquement dans ce lot, il doit être responsable de cette transformation. Cette hypothèse est vérifiée par l'incubation de l'ilimaquinone avec chacun des microorganismes du lot 7 et la présence de nouveaux pics est observée exclusivement avec la souche *M. circinelloides* (figure 39).



Photographie 5 : Mucor circinelloides dans son milieu de culture

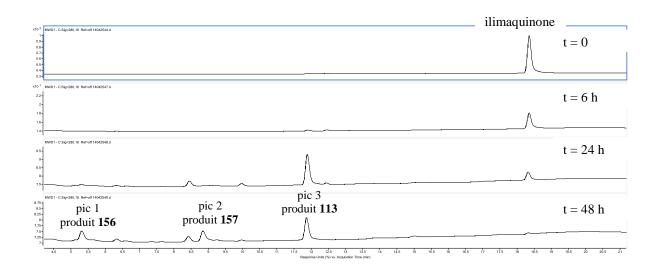


Figure 39 : chromatogramme (UV à 280 nm) du suivi des biotransformations de l'ilimaquinone par M. circinelloides

### 3.2. <u>Biotransformation par Mucor circinelloides</u>

La biotransformation de l'ilimaquinone par *M. circinelloides* conduit à la formation de trois métabolites d'une façon reproductible (analyse par CLHP-SMHR : mêmes temps de rétention et pic moléculaire). Afin d'isoler les produits, la transformation de l'ilimaquinone à plus grande échelle est réalisée (sur 100 mg).

Après 48 h d'incubation de l'ilimaquinone avec M. circinelloides, et après traitement du mélange réactionnel, le mélange brut obtenu a fait l'objet d'une purification par CLHP préparative. Lors de cette purification, les produits ayant un temps de rétention égal à 5,6 min et 9,1 min, et correspondant aux pics 1 et 2 respectivement, sont obtenus sous forme de résidus rouge vif. Ils présentent tous les deux la même masse moléculaire ([M+H]<sup>+</sup> = 404,2355) correspondant à une formule brute de  $C_{23}H_{33}NO_5$ , probablement des métabolites du champignon ou des transformations plus complexes de l'ilimaquinone.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur le pic 3 (12,1 min) qui correspond au composé **113**.

#### 3.2.1. <u>Détermination structurale du produit 113</u>

Ce dernier, correspond à un produit plus polaire que l'ilimaquinone, sa masse de 374 correspond à un gain en masse de 16 uma par rapport à la masse du produit de départ (qui est de 358). Ce produit présente une formule brute correspondant à  $C_{22}H_{30}O_5$ .

La RMN-<sup>1</sup>H de ce composé montre la disparition des signaux du méthine exocyclique (figure 40), pour donner naissance à deux signaux à 2,95 et 2,32 *ppm*: la transformation a lieu au niveau de la double liaison exocyclique, une époxydation est suspectée à ce stade. Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C de ce composé correspondent exactement à ceux du composé **113** obtenu par voie chimique et décrit précédemment.

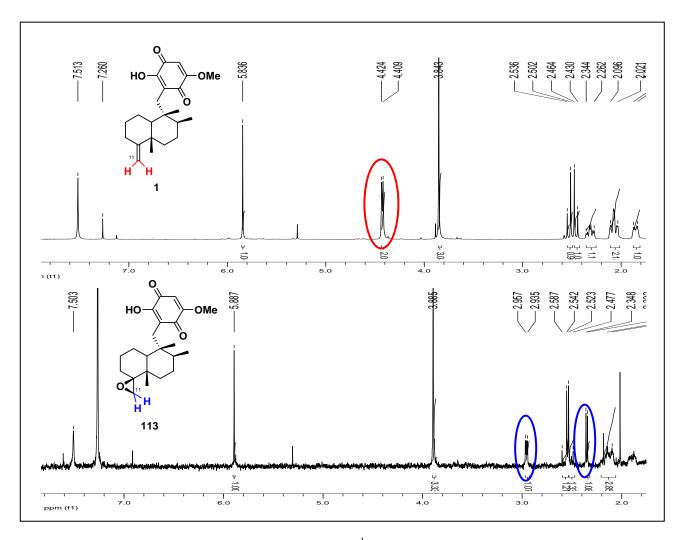


Figure 40 : comparaison des spectres RMN-<sup>1</sup>H de l'ilimaquinone et du composé 84

On observe donc une époxydation diastéréosélective de l'ilimaquinone.

Il semblerait que les enzymes viennent défier la chimie en produisant uniquement l'époxy-ilimaquinone minoritaire obtenue par voie chimique (schéma 58), la figure 41 montre une comparaison entre le chromatogramme des suivis CLHP-SMHR de la biotransformation de l'ilimaquinone par M. circinelloides et le chromatogramme des témoins  $\alpha$  et  $\beta$ -4,11-époxy-ilimaquinones.

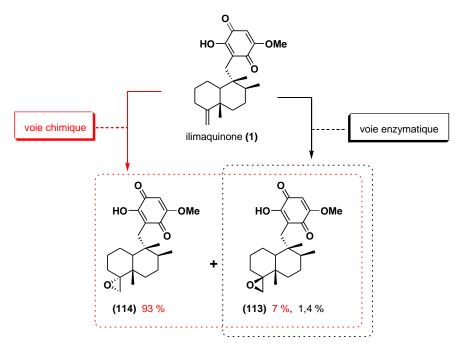


Schéma 58 : époxydation de l'ilimaquinone par voies chimique et enzymatique.

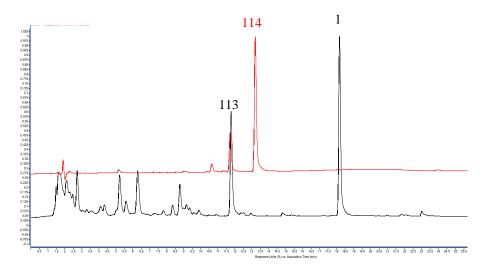


Figure 41 : comparaison des chromatogrammes du suivi de biotransformation à  $t=24\ h$  (noir) et des témoins époxydes de l'ilimaquinone (rouge)

Un exemple semblable a été décrit dans la littérature, en effet lors des biotransformations du jhanidiol par *M. plumbeus* (schéma 48), l'époxy-jhanidiol est obtenu majoritairement et de manière stéréospécifique, il correspond également à l'époxy-jhanidiol minoritaire obtenu par voie chimique. Cependant, ce résultat n'est pas observé pour tous les époxydes obtenus par

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> B. M. Fraga, P. González, R. Guillermo, M. G. Hernández, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 1237–1241.

voie enzymatique, ainsi pour la ribénone<sup>2</sup> et la (–)-isopipériténone,<sup>3</sup> (schéma 60 et 61 respectivement) un mélange d'époxydes est obtenu.

Schéma 59 : composés obtenus de la biotransformation du jhanidiol

Schéma 60 : composés obtenus de la biotransformation de la ribénone

Schéma 61 : composés obtenus de la biotransformation de l'isopipériténone

126

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> B. M. Fraga, M. G. Hernández, P. González, M. López, S. Suárez, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 761–770.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> S.-H. Park, S.-U. Kim, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 354–357.

Les composés correspondant aux pics 1 et 2 (figure 41) ont une masse de 403, ce qui correspond à un gain de 45 uma par rapport à l'ilimaquinone. Par curiosité, ils sont analysés en RMN-<sup>1</sup>H, et à notre grande surprise, les signaux caractéristiques d'une décaline sont retrouvés, il s'agit peut être d'une transformation relativement complexe de l'ilimaquinone.

## 3.2.2. <u>Détermination structurale du produit 156</u>

Le composé 156 (figure 42) (tr = 5,6 min, pic 1), qui présente une formule brute

correspondant à  $C_{23}H_{33}NO_5$  déduite par SMHR, indique le gain d'un carbone, trois hydrogènes, un azote et un oxygène. L'analyse IR montre une absorption correspondant au groupement hydroxyle et/ou amine (3310 cm<sup>-1</sup>) et au groupement carbonyle (1597 cm<sup>-1</sup>).

Le spectre <sup>13</sup>C- Jmod du composé **156** révèle la présence de huit carbones quaternaires, quatre méthines, huit méthylènes et trois méthyles.

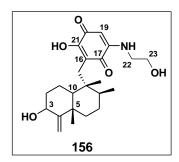


Figure 42 : structure chimique du composé 156

Le méthine à 74,7 *ppm* correspond à un alcool secondaire, donc un des méthylènes de l'ilimaquinone a été hydroxylé.

Le spectre COSY montre que le proton à 4,28 ppm porté par le carbone C-3 à 74,7 ppm corrèle avec les protons du CH<sub>2</sub>-2 ( $\delta$ H, 2 et 1,47 ppm). De plus, en HMBC, le carbone à 74,7 corrèle avec les hydrogènes CH<sub>2</sub>-11 ( $\delta$ H, 4,8 et 4,75 ppm), ce qui confirme la position du groupement hydroxyle en position C-3. Le proton porté par le carbone C-3 est sous forme d'un singulet élargi, en l'absence de constante de couplage la configuration de cet hydroxyle n'a pas pu être établie.

Le spectre RMN- $^{13}$ C montre les signaux caractéristiques de la partie quinone, avec cinq carbones quaternaires, un carbone méthine ( $\delta$ C-19, 91,8 ppm), et deux carbone méthylènes (C-22, C-23). Le carbone C-19 est relié au proton oléfinique à 5,41 ppm.

La présence de l'hydroxyle en position 21 a été confirmée par le déplacement chimique du carbone C-21 ainsi que les corrélations en HMBC entre le H<sub>2</sub>-15/C-21 et le H-19/C-21. Les deux carbonyles C-17 et C-20 présentent des déplacements chimiques à 182,7 et 178,3 *ppm* respectivement déduit par RMN-<sup>13</sup>C et par HMBC (corrélations entre H-19/C-17 et H<sub>2</sub>-15/C-17).

Le déplacement chimique du carbone C-18 (150,6 ppm) suggère qu'il est relié à un azote ( $\delta$ N**H**, 6,9 ppm), ce dernier corrèle en COSY avec les protons H<sub>2</sub>-22 ( $\delta$ H, 3,31 ppm), luimême corrèle avec les protons H<sub>2</sub>-23 ( $\delta$ H, 3,85 ppm), le déblindage de ce signal ( $\delta$ H<sub>2</sub>-23, 3,85 ppm) suggère qu'il est attaché à un deuxième hydroxyle, donc le méthoxyle a été substitué par une éthanolamine.

Ceci nous a permis d'établir la structure du composé 156.

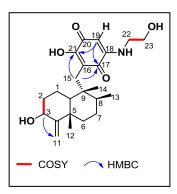


Figure 43 : corrélations COSY et HMBC du composé 156

#### **♦** La position des hydroxyles

Souvent, les composés terpéniques non fonctionnalisés sur la décaline (telle que l'ilimaquinone) sont hydroxylés par les microorganismes, en particulier les champignons, de manière préférentielle sur les positions C-1, C-3, et parfois en C-6, telles que déjà observé avec le sclaréolide, <sup>4</sup> l'ambrox<sup>5</sup> et le sclaréol. <sup>6</sup>



Une fonctionnalisation déjà présente sur la décaline peut avoir une influence sur l'hydroxylation. Par exemple dans le cas de la stémodine (schéma 62), plusieurs métabolites hydroxylés sont obtenus,<sup>7-23</sup> mais avec un produit majoritaire correspondant à une hydroxylation en position C-7.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> R. Atta ur, F. Afgan, M. I. Choudhary, J. Nat. Prod., **1997**, 60, 1038–1040.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> A. Nasib, S. G. Musharraf, S. Hussain, S. Khan, S. Anjum, S. Ali, R. Atta ur, M. I. Choudhary, *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 957–959.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> G. Aranda, M. S. El Kortbi, J.-Y. Lallemand, A. Neuman, A. Hammoumi, I. Facon, R. Azerad, *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 8339–8350.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> A. S. Lamm, W. F. Reynolds, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2006**, 67, 1088–1093.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> G. O. Buchanan, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2001**, *56*, 141–151

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> A. R. M. Chen, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2002**, *59*, 57–62.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> G. D. Martin, W. F. Reynolds, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 701–710.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> A. R. Chen, P. L. Ruddock, A. S. Lamm, W. F. Reynolds, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 1898–1902.

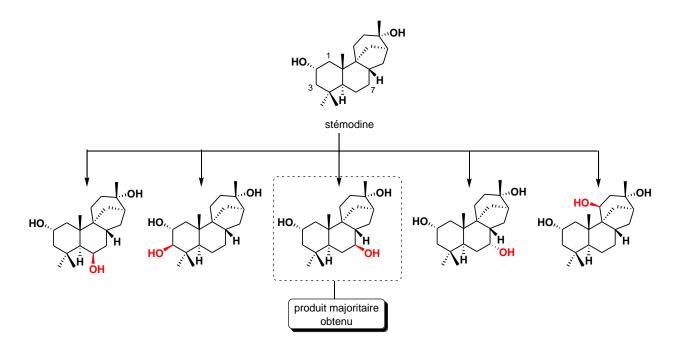


Schéma 62 : exemple de quelques produits obtenus lors des biotransformation de la stémodine

# 3.2.3. <u>Détermination structurale du produit 157</u>

Le composé **157** (tr = 9,1 min, pic 2) présente la même formule brute que le composé **156**,  $C_{23}H_{33}NO_5$ .

Ses données RMN montrent une similitude au niveau des signaux caractéristiques de la décaline du composé **113**, ainsi qu'une similitude au niveau des signaux de la quinone du composé **156** (figure 44). Ce qui laisse penser à une époxydation diastéréoséléctive avec une modification au niveau de la quinone.

Les corrélations NOESY observées pour le composé 157 sont les mêmes que pour le composé 113, ce qui confirme que l'époxyde est en position  $\alpha$ .

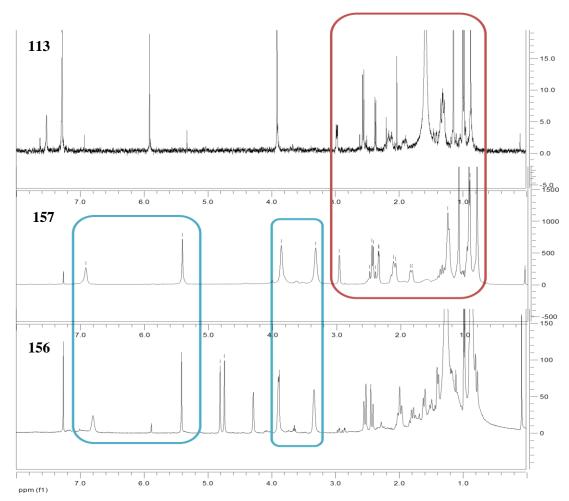


Figure 44 : comparaison des spectres RMN-<sup>1</sup>H des composés 113, 156 et 157

Les déplacements chimiques des carbones C16-C21 du composé **157** sont très proches de ceux des analogues amino-quinones isolés<sup>12</sup> et/ou synthétisés au cours de ce travail (**154**), et identiques à ceux du composé **156**, ce qui nous a permis (après analyse RMN-<sup>1</sup>H, -<sup>13</sup>C et RMN bidimensionnelle) d'établir la structure de ce dernier, avec :

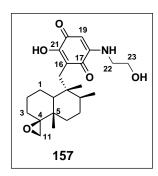


Figure 45 : structure chimique du composé **157** 

- les absorptions en IR correspondant au groupement hydroxyle et/ou amine  $(3315 \text{ cm}^{-1})$  et au groupement carbonyle  $(1596 \text{ cm}^{-1})$ ;
- le déplacement chimique du carbone méthine ( $\delta$  C-19, 92,0 ppm) obtenu par RMN- $^{13}$ C, et son proton oléfinique à 5,41 ppm par analyse HSQC;
- la détermination de la position de l'hydroxyle en position 21 par le déplacement chimique du carbone C-21 ainsi que les

corrélations en HMBC entre le H2-15/C-21 et le H-19/C-21.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Y. Takahashi, T. Kubota, S. Yamamoto, J. Fromont, J. Kobayashi, J. Nat. Prod., **2010**, 73, 467–471.

- la détermination des déplacements chimiques des deux carbonyles C-17 et C-20 à 182,7 et 178,4 ppm respectivement, déduite par RMN-<sup>13</sup>C et par HMBC (corrélations entre H-19/C-17 et H<sub>2</sub>-15/C-17);
- la caractérisation du carbone C-18 (150,6 *ppm*), ainsi que la partie éthanolamine (corrélation en COSY entre NH/H<sub>2</sub>-22, H<sub>2</sub>-22/H<sub>2</sub>-23), qui est reliée au carbone C-18.

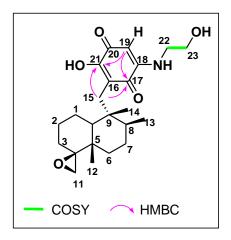


Figure 46 : corrélation COSY et HMBC du composé 157

# **♦** Origine de l'éthanolamine

Les phospholipides sont les principaux constituants lipidiques des membranes plasmiques, on distingue trois phospholipides majoritaires chez les champignons : les phosphatidylcholines (8-40 %), les phosphatidyléthanolamines (19-30 %) (figure 47) et les phosphatidylsérines (10-28 %). Cependant chez *Mucor mucedo*, la phosphatidyléthanolamine est le phospholipide le plus abondant à 59,6 %. Les

Figure 47: structure chimique des phosphatidyléthanolamines

La synthèse de la phosphatidyléthanolamine commence par la phosphorylation de l'éthanolamine qui donne la phosphoryléthanolamine. L'éthanolamine dans cette étape de synthèse est obtenue par décarboxylation de la sérine par une sérine décarboxylase (schéma 63).

131

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> M. A. Yorek, **1993**, in *Phospholipids Handbook*, (Eds G. Cevc), CRC Press, pp 748–749.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> L. Chavant, M. Sancholle, C. Montant, *Biochem. Syst. Ecol.*, **1978**, *6*, 261–266.

Il est à noter que l'éthanolamine n'a pas été utilisée durant nos manipulations, donc il semblerait que la source de cette molécule pourrait être l'éthanolamine libre dans les cellules du champignon.

$$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \text{Sefrine} \end{array} \begin{array}{c} \text{SD} \\ \text{-CO}_2 \\ \text{Sefrine} \end{array} \begin{array}{c} \text{H}_2 \text{N} \\ \text{ethanolamine} \end{array} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{ATP} \\ \text{ADP} \end{array} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{OP} \\ \text{OP} \\ \text{OP} \\ \text{OP} \\ \text{OP} \\ \text{Phosphoéthanolamine} \end{array}$$

#### 4. Conclusion

Le criblage combinatoire de 24 bactéries et champignons pour la biotransformation de l'ilimaquinone nous a permis de sélectionner le champignon *Mucor circinelloides*. Trois composés ont été obtenus par transformation oxydante de la décaline ainsi qu'une transformation au niveau de la quinone.

Les composés **113** et **157** résultent d'une époxydation diastéréosélective, et le composé **156** d'une hydroxylation en position C-3 sur l'ilimaquinone.

Une substitution originale du méthoxyle par l'éthanolamine a été observée. Cette dernière provient probablement de l'éthanolamine libre dans les cellules du champignon, à notre connaissance, cette substitution n'a pas été observée précédemment.

Il sera intéressant d'essayer des biotransformations de l'ilimaquinone avec des levures, en espérant de nouveaux résultats originaux.

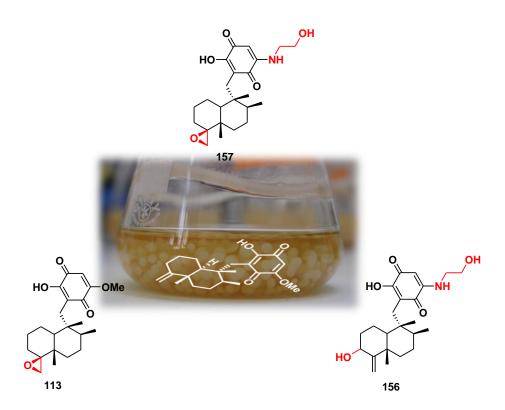


Figure 48 : résumé des résultats obtenus des biotransformations de l'ilimaquinone

## Bibliographie et notes du chapitre V

- S. Sanchez, A. L. Demain, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 224–230.
- <sup>2</sup> R.-C. Zheng, Z.-Y. Yang, C.-C. Li, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2014**, *102*, 161–166.
- R. M. de Padua, N. Meitinger, J. D. de Souza Filho, R. Waibel, P. Gmeiner, F. C. Braga, W. Kreis, *Steroids*, **2012**, *77*, 1373–1380.
- <sup>4</sup> A. D. Rocha, G. C. dos Santos, N. G. Fernandes, L. H. Pfenning, J. A. Takahashi, M. A. D. Boaventura, *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 1431–1433.
- D. H. Peterson, H. C. Murray, S. H. Eppstein, L. M. Reineke, A. Weintraub, P. D. Meister, H. M. Leigh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, *74*, 5933–5936.
- <sup>6</sup> F. Q. Peng, G. G. Ying, B. Yang, S. Liu, H. J. Lai, Y. S. Liu, Z. F. Chen, G. J. Zhou, *Chemosphere*, **2014**, *95*, 581–588.
- <sup>7</sup> B. M. Fraga, L. Alvarez, S. Suarez, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 327–331.
- M. Hosny, H. A. Johnson, A. K. Ueltshy, J. P. N. Rosazza, J. Nat. Prod., 2002, 65, 1266–1269.
- H. S. Radeke, C. A. Digits, S. D. Bruner, M. L. Snapper, J. Org. Chem., 1997, 62, 2823–2831.
- <sup>10</sup> R. Joyeau, M. Planchon, J. Abessolo, K. Aissa, C. Bance, D. Buisson, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2012**, 85-86, 65–70.
- Y. Fromentin, P. Grellier, J. Duplex Wansi, M.-C. Lallemand, D. Buisson. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5054–5057.
- 12 YMS: Yeast Malt extract Soybean
- <sup>13</sup> B. M. Fraga, P. González, R. Guillermo, M. G. Hernández, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 1237–1241.
- B. M. Fraga, M. G. Hernández, P. González, M. López, S. Suárez, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 761–770.
- <sup>15</sup> S.-H. Park, S.-U. Kim, J. Nat. Prod., **1998**, 61, 354–357.
- <sup>16</sup> R. Atta ur, F. Afgan, M. I. Choudhary, J. Nat. Prod., **1997**, 60, 1038–1040.
- A. Nasib, S. G. Musharraf, S. Hussain, S. Khan, S. Anjum, S. Ali, R. Atta ur, M. I. Choudhary, J. Nat. Prod., 2006, 69, 957–959.
- <sup>18</sup> G. Aranda, M. S. El Kortbi, J.-Y. Lallemand, A. Neuman, A. Hammoumi, I. Facon, R. Azerad, R. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 8339–8350.
- <sup>19</sup> A. S. Lamm, W. F. Reynolds, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 1088–1093.
- G. O. Buchanan, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2001**, *56*, 141–151.
- <sup>21</sup> A. R. M. Chen, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2002**, *59*, 57–62.
- G. D. Martin, W. F. Reynolds, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 701–710.
- <sup>23</sup> A. R. Chen, P. L. Ruddock, A. S. Lamm, W. F. Reynolds, P. B. Reese, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 1898–1902.
- Y. Takahashi, T. Kubota, S. Yamamoto, J. Fromont, J. Kobayashi, J. Nat. Prod., 2010, 73, 467–471
- M. A. Yorek, **1993**, in *Phospholipids Handbook*, (Eds G. Cevc), CRC Press, pp 748–749.
- L. Chavant, M. Sancholle, C. Montant, *Biochem. Syst. Ecol.*, **1978**, *6*, 261–266.

Conclusion générale

Mon sujet de thèse avait pour objectif d'isoler l'ilimaquinone (1) et de réaliser des modifications structurales originales sur son squelette.

Lors de nos études, l'ilimaquinone est extraite avec son épimère en position 5 (la 5-epiilimaquinone (2)), ces deux épimères inséparables sur silice normale et/ou inverse ont été
séparés facilement en utilisant une silice imprégnée au nitrate d'argent. Des quantités de
l'ordre du gramme pour chaque épimère sont obtenues au laboratoire à partir de l'éponge
Dactylospongia metachromia.

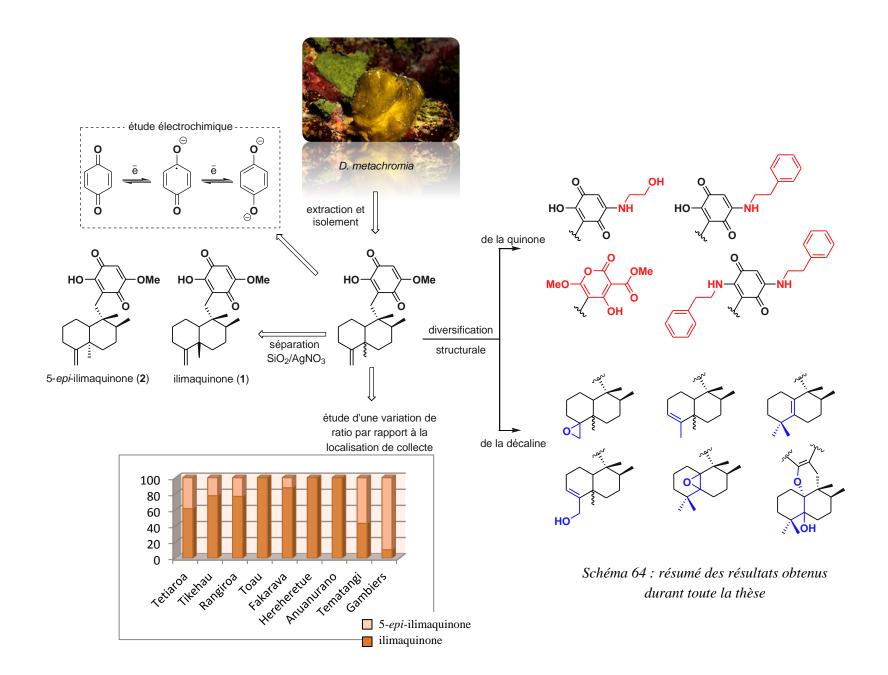
- Un rapport diastéréoisomérique très intriguant concernant ces deux métabolites est observé, en effet, les éponges *D. metachromia* collectées à diverses localisations montrent des pourcentages différents des ilimaquinones. Ces résultats ont conduit à une étude de modélisation moléculaire à partir d'hypothèses de biosynthèse. Cette étude a montré une préférence énergétique faible de formation de la 5-epi-ilimaquinone.
- Le métabolite majoritaire de l'éponge *D. elegans* a également été étudié, sa nature varie selon le lieu de collecte, c'est soit l'ilimaquinone soit l'isospongiaquinone.

Ayant de grandes quantités de ces métabolites, une étude de modifications structurales a été envisagée avec un intérêt particulier porté sur la partie quinonique.

- Vers la synthèse des dactylospongénones : l'ilimaquinone a été utilisée comme point de départ pour l'hémisynthèse des dactylospongénones *via* une réaction de désaromatisation oxydante puis de contraction de cycle. Même si cette étude n'a pas abouti au résultat voulu, une nouvelle réactivité de la quinone est observée permettant l'accés à une quinone totalement réarrangée. C'est la première fois qu'une telle réaction sur des benzoquinones est observée.
- En plus des analogues des ilimaquinones obtenus lors de tentatives d'hémisynthèse des dactylospongénones, d'autres composés issus de modifications chimiques et/ou enzymatiques sont obtenus.
  - Les modifications chimiques ont touché à la fois la décaline (entre autres un réarrangement en milieu acide a été réalisé et a permis d'obtenir les composés naturels isospongiaquinones et néomamanuthaquinone) et la quinone (obtention d'aminoquinones).
  - Quand aux modifications enzymatiques réalisées avec des microorganismes : des réactions d'oxydation sont observées avec le champignon *Mucor circinelloides*. Trois produits sont obtenus.

Une étude d'électrochimie a été réalisée sur les deux métabolites naturels (1 et 2), les données concernant leur potentiel rédox sont recueillies, une différence est observée malgré l'éloignement du centre C-5 épimérisé.

Parallèlement à ces travaux concernant la chimie marine, l'étude chimique d'une mousse endémique à la Bretagne : *Polytrichum formosum* Hedx, 1801 (*Polytrichaceae*) a été débutée dont les études n'ont pas été évoqués dans ce manuscrit.



Partie Expérimentale

## 1- Procédures générales

#### 1.1 Solvants et réactifs

Les solvants utilisés pour les extractions, les premiers fractionnements et la synthèse ont été distillés avant utilisation, sauf mention particulière (solvants anhydres). Pour les séparations CLHP, des solvants de qualités CLHP et/ou CLHP-SM ont été utilisés ; l'eau employée est une eau Milli-Q.

#### 1.2 Analyses chromatographiques

#### 1.2.1 Chromatographie sur couche mince

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de silice de 0,2 mm d'épaisseur sur support d'aluminium (Merck, TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub>). Après élution les plaques ont été visualisées sous UV (254 nm) avant d'être révélées par un révélateur avec chauffage.

#### 1.2.2 Chromatographie sur colonne

Les chromatographies sur colonne sont réalisées dans des colonnes en verre en utilisant du gel de silice (Geduran<sup>®</sup> Si<sub>60</sub>, 40-63 µm), ou du gel de silice imprégné au nitrate d'argent : 5 g d'AgNO<sub>3</sub> solubilisé dans 200 mL d'acétonitrile<sup>1</sup>, auquel nous ajoutons de la silice ; après une bonne agitation pour bien imprégner la silice, le solvant est évaporé sous pression réduite. La silice sèche imprégnée au nitrate d'argent est récupérée et gardée à l'abri de la lumière.

#### 1.2.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les expériences CLHP ont été menées sur différents appareils :

- <u>CLHP analytique</u>: un système *1260 Infinity-Agilent Technologies*, équipé d'une colonne *Sunfire* (ou *XBridge*): C<sub>18</sub>, 4,6 × 150 mm, 5 μm (pour les mises au point avant des CLHP préparatives), ou une *SunFire* C<sub>18</sub>, 2,1 × 150 mm 3,5 μm (pour les CLHP analytiques), munis d'une pompe quaternaire, d'un détecteur UV-Visible à barrette de diodes (DAD) et/ou DEDL. Ce système est contrôlé par le logiciel *Chemstation*<sup>®</sup>. Les conditions de séparation ainsi que les phases mobiles utilisées seront énoncées avec les procédures correspondantes.
- <u>CLHP préparative</u>: un appareil *Waters Delta Prep* équipé d'une colonne *Sunfire* (ou *XBridge*) C<sub>18</sub>, 19 × 150 mm, 5 μm, munis d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes (PDA) et piloté par le logiciel *Empower*<sup>®</sup>. Les conditions de séparation ainsi que les phases mobiles utilisées seront énoncées dans les procédures.
- <u>CLHP-SMHR</u>: un système *Alliance-WATERS*® a été utilisé. Ce dernier est équipé d'un détecteur UV-Visible à barrette de diodes (DAD), d'une pompe quaternaire et d'une colonne *Sunfire* C<sub>18</sub>, 2,1 × 150 mm, 3,5 μm. Ce système est couplé à un spectromètre de masse *LCT Premier*®, équipé d'une source d'ionisation *electrospray (ESI)* en mode positif

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> M. Morita, S. Mihashi, H. Itokawa, S. Hara, Anal. Chem., 1983, 55, 412–414.

et négatif et d'un analyseur de type *Temps de vol (TOF)* avec une résolution de 5000 à 10000. Ce système est piloté par le logiciel *MassLynx*<sup>®</sup>.

Les schémas de gradient pour toutes les séparations HPLC-SMHR seront décrits dans les procédures.

#### 1.3 Analyses physiques et spectrales

#### 1.3.1 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés en utilisant la raie D du sodium ( $\lambda = 589$  nm) comme source lumineuse, dans une cellule de 0,5 mL (l = 1 dm). La valeur de  $[\alpha]_D$  est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$[\alpha]_{D} = (a \times 100) / (1 \times c)$$

Avec : a, la valeur lue sur le polarimètre.

c, la concentration de l'échantillon (g/100 mL de solvant).

l, la longueur de la cuve de mesure (dm).

La température, la concentration et le solvant sont indiqués pour chaque mesure.

#### 1.3.2 Spectrométrie infrarouge

Les spectres IR sont enregistrés entre 4000 et 400 cm<sup>-1</sup> au moyen d'un spectromètre *Bruker Vector* 22<sup>®</sup>. Tous les échantillons sous forme solide sont dissous dans le dichlorométhane ou le chloroforme et analysés sous forme de film par évaporation du solvant sur une pastille de zinc-sélénium. Toutes les valeurs de fréquence (v) sont exprimées en cm<sup>-1</sup>. Seules les bandes caractéristiques sont décrites.

#### 1.3.3 Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse utilisé est de type *LCT Premier*®, il est équipé d'une source d'ionisation *electrospray (ESI)* en mode positif et négatif et d'un analyseur de type *Temps de vol (TOF)* avec une résolution de 5000 à 10000. Ce système est piloté par le logiciel *MassLynx*®.

#### 1.3.4 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN- $^{1}$ H et - $^{13}$ C sont enregistrés dans le CDCl<sub>3</sub> ( $\delta_{H}$  (7,26 ppm),  $\delta_{C}$  (77,3 ppm)), sur des appareils *Bruker Avance-300* (à 300 MHz), -400 (à 400 MHz). Les valeurs des déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimées en ppm relativement au signal résiduel du solvant utilisé comme référence interne.

Les constantes de couplages (J) sont données en Hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire la multiplicité des signaux : s (singulet), s élargi (singulet élargi), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), massif (massif complexe).

L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectué à partir des expériences : 1D : ¹H, ¹³C, et des expériences 2D : ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC.

### 1.4. Étude électrochimique

Les expériences électrochimiques ont été réalisées à  $25 \pm 1$  °C dans une cellule thermo-statée avec un équipement CHI660, une électrode de travail en carbone vitreux (GCE) BAS MF2012, une électrode auxiliaire de fil de platine et une électrode de référence AgCl (3 M NaCl)/Ag ont été utilisés. Le DMSO (Carlo Erba, qualité HPLC) a été désaéré par barbotage d'argon pendant 15 min avant utilisation, le Bu4NPF6 (Fluka) est utilisé comme électrolyte de support.

L'électrochimie des films des composés étudiés (ilimaquinone et 5-*epi*-ilimaquinone) sur électrode de carbone vitreux a été étudiée en utilisant 10 µL de solution (1 mg/ml) dans l'éthanol préalablement passée aux ultrasons pendant 5 min.

#### 1.5. Biotransformations

#### 1.5.1. Milieu de culture

- Tube de culture pour la conservation des microorganismes (milieu A): glucose (20 g/L) Biosolve, bacto peptone (5 g/L) Difco, extrait de levure (5 g/L) Conda-Pronadisa, extrait de malt (5 g/L) Conda-Pronadisa, agar (20 g/L) Conda-Pronadisa. Les poudres sont mélangées QSP dans l'eau (solide à température ambiante), le mélange est porté à surfusion pour homogénéiser la solution, réparti dans les tubes de stockages qui sont ensuite stérilisés à l'autoclave. Les tubes sont lors de la solidification mis en pente pour obtenir la forme désirée.
- <u>Milieu de culture pour la production de la biomasse</u>: le milieu de culture utilisé est le YMS (Yeast, Malt extract, Soybean), c'est un mélange d'extrait de levure (4 g/L) Conda-Pronadisa, extrait de malt (10 g/L) Conda-Pronadisa, peptone de soja (5 g/L) Organo Technie et de glucose Biosolve. Les poudres (sans le glucose) sont mélangées QSP dans l'eau, la solution est stérilisée à l'autoclave et stockée à température ambiante. Avant utilisation, une solution de glucose à 40 % stérilisée est ajoutée au milieu de culture (40 mL par litre d'YMS).
- <u>Milieu d'incubation pour les biotransformations</u>: le milieu d'incubation utilisé pour les biotransformations est une solution tampon phosphate à pH 7,2 (20 mM), elle est obtenue en solubilisant 2 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) et 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) dans 1 L d'eau déminéralisée. Le pH est contrôlé à l'aide d'un pH-mètre.

#### 1.5.2. Mode opératoire

- Mode opératoire pour la culture des microorganismes en milieu liquide :

Cette manipulation est effectuée sous hotte PSM (conditions stériles), les microorganismes stockés sur milieu A sont mis en suspension avec du glycérol à 30 %. Cette suspension est ajoutée dans un erlenmeyer stérile contenant le milieu de culture YMS. Ensuite, la suspension spores/milieu YMS est mise à incuber à 30 °C sous agitation (120 – 145 tpm) pendant 72 heures.

#### - <u>Mode opératoire pour les biotransformations</u>:

Le protocole des biotransformations est réalisé par resting cells : après la croissance des microorganismes dans le milieu de culture YMS, la biomasse est récupérée par filtration sur gaze (pour les champignons) ou par centrifugation (pour les bactéries) pour effectuer les biotransformations. La biomasse récupérée est ensuite mise en suspension dans le tampon phosphate pH 7,2, et mélangée selon le schéma désiré (Chapitre V, mélange combinatoire). Les conditions stériles ne sont plus nécessaires à ce stade. Le substrat est ajouté en solution dans le DMF (0,3 µL de DMF par mL de tampon phosphate) pour obtenir une concentration finale de 0.15 mg de substrat par mL de tampon phosphate. Les erlenmeyers sont mis à incuber à 30°C sous agitation (120 – 145 tpm) pendant le temps nécessaire (de 1 à 5 j). À la fin de la transformation, l'ensemble est mis à centrifuger. Le surnageant aqueux est récupéré et extrait à l'acétate d'éthyle. La biomasse est reprise à son tour dans l'acétate d'éthyle, après agitation, elle est mise aux ultrasons pendant 15 minutes puis centrifugée, la phase acétate d'éthyle est mélangée à celle obtenue de l'extraction de la phase aqueuse puis concentrée sous vide, le résidu brut obtenu est ensuite purifié par CLHP préparative. Le culot est repris dans le méthanol, agité et mis aux ultrasons pendant 15 minutes. Après centrifugation, la phase méthanolique est récupérée puis concentrée sous vide.

# 2- Extraction, isolement et purification

#### 2.1 Dactylospongia metachromia

L'éponge lyophilisée (300 g) a été coupée en petit morceau d'environ 1 cm, puis extraite avec un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1/1 v/v) en utilisant un bain à ultra-sons pendant une heure, cette opération est répétée trois fois, les extraits bruts obtenus sont rassemblés et concentrés sous vide pour obtenir 100 g de résidu violet aubergine. Une extraction liquide-liquide «H<sub>2</sub>O-AcOEt » est réalisée afin d'éliminer le maximum de sel. Le contre-extrait à l'acétate d'éthyle est concentré sous vide (30 g de résidu brut), puis soumis à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice, en éluant avec un gradient de solvant de 100 % éther de pétrole à 100 % acétate d'éthyle, puis à 90/10 acétate d'éthyle-méthanol, pour récupérer 4 fractions (**F-I, -II, -III, -IV**) réunies selon leurs profils CCM.

Ce fractionnement a permis d'obtenir le composé majoritaire de cette éponge (**F-III**) de manière pure (11 g, 3,6 %), identifié comme étant le mélange des diastéréoisomères **ilimaquinone (1)** et **5-epi-ilimaquinone (2)** (mélange **M**).

La fraction (**F-I**, 20 mg, 0,007 %) est obtenue sous forme d'huile jaune pure et est identifiée comme étant la **furospinosuline 1 (46).** 

Les fractions (**F-II** (1 g) et **F-IV** (4,8 g)) contenant le mélange (**M**), ainsi que des composés moins et plus polaires que ce mélange, ont été stockés pour des études ultérieures.

La résolution de mélange (**M**) est effectuée en utilisant la silice imprégnée au nitrate d'argent, avec un gradient de polarité croissante : EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20/80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100 %, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5, pour conduire aux composés **1** et **2**. Ces derniers ont été filtrés sur une couche de silice en éluant avec 100 % de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, afin de filtrer le peu de nitrate d'argent solubilisé lors de

leur séparation, les composés 1 et 2 sont obtenus avec un rendement respectif de 1,1 % (3,3 g) et 1,6 % (5 g) (schéma 64).

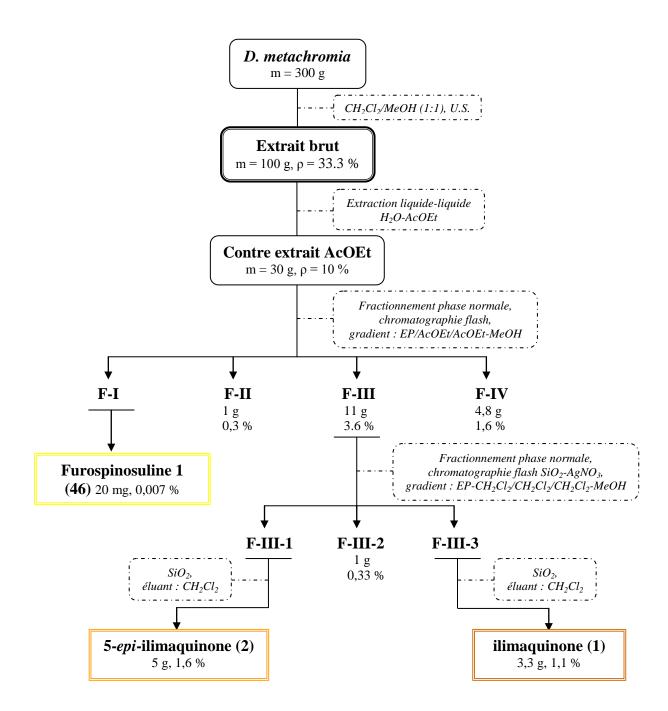


Schéma 64 : schéma de fractionnement de l'extrait brut de D. metachromia

#### 2.2 Protocole d'étude du ratio ilimaquinone/5-epi-ilimaquinone

L'éponge lyophilisée et broyée (500 mg) sont extraits avec 10 mL d'éther diéthylique, en utilisant un bain à ultrason pendant 15 min, ensuite, le solvant est récupéré par filtration sur papier filtre. Cette opération est répétée deux fois. Les phases organiques sont réunies puis concentrées sous vide, l'extrait obtenu est analysé en RMN-<sup>1</sup>H, le pourcentage des deux diastéréoisomères est calculé par rapport aux hydrogènes portés par le carbone C-11. 102 échantillons de *D. metachromia* et 6 de *D. elegans* ont fait l'objet de cette étude.

# 3- Biotransformation de l'ilimaquinone par *Mucor circinelloides* et purification des produits obtenus

Le champignon M. circinelloides est incubé à 30°C pendant 48 h, dans un milieu de culture liquide YMS + glucose, en utilisant un agitateur rotatif. Après 48 h, le champignon est filtré et lavé avec une solution tampon phosphate (pH = 7,2) pour obtenir environ 130 g de mycélium, ce dernier est mis en solution tampon (100 mL), 100 mg d'ilimaquinone (1) sont solubilisés dans 2 mL de DMF et ajoutés au mélange en agitant pour bien uniformiser le mélange final. Après 48 h d'incubation à 30 °C sous agitation rotative (120 tpm) l'ensemble du mélange réactionnel est mis à centrifuger. Le surnageant aqueux est récupéré et extrait à l'AcOEt. La biomasse est reprise à son tour dans l'AcOEt, après agitation, elle est mise aux ultrasons pendant 15 minutes, puis centrifugée. La phase AcOEt est mélangée à celle obtenue de l'extraction de la phase aqueuse puis concentrée sous vide, le résidu brut obtenu est ensuite chromatographié par CLHP préparative suivant un gradient : ACN/( $H_2O + 0.2$  % acide formique)  $40/60 \rightarrow 80/20$ , permettant d'obtenir le composé 156 (6 mg, 5,3 %,  $t_R$  : 5,6 min), le composé 157 (7,2 mg, 6,4 %,  $t_R$  : 9,1 min) et le composé 113 (1,5 mg, 1,4 %,  $t_R$  : 12,1 min).

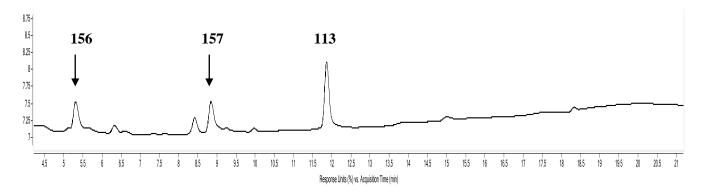
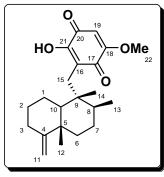


Figure 49 : Chromatogramme du suivi CLHP de biotransformation de l'ilimaquinone avec M. circinelloides

Caractéristiques physico-chimiques et spectrales des produits naturels obtenus

#### ilimaquinone (1)



 $C_{22}H_{30}O_4$ PM: 358 g.mol<sup>-1</sup> **Aspect:** laque orange marron

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2921 (C-H), 1641 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na, calculée : 381,2042, mesurée : 381,2035

**R**<sub>f</sub>: 0,45 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 0,7 (SiO<sub>2</sub>/AgNO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

 $[\alpha]_{589}^{24,5^{\circ}C}$ : -400 (c = 0.015; CHCl<sub>3</sub>), (lit.<sup>2</sup>  $[\alpha]_D$ : -23,2 (c = 1.12; CHCl<sub>3</sub>)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

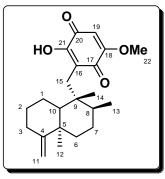
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,51	S	-		ОН
5,83	S	-	1H	H-19
4,42	s élargi		1H	H-11 <sub>a</sub>
4,40	s élargi	-	1H	H-11 <sub>b</sub>
3,84	S	-	3H	OMe
2,52	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,45	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,30	m	-	1H	H-3 <sub>eq</sub>
2,09 - 2,02	massif	=	2H	$H-1_{eq}$ ; $H-3_{ax}$
1,84	m	=	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,51 – 1,31	massif	=	5H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-6; H-7
1,19 – 1,11	massif	=	2H	H-2 <sub>ax</sub> ;H-8
1,02	S	=	3H	H-12
0,95	d	$^{3}J = 6.4$	3H	H-13
0,82	S	-	3H	H-14
0,75	dd	$^{3}J = 12 ; 1,8$	1H	H-10

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 182,3 (C-17) ; 182 (C-20) ; 161,6 (C-18) ; 160,4 (C-4) ; 153,3 (C-21) ; 117,3 (C-16) ; 102,4 (C-11) ; 101,9 (C-19) ; 56,8 (C-22) ; 50,0 (C-10) ; 43,2 (C-9) ; 40,4 (C-5) ; 38,0 (C-8) ; 36,6 (C-6) ; 32,9 (C-3) ; 32,3 (C-15) ; 28,6 (C-2) ; 27,9 (C-7) ; 23,1 (C-1) ; 20,5 (C-12) ; 17,8 (C-13) ; 17,3 (C-14).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>R. L. Luibrand, T. R. Erdman, J. J. Vollmer, P. J. Scheuer, *Tatrahedron*, **1979**, *35*, 609–612.

#### 5-*epi*-ilimaquinone (2)



 $\begin{aligned} & \textbf{C}_{22}\textbf{H}_{30}\textbf{O}_{4} \\ \text{PM}: 358 \text{ g.mol}^{-1} \end{aligned}$ 

**Aspect:** poudre amorphe jaune

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2929 (C-H), 1641 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na, calculée : 381,2042, mesurée : 381,2035

**R**<sub>f</sub>: 0,45 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 0,5 (SiO<sub>2</sub>/AgNO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

 $[\boldsymbol{\alpha}]_{\mathbf{589}}^{\mathbf{24,2} \circ \mathcal{C}}$ : +133 (c = 0.12; CHCl<sub>3</sub>), (lit.<sup>3</sup>  $[\alpha]_{D}$ : +29,8 (c = 0.4; CHCl<sub>3</sub>)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,45	S	-		ОН
5,88	S	-	1H	H-19
4,69	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,66	s élargi	-	1H	H-11 <sub>b</sub>
3,87	S	-	3H	OMe
2,59	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,49	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,43	m	-	1H	H-3 <sub>eq</sub>
2,16-2,08	massif	-	2H	$H-1_{eq}$ ; $H-3_{ax}$
2,0	dt		1H	H-6 <sub>eq</sub>
1,91 – 1,63	massif	-	3H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2
1,48	m	-	1H	H-7 <sub>eq</sub>
1,23 - 1,17	massif	-	3H	H-7 <sub>ax</sub> ; H-8; H-10
1,1	dd	13,9;3,2	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,05	S	-	3Н	H-12
0,92	d	$^{3}J = 6.2$	3Н	H-13
0,87	S	-	3H	H-14

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

 $\boldsymbol{\delta}$  (**ppm**) : 182,4 (C-17 et C-20) ; 161,7 (C-18) ; 153,5 et 153,3 (C-4 ; C-21) ; 117,6 (C-16) ; 105,7 (C-11) ; 102,0 (C-19) ; 56,8 (C-22) ; 48,5 (C-10) ; 44,9 (C-9) ; 39,5 (C-5 ; C-8) ; 37,9 (C-6) ; 33,2 (C-12) ; 32,7 (C-15) ; 32,0 (C-3) ; 27,8 (C-7) ; 24,9 (C-2) ; 22,5 (C-1) ; 18,6 (C-14) ; 18,2 (C-13).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 6667–6680.

# furanospuline 1 (46)

 $\mathbf{C_{25}H_{38}O}$  PM:  $354 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: huile jaunâtre

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2914 (C-H), 1025 (C-O)

SM: m/z

**R**<sub>f</sub>: 0,14 (silice, EP)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,33	pseudo-t	$^{3}J\approx 1,5$	1H	H-1
7,21	s élargi	-	1H	H-4
6,28	s élargi	-	1H	H-2
5,18	td	$^3J=7$ ; $\approx 1$	1H	H-7
5,14 - 5,09	massif	-	3H	H-12; H-17; H-22
2,46	t	$^{3}J = 7,3$	2H	H-5
2,25	m	-	2H	H-6
2,11-2,04	massif	-	6H	H-11; H-16; H-21
2,02 – 1,99	massif	-	6H	H-10; H-15; H-20
1,7	s élargi	-	3H	H-25
1.6	s élargi		12H	H-9; H-14;
1,6	s elargi	-	12Π	H-19; H-24

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 142,5 (C-1) ; 138,8 (C-4) ; 135,7 (C-8) ; 135,0 et 134,8 (C-13 ; C-18) ; 131,2 (C-23) ; 125,0 (C-3) ; 124,4 (C-12) ; 124,2 et 124,1 (C-17 ; C-22) ; 123,7 (C-7) ; 111,0 (C-2) ; 39,7 (C-10 ; C-15 ; C-20) ; 28,4 (C-6) ; 26,7 et 26,6 (C-11 ; C-16 ; C-21) ; 25,7 (C-25) ; 25,0 (C-5) ; 17,6 (C-24) ; 16,0 (C-9 ; C-14 ; C-19).

# Modes opératoires, caractéristiques physico-chimiques et spectrales des produits synthétisés

### néomamanuthaquinone (4) et isospongiaquinone (7)

#### Protocole opératoire:

L'ilimaquinone (1) (100 mg, 0,28 mmol) est solubilisée dans le MeOH (10 mL), un mélange d'AcOH (10 mL) et d'HCl (10 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 15 min puis dilué avec l'eau et extrait quatre fois au  $CH_2Cl_2$ . La phase organique est ensuite séchée sur  $Na_2SO_4$ , filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu d'une coloration jaune vif est purifié sur chromatographie flash sur gel de silice imprégnée au nitrate d'argent en éluant par un gradient  $EP/CH_2Cl_2$  50/50  $\rightarrow$  0/100 % pour donner le composé 4 (32 mg, 32 %) et le composé 7 (48 mg, 48 %).

#### néomamanuthaquinone (4)

 $C_{22}H_{30}O_4 - PM : 358 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune canari

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2925 (C-H), 1642 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na, calculée : 381,2042 ; mesurée : 381,2039

**R**<sub>f</sub>: 0,45 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 0,73 (SiO<sub>2</sub>/AgNO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

 $[\alpha]_{589}^{27,4^{\circ}C}$ : +704 (c = 0.044; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), (lit.  $[\alpha]_D$ : +11 (c = 0.09; CHCl<sub>3</sub>)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,34	S	=		ОН
5,84	S	=	1H	H-19
3,85	S	=	3H	OMe
2,70	d	$^{2}J = 13,2$	1H	1 H-15
2,56	d	$^{2}J = 13,2$	1H	1 H-15
2,13 – 1,97	massif		3Н	H-1; H-6 <sub>eq</sub>
1,90 - 1,85	massif	-	2H	$H-6_{ax}$ ; $H-7_{eq}$
1,60 - 1,53	massif	-	3H	H-2; H-8
1,43 – 1,32	massif	-	3H	H-3; H-7 <sub>ax</sub>
0,99	S	=	3H	H-11
0,95	S	=	3Н	H-12
0,81	S	=	3Н	H-14
0,77	d	$^{3}J = 6.9$	3H	H-13

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 182,6 (C-20) ; 182,1 (C-17) ; 161,4 (C-18) ; 152,8 (C-21) ; 135,0 (C-5) ; 131,3 (C-10) ; 117,9 (C-16) ; 102,0 (C-19) ; 56,8 (C-22) ; 42,8 (C-9) ; 39,9 (C-3) ; 34,5 (C-8) ; 34,2 (C-4) ; 32,2 (C-15) ; 28,9 (C-12) ; 28,0 (C-11) ; 26,5 (C-7) ; 25,8 (C-1) ; 22,0 (C-14) ; 20,7 (C-6) ; 20,0 (C-2) ; 15,4 (C-13).

<sup>4</sup>N. K. Utkina, V. A. Denisenko, O. V. Scholokova, A. E. Makarchenko, J. Nat. Prod., **2003**, 66, 1263–1265

#### isospongiaquinone (7)

 $C_{22}H_{30}O_4 - PM : 358 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune orangé

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2965 (C-H), 1642 (C=O)

**SMHR**: *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na, calculée : 381,2042 ; mesurée : 381,2046

**R<sub>f</sub>:** 0,45 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 0,76 (SiO<sub>2</sub>/AgNO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

 $[\alpha]_{589}^{27,3^{\circ}C}$ : +460 (c = 0.05; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), (lit.  $[\alpha]_D$ : +64,8 (c = 1; CHCl<sub>3</sub>)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,51	S	-		ОН
5,85	S	-	1H	H-19
5,13	s élargi	-	1H	H-3
3,85	S	-	3Н	OMe
2,61	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,49	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,06 – 1,97	massif	-	2H	H-1 <sub>eq</sub> ; H-2 <sub>eq</sub>
1,87	m	-	1H	H-2 <sub>ax</sub>
1,62	dt	$^{3}J = 12,6;3,0$	1H	H-6 <sub>eq</sub>
1,52	s élargi	-	3H	H-11
1,44	m		1H	H-1 <sub>ax</sub>
1,34	m		2H	H-7
1,21	m		1H	H-8
1,03	s élargi		1H	H-6 <sub>ax</sub>
0,99	s élargi	-	4H	H-10; H-12
0,96	d	$^{3}J = 6.2$	3Н	H-13
0,83	S	-	3Н	H-14

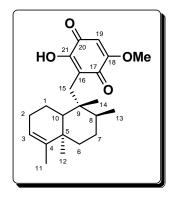
# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 182,3 (C-20) ; 182 (C-17) ; 161,8 (C-18) ; 153,2 (C-21) ; 144,0 (C-4) ; 120,9 (C-3) ; 117,6 (C-16) ; 101,9 (C-19) ; 56,8 (C-22) ; 47,9 (C-10) ; 43,0 (C-9) ; 38,5 (C-5) ; 37,8 (C-8) ; 36,0 (C-6) ; 32,3 (C-15) ; 27,9 (C-7) ; 27,0 (C-2) ; 20,1 (C-12) ; 19,8 (C-1) ; 18,1 (C-11) ; 17,6 (C-13) ; 17,3 (C-14).

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. G. Warren, R. J. Wells, J. F. Blount, *Aust. J. Chem.*, **1978**, *31*, 2685–2697

#### Protocole opératoire:

La 5-epi-ilimaquinone (2) (200 mg, 0,56 mmol) est solubilisée dans le MeOH (10 mL), un mélange d'AcOH (10 mL) et d'HCl (10 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 15 min puis dilué avec l'eau, et extrait quatre fois au  $CH_2Cl_2$ . La phase organique est ensuite séchée sur  $Na_2SO_4$ , filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu d'une coloration jaune vif est purifié sur chromatographie flash sur gel de silice imprégnée au nitrate d'argent en éluant par un gradient  $EP/CH_2Cl_2$  50/50  $\rightarrow$  0/100 % pour donner le composé **106** (106 mg, 53 %) et le composé **4** (71 mg, 35 %).



 $C_{22}H_{30}O_4 - PM : 358 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune orangé

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2925 (C-H), 1642 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na, calculée : 381,2042 ; mesurée : 381,2041

**R**<sub>f</sub>: 0,45 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 0,66 (SiO<sub>2</sub>/AgNO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

# 5-*epi*-isospongiaquinone (**106**)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,45	S	-		ОН
5,86	S	-	1H	H-19
5,39	s élargi	-	1H	H-3
3,86	S	-	3H	OMe
2,60	d	$^{2}J = 13,2$	1H	1 H-15
2,47	d	$^{2}J = 13,2$	1H	1 H-15
2,11	d élargi	$^{3}J = 12,5$	1H	H-8
1,97	dt	$^{3}J \approx 16.8 \; ; 4.7$	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,83 – 1,72	massif	-	3H	H-2 <sub>ax</sub> ; H-7
1,50	m	-	1H	H-1 <sub>eq</sub>
1,43 – 1,35	massif	-	3H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-6 <sub>eq</sub> ; H-10
1,14	td	$^{3}J = 13; 4,5$	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,02	S	-	3H	H-11
0,95	S	-	3H	H-12
0,99	d	$^{3}J = 6.7$	3H	H-13
0,74	S	-	3H	H-14

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 182,4 (C-20) ; 182,1 (C-17) ; 161,6 (C-18) ; 153,8 (C-21) ; 146,3 (C-4) ; 114,9 (C-3) ; 118,4 (C-16) ; 102,0 (C-19) ; 56,8 (C-22) ; 41,8 (C-8) ; 41,3 (C-6) ; 40,9 (C-5) ; 36,5 (C-10) ; 36,4 (C-9) ; 32,7 (C-15) ; 31,6 (C-2) ; 30,6 (C-7) ; 29,7 (C-11) ; 28,0 (C-12) ; 22,8 (C-1) ; 16,6 (C-13) ; 16,0 (C-14).

#### Protocole opératoire 1 (utilisation d'O<sub>3</sub>):

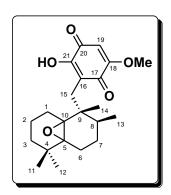
Dans un ballon tricol,  $CH_2Cl_2$  anhydre (50 mL) est mis, le ballon est porté à  $-78^{\circ}C$ , on fait ensuite buller l'ozone jusqu'à saturation (solution bleue). Cette solution présente une concentration d'environ 25 mM, elle est utilisée immédiatement.

La néomamanuthaquinone (4) (100 mg, 0,28 mmol) est solubilisée dans 13 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre à température ambiante, puis portée à –78°C. On prélève de la solution d'ozone (solution bleue) 11,2 mL (1 éq.) et on les ajoute en une seule fois à la solution du composé 4. Après 5 min d'agitaion à –78°C, on ajoute la thiourée (426 mg, 5,6 mmol, 20 éq.) suivi de 24 mL de MeOH. Le mélange obtenu est porté à température ambiante et est laissé sous agitation pendant 4 h.

Le mélange réactionnel est concentré sous vide, puis une extraction liquide-liquide  $H_2O/CHCl_3$  est réalisée. Les phases organiques sont réunies, séchées sur  $Na_2SO_4$ , puis concentrées sous vide. Le brut est purifié sur silice avec un gradient :  $CH_2Cl_2/MeOH\ 100/0 \rightarrow 90/10\ \%$ , pour obtenir le produit de départ (70 mg) et le composé **111** (15,7 mg, 15 %).

#### Protocole opératoire 2 (utilisation du m-CPBA) :

La néomamanuthaquinone (4) (20 mg, 0,056 mmol) est solubilisée dans 3 mL de  $CH_2Cl_2$  anhydre puis le m-CPBA (27 mg, 0,11 mmol, 2 éq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 4 h, puis une extraction liquide-liquide  $H_2O/CH_2Cl_2$  est réalisée, les phases organiques sont réunies, séchées sur  $Na_2SO_4$  et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice en éluant par :  $AcOEt/EP \rightarrow AcOEt \rightarrow AcOEt/MeOH 50/50 \rightarrow 100 \rightarrow 90/10$  %, pour obtenir le composé **111** (16 mg, 76 %).



 $C_{22}H_{30}O_5 - PM : 374 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2926 (C-H), 1641 (C=O), 1225 (C-O)

**SM**: m/z [M+H]<sup>+</sup> 375 **R**<sub>f</sub>: 0,84 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

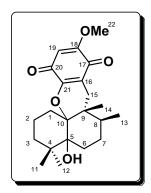
	,3/			
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,20	S	-		ОН
5,78	S	-	1H	H-19
3,79	S	-	3H	OMe
2,75	d	$^{2}J = 13,5$	1H	1 H-15
2,55	d	$^{2}J = 13,5$	1H	1 H-15
1,98 – 1,71	massif		5H	H-1; H-6; H-7 <sub>eq</sub>
1,64 – 1,55	massif	-	3H	H-2; H-8
1,42 – 1,30	massif	-	3H	H-3; H-7 <sub>ax</sub>
0,94	S	-	3H	H-11
0,90	S	-	3H	H-12
0,82	S	-	3H	H-14
0,70	d	$^{3}J = 6.8$	3H	H-13

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 182,5 (C-20) ; 182,2 (C-17) ; 161,3 (C-18) ; 153,1 (C-21) ; 117,7 (C-16) ; 102,3 (C-19) ; 69,1 et 68,9 (C-10 ; C-5) ; 56,7 (C-22) ; 41,7 (C-9) ; 37,2 (C-3) ; 33,5 (C-4) ; 32,4 (C-8) ; 28,4 (C-15) ; 26,9 (C-12) ; 24,6 (C-11) ; 24,6 et 24,5 (C-1 ; C6) ; 22,1 (C-7) ; 20,2 (C-14) ; 17,4 (C-2) ; 16,7 (C-13).

#### Protocole opératoire :

Le composé **4** (50 mg, 0,14 mmol) est solubilisé dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (5 mL), le *m*-CPBA (37 mg, 0,15 mmol, 1,1 éq.) est ajouté, puis une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (3 mL) est ajoutée, le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3 h. Une extraction liquide-liquide est réalisée avec  $H_2O$ - $CH_2Cl_2$ , les phases organiques réunies sont séchées sur  $Na_2SO_4$  puis concentrées sous vide, le mélange est purifié sur colonne, avec comme éluant :  $EtOAc/EP \rightarrow EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 50/50 \rightarrow 100 \% \rightarrow 90/10 \%$ , pour avoir 8 mg (15 %) du produit **112**.



 $C_{22}H_{30}O_5 - PM : 374 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect : laque jaune très clair

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3525 (O-H), 2845 (C-H), 1660 (C=O)

**SMHR**: *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na, calculée : 397,1991; mesurée : 397,1982

 $\mathbf{R_f}$ : 0,8 (silice,  $CH_2Cl_2$ )

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

·	, -,			
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
5.72	S	-	1H	H-19
3.80	S	-	3H	OMe
2,48	d	$^{2}J = 19,1$	1H	1 H-15
1,99	d	$^{2}J = 19,1$	2H	1 H-15, H-1 <sub>eq</sub>
1,84	td	$^{3}J = 13,3 ; 3,4$	1H	C-6 <sub>eq</sub>
1,64 – 1,49	massif	-	6Н	C-1 <sub>ax</sub> ; H-2 <sub>eq</sub> ; H-3 <sub>eq</sub> ; C-6 <sub>ax</sub> ; H-7
1,40	s élargi	-	4H	H-8; H-11ou H-12
1,37	m	-	1H	H-2 <sub>ax</sub>
1,2	m	-	1H	H-3 <sub>ax</sub>
1,10	S	-	3H	H-14
0,90	S	-	3H	H-11 ou H-12
0,78	d	$^{3}J = 6,5$	3Н	H-13

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 181,3 et 181,2 (C-17 et C-20); 159,4 (C-18); 152,0 (C-21); 115,7 (C-16); 104,8 (C-19); 87,5 (C-10); 76,8 (C-5); 56,3 (C-22); 39,1 (C-4); 37,7 (C-9); 36,4 (C-3); 32,3 (C-8); 27,9 (C-15); 27,5 (C-1); 26,8 (C-12); 26,1 (C-7); 25,2 (C-6); 24,2 (C-11); 19,6 (C-14); 17,7 (C-2); 16,1 (C-13).

#### Composés 113 et 114

#### Protocole opératoire (voie chimique):

L'ilimaquinone (116 mg, 0,32 mmol) est solubilisée dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre, puis le m-CPBA (86 mg, 0,35 mmol, 1,1 éq.) est ajouté, le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution saturée de  $Na_2CO_3$  puis extrait avec le dichlorométhane trois fois. La phase organique obtenue est séchée sur  $MgSO_4$  et concentrée sous vide. Après une séparation sur HPLC préparative en utilisant comme méthode d'élution une élution isocratique ( $H_2O + 0,2\%$  acide formique)/ACN 40/60 %, les produits **113** et **114** sont obtenus avec des rendements respectifs de 6 % (7 mg) et 44 % (53 mg).

#### Protocole opératoire (Biotransformation):

Le composé **113** est obtenu de façon diastéréoséléctive avec un rendement de 1,4 % (voir page .. pour le protocole opératoire)

 $C_{22}H_{30}O_5 - PM : 374 \text{ g.mol}^{-1}$ 

**Aspect**: laque jaune

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2928 (C-H), 1643 (C=O), 1235 (C-O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na, calculée : 397,1991, mesurée : 397,1986

 $R_f: 0,44 \text{ (CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9,5/0,5)$ 

 $\boldsymbol{[\alpha]_{589}^{27,2^{\circ}c}:+857\ (c=0{,}028\ ;\text{CH}_{2}\text{Cl}_{2})}$ 

 $t_R$  : 5,5 min (XBridge  $C_{18}$  ; 5 $\mu$ m ; 19 × 150 mm) élution isocratique ACN/(H<sub>2</sub>O

+ 0,2 % acide formique) 60/40

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,61	S	-		ОН
5,86	S	-	1H	H-19
3,86	S	-	3H	OMe
2,93	dd	$^{2}J = 4.5 ; 2$	1H	H-11 <sub>b</sub>
2,53	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,47	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,32	d	$^{2}J = 4,5$	1H	H-11 <sub>a</sub>
2,15-2,07	massif	-	2Н	H-1 <sub>eq</sub> ;
2,13 - 2,07	11103311	_	211	(1 H-3 ou 1 H-6)
1,86	d élargi	$^{3}J = 12,7$	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,38	d	$^{3}J = 2,7$	1H	H-1 <sub>ax</sub>
1,28 – 1,23	massif		4H	H-2 <sub>ax</sub> ; H-7
1,20 1,23	11103311		711	(1 H-3 ou 1 H-6)
1,09	S	-	4H	H-8; H-12
0,96	m		1H	(1 H-3 ou 1 H-6)
0,93	d	$^{3}J = 6.3$	3H	H-13
0,92	dd	$^{3}J = 11 ; 1,9$	1H	H-10
0,82	a álorgi		4H	H-14;
0,82	s élargi	-	4Π	(1 H-3 ou 1 H-6)

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 182,3 (C-20) ; 182,0 (C-17) ; 161,6 (C-18) ; 153,4 (C-21) ; 117,2 (C-16) ; 102,0 (C-19) ; 66,5 (C-4) ; 56,8 (C-22) ; 52,6 (C-11) ; 49,4 (C-10) ; 42,9 (C-9) ; 38,2 (C-5 ; C-8) ; 32,5 (C-15) ; 31,6 (C-3 ou C-6) ; 31,5 (C-3 ou C-6) ; 27,2 (C-7) ; 25,2 (C-2) ; 22,5 (C-1) ; 17,8 (C-13) ; 17,3 (C-12 ; C-14).

 $C_{22}H_{30}O_5 - PM : 374 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2928 (C-H), 1642 (C=O), 1235 (C-O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na, calculée : 397,1991; mesurée : 397,2002

**R**<sub>f</sub>: 0,55 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5/0,5) [ $\alpha$ ]<sup>19,5°C</sup><sub>589</sub>: +75 (c = 0,1; CHCl<sub>3</sub>)

 $t_R$ : 7,5 min (XBridge  $C_{18}$ ; 5 $\mu$ m; 19 × 150 mm) élution isocratique

 $ACN/(H_2O + 0.2 \% \text{ acide formique}) 60/40$ 

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

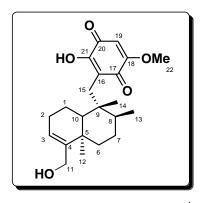
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7.57	S	-		ОН
5.83	S	-	1H	H-19
3.82	S	-	3H	OMe
2,70	d	$^{2}J = 4,5$	1H	H-11 <sub>b</sub>
2,56	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,46	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,26	d	$^{2}J = 4,5$	1H	H-11 <sub>a</sub>
2,18-2,10	massif	-	2H	H-1 <sub>eq</sub> ; H-3 <sub>eq</sub>
1,74	m	-	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,51 – 1,34	massif		2H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2 <sub>ax</sub>
1,26 – 1,11	massif		6Н	H-6 ; H-7 ; H-8 ; H-10
1,07	S	-	3H	H-12
0,93	d	$^{3}J = 6,27$	3H	H-13
0,9	m		1H	H-3 <sub>ax</sub>
0,79	S	-	3H	H-14

# RMN $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 182,2 (C-20); 182,1 (C-17); 161,7 (C-18); 153,4 (C-21); 117,0 (C-16); 102,0 (C-19); 65,3 (C-4); 56,8 (C-22); 49,8 (C-11); 46,7 (C-10); 42,8 (C-9); 37,9 (C-5); 37,2 (C-8); 32,0 (C-15); 30,8 (C-3); 30,0 (C-6); 27,0 (C-7); 24,4 (C-2); 22,5 (C-1); 19,6 (C-12); 17,8 (C-13); 17,2 (C-14).

#### Protocole opératoire:

La 5-epi-ilimaquinone (30 mg, 0,048 mmol) est solubilisée dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre, puis le *m*-CPBA (24 mg, 0,1 mmol, 1,2 éq.) est ajouté, le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> puis extrait au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> trois fois. La phase organique obtenue est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée sous vide. Sur CCM, on remarque la présence d'un seul produit, confirmé par l'analyse du brut réactionnel en RMN-<sup>1</sup>H, après purification, le produit réarrangé **116** est obtenu (30 mg, 96 %)



 $C_{22}H_{30}O_5 - PM : 374 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaunâtre

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2852 (C-H), 1642 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na, calculée : 397,1991, mesurée : 397,1985

**R**<sub>f</sub>: 0,4 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5) [ $\alpha$ ]<sup>27°C</sup><sub>589</sub>: +2000 (c = 0,01; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

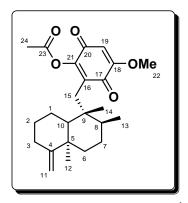
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,49	S	-		ОН
5,87	S	-	1H	H-19
5,67	s élargi	-	1H	H-3
4,19	d	$^{2}J = 13,2$	1H	1 H-11
4,07	d	$^{2}J = 13,2$	1H	1 H-11
3,87	S	-	3H	OMe
2,63	d	$^{2}J = 13,6$	1H	1 H-15
2,49	d	$^{2}J = 13,6$	1H	1 H-15
2,25 – 1,91	massif	-	6Н	H-1; H-7; H-6 <sub>eq</sub> ; H-10
1,40	m	-	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,18	m	-	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,08	d élargi	$^{3}J = 6.5$	1H	H-8
1,03	S	-	3H	H-12
1,0	m	=	1H	H-2 <sub>ax</sub>
0,9	d	$^{3}J = 6.5$	3H	H-13
0,87	S	=	3H	H-14

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 182,4 (C-20); 182,1 (C-17); 161,6 (C-18); 153,4 (C-21); 142,3 (C-4); 125,6 (C-3); 117,5 (C-16); 102,0 (C-19); 64,7 (C-11); 56,8 (C-22); 46,7 (C-8); 44,4 (C-9); 38,9 (C-10); 36,6 (C-5); 36,3 (C-6); 34,4 (C-12); 32,7 (C-15); 29,2 (C-2); 24,1 (C-7); 18,0 (C-13); 17,8 (C-1); 16,3 (C-14).

#### **Protocole experimental:**

5-epi-ilimaquinone (2) (200 mg, 0,078 mmol) est mise en solution avec l'anhydride acétique (10 mL), la DMAP est ajouté ( $\approx 5$  mg) le mélange est mis sous agitation à température ambiante pendant 48 h. une extraction liquide/liquide  $H_2O/CH_2Cl_2$  est réalisée 5 fois, le la phase organique est séchée sur  $Na_2SO_4$  puis concentrée sous vide pour donner le produit **125** avec un rendement de 85 % (190 mg).



 $C_{24}H_{32}O_5 - PM : 400 \text{ g.mol}^{-1}$ 

**Aspect :** solide jaune doré

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2855 (C-H), 1778 (C=O ester), 1659 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+H]<sup>+</sup> C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>O<sub>5</sub>, calculée : 401,2328 ; mesurée : 401,2325

 $\mathbf{R_f}$ : 0,4 (silice,  $CH_2Cl_2$ )

 $\boldsymbol{[\alpha]_{589}^{22,5^{\circ}C}:+100\ (c=0,01\ ; CH_{2}Cl_{2}), (lit.^{6}\ [\alpha]_{D}:+22,6\ (c=0,95\ ; CHCl_{3})}$ 

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> B. Cart, C. B. Rose, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2785–2787.

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

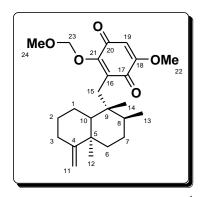
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
5,90	S	-	1H	H-19
4,70	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,66	s élargi	=	1H	H-11 <sub>b</sub>
3,84	S	=	3H	OMe
2,57	d	$^{2}J = 14.8$	1H	1 H-15
2,49 - 2,39	massif		2H	H-3 <sub>eq</sub> ; 1 H-15
2,13 – 1,73	massif	-	6Н	H-1; H-2; H-3 <sub>ax</sub> ; H-6 <sub>eq</sub>
1,49	m	-	1H	H-7 <sub>eq</sub>
1,23 – 1,10	massif	-	3H	H-7 <sub>ax</sub> ; H-8; H-10
1,1	d	$^{3}J = 3.2$	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,05	S	=	3H	H-12
0,93	d	$^{3}J = 6.8$	3H	H-13
0,87	S	=	3H	H-14

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 181,9 (C-17); 179,2 (C-20); 167,9 (C-23); 159,4 (C-18); 152,1 (C-4); 151,3 (C-21); 133,8 (C-16); 106,0 (C-11); 105,3 (C-19); 56,6 (C-22); 46,0 (C-10); 45,1 (C-9); 39,9 (C-8); 37,6 (C-5); 37,0 (C-6); 33,5 (C-15); 32,0 (C-12); 31,7 (C-3); 28,9 (C-7); 24,3 (C-2); 20,5 (C-24); 19,6 (C-1); 18,2 (C-13); 16,2 (C-14).

#### **Protocole experimental:**

5-epi-limaquinone (2) (50 mg, 0,14 mmol) est solubilisé dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (5 mL), puis la base de Hünig est ajoutée (48  $\mu$ L, 0,28 mmol, 2 eq), le mélange réactionnel devient violet foncé tout de suite, ensuite le chlorure de MOM (13  $\mu$ L, 0,17 mmol, 1,2 éq.) est ajouté au mélange. Après 2 h d'agitation à reflux, le mélange est refroidi à température ambiante, puis lavé trois fois à l'eau. La phase organique obtenue est séchée sur  $Na_2SO_4$ , filtrée et concentrée sous vide, une purification par chromatographie sur gel de silice en éluant avec 50/50 EP  $/CH_2Cl_2$  puis à 100 %  $CH_2Cl_2$  a donné le composé 119 (55 mg, 98 %).



 $C_{24}H_{34}O_5 - PM : 402 \text{ g.mol}^{-1}$ 

**Aspect:** laque jaune vert

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2929 (C-H), 1642 (C=O), 1058 (C-O-C)

**SM**: *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> 425 **R**<sub>f</sub>: 0,46 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

# RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

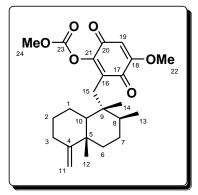
·	,			
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
5,75	S	-	1H	H-19
5,34	pseudo-d	$^2J \approx 1.2$	2H	H-23
4,68	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,65	s élargi		1H	H-11 <sub>b</sub>
3,81	S	-	3Н	H-22 (OMe)
3,50	S	-	3Н	H-24 (OMe)
2,64	d	$^{2}J = 13$	1H	1 H-15
2,54	d	$^{2}J = 13$	1H	1 H-15
2,42	m	-	1H	H-3 <sub>eq</sub>
2,08	dd	$^{3}J = 13,4$ ; 3,9	1H	H-3 <sub>ax</sub>
2,01 - 1,97	massif	-	2H	H-1 <sub>eq</sub> ; H-6 <sub>eq</sub>
1,91 – 1,70	massif	-	3H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2
1,62	m	-	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,50 – 1,41	m		1H	H-7 <sub>eq</sub>
1,22 - 1,13	massif	-	3H	H-10; H-8; H-7 <sub>ax</sub>
1,04	S	-	3H	H-12
0,88	d	$^{3}J = 7,7$	3H	H-13
0,87	S	-	3H	H-14

# RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 183,1 (C-20); 182,4 (C-17); 159,2 (C-18); 155,3 (C-21); 153,3 (C-4); 131,0 (C-23); 105,7 (C-11); 105,1 (C-19); 98,5 (C-16); 57,8 (C-24); 56,4 (C-22); 49,0 (C-10); 45,4 (C-9); 40,0 (C-8); 39,5 (C-5); 37,7 (C-6); 33,7 (C-15); 33,1 (C-12); 31,8 (C-3); 27,8 (C-7); 24,9 (C-2); 22,6 (C-1); 18,3 (C-13 et C14).

#### Protocole opératoire:

L'ilimaquinone (1) (200 mg, 0,56 mmol) est solubilisée dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (15 mL), puis la base de Hünig est ajoutée (192  $\mu$ L, 1,12 mmol, 2 éq.), le mélange réactionnel devient violet foncé tout de suite, ensuite le chloroformate de méthyle (51,4  $\mu$ L, 0,67 mmol, 1,2 éq.) est rajouté au mélange. Après trois heures d'agitation à reflux, le mélange est refroidi à température ambiante, puis lavé trois fois à l'eau. La phase organique obtenue est séchée sur  $Na_2SO_4$ , filtrée et concentrée sous vide pour donner le composé **138** (235 mg, 99%).



 $C_{24}H_{32}O_6 - PM : 416 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2921 (C-H), 1641 (C=O)

**SM**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> 439 **R**<sub>f</sub>: 0,47 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

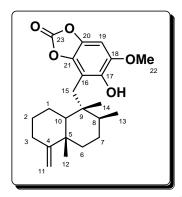
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
5,9	S	-	1H	H-19
4,42	s élargi		1H	H-11 <sub>b</sub>
4,40	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
3,88	S	-	3H	H-22 (OMe)
3,82	S	-	3H	H-24 (OMe)
2,56	d	$^{2}J = 13,3$	1H	1 H-15
2,45	d	$^{2}J = 13,3$	1H	1 H-15
2,31	td	$^{3}J = 13,7 ; 5,2$	1H	H-3 <sub>eq</sub>
2,06	dd	$^{3}J = 13,7 ; 4,2$	1H	H-3 <sub>ax</sub>
1,91	d élargi		1H	H-1 <sub>eq</sub>
1,84	m	-	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,52 - 1,32	massif	-	5H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-6; H-7
1,21 – 1,11	massif	-	2H	H-2 <sub>ax</sub> ; H-8
1,01	S	-	3H	H-12
0,87	d	$^{3}J = 6.3$	3H	H-13
0,82	S	-	3H	H-14
0,7	dd	$^{3}J = 11.8 ; 1.7$	1H	H-10

## RMN $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 181,9 (C-20) ; 179,3 (C-17) ; 159,8 (C-23) ; 159,7 (C-4) ; 152,2 (C-18) ; 150,0 (C-21) ; 133,2 (C-16) ; 105,3 (C-19) ; 102,9 (C-11) ; 56,7 (C-24) ; 56,1 (C-22) ; 50,9 (C-10) ; 44,1 (C-9) ; 40,6 (C-5) ; 38,2 (C-8) ; 36,5 (C-6) ; 33,3 (C-15) ; 32,8 (C-3) ; 28,3 (C-2) ; 27,9 (C-7) ; 23,4 (C-1) ; 20,5 (C-12) ; 17,8 (C-13) ; 17,0 (C-14).

#### Protocole opératoire :

Le composé 138 (170 mg, 0.4 mmol) est mis en solution dans le toluène (8 mL), puis  $Na_2S_2O_4$  est ajouté en excès (~ 20 éq.) avec 1 mL d'eau. Le mélange est agité à température ambiante sous atmosphère inerte jusqu'à éclaircissement de la couleur (environ 5 à 10 min), ensuite la base de Hünig (137  $\mu$ L, 0,8 mmol, 2 éq.) est ajouté doucement. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 15 heures sous atmosphère inerte. Une fois à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec de l'eau puis extrait trois fois avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur  $Na_2SO_4$ , filtrée et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash de gel de silice en éluant avec un gradient de 80/20 EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 100 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour obtenir le produit 137 (109 mg, 70 %).



 $C_{23}H_{30}O_5 - PM : 386 \text{ g.mol}^{-1}$ 

**Aspect:** solide blanc

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2924 (C-H), 1835 (C-C aromatique), 1469 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na, calculée : 409,1991 ; mesurée : 409,1992

 $\mathbf{R_f}$ : 0,15 (silice,  $CH_2Cl_2$ )

 $[\alpha]_{589}^{26,9^{\circ}C}$ : +60 (c = 0,2; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

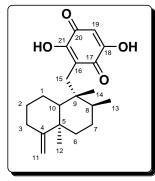
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
6,73	S	-	1H	H-19
4,38	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,42	s élargi	-	1H	H-11 <sub>b</sub>
3,88	S	-	3H	(H-22) OMe
2,70	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,79	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,34	td	$^{3}J = 13.6 ; 5.4$	1H	H-3 <sub>eq</sub>
2,15-2,05	massif	-	2H	$H-1_{eq}$ ; $H-3_{ax}$
1,91	m	-	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,54 – 1,21	massif	-	7H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2 <sub>ax</sub> H6 ; H-7 ; H-8
1,06	S	-	3H	H-12
1,01	d	$^{3}J = 5.9$	3H	H-13
0,92	S	-	3H	H-14
0,89	d	$^{3}J \approx 12 ; 2,1$	1H	H-10

## RMN $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 160,3 (C-4); 152,0 (C-23); 142,2 et 142,7 (C-18 ou C-20); 137,6 et 135,1 (C-17 ou C-21); 111,1 (C-16); 102,5 (C-11); 92,9 (C-19); 56,8 (C-22); 49,5 (C-10); 43,0 (C-9); 40,4 (C-5); 37,4 (C-8); 36,4 (C-6); 34,0 (C-15); 32,9 (C-3); 28,5 (C-2); 28,0 (C-7); 23,2 (C-1); 20,5 (C-12); 18,1 (C-13); 17,3 (C-14).

#### Protocole opératoire:

La 5-epi-ilimaquinone (50 mg, 0,14 mmol), est solubilisée dans l'éthanol (5 mL), puis une solution 2 N NaOH (3 mL) est ajoutée, le mélange réactionnel est porté à reflux, après 40 min d'agitation, le mélange est porté à température ambiante, une extraction liquide-liquide H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est réalisée, les phases organiques sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis concentrées sous vide pour avoir 42 mg du composé **144** (87 %).



 $C_{21}H_{28}O_4 - PM : 344 \text{ g.mol}^{-1}$ 

**Aspect:** solide orange

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3298 (OH), 2959 (C-H), 1608 (C=O)

SM: m/z

 $\mathbf{R_f}$ : 0,96 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9/1)

 $[\alpha]_{589}^{24,2^{\circ}c}:-50 \ (c=0.05; \text{CHCl}_3)$ 

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
7,89	s élargi	-		ОН
6,03	S	-	1H	H-19
4,71	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,68	s élargi	-	1H	H-11 <sub>b</sub>
2,6	d	$^{2}J = 14$	1H	1 H-15
2,50-2,4	massif	-	2H	1 H-15 ; H-3 <sub>eq</sub>
2,14-2,10	massif	-	2H	$H-3_{ax}$ ; $H-1_{eq}$
2,02	pseudo d	$^{3}J = 13.8$	1H	H-6 <sub>eq</sub>
1,90 - 1,72	massif	-	3H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2
1,50	m	-	1H	H-7 <sub>eq</sub>
1,20 - 1,14	massif	-	3H	H-7 <sub>ax</sub> ; H-8; H-10
1,1	dd	$^{3}J = 14.2 ; 2.8$	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,06	S	-	3H	H-12
0,93	d	$^{3}J = 6.2$	3H	H-13
0,87	S	-	3H	H-14

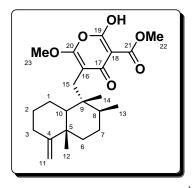
## RMN $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

 $\boldsymbol{\delta}$  (**ppm**) : 153,0 (C-4) ; 115,0 (C-16) ; 105,8 (C-11) ; 102,0 (C-19) ; 48,4 (C-10) ; 44,8 (C-9) ; 39,5 (C-5) ; 39,4 (C-8) ; 37,8 (C-6) ; 33,1 (C-12) ; 32,8 (C-15) ; 31,9 (C-3) ; 27,8 (C-7) ; 24,9 (C-2) ; 22,5 (C-1) ; 18,7 (C-14) ; 18,3 (C-13).

<sup>\*</sup> Les déplacements chimiques des carbones C-17, -18, -20 et -21 n'ont pas pu être obtenus.

#### Protocole opératoire :

L'ilimaquinone (43 mg, 0,12 mmol) est solubilisée dans le MeOH, la potasse est ajoutée d'un coup (280 mg, 4,8 mmol, 40 éq.) (la solution devient violet foncée) suivie de PIDA (200 mg, 0,6 mmol, 5éq.), le mélange réactionnel est porté à reflux à 65°C, après 15 min de reflux le mélange devient jaune (la réaction est suivie par CCM); après 2 h de reflux, l'expérience est arrêtée en portant le mélange à température ambiante, puis, une solution saturée de NaCl est ajoutée, un précipité blanc se forme, après filtration sur coton, le résidu est lavé avec l'eau. Le filtrat obtenu est extrait trois fois au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organises sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash de gel de silice en éluant avec un gradient de 50/50 EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 100 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour obtenir le produit **142** (21 mg, 43 %).



 $C_{23}H_{32}O_6 - PM : 404 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune clair

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2923 (C-H), 1776 (C=O ester), 1612 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+H]<sup>+</sup> C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>6</sub>, calculée : 405,2277 ; mesurée : 405,2273

 $\mathbf{R_f}$ : 0,4 (silice,  $CH_2Cl_2$ )

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

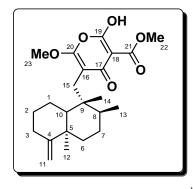
δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
14,49	S	-		ОН
4,45	s élargi	=	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,47	s élargi	-	1H	H-11 <sub>b</sub>
4,00	S	-	3Н	H-23 (OMe)
3,94	S	-	3Н	H-22 (OMe)
2,39	d	$^{2}J = 14,7$	1H	1 H-15
2,30-2,27	massif	-	2H	H-3 <sub>eq</sub> ; 1 H-15
2,08	dd	$^{3}J = 13.6 ; 4.4$	1H	H-3 <sub>ax</sub>
1,95	d élargi	$^{3}J = 13,0$	1H	H-1 <sub>eq</sub>
1,86	m	=	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,53 – 1,31	massif	-	5H	H-1 <sub>ax</sub> H-6 ; H-7
1,19 – 1,12	massif	-	2H	H-2 <sub>ax</sub> ; H-8
1,04	S	-	3Н	H-12
0,91	d	$^{3}J = 6.4$	3Н	H-13
0,8	S	-	3H	H-14
0,76	dd	$^{3}J = 11,9;2$	1H	H-10

## RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 181,4 (C-17) ; 172,8 (C-21) ; 165,0 (C-20) ; 159,9 (C-4) ; 156,0 (C-19) ; 102,9 (C-11) ; 90,0 (C-16) ; 85,2 (C-18) ; 56,0 (C-23) ; 52,7 (C-22) ; 49,5 (C-10) ; 42,1 (C-9) ; 40,4 (C-5) ; 37,3 (C-8) ; 36,4 (C-6) ; 32,9 (C-3) ; 30,8 (C-15) ; 28,7 (C-2) ; 28,0 (C-7) ; 23,4 (C-1) ; 20,4 (C-12) ; 18,0 (C-13) ; 17,0 (C-14).

#### **Protocole experimental:**

La 5-epi-ilimaquinone (300 mg, 0,84 mmol) est solubilisée dans le MeOH, la potasse est ajoutée d'un coup (1,9 g, 33,6 mmol , 40 éq.) (la solution devient violet foncée) suivie de PIDA (1,4 g, 4,2 mmol, 5éq.), le mélange réactionnel est porter à reflux à 65°C, après 15 min de reflux le mélange devient jaune (la réaction est suivie par CCM); après 2 h de reflux, l'expérience est arrêtée en portant le mélange à température ambiante, puis, une solution saturée de NaCl est ajoutée, un précipité blanc se forme, après filtration sur coton, le résidu est lavé avec l'eau. Le filtrat obtenu est extrait trois fois au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organises sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash de gel de silice en éluant avec un gradient de 50/50 EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 100 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour obtenir le produit **143** (159 mg, 47 %).



 $C_{23}H_{32}O_6 - PM : 404 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Aspect: laque jaune clair

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2927 (C-H), 1775 (C=O ester), 1611 (C=O)

**SMHR**: m/z [M+H]<sup>+</sup> C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>6</sub>, calculée : 405,2277 ; mesurée : 405,2273

 $\mathbf{R_f}$ : 0,39 (silice,  $CH_2Cl_2$ )

 $[\alpha]_{589}^{24,5^{\circ}C}:-75\ (c=0.066\ ; \text{CHCl}_3)$ 

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
14,45	S	-		ОН
4,71	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,67	s élargi	-	1H	H-11 <sub>b</sub>
4,02	S	-	3H	H-23 (OMe)
3,95	S	-	3H	H-22 (OMe)
2,44	massif	-	2H	H-15 <sub>a</sub> ; H-3 <sub>eq</sub>
2,34	d	$^{2}J = 14,7$	1H	H-15 <sub>b</sub>
2,12	dd	$^{3}J = 12,1;4,1$	1H	H-3 <sub>ax</sub>
2,05 - 1,99	massif	-	2H	H-1 <sub>eq</sub> ; H-6 <sub>eq</sub>
1,88 - 1,70	massif	-	3H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2
1,45	m	-	1H	H-7 <sub>eq</sub>
1,18 – 1,15	massif	-	3H	H-7 <sub>ax</sub> ; H-8; H-10
1,07	s élargi	-	4H	H-6 <sub>ax</sub> ; H-12
0,87	d	$^{3}J = 6.3$	3H	H-13
0,83	S	-	3H	H-14

## RMN $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 181,5 (C-17) ; 172,8 (C-21) ; 165,0 (C-20) ; 156,2 (C-19) ; 153,2 (C-4) ; 105,9 (C-11) ; 90,2 (C-16) ; 85,2 (C-18) ; 55,8 (C-23) ; 52,7 (C-22) ; 47,6 (C-10) ; 43,6 (C-9) ; 39,3 (C-5) ; 38,6 (C-8) ; 37,7 (C-6) ; 33,1 (C-12) ; 31,9 (C-3) ; 30,9 (C-15) ; 27,8 (C-7) ; 25,0 (C-2) ; 22,5 (C-1) ; 18,4 (C-13 et C-14).

#### Composés 154 et 155

#### Protocole opératoire:

La 5-epi-ilimaquinone (100 mg, 0,28 mmol) est solubilisée dans l'acétonitrile, puis la benzylamine (55  $\mu$ l, 0,33 mmol, 1,2 éq.) est ajoutée, le mélange réactionnel devient tout de suite violet foncé, la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 15 min. Le mélange réactionnel est concentré sous vide puis purifié sur chromatographie flash sur gel de silice en éluant par un gradient  $50/50 \rightarrow 0/100$  % EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puis 90/10 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, pour obtenir deux produits **154** (36 mg, 30%) et **155** (58 mg, 39%).

 $C_{28}H_{35}NO_3 - PM : 433 \text{ g.mol}^{-1}$ 

**Aspect:** laque rouge

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2925 (C-H), 1595 (C-C aromatique), 1212 (C-N)

**SMHR**: m/z [M+H]<sup>+</sup> C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>3</sub>, calculée : 434,2695 ;

mesurée : 434,2693

 $\mathbf{R_f}$ : 0,54 (silice,  $CH_2Cl_2$ )

 $[\alpha]_D$ : non déterminé (solution trop colorée)

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
8,3	s élargi	=	=	ОН
7,38 – 7,36	massif		3H	H-25; H-26; H-27
7,29 - 7,27	massif	-	2H	H-24; H-28
6,7	s élargi	-	=	NH
5,45	S	-	1H	H-19
4,70	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,67	s élargi	-	1H	H-11 <sub>b</sub>
4,34	S	-	2H	H-22
2,54	d	$^{2}J = 13.8$	1H	1 H-15
2,43	d élargi	$^{2}J = 13.8$	2H	1 H-15 ; H-3 <sub>eq</sub>
2,12	t	$^{3}J = 12.8$	2H	$H-1_{eq}$ ; $H-3_{ax}$
2,01	d	$^{3}J = 13,7$	1H	H-6 <sub>eq</sub>
1,86 – 1,74	massif	-	2H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2 <sub>eq</sub>
1,66	s élargi	-	1H	H-2 <sub>ax</sub>
1,49	m	-	1H	H-7 <sub>eq</sub>
1,21	s élargi	-	3H	H-7 <sub>ax</sub> ; H-8; H-10
1,12	d	$^{3}J = 13,5$	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,06	S	-	3H	H-12
0,92	d	$^{3}J = 5,2$	3H	H-13
0,87	S	-	3H	H-14

## RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (**ppm**) : 182,9 (C-20) ; 178,6 (C-17) ; 156,8 (C-21) ; 153,5 (C-4) ; 150,0 (C-18) ; 135,1 (C-23) ; 129,0 (C-25 et C-27) ; 128,0 (C-26) ; 127,7 (C-24 et C-28) ; 114,0 (C-16) ; 105,6 (C-11) ; 92,5 (C-19) ; 48,3 (C-10) ; 47,1 (C-22) ; 44,4 (C-9) ; 39,4 (C-5) ; 39,3 (C-8) ; 37,9 (C-6) ; 33,1 (C-12) ; 32,8 (C-15) ; 32,0 (C-3) ; 27,8 (C-7) ; 25,0 (C-2) ; 22,5 (C-1) ; 18,6 (C-14) ; 18,3 (C-13).

 $C_{35}H_{42}N_2O_2 - PM : 522 \text{ g.mol}^{-1}$ 

**Aspect**: laque bleu vert

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2926 (C-H), 1522 (C-C aromatique),

1231 (C-N)

**SMHR**: m/z [M+H]<sup>+</sup> C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calculée : 523,3325 ;

mesurée : 523,3329 **R<sub>f</sub> :** 0,83 (silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

 $[\alpha]_D$ : non déterminé (solution trop concentrée)

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
**	•		<u> </u>	H-25; H-25';
7,36	s élargi	-	6H	H-27; H-27; H-
				26 ; H-26'
7,26	s élargi	_	4H	H-24; H-24;
	5 Clargi			H-28; H-28'
5,24	S	-	1H	H-19
4,67	s élargi	-	2H	H-11
4,50	S	-	4H	H-22; H-22'
2,54	d	$^{2}J = 13,7$	1H	1 H-15
2,43	d	$^{2}J = 13,7$	2H	1 H-15 ; H-3 <sub>eq</sub>
2,35	d	$^{3}J = 10.9$	1H	H-1 <sub>eq</sub>
2,09	d	$^{3}J = 13,3$	1H	H-3 <sub>ax</sub>
1,99	d	$^{3}J = 13,3$	1H	H-6 <sub>eq</sub>
1,86 – 1,74	massif	-	2H	H-1 <sub>ax</sub> ; H-2 <sub>eq</sub>
1,64	s élargi	-	1H	H-2 <sub>ax</sub>
1,49	m	-	1H	H-7 <sub>eq</sub>
1,38	s élargi	-	2H	H-8; H-10
1,19 – 1,14	massif	-	2H	H-6 <sub>ax</sub> H-7 <sub>ax</sub>
1,07	S	-	3H	H-12
0,99	d	$^{3}J = 5,7$	3H	H-13
0,84	S	-	3H	H-14

## RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm) : 171,2 (C-17; C-20); 157,0 (C-18; C-21); 154,5 (C-4); 134,1 (C-23; C-23'); 129,2 (C-25; C-25'; C-27; C-27'); 128,6 (C-26; C-26'); 127,8 (C-24; C-24'; C-28; C-28'); 109,5 (C-16); 105,1 (C-11); 81,0 (C-19); 48,3 (C-10); 47,4 (C-22; C-22'); 44,0 (C-9); 39,6 (C-5); 39,3 (C-8); 38,0 (C-6); 33,8 (C-15); 33,2 (C-12); 32,3 (C-3); 28,0 (C-7); 25,2 (C-2); 22,8 (C-1); 18,7 (C-14); 18,6 (C-13).

# Caractéristiques physico-chimiques et spectrales des produits obtenus par biotransformation

 $C_{23}H_{33}NO_5 - PM : 403 \text{ g.mol}^{-1}$ 

 $\rho$ : 5,3 %

**Aspect:** laque rouge

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3310 (O-H ou N-H), 2925 (C-H), 1597 (C=O),

1215 (C-N)

**SMHR**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub>, calculée : 404,2437,

mesurée: 404,2355

 $\mathbf{t_R}$ : 5,6 min (Sunfire  $C_{18}$ ; 5 $\mu$ m; 19 × 150 mm) gradient ACN/eau

 $40/60 \rightarrow 80/20$ 

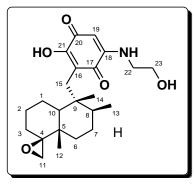
 $[\alpha]_D$ : non déterminé (solution trop colorée)

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
6,7	s élargi	=		NH
5,4	S	=	1H	H-19
4,80	s élargi		1H	$H-11_b$
4,73	s élargi	-	1H	H-11 <sub>a</sub>
4,28	m	=	1H	H-3
3,9	d élargi	$^{3}J = 5,1$	2H	H-23
3,33	S	-	2H	H-22
2,49	d	$^{2}J = 13.8$	1H	1 H-15
2,44	d	$^{2}J = 13.8$	1H	1 H-15
1,98	t	$^{3}J = 12,1$	2H	H-1 <sub>eq</sub> ; H-2 <sub>eq</sub>
1,76	m	=	1H	H-1 <sub>ax</sub>
1,60	m	=	1H	H-6 <sub>eq</sub>
1,47	m	-	1H	H-2 <sub>ax</sub>
1,38	d	$^{3}J = 10,1$	2H	H-7
1,25	S	-	3H	H-12
1,23	m	-	1H	H-6 <sub>ax</sub>
1,17	m	=	1H	H-8
0,97	d	$^{3}J = 6.3$	3H	H-13
0,86	S	=	3H	H-14
0,78		$^{3}J = 11.8$	1H	H-10

## RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 182,7 (C-20); 178,4 (C-17); 160,7 (C-4); 157,0 (C-21); 150,4 (C-18); 113,7 (C-16); 109,5 (C-11); 92,0 (C-19); 74,7 (C-3); 59,9 (C-23); 49,7 (C-10); 44,7 (C-22); 42,8 (C-9); 40,1 (C-5); 37,7 (C-8); 37,1 (C-6); 35,0 (C-2); 32,5 (C-15); 27,5 (C-7); 22,3 (C-12); 18,2 (C-1); 17,8 (C-13); 17,4 (C-14).



 $C_{23}H_{33}NO_5 - PM : 403 \text{ g.mol}^{-1}$ 

ρ: 6,4 %

**Aspect:** laque rouge

IR,  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3315 (O-H ou N-H), 2921 (C-H), 1596 (C=O),

1217 (C-N ou C-O)

**SMHR**: m/z [M+H]<sup>+</sup> C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub>, calculée : 404,2437,

mesurée: 404,2355

 $\mathbf{t_R}$ : 9,1 min (Sunfire  $C_{18}$ ;  $5\mu m$ ;  $19 \times 150$  mm) gradient

 $ACN/eau \ 40/60 \rightarrow 80/20$ 

 $[\alpha]_D$ : non déterminée (solution trop concentrée)

## RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm)	multiplicité	couplage <sup>n</sup> J (Hz)	intégration	attribution
6,9	S	=		NH
5,40	S	=	1H	H-19
3,85	s élargi	=	2H	H-23
3,31	s élargi	=	2H	H-22
2,95	s élargi	=	1H	H-11 <sub>b</sub>
2,46	d	$^{2}J = 13,9$	1H	1 H-15
2,40	d	$^{2}J = 13,9$	1H	1 H-15
2,32	d	$^{2}J = 3.9$	1H	H-11 <sub>a</sub>
2,09 - 2,06	massif	-	2H	H-1 <sub>eq</sub> ;
		2		(1 H-3 ou 1 H-6)
1,82	d	$^{3}J = 11,6$	1H	H-2 <sub>eq</sub>
1,34	m	-	1H	H-1 <sub>ax</sub>
1,24	s élargi	_	4H	H-2 <sub>ax</sub> ; (1 H-3 ou 1
1,24	3 Clargi		711	H-6); H-7
1,08	S	-	4H	H-8; H-12
1,01 – 0,94	massif	_	2H	(1 H-3 ou 1 H-6);
1,01 - 0,94	11145511		211	H-10
0,89	d	$^{3}J = 6$	3H	H-13
0,8	S	-	4H	(1 H-3 ou 1 H-6);
0,8	8	_	711	H-14

## RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**δ (ppm)**: 182,7 (C-20); 178,3 (C-17); 150,6 (C-18); 157,2 (C-21); 113,6 (C-16); 91,8 (C-19); 66,7 (C-4); 59,5 (C-23); 52,8 (C-11); 49,0 (C-10); 44,9 (C-22); 42,5 (C-9); 38,2 (C-5); 38,0 (C-8); 32,5 (C-15); 31,6 (C-3; C-6); 27,2 (C-7); 25,1 (C-2); 22,5 (C-1); 17,8 (C-13); 17,3 (C-12; C-14).

## **Annexes**

Annexe 1
Sesquiterpènes quinoniques

éponges	métabolite isolé	activités biologiques <sup>9</sup>	Réf.
D. elegans, (Australie, Malaisie)	HO—OMe	<ul> <li>Activité antitrypanosomale IC<sub>50</sub>: 7,7 μg/mL</li> <li>Activité antiplasmodiale : IC<sub>50</sub>: 1743 ng/mL (clone K1), 949 ng/mL clone (NF54)</li> <li>CI<sub>50</sub> = 1,5 ; 3,37 μg/mL, contre les cellules cancéreuses du sein (BC) et des poumons (NCI-H187) respectivement.</li> <li>Activité HIF-1 à une concentration de 10 μM, 930 % d'induction</li> <li>Effet antiprolifératif sur plusieurs lignées cancéreuses : P-388 (0,2 μg/mL), KB-16 (0,7 μg/mL), A-549 (0,4 μg/mL)</li> <li>Effet cytotoxique sur les cellules tumorales Ehrlich (CI<sub>50</sub> = 22,4 μg/mL).</li> <li>Inhibitrice de l'activité lyase de l'ADN polymérase β CI<sub>50</sub>= 45,2 μM.</li> <li>Une cytotoxicité modérée contre les cellules A2780 (CI<sub>50</sub>= 10,9 μM).</li> <li>Activité cytotoxique contre plusieurs lignées cellulaires : cancer de la prostate PC-3 (CI<sub>50</sub> = 2,6 μM) et LNCaP (CI<sub>50</sub> = 4,6 μM), cancer du poumon non à petites cellules A549 (CI<sub>50</sub>=4,1) et les cellules hépatocellulaires du carcinome Hep3B (CI<sub>50</sub>=12).</li> <li>L'ilimaquinone (1) et son 5-epimère (2) présentent la même activité contre les cellules V79, avec une IC<sub>50</sub> = 2,8 et 2,3 μmol/L respectivement,</li> <li>Une étude de l'activité inductrice des cellules K562 des érythroblasts a montré que l'ilimaquinone et la 5-epi-ilimaquinone présentent une CI = 15μM pour les deux.</li> </ul>	2, 3, 10-18
D. elegans	HO—OMe	Activité cytotoxique contre les cellules leucémiques P388 avec CI <sub>50</sub> = 2,2 μg/mL, et contre des modèles de tumeur solides A549, HT-29, B16/F10 (CI <sub>50</sub> = 0,9; 3,4; 1,1 μg/mL resp.).	3,6

	T		
D. elegans (île Palaos)	HO—OMe	Activité d'induction du facteur HIF-1 à une concentration de 10 μM, 830 % d'induction	11
Dactylospongia sp. (Australie)	néomamanuthaquinone (4)	$CI_{50} = 8,42 \ \mu g/mL$ ; contre les cellules cancéreuses du sein (BC)	12
D. elegans (Australie)	HO——OMe  ## O OMe  ## O OM	$CI_{50}=6,69$ ; 11,52 µg/mL, contre les cellules cancéreuses du sein (BC) et des poumons (NCI-H187) respectivement.	
Dactylospongia n. sp.	HO OME  15 OME  Spongiaquinone (6)	-	19
H. metachromia (Okinawa)	HO—OMe  3 4 isospongiaquinone (7)	-	20
D. elegans (Australie)	HO OMe  OMe  dictyocératidaquinone (8)	-	12

D. elegans (île Palaos)	HO OMe  H 5  dactylospongiaquinone (9)	Activité d'induction du facteur HIF-1 à une concentration de 10 μM, 1000 % d'induction	11
D. elegans (okinawa)	OMe O 21 O 3 O 3 O 3 O 4 O 4 O 5 6 O 5 6 O 5 7 O 7 O 7 O 7 O 7 O 7 O 7 O 7 O 7 O 7 O	Dactyloquinone B: activité cytotoxique contre: SF-268, MCF-7, H460, HT-29, CHO-K1 (CI <sub>50</sub> = 32; 41; 30; 46; 43 μM resp.)	21
D. elegans	O OMe  O 16  O 15  Néodactyloquinone (12)	Activité cytotoxique modérée contre les cellules $HeLa \; (CI_{50} = 86 \; \mu M.) \label{eq:entropy}$	22
Dactylospongia n. sp (Australie)	MeO O J H cyclospongiaquinone-2 (13)	$CI_{50} = 4,96 \ \mu g/mL$ , contre les cellules cancéreuses des poumons (NCI-H187).	11, 19
D. elegans	OMe O 21 O H 1 9 dactyloquinone C (14)	-	23
D. elegans (île Palaos)	OMe 0 21 0 21 56	-	11

Dactylospongia n. sp. (Australie)	O HO—OMe	-	19
D. elegans (île Palaos)	OMe O O O O O O O O O O O O O O O O O O	-	11
D. elegans	MeO O O Cyclospongiaquinone-1 (59)	-	21
Dactylospongia n. sp (Australie)	MeO  O  Dehydrocyclospongiaquinone-1 (60)	-	19
D. elegans (Australie)	O HO—OMe	$CI_{50}=2,61$ ; 8,78 µg/mL, contre les cellules cancéreuses du sein (BC) et des poumons (NCI-H187) respectivement.	12
D. elegans	MeO O H 5σ: dactyloquinone D (62) 5β: dactyloquinone E (63)	-	23
D. elegans (Australie)	HO—OMe HO—74	$CI_{50}=4,45$ ; 10,9 µg/mL, contre les cellules cancéreuses du sein (BC) et des poumons (NCI-H187) respectivement.	12

MeO  7,8-dehydrocyclospongiaquinone (76)	Inactif contre les cellules cancéreuses des poumons (NCI-H187) et du sein (BC)	
MeO O J J H 9-epi-7,8-dehydro cyclospongiaquinone (77)	$CI_{50}=7,38$ ; 12,4 µg/mL, contre les cellules cancéreuses du sein (BC) et des poumons (NCI-H187) respectivement.	

Annexe 2
Sesquiterpènes phénoliques

éponge	Métabolite isolé	Activité biologique	références
Dactylospongia sp. (île Palaos); D. elegans (Malaisie)	OMe OH R1 OH R1: OH dictyocératine A (15) R1: H dictyocératine C (16)	-	Composé 16 <sup>13,24</sup> Composé 15 <sup>3,24</sup>
D. elegans	OMe R <sub>2</sub> OH OH R1: OH, R2: H sménodiol (17) R1: R2: H dactylosponol (18) R1 = R2: OH dactylospontriol (19)	-	3, 21
D. metachromia	OMe OH OH H 18-hydroxy- 5-epi-hyrtiophénol (20)	CI <sub>50</sub> >10 μM	25
D. elegans (Australie)	OH OH OH OH OCH <sub>3</sub>	Activité antitrypanosomale IC <sub>50</sub> : 17,4 μg/mL Activité antiplasmodiale: IC <sub>50</sub> : 786 ng/mL (clone K1), 1911: ng/mL clone (NF54)	10, 20

D. elegans (Île Palaos)	MeO OH OH		11
D. elegans	OH O O O N-i-h 8-epi-chromazonarol (73)	-	23

Annexe 3

## Sesquiterpènes aminoquinoniques

Éponge	Mét	tabolite isolé	Activités biologiques	Ref
D. elegans		R: NH <sub>2</sub> 5β: sménospongine ( <b>22</b> )	Activité cytotoxique contre les cellules leucémiques P388 avec CI <sub>50</sub> = 2,6 μg/mL, et contre des modèles de tumeur solides A549, HT-29, B16/F10 (CI <sub>50</sub> = 5,7; 4; 4,1 μg/mL resp.).	
	O R	R:  HN  5β: sménospongidine (23)  5α: 5-epi-sménospongidine (24)	<b>24 :</b> Activité cytotoxique contre les cellules leucémiques P388 avec $\text{CI}_{50}$ = 1,9 µg/mL, et contre des modèles de tumeur solides A549, HT-29, B16/F10 ( $\text{CI}_{50}$ = 3,9 ; 2,4 ; 1,9 µg/mL resp.).	3
		R: HN 5β: sménospongiarine (64) 5α: 5-epi-sménospongiarine (72)	<b>72</b> : Activité cytotoxique contre les cellules leucémiques P388 avec $CI_{50}$ = 0,7 μg/mL, et contre des modèles de tumeur solides A549, HT-29, B16/F10 ( $CI_{50}$ = 0,8 ; 0,9 ; 0,6 μg/mL resp.).	
D. elegans (île Truant, nord Australie)	II	R: HN OH 5β: sménospongine B (65)	Activité cytotoxique contre : SF-268, MCF-7, H460, HT-29, CHO-K1 avec $\text{CI}_{50} = 9.7$ ; 10 ; 6 ; 6,0 ; 3,0 $\mu\text{M}$ resp.	26
		O R: HN OH 5β: sménospongine C (66)	Activité cytotoxique contre : SF-268, MCF-7, H460, HT-29, CHO-K1 avec $\text{CI}_{50} = 20$ ; 31 ; 14 ; 28 ; 18 $\mu\text{M}$ resp.	
D.  metachromia  (Indonésie)	O R HO O D	R:  5-epi-nakijiquinone Q (27)  R:  HN  R:  5-epi-nakijiquinone Q (27)  R:  NH  5-epi-nakijiquinone T (68)	Activité cytotoxique contre les cellules de lymphome de souris L5178Y, $\text{CI}_{50} = 1,1~;~1,7~;~3,7~;~1,8~;~1,3~\mu\text{M},~\text{pour}~\textbf{27},~\textbf{69},~\textbf{68},~\textbf{28},~\textbf{70}~\text{resp}.$	25

	R: HN S 5-epi-nakijiquinone U (28)  R: HN F: 5-epi-nakijiquinone N (70)		
D. elegans (île Truant, nord Australie)	nakijinol B (25)	Activité cytotoxique contre : SF-268, MCF-7, H460, HT-29, CHO-K1 avec $\text{CI}_{50} = 24$ ; 35 ; 24 ; 21 ; 11 $\mu\text{M}$ resp.	26
D. metachromia (Indonésie)	MeO HO N S-epi-nakijinol C (26)	Activité cytotoxique contre les cellules de lymphome de souris L5178Y, $CI_{50} = > 10~\mu\text{M},~\text{pour}~\textbf{26},~\textbf{67}.$	25

Annexe 4

Cas particulier de sesquiterpènes

éponge	Métabolite isolé	Activités biologiques	Réf.
Dactylospongia sp. (île Palaos); D. elegans (Malaisie)	MeO  17α-OH: dactylospongénone A (29) 17β-OH: dactylospongénone C (30)  MeO  17β-OH: dactylospongénone B (31) 17α-OH: dactylospongénone D (32)	29 : Activité cytotoxique contre les cellules leucémiques P388 avec CI <sub>50</sub> = 0,6 μg/mL, et contre des modèles de tumeur solides B16/F10 (CI <sub>50</sub> = 2,1 μg/mL).	3, 13, 24
D. elegans (Malaisie)	O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	-	13
D. elegans	18β-MeO: dactylolactone A (34) 18α-MeO: dactylolactone B (35)  18β-MeO: dactylolactone C (36) 18α-MeO: dactylolactone D (37)	-	22
D. elegans (Malaisie)	acide sménospongique (38)	-	13

Annexe 5

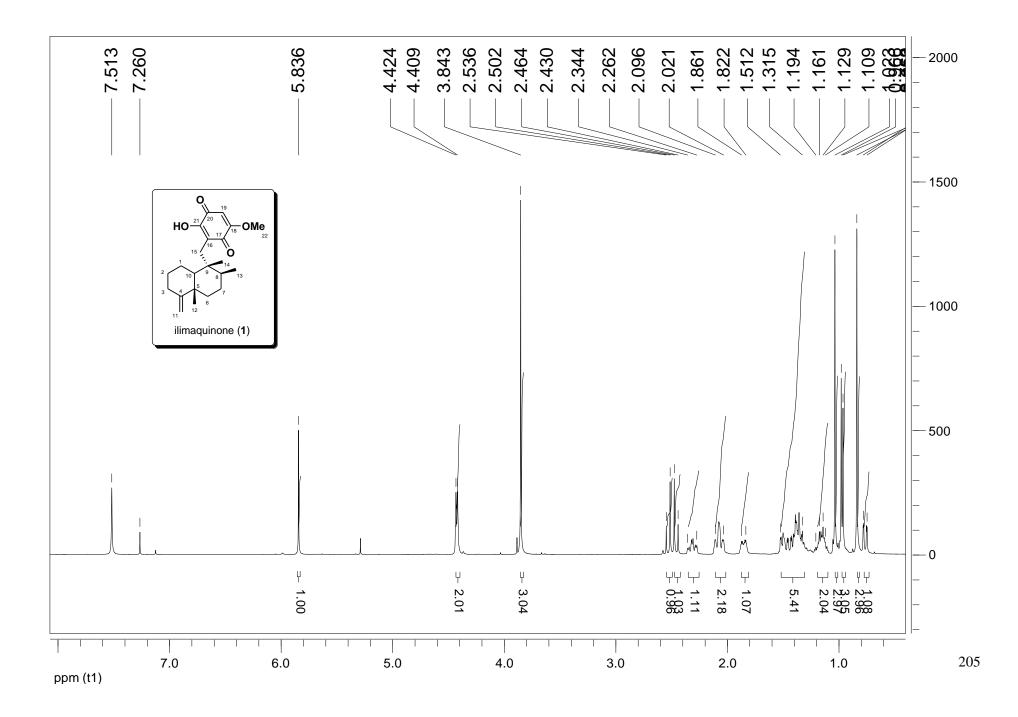
## Sesquiterpènes monocycliques

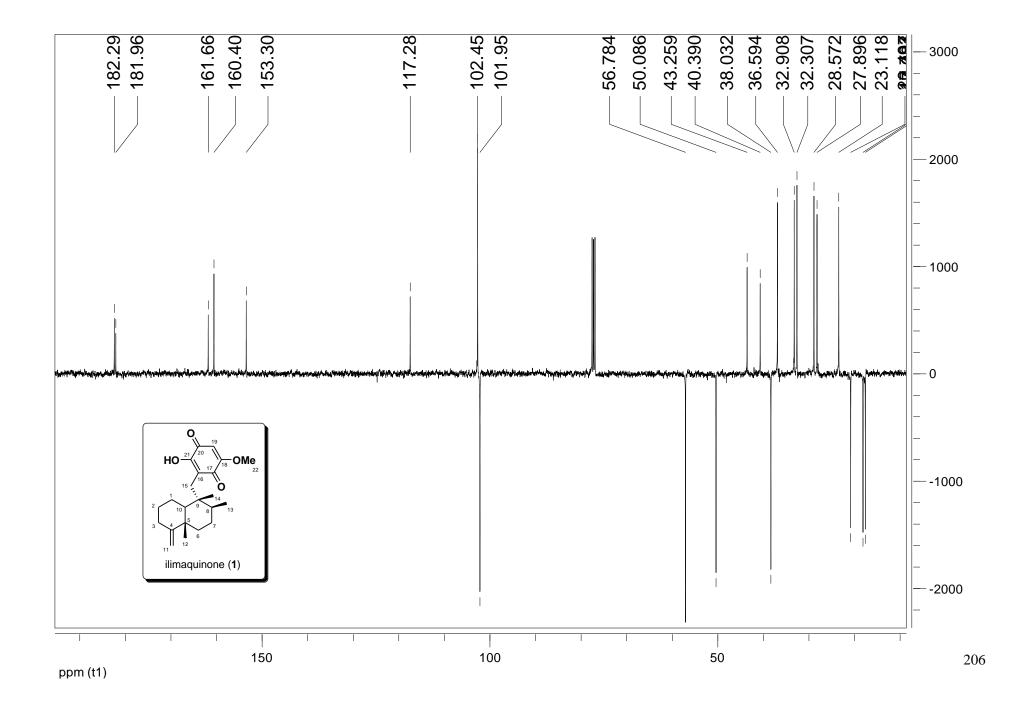
Éponge	Métabolite isolé		Activités biologiques	Réf.	
H. metachromia (Okinawa)	OH OR R	R : <b>OCH<sub>3</sub></b> métachromine A ( <b>39</b> )	- Activité antitumorale contre les cellules leucémiques murine L1210, cytotoxique contre les cellules tumorales humaines du colon, et inhibition de la croissance des cellules tumorales KB (CI <sub>50</sub> = 2,4 ; 0,1 ; 1,8 $\mu$ g/mL resp.)	20	
		R : <b>OC<sub>4</sub>H<sub>9</sub></b> métachromine F ( <b>50</b> )	- Activité cytotoxique contre les cellules du lymphome murin et contre les cellules KB du carcinome épidermoïde humain (CI $_{50}=0.6$ ; 1,9 µg/mL resp.)		
		R: HN métachromine G (40)	- Activité cytotoxique contre les cellules du lymphome murin et contre les cellules KB du carcinome épidermoïde humain (CI $_{50}=1,3$ ; >10 µg/mL resp.)	27	
		R: HN métachromine H (51)	<ul> <li>Activité cytotoxique contre les cellules du lymphome murin et contre les cellules KB du carcinome épidermoïde humain (CI<sub>50</sub> = 2,0; 6,4 μg/mL resp.)</li> </ul>		
	R <sub>1</sub>	$R_1$ : OH, $R_2$ = $R_4$ : OCH <sub>3</sub> , $R_3$ : H métachromine B (41)	- Activité antitumorale contre les cellules leucémiques murines L1210, cytotoxique contre les cellules tumorales humaines du colon, et inhibition de la croissance des cellules tumorales KB (CI $_{50} = 1,62$ ; 0,26; 0,68 µg/mL resp.)	20	
	0 R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> : OH, R <sub>3</sub> : H, R <sub>4</sub> : OCH <sub>3</sub> hippochromine A ( <b>55</b> )	<ul> <li>Hippochromine A diacétate: activité cytotoxique contre les cellules tumorales humaines du colon, et inhibition de la croissance des cellules tumorales KB (CI<sub>50</sub> = 0,22; 0,3; 0,6 μg/mL resp.)</li> </ul>		
		$R_1 = R_4 : OH, R_2 : OCH_{3}, R_3 : H$ hippochromine B ( <b>54</b> )	-	28	

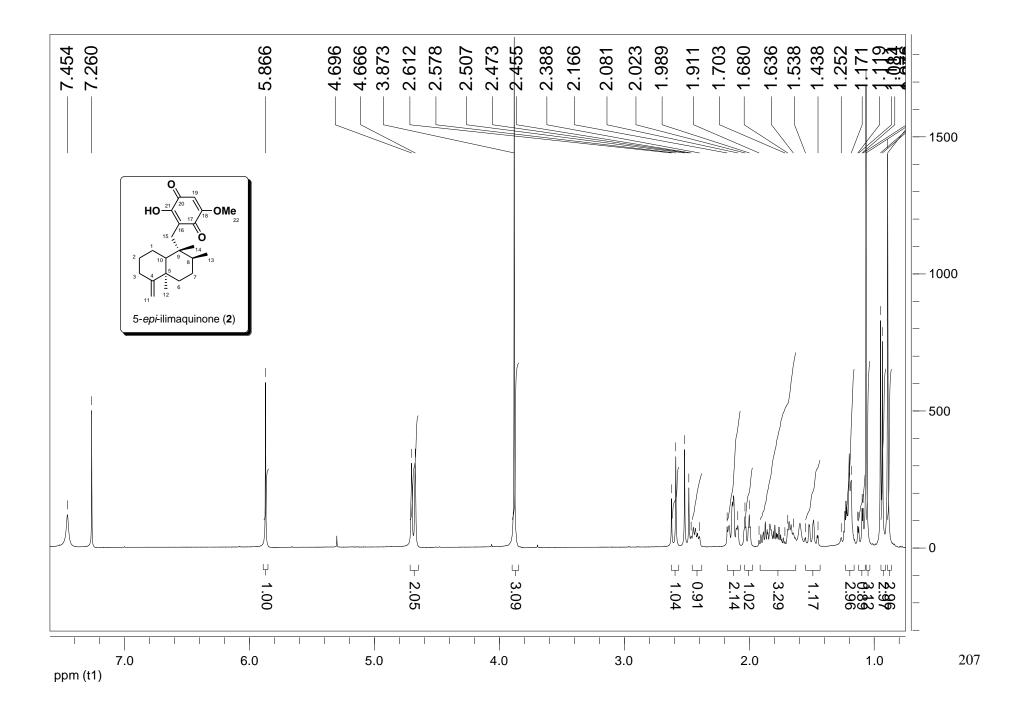
	$R_2 = R_3 = R_4 : OCH_3$ chromine D (67)	- Activité cytotoxique contre les cellules du lymphome murin et contre les cellules KB du carcinome épidermoïde humain (CI $_{50}=3.0$ ; 10,0 µg/mL resp.)	27
OH OCH <sub>3</sub>	romine C (49)	- Activité antitumorale contre les cellules leucémiques murines L1210 et L5178Y (CI $_{50}$ = 2,0 ; 0,92 $\mu g/mL$ resp.)	29
O OCH <sub>3</sub> métachro	omine E ( <b>52</b> )	- Activité cytotoxique contre les cellules du lymphome murin et contre les cellules KB du carcinome épidermoïde humain (CI $_{50}=0.2$ ; 0,4 µg/mL resp.)	27

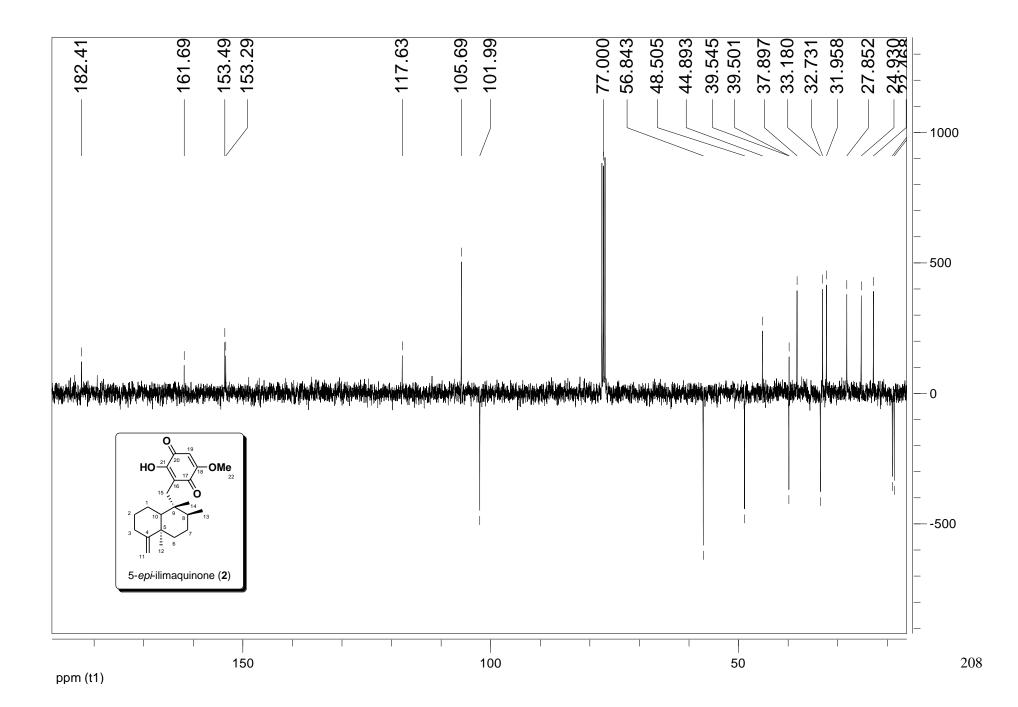
# Annexe 6

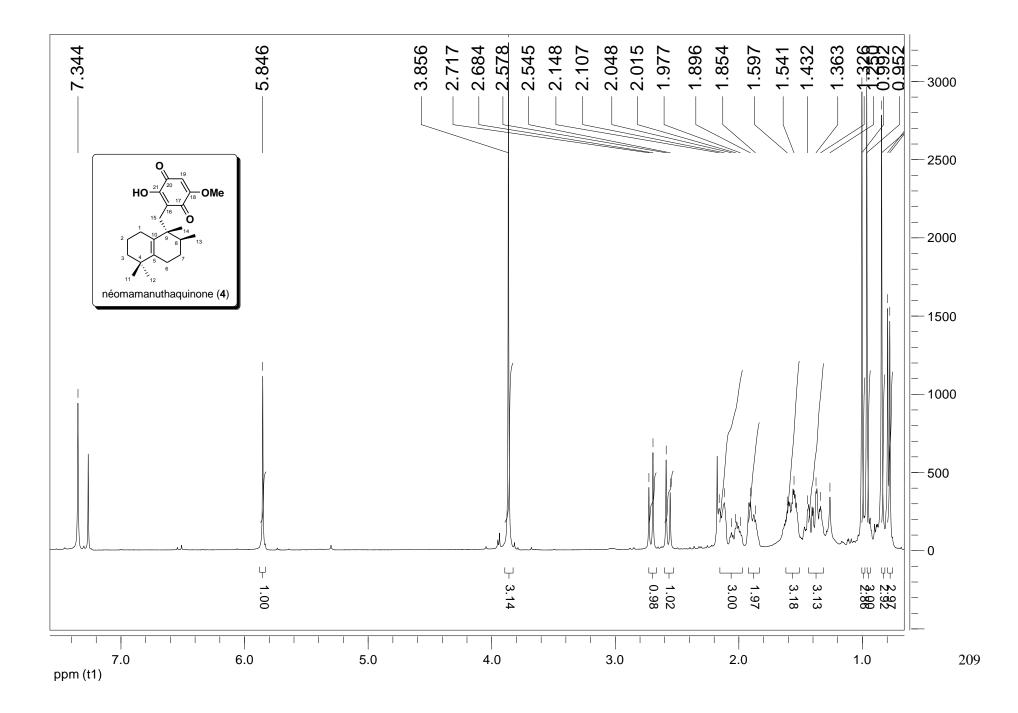
Spectres RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C sélectionnés de quelques structures représentatives

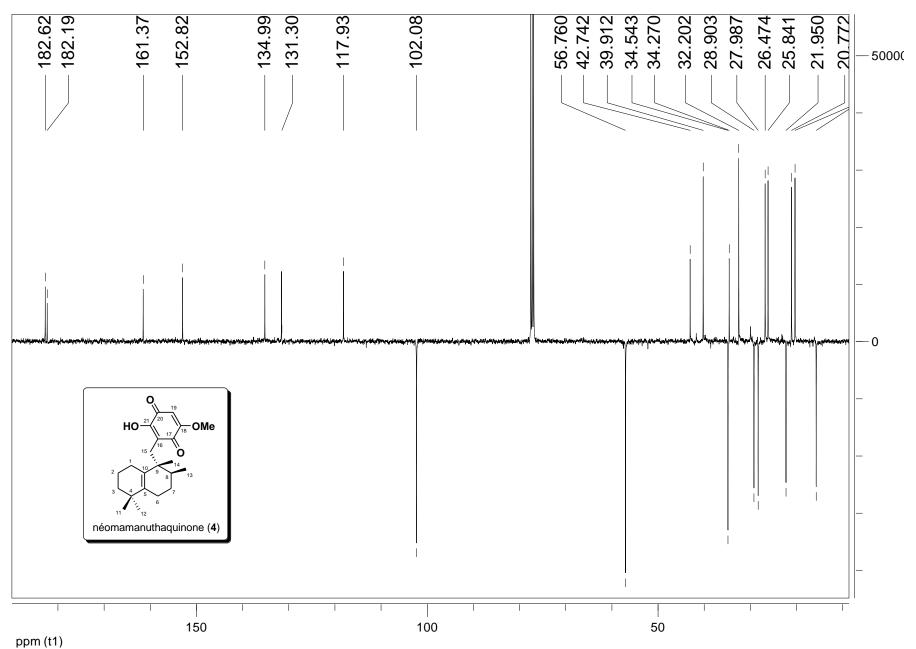


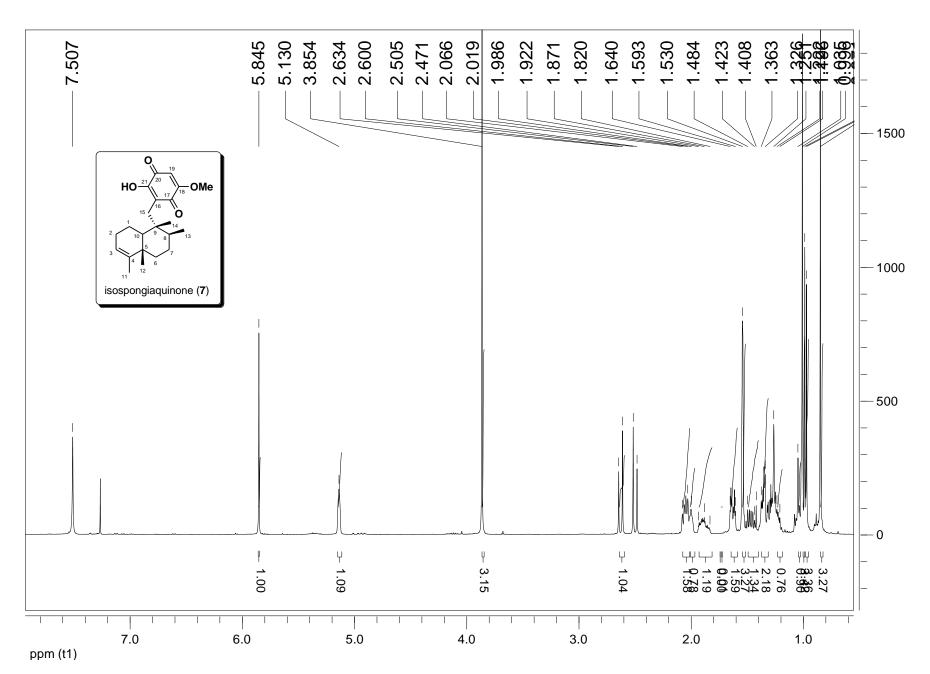


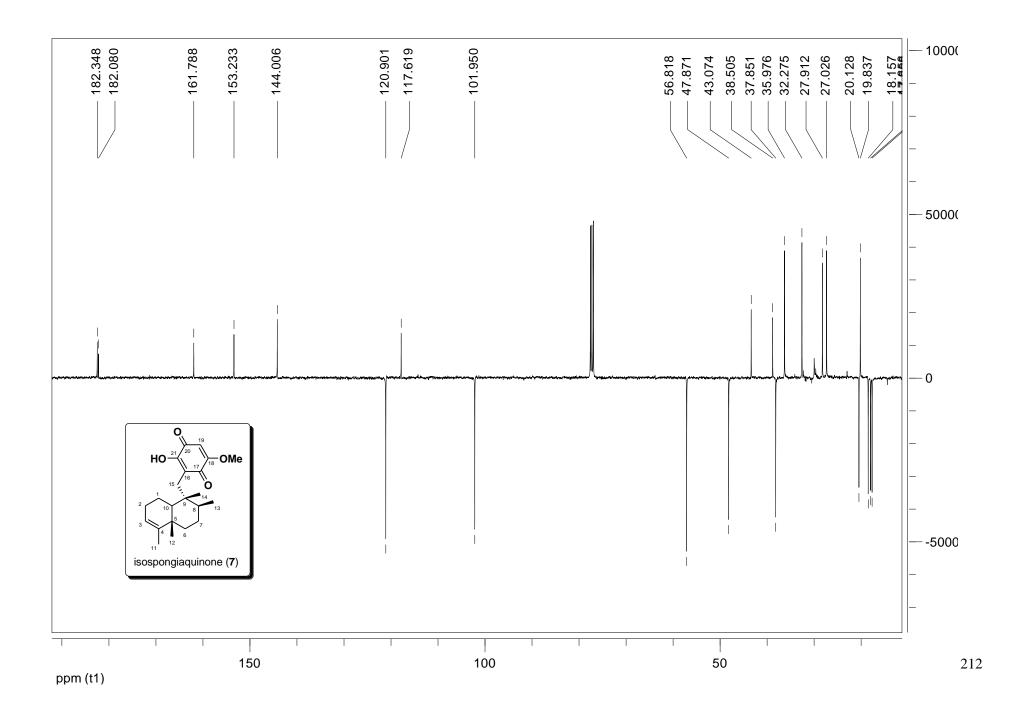


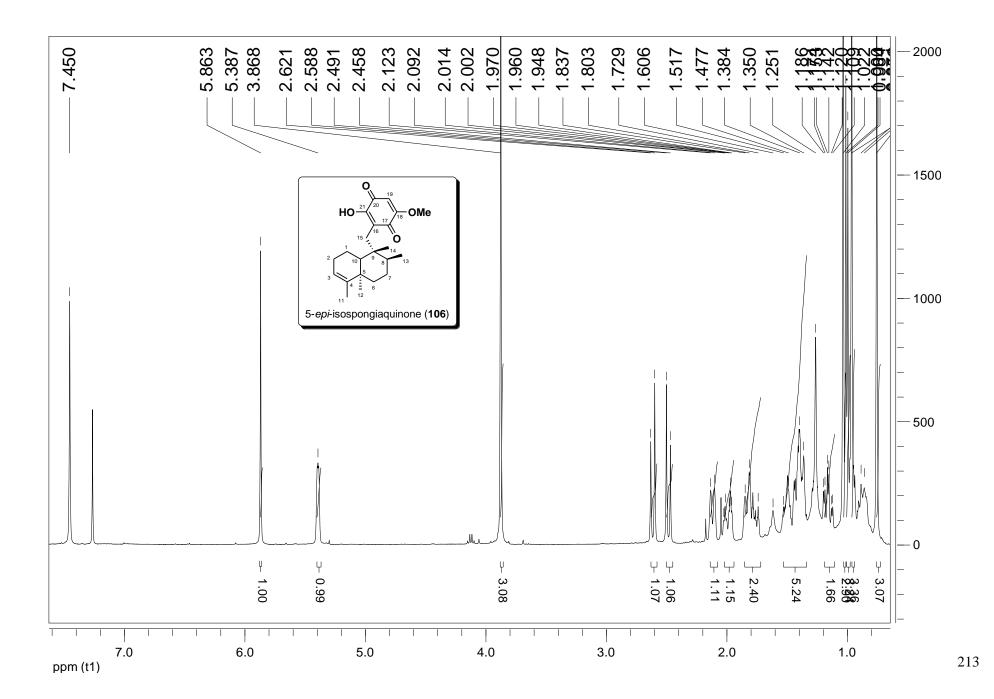


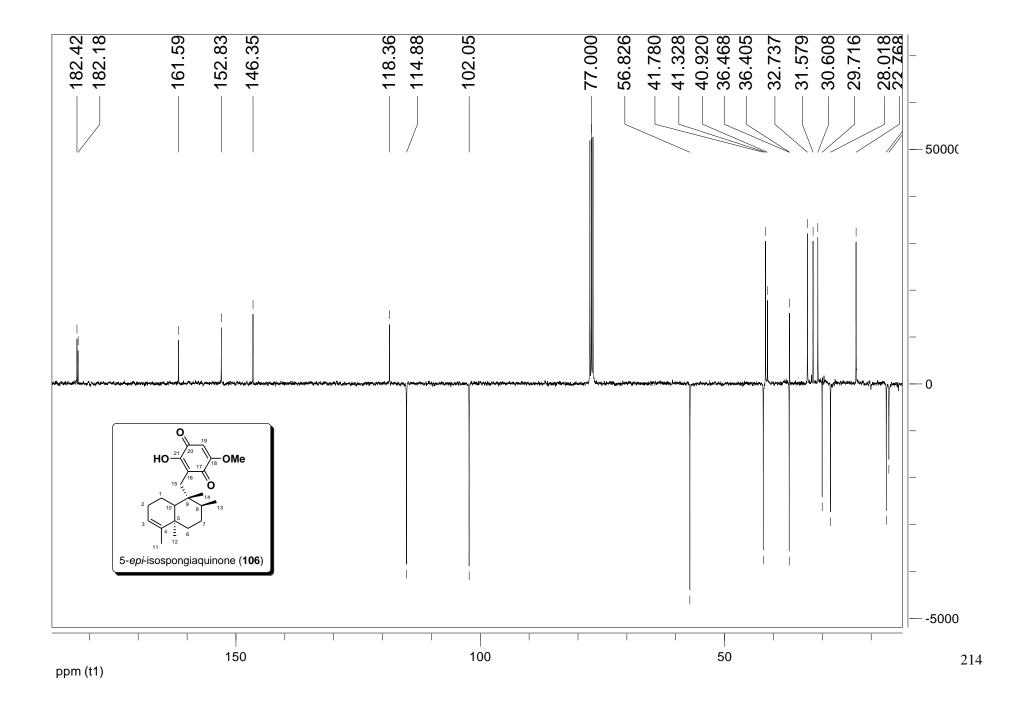


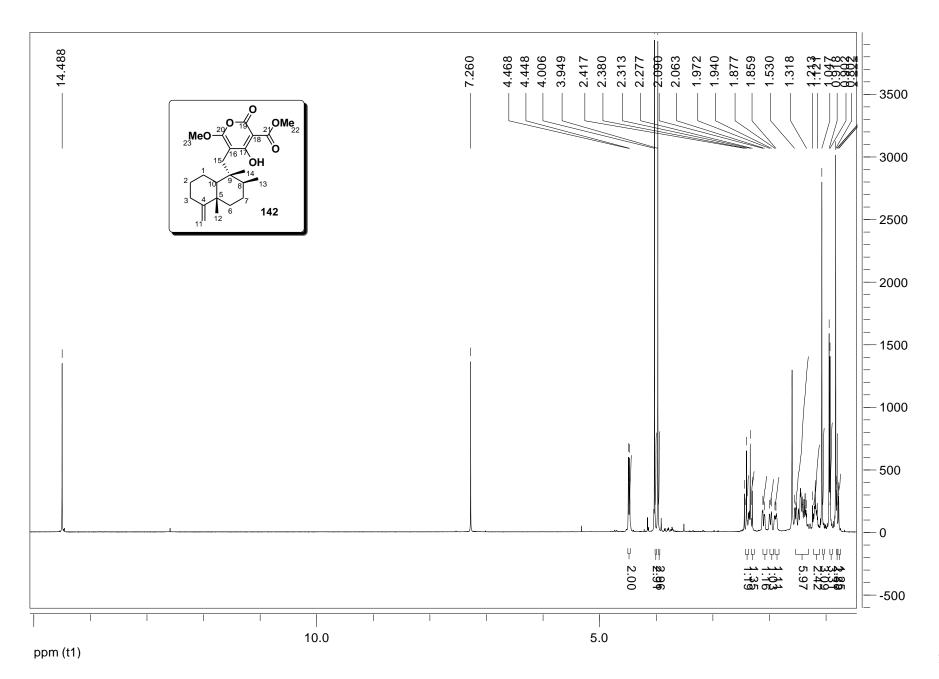


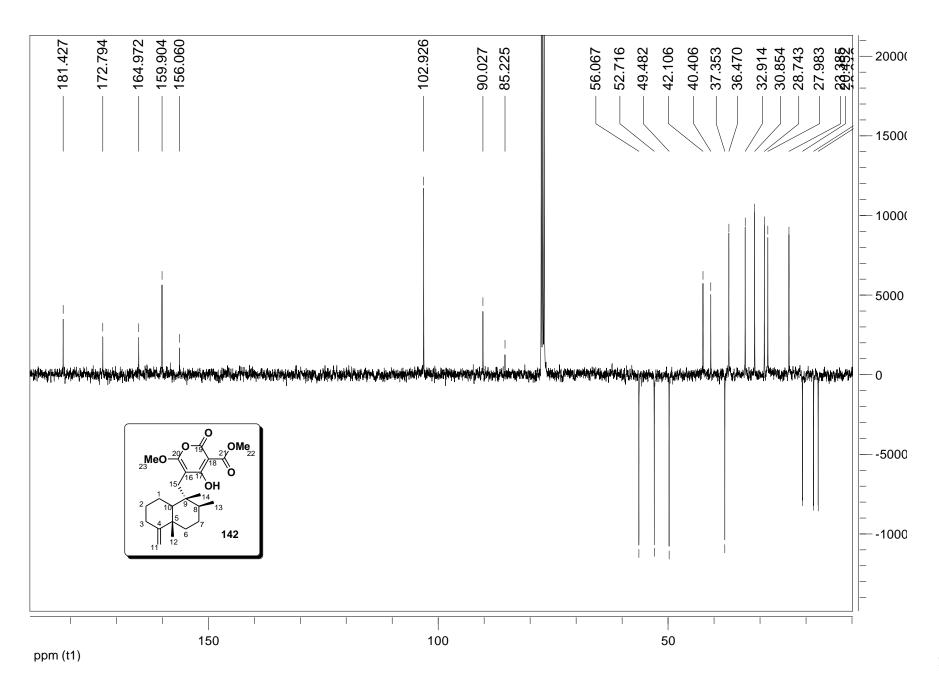












# Annexe 7

## Données cristallographiques du composé 143

Empirical formula Formula weight Temperature Wavelength Crystal system Space group Unit cell dimensions	$C_{23}H_{32}O_6$ 404.48 293(2) K 0.71073 Å Monoclinic $P2_1$ a = 10.0750(10) Å b = 12.2090(10) Å c = 17.849(2) Å	□= 90°. □= 92.275(3)°. □= 90°.
Volume	2193.8(4) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	$1.225 \text{ Mg/m}^3$	
Absorption coefficient	0.087 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	872	
Crystal size	0.560 x 0.48 x 0.100 mm <sup>3</sup>	
$\theta$ range for data collection	2.283 to 25.346°.	
Index ranges	$-11 \le h \le 11, -14 \le k \le 14, -21 \le l \le 21$	
Reflections collected	21072	
Independent reflections	7173 [R(int) = 0.00 - equivalent merged]	
Completeness to $\Box = 25.242^{\circ}$	96.1 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.99 and 0.93	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	7161 / 3 / 540	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.062	
Final R indices $[I>2\square(I)]$	R1 = 0.0499, $wR2 = 0.1120$	
R indices (all data)	R1 = 0.0758, $wR2 = 0.1282$	
Absolute structure parameter	0.3(7)	
Extinction coefficient	0.032(5)	
Largest diff. peak and hole	0.136 and -0.136 e.Å <sup>-3</sup>	

## Bibliographie et notes de la partie expérimentale et des annaxes

- M. Morita, S. Mihashi, H. itokawa, S. Hara, *Anal. Chem.*, **1983**, *55*, 412–414.
- <sup>2</sup> R. T. Luibrand, T. R. Erdman, J. J. Vollmer, P. J. Scheuer, J. Finer, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1979**, *35*, 609–612.
- J. Rodriguez, E. Quinoa, R. Riguera, B. M. Peters, L. M. Abrell, P. Crews, *Tetrahedron*, 1992, 48, 6667–6680.
- N. K. Utkina, V. A. Denisenko, O. V. Scholokova, A. E. Makarchenko, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1263–1265.
- <sup>5</sup> R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. G. Warren, R. J. Wells, J. F. Blount, *Aust. J. Chem.*, **1978**, *31*, 2685–2697.
- <sup>6</sup> B. Cart, C. B. Rose, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2785–2787.
- Metabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse in vivo d'alcaloïdes d'Agelas oroides, N. Cachet, thèse de doctorat, **2009**, Université de Nice Sophia Antipolis.
- <sup>8</sup> Cartouche SPE Phenomenex Strata  $C_{18}$ , V = 12 mL, 2 g de silice.
- Quelques articles de revue sur les activités biologiques des terpènes quinoniques isolés d'éponges marines : a) D. Sladic, M. J.Gasic, *Molecules*, **2006**, *11*, 1–23 ; b) C. A. Motti, M.-L. Bourguet-Kondracki, A. Longeon, J. R. Doyle, L. E. Llewellyn, D. M. Tapiolas, P. Yin, *Molecules*, **2007**, *12*, 1376–1388 ; c) M. Gordaliza, *Mar. Drugs*, **2010**, *8*, 2849–2870.
- <sup>10</sup> E. Goclik, G. M. König, A. D. Wright, R. Kaminsky, J. Nat. Prod., **2000**, 63, 1150–1152.
- L. Du, Y.-D. Zhou, D. G. Nagle, J. Nat. Prod., **2013**, 76, 1175–1181.
- <sup>12</sup> K. W. L. Yong, A. Jankam, J. N. A. Hooper, A. Suksamrarn, M. J. Garson, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 6341–6348.
- D. Lopez, E. Quinoa, R. Riguera, J. Nat. Prod., **1994**, 57, 992–996.
- <sup>14</sup> S. Cao, Z. Gao, S. J. Thomas, S. M. Hecht, J. S. Lazo, D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1716–1718
- <sup>15</sup> A. M. Popov, S. I. Stekhova, N. K. Utkina, N. M. Rebachuk, Pharm. Chem. J., **1999**, *33*, 71–73.
- P.-H. Lu, S.-C. Chueh, F.-L. Kung, S.-L. Pan, Y.-C Shen, J.-H. Guh, Eur. J. Pharmacol., **2007**, 556, 45–54.
- T. Oda, W. Wang, A. Fujita, M. Mochizuki, K. Ukai, M. Namikoshi, *J. Nat. Med.*, **2007**, *61*, 434–437.
- S. Aoki, D. Kong, K. Matsui, R. Rachmat, M. Kobayashi, Chem. Pharm. Bull., 2004, 52, 935–937.
- A. Jankam, M. J. Somerville, J. N. A. Hooper, D. J. Bercknell, A. Suksamrarn, M. J. Garson, Tetrahedron, 2007, 63, 1577–1582.
- M. Ishibashi, Y. Ohizumi, J.-F. Cheng, H. Nakamura, Y. Hirata, T. Sasaki, J. I. Kobayashi, J. Org. Chem., 1988, 53, 2855–2858.
- H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. Van Soest, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1506–1508.
- H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, J. Nat. Prod., 2003, 66, 46–50.
- H. Mitome, T. Nagasawa, H. Miyaoka, Y. Yamada, R. W. M. van Soest, *Tetrahedron*, 2002, 58, 1693–1696.
- D. M. Kushlan, J. D. Faulkner, L. Parka, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 3307–3312
- G. Daletos, N. J. de Voogd, W. E. G. Müller, V. Wray, W. Lin, D. Feger, M. Kubbutat, A. H. Aly, P. Proksch, *J. Nat. Prod.*, **2014**, *77*, 218–226.
- S. P. B. Ovenden, J. L. Nielson, C. H. Liptrot, R. H. Willis, D. M. Tapiolas, A. D. Wrigh, C. A. Motti, *J. Nat. Prod.*, 2011, 74, 65–68.
- <sup>27</sup> J. Kobayashi, K. Naitoh, T. Sasaki, H. Shigemori, J. Org. Chem., **1992**, 57, 5773–5776.
- Y.-C. Shen, C.-Y. Chen, Y.-H. Kuo, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 801–803.
- <sup>29</sup> J. Kobayashi, T. Murayama, Y. Ohizumi, J nat prod, 1989, 52, 1173–1176

#### Résumé de la thèse

Diverses études autour des ilimaquinones, deux sesquiterpènes quinoniques épimèriques, ont été réalisées, de l'extraction à des modifications structurales en passant par de la modélisation moléculaire et des études d'électrochimie.

- <u>Extraction des ilimaquinones</u>: les ilimaquinones ont été isolées de l'éponge *Dactylospongia metachromia* avec un rendement > 3 %. Une étude de la variation de leur pourcentage respectif par rapport à la géographie de collecte de l'éponge a été entreprise, impliquant plus d'une centaine d'échantillons.
  - L'éponge *D. elegans* a également été étudiée, l'évaluation de son métabolite majoritaire a révélé la présence de l'ilimaquinone ou de l'isospongiaquinone.
- Modifications structurales :
  - Par voie chimique : des modifications ont été réalisées sur les ilimaquinones afin de cerner leur réactivité, divers analogues ont été obtenus, entre autres, les substances naturelles isospongiaquinone, 5-epi-isospongiaquinone et néomamanuthaquinone. Lors de ces études, une nouvelle réaction a été découverte, modifiant la quinone de façon surprenante.
  - Par voie enzymatique: des micro-organismes ont été utilisés pour réaliser des biotransformations sur le squelette de l'ilimaquinone, trois composés ont été obtenus. Ces modifications ont touché à la fois la décaline et la quinone.
- Modélisation moléculaire et électrochimie: une étude de modélisation moléculaire nous a permis
  de calculer l'énergie de formation des ilimaquinones en se basant sur leur hypothèse de
  biosynthèse. Finalement une étude d'électrochimie nous a permis d'appréhender les propriétés
  rédox de ces molécules naturelles.
- ♦ Mots clés: éponges marines, *Dactylospongia metachromia*, *Dactylospongia elegans*, sesquiterpènes quinones, isolement, ilimaquinone, ratio diastéréoisomérique, biosynthèse, hémisynthèse, biotransformation.

### ♦ Nom du laboratoire de rattachement :

Laboratoire de pharmacognosie – CNRS UMR 8076 BioCIS Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, CEDEX

PÔLE: CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
5, rue Jean-Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY CEDEX