



HAL
open science

Vers la synthèse biomimétique de pigments fongiques : la sclérocitrine et la chalcitrine. Etude des métabolites de *Scleroderma citrinum*

Elodie Pradayrol

► To cite this version:

Elodie Pradayrol. Vers la synthèse biomimétique de pigments fongiques : la sclérocitrine et la chalcitrine. Etude des métabolites de *Scleroderma citrinum*. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ005 . tel-03662479

HAL Id: tel-03662479

<https://theses.hal.science/tel-03662479>

Submitted on 9 May 2022

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.

Vers la synthèse biomimétique de pigments fongiques : la sclérocitrine et la chalcitrine

Etude des métabolites de *Scleroderma citrinum*

*Towards the biomimetic synthesis of fungal pigments :
sclerocitrin and chalcitrin*

Study of metabolites of Scleroderma citrinum

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité : Chimie des substances naturelles

Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **BioCIS (Université Paris-Saclay, CNRS)**,
sous la direction de **Laurent EVANNO**, maître de conférences, et la co-direction
d'**Alexandre MACIUK**, maître de conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 10 février 2022, par

Elodie PRADAYROL

Composition du Jury

Guillaume VINCENT

Directeur de recherche, Université Paris-Saclay

Président

Marie-Isabelle LANNOU

Chargée de recherche, HDR, Université de Paris

Rapporteuse & Examinatrice

Soizic PRADO

Professeure, Museum National d'Histoire Naturelle

Rapporteuse & Examinatrice

Bastien NAY

Directeur de recherche, Ecole Polytechnique

Examineur

Jérôme VIAL

Maître de conférences, ESPCI Paris

Examineur

Laurent EVANNO

Maître de conférences, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

À Rolland FORT,

Scientifique autodidacte,
ayant démarré sa carrière comme électricien à la verrerie d'Albi (Tarn),
pour l'achever comme ingénieur au CEAT de Toulouse,
dont la plus grande fierté était d'avoir travaillé sur le Concorde et la Caravelle.
Mais avant tout, un grand-père aimant et aimé.

Papy, je te dédie ce manuscrit et
tout le travail réalisé au cours de ce doctorat.



« Vanité des vanités, tout est vanité ! »

(Qo 1, 2)

« J'aurais beau parler toutes les langues des hommes et des anges, si je n'ai pas la charité,
s'il me manque l'amour, je ne suis qu'un cuivre qui résonne, une cymbale retentissante.

J'aurais beau être prophète, avoir toute la science des mystères et toute la connaissance de Dieu,
j'aurais beau avoir toute la foi jusqu'à transporter les montagnes, s'il me manque l'amour, je ne suis rien.

L'amour ne passera jamais. Les prophéties seront dépassées, le don des langues cessera,
la connaissance actuelle sera dépassée. »

(1 Co 13 1, 2 & 8)



Je remercie vivement la Dr Marie-Isabelle LANNOU (chargée de recherche à l'université Paris-Descartes) et la Prof. Soizic PRADO (professeure des universités au Museum National d'Histoire Naturelle) d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit en tant que rapportrices. Je remercie également le Dr Bastien NAY (directeur de recherche à l'Ecole Polytechnique), le Dr Jérôme VIAL (maître de conférences à l'ESPCI Paris) et le Dr Guillaume VINCENT (directeur de recherche à l'université Paris-Saclay) pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger mon travail. J'ai une pensée particulière pour la Prof. Véronique BELLOSTA, qui a toujours été d'un soutien indéfectible au cours de mes études et grâce à qui j'ai découvert l'équipe de « Chimie des Substances Naturelles » de BioCIS.



Ce doctorat a été financé par la bourse ANR (Agence Nationale de la Recherche) X-COMIC et effectué au sein du laboratoire BioCIS (UMR 8076) de l'université Paris-Saclay à la faculté de pharmacie sous la direction du Dr. Laurent EVANNO et le co-encadrement du Dr. Alexandre MACIUK.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux dr Laurent EVANNO et Alexandre MACIUK, mes deux directeurs de thèse, dont la gentillesse n'est plus à présenter. Ces quatre années n'ont pas été de tout repos, je vous en ai fait voir ! Merci infiniment pour la liberté expérimentale que vous m'avez laissée tout au long de ma thèse, vos conseils et votre soutien dans les moments de tensions, qui ont malheureusement émaillé la vie au labo. J'espère ne pas vous avoir causé trop de soucis, malgré tout.

Je n'oublie pas le dr Bruno FIGADÈRE, directeur du laboratoire BioCIS jusqu'en décembre 2019, pour m'avoir accueillie dès mon stage de M2 au sein de l'équipe. Nos discussions scientifiques et professionnelles m'ont été d'une grande aide tout au long de mon doctorat. Un très grand merci pour votre disponibilité, votre écoute et vos conseils. Je tiens également à remercier très chaleureusement le Prof. Michel LEBOEUF pour ses encouragements incessants. Malgré la crise sanitaire qui vous a éloigné un temps du laboratoire, vous n'avez pas cessé de prendre de mes nouvelles et de me transmettre votre optimisme en toutes circonstances. Merci infiniment pour cette attitude paternelle à mon égard !

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude envers Rémi, RMNiste dévoué de BioCIS, sans qui 75% des analyses ^{13}C de mon projet de thèse manquerait pour cause de non-solubilité. Merci mille fois Rémi ! J'ai également une pensée particulière pour Karine et Soumia du service « Masse ». Nos discussions de prép' me manqueront, Soumia : bon courage avec tes deux petits !

Je tiens à remercier vivement mes collègues du 4^e étage : Alexis (ou Père Pinet), Clémence, Nicolas (ou M. Jamais), Mansour, et ceux du 3^e : Erick et Vanessa, pour leur bonne humeur à toute épreuve et leur gentillesse. Restez comme vous êtes, la recherche a besoin de personnes honnêtes, humbles et généreuses comme vous !!

Le plus beau cadeau qui m'a été fait au cours de ma thèse, cela a été de pouvoir nouer de nouvelles amitiés, qui se sont révélées être parmi les plus belles de ma courte vie. Au sein de ce groupe des « Coolkids », on peut compter : Charlotte et Alexander (alias les pontoisiens), Coralie (alias CocoRandom, si tu savais comme tes « ça n'a rien à voir, mais ... » me manque), Marco (n'oublie pas que je t'ai battu au karaoké, hein ?), Anne (alias Nannou), LAB (et Gallifrey !), Antoine et Samuel (pour vous deux, j'ai prévu un paragraphe personnalisé ;)). Vous avez rendu ma première année de thèse tout simplement lumineuse. Je n'ai pas les mots pour vous exprimer toute ma gratitude et mon affection. Je n'oublierai pas de sitôt nos parties de jeu de sociétés endiablées et improvisées jusqu'au bout de la nuit ! Merci mille fois !!

J'aimerais maintenant m'attarder sur les 3 piliers de ma thèse. Sans eux, je n'aurais jamais pu accomplir le quart de tout ce qui est présenté dans ce manuscrit, car leur soutien scientifique et humain indéfectible m'a permis de ne pas céder au découragement qui me guettait régulièrement. En tout premier lieu, il y a Samuel. Ou SamU. Ou papy Oger. On est arrivé à une semaine d'intervalle au laboratoire : tu étais en post-doc, j'étais en M2. On n'est resté qu'un an et demi à se supporter mutuellement à la paillasse, mais je ne compte pas les heures passées sur discord à me faire répéter mes communications orales, à analyser des RMN 2D, à chercher des solutions aux blocages dans mes synthèses, à me former sur la fluorescence ou tout simplement à m'écouter râler ! Je te suis extrêmement reconnaissante

pour ta disponibilité, ta jovialité, tes tics de langages et tes accents ubuesques qui me font toujours rire (oui, je sais, je suis bon public), et surtout, pour tes envois anonymes de mug depuis la Belgique (j'ai vraiment cru que tu m'avais envoyé de la coke ce jour-là !). Merci d'avoir endossé et de continuer régulièrement à jouer le rôle de grand frère dans la chimie !

Après, il y a Blandine. La « maman du labo ». Toujours prête à rendre service et devant systématiquement les besoins des membres du labo. C'est simple, si tu n'avais pas été là, je crois que j'aurais passé ma thèse à faire de la remontée de matière sans pouvoir avancer dans mes synthèses. Travailler avec toi a été un vrai privilège et les « Miss » que tu me lançais dans le couloir à la volée vont terriblement me manquer. En quittant le labo, je perds une formidable partenaire de paillasse et une confidente. Merci encore infiniment pour ta disponibilité et pour ton investissement sur mon projet de thèse. Merci mille fois !

Et le dernier membre de ce trio de choc, c'est Antoine. Mon fidèle partenaire des repas de midi ! Je n'ai pas les mots pour te remercier d'avoir supporté toutes les inepties que je raconte au moment des repas, mes élucubrations, mes raisonnements à deux ronds, mes goûts de vieux, ma non-connaissance culinaire et surtout, ma foi. On n'était pas toujours d'accord suivant les sujets qu'on abordait (souvent même !), mais au-delà de tout ça, on s'est beaucoup soutenu mutuellement tout au long de nos thèses respectives. J'espère avoir su te rendre un peu du soutien incommensurable que tu m'as manifesté chaque jour. Et surtout, merci de m'avoir fait découvrir RPZ : c'était la dose d'humour dont on avait besoin tous les deux pour tenir jusqu'au bout (je ne compte plus heures passées à se rappeler en riant des aventures de Croûtes, de Dona etc ...). Je te souhaite du fond du cœur de pouvoir t'épanouir dans tes futurs projets professionnels et musicaux.

Il me reste enfin à exprimer ma profonde reconnaissance envers tous mes proches : mes amis de l'ESPCI et des Mines (les deux Thomas, Cécile, Estelle, Donatien, Raphaël, Alice, Sylvain, Audrey, Maxence, ma bibi Agathe, PA, Matthieu et Maxime) qui ont toujours répondu présents quand j'en avais besoin, les paroissiens de Massy-Verrières, le père Matthias, le groupe St-Joseph, mes sœurs candidates à l'ODV et le père Stéphane principalement, pour leur écoute attentive et leur soutien (votre intercession régulière pour moi et mes collègues constitue un cadeau inestimable à mes yeux).

Mais surtout, comment ne pas remercier ma famille et tout particulièrement mes parents, chez qui il m'arrivait (souvent) de débarquer à l'improviste le soir quand je n'avais pas le moral ? « Histoire sans parole » comme on dit. En un regard, vous compreniez, vous écoutiez et vous réconfortiez. Ce manuscrit, c'est l'aboutissement de 9 années d'études, au cours desquelles j'ai toujours pu compter sur vous, en toutes circonstances. Merci de m'avoir accompagnée sur ce chemin. Merci ! Merci !

Et enfin, à celui qui a trouvé une place de choix dans mon cœur. A celui qui a su, mieux que quiconque, faire preuve de tendresse, de prévenance et d'attention à mon égard au quotidien, pour m'aider à aller de l'avant. A celui, enfin, sans qui tout serait vain, je redis tout mon amour et ma gratitude.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	17
LISTE DES SCHÉMAS	19
LISTE DES FIGURES	25
LISTE DES TABLEAUX.....	31
PRÉAMBULE	35
INTRODUCTION GÉNÉRALE	39
1 CONTEXTUALISATION	39
1.1 LA SCLÉROCITRINE ET LA CHALCITRINE, DEUX PIGMENTS FONGIQUES AU SEIN DE LA FAMILLE DES DIMÈRES PULVINIQUES	39
1.2 HYPOTHÈSES DE BIOSYNTHÈSE DES DIMÈRES PULVINIQUES FORMULÉES PAR W. STEGLICH	40
1.2.1 Formulation des hypothèses de biosynthèse à partir du comportement du méthylcatéchol (9) en conditions oxydantes	40
1.2.2 Voie a : pseudo-cycloaddition de type [4+2] (vers la badione A (6) et la norbadione A (5))	42
1.2.3 Voie b : pseudo-cycloaddition de type [2+2] (vers la sclérocitrine (3))	43
1.2.4 Voie c : pseudo-cycloaddition de type [5+2] (vers la chalcitrine (4))	44
1.3 HYPOTHÈSES DE BIOSYNTHÈSE DE LA SCLÉROCITRINE (3) ET DE LA CHALCITRINE (4) PROPOSÉES PAR LE LABORATOIRE.....	46
2 LES ACIDES PULVINIQUES ET LE MOTIF BUTÉNOLIDE	48
2.1 BIOSYNTHÈSE DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE ET DES ACIDES PULVINIQUES	48
2.1.1 Conversion du glucose en acides polyporiques	48
2.1.2 Conversion des acides polyporiques en acides pulviniques.....	50
2.2 SYNTHÈSE DU MOTIF BUTÉNOLIDE DANS LA LITTÉRATURE.....	51
2.2.1 Fonctionnalisation d'un buténolide commercial ou d'un équivalent marqué.....	54
2.2.2 Oxydation d'un furane préalablement substitué	62
2.2.3 Synthèse de buténolides à partir d'anhydrides cycliques (cas particulier de l'anhydride maléique) 66	
2.2.4 Cyclisation intramoléculaire de dérivés carbonylés	68
2.2.5 Contraction de cycles.....	81
3 DIMÉRISATION D'ACIDES PULVINIQUES.....	85
3.1 SYNTHÈSE DE DIMÈRES DANS LA LITTÉRATURE	85
3.1.1 Bilan des stratégies synthétiques déjà employées pour la synthèse de dimères pulviniques.....	85
3.1.2 Occurrence des dimérisations de phénols par cycloaddition de type [5+2] dans la nature : exemples de la purpurogalline (212) et de la théacitrine C (217).....	89
3.2 OXYDATION DÉAROMATISANTE COMME STRATÉGIE SYNTHÉTIQUE DANS LA LITTÉRATURE.....	91
3.2.1 Synthèse totale de l'épicolactone (228) par D. Trauner.....	91
3.2.2 Synthèse totale de la preuisolactone A (240) par D. Trauner.....	93
3.2.3 Synthèse totale de la (-)-pérezopérezone (247) par J. Deng.....	95
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSES TOTALES BIOMIMÉTIQUES D'ACIDES PULVINIQUES ET ÉTUDE PHYSIQUE DE LEURS INTERMÉDIAIRES BISTÉTRONIQUES	99

1 SYNTHÈSES TOTALES BIOMIMÉTIQUES DES ACIDES ATROMENTIQUE, XÉROCOMIQUE ET VARIÉGATIQUE 99

1.1	PRÉSENTATION DU PROJET	99
1.1.1	<i>Synthèse à partir d'un cœur tétronique pré-formé</i>	99
1.1.2	<i>Cyclisation intramoléculaire d'un diacide linéaire</i>	100
1.1.3	<i>Stratégie bio-inspirée</i>	101
1.2	RÉSULTATS ET DISCUSSION	103
1.2.1	<i>Première tentative de synthèse totale de l'acide xérocomique (7) par la méthode de J. Volhard/P. Bischoff</i> 103	
1.2.2	<i>Présentation de la voie de synthèse biomimétique de l'acide xérocomique développée au cours du projet de thèse</i>	110
1.2.3	<i>Optimisation de la synthèse de la terphénylquinone</i>	112
1.2.4	<i>Contraction de cycle de la terphénylquinone en acide bisttronique</i>	129
1.2.5	<i>Stratégie à suivre pour la fin de la synthèse des acides pulviniques</i>	134
1.3	CONCLUSION	145

2 FLUORESCENCE DES ACIDES BISTÉTRONIQUES 147

2.1	PROPRIÉTÉS SPECTRALES DE MOLÉCULES ORGANIQUES	147
2.1.1	<i>Absorbance et coefficient d'extinction molaire</i>	148
2.1.2	<i>Emission et rendement quantique de fluorescence</i>	149
2.2	RÉSULTATS ET DISCUSSION	151
2.3	PERSPECTIVES DE VALORISATION DES PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES DES ACIDES BISTÉTRONIQUES .	163

CHAPITRE 2 : PROFILAGE CHIMIQUE DE *SCLERODERMA CITRINUM* ; EXTRACTION ET ISOLEMENT DE DÉRIVÉS PULVINIQUES..... 167

1 EXTRACTION, PRÉ-FRACTIONNEMENT, CHROMATOGRAPHIE 167

1.1	EXTRACTION DES MÉTABOLITES DU CHAMPIGNON <i>SCLERODERMA CITRINUM</i>	167
1.2	PRÉ-FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE EN POLARITÉ DE PHASE NORMALE	168
1.3	APPLICATION DE CONDITIONS HPLC CLASSIQUES	170
1.4	MISE AU POINT DE CONDITIONS HPLC ADÉQUATES	171
1.5	CONCLUSIONS	173

2 DÉRÉPLICATION, CIBLAGE DE MÉTABOLITES D'INTÉRÊT ET ÉLUCIDATION STRUCTURALE DES MÉTABOLITES ISOLÉS 174

2.1	DÉRÉPLICATION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET RÉSEAUX MOLÉCULAIRES : UNE MÉTHODE D'APPRÉHENSION DES MÉLANGES COMPLEXES NATURELS.....	174
2.1.1	<i>Les réseaux moléculaires</i>	174
2.1.2	<i>GNPS et MetGEM : deux plates-formes pour générer des réseaux moléculaires</i>	178
2.1.3	<i>Réseaux moléculaires de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i></i>	179
2.1.4	<i>Structures des métabolites isolés de <i>Scleroderma citrinum</i></i>	189
2.2	CONCLUSIONS	212

3 PURIFICATION DE L'EXTRAIT DE *SCLERODERMA CITRINUM* PAR CPC..... 215

3.1	LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC) : UNE MÉTHODE DE PURIFICATION DES MÉLANGES COMPLEXES	215
3.1.1	<i>Définitions et développements historiques</i>	215
3.1.2	<i>Principe de la chromatographie de partage centrifuge</i>	216
3.1.3	<i>Avantages de la chromatographie de partage centrifuge</i>	217
3.2	APPLICATION DE LA CPC À L'EXTRAIT DE <i>SCLERODERMA CITRINUM</i>	218
3.2.1	<i>Présentation de la technique du pH-zone refining</i>	218
3.2.2	<i>Etude préliminaire de partage de l'extrait de Scleroderma citrinum</i>	221
3.2.3	<i>Résultats et discussion</i>	227
3.3	CONCLUSIONS	230
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE EN MILIEU OXYDANT PAR L'INTERMÉDIAIRE DE MOLÉCULES MODÈLES ET ESSAIS DE DIMÉRISATION DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE.....		235
1 UTILISATION ET DÉVELOPPEMENT DE MOLÉCULES MODÈLES DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE		235
1.1	SYNTHÈSE D'UN SUBSTITUT PROCHE DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE ET ESSAIS DE DIMÉRISATION EN CONDITIONS OXYDANTES	236
1.1.1	<i>Synthèse du substitut proche de l'acide xérocomique</i>	236
1.1.2	<i>Essais de dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360) en conditions oxydantes</i> 237	
1.1.3	<i>Post-fonctionnalisations envisagées des dimères de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360)</i> 242	
1.1.4	<i>Conclusions</i>	244
1.2	ESSAIS DE DIMÉRISATION DE LA QUERCÉTINE ET DE LA (+)-CATÉCHINE EN CONDITIONS OXYDANTES 245	
1.2.1	<i>Présentation des deux molécules initiales</i>	245
1.2.2	<i>Criblage de conditions oxydantes et structures des produits obtenus</i>	246
2 ESSAIS DE DIMÉRISATION DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE EN CONDITIONS OXYDANTES		252
2.1	PRÉ-REQUIS SUR LA RÉACTIVITÉ DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE DANS LA LITTÉRATURE.....	252
2.2	ESSAIS D'OXYDATION DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE	253
2.3	CONCLUSIONS	258
CONCLUSION GÉNÉRALE.....		263
1 RAPPELS DES OBJECTIFS FIXÉS EN DÉBUT DE DOCTORAT..		263
2 SYNTHÈSES TOTALES BIOMIMÉTIQUES ET ÉTUDE DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE ET DE DÉRIVÉS PULVINIQUES		264
2.1	SYNTHÈSE TOTALE BIOMIMÉTIQUE DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE (7) ET DE DÉRIVÉS PULVINIQUES.....	264
2.2	ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS SPECTRALES DES INTERMÉDIAIRES DE SYNTHÈSE	264
2.3	SYNTHÈSE TOTALE DE DIMÈRES PULVINIQUES	265
3 ÉTUDE DES MÉTABOLITES PRODUITS PAR LE CHAMPIGNON <i>SCLERODERMA CITRINUM</i>		267

3.1	EXTRACTION ET DÉVELOPPEMENT DE CONDITIONS HPLC-MS ADÉQUATES	267
3.2	DÉRÉPLICATION PAR RÉSEAU MOLÉCULAIRE ET ISOLEMENT DE MÉTABOLITES PAR HPLC PRÉPARATIVE 267	
3.3	PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE.....	270
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....		273
1 GENERAL INFORMATION		273
2 EXPERIMENTAL DATA.....		274
2.1	BISTETRONIC ACIDS SYNTHESIS BY J. VOLHARD/P. BISCHOFF'S METHOD	274
2.1.1	<i>Condensation of phenylacetonitrile on diethyloxalate</i>	<i>274</i>
2.1.2	<i>Sulfuric hydrolysis of nitrile function and ring contraction.....</i>	<i>279</i>
2.2	SYNTHESIS OF PULVINIC ACIDS	280
2.2.1	<i>(3,4-dibenzyloxyphenyl)boronic acid synthesis.....</i>	<i>280</i>
2.2.2	<i>Terphenylquinones synthesis</i>	<i>285</i>
2.2.3	<i>Ring contraction of terphenylquinones to bistetronic acids.....</i>	<i>322</i>
2.2.4	<i>Ring opening of bistetronic acids.....</i>	<i>334</i>
2.2.5	<i>Deprotection reactions.....</i>	<i>349</i>
2.3	3-(3,4-DIHYDROXYPHENYL)TETRONIC ACID SYNTHESIS (XEROCOMIC ACID MODEL).....	362
2.4	DIMERIZATIONS	365
2.5	SYNTHESIS OF UREIDO-DIPEPTIDES	374
2.6	EXTRACTED FUNGAL METABOLITES.....	380
3 PHOTOPHYSICAL STUDY		386
3.1	ABSORPTION AND FLUORESCENCE SPECTRA	386
3.2	MOLAR EXTINCTION COEFFICIENTS.....	390
3.3	QUANTUM YIELDS.....	393
RÉFÉRENCES.....		397

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

- **Solvants, réactifs et groupements fonctionnels**

AF	acide formique
AIBN	azobisisobutyronitrile
AMVN	2,2'-azobis(2,4-diméthylpentanitrile)
Bn	benzyle
Bu	butyle
BTC	triphosgène ou carbonate de bis(trichlorométhyle)
CAN	nitrate de cérium et d'ammonium
CuTC	thiophène-2-carboxylate de cuivre (I)
DCE	dichloroéthane
DCM	dichlorométhane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMEDA	N,N'-diméthyl-1,2-éthanediamine
DMF	diméthylformamide
DMS	diméthylsulfure
DMSO	diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
Et	éthyle
[HMIM][Br]	1-méthylimidazole/HBr
LDA	diisopropylamidure de lithium
LiHMDS	bis(triméthylsilyl)amide de lithium
<i>m</i> -CPBA	acide 3-chloroperbenzoïque
Me	méthyle
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
PCC	chlorochromate de pyridinium
PE	éther de pétrole
Ph	phényle
Pr	propyle
py ⁺ HCl	chlorure de pyridinium
TBAF	fluorure de <i>tétra</i> -butylammonium
TBAB	bromure de <i>tétra</i> -butylammonium
THF	tétrahydrofurane
TFA	acide trifluoroacétique
TMS	triméthylsilyle

- **Conditions réactionnelles et analytiques**

CCM	chromatographie sur couche mince
MW	micro-ondes
t_R	temps de rétention

- **Spectroscopies**

RMN	résonance magnétique nucléaire
^1H	proton
^{13}C	carbone 13
COSY	correlated spectroscopy (proton-proton)
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
J	constante de couplage
Hz	Hertz
ppm	partie par million
δ	déplacement chimique
s	singulet
d	doublet
t	triplet
q	quadruplet
m	multiplet
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
MS	spectrométrie de masse
HRMS	spectrométrie de masse à haute résolution
ESI +	ionisation par électronébulisation (mode positif)
ESI -	ionisation par électronébulisation (mode négatif)
m/z	rapport masse sur charge
Da	Dalton
IR	infrarouge
UV	ultraviolet
λ	longueur d'onde
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1 – Panorama de quelques structures dimériques fongiques issues de l'acide xérocomique.....	40
Schéma 2 – Synthèse d'un modèle du cœur central de la badione A (6) à partir d'un méthylcatéchol (9).....	41
Schéma 3 – Mécanisme d'obtention du précurseur commun (15) aux dimères d'acides pulviniques par oxydation de l'acide xérocomique (7).....	42
Schéma 4 – Hypothèse de biosynthèse de la norbadione A (5) et de la badione A (6) d'après les travaux de W. Steglich.	43
Schéma 5 – Hypothèse de biosynthèse de la sclérocitrine (3) d'après les travaux de W. Steglich.	44
Schéma 6 – Hypothèse de biosynthèse de la chalcitrine (4) d'après les travaux de W. Steglich.	45
Schéma 7 – Hypothèses mécanistiques de biosynthèse de la sclérocitrine (3) et de la chalcitrine (4).	47
Schéma 8 – Biosynthèse des acides polyporiques, précurseurs des acides pulviniques.	49
Schéma 9 – Biosynthèse des acides pulviniques à partir des acides polyporiques.	50
Schéma 10 – Schéma général d'addition nucléophile d'un 2-oxyfurane catalysée par un acide de Lewis comme SnCl ₄ . ³⁹	54
Schéma 11 – Synthèses totales des nostoclides I (51) et II (52) ²⁶ et des goniobutébolides A (55) et B (56) ¹⁴⁹ par addition nucléophile d'un motif 2-oxyfurane sur un substrat électrophile par catalyse acide (resp. de Brønsted et de Lewis).....	55
Schéma 12 – Synthèse d'un épimère de la kalafungine par addition de Michael d'un 2-oxyfurane sur une benzoquinone, suivi d'un réarrangement intramoléculaire en butyrolactone. ³⁶	56
Schéma 13 – Synthèse énantiosélective de l'acide (+)-spiculisporique (65) ⁴⁰ et du fragment C17-C28 de la pectenotoxine-2 (70). ¹⁴²	57
Schéma 14 – Schéma général d'addition nucléophile d'un buténolide sur un accepteur Michael ou un substrat électrophile sous l'action d'une base comme le LDA.	59
Schéma 15 – Synthèse totale du paniculide A (76) par F. Kido. ¹⁴⁴	59
Schéma 16 – Synthèse énantiosélective de deux antagonistes du récepteur des neurokinines [(+)-L-733,060 (81) et (+)-CP-99,994 (82)] ²¹⁹ et de l'aflatoxine B (86). ²⁸⁰	60
Schéma 17 – Alkylation en α sur adduit de Diels-Alder. ⁶⁰	61
Schéma 18 – Exemples de couplages de buténolides dans le cadre de la synthèse totale du mokupalide (89), ¹⁵¹ d'un précurseur de la streptolutine (92) ²¹⁶ et de l'acide (\pm)-marasmique (96). ²²	62
Schéma 19 – Influence de l'oxydant sur le buténolide synthétisé.	63
Schéma 20 – Schéma général d'oxydation d'un furane sans ajout d'un groupement OR en position γ	63
Schéma 21 – Réarrangement [2,3]-sigmatropique possible pour les composés furanosélinés.	64

Schéma 22 – Synthèses totales de l'isodrimenine et du colorata-4(13),8-diénoïde par oxydation d'un furane. ^{75, 76}	64
Schéma 23 – Schéma général d'oxydation d'un furane avec ajout d'un groupement OR en position γ	64
Schéma 24 – Schéma général d'oxydation d'un furane par photo-oxygénation.....	65
Schéma 25 – Synthèses totales du valdiviolide (102) ¹⁶⁶ et du seco-manoalide (105) ¹³⁹ par photo-oxygénation.....	66
Schéma 26 – Schéma général de synthèse de buténolides à partir de l'anhydride maléique. ^{45, 125}	67
Schéma 27 – Schéma général de synthèse de 4-ylidènebuténolides par réaction de Wittig. ...	67
Schéma 28 – Synthèse de la freelingyne (109) faisant intervenir une réaction de Wittig sur un adduit de Diels-Alder.....	67
Schéma 29 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie A.....	69
Schéma 30 – Synthèses totales de l'éremophilénolide (112) par S. Pennanen ²²⁸ et de la digitoxigénine (115) par N. Danieli. ⁷⁰	69
Schéma 31 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie B.....	70
Schéma 32 – Synthèse totale de la cornicularlactone (119) par Y. Rao ²³⁵ et du dihydromahubanolide (122) par K. Tanaka. ²⁷¹	71
Schéma 33 – Schéma général de synthèse de buténolides par cyclisation radicalaire.	71
Schéma 34 – Synthèses totales de l'andiroolactone (131) par A. Srikrishna et de la lettucénine A (126) par K. Monde.	72
Schéma 35 – Schéma général de la cyclisation catalysée par les sels d'argent. ¹⁹	72
Schéma 36 – Influence du métal utilisé sur la régiosélectivité de cyclisation. ¹³³	73
Schéma 37 – Mécanisme proposé pour la <i>tandem cross-coupling lactonization</i> . ¹⁷⁵	74
Schéma 38 – Synthèses du goniobuténolide A silylé (137) ¹⁵⁴ et du diacétate de rubrolide A (140) ¹⁵⁵ par M. Kotora.....	74
Schéma 39 – Synthèse de la cryptoconcatone I acétylée (142) par R. K. Acharyya. ¹	75
Schéma 40 – Schéma général de la synthèse de buténolides par carbonylation avec une ou deux insertions de molécule de monoxyde de carbone.	75
Schéma 41 – Synthèses du bovolide (145), ⁵⁹ d'un dérivé de la patuline (147) ²⁰⁵ et de l'aristolactone (149) ¹⁸³ par carbonylation pallado-catalysée.....	76
Schéma 42 – Synthèse du (+)-astériscanolide (153) par P. A. Wender.....	77
Schéma 43 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie C.....	77
Schéma 44 – Synthèse totale de l'acide acarénoïque (158) par S. Tsuboi. ²⁸²	77
Schéma 45 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie D.....	78
Schéma 46 – Synthèse totale de la proto-anémone (153) par E. Shaw ²⁴⁸ et de l'atractylénolide I (157) par H.-H. Bokel. ²³	78
Schéma 47 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie E.....	79
Schéma 48 – Synthèse du fragment C5-C9 (160), intermédiaire dans la synthèse des géodiamolides A (161) et B (162) par J. Chiarello. ⁵⁶	79
Schéma 49 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie F.	80

Schéma 50 – Synthèse totale de cardénolides typiques (165) et de la (3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>)-(-)-whiskey lactone (168).	80
Schéma 51 – Schéma général de synthèse de buténolide par un intermédiaire de type azidoquinone.	81
Schéma 52 – Contraction de cycle de la thymoquinone (169) en analogue de dérivés pulviniques (170).	82
Schéma 53 – Schéma général de la contraction de cycle d'une benzoquinone hydroxylée (Ia ou Ib).	83
Schéma 54 – Schéma général de la photo-oxygénation du résorcinol (171) et du pyrocatechol (175).	84
Schéma 55 – Synthèse totale de la norbadione A (5) par C. Mioskowski.	86
Schéma 56 – Synthèse totale de la chalcitrine (4) par S. A. Snyder.	87
Schéma 57 – Biosynthèse de la purpurogalline (212) à partir de l'acide gallique.	89
Schéma 58 – Biosynthèse proposée de la théacitrine C (217).	90
Schéma 59 – Synthèse totale de l'épicolactone (228) par D. Trauner.	92
Schéma 60 – Synthèse totale de la preuisolactone A (240) par D. Trauner.	93
Schéma 61 – Synthèse d'un dimère du 5-méthylpyrogallol (241) à partir de peroxydases de raifort et d'eau oxygénée.	94
Schéma 62 – Synthèse totale de la (-)-pérezopérezone (247) par J. Deng.	95
Schéma 63 – Synthèse du squelette pulvinique par fonctionnalisation d'un cœur tétronique pré-formé, selon la méthode de G. Pattenden ²²⁵ ou de T. Le Gall et C. Miokowski. ²⁷	100
Schéma 64 – Synthèse d'acides pulviniques par la méthode de J. Volhard. ¹⁶⁴	101
Schéma 65 – Première stratégie bio-inspirée par R. Ramage en 1984. ²³³	102
Schéma 66 – Condensation des phénylacétonitriles (254) et (265) sur l'oxalate de diéthyle (255) (selon les conditions développées par J. Volhard et P. Bischoff) ^{164, 289} par chimie combinatoire.	104
Schéma 67 – Hydrolyse acide des intermédiaires (256a), (266a) et (267a) induisant une cyclisation intramoléculaire spontanée aboutissant aux quatre précurseurs d'acides pulviniques (257), (268), (269) et (270).	105
Schéma 68 – Synthèse des acides bistétroniques atromentique (258), xérocomique (271) et variégatique (272) par chauffage à reflux dans l'anhydride acétique de dérivés pulviniques.	105
Schéma 69 – Première étape de la séquence réactionnelle, <i>i. e.</i> la condensation des phénylacétonitriles sur l'oxalate de diéthyle.	106
Schéma 70 – Comparaison d'un ajout simultané des phénylacétonitriles par rapport à un ajout séquentiel.	107
Schéma 71 – Transalkylation du composé (273) au cours du 2 ^e ajout de phénylacétonitrile.	108
Schéma 72 – Hydrolyse sulfurique des groupements nitriles des composés (256a), (266a) et (267a) en acides carboxyliques, suivie d'une cyclisation spontanée aboutissant à la formation des composés (257), (268), (269) et (270).	109
Schéma 73 – Hydrolyse partielle des fonctions nitriles en amides.	109
Schéma 74 – Synthèse des acides bistétroniques (258), (271) et (272) à partir des produits d'alkylation de l'oxalate de diéthyle (256a), (266a) et (267a).	110

Schéma 75 – Voie de synthèse de l'acide xérocémique (7) développée au laboratoire.	111
Schéma 76 – Séquence monotopie des deux couplages de Suzuki-Miyaura optimisés pour la synthèse de la terphénylquinone dissymétrique (278), précurseur de l'acide xérocémique. ..	115
Schéma 77 – Sous-produits des couplages de Suzuki-Miyaura. Les rendements affichés correspondent aux rendements totaux après les deux étapes de couplages.	116
Schéma 78 – Voies rétrosynthétiques possibles pour une iodobenzoquinone. Quelques conditions expérimentales ont été reportées à titre d'exemple. ^{16, 111, 137}	117
Schéma 79 – Exemple des méthodologies de C-H activation sur <i>p</i> -benzoquinones (284) développées par les équipes de P. Baran ⁹⁵ et de A.-L. Lee. ²⁹⁰	119
Schéma 80 – Stratégie envisagée d'application des protocoles de C-H activation à notre séquence réactionnelle.	120
Schéma 81 – Résultats de l'application du protocole de P. Baran ⁹⁵ sur des <i>p</i> -benzoquinones. Toutes les expériences sont réalisées à l'obscurité.	120
Schéma 82 – Résultats de l'application des protocoles de P. Baran ⁹⁵ et A.-L. Lee ²⁹⁰ pour le deuxième couplage. Les réactions au nitrate d'argent sont réalisées à l'obscurité.	121
Schéma 83 – Acides boroniques impliqués dans l'extension de la méthode de couplage des <i>p</i> -benzoquinones.	123
Schéma 84 – Rappel de la réaction de contraction de cycle suivant les conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm. ²⁰⁰	125
Schéma 85 – Voie de synthèse de l'acide 3,4-bis(benzyloxy)boronique (301).	127
Schéma 86 – Produits de couplages à partir des acides boroniques benzylés et méthylènedioxylés.	129
Schéma 87 – Hydrolyse basique de terphénylquinones.	130
Schéma 88 – Rappel du mécanisme de contraction de cycle d'une 2,5-dihydroxy-3,6-diphénylquinone (I) selon les conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm. ²⁰⁰	130
Schéma 89 – Acides bistétroniques obtenus par la méthode de H. W. Moore et R. J. Wikholm optimisée. Les rendements affichés sont les meilleurs obtenus lors des différents essais et remontés de matière. La photographie représente le comportement des composés (258) et (271) en tube RMN sous lampe UV.	133
Schéma 90 – Stratégie de synthèse suivie en début de doctorat.	134
Schéma 91 – Récapitulatif des deux stratégies de synthèse étudiées pour la synthèse totale de l'acide xérocémique.	136
Schéma 92 – Hydrolyse de l'acide bistétronique précurseur de l'acide xérocémique.	136
Schéma 93 – Synthèse totale de l'acide pulvinique (323), réalisée au laboratoire.	137
Schéma 94 – Méthanololyse de l'acide bistétronique (271), précurseur de l'acide xérocémique.	138
Schéma 95 – Corrélations J^3 entre les protons aromatiques et les carbones 2 et 5 ayant permis d'attribuer définitivement les structures des composés (279a) et (279b).	138
Schéma 96 – Effet <i>push-pull</i> du groupement méthoxy orange (en position <i>para</i>) sur le composé (271).	139
Schéma 97 – Synthèse totale de l'acide pinastrique (291) et <i>isopinastrique</i> (408), réalisée au laboratoire.	140

Schéma 98 – Déprotection des fonctions phénols pour les dérivés pulviniques par chauffage par micro-ondes en présence de [HMIM] [Br] (les taux de conversion sont exprimés entre parenthèse).	141
Schéma 99 – Structures de trois terphénylquinones fongiques : l'atromentine (2), la variégatine (326) et l'acide théléphorique (292).....	142
Schéma 100 – Synthèse totale de l'atromentine (2) par couplage de Suzuki-Miyaura, réalisée au laboratoire.....	143
Schéma 101 – Synthèse totale de la variégatine (326) par couplage de Suzuki-Miyaura, réalisée au laboratoire.....	143
Schéma 102 – Produits d'hydrogénation des précurseurs de l'acide xérocémique et <i>isoxérocémique</i>	145
Schéma 103 – Illustration de la perte de fluorescence après la méthanolyse du composé Xéro (271).....	162
Schéma 104 – Effet d'un groupement acide carboxylique ou d'un ester sur la résonance d'un système conjugué de type acrylate.	197
Schéma 105 – Proposition de rétrosynthèse des dipeptides C et D.	207
Schéma 106 – Séquence réactionnelle suivie pour la synthèse du dipeptide.	208
Schéma 107 – Synthèse du dipeptide correspondant à l'homocouplage de l'ester de méthyle de la (L)-phénylalanine sur lui-même en raison de l'hydrolyse du groupement isocyanate en présence d'eau.....	209
Schéma 108 – Synthèse de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360) développée au cours de ce doctorat.	236
Schéma 109 – Proposition de mécanisme pour la synthèse du composé A (363).	239
Schéma 110 – Comparaison des mécanismes de dimérisation du modèle de l'acide xérocémique (à gauche) et de la biosynthèse des dimères pulviniques (à droite).	240
Schéma 111 – Propositions de post-fonctionnalisation des dimères de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360), suivant la stratégie de T. Le Gall/C. Mioskowski ^{27, 178} ou de G. Pattenden. ²²⁵	243
Schéma 112 – Mécanisme de la réaction d' <i>oxa</i> -Diels-Alder ayant abouti à la formation du composé B (377).	248
Schéma 113 – Mécanisme du couplage de la (+)-catéchine (362) sur elle-même ayant abouti à la formation du composé E (<i>i. e.</i> la déhydrodicatéchine A) (381).	250
Schéma 114 – Réactivité des acides xérocémique (7) et <i>isoxérocémique</i> (333) en condition oxydante par W. Steglich. Le nombre d'équivalent des oxydants utilisés et le pH des solutions n'est pas spécifié. ²⁶¹	252
Schéma 115 – Récapitulatif des conditions de dimérisations fructueuses utilisées au cours de ce doctorat.....	266



LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Nomenclature des γ -lactones et panorama de molécules naturelles comportant le motif « buténolide ».....	52
Figure 2 – Quelques exemples de composés naturels comportant un motif <i>p</i> -benzoquinone, buténolide ou bistétronique substitué par des groupements aromatiques ou des hétérocycles.	122
Figure 3 – Récapitulatif des résultats d’extension des couplages de Suzuki-Miyaura de la dibromodiméthoxyquinone (276) à d’autres cycles aromatiques.	124
Figure 4 – Acides boroniques impliqués dans le choix d’un groupement protecteur des fonctions phénols adapté.....	127
Figure 5 – Cliché de DRX du composé (279b), précurseur de l’acide xéromique.	139
Figure 6 – Structures des 9 produits naturels synthétisés au cours de ce doctorat.....	146
Figure 7 – Acides bistétroniques xéromique (271) et atromentique (258) sous irradiation UV.	146
Figure 8 – Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié. ¹⁶²	148
Figure 9 – Visualisation du déplacement de Stokes sur les spectres d’absorption et d’émission d’un composé fictif.	150
Figure 10 – Structure des six acides bistétroniques étudiés. De nouvelles abréviations sont proposées pour cette partie du manuscrit, afin de faciliter l’analyse des résultats.....	152
Figure 11 – Absorbance maximale mesurée dans le chloroforme en fonction de la concentration. Les droites des composés XéroBn (rose) et Varié (noire) sont confondues. ..	154
Figure 12 – Coefficient d’extinction molaire ϵ dans différents solvants pour les acides bistétroniques Pulv et Pina (les longueurs d’onde λ_{\max} pour lesquelles ϵ a été calculé sont reportées sur les histogrammes).	155
Figure 13 – Coefficient d’extinction molaire ϵ dans différents solvants pour les acides bistétroniques Atro et Varié (les longueurs d’onde λ_{\max} pour lesquelles ϵ a été calculé sont reportées sur les histogrammes).	155
Figure 14 – Coefficient d’extinction molaire ϵ dans différents solvants pour les acides bistétroniques Xéro et XéroBn (les longueurs d’onde λ_{\max} pour lesquelles ϵ a été calculé sont reportées sur les histogrammes).	155
Figure 15 – Structures des molécules de référence ayant des propriétés d’absorbance similaire aux acides bistétroniques étudiés (ϵ est donné en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).	157
Figure 16 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l’acide bistétronique pinastrique dans 2 solvants (excitation réalisée à λ_{\max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{\max}$) est représenté par une courbe.	158
Figure 17 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l’acide bistétronique atromentique dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{\max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{\max}$) est représenté par une courbe.....	158
Figure 18 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l’acide bistétronique xéromique dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{\max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{\max}$) est représenté par une courbe.....	159

Figure 19 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l'acide bistétronique xérocémique (Bn) dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$) est représenté par une courbe.....	159
Figure 20 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l'acide bistétronique variégatique dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$) est représenté par une courbe.....	159
Figure 21 – Aire sous la courbe d'émission mesurée dans le chloroforme en fonction du facteur d'absorption. Les droites des composés XéroBn (rose) et Varié (noire) sont confondues.	160
Figure 22 – Rendements quantiques de fluorescence pour les acides bistétroniques étudiés.	161
Figure 23 – Représentation du système π de l'acide bistétronique xérocémique triméthoxylé Xéro (271).....	162
Figure 24 – Illustration du processus de maturation du champignon <i>Scleroderma citrinum</i> . Au début de sa croissance, le champignon possède une enveloppe de couleur beige. À maturité, l'enveloppe du champignon est jaune, elle éclate et libère les spores qu'elle contient. Le champignon peut alors coloniser son milieu.....	168
Figure 25 – Protocole d'extraction des métabolites du champignon <i>Scleroderma citrinum</i> . .	168
Figure 26 – Protocole d'extraction des métabolites de <i>Scleroderma citrinum</i> et répartition du bilan matière des fractions F0 à F14 obtenues après pré-fractionnement sur silice.....	169
Figure 27 – Chromatogramme TIC (ESI-) de la fraction F10 de l'extrait sur Sunfire C18 avec un éluant ACN/H ₂ O + 0,1% AF (5% à 100% en 25 minutes).....	170
Figure 28 – Chromatogramme TIC (ESI-) de la fraction F10 de l'extrait sur colonne Waters XBridge avec un éluant ACN/H ₂ O + NH ₄ Ac (20 mM) (5% à 100% d'ACN en 20 minutes).	172
Figure 29 – Comparaison des spectres de fragmentation MS/MS obtenus pour les composés A et B.....	175
Figure 30 – Conversion des spectres de fragmentation des composés A et B en vecteur à 4 dimensions (la représentation des vecteurs est réduite à deux dimensions sur le graphe).	176
Figure 31 – Elaboration d'un réseau moléculaire entre 3 molécules de rapport m/z 350,01 Da, 280,70 Da et 725,45 Da selon la méthode du <i>spectral contrast angle</i>	177
Figure 32 – Spectres de fragmentation de l'acide xérocémique ($m/z = 355,1303$ Da) avec une énergie de collision de 10 eV (haut), 30 eV (milieu) et 50 eV (bas). Le losange et la flèche bleus représentent l'ion parent sélectionné.	180
Figure 33 – Spectres de fragmentation d'un ion ($m/z = 759,3056$ Da) avec une énergie de collision de 10 eV (haut), 30 eV (milieu) et 50 eV (bas). Le losange et la flèche bleus représentent l'ion parent sélectionné.	181
Figure 34 – Structure des deux lysophosphatidyléthanolamines identifiées au sein du réseau de <i>Scleroderma citrinum</i>	183
Figure 35 – Réseau moléculaire obtenu pour <i>Scleroderma citrinum</i> sur GNPS.	185
Figure 36 – Structures de quelques analogues proposés par MetGEM sur le réseau moléculaire généré par GNPS.....	186

Figure 37 – Répartition des composés du réseau sur GNPS entre les différentes fractions obtenues par fractionnement sur silice. La couleur choisie pour chaque nœud correspond à la fraction contenant majoritairement le composé du nœud étudié. Les composés « non isolables » sont ceux présents en trop faible quantité pour être isolés.	187
Figure 38 – Réseau moléculaire obtenu pour <i>Scleroderma citrinum</i> sur MetGEM. Les nœuds non annotés sont colorés en gris.....	188
Figure 39 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (254 nm et 410 nm) de la sclérocitrine ($t_R = 6,20$ min) et spectre de masse correspondant (colonne Waters XBridge - $150 \times 2,1$ mm ; i. d. $3,5 \mu\text{m}$; éluant ACN/H ₂ O+NH ₄ Ac - 5% → 100% en 20 minutes ; débit = 0,3 mL/min).	190
Figure 40 – Mono-deutération de la sclérocitrine sur la position 3 en présence d'eau lourde.	191
Figure 41 – Spectre ¹ H de la sclérocitrine d'après W. Steglich (acétone- <i>d</i> ₆ , 600 MHz). ³⁰² ...	192
Figure 42 – Spectre ¹ H de la sclérocitrine mono-deutérée (acétone- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	192
Figure 43 – Spectre ¹³ C de la sclérocitrine d'après W. Steglich (acétone- <i>d</i> ₆ , 151 MHz). ³⁰² ..	193
Figure 44 – Spectre ¹³ C de la sclérocitrine mono-deutérée (acétone- <i>d</i> ₆ , 101 MHz).	193
Figure 45 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (254 nm et 410 nm) du composé A ($m/z = 739,0976$ Da) ($t_R = 7,65$ min) et du composé B ($m/z = 739,0966$ Da) ($t_R = 8,38$ min) (colonne XBridge analytique ; éluant ACN/H ₂ O + NH ₄ Ac - 5% → 100%).	194
Figure 46 – Spectre ¹ H du composé A ($m/z = 739,0976$ Da) (acétone- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	195
Figure 47 – Spectre ¹ H du composé B ($m/z = 739,0966$ Da) (acétone- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	196
Figure 48 – La méthyl-sclérocitrine, une structure potentielle des composés A et B.	196
Figure 49 – Spectre HMBC du composé A ($m/z = 739,0976$ Da) (acétone- <i>d</i> ₆ , 400 MHz). ...	198
Figure 50 – Corrélations entre le proton 7a et les carbones 4' et 4'' pour le composé A ($m/z = 739,0976$ Da).	198
Figure 51 – Structures finales de la méthyl-sclérocitrine A (334) ($m/z = 739,0976$ Da) et de la méthyl-sclérocitrine B (335) ($m/z = 739,0966$ Da).	199
Figure 52 – Spectre HMBC du composé B (<i>i. e.</i> la méthyl-sclérocitrine B) ($m/z = 739,0966$ Da) (acétone- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	200
Figure 53 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (254 nm) du composé C de rapport $m/z = 453,1882$ Da ($t_R = 13,24$ min) (colonne XBridge analytique ; éluant ACN/H ₂ O + NH ₄ Ac - 5% → 100%).	201
Figure 54 – Spectre de masse du composé C de rapport $m/z = 453,1882$ Da ($t_R = 13,24$ min) (colonne XBridge analytique ; éluant ACN/H ₂ O+NH ₄ Ac - 5% → 100%).	202
Figure 55 – Spectre ¹ H du composé C ($m/z = 453,1882$ Da) (acétone- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	203
Figure 56 – Spectre HMBC du composé C ($m/z = 453,1882$ Da) (acétone- <i>d</i> ₆ , 400 MHz). ...	204
Figure 57 – Structure finale du composé C (336) ($m/z = 453,1882$ Da).	205
Figure 58 – Rappel des structures de la khayanthone (337) et du composé (419), appartenant au cluster B du réseau généré par le GNPS.	206
Figure 59 – Quelques exemples de peptides naturels possédant un pont urée : le mozamide A (350), ²⁴⁴ la muréidomycine A (351), ²⁴ la pacidamycine D (352) ²⁴ et l'anabaenopeptine B (353). ¹¹³ Le nom des acides aminés encadrant le motif urée (en vert) est indiqué.	211

Figure 60 – Structure de l'aspergillomarasmine A (354) (<i>Aspergillus versicolor</i>).	212
Figure 61 – Schéma récapitulatif de l'isolation de 5 métabolites de <i>Scleroderma citrinum</i> . Les purifications par HPLC ont été réalisées sur colonne Waters XBridge préparative, avec l'éluant ACN/H ₂ O + NH ₄ Ac (20 mM).	213
Figure 62 – Pièces constituant un chromatographe de partage centrifuge.	216
Figure 63 – Schéma illustrant les échanges entre la phase stationnaire et la phase mobile dans une cellule de CPC pour un soluté A.	217
Figure 64 – Echelle de pKa des espèces impliquées.	219
Figure 65 – Schéma de la progression d'un soluté A lors de la séparation par CPC avec une phase stationnaire aqueuse (reteneur : NH ₃) et une phase mobile organique (déplaceur : TFA).	219
Figure 66 – Schéma des tests de partage réalisés avec 7 solvants organiques d'extraction et 2 phases aqueuses.	221
Figure 67 – Photos des tests de partage réalisés sur 7 solvants organiques et 2 phases aqueuses, après une nuit à décanter.	222
Figure 68 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase organique (<i>i. e.</i> AcOEt) des tests de partage de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i> dans le système AcOEt/H ₂ O.	223
Figure 69 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase aqueuse des tests de partage de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i> dans le système AcOEt/H ₂ O.	224
Figure 70 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase organique (<i>i. e.</i> <i>n</i> -BuOH) des tests de partage de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i> dans le système <i>n</i> -BuOH/H ₂ O.	225
Figure 71 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase aqueuse des tests de partage de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i> dans le système <i>n</i> -BuOH/H ₂ O.	225
Figure 72 – Comparaison des chromatogrammes UV à 254 nm et à 410 nm de l'analyse HPLC-MS de la phase organique des tests de partage de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i> dans le système AcOEt/H ₂ O + TFA.	226
Figure 73 – Comparaison des chromatogrammes UV à 254 nm et à 410 nm de l'analyse HPLC-MS de la phase organique des tests de partage de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i> dans le système <i>n</i> -BuOH/H ₂ O + TFA.	226
Figure 74 – Extraction retour des métabolites du champignon <i>Scleroderma citrinum</i> contenus dans la phase organique (en rouge) par une phase aqueuse basique.	227
Figure 75 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (410 nm) des fractions I, J et K contenant la sclérocitrine (3) ($t_R = 5,28$ min) et spectre de masse correspondant au pic entouré en noir (entrée 1. du Tableau 16).	229
Figure 76 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV (410 nm) des fractions J et K contenant un isomère de l'acide atromentique ($t_R = 9,03$ min) et spectre de masse correspondant au pic entouré en noir (entrée 3. du Tableau 13). La structure de l'acide atromentique est rappelée.	230
Figure 77 – Structures des molécules modèles choisies.	235

Figure 78 – Structure du produit d'oxydation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360).....	238
Figure 79 – Structures des cœurs centraux potentiellement synthétisables par dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360).	242
Figure 80 – Rappel des structures de la quercétine (361) et de la (+)-catéchine (362).	245
Figure 81 – Structures des produits d'oxydation de la quercétine (361) obtenus.	248
Figure 82 – Structures des produits d'oxydation de la (+)-catéchine (362) obtenus.	249
Figure 83 – Graphe représentant la conversion de l'acide xérocomique (7) ($m/z = 355,05$ Da) et de sa forme oxydée (7a) ($m/z = 353,03$ Da) au cours du temps lors de l'oxydation par $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$ (Tableau 23, entrée 1.).	256
Figure 84 – Chromatogrammes du TIC (en haut) et de l'UV à 410 nm (en bas) lors de l'oxydation de l'acide xérocomique par $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$ (Tableau 23, entrée 1.).	257
Figure 85 – Rappel des structures des cinq métabolites fongiques isolés à partir de <i>Scleroderma citrinum</i>	268
Figure 86 – Rappel du schéma récapitulatif de l'isolement de 5 métabolites de <i>Scleroderma citrinum</i> . Les purifications par HPLC ont été réalisées sur colonne XBridge, avec l'éluant ACN/H ₂ O + NH ₄ Ac (20 mM).....	269
Figure 87 – Evolution of the proportion of the trimeric form and the monomeric form of compound (301) as a function of the amount of water. The analysis were recorded in DMSO- <i>d</i> ₆ after 48h of stirring (abbreviations : T, trimeric form ; M, monomeric form).	284
Figure 88 – Crystallographic image of compound (279b). 3 intramolecular hydrogen bonds induce flatness of the two cycles C2-C7 and C9-C12.....	343
Figure 89 – Absorption of compounds 1 (Atro), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in acetone and AcOEt at concentration c_1	386
Figure 90 – Absorption of compounds 1 (Atro), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in CH ₂ Cl ₂ and 1,4-dioxane at concentration c_1	387
Figure 91 – Absorption of compounds 1 (Atro), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in DMF and pentane at concentration c_1 (except for pentane because of solubility limit).....	387
Figure 92 – Absorption of bistetronic acids in CHCl ₃ and toluene at concentration c_1	387
Figure 93 – Absorption of compounds 1 (Atro), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in cyclohexane and isopropanol at at unknown concentration (because of solubility limit).....	388
Figure 94 – Absorption of compound 2 (Xéro) in ACN at unknown concentration (because of solubility limit).....	388
Figure 95 – Emission spectra of compounds 1 (Atro), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in CH ₂ Cl ₂ and ACN at concentration c_1 (except for ACN, because of solubility limit) at their own λ_{max}	388
Figure 96 – Emission spectra of compounds 1 (Atro), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in acetone and AcOEt at concentration c_1 at their own λ_{max}	389
Figure 97 – Emission spectra of bistetronic acids in CHCl ₃ and toluene at concentration c_1 at their own λ_{max}	389
Figure 98 – Emission spectra of compounds 1 (Atro), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in 1,4-dioxane at concentration c_1 at their own λ_{max}	389

Figure 99 – Reported values of λ_{max} for bistetronic acids in different solvents.....	390
Figure 100 – Calculations of molar extinction coefficients for each compound (1 - Atro, 2 - Xéro, 3 - XéroBn and 4 - Varié) in acetone and AcOEt.....	391
Figure 101 – Calculations of extinction coefficients for each compound (1 - Atro, 2 - Xéro, 3 - XéroBn and 4 - Varié) in CH_2Cl_2 and toluene.	391
Figure 102 – Calculations of molar extinction coefficients for each compound (1 - Atro, 2 - Xéro, 3 - XéroBn and 4 - Varié) in DMF and 1,4-dioxane.....	391
Figure 103 – Calculations of molar extinction coefficients for each compound (1, 2, 3 and 4) in CHCl_3 , pentane and ACN.	392
Figure 104 – Reported values of molar extinction coefficients (ϵ) for compounds Pulv and Pina in different solvents (the wavelength at which it has been calculated is reported on each histogram).	392
Figure 105 – Reported values of molar extinction coefficients (ϵ) for compounds Atro and Xero in different solvents (the wavelength at which it has been calculated is reported on each histogram).	392
Figure 106 - Reported values of molar extinction coefficients (ϵ) for compounds XeroBn and Varié in different solvents (the wavelength at which it has been calculated is reported on each histogram).	393
Figure 107 – Calculations of quantum yield for each compound (1 - Atro, 2 - Xero, 3 - XeroBn and 4 - Varié) in acetone, AcOEt, CHCl_3 and CH_2Cl_2 . Values for compound Pina are too small to be seen on plots.	394
Figure 108 – Calculations of quantum yield for each compound (1 - Atro, 2 - Xero, 3 - XeroBn and 4 - Varié) in toluene and 1,4-dioxane. Values for compound Pina are too small to be seen on plots.	394
Figure 109 – Calculations of quantum yield for compound 2 (Xero) and LY in ACN and water.	395

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Exemples de fonctionnalisation de 2-oxyfuranes.	56
Tableau 2 – Influence des traces d'eau dans le milieu réactionnel sur la régiosélectivité de l'addition nucléophile du 2-oxyfurane sur le benzaldéhyde. ³⁰⁴	58
Tableau 3 – Récapitulatif des 6 voies de cyclisation intramoléculaire possibles.	68
Tableau 4 – Méthodologie pour le premier couplage de Suzuki-Miyaura sous irradiation micro-ondes (MW).	113
Tableau 5 – Méthodologie pour le deuxième couplage de Suzuki-Miyaura sous irradiation micro-ondes (MW).	114
Tableau 6 – Tableau récapitulatif des essais d'iodation réalisés sur la bromodiméthoxybenzoquinone.	118
Tableau 7 – Récapitulatif des essais de contraction de cycle.	132
Tableau 8 – Récapitulatif des conditions de déprotections testées sur les acides bistétroniques.	134
Tableau 9 – Récapitulatif des conditions d'hydrogénation testées sur les composés (327a) et (327b).	144
Tableau 10 – Valeurs de λ_{\max} mesurées pour les six acides bistétroniques étudiés dans 7 solvants. $\Delta\lambda_{\max}$ correspond à l'écart moyen entre les valeurs de λ_{\max} des composés Pulv, Pina, Atro, Xéro et Varié.	152
Tableau 11 – Constantes diélectriques ϵ_R des solvants utilisés.	153
Tableau 12 – Récapitulatif des coefficients d'extinction molaires ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) mesurés pour les six composés étudiés et 5 références (la longueur d'onde et le solvant reportés sont ceux pour lesquels la meilleure mesure a été effectuée). ²⁷³	157
Tableau 13 – Bilan matière des 15 fractions obtenues par purification sur gel de silice avec l'éluant DCM/MeOH + 1,0% HCO ₂ H (0% à 100%).	169
Tableau 14 – Tableau comparatif des caractéristiques de GNPS et MetGEM.	178
Tableau 15 – Méthodologie pour le couplage entre le diester 2-aminoadipate de méthyle et l'isocyanate de l'ester de méthyle de la phénylalanine. (Abréviations : Φ : phénylalanine ; α : 2-aminoadipate de méthyle).	208
Tableau 16 – Récapitulatif des concentrations en reteneur et déplaceur testées lors de la purification par CPC de la phase aqueuse résultante de la pré-purification de l'extrait de <i>Scleroderma citrinum</i>	228
Tableau 17 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par un agent oxydant testées sur l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du substrat).	238
Tableau 18 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par électrochimie testées sur la quercétine (361).	246
Tableau 19 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par un agent oxydant testées sur la quercétine (361) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du pyrocatechol).	247
Tableau 20 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par photochimie testées sur la quercétine (361) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du pyrocatechol).	247
Tableau 21 – Récapitulatif des conditions d'oxydation testées sur la (+)-catéchine (362) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du substrat).	251

Tableau 22 – Récapitulatif des potentiels d'oxydo-réduction des réactifs impliqués dans les essais de dimérisation de l'acide xéromique (tous les potentiels sont donnés en V par rapport à l'électrode standard à hydrogène, à 25°C et sous 1 bar).....	253
Tableau 23 – Récapitulatif des conditions d'oxydation testées sur l'acide xéromique (7). L'acide xéromique est toujours introduit à 1,0 équivalent (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte de l'oxydant).	255
Table 24 – Crystallographic data and structure refinement details.	344

PRÉAMBULE



PRÉAMBULE

La chimie des substances naturelles est une discipline appartenant à la famille des sciences du vivant, dont la vocation est de décrypter le fonctionnement de la nature à l'échelle moléculaire par l'étude des métabolites produits par la faune et la flore, ainsi que les mécanismes réactionnels impliqués dans leurs biosynthèses. Cette nouvelle manière d'appréhender le vivant a vu le jour au XIX^{ème} siècle et a joué un rôle important dans la rationalisation de la médecine traditionnelle (encore marquée par la pensée des philosophes grecs de l'Antiquité) et la découverte de nouveaux médicaments, entraînant ainsi une amélioration drastique de l'état de santé global de la population mondiale. C'est en 1820 précisément que cette discipline connaît un essor fulgurant grâce à deux chimistes français, Joseph Pelletier et Joseph Caventou. Leurs travaux sur l'écorce de quinquina (connue depuis 1639 pour lutter contre les fièvres paludiques) ont permis d'en extraire la quinine et la cinchonine, les deux alcaloïdes responsables de l'activité antipyrétique, ouvrant ainsi la voie à une méthodologie rigoureuse d'isolement de principes actifs présents dans la nature, de contrôle de la dose administrée aux malades et de la qualité des lots produits. Tout au long des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles, les alcaloïdes principalement, mais également d'autres familles de métabolites secondaires, comme les polyphénols se sont révélés être de formidables molécules pharmaceutiques à la structure et aux propriétés variées (analgésiques, antipaludiques ou anticancéreuses), permettant ainsi la prise en charge d'une plus large gamme de pathologies et suscitant une curiosité toujours croissante. Le cas particulier qui va être développé dans ce manuscrit est la recherche dans le domaine des pigments et des métabolites fongiques, qui a suscité un véritable engouement à la fin du XIX^{ème} siècle. En effet, à cette époque, C. Stahlshmidt et W. Thörner ont réussi à isoler de nouvelles espèces chimiques (respectivement, l'acide polyporique (**1**)²⁶⁰ en 1877 et l'atromentine (**2**)²⁷⁷ en 1878), révélant des propriétés antileucémiques.⁴²

La complexité et la diversité des structures des métabolites régulièrement extraits et publiés ont incité la chimie de synthèse à se tourner vers l'étude des mécanismes réactionnels impliqués dans leurs biosynthèses. Les objectifs de cette démarche sont de découvrir de nouvelles réactivités, de pouvoir synthétiser, en un minimum d'étapes, ces molécules d'une grande complexité structurale, et ainsi de pouvoir en (in)valider les hypothèses de biosynthèse. Cette démarche est qualifiée d'*approche biomimétique*. Ainsi, aujourd'hui, on

parle de *synthèse biomimétique* lorsque l'étape clé d'une synthèse ou une cascade réactionnelle copie la réactivité observée dans la nature, même si le mode d'activation diffère très largement en laboratoire. L'équipe de *Chimie des Substances Naturelles* du laboratoire *BioCIS* s'inscrit dans cette démarche d'étude et de compréhension des voies de biosynthèse de métabolites secondaires données par la réalisation de leur synthèse totale en laboratoire.

Le but principal de ce travail de thèse est de proposer une voie de biosynthèse cohérente de deux pigments fongiques de structure similaire : la **sclérocitrine (3)**, pigment extrait du scléroderme commun (*Scleroderma citrinum*), et la **chalcitrine (4)**, pigment issu du bolet poivré (*Chalciporus piperatus*), deux champignons du règne des *Boletales* élargi. L'**introduction générale** de ce manuscrit est ainsi dédiée à la présentation de ces deux pigments, aux différentes hypothèses de biosynthèse formulées dans la littérature, ainsi qu'aux efforts synthétiques déjà réalisés pour ces composés et leurs dérivés au sein de cette famille chimique. Une fois cette présentation de l'état actuel des connaissances scientifiques dans ce domaine réalisée, le **premier chapitre** de ce manuscrit détaillera la synthèse totale biomimétique d'acides pulviniques (précurseurs de la sclérocitrine (3) et de la chalcitrine (4)) mise au point au cours de ce doctorat, ainsi que leurs caractérisations. Le **deuxième chapitre** de ce manuscrit constitue un essai d'étude exhaustive des métabolites secondaires produits par le champignon *Scleroderma citrinum*, dans le but d'isoler et de caractériser des intermédiaires de biosynthèse de la sclérocitrine (3). Le **troisième chapitre** s'attardera sur les différentes stratégies mises en place au cours de ce doctorat pour achever la synthèse totale de nos deux cibles synthétiques : la sclérocitrine (3) et de la chalcitrine (4). Enfin, une **conclusion générale** récapitulera les différents résultats obtenus au cours de ce doctorat à la lumière des objectifs définis initialement et proposera quelques pistes de poursuite et d'approfondissement de ces travaux.

INTRODUCTION GÉNÉRALE



INTRODUCTION GÉNÉRALE

1 CONTEXTUALISATION

1.1 La sclérocitrine et la chalcitrine, deux pigments fongiques au sein de la famille des dimères pulviniques

La **sclérocitrine (3)** et la **chalcitrine (4)** sont deux métabolites fongiques extraits pour la première fois en 2004 par l'équipe de Wolfgang Steglich, au sein de l'université Ludwig-Maximilian à Munich.³⁰² La sclérocitrine (3), en particulier, est un pigment jaune produit en grande quantité par les champignons *Scleroderma citrinum* et *Chalciporus piperatus* entre autres : les rendements d'extraction sont de l'ordre de 400 mg de produit extrait et purifié pour 1 kg de champignon frais. Bien que la sclérocitrine soit très largement majoritaire au sein de ces deux souches, on y retrouve également d'autres métabolites secondaires complexes, comme la norbadione A (5), la badione A (6) et l'acide xérocomique (7) au sein de *Scleroderma citrinum*, et la chalcitrine (4), l'acide xérocomique (7), l'acide variégatique (8), la variégatorubine et un dérivé de la 2H-azépine chalciporone au sein de *Chalciporus piperatus*.

Dans le cadre de ce travail de thèse, la sclérocitrine (3) et la chalcitrine (4) ont été étudiées simultanément en raison de la grande similarité entre leurs structures moléculaires. En effet, ces deux composés sont constitués d'un cœur central comportant des fonctions exclusivement oxygénées (Schéma 1). Bien que les cœurs centraux des deux structures diffèrent, ils sont tous les deux substitués par des groupements identiques. En observant les cœurs centraux et les chaînes latérales, on peut conclure que le monomère constitutif de ces deux pigments correspond à un métabolite fongique également produit par *Scleroderma citrinum* et *Chalciporus piperatus* : l'acide xérocomique (7). Plus précisément, l'acide xérocomique (7) appartient à la famille des acides pulviniques : il est constitué d'un domaine central, appelé acide tétronique (*i. e.* une γ -lactone α,β insaturée possédant un groupement hydroxy en position β), substitué par un acide vinylique en position γ et par deux groupements phénoliques en position α et δ . Du point de vue structural, la sclérocitrine (3) et la chalcitrine (4) appartiennent donc à la même série chimique que la badione A (6) et la norbadione A (5), deux autres pigments déjà isolés et identifiés par l'équipe de W. Steglich (Schéma 1). Il est donc naturel d'envisager des voies de biosynthèse communes pour ces différents composés.

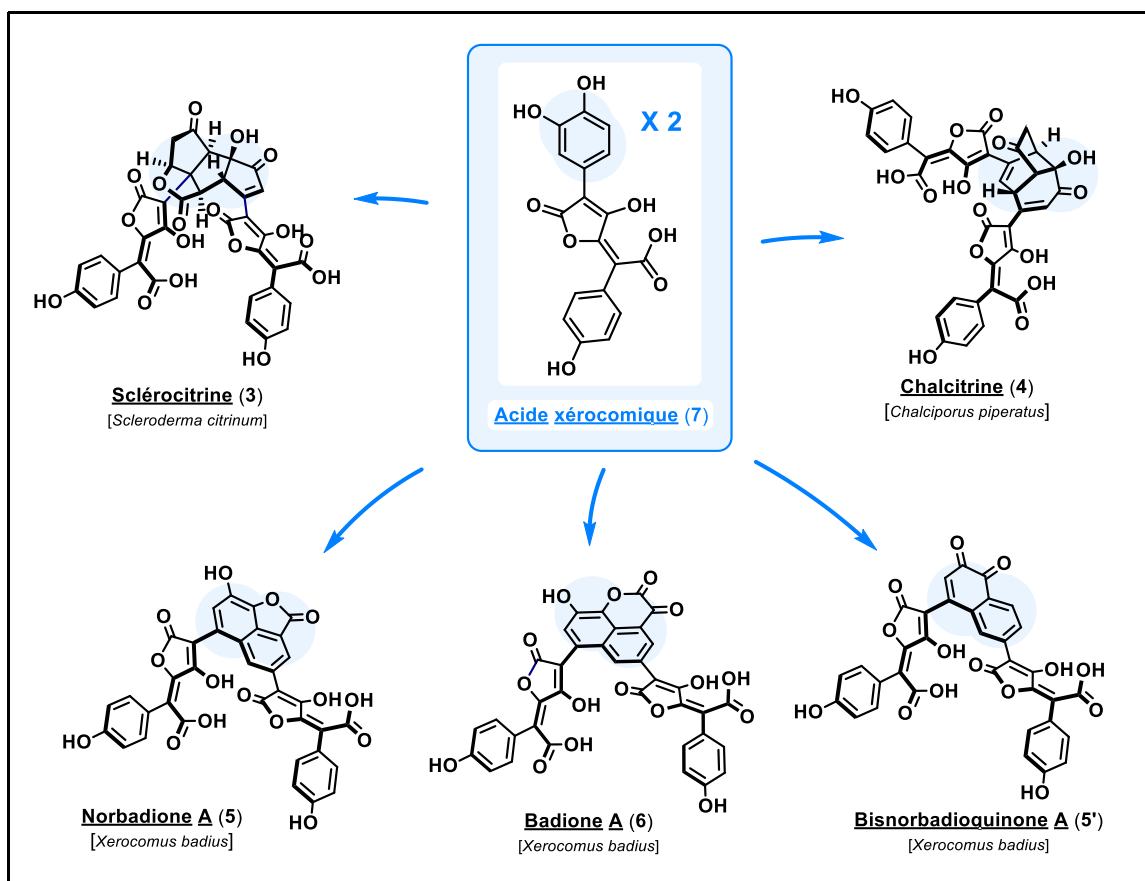


Schéma 1 – Panorama de quelques structures dimériques fongiques issues de l'acide xérocomique.

1.2 Hypothèses de biosynthèse des dimères pulviniques formulées par W. Steglich

1.2.1 Formulation des hypothèses de biosynthèse à partir du comportement du méthylcatéchol (9) en conditions oxydantes

L'analyse des structures de la sclérocitrine (3), la chalcitrine (4), la badione A (6) et la norbadione A (5) et la présence de l'acide xérocomique (7) dans les extraits naturels fongiques font instinctivement naître l'hypothèse selon laquelle ces pigments sont biosynthétisés à partir de l'acide xérocomique (7), en faisant intervenir une cascade mécanistique complexe. Cette hypothèse de biosynthèse a été formulée explicitement pour la badione A (6) et la norbadione A (5), dès 1985, par W. Steglich, puis validée expérimentalement la même année par l'étude du comportement d'un méthylcatéchol (9) en milieu oxydant (Schéma 2).²⁶² Le méthylcatéchol (9) a été choisi pour modéliser le comportement du groupement catéchol présent sur l'acide xérocomique (7). Le groupement méthyle permet de stabiliser la quinone obtenue en condition oxydante et de repérer l'emplacement des substituants sur le cœur central formé.

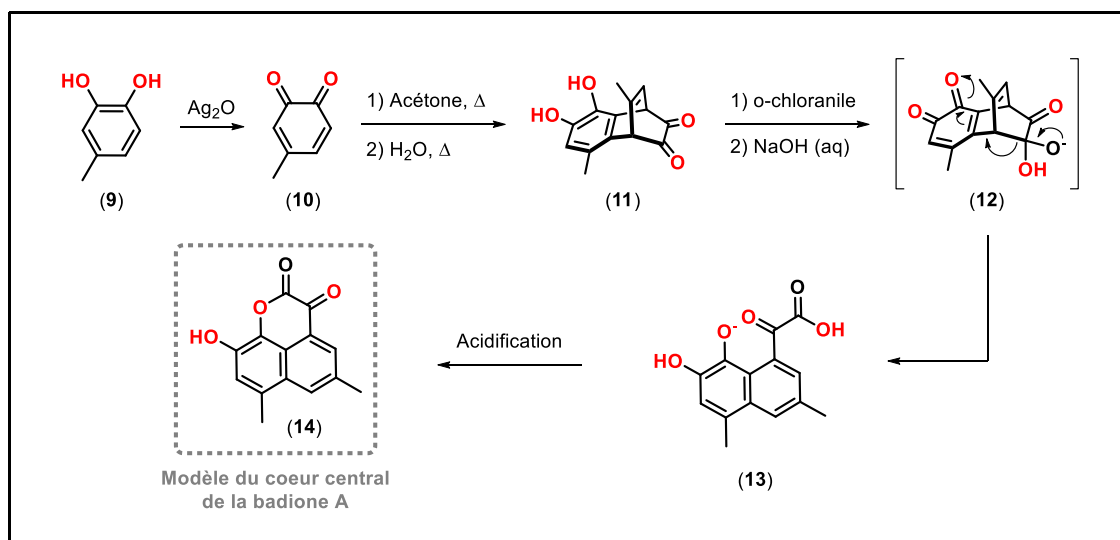


Schéma 2 – Synthèse d'un modèle du cœur central de la badione A (**6**) à partir d'un méthylcatéchol (**9**).

La synthèse démarre par l'oxydation du méthylcatéchol (**9**) grâce à l'oxyde d'argent. La méthylquinone (**10**) ainsi formée est isolée, puis chauffée au reflux pour induire une réaction de Diels-Alder entre deux méthylquinones. Enfin, l'ajout d'*o*-chloranil permet d'oxyder le produit obtenu en une *o*-quinone (**11**), qui réagira en présence de soude pour se fragmenter en pyruvate naphthalénique (**13**). Sous condition acide, ce pyruvate (**13**) se cyclise pour former un modèle (**14**) du cœur central de la badione A. Cette synthèse constitue, à ce jour, l'unique étude concernant l'assemblage du squelette central de ce composé et malgré ses limites (*i. e.* alternance des conditions basiques et acides), elle permet de préciser l'hypothèse initiale de biosynthèse des pigments fongiques. Ainsi, il apparaît que la sclérocitrine (**3**), la chalcitrine (**4**), la badione A (**6**) et la norbadione A (**5**) peuvent être obtenues par **dimérisation de l'acide xérocomique en conditions oxydantes**. Précisons qu'ici, le terme « dimérisation » est employé de manière abusive, car il ne revêt pas la même réalité qu'en chimie des polymères. En effet, dans notre cas, des réarrangements intramoléculeux peuvent intervenir au cours de la synthèse. Cependant, il présente l'avantage d'être concis et d'illustrer efficacement le processus en jeu. Il sera donc employé systématiquement dans la suite de ce manuscrit.

Pour les dimères précédemment mentionnés, d'après cette hypothèse de biosynthèse, la sous-unité catéchol de l'acide xérocomique (**7**) doit être oxydée en *o*-quinone, formant ainsi l'acide déshydroxérocomique (**7a**), pouvant réagir sur lui-même suivant une addition de Michael. Le précurseur obtenu (**15**) peut ensuite évoluer selon différentes voies réactionnelles

conduisant chacune à un composé naturel (Schéma 3). Au cours de ses différents travaux, W. Steglich a postulé trois chemins réactionnels distincts.

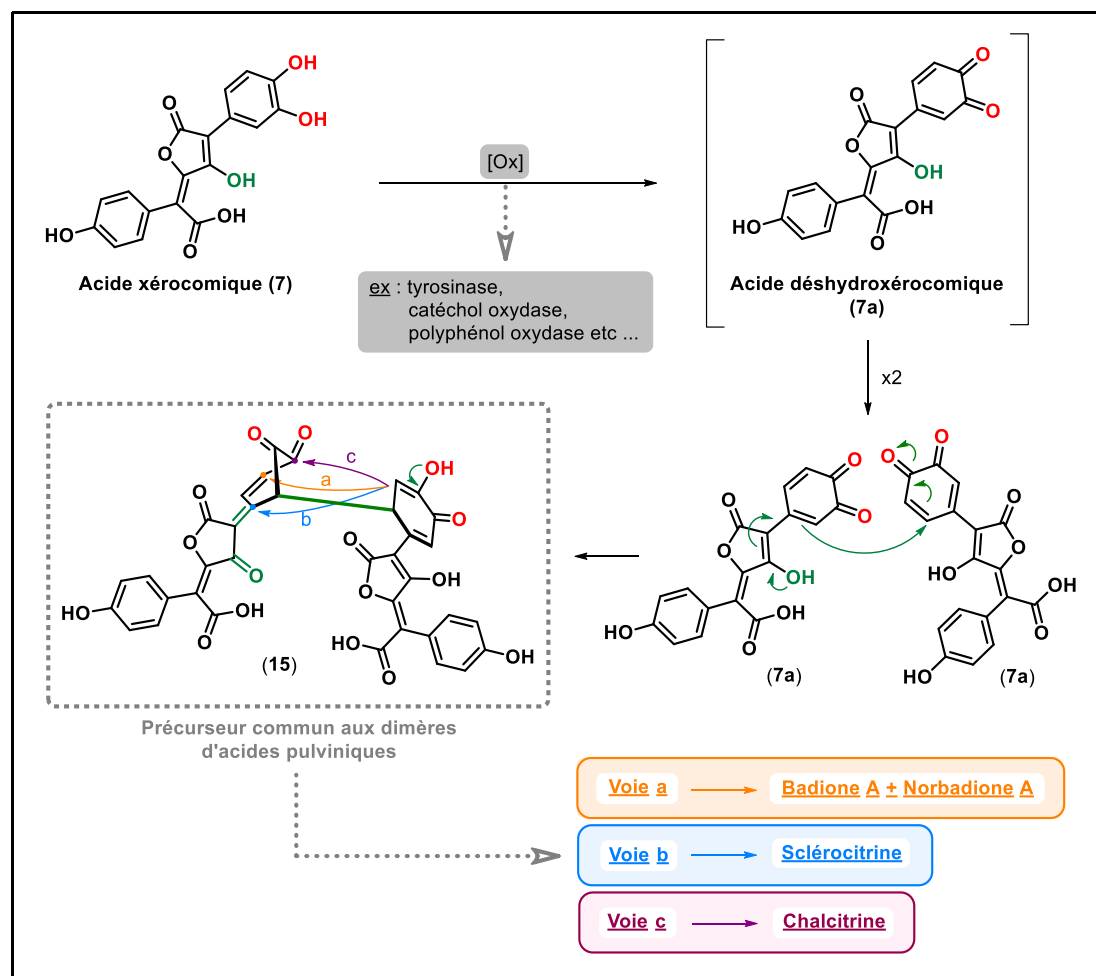


Schéma 3 – Mécanisme d'obtention du précurseur commun (15) aux dimères d'acides pulviniques par oxydation de l'acide xérocomique (7).

1.2.2 Voie a : pseudo-cycloaddition de type [4+2] (vers la badione A (6) et la norbadione A (5))

Ce chemin réactionnel implique une seconde étape d'oxydation (Schéma 4). Le substrat obtenu lors de la [4+2] formelle (16) réagit ensuite avec l'eau présente dans le milieu réactionnel pour induire une réaromatisation. L'intermédiaire (17) obtenu subit ensuite une deuxième oxydation pour former le composé (18). Ce dernier peut, de nouveau, être hydraté. L'intermédiaire (19) postulé à ce stade est un 2-oxoacide (ou α -cétoacide) naphthalénique identique au modèle du Schéma 2. La dernière étape de cyclisation, suivant le centre électrophile sur lequel elle intervient, permet d'obtenir soit la norbadione A (5) (grâce à l'action d'une déshydrogénase catalysant la décarboxylation) soit la badione A (6).

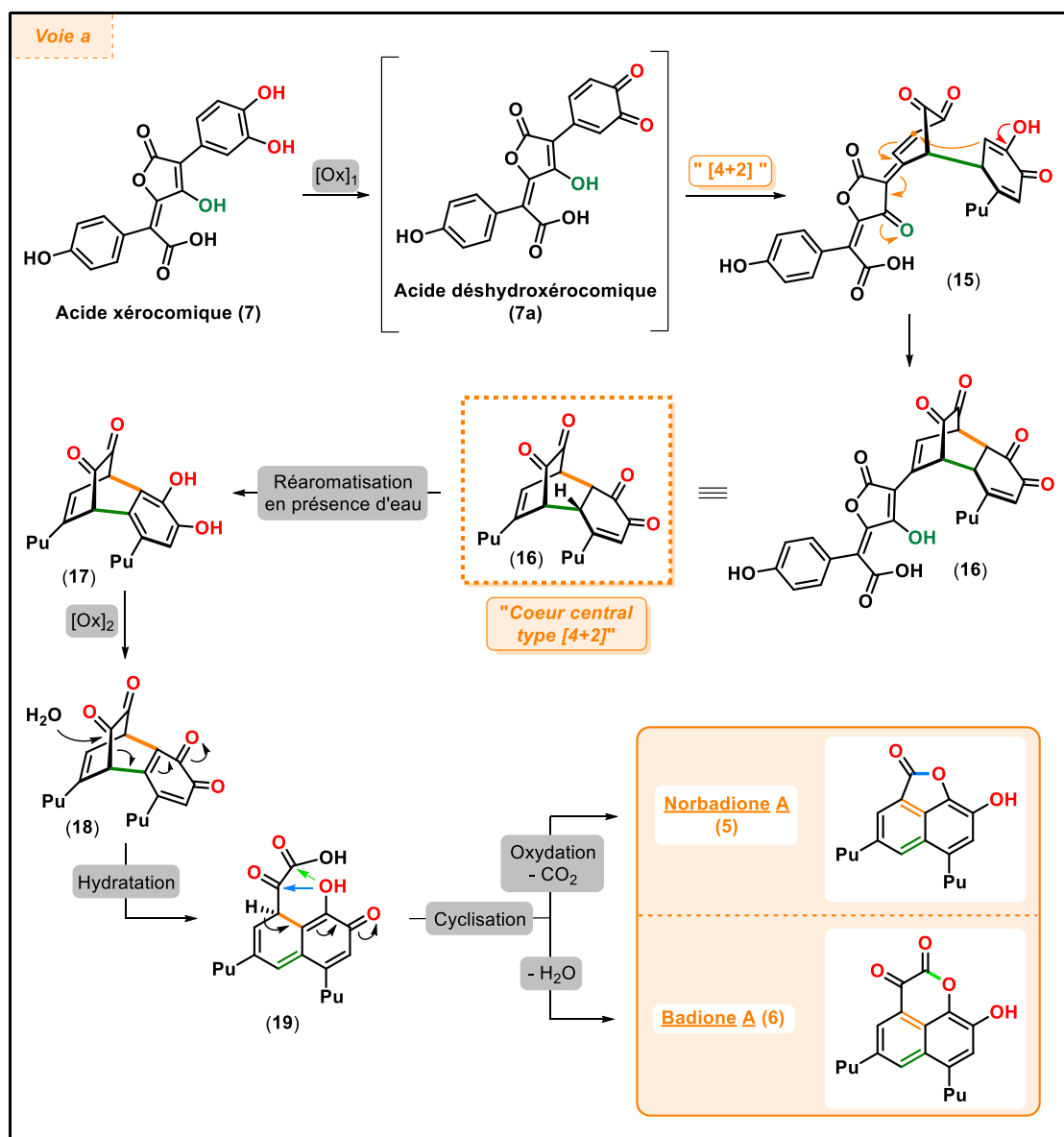


Schéma 4 – Hypothèse de biosynthèse de la norbadione A (5) et de la badione A (6) d'après les travaux de W. Steglich.

Notons que les deux prochaines voies proposées par W. Steglich font l'objet de certaines critiques. Nous proposerons une hypothèse mécanistique révisée par la suite.

1.2.3 Voie b : pseudo-cycloaddition de type [2+2] (vers la sclérocitrine (3))

A partir de l'adduit [2+2] (20) (Schéma 5), l'un des deux groupements α -cétoénone peut réaliser une contraction de cycle et former une γ -lactone *via* une coupure oxydante (intermédiaire (21)), puis une cyclisation par addition 1,4 des acides carboxyliques générés (intermédiaire (22)).²⁰⁷ Survient ensuite une étape de réduction, ouvrant la voie à une

extension de cycle par réarrangement de Cope.²¹⁰ Le cyclooctatriènediol résultant (**24**) peut ensuite réagir suivant deux aldolisations vinylogues successives, permettant de former le squelette triquinane propre à la sclérocitrine (**3**).^{81, 100}

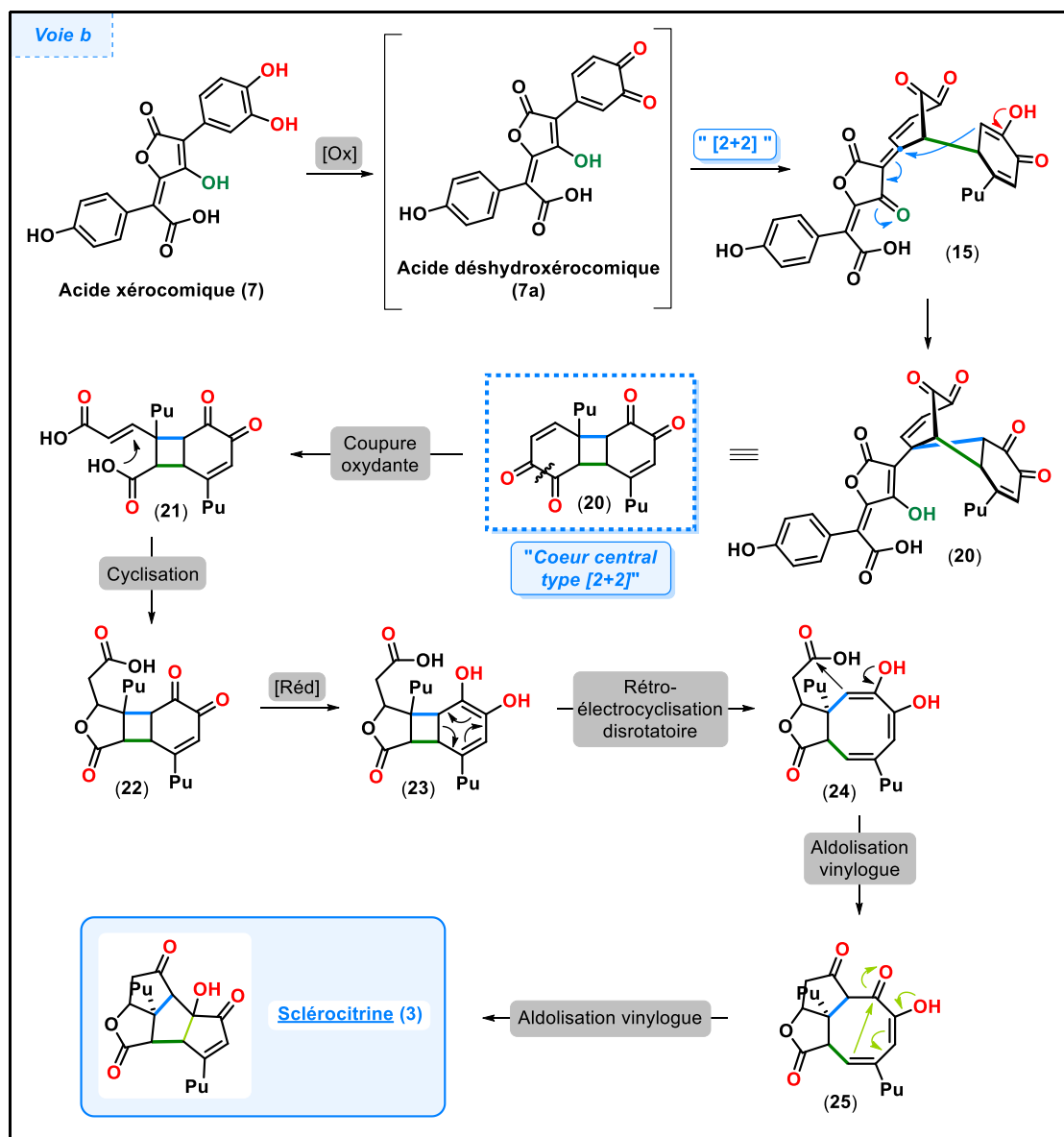


Schéma 5 – Hypothèse de biosynthèse de la sclérocitrine (**3**) d'après les travaux de W. Steglich.

1.2.4 Voie c : pseudo-cycloaddition de type [5+2] (vers la chalcitrine (**4**))

De même que pour la sclérocitrine, une coupure oxydante intervient sur le cycloadduit obtenu (**26**), libérant ainsi une fonction carboxylique (intermédiaire (**27**)) pouvant être décarboxylée enzymatiquement (intermédiaire (**28**)). La réduction de la dicétone fonctionnalisant le cyclohexène permet de générer un diol (**29**). La finalisation du squelette

central de la chalcitrine est ensuite permise par une addition de Michael entre le diol porté par le cyclohexène et la cyclohepténone (Schéma 6).

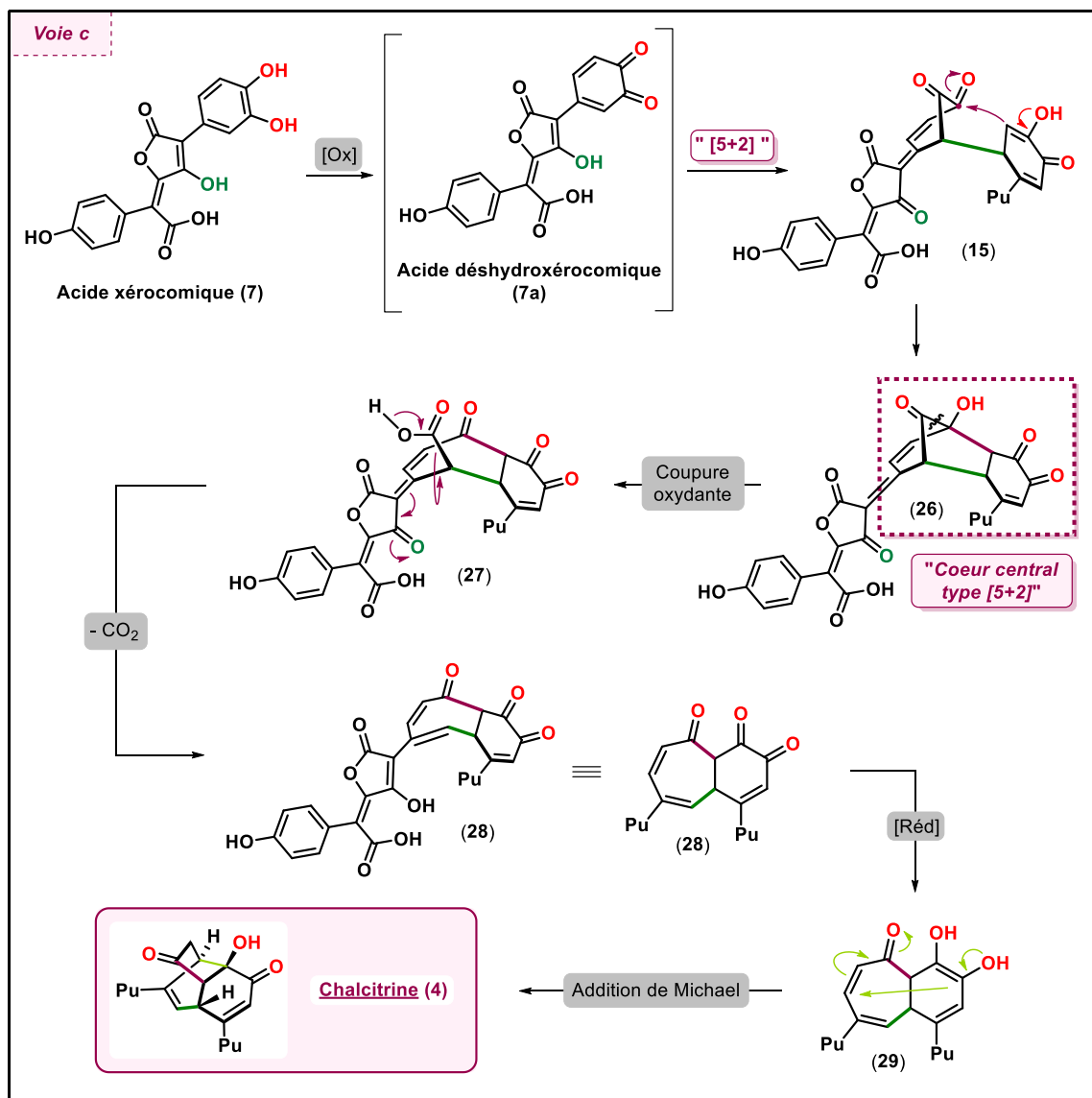


Schéma 6 – Hypothèse de biosynthèse de la chalcitrine (4) d'après les travaux de W. Steglich.

Les hypothèses mécanistiques de W. Steglich pour la sclérocitrine et la chalcitrine présentent l'avantage de former une démarche très englobante : un évènement oxydant sur l'acide xéromique (7) permet ensuite de générer une grande diversité de dimères de structures particulièrement complexes, grâce à de nombreux réarrangements intramoléculaires. La force de cette démarche réside également dans le fait qu'elle s'appuie sur la biosynthèse d'autres métabolites proches de la sclérocitrine (3) et de la chalcitrine (4), comme la norbadione A (5) et la badione A (6), qui a déjà été prouvée *in vitro*.²⁶² Cependant, il est à noter que dans le cas de la sclérocitrine (3) et de la chalcitrine (4), les hypothèses

mécanistiques avancées impliquent une alternance entre des évènements oxydants, puis réducteurs. Cette alternance semble peu cohérente, car elle nécessite que le métabolite passe par différents organelles avec des environnements chimiques opposés au sein du champignon. Cette remarque constitue la principale limite des hypothèses émises par W. Steglich en 2004.

1.3 Hypothèses de biosynthèse de la sclérocitrine (3) et de la chalcitrine (4) proposées par le laboratoire

L'approche globalisée de W. Steglich reste, malgré ses limites, particulièrement élégante, du fait de la génération très rapide d'une grande diversité et complexité structurale grâce à des réactions simples. L'hypothèse que nous cherchons donc à valider par ce travail de thèse est qu'un *seul et unique évènement oxydant* se produise en début de biosynthèse, permettant d'enclencher une *cascade réactionnelle isohypsique*, proche de celle proposée par W. Steglich et ainsi, de conduire à la sclérocitrine (3) et à la chalcitrine (4) (Schéma 7).

Plus précisément, nous supposons que l'oxydation en *o*-quinone de l'acide xérocomique (7) conduit à une pseudo-cycloaddition de type [5+2] et à la disparition des deux groupements catéchols. L'adduit (26) obtenu subit ensuite une hydratation sur la cétone pontée du cœur central. A partir de cette étape, nous supposons que les voies de biosynthèse de la sclérocitrine et de la chalcitrine divergent :

- D'une part, l'intermédiaire commun aux deux dimères (30) peut subir une décarboxylation provoquant la formation d'une nouvelle liaison carbone-carbone par addition-1,2 sur une cétone du cœur central (intermédiaire (31)) ; un équilibre céto-énolique finit de rationaliser la biosynthèse de la chalcitrine (4).
- D'autre part, on remarque que, par équilibre céto-énolique, il est possible de faire apparaître un accepteur de Michael sur le cœur central de l'intermédiaire commun (30). Une fonction énol de l'intermédiaire (32) peut enclencher cette addition de Michael et ainsi permettre la formation d'une nouvelle liaison carbone-carbone (intermédiaire (33)). Par la suite, une deuxième addition de Michael peut intervenir entre l'acide carboxylique et l'énone précédemment formée. Le tétracycle obtenu (34) est particulièrement tendu en raison de la présence d'un cyclobutane et son ouverture par réarrangement de Cope semble favorisée. Enfin, une aldolisation vinylogue peut venir refermer l'intermédiaire (36) et ainsi venir former les cinq cycles propres au cœur central de la sclérocitrine (3).

2 LES ACIDES PULVINIQUES ET LE MOTIF BUTÉNOLIDE

2.1 Biosynthèse de l'acide xérocomique et des acides pulviniques

2.1.1 Conversion du glucose en acides polyporiques

L'objectif de ce travail de thèse étant de réaliser la synthèse biomimétique de la sclérocitrine (**3**) et de la chalcitrine (**4**) à partir de l'acide xérocomique (**7**), il est naturel de s'attarder, en premier lieu, sur la biosynthèse de l'acide xérocomique (**7**) au sein des espèces fongiques qui le produisent.

L'acide xérocomique (**7**) appartient à la famille des acides pulviniques, qui sont des métabolites de la *voie du shikimate-chorismate* (Schéma 8).¹⁰³ Au sein des organismes vivants, cette voie métabolique a pour rôle de synthétiser le chorismate (**41**), précurseur commun des acides aminés aromatiques, comme la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Concrètement, il s'agit d'une série de réactions enzymatiques intervenant une fois que le glucose assimilé par l'organisme a été converti en phosphoénolpyruvate (**39**) par *glycolyse*. Cette série de réactions démarre avec la condensation du phosphoénolpyruvate (**39**) (généralisé par glycolyse) avec l'érythrose-4-phosphate (**38**), puis de nombreuses étapes se succèdent pour aboutir finalement à la formation du chorismate (**41**). Par réarrangement de Claisen, le chorismate (**41**) est ensuite converti en préphénate (**42**), susceptible d'être décarboxylé. Le dérivé de phénylpyruvate obtenu (**43**) est un intermédiaire commun aux acides aminés aromatiques et aux acides pulviniques, car à ce stade de la métabolisation, leurs voies de biosynthèse divergent : d'un côté, le dérivé de phénylpyruvate (**43**) peut subir une transamination enzymatique conduisant à la phénylalanine ou à la tyrosine²³⁶ ; de l'autre, le dérivé de phénylpyruvate (**43**) peut se condenser sur lui-même pour former un intermédiaire bisaromatique (**44**), dont la cyclisation intramoléculaire permet d'obtenir un intermédiaire de type terphénylquinone. Les métabolites ainsi formés appartiennent à la famille des acides polyporiques et sont des précurseurs des acides pulviniques.

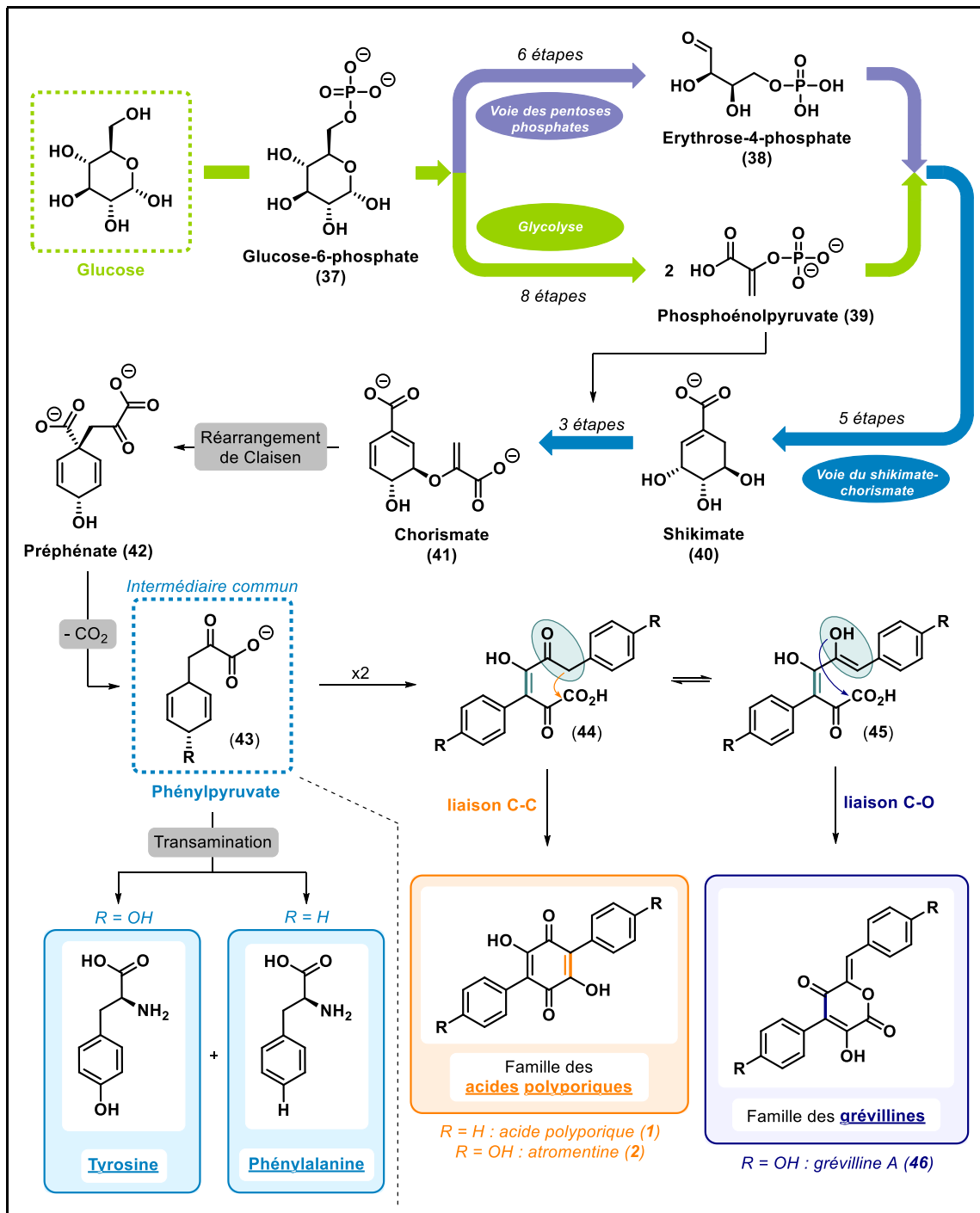


Schéma 8 – Biosynthèse des acides polyphoriques, précurseurs des acides pulviniques.

Il est à noter qu'une autre famille de pigments fongiques, les grévillines, est biosynthétisée par le biais de cette même voie métabolique, par un processus divergeant avant la formation du cœur quinonique (Schéma 8). Il a été montré que les grévillines peuvent se réarranger en acide polyphorique (cf équilibre dynamique entre (44) et (45)).¹⁰³

2.1.2 Conversion des acides polyporiques en acides pulviniques

La conversion des acides polyporiques en acides pulviniques constitue l'étape clé de cette biosynthèse (Schéma 9). Formellement, les dérivés polyporiques, comme l'atromentine (2) (dont le cœur central est une *p*-benzoquinone, *i. e.* un cycle à six chaînons) doivent être convertis en dérivés tétroniques (dont le cœur central est un cycle à cinq chaînons).

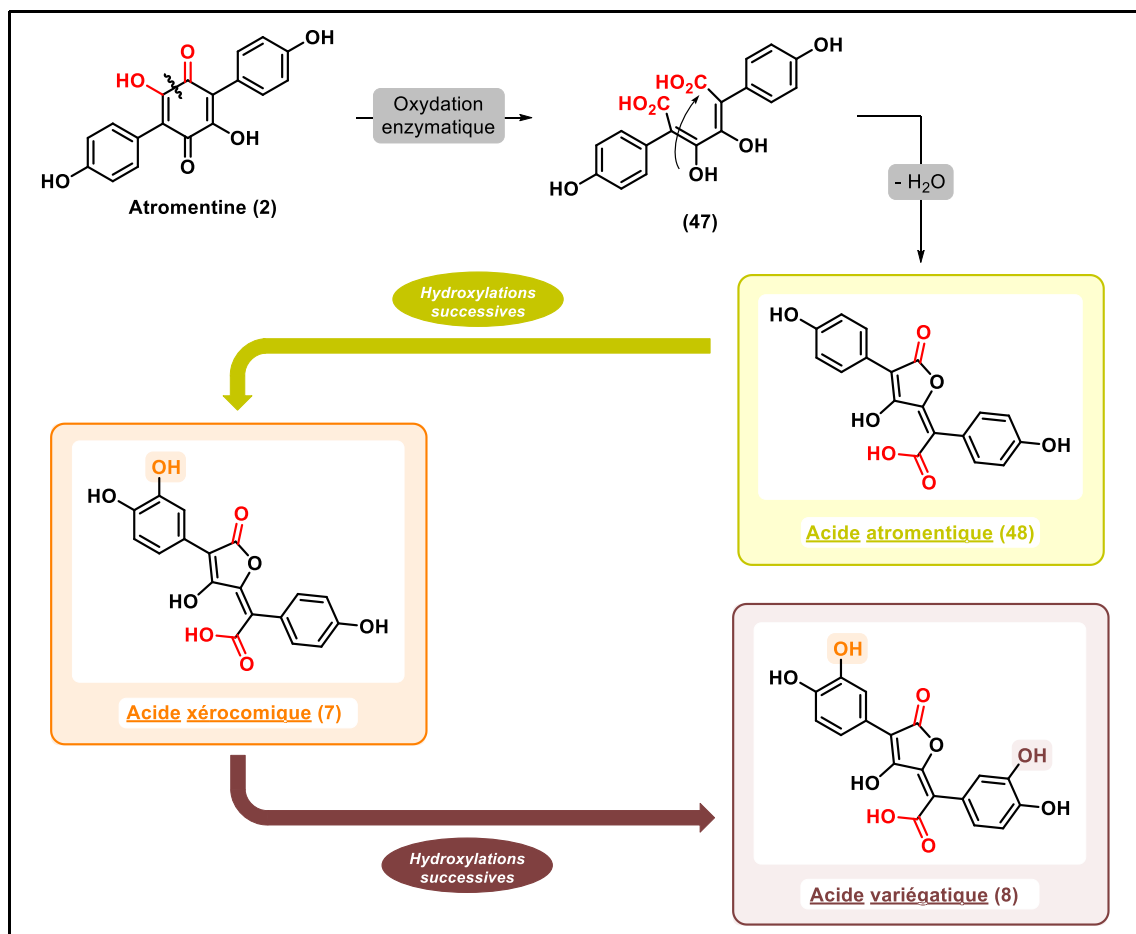


Schéma 9 – Biosynthèse des acides pulviniques à partir des acides polyporiques.

Concrètement, cette contraction de cycle peut être réalisée grâce à une coupure oxydante enzymatique de la *p*-benzoquinone, fournissant ainsi un diacide linéaire (47) pouvant se cycliser par addition nucléophile d'un groupement hydroxyle sur un des deux acides préalablement formés. Le dérivé pulvinique obtenu est l'acide atromentique (48). Ce dernier peut enfin être impliqué dans différentes étapes d'hydroxylation permettant d'obtenir l'acide xéromicomique (7), puis l'acide variégatique (8), un autre acide pulvinique connu de cette série chimique.¹⁰³ Une méthode biomimétique mimant cette étape a d'ailleurs été

exploitée au cours de ce travail de thèse et sera présentée dans la section 1.2.4 du chapitre 1 de ce manuscrit (page 129).

2.2 Synthèse du motif buténolide dans la littérature

L'étude de la biosynthèse de l'acide xérocémique et des acides pulviniques en général, permet de mettre en lumière l'étape clé de leur biosynthèse, à savoir : la contraction de cycle du dérivé polyporique en bisbuténolide. Toute synthèse biomimétique de dérivés pulviniques se doit donc de reproduire cette réactivité. Or, l'un des objectifs de ce travail de thèse étant de réaliser la synthèse biomimétique de l'acide xérocémique, il est nécessaire de s'appuyer sur les travaux publiés dans ce domaine pour y rechercher de potentielles stratégies biomimétiques ayant déjà fait leurs preuves. Cette partie du manuscrit s'attarde donc sur les principales voies de synthèse du motif « buténolide » que l'on trouve dans la littérature.

Le terme « buténolide » est employé pour décrire les systèmes crotonolactoniques au sens large. Il a été utilisé pour la première fois dans le *Bulletin de la Société Chimique de France* en 1898 par T. Klobb.¹⁴⁷ Cette nomenclature, très populaire au début du XX^e siècle, a depuis été officiellement incluse dans la nomenclature des furanones. Cependant, par sa concision, l'appellation « buténolide » reste encore très répandue dans la littérature. C'est donc cette dénomination qui a été choisie pour décrire cette famille de composés tout au long de ce manuscrit.

Au sein de cette classification, le motif « buténolide » peut se décliner sous différentes isoméries de structure, présentées sur la Figure 1, chacune concernant la position de l'insaturation et celle de l'atome d'oxygène au sein du cycle. Dans le cadre de l'étude des acides pulviniques, les isomères d'intérêt sont les buténolides α,β -insaturés (ou Δ^1 -buténolides, ou $\Delta^{\alpha,\beta}$ -buténolides ou furan-2(5H)-one, en bleu sur la Figure 1). Ils forment une famille de composés très largement représentés dans la nature. Quelques exemples sont présentés sur la Figure 1. La plupart d'entre eux ont révélé, au fur et à mesure des investigations, des propriétés biologiques diverses¹¹⁵ et intéressantes sur le plan médicinal, agrochimique ou écologique : à titre d'exemple, certains buténolides possédant des propriétés antifouling avérées, ils pourraient être employés pour protéger les coques de bateaux des colonies d'algues et de microorganismes, en remplacement des peintures au plomb utilisées à l'heure actuelle.¹⁶⁷ D'autres encore se sont avérés être de formidables colorants.^{91, 243} Au vu des nombreuses potentielles applications de ces composés, de très nombreux travaux ont été

réalisés, depuis les années 1950, dans le but de développer leurs voies de synthèse. Cette thématique a ainsi fait l'objet de plusieurs revues, chacune ayant pour objectif d'organiser la profusion des stratégies de synthèse appliquées durant ces 70 dernières années.^{134, 148, 205, 234}

Au travers de ces nombreuses revues, il apparaît comme étant impossible de faire ressortir un principe général de synthèse des buténolides. Malgré la faible complexité structurale de ces molécules, de nombreuses étapes de synthèse sont requises, faisant appel à des réactifs élaborés, parfois difficiles à obtenir. Les rendements obtenus sont généralement décents, mais très variables suivant les substrats impliqués : typiquement, très peu de protocoles permettent de synthétiser des buténolides tri- et tétrasubstitués. Aussi, en donner un aperçu clair et concis est un vrai défi. Malgré tout, il a été choisi de présenter, dans ce manuscrit, toutes ces réflexions qui animent la communauté scientifique depuis ces 70 dernières années dans le domaine des substances naturelles, de la manière la plus brève possible, afin de laisser entrevoir la richesse et l'esprit d'innovation de la recherche concernant la synthèse du motif buténolide.

N. B. : les buténolides substitués par des groupements amines ne sont pas traités au sein de ce manuscrit, car ces composés n'interviennent pas dans les recherches menées au cours de ce doctorat. Mais, il existe des voies de synthèse qui leur sont propres.²⁴²

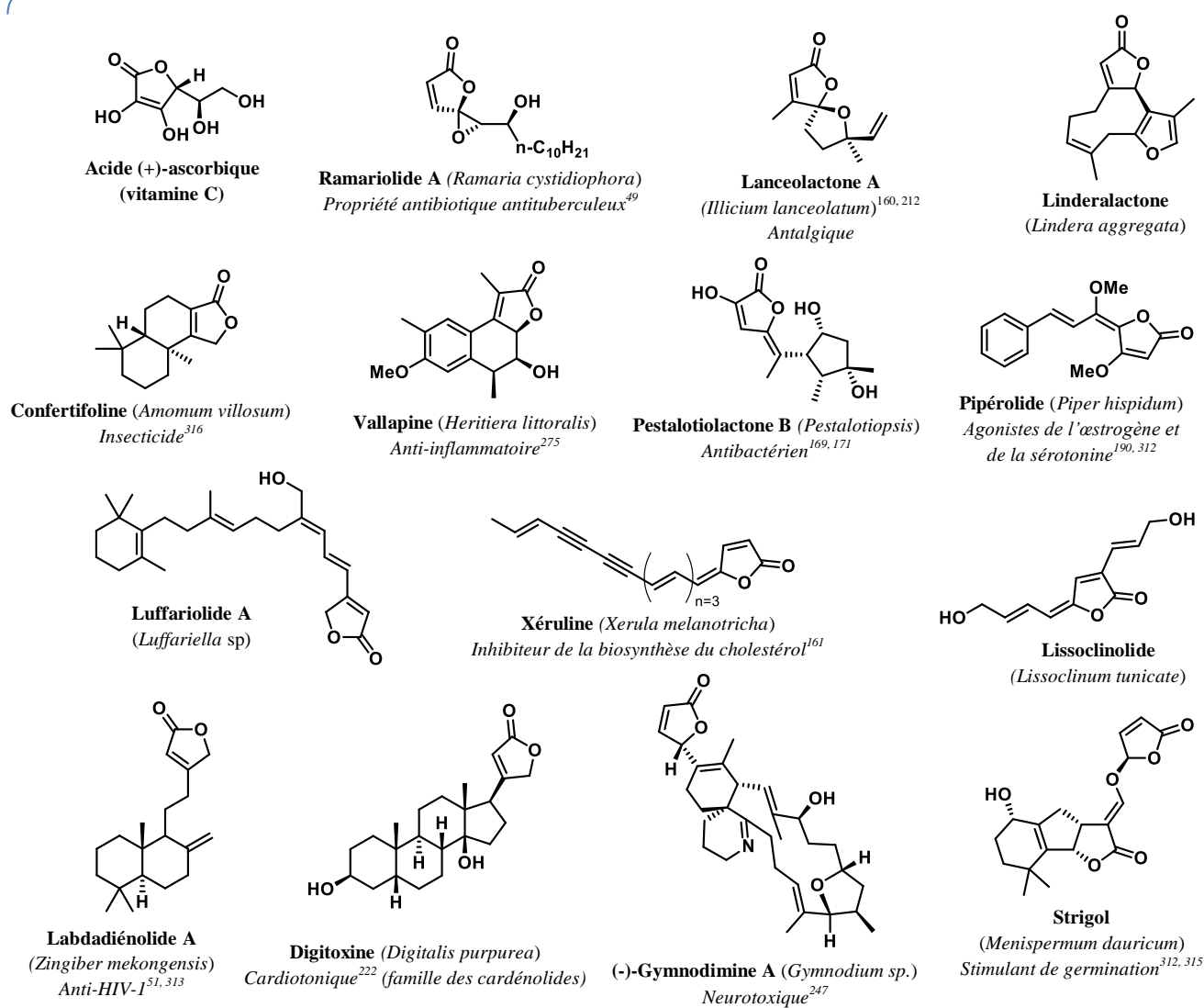
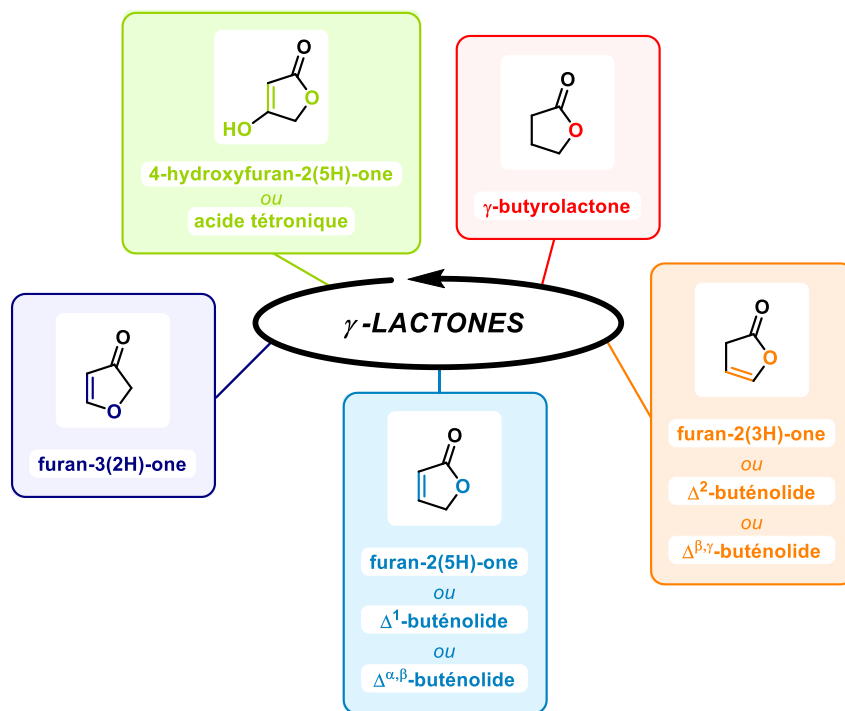


Figure 1 – Nomenclature des γ-lactones et panorama de molécules naturelles comportant le motif « buténolide ».

2.2.1 Fonctionnalisation d'un buténolide commercial ou d'un équivalent masqué

2.2.1.1 Addition nucléophile d'un 2-oxyfurane polysubstitué sur un électrophile en présence d'un acide de Lewis

La stratégie la plus évidente revient à utiliser un buténolide commercial, puis de le fonctionnaliser pour aboutir à la molécule cible. Pour cela, il est possible d'utiliser soit un « vrai » buténolide, soit un 2-oxyfurane, qui est, en réalité, un buténolide caché²⁷⁴ : en effet, les 2-oxyfuranes et les buténolides sont les deux formes tautomériques d'une même molécule. L'équilibre tautomérique s'établit préférentiellement en milieu basique.

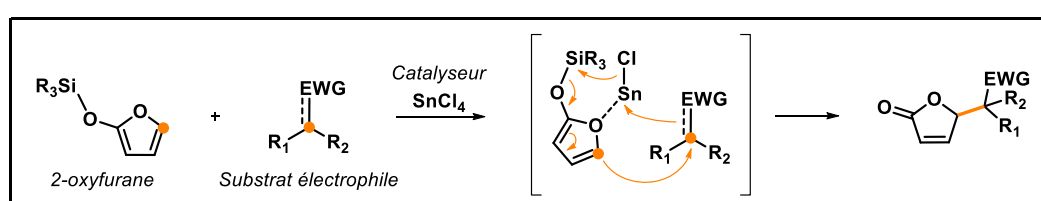


Schéma 10 – Schéma général d'addition nucléophile d'un 2-oxyfurane catalysée par un acide de Lewis comme SnCl_4 .³⁹

Pour ce type de stratégie de synthèse, la forme 2-oxyfurane est protégée par un groupement alkyle, silyle ou acétyle. Par catalyse par un acide de Lewis, de Brønsted (par exemple, l'APTS ou $\text{Tf}_2\text{CHCH}_2\text{CHTf}_2$ ^{268, 310}) ou des dérivés fluorés⁹⁶, le 2-oxyfurane peut s'additionner sur un substrat électrophile. Quelques exemples de catalyses hétérogènes sont également décrits dans la littérature.⁹² Dans certains cas, le 2-oxyfurane peut être généré *in-situ* à partir de substrats approchants.⁹⁹ Mécanistiquement parlant, la réaction est initiée par la délocalisation d'un doublet non-liant porté par l'oxygène en position 2 du furane. Grâce au système conjugué du furane, cela permet la formation d'une liaison C-C en position 4 du furane (Schéma 10). Plusieurs molécules naturelles ont pu être synthétisées grâce à cette stratégie (Schéma 11), notamment les nostoclidés I (**51**) et II (**52**)²⁶ (extraits des cyanobactéries *Nostoc* sp.), les goniobuténolides A (**55**) et B (**56**)^{149, 203, 251, 252} (extraits des feuilles de *Goniothalamus giganteus*, un arbre que l'on retrouve en Asie), l'eldanolide (phéromone sexuelle de l'insecte *Eldana saccharina*)¹²⁹ ou encore la freelingnite (métabolite de la plante *Eremophila freelingii*, endémique d'Australie).¹³⁰

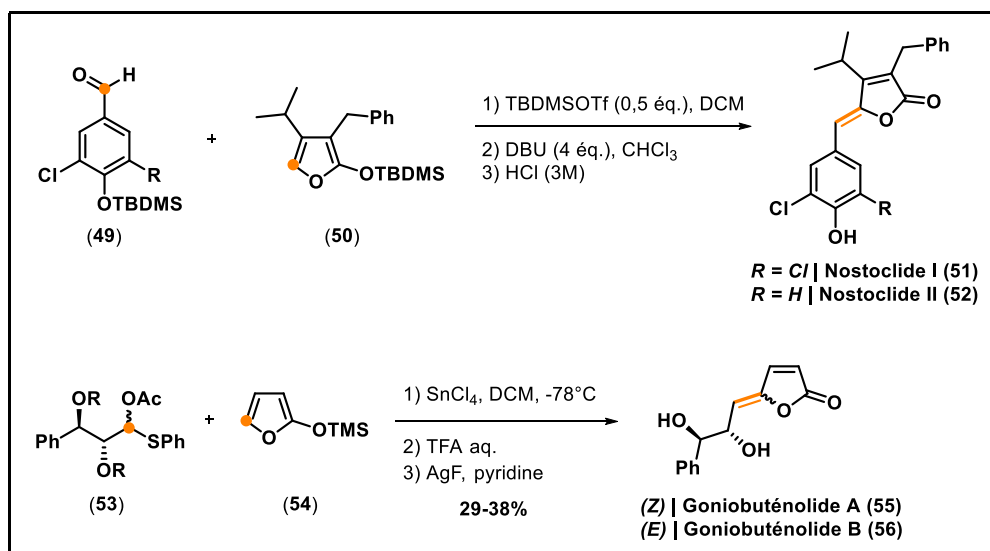


Schéma 11 – Synthèses totales des nostoclides I (**51**) et II (**52**)²⁶ et des goniobuténolides A (**55**) et B (**56**)¹⁴⁹ par addition nucléophile d'un motif 2-oxofurane sur un substrat électrophile par catalyse acide (resp. de Brønsted et de Lewis).

Parmi les nombreux substrats électrophiles impliqués dans cette voie de synthèse, on retrouve des carbonyles (aldéhydes, cétones ou (a)cétals)^{26, 203} (*addition 1,2* ou *couplage [vinylique] de Mukaiyama-Aldol*), des amides,⁴⁸ des imines ou base de Schiff⁴⁷ (*couplage [vinylique] de Mukaiyama-Mannich*), des halogénures d'acyle²⁵³ (*réaction de Friedel-et-Crafts*), des accepteurs de Michael^{96, 116} (*addition 1,4* ou *couplage vinylique de Mukaiyama-Michael*) et enfin, plus anecdotiquement des iodosobenzènes.²⁰¹ En réalité, la présence d'un substituant inductif attracteur -I (ou bon groupe partant) suffit pour que la réaction puisse se produire. Ainsi, les substrats classiques des substitutions nucléophiles sont également pertinents dans cette voie de synthèse, comme les substrats halogénés,^{129, 130} hydroxylés ou acétylés.^{132, 149} La revue rédigée par X. Jusseau *et al.* en 2014 compile de manière exhaustive cette approche.¹³⁴ Il est à noter que dans le cas d'une addition 1,4 de Michael du furane sur des dérivés de type benzoquinone, l'adduit de Michael obtenu, instable, se réarrange spontanément pour former une butyrolactone,³³ ouvrant ainsi la voie à l'obtention de butyrolactones naturelles, comme : la kalafungine, un antibiotique extrait de *Streptomyces tanashiensis*³⁶ ; les griseusines A et B, des antibiotiques extraits de *Streptomyces griseus*³⁵ ou encore les juglomycines A et B³⁴, extraits de *Streptomyces* sp. (Schéma 12).

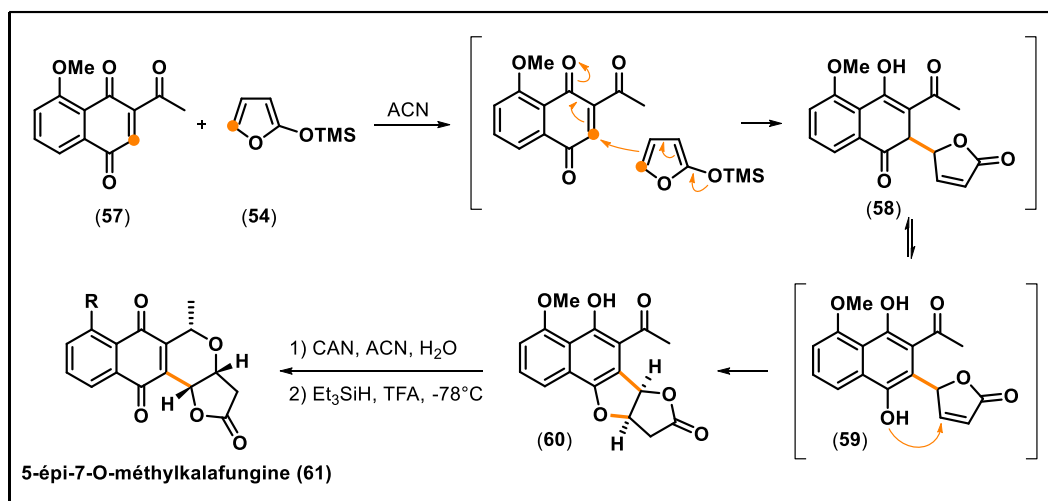


Schéma 12 – Synthèse d'un épimère de la kalafungine par addition de Michael d'un 2-oxyfurane sur une benzoquinone, suivi d'un réarrangement intramoléculaire en butyrolactone.³⁶

Aucune généralisation n'a pas pu être établie quant aux conditions expérimentales à appliquer : elles restent propres à chaque substrat. Cependant, on remarque une certaine récurrence parmi les acides de Lewis les plus performants : $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, SnCl_4 , TiCl_4 , ZnCl_2 . Quelques exemples sont reportés dans le Tableau 1.

<u>Entrées</u>	<u>Substrats</u>	<u>2-oxyfurane</u>	<u>Produit</u>	<u>Acide de Lewis</u>	<u>Rdt</u>	<u>Réf.</u>
1.				$\text{TiCl}_4 - 0,75 \text{ éq.}$	60 %	253
2.				$\text{SnCl}_4 - 0,2 \text{ éq.}$	96 %	50

Tableau 1 – Exemples de fonctionnalisation de 2-oxyfuranes.

Cette stratégie présente l'inconvénient d'être intrinsèquement non-stéréosélective. Plusieurs études mécanistiques ont été effectuées pour expliquer les ratios de diastéréosélectivités observés, notamment par la modélisation de la structure des états de transition, mais aucune conclusion générale n'a pu être émise, car l'état de transition semble dépendre de la nature de l'électrophile mis en jeu.^{134, 135, 231} De nombreux développements ont été réalisés pour améliorer cet aspect de cette stratégie de synthèse. Les premiers résultats concrets sont apparus en 1998 avec le premier exemple de couplage vinylique de Mukaiyama-Aldol asymétrique publié par B. Figadère *et al.*,²⁶⁷ ouvrant ainsi la voie à la synthèse de produits naturels optiquement actifs comme la (+)-muricatatine²⁶⁷ et l'iso-cladospolide B.⁹³ Depuis, il apparaît que la technique majoritairement appliquée dans le cas des réactions

énantiosélectives consiste à utiliser un catalyseur chiral (*i. e.* un acide de Lewis avec un ligand chiral) ou une copule chirale, même si cela augmente le nombre d'étape de synthèse. Le type de copules chirales typiquement utilisées sont les oxazolidinones,^{80, 212} les groupements phénylesulfonyles⁴⁶ ou plus anecdotiquement, des complexes carbènes tungstiques.¹⁸ Dans le cas précis des additions de Michael énantiosélectives sur des crotonaldéhydes, il faut noter que la catalyse par acide de Lewis présente certaines limitations, notamment la proportion d'additions 1,2 reste conséquente. Pour obtenir une meilleure sélectivité, des essais d'organocatalyse ont été menés. Il s'est avéré que le passage par un état de transition de type iminium favorise particulièrement les additions 1,4. À ce titre, les imidazolidinones de MacMillan,^{40,122} ainsi que les dérivés de pyrrolidines⁵⁸ sont particulièrement employés pour la synthèse de produits naturels. Le Schéma 13 représente l'intégration de cette réactivité dans la synthèse totale de l'acide (+)-spiculisporique (**65**), produit par *Penicillium spiculisporum*⁴⁰, ainsi que celle d'une toxine, la pectenotoxine-2 (**70**), produite par les algues *Dinophysis*.¹⁴²

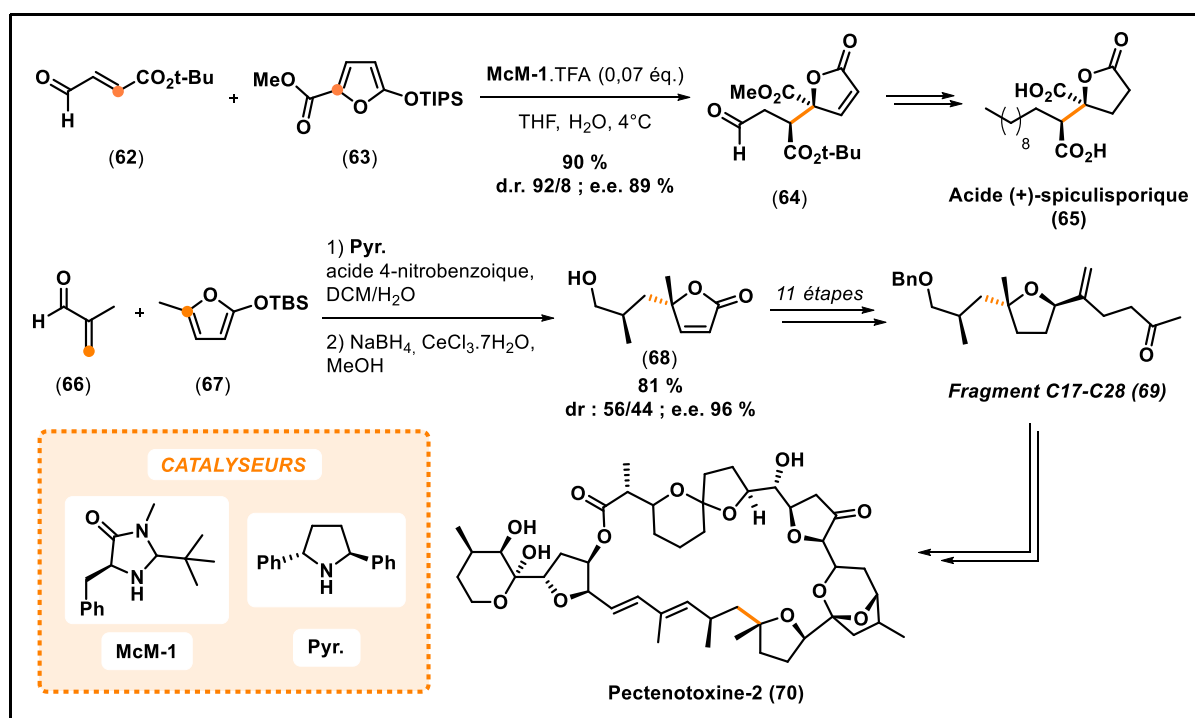


Schéma 13 – Synthèse énantiosélective de l'acide (+)-spiculisporique (**65**)⁴⁰ et du fragment C17-C28 de la pectenotoxine-2 (**70**).¹⁴²

N. B. : « Modification de la régiosélectivité »

Il est à noter que la présence d'eau dans le milieu réactionnel peut radicalement modifier la régiosélectivité de l'attaque nucléophile du furane. Ainsi, comme cela a été montré par J. Mlynarski en 2012, la réaction de Mukaiyama-Aldol, catalysée par un acide de Lewis, peut également engendrer une fonctionnalisation du furane/buténoïde en α du carbonyle (cf Tableau 2).³⁰⁴ De même, dans le cas d'une catalyse au palladium¹⁸⁰ ou à l'iridium,⁵⁴ spontanément, la fonctionnalisation s'effectue en α du carbonyle.

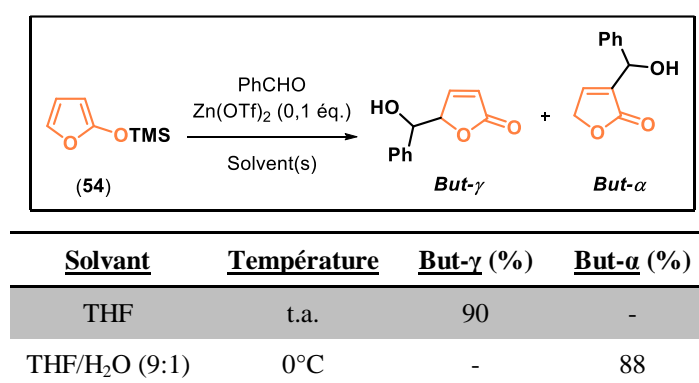


Tableau 2 – Influence des traces d'eau dans le milieu réactionnel sur la régiosélectivité de l'addition nucléophile du 2-oxyfurane sur le benzaldéhyde.³⁰⁴

2.2.1.2 Fonctionnalisation de buténoïdes

Quand les buténoïdes ne sont pas présents sous forme d'oxyfuranes, d'autres stratégies de fonctionnalisation ont été employées, allant de la « simple » addition de Michael de l'anion buténoïde sur un substrat électrophile à des réactions plus complexes, comme la réaction de Wittig, d'Horner-Wadsworth-Emmons, de Friedel-et-Crafts ou encore des couplages organo-métalliques (tous nécessitant une étape préalable d'halogénéation du substrat).

Addition de Michael/substitution par un anion buténolide :

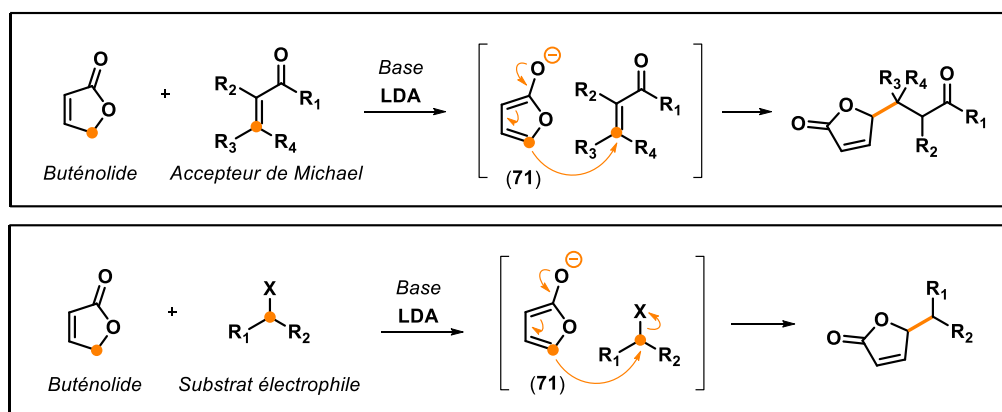


Schéma 14 – Schéma général d'addition nucléophile d'un buténolide sur un accepteur Michael ou un substrat électrophile sous l'action d'une base comme le LDA.

En présence d'une base minérale (par exemple, KOH^{12} , $\text{K}_2\text{CO}_3^{318}$, NaH , Na , $\text{KF}^{143, 144}$) ou organique (comme le DBU^{145}), mais plus généralement d'une base forte lithiée, comme le $\text{LDA}^{39, 159}$, le buténolide peut être déprotoné en position γ . L'anion ainsi formé (71) peut ensuite réaliser une addition 1,4 sur un accepteur de Michael, comme un autre buténolide, un ester α,β -insaturé, un halogénure de vinyle, une base de Schiff etc La même réactivité est observée en présence d'un halogénure d'alkyle ou d'un groupement acétyle : dans ce cas, une simple réaction de substitution nucléophile se produit.³¹⁷ Cette réactivité est illustrée sur le Schéma 14. C'est ainsi que le paniculide A (76) (buténolide naturel extrait de la chirette verte – *Andrographis paniculata* – présente en Inde et au Sri Lanka) a pu être synthétisé par F. Kido en 1982.¹⁴⁴ La synthèse totale de ce composé est présentée sur le Schéma 15.

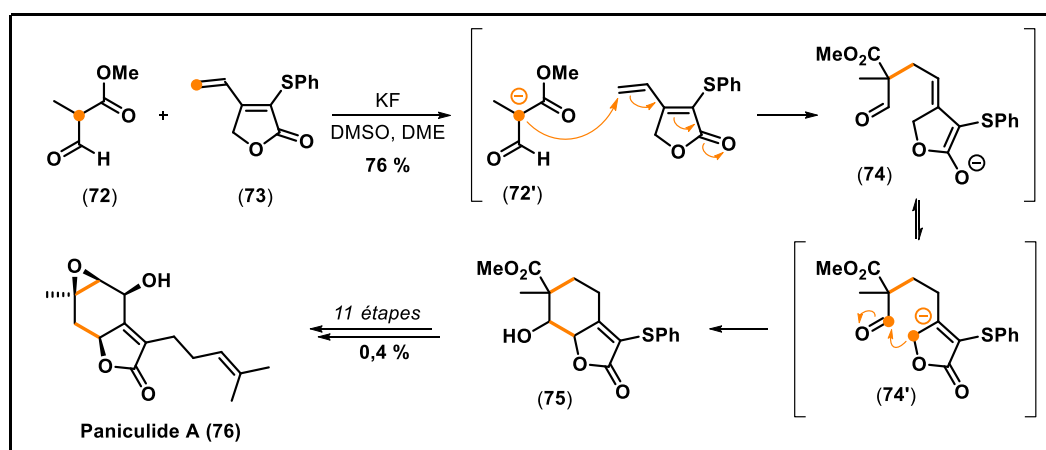


Schéma 15 – Synthèse totale du paniculide A (76) par F. Kido.¹⁴⁴

Par extension, il a été montré que la stéréosélectivité de la réaction peut être contrôlée par la présence d'un catalyseur chiral, comme les exemples présentés sur le Schéma 16.

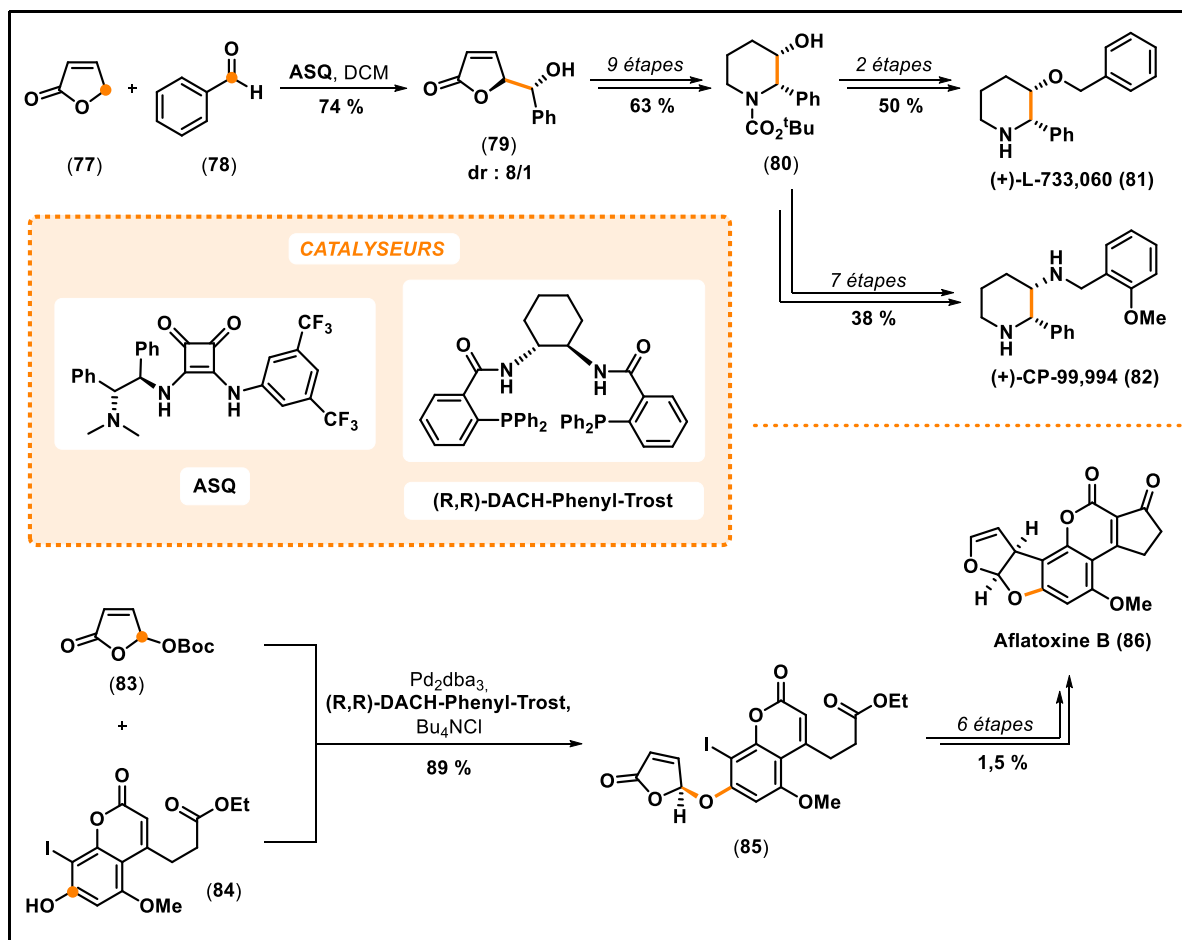


Schéma 16 – Synthèse énantiosélective de deux antagonistes du récepteur des neurokinines [(+)-L-733,060 (**81**) et (+)-CP-99,994 (**82**)]²¹⁹ et de l'aflatoxine B (**86**).²⁸⁰

Enfin, au cours des recherches, il est apparu que la présence de substituants soufrés en position γ sur le buténolide permettait de mieux contrôler la stéréosélectivité de la réaction et de travailler en conditions plus douces. Dans la littérature, on trouve quelques exemples avec des thioéthers ou des dérivés de tosyyles.^{13, 265}

N. B. : « Fonctionnalisation en α »

Dans tous les exemples présentés précédemment, le motif « buténolide » était fonctionnalisé en position γ spontanément, sans action particulière de la part de l'expérimentateur. A la fin des années 1970, il a donc été question de développer une méthodologie tout aussi efficace permettant d'avoir accès à des buténolides fonctionnalisés en position α . Quelques équipes ont pensé reprendre la stratégie des substituants soufrés pour

orienter la fonctionnalisation des buténolides en position α ²⁹⁴ : de nombreuses difficultés sont apparues, comme la polyaddition et le nombre restreint de substrats compatibles. Par conséquent, cette stratégie n'a pas été employée, à ce jour, pour la synthèse de produits naturels.

En revanche, il a été remarqué qu'il est possible de fonctionnaliser efficacement un buténolide en position α , à condition de passer par un intermédiaire de type adduit de Diels-Alder (le buténolide (I) ayant joué le rôle de diénoophile)⁶⁰. Le buténolide fonctionnalisé (V) est ensuite obtenu par *rétro*-Diels-Alder (Schéma 17).

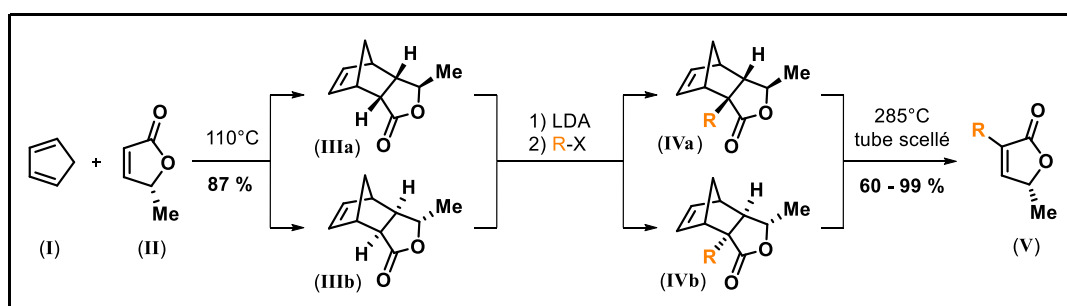


Schéma 17 – Alkylation en α sur adduit de Diels-Alder.⁶⁰

Bromation du buténolide :

Afin de préparer le buténolide à une fonctionnalisation ultérieure, différentes équipes ont travaillé au développement d'une bromation efficace de ce substrat. L'étude de différents agents bromants a permis de montrer que l'utilisation de Br_2 produit une bromation spécifique en position β par rapport à la position γ ,²¹⁶ alors que l'utilisation du NBS dans le CCl_4 ³⁷ produit une bromation spécifique en position γ par rapport à la position β du buténolide.

Couplages après bromation :

Parmi la palette des couplages organométalliques à la disposition du chimiste organicien, le couplage de *Negishi* a été appliqué à des buténolides simples au cours des années 1980, notamment pour la synthèse de mokupalides (**89**)¹⁵¹ (molécules isoprénoïdes issues d'éponges marines),³²⁰ ainsi que le couplage de *Stille*²³⁸, notamment dans le cadre de la synthèse du cléviolide et du (*Z*)- et (*E*)-scobinolide.¹¹⁹ Auparavant, d'autres réactions ont été étudiées, comme : la réaction de *Corey-House* (grâce à un organocuprate lithié, appelé aussi *réactif de Gilman*),²¹⁶ qui a permis la synthèse d'un précurseur de la streptolutine (**92**), elle-même précurseur de l'antibiotique 593A (ou cyclostreptolutine (**93**)), isolé de la souche

*Streptomyces griseolutus*⁴³ ; la condensation de Reformatsky dans le cadre de la synthèse de l'anthéridiol, une hormone fongique, extraite de *Achlya bisexualis*¹⁸⁹ ; la réaction de Wittig pour la synthèse de dérivés de la vitamine A²¹ ; la réaction d'*Horner-Wadsworth-Emmons*, notamment dans le cas de la synthèse du manoalide, bloqueur des canaux calciques naturel, issu d'éponges marines⁸ ou de l'acide marasmique (**96**)²², molécule naturelle possédant des propriétés antibiotiques, isolée de champignons basidiomycètes.¹⁴¹ Parfois, de simples substitutions nucléophiles en milieu basique sont appliquées sur le carbone bromé.³⁷ Dans tous les cas, l'objectif des équipes de recherches étaient de synthétiser des buténolides fonctionnalisés par de longues chaînes alkyles, plus ou moins insaturées, d'origine terpénique (Schéma 18).

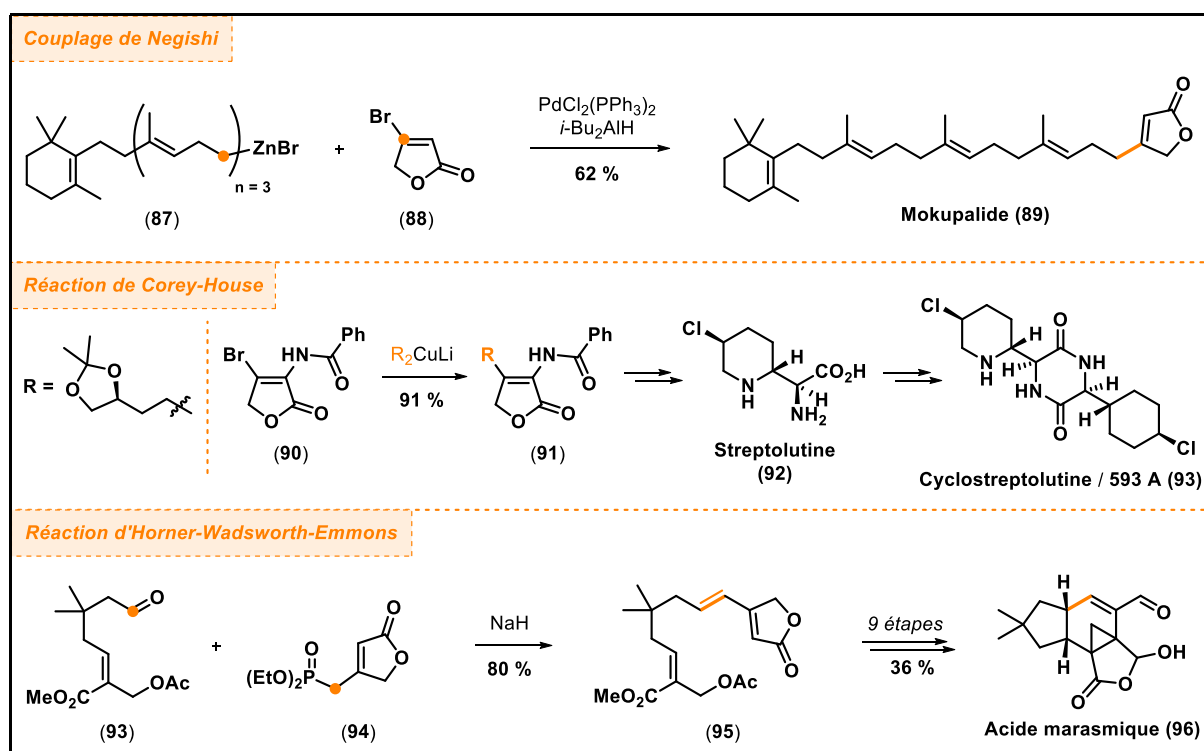


Schéma 18 – Exemples de couplages de buténolides dans le cadre de la synthèse totale du mokupalide (**89**),¹⁵¹ d'un précurseur de la streptolutine (**92**)²¹⁶ et de l'acide (\pm)-marasmique (**96**).²²

2.2.2 Oxydation d'un furane préalablement substitué

De manière similaire à ce qui a été présenté dans la section précédente, il est possible de synthétiser des buténolides polysubstitués à partir de furanes (*i. e.* des buténolides masqués). Dans ce cas, les furanes doivent être fonctionnalisés au préalable, principalement grâce à des lithiens ou des magnésiens : les méthodes de fonctionnalisation sont nombreuses

et sortent du cadre de ce manuscrit, nous ne les développerons donc pas ici. Notre objectif est plutôt de s'attarder sur les différents protocoles d'oxydation de furanes mis au point jusqu'à présent.

Deux types d'oxydations sont à distinguer : la première consiste à oxyder le furane et à former la fonction carbonyle sans modifier les autres substituants présents ; la deuxième revient à ajouter un groupement hydroxyle supplémentaire en position γ . Dans tous les cas, l'hétéroatome en position 2 sur le furane joue le rôle de groupe directeur lors de l'oxydation : on observe une forte régiosélectivité. L'agent oxydant choisi revêt également une grande importance, car il influe grandement sur la direction prise lors de l'oxydation, comme illustré par la synthèse de la digitoxine⁸⁹ (Schéma 19).

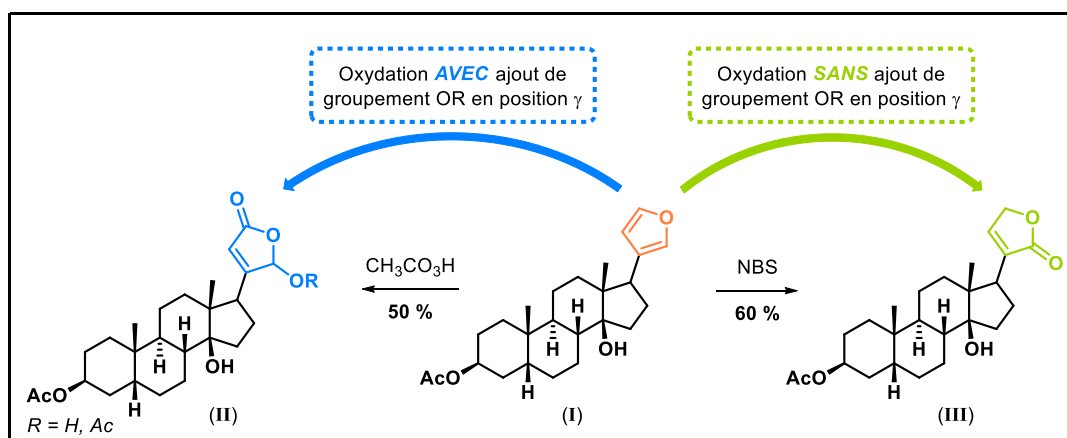


Schéma 19 – Influence de l'oxydant sur le buténolide synthétisé.

2.2.2.1 Oxydation sans ajout de groupements OR en γ

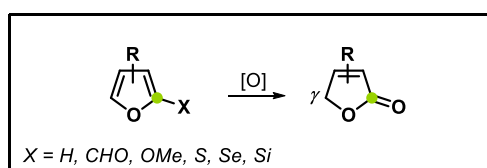


Schéma 20 – Schéma général d'oxydation d'un furane sans ajout d'un groupement OR en position γ .

L'oxydation peut être réalisée à température ambiante par un peracide, H₂O₂,¹⁵ NBS dans le dioxane,⁸⁹ HgCl₂ en milieu acide,^{75, 76} ou encore une simple méthanolyse en milieu acide,²¹⁵ et ceci suivant l'hétéroatome X choisi comme groupe directeur (Schéma 20). Dans le cas des peracides, l'acide peracétique est le réactif de choix,¹⁰⁴ car le *m*-CPBA s'est révélé inefficace sur certains substrats.¹⁷⁷ Le protocole faisant appel à l'eau oxygénée présente

l'avantage de travailler en conditions douces, mais dans le cas des composés séléniés, il se poursuit en cascade avec différents réarrangements [2,3]-sigmatropiques qui peuvent intervenir (Schéma 21).²²⁷ On peut également citer quelques essais anecdotiques de méthodologie d'oxydation par photochimie.²⁵⁹

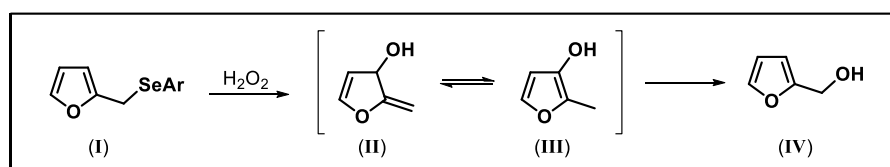


Schéma 21 – Réarrangement [2,3]-sigmatropique possible pour les composés furanosélinés.

Au final, l'utilisation de ces oxydations sans ajout de groupement OR en position γ semble limitée, car peu exploitée lors de synthèses totales de produits naturels. Les quelques exemples probants ont été réalisés dans les années 1980 et concernent la synthèse de l'isodriménine (**98**)⁷⁶, isolée à partir de plantes d'Amérique du Sud, du genre *Drimys* sp.¹⁰ et du colorata-4(13),8-diénoïde (**100**)⁷⁵, isolé à partir de *Pseudowintera colorata*, un arbuste de Nouvelle-Zélande⁶¹ (Schéma 22).

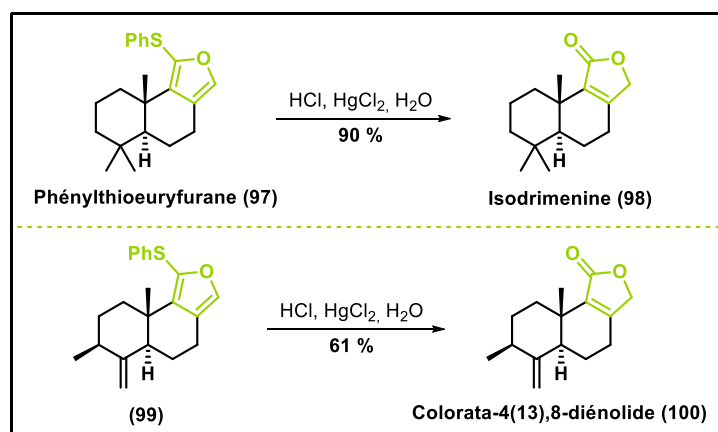


Schéma 22 – Synthèses totales de l'isodriménine et du colorata-4(13),8-diénoïde par oxydation d'un furane.^{75, 76}

2.2.2.2 Oxydation avec ajout de groupements OR en γ

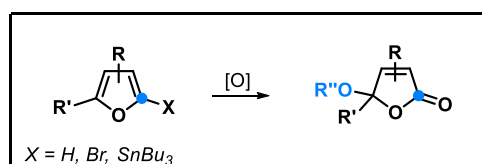


Schéma 23 – Schéma général d'oxydation d'un furane avec ajout d'un groupement OR en position γ .

Dans le cadre de la synthèse de buténolides par oxydation d'un furane avec ajout d'un groupement OR en position γ (Schéma 23), les réactifs d'oxydation classiques, comme les peracides (l'acide peracétique⁸⁹ ou le *m*-CPBA¹⁰⁵), le réactif de Jones ($\text{CrO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$)¹⁷⁷ ou le réactif de Corey (PCC)²²⁹ peuvent être utilisés en première intention avec de bons rendements (93 % pour le réactif de Jones et 60-75 % pour le réactif de Corey, respectivement).

Au cours des années 1980, au vu de l'émergence des intermédiaires organostanniques en méthodologie de synthèse organique, l'équipe de Yamada a souhaité étendre cette stratégie aux composés organostanniques. Leur travail a permis de mettre en évidence qu'un tri-*n*-butylstannylfurane peut être acétylé en position γ par le $\text{Pb}(\text{OAc})_4$.³⁰⁸ Cet exemple reste unique à ce jour. Enfin, de rares essais d'oxydation par électrochimie en présence d'un solvant protique ont été réalisés par Yamasita *et al.* dans les années 1970, sans que cette approche soit réellement approfondie par la suite.²⁷⁹

Une technique particulièrement pertinente pour oxyder un furane en buténolide lors de la synthèse totale de produits naturels est la photo-oxygénation (Schéma 24) : elle implique la formation *in-situ* de dioxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Le principal avantage de cette démarche est un meilleur contrôle de la régiosélectivité.

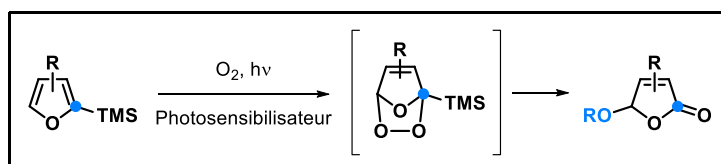


Schéma 24 – Schéma général d'oxydation d'un furane par photo-oxygénation.

Cette approche s'est révélée efficace, en particulier, lors de la synthèse de buténolides substitués par de longues chaînes insaturées, pouvant elles aussi réagir lors de l'étape finale d'oxydation. En effet, l'addition-1,4 de $^1\text{O}_2$ formant l'intermédiaire endopéroxyde sur le furane est plus rapide que l'oxydation des insaturations présentes sur les chaînes latérales.¹⁴⁰ Plusieurs études ont été menées pour optimiser le photosensibilisateur employé ou le solvant de réaction.¹⁰⁶ Parmi les différents photosensibilisateurs étudiés en synthèse produits naturels (Schéma 25), on peut citer : le bleu de méthylène,¹⁰⁹ la tétraphénylporphyrine,¹⁴⁰ le rose Bengale, qui a permis la synthèse totale du manoalide ou du séco-manoalide (**105**)¹³⁹ (deux molécules isolées à partir de l'éponge marine *Luffariella variabilis*)⁷⁷ ou encore l'éosine,

employé lors de la synthèse totale du valdiviolide (**102**) (isolé à partir de *Drimys winteri*, une plante présente au Chili et en Argentine).¹⁶⁶

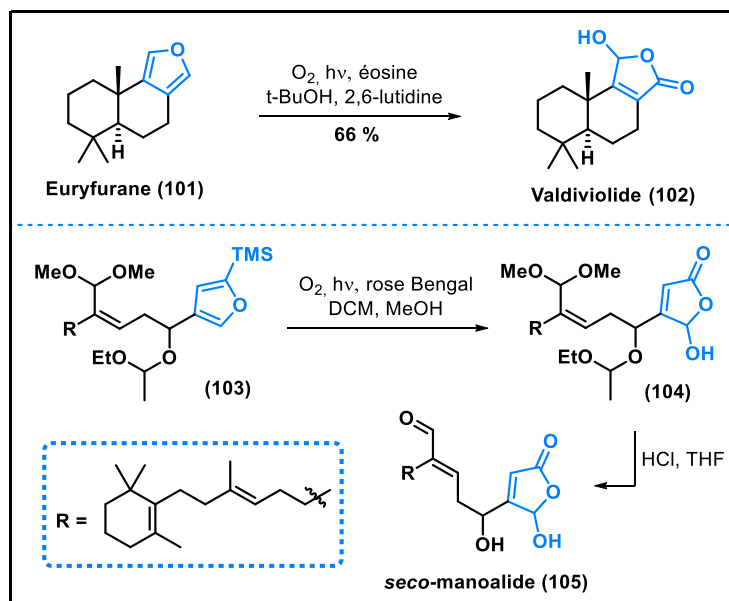


Schéma 25 – Synthèses totales du valdiviolide (**102**)¹⁶⁶ et du seco-manoalide (**105**)¹³⁹ par photo-oxygénation.

2.2.3 Synthèse de buténolides à partir d'anhydrides cycliques (cas particulier de l'anhydride maléique)

2.2.3.1 Passage par un intermédiaire « adduit de Diels-Alder »

À la fin des années 1970, une attention particulière a été portée sur les anhydrides cycliques comme substrats de départ pour la synthèse de buténolides naturels simples, du fait de leur grande proximité structurale. L'anhydride maléique, en particulier, s'est révélé être un précurseur de choix depuis le constat de sa forte propension à former des adduits de Diels-Alder avec furanes et cyclopentadiènes ; ceci est très similaire à ce qui a été présenté sur la fonctionnalisation des buténolides (Schéma 17 – page 61). L'adduit ainsi formé peut ensuite être monosubstitué en position α , grâce à un lithien, ou mono-/disubstitué en position γ , grâce à un réactif de Grignard. Le buténolide final est ensuite obtenu en réalisant une étape de *rétro*-Diels-Alder (Schéma 26).

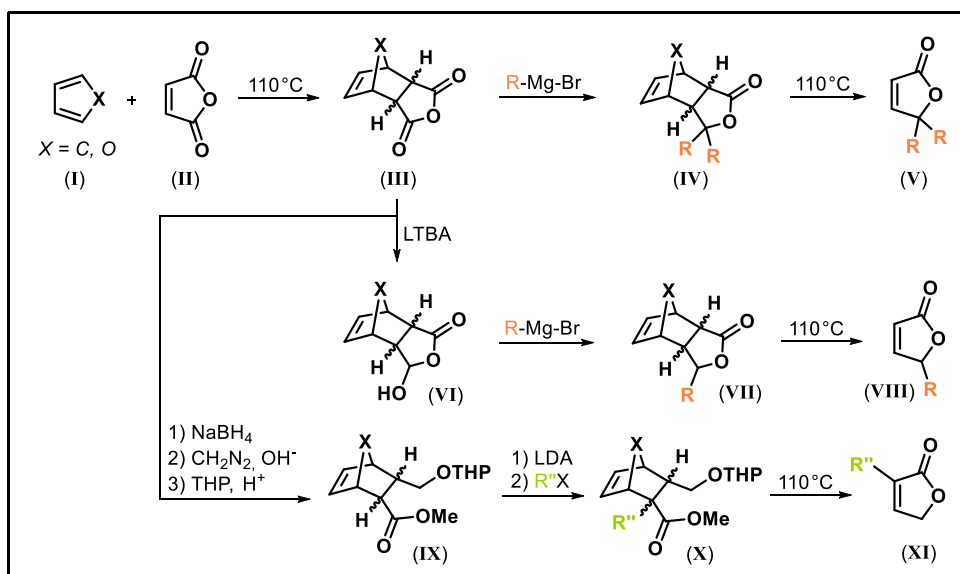


Schéma 26 – Schéma général de synthèse de buténolides à partir de l'anhydride maléique.^{45, 125}

2.2.3.2 Cas particulier de la synthèse de 4-ylidènebuténolide

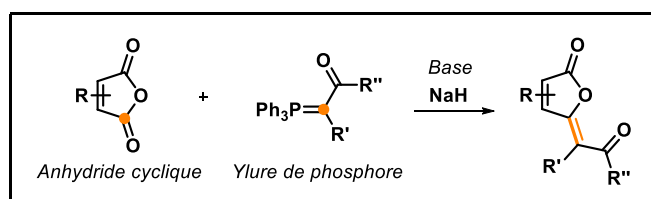


Schéma 27 – Schéma général de synthèse de 4-ylidènebuténolides par réaction de Wittig.

Dans le cas précis de la synthèse de 4-ylidènebuténolide, la fonctionnalisation de l'adduit de Diels-Alder peut être réalisée grâce à une simple réaction de Wittig. Cette étape permet la formation de la double liaison C=C entre le buténolide et un ylure précurseur de la chaîne alkyle désirée (Schéma 27).¹⁸⁵ Cette stratégie a permis la synthèse totale de produits naturels simples de la famille des 4-ylidènebuténolides (Schéma 28), comme la freelingyne (**109**) (*Eremophila freelingii*).¹²⁶

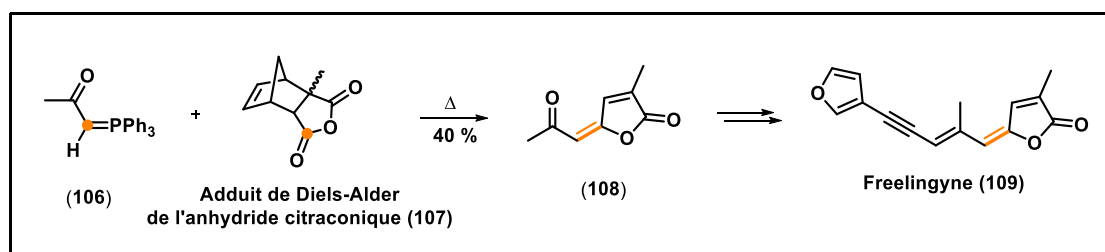


Schéma 28 – Synthèse de la freelingyne (**109**) faisant intervenir une réaction de Wittig sur un adduit de Diels-Alder.

2.2.4 Cyclisation intramoléculaire de dérivés carbonylés

Jusqu'à présent, les stratégies de synthèse de buténolides présentées dans ce manuscrit reviennent à fonctionnaliser des hétérocycles pré-formés. Dans cette partie, nous allons maintenant nous intéresser aux méthodes de cyclisations intramoléculaires de chaînes linéaires. Cette voie synthétique, intuitive, a été l'une des premières développées et à ce jour, on compte une multitude de protocoles expérimentaux cherchant à induire ce type de cyclisation intramoléculaire. Cette profusion de conditions opératoires est révélatrice des limites de cette stratégie : les rendements dépassent rarement les 40%, ils varient drastiquement suivant le substrat étudié et peu de complexité structurale a pu être introduite grâce à cette stratégie. Par souci de concision, seules les conditions expérimentales ayant abouti à la synthèse totale de produits naturels seront détaillées dans cette partie. Ainsi, au total, on dénombre six types de cyclisation différents, rassemblés dans le Tableau 3.

Entrées	Substrats initiaux	Réactivités
A		
B		
C		
D		
E		
F		

Tableau 3 – Récapitulatif des 6 voies de cyclisation intramoléculaire possibles.

2.2.4.1 Voie A

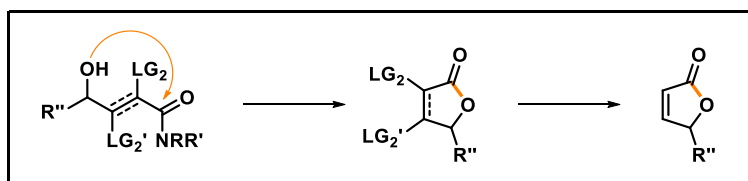


Schéma 29 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie A.

Dans un premier temps, la cyclisation peut intervenir par lactonisation (Schéma 29). Le groupement hydroxyle réalisant la cyclisation peut tout aussi bien être généré par réduction d'un carbonyle, comme c'est le cas dans la synthèse de l'éremophilénolide (**112**)²²⁸ (un sesquiterpénoïde isolé de la plante *Petasites officinalis* Moench, répandue en zone humide au sein de la flore française), ou par oxydation d'une chaîne alkyle, comme cela a été montré pour la synthèse de la digitoxigénine (**115**) (un cardiotonique toxique extrait de *Digitalis purpurea* et de *Digitalis lanata*).⁷⁰ Les excellents rendements obtenus au cours de ces deux synthèses font figures d'exception, car cette méthode n'a pas été réemployée, par la suite, pour d'autres synthèses totales (Schéma 30).

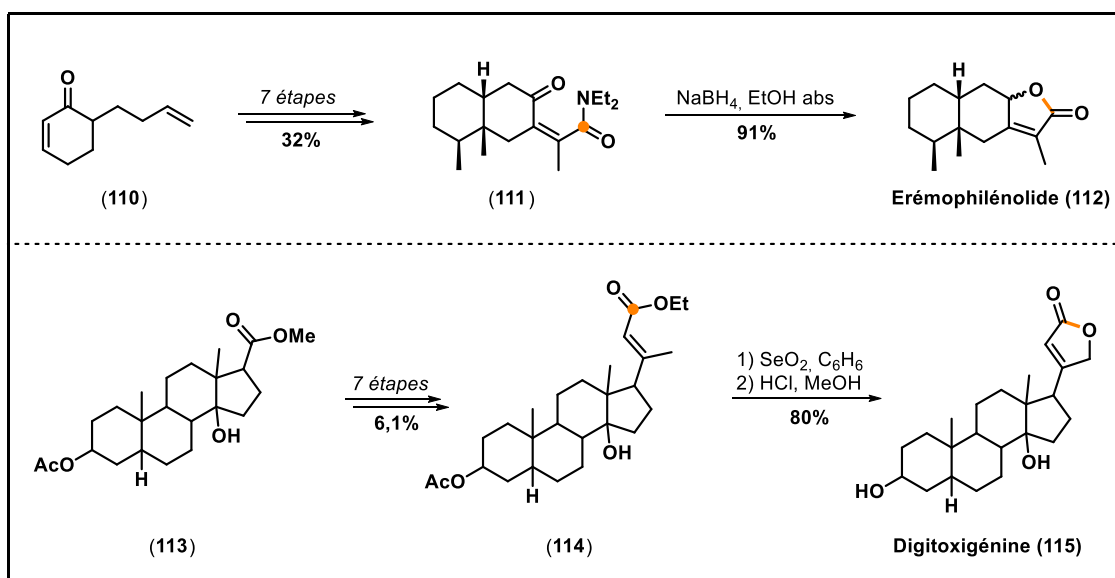


Schéma 30 – Synthèses totales de l'éremophilénolide (**112**) par S. Pennanen²²⁸ et de la digitoxigénine (**115**) par N. Danieli.⁷⁰

2.2.4.2 Voie B

Cyclisation :

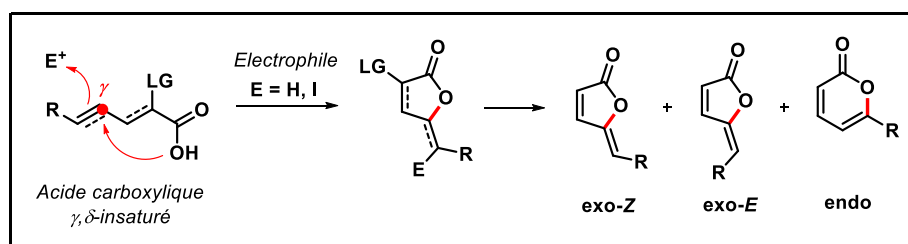


Schéma 31 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie B.

Les méthodes les plus récentes et les plus prometteuses de cyclisation permettant la synthèse de 4-ylidènebuténolide sont basées sur les réactivités présentées dans la voie B du Tableau 3 (Schéma 31). Pour former le buténolide, la fonction carboxylate cyclise sur la position γ du carboxyle en faisant principalement appel à un électrophile. En effet, même si ce type de réaction de cyclisation peut intervenir spontanément, en pratique, une activation est nécessaire, que ce soit par un agent protique, un acide de Lewis ou un sel de métal lourd, comme Hg, Ag, Pd ou Rh.

Plus précisément, trois formes cycliques peuvent être obtenues : le buténolide *exo*-(Z) ou *exo*-(E) ou l' α -pyrone. Généralement, la forme buténolide est produite majoritairement.²⁰⁵ Il est cependant à noter que le ratio entre la forme *exo* et *endo* dépend grandement des substituants qui décorent le substrat de départ, du solvant, ainsi que de l'agent cyclisant utilisé. Plusieurs études ont été menées pour tenter de comprendre les mécanismes mis en jeu pour mettre au point des conditions optimales en fonction du produit recherché. Malheureusement, aucune règle générale n'a pu être établie jusqu'à présent.^{132, 178} Les quelques exemples en synthèse totale de produits naturels que nous allons présenter sont classés en fonction du type de catalyse requis.

- **Catalyse non-métallique**

Les premières tentatives consistèrent à utiliser des conditions acides et de hautes températures (généralement, supérieures à 150°C) pour déclencher la cyclisation. On peut citer en exemple la synthèse de la cornicularlactone (**119**), un dérivé réduit des acides pulviniques (extrait du lichen *Cetraria vulpina*)²⁵⁷, requérant un chauffage à 150°C pendant 18h.²³⁵ Cette stratégie a également été employée au cours de la synthèse du

dihydromahubanolide (**122**),²⁷¹ extrait de petits arbustes asiatiques *Litsea japonica* et *Lindera obtusiloba*. Notons que dans ce cas précis, le mécanisme est celui d'une iodolactonisation (Schéma 32). Dans la plupart des cas, les réactions sont lentes ou nécessitent des conditions expérimentales drastiques, alors qu'on augmente peu la complexité structurale.²⁰⁵

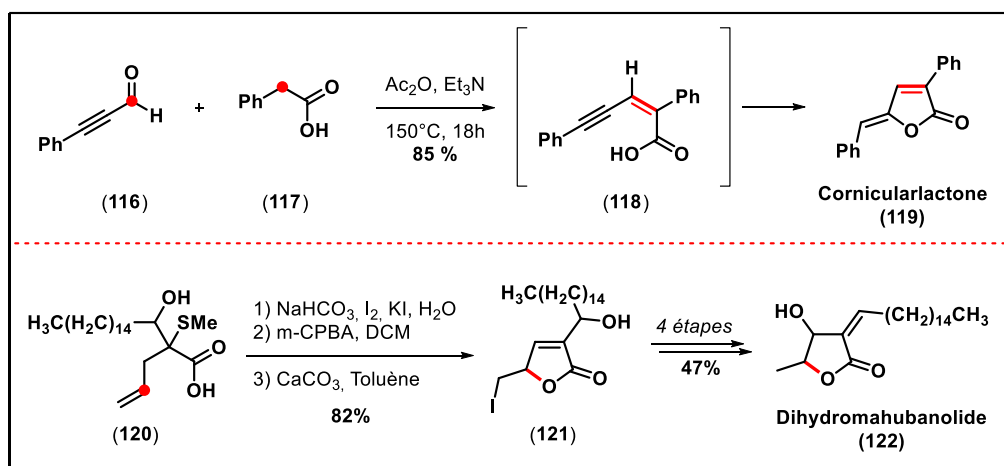


Schéma 32 – Synthèse totale de la cornicularlactone (**119**) par Y. Rao²³⁵ et du dihydromahubanolide (**122**) par K. Tanaka.²⁷¹

Face aux limites de la méthode précédente, des tentatives de cyclisation radicalaire ont été réalisées,^{29, 57} notamment pour la synthèse de spirobuténolides ou de buténolides polycycliques (Schéma 33). La cyclisation est réalisée grâce à Bu₃SnH/AIBN et est nécessairement suivie d'une étape d'oxydation (ex : le réactif de Jones) et/ou d'isomérisation, car la cyclisation radicalaire privilégie la formation d'une insaturation exocyclique.

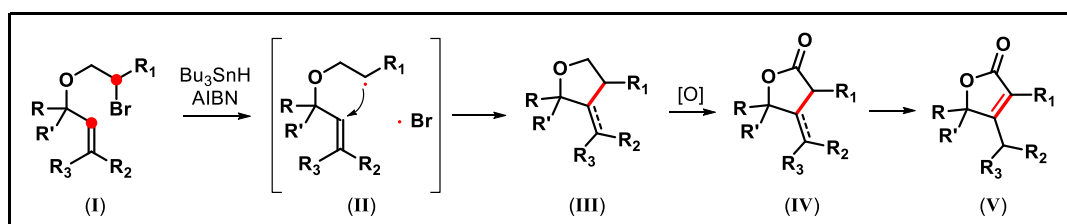


Schéma 33 – Schéma général de synthèse de buténolides par cyclisation radicalaire.

Parfois, l'étape d'isomérisation n'est pas nécessaire (Schéma 34), comme dans le cas de la synthèse de la lettucénine A (**126**), une lactone sesquiterpénique antifongique extraite des feuilles de pissenlit ou de la laitue *Lactuca sativa* var. *capitata*.¹⁹⁵ Quand elle est requise pour faire migrer l'insaturation de sa forme exocyclique à la forme endocyclique, l'étape d'isomérisation ne présente aucune généralité : elle peut nécessiter l'utilisation de base

comme le DBU^{202, 264} ou bien une catalyse en phase homogène (ex : RhCl₃/EtOH).^{9, 263} Parfois, un simple passage sur gel de silice suffit, comme cela est le cas pour la synthèse totale de l'andiro lactone (**131**)²⁵⁸, un spirobuténolide extrait de l'écorce du cèdre du Liban (*Cedrus Libanotica*).¹⁴

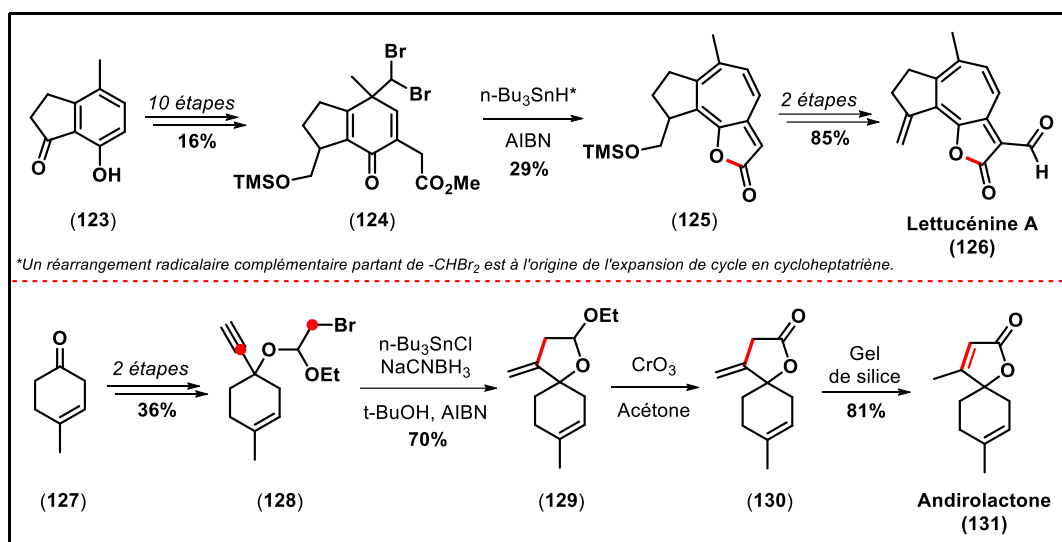


Schéma 34 – Synthèses totales de l'andiro lactone (**131**) par A. Srikrishna et de la lettucénine A (**126**) par K. Monde.

Malgré ces quelques exemples, la voie radicalaire s'est révélée trop délicate pour être développée au sein d'autres synthèses de produits naturels. D'où le choix de se tourner vers la catalyse organométallique.

- **Méthode récente métallo-catalysée**

L'utilisation de métaux comme catalyseur a permis d'augmenter la cinétique des réactions de cyclisation, de limiter le nombre de sous-produits et d'augmenter les rendements.²⁰⁵ En effet, la métallation de la fonction carboxylique permet d'activer l'insaturation et ainsi de favoriser la cyclisation (Schéma 35).

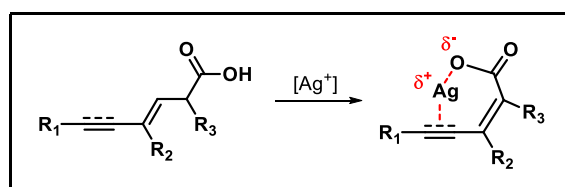


Schéma 35 – Schéma général de la cyclisation catalysée par les sels d'argent.¹⁹

Dans un premier temps, ce sont surtout les sels d'argent et de mercure qui ont été étudiés, car ils ne présentaient pas la même régiosélectivité en présence d'un même substrat. L'argent favorise plutôt l'attaque 5-*exo*-dig (**133**), alors que le mercure favorise plutôt l'attaque 6-*endo*-dig, formant ainsi préférentiellement l' α -pyrone (**134**). Cette observation empirique est illustrée par l'exemple de la synthèse de la cyanobactérine (**133**), un métabolite produit par la cyanobactérie *Syctonema hofmanni*, par T.-T. Jong¹³³ (Schéma 36).

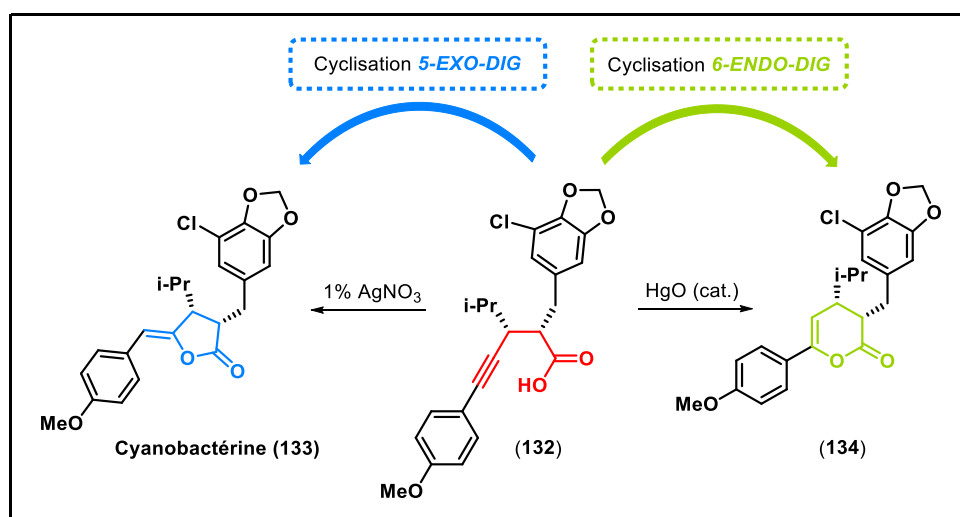


Schéma 36 – Influence du métal utilisé sur la régiosélectivité de cyclisation.¹³³

Plus récemment, la catalyse au palladium s'est révélée plus efficace sur deux aspects : dans un premier temps, les réactions pallado-catalysées présentent une sélectivité proche de 100% pour la forme *exo*-(*Z*) (en bleu sur le Schéma 36) ; dans un deuxième temps, le palladium permet de simplifier la synthèse des buténolides en rassemblant en une seule étape, la condensation d'un alcyne et d'un acide (*Z*)- β -halo-acrylique (*i. e.* couplage de Sonogashira) **ET** leur cyclisation en buténolide. Cette unique étape a été nommée « *tandem cross-coupling lactonization* ». ²⁰⁵ Un mécanisme a été proposé par X. Lu en 1993 : il s'agit d'un double cycle de catalyse, comprenant d'abord le couplage de Sonogashira, puis la lactonisation pallado-catalysée (Schéma 37).¹⁷⁵

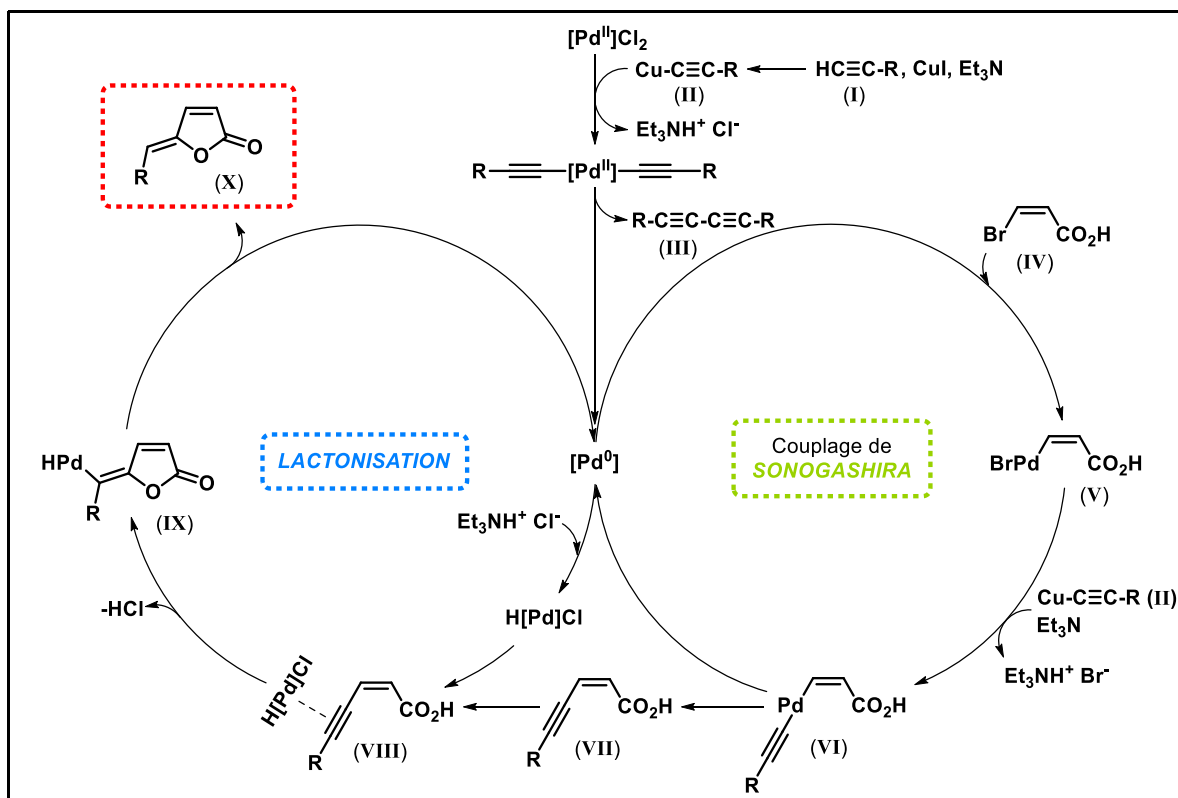


Schéma 37 – Mécanisme proposé pour la *tandem cross-coupling lactonization*.¹⁷⁵

Ainsi, le développement de cette réactivité a permis de réaliser la synthèse totale de quelques produits naturels, notamment le diacétate de rubrolide A (**140**),¹⁵⁵ isolé à partir de l'ascidie de Blochmann (*Synoicum blochmanni*), le goniobutérolide A (**55**)¹⁵⁴ (Schéma 38) et plus récemment, la cryptoconcatone I¹ (*Cryptocaria concinna*)³¹¹ (Schéma 39).

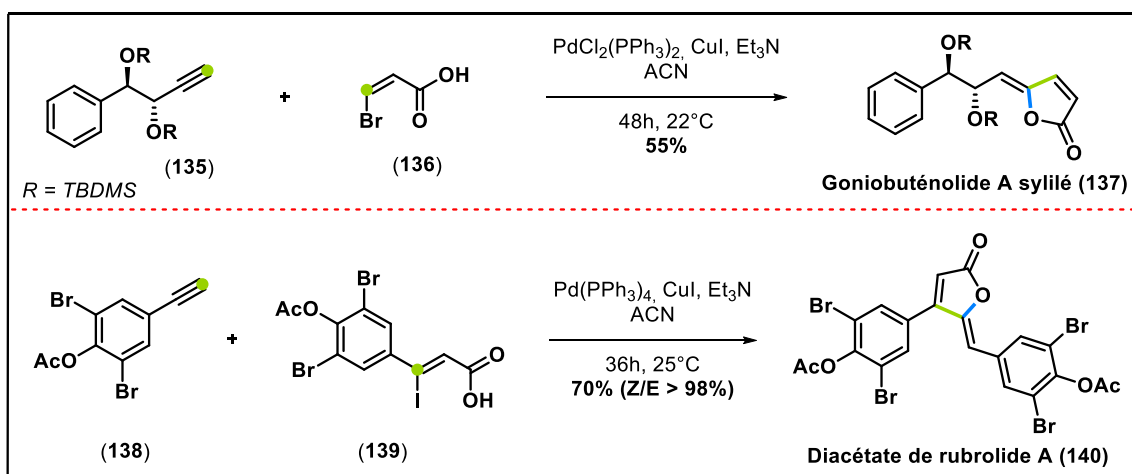


Schéma 38 – Synthèses du goniobutérolide A silylé (**137**)¹⁵⁴ et du diacétate de rubrolide A (**140**)¹⁵⁵ par M. Kotora.

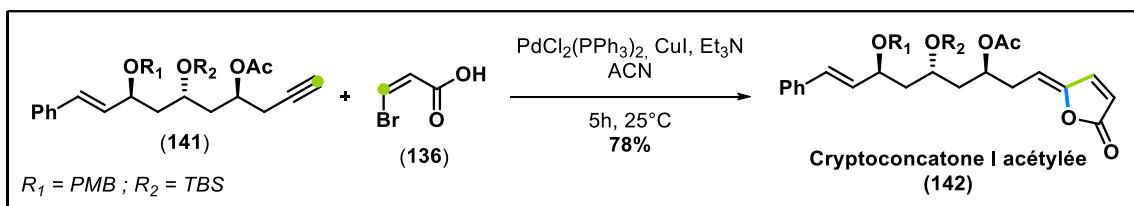


Schéma 39 – Synthèse de la cryptoconcatone I acétylée (142) par R. K. Acharyya.¹

Carbonylation :

La carbonylation est une étape supplémentaire dans la réduction du nombre d'étapes lors de la synthèse de buténolides naturels et la simplification structurale des substrats initiaux. Ainsi, la fonction carbonyle, caractéristique des buténolides, peut être introduite par carbopalladation sous atmosphère de monoxyde de carbone (Schéma 40). Cette réaction a été découverte de manière fortuite par Negishi en 1986.²⁰⁶

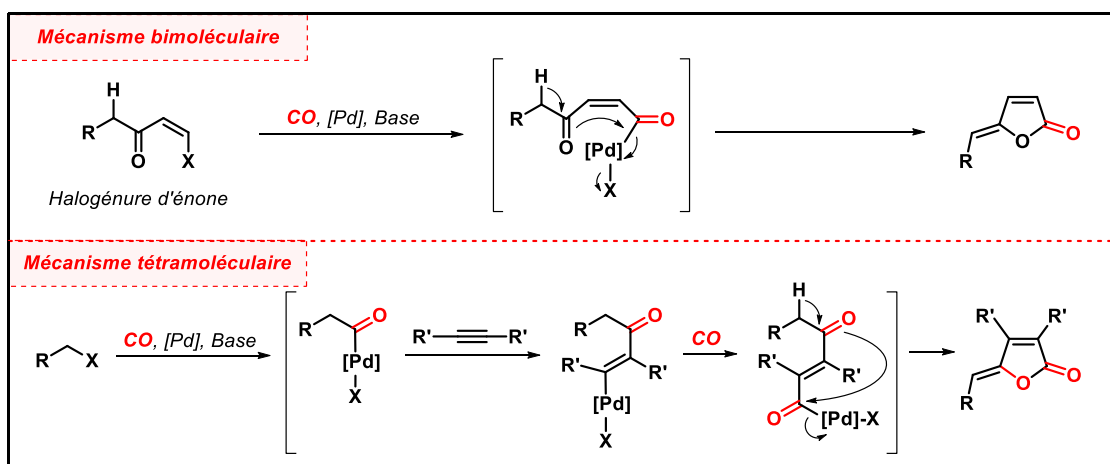


Schéma 40 – Schéma général de la synthèse de buténolides par carbonylation avec une ou deux insertions de molécule de monoxyde de carbone.

Cette réaction est compatible avec un grand nombre de substrats de départ : dans le cas d'un mécanisme bimoléculaire, la carbopalladation peut s'effectuer sur un halogénure d'énone (ou cétone β -halo- α,β -insaturée), un alcool vinylique β -halogéné ou un halogénure de vinyle β -hydroxylé.⁶³ Lorsque le substrat de départ est uniquement substitué par un halogène, deux insertions de molécules de monoxyde de carbone sont nécessaires pour introduire les deux hétéroatomes du buténolide final, ainsi qu'une réaction de Heck intermoléculaire avec un alcyne pour introduire l'insaturation en α du carbonyle du buténolide final.⁵⁹ Il est à noter que ce mécanisme est aussi possible en version trimoléculaire avec une molécule organique non halogénée mais oxygénée (typiquement, un aldéhyde), on parle alors

de réaction d'**oxa-Pauson-Khand**, mais cette dernière stratégie n'a pas encore été appliquée à la synthèse de produits naturels.¹⁹⁴

Cette stratégie de synthèse présente de nombreux avantages. En effet, la stéréosélectivité est très marquée : la synthèse de buténolides par carbonylation pallado-catalysée permet d'obtenir majoritairement l'isomère (*Z*) (entre 75% et 80%).²⁰⁵ De plus, la gamme de substrats compatibles avec ces conditions expérimentales est très diversifiée : on peut citer notamment les époxydes^{4, 6}, les alcools vinyliques¹⁶³ et leurs dérivés⁶⁶, les halogénures de vinyliques^{62, 183}, les oléfines¹⁸² etc ... Cette stratégie de synthèse présente également l'avantage de permettre de former certains buténolides impossibles à synthétiser par les méthodes présentées précédemment, en raison de la difficulté de synthétiser les synthons requis. C'est ainsi que le bovolide (**145**)⁵⁹, un buténolide présent dans l'huile essentielle de menthe poivrée et l'aristolactone (**149**)¹⁸³, extraite de *Aristolochia reticulata* et *Aristolochia serpentaria*¹⁸⁴, ont pu être synthétisés (Schéma 41).

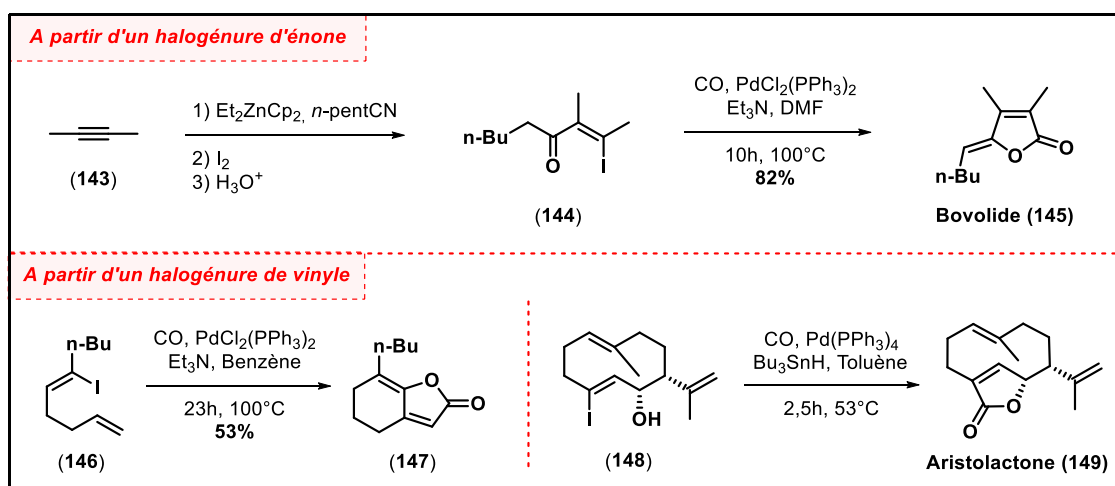


Schéma 41 – Synthèses du bovolide (**145**),⁵⁹ d'un dérivé de la patuline (**147**)²⁰⁵ et de l'aristolactone (**149**)¹⁸³ par carbonylation pallado-catalysée.

Par la suite, ce travail de carbonylation a pu être élargi à d'autres métaux, comme le chrome,^{30, 120} le cobalt^{5, 11, 157, 158} (ex : la synthèse du bovolide (**145**))³⁰⁵, le rhodium,^{82, 193} le zirconium⁴¹ et le manganèse.^{78, 79} Dans le cas du rhodium, des études mécanistiques poussées ont été menées.^{192, 218} Rapidement, les travaux ont révélé que ces métaux doivent être introduits en quantité stœchiométrique et non en quantité catalytique, ce qui en amoindrit l'intérêt. Pour se libérer d'une catalyse métallique, Woo *et al.*, en 1986, ont réussi à

carbonyler un aldéhyde α,β -insaturé grâce à du monoxyde de carbone en présence d'acide sulfurique uniquement.³⁰³ Cette expérience reste, malgré tout, unique dans ce domaine.

Il est à noter que, dans le même temps, des essais de carbonatation (*i. e.* addition de CO_2 au lieu de CO) ont été effectués. La seule application que l'on trouve en synthèse de produit naturel concerne le (+)-astériscanolide (**153**) (extrait d'*Asteriscus aquaticus*)²⁹⁹ (Schéma 42).

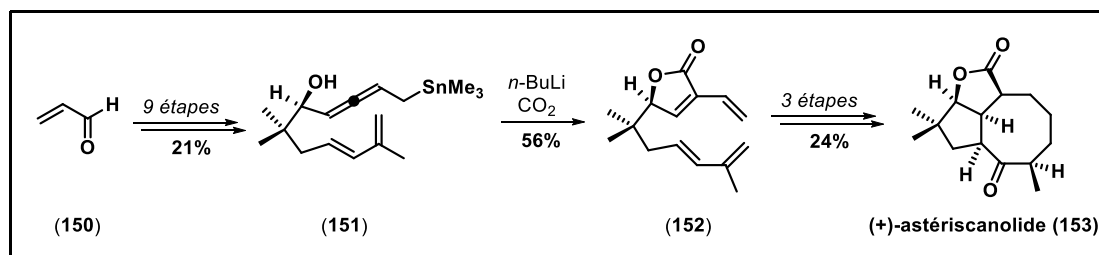


Schéma 42 – Synthèse du (+)-astériscanolide (**153**) par P. A. Wender.

2.2.4.3 Voie C

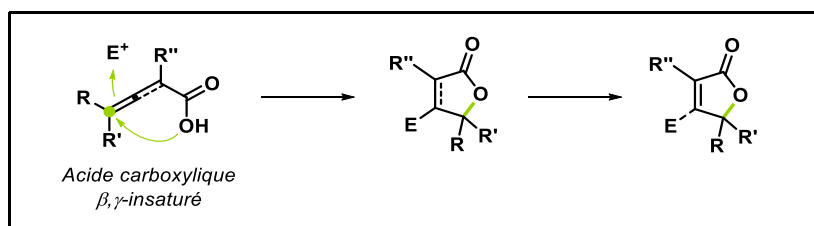


Schéma 43 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie C.

Lorsque l'insaturation se trouve en position β , on retrouve le même type de réactivité que pour la voie B. Ce type de réactivité a permis de réaliser la synthèse de l'acide acarénoïque (**158**), extrait du lichen *Acarospora chlorophana*²⁸² (Schéma 44).

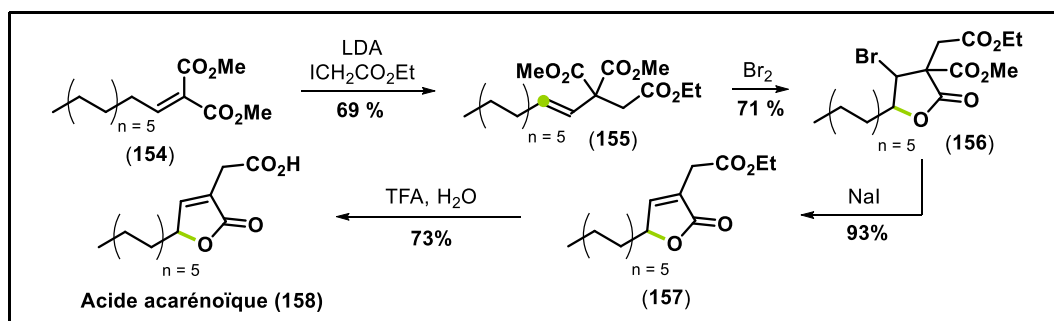


Schéma 44 – Synthèse totale de l'acide acarénoïque (**158**) par S. Tsuboi.²⁸²

2.2.4.4 Voie D

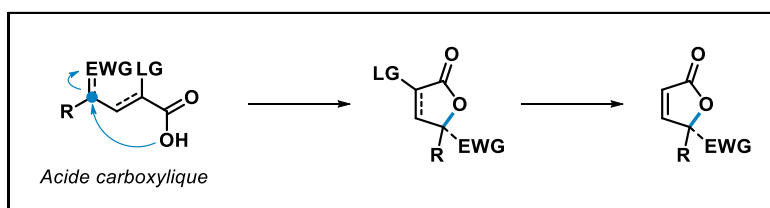


Schéma 45 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie D.

Parmi les différents types de cyclisation possibles, la lactonisation peut s'effectuer, dans un premier temps, par addition nucléophile d'un acide carboxylique sur un carbone électrophile en position γ (Schéma 45). Le caractère électrophile peut être dû à la présence d'un groupe oxo ou d'un groupe partant électroattracteur. Cette stratégie a permis de réaliser, dès les années 1940, la synthèse totale de la proto-anémone (**153**) (Schéma 46), une molécule aux propriétés antibiotiques présente chez tous les représentants des *Ranunculaceae*,³ à partir de l'acide lévulinique (**150**)²⁴⁸ ; ainsi que la synthèse totale de l'atractylénolide I (**157**), aussi appelé 8,9-déshydroastérolide²³ et extrait de *Atractylodes macrocephala*, une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise.⁵³

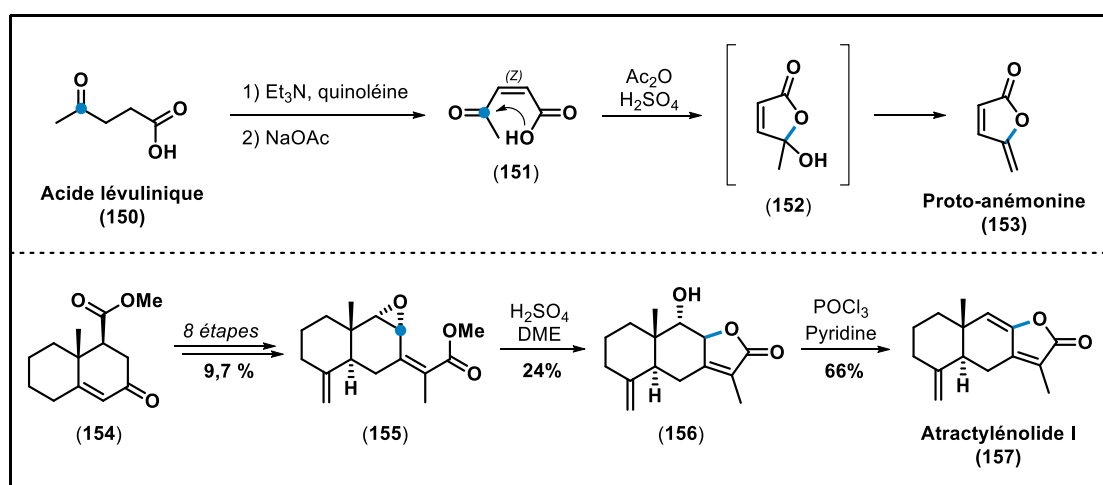


Schéma 46 – Synthèse totale de la proto-anémone (**153**) par E. Shaw²⁴⁸ et de l'atractylénolide I (**157**) par H.-H. Bokel.²³

Ici s'achève la présentation des différentes stratégies de synthèse du motif buténolide par la création de liaisons C-O intramoléculaires. Les autres voies de synthèse rassemblées dans le Tableau 3 sont caractérisées par la création de liaisons C-C intramoléculaires et concernent les voies E et F.

2.2.4.5 Voie E

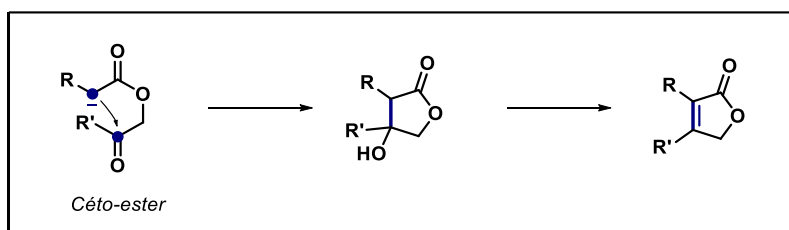


Schéma 47 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie E.

Une autre stratégie de cyclisation, adaptée à des substrats de type céto-ester (Schéma 47), revient à exalter le caractère nucléophile du carbone en position α d'un ester, par le biais d'une déprotonation ou de la formation d'un Grignard. Une liaison carbone-carbone peut ainsi se former entre ce carbone en position α et le carbonyle. Cette démarche a permis de réaliser une partie de la synthèse du fragment C5-C9 (**160**), qui intervient dans la synthèse des géodiamolides A (**161**) et B (**162**) (isolées à partir d'éponges marines)⁵⁶ (Schéma 48).

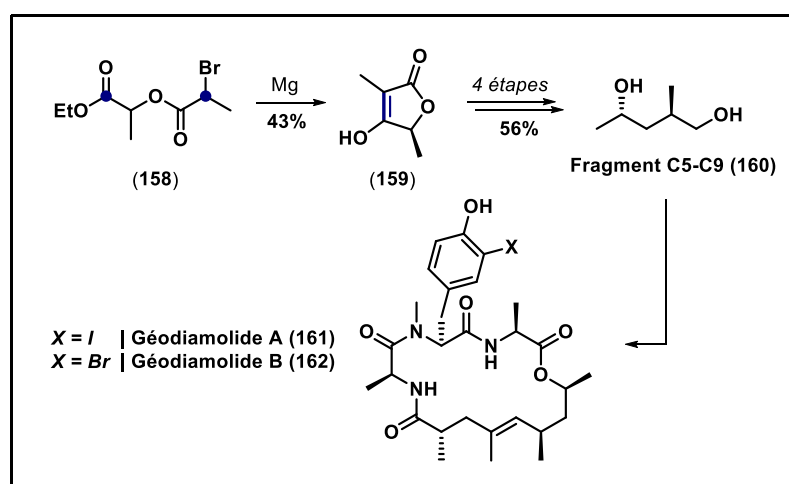


Schéma 48 – Synthèse du fragment C5-C9 (**160**), intermédiaire dans la synthèse des géodiamolides A (**161**) et B (**162**) par J. Chiarello.⁵⁶

2.2.4.6 Voie F

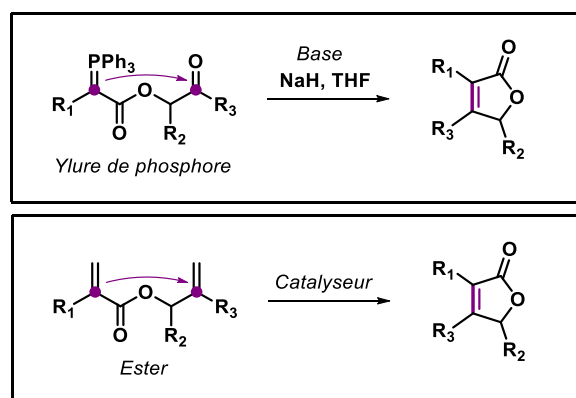


Schéma 49 – Schéma général de synthèse de buténolides par la voie F.

La dernière stratégie générale de synthèse de buténolides par la création de liaisons C-C est de réaliser une réaction de Wittig/Horner-Wadsworth-Emmons intramoléculaire ou encore une métathèse cyclisante grâce aux catalyseurs de Grubbs et d'Hoveyda (Schéma 49). Peu utilisée en synthèse de produits naturels, cette stratégie a néanmoins été appliquée dans le cadre de la synthèse de cardénolides (**165**) (des stéroïdes très répandus dans les tissus végétaux)¹⁶⁵ ou encore de la (3*R*, 4*S*)-(-)-whiskey lactone (**168**) (composant majeur responsable du goût dans le whisky)¹⁷⁹ (Schéma 50).

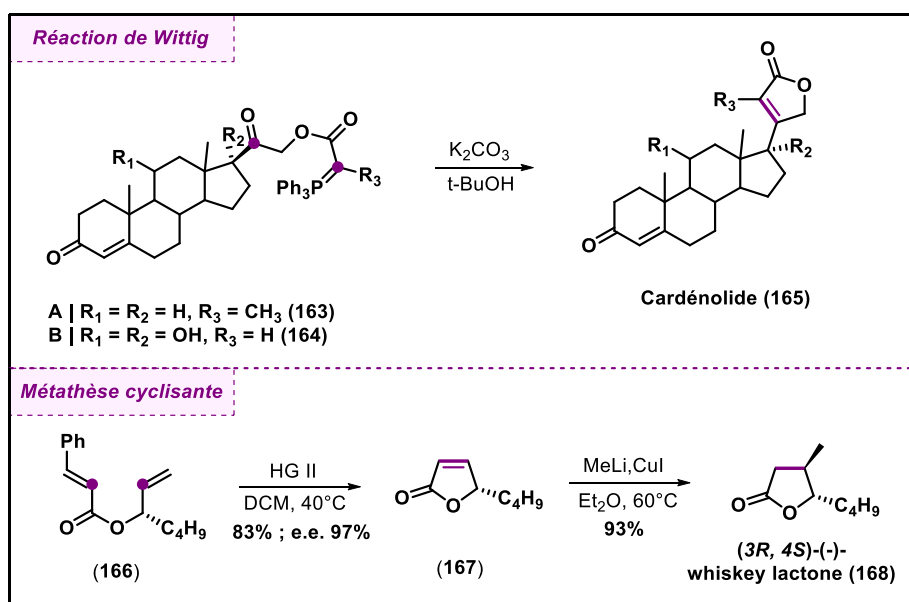


Schéma 50 – Synthèse totale de cardénolides typiques (**165**) et de la (3*R*, 4*S*)-(-)-whiskey lactone (**168**).

2.2.5 Contraction de cycles

2.2.5.1 A partir de benzoquinones

Parmi les précurseurs utilisés pour la synthèse des γ -ylidènebuténolides, les benzoquinones se sont révélées être des substrats de choix, car ce sont des réactifs commerciaux très répandus, stables et relativement faciles à fonctionnaliser. Seule une étape de contraction de cycle oxydante est nécessaire pour passer du cycle à 6 carbones des benzoquinones au cycle à 5 chaînons (4 carbones et 1 oxygène) des buténolides. Pour réaliser cette étape, deux stratégies principales ont été mises au point au cours des années 1970 : la première consiste à passer par un intermédiaire « azidoquinone » et a fait l'objet d'une revue détaillée en 1973¹⁹⁶ ; la deuxième a été développée par H. W. Moore et R. J. Wikholm dans les années 1970 et mime la biosynthèse des acides pulviniques.

Passage par un intermédiaire « azidoquinone » :

Les azidoquinones présentent l'avantage d'être des précurseurs faciles à synthétiser et peuvent être utilisées pour la synthèse d'une très large gamme de composés, dont les buténolides. La synthèse des azidoquinones suit, à quelques exceptions près, toujours la même voie : la substitution nucléophile, par un azoture, d'un halogène ou d'un acétyle porté par une benzoquinone. Les rendements obtenus sont d'ordinaire très élevés (>70%).¹⁹⁷ Puis, une étape de contraction de cycle permet d'obtenir un 5-cyano-4-ylidènebuténolide (Schéma 51).

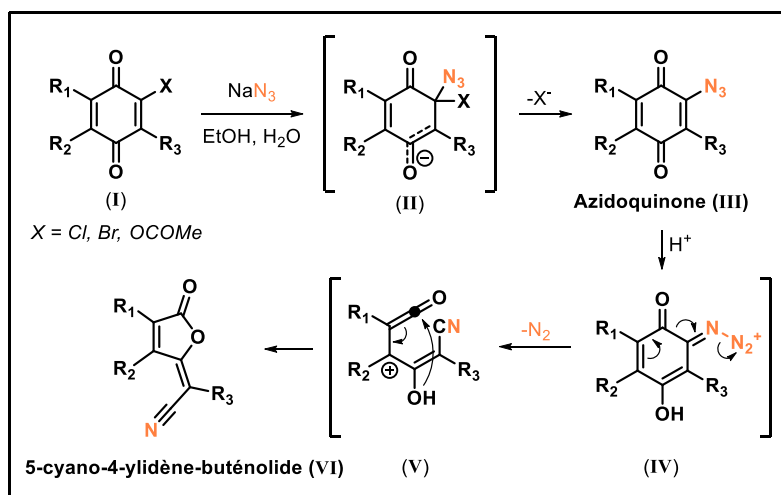


Schéma 51 – Schéma général de synthèse de buténolide par un intermédiaire de type azidoquinone.

Le mécanisme de cette contraction de cycle implique une activation acide. Le jeu des délocalisations induit une rupture du cycle à 6 chaînons et on observe la formation d'un cétène, concomitante au départ d'une molécule de N₂. L'obtention du buténolide final est réalisée par addition du groupement hydroxyle formé sur le cétène.¹⁹⁹ L'exemple le plus manifeste d'application des azidoquinones à la synthèse de buténolides est celui de la thymoquinone (**169**).¹⁹⁸ En effet, en une seule étape, il est possible de passer de la thymoquinone (**169**) au 5-cyano-4-ylidènebuténolide (**170**) associé (Schéma 52).

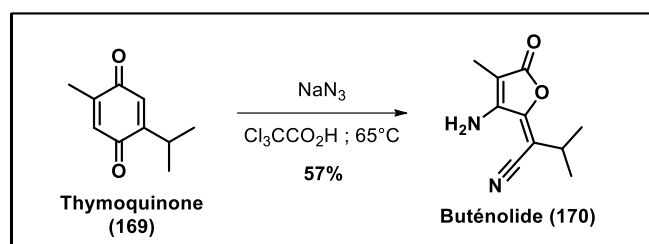


Schéma 52 – Contraction de cycle de la thymoquinone (**169**) en analogue de dérivés pulviniques (**170**).

Stratégie de H. W. Moore et R. J. Wikholm :

H. W. Moore et R. J. Wikholm ont développé une variante à partir de benzoquinones hydroxylées. Dans ce cas, d'autres conditions expérimentales peuvent être employées pour obtenir la même réactivité. Ainsi, la contraction de cycle s'effectue en présence d'Ac₂O dans le DMSO (Schéma 53).^{200, 301} La première étape de ce mécanisme consiste en l'activation du DMSO par l'anhydride acétique, sur le modèle d'une oxydation de Swern. Par équilibre céto-énolique, le doublet libre de l'oxygène marqué en orange se rabat sur la quinone, provoquant ainsi la délocalisation de la liaison π et l'attaque nucléophile sur le DMSO activé. L'acétate libéré peut ensuite attaquer le carbone en α du groupement carbonyle formé. La délocalisation engendrée permet la libération de diméthylsulfure et la formation d'un cétène. Une cyclisation conduit ensuite à la fermeture du buténolide et permet d'obtenir le cycle à 5 chaînons souhaité.

Cette stratégie est élégante, car elle permet d'augmenter considérablement la complexité structurale en peu d'étapes. Il est à noter que le mécanisme réactionnel varie si l'on se trouve en présence d'une benzoquinone monohydroxylée ou dihydroxylée (par exemple, le cas des acides polyporiques). En effet, la présence de deux groupements hydroxyles en position 2 et 4 induit la formation d'un dibuténolide. Cette dernière stratégie est particulièrement intéressante, car elle permet une synthèse biomimétique des acides

pulviques. Ces composés sont des métabolites courants dans le règne fongique et constitue le cœur de ce travail de thèse.

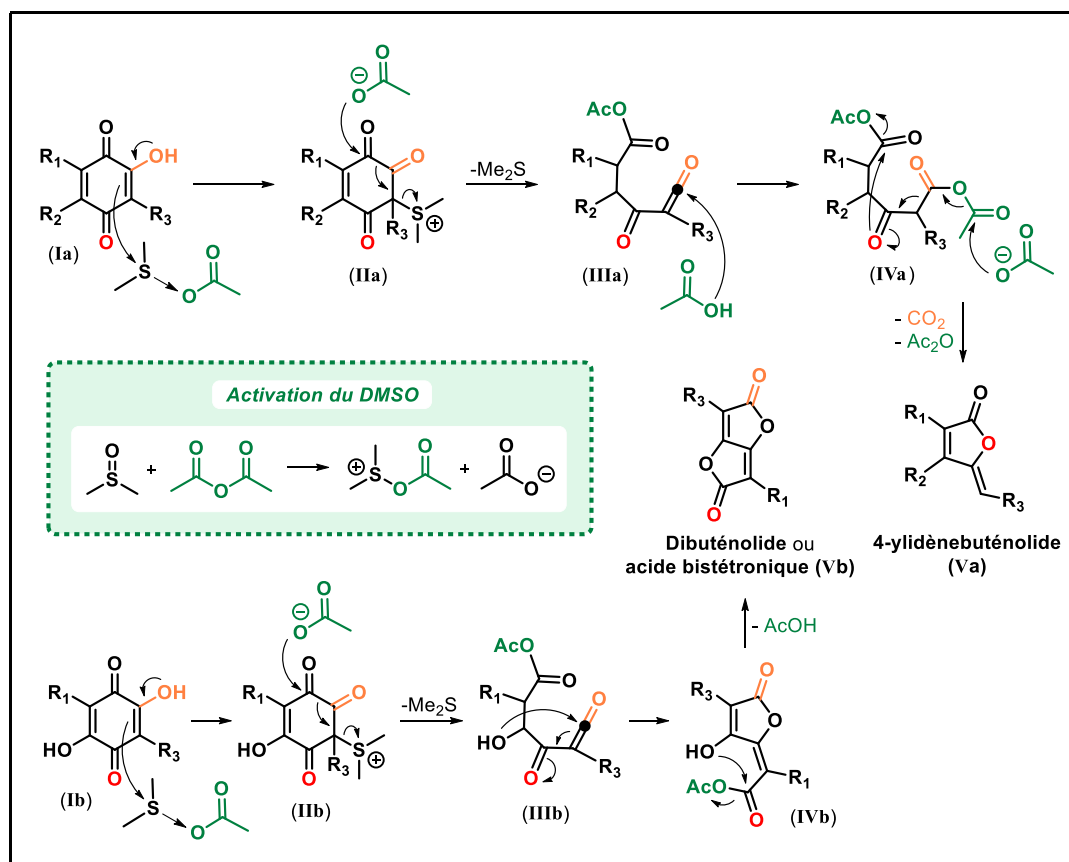


Schéma 53 – Schéma général de la contraction de cycle d'une benzoquinone hydroxylée (**Ia** ou **Ib**).

2.2.5.2 A partir de polyphénols

Dans le cadre de la recherche sur les mécanismes de dégradation enzymatique des polyphénols, comme la quercétine, par les dioxygénases, il a été observé que les noyaux aromatiques de type catéchol peuvent se réarranger en buténolide. En effet, les dioxygénases sont des enzymes capables d'oxyder leur substrat par insertion d'une molécule d'O₂ sans libération d'eau, ce qui les différencie des enzymes monooxygénases. Afin de mimer ce mécanisme, T. Matsuura et I. Saito ont cherché à réaliser la photo-oxydation de molécules modèles, à savoir le 4,6-di-*t*-butylrésorcinol (**171**) et le 3,5-di-*t*-butylpyrocatechol (**175**). Les conditions appliquées sont sensiblement identiques à celles reportées pour la photo-oxygénation de furanes (Schéma 24 – page 65) : il s'agit de former *in-situ* du dioxygène singulet (¹O₂) grâce à un photosensibilisateur irradié à la longueur d'onde adéquate. Ainsi, il a été observé que la photo-oxydation du 4,6-di-*t*-butylrésorcinol (**171**) et du 3,5-di-*t*-

butylpyrocatechol (**175**) en présence de rose Bengale permet d'obtenir deux types de produits : un β -céto-ester (**174**) et un buténolide (**173** et **177**), avec un rendement respectivement de 22% et de 41% (Schéma 54).^{188, 241} Ce réarrangement est délicat à observer : en effet, la présence de groupements électro-attracteurs sur le noyau aromatique semble diminuer la réactivité du catéchol, les hydroquinones ne sont pas sujettes à ce type de réactivité et la présence de groupement protecteur sur les hydroxyles annihile toute réactivité.¹⁸⁷

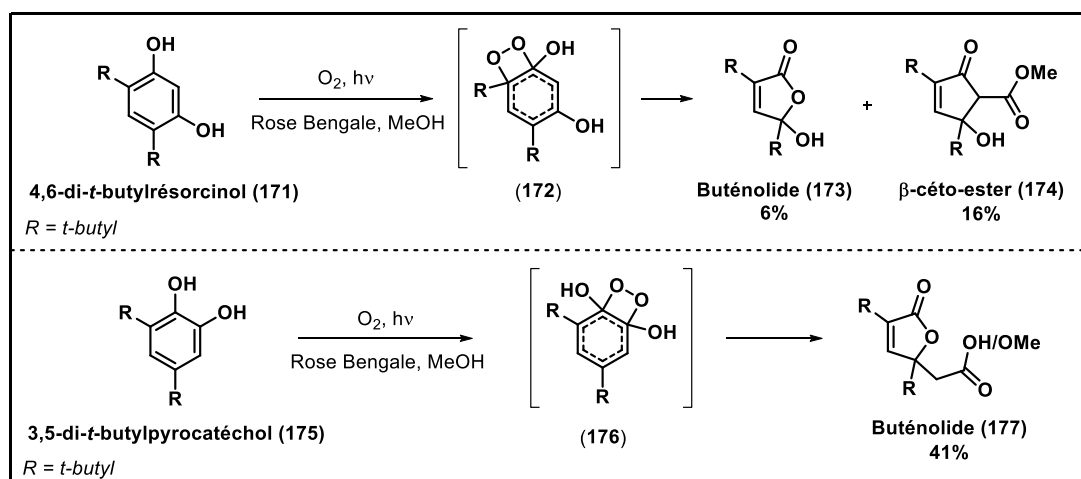


Schéma 54 – Schéma général de la photo-oxygénation du résorcinol (**171**) et du pyrocatechol (**175**).

Bien que particulièrement élégante, cette stratégie ne peut pas être étendue à l'utilisation de peroxydes ou de peracides comme oxydant. Cela explique pourquoi cette réactivité n'a pas encore trouvé d'application en synthèse totale de produits naturels.

3 DIMÉRISATION D'ACIDES PULVINIQUES

3.1 Synthèse de dimères dans la littérature

3.1.1 Bilan des stratégies synthétiques déjà employées pour la synthèse de dimères pulviniques

Comme cela a été présenté précédemment, la sclérocitrine (**3**) et la chalcitrine (**4**) font partie de la même série chimique que la badione A (**6**) et la norbadione A (**5**). Il est donc judicieux d'étudier les démarches synthétiques entreprises dans la littérature pour ces quatre composés naturels. À ce jour, aucune synthèse totale de la sclérocitrine (**3**) n'a été publiée. Les travaux de synthèse sur cette série chimique comprennent :

- l'étude de W. Steglich en 1985 sur le méthylcatéchol (**9**) (Schéma 2 – page 41) comme modèle du cœur central de la badione A (**6**) ;
- la synthèse totale de la norbadione A (**5**) par l'équipe de C. Mioskowski en 2008 ;²⁸
- la synthèse totale de la chalcitrine (**4**), par l'équipe de S. A. Snyder au cours de la première année de ce doctorat en 2019 ;³¹⁴

Comme cela a été présenté dans la partie 1.2 de cette introduction générale (page 40), l'approche de W. Steglich, appliquée dès 1985 pour la synthèse du cœur de la badione A (**6**), consiste à effectuer la dimérisation biomimétique d'un modèle de l'acide xérocomique (**7**), puis à induire de nombreux réarrangements intramoléculaires pour former les dimères pulviniques d'intérêt. Cette démarche est celle dans laquelle s'inscrit ce projet de thèse. À l'inverse, la démarche suivie par C. Mioskowski et S. A. Snyder revient à synthétiser le cœur central du dimère ciblé, puis à le fonctionnaliser, par couplage, en fin de synthèse, par les fragments manquants de l'acide xérocomique (**7**).

Concernant la norbadione A (**5**), le travail de C. Mioskowski (Schéma 55) fait intervenir, dans un premier temps, une réaction de Diels-Alder entre une quinone (**180**) et un diène de Danishefsky (**181**), pour former un bicycle naphthalénique (**182**). Puis, une réduction et une lactonisation conduisent au cœur central de la norbadione A (**184**). Enfin, ce cœur central est converti en bis-boronate (**185**) pour permettre le couplage avec le squelette tétronique (**186**) présent dans l'acide xérocomique et ainsi, former la norbadione A (**5**).

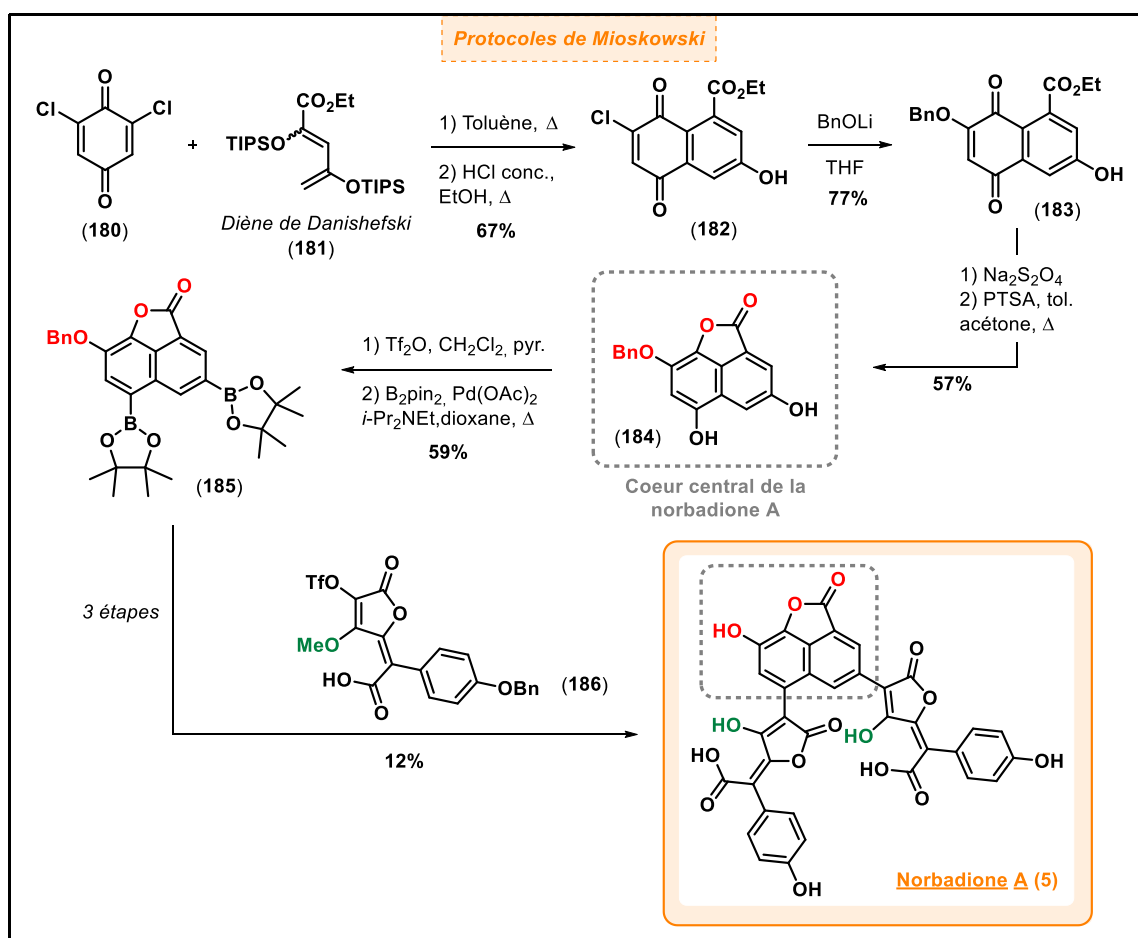


Schéma 55 – Synthèse totale de la norbadiione A (5) par C. Mioskowski.

Concernant la chalcitrine (4), la procédure à suivre est nettement plus contraignante, du fait de la complexité du cœur central et des centres asymétriques de ce composé. 17 étapes sont ainsi requises pour synthétiser les quatre cycles centraux imbriqués (Schéma 56). La synthèse démarre par l'addition 1,4 de $\text{PhMe}_2\text{Si}(\text{Me})\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2$ sur la 2-cyclopenténone (190), suivie d'une aldolisation sur le triméthylsilylpropynal (191). L'alcool secondaire généré est ensuite protégé par un groupement MOM (192). L'orientation de ce groupement dans l'espace importe peu pour la suite de la synthèse. Un seul diastéréoisomère de la cyclopentanone (192) est formé et ceci de manière racémique. L'alcyne terminal est ensuite iodé et la fonction cétone est convertie en éther d'énol silylé (193). Le substrat peut ainsi se cycliser selon une réaction de Conia-ène, catalysée par le complexe de CyJohnPhosAuOTf : on obtient ainsi le composé (194). Un troisième cycle doit encore être formé pour finaliser la synthèse du cœur central de la chalcitrine (4). Dans ce but, un groupement allylique est ajouté

par S_{N1} à partir de l'alcool allylique protégé en présence de SnCl_4 . L'alcène terminal (**195**) subit ensuite une hydroboration et deux oxydations successives, afin de générer un aldéhyde (**197**), susceptible de réaliser la dernière cyclisation menant au cœur central de la chalcitrine (**198**) par addition acyloïne sur le carbonyle originel de la cyclopenténone. Enfin, à partir de ce squelette du cœur central de la chalcitrine, les dernières étapes servent à préparer sa fonctionnalisation par les chaînes tétroniques.

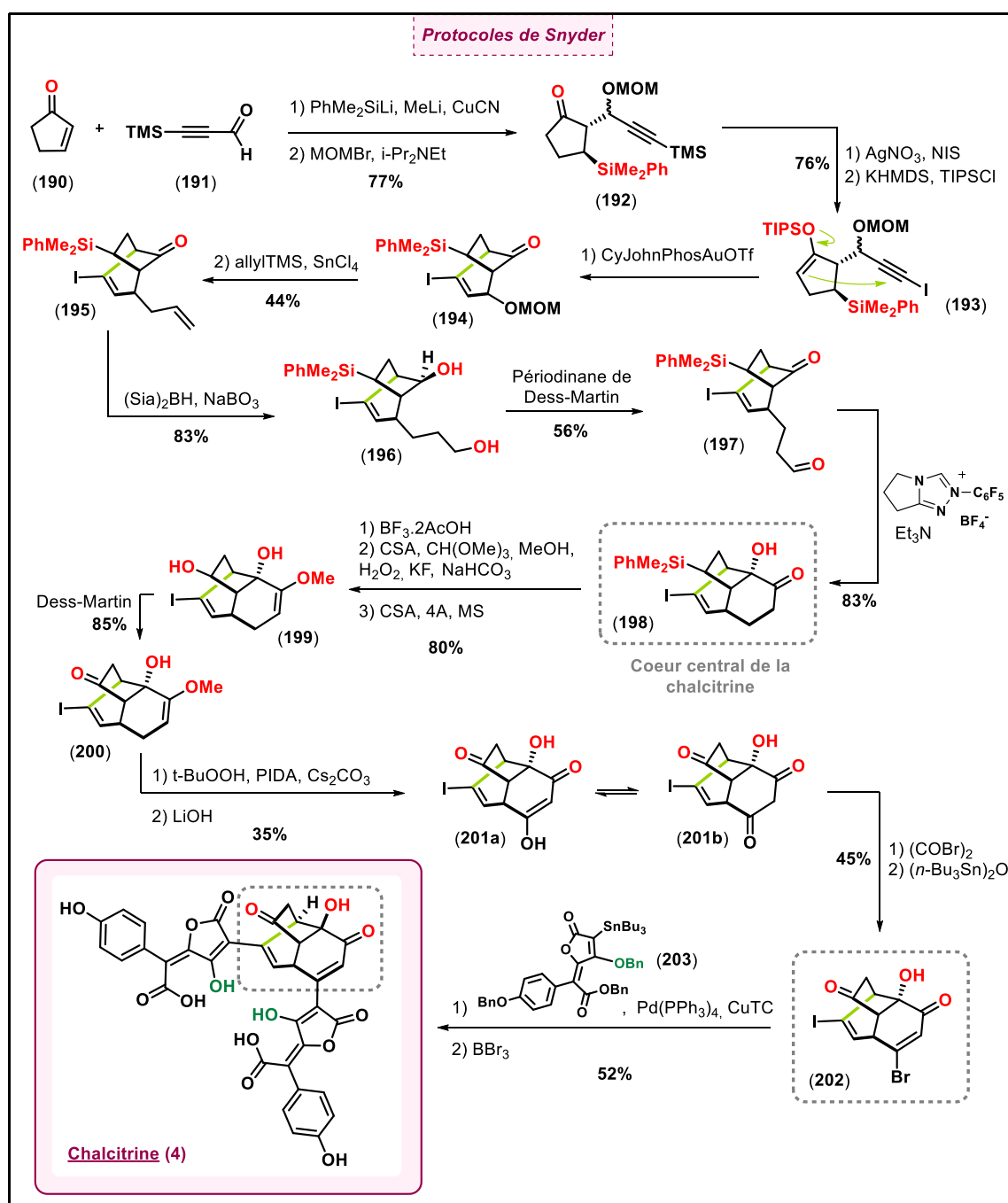


Schéma 56 – Synthèse totale de la chalcitrine (**4**) par S. A. Snyder.

Dans un premier temps, les auteurs ont choisis de convertir le silane (**198**) en alcool (**199**) par oxydation de Tamao-Fleming, puis en cétone pontée (**200**) par oxydation au périodine de Dess-Martin. La fonction éther d'énol formée (intermédiaire (**200**)) est oxydée sur sa position allylique (*t*-BuOOH, PIDA). Ensuite, un traitement par la lithine permet d'hydrolyser l'éther d'énol en question. Le composé obtenu (**201a** et **201b**) est ensuite bromé par le bromure d'oxalyle et traité à l'oxyde de tributylétain pour empêcher une potentielle formylation du groupement OH libre. Les auteurs ont ensuite cherché à fonctionnaliser ce cœur central (**202**) avec le dérivé tétronique (**203**) fragment de l'acide xéromique (**7**) par le biais de couplages pallado-catalysés. Parmi les différents essais réalisés par les auteurs, il a été montré que le couplage intervient sans dégradation uniquement lorsque le groupement stannylé est porté exclusivement par le dérivé tétronique en présence de Pd(PPh₃)₄ et de CuTC (le complexe de cuivre permettant au couplage de se produire sur l'iode). Il reste enfin à retirer les groupements benzyliques portés par le dérivé tétronique grâce au BBr₃, pour obtenir la chalcitrine (**4**) proprement dite.

Les deux démarches qui ont ainsi été suivies par C. Mioskowski et S. A. Snyder (et qui restent uniques à ce jour) ont permis d'aboutir aux composés ciblés, avec un rendement global de 2,1% pour la norbadione A (**5**) et 0,6% pour la chalcitrine (**4**). Certes, l'objectif synthétique est atteint, mais le nombre d'étapes est conséquent et les réactivités impliquées sont relativement éloignées des hypothèses biomimétiques proposées par W. Steglich et de la démarche suivie au cours de ce doctorat. Pour rappel, la stratégie que nous voulons suivre est celle d'un *seul et unique évènement oxydant* permettant à l'acide xéromique (**7**) de dimériser sous la forme d'une pseudo-cycloaddition de type [5+2], suivie de nombreux réarrangements intramoléculaires, conduisant à la sclérocitrine (**3**) et à la chalcitrine (**4**). On parle, dans ce cas, d'*oxydation désaromatisante*.

Il est légitime de s'interroger sur le fait que la perte d'aromaticité (et donc de stabilité) puisse constituer en soi une stratégie biosynthétique. En effet, les polyphénols étant les métabolites de fin de séquence réactionnelle à partir des acides aminés, on est en droit de se demander dans quelle mesure la désaromatisation pour induire des dimérisations de phénols est courante dans les produits naturels et si des exemples de synthèse ont déjà été apportés.

3.1.2 Occurrence des dimérisations de phénols par cycloaddition de type [5+2] dans la nature : exemples de la purpurogalline (212) et de la théacitrine C (217)

Dans ce but, nous allons nous intéresser plus précisément à la structure de l'adduit obtenu lors d'une cycloaddition de type [5+2]. Chez les polyphénols, il s'agit d'un **bicyclo[3.2.1]octane**, fonctionnalisé par des groupements hydroxylés ou carbonylés et fusionné avec un cycle aromatique. Ce type d'adduit peut subir de nombreux réarrangements intramoléculaires pour aboutir à un motif général, appelé *benzotropolone*, qui est très largement répandu parmi les métabolites de la flore à l'échelle mondiale.²⁰ Le plus simple représentant de cette famille de composés est la purpurogalline (212), dont la voie de biosynthèse (Schéma 57) est établie depuis 1948. *In vivo*, la biosynthèse de ce composé débute par la décarboxylation de l'acide gallique (205), permettant d'obtenir le pyrogallol (206). Par la suite, le pyrogallol (206) peut être oxydé en *o*-quinone (207), susceptible de dimériser suivant une cycloaddition de type [5+2] et former ainsi le squelette benzotropolone (209). S'ensuit des étapes d'hydratation (210), d'oxydation (211) et de décarboxylation permettant d'obtenir, à la fin, la purpurogalline (212) comme métabolite secondaire de la voie métabolique du shikimate-chorismate.

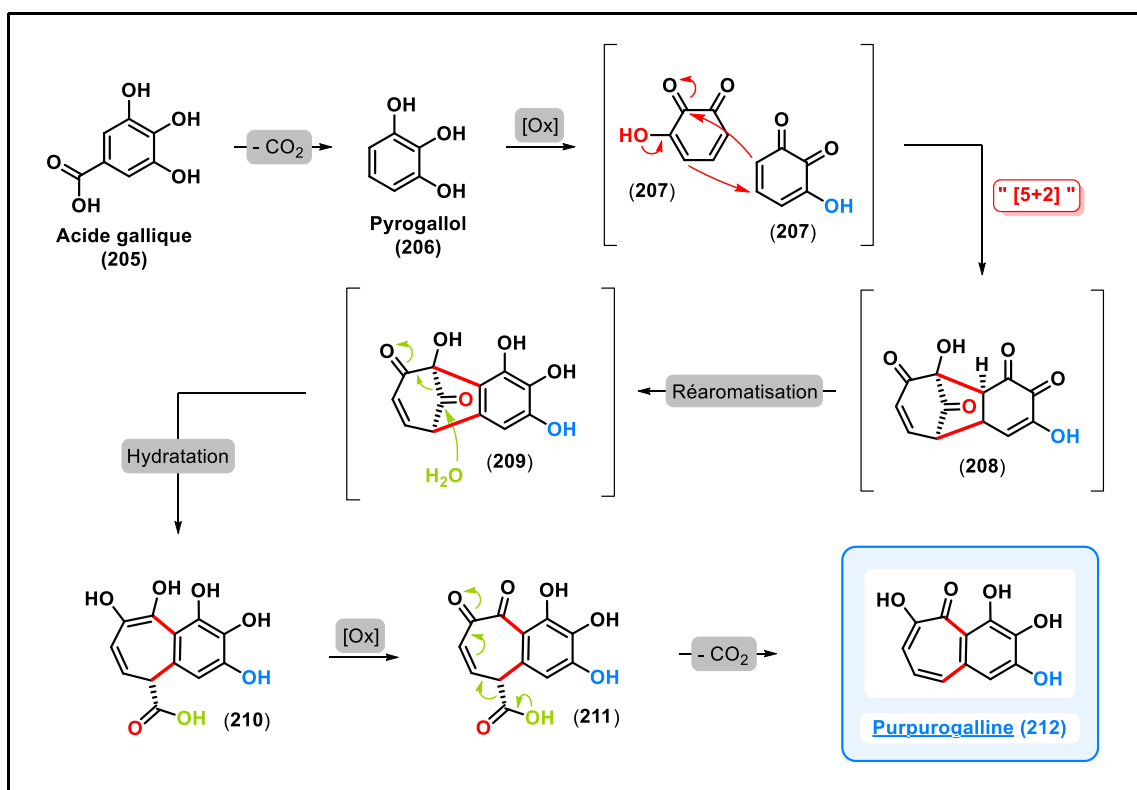


Schéma 57 – Biosynthèse de la purpurogalline (212) à partir de l'acide gallique.

L'exemple de la purpurogalline présente des similitudes avec celui de la théacitrine C (217), un polyphénol extrait des feuilles de thé [*Camellia sinensis*] et responsable de la coloration brune du thé noir. Le mécanisme de biosynthèse proposé pour ce composé repose également sur une homodimérisation de type [5+2]⁷² (Schéma 58) et a été validée expérimentalement par l'utilisation de catéchol-oxydases.¹⁸⁶ Dans ce cas, le substrat de départ est le gallate d'épigallocatechine (213). Il comprend une sous-unité pyrogallol qui peut être oxydée sous la forme d'une *o*-quinone (214) et ainsi induire la cycloaddition. Par la suite, le dérivé benzotropolone (215) obtenu subit spontanément un réarrangement de type « *acide benzilique* »^a, permettant ainsi de former la théacitrine C (217) à l'issue d'un équilibre céto-énolique).

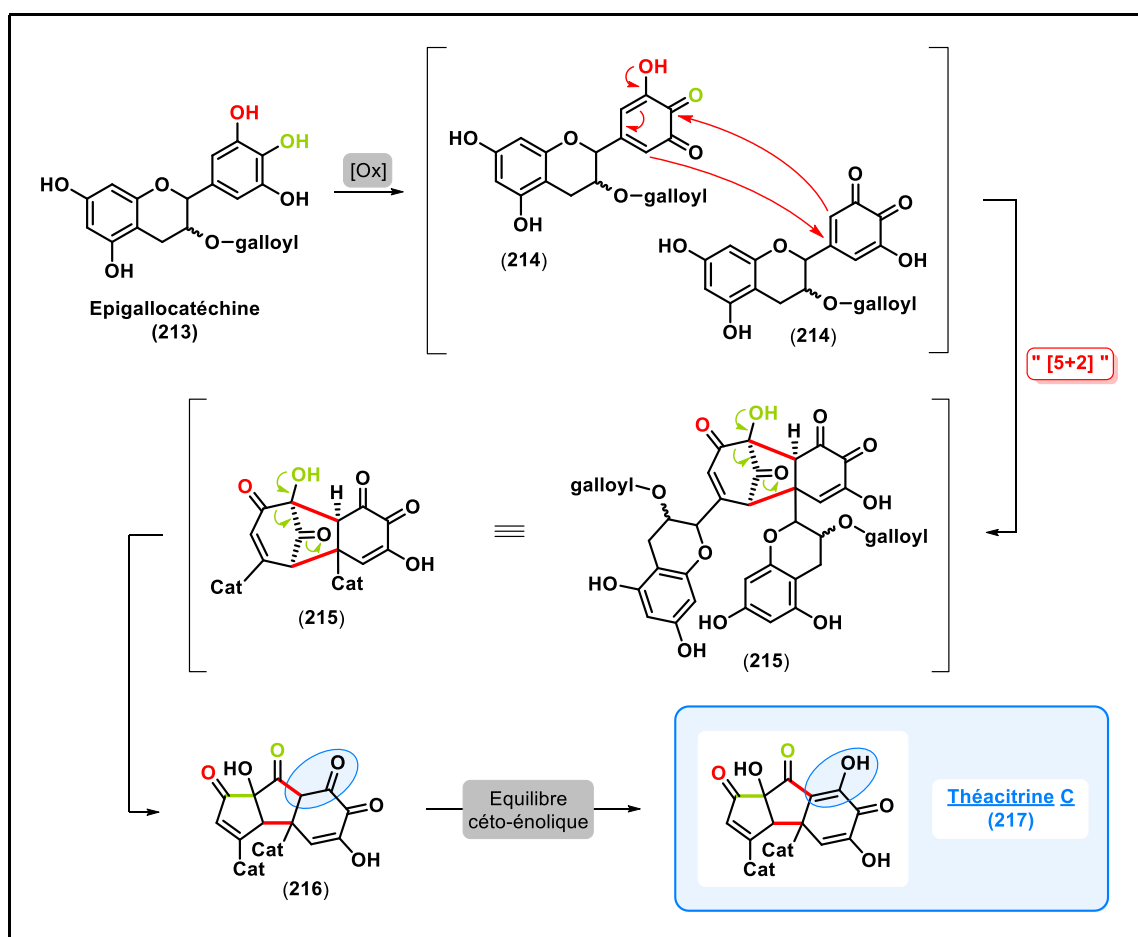
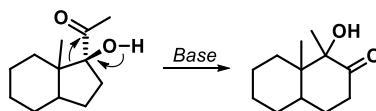


Schéma 58 – Biosynthèse proposée de la théacitrine C (217).

^a Ici, il s'agit de la variation alpha-cétol des réarrangements de type « *acide benzilique* », *i. e.* le groupement acyloïne migre de façon à intervertir la fonction hydroxyle et la fonction carbonyle.



Ce type d'oxydation désaromatisante apparaît donc comme étant une réactivité fondamentale et spontanée pour les composés polyphénoliques. Il est donc naturel de s'appuyer sur cette cascade mécanistique générale pour expliquer et tenter de reproduire la biosynthèse de métabolites ayant des structures similaires, comme les acides pulviniques et leurs dimères associés. Aussi, différentes équipes ont basé leurs stratégies de synthèse biomimétique de produits naturels sur ce type de réactivité.

3.2 Oxydation désaromatisante comme stratégie synthétique dans la littérature

Pour illustrer les cycloadditions de type [5+2] formelles intervenant, selon nos hypothèses, dans la biosynthèse de la sclérocitrine (**3**) et de la chalcitrine (**4**), nous allons nous attarder sur quelques exemples d'oxydations désaromatisantes de la littérature.²⁶⁶ Les synthèses biomimétiques de l'épicolactone (**228**), de la preuisolactone A (**240**), du 5-méthylpyrogallol (**231**) et de la (-)-pérezopérezone (**247**) vont nous permettre d'illustrer différentes approches synthétiques et conditions réactionnelles ayant fait leurs preuves.

3.2.1 Synthèse totale de l'épicolactone (**228**) par D. Trauner

En 2015, l'équipe de D. Trauner a réussi la synthèse totale de l'épicolactone (**228**). Ce métabolite fongique, extrait à partir de différents champignons endophytes de l'espèce *Epicoccum*, colonisant les cannes à sucre⁶⁸ et les cacaoyers²⁶⁹, présente des propriétés antimicrobiennes et antifongiques. L'étape clef de cette synthèse (Schéma 59) comprend une hétérodimérisation, sous la forme d'un cycloadduit de type [5+2], entre l'épicoccine (**221**) et un dérivé du pyrogallol (**222**). Cette hétérodimérisation intervient une fois que chacun de ces composés a été préalablement oxydé en *o*-quinone par du ferricyanure de potassium en condition basique (**223** et **224**).⁸⁵ Plus précisément, la dimérisation est enclenchée par le groupement hydroxyle en rouge sur le Schéma 59. On obtient ainsi un intermédiaire ponté (**225**). L'attaque nucléophile du groupement hydroxyle en vert sur cet intermédiaire ponté permet d'obtenir un cycloheptanediol (**226**) pouvant, par la suite, être impliqué dans une aldolisation vinylogue intramoléculaire. Ainsi, moyennant une étape de déméthylation, les auteurs obtiennent l'épicolactone (**228**) avec un rendement de 31,5%. Cette cascade réactionnelle a pu être validée grâce à l'isolement de l'intermédiaire ponté (**225**). Dans ce but, il a été nécessaire de masquer, au préalable, le groupement hydroxyle en vert de cet intermédiaire (**225**) par un groupement acétate, afin d'empêcher l'attaque nucléophile intramoléculaire.

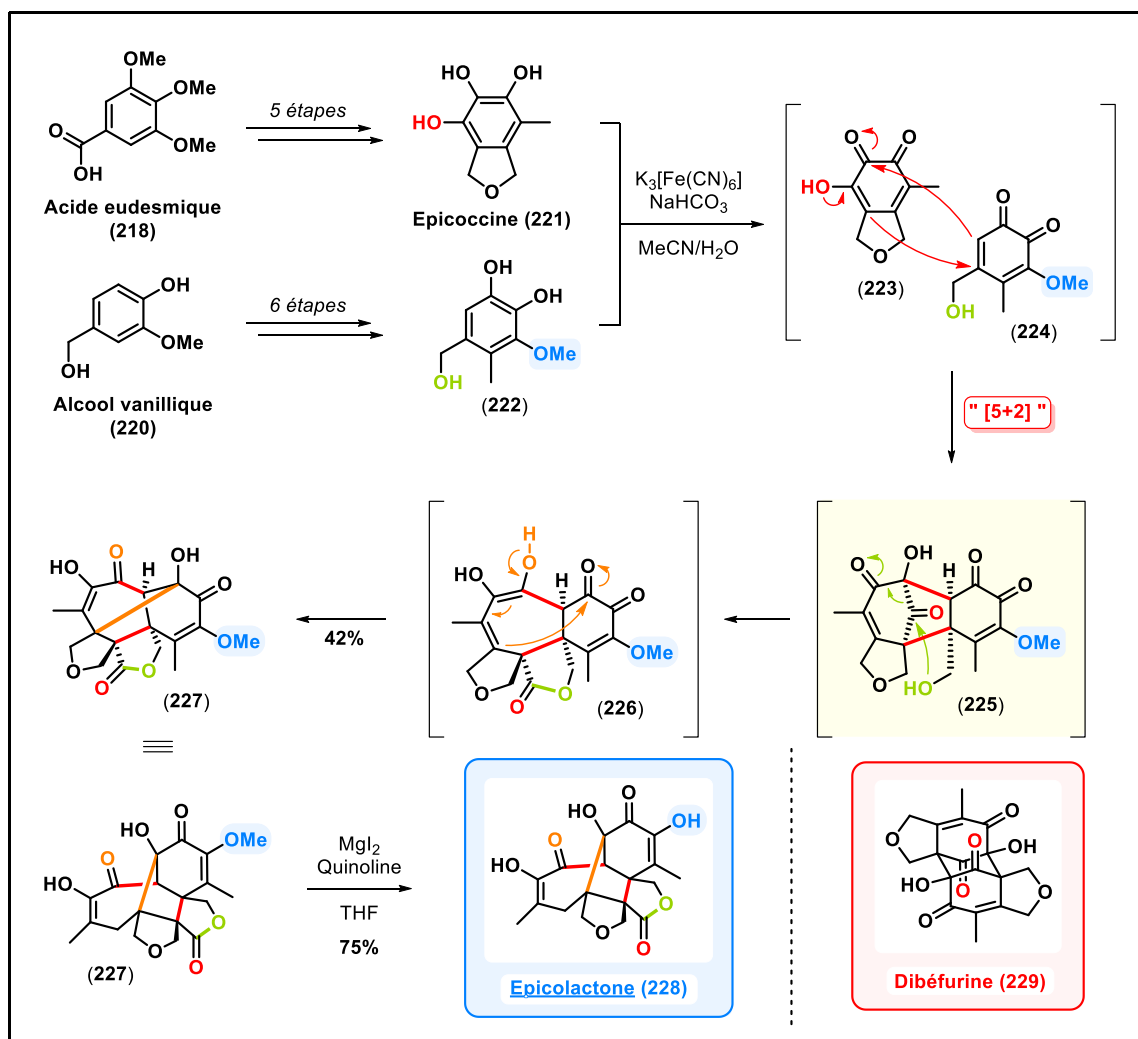


Schéma 59 – Synthèse totale de l'épicolactone (228) par D. Trauner.

Cet exemple d'hétérodimérisation, enclenchée par un unique évènement oxydant sur des polyphénols simples, suivi de deux réarrangements intramoléculaires, est particulièrement élégant et conforte les hypothèses mécanistiques de biosynthèse de la sclérocitrine (3) et de la chalcitrine (4), étant donné la forte proximité structurale avec les centres réactifs. Cependant, les auteurs ont noté que la présence du groupement méthyle sur le dérivé du pyrogallol (222) est nécessaire pour l'aboutissement de la cascade réactionnelle. En effet, il permet de stabiliser la forme *o*-quinone du dérivé du pyrogallol (224) et il semble limiter la multiplication des modes d'ancrage entre les deux substrats. Curieusement, aucun homodimère n'a été observé parmi les sous-produits de la réaction, bien que l'épiloccine (221), dans ces mêmes conditions, puissent réagir sur elle-même pour former la dibéfurine (229), comme cela a été montré par les auteurs en 2014.⁸⁶

3.2.2 Synthèse totale de la preuisolactone A (240) par D. Trauner

Dans la continuité de ce travail, l'équipe de D. Trauner a réalisé, en 2019, la synthèse totale d'un autre métabolite fongique issu de la même espèce de champignon : la preuisolactone A (240).²¹³ La même réactivité que pour l'épicolactone (228) a été observée (Schéma 60).

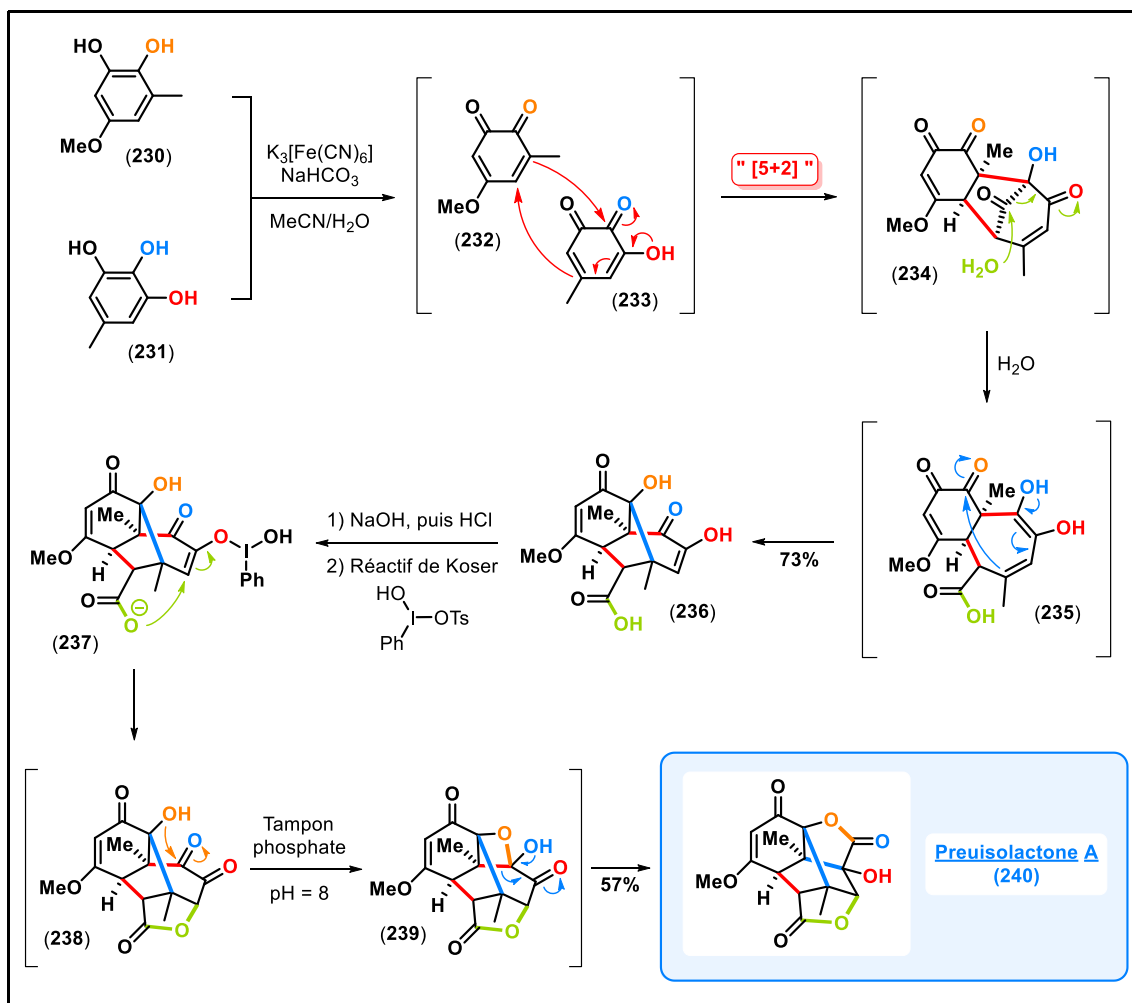


Schéma 60 – Synthèse totale de la preuisolactone A (240) par D. Trauner.

En présence de ferricyanure de potassium en condition basique, les dérivés du pyrogallol (231) et du pyrocatéchole (230) s'oxydent en *o*-quinones, enclenchant ainsi une cycloaddition de type [5+2]. On obtient, de nouveau, un intermédiaire ponté (234). Les traces d'eau dans le milieu réactionnel peuvent réagir sur la cétone pontée sous la forme d'une rétro-Dieckmann et libérer ainsi une fonction acide carboxylique (235). Par la suite, une aldolisation vinylogue partant du groupement hydroxyle en bleu (intermédiaire (235)) permet de générer le squelette tricyclique (236) du composé cible. La formation du quatrième et

dernier cycle est réalisée par addition de Michael du carboxylate en vert sur l'éther d'énol activé grâce au réactif de Koser. Lorsque le milieu réactionnel est neutralisé par un tampon phosphate, l'intermédiaire obtenu (**239**) subit spontanément un réarrangement de type « *acide benzilique* ». ^a Les auteurs obtiennent ainsi la preisolactone A (**240**) avec un rendement global de 37%.

Dans ce cas précis, contrairement à l'épicolactone (**228**), les auteurs n'ont pas réussi à obtenir la preisolactone A (**240**) en une seule étape à partir de l'oxydation initiale au ferricyanure de potassium. La dernière cyclisation nécessite l'utilisation du réactif de Koser en condition basique pour avoir lieu, même lorsque l'oxydation est initiée enzymatiquement (grâce à des peroxydases de raifort) ou que le cycloadduit obtenu (**236**) est laissé à l'air libre. Par ailleurs, de même que pour l'épicolactone (**228**), aucun produit d'homodimérisation des substrats de départ n'a été observé par les auteurs dans le brut réactionnel, alors que le 5-méthylpyrogallol (**231**), en présence de peroxydases de raifort et d'eau oxygénée, a montré qu'il peut réagir sur lui-même (Schéma 61) et donner un dimère (**241**) de structure particulièrement proche de la preisolactone A (**240**) avec un rendement de 91%. ²⁵

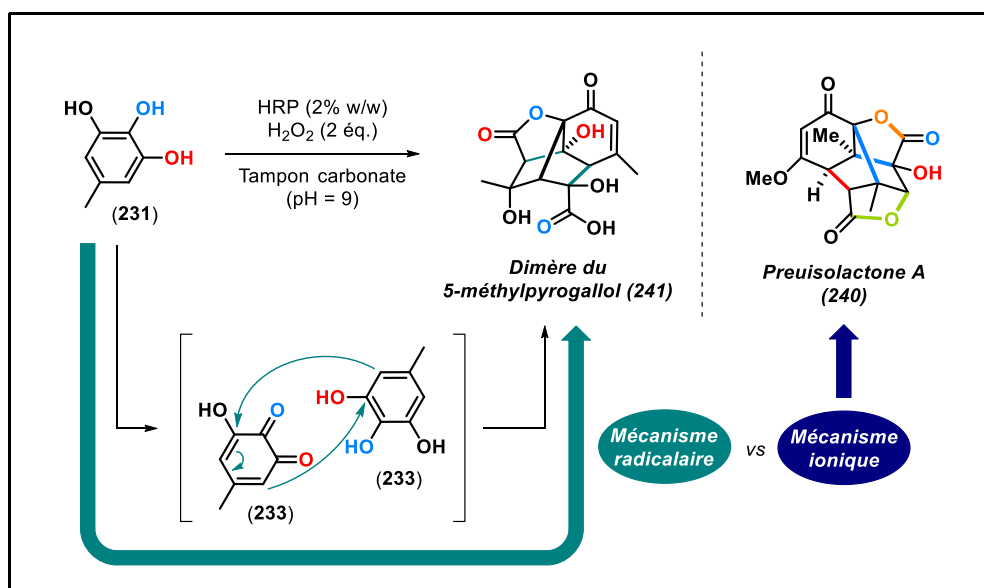


Schéma 61 – Synthèse d'un dimère du 5-méthylpyrogallol (**241**) à partir de peroxydases de raifort et d'eau oxygénée.

Ces différents résultats posent questions sur le type d'oxydant naturel susceptible d'induire de telles cascades réactionnelles et sur leurs capacités à générer préférentiellement

une homo- ou une hétérodimérisation. Les mécanismes impliqués confortent néanmoins nos hypothèses sur une potentielle dimérisation de l'acide xéromique.

3.2.3 Synthèse totale de la (-)-pérezopérezone (247) par J. Deng

Un exemple d'homodimérisation par cycloaddition de type [5+2] a été donné par l'équipe de J. Deng en 2019 avec la synthèse totale de la (-)-pérezopérezone (247),¹⁷² un dimère de structure bisabolène, extrait de *Pseudopterogorgia rigida* (de la famille des coraux *Gorgonacea*) en 2013.¹⁰¹ Bien que ce métabolite soit classé dans la catégorie des sesquiterpènes, on retrouve le motif central bicyclo[3.2.1]octadiénone déjà observé pour l'épicolactone et de nombreux autres produits naturels.

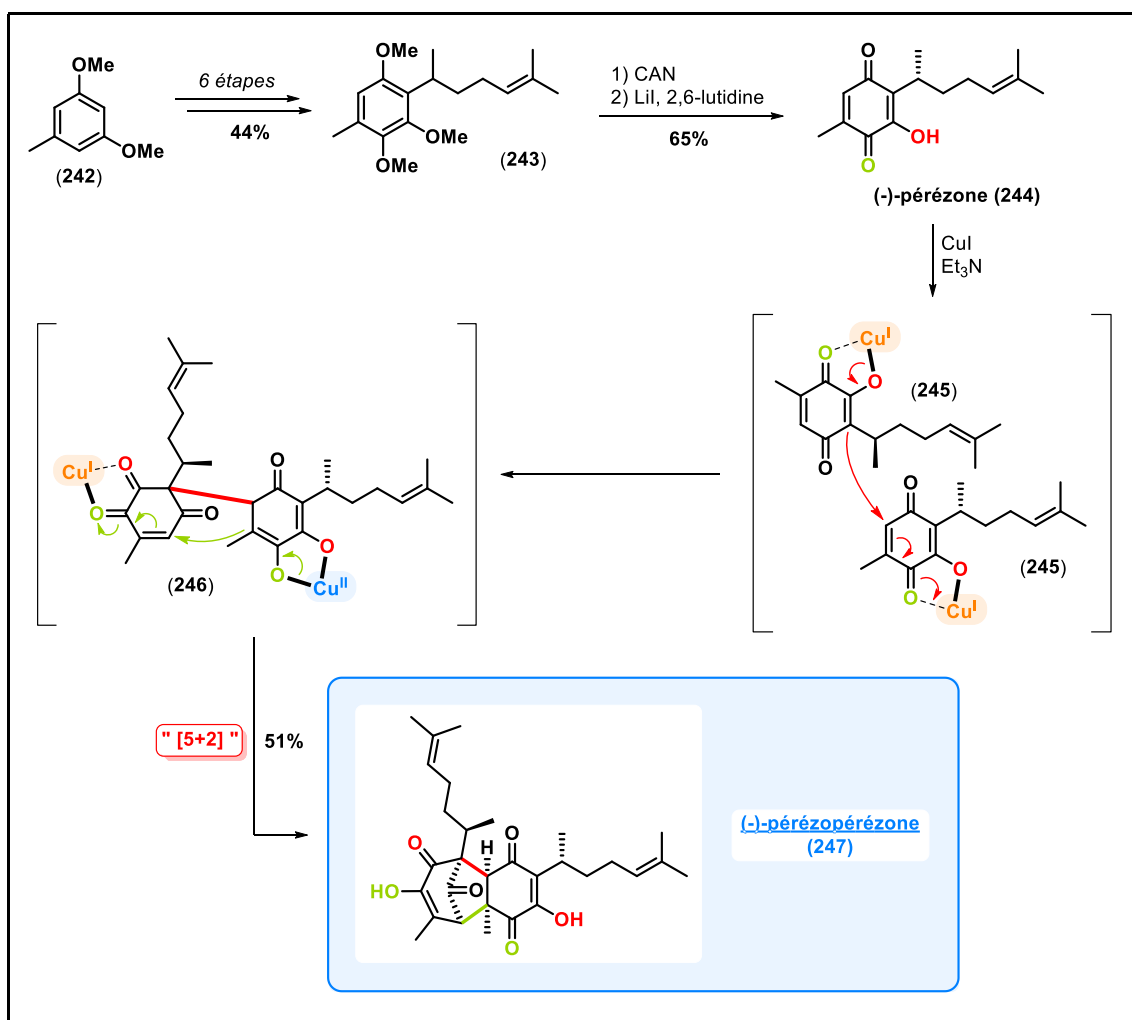


Schéma 62 – Synthèse totale de la (-)-pérezopérezone (247) par J. Deng.

Le métabolite monomérique correspondant à cette dimérisation est une hydroxy-*p*-quinone, appelée la (-)-pérezone (244), dont l'oxydation a été réalisée grâce au CAN à l'étape

précédente. Cette forme oxydée ne peut être engagée telle quelle dans le processus de dimérisation, elle doit être mise en présence de Cu(I) pour que la cycloaddition puisse avoir lieu. En effet, le complexe de cuivre ainsi formé (**245**) permet de stabiliser et d'activer le substrat sous la forme d'un accepteur et d'un donneur de Michael,²⁶⁶ capable de réagir sur lui-même (Schéma 62). Dans ce cas précis, aucun réarrangement intramoléculaire n'intervient sur l'adduit formé (**246**), on obtient directement la (-)-pérezopérezone (**247**), avec un rendement global de 15%. Cette synthèse totale permet de mettre en avant la nécessité de stabiliser les intermédiaires réactionnels de la cascade réactionnelle, notamment grâce à des complexes métalliques, comme on peut en retrouver au sein de métalloprotéines, sans quoi la réactivité se trouve annihilée.

CHAPITRE 1

**SYNTHÈSES TOTALES BIOMIMÉTIQUES
D'ACIDES PULVINIQUES**

ET

**ÉTUDE SPECTRALE DE LEURS
INTERMÉDIAIRES BISTÉTRONIQUES**



CHAPITRE 1 : SYNTHÈSES TOTALES BIOMIMÉTIQUES D'ACIDES PULVINIQUES ET ÉTUDE PHYSIQUE DE LEURS INTERMÉDIAIRES BISTÉTRONIQUES

1 SYNTHÈSES TOTALES BIOMIMÉTIQUES DES ACIDES ATROMENTIQUE, XÉROCOMIQUE ET VARIÉGATIQUE

1.1 Présentation du projet

Cette partie du projet de thèse a pour objectif de réaliser la synthèse totale biomimétique de l'acide xérocomique (utilisé plus tard comme intermédiaire pour la synthèse totale de la sclérocitrine et de la chalcitrine) et d'autres acides pulviniques de cette série chimique, comme l'acide atromentique et l'acide variégatique.

L'acide xérocomique a été synthétisé en laboratoire pour la première fois en 1973 par R. Edwards⁸⁴, selon la méthode dite de J. Volhard. A l'heure actuelle, on recense trois stratégies décrites dans la littérature pour réaliser la synthèse d'acides pulviniques : à partir d'un cœur tétronique pré-formé, à partir de phénylacétonitriles, ou bien par cyclisation intramoléculaire d'un diacide (appelée stratégie *bio-inspirée*).

1.1.1 Synthèse à partir d'un cœur tétronique pré-formé

Une première stratégie de synthèses totales d'acides pulviniques consiste à utiliser, comme substrat de départ, un cœur tétronique déjà formé, sur lequel les deux groupements aryliques sont greffés. On recense deux exemples suivant cette stratégie (Schéma 63) : le premier, développé par G. Pattenden en 1991, part d'un anhydride maléique (**250**). Cet anhydride peut réagir avec un diméthylphosphonate par réaction de Wittig pour former un phosphonate de buténolide (**251**). Ce phosphonate peut ensuite former le squelette pulvinique grâce à une réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons avec un ester pyruvique (**I**).²²⁵ Le deuxième exemple de cette stratégie de synthèse démarre de l'acide tétronique (**252**) proprement dit : par le biais d'une addition d'un ester pyruvique suivie d'une iodation, on obtient l'intermédiaire (**253**). Cet intermédiaire peut ensuite être fonctionnalisé par couplage de Suzuki-Miyaura pour obtenir le squelette pulvinique.²⁷ Grâce à cette deuxième stratégie,

les auteurs ont pu synthétiser l'acide xéromique avec un rendement global de **8,4%** pour 6 étapes.^b

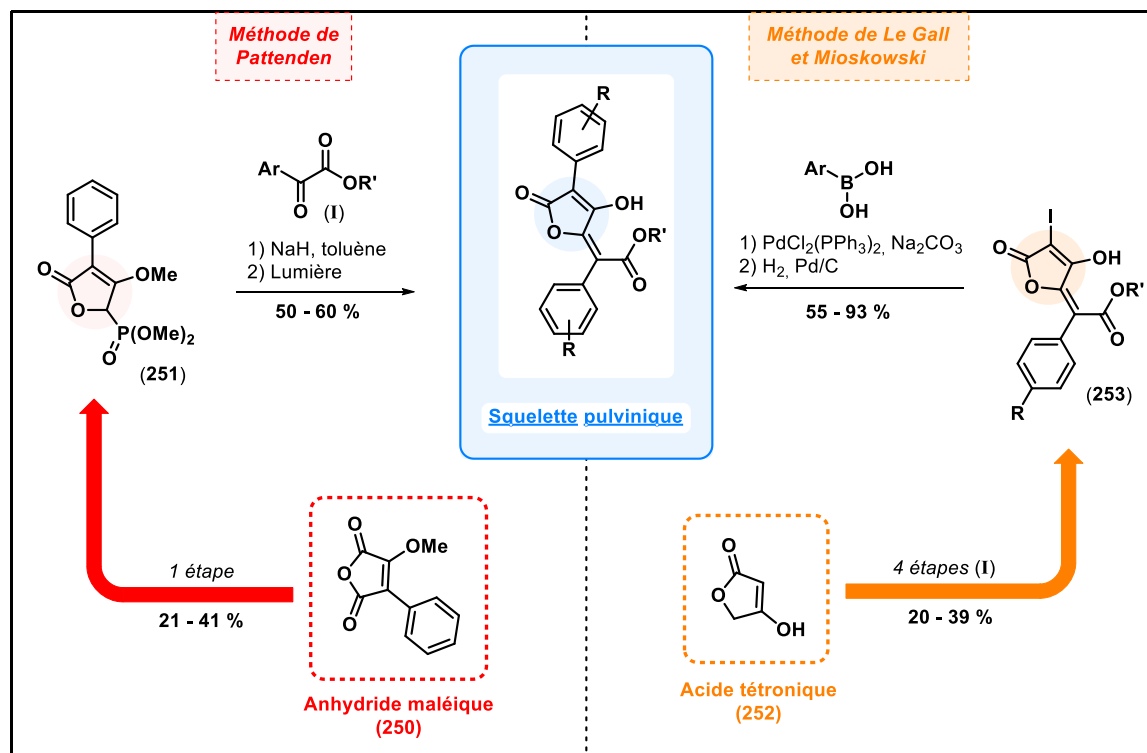
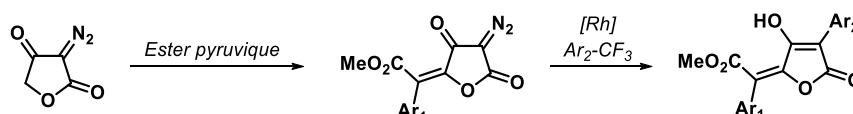


Schéma 63 – Synthèse du squelette pulvinique par fonctionnalisation d'un cœur tétronique pré-formé, selon la méthode de G. Pattenden²²⁵ ou de T. Le Gall et C. Mioskowski.²⁷

1.1.2 Cyclisation intramoléculaire d'un diacide linéaire

La deuxième voie de synthèse possible des acides pulviniques revient à additionner des phénylacétonitriles mono- ou di-méthoxylés sur un oxalate de diéthyle (**255**) en milieu basique. Historiquement, cette méthode a été la première à être développée en 1894 par J. Volhard.²⁸⁹ Depuis, elle a été reprise par P. Bischoff en 2011 pour la synthèse d'acides bistétroniques exclusivement symétriques¹⁶⁴ (Schéma 64). Au cours de ce doctorat, nous avons tenté d'associer cette méthode à la chimie combinatoire pour obtenir, en une seule étape, les dérivés de l'acide atromentique, xéromique et variégatique en ajoutant dans le milieu réactionnel simultanément, en proportion 1:1, des phénylacétonitriles mono- ou di-

^b Notons qu'en 2016, S. V. Pansare *et al.* ont développé une voie de synthèse de dérivés proches de l'acide xéromique (**7**), comme l'ester méthylisoxéromate, l'acide pulvinique (**323**), l'acide pinastrique (**291**) et l'acide 4-hydroxypulvinique.



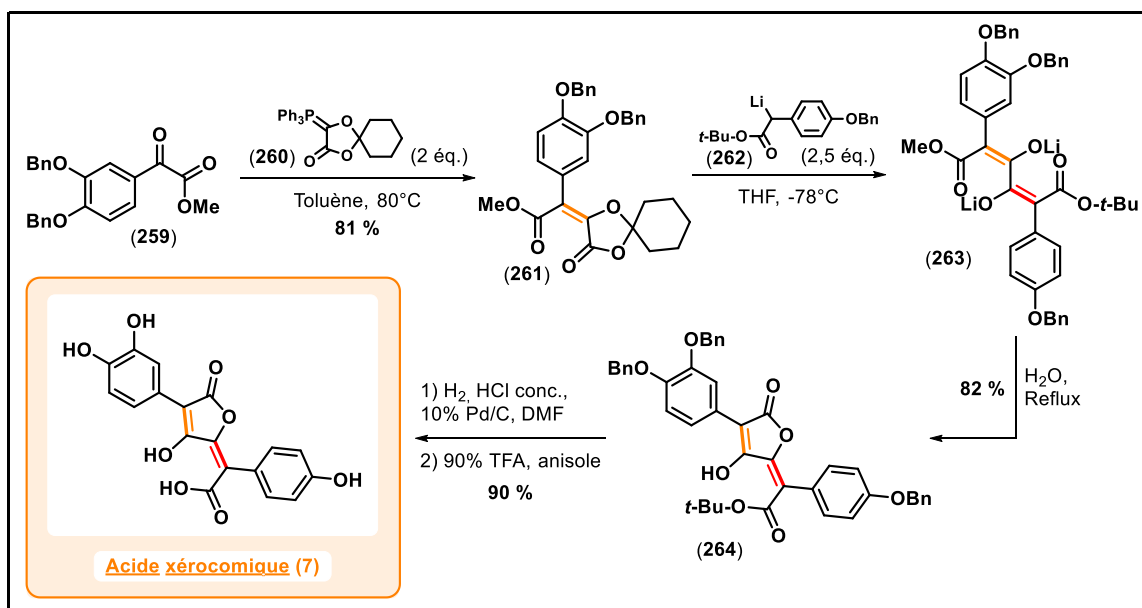


Schéma 65 – Première stratégie bio-inspirée par R. Ramage en 1984.²³³

Au moment de sa publication, cette stratégie a été qualifiée de *biomimétique*, car elle reprend l'idée d'une cyclisation intramoléculaire d'un diacide linéaire (263), comme cela a été présenté sur le Schéma 9 dans l'introduction générale à la section 2.1.2 (page 50). Néanmoins, grâce au travail réalisé par H. W. Moore et R. J. Wickholm sur les contractions de cycle de benzoquinone (présenté sur le Schéma 53, page 83), il est possible d'être encore plus ambitieux et de chercher à réaliser l'étape clé de la biosynthèse des acides pulviniques, à savoir la contraction de cycle d'une dihydroxy-*p*-benzoquinone fonctionnalisée par deux groupements phénoliques différents. C'est ce que nous avons cherché à faire dans cette première partie du projet de thèse. Par ailleurs, au terme de cette présentation des trois stratégies développées dans la littérature pour la synthèse du squelette pulvinique, nous pouvons noter que seules deux d'entre elles ont permis d'aboutir réellement à la synthèse de l'acide xéromique : la méthode de T. Le Gall/C. Mioskowski (partie 1.1.1 de ce chapitre – page 99) et la méthode de R. Ramage (partie 1.1.3 de ce chapitre – page 101). Dans ce contexte, il est pertinent de chercher à développer une nouvelle stratégie de synthèse de ce métabolite, notamment biomimétique.

1.2 Résultats et discussion

1.2.1 Première tentative de synthèse totale de l'acide xérocomique (7) par la méthode de J. Volhard/P. Bischoff

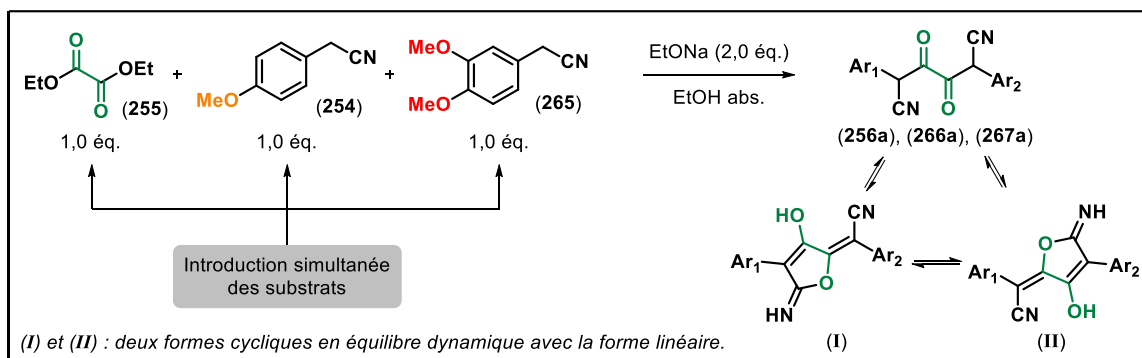
1.2.1.1 Présentation générale de la stratégie de synthèse

Comme cela a été présenté dans la partie 1.1.2 de ce chapitre (page 100), la première synthèse historique des acides pulviniques a été réalisée en 1894 par J. Volhard.²⁸⁹ Cette méthode est particulièrement attrayante, car elle permet d'accéder au squelette pulvinique en seulement 3 étapes à partir de substrats simples (*i. e.* l'oxalate de diéthyle (**255**) et des dérivés de phénylacétonitriles) et des réactifs usuels (*i. e.* EtONa, H₂SO₄ et Ac₂O), c'est pourquoi elle a été reprise, adaptée et optimisée par P. Bischoff en 2011. A cette époque, cette méthode a été principalement appliquée à la synthèse d'acides bistétroniques exclusivement symétriques, ce qui a permis à P. Bischoff d'obtenir le précurseur de l'acide atromentique (**258**) (cf Schéma 64 – page 101).¹⁶⁴ On ne dénombre qu'un seul exemple de synthèse d'un acide pulvinique dissymétrique rapporté dans la littérature : il s'agit de la synthèse de l'acide isopinastrique en 1958 par P. K. Grover, sans qu'aucun détail expérimental ne soit fourni.¹¹⁰ Or, l'acide xérocomique est un acide pulvinique dissymétrique. Nous avons donc tenté, au cours de ce doctorat, de reprendre cette méthodologie et de nous l'approprier en l'associant à la chimie combinatoire pour obtenir le précurseur de l'acide xérocomique en une seule étape, ce qui revient à ajouter dans le milieu réactionnel des phénylacétonitriles mono- ou di-méthoxylés simultanément. Par ce biais, nous cherchions également à former d'autres précurseurs d'acides pulviniques (comme les dérivés de l'acide atromentique et variégatique) au cours de la même réaction. Notre objectif était d'utiliser cette méthodologie déjà publiée pour synthétiser l'acide xérocomique rapidement et en grande quantité, afin de pouvoir mener en parallèle les essais de dimérisation en condition oxydante *ET* le développement d'une voie de synthèse biomimétique de l'acide xérocomique.

Ainsi, la méthodologie de synthèse de J. Volhard/P. Bischoff que nous avons suivie comporte trois étapes, que nous allons décrire ci-dessous :

① La 1^{ère} étape consiste en la condensation de deux phénylacétonitriles sur l'oxalate de diéthyle (**255**). Dans le cadre de notre stratégie de chimie combinatoire, deux phénylacétonitriles seront introduits simultanément dans le milieu réactionnel : le *p*-méthoxyphénylacétonitrile (**254**) et le 3,4-diméthoxyphénylacétonitrile (**265**). On doit ainsi

obtenir trois composés correspondant à l'accrochage statistique des deux phénylacétonitriles (254) et (265) sur l'oxalate de diéthyle (255). Il est à noter que pour chaque intermédiaire formé, il existe un équilibre dynamique entre la forme linéaire et deux formes cycliques (Schéma 66).



	<u>Ar₁</u>	<u>Ar₂</u>	<u>Proportions attendues</u>
Précurseur de l'acide atromentique - (256a)			25%
Précurseur de l'acide xérocômique - (266a)			25%
Précurseur de l'acide xérocômique - (266a)			25%
Précurseur de l'acide variégatique - (267a)			25%

Schéma 66 – Condensation des phénylacétonitriles (254) et (265) sur l'oxalate de diéthyle (255) (selon les conditions développées par J. Volhard et P. Bischoff)^{164, 289} par chimie combinatoire.

② La deuxième étape consiste en une hydrolyse sulfurique des groupements nitriles des intermédiaires (256a), (266a) et (267a), pour obtenir des groupements carboxyliques (Schéma 67). Notons que l'intermédiaire formé (I) possède deux carbonyles qui sont en équilibre avec leurs formes énol correspondantes (II). Théoriquement, une cyclisation intramoléculaire peut donc intervenir spontanément entre les énols et les groupements carboxyles, permettant ainsi la formation du cœur tétronique commun à quatre acides pulviniques (Schéma 67).

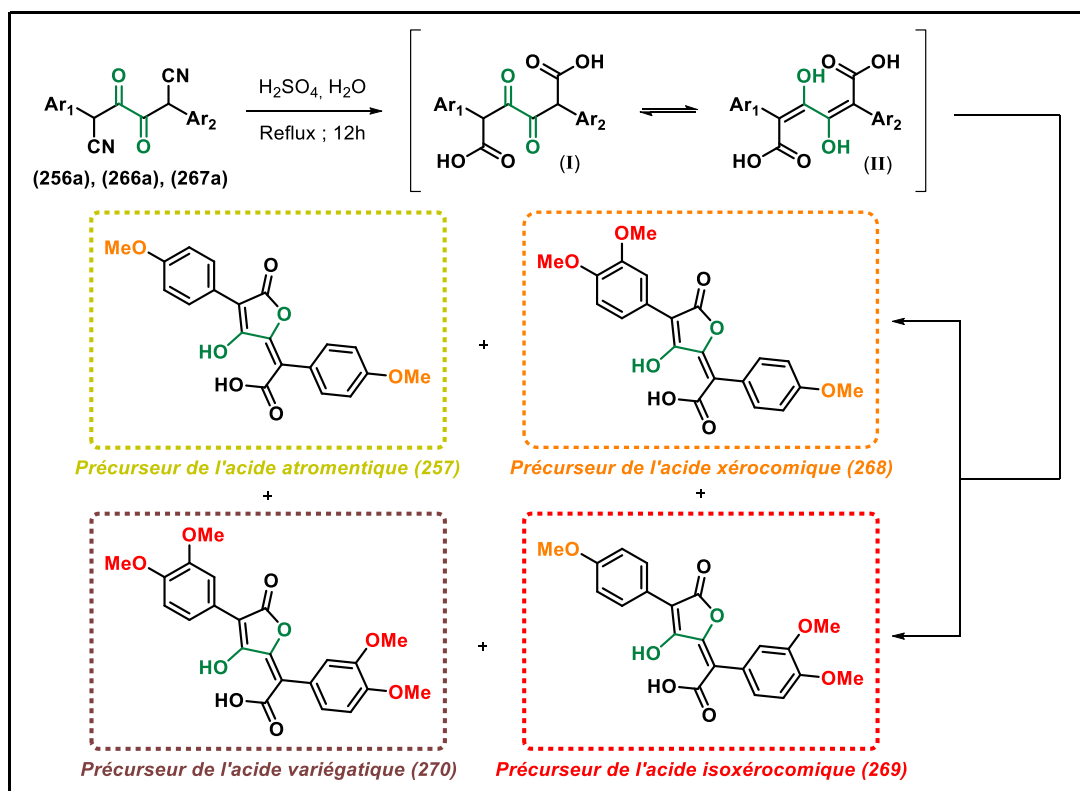


Schéma 67 – Hydrolyse acide des intermédiaires (256a), (266a) et (267a) induisant une cyclisation intramoléculaire spontanée aboutissant aux quatre précurseurs d'acides pulviques (257), (268), (269) et (270).

③ Cependant, l'étape d'hydrolyse sulfurique n'arrive pas toujours à son terme, le brut réactionnel résultant comporte un mélange d'acides et d'amides, il est donc particulièrement complexe et difficile à purifier. Une 3^e étape est donc requise pour éclaircir le brut réactionnel. Elle consiste en une déshydratation en chauffant au reflux dans l'anhydride acétique. L'objectif de cette dernière étape est d'achever l'hydrolyse des fonctions azotées et la cyclisation intramoléculaire des différents intermédiaires, ce qui permet d'aboutir à la formation de trois acides bistétroniques (258), (271) et (272) (Schéma 68).

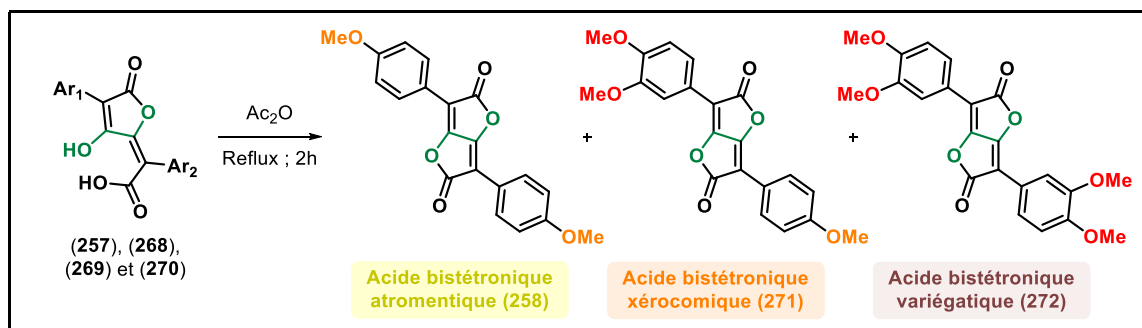


Schéma 68 – Synthèse des acides bistétroniques atromentique (258), xérocomique (271) et variégatique (272) par chauffage à reflux dans l'anhydride acétique de dérivés pulviques.

Ainsi, la déshydratation par l'anhydride acétique clôt la séquence réactionnelle proposée par J. Volhard et P. Bischoff. Après purification et séparation des différents acides bistéroniques du brut réactionnel, il suffit *in fine* de réaliser l'hydrolyse de l'un des deux acides tétroniques pour obtenir l'acide xéromique (**7**) en tant que tel. Les résultats expérimentaux de cette séquence réactionnelle sont présentés dans les parties 1.2.1.2 et 1.2.1.3 de ce chapitre. Il est à noter que nous avons choisi de réaliser les trois étapes de cette séquence réactionnelle sans purification intermédiaire, afin de déterminer à quelle étape la séparation des produits de synthèse di-méthoxylé, tri-méthoxylés et tétra-méthoxylé pouvait être réalisée le plus facilement.

1.2.1.2 Condensation des phénylacétonitriles sur l'oxalate de diéthyle

Pour rappel, la première étape de notre séquence réactionnelle consiste en la condensation de deux phénylacétonitriles (**254**) et (**265**) sur l'oxalate de diéthyle (**255**), selon un protocole monotope nécessitant l'introduction simultanée des réactifs, permettant ainsi d'obtenir les trois composés (**256a**), (**266a**) et (**267a**) (Schéma 69).

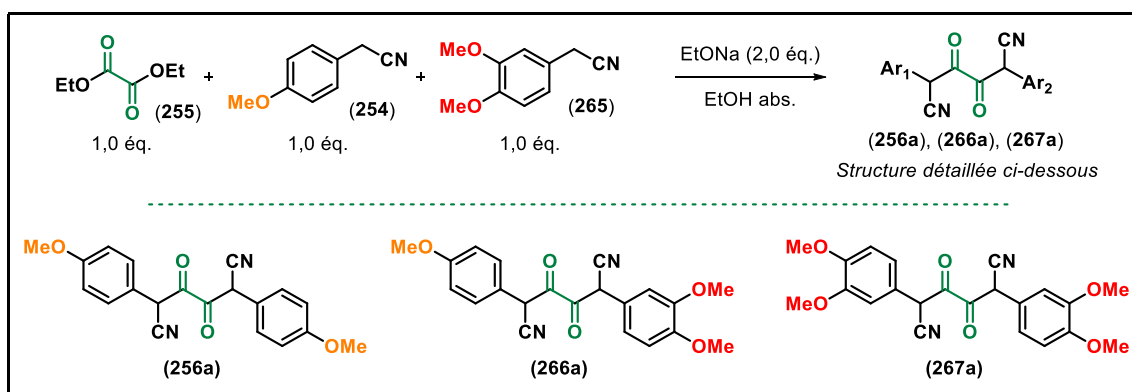


Schéma 69 – Première étape de la séquence réactionnelle, *i. e.* la condensation des phénylacétonitriles sur l'oxalate de diéthyle.

Le meilleur rendement que nous avons obtenu lors de cette étape a été de **53%** en produits totaux. Une analyse par HPLC-MS a confirmé la répartition statistique des trois composés (**256a**), (**266a**) et (**267a**), *i. e.* 25% du composé (**256a**), 50% du composé (**266a**) et 25% du composé (**267a**). Cependant, à ce stade de la séquence réactionnelle, il n'était pas possible de résoudre le mélange de produits par chromatographie. Donc, nous pouvons seulement calculer les rendements de la réaction à partir de la masse du brut réactionnel sec et de l'analyse HPLC-MS, à savoir : 13% pour le composé (**256a**), 26 % pour le composé (**266a**)

et 13% pour le composé (**267a**). Nous avons également pu confirmer par RMN l'équilibre entre les formes ouvertes et fermées de ces trois composés.

L'inconvénient majeur de cette réaction est sa faible reproductibilité, notamment en raison de la sensibilité de l'éthanolate de sodium (EtONa) à l'humidité.^c Nous avons tenté d'y remédier en préparant EtONa extemporanément, mais sans succès. Nous avons donc décidé de le remplacer par le *tert*-butylate de potassium (*t*-BuOK) dans le THF (ces conditions ont été développées par P. Bischoff pour le même type de condensation mais sur des substrats de structures légèrement différentes).¹⁶⁴ L'utilisation de cette base a permis d'obtenir des rendements similaires, à savoir 24% en composé (**266a**) dissymétrique contre 26% lors de l'utilisation d'EtONa, tout en améliorant considérablement la reproductibilité de cette réaction. Ces conditions de condensation ont donc été conservées.

Ajout séquentiel des phénylacétonitriles :

En parallèle de ces travaux d'optimisation, nous avons voulu étudier la différence entre un ajout simultané des phénylacétonitriles par rapport à un ajout séquentiel sur le rendement global de la réaction. Notre objectif était de mieux comprendre le mécanisme réactionnel, afin de pouvoir, à terme, dépasser les 53% de rendement global décrits précédemment (Schéma 70).

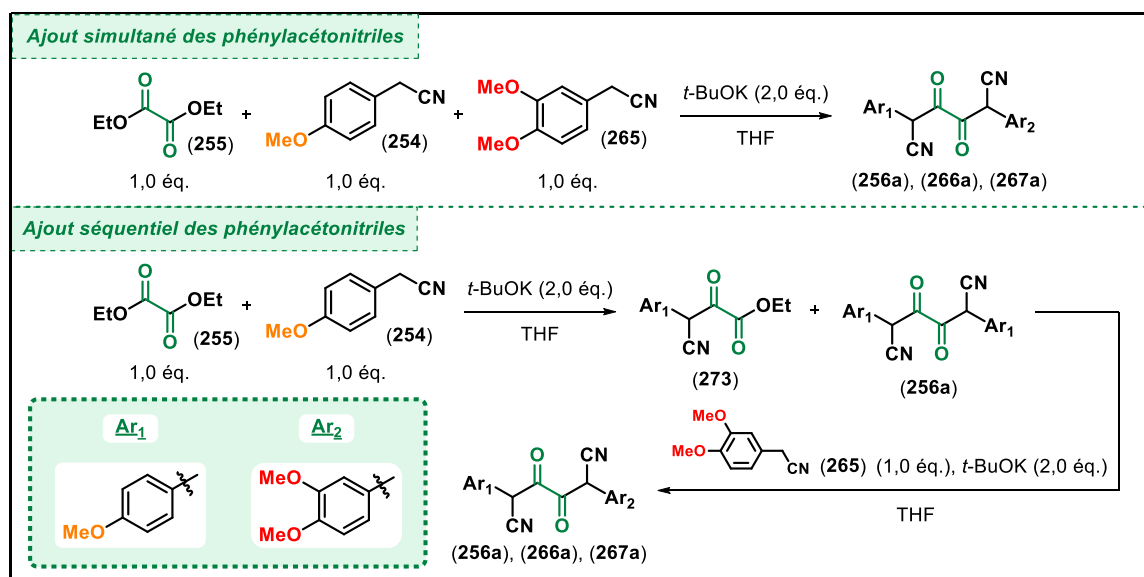


Schéma 70 – Comparaison d'un ajout simultané des phénylacétonitriles par rapport à un ajout séquentiel.

^c Cette assertion est justifiée par le fait que l'éthanolate de sodium commercial est inefficace.

Concrètement, l'ajout séquentiel des deux phénylacétonitriles a permis d'améliorer de 15 à 20% la répartition statistique en faveur du produit dissymétrique (**266a**), précurseur de l'acide xéromique. Cependant, nous avons remarqué qu'un phénomène de transalkylation se produisait. En effet, au cours d'un essai, nous avons purifié le composé (**273**), puis nous l'avons mis en réaction avec le diméthoxyphénylacétonitrile (**265**). Après purification du brut réactionnel, les deux composés (**266a**) et (**267a**) ont été identifiés (Schéma 71). Cet effet justifie le fait que cette méthodologie de synthèse n'a été employée, jusqu'à présent, que pour des composés symétriques.

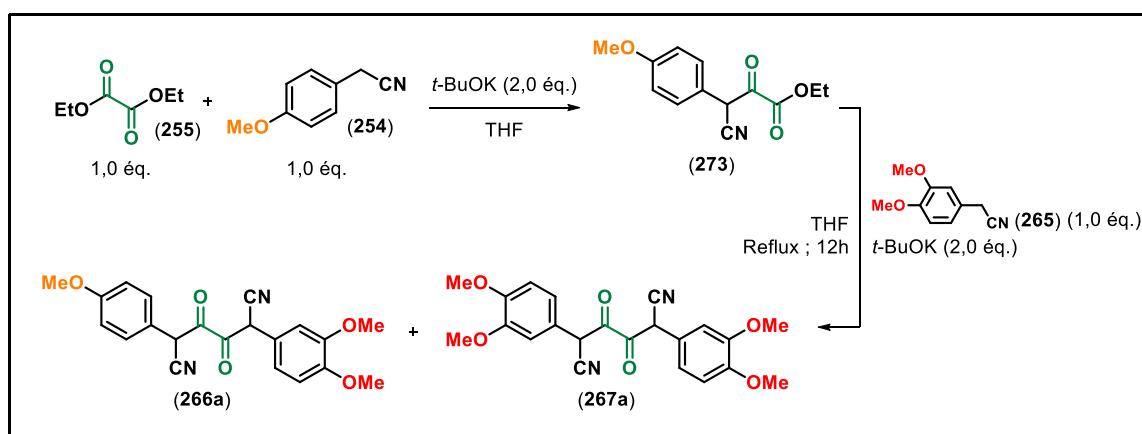


Schéma 71 – Transalkylation du composé (**273**) au cours du 2^e ajout de phénylacétonitrile.

Cependant, nous avons remarqué que le phénomène de transalkylation est très largement amoindri lorsqu'on remplace *t*-BuOK/THF par NaH/1,4-dioxane lors du 2^e ajout. La question de remplacer le système *t*-BuOK/THF dès le premier ajout s'est alors posée, avec l'objectif affiché de pouvoir revenir à un protocole monotope. Mais cela ne s'est pas avéré judicieux, car NaH/1,4-dioxane favorise la double fonctionnalisation de l'oxalate de diéthyle (*i. e.* la formation du composé (**256a**)), alors que notre produit d'intérêt est le composé dissymétrique (**266a**).

Ainsi, nous pouvons conclure de ces observations que le phénomène de transalkylation est sans doute responsable du faible rendement global observé (53%), car il consomme inutilement une partie non négligeable des réactifs, au lieu de favoriser le double ancrage des phénylacétonitriles sur l'oxalate de diéthyle. Malgré tout, les rendements en composés (**256a**), (**266a**) et (**267a**) étant décents, nous avons pu poursuivre la séquence réactionnelle, en réalisant l'hydrolyse des fonctions nitriles.

1.2.1.3 Hydrolyse sulfurique des fonctions nitriles

La deuxième étape de la séquence réactionnelle consiste à hydrolyser les fonctions nitriles des produits de fonctionnalisation de l'oxalate de diéthyle obtenues précédemment en acides carboxyliques. Pour cela, un chauffage au reflux dans l'acide sulfurique est nécessaire (Schéma 72).

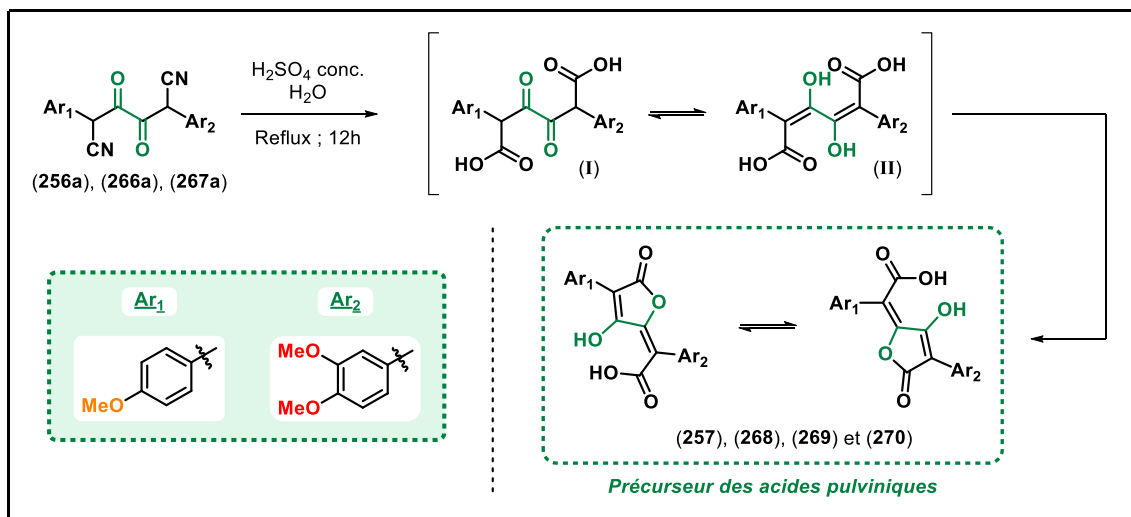


Schéma 72 – Hydrolyse sulfurique des groupements nitriles des composés (256a), (266a) et (267a) en acides carboxyliques, suivie d'une cyclisation spontanée aboutissant à la formation des composés (257), (268), (269) et (270).

Comme cela a été présenté précédemment, les groupements carboxyliques ainsi formés peuvent, par la suite, réagir avec les fonctions énol en position γ (en vert sur le Schéma 72) au cours d'une cyclisation spontanée. Ainsi, on forme le cœur tétronique des acides pulviniques visés. L'analyse systématique du brut réactionnel par HPLC-MS a permis de mettre en évidence la consommation totale des substrats initiaux, ainsi que la présence d'analogues mono- et di-azotés des produits désirés. La présence de ces composés azotés s'explique par l'hydrolyse incomplète des nitriles en amides intermédiaires (Schéma 73).

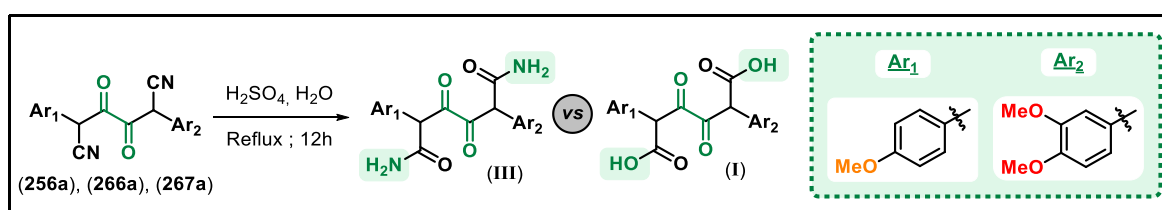


Schéma 73 – Hydrolyse partielle des fonctions nitriles en amides.

L'application de temps de réactions plus longs et l'augmentation du nombre d'équivalent d'acide n'ont, malheureusement, pas permis d'amener l'hydrolyse à son terme, mais ont plutôt entraîné la dégradation du brut réactionnel. Ne pouvant pas amener l'hydrolyse à son terme, nous nous retrouvions donc en présence d'un brut réactionnel riche, complexe et difficile à purifier. Par conséquent, nous avons décidé de réaliser une étape supplémentaire de chauffage au reflux dans l'anhydride acétique, comme proposé par P. Bischoff *et al.*,¹⁶⁴ afin d'achever l'hydrolyse des fonctions azotées et de favoriser la cyclisation en acide bistétronique (Schéma 74). Ainsi, cette étape supplémentaire présente l'avantage de résoudre le mélange et donc de faciliter la séparation des trois produits de synthèse issus de notre démarche combinatoire.

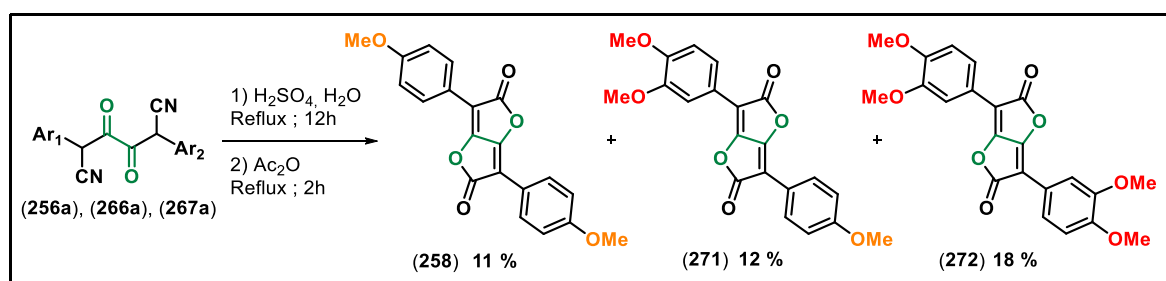


Schéma 74 – Synthèse des acides bistétroniques (258), (271) et (272) à partir des produits d'alkylation de l'oxalate de diéthyle (256a), (266a) et (267a).

Bien que cette étape soit très élégante et ait présenté, lors de certains essais, un rendement global de 98%, nous nous sommes rapidement heurtés à sa faible reproductibilité. Ne parvenant pas à trouver d'alternatives pour éviter la dégradation du brut réactionnel lors de cette étape finale, nous avons décidé de laisser de côté cette stratégie de synthèse et de nous concentrer sur le développement d'une voie de synthèse biomimétique de l'acide xérocomique (qui sera présentée dans la partie 1.2.2 de ce chapitre – page 110).

1.2.2 Présentation de la voie de synthèse biomimétique de l'acide xérocomique développée au cours du projet de thèse

Dans un premier temps, la synthèse totale de l'acide xérocomique à laquelle nous avons abouti est présentée dans son ensemble sur le Schéma 75. Les essais d'optimisation et les subtilités de chaque étape de cette synthèse seront détaillés dans la partie suivante.

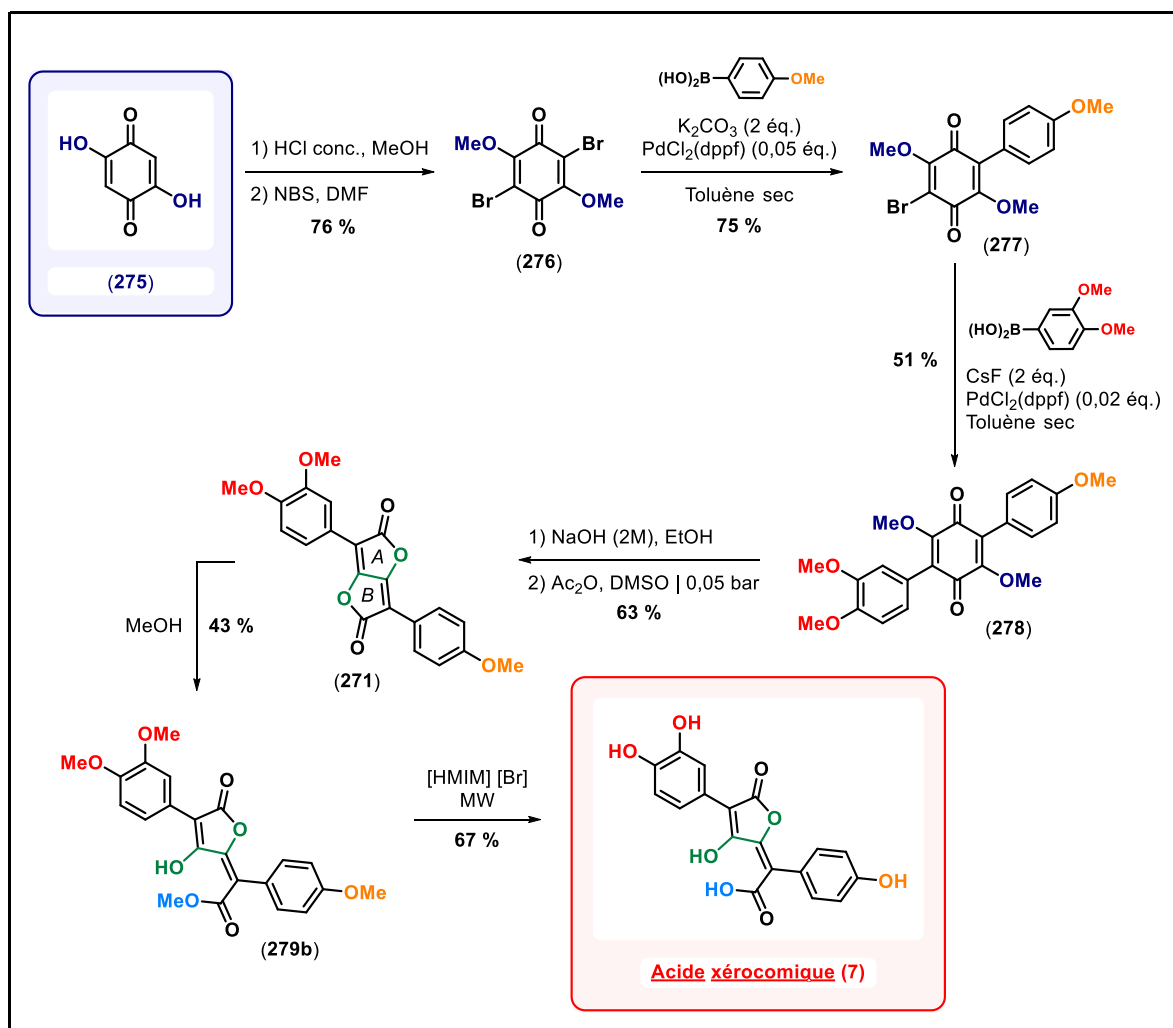


Schéma 75 – Voie de synthèse de l'acide xérocannique (7) développée au laboratoire.

La synthèse débute avec une dihydroxyquinone (275), qui est méthylée en milieu acide, puis bromée grâce au NBS. L'intermédiaire obtenu (276) est ensuite engagé dans deux couplages de Suzuki-Miyaura séquentiels.⁹⁸ On obtient ainsi une terphénylquinone (278), correspondant aux dérivés des acides polyporiques dans la biosynthèse des acides pulviniques. L'étape suivante est l'étape clé de la synthèse biomimétique, puisqu'il s'agit de réaliser la contraction de cycle de la terphénylquinone (278). Pour cela, une hydrolyse à la soude⁸⁷ permet de libérer les fonctions hydroxyles portées par la quinone (en bleu foncé sur le Schéma 75). Les conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm (Ac_2O , DMSO)²⁰⁰ peuvent alors être appliquées et on obtient un acide bistétronique (271) (le mécanisme de cette réaction est présenté sur le Schéma 53 – page 83). En chauffant au reflux dans le méthanol, on réalise la mono-ouverture du cycle A et du cycle B : ces deux composés (279a) et (279b) sont séparables par chromatographie. Le précurseur de l'acide xérocannique (279b) correspond à

l'ouverture du cycle B et a pu être caractérisé par diffraction des RX. Une dernière étape de déprotection par chauffage micro-onde dans un liquide ionique²⁷⁶ permet d'obtenir l'acide xérocomique (**7**) avec un rendement de **5,3%** pour 8 étapes.

Chaque étape de synthèse et les optimisations qui ont été réalisées au cours de ce travail de thèse sont développées dans les parties suivantes.

1.2.3 Optimisation de la synthèse de la terphénylquinone

1.2.3.1 Méthylation et bromation de la dihydroxyquinone

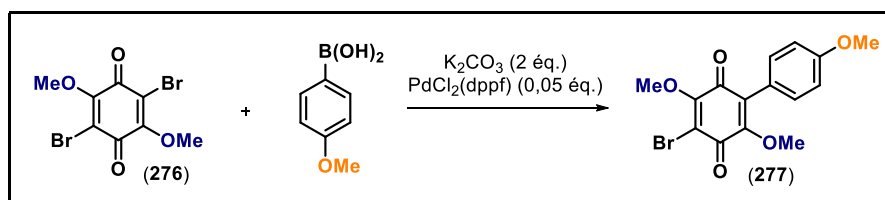
La méthylation et la bromation de la dihydroxyquinone (**275**) sont des étapes simples qui ne nécessitent pas de purification élaborée (les produits sont obtenus par précipitation et filtration) et qui supportent une montée en échelle sur plusieurs dizaines de grammes, ce qui est non négligeable au début d'une synthèse multi-étapes. Il est important de noter qu'il n'est pas nécessaire de recristalliser le NBS avant utilisation, au risque d'annihiler la réactivité : les traces de Br₂ présentes dans le solide semblent requises pour enclencher la bromation. Tant est si bien que l'ajout de quelques gouttes de Br₂ permet d'augmenter le rendement de la bromation lorsqu'on utilise une bouteille neuve de réactif. Néanmoins, nous avons décidé de continuer à travailler avec le NBS, car les rendements sont similaires, c'est un réactif plus facile à manipuler, moins dangereux et il permet un traitement plus simple en fin de réaction. De plus, nous avons remarqué que la dibromodiméthoxyquinone (**276**) précipite plus facilement lorsque la bromation a été réalisée par NBS, plutôt que par Br₂.

1.2.3.2 Couplages séquentiels de Suzuki-Miyaura

Optimisation des conditions expérimentales :

Les couplages pallado-catalysés constituent une approche stratégique en synthèse totale, car ils permettent un bon contrôle de l'ajout de groupements aromatiques. Dans notre cas, les deux acides boroniques impliqués préfigurent les substituants des acides pulviniques que nous cherchons à synthétiser. Dans ce but, nous nous sommes appuyés sur la méthodologie développée par X. Gan en 2009 pour la synthèse de la leucomelone (**280**).⁹⁸ Ainsi, nous avons utilisé PdCl₂(dppf) comme catalyseur et K₂CO₃ et CsF comme bases (respectivement, pour le premier et le deuxième couplage).

En première intention, nous avons réalisé les couplages avec un montage expérimental classique (chauffage au reflux sous argon), mais les rendements obtenus pour les deux couplages n'étaient pas satisfaisants, car loin des rendements décrits dans la publication de référence. En effet, le **premier couplage** réalisé dans le THF à 80°C pendant 24h fournissait le produit (**277**) avec un rendement de **32%** et le **second couplage** réalisé dans le toluène à 145°C pendant 24h en tube scellé plafonnait à **50%** de rendement. Ces faibles rendements peuvent s'expliquer par la difficulté à maintenir le montage expérimental sous atmosphère inerte en l'absence de rampe à argon. Suivant les observations de A. Ghods,¹⁰² nous avons cherché à améliorer la séquence de couplage en la réalisant sous irradiation aux micro-ondes (MW). L'influence du solvant, de la température et de la durée de réaction ont ainsi été évaluées (Tableau 4 et Tableau 5).

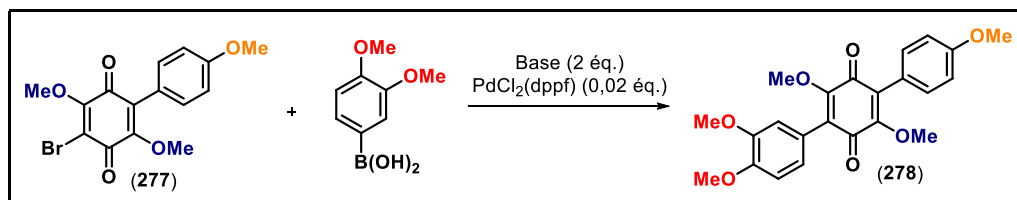


<u>Entrée</u>	<u>Solvant</u>	<u>Température</u>	<u>Durée</u>	<u>Rendement</u>
1	Dioxane	120 °C	20 min	12%
2	Dioxane	120 °C	12 h	55%
3	THF	120 °C	12 h	< 5%
4	1,3-dichlorobenzène	120 °C	12 h	8,5%
5	Toluène	120 °C	12 h	75%
6	Toluène	150 °C	2 h	29%

Tableau 4 – Méthodologie pour le premier couplage de Suzuki-Miyaura sous irradiation micro-ondes (MW).

Dans le cas du **premier couplage** (Tableau 4), nous avons testé les trois solvants proposés dans l'article de X. Gan⁹⁸ : le dioxane (solvant optimum de l'article), le THF et le toluène. Nous avons également souhaité évaluer l'influence du 1,3-dichlorobenzène sur le rendement de la réaction, car il s'agit d'un solvant plus adapté aux réactions aux micro-ondes. En effet, sa très haute température d'ébullition (172°C) et son moment dipolaire élevé sont adaptés à un chauffage aux micro-ondes. Les meilleurs rendements ont été obtenus pour les essais dans le toluène avec un **rendement optimisé de 75%**. Ce couplage réalisé dans le toluène est avantageux, car il laisse entrevoir la possibilité de réaliser le deuxième couplage, lui aussi dans le toluène, par un procédé monotope séquentiel.

Pour le **deuxième couplage** (Tableau 5), les différentes bases proposées dans l'article de X. Gan ont été testées : CsF et K₂CO₃,⁹⁸ avec l'idée de pouvoir utiliser le même couple base/solvant pour les deux couplages.



<u>Entrée</u>	<u>Solvant</u>	<u>Base</u>	<u>Température</u>	<u>Durée</u>	<u>Rendement</u>
1	Toluène	CsF	120 °C	12 h	32%
2	Toluène	K ₂ CO ₃	120 °C	12 h	28%
3	Toluène	CsF	200 °C	4 h	17%
4	Toluène	K ₂ CO ₃	200 °C	4 h	11%

Tableau 5 – Méthodologie pour le deuxième couplage de Suzuki-Miyaura sous irradiation micro-ondes (MW).

Cette étude méthodologique montre qu'avec des conditions de températures et de durée de réaction similaires, la base CsF permet systématiquement d'obtenir de meilleurs rendements en terphénylquinone dissymétrique (**278**) (32% vs 28% et 17% vs 11%). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que CsF est une base plus forte que K₂CO₃ (F⁻ est un meilleur nucléophile que CO₃²⁻, car moins encombré). Or, l'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique est un acide boronique plus enrichi (donc moins réactif) que l'acide 4-méthoxyphénylboronique utilisé lors du premier couplage. L'utilisation d'une base plus forte comme CsF est donc nécessaire pour former un boronate suffisamment réactif pour réaliser le couplage avec la quinone mono-arylée (**277**).^d Par ailleurs, le Tableau 5 montre que le meilleur rendement pour le deuxième couplage de Suzuki-Miyaura par irradiation aux micro-ondes est de 32%, ce qui n'apporte pas d'amélioration par rapport au chauffage au reflux conventionnel (dont le rendement est de **51%**). Le chauffage par voie thermique sera donc conservé pour la réalisation du second couplage.

Ainsi, d'après ces différents essais d'optimisation, nous concluons que le premier couplage doit être réalisé dans le toluène sous irradiation aux micro-ondes. Puis, le second acide boronique, la base CsF et le catalyseur PdCl₂(dppf) sont ajoutés au milieu réactionnel et

^d Cette assertion est justifiée par le fait que l'utilisation de CsF comme base lors du premier couplage favorise la double arylation de la quinone au lieu du mono-couplage.

on chauffe par voie thermique sans réaliser de purification intermédiaire entre les deux couplages. Le rendement global obtenu pour cette séquence est de **38%**.^e

Cette stratégie s'est malheureusement révélée limitée dans le cadre des remontées de matière régulièrement effectuées : en effet, il n'était pas possible de lancer plusieurs réactions sous micro-ondes simultanément et les flacons à disposition ne permettaient pas de travailler sur grande échelle. Nous avons donc choisi d'investir dans des ballons scellés de 250 mL et de revenir à un chauffage thermique classique. Les essais préliminaires ont montré que ce montage expérimental permettait de travailler à l'échelle du gramme sans affecter les rendements. De plus, il permet de faciliter l'ajout des réactifs pour le deuxième couplage. C'est donc la stratégie que nous avons conservée à ce jour. Au final, les conditions expérimentales optimisées sont les suivantes (Schéma 76) :

- Procédé monotope séquentiel
- Chauffage en ballon scellé à 120°C pendant 12h pour les deux couplages
- Utilisation de K₂CO₃ comme base pour le premier couplage, afin de limiter la double arylation de la quinone
- Utilisation de CsF comme base pour le deuxième couplage

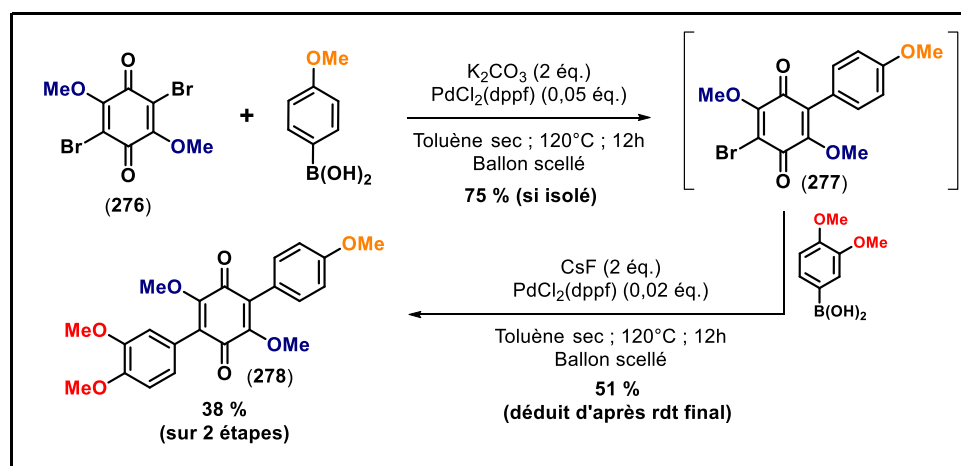


Schéma 76 – Séquence monotope des deux couplages de Suzuki-Miyaura optimisés pour la synthèse de la terphénylquinone dissymétrique (278), précurseur de l'acide xérocémique.

Pour finir, nous avons noté que la présence des deux bromes sur la quinone initiale (276) provoque également la formation du produit de double arylation (281) comme produit

^e Il est à noter que lorsqu'une purification intermédiaire est réalisée entre les deux couplages de Suzuki-Miyaura, le rendement en terphénylquinone dissymétrique (278) sur les deux étapes de synthèse chute à 7 %.

secondaire dès que le premier couplage de Suzuki-Miyaura est réalisé. Ce produit de double arylation (**281**) est une terphénylquinone symétrique, précurseur de l'acide atromentique (qui est un autre acide pulvinique, analogue à l'acide xéromomique). Or, sa formation, non désirée, au cours de la réaction implique qu'il reste une quantité non négligeable de la dibromodiméthoxyquinone (**276**) de départ dans le milieu réactionnel ; la séquence réactionnelle choisie (cf Schéma 76) étant monotopie (*i. e.* sans purification intermédiaire), les sous-produits du premier couplage interfèrent donc lors du deuxième couplage. *In fine*, le milieu réactionnel est majoritairement constitué de trois produits (Schéma 77) :

- Une quinone symétrique (**281**), précurseur de l'acide atromentique (20%)
- Une quinone dissymétrique (**278**), précurseur de l'acide xéromomique (38%)
- Une quinone symétrique (**282**), précurseur de l'acide variégatique (22%)

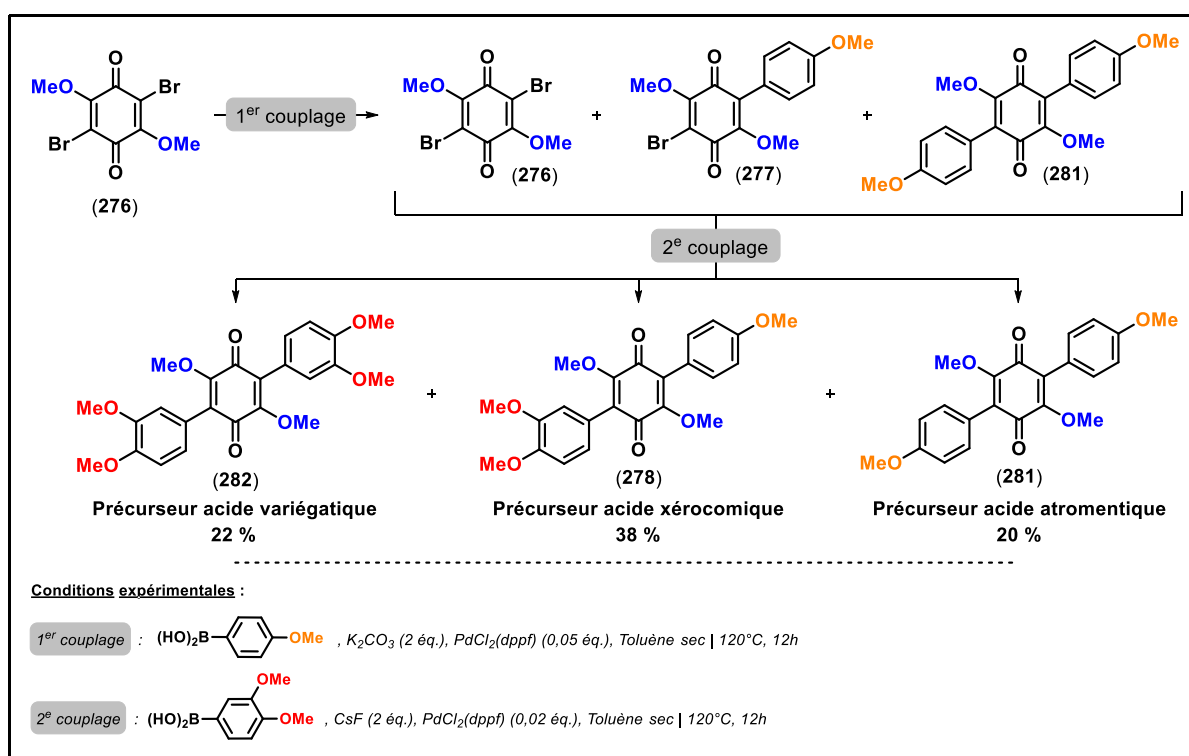


Schéma 77 – Sous-produits des couplages de Suzuki-Miyaura. Les rendements affichés correspondent aux rendements totaux après les deux étapes de couplages.

Mono-iodation de la quinone :

Les conditions développées dans la partie précédente permettent d'obtenir le produit de mono-couplage de la dibromodiméthoxybenzoquinone avec un rendement de **75%**.^f Cependant, nous avons pu observer que la présence de deux bromes sur la *p*-benzoquinone initiale implique également une double fonctionnalisation (à hauteur de 20%), ce qui a pour effet de limiter la formation de la quinone dissymétrique (**278**), précurseur de l'acide xérocomique (cf Schéma 77). L'objectif de cette séquence réactionnelle étant de favoriser la formation du produit de couplage dissymétrique, nous avons cherché à limiter la formation des produits secondaires. Dans ce but, nous avons pensé remplacer un brome de la *p*-benzoquinone par un iode : la différence de réactivité entre le brome et l'iode devait permettre de favoriser la mono-arylation lors du premier couplage.

Le peu d'exemples d'iodation de quinone que l'on trouve dans la littérature fait état de deux voies rétrosynthétiques (Schéma 78) : une iodation directe sur un dérivé d'hydroquinone, suivie d'une oxydation en *p*-benzoquinone d'une part, ou alors un échange d'halogène sur une *p*-benzoquinone pré-halogénée d'autre part.¹⁶

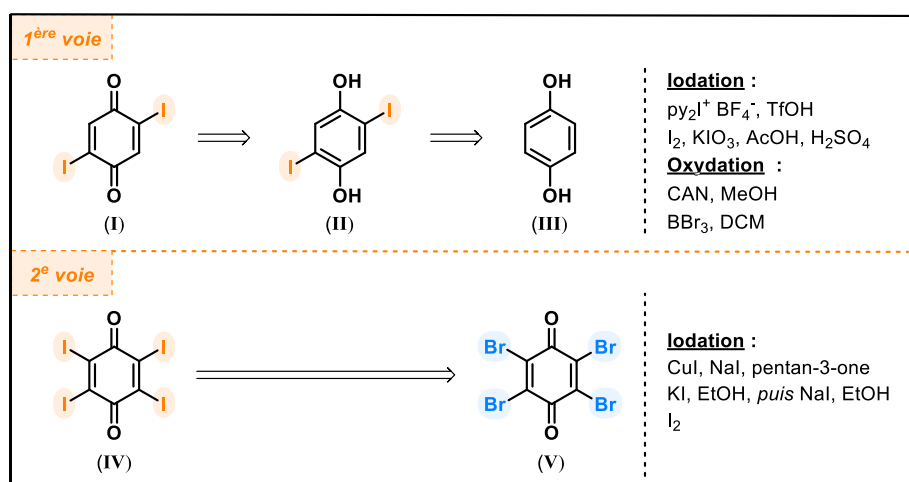


Schéma 78 – Voies rétrosynthétiques possibles pour une iodobenzoquinone. Quelques conditions expérimentales ont été reportées à titre d'exemple.^{16, 111, 137}

Le Tableau 6 résume les différentes conditions expérimentales qui ont été testées pour réaliser la mono-iodation de la quinone. Aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir la

^f Pour rappel, ce rendement correspond au produit de mono-couplage (**277**) lorsque les couplages de Suzuki-Miyaura sont réalisés séquentiellement. Nous pouvons extrapoler que lors du procédé monotope, le rendement de ce premier couplage est sensiblement identique.

quinone iodée, ne serait-ce qu'à l'état de traces. Cela peut s'expliquer par la faible stabilité des produits ou par la présence des groupements méthoxylés qui enrichissent considérablement la quinone et défavorisent les réactions de substitution.

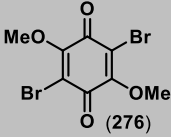
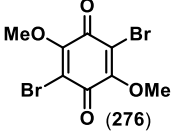
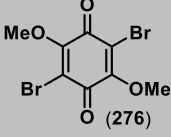
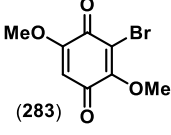
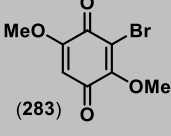
<u>Entrée</u>	<u>Substrat de départ</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Température</u>	<u>Durée</u>	<u>Résultat</u>	<u>Réf.</u>
1		CuI (0,3 éq.) NaI (6,0 éq.) DMEDA (0,6 éq.)	110 °C 1,4-dioxane	5 h	Dégradation	16
2		NaI anhydre (5,0 éq.)	125 °C (tube scellé) 1,4-dioxane	5 h	Dégradation	16
3		<i>n</i> -BuLi, I ₂ (1,1 éq.)	-78 °C THF	12 h	Dégradation	137
4		I ₂ (0,4 éq.) KIO ₃ (0,3 éq.) H ₂ O, H ₂ SO ₄	90 °C AcOH	12 h	Dégradation	111
5		NIS (1,1 éq.) TFA (3 éq.)	t. a. ACN	12 h	Pas de réaction	/

Tableau 6 – Tableau récapitulatif des essais d'iodation réalisés sur la bromodiméthoxybenzoquinone.

Pour se rapprocher au plus des conditions que l'on retrouve dans la littérature, il faudrait utiliser le 1,4-diméthoxybenzène comme substrat de départ. Cela nécessiterait de revoir entièrement le début de la voie de synthèse de l'acide xéromique. Or, au vu des bons rendements de couplages de Suzuki-Miyaura obtenus avec la dibromodiméthoxybenzoquinone, cela ne nous a pas semblé pertinent. Cette stratégie de mono-iodation de la *p*-benzoquinone a donc été abandonnée.

Optimisation du nombre d'étapes :

Face aux difficultés rencontrées pour optimiser les conditions de couplages de Suzuki-Miyaura détaillées ci-avant, nous avons choisi de tester en parallèle les méthodes de C-H fonctionnalisation sur les *p*-quinones développées par P. Baran⁹⁵ et A.-L. Lee²⁹⁰ au début des

années 2010 et présentées sur le Schéma 79 pour notre acide boronique d'intérêt : l'acide *p*-méthoxyphénylboronique. La méthode de P. Baran implique l'utilisation de nitrate d'argent, associé à un fort co-oxydant ($K_2S_2O_8$) (des réactifs communs et faciles d'utilisation) : de ce fait, le mécanisme impliqué est désormais radicalaire. De son côté, le protocole de A.-L. Lee fait toujours appel à un catalyseur au palladium ($Pd(TFA)_2$), mais moins spécifique que $PdCl_2(dppf)$ et pouvant être préparé extemporanément. Ces deux méthodologies supportent la présence de traces d'eau et d'oxygène dans le milieu réactionnel et elles ne nécessitent ni chauffage, ni dégazage spécifique. Les temps de réaction sont également réduits, rendant ainsi ces protocoles particulièrement attractifs.

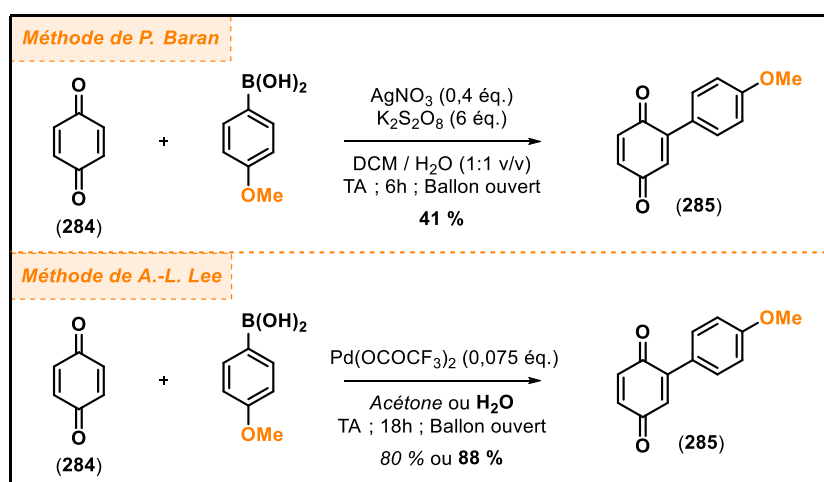


Schéma 79 – Exemple des méthodologies de C-H activation sur *p*-benzoquinones (**284**) développées par les équipes de P. Baran⁹⁵ et de A.-L. Lee.²⁹⁰

Ainsi, outre une potentielle amélioration des rendements, cette stratégie permettrait de réduire le nombre d'étape dans la séquence réactionnelle de l'acide xéromique et de ses analogues pulviniques en supprimant l'étape de bromation de la *p*-benzoquinone. Nous avons donc décidé d'appliquer cette stratégie de C-H activation à la diméthoxyquinone (**286**). Le Schéma 80 illustre la démarche que nous avons suivie, les conditions du premier couplage étant reprises de P. Baran (*i. e.* $AgNO_3/K_2S_2O_8$), tandis que celles du deuxième couplage de A.-L. Lee (*i. e.* $Pd(TFA)_2/2,6\text{-DCBQ}$).

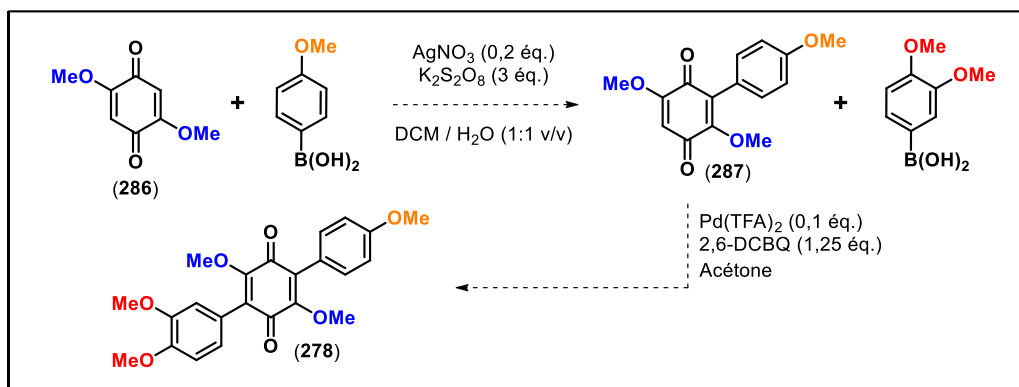


Schéma 80 – Stratégie envisagée d'application des protocoles de C-H fonctionnalisation à notre séquence réactionnelle.

Malheureusement, expérimentalement, nous avons observé que l'ajout de l'acide boronique sur la diméthoxyquinone (**286**) était concomitant avec l'élimination des groupements méthoxylés. Cette méthodologie de synthèse ne semble pertinente que sur les *p*-benzoquinones nues (**284**), comme nos essais l'ont montré (Schéma 81).

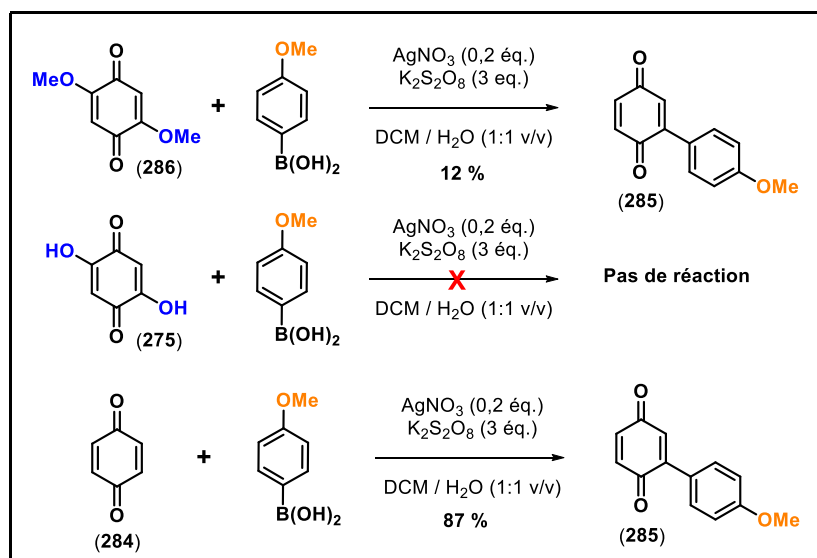


Schéma 81 – Résultats de l'application du protocole de P. Baran⁹⁵ sur des *p*-benzoquinones. Toutes les expériences sont réalisées à l'obscurité.

Néanmoins, étant donné l'excellent rendement obtenu avec les conditions de P. Baran pour la *p*-benzoquinone simple (87%), nous avons cherché à aller plus loin en essayant de fonctionnaliser la quinone obtenue (**285**) avec l'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique. Dans ce but, nous avons repris les conditions de P. Baran ($\text{AgNO}_3/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) et nous avons complété notre étude avec les conditions proposées par A.-L. Lee (*i. e.* des couplages pallado-

catalysés). Les résultats obtenus sont décevants (Schéma 82) : aucune conversion n'est observée pour le couplage au nitrate d'argent et les rendements obtenus pour les couplages pallado-catalysés sont très faibles (inférieurs à 5%). Par ailleurs, dans le cas des couplages pallado-catalysés, nous avons observé la même régiosélectivité que A.-L. Lee, à savoir que l'ajout d'un deuxième groupement aromatique intervient préférentiellement en position *mé*ta (288) ou *ortho* (290) du premier groupement aromatique et non en position *para* (289) comme nous le souhaitons.²⁹⁰ Cette stratégie se révélant inadaptée à nos objectifs synthétiques, nous l'avons abandonnée et nous sommes restés focalisés sur les conditions de couplages de Suzuki-Miyaura présentées dans la partie précédente (*i. e.* deux couplages monotopes entre une dibromodiméthoxybenzoquinone et deux acides boroniques avec un chauffage thermique en ballon scellé).

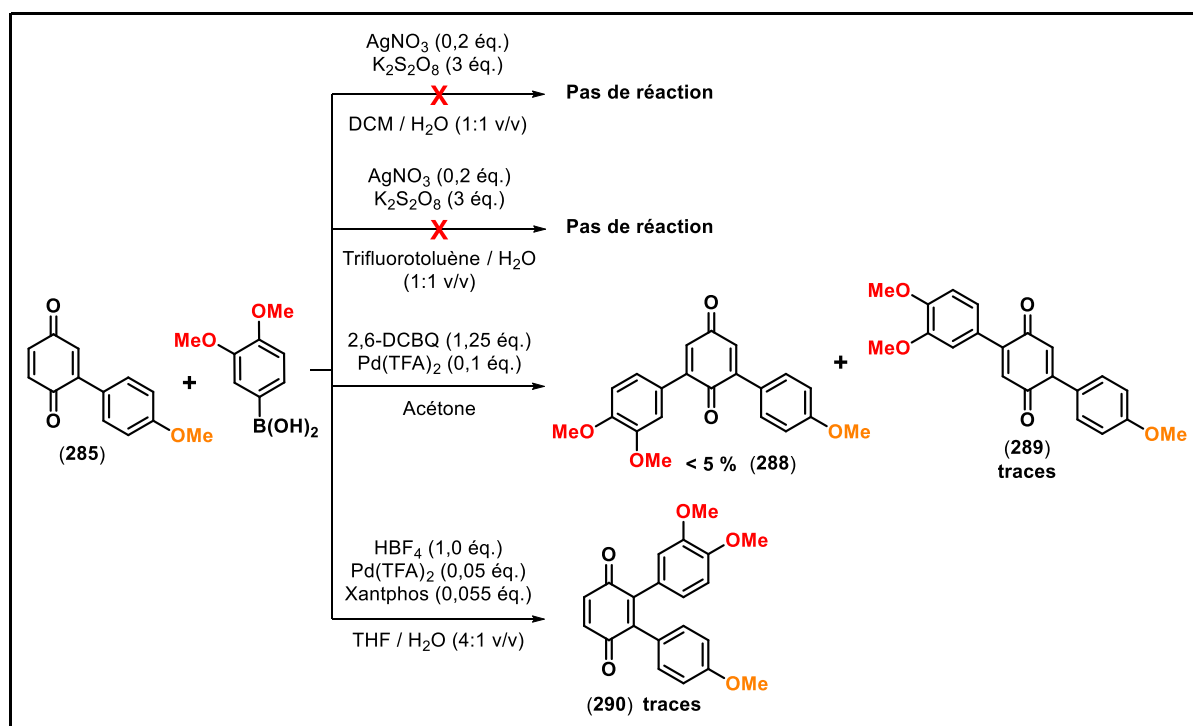


Schéma 82 – Résultats de l'application des protocoles de P. Baran⁹⁵ et A.-L. Lee²⁹⁰ pour le deuxième couplage. Les réactions au nitrate d'argent sont réalisées à l'obscurité.

Extension à d'autres substituants aromatiques :

Une fois la séquence réactionnelle optimisée, il était intéressant d'étudier sa robustesse en l'extrapolant à d'autres substituants aromatiques et notamment des hétérocycles que l'on peut retrouver chez certains métabolites secondaires naturels (Figure 2). Par exemple, la cristatomentine (pigment vert extrait du champignon *Albatrellus cristatus*)¹⁵², l'échinofurane

C (pigment jaune de la plante *Arnebia euchroma*)³²¹, les acides pinastrique (**291**) et lérapinique (acides pulviniques extraits des lichens *Lepraria* sp.)²¹⁴, la cochliodionone (pigment fluorescent extrait de plusieurs champignons de l'espèce *Chaetomium* sp.)^{32, 131}, l'asterriquinone B1 (extrait d'*Aspergillus terreus*)¹⁶⁸ ou encore l'atromentine (**2**), la leucomelone (**280**) et l'acide théléphorique (**292**) (des terphénylquinones très répandues parmi les Basidiomycètes).^{83, 121, 127, 209, 245}

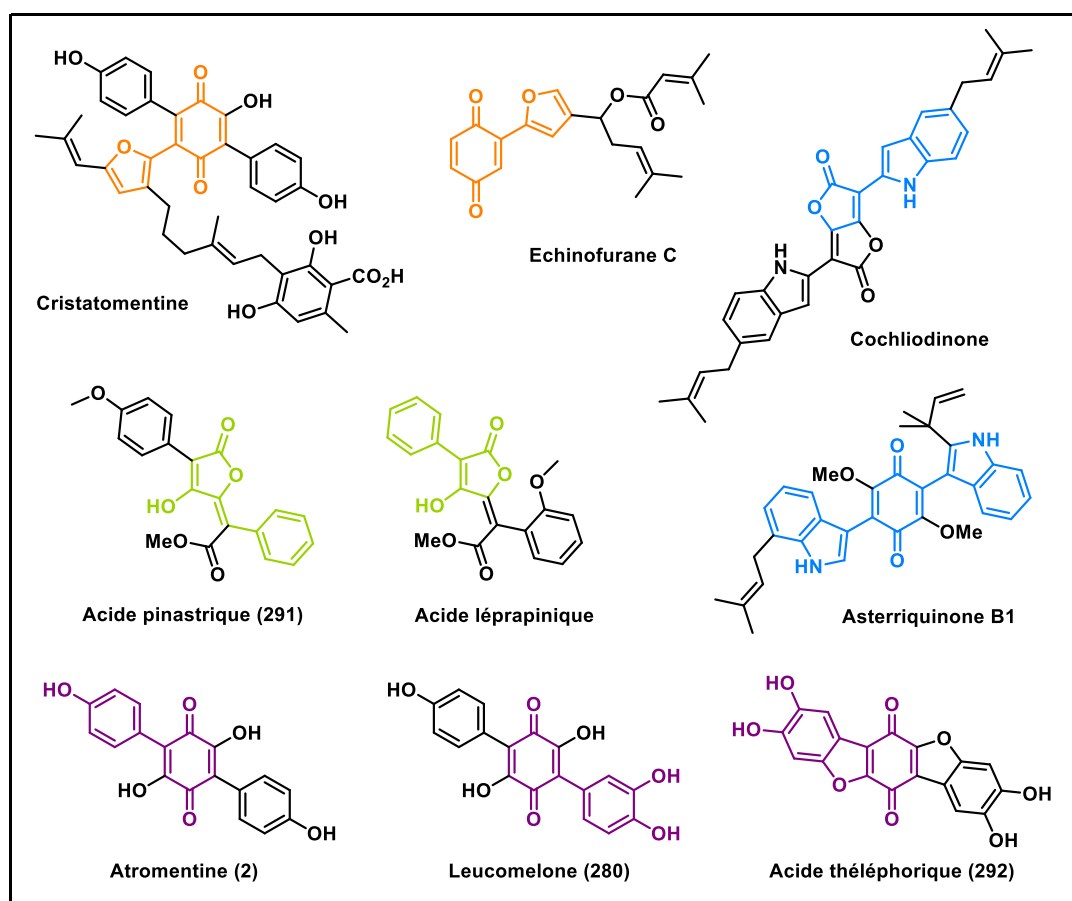


Figure 2 – Quelques exemples de composés naturels comportant un motif *p*-benzoquinone, buténolide ou bistétronique substitué par des groupements aromatiques ou des hétérocycles.

À la lumière de ces quelques exemples de composés naturels comportant un motif de type *p*-benzoquinone, buténolide ou bistétronique substitué par des groupements aromatiques ou des hétérocycles, nous avons appliqué nos conditions optimisées de couplage de Suzuki-Miyaura aux acides boroniques du Schéma 83 en première intention. Il est à noter que lorsque nous cherchions expressément à réaliser un homocouplage de la terphénylbenzoquinone, nous utilisions uniquement CsF comme base, puisque nous avons montré qu'elle favorise la double arylation.^d

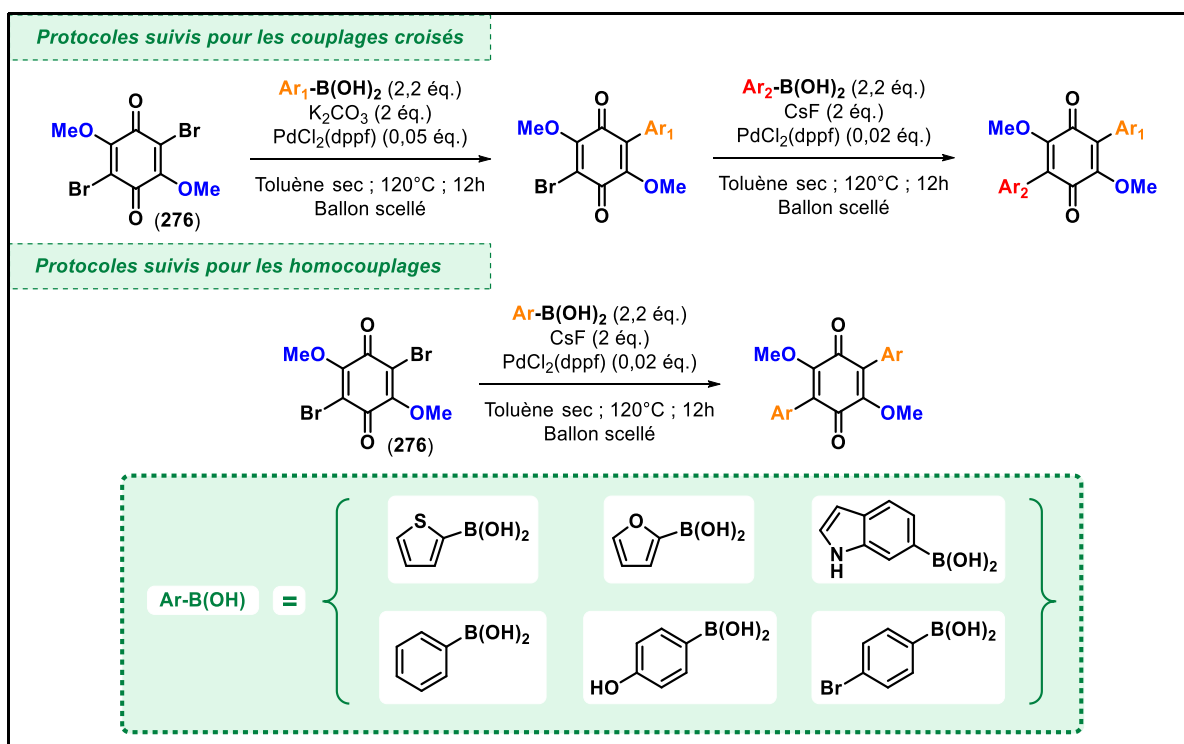


Schéma 83 – Acides boroniques impliqués dans l'extension de la méthode de couplage des *p*-benzoquinones.

Les résultats de ces essais préliminaires de couplages de Suzuki-Miyaura étendus sont résumés sur la Figure 3. Pour rappel, grâce à ces conditions de couplage, nous avons synthétisés les terphénylquinones (**281**), (**278**) et (**282**), comportant respectivement 2, 3 et 4 groupements méthoxyles. Afin de compléter cette série et en vue de la synthèse des acides pinastrique (**291**) (Figure 2) et *isopinastrique* (**408**), un couplage croisé a été réalisé entre l'acide phénylboronique et l'acide 4-méthoxyphénylboronique, donnant le produit symétrique de double arylation (**293**) avec un rendement de 9% (sous-produit de la réaction de couplage) et le produit de couplage croisé (**294**) avec un rendement de 30% sur les deux étapes : en comparaison, le précurseur de l'acide xéromique a été obtenu avec un rendement de **51%** à l'issu des deux couplages (cf Schéma 77). Ce rendement est donc plutôt satisfaisant, car du même ordre de grandeur. De manière similaire, l'acide 4-bromophénylboronique nous a permis d'obtenir la terphénylquinone di-arylée (**296**) correspondante avec un rendement de **36%**.

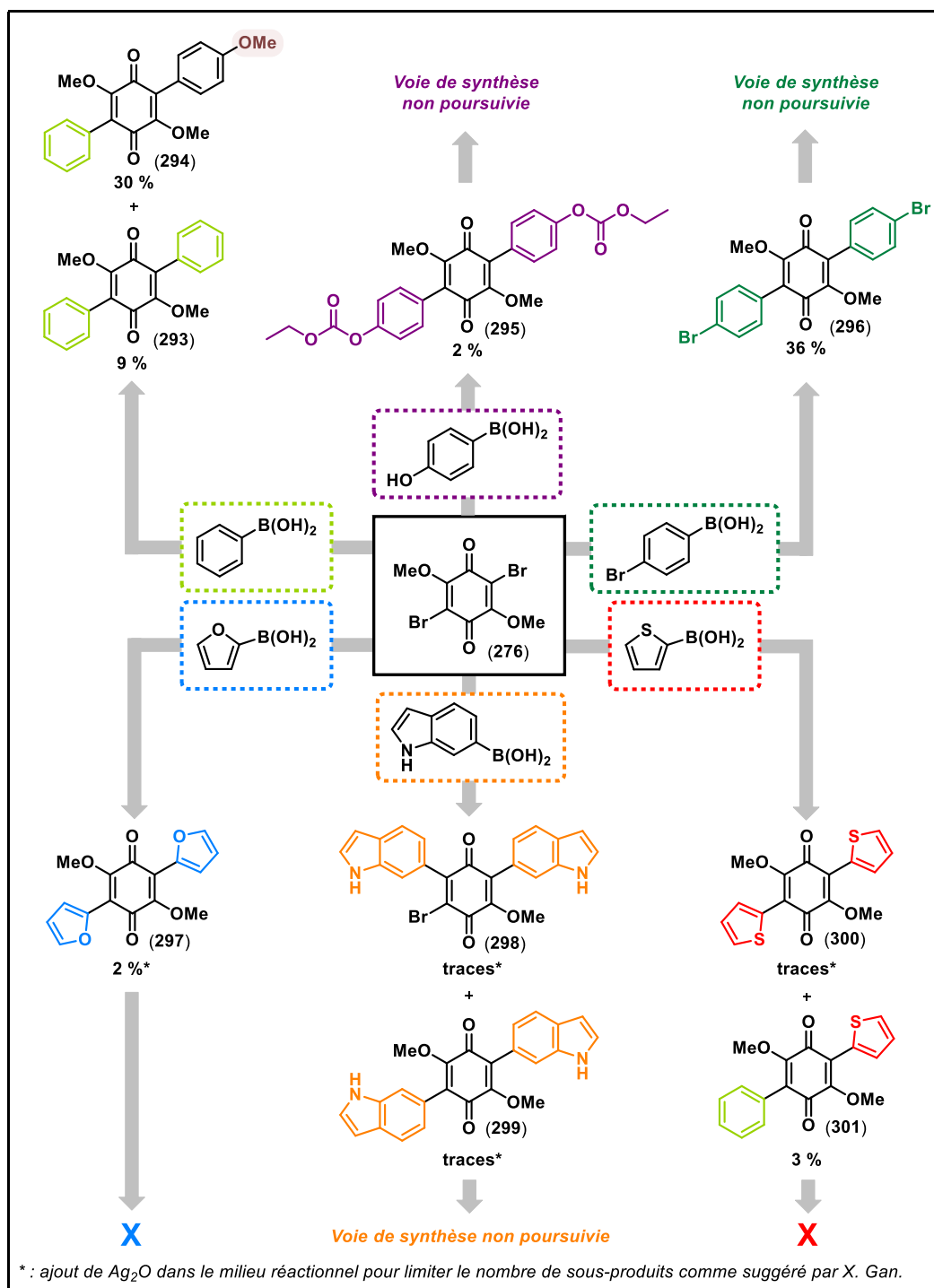


Figure 3 – Récapitulatif des résultats d’extension des couplages de Suzuki-Miyaura de la dibromodiméthoxyquinone (**276**) à d’autres cycles aromatiques.

Par ailleurs, nous avons tenté d’appliquer ces couplages de Suzuki-Miyaura à l’acide 4-hydroxyphénylboronique, car en cas de succès, nous aurions ainsi pu obtenir la terphénylquinone correspondante directement avec les fonctions phénols libres. Cette perspective était plutôt attrayante, car elle nous aurait permis de nous libérer de l’étape finale

de déprotection de ces fonctions phénols au cours de la synthèse totale des acides pulviques, étape qui se révèle souvent laborieuse (cf Schéma 75 – page 111). Malheureusement, outre le très faible rendement obtenu (2% pour le produit de double arylation), il s'avère que la fonction hydroxyle perturbe le déroulement du couplage en interagissant avec la base choisie. Ainsi, la présence de K_2CO_3 dans le milieu réactionnel induit une carbonatation du groupement hydroxyphényle. Par la suite, ce groupement carbonate est alkylé par l'éthanol stabilisant le DCM utilisé lors de la purification du brut réactionnel, aboutissant ainsi au composé (295). Au vu de ce phénomène et du faible rendement obtenu, nous avons décidé de ne pas poursuivre la séquence réactionnelle pour ce composé.

L'application des couplages de Suzuki-Miyaura aux trois autres composés hétérocycliques (Schéma 83) a été beaucoup plus laborieuse : les rendements sont très faibles, les sous-produits sont très nombreux et de structure indéterminée. Plus précisément, l'acide thionylboronique a été engagé dans un processus de couplage croisé. Le produit (301) comportant un substituant thiophène et phényle a ainsi pu être isolé avec un rendement médiocre de 3%. Concernant l'acide furylboronique, une réaction de couplage croisé a été réalisée avec l'acide phénylboronique, mais seul le produit de double arylation (297) symétrique a été isolé avec un rendement médiocre de 2%.

Enfin, dans le cas de l'acide indole-6-boronique, deux produits de double arylation ont été formés : un produit de couplage en para (299) et un produit de couplage en méta (298). Ces deux produits ont pu être isolés à l'état de traces et n'ont pas pu être parfaitement séparés l'un de l'autre. La suite de la séquence réactionnelle n'a donc pas été poursuivie pour l'acide indole-6-boronique.

Par la suite, bien que les rendements de synthèse des produits (297) et (301) (Figure 3) soient faibles, nous disposons de quantités décentes pour continuer la séquence réactionnelle et réaliser les contractions des quinones en acides bistétroniques (Schéma 84).

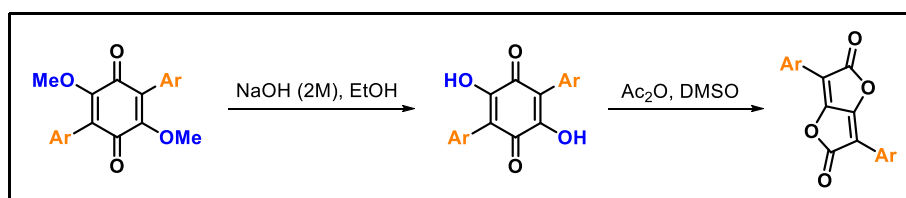


Schéma 84 – Rappel de la réaction de contraction de cycle suivant les conditions de H. W. Moore et R. J.

Wikholm.²⁰⁰

La première étape consiste en une hydrolyse basique des groupements méthoxylés portés par la quinone. Pour le composé (**297**) comportant deux furanes, cette étape a conduit à l'élimination des furanes. En revanche, cette étape est supportée par la quinone fonctionnalisée par deux groupements thiophène (**300**) et a abouti à la dihydroxydithiophénylquinone correspondante (**300'**). Enfin, les conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm (Ac₂O, DMSO)²⁰⁰ ont été appliquées aux différentes quinones obtenues à ce stade. Premièrement, la contraction de cycle de la dihydroxydithiophénylquinone (**300'**) n'a donné d'autre résultat que la dégradation des produits de départ.^g Concernant les produits (**293**) et (**294**), comportant des substituants phényle et 4-méthoxyphényle, les résultats seront détaillés dans la section 1.2.4 de ce chapitre (page 129), avec les composés apparentés.

Ces résultats sont assez décevants et indiquent que la séquence réactionnelle mise au point dans le cadre de la synthèse totale biomimétique de l'acide xéromique est très spécifique aux acides pulviniques. Elle tolère des substituants aromatiques proches, plus ou moins méthoxylés, mais ne peut être étendue de manière globale aux hétérocycles classiques. Au vu de ces résultats et de notre volonté de rester focalisés sur l'objectif général d'étude du comportement de l'acide xéromique en condition oxydante, nous n'avons pas plus approfondi cet aspect du projet.

Choix du groupement protecteur des phénols :

Comme cela sera présenté dans la partie 1.2.5 de ce chapitre (page 134), des difficultés ont été rencontrées lors de l'étape finale de déprotection des phénols, protégés sous la forme de groupements méthoxylés. En parallèle de la recherche d'une méthode de déprotection adaptée (détaillée dans la partie 1.2.5 – page 134), nous avons également cherché à utiliser des groupements protecteurs plus faciles à retirer et supportant les conditions de couplages et de contraction de cycle. Selon ces critères, les groupements MOM ou silylés n'ont pas été retenus. Notre choix s'est donc porté sur le benzyloxy et le méthylènedioxy (Figure 4), l'idéal étant que différents groupements protecteurs supportent la voie de synthèse mise au point (Schéma 75), afin de pouvoir réaliser une déprotection sélective de la fonction catéchol. L'acide 4-(benzyloxy)phénylboronique et l'acide 3,4-(méthylènedioxy)phénylboronique sont commerciaux, contrairement à l'acide 3,4-bis(benzyloxy)phénylboronique.

^g Il est à noter, cependant, qu'à cette période, nous ne réalisons pas la contraction de cycle sous faible pression, comme cela sera expliqué dans la partie 1.2.4.2 de ce chapitre (page 103), ce qui a pu jouer sur les résultats.

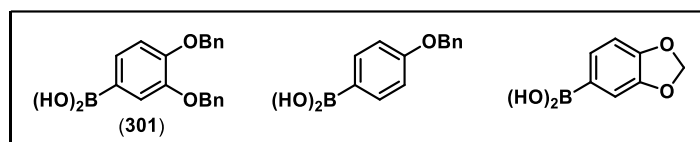


Figure 4 – Acides boroniques impliqués dans le choix d'un groupement protecteur des fonctions phénols adapté.

Nous avons réalisé la synthèse de l'acide 3,4-bis(benzyloxy)boronique (**301**) à partir du pyrocatechol (**302**) (Schéma 85).

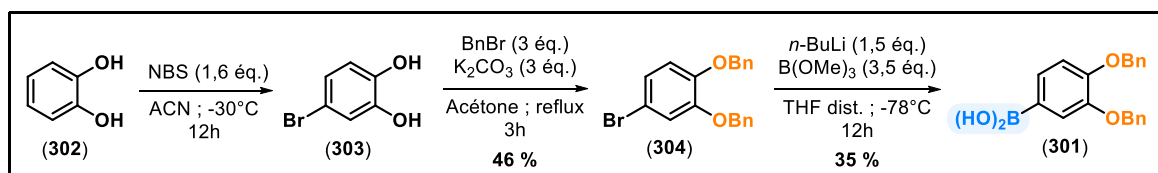


Schéma 85 – Voie de synthèse de l'acide 3,4-bis(benzyloxy)boronique (**301**).

Une première étape de bromation par le NBS permet d'obtenir le 4-bromocatechol (**303**).⁵⁵ Pour que la conversion du pyrocatechol (**302**) soit totale, il est nécessaire de réaliser l'ajout de NBS en deux fois : 1,1 équivalent de NBS sont ajoutés en premier lieu, puis 0,5 équivalent sont rajoutés 12 heures après. Au bout de 30 minutes, il ne reste plus de produit de départ. Le composé majoritaire obtenu est le produit de mono-bromation en position 4, accompagné du produit de mono-bromation en position 3 (selon un rapport 6:1). L'inconvénient de cette approche de double ajout de NBS est qu'elle provoque également la formation de produits dibromés, qui sont inséparables du produit de monobromation, même en phase inverse, en raison du π -stacking et des multiples liaisons hydrogène pouvant s'établir entre les produits. Cet inconvénient est levé lors de l'étape suivante de benzylation des fonctions phénols. Ainsi, cette étape de benzylation des fonctions phénols est réalisée sur le brut réactionnel de la réaction de bromation.

Il est à noter que d'autres protocoles de bromation ont été testés : le protocole de Y. Xu (BTC + TBAB + KBr dans AcOEt + H₂O pendant 19h à température ambiante)³⁰⁷ et le protocole de X. Ma (TMSBr dans DMSO + ACN pendant 12h à température ambiante)¹⁷⁶ sans apporter de réelles améliorations en termes de rendement, de sélectivité, d'ergonomie expérimentale et de montée en échelle.

Une fois la bromation du pyrocatecholé réalisée, il est possible de réaliser la benzylation des fonctions phénols par le bromure de benzyloxy au reflux de l'acétone pendant

3h, sur le brut réactionnel.²²⁶ De même que l'étape précédente, cette réaction présente l'avantage de pouvoir être facilement réalisée sur plus de 20 grammes de produit de départ. Elle permet également de résoudre le brut réactionnel et de faciliter la séparation des produits de la réaction. En revanche, la purification du produit d'intérêt n'est possible que par chromatographie en phase inverse. On obtient ainsi le 4-bromo-1,2-bis(benzyloxy)benzène (**304**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement sur deux étapes de **46%**.

Enfin, la dernière étape de cette synthèse consiste en la formation de l'acide boronique (**301**) à proprement parler à partir du 4-bromo-1,2-bis(benzyloxy)benzène (**304**). Dans ce but, on réalise une lithiation par le *n*-BuLi à -78°C, puis on ajoute le triméthylborate et on laisse revenir à température ambiante pendant 12h.¹⁷ Le brut réactionnel est ensuite traité par une solution d'HCl (2M) pour hydrolyser les groupements MeO et ainsi aboutir à l'acide 3,4-bis(benzyloxy)phénylboronique (**301**) avec un rendement de **35%**. La purification de ce composé consiste en une simple recristallisation dans un mélange DCM/PE. Il est à noter que le triisopropylborate est également proposé dans la littérature avec des conditions similaires sans que cela ait fonctionné sur notre substrat, sans doute en raison de l'encombrement des chaînes *isopropyles* qui masquent stériquement le bore.⁴⁴ Bien que la purification de ce composé soit aisée et facilement transposable à grande échelle, cette réaction ne peut pas être lancée sur plus de 2 grammes de produit de départ, au risque de voir chuter drastiquement le rendement en raison de la difficulté à dégazer le volume de solvant requis et le solide de départ.

Une fois cette synthèse réalisée, nous avons pu débiter l'étude des couplages de Suzuki-Miyaura avec nos conditions optimisées sur ces nouveaux groupements protecteurs. Comme cela a été dit précédemment, nous avons réalisé des couplages croisés entre les différents acides boroniques pour varier les conditions de déprotection des fonctions phénols et ainsi, en fin de synthèse, pouvoir réaliser des déprotections sélectives. Les produits obtenus sont décrits sur le Schéma 86.

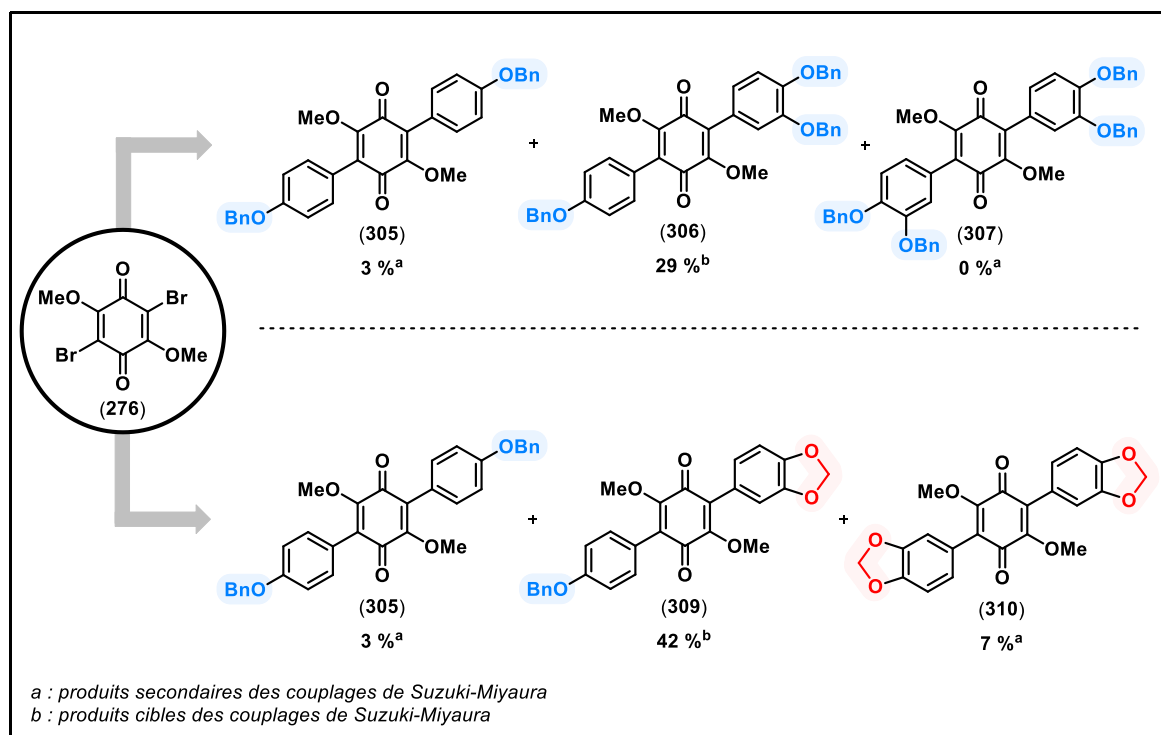


Schéma 86 – Produits de couplages à partir des acides boroniques benzylés et méthylènedioxylés.

Les résultats sont encourageants, car les rendements obtenus sont similaires à ceux de la terphénylquinone (**278**), précurseur de l'acide xérocémique (*i. e.* 29% et 42% vs 38%). Notons cependant que la présence des benzyles rend la purification des produits de couplage plus difficile, à cause du possible π -stacking et de la faible polarité des composés, ce qui explique en partie les valeurs de rendement plus faibles.

1.2.4 Contraction de cycle de la terphénylquinone en acide bistétronique

1.2.4.1 Formation de la dihydroxyterphénylquinone

Une fois que les différentes terphénylquinones d'intérêt sont obtenues grâce aux couplages séquentiels de Suzuki-Miyaura, on peut alors réaliser l'étape biomimétique de la voie de synthèse, qui est la contraction de cycle de la terphénylquinone en acide bistétronique, précurseur des acides pulviniques. D'après les conditions développées par H. W. Moore et R. J. Wikholm en 1968,²⁰⁰ le substrat de départ doit être une dihydroxyterphénylquinone, il convient donc d'hydrolyser au préalable les groupements méthoxylés portés par la quinone (Schéma 87).

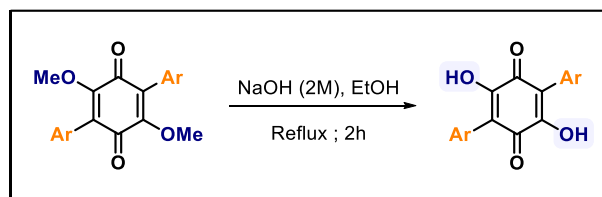


Schéma 87 – Hydrolyse basique de terphénylquinones.

Cette hydrolyse est réalisée par la soude dans de l'éthanol au reflux pendant 2h, selon le protocole développé au sein du laboratoire pour la diversification chimique de l'illimaquinone.⁸⁷ Cette réaction est quantitative pour tous les substrats testés. Après l'arrêt de la réaction par ajout d'HCl (2M), une extraction liquide-liquide Eau/AcOEt permet de collecter, dans la phase organique, le produit de réaction qui, une fois mis à sec, peut être engagé directement dans l'étape de contraction de cycle.

1.2.4.2 Optimisation des conditions de contraction de cycle

Les conditions de contraction de cycle ont été développées par H. W. Moore et R. J. Wikholm²⁰⁰ pour la 2,5-dihydroxy-3,6-diphénylquinone et requièrent de dissoudre le composé dans un mélange Ac₂O/DMSO (1:2), puis de chauffer à 60°C pendant 15 minutes. Le mécanisme de cette réaction est rappelé sur le Schéma 88.

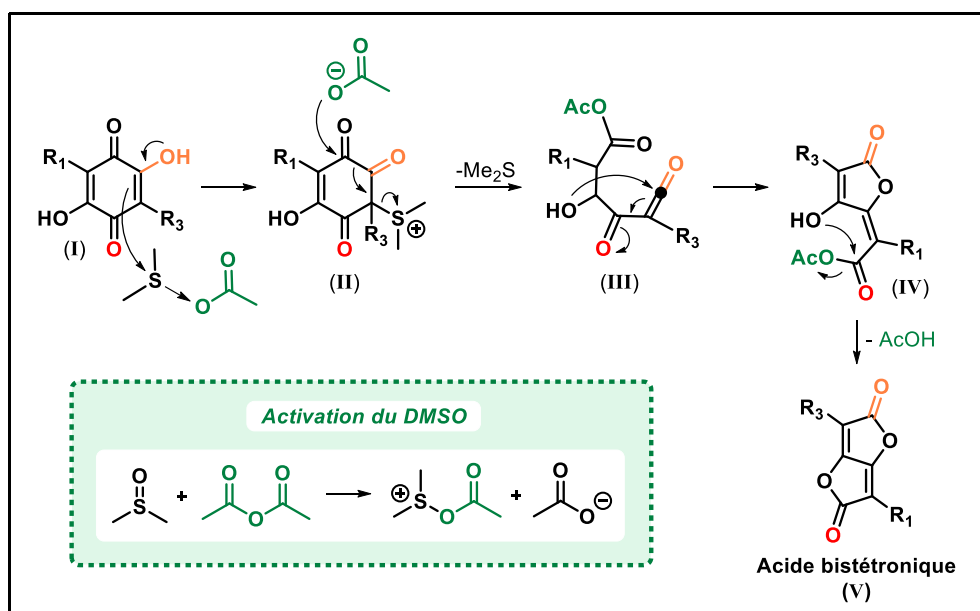


Schéma 88 – Rappel du mécanisme de contraction de cycle d'une 2,5-dihydroxy-3,6-diphénylquinone (I) selon les conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm.²⁰⁰

La première étape de ce mécanisme consiste en l'activation du DMSO par l'anhydride acétique, sur le modèle d'une oxydation de Swern. Par équilibre céto-énolique, le doublet libre de l'oxygène marqué en orange se rabat sur la quinone, provoquant ainsi la délocalisation de la liaison π et l'attaque nucléophile sur l'acétylsulfonium. L'acétate libéré peut ensuite attaquer le carbone en α du groupement carbonyle formé. La délocalisation engendrée permet la libération de diméthylsulfure et la formation d'un cétène. Une cyclisation conduit ensuite à la fermeture du buténolide et permet de former le cycle à 5 chaînons souhaité. Enfin, l'acide bistéronique final (**V**) est obtenu par une lactonisation, provoquant l'élimination d'un équivalent d'acide acétique.

Des essais préliminaires de ce protocole ont été menés sur la quinone précurseur de l'acide xéromique et ont révélé que ce protocole était peu reproductible. Dans certains cas, l'acide bistéronique correspondant précipite et est récupéré par une simple filtration, alors que dans d'autres cas, le produit ne semble pas s'être formé, et aucune précipitation n'est observée. Le milieu réactionnel est alors très complexe et aucune des tentatives de purification qui ont été réalisées dessus n'a permis d'aboutir à l'identification des composés présents. Au fur et à mesure des tentatives, il nous est apparu que le DMS relargué au cours du mécanisme (Schéma 88) pouvait « empoisonner » la réaction, nous avons donc pensé réaliser l'expérience sous légère dépression (0,05 bar) pour éliminer le DMS généré du milieu réactionnel. Cela nous a permis de rendre cette étape plus fiable. Ainsi, ce nouveau protocole permet d'obtenir systématiquement l'acide bistéronique attendu par précipitation, bien que le rendement pour un même substrat de départ reste très fluctuant d'une expérience à l'autre. Dans tous les cas, nous n'avons jamais réussi à atteindre les 90% de rendement présentés dans la publication de référence.

Au vu des difficultés rencontrées pour optimiser cette étape avec les conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm, nous avons voulu tester d'autres réactifs (Tableau 7). Nous étions prêts à faire des compromis sur les rendements s'ils étaient reproductibles, mais aucune des conditions ne se sont concrétisées.

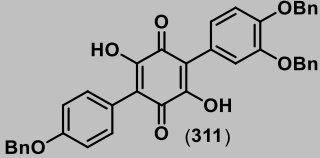
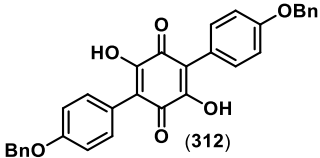
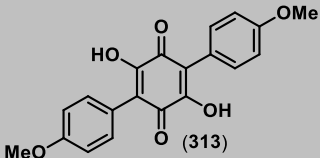
<u>Entrée</u>	<u>Substrat de départ</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Température</u>	<u>Durée</u>	<u>Résultat</u>
1	 (311)	PIDA (2,0 éq.) ACN	90 °C	12 h	Pas de réaction
2	 (312)	Pb(OAc) ₄ (2,0 éq.) ⁹⁴ Toluène	110 °C	6 h	Pas de réaction
3	 (313)	Pb(OAc) ₄ (2,0 éq.) ⁹⁴ Toluène	110 °C	6 h	< 10%

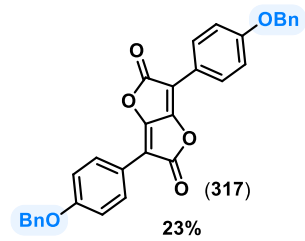
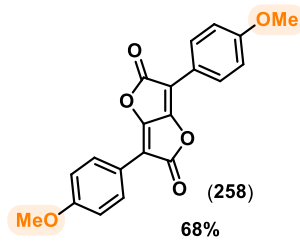
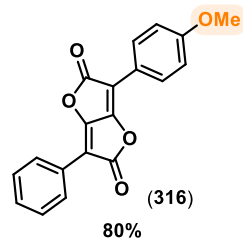
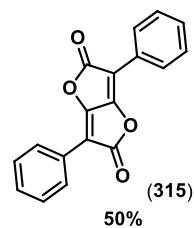
Tableau 7 – Récapitulatif des essais de contraction de cycle.

1.2.4.3 Application des conditions optimisées de contraction de cycle

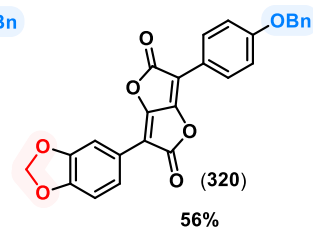
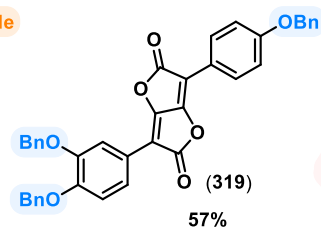
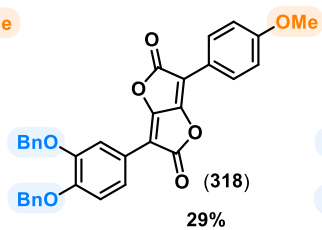
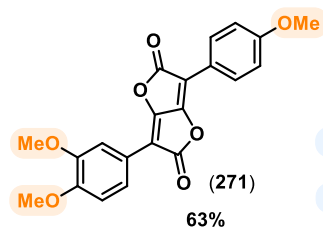
En nous basant sur les conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm optimisées (Ac₂O + DMSO à 60°C sous 0,05 bar), le protocole de contraction de cycle a pu être appliqué sur les différents produits de couplage obtenus au cours des travaux de ce projet de thèse. Les différents acides tétroniques obtenus sont rassemblés sur le Schéma 89.

Les rendements obtenus sont très variables suivant les substrats étudiés, illustrant ainsi la reproductibilité limitée de l'expérience. On remarque néanmoins que ces conditions de H. W. Moore et R. J. Wikholm sont compatibles avec les différents groupements protecteurs choisis, nous permettant ainsi de poursuivre la séquence réactionnelle et de sélectionner le groupement protecteur le plus adapté à nos contraintes (dans le cas d'essais de déprotections sélectives par exemple).

Dérivés pulviniques et atromentiques



Dérivés xérocômiques



Dérivés variégatiques

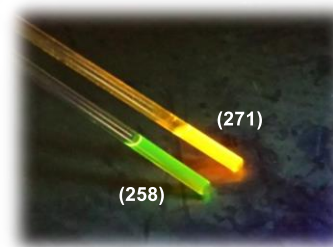
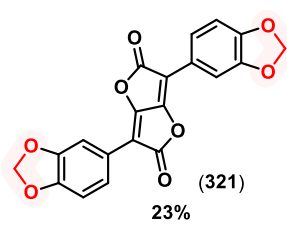
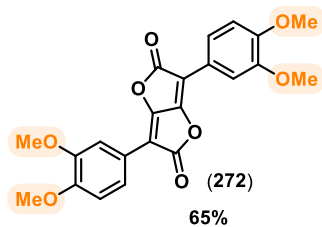


Schéma 89 – Acides bistétroniques obtenus par la méthode de H. W. Moore et R. J. Wikholm optimisée. Les rendements affichés sont les meilleurs obtenus lors des différents essais et remontées de matière. La photographie représente le comportement des composés (258) et (271) en tube RMN sous lampe UV.

1.2.5 Stratégie à suivre pour la fin de la synthèse des acides pulviniques

1.2.5.1 Déprotection des fonctions phénols, suivie de l'ouverture d'un motif buténolide

Au début de ce travail de doctorat, la stratégie de synthèse que nous suivions à partir de l'obtention de l'acide bistétronique consistait à réaliser l'étape de déprotection des fonctions phénols, puis l'ouverture sélective d'un motif buténolide pour obtenir l'acide pulvinique correspondant (Schéma 90).

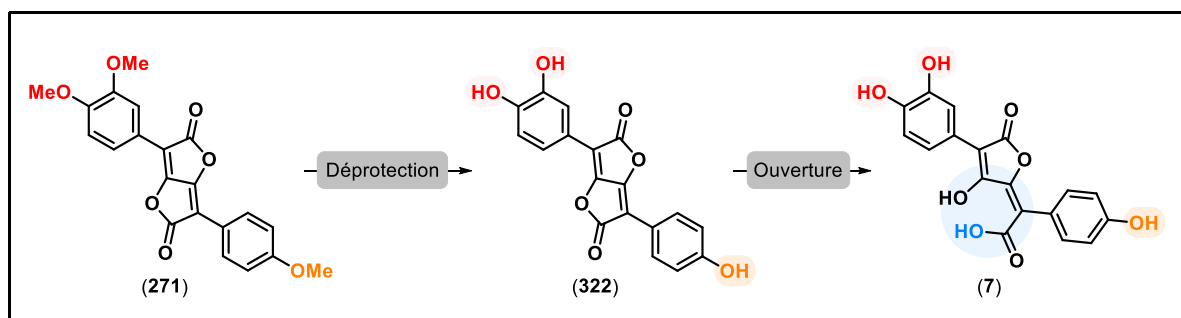


Schéma 90 – Stratégie de synthèse suivie en début de doctorat.

Plusieurs méthodes sont déjà décrites dans la littérature pour libérer des fonctions phénols¹⁰⁷ et ont donc été testés sur les différents acides bistétroniques obtenus (Tableau 8).

<u>Groupe protecteur</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions expérimentales</u>	<u>Résultats</u>
	BBr ₃	DCM, 0°C	Bore irrémédiablement complexé par le catéchol
	TMSI	CDCl ₃ , 55°C DCE, 130°C (MW) <i>m</i> -DCB, 130°C (MW)	Efficace uniquement à l'échelle du tube RMN
	HBr	AcOH, reflux AcOH, reflux (tube scellé)	Dégradation/Décarboxylation
	HI	AcOH, reflux	Dégradation
	Pb(OAc) ₄	Benzène, 60°C	Pas de réaction
	H ₂ , Pd/C	AcOEt, reflux AcOEt, t. a., bonde à hydrogène	Pas de réaction

Tableau 8 – Récapitulatif des conditions de déprotections testées sur les acides bistétroniques.

Pour hydrolyser les fonctions éther de phénol portées par les acides bistétroniques, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Cette étape a été difficile à mettre au point. De manière assez classique, BBr_3 a été utilisé en première intention, d'après le travail de Z. Ahmed.² La réaction s'est montrée rapide à température ambiante. En revanche, contrairement aux exemples de la littérature, le milieu réactionnel est particulièrement complexe et on observe la formation irrémédiable de complexes de bore avec la fonction catéchol générée.¹⁷⁰ Malgré plusieurs essais de décomplexation en modifiant le pH par ajout d'acide acétique, le produit est resté inaccessible.

Comme alternative, nous nous sommes tournés vers l'acide iodhydrique, qui a été utilisé dans les années 1970 par R. Edwards⁸⁴ et F. Foden⁹⁰ sur ces substrats, et vers l'acide bromhydrique, comme cela est suggéré par W. Greene dans le livre *Protective groups in organic synthesis*.¹⁰⁷ Malheureusement, sans résultat, car l'acide bistétronique de départ se retrouvait dégradé. De plus, la présence d'eau dans le milieu réactionnel engendrait l'ouverture d'un des deux motifs « buténolide » et la fonction acide carboxylique ainsi générée pouvait aisément s'éliminer par décarboxylation.

Enfin, inspirés par le travail de Y. Bourdreux sur la synthèse totale de la norbadione A (5) en 2008,²⁸ la méthode de déprotection alternative par TMSI^{2, 224} a également été testée, car les excès de réactif et les sous-produits de déprotection (silanols), volatils, peuvent être facilement éliminés. De plus, l'absence d'ion métallique (ou métalloïde) permet d'éviter la formation de complexes avec la fonction catéchol. Nous avons réalisé l'expérience sur quelques milligrammes en comparant un chauffage thermique classique (CDCl_3 , 55°C) avec un chauffage aux micro-ondes (DCE et *m*-DCB, 130°C). Seul le chauffage thermique a permis d'obtenir la déprotection des fonctions phénols sans dégrader le produit de départ. Malheureusement, il n'a pas été possible d'augmenter en échelle, ce qui n'était pas envisageable dans le cadre de remontée de matière pour la synthèse de l'acide xérocémique.

Dans le cas des autres groupements protecteurs (groupements benzyle et méthylénique), les conditions classiques de déprotection ont été appliquées (à savoir, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ pour le pont méthylène et H_2 , Pd/C pour les benzyles), sans résultat. Aucune conversion n'a été observée.

Face à l'absence de résultat de cette stratégie, nous avons décidé de changer de paradigme. En effet, deux paramètres peuvent expliquer l'absence de réactivité des acides

bistéronique : leur structure particulièrement rigide et le système conjugué, qui est réparti sur l'entièreté de la molécule. Nous avons donc décidé de réaliser l'ouverture d'un motif buténolide avant la déprotection des fonctions phénols (Schéma 91).

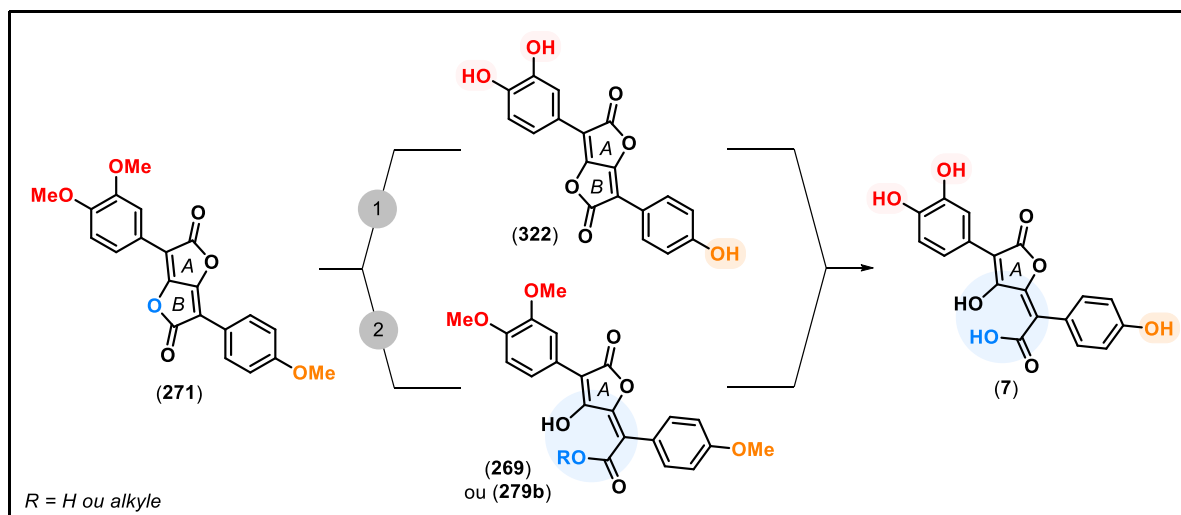


Schéma 91 – Récapitulatif des deux stratégies de synthèse étudiées pour la synthèse totale de l'acide xérocomique.

L'ouverture du motif buténolide a d'abord été classiquement réalisée par hydrolyse (*i. e.* en chauffant au reflux dans un mélange H₂O/acétone : 1:4 (v/v)), puis par méthanolyse (*i. e.* en chauffant au reflux dans le méthanol). Dans les deux cas, cette réaction est quantitative, quel que soit le dérivé pulvinique considéré et le groupement protecteur choisi. En revanche, elle n'est pas intrinsèquement régiosélective et elle induit la formation de deux isomères : l'ouverture du cycle A donne le composé (269), précurseur de l'acide *isoxérocomique* et l'ouverture du cycle B conduit au composé (268) (Schéma 92).

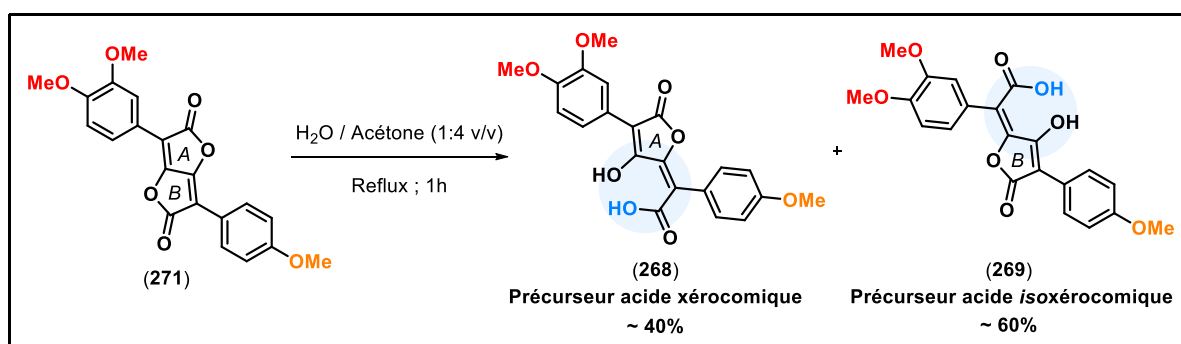


Schéma 92 – Hydrolyse de l'acide bistéronique précurseur de l'acide xérocomique.

Il est à noter que les deux isomères (**268**) et (**269**) formés par la simple hydrolyse du motif buténolide sont quasiment inséparables en chromatographie en phase normale (sur silice vierge), car leur différence de polarité est trop tenue. Une purification par HPLC préparative (en phase inverse) est requise, ce qui n'est pas compatible avec nos exigences de remontée de matière pour la synthèse de l'acide xérocomique. De plus, nous avons remarqué que ces deux isomères sont en équilibre dynamique. Ainsi, même après les avoir isolés l'un de l'autre, chaque fraction pure finit par être de nouveau constituée du mélange des deux isomères (Schéma 92). Au vu des différentes limites que nous venons d'exposer (*i. e.* purification et équilibre thermodynamique), il apparaît que cette voie de synthèse n'est pas adaptée aux composés dissymétriques, comme le précurseur des acides xérocomique et *isoxérocomique*. Néanmoins, elle garde toute sa pertinence pour les dérivés bistétroniques symétriques : c'est ainsi qu'en appliquant cette simple hydrolyse à l'acide bistétronique pulvinique (**315**), nous avons pu synthétiser l'acide pulvinique (**323**) en tant que tel (Schéma 93).

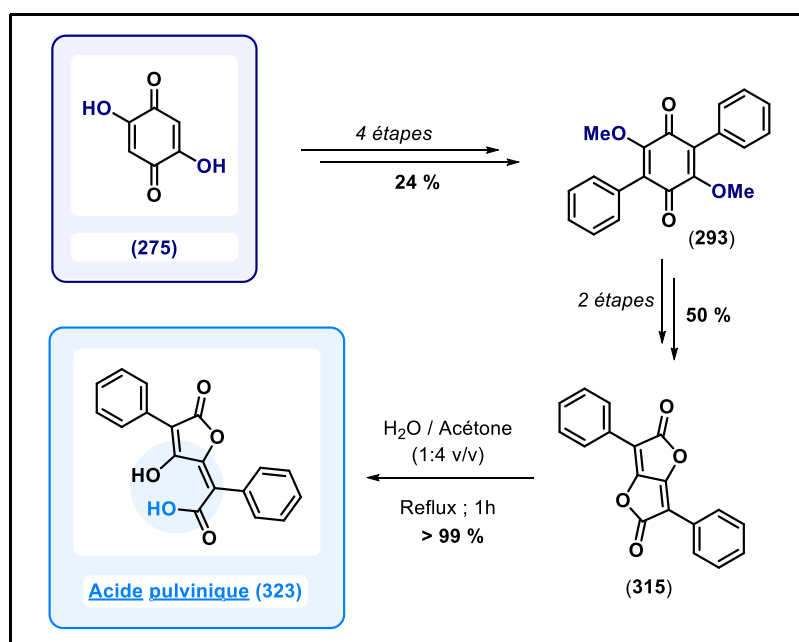


Schéma 93 – Synthèse totale de l'acide pulvinique (**323**), réalisée au laboratoire.

Concernant la synthèse de composés dissymétriques et notamment du précurseur de l'acide xérocomique, les deux limites de l'hydrolyse des acides bistétroniques évoquées précédemment (*i. e.* purification et équilibre thermodynamique) ne sont pas rencontrées lors de la méthanolyse du motif buténolide, nous avons donc choisi de nous tourner préférentiellement vers cette voie (Schéma 94). D'autant plus que la liaison C-O de l'ester

formé pourra être aisément rompue, soit par saponification, soit simultanément lors de la déprotection des fonctions phénols, suivant le réactif choisi.

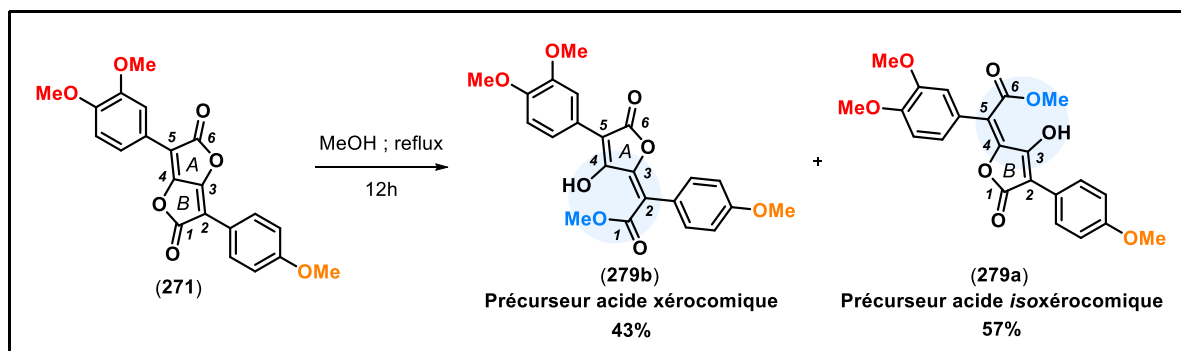


Schéma 94 – Méthanolyse de l'acide bistétronique (271), précurseur de l'acide xérocémique.

L'identification par RMN des deux isomères (279a) et (279b) obtenus par méthanolyse n'a pas été aisée, du fait de la présence de nombreux carbones quaternaires et d'hétéroatomes. L'analyse HMBC a été déterminante, car elle indique que les protons portés par les cycles aromatiques corrèlent avec les carbones 2 et 5 (en α des carboxyles) (corrélation en J^3 ; Schéma 95). En présumant que le signal du carbone 5 sera plus blindé que celui du carbone 2, il a été possible d'attribuer définitivement les deux structures (279a) et (279b).^h

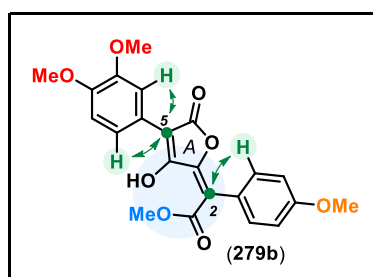


Schéma 95 – Corrélations J^3 entre les protons aromatiques et les carbones 2 et 5 ayant permis d'attribuer définitivement les structures des composés (279a) et (279b).

Dans le cas des phénols protégés par des groupements méthyles, l'attribution finale a pu être validée grâce à l'obtention d'un cliché de diffraction aux RX, obtenu pour la molécule (279b) (co-cristallisée avec une molécule d'acétonitrile) (Figure 5).

^h Il est à noter que lors de l'utilisation de groupement protecteur de type benzyle, la polarité des deux isomères est inversée sur CCM : l'analyse HMBC et par conséquent, l'attribution des deux structures possibles à chaque isomère, doit être effectuée systématiquement.

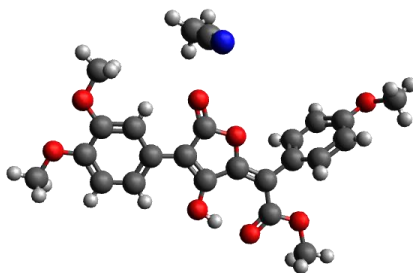


Figure 5 – Cliché de DRX du composé (**279b**), précurseur de l'acide xérocomique.

Concernant la réaction de méthanolyse, on note un ratio d'ouverture des cycles **A**:**B** de **3:2** (Schéma 94), ce qui peut s'expliquer par un effet *push-pull* des groupements méthoxyles. En effet, par effet mésomère longue distance, les groupements méthoxyles des cycles aromatiques enrichissent le carboxyle le plus éloigné, diminuant ainsi son électrophilie (Schéma 96).

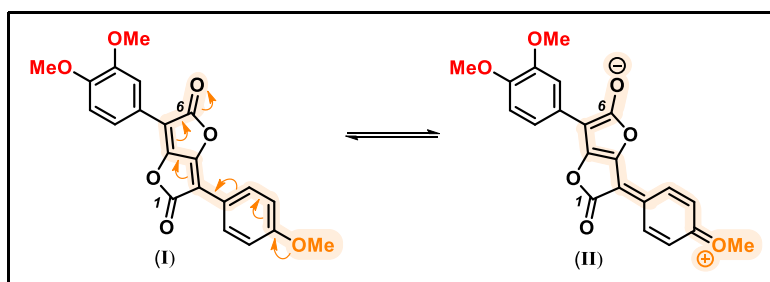


Schéma 96 – Effet *push-pull* du groupement méthoxyle orange (en position *para*) sur le composé (**271**).

Or, sur le catéchol méthylé, la compétition entre les groupements méthoxyles limite légèrement la mésométrie sur le carbone 1, ainsi le carbone 6 se retrouve légèrement plus électrophile que le carbone 1, ce qui explique l'ouverture préférentielle du cycle A par rapport au cycle B.

Concernant la purification du brut réactionnel de méthanolyse, les deux composés (**279a**) et (**279b**) obtenus après méthanolyse sont certes séparables par chromatographie en phase normale, mais dans les mêmes conditions, les produits de méthanolyse de l'acide bistéronique (**319**) comportant des benzyles comme groupements protecteurs ne sont pas séparables. Il aurait été judicieux de tester d'autres nucléophiles que le méthanol (ex : une chaîne alkyle plus longue) pour conférer aux composés une différence de polarité plus grande et ainsi faciliter la purification. Par manque de temps, cela n'a pas pu être réalisé.

Enfin, il est à noter que l'application de cette étape de méthanolyse des acides bistétroniques étudiés nous a permis de réaliser, en annexe du présent travail de thèse, la synthèse totale de l'acide pinastrique (**291**) (Schéma 97), un acide pulvinique extrait des lichens *Lepraria* sp.²¹⁵ et dont la structure a été présentée sur la Figure 2 (page 122).

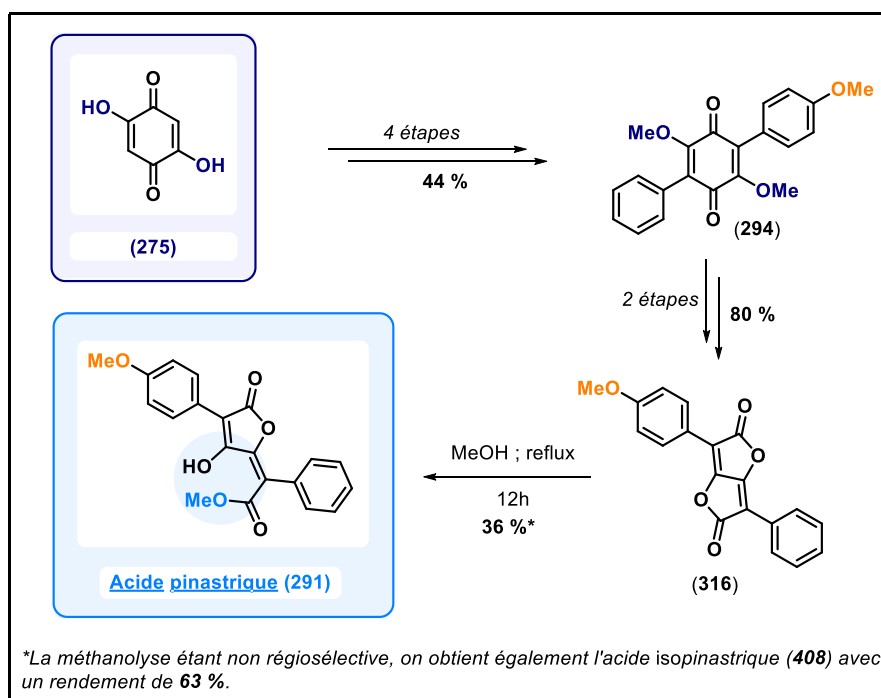


Schéma 97 – Synthèse totale de l'acide pinastrique (**291**) et isopinastrique (**408**), réalisée au laboratoire.

1.2.5.2 Déprotection des fonctions phénols après l'ouverture d'un motif buténolide

Une fois que la mono-ouverture de l'acide bistétronique a été réalisée et que le précurseur des acides pulviniques a été isolé et purifié, la problématique de la déprotection des fonctions phénols s'est présentée de nouveau. Au vu des résultats précédemment décrits dans la partie 1.2.5.1 de ce chapitre (Tableau 8, page 134), nous avons recherché d'autres méthodes de déméthylation à appliquer à nos substrats. Concernant les groupements méthyles, notre attention s'est portée sur les différents protocoles développés en matière de dépolymérisation de la lignine issue de la biomasse, car la similarité structurale avec les acides pulviniques est forte (*i. e.* ce sont des polyphénols), c'est une matière peu réactive et peu soluble dans les solvants organiques usuels (comme nos substrats), la rupture efficace des liaisons C-O de cette matière première très abondante est, de ce fait, particulièrement complexe et constitue un enjeu majeur pour la chimie biosourcée. Dans ce domaine, la

technologie des liquides ioniques semblent très prometteuse et de nombreux articles ont déjà montré leur efficacité en matière de désalkylation des éthers aryles alkyles, tout en utilisant des conditions plus douces que les réactifs classiques (BBr_3 , HBr , HI etc ...) et en facilitant le traitement des bruts réactionnels.^{7, 52, 74} Plus spécifiquement, les paramètres clés influençant la réactivité des liquides ioniques dans la rupture des liaisons éthers-oxydes sont l'acidité des liquides ioniques (donnée par la constante de Hammett H_0) et la nucléophilie de leur contre-ion. Ainsi, les liquides ioniques de type halogénure d'imidazole sont les meilleurs candidats, car ils présentent la plus forte acidité (*i. e.* une constante de Hammett H_0 faible) et les halogénures sont de bons nucléophiles peu encombrés.⁶⁴ Beaucoup de travaux proposent de combiner l'action des halogénures d'imidazole aux micro-ondes pour augmenter les rendements et la cinétique des réactions concernées.^{52, 220} Nous nous sommes donc intéressés aux travaux de l'équipe *Biopolymères lignocellulosiques* de l'Institut Jean-Pierre Bourgin (INRAE, Versailles) et avons repris leurs conditions publiées en 2018 pour la déméthylation de la vanilline, à savoir : un chauffage par micro-ondes en présence de 1-méthylimidazole/HBr (noté [HMIM] [Br]).²⁷⁶ L'ensemble des résultats est détaillé sur le Schéma 98. Il est à noter que sur le même principe, nous avons également testé le chlorure de pyridinium (noté py^+HCl) en marge des essais sur les liquides ioniques, sans succès : aucune conversion n'a été observée.

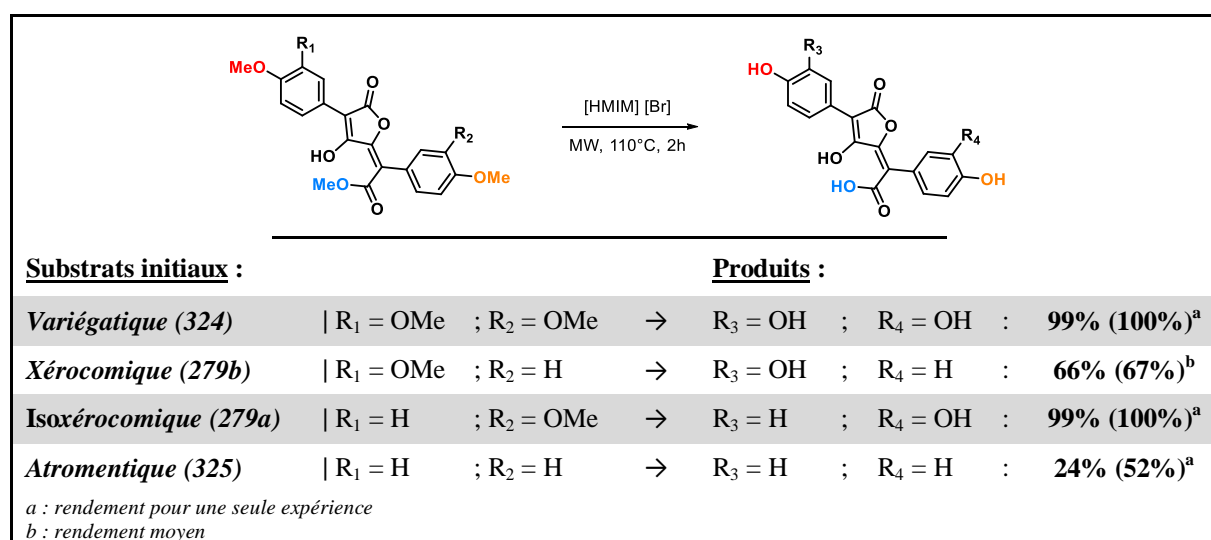


Schéma 98 – Déprotection des fonctions phénols pour les dérivés pulviques par chauffage par micro-ondes en présence de [HMIM] [Br] (les taux de conversion sont exprimés entre parenthèse).

L'utilisation du liquide ionique [HMIM] [Br] répond à nos attentes, car il est possible d'obtenir l'acide xéromique et ses analogues avec des rendements décents sans que la

dégradation des substrats de départ soit majoritaire et une simple extraction liquide-liquide permet de traiter le brut réactionnel. En revanche, plusieurs limites persistent toujours à ce jour : premièrement, les taux de conversion sont particulièrement bas, ce qui peut s'expliquer par la faible solubilité des composés initiaux dans le liquide ionique choisi ; de plus, comme le montre les rendements affichés sur le Schéma 98, la réaction est plutôt capricieuse et d'un lot à l'autre, les rendements peuvent très fortement varier. Ces fortes variations peuvent s'expliquer, d'une part, par la stabilité du liquide ionique dans le temps, et par la difficulté à monter en échelle d'autre part. Les discussions avec l'équipe de l'Institut Jean-Pierre Bourgin ont permis de mettre l'accent sur le séchage du liquide ionique comme paramètre important influençant le rendement de la réaction, sans pour autant que ce paramètre puisse être efficacement contrôlé sur des lots de plus de 100 mL. Enfin, pour augmenter les rendements, nous avons essayé d'augmenter la durée de la réaction, mais cela ne faisait que favoriser la proportion de matière dégradée. Au vu de tous ces éléments, nous avons décidé de conserver ces conditions réactionnelles pour pouvoir synthétiser l'acide xéromique en quantité suffisante pour la partie du projet de thèse décrite au chapitre 3 (*i. e.* l'étude du comportement de l'acide xéromique en conditions oxydantes).

Notons que grâce à cette méthode de déprotection et en nous basant sur la voie de synthèse mise au point jusqu'à présent, nous avons pu réaliser la synthèse totale de l'atromentine (**2**) et de la variégatine (**326**), deux terphénylquinones naturelles couramment isolées parmi les Basidiomycètes.^{83, 121, 209, 245} Plus précisément, l'atromentine (**2**) est un métabolite fongique jouant le rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse des acides pulviniques (cf Schéma 8 – page 49), tandis que la variégatine (**326**) est supposée être le précurseur d'une autre terphénylquinone fongique : l'acide théléphorique (**292**) (Schéma 99).

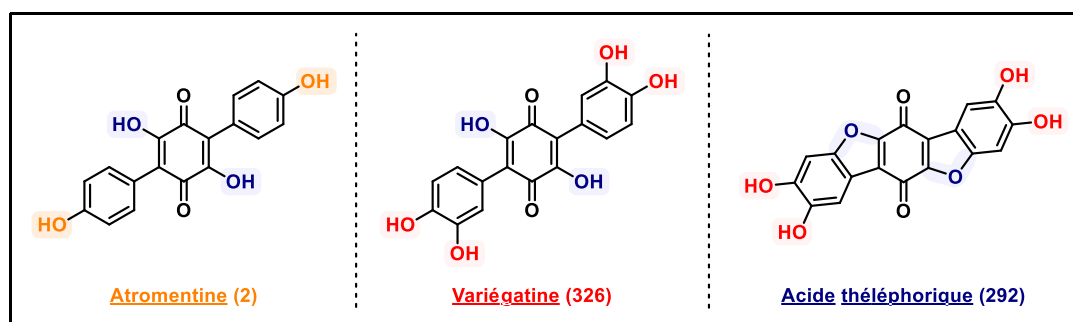


Schéma 99 – Structures de trois terphénylquinones fongiques : l'atromentine (**2**), la variégatine (**326**) et l'acide théléphorique (**292**).

Ainsi, au cours de ce doctorat, les synthèses totales de l'atromentine (**2**) et de la variégatine (**326**) ont pu être réalisées en seulement **4 étapes**, avec **18%** de rendement global pour l'atromentine (**2**) (Schéma 100) et **19%** pour la variégatine (**326**) (Schéma 101).

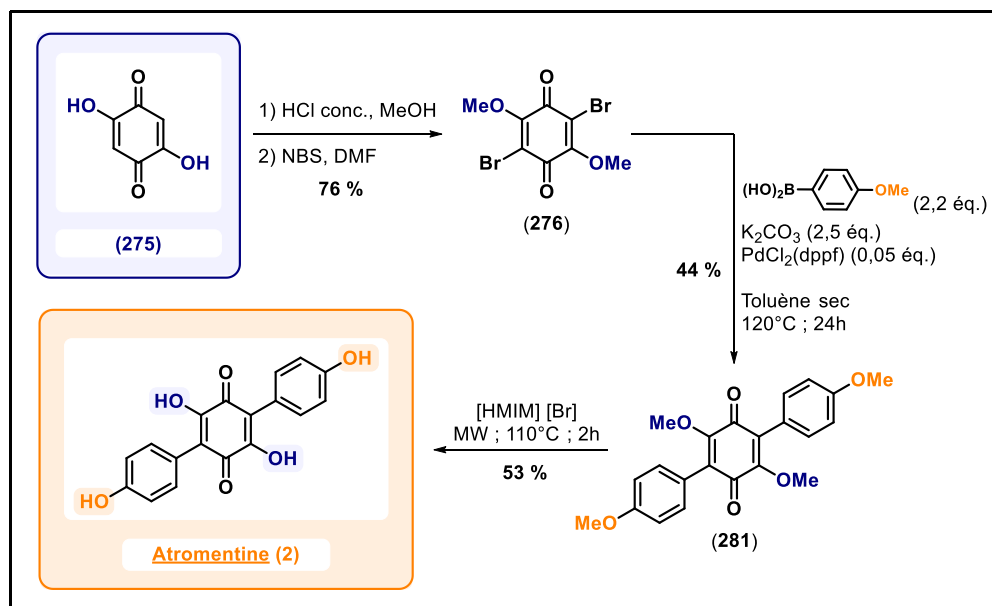


Schéma 100 – Synthèse totale de l'atromentine (**2**) par couplage de Suzuki-Miyaura, réalisée au laboratoire.

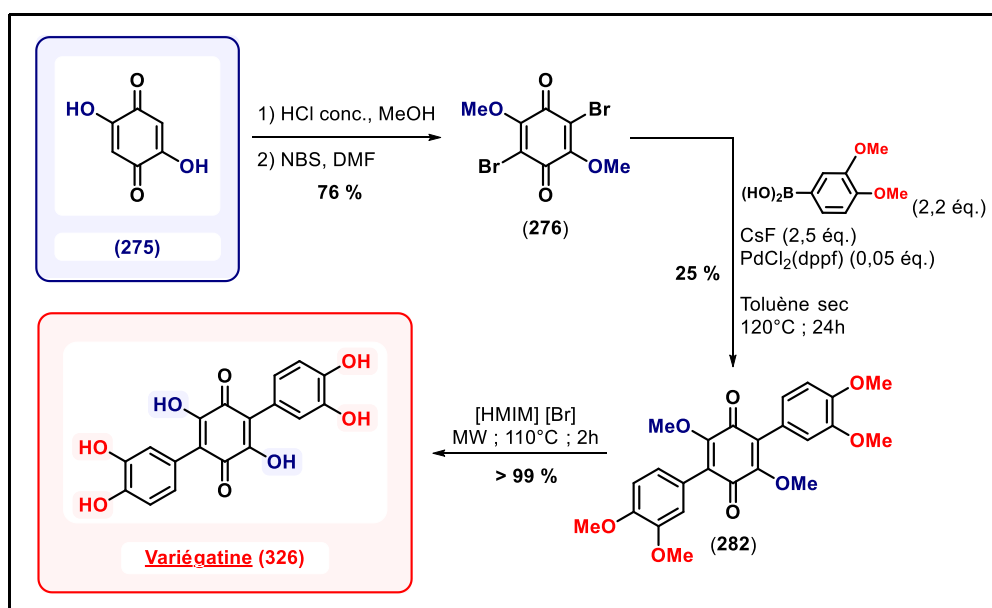


Schéma 101 – Synthèse totale de la variégatine (**326**) par couplage de Suzuki-Miyaura, réalisée au laboratoire.

Notons que l'atromentine (**2**) a déjà été synthétisé par différentes voies au cours du XX^e siècle, la plus ancienne publiée remontant à 1928 par F. Kögl, par condensation d'esters pyruviques sur un ester d'oxalate en milieu basique.¹⁵³ A l'inverse, on ne dénombre qu'une

seule synthèse de la variégatine (**326**) reportée en 1975 par R. L. Edwards. Celle-ci fait appel à une arylation de Meerwein entre une 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone et un 3,4-diméthoxyphényldiazonium, puis à une hydrolyse sulfurique pour libérer les fonctions phénols et ainsi obtenir la variégatine (**326**) avec un rendement global de 0,6% sur 6 étapes.⁸³

En parallèle de ces travaux, nous avons repris les essais d'hydrogénation des groupements benzyles sur les précurseurs des acides xérocomique et *isoxérocomique*. Les premiers essais réalisés sur les dérivés tribenzylés sous la forme « acide carboxylique » (**327a**) et (**327b**) n'ont pas permis d'obtenir les acides pulviniques (Tableau 9).

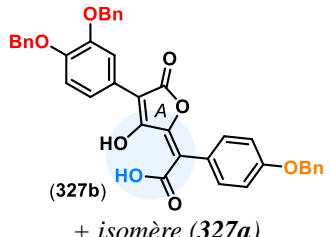
<u>Substrats</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions expérimentales</u>	<u>Résultats</u>
 (327b) + isomère (327a)	H ₂ , Pd/C (10%)	AcOEt, reflux 1 semaine	Qq%
	H ₂ , Pd/C (10%)	AcOEt, t. a., bonde à hydrogène 2 jours	Pas de réaction

Tableau 9 – Récapitulatif des conditions d'hydrogénation testées sur les composés (**327a**) et (**327b**).

Dans la perspective de l'étude du comportement de la fonction catéchol des acides pulviniques en milieu oxydant (cf chapitre 3 de ce manuscrit), nous avons utilisé un dérivé pulvinique possédant des groupements protecteurs orthogonaux (*i. e.* groupement benzyle pour la fonction catéchol et groupement méthyle pour la fonction phénol), de façon à pouvoir déprotéger sélectivement la fonction catéchol. Les conditions d'hydrogénation ont été appliquées sur le mélange des précurseurs de l'acide xérocomique et *isoxérocomique*ⁱ (Schéma 102). Ces conditions ont permis d'obtenir la conversion totale des substrats initiaux et la déprotection de la fonction catéchol : les composés (**329**) et (**331**). De manière décevante, le composé (**329**), précurseur de l'acide xérocomique, n'a pas pu être entièrement caractérisé en raison de sa faible stabilité. Par ailleurs, les produits de dégradation n'ont pas pu être identifiés. Le composé (**331**), précurseur de l'acide *isoxérocomique*, présente, quant à lui, une stabilité plus grande et a pu être totalement caractérisé.

En marge de ces constatations, on peut noter également que ces conditions d'hydrogénation génèrent la présence des deux sous-produits (**330**) et (**332**) non-désirés,

ⁱ Comme cela a été dit plus haut (section 1.2.5.1 de ce chapitre – page 108), la présence des groupements benzyles rend la séparation des deux isomères (**327a**) et (**327b**) particulièrement complexe ...

correspondant à la réduction de l'insaturation entre le cœur tétronique et le carboxyle. Bien que cette insaturation soit la plus susceptible d'être réduite, cette réactivité est surprenante, car cette insaturation est impliquée dans le système π présent sur toute la molécule. À l'avenir, cette réaction d'hydrogénation devra donc être optimisée (en jouant sur la température et la durée de la réaction notamment) pour ne former que les produits d'intérêt (**329**) et (**331**) et ainsi pouvoir achever leur caractérisation.

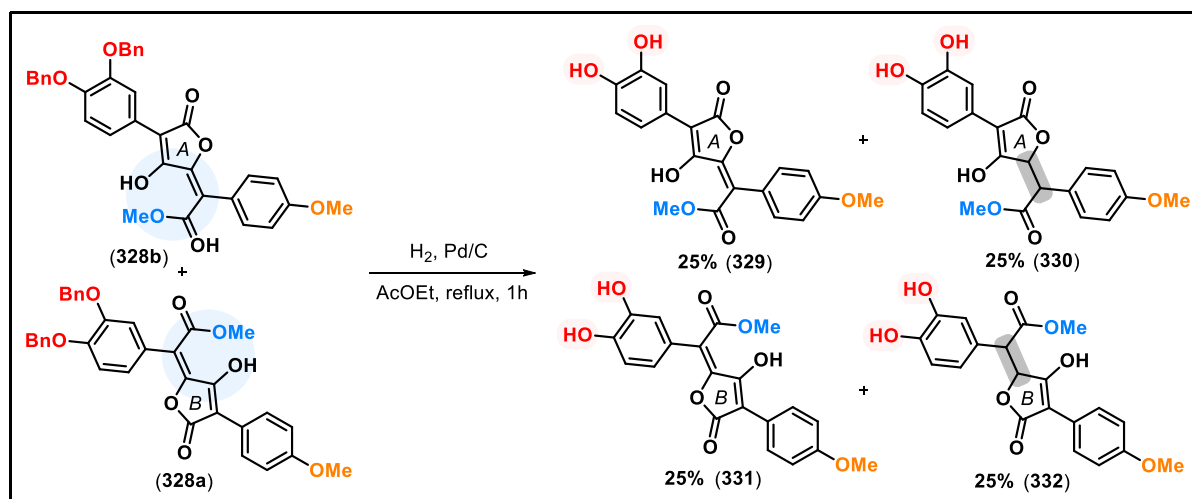


Schéma 102 – Produits d'hydrogénation des précurseurs de l'acide xérocomique et isoxérocomique.

1.3 Conclusion

Les travaux réalisés dans cette première partie du projet de thèse ont permis de réaliser, après de nombreux essais d'optimisation, la synthèse totale de l'acide xérocomique (**7**), un acide pulvinique naturel, avec un rendement global de 5,3% sur 8 étapes. Grâce à l'étape finale de déprotection par [HMIM] [Br], malgré les faibles rendements, il est possible de synthétiser l'acide xérocomique (**7**) en quantité raisonnable pour étudier son comportement en conditions oxydantes (cf Chapitre 3), ainsi que de synthétiser les acides atromentique (**48**), isoxérocomique (**333**) et variégatique (**8**). Ces conditions de déprotection nous ont également permis de réaliser la synthèse totale de l'atromentine (**2**) et de la variégatine (**326**), deux terphénylquinones symétriques naturelles, qui sont des intermédiaires dans la biosynthèse des acides pulviniques. Enfin, l'étude réalisée sur l'hydrolyse et la méthanolyse des acides bistétroniques nous ont permis de synthétiser trois autres acides pulviniques naturels appartenant à la même série chimique : l'acide pulvinique en tant que tel (**323**), l'acide pinastrique (**291**) et l'acide isopinastrique (**408**). L'ensemble de ces 9 produits naturels synthétisés au cours de ce doctorat est résumé sur la Figure 6.

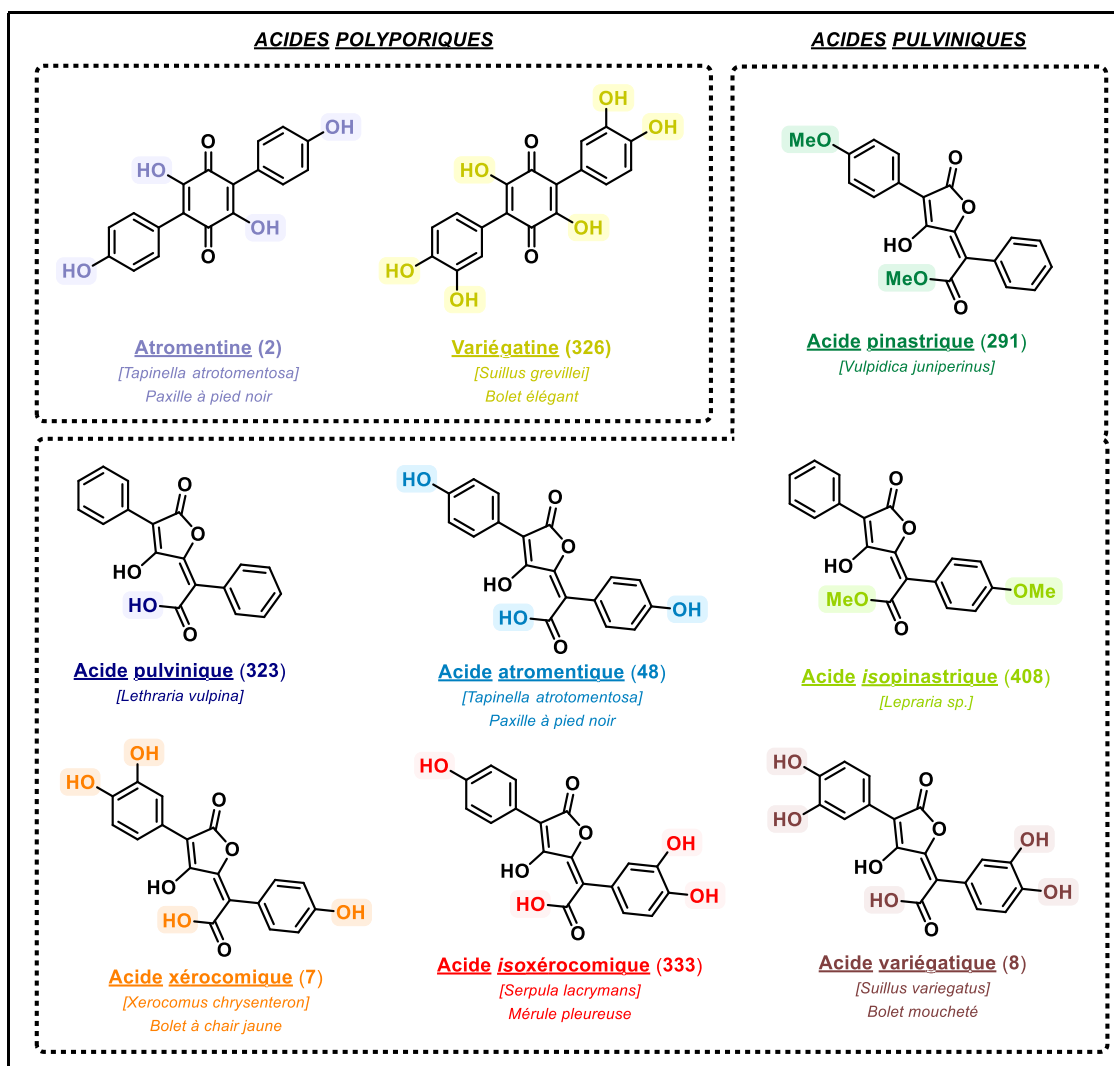


Figure 6 – Structures des 9 produits naturels synthésisés au cours de ce doctorat.

Au cours de ces différents travaux, les intermédiaires de types acides bistétroniques ont révélé, de manière inattendue, qu'ils pouvaient émettre un fort rayonnement sous irradiation UV (Figure 7). Nous avons donc décidé d'étudier les propriétés de fluorescence de ces différents composés.



Figure 7 – Acides bistétroniques xérocomique (271) et atromentique (258) sous irradiation UV.

2 FLUORESCENCE DES ACIDES BISTÉTRONIQUES

Certains intermédiaires de la synthèse de l'acide xérocromique, appelés acides bistétroniques, ont révélé des propriétés de fluorescence inattendues. Il était donc judicieux de caractériser les propriétés spectrales de ces composés, en mesurant notamment le rendement quantique de fluorescence. Les résultats obtenus sont présentés après un rapide rappel théorique.

2.1 Propriétés spectrales de molécules organiques

L'absorption d'un photon par une molécule organique entraîne une modification de son état électronique : elle atteint ainsi un état excité singulet (S_n) et elle va chercher à retourner à son état fondamental (S_0). L'outil de choix permettant de visualiser simplement ces processus d'excitation et de désexcitation est le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 8). À la lumière de ce diagramme, les différents modes de désexcitation, radiatifs ou non, qui permettent à une molécule excitée de retourner à son état fondamental, sont :

- **La fluorescence** : émission d'un photon (le retour à l'état fondamental S_0 s'effectue à partir d'un état électronique singulet S_n) ;
- **La conversion interne** : retour direct à l'état fondamental par relaxation vibrationnelle de la molécule (donc sans émission de photon) ;
- **Le croisement inter-système** : conversion non-radiative du spin singulet S_n d'un état électronique en son état triplet correspondant T_n (le retour à l'état fondamental S_0 à partir de cet état triplet T_n provoque l'émission d'un photon et est appelé phosphorescence) ;
- **Les interactions entre la molécule excitée et son environnement** (ex : transfert de charge intramoléculaire, d'électrons, de protons et d'énergie, formation d'excimères ou d'exciplexes [complexes entre une molécule à l'état excité et une molécule à l'état fondamental], réaction photochimique etc ...).

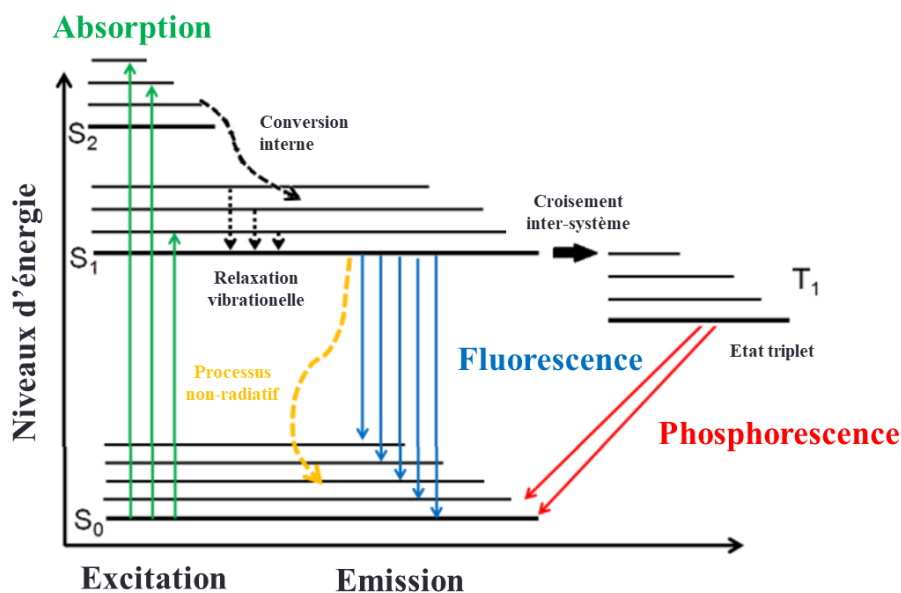


Figure 8 – Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié.¹⁶²

Il est à noter que le diagramme de Perrin-Jablonski présenté en Figure 8 est simplifié : il suppose que les transitions électroniques sont suffisamment rapides (de l'ordre de 10^{-15} s) pour pouvoir considérer que les noyaux atomiques des molécules concernées demeurent immobiles par rapport à leurs électrons et ceci d'après le principe de Franck-Condon.

Les propriétés spectrales qui nous intéressent dans le cadre de ce travail de thèse sont l'absorption et l'émission par fluorescence. Nous allons développer plus particulièrement ces deux points dans les parties suivantes.

2.1.1 Absorbance et coefficient d'extinction molaire

L'étude des propriétés d'absorption d'une molécule passe par la mesure de son **absorbance A**, *i. e.* de sa capacité à absorber un photon suivant sa longueur d'onde. L'absorbance se mesure comme le rapport entre l'intensité incidente I_0 irradiant un composé en solution et l'intensité transmise I , pour une longueur d'onde donnée : $A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$. Un balayage de toutes les longueurs d'onde du visible et du proche UV permet de faire apparaître les transitions électroniques possibles au sein d'une molécule ($S_0 \rightarrow S_n$) sous la forme de maxima d'absorbance. Pour chacune de ces transitions électroniques, il est possible de définir un **coefficient d'extinction molaire ϵ** ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), reflétant l'efficacité avec laquelle une molécule peut absorber un photon de longueur d'onde donnée. Cette grandeur est propre à une transition électronique d'une molécule donnée. C'est la *loi de Beer-Lambert* qui permet

d'accéder à cette grandeur. Si la solution étudiée est suffisamment diluée (*i. e.* pas de formation d'agrégat) et en l'absence d'autres espèces absorbantes, la loi de Beer-Lambert s'énonce comme suit : l'absorbance A d'une molécule à une longueur d'onde λ donnée est directement proportionnelle au produit de sa concentration c (mol.L^{-1}) par la longueur du chemin optique d'absorption l (cm), la proportionnalité étant assurée par le coefficient d'extinction molaire ε ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) :

$$A(\lambda) = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Ainsi, pour une transition électronique donnée, une molécule possédant un coefficient d'extinction molaire ε élevé absorbe efficacement la lumière.

D'un point de vue expérimental, le coefficient d'extinction molaire ε est obtenu en reportant l'absorbance maximale pour une concentration donnée (la valeur de l étant égale à 1 cm) : la valeur de ε est alors lue comme coefficient directeur de la droite $A_{\text{max}} = f(c)$.

2.1.2 Emission et rendement quantique de fluorescence

Comme cela a été vu sur le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 8), une molécule excitée dans un état singulet peut retourner à son état fondamental par l'émission d'un photon : c'est le phénomène de fluorescence. Ce phénomène, très utilisé en imagerie, peut être quantifié par le **rendement quantique de fluorescence** ϕ_F . Plus précisément, le rendement quantique de fluorescence se définit comme *la fraction de molécules excitées retournant à leur état fondamental par émission de fluorescence, i. e. comme le rapport entre le nombre de photons émis par la molécule et le nombre de photons absorbés*. Il est donc compris entre 0 et 1 ; il est mesuré pour une longueur d'onde d'excitation λ_{exc} correspondant à celle où l'absorbance est maximale (λ_{max}), de manière à maximiser le nombre de photons absorbés et donc émis. La longueur d'onde pour laquelle l'émission est maximale est notée λ_{em} . Le décalage observé entre la longueur d'onde maximale d'absorption λ_{max} et la longueur d'onde maximale d'émission λ_{em} est dû aux différents niveaux d'énergie vibrationnels propres à chaque état d'énergie (cf Figure 8). Ce décalage est appelé **déplacement de Stokes**, il peut être exprimé en nombre d'onde (cm^{-1}) ou longueur d'onde (nm) (Figure 9).

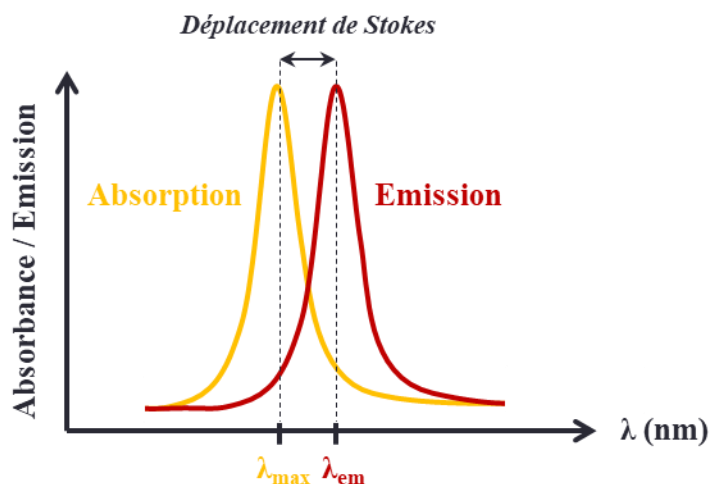


Figure 9 – Visualisation du déplacement de Stokes sur les spectres d'absorption et d'émission d'un composé fictif.

Lorsque le déplacement de Stokes est faible, il est possible que le photon émis lors du processus de désexcitation d'une molécule M^* puisse être ré-absorbé par une même molécule à l'état fondamental M ($M^* + M \rightarrow M + M^*$) : ce phénomène est appelé *transfert radiatif* ou *effet de filtre interne* et provoque une diminution de l'intensité de fluorescence. D'un point de vue pratique, il est donc préférable de concevoir des molécules fluorescentes avec un large déplacement de Stokes, de façon à éviter ce phénomène. A titre d'exemple, on peut citer le sulfate de quinine, un standard historique de fluorescence, dont le déplacement de Stokes est élevé et vaut environ 115 nm ($\lambda_{\max} = 345 \text{ nm}^{273}$ et $\lambda_{\text{em}} = 451 \text{ nm}^{38}$).

Par la suite, le rendement quantique de fluorescence est mesuré en utilisant une référence dont le rendement quantique de fluorescence est connu pour un solvant et une longueur d'onde donnés. La référence est choisie de telle sorte que la gamme spectrale couverte en absorption et émission soit proche du composé étudié, *i. e.* que la longueur d'onde d'excitation de la référence soit proche de la longueur d'onde d'absorption maximale du composé étudié et que leur longueur d'onde d'émission soit similaire. L'équation utilisée pour calculer le rendement quantique de fluorescence est la suivante :³⁸

$$\Phi_F^i = \frac{f_{\text{réf}}}{f_i} * \frac{F_i}{F_{\text{réf}}} * \left(\frac{n_i}{n_{\text{réf}}} \right)^2 * \Phi_F^{\text{réf}}$$

Avec :

- Φ_F^i : rendement quantique du composé i à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc}
- $f_i = 1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}$, où $A(\lambda_{exc})$ est l'absorbance du composé i à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc}
- F_i : aire sous la courbe d'émission du composé i à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc}
- n_i : indice de réfraction du solvant (à 25°C) dans lequel le composé i est solubilisé
- $n_{réf}$: indice de réfraction du solvant dans lequel le composé de référence est solubilisé

Les données expérimentales obtenues sont : l'aire sous la courbe d'émission F et l'absorbance $A(\lambda_{exc})$, obtenues pour différentes concentrations en composé i. Pour chaque composé, on trace donc un graphe représentant $F_i = g(f_i)$, on obtient donc :

$$F_i = \frac{F_{réf}}{f_{réf}} * \left(\frac{n_{réf}}{n_i} \right)^2 * \frac{\Phi_F^i}{\Phi_F^{réf}} * f_i = \alpha_i * f_i$$

On note α_i , le coefficient directeur de la droite expérimentale affine obtenue pour les composés i à étudier et on note β , le coefficient directeur de la droite obtenue pour le standard de fluorescence. Ainsi, on peut calculer le rendement quantique de fluorescence Φ_F^i pour chaque composé i à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} avec la formule suivante, issue des données expérimentales :

$$\Phi_F^i = \frac{\alpha_i}{\beta} * \left(\frac{n_i}{n_{réf}} \right)^2 * \Phi_F^{réf}$$

Il est à noter que la mesure du rendement quantique de fluorescence s'effectue préférentiellement sur des solutions diluées (où l'absorbance maximale est inférieure à 0.1), pour limiter les interactions intermoléculaires au sein de la solution.

Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus lors de l'étude photophysique des composés d'intérêt : les acides bistétroniques.

2.2 Résultats et discussion

L'étude des propriétés spectrales a été réalisée sur six acides bistétroniques : un précurseur de l'acide pulvinique (**315**), noté **Pulv**, un précurseur de l'acide pinastrique (**316**), noté **Pina**, un précurseur de l'acide atromentique (**258**), noté **Atro**, deux précurseurs de

l'acide xéromique (**271**) et (**319**), notés **Xéro** et **XéroBn**, et un précurseur de l'acide variégatique (**272**), noté **Varié** (Figure 10).

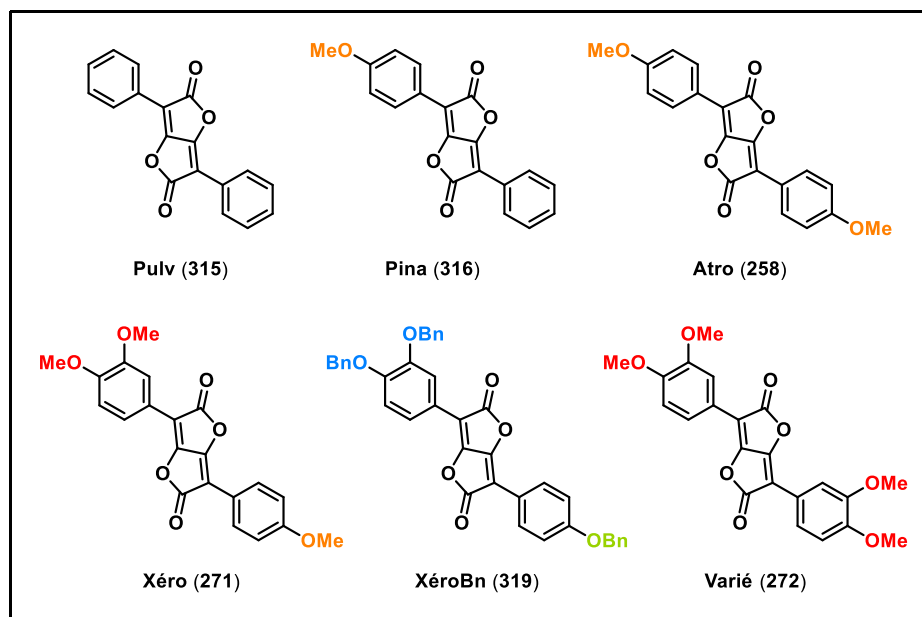


Figure 10 – Structure des six acides bistétroniques étudiés. De nouvelles abréviations sont proposées pour cette partie du manuscrit, afin de faciliter l'analyse des résultats.

Dans un premier temps, les spectres d'absorbance UV-visible de chaque acide bistétronique ont été mesurés dans différents solvants (Tableau 10). Les mesures des composés **Pulv** et **Pina** ayant été faites après celles des composés **Atro**, **Xéro**, **XéroBn** et **Varié**, seuls les deux solvants les plus significatifs ont été testés : le toluène et le chloroforme.

<u>Solvants</u>	<u>Pulv</u>	<u>Pina</u>	<u>Atro</u>	<u>Xéro</u>	<u>(XéroBn)</u>	<u>Varié</u>	$\Delta\lambda_{max}$
Toluène	383 nm	409 nm	422 nm	436 nm	(432 nm)	448 nm	+13 nm
1,4-dioxane	/	/	416 nm	428 nm	(424 nm)	442 nm	+13 nm
AcOEt	/	/	416 nm	426 nm	(423 nm)	441 nm	+12,5 nm
CHCl ₃	382 nm	412 nm	427 nm	437 nm	(436 nm)	450 nm	+12,5 nm
CH ₂ Cl ₂	/	/	424 nm	433 nm	(433 nm)	446 nm	+11 nm
Acétone	/	/	414 nm	422 nm	(421 nm)	437 nm	+11,5 nm
DMF	/	/	391 nm	394 nm	(392 nm)	398 nm	/

Tableau 10 – Valeurs de λ_{max} mesurées pour les six acides bistétroniques étudiés dans 7 solvants. $\Delta\lambda_{max}$ correspond à l'écart moyen entre les valeurs de λ_{max} des composés **Pulv**, **Pina**, **Atro**, **Xéro** et **Varié**.

Premièrement, on ne note aucun effet solvatochromique clair sur la longueur d'onde d'absorbance maximale λ_{max} , à la différence près que les valeurs de λ_{max} sont sensiblement

plus faibles dans le DMF par rapport à tout autre solvant étudié (393 nm en moyenne) : ce déplacement hypsochrome est dû à la forte constante diélectrique du DMF. En effet, le DMF est un solvant présentant une constante diélectrique particulièrement élevée ($\epsilon_R = 38,25$), qui est environ 20 fois supérieure à celles du toluène ou du 1,4-dioxane (cf Tableau 11). Par conséquent, le moment dipolaire des molécules étudiées à l'état fondamental est particulièrement stabilisé dans ce solvant. Le gap entre le niveau d'énergie de l'état fondamental et celui de l'état excité est plus élevé, l'énergie à fournir doit être plus grande, donc la longueur d'onde correspondante plus faible.

<u>Solvants</u>	<u>ϵ_R</u>	<u>Solvants</u>	<u>ϵ_R</u>
Toluène	2,38 (25°C)	CH ₂ Cl ₂	8,93 (20°C)
1,4-dioxane	2,21 (25°C)	Acétone	21,01 (20°C)
AcOEt	6,00 (25°C)	DMF	38,25 (20°C)
CHCl ₃	4,81 (20°C)	Eau	78,54 (20°C)

Tableau 11 – Constantes diélectriques ϵ_R des solvants utilisés.^j

Par ailleurs, on remarque que pour les composés **Pina**, **Atro**, **Xéro/XéroBn** et **Varié**, la valeur de λ_{\max} augmente en fonction du nombre de groupements alcoyles électrodonneurs substituants les cycles aromatiques. Plus précisément, on observe un effet bathochrome de 12 nm en moyenne entre chaque acide bistéronique de la série étudiée (à l'exception des mesures réalisées dans le DMF). Cette valeur de $\Delta\lambda_{\max} = 12$ nm est 10 000 fois supérieure aux variations de couleurs détectables par l'œil humain, expliquant ainsi que cet effet bathochrome est visible à l'œil nu. Le composé **Pina** apparaît jaune clair, le composé **Atro** jaune, le composé **Xéro** orange et le composé **Varié** orange foncé. Cet effet bathochrome s'explique par le fait que l'ajout de groupements méthoxylés (électro-donneurs) sur les cycles aromatiques étend et enrichit le système conjugué présent.²⁸⁴ Concernant le composé **Pulv**, nous pouvons noter que ses valeurs de λ_{\max} ne suivent pas cet effet bathochrome moyen de 12 nm, mais présentent plutôt un $\Delta\lambda_{\max} = 28$ nm. Enfin, la comparaison des valeurs de λ_{\max} pour **Xéro** et **XéroBn** montre que le groupement protecteur choisi n'influe pas sur les propriétés spectrales des composés.

Par la suite, pour chaque acide bistéronique, l'absorbance A_{\max} mesurée à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption pour différentes concentrations est reportée

^j *Common Solvents Used in Organic Chemistry : Table of Properties* (<https://organicchemistrydata.org>)

sur un graphe et modélisée par une fonction linéaire (selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot l \cdot c$). La longueur de la cuve l étant standardisée (cf section 2.1.1 du Chapitre 1), le coefficient directeur affiché correspond au coefficient d'extinction molaire ϵ . Un exemple de graphe est proposé sur la Figure 11. Plus précisément, ce graphique reprend les valeurs d' ϵ pour les six acides bistétroniques dans le chloroforme. La droite correspondant au composé **Pina** a la pente la plus forte parmi les quatre composés étudiés dans ce solvant, il apparaît donc que l'acide bistétronique pinastrique présente le coefficient d'extinction molaire le plus élevé, ce qui traduit sa plus grande capacité à absorber la lumière à cette longueur d'onde. L'ensemble des valeurs d' ϵ des acides bistétroniques pour chaque solvant est reporté sur les histogrammes des Figure 12, Figure 13 et Figure 14.

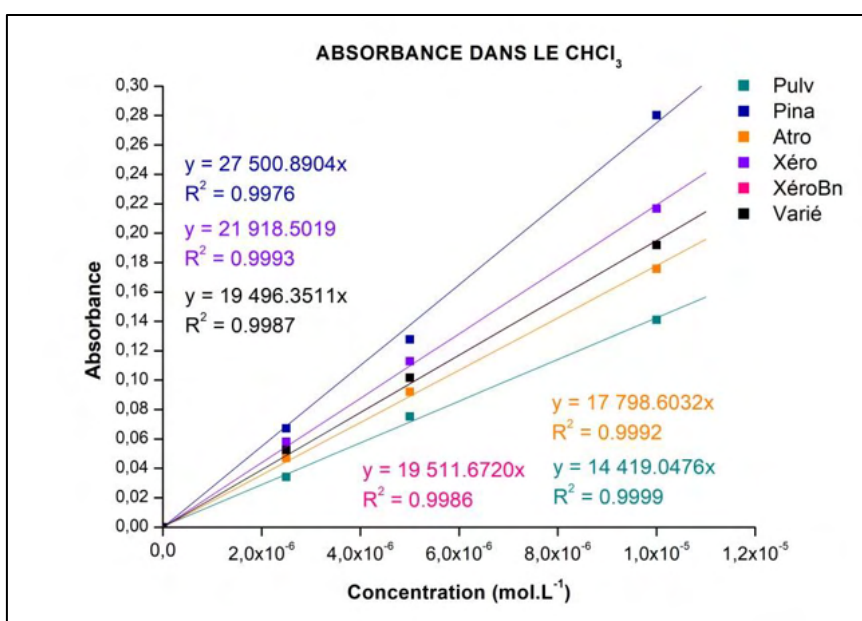


Figure 11 – Absorbance maximale mesurée dans le chloroforme en fonction de la concentration. Les droites des composés **XéroBn** (rose) et **Varié** (noire) sont confondues.

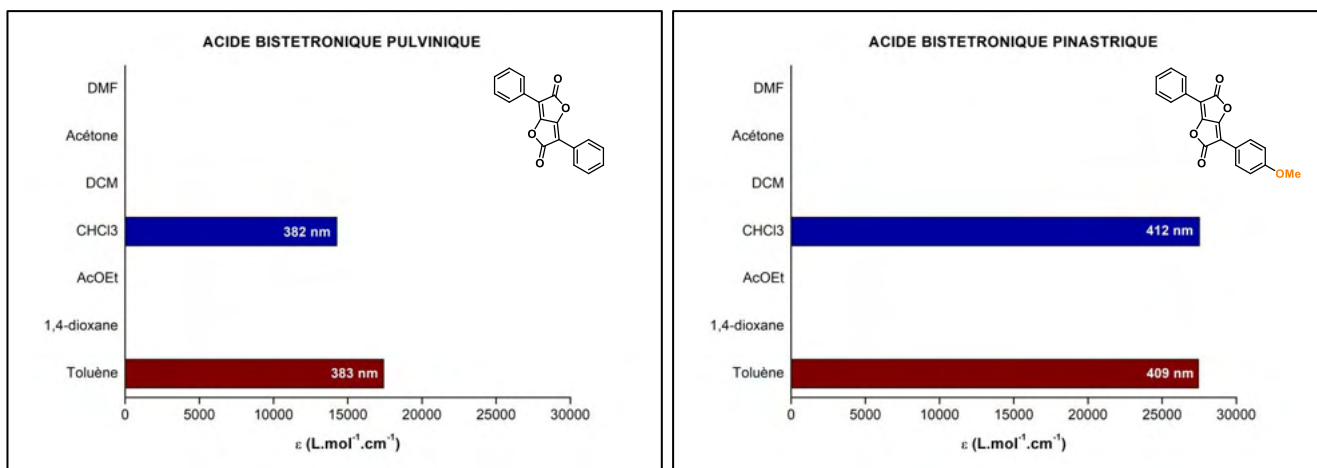


Figure 12 – Coefficient d’extinction molaire ϵ dans différents solvants pour les acides bistrioniques **Pulv** et **Pina** (les longueurs d’onde λ_{\max} pour lesquelles ϵ a été calculé sont reportées sur les histogrammes).

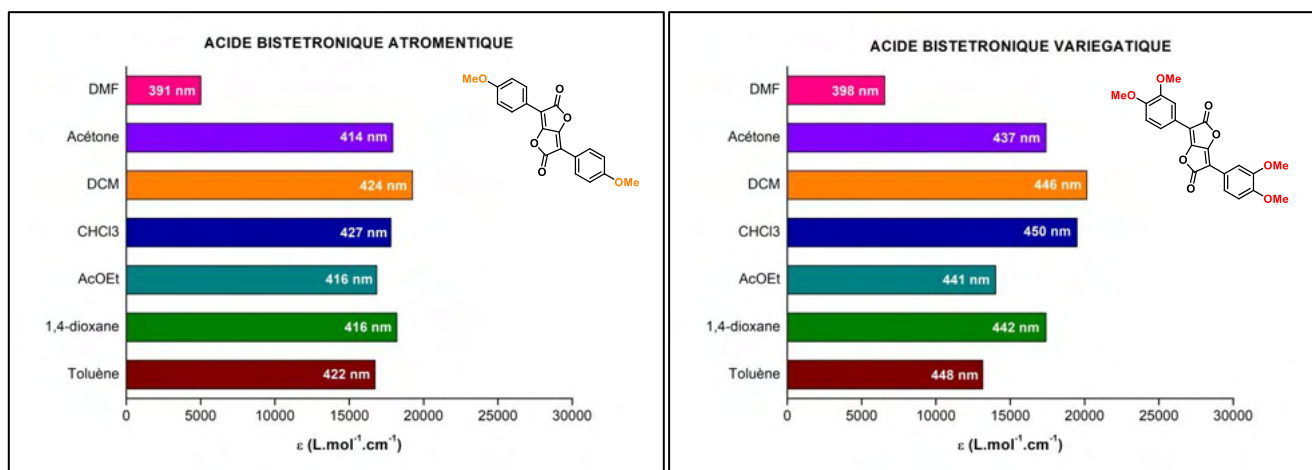


Figure 13 – Coefficient d’extinction molaire ϵ dans différents solvants pour les acides bistrioniques **Atro** et **Varié** (les longueurs d’onde λ_{\max} pour lesquelles ϵ a été calculé sont reportées sur les histogrammes).

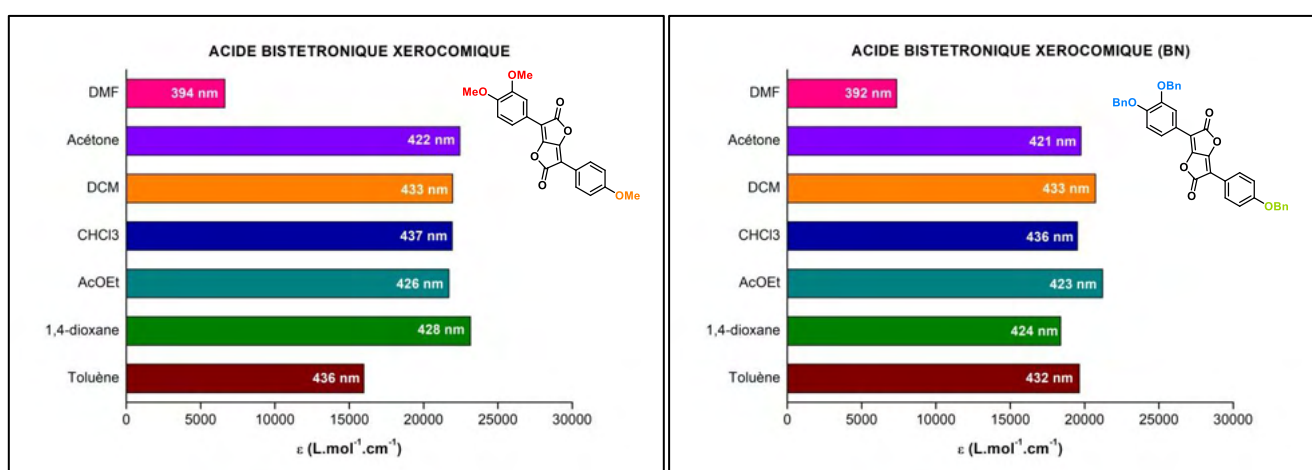


Figure 14 – Coefficient d’extinction molaire ϵ dans différents solvants pour les acides bistrioniques **Xéro** et **XéroBn** (les longueurs d’onde λ_{\max} pour lesquelles ϵ a été calculé sont reportées sur les histogrammes).

Une première analyse de ces histogrammes permet de montrer qu'à l'exception du DMF, le solvant choisi ne présente pas d'influence majeure sur les valeurs d' ϵ mesurées, donc sur les capacités des molécules étudiées à absorber la lumière. La régularité des valeurs d' ϵ mesurées est particulièrement manifeste pour l'acide bistéronique xéromique, quel que soit le groupement protecteur des fonctions phénols (méthyle ou benzyle). Concernant le comportement des molécules étudiées dans le DMF, on remarque une chute drastique et générale des valeurs d' ϵ . Cet effet est connu et souvent reporté dans la littérature, par exemple pour la dopamine²⁹² ou les composés de type azo-cinnoline.²³² Il est dû, de nouveau, à la constante diélectrique particulièrement élevée du DMF. En effet, l'absorption d'un photon nécessite une réorganisation de la molécule concernée et donc une modification de son moment dipolaire, qui est plus ou moins aisée. Dans le cas du DMF, la stabilisation des molécules étudiées à l'état fondamental prédomine, ce qui amoindrit sa capacité à absorber la lumière, d'où une diminution drastique du coefficient d'extinction molaire ϵ .

Enfin, il est à noter que d'ordinaire, l'ajout de groupements électro-donneurs comme les groupements méthoxylés engendre une augmentation du coefficient d'extinction molaire. D'après cette assertion, c'est le composé **Varié** qui devrait présenter les valeurs d' ϵ les plus élevées, or ce n'est pas ce qu'on observe : ce sont les composés **Pina** et **Xéro** qui absorbent le mieux à leur λ_{\max} . Au contraire, les composés **Pulv**, **Atro** et **Varié** présentent des valeurs d' ϵ similaires et plus faibles que pour les composés **Pina**, **Xéro** et **XéroBn**. Cet effet peut s'expliquer par la symétrie centrale des composés **Pulv**, **Atro** et **Varié** : à cause de cette symétrie, le moment dipolaire de ces molécules est peu marqué. La polarisation de ces composés lors de l'excitation est donc moins favorisée que pour les composés **Pina**, **Xéro** et **XéroBn**, ce qui se traduit concrètement par des valeurs de coefficient d'extinction molaire plus faibles.

Dans un second temps, nous pouvons comparer ces valeurs d' ϵ à celles de molécules utilisées classiquement comme références pour leurs propriétés optiques : le sulfate de quinine, le lucifer yellow CH, le pérylène, la fluorescéine et la rhodamine 6G²⁷³ (cf Tableau 12).

<u>Composés</u>	<u>ϵ</u>	<u>(λ nm)</u>	<u>[Solvant]</u>
Pulv	14 263	(382 nm)	[CH ₃ Cl]
Pina	27 501	(412 nm)	[CH ₃ Cl]
Atro	17 799	(427 nm)	[CH ₃ Cl]
Xéro	21 919	(437 nm)	[CH ₃ Cl]
XéroBn	19 489	(436 nm)	[CH ₃ Cl]
Varié	19 530	(450 nm)	[CH ₃ Cl]
Sulfate de quinine	5 700	(345 nm)	[H ₂ SO ₄ aq. (0,05 M)]
Lucifer yellow CH	24 200	(280 nm)	[Eau]
Pérylène	38 500	(438 nm)	[Cyclohexane]
Fluorescéine	92 300	(499 nm)	[Ethanol]
Rhodamine 6G	116 000	(530 nm)	[Ethanol]

Tableau 12 – Récapitulatif des coefficients d’extinction molaires ϵ (L.mol⁻¹.cm⁻¹) mesurés pour les six composés étudiés et 5 références (la longueur d’onde et le solvant reportés sont ceux pour lesquels la meilleure mesure a été effectuée).²⁷³

Nous remarquons que les six acides bistétroniques étudiés présentent des valeurs d’ ϵ du même ordre de grandeur que celles du lucifer yellow CH et du pérylène, ce qui est intéressant, car les structures de ces différents composés sont toutes rigides, plates, avec un système conjugué réparti sur l’entièreté de la molécule (cf Figure 15). D’un point de vue pratique, cela signifie que ces acides bistétroniques pourraient potentiellement servir de standard de fluorescence à l’avenir.

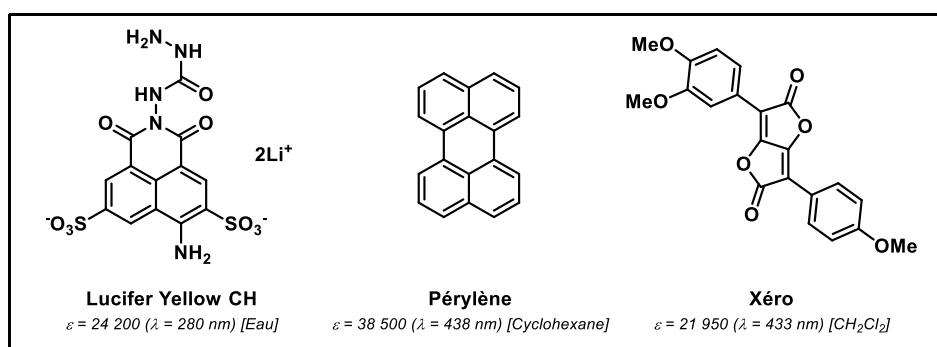


Figure 15 – Structures des molécules de référence ayant des propriétés d’absorbance similaire aux acides bistétroniques étudiés (ϵ est donné en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Par la suite, la gamme spectrale d’émission des acides bistétroniques étudiés a été caractérisée par la mesure de la longueur d’onde pour laquelle l’émission est maximale λ_{em} et par la mesure du déplacement de Stokes $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$ (Figure 16 à Figure 20).

Contrairement à ce qui a pu être observé pour l'absorption, il n'y a pas d'effet bathochrome régulier entre les différents composés étudiés : les composés **Xéro**, **XéroBn** et **Varié** présentent des valeurs de longueur d'onde d'émission similaires (autour de 550 nm), tandis que les composés **Pina** et **Atro** émettent préférentiellement autour de 500 nm. Par ailleurs, il est à noter qu'aucune émission n'a été détectée pour le composé **Pulv**.

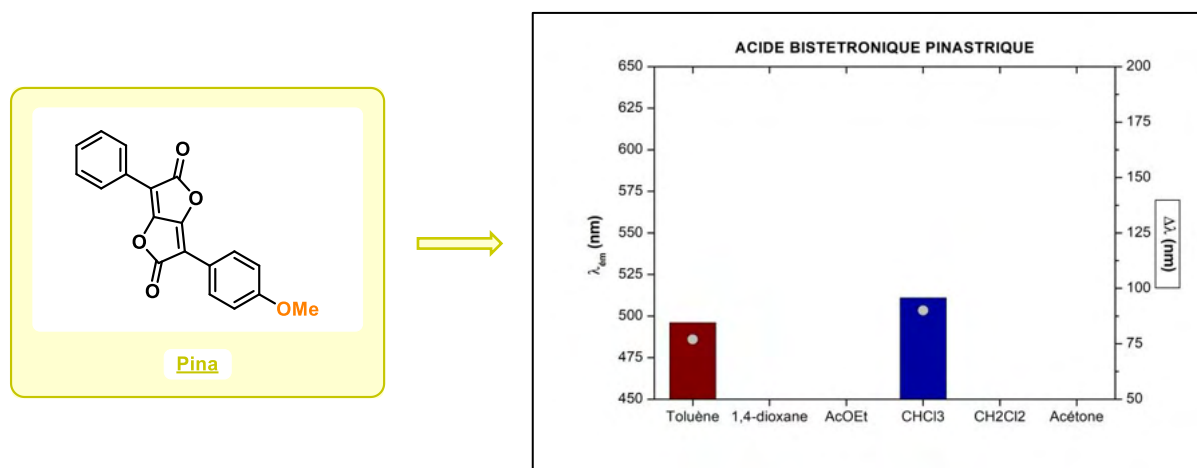


Figure 16 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l'acide bistétronique pinastrique dans 2 solvants (excitation réalisée à λ_{max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$) est représenté par une courbe.

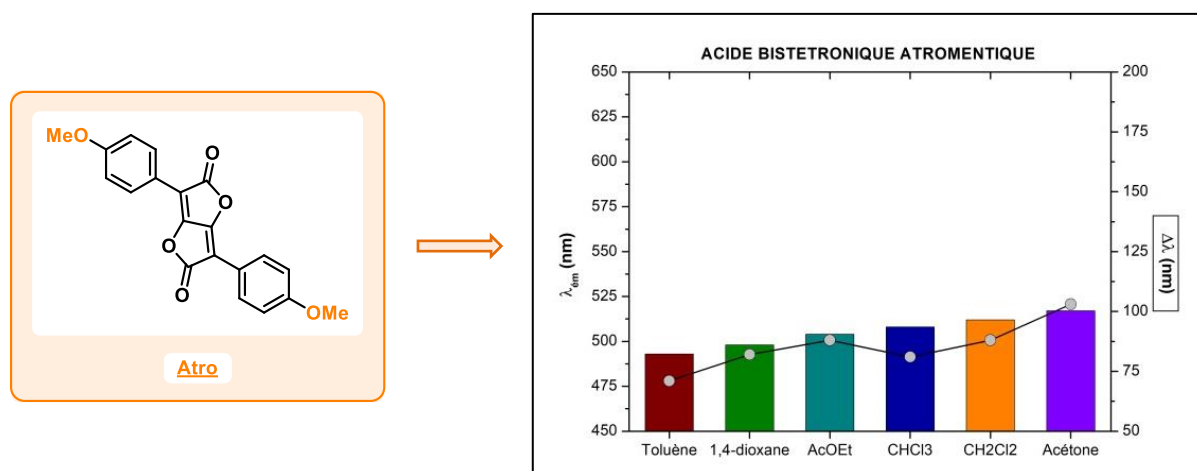


Figure 17 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l'acide bistétronique atromentique dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$) est représenté par une courbe.

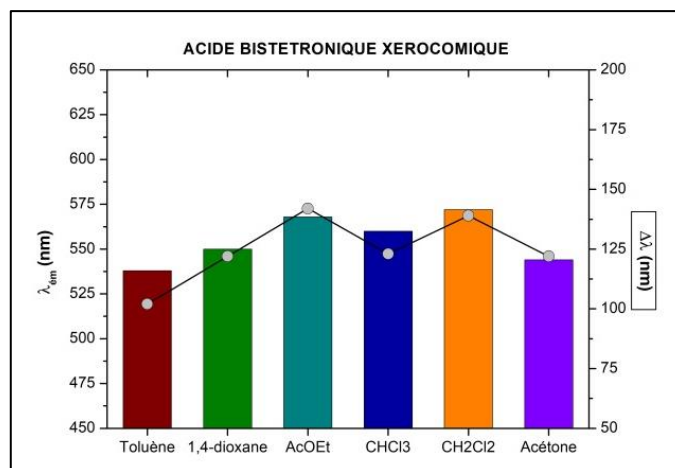
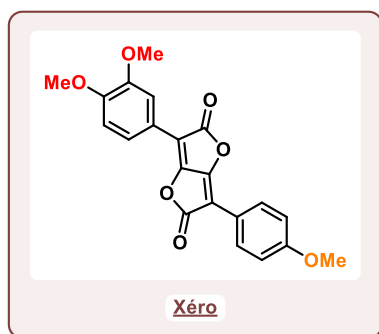


Figure 18 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l'acide bistétronique xérocémique dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$) est représenté par une courbe.

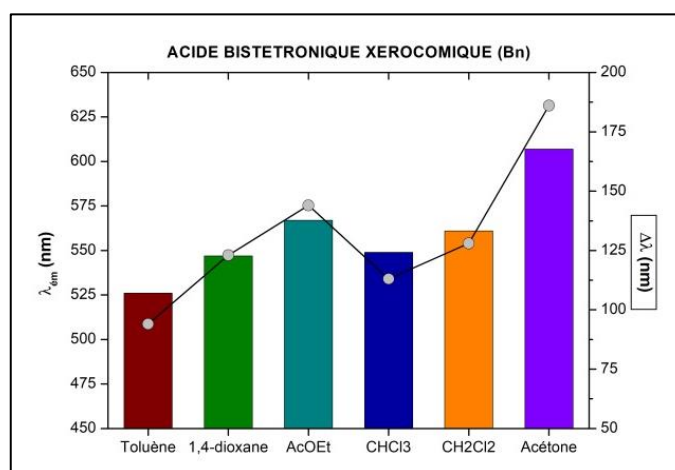
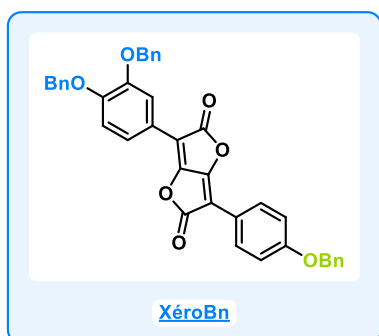


Figure 19 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l'acide bistétronique xérocémique (Bn) dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$) est représenté par une courbe.

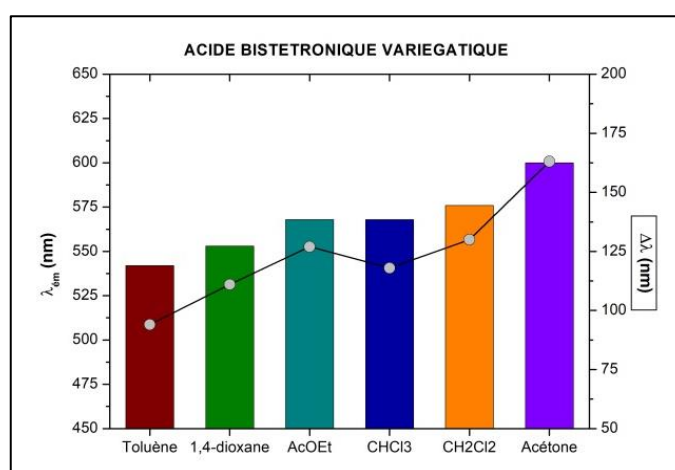
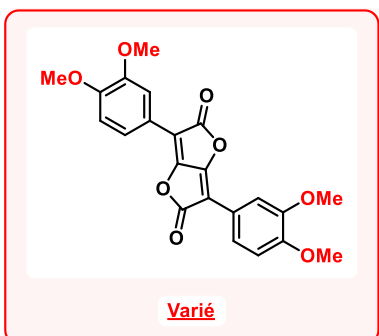


Figure 20 – Histogrammes représentant les valeurs de λ_{em} de l'acide bistétronique variégatique dans 6 solvants (excitation réalisée à λ_{max}). Le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{max}$) est représenté par une courbe.

De plus, on remarque que, pour chaque acide bistéronique étudié, la valeur de la longueur d'onde d'émission λ_{em} tend à augmenter lorsque la polarité du solvant augmente. Cette observation est cohérente, car plus la polarité d'un solvant augmente, plus le niveau d'énergie de l'état excité est abaissé ; le photon émis lors de la désexcitation sera d'énergie faible, et donc de longueur d'onde plus élevée.²⁸⁴

Enfin, il est à noter que les valeurs de déplacement de Stokes s'étendent de 70 nm à 180 nm. Par comparaison avec le sulfate de quinine ($\Delta\lambda = 115$ nm), cette gamme de valeur est jugée suffisamment élevée pour éviter tout effet de *filtre interne* : la mesure de rendement quantique de fluorescence pourra donc être réalisée sans perturbation.

Une fois la caractérisation de la gamme spectrale d'émission des cinq acides bistéroniques achevée, nous avons décidé de calculer leurs rendements quantiques de fluorescence. Pour rappel, le calcul du rendement quantique de fluorescence est réalisé en reportant sur un graphe l'aire sous la courbe d'émission F en fonction du paramètre f selon l'équation : $f = 1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}$. Le nuage de point est alors modélisé par une droite linéaire, correspondant à l'équation : $F = \alpha * f$, où α est le coefficient directeur de la droite expérimentale affine obtenue. Un exemple de graphe est proposé sur la Figure 21.

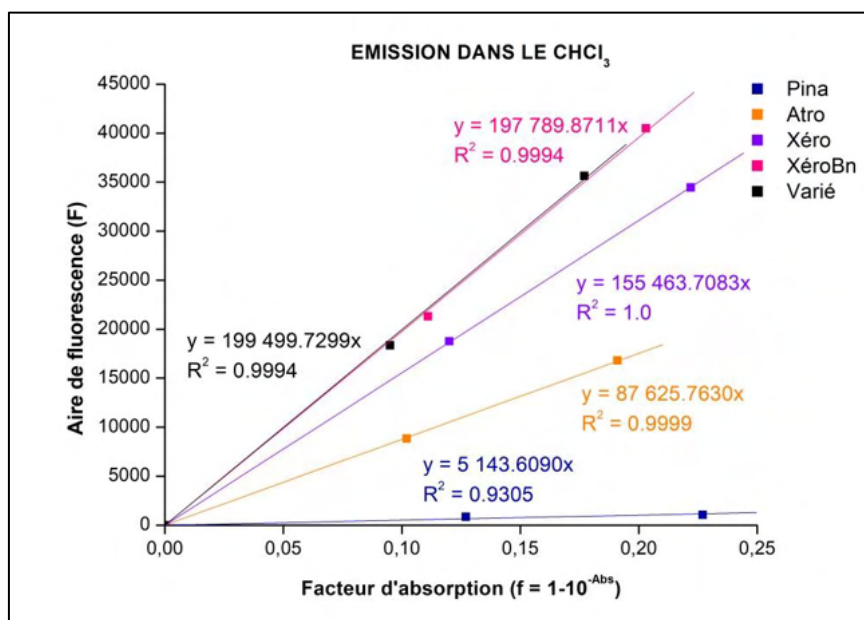


Figure 21 – Aire sous la courbe d'émission mesurée dans le chloroforme en fonction du facteur d'absorption.

Les droites des composés **XéroBn** (rose) et **Varié** (noire) sont confondues.

La même démarche est appliquée avec le standard de fluorescence choisi. Dans notre cas, nous nous sommes tournés vers le *Lucifer Yellow CH* (Figure 15), car cette molécule présente les mêmes caractéristiques spectrales que les acides bistétroniques étudiés (à savoir, $\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$, $\epsilon = 24\,200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 280 nm , $\phi_{\text{F}} = 0,21$ dans l'eau).^{217, 273} Pour cette molécule, le rapport F/f est noté β et vaut $335\,743,4599$. Ainsi, grâce aux valeurs α et β mesurées expérimentalement et en appliquant la formule $\phi_{\text{F}}^i = \frac{\alpha_i}{\beta} * \left(\frac{n_i}{n_{\text{réf}}}\right)^2 * \phi_{\text{F}}^{\text{réf}}$, on peut calculer le rendement quantique de fluorescence pour chaque composé i dans les différents solvants étudiés. Les valeurs obtenues sont reportées sur les histogrammes de la Figure 22.

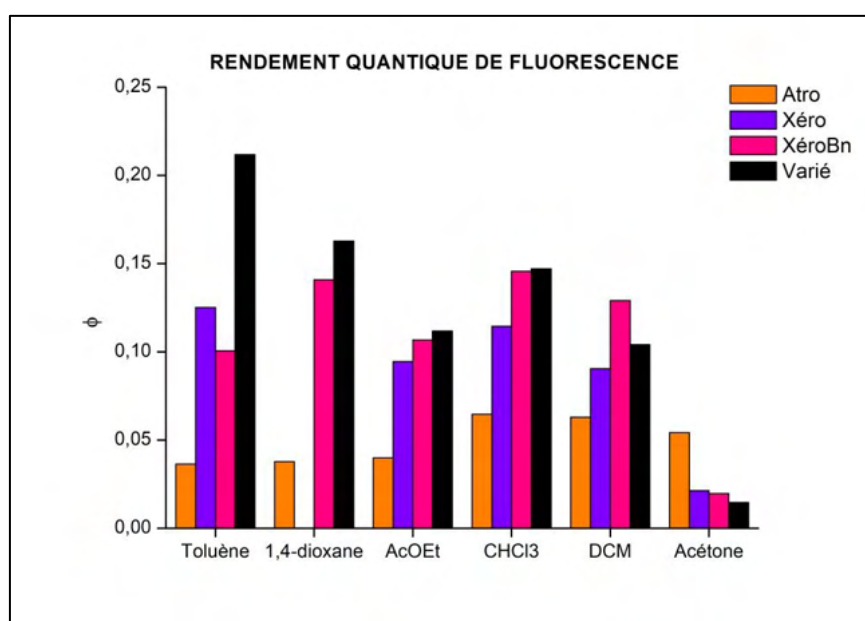


Figure 22 – Rendements quantiques de fluorescence pour les acides bistétroniques étudiés.

Dans un premier temps, notons que les valeurs de rendements quantiques de fluorescence du composé **Pina** sont trop faibles pour être visibles sur la Figure 22 (0,0047 dans le toluène et 0,0038 dans le chloroforme). Pour les autres composés, on observe que les valeurs de rendements quantiques de fluorescence obtenues sont comprises entre 0,03 et 0,22. De plus, parmi les différents solvants étudiés, l'acétone inhibe fortement le rendement de fluorescence pour les composés **Xéro**, **XéroBn** et **Varié** (*i. e.* ceux présentant une plus forte lipophilicité). Enfin, au sein de la série chimique, il est à noter que l'ajout successif de groupements méthoxylés engendre une exaltation du rendement de fluorescence. En effet, ces groupements alcoyles renforcent la densité électronique des molécules étudiées, ces molécules étant déjà entièrement conjuguées, planes et permettant un alignement parfait de

toutes les orbitales de liaisons π du système conjugué et des doublets non liants des oxygènes (Figure 23). Par ailleurs, l'absence de fluorescence du composé **Pulv** et les faibles rendements quantiques de fluorescence du composé **Pina** indiquent que la présence de ces groupements électro-donneurs est indispensable dans le processus d'émission.

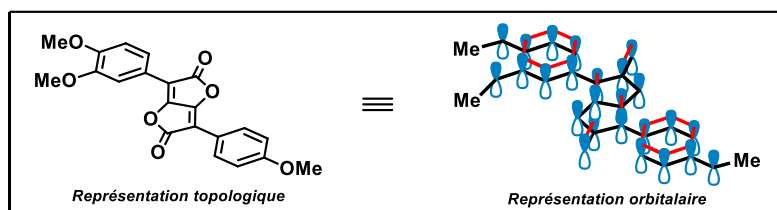


Figure 23 – Représentation du système π de l'acide bistéronique xérocémique triméthoxylé **Xéro** (271).

Pour conclure cette étude photophysique, nous avons voulu savoir si ces propriétés de fluorescence étaient conservées au long de la synthèse vers les acides pulviniques. Le même travail de caractérisation des propriétés optiques a donc été réalisé sur les esters de méthyle des acides pulviniques méthoxylés et nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'ouverture du cœur bistéronique entraînait une *disparition du phénomène de fluorescence*. Cet effet peut être expliqué par le fait que l'ouverture du cœur bistéronique confère au squelette pulvinique une certaine souplesse. Ainsi, le retour à l'état fondamental du système va certainement se produire préférentiellement par le biais de désexcitations non radiatives (ex : par relaxation vibrationnelle) (cf Schéma 103).

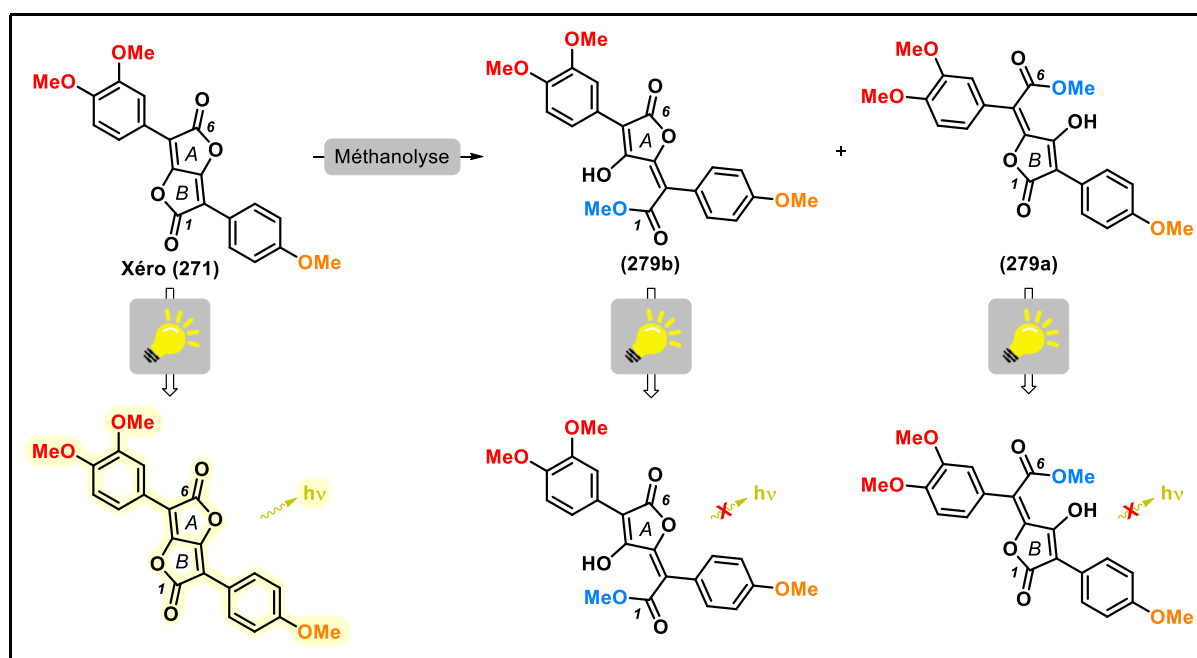


Schéma 103 – Illustration de la perte de fluorescence après la méthanolyse du composé **Xéro** (271).

2.3 Perspectives de valorisation des propriétés photophysiques des acides bistétroniques

Au vu de ces caractéristiques d'absorbance et de rendement quantique de fluorescence des six acides bistétroniques étudiés, il est possible d'envisager une valorisation de ces composés dans le domaine de l'optique, notamment dans le cadre des OLEDs. Cette technologie s'est considérablement développée depuis la preuve de concept fournie par C. W. Tang et S. A. Van Slyke en 1987,²⁷² notamment grâce à une meilleure compréhension des phénomènes de peuplement des niveaux d'énergie (singulet ou triplet) des états excités des molécules impliquées et aux différentes désexcitations radiatives correspondantes (*i. e.* fluorescence ou phosphorescence).²⁹⁵ Dans le cadre de la valorisation des acides bistétroniques dans ce domaine, il serait judicieux, à l'avenir, de poursuivre l'étude photophysique de ces composés, afin, par exemple, de mettre en évidence ou non un phénomène de phosphorescence. À ce titre, la mesure du temps de demi-vie de l'état excité τ et l'étude de la photostabilité des composés seront primordiales.

Par ailleurs, il serait intéressant d'exploiter la grande différence de fluorescence entre les systèmes bistétroniques ouverts et fermés pour former des sondes de fluorescence « on-off » (aussi appelé *reaction-based fluorescent probe*).²⁵⁵ En effet, comme cela a été présenté sur le Schéma 103, les systèmes bistétroniques fermés, fluorescents, possèdent deux centres électrophiles (les carbonyles 1 et 6) qui peuvent réagir en présence de nucléophiles, comme des alcools ROH (cela a été démontré au cours de ce doctorat – cf partie 1.2.5 du chapitre 1, page 134), mais aussi des thiols RSH ou des amines RNH₂, donc potentiellement des protéines. Ainsi, l'ouverture induite du cœur bistétronique par le système biologique étudié engendrerait une inhibition de l'émission qui pourra être observée et quantifiée par microscopie de fluorescence. Dans ce cas, il sera nécessaire de travailler la fonctionnalisation des cycles aromatiques des acides bistétroniques, de façon à rendre ces composés solubles en phase aqueuse, ce qui n'est pas le cas à l'heure actuelle. Enfin, dans une perspective d'amélioration des rendements quantiques de fluorescence, il serait intéressant de chercher à générer un effet *push-pull* au sein des dérivés bistétroniques en associant des groupements électroattracteurs et électrodonneurs sur leurs cycles aromatiques.

CHAPITRE 2

**PROFILAGE CHIMIQUE DE
*SCLERODERMA CITRINUM***

**EXTRACTION ET ISOLEMENT DE
DÉRIVÉS PULVINIQUES**

CHAPITRE 2 : PROFILAGE CHIMIQUE DE *SCLERODERMA CITRINUM* ; EXTRACTION ET ISOLEMENT DE DÉRIVÉS PULVINIQUES

1 EXTRACTION, PRÉ-FRACTIONNEMENT, CHROMATOGRAPHIE

Le deuxième volet de ce projet de thèse consiste à rechercher et identifier des métabolites secondaires de structure proche de celle de la sclérocitrine au sein du champignon *Scleroderma citrinum*. En effet, de tels composés, suivant la structure qu'ils arborent, peuvent nous renseigner sur les voies de biosynthèse qui existent au sein de ce champignon et ainsi nous aider à nous prononcer sur la cohérence de nos hypothèses de biosynthèse de la sclérocitrine et de la chalcitrine (cf section 1.3 de l'Introduction générale). De plus, le champignon *Scleroderma citrinum* n'ayant pas fait l'objet de beaucoup d'études, ce travail a également pour ambition d'apporter une vision globale des types de squelettes naturels biosynthétisés par cet organisme.

1.1 Extraction des métabolites du champignon *Scleroderma citrinum*

Tout au long de ce doctorat, nous avons travaillé avec un lot de 3,7 kg de champignons frais de type *Scleroderma citrinum*, récoltés en novembre 2018 en Bretagne (47° 55' 28,9" N - 3° 05' 48,8" W) et maintenus à 5°C avant extraction. Les champignons de cette espèce sont constitués d'une enveloppe de couleur beige qui vire au jaune vif quand le champignon mûrit : la couleur jaune est due à la production et à l'accumulation de sclérocitrine au fur et à mesure du processus de maturation. Une fois arrivée à maturité, cette enveloppe éclate et libère des spores, afin de permettre au champignon de coloniser son environnement et potentiellement de croître en symbiose avec d'autres espèces (Figure 24). Dans notre cas, il est fréquent de retrouver *Scleroderma citrinum* en présence d'une autre espèce de champignon, le bolet parasite (*Pseudoboletus parasiticus*).



Figure 24 – Illustration du processus de maturation du champignon *Scleroderma citrinum*. Au début de sa croissance, le champignon possède une enveloppe de couleur beige. À maturité, l'enveloppe du champignon est jaune, elle éclate et libère les spores qu'elle contient. Le champignon peut alors coloniser son milieu.

Une fois récoltés, nous avons séparé les champignons de leurs spores, les enveloppes restantes ont été réduites en fines lamelles et extraites dans 6 litres de méthanol pendant 48h (*i. e.* une macération à froid). Ce processus a été réitéré une fois, puis les deux extraits méthanoliques obtenus ont été rassemblés et concentrés sous vide, ce qui a eu pour effet de faire précipiter la majorité des stéroïdes contenus dans l'extrait (d'après la RMN du solide formé). Une fois ces derniers éliminés par filtration, l'extrait a ensuite été resolubilisé dans de l'acétate d'éthyle, puis une extraction liquide-liquide avec une phase aqueuse acide (pH < 4) a été réalisée pour éliminer les composés très polaires de l'extrait, comme les glucides ou les acides aminés (Figure 25). Ainsi, à la fin de ce processus d'extraction et de pré-purification, les composés d'intérêt, portant des fonctions phénols et acides carboxyliques, se trouvent *a priori* dans la phase organique (en rouge sur la Figure 25).

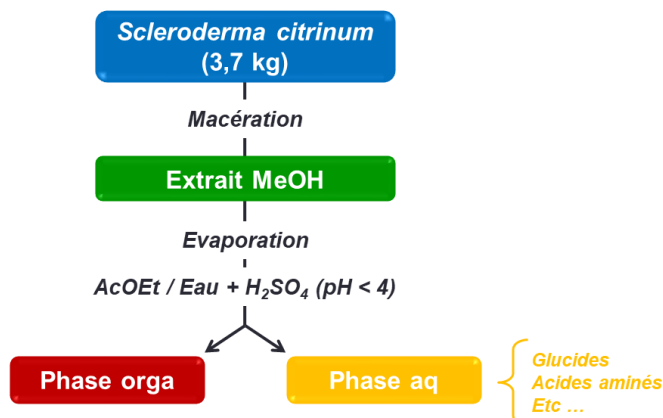


Figure 25 – Protocole d'extraction des métabolites du champignon *Scleroderma citrinum*.

1.2 Pré-fractionnement par chromatographie d'adsorption en phase normale

La phase organique obtenue lors de l'extraction liquide-liquide du brut d'extraction de *Scleroderma citrinum* (en rouge sur la Figure 25) reste complexe, malgré l'extraction liquide-liquide qui en a retiré les composés les plus polaires. Dans cet extrait, les métabolites

secondaires que nous recherchons (*i. e.* des analogues de la sclérocitrine et des intermédiaires de sa biosynthèse) risquent d'être très minoritaires par rapport aux lipides (présents en très grande majorité) et aux stéroïdes résiduels. Afin de limiter cet effet et de faciliter l'analyse de cette phase organique, nous avons choisi de l'éclaircir en la pré-fractionnant par chromatographie sur gel de silice avec un gradient DCM/MeOH + 1,0% HCO₂H de 0% à 100% : par détection UV (254 nm), 15 fractions ont ainsi pu être constituées, notées de F0 à F14. Le bilan matière de ces 15 fractions est présenté dans le Tableau 13.

<u>Fractions</u>	<u>Masse</u>	<u>Fractions</u>	<u>Masse</u>	<u>Fractions</u>	<u>Masse</u>
F0	570 mg	F5	182 mg	F10	58 mg
F1	1 081 mg	F6	60 mg	F11	51 mg
F2	901 mg	F7	75 mg	F12	245 mg
F3	627 mg	F8	16 mg	F13	237 mg
F4	303 mg	F9	124 mg	F14	275 mg

Tableau 13 – Bilan matière des 15 fractions obtenues par purification sur gel de silice avec l'éluant DCM/MeOH + 1,0% HCO₂H (0% à 100%).

Un schéma récapitulatif du protocole d'extraction et de purification des métabolites de *Scleroderma citrinum* suivi jusqu'à ce stade est proposé sur la Figure 26.

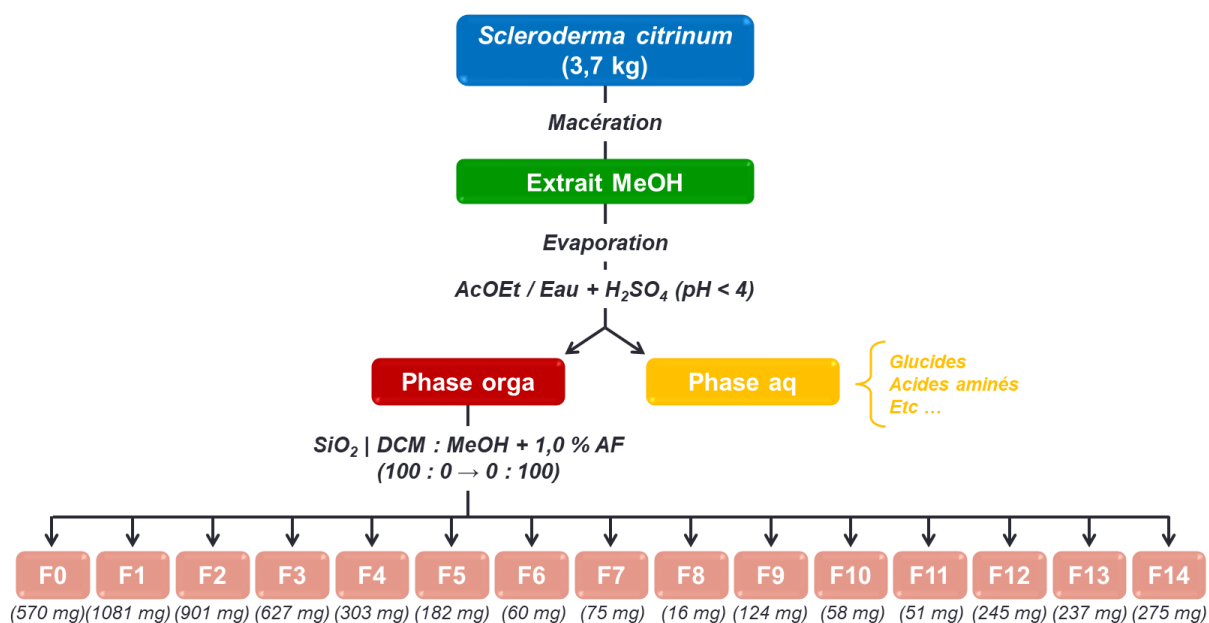


Figure 26 – Protocole d'extraction des métabolites de *Scleroderma citrinum* et répartition du bilan matière des fractions F0 à F14 obtenues après pré-fractionnement sur silice.

Ces quinze fractions ont ensuite pu être analysées séparément par HPLC-MS, comme cela est présenté dans les parties suivantes 1.3 et 1.4 de ce chapitre.

1.3 Application de conditions HPLC classiques

Avant de pouvoir appréhender la composition des quinze fractions obtenues lors du pré-fractionnement sur gel de silice et *in fine* de pouvoir en isoler certains métabolites, il est nécessaire de mettre au point des conditions HPLC adaptées aux caractéristiques de l'extrait de *Scleroderma citrinum*, l'objectif étant que les différents constituants des fractions se répartissent le long du gradient en pics chromatographiques idéalement bien résolus.

Ainsi, en première intention, ces différentes fractions ont été analysées avec des conditions classiques d'éluion, c'est-à-dire un gradient de 5% à 100% de B avec A = H₂O + 0,1% HCO₂H et B = ACN (0,3 mL/min), sur une colonne Sunfire C18 (150 × 2,1 mm ; 3,5 μm), avec une source d'ionisation par électrospray en mode positif et négatif. Immédiatement, nous avons pu noter que seule l'ionisation en mode négatif permettait de détecter les constituants de l'extrait de *Scleroderma citrinum*, ce qui s'explique aisément par la présence de nombreuses fonctions OH libres dans la structure de l'acide xéromique et de la sclérocitrine (et donc, par extension, des autres molécules de cette série chimique). Par la suite, toutes les analyses par spectrométrie de masse ont donc été faites en mode négatif. Un exemple représentatif des chromatogrammes obtenus avec ces conditions HPLC-MS est présenté sur la Figure 27.

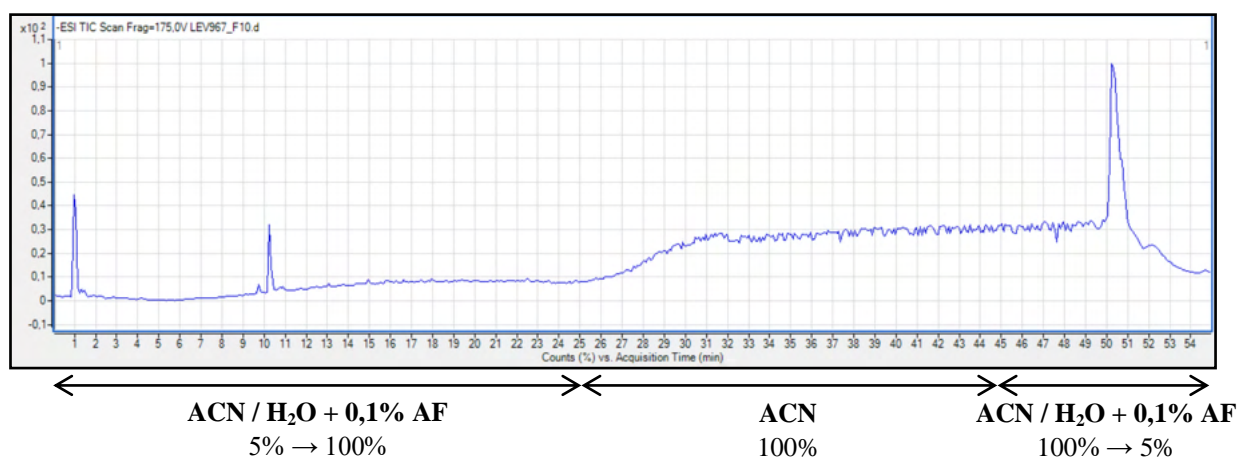


Figure 27 – Chromatogramme TIC (ESI-) de la fraction F10 de l'extrait sur Sunfire C18 avec un éluant ACN/H₂O + 0,1% AF (5% à 100% en 25 minutes).

Comme le montre le chromatogramme obtenu pour la fraction F10 (Figure 27), aucune séparation n'était obtenue avec ces conditions d'élution : tous les produits de l'extrait co-éluent en un seul pic après 20 minutes de lavage de la colonne, au moment de la rééquilibration ($t_R = 50$ min). L'augmentation de la proportion d'acétonitrile au début du gradient ne permettait pas de pallier cet effet, ce qui est surprenant puisque ces mêmes conditions avaient permis à P. Davoli et R. Weber⁷³ de détecter l'acide xéromique présent dans un extrait méthanolique de *Boletus permagnificus* en 20 minutes. Dans le cas de la sclérocitrine, W. Steglich *et al.* ont pu la détecter et l'isoler à partir d'extraits de *Scleroderma citrinum* et de *Chalciporus piperatus* avec un gradient de 0% à 50% de B en 30 minutes, puis de 50% à 100% de B en 10 minutes (avec A = H₂O/ACN (9:1) + 0,5% TFA et B = ACN) (5 mL/min).³⁰² Là encore, les auteurs font état d'élutions longues (*ex* : $t_R = 27,8$ min pour la sclérocitrine) et annoncent des purifications itératives en HPLC préparative, ce qui reflète des difficultés analytiques similaires aux nôtres. Notons que la colonne Sunfire C18 que nous avons utilisé présente les mêmes caractéristiques de polarité et de granulométrie que celle utilisée par les auteurs dans ces deux cas, à savoir, une LiChrospher RP-18 et une Nucleosil 100 C18 respectivement.^k Nous avons donc décidé de changer de stratégie analytique.

1.4 Mise au point de conditions HPLC adéquates

Comme cela a été dit dans la section 1.1 de ce chapitre (page 167), la sclérocitrine et l'acide xéromique (et par extension, les molécules de cette série chimique) possèdent de nombreuses fonctions OH libres et des acides carboxyliques. Nous avons donc pensé jouer sur l'état de protonation de ces différentes fonctions pour induire une vraie différence de polarité entre les différents constituants de l'extrait. Cela nécessitait d'augmenter le pH de la phase aqueuse de l'éluant, ce qui n'est pas compatible avec l'utilisation d'une colonne Sunfire C18. En effet, les liaisons Si-O-Si du gel de silice peuvent se rompre en présence d'un éluant basique. Nous avons donc décidé de travailler avec une colonne Waters XBridge (150 × 2,1 mm ; i. d. 3,5 μm), dont la silice possède des pontages éthyléniques lui permettant de supporter une large gamme de pH.

^k *Comparison Guide to C18 Reversed Phase HPLC Columns* – www.mad-mod.com
Guide des colonnes HPLC – www.aitfrance.fr

Nous avons ensuite choisi de travailler avec une phase aqueuse maintenue à pH = 7 grâce à de l'acétate d'ammonium ($c = 20 \text{ mM}$)¹, de façon à ce que les acides carboxyliques de la sclérocitrine soient déprotonés. Ces nouvelles conditions nous ont permis d'obtenir avec succès la séparation des constituants de l'extrait (cf Figure 28).

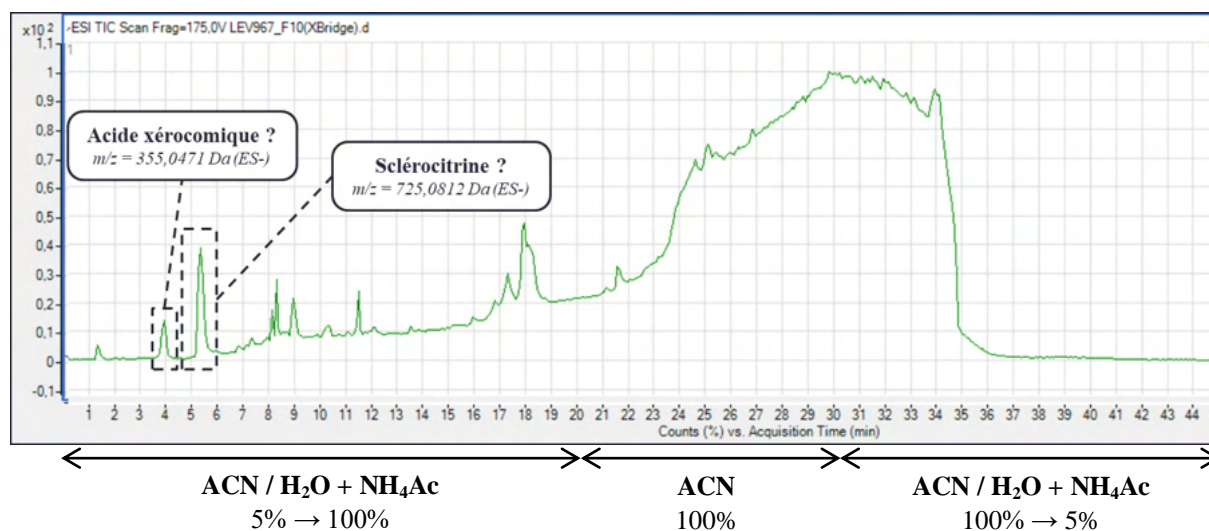


Figure 28 – Chromatogramme TIC (ESI-) de la fraction F10 de l'extrait sur colonne Waters XBridge avec un éluant ACN/H₂O + NH₄Ac (20 mM) (5% à 100% d'ACN en 20 minutes).

Grâce à ces conditions d'élution, l'acide xéromique et la sclérocitrine peuvent être isolés du reste des constituants de l'extrait de *Scleroderma citrinum*. En effet, le chromatogramme de la fraction F10 (Figure 28) permet de visualiser un composé ayant le même rapport m/z que l'acide xéromique avec un temps de rétention de $t_R = 3,95 \text{ min}$ et un deuxième composé ayant le même rapport m/z que la sclérocitrine avec un temps de rétention de $t_R = 5,18 \text{ min}$. Ces conditions d'élution semblent adaptées aux caractéristiques des composés contenus dans l'extrait, nous les avons donc conservées pour réaliser la purification des différentes fractions de l'extrait de *Scleroderma citrinum* par HPLC préparative. Il est à noter que l'acétate d'ammonium est volatil à basse pression, il ne perturbera donc pas la caractérisation des métabolites isolés, car il sera aisément éliminé lors de l'évaporation des fractions d'HPLC préparative à l'évaporateur rotatif.

¹ Différentes concentrations en acétate d'ammonium ont été testées (20 mM, 50 mM et 100 mM). La concentration la plus faible en NH₄Ac (*i. e.* 20 mM) était suffisante pour maintenir les analytes sous une forme ionisée tout en minimisant l'encrassement de la source d'ionisation (même si NH₄Ac est considéré comme laissant peu de résidu solide).

1.5 Conclusions

L'analyse des métabolites produits par *Scleroderma citrinum* a débuté par l'extraction au méthanol de 3,7 kg de champignons frais. Ce brut d'extraction a ensuite été engagé dans une extraction liquide-liquide pour en retirer les composés les plus polaires qui ne retiennent pas notre attention (*i. e.* les glucides et les acides aminés principalement). La phase organique obtenue a été pré-fractionnée par chromatographie en phase normale et quinze fractions ont ainsi pu être formées, puis analysées par HPLC-MS. Au vu des caractéristiques de l'extrait de *Scleroderma citrinum*, il est apparu nécessaire de travailler en mode négatif, avec une colonne Waters XBridge et l'éluant ACN/H₂O + NH₄Ac (20 mM), à pH = 7, afin de travailler avec les bases conjuguées des acides carboxyliques de l'extrait. Grâce à ce travail préparatoire, il est désormais possible de s'intéresser plus précisément à la composition de notre extrait. Pour cela, nous avons utilisé un outil de déréplication classique en chimie des substances naturelles : les réseaux moléculaires.

2 DÉRÉPLICATION, CIBLAGE DE MÉTABOLITES D'INTÉRÊT ET ÉLUCIDATION STRUCTURALE DES MÉTABOLITES ISOLÉS

Bien que l'extrait méthanolique initial ait pu être simplifié par extraction liquide-liquide et par un pré-fractionnement sur gel de silice, il reste particulièrement complexe et difficile à appréhender. En effet, comme tout extrait naturel brut, il comporte une multitude d'entités chimiques de structures et de poids moléculaires très divers : les macromolécules telles que les polysaccharides, les protéines, les métabolites primaires (*i. e.* les métabolites entrant dans la biosynthèse des dites macromolécules) et les métabolites secondaires, appelés aussi métabolites spécialisés. L'exploration efficace de ces mélanges complexes nécessite de faire appel à des outils de *déréplication*, destinés à identifier le plus tôt possible au sein d'un mélange complexe, les composés déjà décrits dans la littérature, avant même leur isolement en quantité pondérable qui peut être long et coûteux. Cette approche permet de concentrer les efforts d'isolement et d'élucidation structurale sur des molécules qui ont une forte probabilité d'être originales et/ou biologiquement actives. Plusieurs techniques peuvent être mises en œuvre pour réaliser une déréplication, selon les propriétés des molécules recherchées. Dans notre cas, nous avons à notre disposition la spectrométrie de masse tandem haute résolution (HRMS/MS), qui permet à la fois une déréplication du mélange et une cartographie de ses composés sous la forme de réseaux moléculaires, basés sur les similarités structurales.

2.1 Déréplication par spectrométrie de masse et réseaux moléculaires : une méthode d'appréhension des mélanges complexes naturels

2.1.1 Les réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires résultent d'un traitement de données MS/MS permettant de comparer un grand nombre de molécules, de structure connue ou non, en fonction de leur **similarité structurale**.

Les techniques d'analyse actuelles utilisées pour la détermination de la structure d'une molécule sont nombreuses, comme la RMN, l'IR et la MS. La particularité des réseaux moléculaires est qu'ils s'appuient sur la spectrométrie de masse et notamment, sur les spectres de fragmentation MS/MS. En effet, dans le cadre d'une analyse MS/MS, les molécules étudiées sont sélectionnées, au sein du spectromètre de masse, par un premier analyseur, puis subissent une accélération au sein d'une enceinte comportant un gaz non ionisé. Cette

accélération est induite par une différence de potentiel réglable et fournit aux espèces chargées une énergie cinétique, appelée énergie de collision, qui est généralement comprise entre 20 eV et 90 eV. Les espèces chargées peuvent donc entrer en collision avec les molécules de gaz non chargées, ce qui conduit à des ruptures de liaisons covalentes et donc, à une fragmentation. *Cette fragmentation est propre à chaque molécule ET à l'énergie de collision utilisée.* Elle est également reproductible. Ainsi, les spectres de fragmentation obtenus constituent une **carte d'identité** des molécules analysées que l'on peut aisément comparer. Cette comparaison qualitative et quantitative de différents spectres de fragmentation est réalisée grâce au calcul d'un **score de similarité cosinus**, appelé *cosine score* et noté $\cos(\theta)$: ce score, compris entre 0 et 1, permet d'évaluer le degré de similarité structurale de deux molécules. La méthode de calcul utilisée est appelée *spectral contrast angle method* et a été développée par K. Wan en 2002.²⁹¹ Le principe de cette méthode est de représenter chaque composé étudié par un vecteur ayant une direction et une norme caractéristiques des ions fils générés lors du processus de fragmentation. Plus le score $\cos(\theta)$ se rapproche de 1, plus les molécules étudiées sont proches structurellement parlant.

Prenons un exemple simple pour illustrer cette méthode vectorielle (Figure 29). Deux composés A et B sont analysés par spectrométrie de masse tandem. Ces deux composés sont introduits dans le spectromètre, ils subissent la même énergie de collision et on postule qu'ils produisent chacun 3 ions fils, notés A₁, A₂, A₃ pour le composé A et B₁, B₂ et B₃ pour le composé B. Les intensités relatives des pics des ions fils sont notées respectivement a₁, a₂, a₃, b₁, b₂ et b₃.

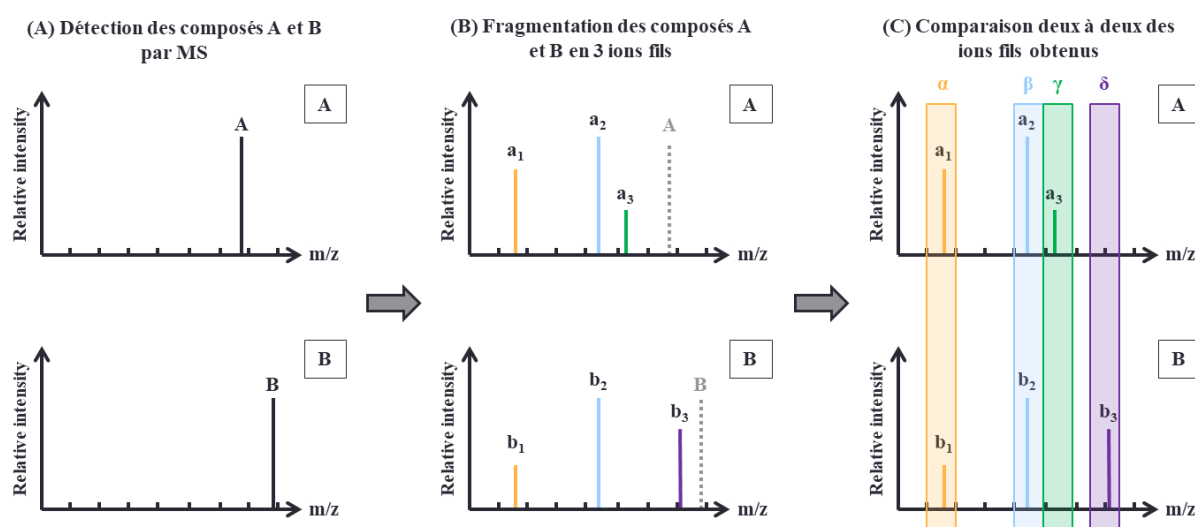


Figure 29 – Comparaison des spectres de fragmentation MS/MS obtenus pour les composés A et B.

Grâce à ces données, il est alors possible de représenter les composés A et B chacun par un vecteur. Dans notre exemple, la fragmentation des composés A et B a produit des ions fils très proches : A_1 et B_1 ont le même rapport m/z (noté α), mais des intensités relatives différentes. Il en va de même pour A_2 et B_2 (leur rapport m/z est noté β). En revanche, A_3 et B_3 n'ont pas le même rapport m/z (notés respectivement γ et δ). Comme on dénombre quatre rapports m/z différents pour les composés A et B, les deux vecteurs \vec{A} et \vec{B} sont donc de dimension $N=4$ et sont les suivants : $\vec{A} = \{a_1 ; a_2 ; a_3 ; 0\}$ et $\vec{B} = \{b_1 ; b_2 ; 0 ; b_3\}$ (Figure 30).

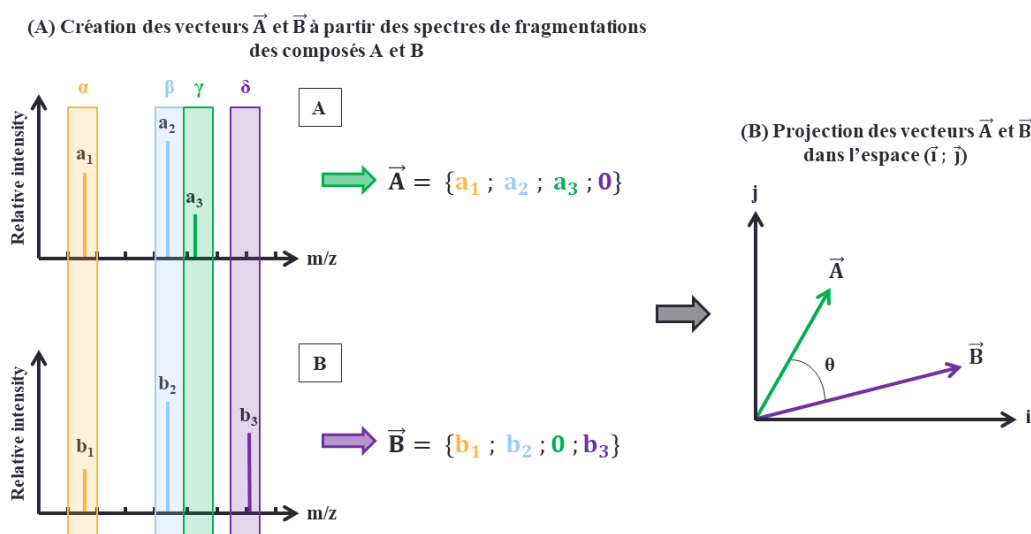


Figure 30 – Conversion des spectres de fragmentation des composés A et B en vecteur à 4 dimensions (la représentation des vecteurs est réduite à deux dimensions sur le graphe).

Le **score de similarité** ou $\cos(\theta)$ correspond à l'angle entre les deux vecteurs comparés (selon la projection proposée sur la Figure 30B). Mathématiquement, il est calculé selon la formule suivante :

$$\cos(\theta) = \frac{\sum_i a_i b_i}{\sqrt{\sum_i a_i^2 * \sum_i b_i^2}}$$

Dans le cas de notre exemple, on obtient la formule suivante :

$$\cos(\theta) = \frac{(a_1 * b_1) + (a_2 * b_2) + (a_3 * 0) + (0 * b_3)}{\sqrt{(a_1^2 + a_2^2 + a_3^2 + 0^2) * (b_1^2 + b_2^2 + 0^2 + b_3^2)}}$$

$$\Leftrightarrow \cos(\theta) = \frac{a_1 b_1 + a_2 b_2}{\sqrt{(a_1^2 + a_2^2 + a_3^2) * (b_1^2 + b_2^2 + b_3^2)}}$$

Cette méthode est appliquée pour chaque composé étudié. Une fois que toutes les molécules étudiées ont été comparées deux à deux, celles présentant un score de similarité supérieur à un seuil déterminé (généralement, 0,7) sont jugées suffisamment proches structurellement pour être rassemblées en un **cluster** dans une représentation graphique nommée « réseau moléculaire ». Un réseau moléculaire correspond donc à la visualisation, sous la forme d'une carte en deux dimensions, des similarités structurales entre les différentes molécules étudiées. Les différentes étapes de la création d'un réseau moléculaire selon la méthode du *spectral contrast angle* sont résumées sur la Figure 31 en prenant pour exemples trois composés virtuels de rapport m/z 350,01 Da, 280,70 Da et 725,45 Da : après avoir comparé leurs spectres de fragmentation, il apparaît que les molécules présentant un rapport m/z 350,01 Da et 280,70 Da ont un score de similarité de 0,9 (> 0,7), donc le réseau moléculaire va les relier ensemble et former un cluster, indiquant une forte similarité structurale entre ces deux molécules. La molécule de rapport m/z 725,45 Da, ayant un score de similarité inférieur à 0,7, reste isolée.

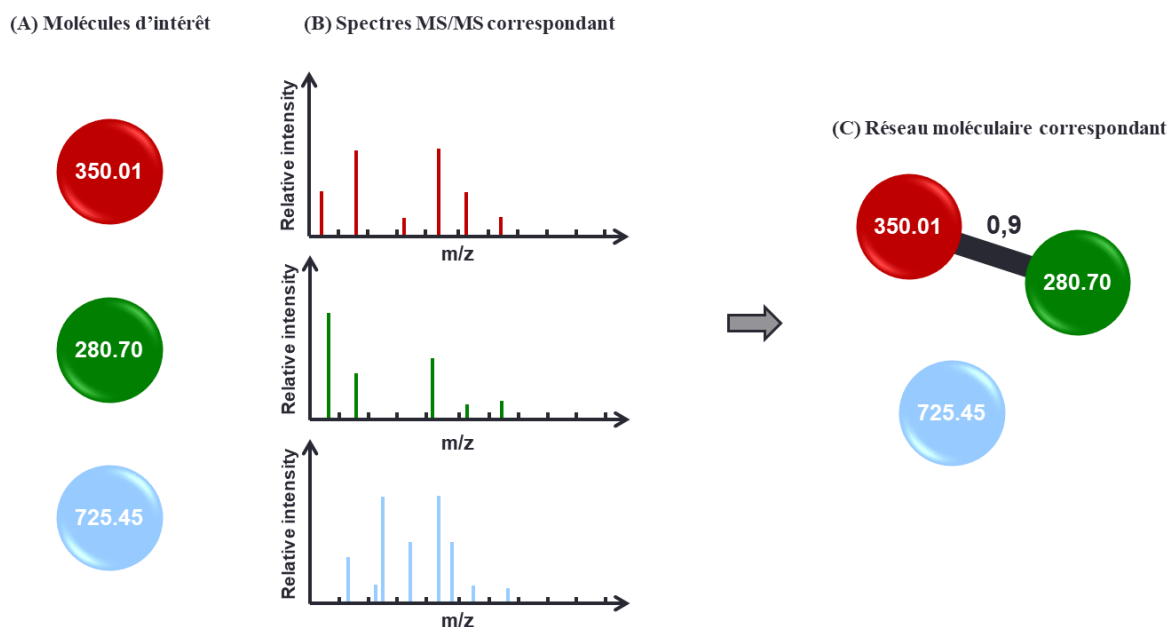


Figure 31 – Elaboration d'un réseau moléculaire entre 3 molécules de rapport m/z 350,01 Da, 280,70 Da et 725,45 Da selon la méthode du *spectral contrast angle*.

Grâce à cette méthode, il est donc possible de comparer rapidement un très grand nombre de molécules entre elles ou avec une base de données de spectres MS/MS déjà compilés, sans pour autant en connaître précisément la structure. Cette technique a donc tout à fait sa place au sein des méthodes utilisées classiquement pour la déréplication d'extraits naturels.

2.1.2 GNPS et MetGEM : deux plates-formes pour générer des réseaux moléculaires

À ce jour, il existe deux plates-formes permettant de générer des réseaux moléculaires : **GNPS** (ou *Global Natural Product Social Molecular Networking*, développé par l'équipe de Pieter Dorrestein – Université de San Diego California, USA) et **MetGEM** (développé par David Touboul – ICSN, France).

	<u>GNPS</u>	<u>MetGEM</u>
Localisation des données	Plate-forme <i>en ligne</i> : stockage et analyse des données sur des serveurs aux États-Unis.	Stockage et analyse des données sur l'ordinateur de l'utilisateur.
Temps d'analyse	Environ 15 minutes (sauf en cas de bug)	Instantané
Variété des analyses	Très large gamme d'analyses possibles en fonction des besoins de l'utilisateur	Focalisation sur la construction de réseaux moléculaires et la comparaison avec les bases de données disponibles.
Visualisation du réseau	<p>Visualisation possible directement sur la plate-forme.</p> <p>Utilisation du logiciel Cytoscape recommandée (ergonomie, beaucoup d'outils pour esthétiser le réseau).</p> <p>Affichage d'un lien entre les molécules au sein d'un même cluster.</p> <p>Affichage des différents clusters côte-à-côte. Aucune information sur la similarité structurale des clusters entre eux.</p>	<p>Visualisation du réseau directement sur le logiciel.</p> <p>Peu d'outils pour esthétiser le réseau.</p> <p>Pas de notion de cluster : toutes les molécules sont représentées en étant plus ou moins proches dans l'espace en fonction de leur similarité structurale.</p> <p>Proposition d'une visualisation identique à celle du GNPS pour aider à analyser le réseau obtenu.</p>
Détection de correspondances dans les bases de données	<p>Affichage des molécules de la base de données ayant un score de similarité <i>supérieur à 0,7</i> à l'une des molécules du réseau.</p> <p>Comparaison automatique des molécules étudiées avec les bases de données au cours de la formation du réseau.</p>	<p>Proposition d'une liste d'analogues aux molécules étudiées dans la base de données, même si le score de similarité est <i>inférieur à 0,7</i>.</p> <p>Téléchargement préalable des bases de données pour comparer les molécules étudiées.</p>

Tableau 14 – Tableau comparatif des caractéristiques de GNPS et MetGEM.

Au vu des caractéristiques complémentaires de ces deux plates-formes, il est judicieux de faire appel aux deux pour permettre une étude approfondie des similarités structurales observées et ainsi faciliter l'annotation des réseaux qui auront été construits.

Forts de ces constatations, nous avons décidé d'utiliser l'outil des réseaux moléculaires pour nous aider à dessiner un panorama des structures présentes au sein de l'extrait méthanolique de *Scleroderma citrinum*.

2.1.3 Réseaux moléculaires de l'extrait de *Scleroderma citrinum*

Pour réaliser le réseau moléculaire de l'extrait de *Scleroderma citrinum*, il est d'abord nécessaire de choisir des paramètres de l'analyse HPLC-MS/MS. Dans notre cas, nous avons d'abord mis au point des conditions d'élution HPLC adéquates (ce point a été détaillé dans la partie 1 de ce chapitre). Pour rappel, ces conditions consistent en l'utilisation d'une colonne Waters XBridge (150 × 2,1 mm ; i. d. 3,5 μm) avec l'éluant ACN/H₂O + NH₄Ac (20 mM – pH = 7) et une source d'ionisation par électrospray en mode négatif (noté **ESI-**).

Concernant les paramètres pour l'analyse MS/MS, nous avons choisi de fragmenter les trois ions les plus abondants détectés à chaque scan du spectromètre de masse, de façon à ne pas multiplier inutilement les données avec des composés présents en trop faible quantité et donc impossibles à isoler par la suite.

Enfin, le paramètre clé à optimiser est l'énergie de collision, car c'est elle qui induit la fragmentation des ions au sein du spectromètre. Ainsi, plus l'énergie de collision choisie est élevée, plus les fragments produits seront petits, nombreux, et donc moins spécifiques de la structure initiale de l'ion parent. À l'inverse, si l'énergie de collision imposée est trop faible, les fragments générés seront trop spécifiques de l'ion parent et il ne sera pas pertinent de le comparer aux autres métabolites de l'extrait. Il faut enfin considérer que pour une même énergie de collision, des molécules plus grosses se fragmenteront moins que des molécules plus petites. Dans notre cas, trois énergies de collision ont été testées : 10 eV, 30 eV et 50 eV. Le défi a été de trouver une énergie de collision adaptée aux ions de masse faible, comme l'acide xérocémique ($m/z = 355,1303$ Da) et aux ions de masse plus élevée, comme la sclérocitrine ($m/z = 725,0812$ Da). Les deux ions témoins dont nous avons étudié la fragmentation pour choisir la bonne énergie de collision sont l'acide xérocémique ($m/z =$

355,1303 Da) (Figure 32) et un composé inconnu mais abondant ayant un rapport $m/z = 759,3056$ Da (du même ordre de grandeur que la sclérocitrine) (Figure 33).

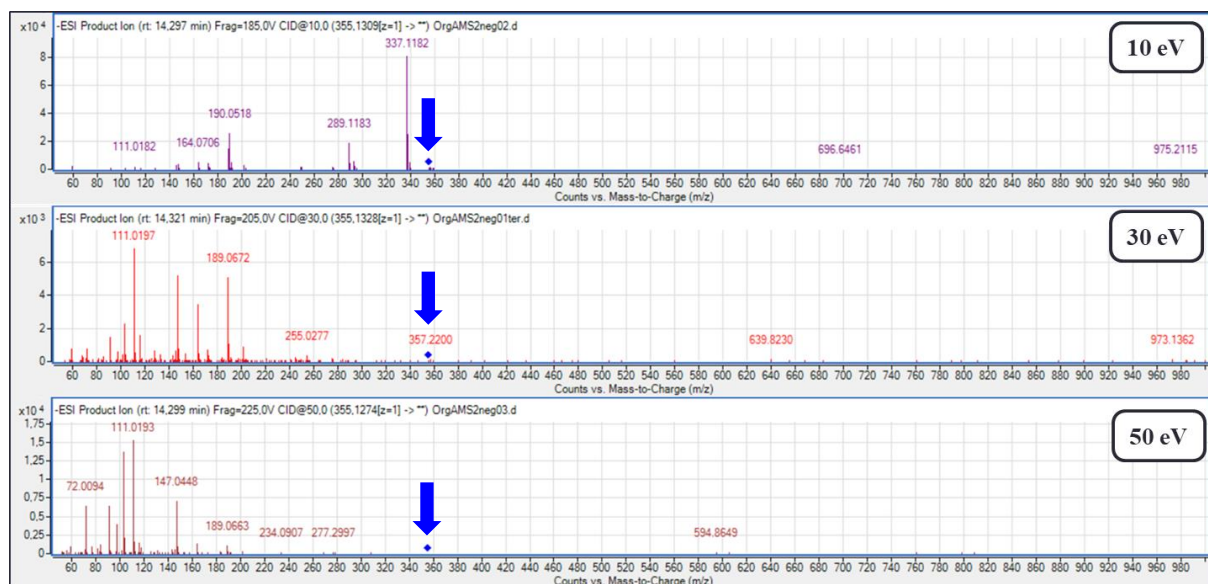


Figure 32 – Spectres de fragmentation de l'acide xérocannique ($m/z = 355,1303$ Da) avec une énergie de collision de 10 eV (haut), 30 eV (milieu) et 50 eV (bas). Le losange et la flèche bleus représentent l'ion parent sélectionné.

Dans le cas de l'acide xérocannique (Figure 32), on remarque que lorsqu'on applique une énergie de collision de 10 eV, on génère un fragment, très largement majoritaire, de rapport $m/z = 337,1182$ Da. Cet ion est lui-même fragmenté lorsqu'on applique une énergie de collision plus élevée. Par ailleurs, on note que les fragments générés à 50 eV sont de rapport m/z trop faibles pour être représentatif de la structure de l'ion parent. On en déduit donc que pour tenir compte des métabolites de faible poids moléculaire, l'énergie de collision à appliquer ne doit pas atteindre 50 eV.

Dans le cas du composé inconnu (Figure 33), l'énergie de collision à 10 eV est trop faible, car elle ne génère que deux fragments $m/z = 347,1196$ Da et $m/z = 348,1230$ Da. Ces deux fragments sont toujours majoritairement présents à 30 eV (quelques autres fragments plus petits ont également été générés) et disparaissent totalement à 50 eV, au profit de nombreux fragments plus petits. Au vu de ces résultats, il semble qu'une énergie de collision de 50 eV soit la plus adaptée à des ions de fort poids moléculaire. Néanmoins, comme cela a été dit précédemment, cette énergie de collision est trop élevée pour les ions de poids moléculaire plus faible. Au final, nous avons donc choisi de réaliser notre étude avec une énergie de collision de **30 eV**.

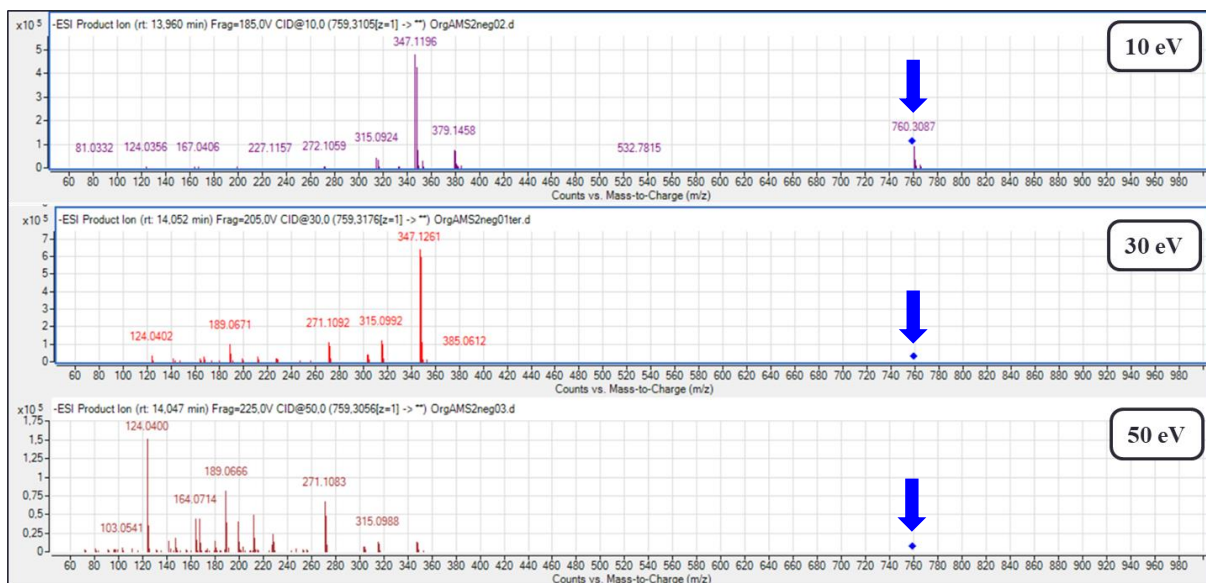


Figure 33 – Spectres de fragmentation d'un ion ($m/z = 759,3056$ Da) avec une énergie de collision de 10 eV (haut), 30 eV (milieu) et 50 eV (bas). Le losange et la flèche bleus représentent l'ion parent sélectionné.

Une fois que la fragmentation des constituants de l'extrait a été réalisée, il faut encore compiler les données brutes obtenues. Nous avons utilisé un logiciel libre pour effectuer ce traitement : **MzMine2**.^{2,30} Ce logiciel permet, entre autres, de regrouper les signaux issus d'une même molécule (sélection redondante d'un même ion parent dans un pic chromatographique), d'éliminer les isotopomères, le bruit de fond, ou encore de discriminer des isomères en fonction de leur temps de rétention. Après plusieurs essais, les paramètres optimisés que nous avons choisis pour cette étape sont les suivants :

- Niveau de bruit en LC-MS : $1,0 \cdot 10^6$
- Niveau de bruit en MS/MS : $1,0 \cdot 10^3$
- Tolérance m/z : 0,02 Da
- Tolérance temps de rétention : 1 minute

Enfin, les données ainsi traitées ont été envoyées sur les deux plates-formes GNPS et MetGEM pour générer le réseau moléculaire correspondant. Là encore, différents paramètres doivent être choisis pour l'élaboration du réseau. Après plusieurs tentatives d'optimisation, nous avons décidé d'appliquer les paramètres suivants dans les deux cas :

- Tolérance m/z de l'ion parent : 0,02 Da
- Tolérance m/z des fragments : 0,02 Da

-
- Seuil du score de similarité^m : 70% (pour le réseau sur GNPS) et 80% (pour le réseau sur MetGEM)
 - Nombre maximum de nœuds au sein d'un cluster : 50
 - Nombre minimum de fragments en communⁿ : 3

La raison pour laquelle nous avons choisi deux seuils de score de similarité différents entre le réseau sur GNPS et celui sur MetGEM tient au fait qu'avec le logiciel MetGEM, un seuil de 70% est trop bas pour discriminer les différents clusters du réseau, tous les nœuds se retrouvent alors superposés, ce qui n'apporte aucune information sur la composition structurale de l'extrait. Par ailleurs, par souci de concision, le processus d'optimisation des paramètres choisis sur MzMine2, GNPS et MetGEM n'est pas détaillé dans ce manuscrit, seuls les réseaux obtenus avec les paramètres optimisés sont présentés. Ainsi, le réseau obtenu sur la plate-forme GNPS est donné en Figure 35, tandis que le réseau formé par le logiciel MetGEM est donné sur la Figure 38.

Dans un premier temps, on peut noter, sur les deux réseaux, la présence de l'acide xérocémique en orange, qui joue le rôle de molécule de référence au sein de l'extrait. De plus, la comparaison des spectres de fragmentation des molécules de notre extrait avec différentes bases de données a permis de proposer deux produits naturels déjà répertoriés comme annotation pour deux composés de notre extrait (en rose clair). Il s'agit de deux lysophosphatidyléthanolamines (notés LPE) dont les structures sont données sur la Figure 34. Les LPE sont connus, au sein des organismes vivants, pour être issues de l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A en réponse à un stress, de façon à favoriser les mécanismes de défense cellulaire.^{o,240} Il est donc naturel de détecter cette famille de métabolites au sein de notre extrait de *Scleroderma citrinum*.

^m Il s'agit de la limite au-delà de laquelle deux composés seront jugés suffisamment similaires pour être reliés au sein d'un même cluster sur le réseau.

ⁿ Il s'agit du nombre minimum de fragments identiques nécessaire pour que deux composés soient jugés identiques et donc représentés par un unique nœud sur le réseau.

^o Notons également que, de manière générale, les LPE peuvent également être utilisés en agronomie comme produit phytosanitaire, par exemple pour stimuler la croissance des plantes.

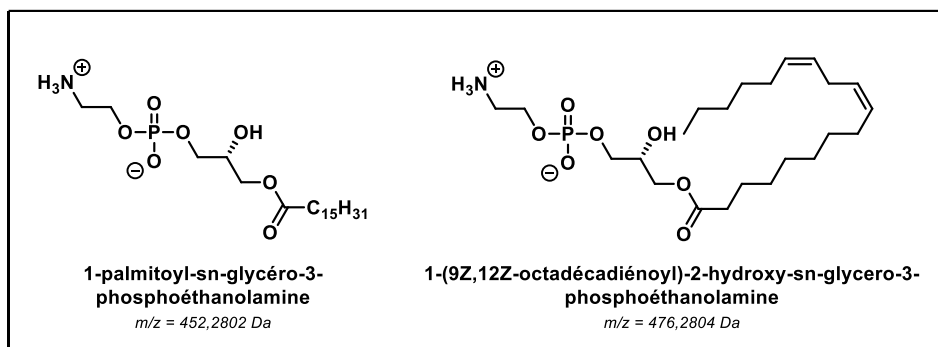


Figure 34 – Structure des deux lysophosphatidyléthanolamines identifiées au sein du réseau de *Scleroderma citrinum*.

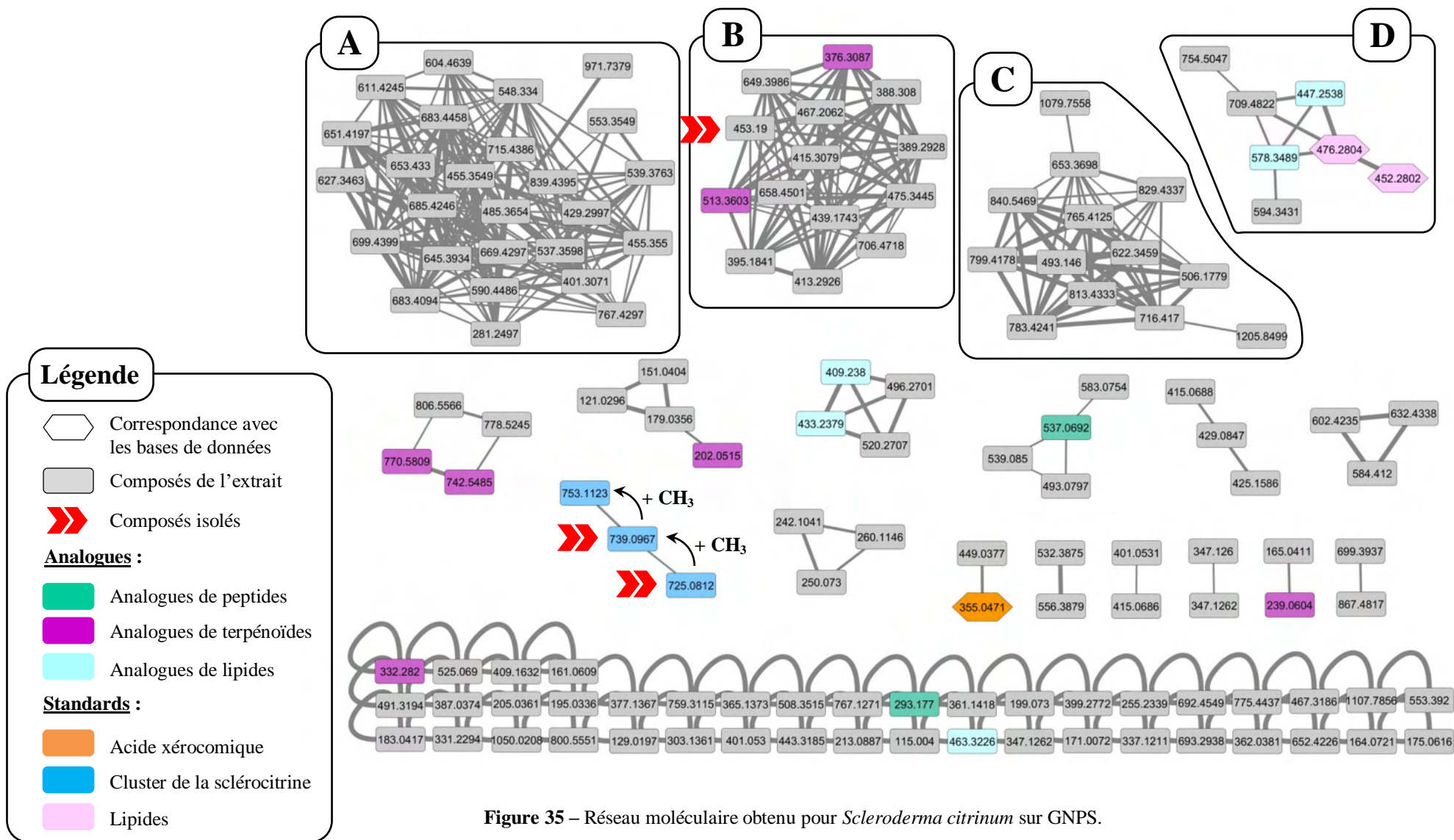
Ces deux molécules sont les deux seules correspondances avec les bases de données que nous pouvons noter sur les réseaux générés, ce qui s'explique par le fait que la fragmentation des composés de notre réseau a été faite en mode négatif, alors qu'environ 95% des bases de données ont été réalisées en mode positif. Or, pour une même molécule, les masses des fragments sont différentes selon que l'on travaille en mode positif ou en mode négatif. Par conséquent, la plate-forme ne va pas réussir à identifier les composés concernés, ce qui limite l'annotation de notre réseau. Pour essayer de dépasser cette limite, nous avons utilisé la liste d'analogues proposée par le logiciel MetGEM pour chaque molécule de notre réseau, même si leur similarité avec les bases de données est plutôt faible, car cela permet de donner une idée de la famille chimique de laquelle se rapprochent les molécules de notre réseau et donc de la composition de l'extrait de *Scleroderma citrinum*.

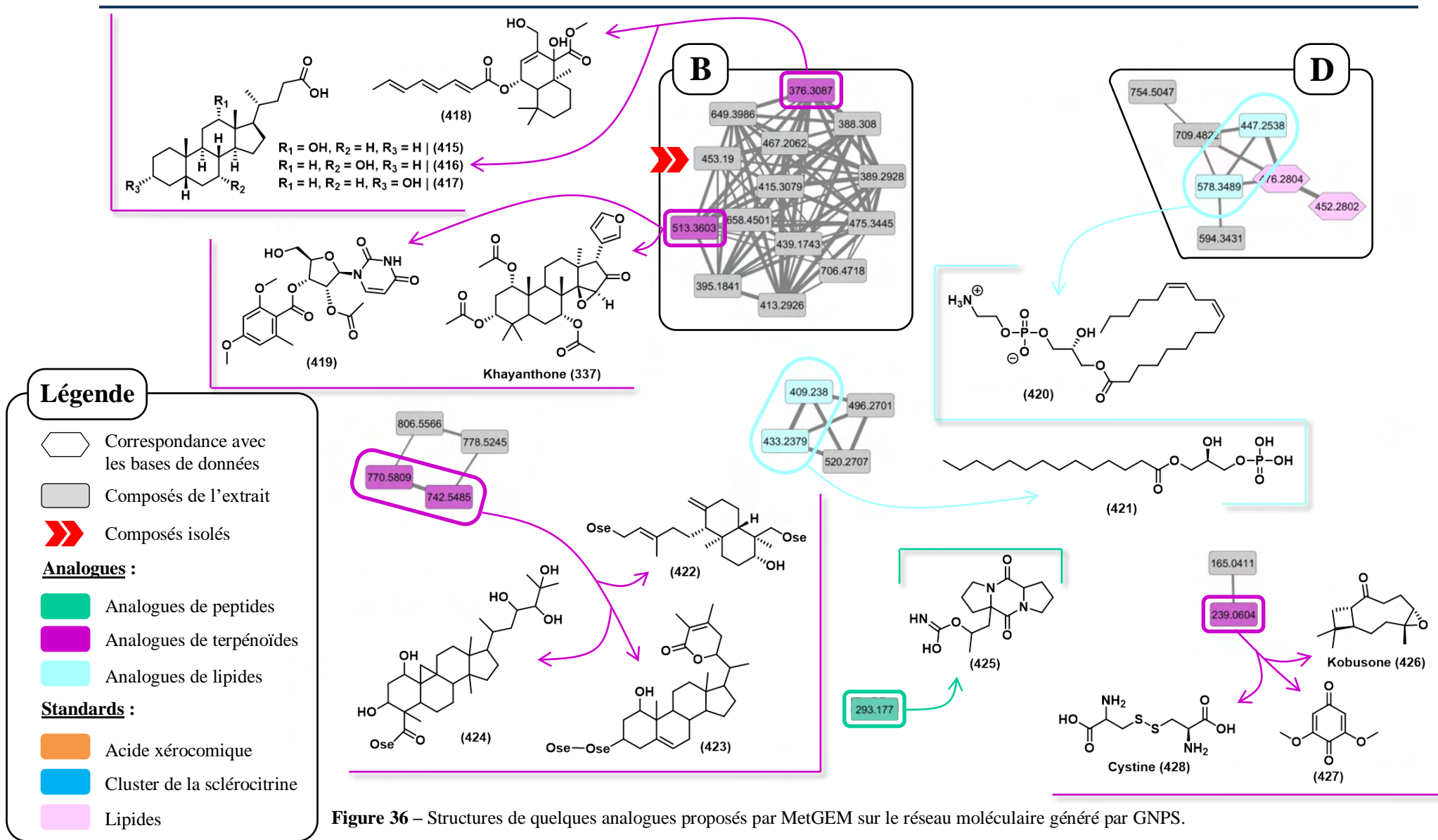
Par cette approche combinée, nous avons réussi à faire ressortir trois familles de composés au sein de notre réseau (Figure 35) : des peptides cycliques, des lipides et des terpénoïdes. Quelques structures de ces analogues sont proposées sur la Figure 36 : le composé (425) est un exemple d'analogue de peptide cyclique, tandis que les composés (420) et (421) sont des exemples d'analogues de lipides. Mais ce sont principalement des analogues de terpénoïdes qui sont présents au sein de notre extrait, comme les composés (415), (416), (417), (418), (419), (423) et (424). Notons d'ailleurs que la proposition par MetGEM de la khayanthone (337) et de la kobusone (426) comme analogues est surprenante, car ce sont des composés issus principalement de végétaux et non de macromycètes (*Rutaceae* et *Meliaceae* pour la khayanthone (337),³¹ *Cyperus rotundus* et *Lavandula sp.* pour la kobusone (426)¹³⁶). Une explication de ce fait sera proposée un peu plus loin dans ce manuscrit (page 205). Enfin, on remarque que le cluster D du réseau GNPS, qui contient déjà les deux LPE connus,

comprend aussi deux autres molécules analogues à des lipides (en bleu clair – Figure 35 et Figure 36). Les structures lipidiques n'étant pas celles ciblées par ce projet, nous avons décidé de ne pas poursuivre l'analyse de ce cluster.

Ensuite, on remarque que sur le réseau généré par le GNPS (Figure 35), le composé de masse identique à la sclérocitrine est liée à deux autres composés (en bleu foncé) : la différence de masse entre ces trois composés est $\Delta m/z = 14,0156$ Da, ce qui correspond à l'ajout de groupements $-\text{CH}_2-$ sur la sclérocitrine. Nous avons donc cherché à isoler ces composés en priorité (cf partie 2.1.4 de ce chapitre). Le composé $m/z = 725,0812$ Da s'avèrera effectivement être la sclérocitrine (cf partie 2.1.4.1 de ce chapitre – page 190). Le fait que le cluster de la sclérocitrine (qui est un dimère pulvinique) ne contienne que trois nœuds laisse entrevoir l'idée d'une convergence métabolique vers la sclérocitrine au sein du champignon *Scleroderma citrinum*, ce qui limite grandement la diversité structurale apportée à ce squelette pulvinique. En parallèle de ces constatations, nous notons que la sclérocitrine est isolée dans le réseau générée par MetGEM (Figure 38). Cela peut s'expliquer par le fait que le seuil du score de similarité choisi pour relier différents composés au sein d'un même cluster sur MetGEM est plus élevé que pour GNPS (80% vs 70%).

Par ailleurs, nous souhaitons visualiser rapidement sur nos réseaux dans quelle fraction de notre pré-fractionnement sur gel de silice se trouvent majoritairement les composés de l'extrait de *Scleroderma citrinum*. C'est ainsi qu'un troisième réseau a été conçu (Figure 37) : manuellement, tous les nœuds du réseau généré sur GNPS ont été recherchés sur les chromatogrammes TIC (ESI-) des fractions F0 à F14 et se sont vus attribuer la couleur de la fraction dans laquelle ils se trouvent majoritairement.





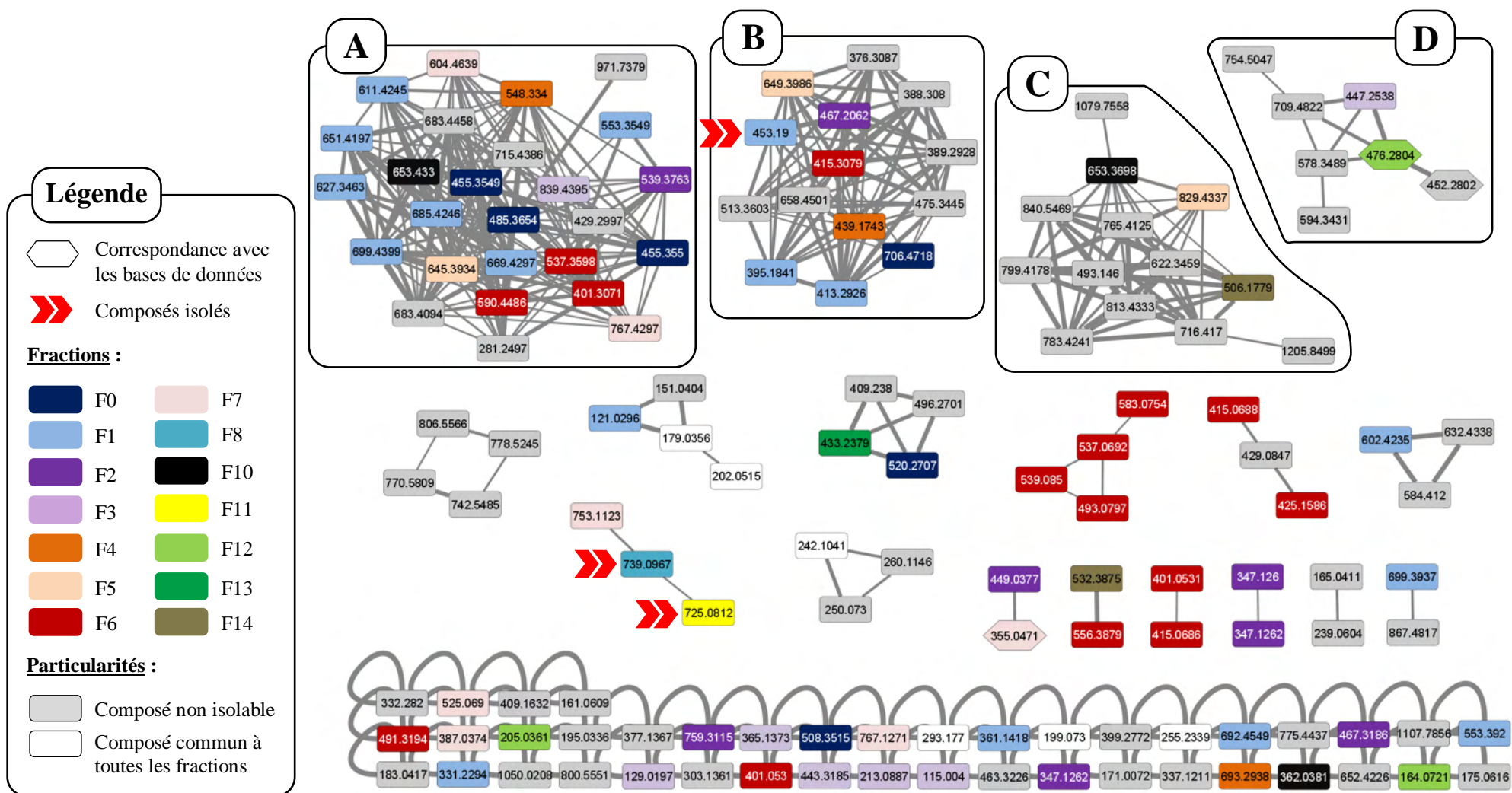


Figure 37 – Répartition des composés du réseau sur GNPS entre les différentes fractions obtenues par fractionnement sur silice. La couleur choisie pour chaque nœud correspond à la fraction contenant majoritairement le composé du nœud étudié. Les composés « non isolables » sont ceux présents en trop faible quantité pour être isolés.

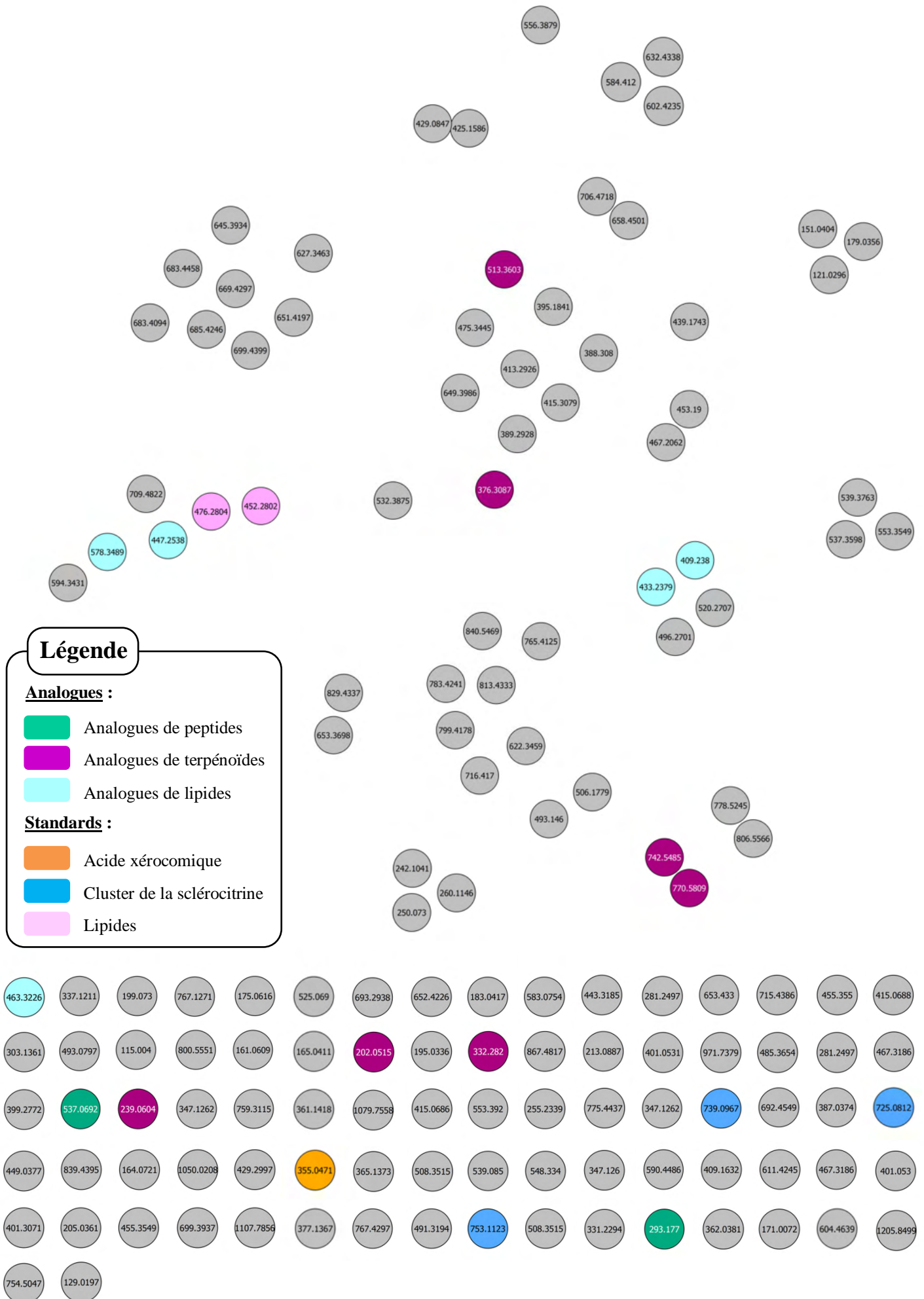


Figure 38 – Réseau moléculaire obtenu pour *Scleroderma citrinum* sur MetGEM. Les nœuds non annotés sont colorés en gris.

Sur ce troisième réseau (Figure 37), chaque nœud s'est vu attribuer une couleur en fonction de la fraction dans laquelle il se trouve principalement. Ainsi, il apparaît sur ce réseau que 58 composés sur 78 au total (soit 74% des composés de notre extrait) se trouvent dans les fractions les moins polaires (de F0 à F6), c'est-à-dire lorsque la proportion en méthanol de l'éluant est comprise entre 0% et 10%. La sclérocitrine, quant à elle, se trouve principalement dans la fraction F11, tandis que les deux composés appartenant à son cluster se trouvent majoritairement dans les fractions F7 (pour le nœud 753,1123) et F8 (pour le nœud 739,0967), ce qui correspond aux fractions sortant pour un éluant DCM/MeOH + 1,0% HCO₂H aux proportions 8,5 : 1,5 → 8,0 : 2,0. Par ailleurs, malgré le choix de paramètres MS/MS destinés à minimiser la sélection et la fragmentation d'ions parents minoritaires (*i. e.* sélection de seulement trois ions parents lors de l'analyse MS/MS et d'un seuil d'abondance minimal lors du nettoyage des données par MzMine2), nous notons que 43% des composés visualisés sur nos réseaux sont jugés « non isolables », même si certains semblent intéressants de par leur relation à une molécule ciblée. Cette proportion, bien que très élevée et relativement décevante, ne concerne heureusement pas le cluster de la sclérocitrine, qui retient principalement notre attention.

Pour finir, afin de pouvoir annoter de manière plus précise les trois clusters principaux formés sur nos réseaux (*i. e.* les clusters A, B et C) nous avons essayé d'isoler des composés provenant de ces trois clusters. Bien que n'étant pas reliés à la sclérocitrine ou à l'acide xérocomique, ces clusters restent prometteurs, car on y retrouve des masses élevées, (supérieure à 600), pouvant correspondre, potentiellement, à des dimères analogues de la sclérocitrine. Pour rappel, les seuls analogues que nous avons pu trouver au sein de ces trois clusters correspondent à des terpénoïdes au sein du cluster B (Figure 35). Au final, le seul composé que nous avons pu isoler et caractériser appartient au cluster B et correspond au nœud 453,19. Tous les métabolites que nous avons réussi à isoler et caractériser au cours de ce travail sont matérialisés sur les réseaux par une double flèche rouge et sont présentés dans la partie 2.1.4 ci-dessous – page 189.

2.1.4 Structures des métabolites isolés de *Scleroderma citrinum*

Une fois que la déréplication par réseau moléculaire a permis de cibler les molécules d'intérêt dans l'extrait, nous avons pu isoler *cinq* métabolites.

2.1.4.1 Sclérocitrine

Nous avons vu dans l'introduction de ce chapitre (page 167) que la littérature comporte peu d'études sur le champignon *Scleroderma citrinum*. L'un des seuls métabolites connus, qui est également notre cible synthétique, est la sclérocitrine. Notre premier objectif a donc été d'isoler ce métabolite pour valider le protocole d'extraction que nous avons suivi. Après l'avoir ciblée sur le réseau moléculaire (Figure 35 – double-flèche rouge – nœud 725,0812), nous l'avons isolée à raison de 7 mg, grâce aux conditions HPLC mises au point et détaillées dans la partie 1.4 de ce chapitre (page 171), puis transposées à l'échelle préparative (colonne Waters XBridge - 19 × 150 mm ; i. d. 5 µm). Les chromatogrammes de la fraction obtenue après purification par HPLC préparative sont donnés sur la Figure 39.

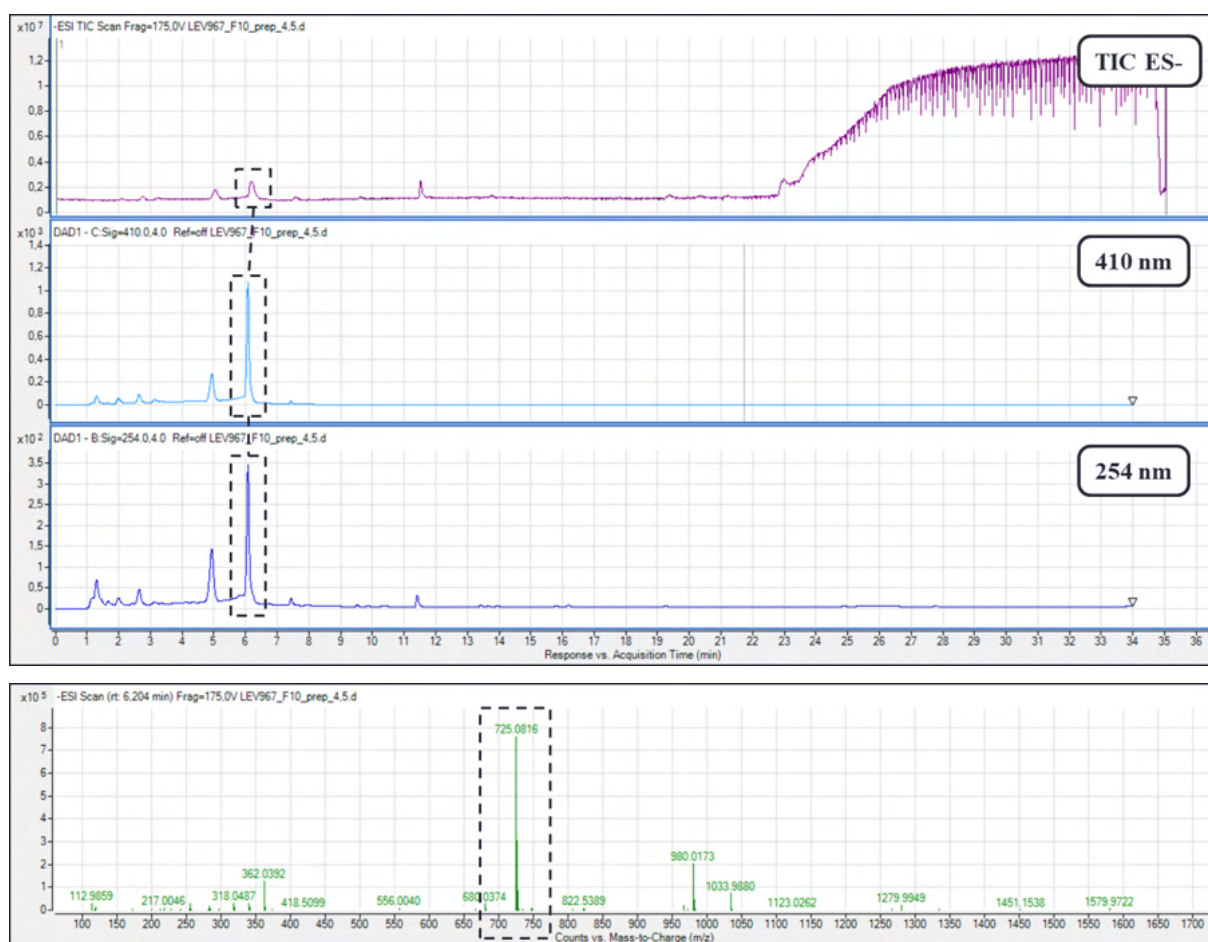


Figure 39 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (254 nm et 410 nm) de la sclérocitrine ($t_R = 6,20$ min) et spectre de masse correspondant (colonne Waters XBridge - 150 × 2,1 mm ; i. d. 3,5 µm ; éluant ACN/H₂O+NH₄Ac - 5% → 100% en 20 minutes ; débit = 0,3 mL/min).

Après purification par HPLC préparative, la sclérocitrine est isolée sous sa forme carboxylate, elle est donc uniquement soluble dans une phase aqueuse et nous avons cherché à réaliser sa RMN dans l'eau lourde. Cependant, la RMN ^1H dans D_2O était particulièrement mal résolue. Nous avons donc décidé de réaliser une extraction liquide-liquide de la phase aqueuse (contenant notre composé), acidifiée à l'acide trifluoroacétique par de l'acétate d'éthyle.

Il est à noter que les analyses RMN de la sclérocitrine dans D_2O ont été effectuées à la veille du confinement de mars-avril 2020 dû à la crise du COVID-19. La sclérocitrine salifiée est donc restée en solution dans le D_2O pendant deux mois avant d'être acidifiée et extraite, ce qui a provoqué sa mono-deutération en position **H-3a** (Figure 40). La deutérioration s'est faite sélectivement sur la face convexe de la molécule, qui est visiblement la seule accessible. Les analyses RMN présentées correspondent donc au composé mono-deutéié.

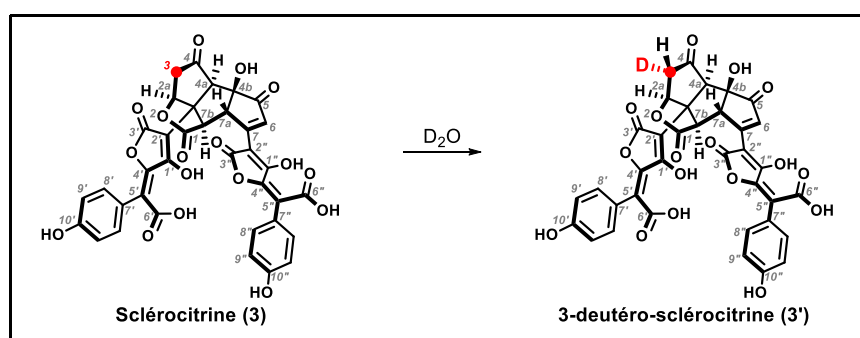


Figure 40 – Mono-deutération de la sclérocitrine sur la position 3 en présence d'eau lourde.

Néanmoins, exception faite de la réaction de mono-deutération, les analyses RMN (^1H , ^{13}C et corrélations 2D) de la sclérocitrine neutralisée (Figure 42 et Figure 44) sont identiques aux spectres réalisés dans l'acétone- d_6 et publiés par W. Steglich en 2004 (Figure 41 et Figure 43).³⁰²

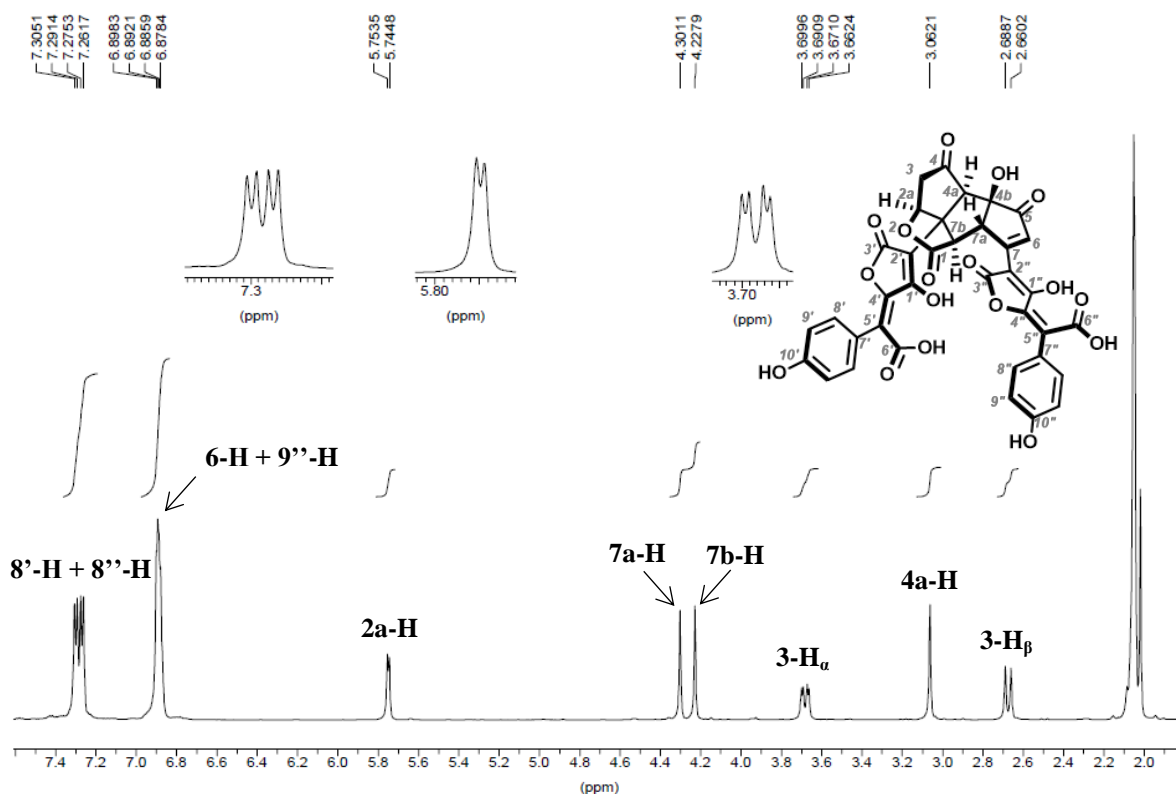


Figure 41 – Spectre ^1H de la scléroicitrine d'après W. Steglich (acétone- d_6 , 600 MHz).³⁰²

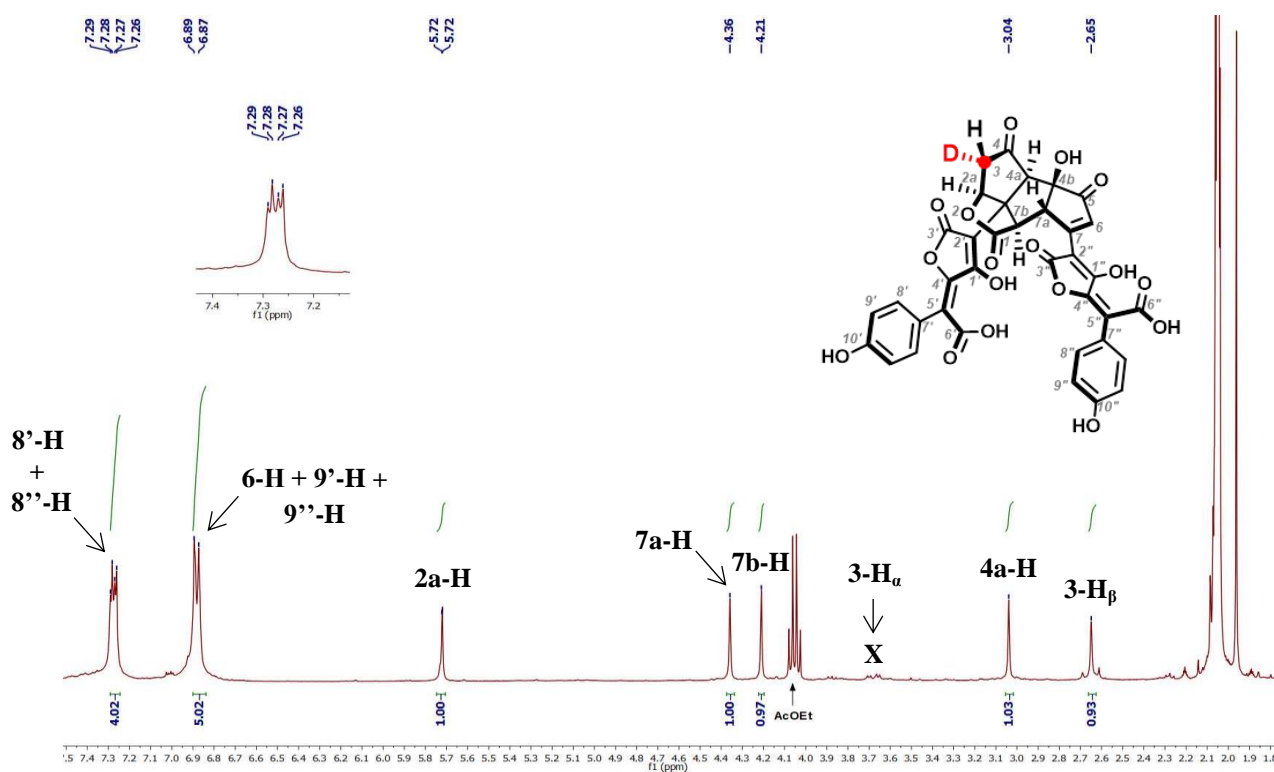


Figure 42 – Spectre ^1H de la scléroicitrine mono-deutérée (acétone- d_6 , 400 MHz).

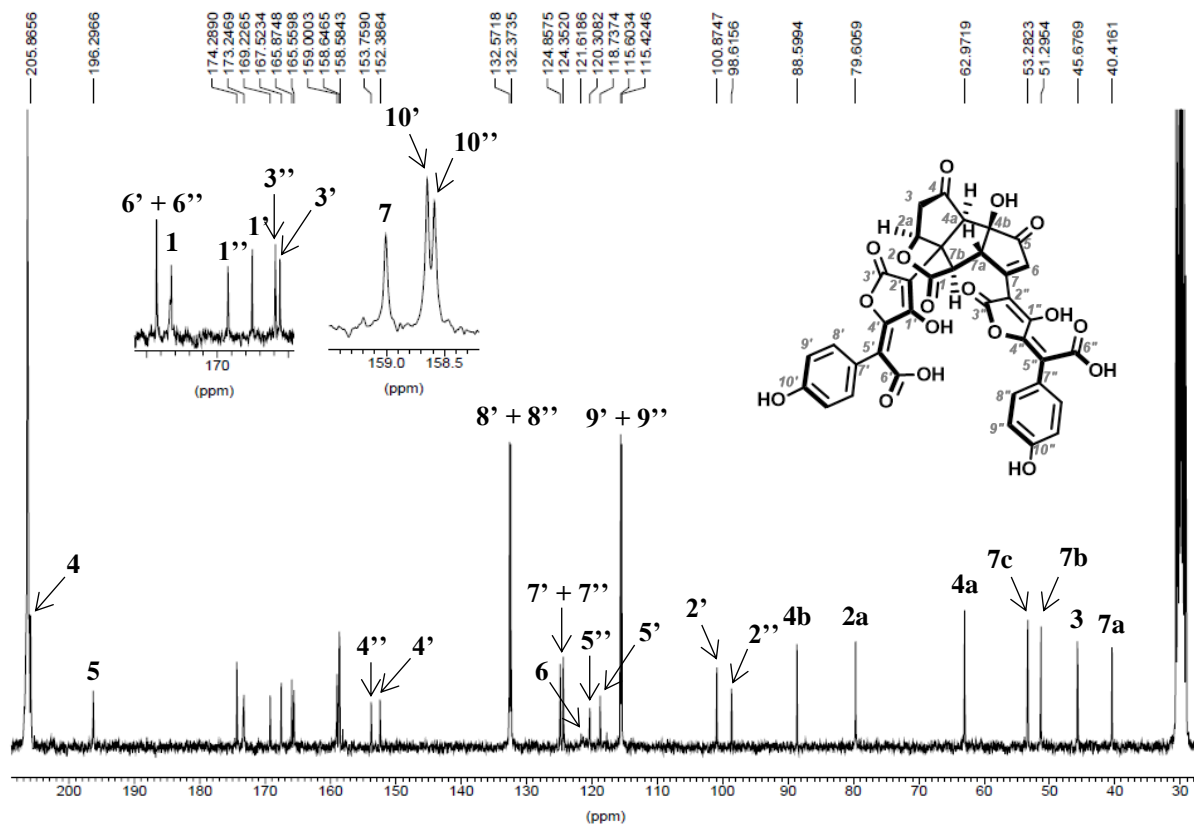


Figure 43 – Spectre ^{13}C de la sclérocitrine d'après W. Steglich (acétone- d_6 , 151 MHz).³⁰²

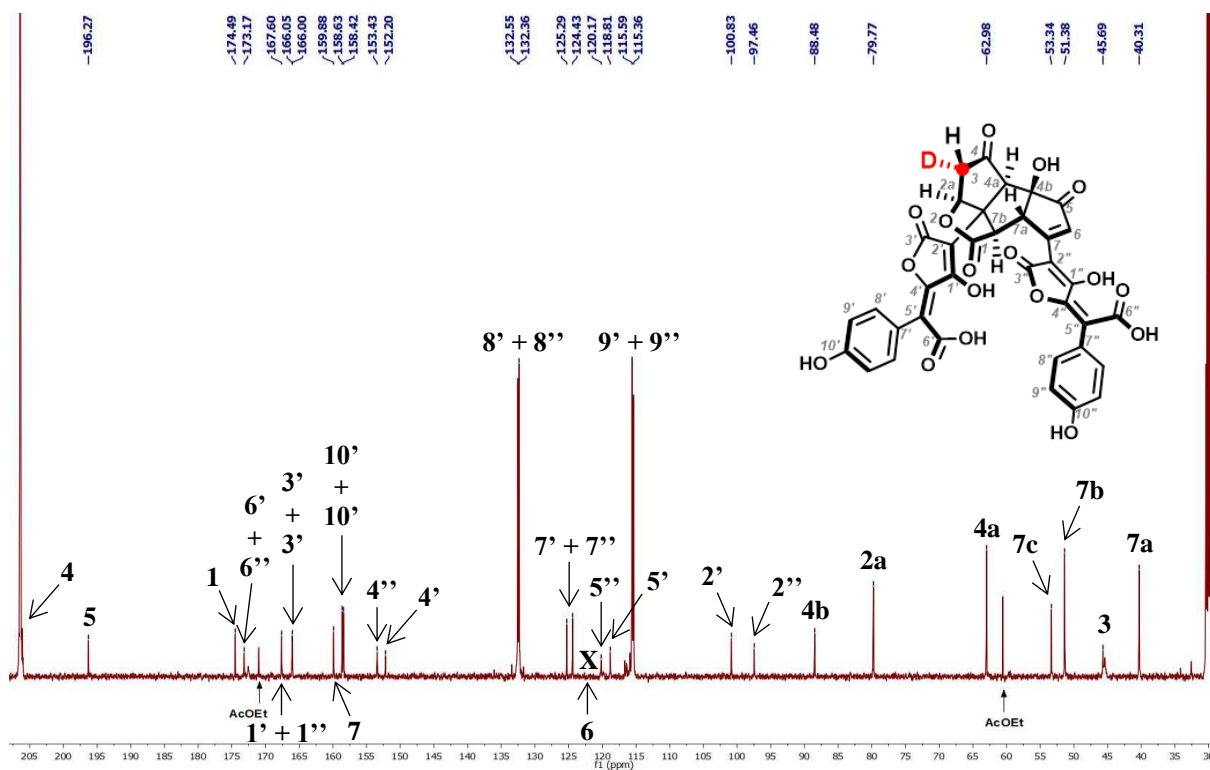


Figure 44 – Spectre ^{13}C de la sclérocitrine mono-deutérée (acétone- d_6 , 101 MHz).

2.1.4.2 Méthyl-sclérocitrine

Une fois la sclérocitrine isolée et caractérisée, nous nous sommes tournés vers les molécules faisant partie du même cluster sur le réseau moléculaire (Figure 35), en raison de leur similarité structurale potentielle avec la sclérocitrine. Il s'est avéré que le nœud 739,0967 cachait deux composés isobares, mais avec des temps de rétention légèrement différents : un composé A à 7,65 minutes et un composé B à 8,38 minutes (Figure 45). La masse de ces composés, $m/z = 739,0976$ Da (ESI-) et $m/z = 739,0966$ Da (ESI-), présente une différence de masse de $\Delta m/z = 14,0155$ Da avec la sclérocitrine, ce qui correspond à la masse d'un groupement méthylène $-\text{CH}_2-$. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces composés sont des analogues méthylés de la sclérocitrine.

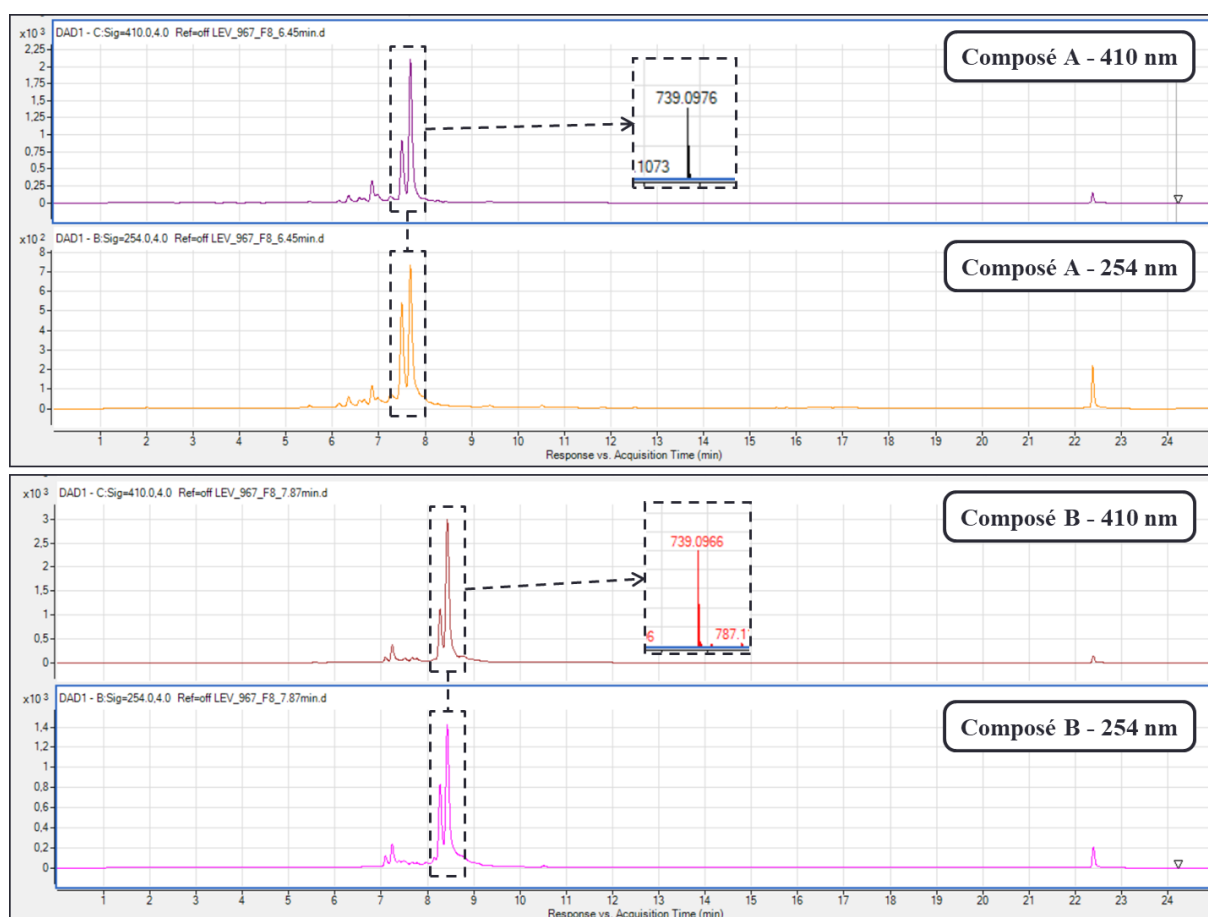


Figure 45 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (254 nm et 410 nm) du composé A ($m/z = 739,0976$ Da) ($t_R = 7,65$ min) et du composé B ($m/z = 739,0966$ Da) ($t_R = 8,38$ min) (colonne XBridge analytique ; éluant $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4\text{Ac} - 5\% \rightarrow 100\%$).

La question est donc de savoir si ces composés A et B sont effectivement des versions méthylées de la sclérocitrine et dans ce cas, où se trouvent ces groupements méthyles sur la sclérocitrine. L'analyse des RMN ^1H du composé A (Figure 46) et du composé B (Figure 47) révèlent chacune des signaux identiques à ceux de la sclérocitrine, avec la présence d'un groupement méthyle subsidiaire, respectivement à 3,89 ppm pour le composé A et 3,92 ppm pour le composé B.

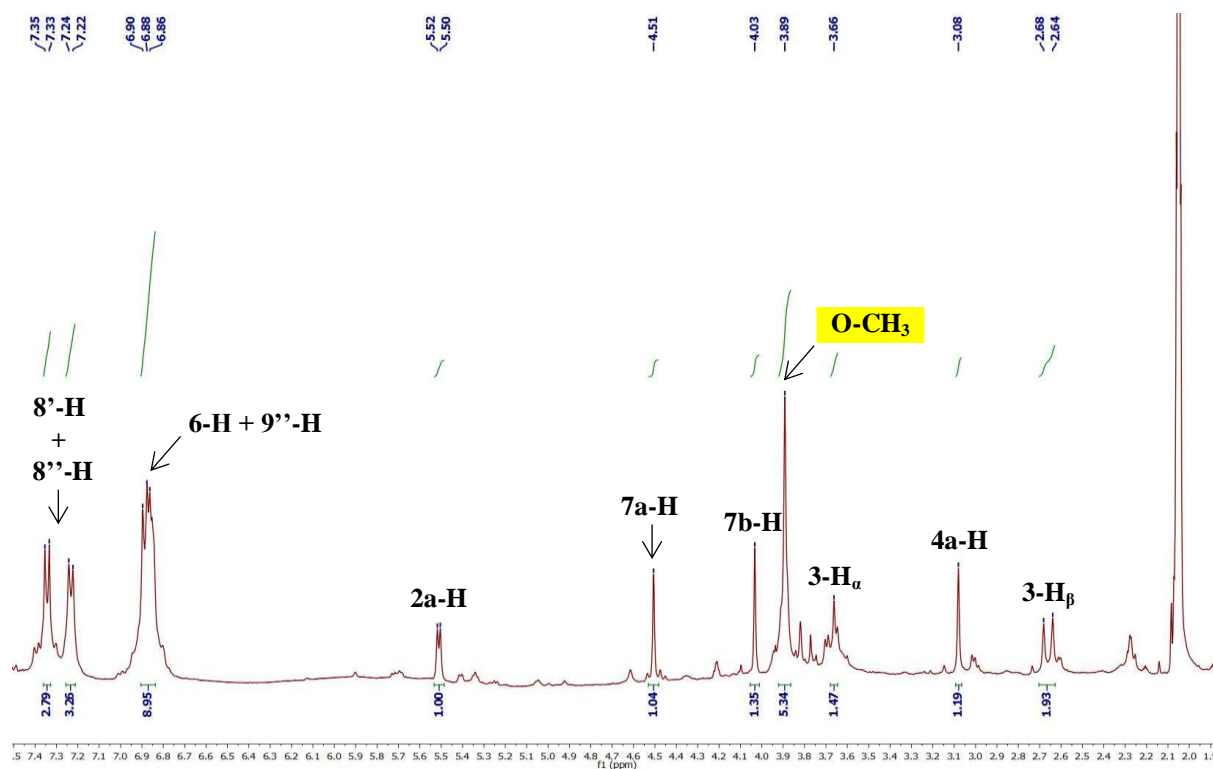


Figure 46 – Spectre ^1H du composé A ($m/z = 739,0976$ Da) (acétone- d_6 , 400 MHz).

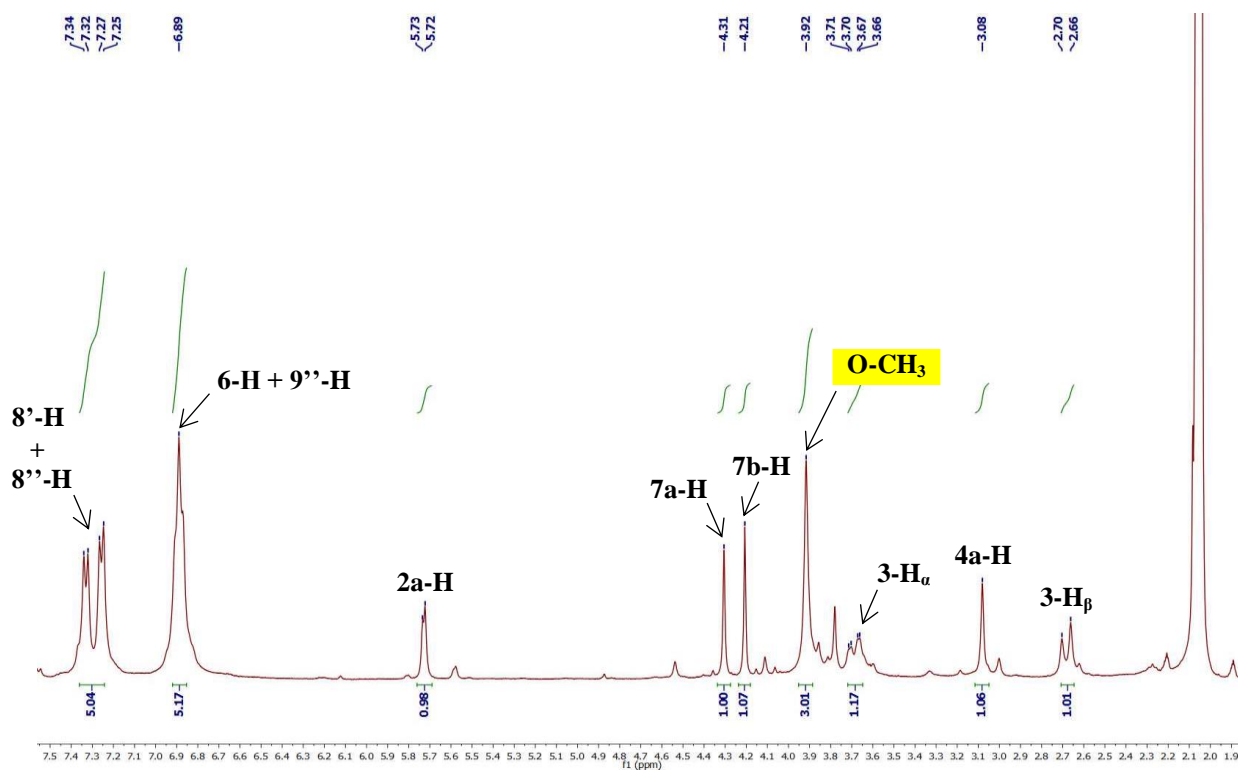


Figure 47 – Spectre ^1H du composé B ($m/z = 739,0966$ Da) (acétone- d_6 , 400 MHz).

Grâce à l'analyse HMBC des deux composés A et B, on note que ce groupement méthyle supplémentaire corrèle avec le carbone d'un carboxyle 6' ou 6'' (respectivement, 170,1 ppm pour le composé A et 172,2 ppm pour le composé B), nous permettant de conclure que les composés A et B sont les esters de méthyle de la sclérocitrine, dont les structures sont représentées sur la Figure 48. Une attribution plus fine est ensuite requise pour discriminer les deux composés et déterminer si l'ester se trouve en position 6' ou 6''.

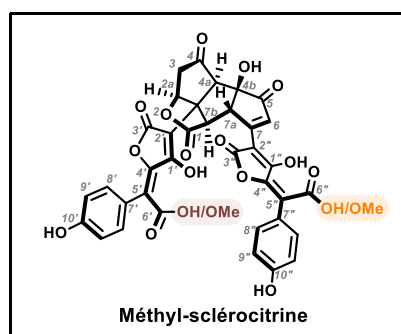


Figure 48 – La méthyl-sclérocitrine, une structure potentielle des composés A et B.

L'attribution a pu être établie grâce aux valeurs de déplacement chimique des carbones 4' et 4'' pour les deux composés A et B. En effet, leurs déplacements chimiques doivent être légèrement différents si le carboxyle 6' ou 6'' est sous sa forme acide ou son équivalent ester

de méthyle. Prenons un exemple pour illustrer cet effet sur un système conjugué de type acrylate (Schéma 104).

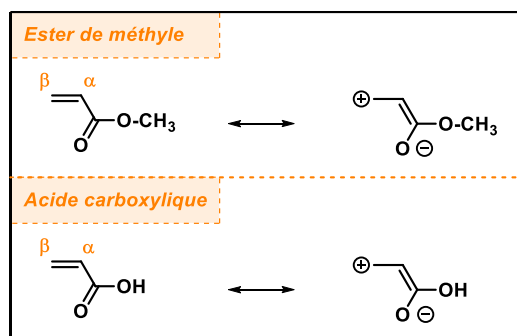


Schéma 104 – Effet d'un groupement acide carboxylique ou d'un ester sur la résonance d'un système conjugué de type acrylate.

Le groupement ester étant un meilleur groupement électroattracteur que l'acide, la position β se retrouve plus appauvrie en électrons dans le cas de l'ester que dans le cas de l'acide. En RMN ^{13}C , il en résulte que la position β de l'ester sera plus déblindée (*i. e.* une valeur plus élevée de déplacement chimique) que la position β de l'acide carboxylique.

Dans les faits, on observe bien une différence de déplacement chimique entre les carbones 4' et 4'' : pour le composé A, les carbones 4' et 4'' sortent à 146,4 ppm et 152,2 ppm^P, tandis que pour le composé B, les carbones 4' et 4'' sortent à 151,20 ppm et 151,70 ppm. Cette légère différence de déplacement chimique nous permet donc effectivement de différencier les deux composés A et B.

Pour réaliser l'attribution finale, nous nous sommes d'abord intéressés au composé A. En effet, le spectre HMBC de ce composé montre une corrélation entre l'un des carbones 4'/4'' et le proton 7a (Figure 49).

^P Il est à noter que les carbones 4' et 4'' du composé A ne sont pas visibles sur le spectre ^{13}C , mais on détecte leur présence grâce aux corrélations présentes sur les différents spectres RMN 2D (notamment HMBC - Figure 49).

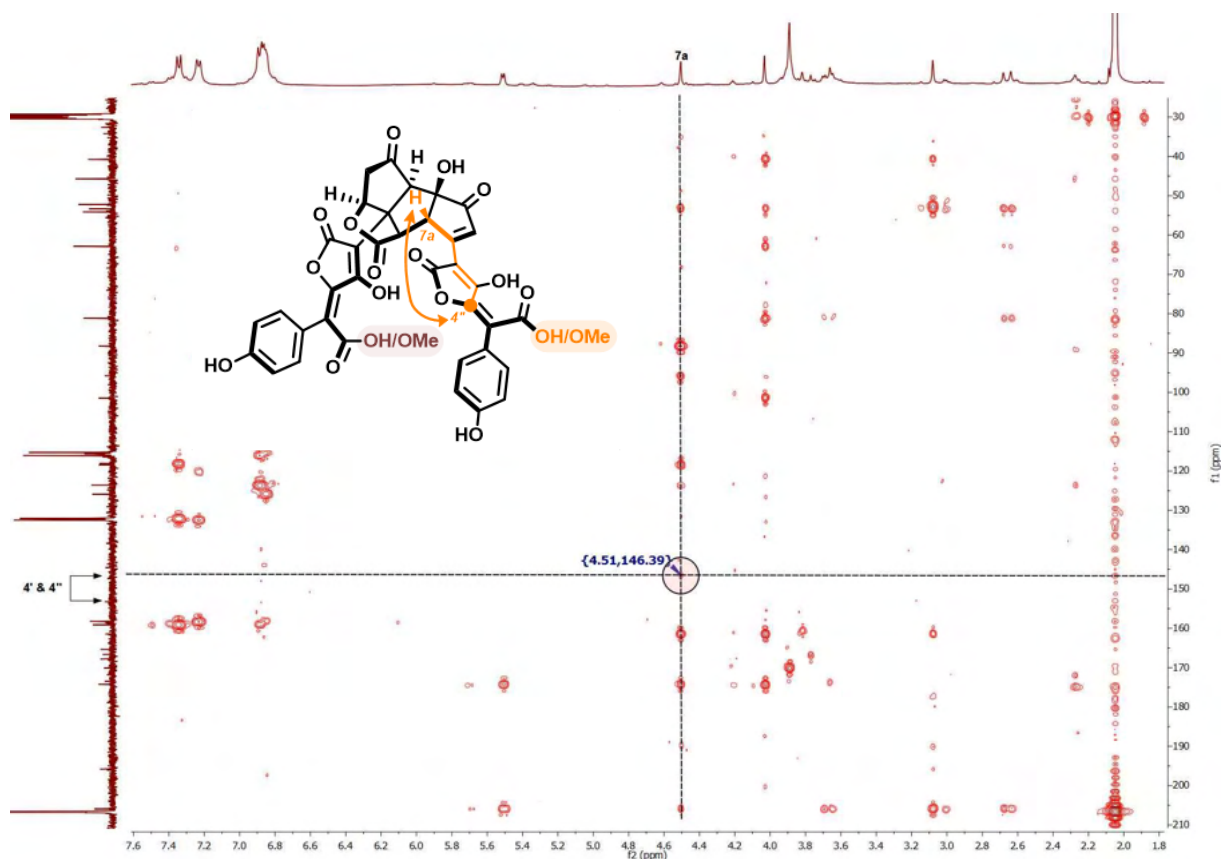


Figure 49 – Spectre HMBC du composé A ($m/z = 739,0976$ Da) (acétone- d_6 , 400 MHz).

D'après notre numérotation (Figure 50), le proton 7a appartient au cœur central de la molécule : si la corrélation visible en HMBC est du type 7a – 4', il s'agirait d'une corrélation longue distance J_6 (en marron sur la Figure 50), tandis qu'une corrélation du type 7a – 4'' serait une corrélation longue distance J_5 (dite en « w ») (en orange sur la Figure 50), ce qui est beaucoup plus probable. La corrélation visible en HMBC est donc celle entre le proton 7a et le carbone 4''.

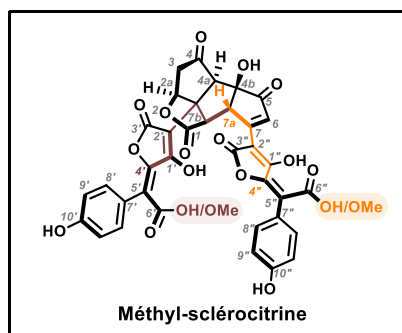


Figure 50 – Corrélations entre le proton 7a et les carbones 4' et 4'' pour le composé A ($m/z = 739,0976$ Da).

Ainsi, nous pouvons attribuer plus précisément les valeurs de déplacements chimiques des carbones 4' et 4'' pour le composé A : $\delta (4')_A = 152,2 \text{ ppm}$ et $\delta (4'')_A = 146,4 \text{ ppm}$. Nous notons donc que le carbone 4' est plus déblindé que le carbone 4''.

Par conséquent, en combinant ces données au raisonnement concernant le déplacement chimique de la position β d'un acide acrylique et de son équivalent ester (présenté sur le Schéma 104 – page 197), nous pouvons localiser l'ester de méthyle pour le composé A. En effet, l'ester étant un meilleur groupement électroattracteur que l'acide correspondant, la position β (*i. e.* 4' ou 4'') est plus déblindée dans le cas de l'ester. Or, à l'aide des analyses RMN 2D, nous avons déjà attribué le signal du carbone 4' à 152,2 ppm et celui du carbone 4'' à 146,4 ppm. Ainsi, nous pouvons conclure que l'ester se trouve sur la position 6' pour le composé A et nous l'avons appelé la **méthyl-sclérocitrine A (334)**. Par élimination, nous pouvons conclure que le composé B correspond à l'autre ester de méthyle de la sclérocitrine : nous l'avons appelé la **méthyl-sclérocitrine B (335)**. Les deux structures finales attribuées pour les composés A et B sont présentées sur la Figure 51.

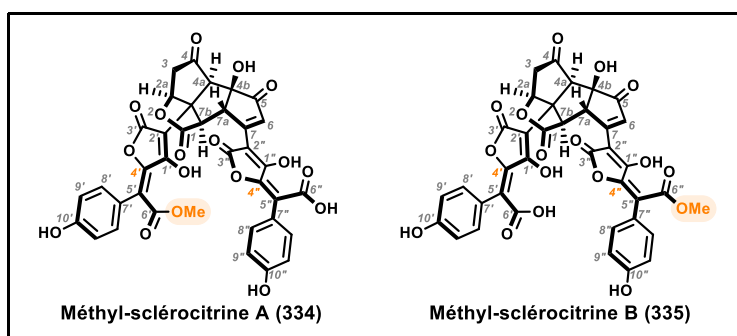


Figure 51 – Structures finales de la méthyl-sclérocitrine A (**334**) ($m/z = 739,0976 \text{ Da}$) et de la méthyl-sclérocitrine B (**335**) ($m/z = 739,0966 \text{ Da}$).

Il est à noter que le composé B ne présente aucune corrélation liée à ses carbones 4' et 4'' (Figure 52). Il ne nous est donc pas possible de valider formellement la réciproque de notre raisonnement, ce qui laisse une part d'incertitude sur les structures de la méthyl-sclérocitrine A et B.

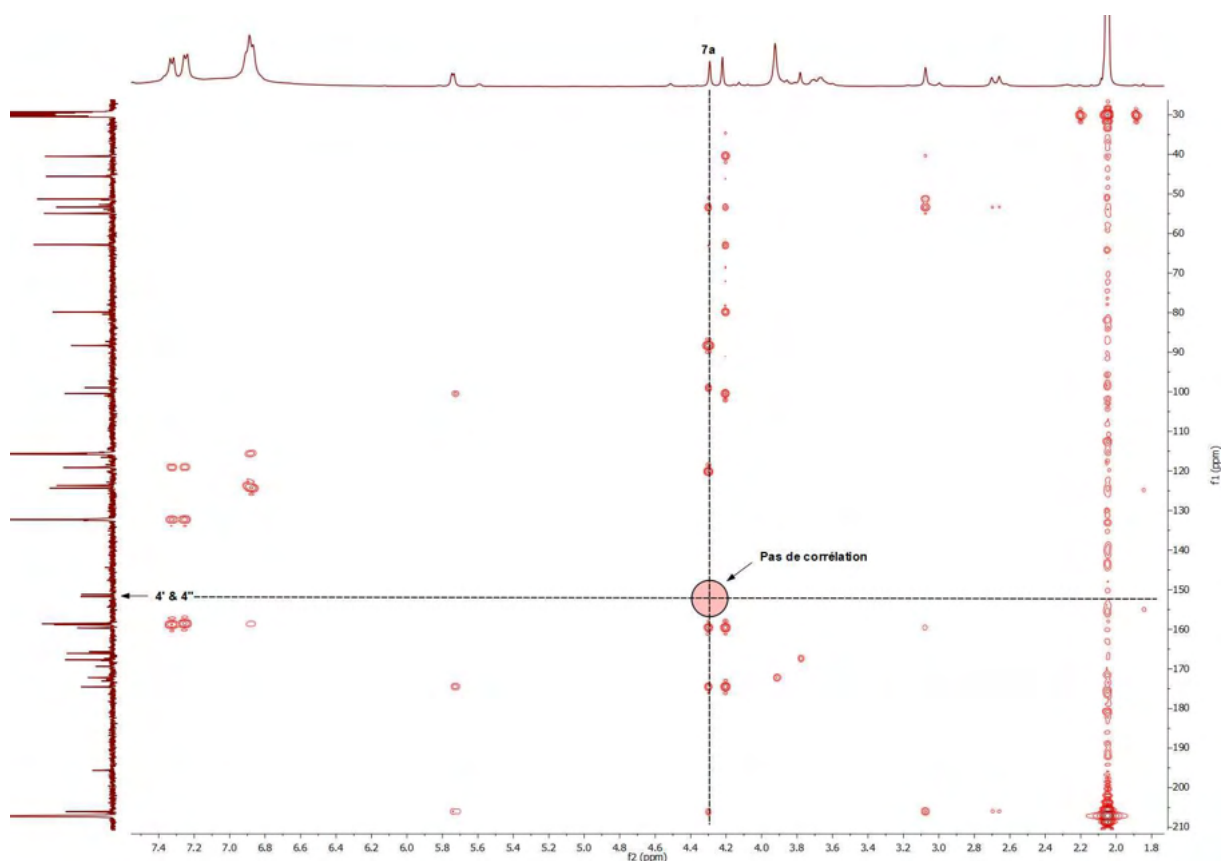


Figure 52 – Spectre HMBC du composé B (*i. e.* la méthyl-sclérocitrine B) ($m/z = 739,0966$ Da) (acétone- d_6 , 400 MHz).

La présence de ces deux dérivés de la sclérocitrine au sein de l'extrait de *Scleroderma citrinum* pose question. Pour rappel, l'extraction de ces composés a été réalisée dans le méthanol et la pré-purification de cet extrait méthanolique a été faite par une extraction liquide-liquide AcOEt/H₂O + H₂SO₄ (Figure 25), il est donc tout à fait possible que ces deux composés soient, en réalité, des artéfacts dus aux conditions d'extraction employées. Pour s'en assurer, il serait nécessaire de réaliser une nouvelle extraction de *Scleroderma citrinum* avec de l'acétone ou l'acétate d'éthyle, voire de l'éthanol : si ces deux composés sont effectivement des artéfacts d'extraction, ils seront alors absents de ces nouveaux bruts d'extraction. Plus précisément, dans le cas d'une extraction par l'éthanol, ces composés pourront peut-être être formés au cours du processus, mais seront détectés avec une masse différente en raison de la présence de la chaîne éthyle ($m/z = 753,1097$ Da en mode négatif).

Pour finir, rappelons que le cluster de la sclérocitrine comprenait également le nœud 753,1123. Ce nœud présente une différence de masse de $\Delta m/z = 14,0156$ Da avec la méthyl-sclérocitrine B, ce qui correspond à la masse d'un groupement méthylène $-CH_2-$. Ce nœud

faisant partie du même cluster que la sclérocitrine et que les méthyl-sclérocitrines A et B, on peut raisonnablement penser que ce composé est un double ester de méthyle de la sclérocitrine. Ce composé étant présent en trop faible quantité dans l'extrait, nous n'avons pas pu l'isoler pour valider cette hypothèse.

2.1.4.3 Dipeptide

Isolement et détermination structurale :

Une fois que les molécules appartenant au cluster de la sclérocitrine ont pu être isolées et caractérisées, nous avons essayé d'isoler des composés provenant des trois clusters principaux formés sur le réseau (les clusters A, B et C - Figure 35). En raison de la crise du COVID-19, le temps nous a manqué pour pouvoir isoler tous les métabolites jugés potentiellement « intéressants » structurellement parlant. Nous nous sommes donc tournés en priorité vers des composés fortement ionisables en ESI, visibles en UV et présents dans des proportions permettant un isolement et une caractérisation relativement aisés. Au final, parmi les différents essais de purification par HPLC préparative que nous avons réalisés, le seul composé que nous avons pu isoler et caractériser pleinement appartient au cluster B. Il correspond au nœud 453,19 et est appelé « composé C » dans la suite de ce manuscrit (les chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis de ce composé C sont présentés sur les Figure 53 et Figure 54). Ce nœud est repérable par une double-flèche rouge sur le réseau moléculaire réalisé sur le GNPS (Figure 35, Figure 36 et Figure 37).

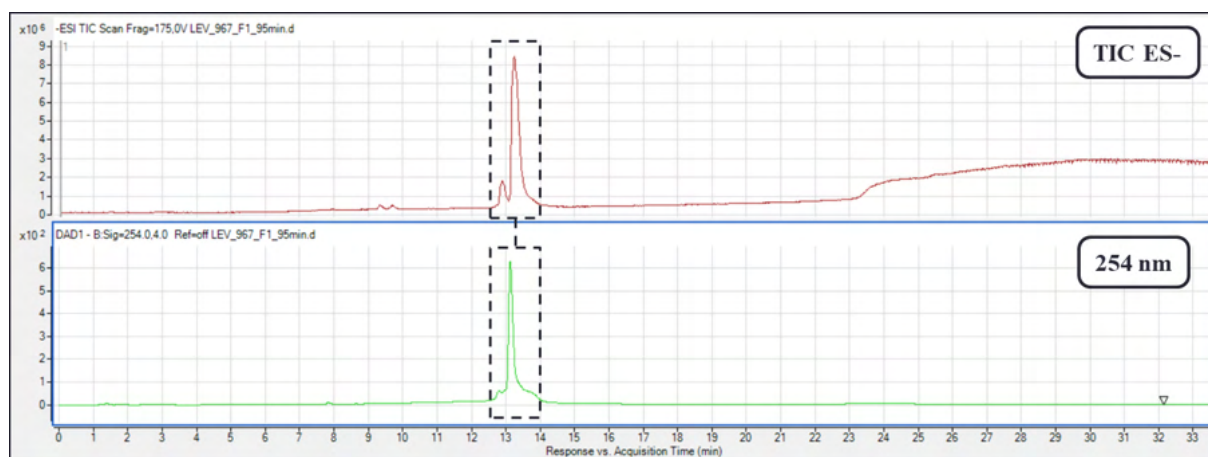


Figure 53 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (254 nm) du composé C de rapport $m/z = 453,1882$ Da ($t_R = 13,24$ min) (colonne XBridge analytique ; éluant ACN/H₂O + NH₄Ac - 5% → 100%).

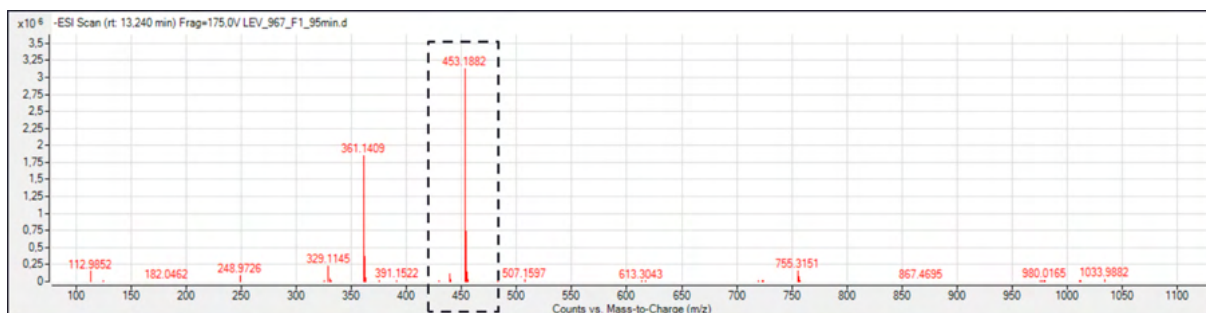


Figure 54 – Spectre de masse du composé C de rapport $m/z = 453,1882$ Da ($t_R = 13,24$ min) (colonne XBridge analytique ; éluant ACN/H₂O+NH₄Ac - 5% → 100%).

Grâce au spectre ¹H (Figure 55) et à l'analyse HSQC, nous pouvons dire que ce composé C comporte :

- 5 protons aromatiques ($\delta = 7,18 - 7,27$ ppm)
- 3 groupements méthoxyles -OCH₃ ($\delta = 3,59$ ppm, 3,64 ppm et 3,67 ppm)
- 2 massifs correspondant à des groupements -CH ($\delta = 4,36$ ppm et 4,64 ppm)
- 4 massifs correspondant à des groupements -CH₂ ($\delta = 1,64$ ppm, 1,78 ppm, 2,32 ppm et 3,04 ppm)

Ces informations sont reportées sur le spectre HMBC du composé C, afin de faciliter la détermination structurale (Figure 56).

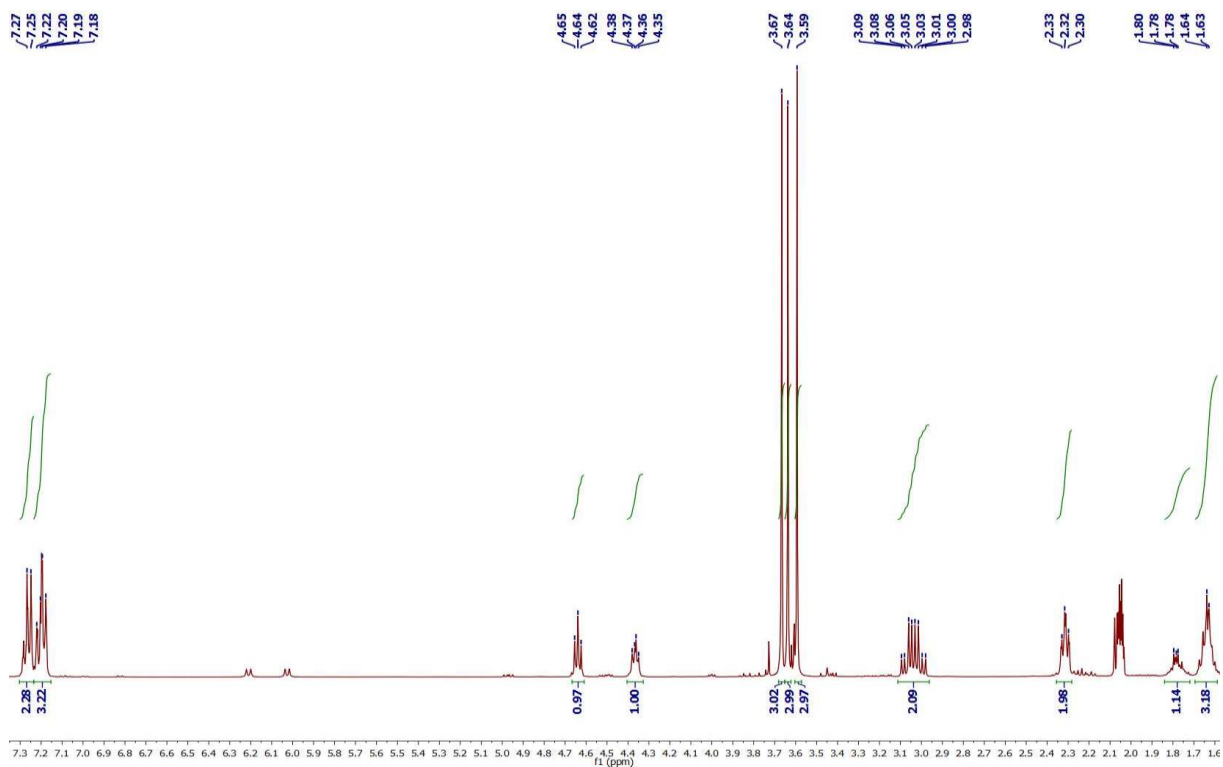


Figure 55 – Spectre ^1H du composé C ($m/z = 453,1882$ Da) (acétone- d_6 , 400 MHz).

Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur le triplet du groupement $-\text{CH}$ à un $\delta = 4,64$ ppm (ses corrélations HMBC sont représentées en vert). Ce triplet à un $\delta = 4,64$ ppm corrèle avec un carbone portant un CH_2 à un $\delta = 39,0$ ppm, un carbonyle à 173,3 ppm et un carbone quaternaire du cycle aromatique à 137,8 ppm : ces caractéristiques évoquent les carbones en position α d'acides aminés aromatiques comme la phénylalanine ou la tyrosine.²⁷⁸ Or, nous avons déterminé précédemment que le composé C comporte 5 protons aromatiques, nous en concluons donc qu'il s'agit d'une sous-unité de type phénylalanine. Par ailleurs, le carbonyle de cette sous-unité ($\delta = 173,3$ ppm) présente une tache de corrélation avec le groupement des méthoxyles $-\text{OCH}_3$ (corrélation en bleu sur la Figure 56) : la sous-unité phénylalanine est donc sous la forme d'un ester de méthyle (comme les dérivés de la sclérocitrine, dont la structure est détaillée dans la partie 2.1.4.2 de ce chapitre – page 199).

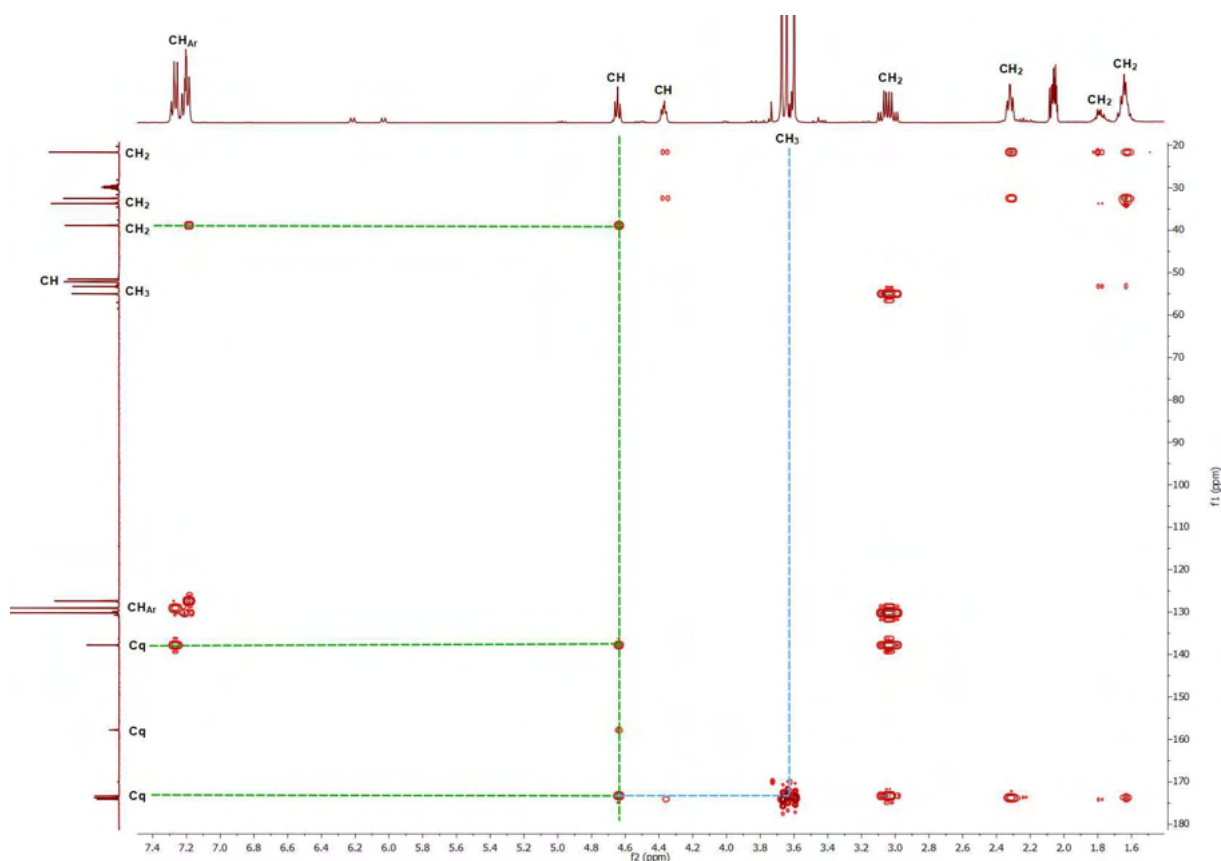


Figure 56 – Spectre HMBC du composé C ($m/z = 453,1882$ Da) (acétone- d_6 , 400 MHz).

Le même raisonnement est appliqué pour la 2^e sous-unité du composé C : le proton du deuxième massif de type –CH ($\delta = 4,36$ ppm) corrèle avec un carbonyle ($\delta = 173,8$ ppm), lui-même lié à un méthyle ($\delta = 3,67$ ppm). On est donc, de nouveau, en présence d'un ester de méthyle. Par ailleurs, ce proton –CH ($\delta = 4,36$ ppm) corrèle également avec deux carbones de type –CH₂ à un $\delta = 21,6$ ppm et un $\delta = 32,5$ ppm, ce qui correspond à une chaîne aliphatique. En poursuivant l'analyse des corrélations de cette chaîne aliphatique, il apparaît que cette 2^e sous-unité correspond à un autre acide aminé : l'acide 2-aminoadipique, lui aussi sous la forme d'un double ester de méthyle.

Le composé C est donc constitué de deux acides aminés sous la forme d'un triple ester de méthyle. L'ancrage entre ces deux sous-unités doit donc être réalisé au niveau des azotes. De fait, nous pouvons noter que les 2 protons de type –CH ($\delta = 4,36$ ppm et 4,64 ppm), en position α des carbonyles, présentent une tache de corrélation avec un carbone quaternaire à un $\delta = 157,8$ ppm, une valeur typique d'un groupement urée. Nous en déduisons que la structure finale du composé C est celle d'un dipeptide (**336**), où la phénylalanine et l'acide 2 aminoadipique sont reliés par un pont urée (Figure 57).

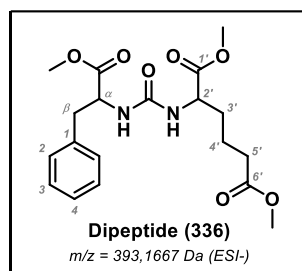


Figure 57 – Structure finale du composé C (**336**) ($m/z = 453,1882$ Da).

À ce stade, les analyses RMN ne nous permettent pas, en tant que tel, de nous prononcer sur la stéréochimie des carbones α et $2'$. Nous pouvons seulement affirmer que le composé C correspond à un seul diastéréoisomère parmi les 4 possibles. Un travail de synthèse a donc été entrepris pour synthétiser le composé C à partir des 4 acides aminés suivant : la (L)-phénylalanine, la (D)-phénylalanine, l'acide (L)-2-aminoadipique et l'acide (D)-2-aminoadipique, avec l'objectif de pouvoir synthétiser les 4 diastéréoisomères possibles, comparer les analyses RMNs entre elles et ainsi déterminer la stéréochimie des carbones α et $2'$ du composé C. Les résultats de ce travail de synthèse sont présentés dans la partie suivante (page 207).

Notons que ce dipeptide possède une masse molaire théorique de $394,424 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sur les chromatogrammes TIC (ESI-) (Figure 54), nous aurions donc dû voir apparaître ce composé avec le rapport $m/z = 393,1667$ Da (pour un ion M^+) et non $453,1882$ Da. Nous faisons l'hypothèse que cela est dû au fait que ce dipeptide forme un adduit acétate, provenant de l'acétate d'ammonium de la phase mobile au cours de l'HPLC-MS. Cette hypothèse pourra être vérifiée en synthétisant ces composés et en comparant leurs analyses RMN ^1H , ^{13}C et LC-HRMS. D'ailleurs, il est tout à fait possible que la formation de cet adduit au cours de l'élution ait biaisé le réseau moléculaire (Figure 35), car au sein du cluster B dont fait partie le dipeptide C (**336**), les structures des analogues trouvés ne présentent pas de points communs avec la structure du dipeptide que nous avons isolé, si ce n'est des groupements acétates (formant des fragments de rapport $m/z = 59,0139$ Da (ESI-)). La formation de cet adduit peut aussi expliquer la détection par MetGEM d'analogues comme la khayanthone (**337**), qui sont plutôt des métabolites issus de végétaux : en effet, ces analogues portent tous des groupements acétates ou bien peuvent former des fragments isobares lors de l'analyse MS/MS (Figure 58).

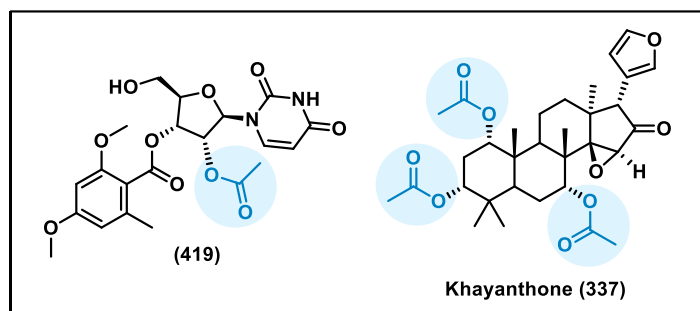


Figure 58 – Rappel des structures de la khayanthone (337) et du composé (419), appartenant au cluster B du réseau généré par le GNPS.

Quoiqu'il en soit, la simple observation du réseau moléculaire ne nous permet pas de nous prononcer sur la présence d'autres dipeptides de ce type au sein de l'extrait de *Scleroderma citrinum*.

Notons néanmoins qu'un deuxième composé (appelé composé D (338)) de structure similaire à ce dipeptide C a été isolé à partir de l'extrait de *Scleroderma citrinum*. Les analyses RMN de ce nouveau composé présentant le même jeu de corrélations que le dipeptide C, nous pouvons en conclure que ce composé D est vraisemblablement un diastéréoisomère du dipeptide fongique C déjà isolé et caractérisé. De même que pour le dipeptide C, la nature de ses centres asymétriques pourra être définie par le travail de synthèse entrepris avec la phénylalanine et l'acide 2-aminoadipique.

Synthèse des dipeptides C et D :

Les dipeptides C (336) et D (338), isolés de l'extrait de *Scleroderma citrinum*, sont constitués de deux acides aminés (la phénylalanine et l'acide 2-aminoadipique) reliés par un pont de type urée. Cette architecture structurale a déjà été synthétisée de nombreuses fois dans la littérature et suit régulièrement la même rétrosynthèse, à savoir une attaque nucléophile d'un groupement aminé sur un isocyanate. Nous avons donc décidé de reprendre cette stratégie de synthèse en l'appliquant à la phénylalanine et l'acide 2-aminoadipique (Schéma 105).

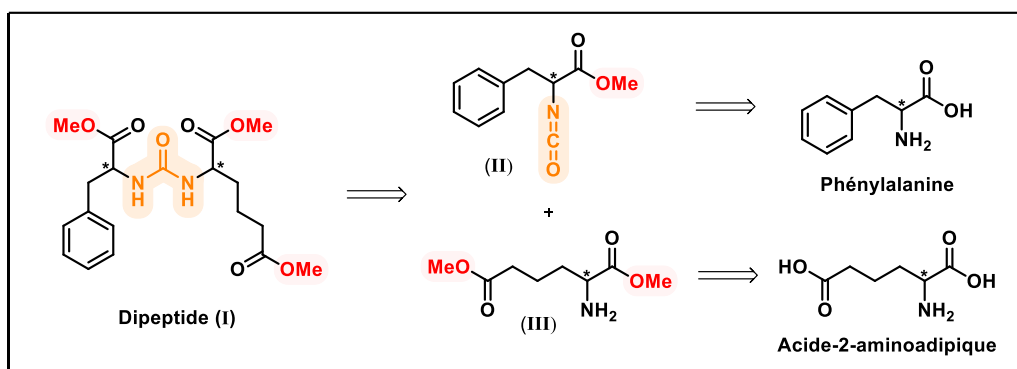


Schéma 105 – Proposition de rétrosynthèse des dipeptides C et D.

Plus précisément, dans le cas de la phénylalanine, nous avons directement utilisé l'ester de méthyle correspondant comme substrat de départ et non la phénylalanine simple, car c'est un produit commercial. Par ailleurs, nous avons travaillé à partir des 4 énantiomères purs, à savoir la (L)-phénylalanine et la (D)-phénylalanine (sous leur forme ester de méthyle), ainsi que l'acide (L)-2-aminoadipique et l'acide (D)-2-aminoadipique. Comme la séquence réactionnelle choisie permet *a priori* de conserver la configuration des centres asymétriques des dérivés d'acides aminés, nous pourrions ainsi connaître avec certitude la stéréochimie des centres asymétriques des dipeptides synthétisés.

Ainsi, nous avons débuté cette séquence réactionnelle en réalisant classiquement la double estérification de l'acide (L)-2-aminoadipique (**339**) par ajout de SOCl₂ dans le méthanol à 60°C. Cela nous a permis d'obtenir le composé (**340**) avec 80% de rendement. En parallèle de cette estérification, nous avons cherché à convertir le groupement aminé de l'ester de méthyle de la (L)-phénylalanine (**341**) en isocyanate (**342**). Pour cela, nous nous sommes basés sur les conditions développées par J. Tsai *et al.* en 2002, qui consistent à dissoudre l'ester de méthyle de la (L)-phénylalanine (**341**) dans un mélange CH₂Cl₂ : NaHCO₃ (10%) (1:1) et à le mettre en présence de triphosgène.²⁸¹ De même, ces conditions nous permettent de former l'isocyanate (**342**) avec un rendement de 55% (Schéma 106).

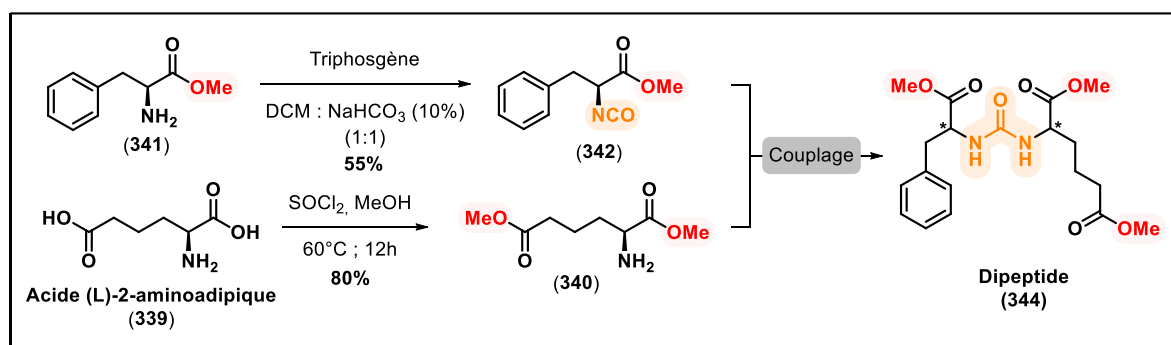


Schéma 106 – Séquence réactionnelle suivie pour la synthèse du dipeptide.

Une fois les composés (340) et (342) synthétisés en parallèle l'un de l'autre, nous avons tenté de les coupler pour former le dipeptide recherché. Dans ce but, différentes conditions expérimentales ont été testées. Les résultats obtenus au cours de ces essais sont rassemblés dans le Tableau 15.

Entrées	Substrats	Base	Solvant	Température	Durée	Résultats	Réf.
1.	(L)-Φ/(L)-α	NaHCO ₃ (10%)	CH ₂ Cl ₂ (1:1)	t.a.	12h	Homocouplage de (L)-Φ sur lui-même	/
2.	(L)-Φ/(L)-α (L)-Φ/(D)-α	NEt ₃	CH ₂ Cl ₂ (1:3)	t.a.	3 jours	Dipeptide (rdt = 10%)	/
3.	(D)-Φ/(L)-α (D)-Φ/(D)-α	NEt ₃	CH ₂ Cl ₂ (1:3)	50°C	3 jours	Dipeptides (rdt = 10%)	/
4.	(L)-Φ/(L)-α	NEt ₃ (2,0 éq.)	DMF anhydre	t.a.	3 jours	Pas de conversion	204
5.	(L)-Φ/(L)-α	K ₂ CO ₃ (2,0 éq.)	Acétone	t.a.	3 jours	Pas de conversion	/

Tableau 15 – Méthodologie pour le couplage entre le diester 2-aminoadipate de méthyle et l'isocyanate de l'ester de méthyle de la phénylalanine. (Abréviations : Φ : phénylalanine ; α : 2-aminoadipate de méthyle).

Le premier essai de couplage que nous avons réalisé a consisté à réemployer le système base/solvant que nous avons préalablement utilisé pour la formation de l'isocyanate, à savoir DCM/NaHCO₃ (10%) (1 : 1) (Tableau 15 – entrée 1.). En cas de succès, cela nous aurait permis de réaliser ces deux étapes de manière monotope. Cependant, la présence prolongée d'eau dans le milieu réactionnel a induit une hydrolyse partielle des groupements isocyanate, ce qui a conduit l'ester de méthyle de la phénylalanine (341) ainsi libéré à réagir préférentiellement avec les substrats non hydrolysés encore présents (342). Le dipeptide obtenu correspond donc à un homocouplage de l'ester de méthyle de la (L)-phénylalanine (Schéma 107).

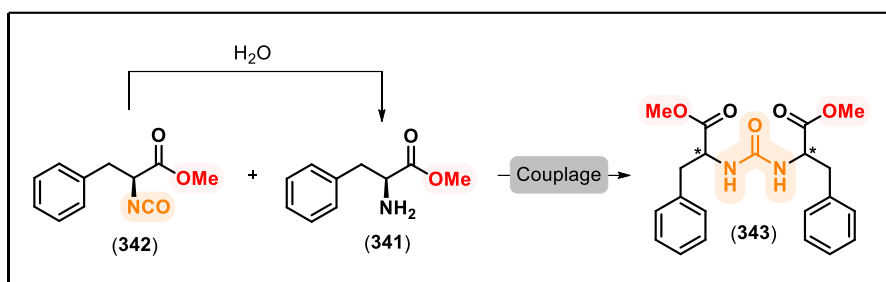


Schéma 107 – Synthèse du dipeptide correspondant à l’homocouplage de l’ester de méthyle de la (L)-phénylalanine sur lui-même en raison de l’hydrolyse du groupement isocyanate en présence d’eau.

Ce résultat permet de mettre en évidence la forte réactivité de l’ester de méthyle de la (L)-phénylalanine sur la forme isocyanate. À l’avenir, pour contre-balancer cette réactivité et ainsi éviter la formation d’homodimère de ce type, il serait judicieux de faire réagir l’ester de méthyle de la (L)-phénylalanine (**341**) avec l’isocyanate de l’acide (L)-2-aminoadipique.

Par la suite, nous avons cherché à éviter l’hydrolyse de l’isocyanate en remplaçant NaHCO₃ par une base organique : la triéthylamine. Un premier essai dans le dichlorométhane à température ambiante (Tableau 15 – entrée **2.**) a conduit à une réaction de couplage à hauteur de 10% en 3 jours. Afin d’accélérer la cinétique de la réaction, nous avons décidé de réaliser la même réaction en chauffant à 50°C (Tableau 15 – entrée **3.**), sans observer d’amélioration. Par ailleurs, en raison du manque de solubilité du diester de l’acide (L)-2-aminoadipique (**340**) dans le DCM, nous avons décidé de réaliser la réaction de couplage dans le DMF anhydre (Tableau 15 – entrée **4.**). Malheureusement, nous n’avons observé aucune conversion, ce qui est sans doute dû à un nombre d’équivalent trop faible en NEt₃. En dernier lieu, nous avons enfin testé le couple K₂CO₃/acétone comme conditions de couplage (Tableau 15 – entrée **5.**). Là encore, aucune conversion n’a été observée. Dans l’optique d’améliorer la solubilité du diester de l’acide (L)-2-aminoadipique (**340**), d’autres solvants pourront être testés à l’avenir, comme ACN, MeOH ou encore le DMSO, toujours avec un large excès de triéthylamine.

Grâce à cette étude synthétique et à la comparaison des analyses RMN ¹H des différents produits de couplage obtenus, nous pouvons conclure que le dipeptide C, isolé de *Scleroderma citrinum*, présente une configuration de type (L)-(L) ou (D)-(D). Quant au dipeptide D, il n’a pas été obtenu suffisamment pur pour pouvoir se prononcer sur sa configuration. Au cours de ces analyses, nous avons remarqué que les multiplicités de certains massifs diffèrent suivant le solvant choisi (CDCl₃ ou acétone-*d*₆). Les spectres RMN ¹H

enregistrés dans le chloroforme- d_1 permet de mieux différencier les diastéréoisomère (L)-(L)/(D)-(D) des diastéréoisomères (L)-(D)/(D)-(L). Il sera judicieux, à l'avenir, de refaire les analyses RMN des dipeptides C et D dans ce solvant. En complément, une analyse HPLC chirale et une mesure des pouvoirs rotatoires nous permettront de valider de manière sûre la configuration des dipeptides C et D, notamment entre les possibilités d'une configuration (L)-(L) ou (D)-(D). Ceci sera réalisé dans les semaines à venir.

Considérations biogénétiques et pharmacologiques :

La première remarque que nous pouvons faire sur ces dipeptides est que, contrairement à la méthyl-sclérocitrine A et B, cette structure ne peut pas être un artéfact dû aux conditions d'extraction utilisées : nous sommes donc en présence de métabolites produits effectivement par *Scleroderma citrinum*.

De plus, la présence de l'acide 2-aminoadipique dans la structure de ces métabolites peut attirer l'attention, car contrairement à la phénylalanine, l'acide 2-aminoadipique ne fait pas partie des 22 acides aminés standards universellement distribués dans le règne vivant. Il s'agit d'un intermédiaire pour la biosynthèse de la lysine (l'un des 22 acides aminés standards), et la voie de biosynthèse suivie (appelée *voie de l' α -aminoadipate*) est **unique** dans le règne vivant et est propre aux champignons dits supérieurs, comme les basidiomycètes (dont fait partie *Scleroderma citrinum*) et les ascomycètes.⁹ Il est donc logique et légitime de retrouver cet acide aminé au sein de composés isolés à partir d'un extrait de *Scleroderma citrinum* et justifie le fait que ces dipeptides sont des métabolites fongiques.¹⁸¹

En revanche, ce type de couplage peptidique (*i. e.* par le biais d'un pont urée) est particulièrement inhabituel du point de vue biogénétique. En effet, on le retrouve de manière très anecdotique au sein de quelques bactéries (*Streptomyces* spp.),²⁴ de quelques cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii*) ou encore de quelques éponges marines (*Theonella* spp.).²⁴⁴ Les rares métabolites isolés à ce jour présentant ce type d'ancrage affichent une grande similarité structurale : il s'agit, systématiquement, de peptides complexes, linéaires ou cycliques, comportant entre deux et cinq sous-unités acides aminés reliés à leur extrémité à un unique acide aminé par un pont urée. Quelques exemples de structures sont donnés sur la Figure 59.

⁹ Il est à noter qu'à titre anecdotique, on retrouve la voie de l' α -aminoadipate (et donc, par extension, l'acide 2-aminoadipique) chez certaines algues unicellulaires : les euglénoïdes.

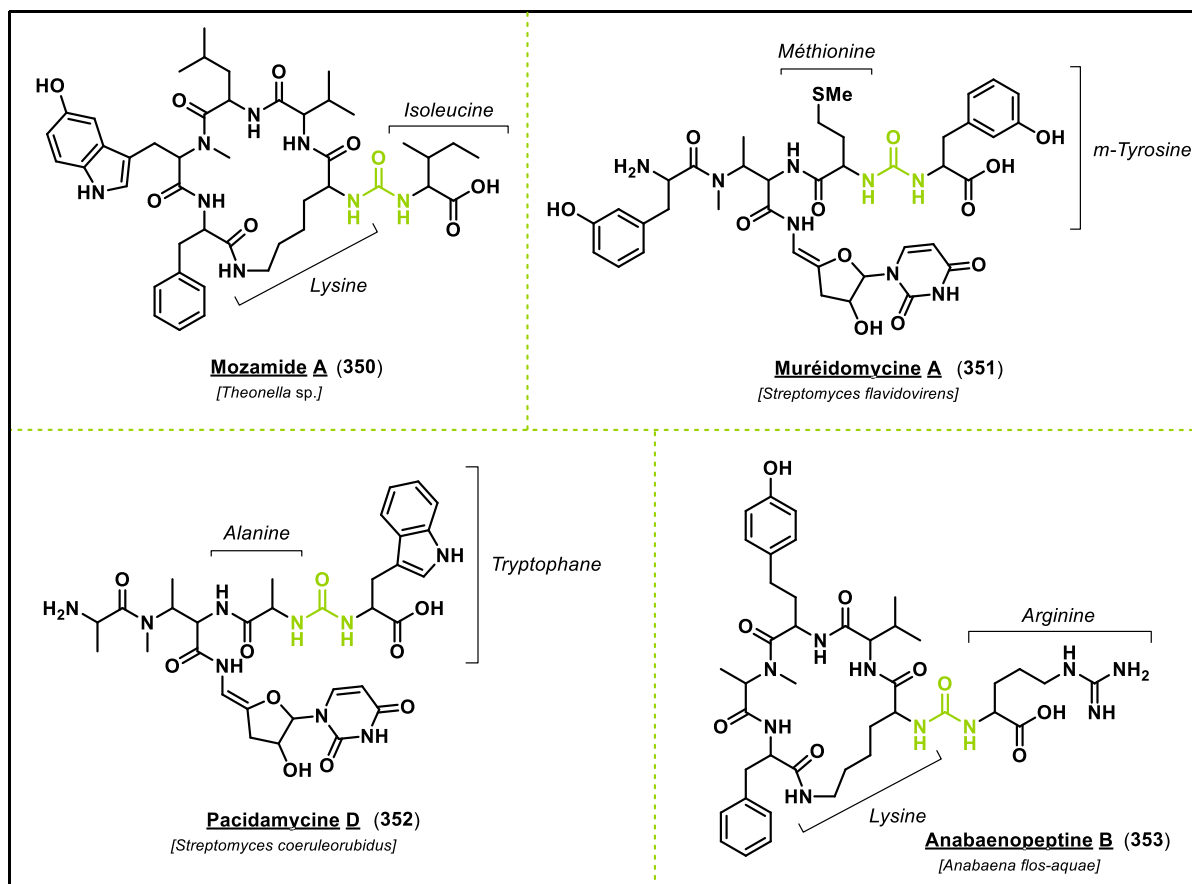


Figure 59 – Quelques exemples de peptides naturels possédant un pont urée : le mozamide A (350),²⁴⁴ la muréidomycine A (351),²⁴ la pacidamycine D (352)²⁴ et l'anabaenopeptine B (353).¹¹³ Le nom des acides aminés encadrant le motif urée (en vert) est indiqué.

Dans aucun cas, ce type de métabolite n'a été isolé d'organismes complexes, comme les champignons dits supérieurs. Par ailleurs, les dipeptides que nous avons isolés de *Scleroderma citrinum* se distinguent de cette classe de métabolites en raison de leur grande simplicité structurale : il s'agit uniquement de deux acides aminés reliés par un pont urée. Par conséquent, à l'heure actuelle, ces dipeptides semblent unique dans le règne du vivant.

En terme de valorisation, ces dipeptides pourraient trouver leur place dans la démarche actuelle de traitement peptidomimétique de certaines pathologies neurologiques ou de différents types de cancer.¹⁵⁶ En effet, depuis une vingtaine d'année, des efforts importants sont réalisés pour remplacer la liaison amide classique au sein de peptides à visée thérapeutique par un pont urée, car ce motif semble conférer une certaine rigidité à l'ancrage peptidique, donc une certaine stabilité face à la métabolisation, ce qui peut améliorer leur biodisponibilité ou diminuer leur toxicité.²²¹ Par ailleurs, certains de ces peptides thérapeutiques sont très prometteurs, car ils présentent des propriétés métallophores leur

permettant d'inhiber la résistance de certaines bactéries aux antibiotiques, comme c'est le cas de l'aspergillomarasmine A (**354**), un tripeptide biosynthétisé par la souche *Aspergillus versicolor* – Figure 60.^{67, 146, 325} Ainsi, dans un avenir proche, il serait judicieux de tester l'activité biologique et les propriétés cytotoxiques des dipeptides fongiques que nous avons isolés.

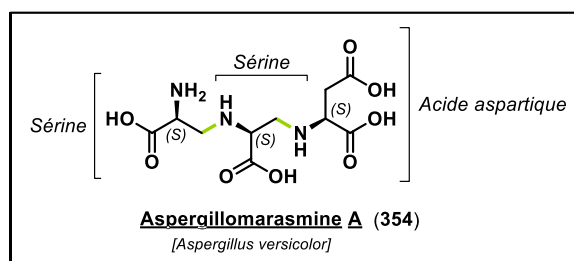


Figure 60 – Structure de l'aspergillomarasmine A (**354**) (*Aspergillus versicolor*).

2.2 Conclusions

Au cours de ce travail de thèse, une étude des métabolites produits par le champignon *Scleroderma citrinum* a pu être réalisée, notamment par l'intermédiaire de l'outil des réseaux moléculaires. Ainsi, cinq métabolites ont pu être isolés et caractérisés : la sclérocitrine (**3**), deux analogues de ce pigment (la méthyl-sclérocitrine A (**334**) et la méthyl-sclérocitrine B (**335**), que nous soupçonnons être des artéfacts d'extraction), ainsi que deux dipeptides (**336**) et (**338**), dont la particularité est de présenter un ancrage peptidique rare, sous la forme d'une urée (Figure 57). Ces dipeptides appartenant au cluster B du réseau moléculaire sur GNPS (Figure 35), il est possible que d'autres dipeptides de ce type soit produits par *Scleroderma citrinum*. Il sera donc intéressant de poursuivre ce travail de purification pour les rechercher et les caractériser, en nous focalisant principalement sur les fractions F0 à F6 qui contiennent la majorité des composés de notre extrait (cf Figure 37 – page 187). Notons, par ailleurs, qu'au cours de ce travail, la technique des réseaux moléculaires a montré sa limite dans le cas des dipeptides C et D : en effet, le cluster B, auquel ils appartiennent, était exclusivement annoté avec des analogues de type terpénoïdes, ce qui ne correspond pas du tout à leur famille chimique. Le processus de « clusterisation » a été perturbé par la formation d'un adduit acétate au cours de l'élution.

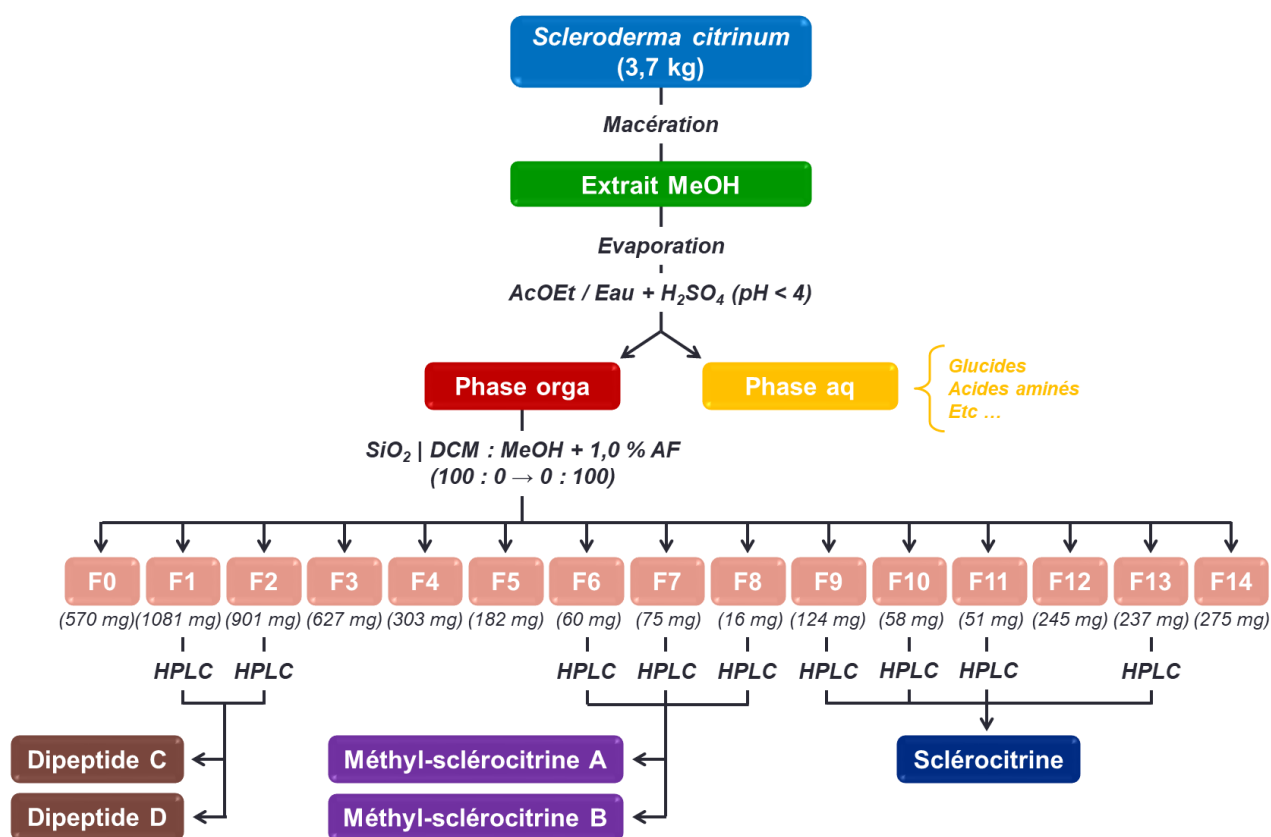


Figure 61 – Schéma récapitulatif de l'isolation de 5 métabolites de *Scleroderma citrinum*. Les purifications par HPLC ont été réalisées sur colonne Waters XBridge préparative, avec l'éluant ACN/H₂O + NH₄Ac (20 mM).

Malgré l'isolement et la caractérisation de ces cinq métabolites fongiques dont un squelette dipeptidique inhabituel (Figure 61), nous n'avons pas réussi à atteindre notre objectif d'isoler des dimères pulviniques ou des métabolites intermédiaires dans la biosynthèse de la sclérocitrine. Cela peut être dû à la complexité du brut d'extraction et aux difficultés analytiques qui en découlent : en effet, les conditions d'éluion que nous avons mises au point sont spécifiques à la sclérocitrine et à l'acide xérocomique, mais elles ne sont peut-être pas adaptées à des métabolites appartenant à une autre famille chimique. Cela peut également s'expliquer par une faible production de métabolites de la part de *Scleroderma citrinum*, ou encore d'une convergence du métabolisme vers la production exclusive de sclérocitrine. Dans tous les cas, à ce stade du projet, nous ne pouvons donc pas nous prononcer sur la cohérence des hypothèses de biosynthèse que nous avons formulées dans la section 1.3 de l'Introduction générale. Seul le travail de synthèse de ces métabolites, présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit, pourra potentiellement y répondre.

Par ailleurs, au cours de cette étude du champignon *Scleroderma citrinum*, la purification des différents métabolites ciblés a nécessité le choix de techniques analytiques adaptées. L'HPLC préparative, appliquée en première intention, s'est révélée être particulièrement efficace. Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons également souhaité utiliser la technique de la chromatographie de partage centrifuge (ou CPC), qui a déjà fait ses preuves en chimie des substances naturelles pour la purification de bruts d'extraction complexes.

3 PURIFICATION DE L'EXTRAIT DE *SCLERODERMA CITRINUM* PAR CPC

3.1 La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) : une méthode de purification des mélanges complexes

3.1.1 Définitions et développements historiques

La chromatographie est l'art de séparer les différents composants d'un mélange. Inventée par le botaniste M. Tswett en 1903, elle s'est depuis très largement diversifiée et complexifiée, dans le but de permettre une purification efficace des mélanges complexes, quelles que soient les propriétés des molécules concernées ou la nature de leur matrice. Dans les années 1940, deux chimistes anglais, A. Martin et R. Synge, ont cherché à transposer le principe de l'extraction liquide-liquide à la chromatographie en fixant une des phases liquides sur un solide : c'est ainsi que la chromatographie liquide sur gel de silice imprégnée d'eau est née, ce qui vaudra à A. Martin et R. Synge le prix Nobel de Chimie en 1952. Les développements successifs de cette approche chromatographique permettront ensuite d'aboutir à la chromatographie liquide en polarité de phase inversée, suivant la nature des greffons fonctionnalisant la silice de la phase stationnaire.

L'idée d'utiliser deux phases liquides non miscibles librement en contact est reprise par L. Craig (l'inventeur de l'évaporateur rotatif) en 1944. Il conçoit un instrument permettant de reproduire en série un grand nombre d'extractions liquides-liquides. En 1966, Yoichiro Ito implémente ce principe dans un système de tubes enroulés mis en rotation, permettant ainsi de maintenir stationnaire l'une des phases sous l'action de la force centrifuge : c'est la chromatographie à contre-courant hydrodynamique. En 1982, un nouveau mode de fonctionnement, dit hydrostatique, est proposé par Nunogaki et fait intervenir, non plus des tubes, mais des cellules : c'est la chromatographie de partage centrifuge. Ainsi, il est possible de définir la *chromatographie de partage centrifuge (ou CPC)* comme *une méthode de chromatographie liquide-liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés à purifier entre les deux phases. Une des phases liquides est maintenue stationnaire dans des cellules orientées radialement par une force centrifuge appliquée par rotation autour d'un axe unique.*

3.1.2 Principe de la chromatographie de partage centrifuge

Un appareil de CPC est constitué de plusieurs disques, dans lesquels sont gravées des cellules, qui sont autant d'ampoules à décanter en série. Ces disques sont empilés les uns sur les autres et mis en rotation autour d'un axe unique (Figure 62).

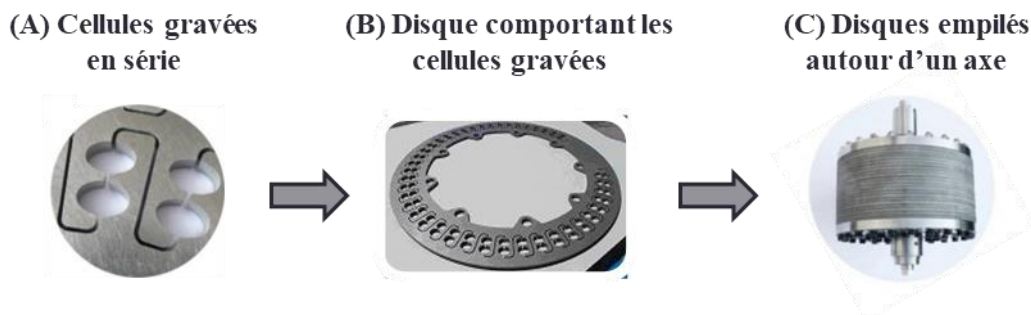


Figure 62 – Pièces constituant un chromatographe de partage centrifuge.

Dans un premier temps, la phase stationnaire liquide est pompée de façon à remplir l'appareil en rotation. Une fois le système stabilisé, la phase mobile, non miscible avec la phase stationnaire, est pompée de façon à traverser la phase stationnaire en formant des gouttelettes. Elle prend la place d'une certaine proportion de phase stationnaire, jusqu'à ce que le système atteigne une répartition équilibrée entre les volumes des deux phases. Les échanges de solutés entre les deux phases s'effectuent à l'interface des gouttelettes de phase mobile (Figure 63).

Ces échanges à l'équilibre sont décrits par le **coefficient de partage P** ou la **constante de distribution K_D** des solutés à séparer. Ce coefficient illustre le phénomène de *partage*, *i. e.* le fait qu'une substance dissoute se répartit, à l'équilibre, entre deux phases liquides non miscibles selon un rapport qui est constant et reproductible pour un système biphasique et une substance donnée. Ce coefficient dépend de la température, mais il ne dépend pas de la présence d'autres substances dans le milieu, ni de la concentration (tant que la saturation n'est pas atteinte). Il est donc possible de définir, pour une température donnée et une substance donnée A, le coefficient K_D comme étant le rapport des concentrations du composé A entre la phase mobile et la phase stationnaire : $K_D = \frac{[A_{org}]}{[A_{aq}]}$.

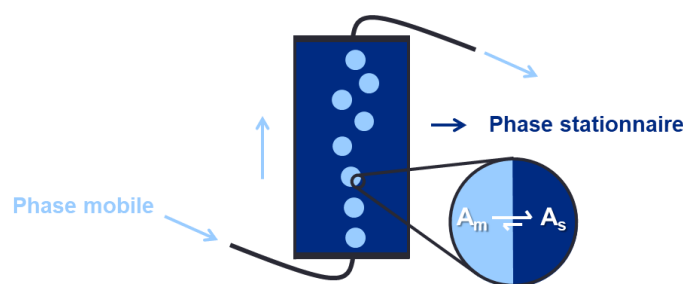


Figure 63 – Schéma illustrant les échanges entre la phase stationnaire et la phase mobile dans une cellule de CPC pour un soluté A.

3.1.3 Avantages de la chromatographie de partage centrifuge

Dans le cadre de travaux en chimie des substances naturelles, la CPC est un outil de choix pour traiter des bruts d'extraction particulièrement complexes. En effet, elle présente plusieurs caractéristiques qui la différencient de la chromatographie sur phase stationnaire solide en phase normale ou inverse (classiquement utilisée) :

- L'absence de support solide permet d'éviter les problèmes d'absorption irréversible de composés sur la phase stationnaire ;
- Le nombre de systèmes biphasiques possibles est quasiment illimité et permet de jouer finement sur la sélectivité du système ;
- Les composés non élués peuvent être récupérés par évaporation de la phase stationnaire ;
- La phase stationnaire a un coût financier et un niveau de technologie plus faible que les phases stationnaires solides ;
- La consommation de solvants est 5 à 10 fois inférieure à l'HPLC.²⁸⁸

En terme de résolution, la CPC et l'HPLC présentent des caractéristiques complémentaires. L'HPLC présente un nombre de plateaux théoriques très élevé (généralement, plusieurs milliers), donc une grande efficacité, grâce à la porosité de la silice qui permet d'avoir une très grande surface de contact entre les deux phases ; en revanche, la sélectivité est plus restreinte. À l'inverse, la CPC présente peu de plateaux théoriques (de l'ordre de 500), mais grâce au choix quasiment illimité de solvants utilisables, il est possible d'obtenir des sélectivités considérablement plus variées.²³⁷

Ainsi, au vu de ces caractéristiques, la CPC semble une technique de choix pour purifier des extraits bruts naturels. Nous l'avons donc appliquée à l'extrait de *Scleroderma citrinum*.

3.2 Application de la CPC à l'extrait de *Scleroderma citrinum*

3.2.1 Présentation de la technique du pH-zone refining

Parmi les différents modes de développement de la CPC, le *pH-zone refining* est particulièrement adapté à la série chimique étudiée au cours de ce doctorat. Le principe de ce mode de développement est d'appliquer un pH différent entre la phase mobile et la phase stationnaire, de façon à ce que les solutés à séparer changent d'état d'ionisation selon qu'ils sont dans l'une ou l'autre phase. Or, leur coefficient de partage K_D entre la phase stationnaire et la phase mobile varie suivant leur état d'ionisation. Ainsi, il sera possible d'effectuer une séparation des solutés non plus seulement en fonction de leur K_D , mais aussi en fonction de leur pK_a . Cette technique chromatographique se rapproche du raisonnement que nous avons suivi pour trouver des conditions HPLC adaptées aux métabolites de l'extrait de *Scleroderma citrinum*. Notons que les acides et bases utilisés pour tamponner les phases lors de l'élution sont appelés *reteneur* (dans la phase stationnaire) et *déplaceur* (dans la phase mobile).

Pour illustrer le principe du pH-zone refining, nous proposons de prendre un exemple concret pour détailler les étapes principales de la séparation. Pour cet exemple, nous avons choisi de prendre une phase stationnaire aqueuse et une phase mobile organique. Le reteneur, solubilisé dans la phase stationnaire aqueuse est une base, l'ammoniaque (le pK_a du couple NH_4^+/NH_3 est 9,25), tandis que le déplaceur, solubilisé dans la phase mobile organique, est l'acide trifluoroacétique (le pK_a du couple TFA/TFA⁻ vaut 0,52). Par souci de simplification, nous allons présenter les équilibres en jeu pour un seul soluté (noté A pour la forme acide et A⁻ pour la base conjuguée), solubilisé dans la phase aqueuse stationnaire en tête du système analytique. Postulons que le pK_a du couple A/A⁻ se trouve entre ces deux valeurs (cf Figure 64). Ainsi, au début de la chromatographie, les espèces en présence en tête de colonne sont NH_3 et A⁻ (solubilisés dans la phase stationnaire aqueuse), ainsi que TFA (solubilisé dans la phase mobile organique).

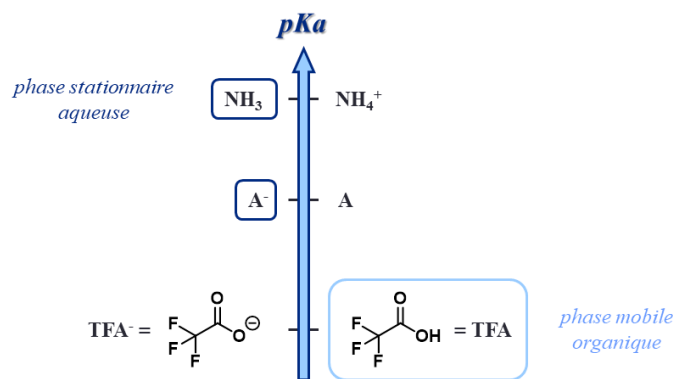


Figure 64 – Echelle de pKa des espèces impliquées.

On trouve en Figure 65 un schéma représentant une illustration de l'interface entre la phase stationnaire et une gouttelette de phase mobile pour présenter les différentes étapes de la séparation.

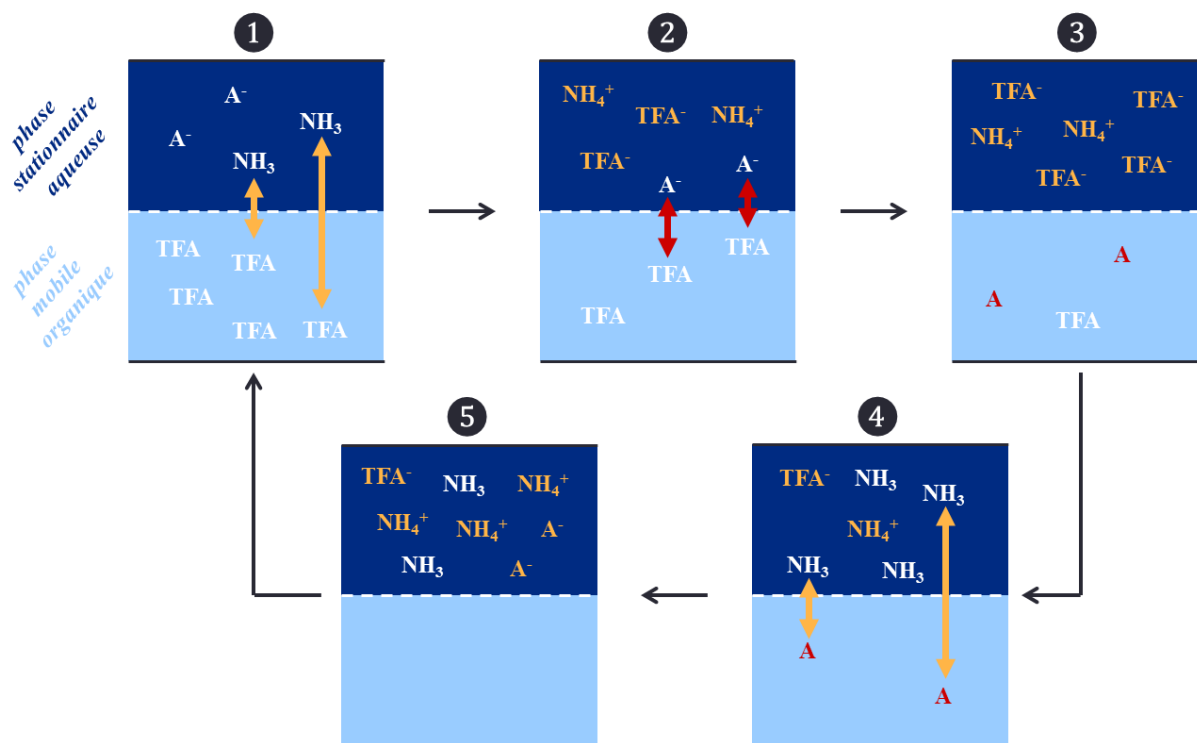


Figure 65 – Schéma de la progression d'un soluté A lors de la séparation par CPC avec une phase stationnaire aqueuse (reteneur : NH_3) et une phase mobile organique (déplaceur : TFA).

Schématiquement, on distingue 5 étapes clés :

① Lorsque la phase mobile, contenant le TFA, entre en contact avec la phase stationnaire dans le système analytique, il y a une neutralisation des espèces basiques qui s'y

trouvent par réaction acido-basique, en commençant préférentiellement par la base la plus forte. Dans notre cas, il s'agit de l'ammoniaque, car il possède un pKa plus élevé que A^- .

② Les espèces formées sont NH_4^+ et TFA^- , qui sont solubles en phase aqueuse. On observe alors un enrichissement de la phase aqueuse en sels. Or, le TFA est contenu dans la phase mobile, il est donc introduit en continu dans le système analytique. Localement, NH_3 finit par être entièrement neutralisé. Par conséquent, les équilibres acido-basiques se portent sur l'analyte A^- , qui va être protoné par le TFA nouvellement introduit.

③ Une fois protoné, l'analyte A devient soluble en phase organique mobile. Il migre donc vers la phase mobile et est entraîné plus loin dans le système analytique.

④ Au fur et à mesure de son parcours dans le système analytique, la gouttelette de phase mobile s'appauvrit en TFA et s'enrichit en analyte A, jusqu'au point où, localement, l'acide trifluoroacétique est entièrement consommé dans la gouttelette. Les équilibres acido-basiques se portent alors entre NH_3 et A : l'analyte A va être déprotoné par NH_3 .

⑤ L'analyte A est déprotoné et passe donc dans la phase aqueuse, stationnaire, ce qui stoppe sa progression. Il faudra attendre l'arrivée d'une nouvelle gouttelette de phase mobile, riche en TFA, pour reprendre le processus à l'étape ① et ainsi permettre à l'analyte A de poursuivre sa migration dans le système analytique.

Grâce à ce processus, les analytes ayant un pKa élevé (*i. e.* les acides faibles dans notre exemple) sont élués en premier et les analytes présentant un faible pKa (*i. e.* les acides forts) ensuite. Dans le cas d'extraits à purifier contenant de nombreux analytes différents, des effets de compétition interviennent entre les analytes et jouent sur les équilibres acido-basiques. À la suite de cet exemple, le couple TFA/ NH_3 comme déplaceur/reteneur a été conservé pour les expériences de CPC que nous avons réalisées dans le cadre de ce projet de thèse.

Par ailleurs, dans l'exemple que nous avons pris, nous sommes partis du postulat que l'analyte A et sa base conjuguée A^- ne présentent aucune limite de solubilité dans la phase mobile et stationnaire. Or, ce paramètre est fondamental et ne doit pas être négligé pour que les échanges entre les deux phases ne soient pas limitants. Nous avons donc réalisé une étude préliminaire pour choisir un système biphasique permettant un partage différentiel des métabolites extraits de *Scleroderma citrinum*.

3.2.2 Etude préliminaire de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum*

Pour réaliser l'étude de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum*, nous avons travaillé sur la phase organique résultante de l'extraction liquide-liquide de l'extrait méthanolique en milieu acide (cf Figure 25 – page 168). Le résidu sec a été dissous dans le minimum de méthanol possible. 2,8 mL de cette solution ont été prélevés et répartis dans 14 tubes à hémolyse (*i. e.* 200 μ L par tube à hémolyse), puis mis à sec. Par la suite, chaque tube à hémolyse s'est vu attribuer un système biphasique, selon le schéma détaillé sur la Figure 66. Sept solvants organiques ont été testés : le 2-méthyltétrahydrofurane (2mTHF), l'acétate d'éthyle (AcOEt), le toluène, le diisopropyléther (DIPE), le butanol (*n*-BuOH), l'heptane et un mélange toluène + 15% de 1-propanol. En parallèle, deux phases aqueuses ont été testées : H₂O+NH₃ (pH = 11) et H₂O+TFA (pH = 1). 1 mL de chaque solvant a été ajouté dans les tubes à hémolyse.

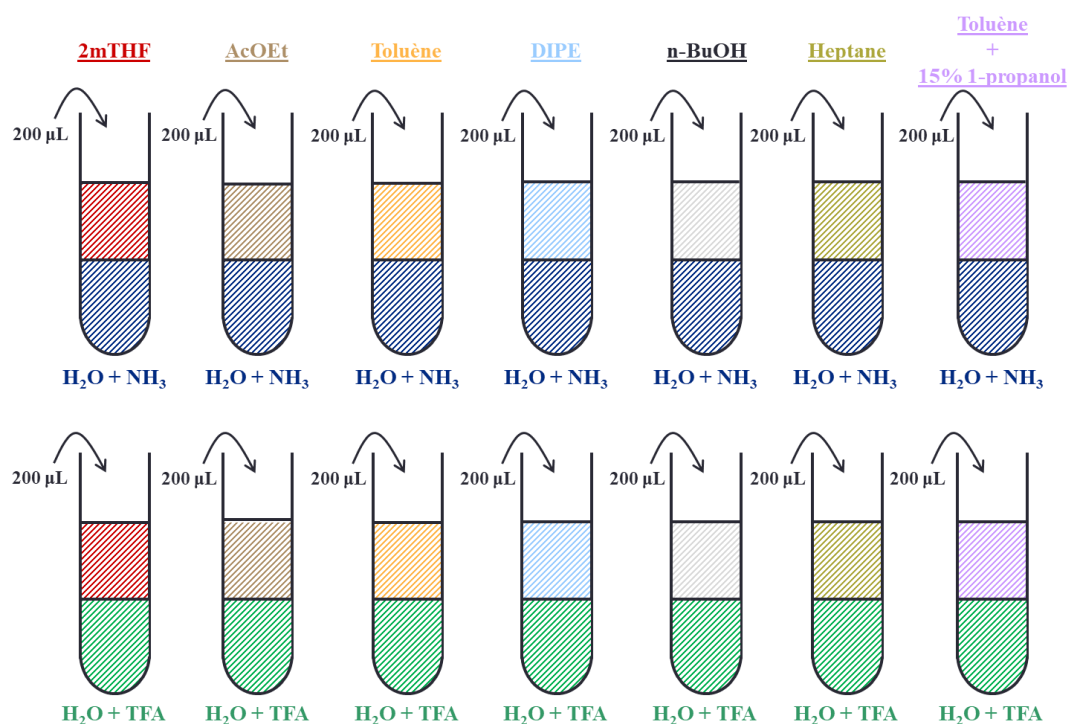


Figure 66 – Schéma des tests de partage réalisés avec 7 solvants organiques d'extraction et 2 phases aqueuses.

Chaque tube à hémolyse est ensuite agité pour solubiliser l'extrait et permettre d'atteindre l'équilibre de partage, puis laissé une nuit à décanter (Figure 67). Cette opération est répétée une fois. Ensuite, chaque phase est extraite du tube à hémolyse, séchée, puis analysée par HPLC-UV-MS.

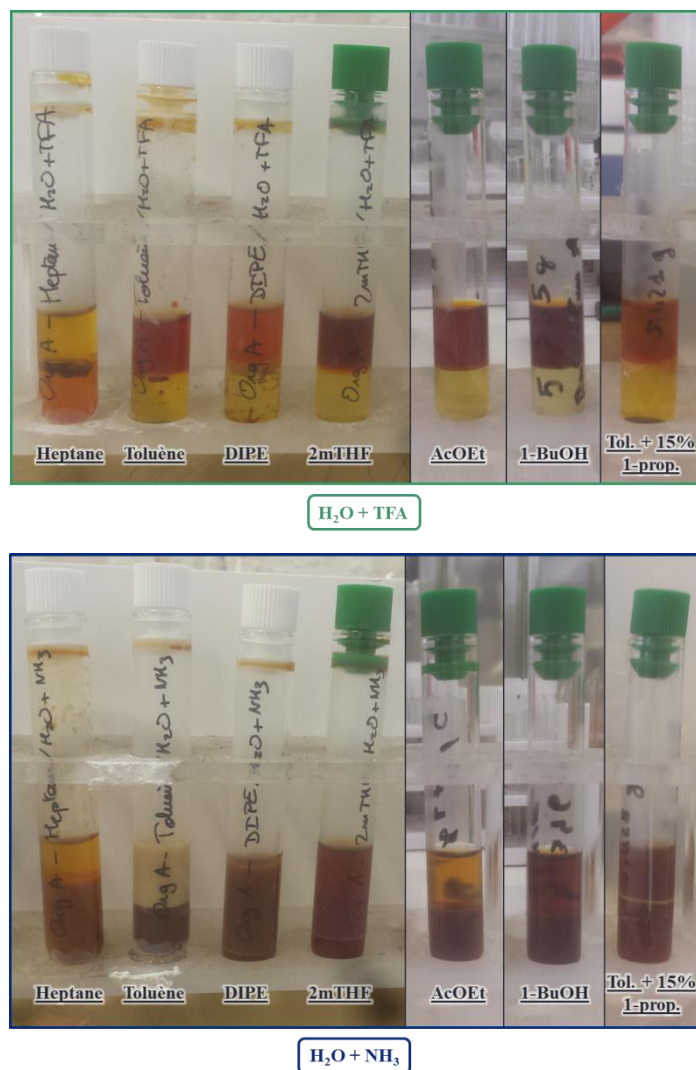


Figure 67 – Photos des tests de partage réalisés sur 7 solvants organiques et 2 phases aqueuses, après une nuit à décanter.

L'objectif de cette étude est d'observer le comportement des métabolites de l'extrait en fonction du pH. Ainsi, nous souhaitons trouver une combinaison de solvants pour lesquels, en milieu acide, la majorité de l'extrait est soluble dans la phase organique, tandis qu'en milieu basique, la majorité de l'extrait reste solubilisé dans la phase aqueuse.

Un premier tri parmi les différents solvants est réalisé en fonction de la solubilisation de l'extrait. Ainsi, dans le cas de l'heptane, du toluène, du 2mTHF et du DIPE, des résidus solides restent présents à l'interface des deux phases. On note que l'ajout de 1-propanol dans le toluène n'a pas permis d'améliorer de manière significative la solubilisation de l'extrait. De plus, l'émulsion créée par l'agitation entre le toluène et l'eau se révèle difficile à briser. Par conséquent, ces trois solvants sont abandonnés. Concernant les deux solvants restant (AcOEt

et *n*-BuOH), le contrôle visuel montre qu'en milieu basique, seul l'AcOEt permet une inversion nette de la coloration des deux phases, effet qui est moins marqué avec *n*-BuOH. Cette tendance est confirmée par l'analyse HPLC-MS des différentes phases.

Les chromatogrammes des analyses UV à 254 nm sont présentés sur la Figure 68 et la Figure 69 pour l'AcOEt et les Figure 70 et Figure 71 pour le *n*-BuOH. Les chromatogrammes 1, 2 et 3 (Figure 68) présentent le contenu de la phase organique (*i. e.* AcOEt) en fonction du pH de la phase aqueuse dans le système biphasique étudié, tandis que les chromatogrammes 4, 5 et 6 (Figure 69) présentent le contenu de la phase aqueuse. Ainsi, sur les chromatogrammes 1, 2 et 3, on peut distinguer deux groupes de composés, le groupe A (qui sort entre 7 et 11 minutes) et le groupe B (qui sort entre 23 et 33 minutes). On remarque que le groupe A est présent sur les chromatogrammes de l'extrait d'AcOEt quand la phase aqueuse est acide ou neutre, tandis qu'on le retrouve dans la phase aqueuse (groupe C) lorsqu'elle est neutre (chromatogramme 5). Ainsi, le groupe C s'enrichit quand le pH de la phase aqueuse augmente (chromatogrammes 4, 5 et 6). Par ailleurs, on remarque que le groupe B est toujours présent dans la phase organique, quelque soit le pH de la phase aqueuse (chromatogrammes 1, 2 et 3).

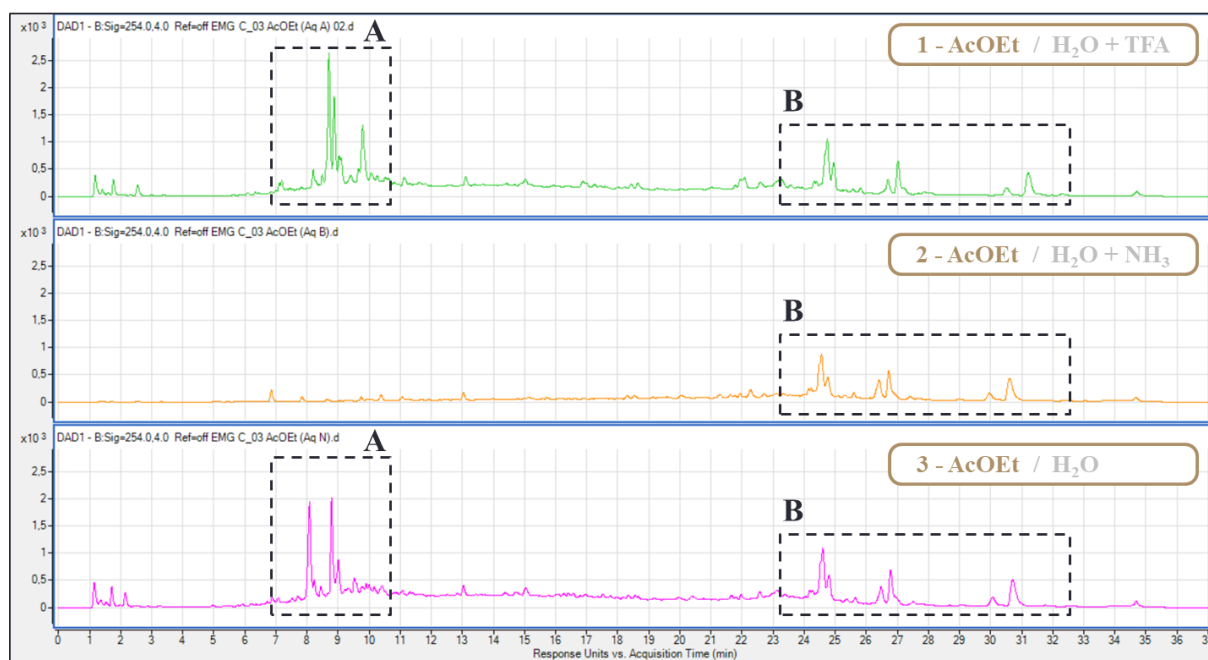


Figure 68 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase organique (*i. e.* AcOEt) des tests de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum* dans le système AcOEt/H₂O.

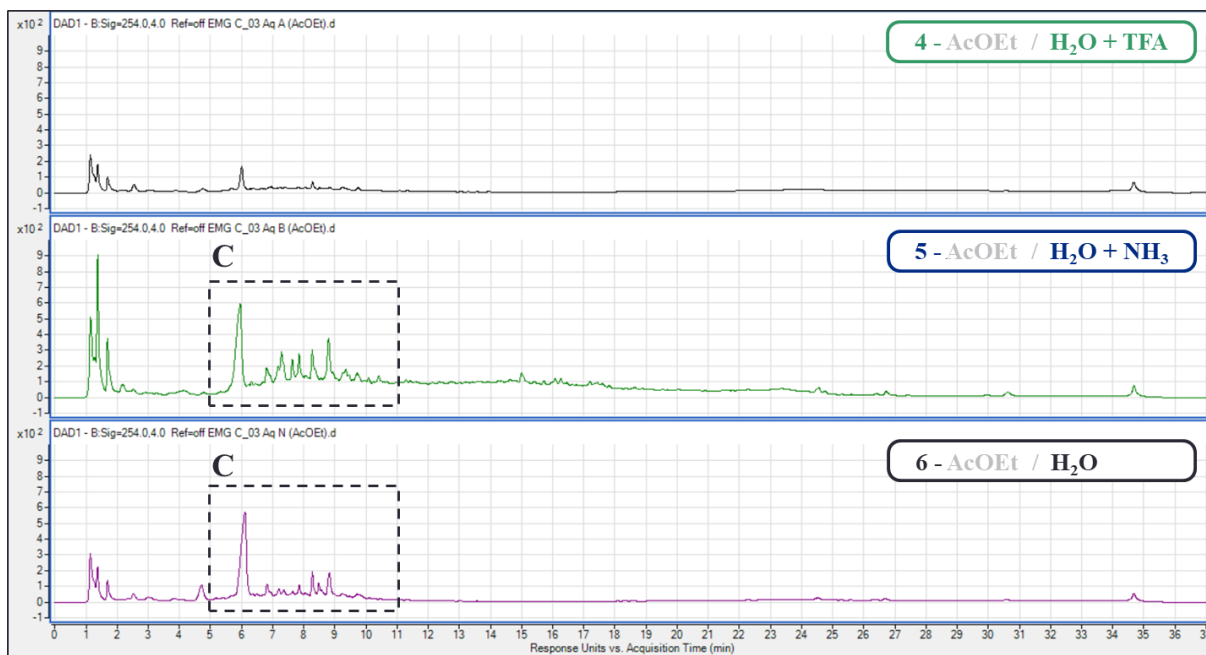


Figure 69 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase aqueuse des tests de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum* dans le système AcOEt/H₂O.

Dans le cas des tests de partage dans le butanol, les chromatogrammes 1, 2 et 3 (Figure 70) présentent le contenu de la phase organique (*i. e.* n-BuOH) en fonction du pH de la phase aqueuse dans le système biphasique étudié, tandis que les chromatogrammes 4, 5 et 6 (Figure 71) présentent le contenu de la phase aqueuse. Comme précédemment, on remarque la présence du groupe B dans la phase organique, quelque soit le pH de la phase aqueuse (chromatogrammes 1, 2 et 3). Par ailleurs, sur les chromatogrammes 1, 2 et 3, on peut distinguer un groupe D (qui sort entre 4 et 11 minutes), qui s'apparente au groupe A par sa gamme de temps de rétention et la présence de produits de rapports m/z communs et qui est présent sur les chromatogrammes du n-BuOH quand la phase aqueuse est acide ou neutre, tandis qu'on le retrouve dans la phase aqueuse (groupe C) lorsqu'elle est neutre (chromatogramme 5). Ainsi, comme précédemment, on peut noter que le groupe C s'enrichit quand le pH de la phase aqueuse augmente (chromatogrammes 4, 5 et 6).

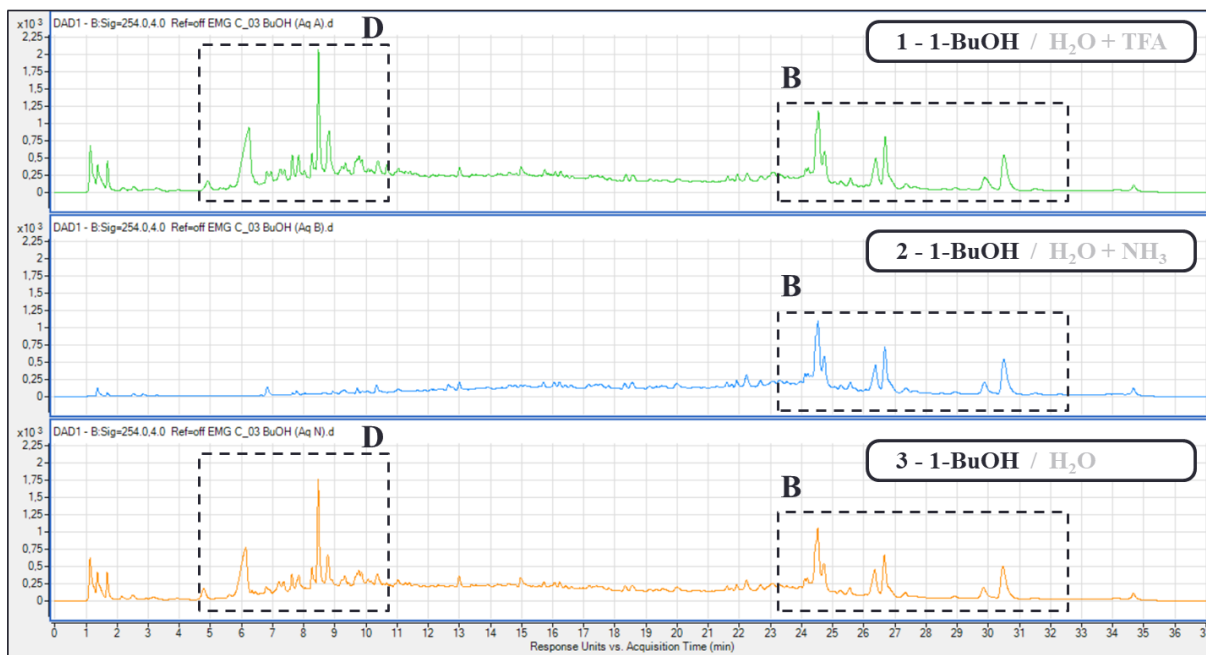


Figure 70 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase organique (*i. e.* *n*-BuOH) des tests de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum* dans le système *n*-BuOH/H₂O.

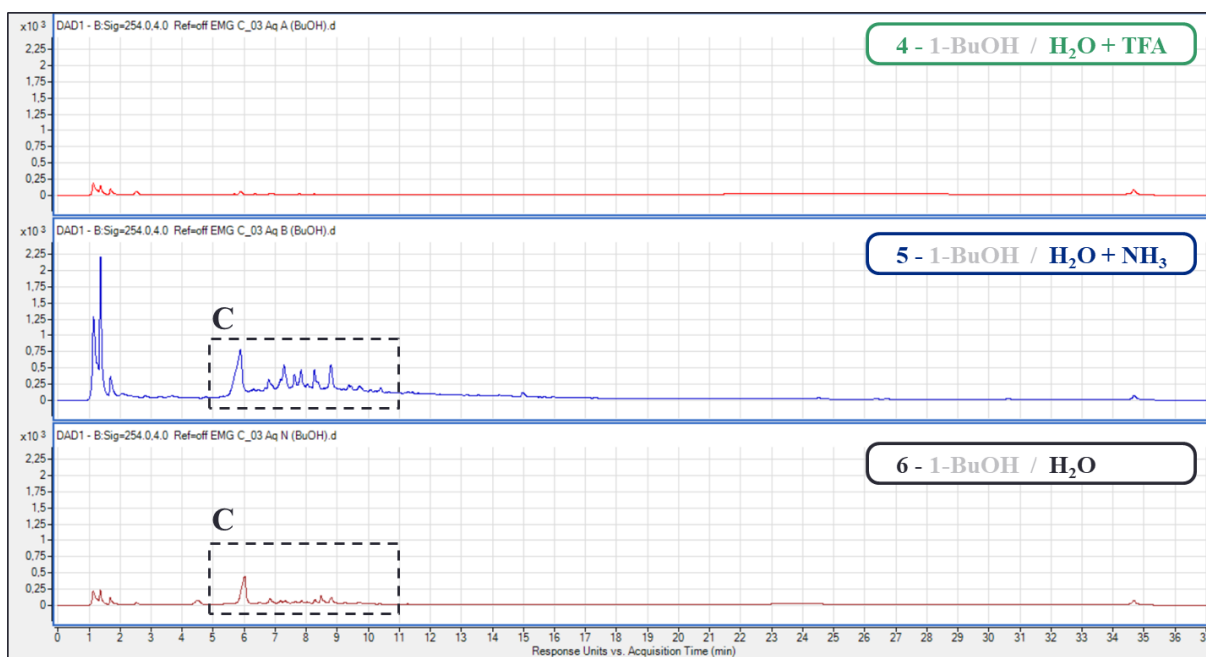


Figure 71 – Chromatogrammes UV (254 nm) de l'analyse HPLC-MS de la phase aqueuse des tests de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum* dans le système *n*-BuOH/H₂O.

Ces analyses valident partiellement notre hypothèse initiale, car les composés des groupes A et D changent effectivement de phase en fonction du pH, donc en fonction de leur état de protonation, ce qui est en accord avec une nature ionisable acide. En revanche, il

apparaît que le partage des composés du groupe B ne dépend pas du pH, puisqu'on les retrouve exclusivement dans la phase organique. Ils ne sont donc pas ionisables, ce qui n'est pas compatible avec le principe du pH-zone refining que nous voulons appliquer sur l'extrait de *Scleroderma citrinum*. Une étude plus approfondie montre que les composés du groupe B n'absorbent pas à 410 nm, la longueur d'onde d'absorption à laquelle absorbent l'acide xérocomique, la sclérocitrine et les autres analogues de cette série chimique, qui sont les composés visés (Figure 72 et Figure 73).

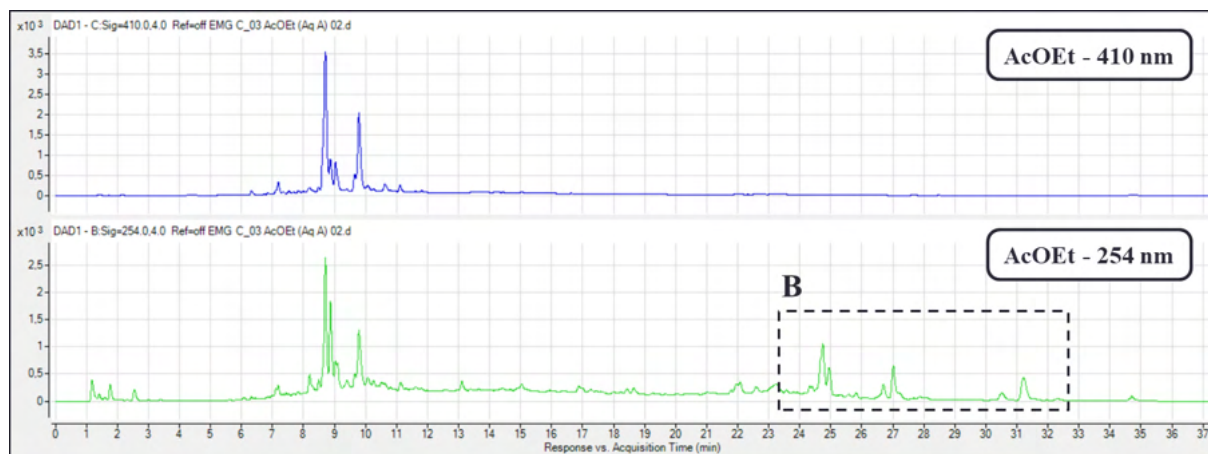


Figure 72 – Comparaison des chromatogrammes UV à 254 nm et à 410 nm de l'analyse HPLC-MS de la phase organique des tests de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum* dans le système AcOEt/H₂O + TFA.

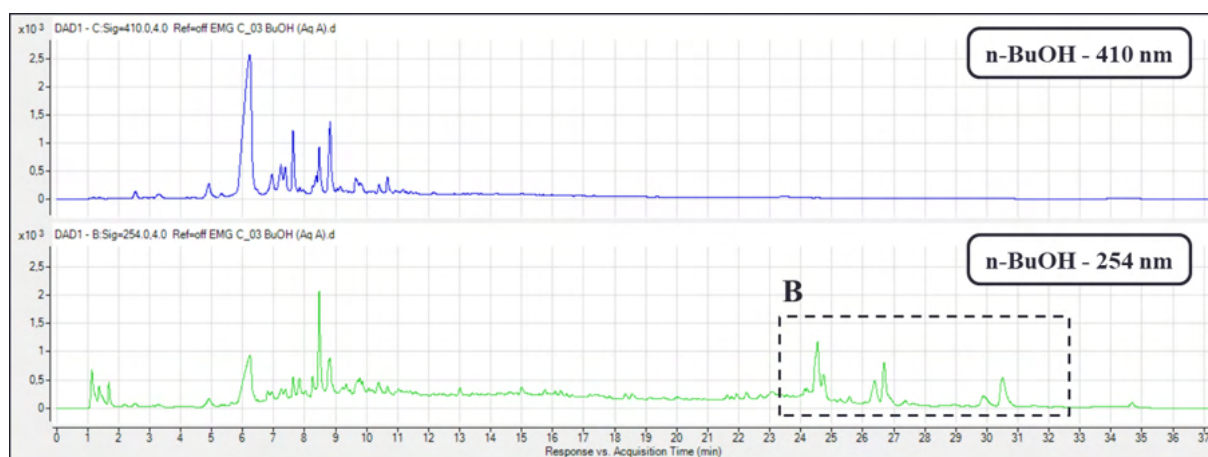


Figure 73 – Comparaison des chromatogrammes UV à 254 nm et à 410 nm de l'analyse HPLC-MS de la phase organique des tests de partage de l'extrait de *Scleroderma citrinum* dans le système *n*-BuOH/H₂O + TFA.

Il semble donc que les composés du groupe B n'appartiennent pas à la famille de composés que nous recherchons. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une deuxième extraction liquide-liquide avec une phase aqueuse basique (pH > 12), de façon à ce

que les composés du groupe B restent solubilisés dans la phase organique et que les composés des groupes A et D passent dans la phase aqueuse (Figure 74). La phase organique choisie a été l'acétate d'éthyle, afin de rester cohérent avec la première extraction, réalisée sur l'extrait méthanolique de *Scleroderma citrinum*. L'analyse RMN de la phase organique obtenue (en rose sur la Figure 74) montre des massifs uniquement dans la zone aliphatique, nous laissant supposer que les composés du groupe B sont analogues à des lipides et à des stéroïdes. Ainsi, à la fin de cette étude préliminaire, les métabolites d'intérêt à purifier se trouvent dans la phase aqueuse résultante (en bleu sur la Figure 74), sur laquelle s'est exclusivement concentré le travail de purification par CPC.

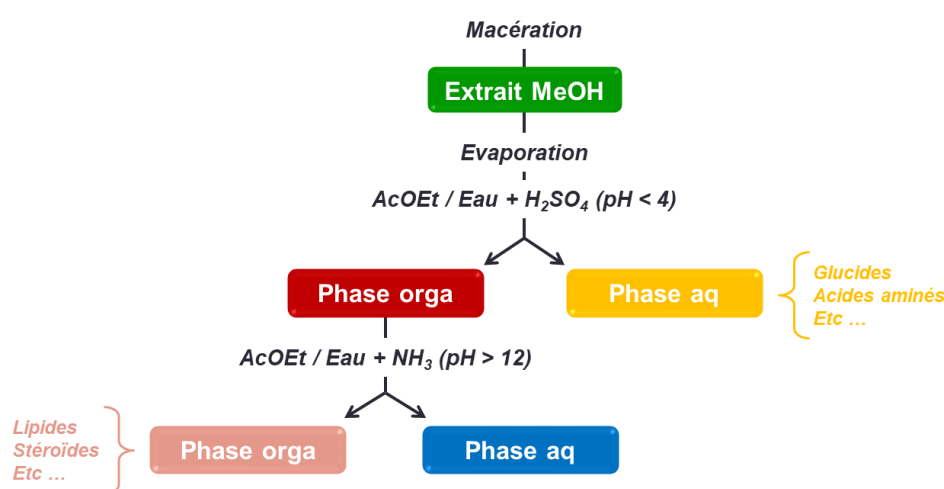


Figure 74 – Extraction retour des métabolites du champignon *Scleroderma citrinum* contenus dans la phase organique (en rouge) par une phase aqueuse basique.

Ainsi, cette étude préliminaire de partage nous a permis de valider le principe d'une purification de l'extrait de *Scleroderma citrinum* par pH-zone refining en sélectionnant deux systèmes biphasiques équivalents : AcOEt/H₂O et *n*-BuOH/H₂O. *In fine*, pour garder une certaine cohérence avec les différentes pré-purifications de l'extrait méthanolique de *Scleroderma citrinum* par extractions liquides-liquides et en raison point d'ébullition élevé du *n*-BuOH, nous avons choisi de travailler avec le système AcOEt/H₂O.

3.2.3 Résultats et discussion

Grâce aux études réalisées en amont de la purification et présentées dans les parties 3.2.1 et 3.2.2, nous avons décidé d'appliquer les paramètres suivants pour nos différents essais de purification par CPC :

- **Mode ascendant :**
 - **Reteneur** : H₂O + NH₃
 - **Déplaceur** : AcOEt + TFA
- **Débit** : 2 mL/min
- **Volume des fractions** : 10 mL/tube

Dans tous les essais réalisés, nous sommes partis de 500 mg d'extrait sec, provenant soit de la phase organique obtenue après la première extraction liquide-liquide (en rouge sur la Figure 74), soit provenant de la phase aqueuse résultant de la deuxième extraction liquide-liquide (en bleu sur la Figure 74). Les 500 mg d'extrait sec sont solubilisés dans un mélange de 1 mL d'acétate d'éthyle, 2 mL d'eau basique (pH = 9,2, par l'ammoniaque (28%)) et 140 µL d'ammoniaque (28%). L'ensemble est agité, puis centrifugé. Une partie de l'échantillon reste systématiquement sous la forme d'une émulsion stabilisée, qui est retirée. Puis l'échantillon restant, limpide, est injecté en tête de colonne. L'optimisation des paramètres de purification a principalement porté sur les concentrations en reteneur et en déplaceur. Ainsi, trois essais ont été réalisés et montrent l'influence des concentrations en reteneur et déplaceur sur la durée totale de la séparation (Tableau 16).

<u>Entrées</u>	<u>Extrait purifié</u>	<u>Reteneur</u> [NH ₃]	<u>Déplaceur</u> [TFA]	<u>Durée de la séparation</u>
1.	Phase organique – 1 ^{ère} extraction	10 mM	5 mM	2 jours
2.	Phase organique – 1 ^{ère} extraction	100 mM	5 mM, puis 20 mM après 48 h	1 semaine
3.	Phase aqueuse – 2 ^{ème} extraction	20 mM	10 mM	3 jours

Tableau 16 – Récapitulatif des concentrations en reteneur et déplaceur testées lors de la purification par CPC de la phase aqueuse résultante de la pré-purification de l'extrait de *Scleroderma citrinum*.

D'après ces essais, il apparaît que lorsqu'on applique un ratio [NH₃]/[TFA] de 2, la purification de l'extrait dure entre 2 et 3 jours (entrées **1.** et **3.** du Tableau 16), tandis qu'un ratio plus grand (entre 5 et 20) provoque un allongement disproportionné de la durée de la séparation, qui n'est pas acceptable (1 semaine – entrée **2.** du Tableau 16), d'autant plus que les volumes de solvants impliqués (**4,8 L** de solvants pour 5 jours d'expérience) sont conséquents. Le ratio [NH₃]/[TFA] = 2 semble donc le plus pertinent dans notre cas.

L'analyse des différentes fractions obtenues a été réalisée par HPLC-MS : 100 µL de chaque tube est prélevé, rassemblé par lot de 5 tubes, puis dilué dans 500 µL de méthanol et enfin, analysé par HPLC-MS. Les conditions d'élution choisies sont celles mises au point

pour l'extraction des métabolites de *Scleroderma citrinum* dans la partie 1.4 de ce chapitre (page 171), *i. e.* une colonne Waters XBridge analytique avec l'éluant H₂O + NH₄Ac (20 mM)/ACN (5% à 100% en 20 minutes).

Suivant ces conditions, l'analyse des différentes fractions obtenues lors des essais **1.** et **3.** (Tableau 16) a été effectuée. Parmi les résultats notables, l'essai **1.** nous a permis de ré-isoler la sclérocitrine (**3**) (confirmée par la RMN ¹H), à hauteur d'environ 17 mg pour 500 mg d'extrait sec : les chromatogrammes correspondants aux fractions I, J et K contenant la sclérocitrine sont présentés sur la Figure 75.

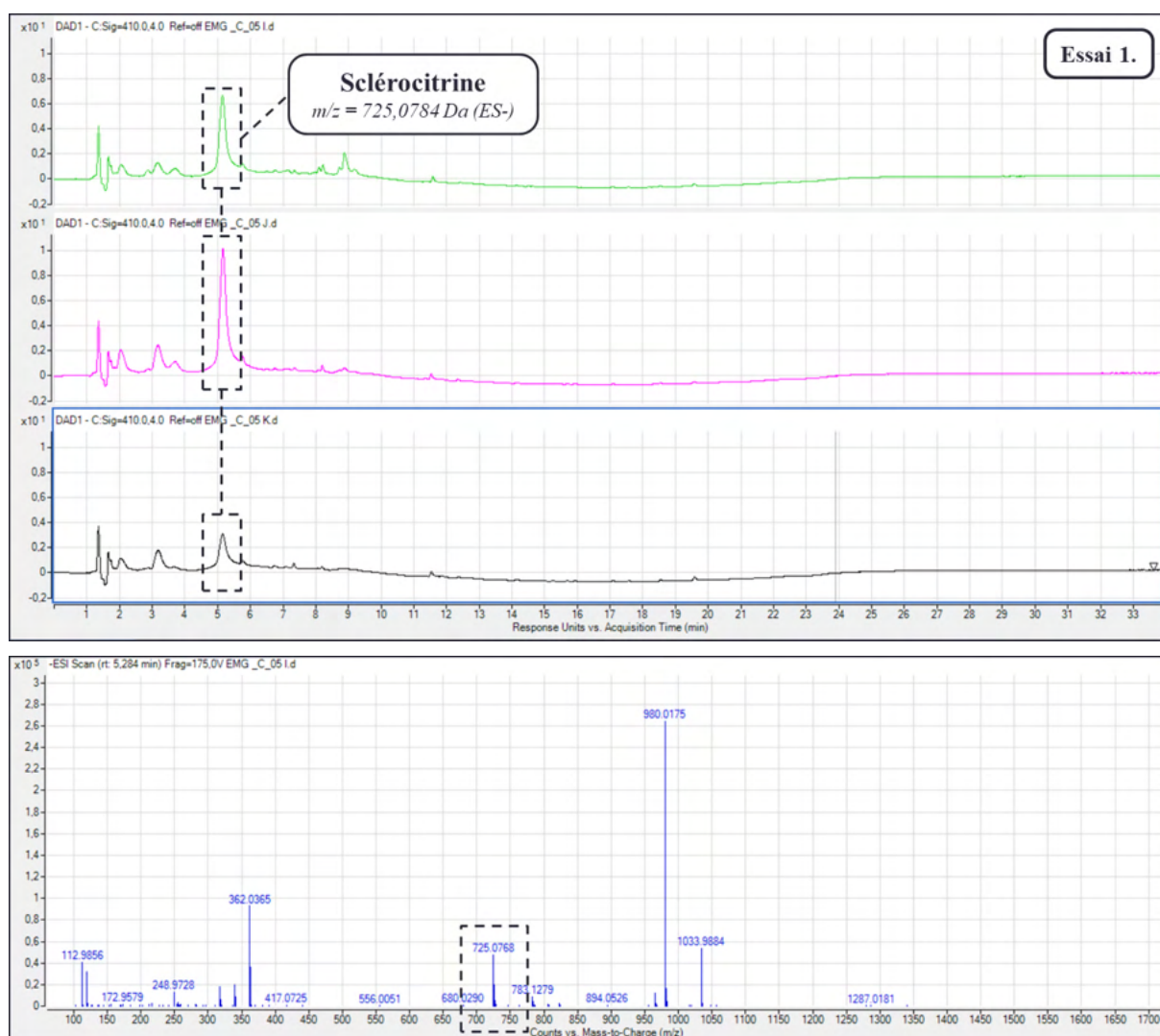


Figure 75 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV-vis (410 nm) des fractions I, J et K contenant la sclérocitrine (**3**) ($t_R = 5,28$ min) et spectre de masse correspondant au pic entouré en noir (entrée **1.** du Tableau 16).

Par ailleurs, l'essai **3.** nous a permis d'isoler un composé possédant le même rapport m/z que l'acide atromentique (*i. e.* $m/z = 339,0510$ Da en mode négatif) dans les fractions J et

K. Les chromatogrammes correspondants sont présentés sur la Figure 76. Malheureusement, ce composé a été isolé en quantité trop faible pour pouvoir être caractérisé par RMN.

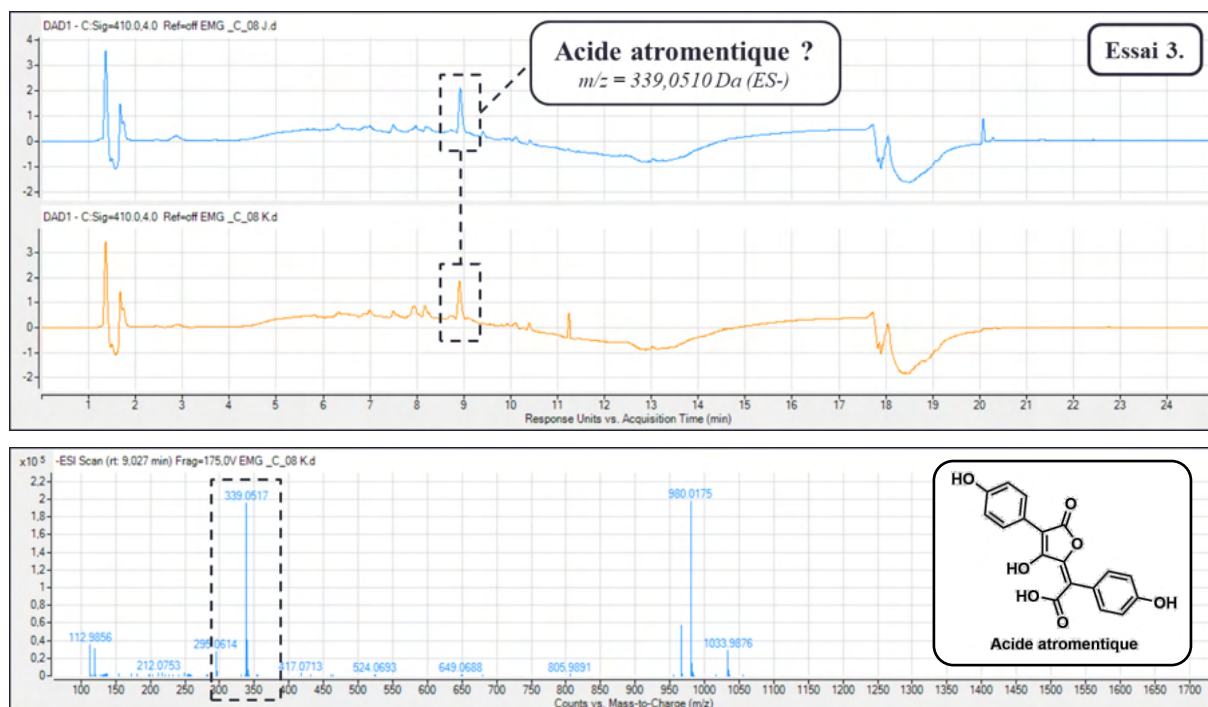


Figure 76 – Chromatogrammes TIC (ESI-) et UV (410 nm) des fractions J et K contenant un isomère de l'acide atromentique ($t_R = 9,03$ min) et spectre de masse correspondant au pic entouré en noir (entrée **3.** du Tableau 13).

La structure de l'acide atromentique est rappelée.

Suite à ces trois essais et à la faible quantité d'isomère de l'acide atromentique isolé, il aurait été judicieux de lancer d'autres essais de purification par CPC sur une plus grande quantité d'extrait. Malheureusement, nous étions limités par la faible solubilisation de l'extrait en tête de colonne. Il aurait été nécessaire de travailler avec un système plus grand, supportant de plus grandes quantités de solvants pour pouvoir purifier une plus grande quantité d'extrait de *Scleroderma citrinum*. Face à cette limite et malgré les résultats encourageants obtenus, nous avons choisi de ne pas poursuivre le développement de cette technique de purification.

3.3 Conclusions

Au cours de ce doctorat, nous avons pu réaliser une étude plus approfondie que ce qui est actuellement publié dans la littérature sur le champignon *Scleroderma citrinum*. Grâce à l'utilisation des réseaux moléculaires et la mise au point de conditions HPLC adaptées, nous avons pu isoler cinq métabolites de ce champignon : la sclérocitrine (**3**), deux analogues de ce

dimère (334) et (335) et deux dipeptides (336) et (338), dont la structure est particulièrement inhabituelle dans le règne du vivant. À l'avenir, il serait intéressant de poursuivre ce travail en recherchant, notamment, la présence d'autres dipeptides de ce type au sein de *Scleroderma citrinum*.

Par ailleurs, nous avons réalisé la preuve de concept d'une purification de l'extrait fongique par la technique de la chromatographie de partage centrifuge (CPC). Plus précisément, nous avons travaillé en mode « pH-zone refining » pour que la séparation des analytes s'effectue en fonction de leur pKa. Freinés par la faible solubilité de l'extrait, nous restons confiants dans le fait que reproduire ce travail avec un système analytique plus grand permettrait de valider pleinement l'utilisation de la CPC pour notre extrait de *Scleroderma citrinum*.

CHAPITRE 3

**ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE L'ACIDE
XÉROCOMIQUE EN MILIEU OXYDANT
PAR L'INTERMÉDIAIRE DE MOLÉCULES
MODÈLES**

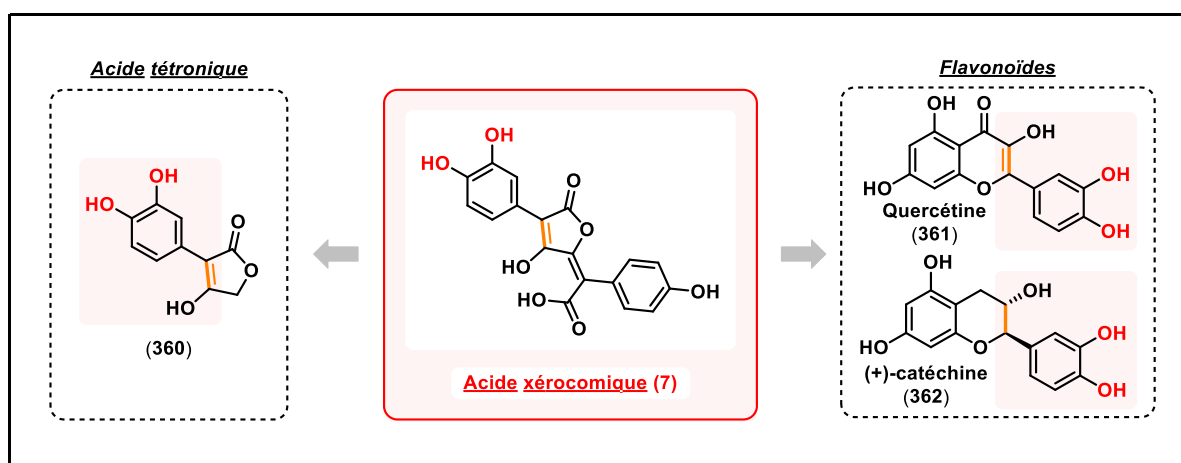
ET

**ESSAIS DE DIMÉRISATION DE L'ACIDE
XÉROCOMIQUE**

CHAPITRE 3 : ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE EN MILIEU OXYDANT PAR L'INTERMÉDIAIRE DE MOLÉCULES MODÈLES *ET* ESSAIS DE DIMÉRISATION DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE

1 UTILISATION ET DÉVELOPPEMENT DE MOLÉCULES MODÈLES DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE

Le Chapitre 1 de ce manuscrit a permis de mettre en évidence les différentes stratégies de synthèse élaborées au cours de ces trois années de doctorat pour réaliser la synthèse totale de l'acide xérocomique (7), notre objectif principal étant de confronter notre hypothèse de biosynthèse de la sclérocitrine (3) par dimérisation de l'acide xérocomique à la réalité expérimentale. Les difficultés rencontrées sur cette partie du projet de thèse nous ont incités à mener, en parallèle, des travaux exploratoires, afin d'anticiper le comportement des molécules de cette famille chimique en milieu oxydant et d'effectuer un premier tri parmi toutes les conditions opératoires possibles présentes dans la littérature. Pour ce faire, nous avons suivi deux stratégies : la première consistait à synthétiser un composé modèle simple (360), proche de l'acide xérocomique (7) ; la deuxième revenait à utiliser une série chimique différente, comportant une fonction catéchol, mais de structure complexe et abondante, comme des flavonoïdes (par exemple, la quercétine (361) et la (+)-catéchine (362), pour nous familiariser avec l'oxydation et le suivi analytique des composés phénoliques (Figure 77).



1.1 Synthèse d'un substitut proche de l'acide xérocomique et essais de dimérisation en conditions oxydantes

1.1.1 Synthèse du substitut proche de l'acide xérocomique

Comme cela a été présenté dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, la synthèse totale biomimétique de l'acide xérocomique requiert 8 étapes de synthèse pour un rendement global de 5,3%. Ce rendement étant relativement faible et le nombre d'étapes élevé, il était difficile de synthétiser l'acide xérocomique en quantité suffisante pour l'utiliser comme matière première dans la synthèse de la sclérocitrine et de la chalcitrine, d'autant plus que de nombreuses étapes de cette synthèse supportaient mal la montée en échelle et que nous avons mis deux ans à trouver des conditions optimales de déprotection des fonctions phénols. Dans l'objectif de rentabiliser les essais de dimérisation de l'acide xérocomique, nous avons décidé de développer la synthèse d'un substitut de structure proche, synthétisable en 3 étapes maximum et comportant la partie réactive de l'acide xérocomique, à savoir la fonction catéchol. Le second critère de choix du substitut à synthétiser était aussi de pouvoir se laisser la possibilité de post-fonctionnaliser le dimère obtenu en cas de succès lors d'essais de dimérisation de ce même substitut. Nous avons donc décidé de partir de la 4-méthoxy-2(5H)-furanone (**360**) (Schéma 108).

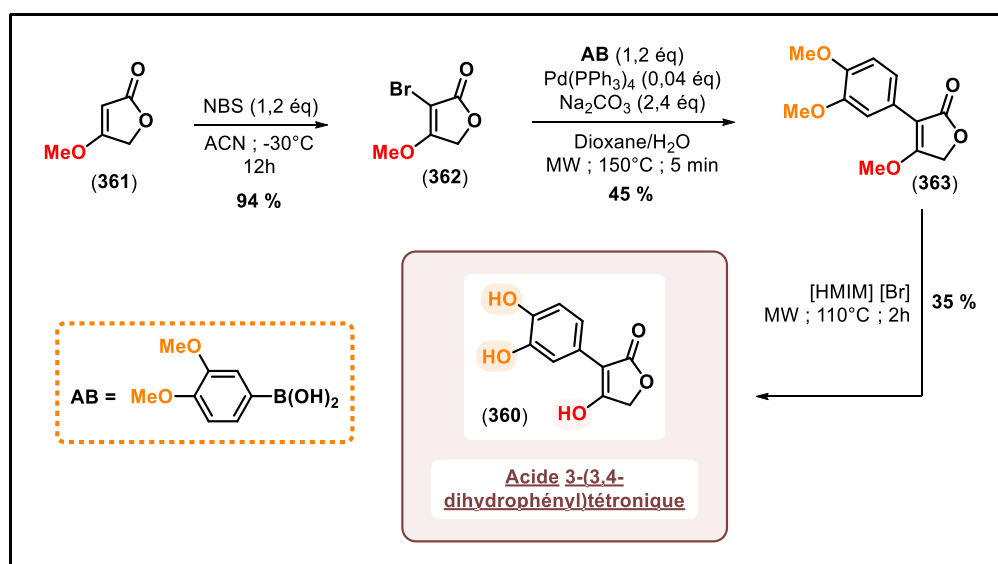


Schéma 108 – Synthèse de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**) développée au cours de ce doctorat.

Dans un premier temps, la 4-méthoxy-2(5H)-furanone (**361**) est bromée grâce au NBS en reprenant les mêmes conditions que pour la dihydroxybenzoquinone (**275**) (cf section

1.2.3.1 du Chapitre 1 – page 112). Après le traitement de la réaction, le brut réactionnel est directement engagé dans un couplage de Suzuki-Miyaura pour fonctionnaliser le cœur tétronique par l'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique selon les conditions développées par Song *et al.* en 2006.²⁵⁶ Puis, les conditions de déprotection utilisées pour obtenir l'acide xérocomique, c'est-à-dire un chauffage sous irradiation micro-ondes à 110°C pendant 2h dans le [HMIM] [Br], ont été réemployées avec succès pour former l'acide 3-(3,4-dihydrophényl)tétronique (**360**). Cette synthèse répond à nos objectifs, car elle permet d'obtenir en 3 étapes avec un rendement global de **15%** un substitut proche de l'acide xérocomique, et notamment de la partie que nous supposons impliquée dans le mécanisme de synthèse de la sclérocitrine et de la chalcitrine. Bien que le couplage de Suzuki-Miyaura et la déprotection des fonctions phénols se déroulent sous irradiation micro-ondes, ce qui limite la montée en échelle, le faible nombre d'étapes impliquées nous a permis d'obtenir rapidement une quantité satisfaisante de matière première pour essayer de le faire dimériser en conditions oxydantes.

1.1.2 Essais de dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360) en conditions oxydantes

Pour mener à bien ce travail de synthèse de dimères de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**), nous avons voulu tester le plus grand nombre d'agent oxydant possible sans nécessairement chercher à optimiser chaque protocole expérimental, notre objectif étant, pour rappel, d'effectuer un premier tri parmi toutes les conditions opératoires possibles présentes dans la littérature. Afin d'avoir rapidement une vision globale de l'évolution des différents bruts réactionnels en s'affranchissant des limites d'un suivi par CCM et de pouvoir détecter aisément les potentiels adduits issus de la dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**), toutes les expériences ont été menées à l'échelle préparative et un suivi HPLC-MS a été systématiquement réalisé. Pour cela, des prélèvements ont été réalisés à t = 0 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h et 48h. Les purifications des bruts réactionnels ont été menées par HPLC préparative. L'ensemble des conditions expérimentales testées au cours de ce travail sont compilées dans le Tableau 17.

<u>Entrées</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions</u>	<u>Produits obtenus</u>	<u>Réf.</u>
1.	(360) (1,0 éq.) Ag ₂ CO ₃ (5,0 éq.) ^s	G.-à-G. Toluène/H ₂ O Reflux – 1h	Dégradation	287
2.	(360) (1,0 éq.) K ₃ [Fe(CN) ₆] (5,0 éq.) NaHCO ₃ (5,0 éq.)	ACN/H ₂ O t.a. – 96h	Produits de haut poids moléculaire (200 – 400 Da) qui se dégradent rapidement	85
3.	(360) (1,0 éq.) CAN (2,5 éq.)	ACN/H ₂ O t.a. – 24h	Composé A (rdt < 5%)	/
4.	(360) (1,0 éq.) Ag ₂ O (2,5 éq.)	HCO ₂ H/ACN 60°C – 96h	Isomère du composé A (non isolé) Produits de haut poids moléculaire (200 – 700 Da), non isolables (rendement trop faible)	/
5.	(360) (1,0 éq.) PIFA (2,5 éq.)	ACN/H ₂ O t.a. – 24h	Dégradation	123
6.	(360) (1,0 éq.) PIDA (2,5 éq.)	ACN/H ₂ O t.a. – 24h	Dégradation	/
7.	(360) (1,0 éq.) NaIO ₄ (2,5 éq.)	ACN/H ₂ O t.a. – 24h	Produits de haut poids moléculaire (200 – 400 Da) qui se dégradent rapidement	/
8.	(360) (1,0 éq.) DDQ (2,5 éq.)	ACN/H ₂ O t.a. – 24h	Traces de produits de haut poids moléculaire (200 – 400 Da), non isolables	/

Tableau 17 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par un agent oxydant testées sur l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du substrat).

Au cours de ces différents essais, un seul produit a pu être isolé et caractérisé. Sa structure est détaillée sur la Figure 78.

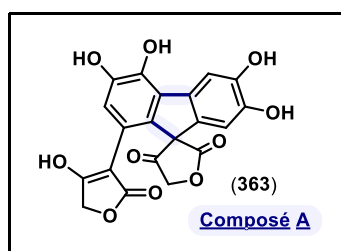


Figure 78 – Structure du produit d'oxydation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**).

Ce composé A a été isolé uniquement lors de l'essai d'oxydation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**) par le CAN (Tableau 17 – entrée 3.) et la même masse a été observée, avec le même temps de rétention, lors des analyses HPLC-MS de l'essai d'oxydation par Ag₂O (Tableau 17 – entrée 4.). Notre hypothèse est qu'il se soit formé selon

le mécanisme proposé sur le Schéma 109 : dans un premier temps, en présence du CAN, la sous-unité catéchol est oxydée en *o*-quinone. Deux additions de Michael séquentielles peuvent ainsi avoir lieu : la première entre le carbone α d'une part et l'*o*-quinone d'autre part permet de former la première liaison C-C entre les deux monomères. Puis, une deuxième addition de Michael peut intervenir entre le cétole intermédiaire et l'*o*-quinone reliée au carbone α , formant ainsi la deuxième liaison C-C entre les deux monomères. Par la suite, un processus de réaromatisation par tautomérie permet d'aboutir au composé A (**363**).

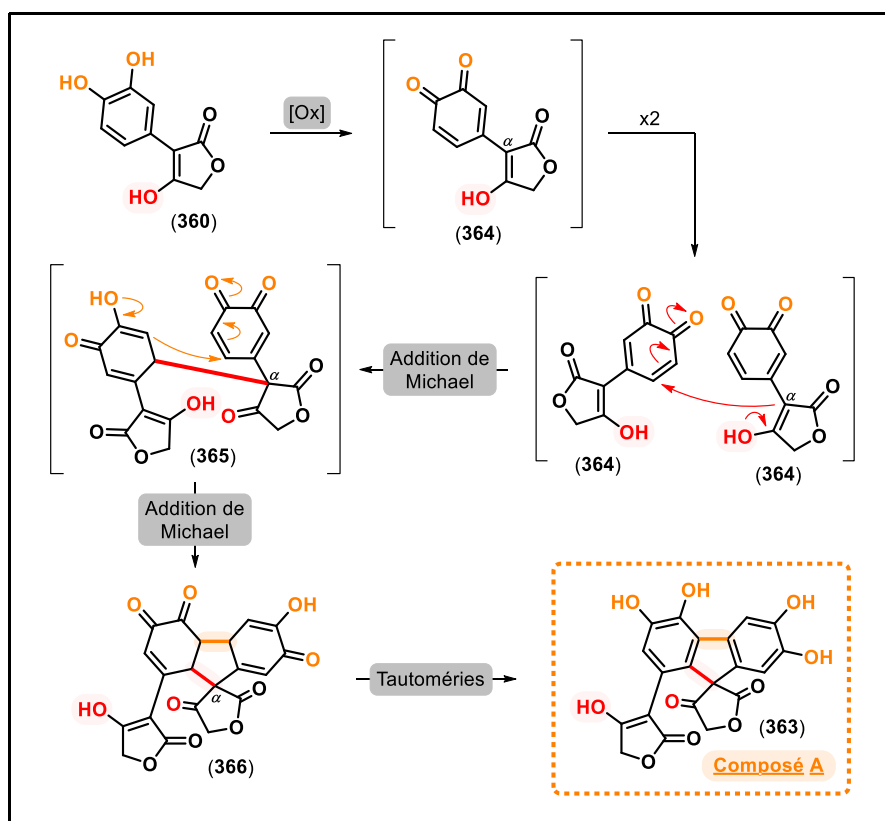


Schéma 109 – Proposition de mécanisme pour la synthèse du composé A (**363**).

Cette hypothèse mécanistique est plutôt attrayante, car elle se rapproche des hypothèses de biosynthèse de la norbadione A (**5**), la badione A (**6**), la sclérocitrine (**3**) et la chalcitrine (**4**) que nous avons postulées et présentées sur le Schéma 3 (page 42), à savoir deux additions de Michael séquentielles à partir du groupement hydroxyle de l'acide tétronique. La différence entre ces deux mécanismes postulés réside dans le fait que dans le cas de la molécule modèle, la première liaison C-C est formée par aldolisation directe (à partir du carbone α), alors que dans le cas des dimères pulviniques (badione A, norbadione A,

sclérocitrine et chalcitrine), c'est un processus vinylogue qui intervient (la liaison C-C est formée à partir du carbone γ) (Schéma 110).

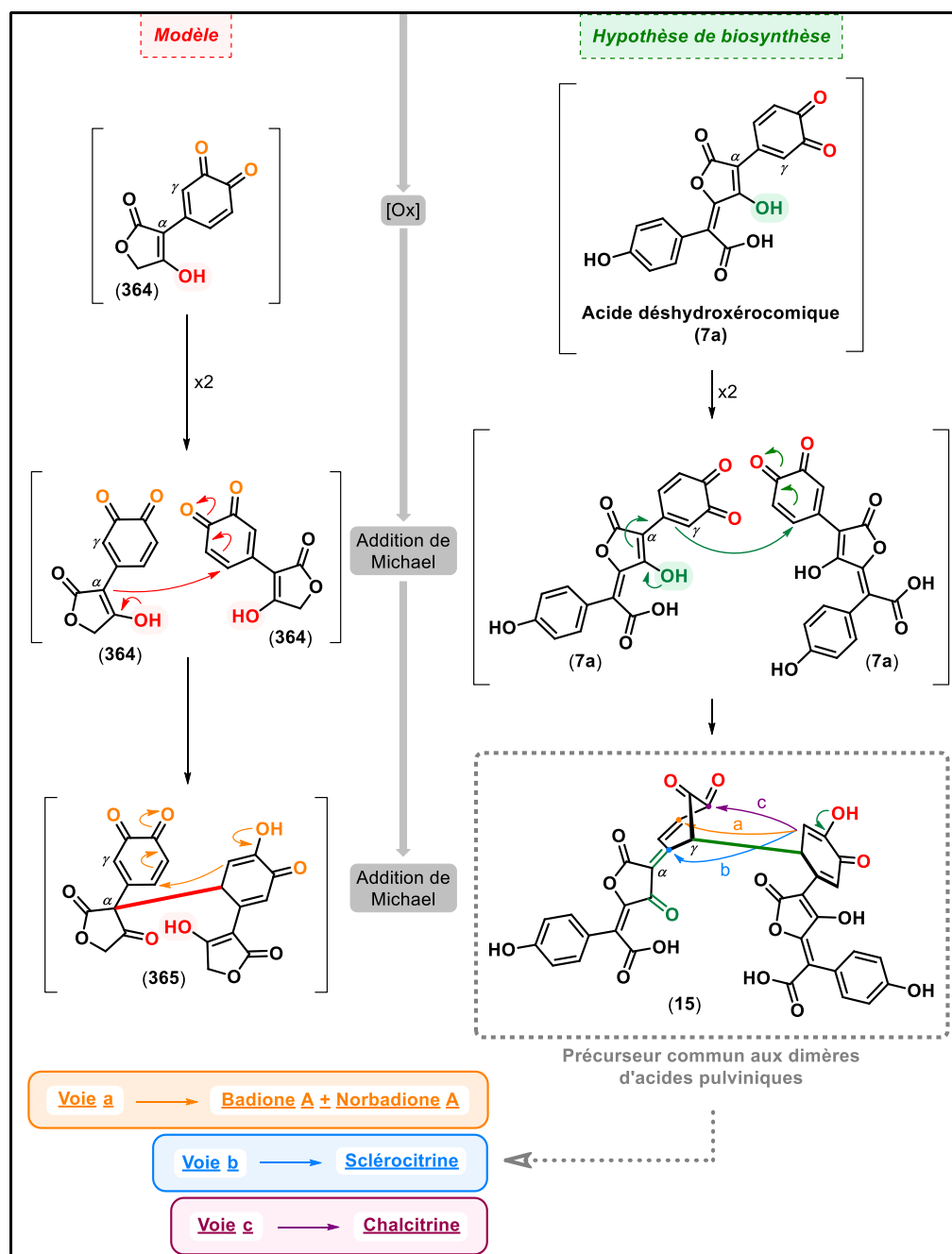


Schéma 110 – Comparaison des mécanismes de dimérisation du modèle de l'acide xérocomique (à gauche) et de la biosynthèse des dimères pulviniques (à droite).

Nous pouvons également noter que cette réactivité diffère de celle observée par W. Steglich en 1985, lors de l'étude du comportement du méthylcatéchol (9) en milieu oxydant (cf Schéma 2 – page 41). Rappelons que dans ce cas précis, le méthylcatéchol (9) était oxydé

en méthylquinone (**10**), puis une réaction de Diels-Alder se produisait entre deux méthylquinones (**10**). Une deuxième oxydation par l'*o*-chloranile, suivie d'une cyclisation permettait enfin d'aboutir au cœur central de la badione A.²⁶² Cette différence de réactivité entre ces deux molécules modèles laisse entrevoir l'importance du groupement hydroxyle sur l'acide tétronique dans le mécanisme de dimérisation. Il sera intéressant de développer ce point à l'avenir en réitérant les essais d'oxydation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**) mais en masquant le groupement hydroxyle par exemple.

Les autres essais de dimérisation du composé (**360**) que nous avons réalisés ne se sont pas révélés concluants. En effet, l'utilisation du carbonate d'argent (Tableau 17 – entrée **1.**) et de deux iodes hypervalents, PIFA (Tableau 17 – entrée **5.**) et PIDA (Tableau 17 – entrée **6.**) n'a abouti qu'à la dégradation du substrat de départ dès les 15 premières minutes de réaction. Cependant, les analyses HPLC-MS des essais d'oxydation avec le ferricyanure de potassium (Tableau 17 – entrée **2.**), NaIO₄ (Tableau 17 – entrée **7.**) et le DDQ (Tableau 17 – entrée **8.**) ont révélé la présence de produits ayant des masses intéressantes (*i. e.* comprises entre 200 et 700 Da) dans les différents bruts réactionnels. Ces composés n'ont pas pu être isolés en raison de leur faible stabilité ou leur faible rendement, mais nous sommes confiants dans le fait de pouvoir obtenir, à l'avenir, certains de ces composés en optimisant ces trois conditions d'oxydation et les conditions d'élution des analyses HPLC-MS.

In fine, l'idéal serait, grâce à ce travail de dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**), de pouvoir obtenir des modèles des cœurs centraux des différents dimères pulviniques décrits dans la littérature (*i. e.* des modèles des cœurs centraux de la sclérocitrine (**3**), de la chalcitrine (**4**), de la badione A (**6**), de la norbadione A (**5**) et la bisnorbadionone A (**5'**)). Les structures de ces dimères modèles que nous ciblons sont présentées sur la Figure 79.

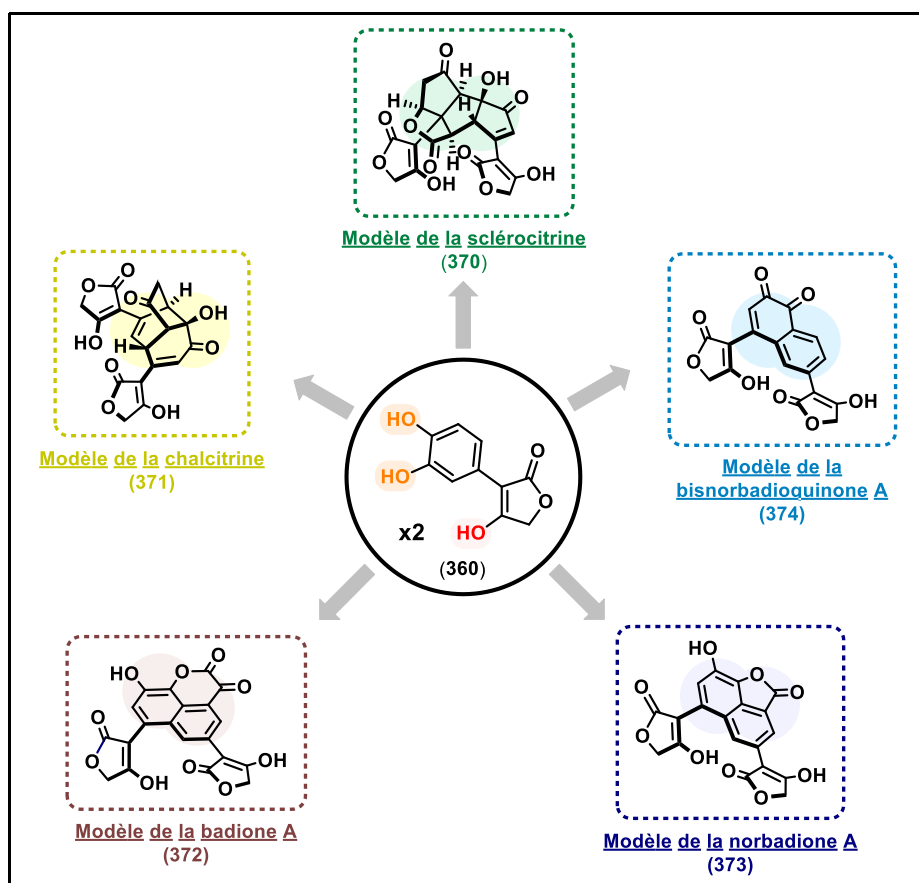


Figure 79 – Structures des cœurs centraux potentiellement synthétisables par dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**).

Par la suite, une post-fonctionnalisation de ces molécules modèles devra nécessairement être réalisée pour achever la synthèse totale de ces différents dimères pulviniques naturels ciblés.

1.1.3 Post-fonctionnalisations envisagées des dimères de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**)

Comme cela a été présenté dans l'introduction de ce chapitre (page 235), nous avons décidé d'utiliser l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**) comme molécule modèle de l'acide xérocomique (**7**) (et des acides pulviniques en général) dans le but d'anticiper le comportement des molécules de cette famille chimique en milieu oxydant et de nous aider à mieux comprendre les mécanismes en jeu. Au-delà de cet apport mécanistique et réactionnel, il est possible d'envisager une valorisation de notre modèle en post-fonctionnalisant les potentiels dimères obtenus pour aboutir aux dimères pulviniques ciblés, *i. e.* la sclérocitrine

(3) et la chalcitrine (4) qui sont les cibles synthétiques de ce travail de thèse, mais aussi la badione A (6), la norbadione A (5) et la bisnorbadioquinone A (5')).

Dans le cas des modèles des cœurs centraux des dimères pulviniques (cf Figure 79) ou du composé A (363) synthétisé par dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360) (cf Figure 78), cette post-fonctionnalisation peut intervenir au niveau des groupements $-CH_2-$ des acides tétroniques. Pour cela, nous envisageons de réemployer les protocoles développés dans la littérature pour la synthèse d'acides pulviniques à partir d'un cœur tétronique pré-formé et qui ont été présentés dans la partie 1.1.1 du chapitre 1 de ce manuscrit (page 99).

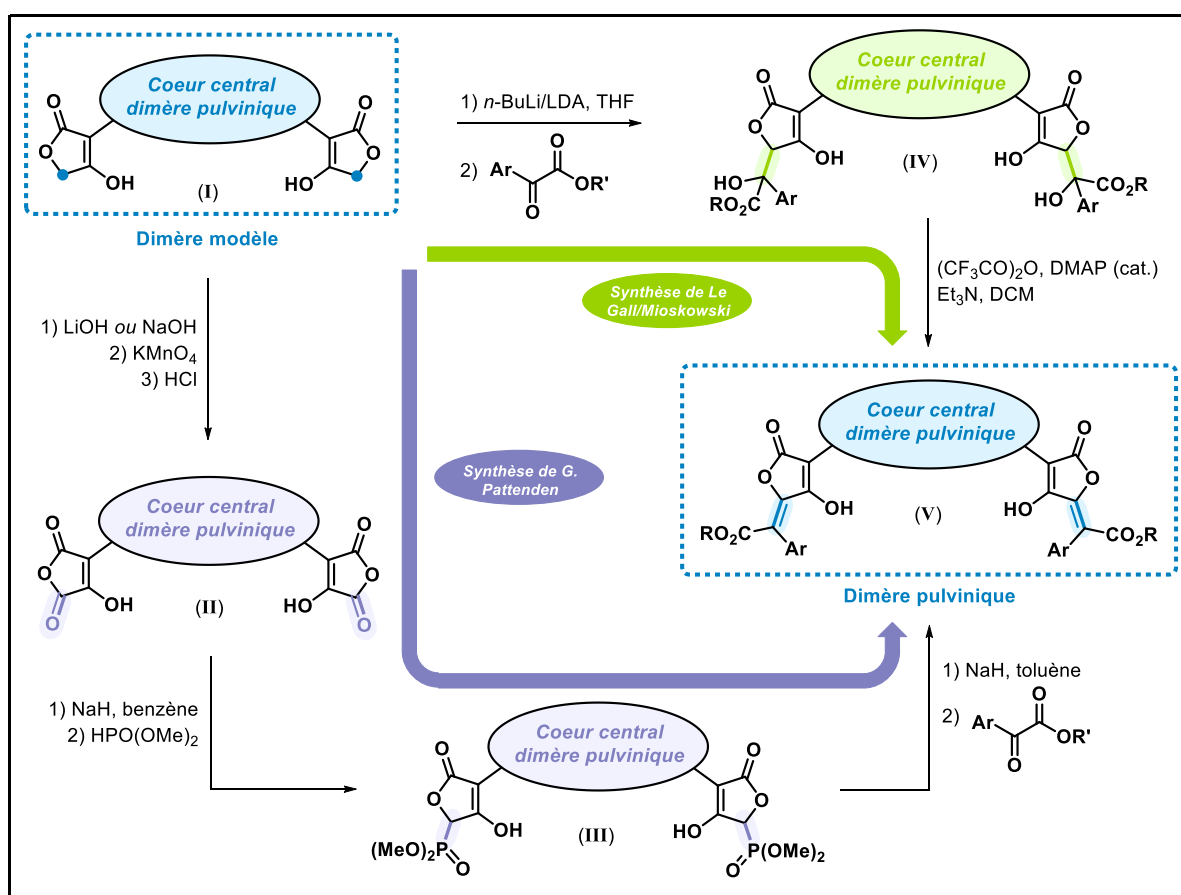


Schéma 111 – Propositions de post-fonctionnalisation des dimères de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (360), suivant la stratégie de T. Le Gall/C. Mioskowski^{27, 178} ou de G. Pattenden.²²⁵

Selon cette approche, une première voie de post-fonctionnalisation reviendrait à réaliser une cétylisation, initiée par le *n*-BuLi ou le LDA, entre l'acide tétronique déprotoné en position γ et un ester pyruvique, selon le protocole proposé par C. Mioskowski *et al.* en 2008²⁸ et 2009¹⁷⁸ dans le cadre de la synthèse des acides pulviniques et par S. A. Snyder *et al.*

en 2019 dans le cadre de la synthèse totale de la chalcitrine.³¹⁴ Une deuxième voie de post-fonctionnalisation possible consisterait à transformer les sous-unités tétroniques en anhydrides maléiques (**II**)^{108, 300} et à les faire réagir avec un diméthylphosphonate par réaction de Wittig pour former un phosphonate de buténolide (**III**). Ce phosphonate de buténolide pourra ensuite former le squelette pulvinique grâce à une réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons avec l'ester pyruvique, selon le protocole développé par G. Pattenden en 1991²²⁵ (cf Schéma 111).

Ces propositions de post-fonctionnalisation pourront être testées sur tous les dimères de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique qui seront obtenus en quantité décente, qu'ils soient précurseurs d'un dimère pulvinique naturel ou non. Ainsi, le composé A (**363**) qui a été synthétisé dans la partie 1.1.2 de ce chapitre (page 238) pourra également être sujet à ces essais de post-fonctionnalisation.

1.1.4 Conclusions

En raison des difficultés rencontrées au cours de la synthèse totale de l'acide xérocomique, nous avons été amenés à travailler sur un modèle de ce métabolite : l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**). Synthétisé en seulement 3 étapes avec un rendement global de **15%**, ce composé nous a permis de réaliser des essais de dimérisation en conditions oxydantes à grande échelle pour effectuer un tri préliminaire parmi les conditions opératoires possibles présentes dans la littérature et également pour anticiper le comportement des acides pulviniques en milieu oxydant. Ainsi, parmi les 8 conditions expérimentales testées au cours de ce doctorat, seule l'utilisation du CAN comme oxydant nous a permis de synthétiser un dimère, le composé A (**363**) (Figure 78), que nous avons pu isoler et caractériser. L'hypothèse mécanistique que nous avons émise pour expliquer la formation de ce composé A comprend une oxydation de la sous-unité catéchol en *o*-quinone, puis deux additions de Michael séquentielles à partir du groupement hydroxyle de l'acide tétronique. Cette hypothèse, cohérente avec les hypothèses de biosynthèse de dimères pulviniques qui ont été postulées au laboratoire, nous conforte dans notre stratégie de synthèse de la sclérocitrine (**3**) et de la chalcitrine (**4**) par dimérisation de l'acide xérocomique (**7**). Nous pouvons également noter que l'oxydation par Ag₂O semble prometteuse, puisqu'un isomère du composé A a été détecté par HPLC-MS, sans qu'il puisse être isolé, ni caractérisé. Enfin, au-delà de la validation de la pertinence de nos hypothèses mécanistiques, il sera possible, à l'avenir, de valoriser les

dimères de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**) obtenus par post-fonctionnalisation des sous-unités tétroniques pour réaliser une synthèse totale innovante de la sclérocitrine (**3**) et de la chalcitrine (**4**) ou bien pour anticiper la structure de dimères pulviniques naturels inconnus à l'heure actuelle. En suivant cette démarche, nous passerons alors d'une stratégie de synthèse biomimétique par dimérisation de l'acide xérocémique à une synthèse totale bioinspirée.

Il est à noter que ce travail de synthèse et de dimérisation de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**) a également été perturbé par la crise du COVID-19, car l'approvisionnement en produits chimiques et l'accès aux outils classiques d'analyse (RMN et HPLC-MS notamment) étaient particulièrement difficiles. Par conséquent, en parallèle de ce travail, nous avons décidé de travailler également sur des molécules naturelles, ne conservant que le motif catéchol, mais déjà présentes en grande quantité dans les réserves du laboratoire, à savoir la quercétine (**361**) et la (+)-catéchine (**362**).

1.2 Essais de dimérisation de la quercétine et de la (+)-catéchine en conditions oxydantes

1.2.1 Présentation des deux molécules initiales

La quercétine (**361**) et la (+)-catéchine (**362**) sont deux polyphénols appartenant à la classe des flavonoïdes. Ce sont des métabolites secondaires très largement répandus dans le règne végétal et impliqués dans de nombreux mécanismes biologiques fondamentaux, comme la fixation du diazote ou encore la pigmentation.¹¹⁴ Plus précisément, cette famille de composés participe à la protection des systèmes biologiques contre le stress oxydant. En effet, ces composés polyphénoliques (Figure 80) sont des réducteurs, dont la particularité est de réagir rapidement avec les ROS (*Reactive Oxygen Species*), c'est-à-dire les radicaux libres provenant du métabolisme de l'oxygène au sein des organismes aérobies.²⁵⁴

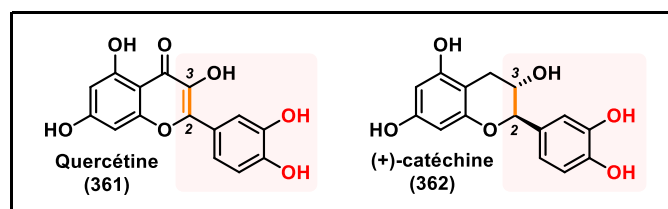


Figure 80 – Rappel des structures de la quercétine (**361**) et de la (+)-catéchine (**362**).

Ainsi, la quercétine et la (+)-catéchine étant sujettes aux oxydations, cela en fait de bons candidats pour étudier leur capacité à dimériser en conditions oxydantes.

1.2.2 Criblage de conditions oxydantes et structures des produits obtenus

Nous avons débuté cette étude par la quercétine et nous avons cherché à tester trois modes d'oxydation différents : par un agent oxydant, par électrochimie et par photochimie. Il est à noter que dans l'optique d'améliorer notre compréhension des mécanismes en jeu, nous avons essayé de réaliser une hétérodimérisation entre la quercétine et le pyrocatechol dans certaines conditions.

Toutes les expériences ont été menées à l'échelle préparative, un suivi par HPLC-MS a été systématiquement réalisé. Pour cela, des prélèvements sont réalisés à $t = 0$ min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h. Les purifications ont été réalisées par HPLC préparative. L'ensemble des conditions expérimentales testées au cours de ce travail sont compilées dans le Tableau 18 (pour les essais d'oxydation par électrochimie), le Tableau 19 (pour les essais d'oxydation par un agent oxydant) et le Tableau 20 (pour l'essai d'oxydation par photochimie).

<u>Entrées</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions</u>	<u>Produits obtenus</u>	<u>Réf.</u>
1.	NBu ₄ BF ₄ (0,1 M)	ACN/H ₂ O/MeOH 8,9 mA – t.a. – 1h Pt(+)/C(-)	Traces de composés de masses dimériques en HPLC-MS	71
2.	Tampon pH = 1,78 (H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄)	ACN/H ₂ O/MeOH ^f 8,9 mA – t.a. – 1h Pt(+)/C(-)	Dégradation	322
3.	Tampon pH = 1,78 (H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄) NaCl (0,1 M)	ACN/H ₂ O/MeOH ^f 8,9 mA – t.a. – 1h Pt(+)/C(-)	Composé A (rdt < 5%)	322
4.	Tampon pH = 9,64 (NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃)	ACN/H ₂ O/MeOH ^f 8,9 mA – t.a. – 1h Pt(+)/C(-)	Dégradation	322
5.	Tampon pH = 9,64 (NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃) NaCl (0,1 M)	ACN/H ₂ O/MeOH ^f 8,9 mA – t.a. – 1h Pt(+)/C(-)	Dégradation	322

Tableau 18 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par électrochimie testées sur la quercétine (361).

^f En remplaçant l'acétonitrile par l'acétone, seule la dégradation de la quercétine a été observée.

<u>Entrées</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions</u>	<u>Produits obtenus</u>	<u>Réf.</u>
1.	Quercétine (1,0 éq.) K ₃ [Fe(CN) ₆] (6,0 éq.) NaHCO ₃ (6,0 éq.)	G.-à-G. ACN/H ₂ O t.a. – 3h	Traces de composés de masses dimériques en HPLC-MS	85
2.	Quercétine (1,0 éq.) <i>o</i> -chloranil (2 éq.)	DMSO 80°C – 1 semaine	Dégradation	/
3.	Quercétine (1,0 éq.) Ag ₂ CO ₃ (5,0 éq.) ^s	Toluène/Acétone Obscurité Reflux – 30 min	Composé B (rdt < 5%) Masse d'un trimère en LC	287
4.	Quercétine (1,0 éq.) PIFA (1,0 éq.)	THF distillé t.a. – 48h	Composé B (rdt < 5%) Traces de composés de masses dimériques et trimériques en HPLC-MS	123
5.	Quercétine (1,0 éq.) PIFA (1,0 éq.) DIPEA (1,0 éq.)	THF distillé t.a. – 48h	Composé B (rdt < 5%)	123
6.	Quercétine (1,0 éq.) PIFA (5,0 éq.)	THF distillé t.a. – 48h	Dégradation	123
7.	Quercétine (1,0 éq.) Pyrocatechol (1,0 éq.) K ₃ [Fe(CN) ₆] (6,0 éq.) NaHCO ₃ (6,0 éq.)	G.-à-G. ACN/H ₂ O t.a. – 3h	Composé C (rdt < 5%)	85

Tableau 19 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par un agent oxydant testées sur la quercétine (**361**) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du pyrocatechol).

<u>Entrée</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions</u>	<u>Produits obtenus</u>	<u>Réf.</u>
1.	Quercétine (1,0 éq.) Pyrocatechol (1,0 éq.) MesAcr ⁺ ClO ₄ ⁻ (0,02 éq.) 4,4'-di- <i>t</i> -butylbiphényle (0,25 éq.) O ₂	G.-à-G. MeOH/ACN LEDs bleues t.a. – 24h	Composé B (rdt < 5%) Composé C (rdt < 5%)	211

Tableau 20 – Récapitulatif des conditions d'oxydation par photochimie testées sur la quercétine (**361**) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du pyrocatechol).

Les structures des produits obtenus au cours de ces différents essais d'oxydation sont détaillées sur la Figure 81.

^s Le carbonate d'argent est préparé extemporanément : $2\text{AgNO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{Ag}_2\text{CO}_3 + 2\text{NaNO}_3$.

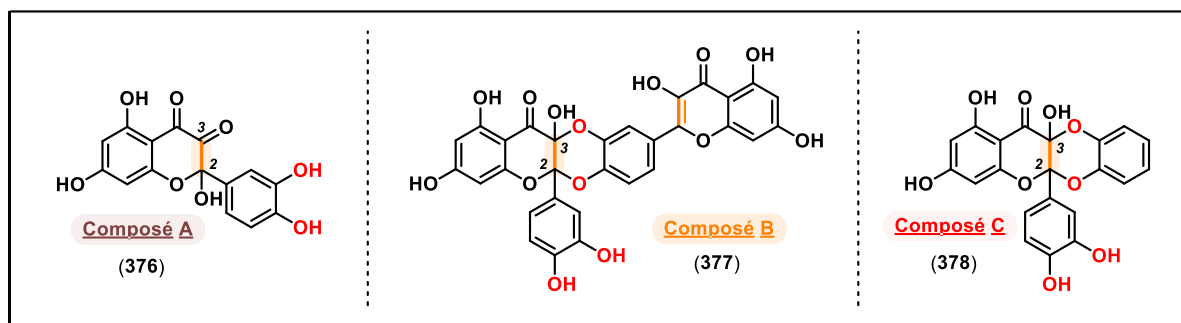


Figure 81 – Structures des produits d'oxydation de la quercétine (361) obtenus.

Le composé A (376) correspond à l'addition 1,4 formelle d'une molécule d'eau en position 2, suivie d'une oxydation en position 3. Ce composé a été observé uniquement lors des essais d'oxydation par électrochimie en milieu acide (Tableau 18, entrée 3.). Avec les données dont nous disposons, nous ne pouvons pas proposer d'hypothèse mécanistique. Toutefois, il est pertinent d'envisager qu'un mécanisme de nature radicalaire se soit produit. Les composés B (377) et C (378) correspondent, quant à eux, à des produits d'*oxa*-Diels-Alder, selon le mécanisme détaillé sur le Schéma 112.

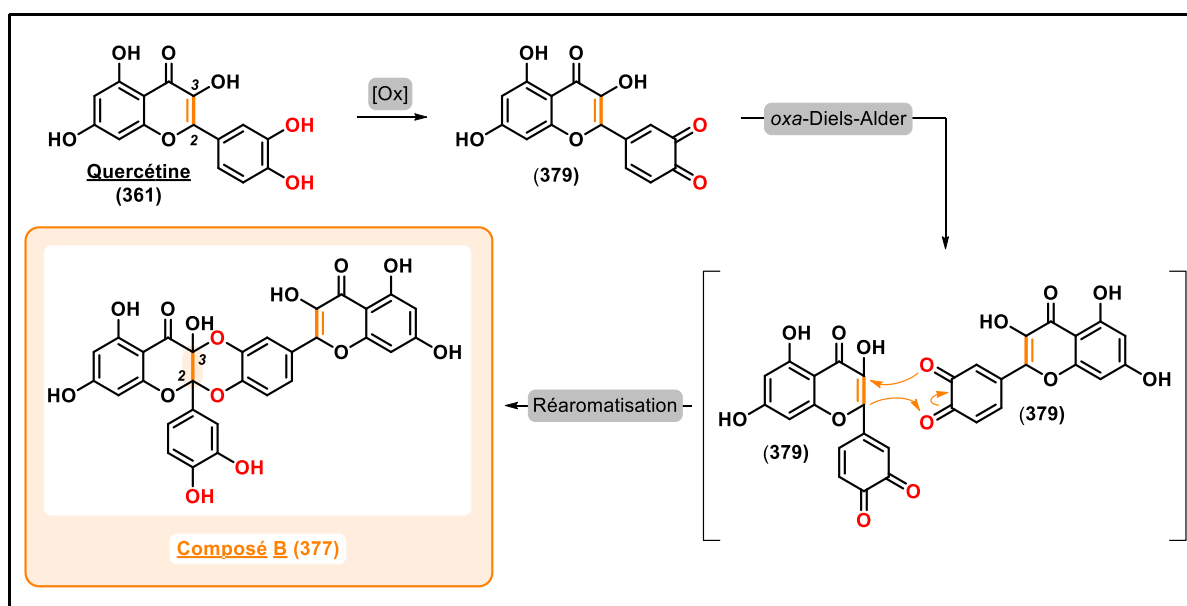


Schéma 112 – Mécanisme de la réaction d'*oxa*-Diels-Alder ayant abouti à la formation du composé B (377).

Le produit B (377), issu de l'assemblage de la quercétine (361) sur elle-même, a été obtenu lorsque Ag_2CO_3 ou le PIFA ont été utilisés comme oxydants (Tableau 19, entrées 3., 4. et 5.). Lorsque le ferricyanure de potassium a été employé comme oxydant, le composé B n'a pas pu être isolé (Tableau 19, entrée 1.) ; en revanche, le produit de réaction croisée entre

la quercétine et le pyrocatéchol (*i. e.* le composé C (**378**)) a pu, lui, être isolé (Tableau 19, entrée 7.). De manière intéressante, lorsque la réaction croisée entre la quercétine et le pyrocatéchol a été réalisée par photochimie (Tableau 20), les deux composés B (**377**) et C (**378**) ont pu être isolés tous les deux.

Dans le cadre des essais sur la (+)-catéchine (**362**), nous avons uniquement mené des oxydations par un agent oxydant. Deux structures ont pu être isolées, le composé D (**380**) et le composé E (**381**) (Figure 82). Il est à noter que ce composé E a déjà été isolé et caractérisé dans la littérature, il s'agit de la *déhydrodicatéchine A*, un métabolite que l'on retrouve chez de nombreux végétaux, comme le chêne vert (*Quercus ilex L.*)¹³⁸ et le rosier des Cherokees (*Rosa laevigata*)³⁰⁹ ou encore dans certains fruits comme la pomme verte.³⁰⁶ Par ailleurs, notons que ce métabolite a déjà fait l'objet de travaux de synthèse totale, que ce soit par voie enzymatique (par le biais de peroxydases, laccases, tyrosinases^{173, 174, 296-298} ou polyphénoloxydases^{112, 173}) ou par voie chimique (initiée par AIBN ou AMVN,¹¹⁷ DPPH,⁶⁹ K₃[Fe(CN)₆]³¹⁹) ou encore par photochimie¹²⁴.

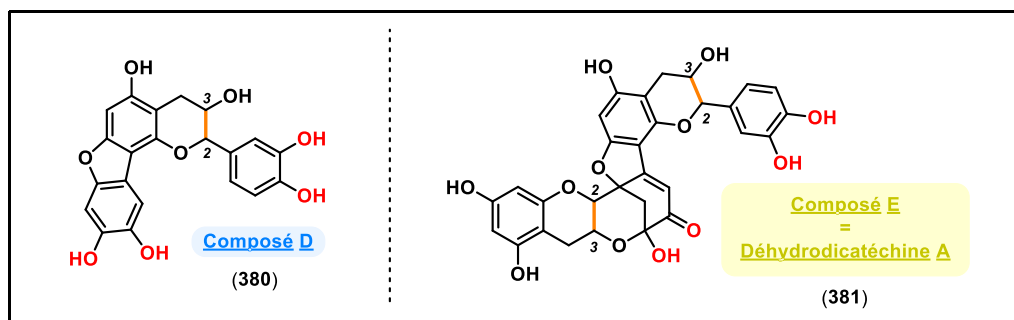


Figure 82 – Structures des produits d'oxydation de la (+)-catéchine (**362**) obtenus.

En l'absence de l'insaturation en C₂-C₃, la réactivité des substrats se trouve modifiée, comparativement à la quercétine. Le composé D (**380**) correspond à un couplage aryle-aryle radicalaire entre le pyrocatéchol et le cycle résorcinol de la (+)-catéchine. Quant au composé E (**381**), il correspond lui aussi à un couplage aryle-aryle radicalaire de la (+)-catéchine sur elle-même entre le cycle résorcinol d'une part et le cycle catéchol d'autre part,^{65, 69, 118, 128, 208, 270} suivi d'une seconde oxydation permettant une addition d'*oxa*-Michael et une acétalisation (Schéma 113).

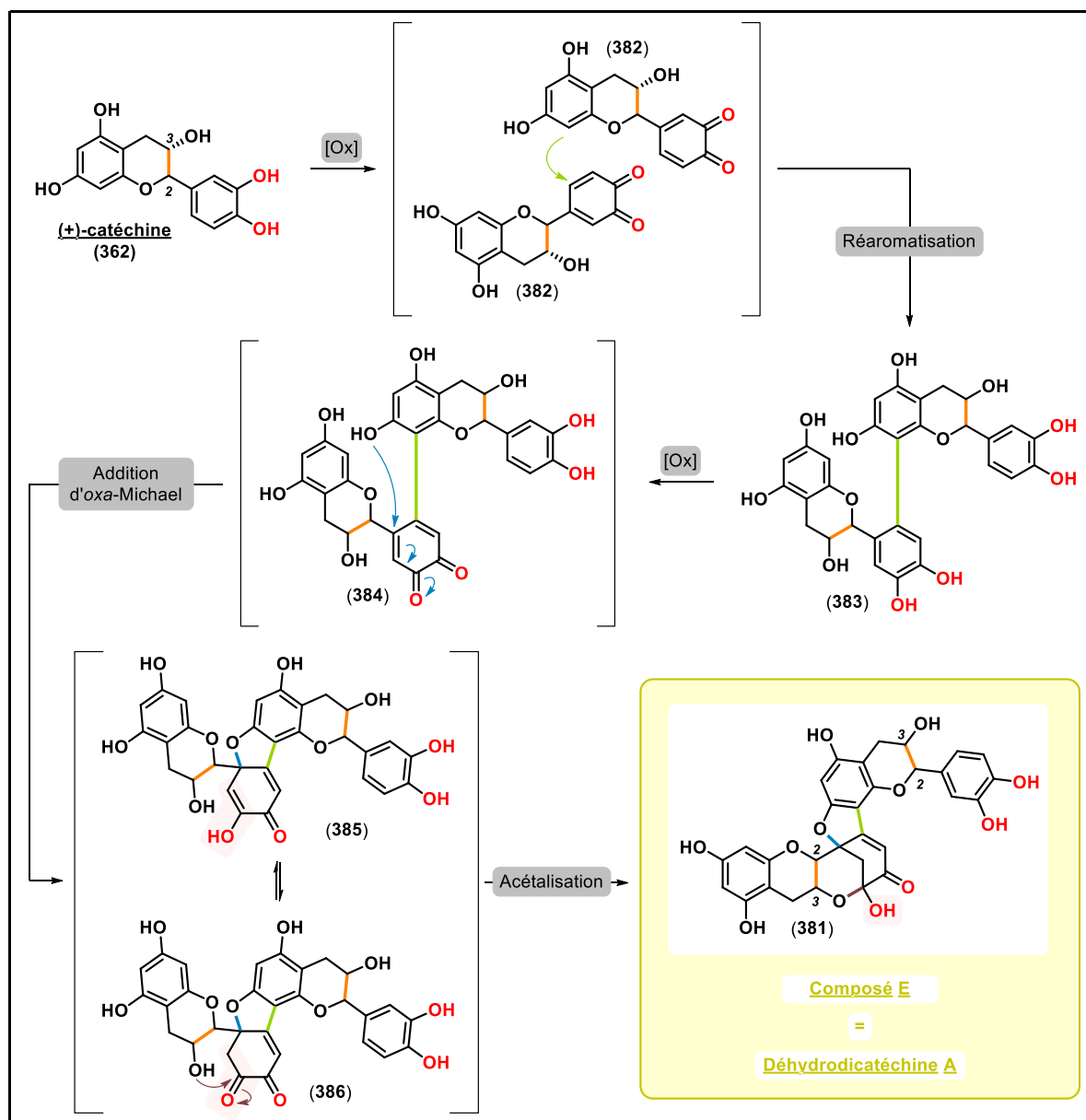


Schéma 113 – Mécanisme du couplage de la (+)-catéchine (362) sur elle-même ayant abouti à la formation du composé E (*i. e.* la déhydrocatéchine A) (381).

Les conditions expérimentales que nous avons testées, au cours de ce travail de thèse, sur la (+)-catéchine sont compilées dans le Tableau 21.

<u>Entrées</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions</u>	<u>Produits obtenus</u>	<u>Réf.</u>
1.	(+)-catéchine (1,0 éq.) K ₃ [Fe(CN) ₆] (6,0 éq.) NaHCO ₃ (6,0 éq.)	G.-à-G. ACN/H ₂ O TA – 3h	Dégradation	85
2.	(+)-catéchine (1,0 éq.) Ag ₂ CO ₃ (5,0 éq.) ^s	Toluène/Acétone Obscurité Reflux – 30 min	Composé E	287
3.	(+)-catéchine (1,0 éq.) Pyrocatechol (1,0 éq.) Ag ₂ CO ₃ (5,0 éq.) ^s	G.-à-G. Toluène/Acétone Obscurité Reflux – 30 min	Composé D	287

Tableau 21 – Récapitulatif des conditions d'oxydation testées sur la (+)-catéchine (**362**) (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte du substrat).

Les résultats obtenus au cours de ces essais sont relativement contrastés. En effet, bien que des dimères de quercétine et de (+)-catéchine aient été obtenus, ils correspondent à des structures déjà connues, décrites et synthétisées dans la littérature et ont été obtenus avec de faibles rendements.^{69, 117, 174, 287, 319} Dans le cas des essais sur la quercétine, les différents modes d'activation testés n'ont permis d'observer qu'un seul mode de couplage de type *oxa*-Diels-Alder.¹²⁴ Dans le cas de la (+)-catéchine, le couplage entre le cycle résorcinol et le cycle catéchol s'explique par le fait que le caractère nucléophile du cycle résorcinol est plus marqué que le cycle catéchol (alors sous la forme *o*-quinone) : ce modèle polyphénolique densément fonctionnalisé nous a donc conduit à différents modes d'assemblage originaux.^{69, 124} Ces essais ont néanmoins eu le mérite de faire apparaître le carbonate d'argent comme un oxydant prometteur pour nos futurs essais sur l'acide xéromique, car il nous a permis d'obtenir des dimères de flavonoïdes à partir de nos deux substrats différents, ce qui n'a pas été le cas du ferricyanure de potassium proposé par D. Trauner dans son exemple d'oxydation désaromatisante pour la synthèse de l'épicolactone⁸⁵ (section 3.2.1 de l'Introduction générale – page 91). Ce réactif a montré sa capacité à former des quinones à partir de catéchol. Par manque de temps, nous avons décidé d'arrêter les essais d'oxydation de nos molécules modèles à ce stade et de démarrer les essais sur notre substrat principal : l'acide xéromique.

2 ESSAIS DE DIMÉRISATION DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE EN CONDITIONS OXYDANTES

2.1 Pré-requis sur la réactivité de l'acide xérocomique dans la littérature

Très peu d'études ont été réalisées sur la réactivité des acides pulviniques, malgré l'hypothèse formulée par W. Steglich en 2004.³⁰² On peut seulement citer quelques observations qui ont été faites dans les années 1970. Tout d'abord, il a été remarqué, lors de collectes de champignons, que l'endroit de la coupe devenait bleu au cours du temps, ce qui est dû à l'oxydation des acides pulviniques au contact de l'air.²²³ Toujours selon une étude datant de 1970, il a été noté que l'acide xérocomique (7) et son isomère, l'acide *isoxérocomique* (333), ne présentent pas la même réactivité en conditions oxydantes. En effet, la fonction catéchol de l'acide xérocomique (7) s'oxyde en *o*-quinone en présence de $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$, ce qui n'est pas le cas pour l'acide *isoxérocomique* (333). Et inversement, en présence de $Cu(OAc)_2/CH_3CO_2H$, la fonction catéchol de l'acide *isoxérocomique* (333) s'oxyde en *o*-quinone (permettant ainsi l'addition-1,4 de l'acide carboxylique sur l'*o*-quinone générée pour former la xérocomorubine (387)), ce qui n'est pas le cas pour l'acide xérocomique (Schéma 114).²⁶¹

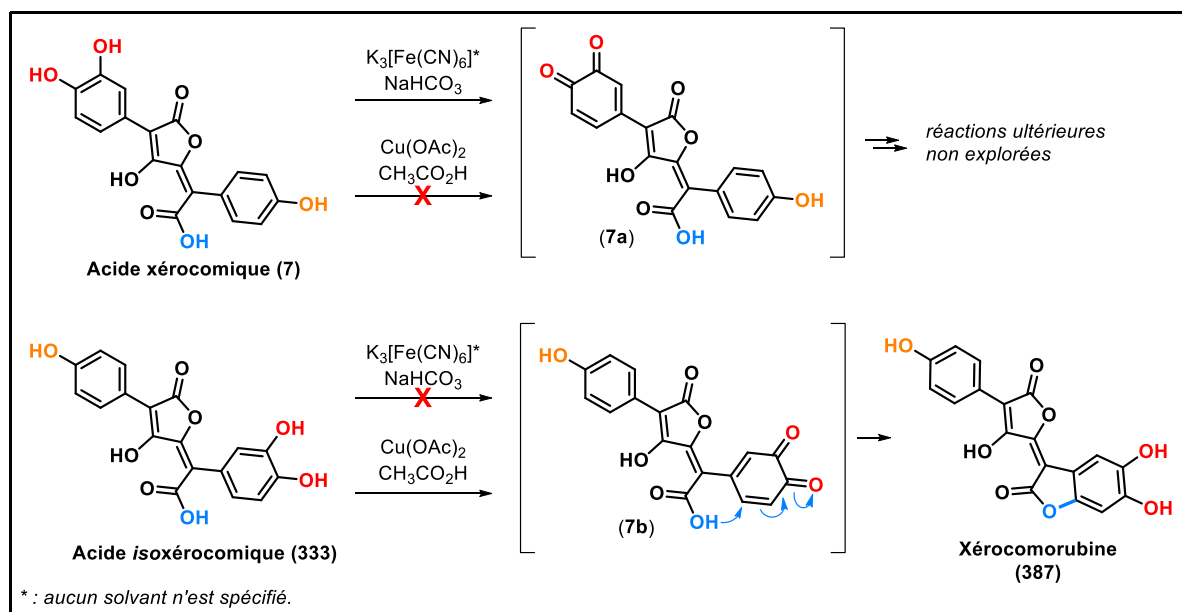


Schéma 114 – Réactivité des acides xérocomique (7) et *isoxérocomique* (333) en condition oxydante par W. Steglich. Le nombre d'équivalent des oxydants utilisés et le pH des solutions n'est pas spécifié.²⁶¹

Cette différence de réactivité pose question, car les deux oxydants impliqués ($K_3[Fe(CN)_6]$ et $Cu(OAc)_2$) sont de structure proche (ce sont tous les deux des complexes de métaux de transition) et présentent des potentiels rédox similaires (cf Tableau 22). Les auteurs ne proposent d'ailleurs pas d'explication à ce fait.

<u>Entrées</u>	<u>Couples rédox</u>	<u>Potentiel standard (V vs ESH)</u>	<u>Réf.</u>
1.	$NaIO_4 (IO_4^-/IO_3^-)^t$	1,653	191, 285
2.	CAN	1,221	239
3.	Ag_2O/Ag^u	1,173	285
4.	<i>o</i> -chloranile	0,79	323
5.	DDQ	0,741	246
6.	<i>p</i> -chloranile	0,68	293
7.	Ag_2CO_3/Ag	0,47	286
8.	$[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$	0,36	286
9.	Cu^{2+}/Cu	0,34	286
10.	PIFA	-0,19	239
11.	PIDA	-0,879	239

Tableau 22 – Récapitulatif des potentiels d'oxydo-réduction des réactifs impliqués dans les essais de dimérisation de l'acide xéromique (tous les potentiels sont donnés en V par rapport à l'électrode standard à hydrogène, à 25°C et sous 1 bar).^v

2.2 Essais d'oxydation de l'acide xéromique

Gardant à l'esprit cette curiosité concernant l'acide xéromique et son isomère, nous avons essayé de tester une gamme diversifiée d'oxydants. Il est à noter que, comme pour l'étude des flavonoïdes, toutes les expériences ont été menées à l'échelle préparative et un suivi HPLC-MS a été systématiquement réalisé grâce aux conditions mises au point précédemment pour détecter l'acide xéromique et la sclérocitrine au sein du champignon

^t $pK_a (HIO_4 / IO_4^-) = 1,70$, donc lorsque $NaIO_4$ est solubilisé à $pH = 6$ (pH de l'eau distillée utilisée), l'espèce majoritaire est IO_4^- , le couple d'oxydo-réduction considéré est donc IO_4^- / IO_3^- : $E^\circ = 1,653 - 0,0591 * pH$ (V vs ESH). Donc, à $pH = 6$, $E(IO_4^- / IO_3^-) = 1,298$ V vs ESH.

Si $pH < pK_a$, on considère que HIO_4 est sous la forme d'un adduit hydraté $HIO_4 \cdot 2H_2O$ ou H_5IO_6 , le couple d'oxydo-réduction considéré est donc H_5IO_6 / IO_3^- et $E^\circ = 1,603 - 0,0295 * pH$ (V vs ESH).

^u La demi-équation d'oxydo-réduction est : $Ag_2O + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2Ag + H_2O$ et $E^\circ = 1,173 - 0,0591 * pH$ (V vs ESH). Donc, à $pH = 6$ (pH de l'eau distillée utilisée), $E(Ag_2O / Ag) = 0,818$ V vs ESH.

^v Convertisseur de potentiels d'oxydo-réduction : <https://www.gamry.com/resources/electrochemical-calculators-tools/convert-potentials-to-another-reference-electrode/>

Scleroderma citrinum et présentées dans le Chapitre 2 de ce manuscrit (*i. e.* colonne XBridge, gradient : H₂O + NH₄Ac (20 mM)/ACN).

Pour cela, des prélèvements sont réalisés à $t = 0$ min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h. Ce suivi HPLC-MS avait pour objectif de détecter rapidement les potentiels adduits issus de l'assemblage de l'acide xérocomique, idéalement la sclérocitrine ($M = 726,5$ g.mol⁻¹), la chalcitrine ($M = 682,5$ g.mol⁻¹) et/ou la norbadione A ($M = 678,5$ g.mol⁻¹).

Enfin, les différents oxydants que nous avons choisi de tester sont les suivants :

- **K₃[Fe(CN)₆]**, car, pour rappel, c'est grâce à cet oxydant que D. Trauner a réalisé la synthèse totale de l'épicolactone par cycloaddition de type [5+2]⁸⁵
- **Ag₂O**, car, pour rappel, cet oxydant a été utilisé en 1985 par W. Steglich pour réaliser le cœur central de la norbadione A lors d'une étude modèle²⁶²
- **DDQ**, car cet oxydant peut être associé à des photosensibilisateurs dans le cadre d'expériences en photochimie
- **PIFA**, comme exemple de l'action des iodes hypervalents sur l'acide xérocomique
- ***p*-chloranile**, pour pouvoir réaliser un suivi RMN de l'expérience

Les différentes conditions testées et les résultats associés sont rassemblés dans le Tableau 23.

Premièrement, nous pouvons noter que dans aucune des conditions testées, il n'a été possible de détecter, au cours du suivi HPLC-MS, la masse correspondant à la sclérocitrine, la chalcitrine et la norbadione A. Certes, quelques masses comprises entre 600 et 800 Da (correspondant à la gamme de masses des composés recherchés) ont pu être détectées, mais leur faible stabilité ne nous a pas laissé le temps de mettre au point des conditions HPLC adéquates pour les isoler.

<u>Entrées</u>	<u>Réactifs</u>	<u>Conditions</u>	<u>Produits obtenus</u>	<u>Réf.</u>
1.	K ₃ [Fe(CN) ₆] (5,0 éq.) NaHCO ₃ (5,0 éq.)	ACN/H ₂ O t.a. – 96h	Produits de haut poids moléculaire (600 – 800 Da) qui se dégradent rapidement	85
2.	DDQ (5,0 éq.)	ACN Obscurité 0°C – 95h	Produits de haut poids moléculaire (600 – 800 Da) qui se dégradent rapidement	/
3.	DDQ (5,0 éq.) Ru(bpy) ₃ Cl ₂ (0,05 éq.)	ACN LEDs bleues 0°C – 95h	Produits de haut poids moléculaire (600 – 800 Da) qui se dégradent rapidement	/
4.	Ag ₂ O (2,5 éq.)	HCO ₂ H/ACN 60°C – 30h	Pas de conversion	/
5.	Ag ₂ O (5,0 éq. en 2 fois) ^w HCO ₂ H (2,0 éq.)	ACN 60°C – 7h	Produits de haut poids moléculaire (600 – 800 Da) qui se dégradent rapidement	/
6.	Ag ₂ O (5,0 éq. en 2 fois) ^w	HCO ₂ H 60°C – 7h	Produits de haut poids moléculaire (600 – 800 Da) qui se dégradent rapidement	/
7.	PIFA (3,0 éq.)	G.-à-G. ACN/H ₂ O t.a. – 96h	Dégradation	71
8.	<i>p</i> -chloranil (2,0 éq.)	(CD ₃) ₂ O Suivi RMN	/	/

Tableau 23 – Récapitulatif des conditions d'oxydation testées sur l'acide xéromique (7). L'acide xéromique est toujours introduit à 1,0 équivalent (G.-à-G. : ajout goutte-à-goutte de l'oxydant).

En revanche, à l'exception de l'entrée **4.** (Tableau 23), l'acide xéromique était systématiquement entièrement consommé. Cette conversion de l'acide xéromique est presque immédiate, dès l'ajout de l'oxydant dans le milieu réactionnel, car dès le prélèvement à $t = 0$ min, on détecte la forme oxydée de l'acide xéromique ($m/z = 353,03$ Da). De plus, nous avons suivi l'évolution de l'aire sous la courbe TIC des pics correspondants à l'acide xéromique ($m/z = 355,05$ Da) et de sa forme oxydée ($m/z = 353,03$ Da) au cours du temps (Figure 83) et il apparaît que 90% de l'acide xéromique est consommé au bout de 10 minutes, tandis que 95% de sa forme oxydée présente à $t = 0$ min a également réagi.

^w Le deuxième ajout est réalisé à $t = 20$ min.

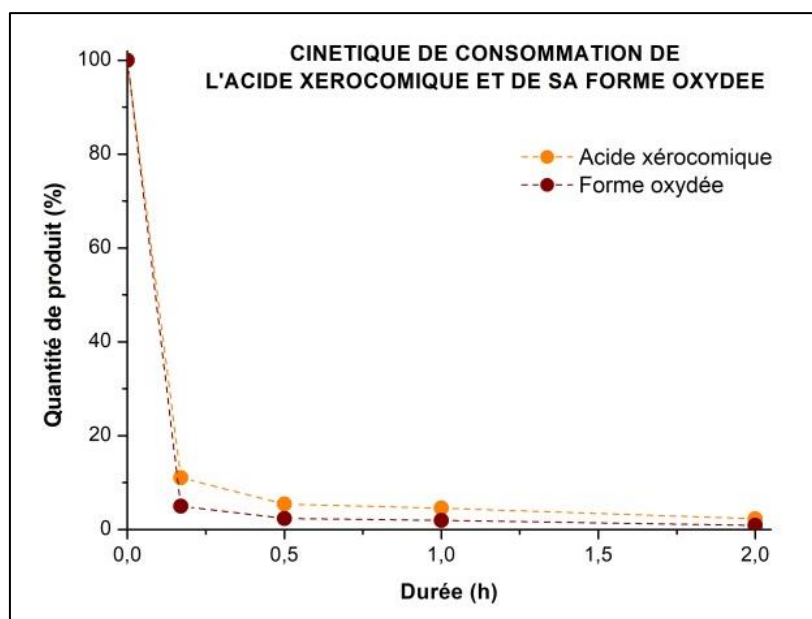


Figure 83 – Graphe représentant la conversion de l'acide xérocomique (**7**) ($m/z = 355,05$ Da) et de sa forme oxydée (**7a**) ($m/z = 353,03$ Da) au cours du temps lors de l'oxydation par $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$ (Tableau 23, entrée **1.**).

Cette cinétique rapide pose la question du devenir de l'acide xérocomique dans le brut réactionnel, car aucune formation franche de produit n'a été détectée. Dans l'hypothèse d'une dégradation de l'acide xérocomique, nous aurions dû observer la présence de résidus avec un rapport m/z plus faible, ce qui n'a pas été le cas non plus.

Nous nous sommes également posé la question de la polarité des potentiels intermédiaires formés : en effet, il est possible qu'avec nos conditions d'élution (*i. e.* colonne XBridge, gradient : H_2O+NH_4Ac (20 mM)/ACN), des composés très polaires sortent dans le pic d'injection, tandis que des composés très apolaires ne sortent qu'après un lavage prolongé de la colonne à l'acétonitrile. Cela pourrait expliquer que nous n'observions pas de formation de produit. À titre d'exemple, dans le cas de l'oxydation par $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$ (entrée **1.** – Tableau 23), nous avons remarqué que le pic d'injection présente une forte absorbance à 410 nm (Figure 84), qui est la longueur d'onde d'absorbance spécifique de l'acide xérocomique et de ses analogues. Nous avons donc décidé de passer nos échantillons sur une colonne présentant un greffage plus polaire, comme la « Synergi Fusion-RP » de Phenomenex^x, afin d'augmenter la rétention des potentiels produits polaires piégés dans le pic d'injection, malheureusement sans succès.

^x <https://www.phenomenex.com/synergi?culture=fr>

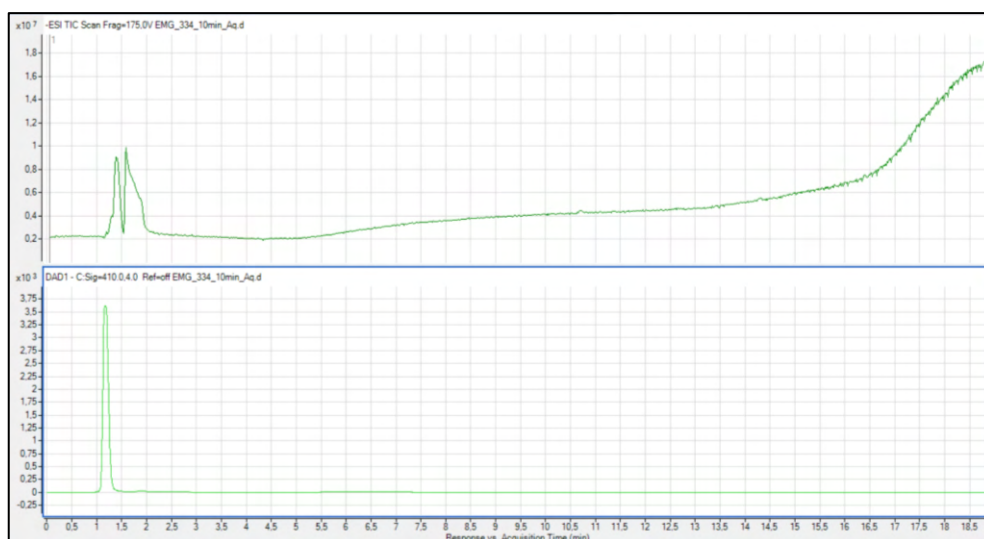


Figure 84 – Chromatogrammes du TIC (en haut) et de l'UV à 410 nm (en bas) lors de l'oxydation de l'acide xérocomique par $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$ (Tableau 23, entrée 1.).

Au vu des difficultés rencontrées pour comprendre les mécanismes en jeu, nous avons essayé de réaliser un suivi RMN (entrée 8. – Tableau 23) de l'oxydation de l'acide xérocomique dans l'acétone- d_6 par le *p*-chloranile (un oxydant soluble dans les solvants organiques usuels et ne possédant aucun proton). Malheureusement, dans ce cas aussi, nous n'avons pas pu conclure sur l'évolution du brut réactionnel en raison de l'évolution peu marquée des intégrations des massifs, de l'apparition de nouveaux massifs de nature inconnue et de l'augmentation du bruit de fond. De plus, nous étions limités dans l'échelle de travail en raison de la faible solubilité de l'acide xérocomique.

Suite à ces différents essais, il n'a pas été possible de produire suffisamment d'acide xérocomique dans les délais de ce doctorat pour pouvoir relancer une vague d'essais de dimérisation avec de nouveaux oxydants, alors qu'il aurait été intéressant d'appliquer à notre substrat les protocoles d'électrochimie et de photochimie développés pour la quercétine et la (+)-catéchine. Par ailleurs, au cours de ces différents essais, nous n'avons pas eu l'occasion de tester l'oxydation par le CAN, alors que ce réactif s'est révélé particulièrement pertinent lors de l'étude de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**), modèle de l'acide xérocomique, car il nous a permis de synthétiser un dimère (noté composé A (**363**)) par aldolisations successives. Cet oxydant devra donc être testé en priorité lors des prochains essais de dimérisation de l'acide xérocomique. Enfin, comme lors de l'étude de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique (**360**), le système Ag_2O/HCO_2H s'est révélé prometteur, car nous avons pu observer la formation de produits de haut poids moléculaire par HPLC-MS. La

cinétique d'oxydation de l'acide xérocromique étant élevée (moins de 10 minutes) (cf Figure 83), il serait donc intéressant, à l'avenir, de réaliser l'oxydation de l'acide xérocromique avec ce système $\text{Ag}_2\text{O}/\text{HCO}_2\text{H}$, puis de filtrer le brut réactionnel au bout de 10 minutes pour en retirer les sels d'argent et de laisser évoluer l'*o*-quinone ainsi formée en appliquant différentes conditions expérimentales (par exemple, en appliquant différentes valeurs de pH). En effet, ce type de protocole nous permettrait d'avoir accès à une plus grande gamme de conditions expérimentales sans nous limiter aux conditions propres à un oxydant donné.

2.3 Conclusions

Au cours de cette partie du doctorat, nous avons testé de nombreuses conditions de dimérisation sur différents substrats : deux polyphénols (l'acide xérocromique et l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique) et deux flavonoïdes (la quercétine et la (+)-catéchine). À ce stade des recherches, les résultats les plus probants ont été obtenus pour l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique) et les deux flavonoïdes, car des dimères ont pu être isolés et caractérisés. Une analyse globale de ces différents résultats et de ceux rappelés dans la littérature (cf section 3.2 de l'Introduction générale présentant les synthèses totales de l'épicolactone, la preisolactone A et la (-)-pérézopérézone – page 91) ne permet pas de mettre en exergue un ensemble de conditions réactionnelles pouvant induire systématiquement une réactivité de type cycloaddition [5+2]. Un début de rationalisation de ces différents résultats a été proposé par D. Trauner quelques semaines avant la remise de ce manuscrit : le travail de synthèse de la preisolactone A réalisée par son équipe (et présentée dans la partie 3.2.2 de l'Introduction générale de ce manuscrit – page 93) les a conduit à mener une étude théorique des différents intermédiaires et états de transition rencontrés au cours de cette synthèse. Les calculs d'énergie libre indiquent clairement que le pH du milieu réactionnel et la nature des contre-ions impliqués peuvent jouer sur la stabilité des intermédiaires de synthèse en abaissant leur énergie libre de près de $40 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.³²⁴ Pour la poursuite de ce projet, il sera donc judicieux, lors des prochains essais de dimérisation réalisés au laboratoire, de contrôler systématiquement ces deux paramètres.

À l'avenir, il serait préférable de compléter, dans un premier temps, l'étude de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique avant celle de l'acide xérocromique en lui-même, qui est difficile à synthétiser à grande échelle, afin de voir si d'autres modes d'accrochage peuvent être favorisés en fonction des conditions réactionnelles choisies. Les potentiels dimères

obtenus pourront alors être post-fonctionnalisés pour terminer la synthèse totale de la sclérocitrine et de la chalcitrine ou pour anticiper la structure de dimères pulviniques naturels inconnus à ce jour.

CONCLUSION GÉNÉRALE



CONCLUSION GÉNÉRALE

1 RAPPELS DES OBJECTIFS FIXÉS EN DÉBUT DE DOCTORAT

Dans le cadre de ces travaux de thèse réalisés au sein de l'équipe *Chimie des substances naturelles* du laboratoire *BioCIS* (université Paris-Saclay), notre objectif était de proposer une voie de biosynthèse cohérente de deux pigments fongiques complexes, la sclérocitrine (**3**) et la chalcitrine (**4**), isolés en 2004 par l'équipe de W. Steglich à partir des champignons *Scleroderma citrinum* et *Chalciporus piperatus*.³⁰² Ces deux pigments présentent des structures similaires : un cœur central comportant des fonctions exclusivement oxygénées, substitué par des groupements identiques correspondant à un autre métabolite fongique également produit par *Scleroderma citrinum* et *Chalciporus piperatus* : l'acide xéromique (**7**). Ce constat a poussé W. Steglich à supposer que la sclérocitrine (**3**) et la chalcitrine (**4**) sont biosynthétisées par dimérisation de l'acide xéromique (**7**), sans pour autant le démontrer expérimentalement. Au sein du laboratoire, cette supposition a été reprise et retravaillée, afin d'aboutir à l'hypothèse suivante : *un seul et unique évènement oxydant se produit en début de biosynthèse sur l'acide xéromique, ce qui permet d'enclencher une cascade réactionnelle isohypsique conduisant à la sclérocitrine et la chalcitrine.*

L'approche que nous avons suivie, au cours de ce doctorat, pour valider cette hypothèse a été d'associer un volet de synthèse avec un volet analytique : d'une part, le volet de synthèse consistait en la synthèse totale biomimétique de l'acide xéromique en laboratoire, puis en l'étude de son comportement en milieu oxydant ; d'autre part, le volet analytique revenait à réaliser une étude approfondie des structures des métabolites produits par le champignon *Scleroderma citrinum*, pour identifier des intermédiaires de biosynthèse.

2 SYNTHÈSES TOTALES BIOMIMÉTIQUES ET ÉTUDE DE L'ACIDE XÉROCOMIQUE ET DE DÉRIVÉS PULVINIQUES

2.1 Synthèse totale biomimétique de l'acide xérocomique (7) et de dérivés pulviniques

Le premier objectif du volet de synthèse a été atteint en réalisant la synthèse totale biomimétique de l'acide xérocomique. Dans ce but, deux voies de synthèse différentes ont été étudiées :

① Dialkylation de l'oxalate de diéthyle par des groupements phénylacétonitriles, suivie d'une hydrolyse acide des fonctions nitriles.

② Couplages de Suzuki-Miyaura entre une *p*-benzoquinone et des acides phénylboroniques, suivis d'une contraction de cycle en milieu acide.

Nous avons retenu la deuxième voie de synthèse en raison de sa reproductibilité et des meilleurs rendements obtenus, bien que le nombre d'étapes soit plus grand. Après plusieurs optimisations, la synthèse totale biomimétique de l'acide xérocomique (7) a été achevée en **8 étapes** avec un rendement global de **5,3%**. Cette voie de synthèse s'est révélée suffisamment robuste pour permettre la synthèse d'autres acides pulviniques naturels, comme l'acide atromentique (48), l'acide variégatique (8), l'acide pulvinique (323) et l'acide pinastrique (291). Notons par ailleurs que grâce à la méthode de déprotection des fonctions phénols utilisées au cours de cette synthèse, nous avons également pu réaliser la synthèse totale de l'atromentine (2) et de la variégatine (326), deux terphénylquinones naturelles qui sont des intermédiaires dans la biosynthèse des acides pulviniques.

2.2 Etude des propriétés spectrales des intermédiaires de synthèse

Au cours du développement de cette voie de synthèse, certains intermédiaires, les acides bistétroniques, ont révélé des propriétés optiques singulières, ce qui nous a amenés à réaliser une étude approfondie des caractéristiques d'absorbance et d'émission de ces acides bistétroniques. Il est apparu que ces intermédiaires de synthèse présentent une absorbance maximale vers 425 nm, ils émettent vers 550 nm et leurs valeurs de rendement quantique de fluorescence sont comprises entre 0,03 et 0,22. Ces propriétés photophysiques, similaires à celles du standard de fluorescence employé (le *Lucifer Yellow dilithium salt CH*), nous

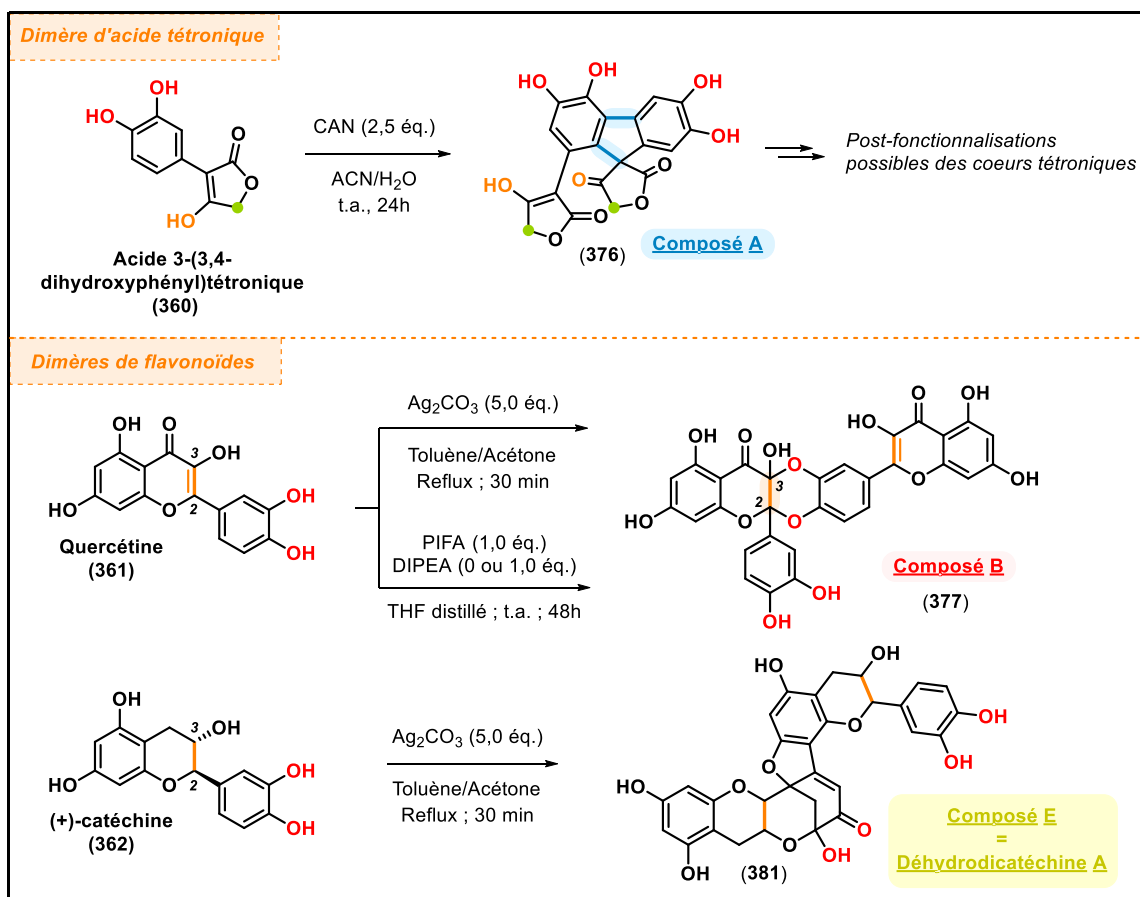
permettent d'imaginer plusieurs stratégies de valorisation ultérieures de ces composés, par exemple leur utilisation dans des dispositifs OLEDs ou le développement de sondes de fluorescence « on-off », dites *reaction-based*, pour l'étude des milieux biologiques. Dans ce but, plusieurs améliorations devront être apportées à ces composés, notamment en termes de solubilité.

2.3 Synthèse totale de dimères pulviniques

Le volet de synthèse totale de ce projet a été poursuivi par l'étude du comportement de l'acide xérocomique en conditions oxydantes. Les différentes tentatives de dimérisation par oxydation de l'acide xérocomique ne se sont pas révélées concluantes : aucun dimère n'a pu être isolé, bien que des composés ayant des masses compatibles aient été détectés dans les bruts réactionnels par HPLC-MS. Notre objectif de réaliser la synthèse totale de la sclérocitrine et de la chalcitrine par dimérisation de l'acide xérocomique n'a donc pas été atteint.

Pour tenter de mieux comprendre les mécanismes en jeu lors du processus de dimérisation, nous avons décidé de travailler avec trois molécules modèles de l'acide xérocomique (**7**) présentant l'avantage d'être proches structurellement parlant ou facilement accessibles. Ainsi, nous avons choisi un acide tétronique (l'**acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)tétronique**) (**360**), synthétisé en **3 étapes**, au cours de ce doctorat, avec un rendement global de **15%**) et deux flavonoïdes commerciaux (la **quercétine** (**361**) et la (+)-**catéchine** (**362**)). Les essais de dimérisation en conditions oxydantes de ces molécules modèles ont été plus fructueux et pour chacune de ces molécules, un dimère a pu être isolé. Les structures de ces dimères et les conditions expérimentales associées sont rassemblées sur le Schéma 115. Les deux dimères de flavonoïdes obtenus sont des composés déjà répertoriés et caractérisés dans la littérature et leurs mécanismes de synthèse sont connus. En revanche, la structure du dimère d'acide tétronique est innovante. Le mécanisme impliqué est proche de celui que nous avons postulé pour la biosynthèse de la sclérocitrine et de la chalcitrine, à savoir : une oxydation de la sous-unité catéchol en *o*-quinone, suivie de deux additions de Michael successives entre les cycles aromatiques. Néanmoins, il s'en détache par la localisation des deux liaisons formées entre les cycles aromatiques. Cette proximité mécanistique tend à valider notre hypothèse de biosynthèse de la sclérocitrine et de la chalcitrine. D'autres expériences devront néanmoins être menées à l'avenir pour compléter ce

résultat préliminaire, afin, notamment, de voir si d'autres modes d'accrochage peuvent être favorisés en fonction des conditions réactionnelles choisies. Des essais de post-fonctionnalisation des potentiels dimères obtenus pourront alors être réalisés, afin de proposer une voie de synthèse innovante de dimères pulviniques de la même série chimique que la sclérocitrine et le chalcitrine, qu'ils soient naturels ou non.



Sch\u00e9ma 115 – R\u00e9capitulatif des conditions de dim\u00e9risations fructueuses utilis\u00e9es au cours de ce doctorat.

\u00c0 la lumi\u00e8re des \u00e9tudes compl\u00e9mentaires qui auront \u00e9t\u00e9 r\u00e9alis\u00e9es sur le comportement de l'acide 3-(3,4-dihydroxyph\u00e9nyl)t\u00e9tronique (**360**) en conditions oxydantes, il sera alors possible de reprendre les essais de dim\u00e9risation de l'acide x\u00e9rocomique (**7**) en reprenant pr\u00e9f\u00e9rentiellement les conditions exp\u00e9rimentales qui auront \u00e9t\u00e9 fructueuses pour le compos\u00e9 (**360**). En parall\u00e8le de ces travaux synth\u00e9tiques nous renseignant sur la validit\u00e9 des hypoth\u00e8ses de biosynth\u00e8se de la scl\u00e9rocitrine et de la chalcitrine que nous avons formul\u00e9es, nous avons \u00e9galement cherch\u00e9 \u00e0 r\u00e9aliser une \u00e9tude approfondie des structures des m\u00e9tabolites produits par le champignon *Scleroderma citrinum*, pour identifier des interm\u00e9diaires de biosynth\u00e8se.

3 ÉTUDE DES MÉTABOLITES PRODUITS PAR LE CHAMPIGNON *SCLERODERMA CITRINUM*

3.1 Extraction et développement de conditions HPLC-MS adéquates

L'analyse des métabolites produits par *Scleroderma citrinum* a été réalisée à partir d'un lot de 3,7 kg de champignons frais, et plus précisément, sur les enveloppes des champignons débarassées de leurs spores, récoltés en Bretagne (56310 Quistinic) à la Toussaint 2018. Le brut d'extraction méthanolique obtenu a ensuite été dépouillé de ses composés les plus polaires (les glucides et les acides aminés principalement) par extraction liquide-liquide. Puis, la phase organique obtenue a été pré-fractionnée en aveugle par chromatographie en phase normale (DCM/MeOH + 1,0% HCO₂H). Quinze fractions ont ainsi pu être formées, puis analysées par HPLC-MS. Les conditions classiques d'analyse par HPLC-MS (à savoir, un éluant ACN/H₂O + 0,1% HCO₂H) se sont révélées inadaptées aux caractéristiques de notre extrait. Nous avons donc décidé de jouer sur les états de protonation des métabolites de l'extrait pour faciliter leur élution, ce qui nous a conduit, après plusieurs optimisations, à travailler en mode négatif, avec une colonne XBridge et l'éluant ACN/H₂O + NH₄Ac (20 mM). L'acétate d'ammonium a été choisi dans le but de maintenir la phase aqueuse à pH = 7, afin de travailler avec les bases conjuguées des acides carboxyliques présents au sein de l'extrait. Grâce à ce travail préparatoire, il a été ensuite possible d'utiliser l'outil des réseaux moléculaires, une méthode classique de déréplication en chimie des substances naturelles.

3.2 Déréplication par réseau moléculaire et isolement de métabolites par HPLC préparative

Basés sur l'analyse HPLC-MS/MS des composants d'un extrait et la comparaison de leurs fragments, les réseaux moléculaires forment un outil puissant pour l'analyse rapide des constituants d'un extrait. Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc utilisé cet outil pour réaliser une étude approfondie des métabolites produits par le champignon *Scleroderma citrinum*. En combinant les points forts des deux plates-formes développées à ce jour (GNPS et MetGEM), nous avons pu dépasser certaines limites, notamment le fait que la majorité des bases de données de molécules naturelles ont été réalisées par ionisation en mode positif, alors que notre extrait de *Scleroderma citrinum* pouvait être analysé uniquement en mode négatif. Grâce aux réseaux annotés obtenus, nous avons pu cibler, isoler et caractériser cinq

métabolites fongiques : la sclérocitrine (**3**), deux analogues de ce pigment (la méthyl-sclérocitrine A (**334**) et la méthyl-sclérocitrine B (**335**), que nous soupçonnons être des artéfacts d'extraction), ainsi que deux dipeptides (**336**) et (**338**), dont la particularité est de présenter un ancrage peptidique rare, sous la forme d'une urée (Figure 85).

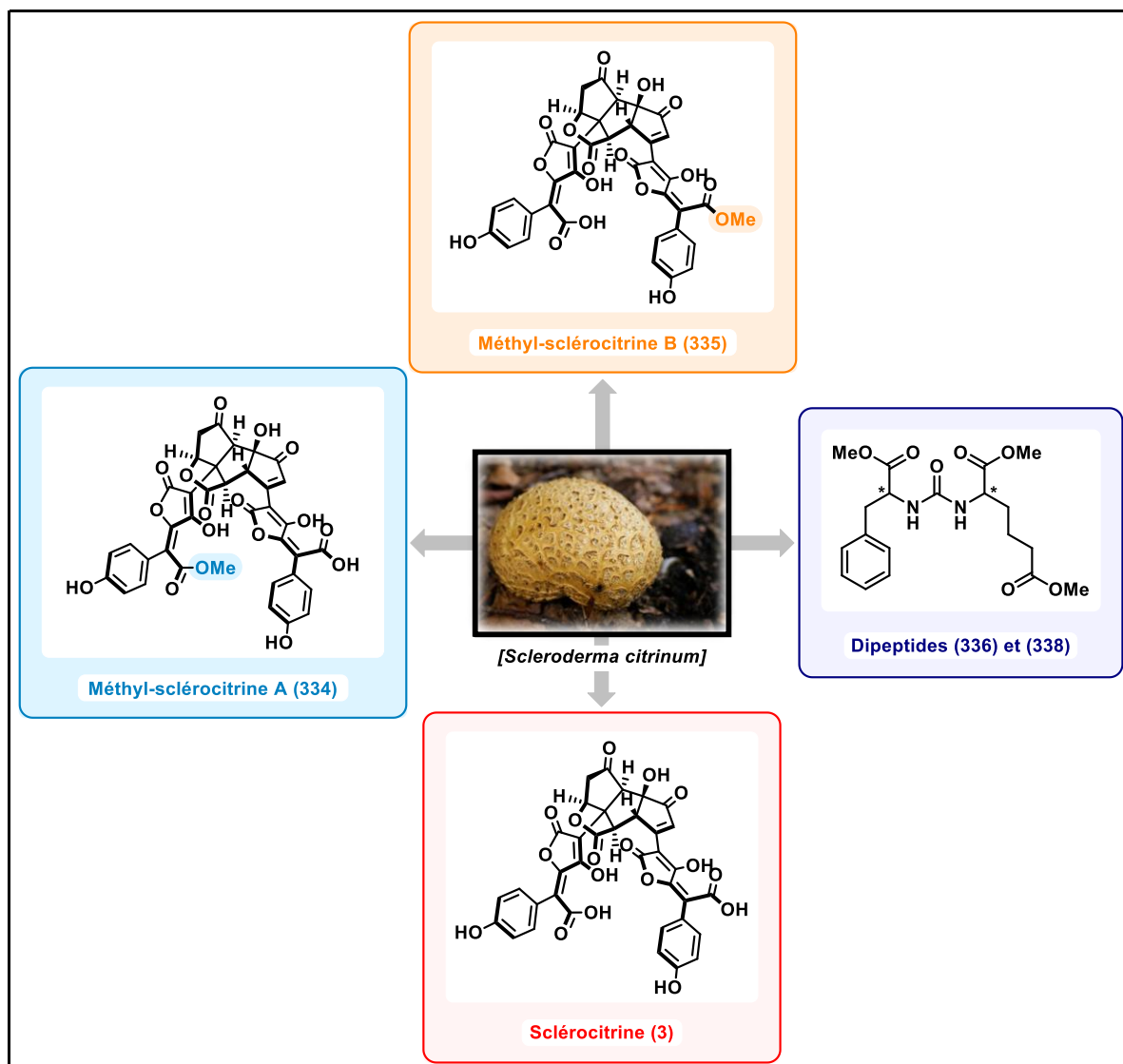


Figure 85 – Rappel des structures des cinq métabolites fongiques isolés à partir de *Scleroderma citrinum*.

Rappelons que les dipeptides que nous avons isolés appartiennent à un cluster du réseau moléculaire sur GNPS (Figure 35 – page 185), il est donc possible que d'autres dipeptides de ce type soit produits par *Scleroderma citrinum*. À l'avenir, il sera intéressant de poursuivre ce travail de purification pour les rechercher et les caractériser, en nous focalisant principalement sur les fractions F0 à F6 qui contiennent la majorité des composés de notre extrait (Figure 86). Il est cependant nécessaire de garder à l'esprit que le processus de

« clusterisation » des composés de l'extrait en réseau moléculaire a été perturbé par la formation d'adduits acétate au cours de l'élution HPLC-MS, ce qui constitue une deuxième limite majeure de l'utilisation de l'outil des réseaux moléculaires.

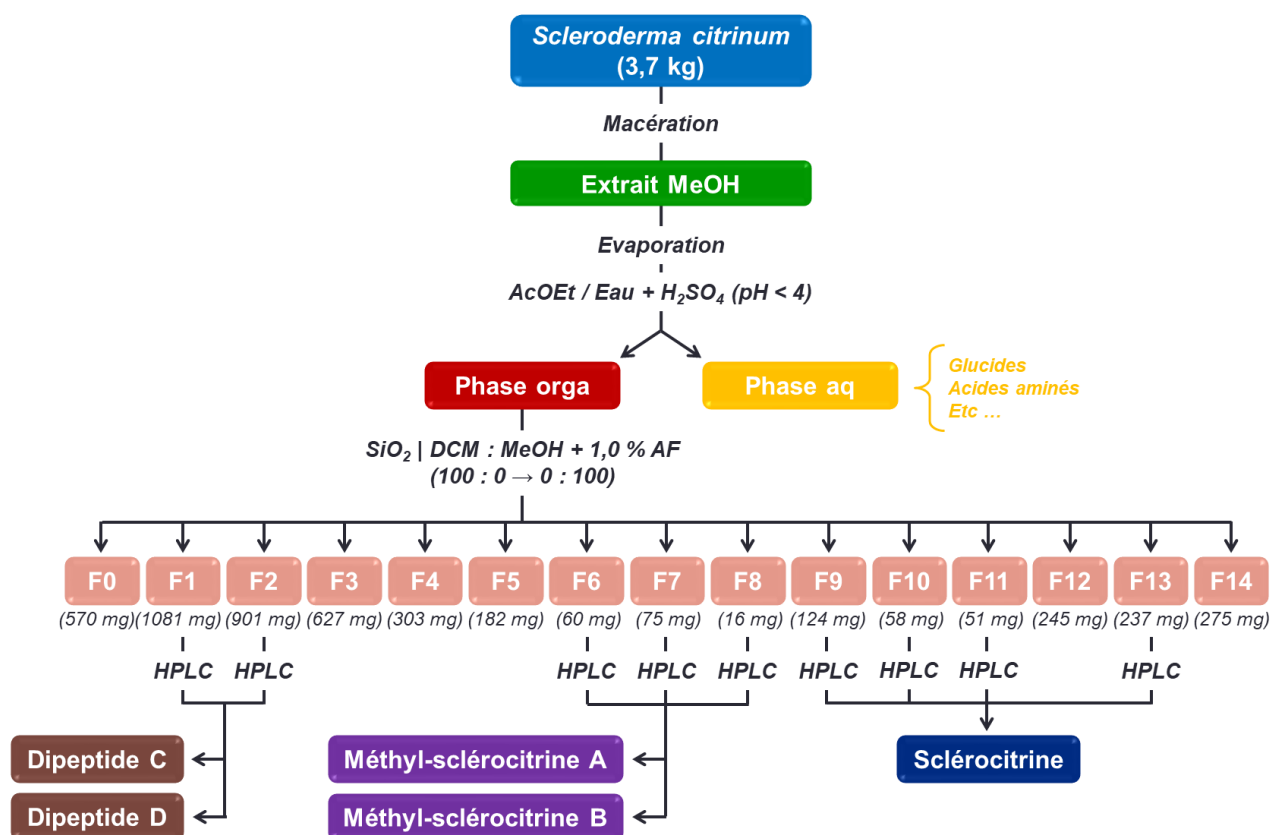


Figure 86 – Rappel du schéma récapitulatif de l'isolement de 5 métabolites de *Scleroderma citrinum*. Les purifications par HPLC ont été réalisées sur colonne XBridge, avec l'éluant ACN/H₂O + NH₄Ac (20 mM).

Malgré l'isolement et la caractérisation de ces cinq métabolites fongiques dont un squelette dipeptidique inhabituel (Figure 85), le bilan de cette étude des métabolites de *Scleroderma citrinum* reste mitigé, car nous n'avons pas réussi à atteindre notre objectif d'isoler des dimères pulviniques ou des métabolites intermédiaires dans la biosynthèse de la sclérocitrine. Nous ne pouvons donc pas nous prononcer sur la cohérence des hypothèses de biosynthèse de la sclérocitrine que nous avons formulées dans la section 1.3 de l'Introduction générale, ce qui était notre but premier. Certes la crise du COVID-19 a fortement perturbé la réalisation de cette partie du projet de thèse, mais cela peut aussi s'expliquer par la complexité du brut d'extraction et les difficultés analytiques qui en découlent : en effet, les conditions d'élution que nous avons mises au point sont spécifiques à la sclérocitrine et à l'acide xérocémique, mais elles ne sont peut-être pas adaptées aux autres métabolites présents dans

notre extrait. Cela peut également être dû à une faible production de métabolites de la part de *Scleroderma citrinum*, ou encore d'une convergence du métabolisme vers la production exclusive de sclérocitrine.

3.3 Purification par chromatographie de partage centrifuge

L'étude du champignon *Scleroderma citrinum*, présentée dans la partie précédente, a pu être réalisée grâce à l'utilisation itérative de l'HPLC préparative pour la purification des différents métabolites ciblés. En parallèle de ces travaux, nous avons également appliqué la chromatographie de partage centrifuge (ou CPC), une technique prometteuse pour la purification de bruts d'extraction complexes.

Au cours de ce doctorat, nous avons pu réaliser la preuve de concept d'une purification de notre extrait méthanolique de *Scleroderma citrinum* par cette technique en travaillant en mode « pH-zone refining » pour que la séparation des analytes s'effectue en fonction de leur pKa. Après optimisation, le système de solvants choisi est le suivant : AcOEt + TFA (10 mM)/H₂O + NH₃ (20 mM), l'acide trifluoroacétique jouant le rôle de déplaceur et l'ammoniaque celui de reteneur. Grâce à ce système de solvant, nous sommes capables de purifier, en une seule injection, un extrait sec de 500 mg en 3 jours. Cependant, en raison de la faible solubilité de l'extrait, nous n'avons pu isoler des fractions suffisamment importantes pour pouvoir les caractériser, par la suite, par RMN. Nous restons malgré tout confiants dans le fait que reproduire ce travail avec un système analytique plus grand permettra de valider pleinement l'utilisation de la CPC pour notre extrait de *Scleroderma citrinum*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1 GENERAL INFORMATION

All reactions were carried out under air atmosphere unless otherwise noted. THF was distilled under argon over sodium and benzophenone. Unless otherwise noted, all reagent-grade chemicals and other solvents were obtained from commercial suppliers and were used as received. For silica gel chromatography, the flash chromatography technique was used, with Merck silica gel 60 (230-400 mesh) and p. a. grade.

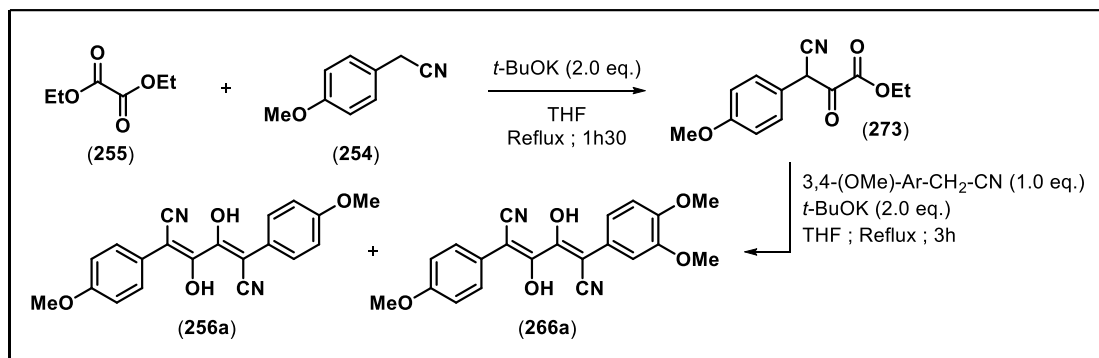
Electrochemical reactions were done with ElectraSyn 2.0 Package IKA. IR spectra were recorded with a Vector 22 Bruker spectrometer or with an IRAffinity-1S Shimadzu spectrometer. The NMR spectra were recorded on Bruker a AM-400 (400 MHz) or a AM-300 (300 MHz) apparatus. HR-ESI-MS and HPLC-MS were run using Electrospray Ionization (ESI) on a QToF 6530 Agilent Technologies spectrometer with a Sunfire[®] analytical C₁₈ column (150 × 2.1 mm ; 3.5 μm, Waters) or with a XBridge[®] C18 column (150 × 2.1 mm ; i. d. 3.5 μm, Waters). Xselect[®] and XBridge[®] analytical C₁₈ column (19 × 150 mm ; i. d. 5 μm) were used for preparative HPLC separations using a Waters Delta Prep equipped with a binary pump (Waters 2525), a UV-visible diode array detector (190-600 nm, Waters 2996). For photophysical study, UV and emission spectra were recorded on Varian Cary 300 Bio UV-Visible Spectrophotometer and Pekin-Elmer Luminescence Spectrometer LS 50B.

2 EXPERIMENTAL DATA

2.1 Bistronic acids synthesis by J. Volhard/P. Bischoff's method

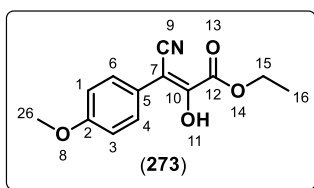
2.1.1 Condensation of phenylacetonitrile on diethyloxalate

2.1.1.1 Sequential condensation



To a solution of 2-(4-methoxyphenyl)acetonitrile (**254**) (1.0 eq., 3.1 mmol, 420 μ L) and diethyloxalate (**255**) (1.0 eq., 3.1 mmol, 420 μ L), *t*-BuOK (2.0 eq., 6.2 mmol, 694 mg) in THF (10 mL) was added and the solution turned to bright yellow. The mixture was stirred at reflux for 1h30. Then, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetonitrile (**265**) (1.0 eq., 3.1 mmol, 500 mg) and *t*-BuOK (2.0 eq., 6.2 mmol, 694 mg) in THF (10 mL) were added to the mixture and the solution turned to bright orange. The mixture was stirred at reflux for 3h. After cooling, the reaction crude was concentrated to dryness and crude product was purified by flash chromatography (Petroleum ether/ CH_2Cl_2 : 2:8) affording dissymmetric compound (**266a**) as an orange amorphous solid (yield : 24%) (cf description page 276), symmetric compound (**256a**) as an orange amorphous solid (yield : 12%) (cf description page 277) and compound (**273**) as an orange amorphous solid (cf description bellow).

→ **Ethyl 3-cyano-3(4-methoxyphenyl)-2-oxopropanoate (273)**

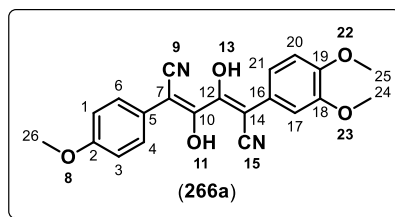


Chemical formula : C₁₃H₁₃NO₄

Molecular weight : 247.25 g/mol

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) :** 7.81 (dt, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 2H, H₄, H₆), 6.90 (dt, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 2H, H₁, H₃), 4.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₁₅), 3.79 (s, 3H, H₂₆), 1.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₁₆) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁) :** 163.3 (C₁₂), 160.1 (C₂), 147.7 (C₁₀), 130.6 (2C, C₄, C₆), 123.4 (C₅), 117.35 (C₉), 113.9 (2C, C₁, C₃), 96.7 (C₇), 64.4 (C₁₅), 55.3 (C₂₆), 13.9 (C₁₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3363, 2958, 2839, 2218, 1708, 1604, 1512, 1465, 1442, 1421, 1400, 1375, 1340, 1311, 1296, 1255, 1213, 1182, 1116, 1068, 1016, 864, 835, 808, 785 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+H]⁺ : 248.0933, calculated for C₁₃H₁₄NO₄⁺ : 248.0917.

→ 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-3,4-dioxohexanedinitrile (266a)



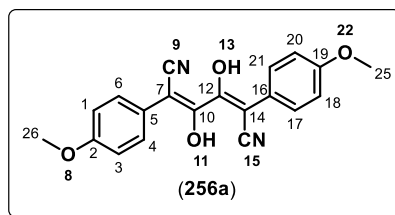
Chemical formula : C₂₁H₁₈N₂O₅

Molecular weight : 378.12 g/mol

Full description could not be done, because of non-reproducibility of the reaction.

- **¹H NMR δ ppm (200 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H₄, H₆), 6.85 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H₁, H₃), 6.81-6.73 (m, 3H, H₁₇, H₂₀, H₂₁), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3566, 3373, 3095, 3003, 2837, 1695, 1643, 1600, 1583, 1560, 1440, 1409, 1253, 1184, 1139, 1097, 1024, 989, 948, 852, 827, 806, 796, 761, 661, 634 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 379.1352, calculated for C₂₁H₁₉N₂O₅⁺ : 379.1288 ; [MM+H]⁺ : 757.2444, calculated for C₄₂H₃₇N₄O₁₀⁺ : 757.2504.

→ 2,5-bis(4-methoxyphenyl)-3,4-dioxohexanedinitrile (256a)



Chemical formula : C₂₀H₁₆N₂O₄

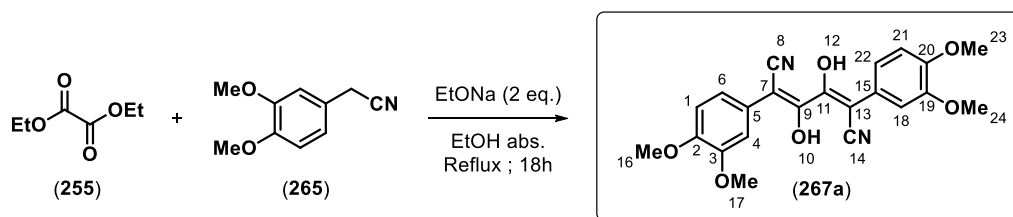
Molecular weight : 348.36 g/mol

Full description could not be done, because of non-reproducibility of the reaction.

- ¹H NMR δ ppm (200 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, H₄, H₆, H₁₇, H₂₁), 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, H₁, H₃, H₁₈, H₂₀), 3.78 (s, 6H, H₂₅, H₂₆) ;
- HRMS (ESI +) : *m/z* [M+H]⁺ : 349.1242, calculated for C₂₁H₁₉N₂O₅⁺ : 349.1183 ; [MM+H]⁺ : 697.2267, calculated for C₄₀H₃₃N₄O₈⁺ : 697.2293.

2.1.1.2 Synthesis of compound (267a)

3,6-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-furo-[3,2-b]-furan-2,5-dione (267a)



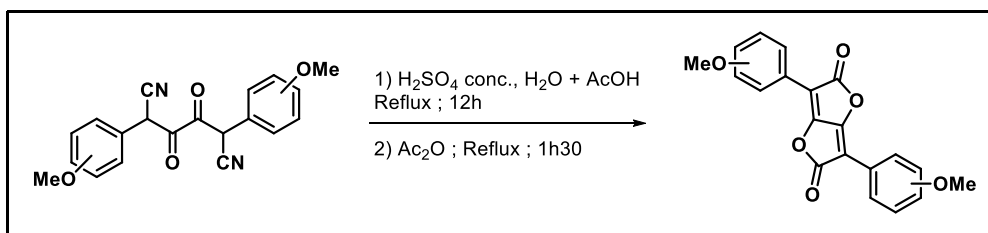
Chemical formula : C₂₂H₂₀N₂O₆

Molecular weight : 408.41 g/mol

Full description could not be done, because of non-reproducibility of the reaction.

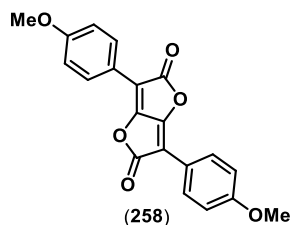
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 409.1424, calculated for C₂₂H₂₁N₂O₆⁺ : 409.1394 ;
[MM+H]⁺ : 817.2575, calculated for C₄₄H₄₁N₄O₁₂⁺ : 817.2715.

2.1.2 Sulfuric hydrolysis of nitrile function and ring contraction

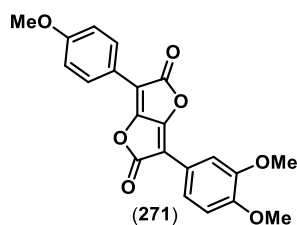


To an orange solution of methoxyphenyl-3,4-dioxohexanedinitrile (1.0 eq., 2.6 mmol) dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (5:5 v/v), concentrated H_2SO_4 (5 mL) was added dropwise : at each drop, the solution turned from orange to red. The mixture was heated to reflux for 12h. After cooling, a brown solid was collected by filtration and dissolved in Ac_2O (100 mL). The new solution was heated to reflux for 1h30. Then, the reaction mixture was filtrated, affording the corresponding bistetric acid as an orange amorphous solid. Further purification by trituration in octane delivered pure product (yield : 11% for compound (**258**), 12% for compound (**271**) and 18% for compound (**272**)).

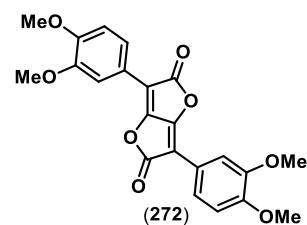
List of compounds synthesized by this procedure :



Description page 326



Description page 328

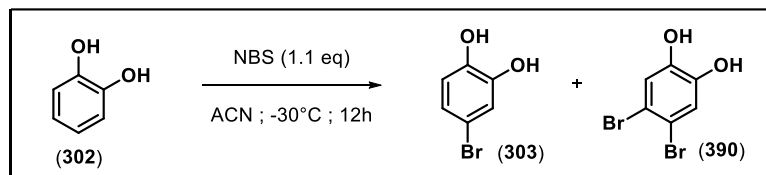


Description page 332

2.2 Synthesis of pulvinic acids

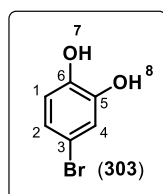
2.2.1 (3,4-dibenzoyloxyphenyl)boronic acid synthesis

2.2.1.1 Bromination of catechol



To a stirred solution of the catechol (**302**) (1.0 eq., 4.4 g, 40 mmol) in acetonitrile (30 mL), NBS (1.1 eq, 7.5 g, 42 mmol) was added at -30°C. Once the addition is complete, the solution was allowed to warm up to room temperature and stirring was maintained overnight. Then, 0.5 eq of NBS was added and the mixture was stirred for 30 min more. Then, the mixture was poured into water and extracted with Et₂O. The organic layers were washed with a 10% aqueous solution of Na₂SO₃, dried over MgSO₄ and concentrated under pressure to afford crude product as a brown oil. The crude product was used in the next step without further purification. A purification by flash chromatography (C18 – H₂O + 0.1% formic acid/CH₃CN : 8:2) was performed to produce a clean sample to authenticate the structure.

→ 4-bromocatechol (**303**)

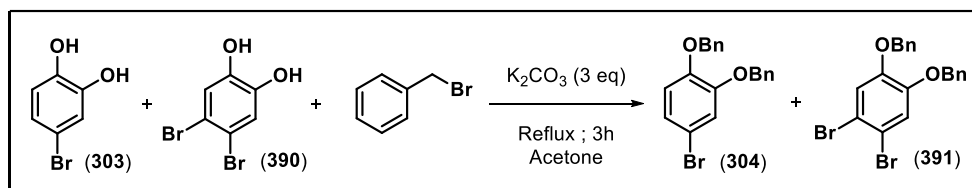


Chemical formula : C₆H₅BrO₂

Molecular weight : 189,01 g/mol

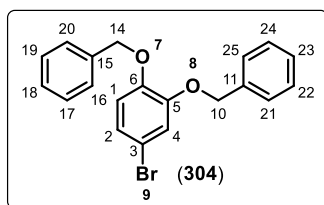
- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, methanol-*d*₄)** : 6.88 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₄), 6.77 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H₂), 6.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₁) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, methanol-*d*₄)** : [147.6, 145.92 (C₅ & C₆)], 123.4 (C₂), 119.32 (C₄), 117.62 (C₁), 111.86 (C₃) ;
- **HRMS (ESI -)** : m/z [M-H]⁻ : 186.9405, calculated for C₆H₄⁷⁹BrO₂⁻ : 186.9400.

2.2.1.2 Benzylation of bromocatechol



To a stirred solution of bromocatechol (1.0 eq., 3.78 g, 20 mmol) in acetone (96 mL), K_2CO_3 (3 eq., 8.25 g, 60 mmol) and benzyl bromide (3 eq., 7.20 mL, 10.38 g, 60 mmol) were added. The mixture was heated to reflux for 3h. After cooling, the solid pellets were eliminated by filtration and washed with acetone. The combine filtrates were concentrated under pressure affording a grey powder. Purification by flash chromatography (C18 – H_2O + 0.1% formic acid/ CH_3CN : 1:1) afforded 1,2-dibenzyloxy-4-bromobenzene (**304**) as a white powder (3.37 g, yield : 46%) and 1,2-dibenzyloxy-4,5-dibromobenzene (**391**) as a yellow powder (yield : 4%).

→ 1,2-dibenzyloxy-4-bromobenzene (304)

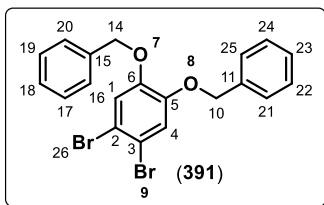


Chemical formula : $C_{20}H_{17}BrO_2$

Molecular weight : 369,26 g/mol

- 1H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform- d_1) : 7.35 (m, 11H, H_{16-20} & H_{21-25}), 7.08 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H_4), 7.00 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H, H_2), 6.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_1) ;
- ^{13}C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform- d_1) : [149.9, 148.2 (C_5, C_6)], [136.9, 136.6 (C_{11}, C_{15})], [128.5, 128.5 (4C, $C_{17}, C_{19}, C_{22}, C_{24}$)], [128.0, 127.9 (C_{18}, C_{23})], [127.3, 127.3 (4C, $C_{16}, C_{20}, C_{21}, C_{25}$)], 124.2 (C_2), 118.3 (C_4), 116.6 (C_1), 113.5 (C_3) ;
- IR (neat) ν_{max} cm^{-1} : 1587, 1498, 1454, 1404, 1381, 1325, 1292, 1253, 1211, 1134, 1080, 1012, 916, 881, 837, 796, 736, 696, 624 ;
- HRMS (ESI +) : m/z $[M+Na]^+$: 391.0304, calculated for $C_{20}H_{17}^{79}BrNaO_2^+$: 391.0304 ; $[M+NH_4]^+$: 386.0748, calculated for $C_{20}H_{21}^{79}BrNO_2^+$: 386.0750.

→ 1,2-dibenzoyloxy-4,5-dibromobenzene (391)



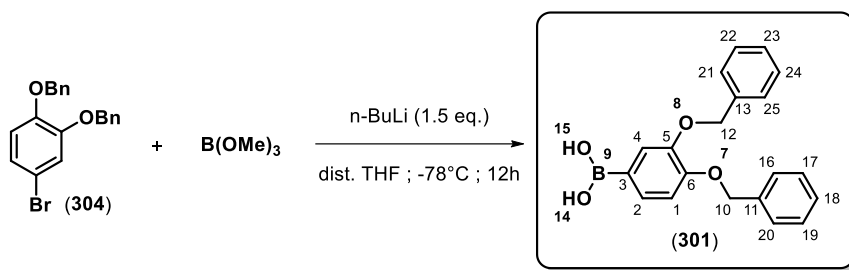
Chemical formula : C₂₀H₁₆Br₂O₂

Molecular weight : 448,15 g/mol

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.36 (m, 11H, H₁₆₋₂₀ & H₂₁₋₂₅), 7.17 (s, 2H, H₁ & H₄), 5.11 (s, 4H, H₁₀ & H₁₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 148.9 (2C, C₅, C₆), 136.2 (2C, C₁₁, C₁₅), 128.6 (4C, C₁₇, C₁₉, C₂₂, C₂₄), 128.1 (2C, C₁₈, C₂₃), 127.3 (4C, C₁₆, C₂₀, C₂₁, C₂₅), 119.5 (2C, C₁, C₄), 115.5 (2C, C₂, C₃), 71.6 (2C, C₁₀, C₁₄) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1571, 1558, 1496, 1452, 1425, 1400, 1369, 1288, 1255, 1215, 1180, 1080, 1008, 974, 916, 896, 844, 831, 796, 734, 694, 651 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+NH₄]⁺ : 465.9843, calculated for C₂₀H₂₀⁷⁹Br⁸¹BrNO₂⁺ : 465.9835.

2.2.1.3 Borylation of dibenzyloxy-bromocatechol

1,2-dibenzyloxy-4-bromobenzeneboronic acid (301)



Chemical formula : C₂₀H₁₉BO₄

Molecular weight : 334,18 g/mol

To a stirred solution of the 1,2-dibenzyloxy-4-bromobenzene (**304**) (1.0 eq., 1 g, 2.8 mmol) in THF (12 mL) cooled to -78°C, n-BuLi (2.5 M in hexane, 1.5 eq., 1.6 mL, 4 mmol) was added slowly. Once the addition is complete, the reaction mixture was stirred for 45 min at -78°C. Then, trimethylborate (3.5 eq., 1.06 mL, 9.5 mmol) was added slowly and the solution was allowed to warm up to room temperature. After an overnight stirring, the reaction was quenched with a 2M-hydrochloric solution. The reaction mixture was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure affording a white oil. Crude product was diluted with a minimum of dichloromethane (10 mL) and a few drops of petroleum ether were added slowly until precipitation. The mixture was then left at 4°C for 2h and the supernatant was left over, affording the title compound (**301**) as a white amorphous solid (314 mg, yield : 35%).

The spectral analysis correspond to a trimeric form in equilibrium with a monomeric form (≈ 20%). The description below corresponds to the trimeric form.^y

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) :** 7.72 (s, 1H, H₄), 7.43 (m, 16H, H₁₆₋₂₀ & H₂₁₋₂₅), 7.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₁ & H₂), 5.27 (s, 4H, H₁₀ & H₁₂) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) :** [153.0, 148.4 (C₆, C₅)], [137.5, 137.0 (C₁₁, C₁₃)], [130.4, 128.5, 127.9, 127.5, 127.2 (11C, C₂, C₁₆₋₂₀, C₂₁₋₂₅)], 121.9 (C₄), 113.8 (C₁), [71.8, 70.8 (C₁₀, C₁₂)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3063, 3034, 2861, 1597, 1517, 1454, 1412, 1343, 1323, 1254, 1194, 1136, 1024, 1002, 936, 916, 875, 847, 814, 790, 740, 713, 693 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+NH₄]⁺ : 352.1717, calculated for C₂₀H₂₃BNO₄⁺ : 352.1715.

^y **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** of the monomeric form : 7.72 (s, 1H, H₄), 7.43 (m, 16H, H₁₆₋₂₀, H₂₁₋₂₅), 6.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₁, H₂), 5.20 (s, 2H, CH₂Ph), 5.19 (s, 2H, CH₂Ph).

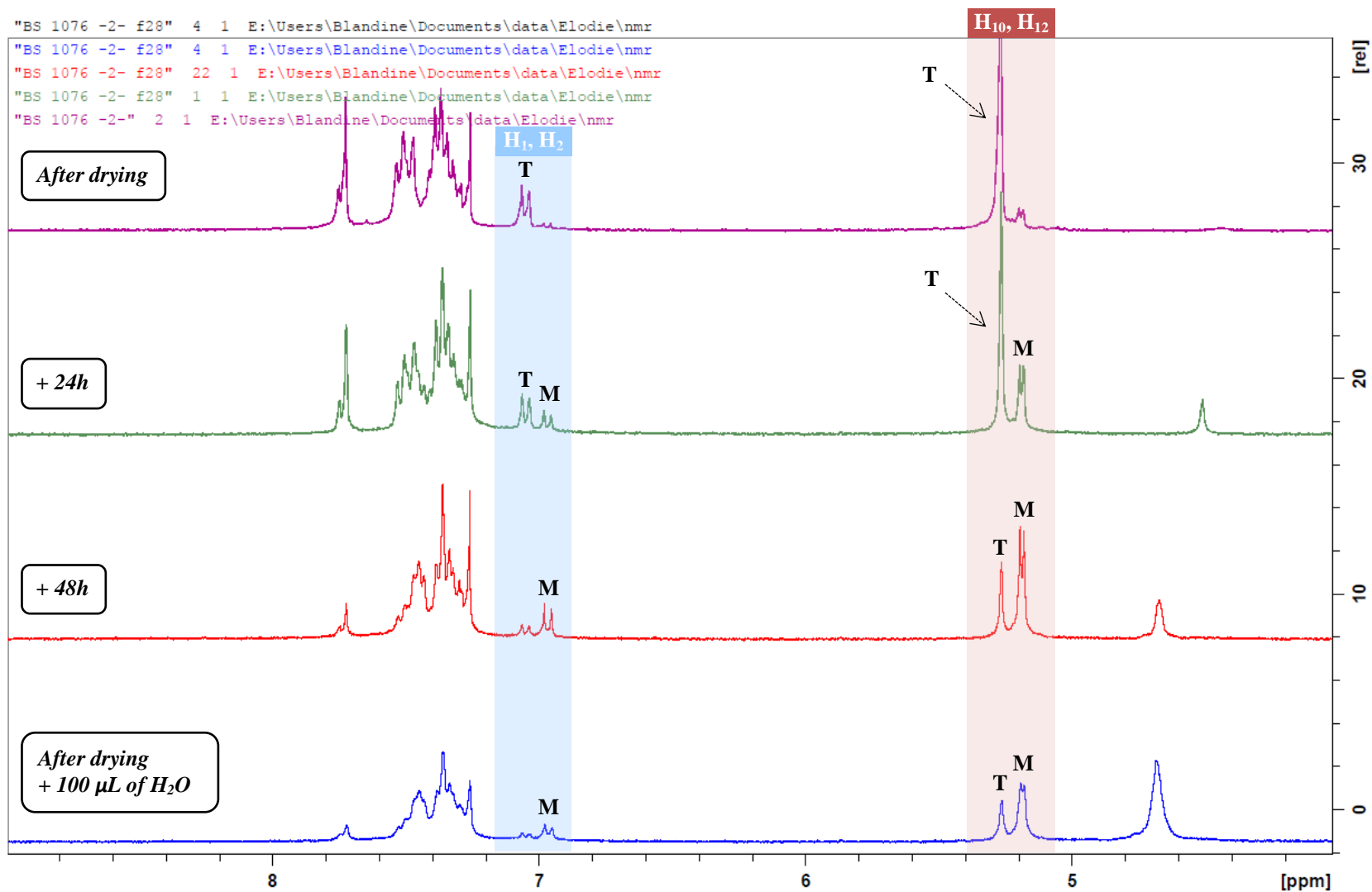
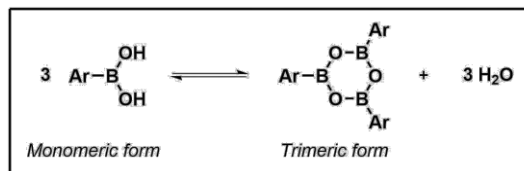
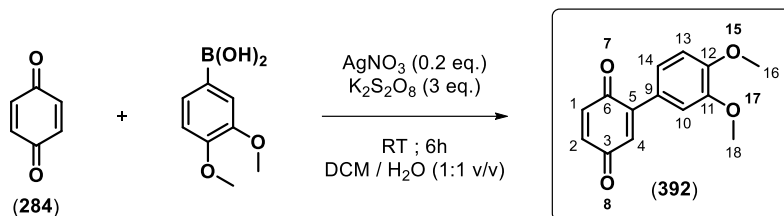


Figure 87 – Evolution of the proportion of the trimeric form and the monomeric form of compound (**301**) as a function of the amount of water. The analysis were recorded in DMSO-*d*₆ after 48h of stirring (abbreviations : **T**, trimeric form ; **M**, monomeric form).

2.2.2 Terphenylquinones synthesis

2.2.2.1 Synthesis of terphenylquinone by P. Baran's method

2-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (392)



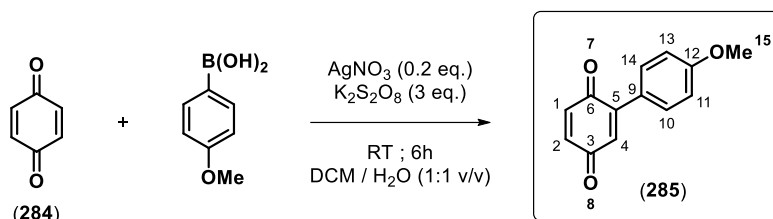
Chemical formula : $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$

Molecular weight : 244.25 g/mol

To a solution of 1,4-benzoquinone (284) (1.0 eq., 4.8 mmol, 500 mg) in dichloromethane (40 mL), 3,4-dimethoxyboronic acid (1.5 eq., 8.3 mmol, 1.514 g), H_2O (23 mL) and a solution of AgNO_3 (0.2 eq., 162 mg in 17 mL of water) were added. Then, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (3.0 eq., 3.846 g) was added and the reaction mixture was stirred vigorously at room temperature for 6h. A second batch of AgNO_3 and $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ was added after 3h of reaction. Upon consumption of 1,4-benzoquinone (284), the reaction was diluted with dichloromethane (50 mL) and washed with water (3x30 mL). The organic layer was collected and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (20 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO_4 , concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (Petroleum ether/ CH_2Cl_2 : 1:1), affording the title product (392) as a dark purple amorphous solid (783 mg, yield : 69%).

- **^1H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform- d_1)** : 7.15 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, H_{14}), 7.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H_{10}), 6.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_{13}), 6.83 (m, 3H, $\text{H}_1, \text{H}_2, \text{H}_4$), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3) ;
- **^{13}C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform- d_1)** : [187.7, 187.2 (C_3, C_6)], [151.3, 149.1, 145.4 ($\text{C}_5, \text{C}_{10}, \text{C}_{11}$)], [137.3, 136.4, 131.4 ($\text{C}_1, \text{C}_2, \text{C}_4$)], 125.4 (C_9), 122.9 (C_{14}), [112.4, 111.3 ($\text{C}_{10}, \text{C}_{13}$)], [56.2, 56.1 ($\text{C}_{16}, \text{C}_{18}$)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm^{-1}** : 3078, 3041, 3003, 2974, 2951, 2912, 2835, 1651, 1589, 1577, 1514, 1477, 1467, 1448, 1436, 1419, 1371, 1336, 1278, 1255, 1222, 1166, 1145, 1091, 1028, 921, 900, 860, 833, 794, 777, 759, 644 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 245.0809, calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4^+$: 245.0808.

2-(4-methoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (285)



Chemical formula : $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$

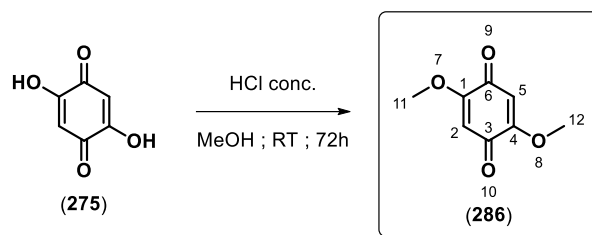
Molecular weight : 214.22 g/mol

To a solution of 1,4-benzoquinone (**284**) (1 eq., 1.9 mmol, 200 mg) in dichloromethane (16 mL), 4-methoxyboronic acid (1.5 eq., 2.8 mmol, 425 mg), H_2O (9.5 mL) and a solution of AgNO_3 (0.2 eq., 65 mg in 6.5 mL of water) were added. Then, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ was added (3 eq., 1.539 g) and the reaction mixture was stirred vigorously at room temperature for 6h. A second batch of AgNO_3 and $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ was added after 3h of reaction. Upon consumption of 1,4-benzoquinone (**284**), the reaction was diluted with dichloromethane (50 mL) and washed with water (3x30 mL). The organic layer was collected and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (20 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (Petroleum ether – CH_2Cl_2 : 1:1), affording the title product (**285**) as an orange amorphous solid (345 mg, yield : 87%).

- $^1\text{H NMR}$ δ ppm (400 MHz, chloroform- d_1) : 7.48 (dt, $J = 8.9, 2.1$ Hz, 2H, $\text{H}_{10}, \text{H}_{14}$), 6.97 (dt, $J = 8.9, 2.2$ Hz, 2H, $\text{H}_{11}, \text{H}_{13}$), 6.82 (m, 3H, $\text{H}_1, \text{H}_2, \text{H}_4$), 3.86 (s, 3H, H_{15}) ;
- $^{13}\text{C NMR}$ δ ppm (101 MHz, chloroform- d_1) : 187.8 (C_6), 187.3 (C_3), 161.6 (C_{12}), 145.4 (C_5), [136.7, 136.4 (C_1, C_2)], 131.3 (C_4), 131.0 (2C, $\text{C}_{10}, \text{C}_{14}$), 125.1 (C_9), 114.3 (2C, $\text{C}_{11}, \text{C}_{13}$), 55.6 (C_{16}) ;
- **IR** (neat) ν_{max} cm^{-1} : 1654, 1643, 1602, 1589, 1508, 1465, 1440, 1344, 1300, 1249, 1178, 1116, 1103, 1029, 1010, 977, 947, 925, 850, 825, 781, 653 ;
- **HRMS** (ESI +) : m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 215.0647, calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_3^+$: 215.0703.

2.2.2.2 Methylation of dihydroxybenzoquinone

2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone (286)



Chemical formula : C₈H₈O₄

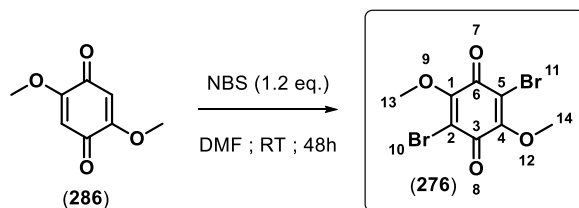
Molecular weight : 168.15 g/mol

To a solution of 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone (**275**) (79 mmol, 11,1 g) in MeOH (650 mL), an aqueous solution of HCl (37%, 24 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 days. A precipitate was formed, collected by filtration and washed with Et₂O (50 mL), affording (**286**) as a yellow amorphous solid (12,31 g, yield : 92%).

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 5.87 (s, 2H, H₂, H₅), 3.84 (s, 6H, H₁₁, H₁₂) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 181.6 (2C, C₃, C₆), 159.6 (2C, C₁, C₄), 105.5 (2C, C₂, C₅), 56.6 (2C, C₁₁, C₁₂) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1664, 1595, 1508, 1456, 1436, 1373, 1286, 1230, 1203, 997, 871, 607 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 169.0495, calculated for C₈H₉O₄⁺ : 169.0495.

2.2.2.3 Bromination of dimethoxybenzoquinone

2,5-dibromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (276)



Chemical formula : C₈H₆Br₂O₄

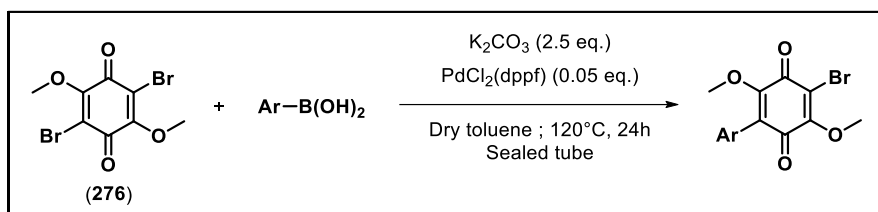
Molecular weight : 325.94 g/mol

To a solution of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone (**286**) (1.0 eq., 73 mmol, 12,31 g) in DMF (200 mL), NBS (1.2 eq., 84 mmol, 15 g) was added slowly. After 2 days of stirring at room temperature, the reaction mixture was diluted with H₂O (400 mL). The orange precipitate was collected by filtration and washed with water, affording the title compound (**276**) as an orange amorphous solid (10.19 g, yield : 76%).

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 4.45 (s, 6H, H₁₃, H₁₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (100 MHz, chloroform-*d*₁)** : 174.7 (2C, C₃, C₆), 156.4 (2C, C₁, C₄), 114.9 (2C, C₂, C₅), 62.2 (2C, C₁₃, C₁₄) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3023, 2958, 2855, 1703, 1649, 1564, 1455, 1440, 1332, 1209, 1153, 1052, 893, 786, 736 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 326.8691, calculated for C₈H₇⁷⁹Br⁸¹BrO₄⁺ : 326.8685.

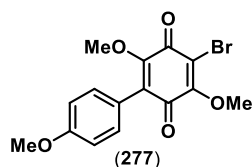
2.2.2.4 Pd^{II}-catalysed first monofunctionalization of benzoquinone

General procedure 1a :

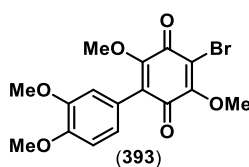


A flame-dried 250 mL sealed vial was filled with 2,5-dibromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (1 eq., 6 mmol) and the corresponding boronic acid (1.1 eq., 6.6 mmol). Then, toluene (50 mL) was added and the solution was flushed with argon. Then, $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (0.05 eq., 0,3 mmol) and K_2CO_3 (2.5 eq., 15 mmol) were added and the reaction mixture was heated to 120°C for 24h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified directly by flash chromatography (Petroleum ether/ CH_2Cl_2 : 8:2) to afford the monoarylated benzoquinone.

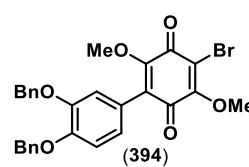
List of compounds synthesized by general procedure 1a :



Synthesis and description page 290

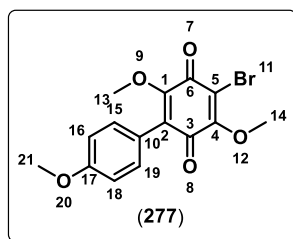


Synthesis and description page 291



Synthesis and description page 292

2-bromo-3,6-dimethoxy-5-(4-methoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (277)



Chemical formula : C₁₅H₁₃BrO₅

Molecular weight : 353.17 g/mol

- **Procedure A** – “Microwave”

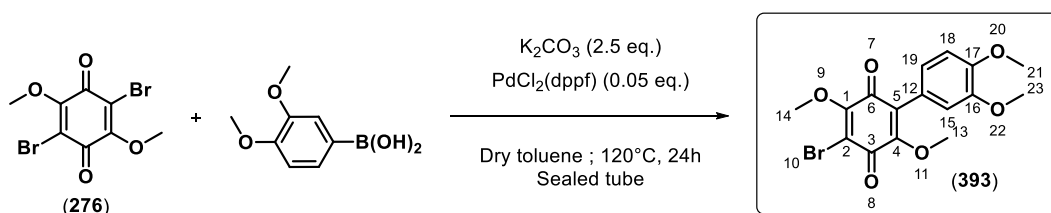
A 10 mL microwave vial was filled with 2,5-dibromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (**276**) (1 eq., 0.6 mmol, 195 mg) and 4-methoxyphenylboronic acid (1.1 eq., 0.66 mmol, 100 mg) in dried toluene (5 mL) and the solution was left under ultrasound irradiation under argon for 1h. Then PdCl₂(dppf) (5% mol., 30 μmol, 22 mg) and K₂CO₃ (2.5 eq., 1.5 mmol, 207 mg) are added, the reaction vial was sealed and heated under microwaves irradiation at 120°C for 12h. After cooling to 55°C, the reaction crude was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (Petroleum ether/CH₂Cl₂ : 8:2) affording (**277**) a red amorphous solid (yield : 75%).

- **Procedure B** – “Thermal heating”

General procedure 1a was also followed to give product (**277**) in 75% yield as a red amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (200 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.24 (dt, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2H, H₁₅, H₁₉), 6.96 (dt, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2H, H₁₆, H₁₈), 4.22 (s, 3H, H₂₁), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : [181.5, 177.1 (C₃, C₆)], 160.0 (C₁₇), [156.7, 154.5 (2C, C₁, C₄)], 131.9 (2C, C₁₅, C₁₉), 126.5 (C₁₀), 121.6 (C₂), 115.1 (C₅), 113.6 (2C, C₁₆, C₁₈), [61.97, 61.95 (C₁₃, C₁₄)], 55.3 (C₂₁) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3014, 2954, 2852, 1654, 1604, 1581, 1510, 1456, 1440, 1319, 1303, 1292, 1247, 1222, 1176, 1124, 1029, 954, 910, 835, 806, 746, 667, 642, 607 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 353.0062, calculated for C₁₅H₁₄⁷⁹BrO₅⁺ : 353.0019.

2-bromo-3,6-dimethoxy-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (393)



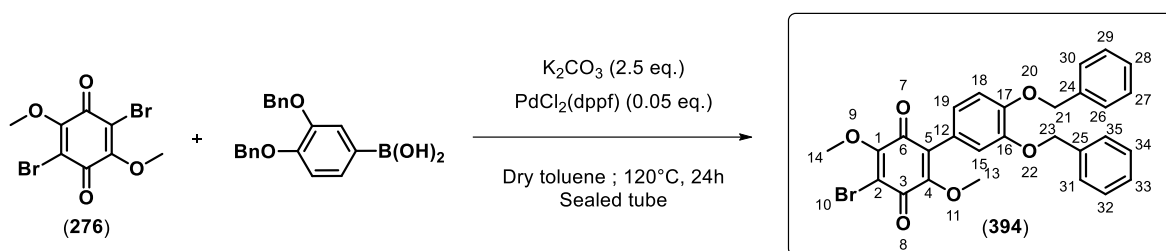
Chemical formula : $C_{16}H_{15}BrO_6$

Molecular weight : 383.19 g/mol

General procedure 1a was followed to give product **(393)** in 5% yield as a red amorphous solid.

- 1H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform- d_1) : 6.94-6.82 (m, 3H, H_{15} , H_{18} , H_{19}), 4.22 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3) ;
- ^{13}C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform- d_1) : [181.4, 177.0 (2C, C_3 , C_6)], [156.6, 154.5, 149.6, 148.4 (4C, C_1 , C_4 , C_{16} , C_{17})], [126.3, 121.8, 115.0 (3C, C_2 , C_5 , C_{12})], [123.5, 113.7, 110.6 (3C, C_{15} , C_{18} , C_{19})], [62.0, 61.6 (2C, C_{13} , C_{14})], [55.94, 55.85 (2C, C_{21} , C_{23})];
- IR (neat) ν_{max} cm^{-1} : 2954, 1662, 1585, 1516, 1456, 1315, 1265, 1249, 1222, 1170, 1143, 1120, 1043, 1026, 962, 810, 756, 609 ;
- HRMS (ESI +) : m/z $[M+H]^+$: 383.0125, calculated for $C_{16}H_{16}^{79}BrO_6^+$: 383.0125.

2-bromo-3,6-dimethoxy-5-(3,4-benzyloxyphenyl)-1,4-benzoquinone (394)



Chemical formula : $C_{28}H_{23}BrO_6$

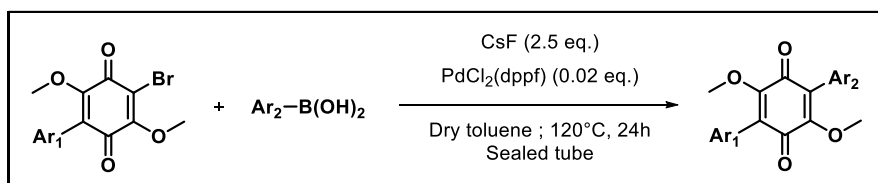
Molecular weight : 535.39 g/mol

General procedure 1a was followed to give product **(394)** as a red amorphous solid.

- **1H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform- d_1)** : 7.48-7.32 (m, 10H, H_{26-35}), 7.00 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_{18}), 6.91 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_{15}), 6.85 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H, H_{19}), 5.21 (s, 2H, OCH_2Ph), 5.18 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.21 (s, 3H, OCH_3), & 3.69 (s, 3H, OCH_3) ;
- **^{13}C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform- d_1)** : [181.4, 177.1 (C_3, C_6)], [156.8, 154.6 (C_1, C_4)], [149.9, 148.3 (C_{16}, C_{17})], [137.2, 137.1 (C_{24}, C_{25})], [128.7, 128.6 (4C, $C_{27}, C_{29}, C_{33}, C_{35}$)], [128.0, 127.9 (C_{28}, C_{34})], [127.4, 127.4 (4C, $C_{26}, C_{30}, C_{31}, C_{35}$)], 126.2 (C_{12}), 124.5 (C_{19}), 122.5 (C_5), 117.9 (C_{18}), 115.2 (C_2), 114.0 (C_{15}), [71.5, 71.2 (C_{21}, C_{23})], [62.0, 61.6 (C_{13}, C_{14})];
- **IR (neat)** will be recorded as soon as possible ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z $[M+H]^+$: 535.0750, calculated for $C_{28}H_{24}^{79}BrO_6^+$: 535.0751.

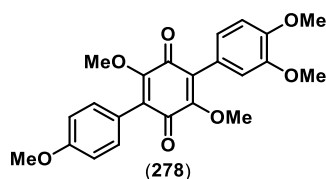
2.2.2.5 Pd^{II}-catalysed second monofunctionalisation of benzoquinone

General procedure 1b :



A solution of 2-phenyl-5-bromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (1.0 eq., 6 mmol) and the corresponding boronic acid (1.1 eq., 6.6 mmol) in dried toluene (50 mL) was flushed with argon. Then, PdCl₂(dppf) (0.02 eq., 120 μmol) and CsF (2.5 eq., 15 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 120°C for 24h. After cooling, the crude mixture was dried under reduced pressure and purified by flash chromatography (Petroleum ether/CH₂Cl₂/CH₃CN : 70:27:3) affording the corresponding terphenylquinone.

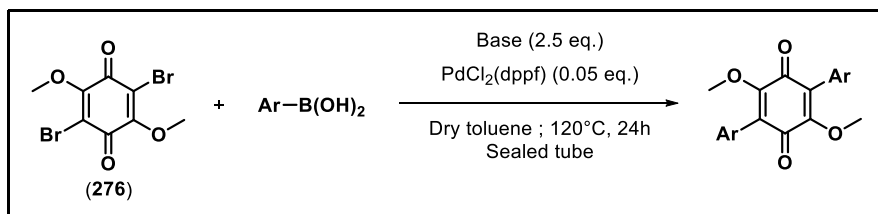
List of compounds synthesized by general procedure 1b :



Synthesis and description page 305

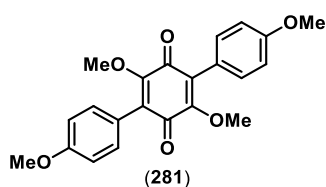
2.2.2.6 One-pot Pd^{II}-catalysed homo-difunctionalization of benzoquinone

General procedure 2 :

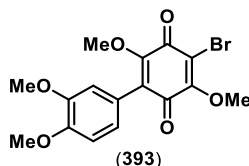


A flame-dried 250 mL sealed vial was filled with 2,5-dibromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (**276**) (1.0 eq., 6 mmol) and the corresponding boronic acid (2.2 eq., 13.2 mmol). Then, toluene (50 mL) was added and the solution was flushed with argon. Then, $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (0.05 eq., 300 μmol) and a base (2.5 eq., 15 eq.) were added and the reaction mixture was heated to 120°C for 24h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified directly by flash chromatography (Petroleum ether/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$: 70:27:3) affording the homo-difunctionalized benzoquinone.

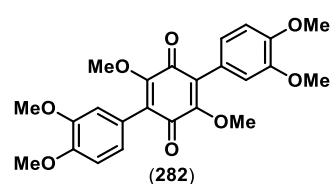
List of compounds synthesized by general procedure 2 :



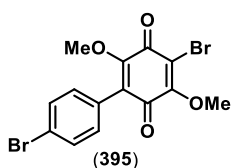
Synthesis and description page 295



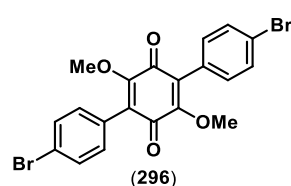
Synthesis page 296
Description page 291



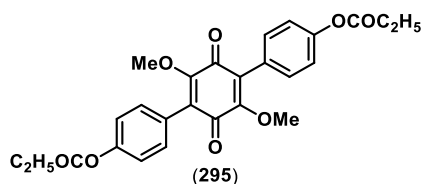
Synthesis and description page 296



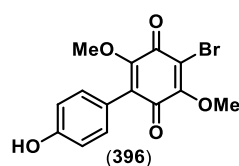
Synthesis page 297
Description page 298



Synthesis and description page 297

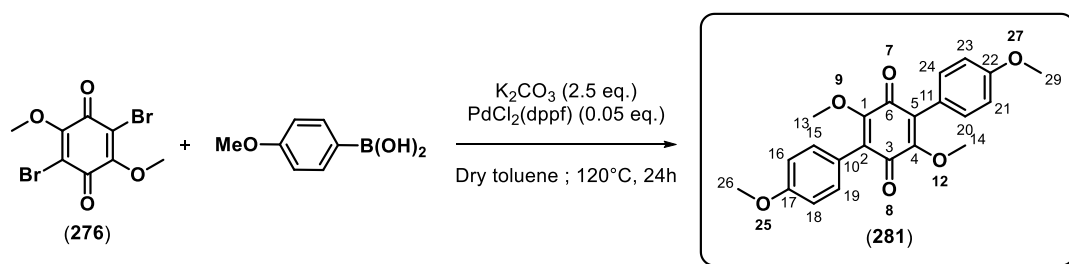


Synthesis page 299
Description page 299



Synthesis page 299
Description page 300

2,5-dimethoxy-3,6-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (281)



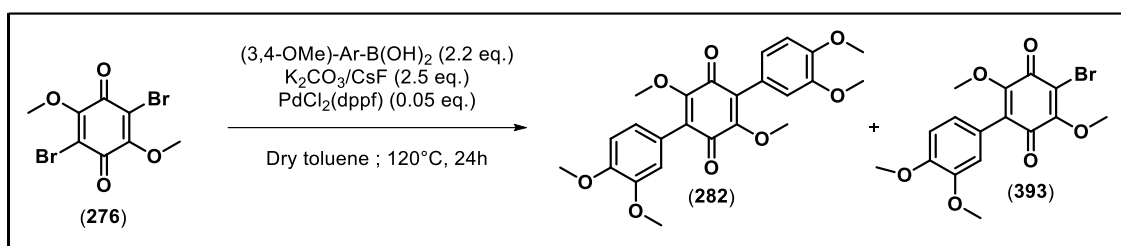
Chemical formula : $C_{22}H_{20}O_6$

Molecular weight : 380.40 g/mol

General procedure 2 was followed using K_2CO_3 (resp. CsF – 4.5 eq.) as base to give product (281) in 44% yield (resp. 38% yield) as a red amorphous solid.

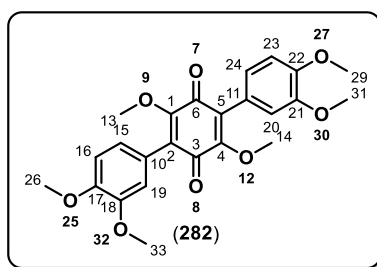
- **1H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform- d_1) :** 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H, H₁₅, H₁₉, H₂₀, H₂₄), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H, H₁₆, H₁₈, H₂₁ & H₂₃), 3.85 (s, 6H, OCH₃), 3.83 (s, 6H, OCH₃) ;
- **^{13}C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform- d_1) :** 183.8 (2C, C₃, C₆), 159.8 (2C, C₁₇, C₂₂), 154.5 (2C, C₁, C₄), 132.00 (4C, C₁₅, C₁₉, C₂₀, C₂₄), 127.1 (2C, C₁₀, C₁₁), 122.2 (2C, C₂, C₅), 113.5 (4C, C₁₆, C₁₈, C₂₁, C₂₃), 61.4 (C₁₃, C₁₄), 55.3 (C₂₆, C₂₉) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm^{-1} :** 2995, 2947, 2824, 1648, 1605, 1587, 1509, 1444, 1320, 1300, 1287, 1253, 1182, 1107, 1050, 1034, 941, 924, 844, 820, 783, 748, 656 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z $[M+H]^+$: 381.1339, calculated for $C_{22}H_{21}O_6^+$: 381.1333.

Synthesis of compounds (282) and (393)



General procedure 2 was followed using K₂CO₃ as base to give product (282) in 7% yield as a brown amorphous solid (cf description below). Alternatively, using CsF as base, product (282) was obtained in 25% yield. The monoarylated compound (393) was afforded as a minor product of this reaction sequence (red amorphous solid, 9% yield) (cf description page 291).

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (282)

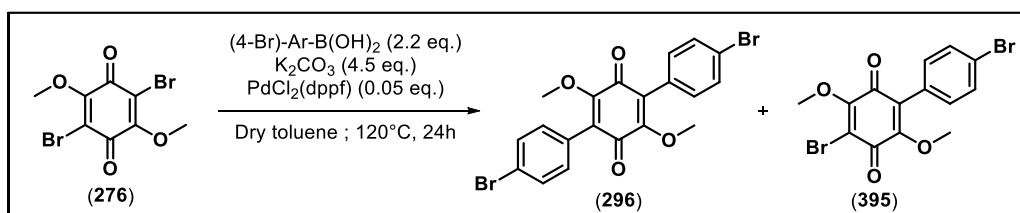


Chemical formula : C₂₄H₂₄O₈

Molecular weight : 440.45 g/mol

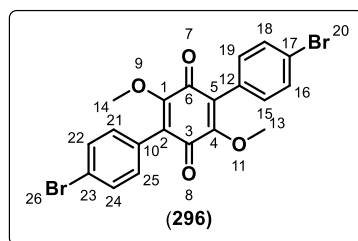
- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) :** 6.95 (s, 2H, H₁₉, H₂₀), 6.94 (d, *J* = 14.7 Hz, 4H, H₁₅, H₁₆, H₂₃ & H₂₄), 3.93, 3.89 & 3.82 (18H, H₁₃, H₁₄, H₂₆, H₂₉, H₃₁, H₃₃, s) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) :** 183.7 (2C, C₃, C₆), [154.6, 149.5, 148.4, 126.5, 122.4 (10C, C₁, C₂, C₄, C₅, C₁₀, C₁₁, C₁₇, C₁₈, C₂₁, C₂₂)], 123.7 (6C, C₁₅, C₁₆, C₁₉, C₂₀, C₂₃, C₂₄), [61.4, 56.0 (4C, C₁₃, C₁₄, C₂₆, C₂₉)], 127.1 (2C, C₁₀, C₁₁), 122.2 (6C, C₁₃, C₁₄, C₂₆, C₂₉, C₃₁, C₃₃) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3022, 3002, 2963, 2840, 1644, 1594, 1516, 1462, 1434, 1411, 1333, 1300, 1274, 1256, 1225, 1170, 1143, 1100, 1052, 1038, 1019, 951, 863, 823, 786, 758, 671, 623 ;
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M+H]⁺ : 441.1494, calculated for C₂₄H₂₅O₈⁺ : 441.1544.

Synthesis of compounds (296) and (395)



General procedure 2 was followed using K₂CO₃ as base (4.5 eq.) to give product (296) in 36% yield as a bright orange amorphous solid (cf description bellow). The monoarylated compound (395) is afforded as a minor product of this reaction sequence (bright red amorphous solid, 25% yield) (cf description page 298).

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bis(4-bromophenyl)-1,4-benzoquinone (296)

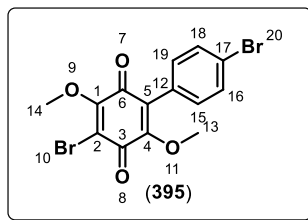


Chemical formula : C₂₀H₁₄Br₂O₄

Molecular weight : 478.14 g/mol

- ¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H, H₁₆, H₁₈, H₂₂, H₂₄), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H, H₁₅, H₁₉, H₂₁, H₂₅), 3.88 (s, 6H, H₁₃, H₁₄) ;
- ¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) : 182.8 (2C, C₃, C₆), 154.7 (2C, C₁, C₄), [132.2, 131.2 (8C, C₁₅, C₁₆, C₁₈, C₁₉, C₂₁, C₂₂, C₂₄, C₂₅)], [128.9, 125.8, 123.0 (6C, C₂, C₅, C₁₀, C₁₂, C₁₇, C₂₃)], 61.7 (2C, C₁₃, C₁₄) ;
- IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ : 1734, 1716, 1683, 1591, 1558, 1543, 1508, 1487, 1456, 1436, 1417, 1394, 1338, 1313, 1296, 1186, 1105, 1074, 1049, 1008, 925, 833, 812, 754, 613 ;
- HRMS (ESI +) : m/z [M+H]⁺ : 478.9309, calculated for C₂₀H₁₅⁷⁹Br⁸¹BrO₄⁺ : 478.9311.

→ **3-bromo-2,5-dimethoxy-6-(4-bromophenyl)-1,4-benzoquinone (395)**



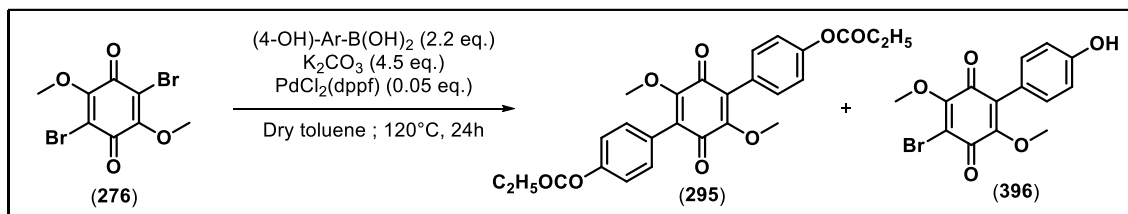
Chemical formula : C₁₄H₁₀Br₂O₄

Molecular weight : 402.04 g/mol

The title compound was afforded as a minor product of the reaction sequence synthesizing symmetrical compound (**296**) (bright red amorphous solid, 25% yield).

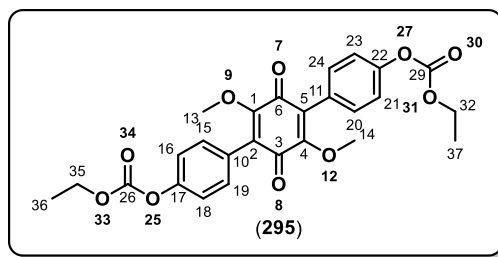
- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H₁₆, H₁₈), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H₁₅, H₁₉), 4.19 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : [180.6 & 176.8 (C₃, C₆)], [156.6, 154.7 (C₁, C₄)], [132.1, 131.2 (4C, C₁₅, C₁₆, C₁₈, C₁₉)], [128.5, 125.5, 123.1, 115.0 (C₂, C₅, C₁₂, C₁₇)], [62.0, 61.8 (C₁₃, C₁₄)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1662, 1577, 1558, 1543, 1508, 1489, 1456, 1394, 1321, 1257, 1226, 1126, 1072, 1045, 1012, 910, 806 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 402.9001, calculated for C₁₄H₁₁⁷⁹Br⁸¹BrO₄⁺ : 402.8998.

Synthesis of compounds (295) and (396)



General procedure 2 was followed using K₂CO₃ as base (4.5 eq.) to give product (295) in 2% yield as a red oil (cf description bellow). The monoarylated compound (396) is afforded as a side product of this reaction sequence (dark red amorphous solid, 3% yield) (cf description page 300).

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bis(4-phenylpropionate)-1,4-benzoquinone (295)

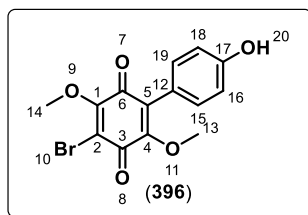


Chemical formula : C₂₆H₂₄O₁₀

Molecular weight : 496.47 g/mol

- ¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, H₁₅, H₁₉, H₂₀, H₂₄), 6.88 (d, *J* = 8.46 Hz, 4H, H₁₆, H₁₈, H₂₁, H₂₃), 4.53 (q, *J* = 14.1, 7.0 Hz, 4H, H₃₁, H₃₃), 3.82 (s, 6H, H₁₃, H₁₄), 1.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, H₃₂, H₃₅) ;
- ¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) : 181.6 (2C, C₂₆, C₂₉), 177.3 (2C, C₃, C₆), [156.7, 156.3, 154.5 (4C, C₁, C₄, C₁₇, C₂₂)], 132.06 (4C, C₁₅, C₁₉, C₂₀, C₂₄), [126.5, 121.6, 116.1 (4C, C₂, C₅, C₁₀, C₁₁)], 115.1 (4C, H₁₆, H₁₈, H₂₁, H₂₃), 71.00 (2C, C₃₂, C₃₅), 61.6 (2C, C₁₃, C₁₄), 16.0 (2C, C₃₆, C₃₇) ;
- IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ : 2347, 2312, 1662, 1653, 1635, 1608, 1577, 1558, 1541, 1516, 1458, 1436, 1319, 1253, 1222, 1172, 1130, 1039, 810, 748 ;
- HRMS (ESI +) : m/z [M-2C₃H₄O₂+H]⁺ : 353.0021, calculated for C₂₀H₁₇O₆⁺ : 353.1020.

→ **3-bromo-2,5-dimethoxy-6-(4-hydroxyphenyl)-1,4-benzoquinone (396)**



Chemical formula : C₁₄H₁₁BrO₅

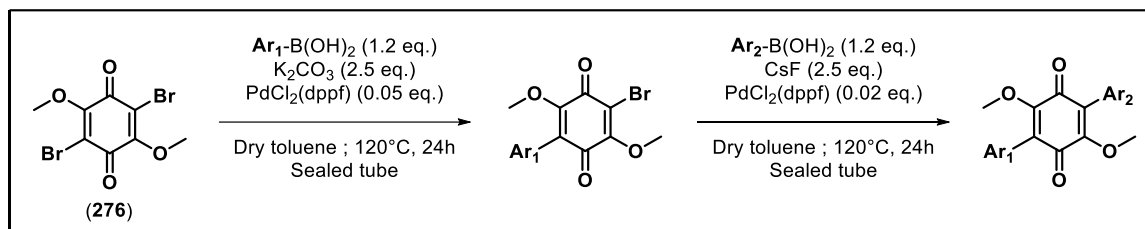
Molecular weight : 339.14 g/mol

The title compound is afforded as a side product of the reaction sequence synthesizing symmetrical compound (**295**) (dark red amorphous solid, 3% yield).

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₆, H₁₈), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₅, H₁₉), 4.48 (s br, 1H, H₂₀), 4.22 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : [181.6, 177.2 (C₃, C₆)], [156.8, 156.3, 154.5 (4C, C₁, C₂, C₄, C₁₇)], [132.1, 115.1 (4C, C₁₅, C₁₆, C₁₈, C₁₉)], [126.5, 121.6 (C₅, C₁₂)], [61.9, 61.6 (C₁₃, C₁₄)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3406, 3018, 2953, 2376, 1654, 1608, 1580, 1514, 1456, 1436, 1317, 1261, 1219, 1174, 1126, 1041, 958, 912, 839, 812, 750, 692, 667 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 338.9862, calculated for C₁₄H₁₂⁷⁹BrO₅⁺ : 338.9863.

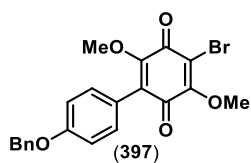
2.2.2.7 *One-pot Pd^{II}-catalysed hetero-difunctionnalization of benzoquinone*

General procedure 3 :

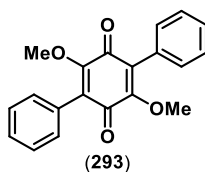


A flame-dried 250 mL sealed vial was filled with 2,5-dibromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (1.0 eq., 6 mmol) and the first boronic acid (1.2 eq., 7.2 mmol). Then, toluene (50 mL) was added and the solution was flushed with argon. Then, $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (0.05 eq., 300 μmol) and K_2CO_3 (2.5 eq., 12 mmol) were added and the reaction mixture was heated to 120°C for 24h. After cooling and TLC monitoring, the second boronic acid (1.2 eq., 7.2 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (0.02 eq., 120 μmol) and CsF (1.2 eq., 7.2 mmol) were added. The reaction mixture was heated to 120°C for 24h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified directly by flash chromatography (Petroleum ether/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$: 70:27:3) affording the hetero-difunctionnalised benzoquinone.

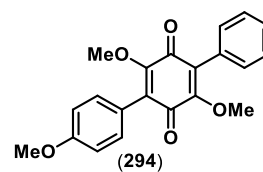
List of compounds synthesized by general procedure 3 :



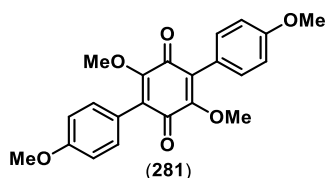
Synthesis page 308
Description page 311



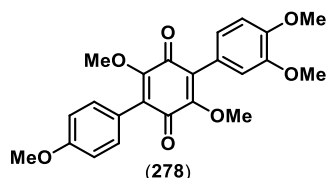
Synthesis page 303
Description page 304



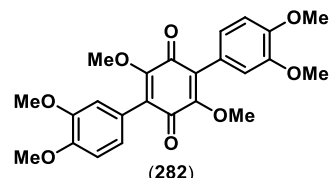
Synthesis page 303
Description page 303



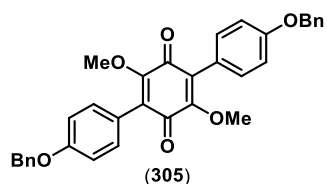
Synthesis page 305
Description page 295



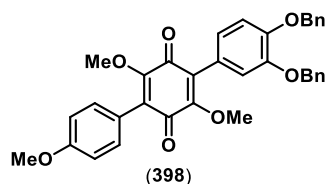
Synthesis page 305
Description page 305



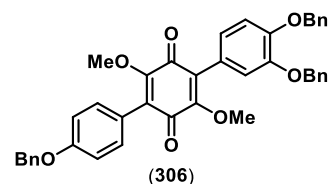
Synthesis page 305
Description page 296



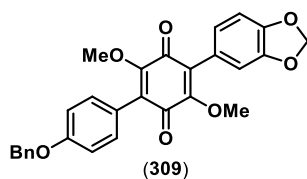
Synthesis pages 308 et 312
Description page 310



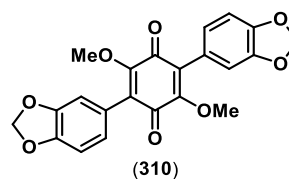
Synthesis page 307
Description page 307



Synthesis page 308
Description page 308

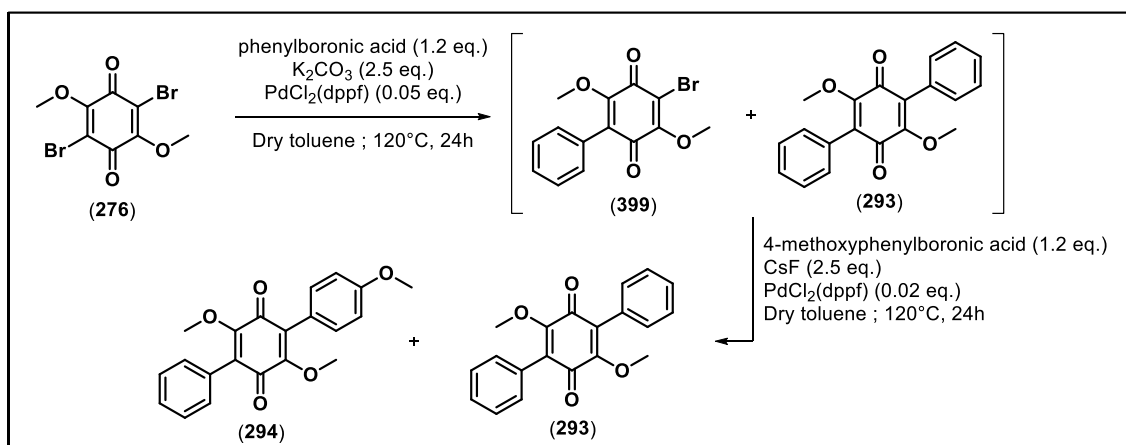


Synthesis page 312
Description page 312



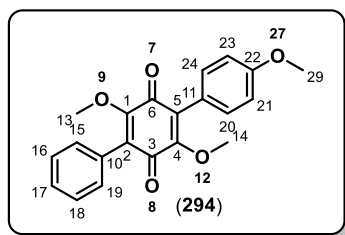
Synthesis page 312
Description page 314

Synthesis of compounds (293) and (294)



General procedure 3 was followed to give product (294) in 58% yield over the two steps as a brown amorphous solid (cf description bellow). Compound (293) was afforded as a minor product of this reaction sequence (brown solid, 31% yield) (cf description page 304).

→ 2,5-dimethoxy-3-phenyl-6-(4-methoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (294)

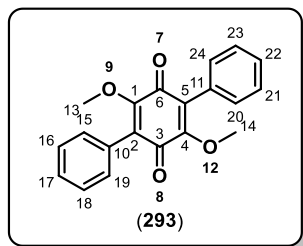


Chemical formula : $C_{21}H_{18}O_5$

Molecular weight : 350.37 g/mol

- 1H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform- d_1) : 7.43 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H, Ar-H), 7.31 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (s, 1H, H_{17}), 6.98 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_{21} , H_{23}), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3) ;
- ^{13}C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform- d_1) : [183.9, 183.7 (C_3 , C_6)], 160.0 (C_{22}), [154.9, 154.6 (C_1 , C_4)], 132.1 (2C, C_{20} , C_{24}), 130.7 (2C, C_{15} , C_{19}), 137.4 (C_{10}), 128.7 (C_{17}), 128.1 (2C, C_{16} , C_{18}), [126.9, 126.8 (C_2 , C_5)], 122.3 (C_{11}), 113.7 (2C, C_{21} , C_{23}), [61.7, 61.6 (C_{13} , C_{14})], 55.43 (C_{29}) ;
- IR (neat) ν_{max} cm^{-1} : 1653, 1606, 1591, 1558, 1543, 1508, 1489, 1458, 1298, 1249, 1178, 1109, 1049, 831, 698 ;
- HRMS (ESI +) : m/z $[M+H]^+$: 351.1227, calculated for $C_{21}H_{19}O_5^+$: 351.1227.

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bisphenyl-1,4-benzoquinone (293)



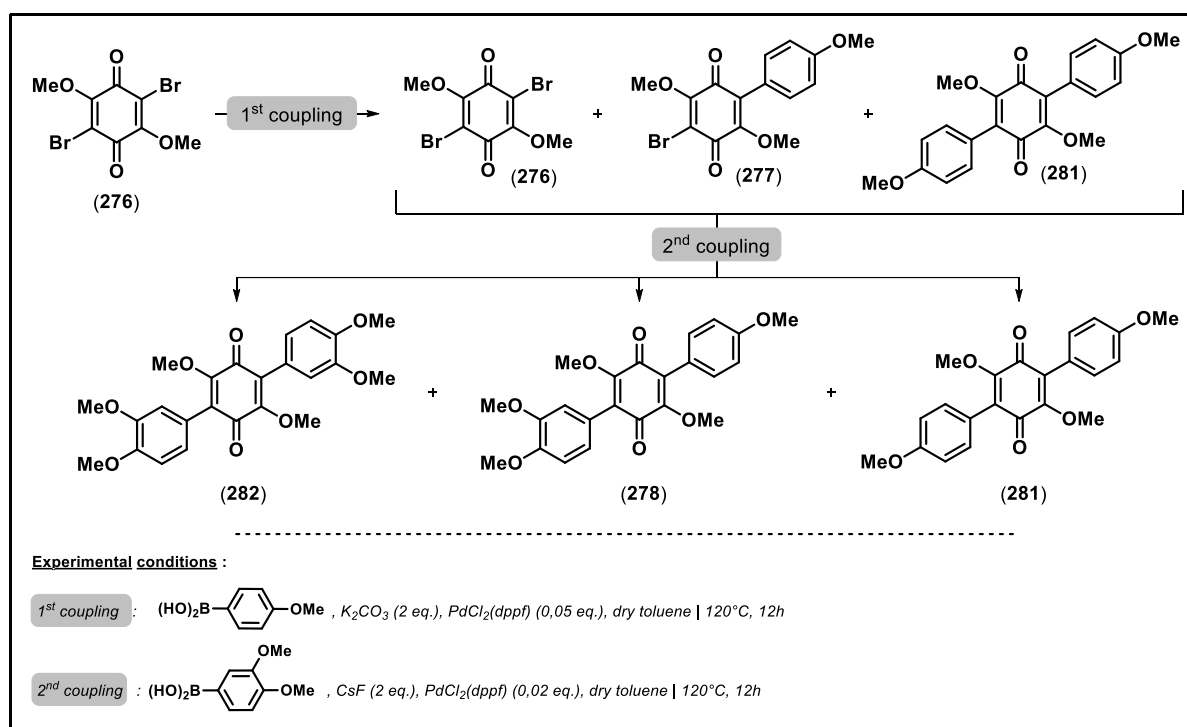
Chemical formula : C₂₀H₁₆O₄

Molecular weight : 320.34 g/mol

The title compound is afforded as a minor product of the reaction sequence synthesizing unsymmetrical compound (**294**) (brown amorphous solid, 31% yield).

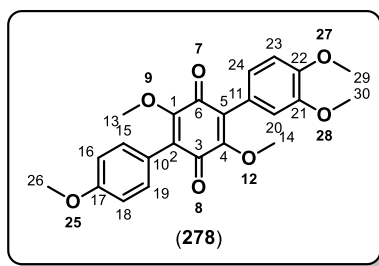
- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.35 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H, H₁₅, H₁₉, H₂₀, H₂₄), 7.42 (m, 2H, H₁₇, H₂₂), 7.35 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H, H₁₆, H₁₈, H₂₁, H₂₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 183.6 (2C, C₃, C₆), 154.9 (2C, C₁, C₄), 130.7 (4C, C₁₅, C₁₉, C₂₀, C₂₄), 130.4 (2C, C₁₀, C₁₁), 128.8 (2C, C₁₇, C₂₂), 128.1 (4C, C₁₆, C₁₈, C₂₁, C₂₃), 126.9 (2C, C₂, C₅), 61.7 (2C, C₁₃, C₁₄) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2954, 2927, 2854, 1761, 1739, 1718, 1691, 1654, 1591, 1570, 1492, 1452, 1396, 1357, 1301, 1207, 1134, 1089, 1041, 1002, 765, 742, 698 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 321.1198, calculated for C₂₀H₁₇O₄⁺ : 321.1121.

Synthesis of compounds (278), (281) and (282)



General procedure 3 was followed to give product (278) in 38% yield over the two steps as a brown amorphous solid (cf description below). During this procedure, two symmetrical compounds were also afforded as minor products : the symmetrical compound (281) (red amorphous solid, 20% yield) (cf description page 295) and the symmetrical compound (282) (brown amorphous solid, 22% yield) (cf description page 296).

→ 2,5-dimethoxy-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)-1,4-benzoquinone (278)



Chemical formula : C₂₃H₂₂O₇

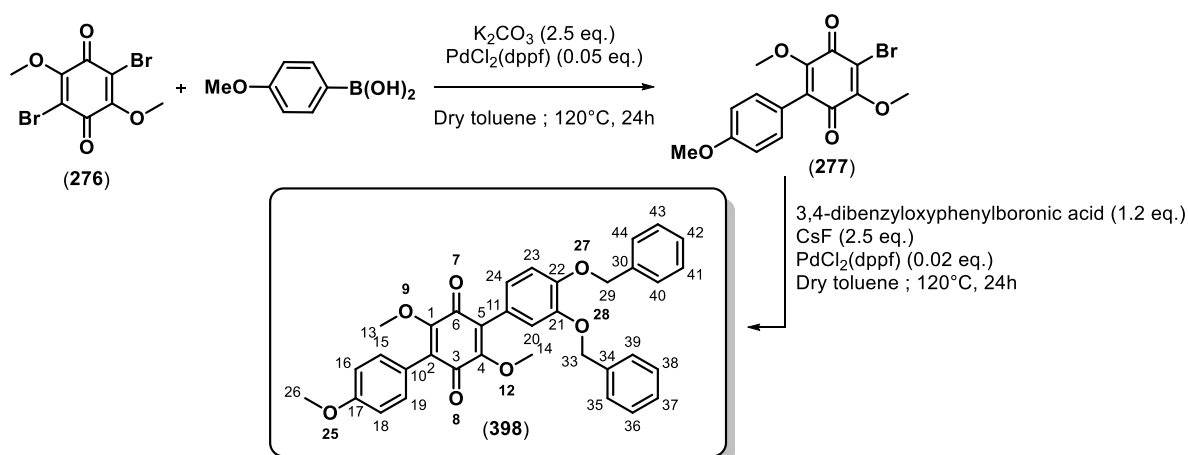
Molecular weight : 410.42 g/mol

Following general procedure 1b, product (**278**) was obtained with 10% yield as a brown amorphous solid.

Following general procedure 3, product (**278**) was obtained with 38% yield over the two steps as a brown amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.31 (dt, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 2H, H₁₅, H₁₉), 6.97 (dt, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 2H, H₁₆, H₁₈), 6.96 (s, 1H, H₂₀), 6.94 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H₂₄), 6.93 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H₂₃), 3.93 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.89 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.85 (3H, H₂₆, s), 3.82 (s, 3H, Q-OCH₃), 3.81 (s, 3H, Q-OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 183.8 (2C, C₃, C₆), 159.9 (C₁₇), [154.6, 154.5 (C₁, C₄)], 149.4 (C₂₁), 148.5 (C₂₂), 132.0 (2C, C₁₅, C₁₉), [126.7, 126.6 (C₂, C₅)], 123.7 (C₂₄), [122.4 & 122.1 (C₁₀, C₁₁)], 114.0 (C₂₃), 113.5 (2C, C₁₆, C₁₈), 110.7 (C₂₀), [61.4, 61.4 (C₁₃, C₁₄)], [56.0, 55.9 (C₂₉, C₃₀)], 55.3 (C₂₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3002, 2943, 2840, 1639, 1594, 1574, 1513, 1466, 1436, 1416, 1296, 1256, 1221, 1180, 1164, 1140, 1103, 1051, 1015, 932, 920, 875, 845, 810, 783, 763, 740, 614 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 411.4749, calculated for C₂₃H₂₃O₇⁺ : 411.1438.

2,5-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-6-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-1,4-benzoquinone (398)



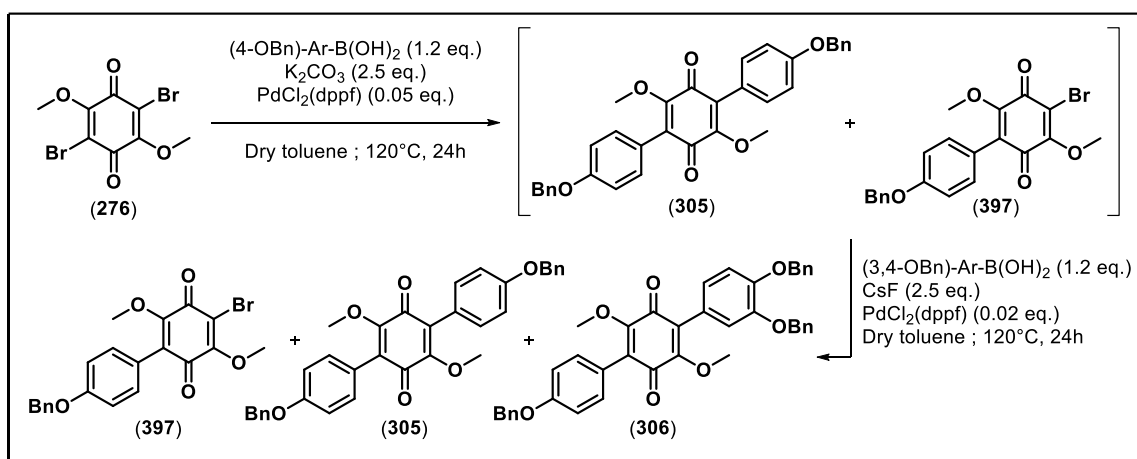
Chemical formula : C₃₅H₃₀O₇

Molecular weight : 562.62 g/mol

General procedure 3 was followed to give product **(398)** in 34% yield over the two steps as a brown amorphous solid.

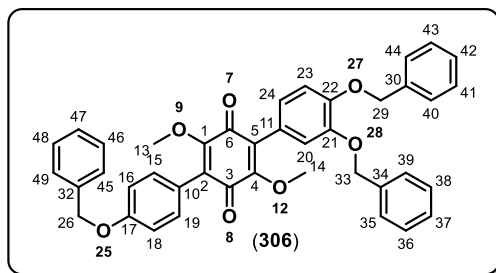
- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.48-7.45, 7.40-7.29, 7.02-6.91 (m, 18H, H₁₅, H₁₆, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₃, H₂₄, H₃₅₋₃₉, H₄₀₋₄₄), 5.21 (s, 2H, CH₂Ph), 5.19 (s, 2H, CH₂Ph), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : [183.7, 183.6 (C₃, C₆)], 159.8 (C₁₇), [154.5, 154.4 (C₁, C₄)], 149.5 (C₂₁), 148.1 (C₂₂), [137.2, 137.1 (C₃₀, C₃₄)], 131.9 (2C, C₁₆, C₁₈), [128.5, 128.5 (4C, C₃₅, C₃₉, C₄₀, C₄₄)], [127.8, 127.8 (C₃₇, C₄₂)], [127.3, 127.2 (4C, C₃₆, C₃₈, C₄₁, C₄₃)], [126.6, 126.3 (C₂, C₅)], 124.4 (C₂₃), 123.0 (C₁₁), 122.1 (C₁₀), 117.8 (C₂₀), 114.0 (C₂₄), 113.5 (2C, C₁₅, C₁₉), [71.4 & 71.1 (C₂₉, C₃₃)], [61.4, 61.3 (C₁₃, C₁₄)], 55.2 (C₂₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1651, 1607, 1590, 1510, 1454, 1413, 1382, 1289, 1248, 1178, 1139, 1104, 1053, 1026, 906, 837, 810 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 563.2070, calculated for C₃₅H₃₁O₇⁺ : 563.2064 ; [M+Na]⁺ : 585.1887, calculated for C₃₅H₃₀NaO₇⁺ : 585.1884.

Synthesis of compounds (305), (306) and (397)



General procedure 3 was followed to give product (306) in 29% yield over the two steps as a brown amorphous solid (cf description below). During this procedure, two other compounds were also afforded as minor products : the symmetrical compound (305) (brown amorphous solid, 3% yield) (cf description page 310) and the mono-arylated compound (397) (red oil, 7% yield) (cf description page 311).

→ 2,5-dimethoxy-3-(4-benzyloxyphenyl)-6-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-1,4-benzoquinone (306)



Chemical formula : C₄₁H₃₄O₇

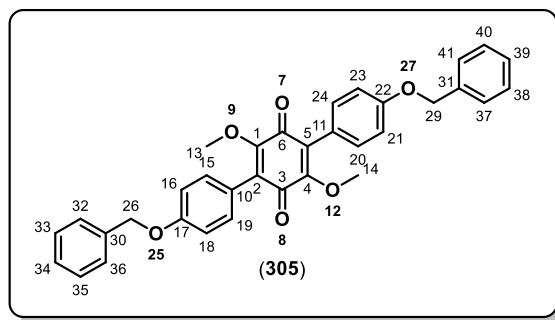
Molecular weight : 638.72 g/mol

- ¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.44-7.32, 7.06-6.93 (m, 22H, H₁₅, H₁₆, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₃, H₂₄, H₃₅₋₄₉), 5.21 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.19 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.11 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (s, 3H, OCH₃) ;
- ¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) : [184.0, 183.8 (C₃, C₆)], [160.5, 159.4 (C₁, C₄)], 159.3 (C₁₇), [149.7, 148.3 (C₂₁, C₂₂)], [137.4, 137.3, 137.0 (C₃₀, C₃₂, C₃₄)], 132.2 (2C, C₁₅, C₁₉), [128.8, 128.7, 128.6 (6C, C₃₆, C₃₈, C₄₁, C₄₃, C₄₆, C₄₈)], [128.2,

128.0, 127.9 (C₃₇, C₄₂, C₄₇), [127.7, 127.5, 127.4 (6C, C₃₅, C₃₉, C₄₀, C₄₄, C₄₅, C₄₉)], [124.6, 122.6 (C₁₀, C₁₁)], 118.0 (C₂₄), 114.5 (3C, C₁₆, C₁₈, C₂₀), 114.2 (C₂₃), [71.58, 71.32, 70.24 (C₂₆, C₂₉, C₃₃)], 61.60, 61.44 (C₁₃, C₁₄) (C₂ and C₅ are not visible) ;

- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1653, 1604, 1591, 1508, 1454, 1413, 1382, 1298, 1247, 1176, 1139, 1105, 1080, 1051, 1024, 1012, 918, 862, 837, 808, 738, 696, 667 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 639.2391, calculated for C₄₁H₃₅O₇⁺ : 639.2377.

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bis(4-benzyloxyphenyl)-1,4-benzoquinone (305)



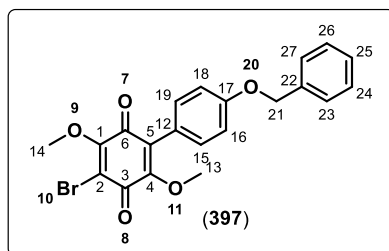
Chemical formula : C₃₄H₂₈O₆

Molecular weight : 532.59 g/mol

The title compound was afforded as a minor product of the reaction sequence synthesizing unsymmetrical compounds (**397**) and (**306**) (brown amorphous solid, 3% yield for each experience).

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.45, 7.42, 7.38, 7.34, 7.30, 7.27 (m, 14H, H₁₅, H₁₉, H₂₀, H₂₄, H₃₂₋₄₁), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, H₁₆, H₁₈, H₂₁, H₂₃), 5.12 (s, 4H, H₂₆, H₂₉), 3.84 (s, 6H, H₁₃, H₁₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 184.0 (2C, C₃, C₆), 159.3 (2C, C₁₇, C₂₂), 154.6 (2C, C₁, C₄), 137.0 (4C, C₃₀, C₃₁), 132.2 (4C, C₁₅, C₁₉, C₂₀, C₂₄), 128.8 (4C, C₃₂, C₃₅, C₃₈, C₄₀), 128.2 (2C, C₃₄, C₃₉), 127.7 (4C, C₃₂, C₃₆, C₃₇, C₄₁), 126.9 (2C, C₁₀, C₁₁), 122.6 (2C, C₂, C₅), 114.5 (4C, C₁₆, C₁₈, C₂₁, C₂₃), 70.2 (2C, C₂₆, C₂₉), 61.6 (2C, C₁₃, C₁₄) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1649, 1606, 1589, 1508, 1465, 1452, 1381, 1298, 1240, 1176, 1105, 1064, 1010, 937, 916, 864, 825, 810, 750, 702, 644 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 533.1984, calculated for C₃₄H₂₉O₆⁺ : 533.1959.

→ 2-bromo-3,6-dimethoxy-5-(4-benzyloxyphenyl)-1,4-benzoquinone (397)



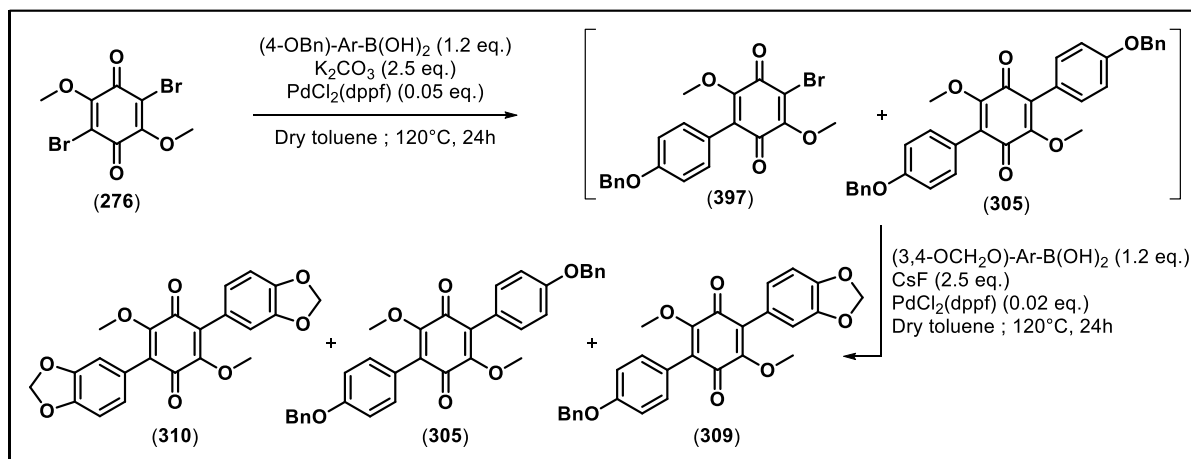
Chemical formula : C₂₁H₁₇BrO₅

Molecular weight : 429.27 g/mol

The title compound was afforded as a minor product of the reaction sequence synthesizing unsymmetrical compound (**306**) (red oil, 7% yield).

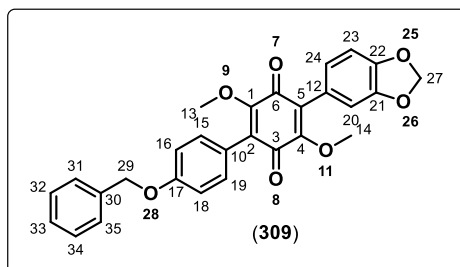
- **¹H NMR δ ppm (200 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.43-7.36 (m, 5H, H₂₃₋₂₇), 7.24 (dt, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2H, H₁₅, H₁₉), 7.03 (dt, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 2H, H₁₆, H₁₈), 5.10 (s, 2H, H₂₁), 4.21 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 181.5 (C₆), 177.1 (C₃), 159.3 (C₁₇), [156.8, 154.5 (C₁, C₄)], 136.8 (C₂₂), 132.0 (2C, C₁₅, C₁₉), 128.7 (2C, C₂₄, C₂₆), 128.1 (C₂₅), 127.5 (2C, C₂₃, C₂₇), 126.6 (C₁₂), 122.0 (C₅), 115.2 (C₂), 114.5 (2C, C₁₆, C₁₈), 70.1 (C₂₁), [62.0, 61.7 (C₁₃, C₁₄)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3014, 2949, 2850, 1654, 1604, 1581, 1508, 1454, 1442, 1417, 1382, 1319, 1303, 1290, 1244, 1224, 1176, 1124, 1041, 1026, 954, 910, 864, 833, 808, 744, 698, 667, 636, 607 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 429.0535, calculated for C₂₁H₁₈⁷⁹BrO₅⁺ : 429.0332.

Synthesis of compounds (305), (309) and (310)



General procedure 3 was followed to give product (309) in 42% yield over the two steps as a brown amorphous solid (cf description below). During this procedure, two other compounds were also afforded as minor products : the symmetrical compound (310) (brown amorphous solid, 7% yield) (cf description page 314) and the symmetrical compound (305) (brown amorphous solid, 3% yield) (cf description page 310).

→ 2,5-dimethoxy-3-(4-benzyloxyphenyl)-6-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,4-benzoquinone (309)



Chemical formula : C₂₈H₂₂O₇

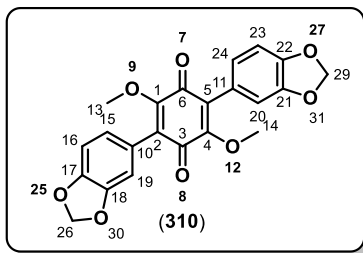
Molecular weight : 470.48 g/mol

- ¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.47-7.34, 7.08-7.04, 6.88, 6.87 (m, 18H, H₁₅, H₁₆, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₃, H₂₄, H₃₁₋₃₅), 6.00 (s, 2H, H₂₇), 5.12 (s, 2H, H₂₉), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃) ;
- ¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) : [183.3, 183.2 (C₃, C₆)], 158.8 (C₁₇), [154.3, 154.1 (C₁, C₄)], [147.6, 147.0 (C₂₁, C₂₂)], 136.5 (C₃₀), 131.7 (2C, C₁₅, C₁₉), 128.3 (2C, C₃₂, C₃₄), 127.7 (C₃₃), 127.1 (2C, C₃₁, C₃₅), [126.3, 126.1 (C₁₀, C₁₂)], 124.3

(C₂₄), [123.1, 122.0 (C₂, C₅)], 114.0 (2C, C₁₆, C₁₈), 110.7 (C₂₀), 107.7 (C₂₃), 100.9 (C₂₇), 61.7 (C₂₉), 61.1 (2C, C₁₃, C₁₄);

- **IR (neat) ν_{\max} cm⁻¹** : 3010, 2945, 2893, 2848, 1651, 1604, 1591, 1504, 1489, 1442, 1382, 1294, 1240, 1176, 1141, 1111, 1082, 1037, 929, 918, 864, 839, 796, 748, 698, 667, 650, 636 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 471.1466, calculated for C₂₈H₂₃O₇⁺ : 471.1438.

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bis(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,4-benzoquinone (310)



Chemical formula : C₂₂H₁₆O₈

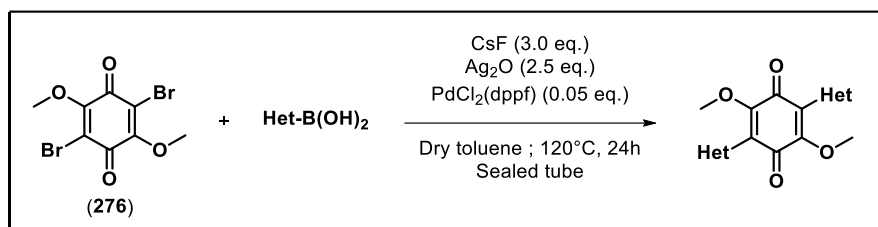
Molecular weight : 408.36 g/mol

The title compound was afforded as a minor product of the reaction sequence synthesizing unsymmetrical compounds (**309**) (brown amorphous solid, 7% yield).

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.49-7.29 (m, 4H, H₁₅, H₁₉, H₂₀, H₂₄), 7.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H₁₆, H₂₃), 6.01 (s, 2H, H₂₆, H₂₉), 3.83 (s, 6H, H₁₃, H₁₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 178.0 (2C, C₃, C₆), 159.1 (2C, C₁, C₄), 132.0 (4C, C₁₇, C₁₈, C₂₁, C₂₂), 128.6 (2C, C₁₀, C₁₁), 128.1 (2C, C₂, C₅), 127.5 (2C, C₁₅, C₂₄), [114.7, 111.0 (4C, C₁₆, C₁₉, C₂₀, C₂₃)], 114.4 (2C, C₂₆, C₂₉), 61.44 (2C, C₁₃, C₁₄) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2954, 2926, 2852, 2358, 1651, 1595, 1506, 1489, 1444, 1298, 1232, 1176, 1111, 1037, 935, 800, 754 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 409.0962, calculated for C₂₂H₁₇O₈⁺ : 409.0918.

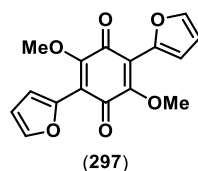
2.2.2.8 One-pot Pd^{II}-catalysed homo-difunctionalization of benzoquinone with heterocycles

General procedure 4 :

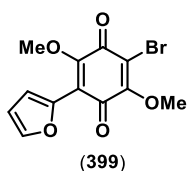


A flame-dried 250 mL sealed vial was filled with 2,5-dibromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (**276**) (1.0 eq., 3 mmol) and the corresponding boronic acid (2.5 eq., 7.5 mmol). Then, toluene (50 mL) was added and the solution was flushed with argon. Then, $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (0.05 eq., 150 μmol), CsF (3.0 eq., 9 mmol) and Ag_2O (2.5 eq., 7.5 mmol) were added and the reaction mixture was heated to 120°C for 24h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified directly by flash chromatography (Petroleum ether/ CH_2Cl_2 / CH_3CN : 70:27:3) affording the homo-difunctionalized benzoquinone.

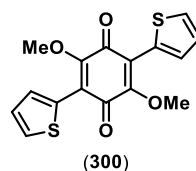
List of compounds synthesized by general procedure 4 :



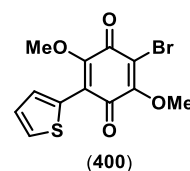
Synthesis page 316
Description page 316



Synthesis page 316
Description page 317

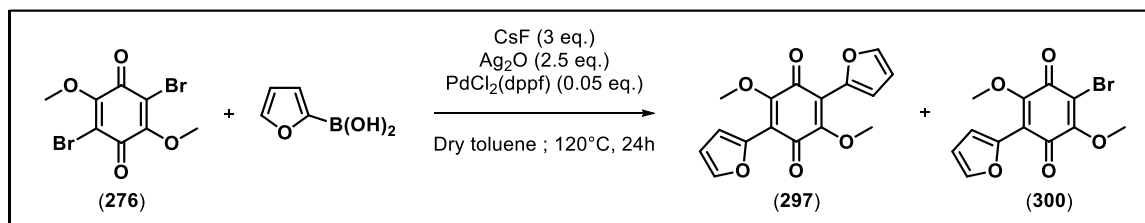


Synthesis page 318
Description page 318



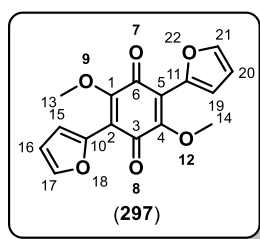
Synthesis page 318
Description page 319

Synthesis of compounds (297) and (399)



General procedure 4 was followed to give product (297) in 2% yield as a dark amorphous solid (cf description bellow). The mono-furanyl compound (399) was also afforded as side product of this reaction sequence (dark red oil, 24% yield) (cf description page 317).

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bisfuranyl-1,4-benzoquinone (297)

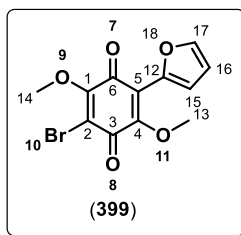


Chemical formula : C₁₆H₁₂O₆

Molecular weight : 300.27 g/mol

- ¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.61 (dd, *J* = 1.8, 0.8 Hz, 2H, H₁₇, H₂₁), 7.08 (dd, *J* = 3.5, 0.8 Hz, 2H, H₁₅, H₁₉), 6.58-6.56 (s, 2H, H₁₆, H₂₀), 4.05 (s, 6H, H₁₃, H₁₄) ;
- ¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) : 181.7 (2C, C₃, C₆), 153.3 (2C, C₁, C₄), 144.5 (2C, C₁₀, C₁₁), 144.1 (2C, C₁₇, C₂₀), 117.9 (2C, C₂, C₅), 116.6 (2C, C₁₅, C₁₉), 111.9 (2C, C₁₆, C₂₀), 61.7 (2C, C₁₃, C₁₄) ;
- IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ : 2954, 2926, 2850, 2364, 2320, 1734, 1716, 1635, 1558, 1541, 1508, 1456, 1436, 1305, 1249, 1182, 1064, 1037, 773, 669 ;
- HRMS (ESI +) : *m/z* [M+H]⁺ : 301.0739, calculated for C₁₆H₁₃O₆⁺ : 301.0707.

→ **2-bromo-3,6-dimethoxy-5-(furan-2-yl)-1,4-benzoquinone (399)**



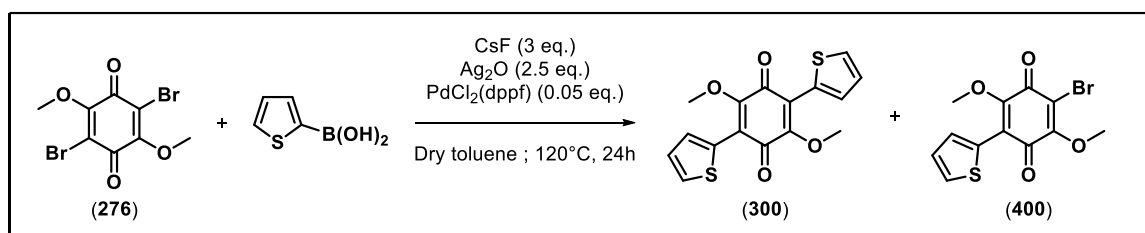
Chemical formula : C₁₂H₉BrO₅

Molecular weight : 313.10 g/mol

The title compound was afforded as side product of the reaction sequence synthesizing symmetrical compound (**297**) (dark red oil, 24% yield).

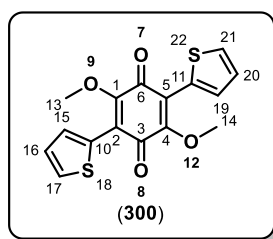
- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.57 (s br, 1H, H₁₇), 6.98 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H₁₅), 6.52 (m, 1H, H₁₆), 4.19 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : [179.6, 176.7 (C₃, C₆)], [157.0, 152.9, 144.0 (C₁, C₄, C₁₂)], 144.3 (C₁₇), [117.7, 115.3 (C₂, C₅)], [116.7, 111.9 (C₁₅, C₁₆)], [62.0, 61.8 (C₁₃, C₁₄)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2951, 2362, 2330, 1662, 1585, 1558, 1541, 1506, 1456, 1319, 1255, 1226, 1188, 1163, 1122, 1041, 1020, 958, 931, 902, 885, 813, 742, 688, 667, 626, 605 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 312.9704, calculated for C₁₂H₁₀⁷⁹BrO₅⁺ : 312.9706.

Synthesis of compounds (300) and (400)



General procedure 4 was followed to give product (300) in < 5% yield as a dark red amorphous solid (cf description below). The mono-thiophenyl compound (400) was also afforded as major product of this reaction sequence (dark purple oil, 24% yield) (cf description page 319).

→ 2,5-dimethoxy-3,6-bis(thiophenyl)-1,4-benzoquinone (300)

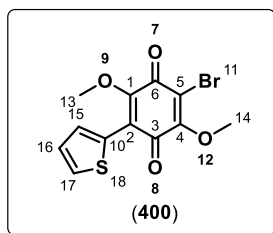


Chemical formula : C₁₆H₁₂O₄S₂

Molecular weight : 332.39 g/mol

- HRMS (ESI +) : m/z [M+H]⁺ : 333.0296, calculated for C₁₆H₁₃O₄S₂⁺ : 333.0250.

→ **2,5-dimethoxy-3-thiophenyl-6-bromo-1,4-benzoquinone (400)**



Chemical formula : C₁₂H₉BrO₄S

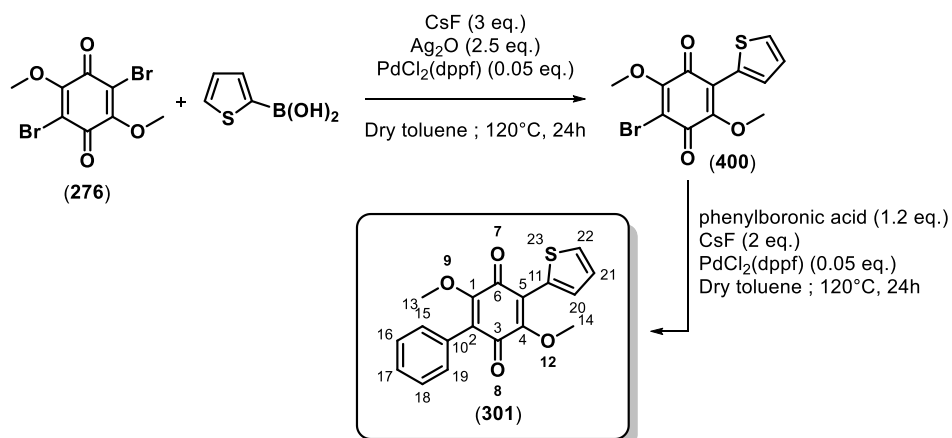
Molecular weight : 329.16 g/mol

The title compound was afforded as major product of the reaction sequence synthesizing symmetrical compound (**300**) (dark purple oil, 24% yield).

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 8.00 (dd, *J* = 3.9, 1.1 Hz, 1H, H₁₅), 7.54 (dd, *J* = 5.2, 1.1 Hz, 1H, H₁₇), 7.15 (dd, *J* = 5.2, 4.0 Hz, 1H, H₁₆), 4.23 (s, 3H, OCH₃), 4.16 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 180.6 (C₆), 176.6 (C₃), [157.1, 151.9 (C₁, C₄)], 132.2 (C₁₅), 130.3 (C₁₀), 130.1 (C₁₇), 127.0 (C₁₆), 121.8 (C₅), 115.2 (C₂), [61.9, 61.3 (C₁₃, C₁₄)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2956, 2922, 2852, 2364, 2322, 1749, 1734, 1662, 1653, 1560, 1496, 1456, 1436, 1332, 1207, 1157, 1114, 1099, 1053, 894, 790, 769 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 328.9510, calculated for C₁₂H₁₀⁷⁹BrO₄S⁺ : 328.9478.

2.2.2.9 One-pot Pd^{II}-catalysed hetero-difunctionalization of benzoquinone with heterocycles

2,5-dimethoxy-3-phenyl-6-thiophenyl-1,4-benzoquinone (301)



Chemical formula : C₁₈H₁₄O₄S

Molecular weight : 326.37 g/mol

A dry 250 mL sealed vial was filled with 2,5-dibromo-3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (**(276)**) (1.0 eq., 1.5 mmol, 500 mg) and the thiophenylboronic acid (2.5 eq., 3.8 mmol, 480 mg) in dried toluene (25 mL) and the solution was flushed with argon. Then PdCl₂(dppf) (0.05 eq., 75 μmol, 59 mg), CsF (3.0 eq., 4.5 mmol, 685 mg) and Ag₂O (2.5 eq., 3.8 mmol, 869 mg) are added and the reaction vial is sealed. The mixture is stirred at 120°C for 24h. After cooling, the vial is unsealed, the reaction crude was dried and subjected to column chromatography for an approximate purification (Petroleum ether/CH₂Cl₂/CH₃CN : 70:27:3). Compound (**(400)**) is then engaged in the second step without further purification. Another dry 250 mL sealed vial was filled with compound (**(400)**) (1.0 eq., 0.36 mmol, 118 mg) and the phenylboronic acid (1.2 eq., 0.42 mmol, 51 mg) in dried toluene (3 mL) and the solution was flushed with argon. Then PdCl₂(dppf) (0.05 eq., 18 μmol, 14 mg) and CsF (2.0 eq., 0.7 mmol, 111 mg) are added and the reaction vial is sealed. The mixture is stirred at 120°C for 24h. After cooling, the vial is unsealed, the reaction crude was dried and subjected to column chromatography for purification (Petroleum ether/CH₂Cl₂/CH₃CN : 70:27:3) affording the hetero-difunctionalised benzoquinone (**(301)**) as a red amorphous solid with 3% yield.

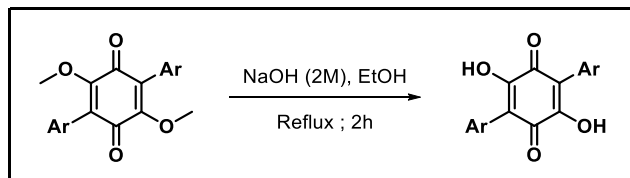
- ¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.48-7.34 (m, 7H, Ar-H), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.87 (s, 6H, H₁₃, H₁₄) ;

-
- **^{13}C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 183.9 (2C, C₃, C₆), [159.2, 154.6 (C₁, C₄)], [137.0, 132.1 (C₁₀, C₁₁)], [128.7, 127.6 (4C, C₁₅, C₁₆, C₁₈, C₁₉)], [128.6, 128.1, 127.5 (C₂₀, C₂₁, C₂₂)], 114.5 (2C, C₂, C₅), 61.5 (2C, C₁₃, C₁₄) ;
 - **IR (neat) ν_{max} cm^{-1}** : 2949, 2858, 1653, 1604, 1593, 1575, 1508, 1454, 1384, 1296, 1240, 1176, 1138, 1107, 1049, 1010, 920, 864, 831, 819, 748, 698, 667, 644 ;
 - **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 327.0715, calculated for C₁₈H₁₅O₄S⁺ : 327.0686.

2.2.3 Ring contraction of terphenylquinones to bistetronic acids

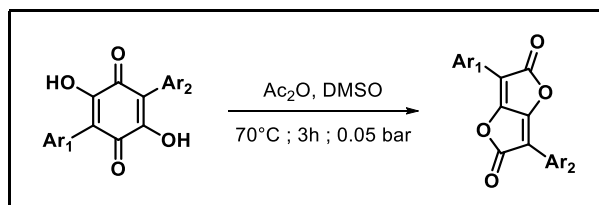
2.2.3.1 General procedures for the ring contraction of terphenylquinones

General procedure 5 : Basic hydrolysis of terphenylquinones



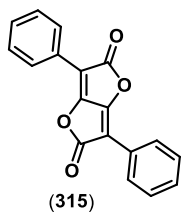
To a solution of 2,5-dimethoxyterphenylquinones (1.0 eq., 1.7 mmol) in EtOH (520 mL), a 2M-aqueous solution of NaOH (260 mL) was added. The reaction mixture was brought to reflux for 2h. After cooling, the reaction was quenched with a 1M-hydrochloric acid solution and the mixture turned from purple to orange. The product was extracted with dichloromethane (3x200 mL). The combined organic layers are dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure affording the corresponding 2,5-dihydroxyterphenylquinones, which is used for the next step without further purification.

General procedure 6 : Ring contraction of dihydroxyterphenylquinones

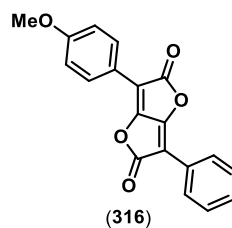


Crude 2,5-dihydroxy-terphenylquinones (1.0 eq., 0.71 mmol) was dissolved in DMSO (42 mL). Ac₂O (21 mL) was added and the dark solution was stirred at 70°C for 3h under vacuum (0.05 bar). After cooling, the reaction was quenched with 1M-hydrochloric acid solution and an orange precipitate was formed, collected by filtration and washed with water, affording the corresponding bistetronic acid.

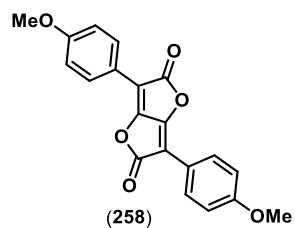
List of compounds synthesized by general sequence procedure 5 and 6 :



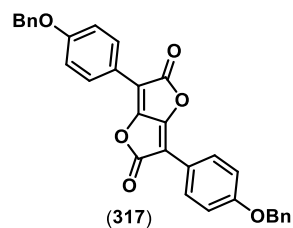
Synthesis and description page 324



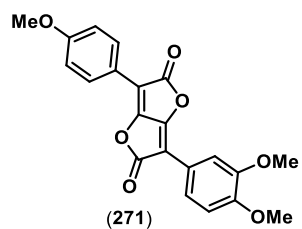
Synthesis and description page 325



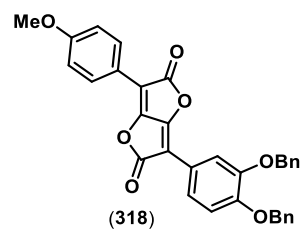
Synthesis and description page 326



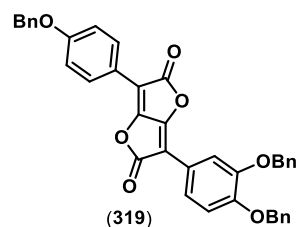
Synthesis and description page 327



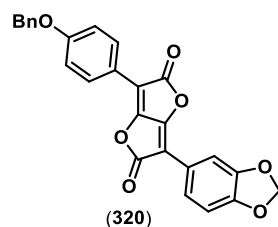
Synthesis and description page 328



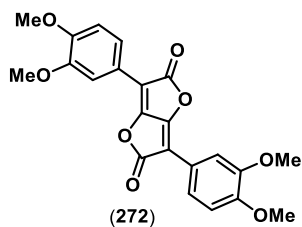
Synthesis and description page 330



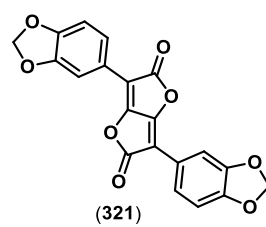
Synthesis and description page 331



Synthesis and description page 329



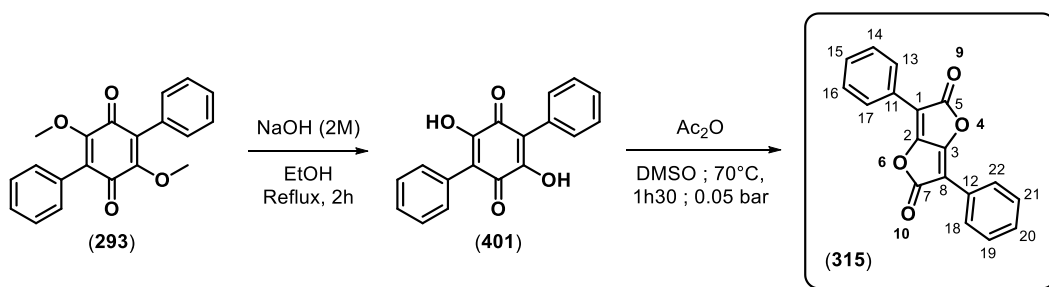
Synthesis and description page 332



Synthesis and description page 333

2.2.3.2 Compounds' description

3,6-bisphenyl-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (315)



Chemical formula : C₁₈H₁₀O₄

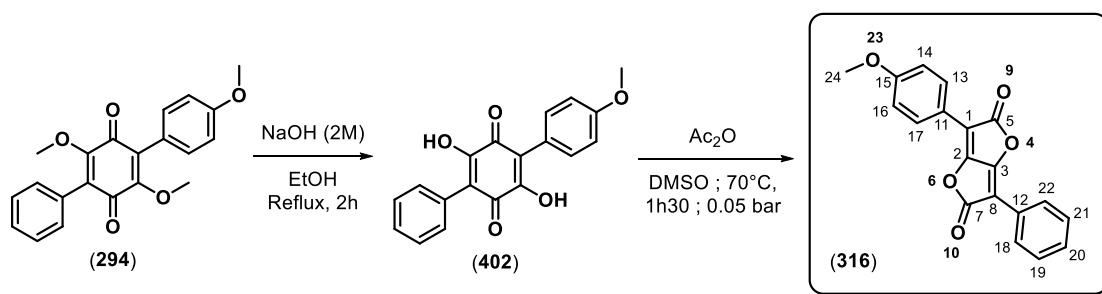
Molecular weight : 290.27 g/mol

General procedure 5 was followed to give product **(401)** in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 1h30 to give product **(315)** in 50% yield as a yellow amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 8.04 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, H₁₃, H₁₇, H₁₈, H₂₂), 7.52-7.44 (m, 6H, H₁₄₋₁₆, H₁₉₋₂₁) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 165.8 (2C, C₅, C₇), 157.3 (2C, C₂, C₃), 130.3 (2C, C₁₅, C₂₀), [129.3, 128.3 (8C, C₁₃, C₁₄, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₁, C₂₂)], 126.5 (2C, C₁₁, C₁₂), 101.5 (2C, C₁, C₈) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1813, 1791, 1656, 1606, 1494, 1448, 1359, 1334, 1317, 1259, 1172, 1163, 1055, 921, 873, 798, 773, 725, 688, 655, 619, 605 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 291.0646, calculated for C₁₈H₁₁O₄⁺ : 291.0652 ; [M+MeOH+H]⁺ : 323.0911, calculated for C₁₉H₁₅O₅⁺ : 323.0914.

3-(4-methoxyphenyl)-6-phenyl-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (316)



Chemical formula : C₁₉H₁₂O₅

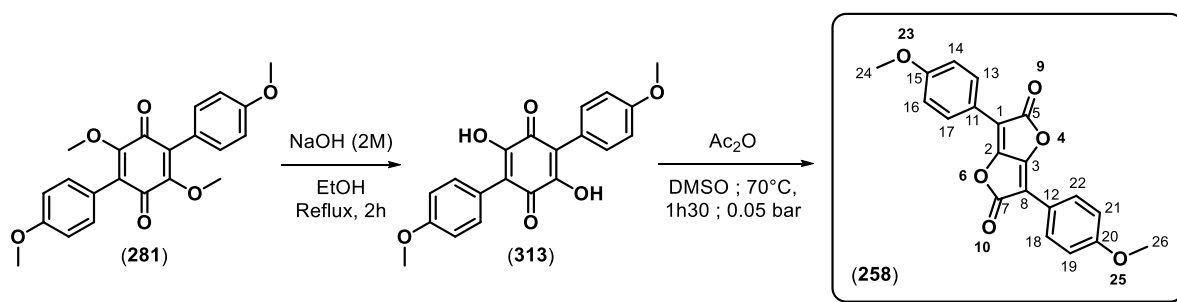
Molecular weight : 320.30 g/mol

General procedure 5 was followed to give product (402) in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 1h30 to give product (316) in 80% yield as an orange amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₂₀), 8.00 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.46 (m, 4H, H₁₈, H₁₉, H₂₁, H₂₂), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 3.87 (s, 3H, H₂₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 166.2 (2C, C₅, C₇), 161.2 (C₁₅), [157.5, 155.3 (C₂, C₃)], 132.6 (C₁₂), [130.0, 129.3, 128.2 (6C, C₁₃, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₁, C₂₂)], 126.8 (C₂₀), 119.2 (C₁₁), 114.9 (2C, C₁₄, C₁₆), [101.7, 101.1 (C₁, C₈)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1770, 1735, 1678, 1602, 1512, 1490, 1463, 1440, 1371, 1305, 1278, 1249, 1180, 1161, 1066, 1029, 960, 904, 835, 781, 754, 694 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 321.0752, calculated for C₁₉H₁₃O₅⁺ : 321.0757.

3,6-bis-(4-methoxyphenyl)-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (258)



Chemical formula : C₂₀H₁₄O₆

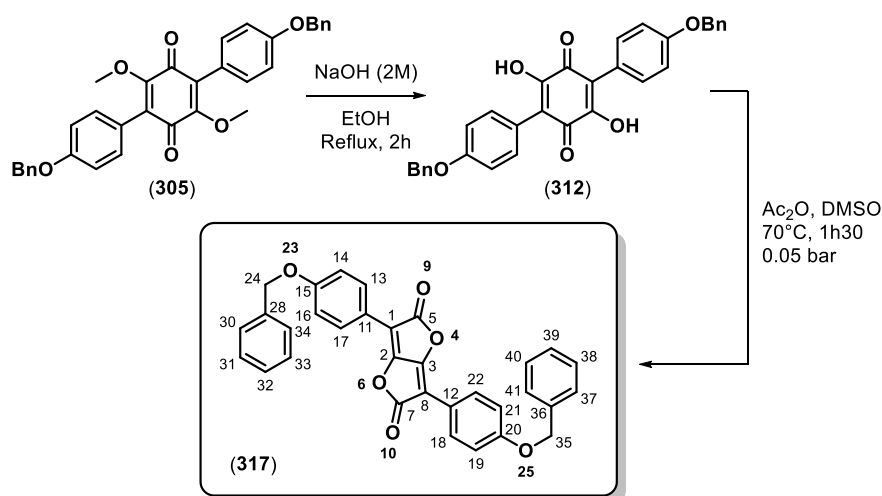
Molecular weight : 350.33 g/mol

General procedure 5 was followed to give product (313) in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 1h30 to give product (258) in 69% yield as a yellow amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.99 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H, H₁₃, H₁₇, H₁₈, H₂₂), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H, H₁₄, H₁₆, H₁₉, H₂₁), 3.87 (s, 6H, H₂₄, H₂₆) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 166.5 (2C, C₅, C₇), 161.0 (2C, C₁₅, C₂₀), 155.6 (2C, C₂, C₃), 129.9 (4C, C₁₃, C₁₇, C₁₈, C₂₂), 119.4 (2C, C₁₁, C₁₂), 114.9 (4C, C₁₄, C₁₆, C₁₉, C₂₁), 101.3 (2C, C₁, C₈), 55.6 (2C, C₂₄, C₂₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2969, 2938, 2843, 2360, 2341, 1817, 1803, 1779, 1658, 1604, 1571, 1510, 1464, 1354, 1311, 1299, 1262, 1190, 1162, 1122, 1064, 1022, 872, 845, 824, 803, 750, 728, 631 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+MeOH+H]⁺ : 383.1117, calculated for C₂₁H₁₉O₇⁺ : 383.1125.

3,6-bis-(4-benzyloxyphenyl)-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (317)



Chemical formula : C₃₂H₂₂O₆

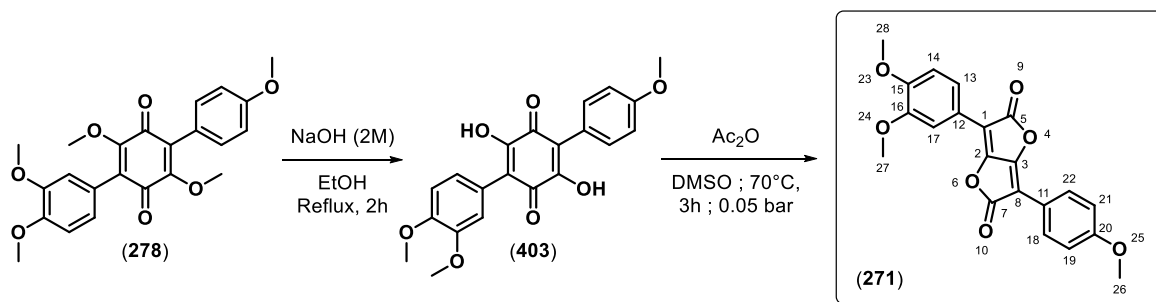
Molecular weight : 502.52 g/mol

General procedure 5 was followed to give product **(312)** in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 1h30 to give product **(317)** in 23% yield as a yellow amorphous solid.

- **¹H NMR** δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) : 7.39-7.35 (m, 14H, Ar-H), 6.85 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H, Ar-H), 5.04 (s, 4H, H₂₄, H₃₅) ;
- **¹³C NMR** will be recorded as soon as possible ;
- **IR (neat)** ν_{max} cm⁻¹ : 2372, 2320, 1772, 1734, 1683, 1647, 1558, 1541, 1521, 1506, 1458 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+MeOH+H]⁺ : 535.1720, calculated for C₃₃H₂₇O₇⁺ : 535.1751.

3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (271)



Chemical formula : C₂₁H₁₆O₇

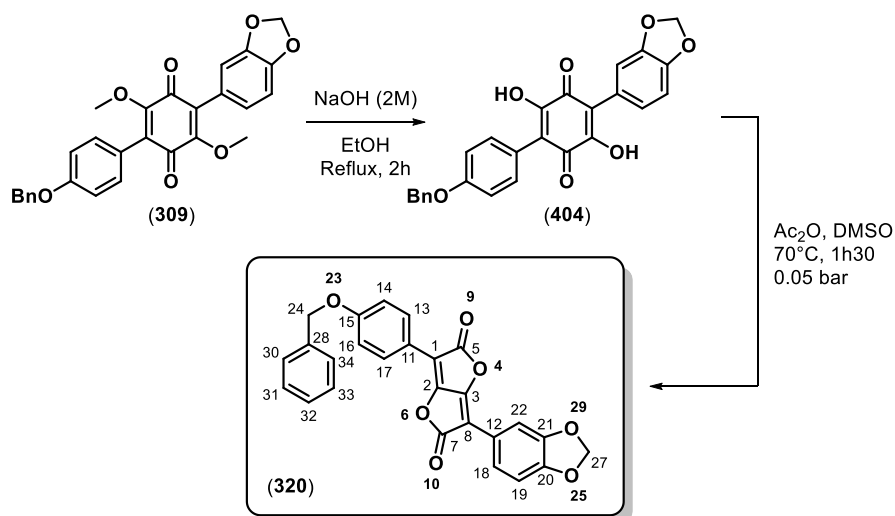
Molecular weight : 380.35 g/mol

General procedure 5 was followed to give product (403) in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 3h to give product (271) in 69% yield as an orange amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) :** 7.99 (dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 7.67 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H, H₁₃), 7.54 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₇), 7.00 (dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 6.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₁₄), 3.97 (s, 3H, H₂₇), 3.94 (s, 3H, H₂₈), 3.87 (s, 3H, H₂₆) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁) :** 166.2 (2C, C₅, C₇), 160.9 (C₂₀), [155.5, 155.4 (C₂, C₃)], 150.6 (C₁₅), 149.4 (C₁₆), [129.8, 129.7 (C₁₈, C₂₂)], 121.9 (C₁₃), 119.5 (C₁₂), 119.2 (C₁₁), 114.7 (2C, C₁₉, C₂₁), 111.4 (C₁₄), 110.5 (C₁₇), 101.1 (2C, C₁, C₈), 56.1 (C₂₇), 56.0 (C₂₈), 55.4 (C₂₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2961, 2920, 2851, 1814, 1780, 1659, 1602, 1514, 1458, 1361, 1301, 1280, 1257, 1176, 1144, 1026, 914, 837, 822, 799, 727 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+H]⁺ : 381.1009, calculated for C₂₁H₁₇O₇⁺ : 381.0969 ; m/z [M+MeOH+H]⁺ : 413.1255, calculated for C₂₂H₂₁O₈⁺ : 413.1231.

3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-6-(4-benzoyloxyphenyl)-furo-[3,2-b]-furan-2,5-dione (320)



Chemical formula : C₂₆H₁₆O₇

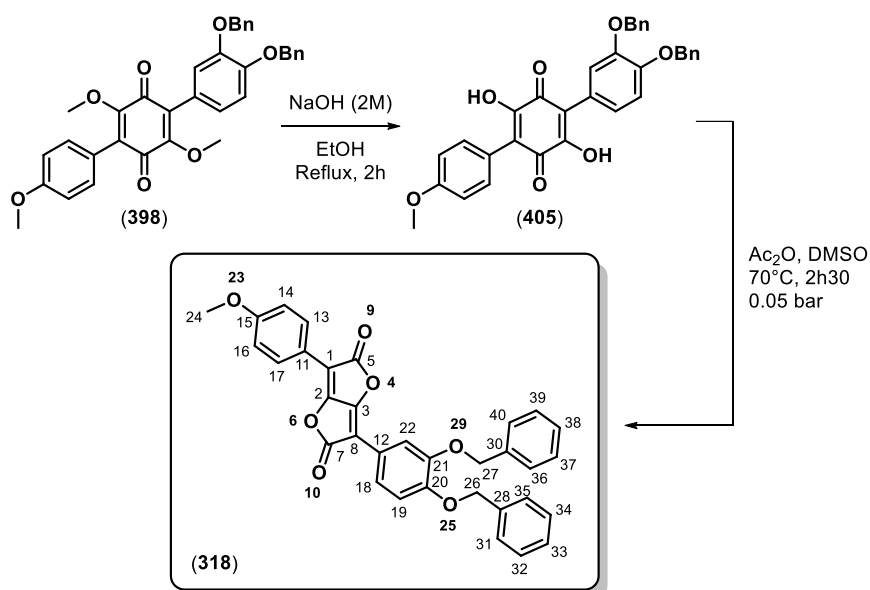
Molecular weight : 440.41 g/mol

General procedure 5 was followed to give product **(404)** in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 1h30 to give product **(320)** in 56% yield as an orange amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.98 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.61 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, H₁₈), 7.53 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₂₂), 7.43-7.35 (m, 5H, H₃₀₋₃₄), 7.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₉), 6.04 (s, 2H, H₂₇), 5.13 (s, 2H, H₂₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 166.2 (2C, C₅, C₇), 160.3 (C₁₅), [155.8, 155.4 (C₂, C₃)], [149.3, 148.6 (C₂₀, C₂₁)], 136.5 (C₂₈), 130.0 (2C, C₁₃, C₁₇), [128.9, 128.4, 127.7 (5C, C₃₀₋₃₄)], 123.4 (C₁₈), 120.7 (C₁₂), 119.5 (C₁₁), 115.8 (2C, C₁₄, C₁₆), 109.2 (C₁₉), 108.1 (C₂₂), 101.8 (C₂₇), [101.4, 101.2 (C₁, C₈)], 70.3 (C₂₄) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2376, 2320, 1811, 1772, 1653, 1602, 1506, 1456, 1348, 1244, 1224, 1170, 1109, 1056, 1033, 991, 981, 914, 842, 833, 794, 746, 729, 698, 663 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+NH₄]⁺ : 458.1238, calculated for C₂₆H₂₀NO₇⁺ : 458.1234.

3-(3,4-bis[benzyloxyphenyl])-6-(4-methoxyphenyl)-furo-[3,2-b]-furan-2,5-dione (318)



Chemical formula : C₃₃H₂₄O₇

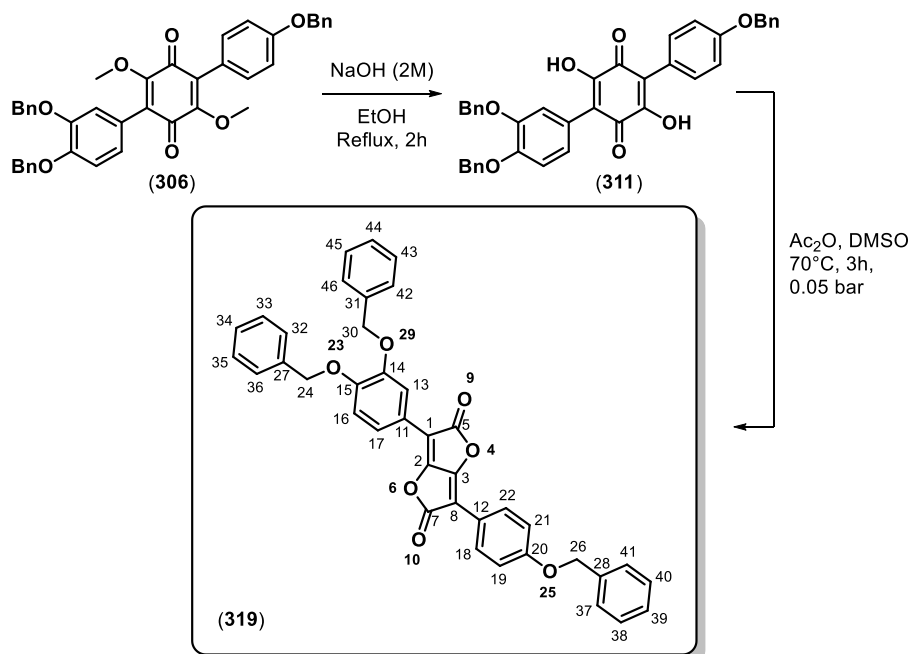
Molecular weight : 532.55 g/mol

General procedure 5 was followed to give product (**405**) in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 2h30 to give product (**318**) in 29% yield as an orange amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) :** 7.98 (dt, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.63-7.34 (m, 13H, H₁₈, H₁₉, H₂₂, H₃₁₋₄₀), 7.00 (dt, *J* = 9.2, 1.6 Hz, 2H, H₁₆, H₁₄), 5.24 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.22 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.87 (s, 3H, H₂₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) :** 166.3 (2C, C₅, C₇), 161.1 (C₁₅), [155.7, 155.4 (C₂, C₃)], 150.6 (C₂₀), 149.2 (C₂₁), [136.9, 136.8 (C₂₈, C₃₀)], 129.9 (2C, C₁₃, C₁₇), [128.8, 128.7, 128.2, 127.8, 127.4 (10C, C₃₁₋₄₀)], 122.4 (C₁₈), 120.0 (C₁₂), 119.3 (C₁₁), 114.8 (2C, C₁₄, C₁₆), 114.7 (C₁₉), 114.1 (C₂₂), [101.3, 101.1 (C₁, C₈)], [71.4, 71.1 (C₂₆, C₂₇)], 55.6 (C₂₄) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2374, 1818, 1647, 1604, 1514, 1456, 1359, 1301, 1257, 1222, 1182, 1141, 1062, 1026, 823, 736, 696 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+MeOH+H]⁺ : 565.1854, calculated for C₃₄H₂₉O₈⁺ : 565.1857.

3-(4-(benzyloxy)phenyl)-6-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (319)



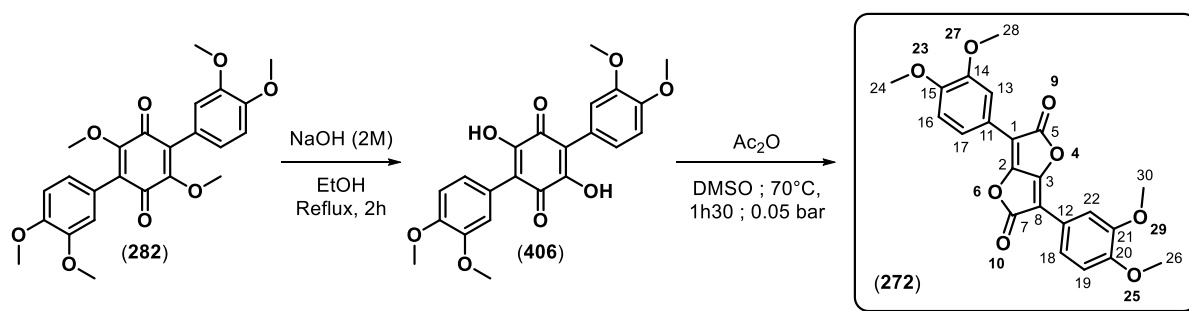
Chemical formula : C₃₉H₂₈O₇

Molecular weight : 608.65 g/mol

General procedure 5 was followed to give product (**311**) in > 99% yield as a dark amorphous solid. General procedure 6 was then followed for 3h to give product (**319**) in 57% yield as an orange amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁) :** 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 7.63 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁₃), 7.60 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H, H₁₇), 7.53-7.32 (m, 15H, H₃₂₋₄₆), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₁₆), 5.23 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.21 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.11 (s, 2H, OCH₂Ph) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) :** [166.3, 166.3 (C₅, C₇)], 160.2 (C₂₀), 155.7 (2C, C₂, C₃), 155.7 (C₁₅), 149.2 (C₁₄), [136.9, 136.8, 136.5 (C₂₇, C₂₈, C₃₁)], 129.9 (2C, C₁₈, C₂₂), 128.8 (2C, C₄₃, C₄₅), [128.7, 128.7 (4C, C₃₃, C₃₅, C₃₈, C₄₀)], 128.4 (C₄₄), 128.2 (C₃₉), 127.8 (2C, C₃₇, C₄₁), 127.6 (2C, C₃₂, C₃₆), 127.4 (2C, C₄₂, C₄₆), 122.4 (C₁₇), 120.0 (C₁₁), 119.6 (C₁₂), 115.7 (2C, C₁₉, C₂₁), 114.7 (C₁₆), 114.1 (C₁₃), [101.2, 101.1 (C₁, C₈)], [71.4, 71.1, 70.3 (C₂₄, C₂₆, C₃₀)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2923, 1814, 1789, 1658, 1600, 1514, 1454, 1432, 1383, 1353, 1312, 1259, 1237, 1180, 1136, 1090, 997, 933, 844, 830, 805, 729, 695, 644, 633 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+MeOH+H]⁺ : 641.2130, calculated for C₄₀H₃₃O₈⁺ : 641.2170.

3,6-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (272)



Chemical formula : C₂₂H₁₈O₈

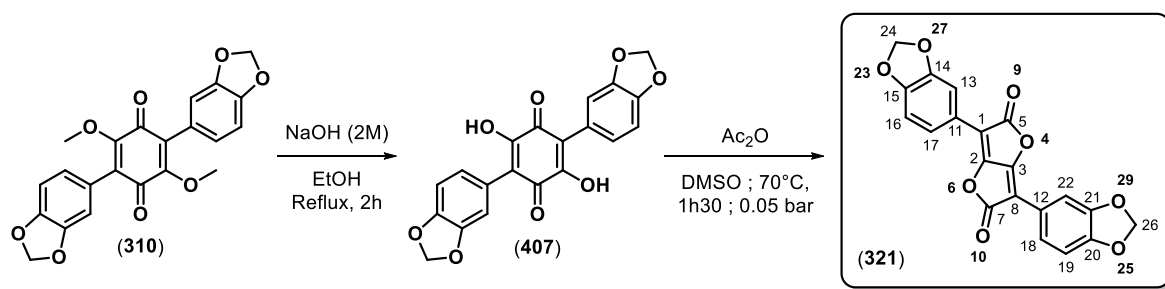
Molecular weight : 410.38 g/mol

General procedure 5 was followed to give product (406) in > 99% yield as a dark amorphous solid.

General procedure 6 was then followed for 1h30 to give product (272) in 65% yield as an orange amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) :** 7.695 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H₁₇, H₁₈), 7.555 (dd, *J* = 2.1 Hz, 2H, H₁₃, H₂₂), 6.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₆, H₁₉), 3.98 (s, 6H, H₂₄, H₂₆), 3.95 (s, 6H, H₂₈, H₃₀) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁) :** 166.4 (2C, C₅, C₇), 155.6 (2C, C₂, C₃), 150.9 (2C, C₁₅, C₂₀), 149.6 (2C, C₁₄, C₂₁), 122.1 (2C, C₁₇, C₁₈), 119.6 (2C, C₁₁, C₁₂), 111.6 (2C, C₁₆, C₁₉), 110.7 (2C, C₁₃, C₂₂), 101.4 (2C, C₁, C₈), 56.3 (2C, C₂₈, C₃₀), 56.2 (2C, C₂₄, C₂₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2915, 2844, 1807, 1777, 1660, 1640, 1598, 1579, 1520, 1464, 1446, 1417, 1366, 1326, 1289, 1264, 1233, 1141, 1023, 954, 870, 822, 764, 746, 730, 621 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+MeOH+H]⁺ : 443.1366, calculated for C₂₃H₂₃O₉⁺ : 443.1337.

3,6-bis(3,4-methylenedioxyphenyl)-furo-[3,2-*b*]-furan-2,5-dione (321)



Chemical formula : C₂₀H₁₀O₈

Molecular weight : 378.29 g/mol

General procedure 5 was followed to give product (407) in > 99% yield as a dark amorphous solid.

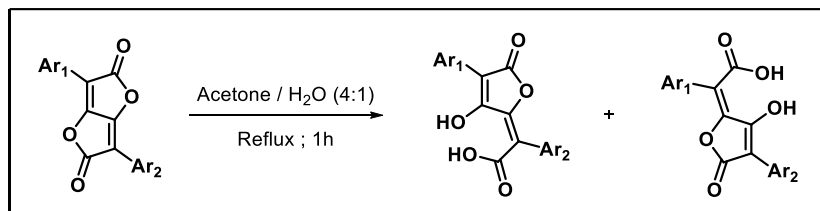
General procedure 6 was then followed for 1h30 to give product (321) in 23% yield as an orange amorphous solid.

- ¹H NMR can not be recorded because of low solubility of (321) ;
- ¹³C NMR can not be recorded because of low solubility of (321) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2954, 2922, 2852, 2366, 1734, 1716, 1558, 1508, 1458, 1261, 1182, 1082, 968 ;
- **HRMS (ESI +):** m/z [M+2MeOH+2ACN+H₂O]⁺ : 518.3786, calculated for C₂₄H₂₆N₂O₁₁⁺ : 518.1537.

2.2.4 Ring opening of bistetronic acids

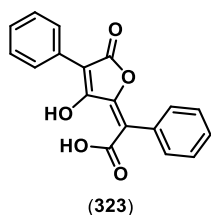
2.2.4.1 Hydrolysis of bistetronic acids

General procedure 7a :

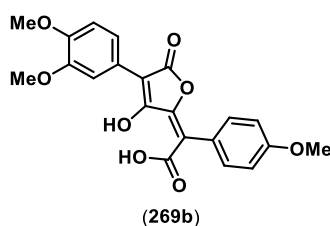


A suspension of bistetronic acid (0.13 mmol) in aqueous acetone (acetone/H₂O : 4:1) (100 mL) was heated to reflux for 1h. After cooling, the crude mixture was concentrated. Crude products were purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/ACN : 4:1). From bistetronic acid, two corresponding products were obtained, which quickly reisoimerize after purification as a mixture of both isomers.

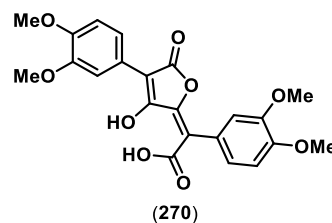
List of compounds synthesized by general procedure 7a :



Synthesis and description page 335

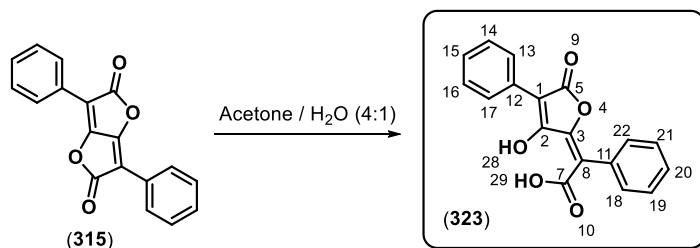


Synthesis and description page 336



Synthesis and description page 337

Pulvinic acid (323)



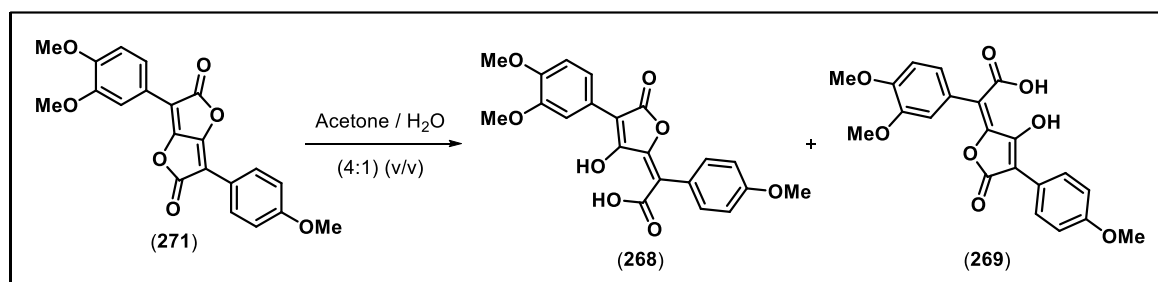
Chemical formula : C₁₈H₁₂O₅

Molecular weight : 308.30 g/mol

General procedure 7a was followed to give product (323) in > 99% yield as a yellow oil.

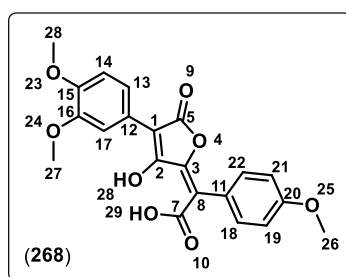
- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) :** 13.69 (s, 1H, OH₂₈), 8.13 (dd, *J* = 8.5, 1.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.46 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.44 (d, *J* = 2.1 Hz, 3H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 7.36 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.33 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 2H, Ar-H) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁) :** 172.2 (C₇), 165.7 (C₅), 160.1 (C₂), 156.0 (C₃), 131.9 (C₁₁), 128.8 (C₁₂), 129.9 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 114.7 (C₈), 105.4 (C₁) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2927, 1772, 1751, 1676, 1610, 1595, 1490, 1442, 1371, 1296, 1261, 1163, 1074, 1058, 956, 904, 783, 727, 692 ;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M-H]⁻ : 307.0622, calculated for C₁₈H₁₁O₅⁻ : 307.0612.

Synthesis of compounds (269) and (268)



General procedure 7a was followed to give product (268) in 27% yield as a orange oil (cf description bellow) and product (269) in 73% yield as a orange oil.

→ 2-(4-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)-acetic acid (268)



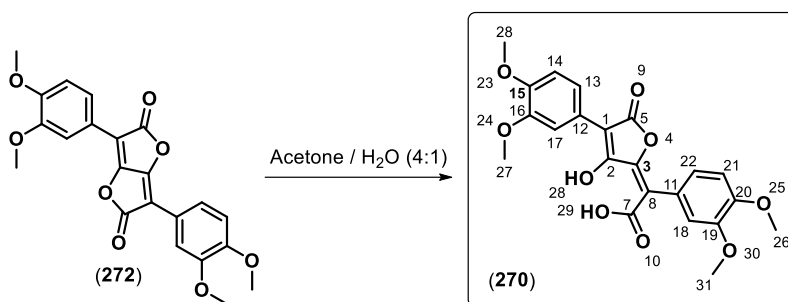
Chemical formula : C₂₁H₁₈O₈

Molecular weight : 398.37 g/mol

General procedure 7a was followed to give product (268) in 27 % yield as a yellow oil.

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, acetonitrile-*d*₃)** : 8.13 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 7.94 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₇), 7.77 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H, H₁₃), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₁₄), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : [166.58, 166.4 (C₃, C₅), 159.7 (C_q), 159.1 (C_q), 149.3 (C_q), 149.0 (C_q), 148.6 (C_q), 148.5 (C_q), 131.5 (C₁₇), 129.2 (C₁₃), 124.8 (C_q), 124.5 (C_q), 122.1 (C_q), 121.7 (C_q), 121.2 (CH-Ar), 113.9 (CH-Ar), 113.6 (CH-Ar), 111.0 (CH-Ar), 110.8 (CH-Ar), [55.89, 55.84 (C₂₇, C₂₈), 55.3 (C₂₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2937, 2839, 1769, 1683, 1596, 1513, 1465, 1413, 1368, 1249, 1182, 1143, 1059, 1025, 993, 956, 915, 865, 835, 812, 767, 744, 697 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 399.1085, calculated for C₂₁H₁₉O₈⁺ : 399.1074.
- **HRMS (ESI -)** : *m/z* [M-H]⁻ : 397.0894, calculated for C₂₁H₁₇O₈⁻ : 397.0929.

2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(4-[3,4-dimethoxyphenyl]-3-hydroxy-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene)-acetic acid (270)



Chemical formula : C₂₂H₂₀O₉

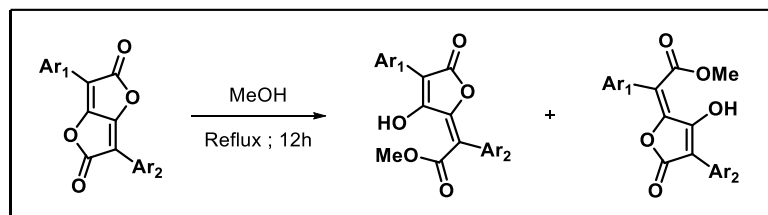
Molecular weight : 428.39 g/mol

General procedure 7a was followed to give product (270) in > 99% yield a orange amorphous solid.

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, DMSO-*d*₆) :** 8.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂₂), 7.85 (s, 1H, H₁₈), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₂₁), 6.94 (dd, *J* = 8.4, 3.3 Hz, 1H, H₁₃), 6.83 (s, 1H, H₁₇), 6.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₁₄), [3.79, 3.76, 3.73 (s, 12H, OCH₃)] ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, DMSO-*d*₆) :** [169.1, 168.5, 167.3 (C₂, C₅, C₇)], 152.1 (C₃), [148.2, 148.0, 147.6, 146.7 (C₁₅, C₁₆, C₁₉, C₂₀)], [128.4, 125.2 (C₁₁, C₁₂)], [117.4, 95.3 (C₁, C₈)], [122.7, 118.2, 114.5, 111.7, 110.9, 109.5 (C₁₃, C₁₄, C₁₇, C₁₈, C₂₁, C₂₂)], [55.5, 55.5, 55.3 (4C, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₃₁)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2839, 1751, 1704, 1599, 1515, 1466, 1413, 1390, 1361, 1322, 1253, 1214, 1175, 1139, 1066, 1021, 924, 869, 814, 794, 766, 701, 655, 626 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+Na]⁺ : 451.1019, calculated for C₂₂H₂₀NaO₉⁺ : 451.1000.

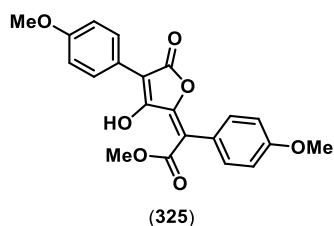
2.2.4.2 Transesterification of bistetronic acids by methanol

General procedure 7b :

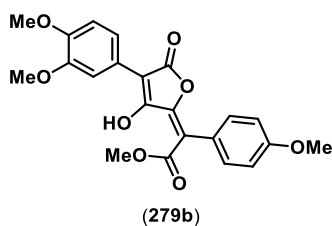


A suspension of bistetronic acid (0.3 mmol) in MeOH (15 mL) was heated to reflux for 12h. After cooling, the crude mixture was concentrated and crude products were purified by flash chromatography (cyclohexane or petroleum ether/AcOEt : 7:3) affording the two corresponding permethylated pulvinic acids.

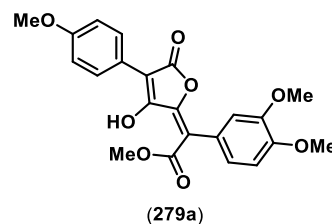
List of compounds synthesized by general procedure 7b :



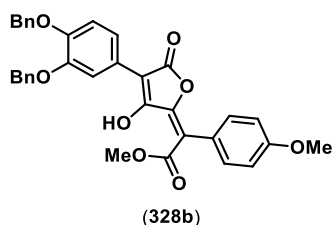
Synthesis and description page 341



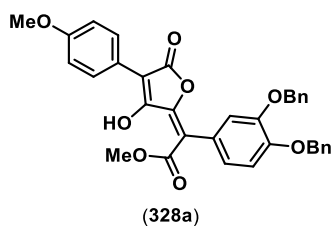
Synthesis and description page 342



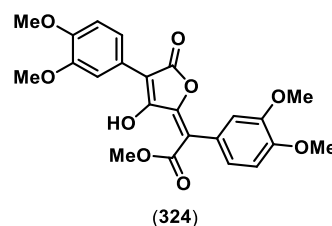
*Synthesis page 342
Description page 345*



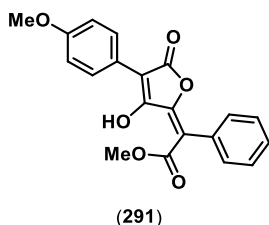
*Synthesis page 346
Description page 347*



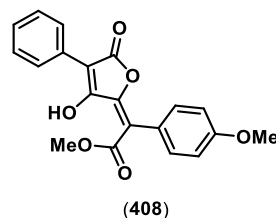
Synthesis and description page 346



Synthesis and description page 348

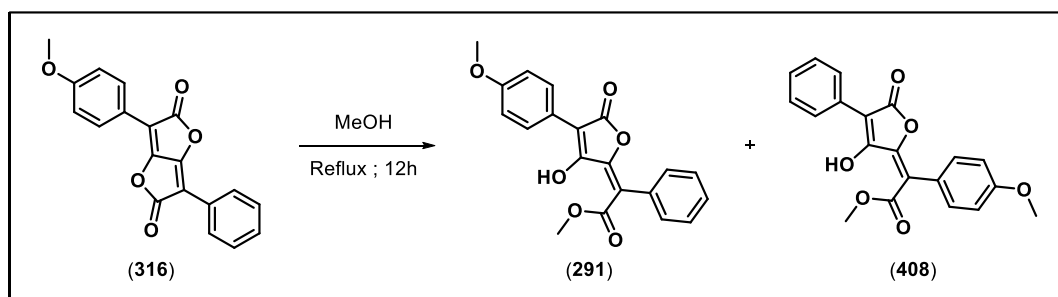


*Synthesis page 339
Description page 340*



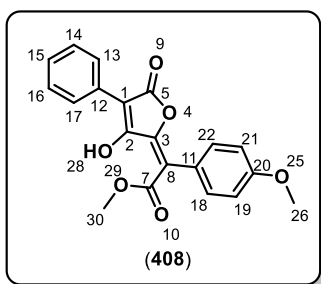
Synthesis and description page 339

Synthesis of compounds (291) and (408)



General procedure 7b was followed to give *isopinastric acid* (**408**) in 63% yield as orange oil (cf description bellow) and *pinastric acid* (**291**) in 33% yield as orange oil (cf description page 340).

→ *Isopinastric acid* (**408**)

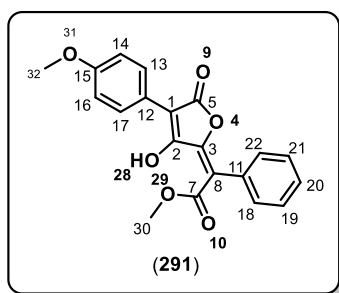


Chemical formula : C₂₀H₁₆O₆

Molecular weight : 352.34 g/mol

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 13.72 (s, 1H, OH₂₈), 8.14 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.44 (tt, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 7.33 (tt, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H, H₁₅), 7.21 (dt, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 6.95 (dt, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 3.90 (s, 3H, H₃₀), 3.85 (s, 3H, H₂₆) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 171.9 (C₇), 166.0 (C₅), 160.3 (C₂), 159.8 (C₂₀), 154.6 (C₃), 131.4 (2C, C₁₈, C₂₂), 128.4 (2C, C₁₄, C₁₆), 128.3 (C₁₅), 127.9 (2C, C₁₃, C₁₇), 124.1 (C₁₁), 115.6 (C₈), [113.7, 113.6 (C₁₉, C₂₁)], 105.1 (C₁), 55.3 (C₂₆), 54.4 (C₃₀) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2954, 2927, 1772, 1678, 1606, 1512, 1463, 1440, 1317, 1305, 1288, 1249, 1180, 1161, 1066, 1031, 960, 948, 904, 835, 781, 731, 698 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 353.1016, calculated for C₂₀H₁₇O₆⁺ : 353.1020.

→ **Pinastric acid** (291)

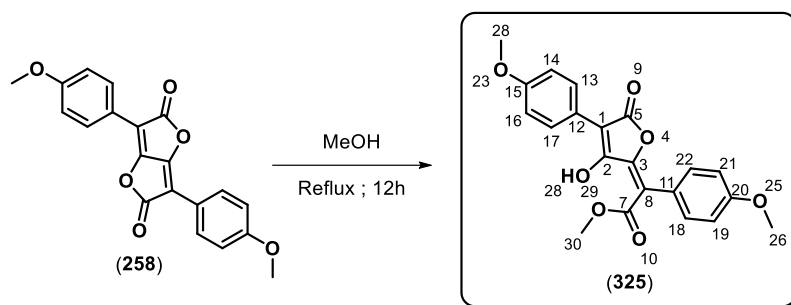


Chemical formula : C₂₀H₁₆O₆

Molecular weight : 352.34 g/mol

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁)** : 13.55 (s, 1H, H₂₈), 8.13 (dt, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.42-7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.27-7.25 (m, 3H, Ar-H), 6.97 (dt, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 3.88 (s, 3H, H₃₀), 3.85 (s, 3H, H₃₂) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁)** : 171.9 (C₇), 166.2 (C₅), 159.8 (C₁₅), 158.7 (C₂), 155.2 (C₃), [130.1, 128.7, 128.3 (5C, C₁₈₋₂₂)], 129.5 (2C, C₁₃, C₁₇), 121.8 (C₁₂), 115.3 (C₈), 114.1 (2C, C₁₄, C₁₆), 105.5 (C₁), 55.4 (C₃₂), 54.5 (C₃₀) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2956, 2926, 2601, 1774, 1716, 1676, 1597, 1514, 1492, 1456, 1438, 1417, 1371, 1307, 1276, 1251, 1184, 1161, 1103, 1076, 1064, 1029, 960, 902, 835, 732, 698 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 353.1007, calculated for C₂₀H₁₇O₆⁺ : 353.1020.

Methyl 2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl) acetate (325)



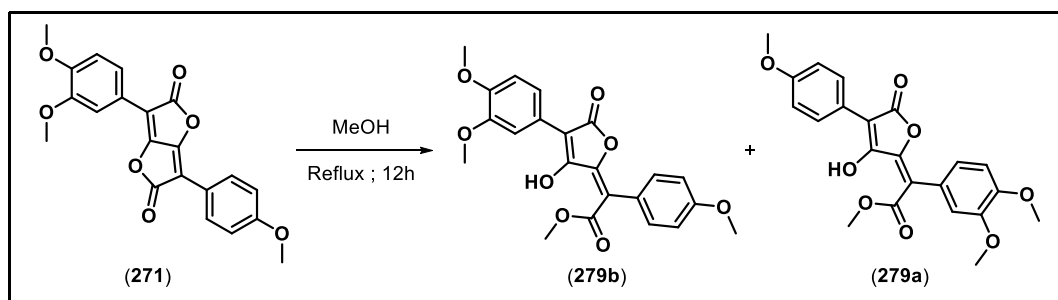
Chemical formula : C₂₁H₁₈O₇

Molecular weight : 382.37 g/mol

General procedure 7b was followed to give product (325) in 84% yield a orange amorphous solid.

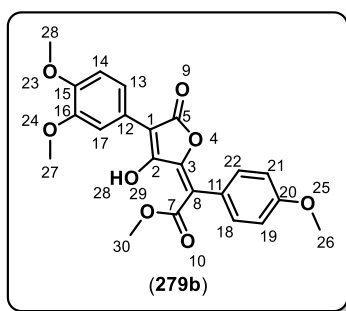
- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) :** 13.53 (1H, OH₂₈, s), 8.13 (dt, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.20 (dt, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 6.97 (dt, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 6.94 (dt, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 3.88 (s, 3H, H₃₀), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁) :** 172.1 (C₇), 166.3 (C₅), 159.9 (C₂), 159.7 (C₂₀), 158.8 (C₁₅), 154.9 (C₃), 131.6 (2C, C₁₃, C₁₇), 129.5 (2C, C₁₈, C₂₂), 124.4 (C₁₁), 121.9 (C₁₂), 115.2 (C₈), 114.07 (2C, C₁₉, C₂₁), 113.8 (2C, C₁₄, C₁₆), 105.3 (C₁), 55.4 (2C, C₂₆, C₃₈), 54.4 (C₃₀) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3014, 2967, 2936, 2837, 2726, 2360, 2340, 1768, 1748, 1675, 1607, 1582, 1511, 1445, 1413, 1364, 1328, 1302, 1274, 1246, 1188, 1159, 1101, 1063, 1031, 959, 941, 902, 822, 783, 765, 744, 700, 652, 637 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+H]⁺ : 383.1118, calculated for C₂₁H₁₉O₇⁺ : 383.1125 ; m/z [MM+H]⁺ : 765.2106, calculated for C₄₂H₃₇O₁₄⁺ : 765.2178.

Synthesis of compounds (279a) and (279b)



General procedure 7b was followed to give product (279b) in 43% yield as orange oil (cf description bellow) and compound (279a) in 57% yield as orange oil (cf description page 345).

→ Methyl 2-(4-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)-acetic acetate (279b)



Chemical formula : $C_{22}H_{20}O_8$

Molecular weight : 412.39 g/mol

- $^1\text{H NMR } \delta \text{ ppm (300 MHz, chloroform-}d_1\text{)}$: 7.82 (dd, $J = 8.6, 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_{13}), 7.81 (1H, H_{17} , d, $J = 1.8 \text{ Hz}$), 7.21 (dt, $J = 8.7, 1.9 \text{ Hz}$, 2H, H_{18}, H_{22}), 6.94 (dt, $J = 8.8, 2.1 \text{ Hz}$, 2H, H_{19} & H_{21}), 6.93 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, H_{14}), [3.94, 3.92 (s, 6H, H_{27}, H_{28})], 3.88 (s, 3H, H_{30}), 3.85 (s, 3H, H_{26}) ;
- $^{13}\text{C NMR } \delta \text{ ppm (75 MHz, chloroform-}d_1\text{)}$: 172.1 (C_7), 166.3 (C_5), 159.9 (C_{20}), 158.9 (C_2), 154.8 (C_3), 149.3 (C_{15}), 148.8 (C_{16}), 131.6 (2C, C_{18}, C_{22}), 124.3 (C_{11}), 122.2 (C_{12}), 121.3 (C_{13}), 115.2 (C_8), 113.7 (2C, C_{19}, C_{21}), 111.1 (C_{14}), 110.9 (C_{17}), 105.2 (C_1), [56.0, 56.0 (C_{27}, C_{28})], 55.4 (C_{26}), 54.49 (C_{30}) ;
- **IR (neat) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$** : 3431, 2959, 2933, 2838, 1777, 1711, 1675, 1596, 1572, 1512, 1466, 1440, 1410, 1373, 1321, 1305, 1288, 1249, 1180, 1144, 1114, 1067, 1025, 960, 825, 813, 766, 748, 701, 654, 626 ;

- **HRMS (ESI +)** : m/z $[M+H]^+$: 413.1213, calculated for $C_{22}H_{21}O_8^+$: 413.1231 ; m/z $[MM+H]^+$: 825.2313, calculated for $C_{44}H_{41}O_{16}^+$: 825.2389 ;
- **Crystallography** :

A little prismatic crystal of 0.21 x 0.19 x 0.07 mm, grown from acetonitrile, was used for data collection. Empirical formula $C_{22}H_{20}O_8$, C_2H_3N , $M = 454.43$, $T = 293$ K. Triclinic system, space group P-1, $Z = 2$, $Z' = 1$, $a = 8.3166(3)$, $b = 9.5989(3)$, $c = 141786(5)$ Å, $\alpha = 74.6770(10)^\circ$, $\beta = 89.390(2)^\circ$, $\gamma = 82.354(2)^\circ$, $V = 1081.58(6)$ Å³, $F(000) = 476$, $\mu = 0.883$ mm⁻¹.

X-ray diffraction data for compound (**279b**) were collected by using a VENTURE PHOTON100 CMOS Bruker diffractometer with Micro-focus I μ S source CuK α radiation ($\lambda = 1.54178$ Å). Crystals were mounted on a CryoLoop (Hampton Research) with Paratone-N (Hampton Research) as cryoprotectant and then flashfrozen in a nitrogen-gas stream at 200 K. For compounds, the temperature of the crystal was maintained at the selected value by means of a 700 series Cryostream cooling device to within an accuracy of ± 1 K. The data were corrected for Lorentz polarization, and absorption effects. The structures were solved by direct methods using SHELXS-97²⁵⁰ and refined against F^2 by full-matrix least-squares techniques using SHELXL-2018²⁴⁹ with anisotropic displacement parameters for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were located on a difference Fourier map and introduced into the calculations as a riding model with isotropic thermal parameters. All calculations were performed by using the Crystal Structure crystallographic software package WINGX.⁸⁸ The crystal data collection and refinement parameters are given in Table 24.

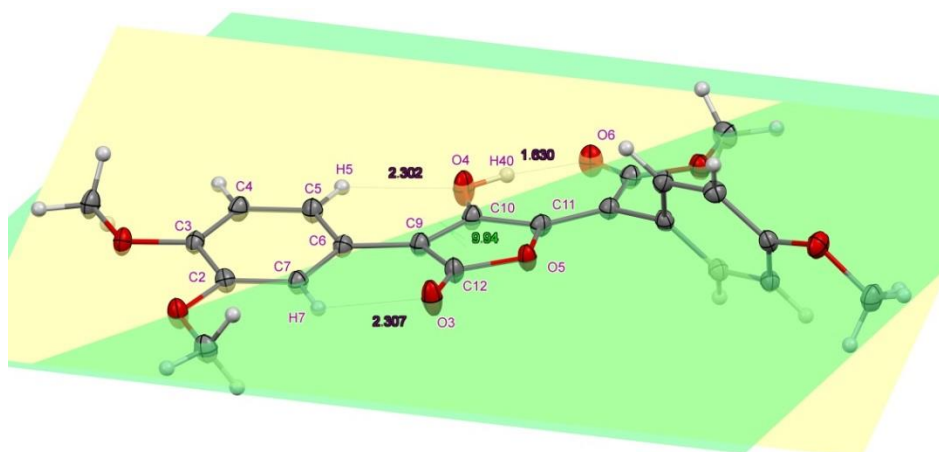
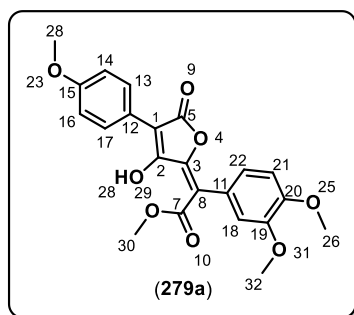


Figure 88 – Crystallographic image of compound (**279b**). 3 intramolecular hydrogen bonds induce flatness of the two cycles C2-C7 and C9-C12.

Compound	(279b)
Empirical Formula	C ₂₂ H ₂₀ O ₈ , C ₂ H ₃ N
<i>M_r</i>	453.43
Crystal size, mm³	0.21 x 0.19 x 0.07
Crystal system	triclinic
Space group	<i>P</i> - 1
a, Å	8.3166(3)
b, Å	9.5989(3)
c, Å	14.1786(5)
α, °	74.6770(10)
β, °	89.390(2)
γ, °	82.354(2)
Cell volume, Å³	1081.58(6)
Z ; Z'	2 ; 1
T, K	200(1)
Radiation type ; wavelength Å	CuKα ; 1.54178
F₀₀₀	476
μ, mm⁻¹	0.883
range, °	3.233 - 66.965
Reflection collected	27 687
Reflections unique	3 835
R_{int}	0.0354
GOF	1.123
Refl. obs. (<i>I</i>>2(<i>I</i>))	3 400
Parameters	306
wR₂ (all data)	0.1107
R value (<i>I</i>>2(<i>I</i>))	0.0427
Largest diff. peak and hole (e⁻·Å⁻³)	0.534 ; -0.461

Table 24 – Crystallographic data and structure refinement details.

→ Methyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene) acetate (279a)



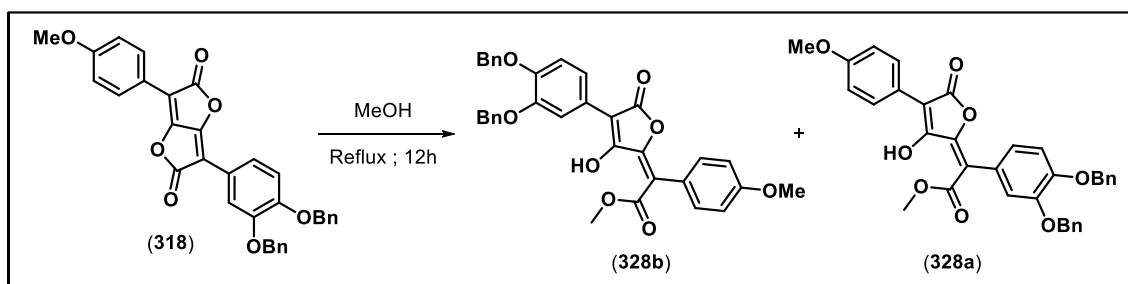
Chemical formula : C₂₂H₂₀O₈

Molecular weight : 412.39 g/mol

General procedure 7b was followed to give product (**279a**) in 57% yield as orange oil.

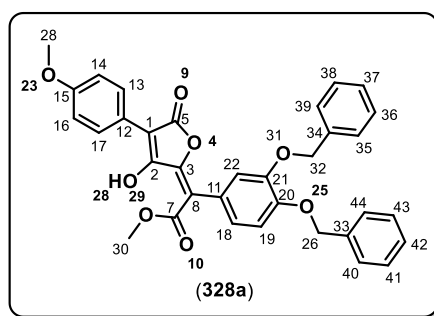
- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 8.09 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.05 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁₈), 7.02 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 6.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₂₁), 6.94 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H₂₂), 3.91 (s, 3H, H₃₀), 3.86 (s, 3H, H₂₆), 3.84 (s, 3H, H₂₈), 3.81 (s, 3H, H₃₂) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 173.1 (C₇), 167.0 (C₅), 160.7 (C₂), 160.3 (C₁₅), 155.0 (C₃), 150.8 (C₂₀), 149.9 (C₁₉), 130.1 (2C, C₁₃, C₁₇), 126.1 (C₁₁), 124.1 (C₂₂), 123.0 (C₁₂), 116.6 (C₈), 115.5 (C₁₈), 114.9 (2C, C₁₄, C₁₆), 112.3 (C₂₁), 105.0 (C₁), 56.5 (C₃₂), 56.3 (C₂₆), 55.8 (C₂₈), 55.0 (C₃₀) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3016, 2956, 2935, 2837, 2590, 1770, 1676, 1597, 1512, 1458, 1438, 1411, 1369, 1305, 1249, 1217, 1182, 1143, 1103, 1066, 1026, 997, 950, 908, 871, 835, 806, 750, 698, 667, 651, 632 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+H]⁺ : 413.1281, calculated for C₂₂H₂₁O₈⁺ : 413.1231 ; m/z [MM+H]⁺ : 825.2345, calculated for C₄₄H₄₁O₁₆⁺ : 825.2389.

Synthesis of compounds (328a) and (328b)



General procedure 7b was followed to give product (328a) in 54% yield as a orange oil (cf description bellow) and compound (328b) in 46% yield as an orange oil (cf description page 347).

→ Methyl 2-(3,4-bis[benzyloxyphenyl]) 2-(3-hydroxy-4-[4-methoxyphenyl])-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene) acetate (328a)

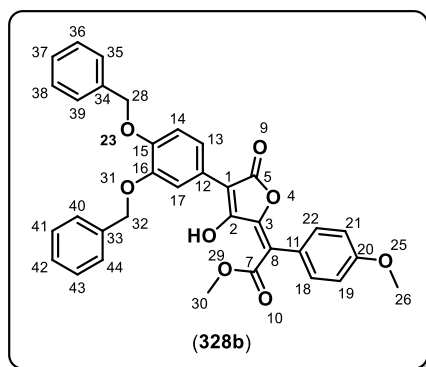


Chemical formula : C₃₄H₂₈O₈

Molecular weight : 564.59 g/mol

- ¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) : 13.50 (s, 1H, OH₂₈), 8.12 (dt, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.49-7.30 (m, 10H, H₃₅₋₄₄), 6.97 (dt, *J* = 9.2, 2.2 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₉), 6.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₂₂), 6.82 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, H₁₈), 5.20 (s, 2H, H₂₆), 5.17 (s, 2H, H₃₂), 3.85 (s, 3H, H₂₈), 3.79 (s, 3H, H₃₀) ;
- ¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁) : 171.9 (C₇), 166.3 (C₅), 159.7 (C₁₅), 158.8 (C₂), 155.0 (C₃), 149.7 (C₂₀), 148.4 (C₂₁), [137.4, 137.3 (C₃₃, C₃₄)], 129.5 (2C, C₁₃, C₁₇), [128.7, 128.6 (4C, C₃₆, C₃₈, C₄₁, C₄₃)], [128.0, 127.9 (C₃₇, C₄₂)], [127.5, 127.4 (4C, C₃₅, C₃₉, C₄₀, C₄₄)], 125.1 (C₁₁), 124.0 (C₁₈), 121.9 (C₁₂), 117.7 (C₂₂), 115.0 (C₈), [114.2, 114.1 (C₁₄, C₁₆)], 105.4 (C₁), 71.8 (C₃₂), 71.3 (C₂₆), 55.4 (C₂₈), 54.4 (C₃₀);
- IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ : 3456, 2355, 1697, 1677, 1646, 1554, 1538, 1507, 1252, 841, 832, 786, 733, 698, 673, 648 ;
- HRMS (ESI +) : m/z [M+H]⁺ : 565.1854, calculated for C₃₄H₂₉O₈⁺ : 565.1857.

→ Methyl 2-(4-(3,4-bis[benzyloxyphenyl])-3-hydroxy-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl) acetate (328b)



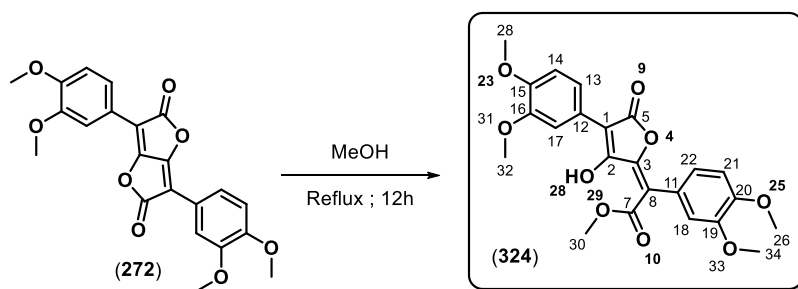
Chemical formula : C₃₄H₂₈O₈

Molecular weight : 564.59 g/mol

General procedure 7b was followed to give product (328b) in 46% yield as a orange oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) :** 13.61 (s, 1H, OH), 7.93 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₇), 7.79 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H₁₃), 7.55-7.28 (m, 10H, Ar-H), 7.22 (dt, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.0 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, Ar-H), 5.24 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.23 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁) :** 171.7 (C₇), 166.0 (C₅), [159.6, 158.6 (C₂, C₂₀)], 154.6 (C₃), [149.1, 148.6 (C₁₅, C₁₆)], [137.3, 137.2 (C₃₃, C₃₄)], 131.4 (2C, C₁₈, C₂₂), [128.5, 128.4 (4C, C₃₆, C₃₈, C₄₁, C₄₃)], [127.8, 127.6 (C₃₇, C₄₂)], [127.4, 127.2 (4C, C₃₅, C₃₉, C₄₀, C₄₄)], 125.0 (C₁₂), 124.2 (C₁₃), 122.6 (C₁₁), 117.5 (C₁₄), 114.9 (C₈), [114.5, 114.3 (C₁₉, C₂₁)], 113.6 (C₁₇), 104.9 (C₁), [71.2, 71.1 (C₂₈, C₃₂)], [55.3, 54.2 (C₂₆, C₃₀)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2916, 2848, 1699, 1597, 1558, 1504, 1456, 1251, 1968, 1026, 962, 738, 696 ;
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M+H]⁺ : 565.1847, calculated for C₃₄H₂₉O₈⁺ : 565.1857.

Methyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(4-[3,4-dimethoxyphenyl]-3-hydroxy-5-oxofuran-2-(5H)-ylidene) acetate (324)



Chemical formula : C₂₃H₂₂O₉

Molecular weight : 442.42 g/mol

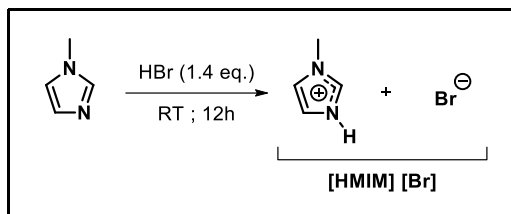
General procedure 7b was followed to give product (324) in > 99% yield as a orange oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, chloroform-*d*₁) :** 13.60 (s, 1H, OH₂₈), 7.81 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁₇), 7.80 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, H₁₃), 6.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H₁₄), 6.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₂₁), 8.84 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H₂₂), 6.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₈), [3.94, 3.92, 3.88 (s, 12H, H₂₆, H₂₈, H₃₂, H₃₄,)], 3.90 (s, 3H, H₃₀) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform-*d*₁) :** 172.1 (C₇), 166.2 (C₅), 158.8 (C₂), 155.3 (C₃), [149.5, 149.4 (C₁₅, C₂₀)], [148.9, 148.7 (C₁₆, C₁₉)], 124.6 (C₁₂), 123.1 (C₂₂), 122.2 (C₁₂), 121.4 (C₁₃), 115.3 (C₈), 113.7 (C₁₈), 111.2 (C₁₄), [110.99, 110.97 (C₁₇, C₂₁)], 105.4 (C₁), [56.2, 56.1, 56.0 (4C, C₂₆, C₂₈, C₃₂, C₃₄)], 54.5 (C₃₀) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3369, 2956, 2935, 2837, 2584, 2254, 1776, 1674, 1597, 1516, 1463, 1440, 1411, 1371, 1330, 1307, 1284, 1255, 1230, 1217, 1141, 1116, 1068, 1024, 999, 960, 914, 883, 866, 833, 810, 788, 765, 729, 700, 648 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+H]⁺ : 443.1337, calculated for C₂₃H₂₃O₉⁺ : 443.1337.

2.2.5 Deprotection reactions

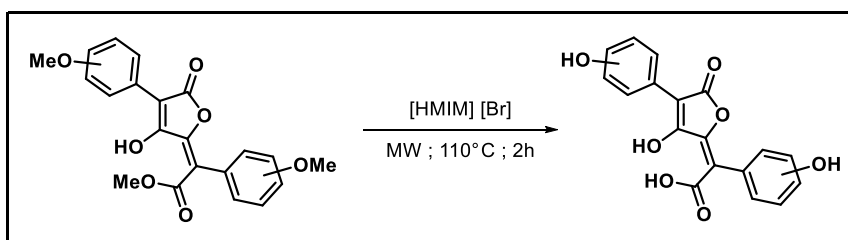
2.2.5.1 Deprotection reaction with ionic liquid

General procedure 8a :



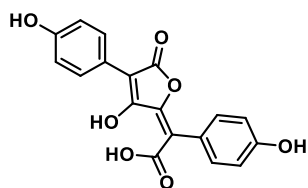
To a solution of 1-methylimidazole (1.0 eq., 0.251 mol, 20 mL) in ACN (100 mL), an aqueous solution of HBr (48 % in water) (1.4 eq., 0.351 mol, 40 mL) was added dropwise at 0°C. After 12h of stirring at room temperature, the reaction mixture was concentrated to dryness. The resulting ionic liquid [HMIM][Br] was dried under vacuum, stored under argon and used within two weeks.

General procedure 8b :

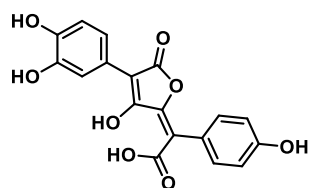


A solution of permethylated pulvinic acid (1.0 eq., 0.23 mmol) in [HMIM][Br] (116 eq., 26.38 mmol, 4.3 g) in a 10 mL vial was heated to 110°C for 2h under microwave irradiation. After cooling to 55°C, the reaction mixture was partitioned between water (25 mL) and AcOEt (3x40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt/Acetone : 7:3) affording the corresponding pulvinic acid.

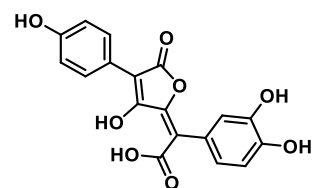
List of compounds synthesized by general sequence procedure 8a and 8b :



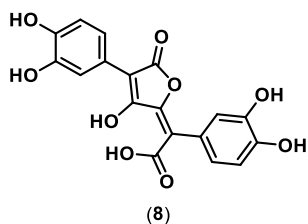
Synthesis and description page 351



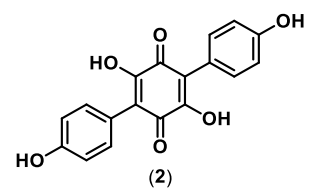
Synthesis and description page 352



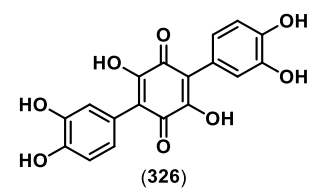
Synthesis and description page 353



Synthesis and description page 354

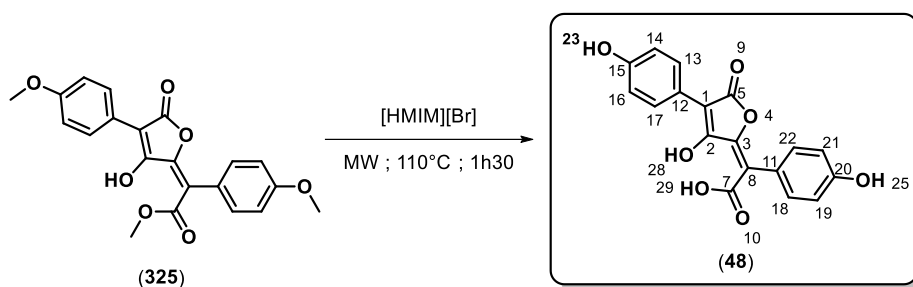


Synthesis and description page 355



Synthesis and description page 356

Atromentic acid (48)



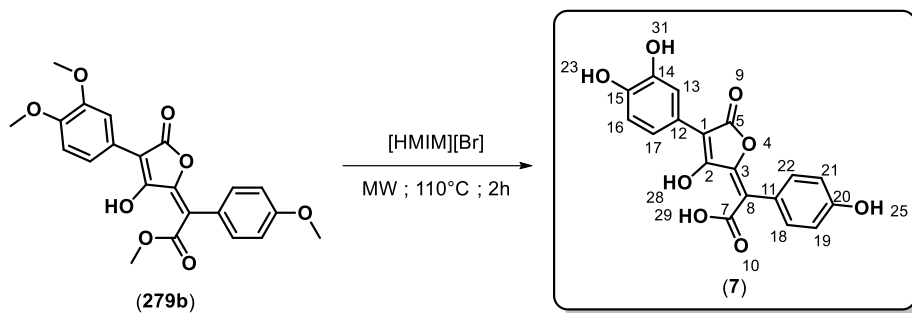
Chemical formula : C₁₈H₁₂O₇

Molecular weight : 340.29 g/mol

General sequence procedure 8a and 8b was followed to give product (48) in 34% yield as a greenish yellow oil.

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, acetone-*d*₆) :** 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.15 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 6.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 6.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, acetone-*d*₆) :** 170.6 (C₇), 169.7 (C₅), 169.0 (C₂), 157.3 (C₂₀), 156.2 (C₁₅), 153.2 (C₃), 132.7 (2C, C₁₈, C₂₂), 128.7 (C₁₁), 128.3 (2C, C₁₃, C₁₇), 125.2 (C₁₂), 119.5 (C₈), 115.5 (2C, C₁₄, C₁₆), 114.8 (2C, C₁₉, C₂₁), 97.5 (C₁) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2368, 2318, 1992, 1843, 1734, 1716, 1683, 1653, 1635, 1558, 1541, 1521, 1506, 1489, 1473, 1458, 1338 ;
- **HRMS (ESI -) :** m/z [M-H]⁻ : 339.0429, calculated for C₁₈H₁₁O₇⁻ : 339.0510.

Xerocomic acid (7)



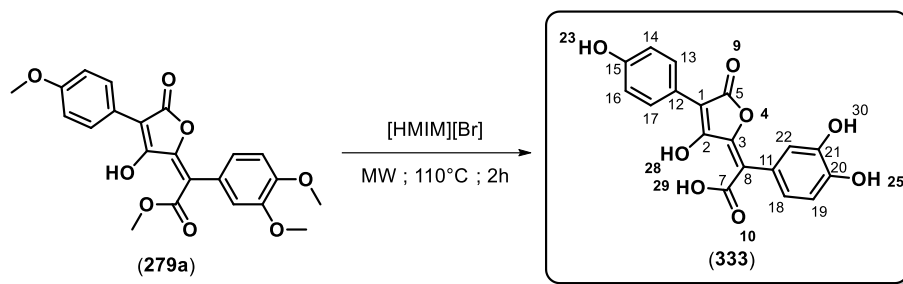
Chemical formula : C₁₈H₁₂O₈

Molecular weight : 356.29 g/mol

General sequence procedure 8a and 8b was followed to give product (7) in 67% yield as a greenish yellow oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 7.74 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₃), 7.60 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H, H₁₇), 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 6.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₆) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 174.0 (C₇), 167.1 (C₅), 160.6 (C₂), 158.3 (C₂₀), 155.2 (C₃), 146.2 (C₁₅), 145.5 (C₁₄), 132.6 (2C, C₁₈, C₂₂), 125.6 (C₁₁), 122.7 (C₁₂), 121.0 (C₁₇), 117.0 (C₈), 116.0 (C₁₆), 115.4 (2C, C₁₉, C₂₁), 115.4 (C₁₃), 104.3 (C₁) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3311, 1736, 1699, 1605, 1573, 1513, 1437, 1394, 1365, 1231, 1173, 1116, 1061, 1022, 1001, 963, 881, 838, 819, 770, 634 ;
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M_{ox}+H]⁺ : 355.0436, calculated for C₁₈H₁₁O₈⁺ : 355.0448 ; [M+H]⁺ : 357.0589, calculated for C₁₈H₁₃O₈⁺ : 357.0605 ; [MM+H]⁺ : 713.1086, calculated for C₃₆H₂₅O₁₆⁺ : 713.1137 ;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M-H]⁻ : 355.0453, calculated for C₁₈H₁₁O₈⁻ : 355.0459 ; [MM-H]⁻ : 711.1029, calculated for C₃₆H₂₃O₁₆⁻ : 711.0992.

Isoxerocomic acid (333)



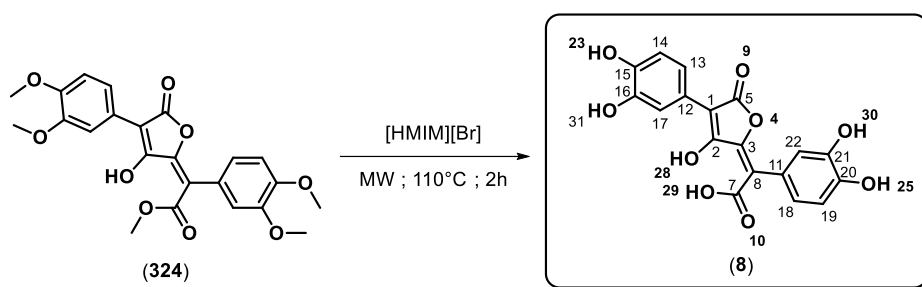
Chemical formula : C₁₈H₁₂O₈

Molecular weight : 356.29 g/mol

General sequence procedure 8a and 8b was followed to give product (333) in 67% yield as a greenish yellow oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 8.16 (dt, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 6.81 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H₂₂), 6.80 (dt, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 6.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₁₉), 6.65 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H₁₈) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 170.0 (C₇), 169.0 (C₅), 168.9 (C₂), 154.9 (C₁₅), 152.5 (C₃), 144.0 (C₂₀), 143.4 (C₂₁), 131.9 (C₈), 128.6 (C₁₁), 127.2 (2C, C₁₃, C₁₇), 124.8 (C₁₂), 122.6 (C₁₈), 118.1 (C₂₂), 114.5 (2C, C₁₄, C₁₆), 113.8 (C₁₉), 97.3 (C₁);
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M+H]⁺ : 357.0609, calculated for C₁₈H₁₃O₈⁺ : 357.0605 ; [MM+H]⁺ : 713.1085, calculated for C₃₆H₂₅O₁₆⁺ : 713.1137 ;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M-H]⁻ : 355.0264, calculated for C₁₈H₁₁O₈⁻ : 355.0459 ; [MM-H]⁻ : 711.0722, calculated for C₃₆H₂₃O₁₆⁻ : 711.0992.

Variegatic acid (8)



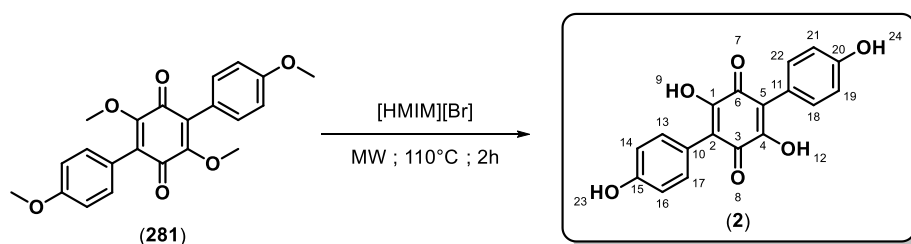
Chemical formula : C₁₈H₁₂O₉

Molecular weight : 372.29 g/mol

General sequence procedure 8a and 8b was followed to give variegatic acid (**8**) in > 99% yield as a brown oil. Characterisation of variegatic acid (**8**) is still in progress.

- **¹H NMR** δ ppm (300 MHz, acetone-*d*₆) : 7.72 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.54 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.95 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.92 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.74 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, Ar-H) ;
- **¹³C NMR** will be recorded as soon as possible ;
- **IR (neat)** ν_{max} cm⁻¹ : 3304, 2364, 2191, 2032, 1635, 1558, 686, 673, 640, 619 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 373.0539, calculated for C₁₈H₁₃O₉⁺ : 373.0554.

Atromentin (2)



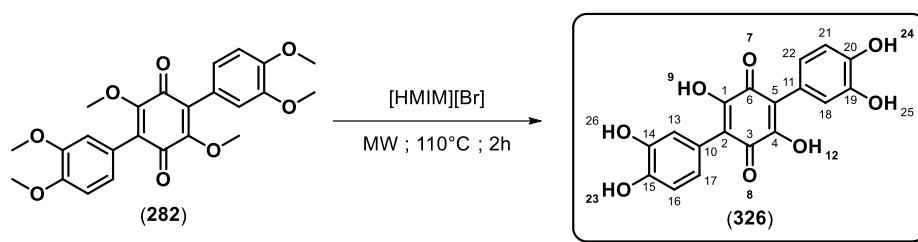
Chemical formula : C₁₈H₁₂O₆

Molecular weight : 324.29 g/mol

General sequence procedure 8a and 8b was followed to give product (2) in 53% yield as a violet oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetonitrile-*d*₃) :** 8.04 (s, 1H, OH), 7.65 (dt, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 4H, H₁₃, H₁₇, H₁₈, H₂₂), 6.82 (dt, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 4H, H₁₄, H₁₆, H₁₉, H₂₁) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetonitrile-*d*₃) :** 170.9 (2C, C₃, C₆), 162.9 (2C, C₁, C₄), 157.0 (2C, C₂₀, C₁₅), 132.7 (4C, C₁₃, C₁₇, C₁₈, C₂₂), 124.3 (2C, C₁₀, C₁₁), 115.4 (4C, C₁₄, C₁₆, C₁₉, C₂₁), 114.2 (2C, C₂, C₅) ;
- **IR (neat)** will be recorded as soon as possible ;
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M+H]⁺ : 325.0758, calculated for C₁₈H₁₃O₆⁺ : 325.0707 ;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M-H]⁻ : 323.0578, calculated for C₁₈H₁₁O₆⁻ : 323.0561.

Variegatin (326)



Chemical formula : C₁₈H₁₂O₈

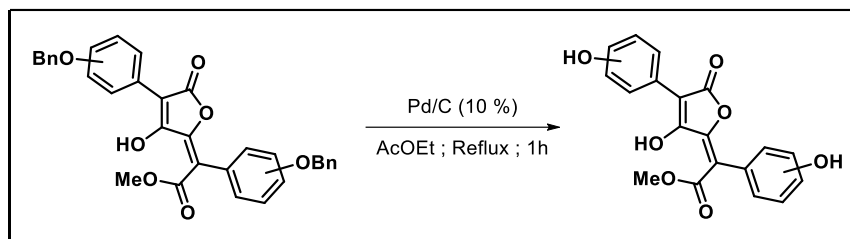
Molecular weight : 356.29 g/mol

General sequence procedure 8a and 8b was followed to give product (**326**) in > 99% yield as a brown oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 6.98 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, H₁₃, H₁₈), 6.84 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H, H₁₇, H₂₂), 6.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H₁₆, H₂₁) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 159.6 (2C, C₁, C₄), [145.9, 145.0 (4C, C₁₄, C₁₅, C₁₉, C₂₀)], 126.8 (2C, C₁₀, C₁₁), [123.7, 118.7, 115.4 (6C, C₁₃, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₂₁, C₂₂)], 114.4 (2C, C₂, C₅) ; (C₃ and C₆ not visible) ;
- **IR (neat)** will be recorded as soon as possible ;
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M+H]⁺ : 357.0585, calculated for C₁₈H₁₃O₈⁺ : 357.0605 ;

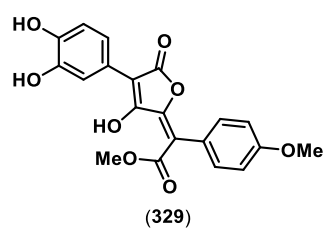
2.2.5.2 Selective hydrogenation of benzyl function

General procedure 9 :

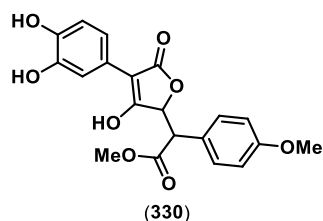


To a stirred solution of permethylated pulvinic acid (1.0 eq., 0.035 mmol) in ethyl acetate (3.5 mL), Pd/C (10 % m/m) was added. The reaction mixture was brought to reflux for 1h under an N₂ atmosphere. After cooling, the reaction mixture was filtered on celite and washed with ethyl acetate. The combine filtrates were concentrated under reduced pressure and purified by preparative HPLC (C18 – H₂O + 0.1 % formic acid/CH₃CN : 1:1) to separate the products of the crude.

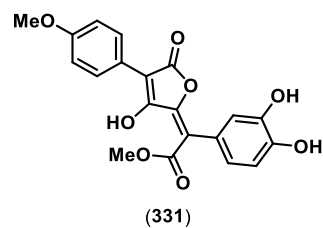
List of compounds synthesized by general procedure 9 :



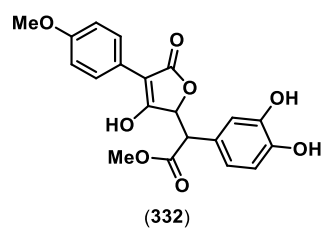
Synthesis page 358
Description page 359



Synthesis and description page 358

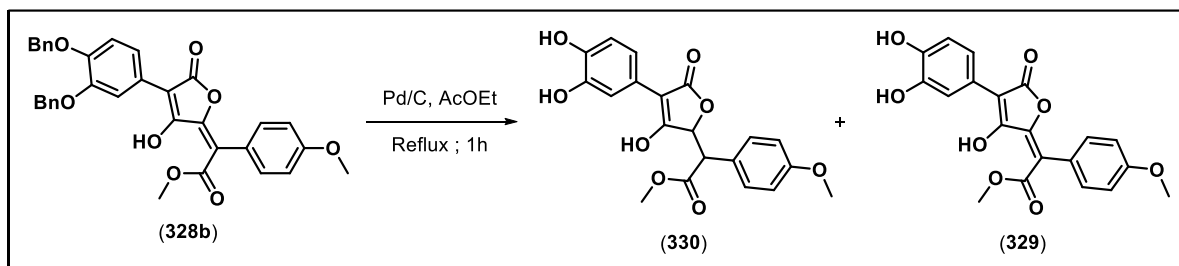


Synthesis page 360
Description page 361



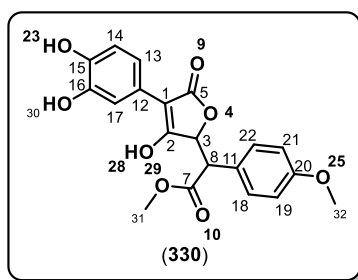
Synthesis and description page 360

Synthesis of compounds (329) and (330)



General procedure 9 was followed to give product (330) in 50% yield as a yellow oil (cf description bellow) and compound (329) in 50% yield as a yellow oil (cf description page 359).

→ Methyl 2-(4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-(4-methoxyphenyl)-acetate (330)

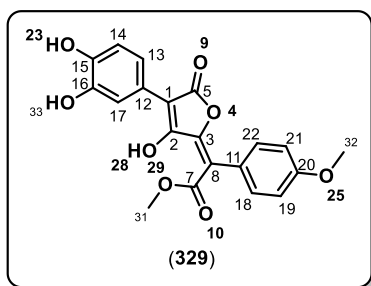


Chemical formula : $C_{20}H_{18}O_8$

Molecular weight : 386.36 g/mol

- 1H NMR δ ppm (400 MHz, acetone- d_6) : 7.81 (s br, OH), 7.36 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_{17}), 7.27 (dt, $J = 8.7, 2.1$ Hz, 2H, H_{18}, H_{22}), 7.20 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H, H_{13}), 6.88 (dt, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 2H, H_{19}, H_{21}), 6.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_{14}), 5.37 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H_3), 4.51 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H_8), 3.76 (s, 3H, H_{31}), 3.75 (s, 3H, H_{32}) ;
- ^{13}C NMR δ ppm (101 MHz, acetone- d_6) : 175.1 (C_7), 171.1 (C_5), 170.7 (C_2), 160.6 (C_{20}), 145.4 (C_{16}), 145.2 (C_{15}), 131.1 (2C, C_{18}, C_{22}), 125.4 (C_{11}), 122.7 (C_{12}), 120.4 (C_{13}), 115.7 (C_{14}), 115.5 (C_{17}), 114.8 (2C, C_{19}, C_{21}), 76.5 (C_3), 55.5 (C_{32}), 53.6 (C_8), 53.5 (C_{31}) ; (C_1 is not visible) ;
- IR (neat) ν_{max} cm^{-1} : 2374, 2320, 1772, 1734, 1716, 1683, 1670, 1653, 1647, 1635, 1616, 1558, 1541, 1506, 1489, 1473, 1458, 1436, 1396 ;
- HRMS (ESI +) : m/z $[M+H]^+$: 387.1073, calculated for $C_{20}H_{19}O_8^+$: 387.1074 ; $[MM+H]^+$: 773.2083, calculated for $C_{40}H_{37}O_{16}^+$: 773.2076.

→ Methyl 2-(4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-2-(4-methoxyphenyl)-acetate (329)



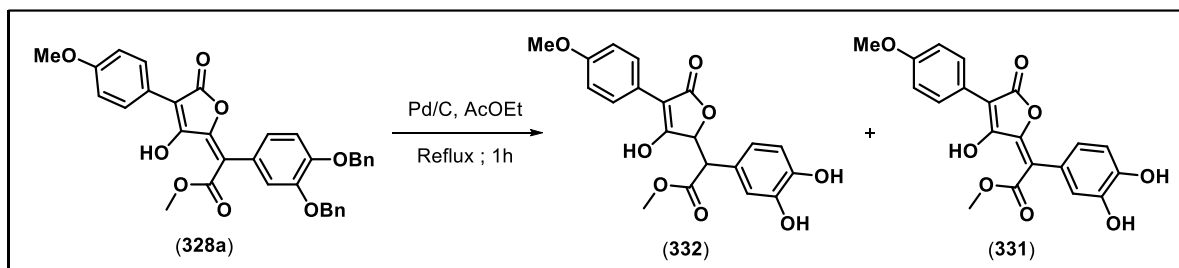
Chemical formula : C₂₀H₁₆O₈

Molecular weight : 384.34 g/mol

General procedure 9 was followed to give product (329) in 50% yield as a yellow oil.

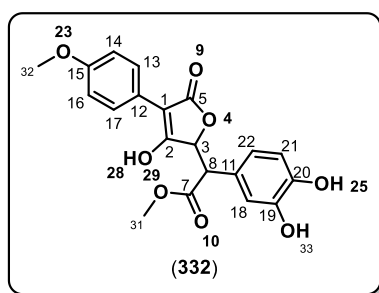
- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 13.74 (s br, 1H, OH₁₈), 8.15 (s br, 1H, OH₂₃), 8.05 (s br, 1H, OH₃₃), 7.72 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₇), 7.58 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H, H₁₃), 7.34 (dt, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 2H, H₁₈, H₂₂), 6.98 (dt, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 2H, H₁₉, H₂₁), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₁₄), 3.91 (s, 3H, H₃₁), 3.85 (s, 3H, H₃₂) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 173.2 (C₇), 161.0 (C₂₀), 146.6 (C₁₅), 145.9 (C₁₆), 132.5 (2C, C₁₈, C₂₂), 125.9 (C₁₁), 122.6 (C₁₂), 121.3 (C₁₃), 116.5 (C₈), 116.1 (C₁₄), 115.7 (C₁₇), 114.3 (2C, C₁₉, C₂₁), 105.6 (C₁), 55.6 (C₃₂), 54.8 (C₃₁) ; (C₂, C₃ and C₅ are not visible) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 2364, 1734, 1716, 1683, 1653, 1635, 1558, 1541, 1458, 1249, 1180 ;
- **HRMS (ESI +) :** m/z [M+H]⁺ : 385.0963, calculated for C₂₀H₁₇O₈⁺ : 385.0918.

Synthesis of compounds (331) and (332)



General procedure 9 was followed to give product (332) in 50% yield as a yellow oil (cf description bellow) and compound (331) in 50% yield as a yellow oil (cf description page 361).

→ Methyl 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-acetate (332)



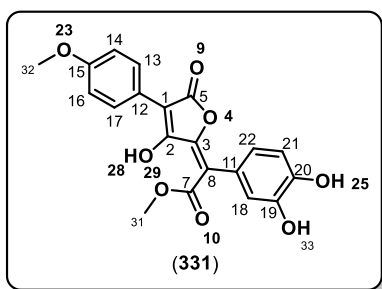
Chemical formula : C₂₀H₁₈O₈

Molecular weight : 386.36 g/mol

General procedure 9 was followed to give product (332) in 50% yield as a yellow oil.

- ¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) : 7.82 (dt, *J* = 9.0, 1.9 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 6.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₁₈), 6.87 (dt, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 6.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂₁), 6.68 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, H₂₂), 5.29 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H₃), 4.40 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H₈), 3.78 (s, 3H, H₃₂), 3.73 (s, 3H, H₃₁) ;
- ¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) : 175.0 (C₇), [159.4, 159.3 (C₁₅, C₁₉), 145.8 (C₂₀), 129.1 (2C, C₁₃, C₁₇), 125.1 (C₁₁), 124.0 (C₁₂), 121.6 (C₂₂), 117.0 (C₁₈), 116.0 (C₂₁), 114.2 (2C, C₁₄, C₁₆), 101.3 (C₁), 77.0 (C₃), 55.5 (C₃₂), 53.6 (C₈), 53.4 (C₃₁) ;
- IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ : 2368, 2320, 1734, 1716, 1699, 1683, 1653, 1558, 1541, 1516, 1508, 1249, 1174, 1028, 669, 615 ;
- HRMS (ESI +) : m/z [M+H]⁺ : 387.1073, calculated for C₂₀H₁₉O₈⁺ : 387.1074 ; [MM+H]⁺ : 773.2083, calculated for C₄₀H₃₇O₁₆⁺ : 773.2076.

→ Methyl 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidene)-acetate (331)



Chemical formula : C₂₀H₁₆O₈

Molecular weight : 384.34 g/mol

General procedure 9 was followed to give product (331) in 50% yield as a yellow oil.

- ¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) : 8.15 (s br, 1H, OH₂₅), 8.09 (dt, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 8.02 (s br, 1H, OH₃₃), 7.04 (dt, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 2H, H₁₄, H₁₆), 6.93 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₈), 6.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₂₁), 6.77 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, H₂₂), 3.93 (s, 3H, H₃₁), 3.86 (s, 3H, H₃₂) ;
- ¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) : 173.0 (C₇), 166.9 (C₅), 160.5 (C₁₅), 160.1 (C₂), 146.5 (C₂₀), 145.4 (C₁₉), 130.0 (2C, C₁₃, C₁₇), 125.0 (C₁₁), 123.1 (C₂₂), 122.8 (C₁₁), 118.4 (C₁₈), 115.6 (C₂₁), 114.7 (2C, C₁₄, C₁₆), 104.9 (C₁), 55.6 (C₃₂), 54.8 (C₃₁) ; (C₃ and C₈ are not visible) ;
- IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ : 2364, 2320, 1772, 1749, 1716, 1683, 1653, 1558, 1541, 1506 ;
- HRMS (ESI +) : *m/z* [M+H]⁺ : 385.0920, calculated for C₂₀H₁₇O₈⁺ : 385.0918 ; [MM+H]⁺ : 769.1768, calculated for C₄₀H₃₃O₁₆⁺ : 769.1763.

2.3 3-(3,4-dihydroxyphenyl)tetronic acid synthesis (xerocomic acid model)

2-bromo-3-methoxyfuran-2(5H)-one (362)



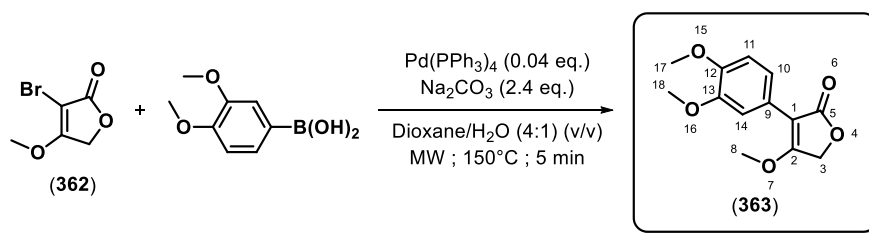
Chemical formula : C₅H₅BrO₃

Molecular weight : 193.00 g/mol

To a solution of 3-methoxyfuran-2(5H)-one (**361**) (1.0 eq., 1.00 g, 8.8 mmol) in CH₃CN (50 mL), NBS (1.2 eq, 1.87 g, 10.50 mmol) was slowly added at -30°C. Then, solution was allowed to warm up to room temperature. After 12h of stirring at room temperature, the reaction mixture was quenched with a saturated solution of Na₂S₂O₃ and extracted with DCM. The organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure affording (**362**) as a white amorphous solid (1.54 g ; 93.5% yield). The crude product was used in the next step without further purification.

- **¹H NMR δ ppm (200 MHz, chloroform-*d*₁)** : 4.70 (s, 2H, H₃, s), 4.10 (s, 3H, H₈) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 173.0 (C₂), 169.5 (C₅), 88.7 (C₁), 67.3 (C₃), 58.9 (C₈) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 1772, 1743, 1708, 1635, 1442, 1367, 1313, 1246, 1228, 1172, 1155, 1047, 1037, 989, 923, 885, 806, 750, 719 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 192.9496, calculated for C₅H₆⁷⁹BrO₃⁺ : 192.9495.

2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-methoxyfuran-2(5H)-one (363)



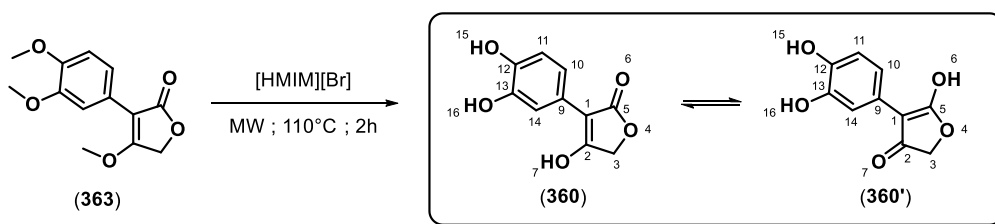
Chemical formula : C₁₃H₁₄O₅

Molecular weight : 250.25 g/mol

To a solution of 2-bromo-3-methoxyfuran-2(5H)-one (**(362)**) (1.0 eq., 5.18 mmol, 1.0 g) and 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (1.2 eq., 6.21 mmol, 1.130 g) in dioxane (21 mL) in a 30 mL vial, a solution of Na₂CO₃ (2.4 eq., 12.43 mmol, 1.317 g) in water (5.2 mL) and Pd(PPh₃)₄ (4 % mol., 0.21 mmol, 287 mg) were added. The reaction mixture was heated to 150°C for 5 minutes under microwave irradiation. After cooling to 55°C, the reaction mixture was filtered and concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/AcOEt : 9:1) affording the title compound (**(363)**) as a white amorphous solid (yield : 45%).

- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.45 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₄), 7.38 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, H₁₀), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₁₁), 4.72 (s, 2H, H₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 172.7 (C₅), 172.1 (C₂), [148.5, 148.3 (C₁₂, C₁₃)], 122.1 (C₉), 120.4 (C₁₀), [111.0, 110.8 (C₁₁, C₁₄)], 101.9 (C₁), 64.3 (C₃), [57.8, 55.8, 55.7 (C₈, C₁₇, C₁₈)] ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 2997, 2956, 2837, 1735, 1645, 1604, 1581, 1517, 1463, 1442, 1411, 1382, 1344, 1325, 1269, 1247, 1222, 1174, 1141, 1120, 1060, 1026, 993, 941, 879, 864, 850, 813, 763, 725, 696, 653, 636 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 251.0915, calculated for C₁₃H₁₅O₅⁺ : 251.0914.

2-(3,4-dihydroxyphenyl)tetronic acid (360)



Chemical formula : C₁₀H₈O₅

Molecular weight : 208.17 g/mol

General sequence procedure 8a and 8b was followed to give product (360) in 35% yield as a greenish yellow oil.

The spectral analysis correspond to a keto-enol tautomerism with an equilibrium with with an enol tautomer on carbon C₂ (≈ 55 %) and an enol tautomer on carbone C₅ (≈ 45 %). The description bellow corresponds to the enol tautomer on carbon C₂.^z

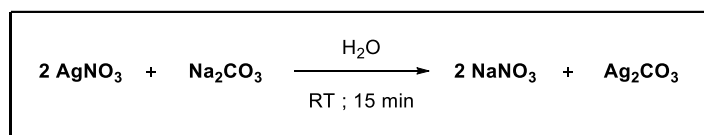
- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, DMSO-*d*₆)** : 7.46 (s, 1H, H₁₄), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₀), 6.71 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₁₁), 4.63 (s, 2H, H₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, DMSO-*d*₆)** : 174.5 (C₂), 173.7 (C₅), 144.6 (C₁₃), 143.6 (C₁₂), 122.5 (C₉), 117.8 (C₁₀), 115.2 (C₁₁), 114.0 (C₁₄), 96.7 (C₁), 66.2 (C₃) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3259, 2364, 2318, 1734, 1716, 1653, 1616, 1558, 1541, 1521, 1417, 1340, 1280, 1259, 1151, 1120, 1055, 1026, 999, 881, 813, 725, 640, 621 ;
- **HRMS (ESI -)** : m/z [M-H]⁻ : 207.0307, calculated for C₁₀H₇O₅⁻ : 207.0299 ; [MM-H]⁻ : 415.0674, calculated for C₂₀H₁₅O₁₀⁻ : 415.0671.

^z **¹H NMR δ ppm (400 MHz, DMSO-*d*₆)** of the enol tautomer on C₅ : 6.66 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁₁), 6.57 (s, 1H, H₁₄), 6.44 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H₁₀), 3.50 (s, 2H, H₃) ;

¹³C NMR δ ppm (101 MHz, DMSO-*d*₆) of the enol tautomer on C₅ : 206.7 (C₂), 163.1 (C₅), 145.2 (C₁₃), 144.1 (C₁₂), 125.7 (C₉), 120.3 (C₁₀), 116.9 (C₁₄), 115.6 (C₁₁), 66.2 (C₃), 49.4 (C₁).

2.4 Dimerizations

General procedure 10a : Preparation of fresh Ag_2CO_3



To a solution of AgNO_3 (2.1 eq., 35 mmol, 6.0 g) in water (100 mL), a solution of Na_2CO_3 (1.0 eq., 17 mmol, 1.848 g) in water (32 mL) was slowly added protected from light. A precipitate was formed immediately. The reaction mixture was stirred vigorously for 15 min. Then, product was collected by filtration and washed with acetone, then dried.

General procedure 10b : Oxydation by Ag_2CO_3

To a stirred solution of initial substrate (1.0 eq., 0.44 mmol) in toluene (5 mL) and acetone (5 mL), fresh Ag_2CO_3 (5.0 eq., 2.2 mmol, 611 mg) (cf general procedure 10a) was added. The reaction mixture was heated to reflux in darkness for 30 min. Then, the reaction mixture was filtered on celite and concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (C18 – H_2O + 0.1 % formic acid/ACN : 95:5 \rightarrow 0:100).

General procedure 11 : Oxydation by PIFA

To a stirred solution of initial substrate (1.0 eq., 0.44 mmol) in THF (15 mL), PIFA (1.0 eq., 0.44 mmol, 189 mg) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h. Then, the reaction mixture was concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (C18 – H_2O + 0.1 % formic acid/ACN : 95:5 \rightarrow 0:100).

General procedure 12 : Oxydation by PIFA/DIPEA

To a stirred solution of initial substrate (1.0 eq., 0.44 mmol) in THF (15 mL), PIFA (1.0 eq., 0.44 mmol, 189 mg) and DIPEA (1.0 eq., 0.44 mmol, 75 μL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 48h. Then, the reaction mixture was concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (C18 – H_2O + 0.1 % formic acid/ACN : 95:5 \rightarrow 0:100).

General procedure 13 : Oxydation by $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{NaHCO}_3$

To a stirred solution of initial substrate (1.0 eq., 0.44 mmol) in ACN (22 mL) and water (45 mL), a solution of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (6.0 eq., 2.7 mmol, 876 mg) and NaHCO_3 (6.0 eq., 2.7 mmol, 224 mg) were added. Then, catechol (1.0 eq., 0.44 mmol, 48 mg) was dissolved in ACN (3.75 mL) and water (0.75 mL) and was added dropwise for 2 minutes to the stirred reaction mixture. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3h. Then, the reaction mixture was quenched by adding few drops of TFA and extracted with AcOEt. The organic phases were concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (C18 – H_2O + 0.1 % formic acid/ACN : 95:5 \rightarrow 0:100).

General procedure 14 : Oxydation by photochemistry

Initial substrate (1.0 eq., 0.44 mmol), 4,4'-di-*t*-butylbiphenyl (0.25 eq., 0.11 mmol, 29 mg) and 9-mesityl-10-methylacridinium perchlorate (0,02 eq., 8.8 μmol , 3.6 mg) were dissolved in MeOH (5 mL). Pyrocatechol (1.0 eq., 0.44 mmol, 48 mg) was dissolved in ACN (2 mL) and added dropwise for 2 minutes to the stirred reaction mixture under flow of O_2 . Then, the reaction mixture was stirred at room temperature for 24h under blue light irradiation. Then, the reaction mixture was filtered and concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (C18 – H_2O + 0.1 % formic acid/ACN : 95:5 \rightarrow 0:100).

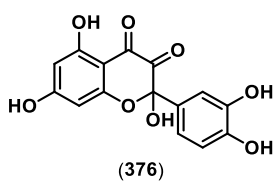
General procedure 15 : Oxydation by electrochemistry

Initial substrate (1.0 eq., 0.29 mmol) and NaCl (1.2 eq., 0.34 mmol) were dissolved in MeOH (1.7 mL) and buffer solution ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 M, 1.7 mL, pH = 1.78) under flow of argon. ElectraSyn 2.0 apparatus was used with the following parameters :

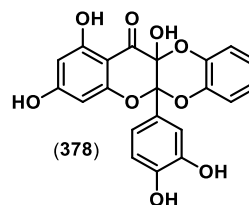
- Pt(+)/C(-)
- Constant current : 8.9 mA
- Inversion of polarity each minute
- Room temperature ; 1h

Then, the reaction mixture was concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (C18 – H_2O + 0.1 % formic acid/ACN : 95:5 \rightarrow 0:100).

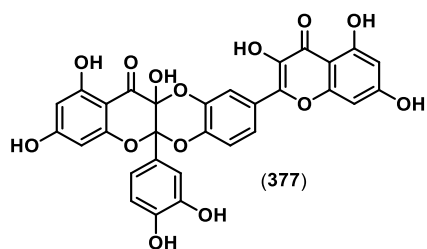
List of synthesized dimers by oxydation reaction :



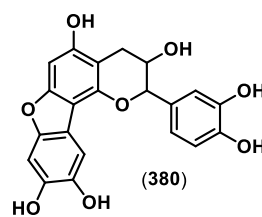
Synthesis and description page 368



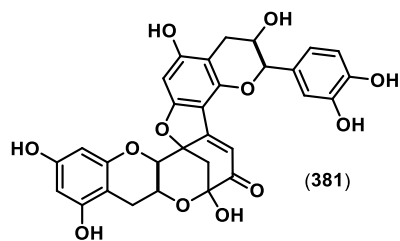
Synthesis and description page 369



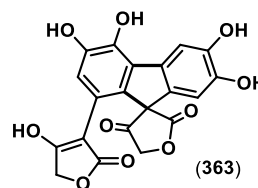
Synthesis and description page 370



Synthesis and description page 371

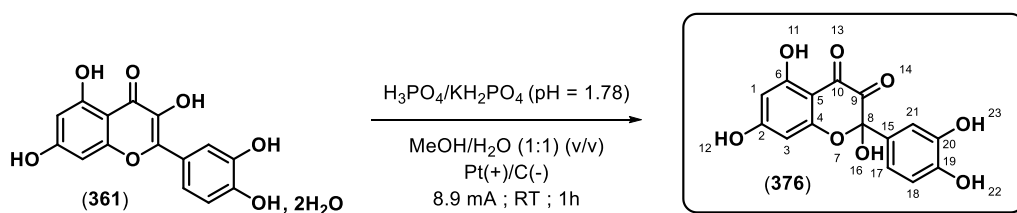


Synthesis and description page 372



Synthesis and description page 373

2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,5,7-trihydroxychromane-3,4-dione (376)



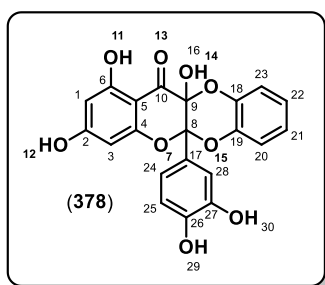
Chemical formula : C₁₅H₁₀O₈

Molecular weight : 318.24 g/mol

General procedure 15 was followed for dihydrated quercetin (**361**) to give product (**376**) in <5% yield as bright yellow oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, DMSO-*d*₆)** : 10.81 (OH), 9.38 (OH), 8.60 (OH), 7.56 (s, 1H, H₂₁), 7.56 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H, H₁₇), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₁₈), 5.97 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 5.92 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₁) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, DMSO-*d*₆)** : 190.6 (C₉), 190.3 (C₁₀), 172.2 (C₂), 167.7 (C₆), 158.9 (C₄), 151.7 (C₁₉), 145.0 (C₂₀), 125.4 (C₁₅), 124.1 (C₁₇), 117.7 (C₂₁), 115.3 (C₁₈), 104.9 (C₈), 100.8 (C₅), 97.0 (C₃), 90.8 (C₁) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3361, 3226, 1701, 1668, 1624, 1519, 1463, 1446, 1386, 1298, 1211, 1161, 1101, 1045, 1024, 989, 827, 763 ;
- **HRMS (ESI -)** : *m/z* [M-H]⁻ : 317.0316, calculated for C₁₅H₉O₈⁻ : 317.0303 ; [MM-H]⁻ : 635.0685, calculated for C₃₀H₁₉O₁₆⁻ : 635.0679.

5a-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,3,11a-trihydroxy-5a,11a-dihydro-12H-benzo-[5,6]-[1,4]-dioxino-[2,3-b]-chromen-12-one (378)



Chemical formula : C₂₁H₁₄O₉

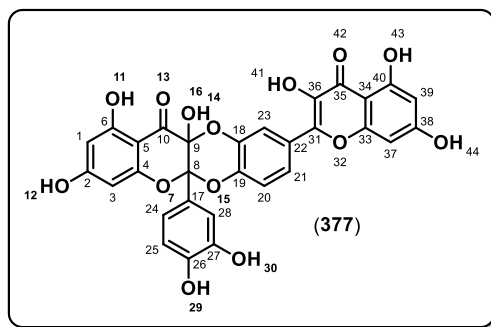
Molecular weight : 410.33 g/mol

General procedure 13 was followed for dihydrated quercetin (**361**) to give product (**378**) in <5% yield as bright yellow oil.

General procedure 14 was followed for dihydrated quercetin (**361**) to give product (**378**) in <5% yield as bright yellow oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, DMSO-*d*₆) :** 10.90 (OH), 9.16 (OH), 8.71 (OH), 7.16 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₂₈), [7.07, 6.99 (m, 4H, H₂₀₋₂₃)], 6.94 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H₂₄), 6.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₂₅), 5.98 (s, 2H, H₁, H₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, DMSO-*d*₆) :** 188.0 (C₁₀), 168.0 (C₂), 163.2 (C₆), 159.4 (C₄), 146.9 (C₂₆), 144.7 (C₂₇), [140.8, 140.41 (C₁₈, C₁₉)], 124.9 (C₁₇), [122.8, 122.6, 117.5, 117.1 (C₂₀₋₂₃)], 119.3 (C₂₄), 115.8 (C₂₈), 114.8 (C₂₅), 100.2 (C₈), 99.9 (C₅), [97.1, 96.3 (C₁, C₃)], 90.4 (C₉) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3379, 1635, 1602, 1508, 1490, 1473, 1294, 1259, 1217, 1151, 1089, 1047, 1024, 997, 823, 763 ;
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M+H]⁺ : 411.0719, calculated for C₂₁H₁₅O₉⁺ : 411.0711.

5a-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,3,11a-trihydroxy-9-(3,5,7-trihydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-5a,11a-dihydro-12H-benzo-[5,6]-[1,4]-dioxino-[2,3-b]-chromen-12-one (377)



Chemical formula : C₃₀H₁₈O₁₄

Molecular weight : 602.46 g/mol

General sequence procedure 10a and 10b was followed for dihydrated quercetin (**361**) to give product (**377**) in < 5% yield as bright yellow oil.

General procedure 11 was followed for dihydrated quercetin (**361**) to give product (**377**) in <5% yield as bright yellow oil.

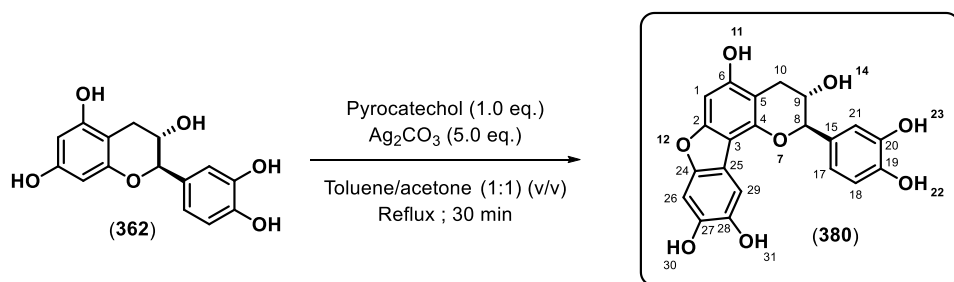
General procedure 12 was followed for dihydrated quercetin (**361**) to give product (**377**) in <5% yield as bright yellow oil.

General procedure 14 was followed for dihydrated quercetin (**361**) to give product (**377**) in <5% yield as bright yellow oil.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, DMSO-*d*₆) :** 12.37 (OH), 10.89 (OH), 9.66 (OH), 9.29 (OH), 9.15 (OH), 8.93 (OH), 7.88 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H₂₁), 7.84 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₂₃), 7.28 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₂₀), 7.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₂₈), 6.97 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H₂₄), 6.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₂₅), 6.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₃₇), 6.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₃₉), 6.01 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, H₁, H₃) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, DMSO-*d*₆) :** 176.2 (C₃₅), 167.9 (C₂), 164.3 (C₃₈), 163.3 (C₆), 160.8 (C₄₀), 159.2 (C₄), 156.4 (C₃₃), 147.1 (C₂₆), 145.2 (C₃₁), 144.8 (C₂₇), 141.8 (C₁₉), 140.6 (C₁₈), 136.8 (C₃₆), 125.8 (C₂₂), 124.5 (C₁₇), 122.5 (C₂₁), 119.4 (C₂₄), 117.3 (C₂₀), 116.8 (C₂₃), 115.8 (C₂₈), 115.0 (C₂₅), 103.3 (C₃₄), 100.4 (C₈), 99.9 (C₅), 98.5 (C₃₉), [97.3, 96.4 (C₁, C₃)], 93.8 (C₃₇) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3392, 2366, 2312, 1647, 1635, 1506, 1394, 1273, 1247, 1213, 1166, 1089, 1047, 1024, 997, 825, 763 ;
- **HRMS (ESI +) :** *m/z* [M+H]⁺ : 603.0780, calculated for C₃₀H₁₉O₁₄⁺ : 603.0769.

2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-benzofuro-[2,3-*h*]-chromene-3,5,9,10-tetraol

(380)



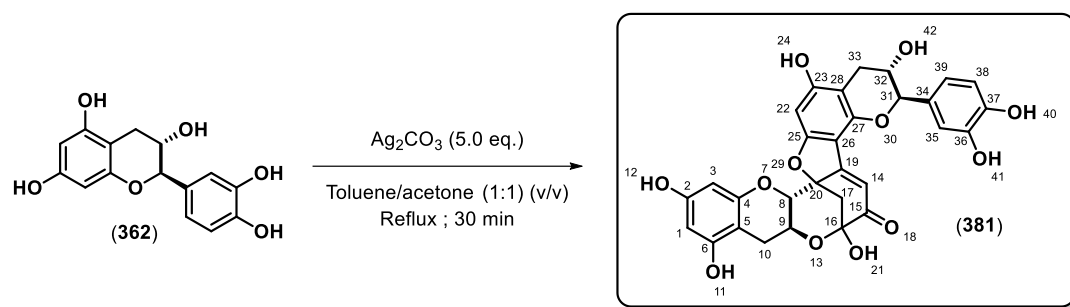
Chemical formula : $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_8$

Molecular weight : 396.35 g/mol

General sequence procedure 10a and 10b was followed for (+)-catechin (**362**). Pyrocatechol (**302**) (1.0 eq.) was added dropwise for 2 minutes. Product (**380**) is obtained in < 5% yield as bright yellow oil.

- ^1H NMR δ ppm (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 8.90 (OH), 7.30 (s, 1H, H_{29}), 6.99 (s, 1H, H_{26}), 6.78 (s, 1H, H_{21}), 6.73 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_{18}), 6.66 (dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, 1H, H_{17}), 6.24 (s, 1H, H_1), 4.72 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H_8), 4.03 (dt, $J = 6.3, 6.0, 6.9$ Hz, 1H, H_9), 2.97 (dd, $J = 15.8, 5.1$ Hz, 1H, H_{10}), 2.76 (dd, $J = 15.8, 7.3$ Hz, 1H, H_{10}) ;
- ^{13}C NMR δ ppm (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : [155.5, 152.9, 150.7 ($\text{C}_2, \text{C}_4, \text{C}_6$)], 148.9 (C_{24}), 145.0 (2C, $\text{C}_{19}, \text{C}_{20}$), 143.9 (C_{27}), 142.1 (C_{28}), 130.4 (C_{15}), 118.4 (C_{17}), 115.3 (C_{18}), 114.9 (C_{25}), 114.5 (C_{21}), 106.8 (C_{29}), 106.2 (C_3), 98.5 (C_{26}), 97.0 (C_1), 96.2 (C_5), 81.5 (C_8), 65.7 (C_9), 26.9 (C_{10}) ;
- IR (neat) ν_{max} cm^{-1} : 3373, 2310, 1616, 1288, 1151, 1118, 1047, 1024, 995, 825, 763 ;
- HRMS (ESI +) : m/z [$\text{Mox}+\text{H}$] $^+$: 395.0763, calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{O}_8^+$: 395.0761 ;
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

Dehydrodicatechin A (381)



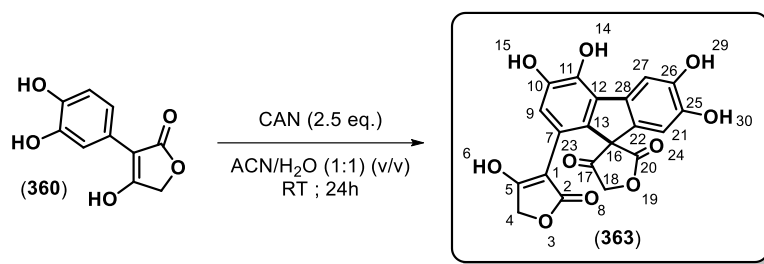
Chemical formula : $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$

Molecular weight : 576.51 g/mol

General sequence procedure 10a and 10b was followed for (+)-catechin (**362**) to give product (**381**) in < 5% yield as bright yellow oil.

- $^1\text{H NMR } \delta \text{ ppm (400 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: 10.86 (OH), 4.87 (OH), 9.40 (s, 1H, OH₁₁), 8.98 (s, 1H, OH₁₂), 8.92 (s, 1H, OH₄₀₋₄₁), 7.00 (s, 1H, OH₂₁), 6.76 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H₃₅), 6.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H₃₈), 6.64 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H, H₃₉), [6.19, 6.18 (s, 2H, H₁₄, H₂₂)], 5.90 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H₁), 5.43 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H₃), 4.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H₃₁), 4.07 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H₈), 3.96 (m, 1H, H₃₂), 3.86 (m, 1H, H₉), 2.79 (dd, $J = 15.0, 5.9$ Hz, 2H, H₁₀), 2.69 (dd, $J = 16.4, 5.2$ Hz, 2H, H₃₃), 2.62 ($J = 11.7$ Hz, 1H, H₁₇), 2.45 ($J = 11.6$ Hz, 1H, H₁₇) ;
- $^{13}\text{C NMR } \delta \text{ ppm (101 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: 192.3 (C₁₅), [165.9, 164.2, 161.0 (C₂₃, C₂₅, C₂₇)], [157.2, 156.9 (C₂, C₄)], 154.7 (C₆), 153.6 (C₁₉), [145.6, 145.5 (C₃₆, C₃₇)], 130.1 (C₃₄), 118.4 (C₃₉), 115.8 (C₃₈), 114.5 (C₃₅), 112.3 (C₁₄), [103.8, 102.8 (C₂₆, C₂₈)], 98.9 (C₅), 96.5 (C₁), 94.6 (C₁₆), 94.4 (C₃), 90.1 (C₂₂), 88.7 (C₂₀), 82.2 (C₃₁), 77.9 (C₈), 66.0 (C₃₂), 65.2 (C₉), 44.9 (C₁₇), [27.5, 27.2 (C₁₀, C₃₃)] ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 577.1351, calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{O}_{12}^+$: 577.1341 ;
- $[\alpha]_D^{20}$: optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

3,4,6,7-tetrahydroxy-1-(4-hydroxy-2-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)-2'H-spiro[fluorene-9,3'-furan]-2',4'(5'H)-dione (363)



Chemical formula : C₂₀H₁₂O₁₀

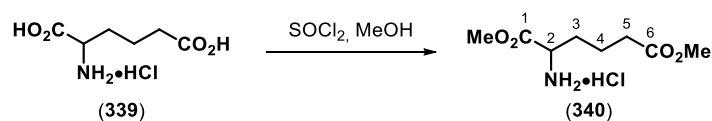
Molecular weight : 412.31 g/mol

To a stirred solution of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)tetronic acid (**360**) (1.0 eq., 0.24 mmol, 50 mg) in ACN (600 μ L) and water (600 μ L), a solution of CAN (2.5 eq., 0.6 mmol, 329 mg) in ACN (600 μ L) and water (600 μ L) was added. The reaction mixture is stirred at room temperature for 24h. Then, the reaction mixture was concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography (C18 – H₂O + 0.1 % formic acid/ACN : 95:5 \rightarrow 0:100) affording the title compound (**363**) as a bright yellow oil (yield : < 5%).

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, DMSO-*d*₆)** : 9.73 (OH), 9.40 (OH), 9.08 (OH), 8.97 (OH), 7.58 (s, 1H, H₂₇), 6.72 (s, 1H, H₂₁), 6.67 (s, 1H, H₉), 5.26 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, H₁₈), 4.74 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H₁₈), 4.71 (s, 2H, H₄) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, DMSO-*d*₆)** : 204.5 (C₁₇), 175.7 (C₂), 173.3 (C₅), 172.8 (C₂₀), 146.0 (2C, C₁₀, C₂₆), 144.8 (C₂₅), 140.1 (C₁₁), 132.2 (2C, C₂₂, C₂₈), 131.0 (C₇), 130.3 (C₁₃), 117.8 (C₁₂), 115.2 (C₉), 111.1 (C₂₇), 109.6 (C₂₁), 97.8 (C₁), 74.2 (C₁₈), 66.7 (C₄), 63.1 (C₁₆) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3199, 1751, 1734, 1653, 1458, 1417, 1286, 1213, 1149, 1080, 1045, 1022, 981, 883, 821, 765, 723, 638 ;
- **HRMS (ESI +)** : *m/z* [M+H]⁺ : 413.0510, calculated for C₂₀H₁₃O₁₀⁺ : 413.0503 ; [MM+H]⁺ : 825.0951, calculated for C₄₀H₂₅O₂₀⁺ : 825.0934.

2.5 Synthesis of ureido-dipeptides

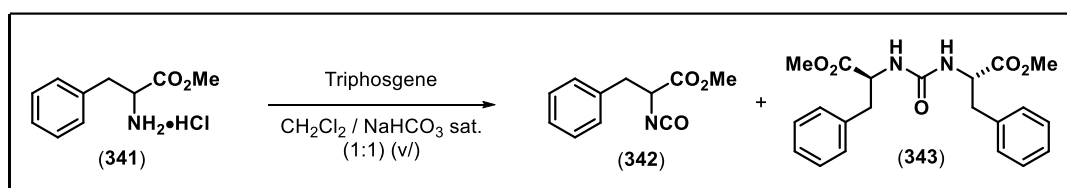
Dimethyl 2-aminohexanedioate hydrochloride (340)



To a solution of 2-aminohexanedioic acid (**339**) (1.0 eq., 5.07 mmol, 1.00 g) in methanol (12 mL), SOCl_2 (3.0 eq., 1.2 mL, 15.28 mmol) was added. After 16 h of stirring at 60°C , the reaction mixture was concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography over silica gel (AcOEt/MeOH : 9:1) to afford the title product (**340**) as a colorless oil (915 mg, 80% yield).

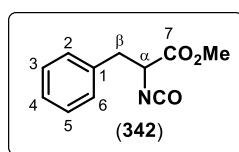
- $^1\text{H NMR } \delta \text{ ppm (300 MHz, methanol-}d_4)$: 4.07 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H_2), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.33 (dt, $J = 3.3, 1.6$ Hz, 2H, H_5), 2.44 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H_4), 1.95 (m, 1H, H_3), 1.75 (m, 1H, H_3) ;
- $^{13}\text{C NMR } \delta \text{ ppm (75 MHz, methanol-}d_4)$: 175.0 (C=O), 170.8 (C=O), 53.8 (OCH_3), 53.7 (OCH_3), 52.2 (C_2), 33.8 (C_5), 30.8 (C_3), 21.3 (C_2) ;
- IR (neat) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3032, 2954, 2850, 2235, 1743, 1681, 1496, 1436, 1346, 1278, 1217, 118, 1012 ;
- HRMS (ESI +) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 190.1073, calculated for $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}^+$: 190.1074 ;
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

Synthesis of compounds (342) and (343)



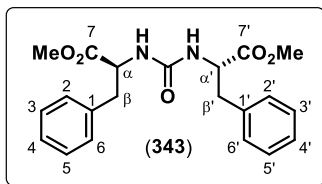
To a biphasic solution of phenylalanine methyl ester hydrochloride (**341**) (1.0 eq, 4.65 mmol, 1 g) in 1:1 biphasic mixture of dichloromethane (9 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (9 mL) triphosgene (0.33 eq, 460 mg, 1.55 mmol) was added in one portion. After 15 min of vigorous stirring, the reaction mixture was extracted with dichloromethane (3x30 mL). Combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography afforded isocyanate (**342**) as a white amorphous solid (527 mg, 55% yield) and then urea (**343**) as a white amorphous solid (305 mg, 17% yield).

→ Carbonylphenylalanine methyl ester (342)



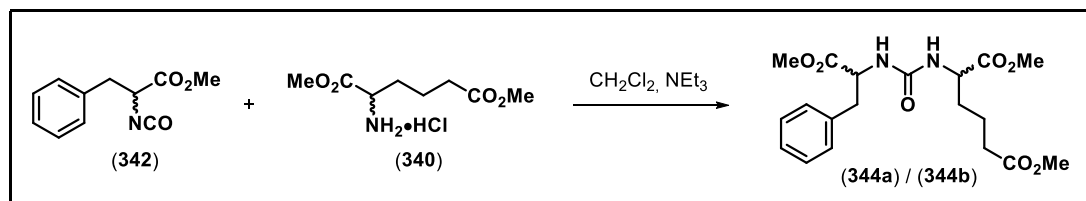
- **¹H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform-*d*₁)** : 7.43 – 7.29 (m, 3H, H₂, H₄, H₆), 7.26 – 7.18 (m, 2H, H₃, H₅), 4.29 (dd, $J = 7.8, 4.7$ Hz, 1H, H _{α}), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.19 (dd, $J = 13.8, 4.7$ Hz, 1H, H _{β}), 3.06 (dd, $J = 13.8, 7.8$ Hz, 1H, H _{β}) ;
- **¹³C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform-*d*₁)** : 171.1 (C₇), 135.7 (C₁), 129.4 (2C, C₂, C₆), 128.8 (2C, C₃, C₅), 127.6 (C₄), 127.0 (NCO), 58.7 (C _{α}), 53.2 (OCH₃), 40.2 (C _{β}) ;
- **IR (neat) ν_{\max} cm⁻¹** : 3032, 2954, 2237, 1743, 1497, 1456, 1436, 1348, 1278, 1217, 1180, 1080, 1012, 748, 700 ;
- **HRMS (ESI +)** : *not detected* ;
- **$[\alpha]_D^{20}$** : optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

→ **Carbonylbis(phenylalanine) dimethyl ester (343)**



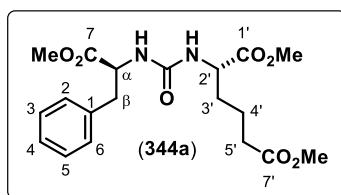
- **^1H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform- d_1)** : 7.25 (m, 6H, H_2 , H_4 , H_6 , $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{4'}$, $\text{H}_{6'}$), 7.09 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 4H, H_3 , H_5 , $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 5.31 (s, 2H, NH), 4.80 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, H_{α} , $\text{H}_{\alpha'}$), 3.65 (s, 6H, OCH_3), 3.03 (d, $J = 5.8$ Hz, 4H, H_{β} , $\text{H}_{\beta'}$) ;
- **^{13}C NMR δ ppm (75 MHz, chloroform- d_1)** : 173.3 (2C, C=O), 156.3 (N_2CO), 136.3 (2C, C_1 , $\text{C}_{1'}$), 129.5 (4C, C_2 , C_6 , $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 128.6 (4C, C_3 , C_5 , $\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 127.1 (2C, C_4 , $\text{C}_{4'}$), 54.2 (2C, C_{α} , $\text{C}_{\alpha'}$), 52.3 (2C, OCH_3), 38.8 (2C, C_{β} , $\text{C}_{\beta'}$) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm^{-1}** : 3030, 2951, 1739, 1637, 1554, 1496, 1454, 1203, 1176, 112, 1014, 744, 700 ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 385.1753, calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_5^+$: 385.1758 ;
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$** : optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

Synthesis of compounds (344a)/(344b)



A solution of carbonylphenylalanine methyl ester (1.0 eq., 23 mg, 0.11 mmol) and dimethyl 2-amino-2,4-hexanedioate hydrochloride (1.0 eq., 25 mg, 0.11 mmol) in a 2:1 mixture of CH_2Cl_2 and Et_3N (1.5 mL) was heated to 50°C for 72h. After cooling, the reaction mixture was concentrated to dryness and purification by preparative TLC on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 85:15) afforded the title product as white amorphous solid (5 mg, 12%).

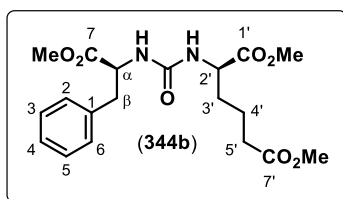
→ **(1'S)-methyl (1,4-dicarbomethoxy-butylcarbamoyl)-L-phenylalaninate or (1'R)-methyl (1,4-dicarbomethoxy-butylcarbamoyl)-D-phenylalaninate (344a)**



- $^1\text{H NMR } \delta \text{ ppm (400 MHz, acetone-}d_6)$: 7.27 (tt, $J = 6.7, 1.2 \text{ Hz}$, 2H, H_2, H_6), 7.24 – 7.16 (m, 3H, $\text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5$), 4.61 (t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 1H, H_α), 4.34 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, H_2'), 3.67 (s, 3H, OCH_3), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 3.07 (dd, $J = 13.7, 5.7 \text{ Hz}$, 1H, H_β), 3.00 (dd, $J = 13.7, 6.6 \text{ Hz}$, 1H, H_β), 2.32 (td, $J = 7.1, 2.5 \text{ Hz}$, 2H, H_5'), 1.82 – 1.74 (m, 1H, H_3'), 1.69 – 1.56 (m, 3H, H_3', H_4') ;
- $^{13}\text{C NMR } \delta \text{ ppm (101 MHz, acetone-}d_6)$: 174.2 (C=O), 173.8 (C=O), 173.4 (C=O), 137.9 (C_1), 130.3 (2C, C_2, C_6), 129.1 (2C, C_3, C_5), 127.5 (C_4), 55.1 (C_α), 53.3 (C_2'), 52.2 (OCH_3), 52.1 (OCH_3), 51.6 (OCH_3), 39.0 (C_β), 33.8 (C_5'), 32.6 (C_3'), 21.8 (C_4') ;
- $^1\text{H NMR } \delta \text{ ppm (400 MHz, chloroform-}d_1)$: 7.24 (m, 3H, $\text{H}_2, \text{H}_4, \text{H}_6$), 7.10 (d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, H_3, H_5), 4.76 (s, 1H, H_α), 4.47 (d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H, H_2'), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.67 (s, 3H, OCH_3), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 3.06 (d, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 2H, H_β), 2.30 (t, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 2H, H_5'), 1.79 (s, 1H, H_3'), 1.63 (d, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 3H, H_3', H_4') ;

-
- **^{13}C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform- d_1)** : 173.9 (C=O), 173.6 (C=O), 173.0 (C=O), 156.5 (N₂C=O), 136.1 (C₁), 129.4 (2C, C₂, C₆), 128.4 (2C, C₃, C₅), 126.9 (C₄), 54.0 (C _{α}), 52.6 (C_{2'}), 52.4 (OCH₃), 52.2 (OCH₃), 51.5 (OCH₃), 38.6 (C _{β}), 33.3 (C_{5'}), 32.2 (C_{3'}), 20.7 (C_{4'}) ;
 - **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** : 3375, 2953, 2924, 1735, 1645, 1558, 1496, 1436, 1206, 1176 ;
 - **HRMS (ESI +)** : m/z [M+H]⁺ : 395.1818, calculated for C₁₉H₂₇N₂O₇⁺ : 395.1813 ;
 - **[α_{D}^{20}]** : optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

→ (1'S)-methyl (1,4-dicarbomethoxy-butylcarbamoyl)-D-phenylalaninate or
(1'R)-methyl (1,4-dicarbomethoxy-butylcarbamoyl)-L-phenylalaninate (344b)



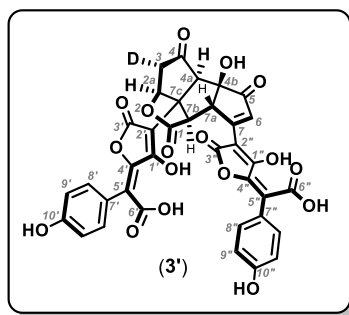
- **^1H NMR δ ppm (400 MHz, acetone- d_6)** : 7.27 (dd, $J = 8.0, 6.3$ Hz, 2H, H_2, H_6), 7.24 – 7.15 (m, 3H, $\text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5$), 6.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 5.94 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 4.63 (m, 1H, H_α), 4.36 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.62 (s, 3H, OCH_3), 3.09 (dd, $J = 13.7, 5.7$ Hz, 1H, H_β), 2.99 (dd, $J = 13.7, 6.7$ Hz, 1H, H_β), 2.33 (td, $J = 7.1, 3.0$ Hz, 2H, $\text{H}_{5'}$), 1.77 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 1.68 – 1.58 (m, 3H, $\text{H}_{3'}, \text{H}_{4'}$) ;
- **^{13}C NMR δ ppm (101 MHz, acetone- d_6)** : 174.1 (C=O), 173.8 (C=O), 173.4 (C=O), 138.0 (C_1), 130.3 (2C, C_2, C_6), 129.1 (2C, C_3, C_5), 127.4 (C_4), 55.1 (C_α), 53.3 ($\text{C}_{2'}$), 52.2 (OCH_3), 52.1 (OCH_3), 51.6 (OCH_3), 39.2 (C_β), 33.8 ($\text{C}_{5'}$), 32.8 ($\text{C}_{3'}$), 21.7 ($\text{C}_{4'}$) ;
- **^1H NMR δ ppm (300 MHz, chloroform- d_1)** : 7.28 (m, 3H, $\text{H}_2, \text{H}_4, \text{H}_6$), 7.14 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_3, H_5), 4.76 (t, $J = 5.6$ Hz, H_α), 4.46 (s, $\text{H}_{2'}$), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.14 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H_β), 3.11 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H_β), 2.36 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$), 1.85 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 1.74 – 1.61 (m, 3H, $\text{H}_{3'}, \text{H}_{4'}$) ;
- **^{13}C NMR δ ppm (101 MHz, chloroform- d_1)** : 173.7 (C=O), 173.6 (C=O), 173.0 (C=O), 156.4 ($\text{N}_2\text{C}=\text{O}$), 136.2 (C_1), 129.4 (2C, C_2, C_6), 128.5 (2C, C_3, C_5), 126.9 (C_4), 54.1 (C_α), 52.6 ($\text{C}_{2'}$), 52.4 (OCH_3), 52.2 (OCH_3), 51.6 (OCH_3), 38.6 (C_β), 33.4 ($\text{C}_{5'}$), 32.3 ($\text{C}_{3'}$), 20.7 ($\text{C}_{4'}$) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm^{-1}** : 2954, 2916, 2848, 1735, 1622, 1496, 1446, 1207, 1178 cm^{-1} ;
- **HRMS (ESI +)** : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 395.1815, calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_7^+$: 395.1813 ;
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$** : optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

2.6 Extracted fungal metabolites

General procedure 16 : Isolation of metabolites from *Scleroderma citrinum*

The specimen of *Scleroderma citrinum* was collected manually in Bretagne (47° 55' 28,9" N - 3° 05' 48,8" W) on November of 2018. Air-dried mushroom (3.7 kg) was emptied of spores, cut in thin strips and exhaustively extracted with MeOH (6 L, 2x48h). Combined extracts were concentrated under reduced pressure inducing precipitation of steroids (grey solid). After elimination by filtration, crude extract was afforded as a brown oil, which was extracted by a 1:1 AcOEt/H₂O (pH = 4) mixture. Pre-fractionation was performed by flash chromatography over silica gel using the following gradient : CH₂Cl₂/MeOH + 0.1% HCO₂H (from 0% to 100%). 15 fractions were constituted by UV detection (254 nm) : F0 (570 mg), F1 (1081 mg), F2 (901 mg), F3 (627 mg), F4 (303 mg), F5 (182 mg), F6 (60 mg), F7 (75 mg), F8 (16 mg), F9 (124 mg), F10 (58 mg), F11 (51 mg), F12 (245 mg), F13 (237 mg), F14 (275 mg). This 15 fractions were analysed by HPLC-MS (XBridge[®] C18 column, 150 × 2.1 mm ; i. d. 3.5 μm) using the following elution gradient : H₂O + NH₄Ac (20 mM)/ACN (from 0% to 100%).

3-deutero-sclerocitrin (3')



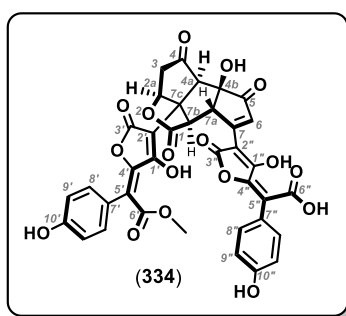
Chemical formula : C₃₆H₂₁DO₁₇

Molecular weight : 727.56 g/mol

After analyse by HPLC-MS of 15 fractions of crude extract from *Scleroderma citrinum*, F9, F10, F11 and F13 were pooled together and purified by RP-18 reversed phase silica gel with XBridge[®] C18 column (19 × 150 mm ; i. d. 5 μm) using the following elution gradient : H₂O + NH₄Ac (20 mM)/CH₃CN (from 1% to 60% - 15 min), affording sclerocitrin (**3**) at *t*_r = 6.3 min. After two months in D₂O, compound (**3'**) was formed and extracted with a 1:1 AcOEt/H₂O + 0.1% TFA.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 7.27 (dd, *J* = 8.7, 3.7 Hz, 4H, H_{8'}, H_{8''}), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, H_{9'}, H_{9''}), 5.71 (s, 1H, H_{2a}), 4.35 (s, 1H, H_{7a}), 4.20 (s, 1H, H_{7b}), 3.03 (s, 1H, H_{4a}), 2.62 (t, *J* = 14.8 Hz, 1H, H_{3-β}) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 200.9 (C₄), 196.1 (C₅), 174.3 (C₁), [173.0, 172.4 (C_{6'}, C_{6''})], 170.8 (C_{1''}), 167.5 (C_{1'}), [165.9, 165.8 (C_{3'}, C_{3''})], 159.7 (C₇), [158.5, 158.3 (C_{10'}, C_{10''})], 153.3 (C_{4''}), 152.1 (C_{4'}), 132.4 (C_{8''}), 132.2 (C_{8'}), 125.2 (C_{7''}), 124.3 (C_{7'}), 120.0 (C_{5''}), 118.7 (C_{5'}), 115.4 (2C, C_{9'}), 115.2 (2C, C_{9''}), 100.7 (C_{2'}), 97.3 (C_{2''}), 88.3 (C_{4b}), 79.6 (C_{2a}), 62.8 (C_{4a}), 53.2 (C_{7c}), 51.2 (C_{7b}), 45.5 (C₃), 40.2 (C_{7a}) ; C₆ is not visible ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** for the deuterated form : 3410, 2368, 2310, 1683, 1541, 1508, 1203, 1174 ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹** for the hydrogenated form : 3404, 2002, 1647, 1575, 1514, 1431, 1396, 1369, 651, 617 ;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M-H]⁻ : 726.0878, calculated for C₃₆H₂₀DO₁₇⁻ : 726.0847 ;
- **[α_D²⁰]** : optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

Methyl-sclerocitrin A (334)



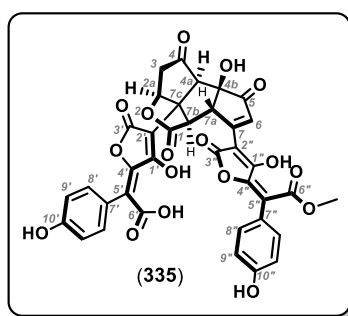
Chemical formula : C₃₇H₂₄O₁₇

Molecular weight : 740.58 g/mol

After analyse by HPLC-MS of 15 fractions of crude extract from *Scleroderma citrinum*, F6, F7 and F8 were pooled together and purified by RP-18 reversed phase silica gel with XBridge[®] C18 column (19 × 150 mm ; i. d. 5 μm) using the following elution gradient : H₂O + NH₄Ac (20 mM)/CH₃CN (from 7% to 40% - 15 min), affording compound (334) at t_r = 7.9 min.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₈'), 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{8''}), 6.99 – 6.77 (m, 5H, H₆, H₉', H_{9''}), 5.51 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H_{2a}), 4.51 (s, 1H, H_{7a}), 4.03 (s, 1H, H_{7b}), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.72 – 3.62 (m, 1H, H_{3-α}), 3.08 (s, 1H, H_{4a}), 2.66 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, H_{3-β}) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 205.9 (C₄), 195.7 (C₅), 174.3 (C₁), [173.5, 170.1 (C₆', C_{6''})], [167.8, 167.7 (C₁', C_{1''})], [166.7, 165.4 (C₃', C_{3''})], 161.3 (C₇), 159.1 (C₁₀'), 158.2 (C_{10''}), 153.2 (C₄'), 147.3 (C_{4''}), 132.5 (2C, C₈''), 132.1 (C₈'), 125.8 (C_{7''}), 123.6 (C_{7'}), 118.4 (C_{5''}), 118.2 (C₆), 118.1 (C_{5'}), [116.1, 115.3 (4C, C₉', C_{9''})], 101.5 (C₂'), 95.8 (C_{2''}), 88.3 (C_{4b}), 81.8 (C_{2a}), 62.9 (C_{4a}), 54.2 (OMe), 53.3 (C_{7c}), 52.2 (C_{7b}), 45.8 (C₃), 40.8 (C_{7a}) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3433, 2924, 1716, 1606, 1516, 1456, 1271, 1219, 1178, 1049, 837 ;
- **HRMS (ESI -) :** m/z [M-H]⁻ : 739.0976, calculated for C₃₇H₂₃O₁₇⁻ : 739.0941 ;
- **[α_D²⁰] :** optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

Methyl-sclerocitrin B (335)



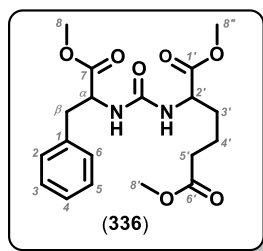
Chemical formula : C₃₇H₂₄O₁₇

Molecular weight : 740.58 g/mol

After analyse by HPLC-MS of 15 fractions of crude extract from *Scleroderma citrinum*, F6, F7 and F8 were pooled together and purified by RP-18 reversed phase silica gel with XBridge[®] C18 column (19 × 150 mm ; i. d. 5 μm) using the following elution gradient : H₂O + NH₄Ac (20 mM)/CH₃CN (from 7% to 40% - 15 min), affording compound (335) at *t*_r = 6.5 min.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** [7.33, 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, H_{8'}, H_{8''})], 6.99 – 6.78 (m, 5H, H₆, H_{9'}, H_{9''}), 5.73 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H_{2a}), 4.31 (s, 1H, H_{7a}), 4.21 (s, 1H, H_{7b}), 3.92 (s, 3H, OMe), 3.74 – 3.61 (m, 1H, H_{3-α}), 3.08 (s, 1H, H_{4a}), 2.68 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H, H_{3-β}) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 206.0 (C₄), 195.6 (C₅), 174.5 (C₁), [173.0, 172.2 (C_{6'}, C_{6''})], [169.4, 165.7 (C_{1'}, C_{1''})], [167.7, 166.1 (C_{3'}, C_{3''})], 159.7 (C₇), [158.8, 158.6 (C_{10'}, C_{10''})], [151.7, 151.2 (C_{4'}, C_{4''})], 132.3 (4C, C_{8'}, C_{8''}), [124.3, 123.7 (C_{7'}, C_{7''})], 120.2 (C₆), [119.1, 116.5 (C_{5'}, C_{5''})], [115.7, 115.5 (4C, C_{9'}, C_{9''})], 100.5 (C_{2'}), 99.0 (C_{2''}), 88.3 (C_{4b}), 79.8 (C_{2a}), 62.9 (C_{4a}), 54.9 (OMe), 53.4 (C_{7c}), 51.3 (C_{7b}), 45.6 (C₃), 40.5 (C_{7a}) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3427, 2883, 1772, 1705, 1203, 1180, 1139, 1051 ;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M-H]⁻ : 739.0966, calculated for C₃₇H₂₃O₁₇⁻ : 739.0941 ;
- **[α_D²⁰] :** optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

Dimethyl-2-(3-(1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-ureido)-hexanedioate (EMG-394-G) (336)



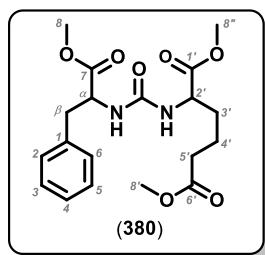
Chemical formula : C₁₉H₂₆N₂O₇

Molecular weight : 394.42 g/mol

After analyse by HPLC-MS of 15 fractions of crude extract from *Scleroderma citrinum*, F1 and F2 were pooled together and purified by RP-18 reversed phase silica gel with XSelect[®] C18 column (19 × 150 mm ; i. d. 5 μm) using the following elution gradient : H₂O + NH₄Ac (20 mM)/CH₃CN (from 5% to 110% - 15 min), affording compound (336) at *t*_r = 9.5 min.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 7.27 (m, 2H, H₃, H₅), 7.24 – 7.17 (m, 3H, H₂, H₄, H₆), 4.64 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H_β), 4.37 (td, *J* = 4.9, 1.9 Hz, 1H, H_{2'}), 3.67 (s, 3H, H_{8''}), 3.64 (s, 3H, H₈), 3.60 (s, 3H, H_{8'}), 3.08 (dd, *J* = 13.7, 5.8 Hz, 1H, H_α), 3.01 (dd, *J* = 13.7, 6.5 Hz, 1H, H_α), 2.35 – 2.29 (m, 2H, H_{4'}), 1.84 – 1.73 (m, 1H, H_{3'}), 1.70 – 1.59 (m, 3H, H_{3'}, H_{5'}) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 174.1 (C_{1'}), 173.8 (C_{6'}), 173.3 (C₇), 157.8 (HNCONH), 137.8 (C₁), 130.2 (2C, C₂, C₆), 129.0 (2C, C₃, C₅), 127.4 (C₄), 55.0 (C_β), 53.3 (C_{2'}), 52.2 (C_{8''}), 52.1 (C₈), 51.5 (C_{8'}), 38.9 (C_α), 33.7 (C_{4'}), 32.5 (C_{3'}), 21.6 (C_{5'}) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3365, 2953, 1734, 1637, 1558, 1508, 1436, 1363, 1201, 1174, 1116, 1014, 748, 702 ;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M+AcO]⁻ : 453.1882, calculated for C₂₁H₂₉N₂O₉⁻ : 453.1879 ;
- **[α_D²⁰] :** optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

Dimethyl-2-(3-(1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-ureido)-hexanedioate (EMG-394-A) (380)



Chemical formula : C₁₉H₂₆N₂O₇

Molecular weight : 394.42 g/mol

After analyse by HPLC-MS of 15 fractions of crude extract from *Scleroderma citrinum*, F1 and F2 were pooled together and purified by RP-18 reversed phase silica gel with XSelect[®] C18 column (19 × 150 mm ; i. d. 5 μm) using the following elution gradient : H₂O + NH₄Ac (20 mM)/CH₃CN (from 5% to 110% - 15 min), affording compound (380) at *t*_r = 6.0 min.

- **¹H NMR δ ppm (400 MHz, acetone-*d*₆) :** 7.20 – 7.12 (m, 4H, H₂, H₃, H₅, H₆), 7.12 – 7.07 (m, 1H, H₄), 4.51 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H_α), 4.24 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H_{2'}), 3.57 (s, 3H, OMe), 3.51 (s, 3H, OMe), 3.50 (s, 3H, OMe), 3.05 (dd, *J* = 13.5, 5.0 Hz, 1H, H_β), 2.98 – 2.89 (m, 1H, H_β), 2.26 – 2.15 (m, 2H, H_{4'}), 1.74 – 1.64 (m, 1H, H_{3'}), 1.54 (d, *J* = 4.3 Hz, 3H, H_{3'}, H_{5'}) ;
- **¹³C NMR δ ppm (101 MHz, acetone-*d*₆) :** 174.3 (C_{1'}), 174.2 (C_{6'}), 173.9 (C₇), 158.4 (HNCONH), 138.7 (C₁), 130.5 (2C, C₂, C₆), 128.9 (2C, C₃, C₅), 127.1 (C₄), 55.2 (C_α), 53.5 (C_{2'}), 52.2 (OMe), 52.1 (OMe), 51.6 (OMe), 38.8 (C_β), 33.8 (C_{4'}), 32.4 (C_{3'}), 21.8 (C_{5'}) ;
- **IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ :** 3392, 2951, 1718, 1647, 1558, 1436, 1367, 1211, 1174, 750, 702;
- **HRMS (ESI -) :** *m/z* [M+AcO]⁻ : 453.0992, calculated for C₂₁H₂₉N₂O₉⁻ : 453.1879 ;
- **[α_D²⁰] :** optical rotation will be recorded as soon as new polarimeter will be delivered to BioCIS laboratory.

3 PHOTOPHYSICAL STUDY

3.1 Absorption and fluorescence spectra

Dilutions : a stock solution for each tested compound was prepared by dissolving them in CH_2Cl_2 ($c = 1.0\text{E-}03 \text{ M}$). These stock solutions were used to prepare solutions of concentration $c_1 = 1.0\text{E-}05 \text{ M}$ in the accurate solvent : for each compound, 100 μL of the stock solution were put in a 10 mL volumetric flask and let to dry. 10 mL of the accurate solvent was added and the resulting solution S_1 was homogenised by inversion.

To a 3.5 mL rectangular quartz cell, 3.0 mL of the solution S_1 ($c_1 = 1.0\text{E-}05 \text{ M}$) was added. Once the absorption and emission spectra were recorded, 1.5 mL of solution S_1 was replaced by 1.5 mL of fresh solvent : the resulting mixture was homogenised by inversion, giving the solution S_2 ($c_2 = 5.0\text{E-}06 \text{ M}$). Once the absorption and emission spectra were recorded, the same dilution procedure was repeated to record the absorption and emission spectra of solution S_3 ($c_3 = 2.5\text{E-}06 \text{ M}$).

Absorption spectra were recorded from 250 nm to 800 nm. Emission spectra were recorded under the same conditions on the same sample after excitation at their λ_{max} .

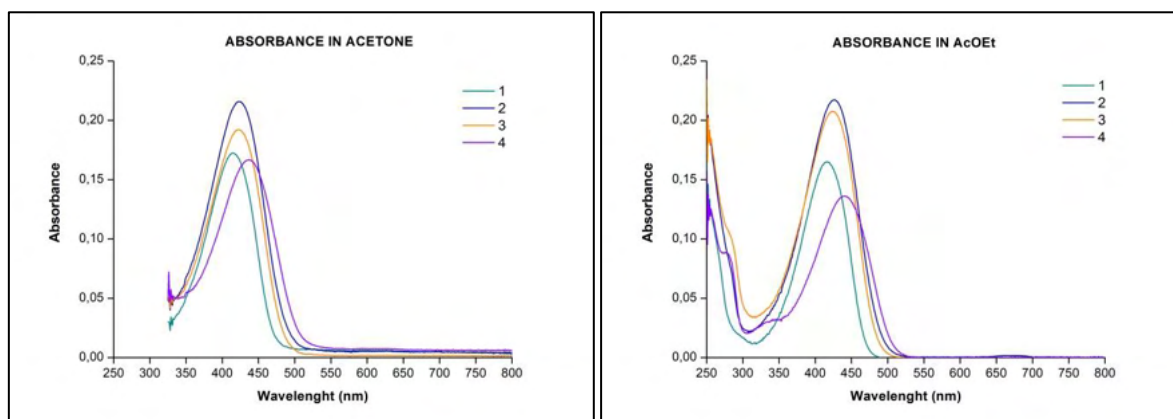


Figure 89 – Absorption of compounds 1 (Atró), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in acetone and AcOEt at concentration c_1 .

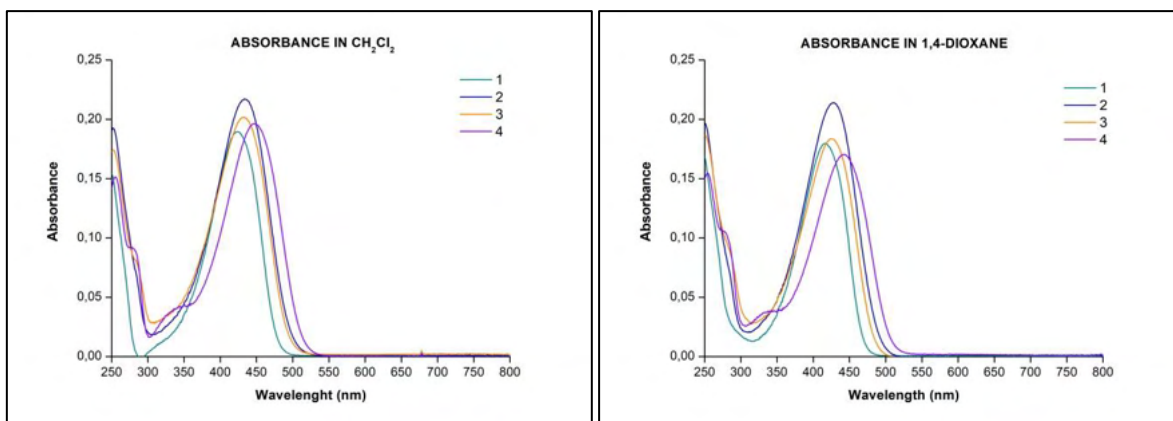


Figure 90 – Absorption of compounds 1 (Atró), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in CH_2Cl_2 and 1,4-dioxane at concentration c_1 .

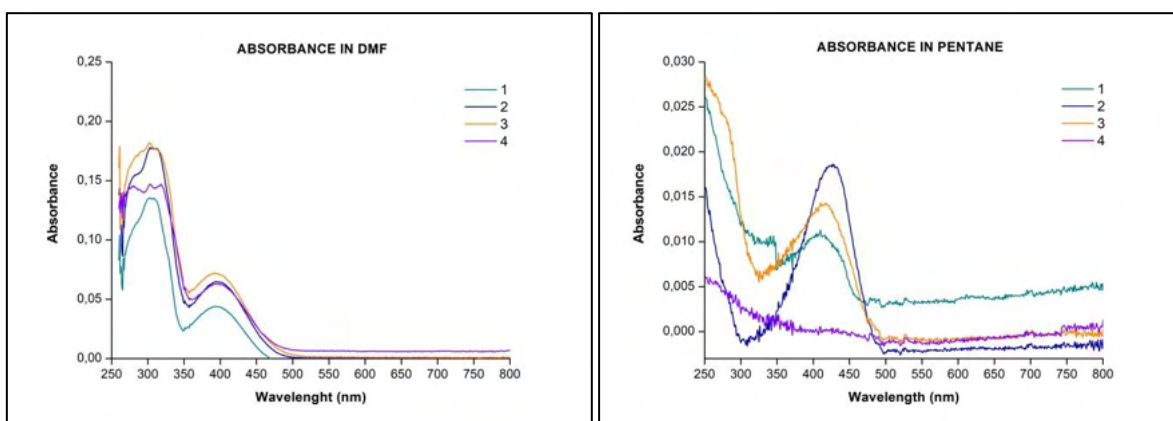


Figure 91 – Absorption of compounds 1 (Atró), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in DMF and pentane at concentration c_1 (except for pentane because of solubility limit).

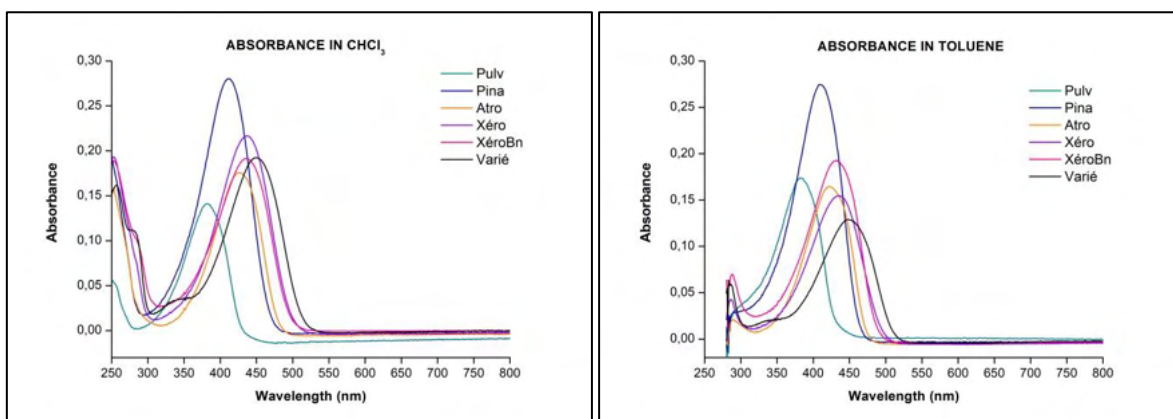


Figure 92 – Absorption of bistetronic acids in CHCl_3 and toluene at concentration c_1 .

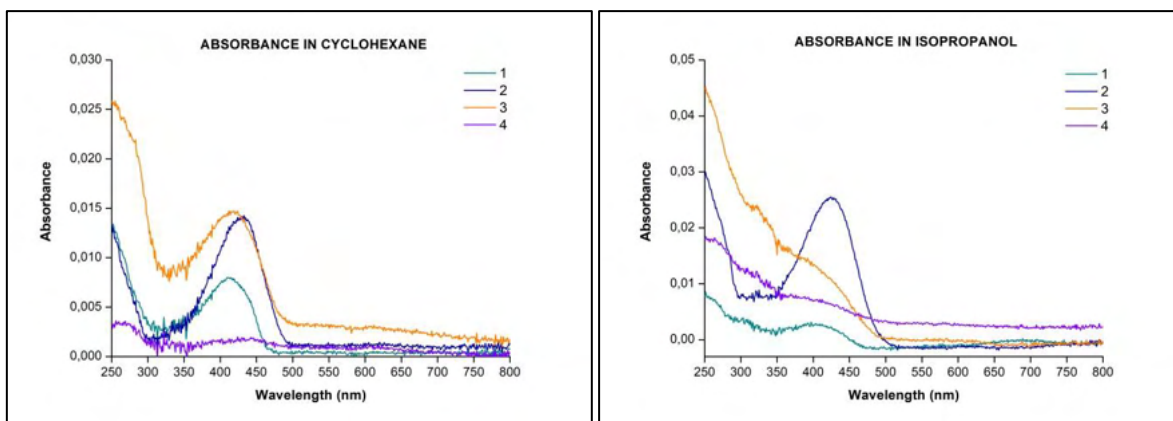


Figure 93 – Absorption of compounds 1 (Atró), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in cyclohexane and isopropanol at unknown concentration (because of solubility limit).

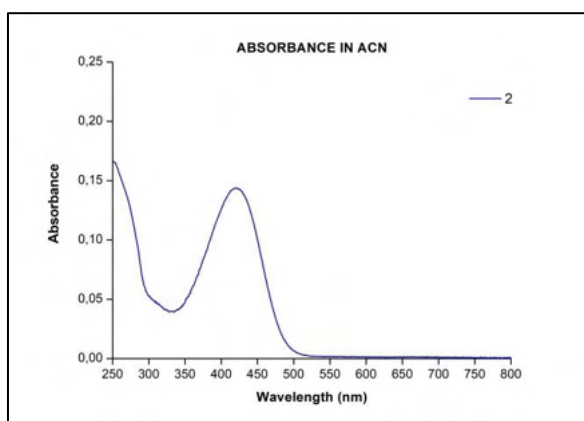


Figure 94 – Absorption of compound 2 (Xéro) in ACN at unknown concentration (because of solubility limit).

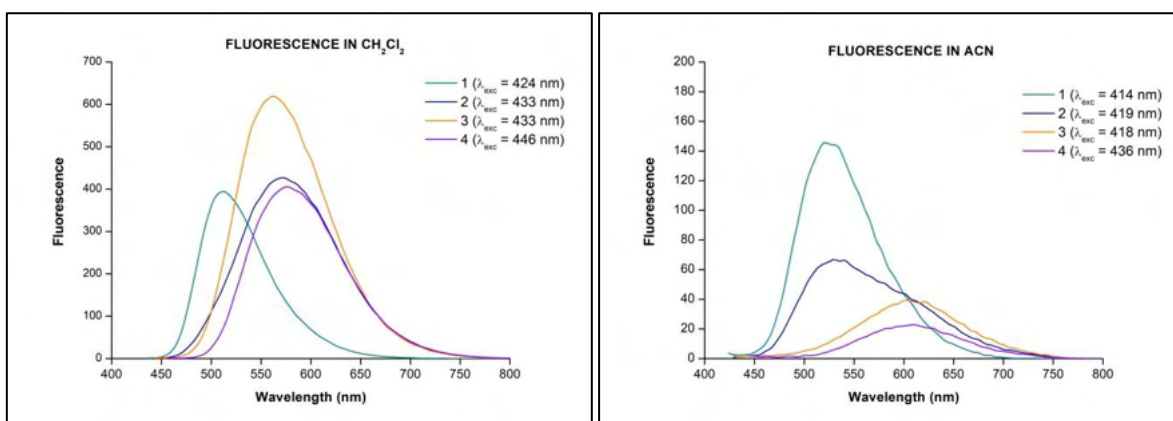


Figure 95 – Emission spectra of compounds 1 (Atró), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in CH₂Cl₂ and ACN at concentration c_1 (except for ACN, because of solubility limit) at their own λ_{max} .

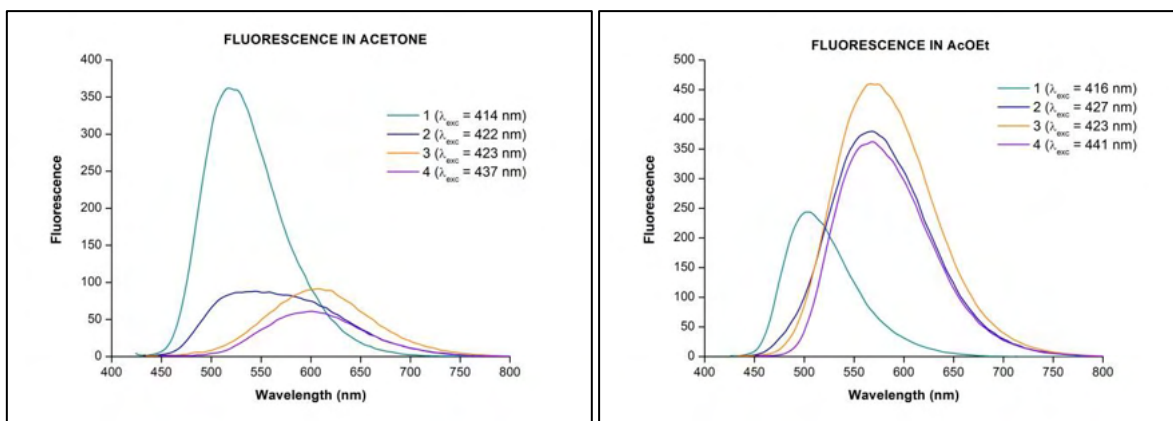


Figure 96 – Emission spectra of compounds 1 (Atró), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in acetone and AcOEt at concentration c_1 at their own λ_{max} .

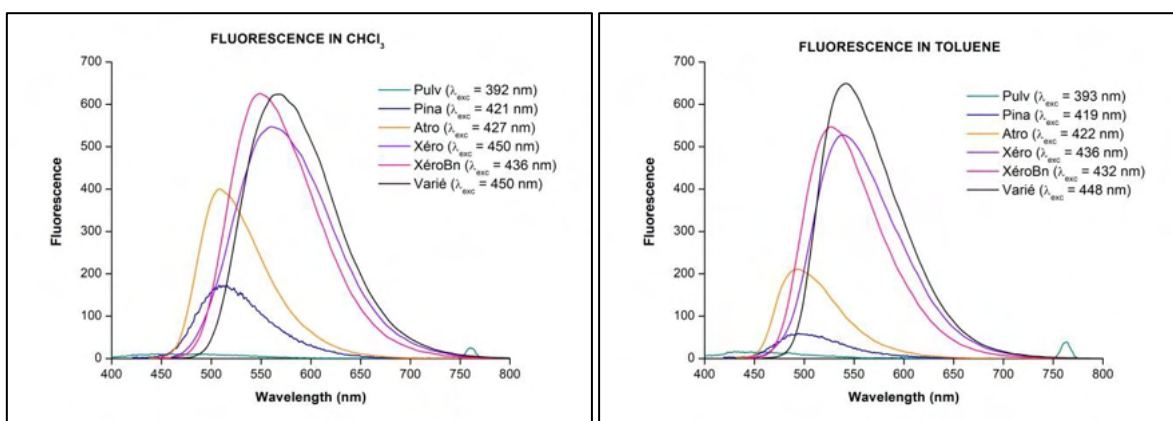


Figure 97 – Emission spectra of bistetronic acids in $CHCl_3$ and toluene at concentration c_1 at their own λ_{max} .

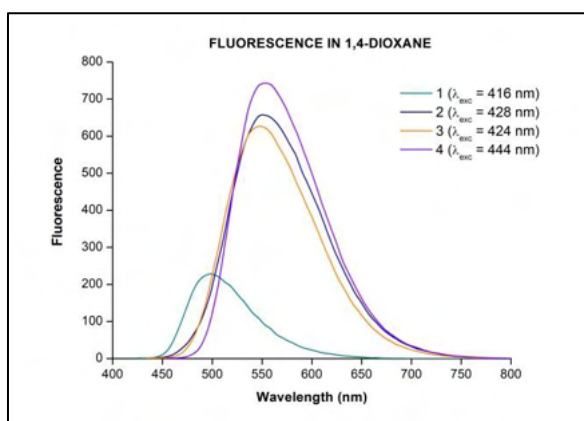


Figure 98 – Emission spectra of compounds 1 (Atró), 2 (Xéro), 3 (XéroBn) and 4 (Varié) in 1,4-dioxane at concentration c_1 at their own λ_{max} .

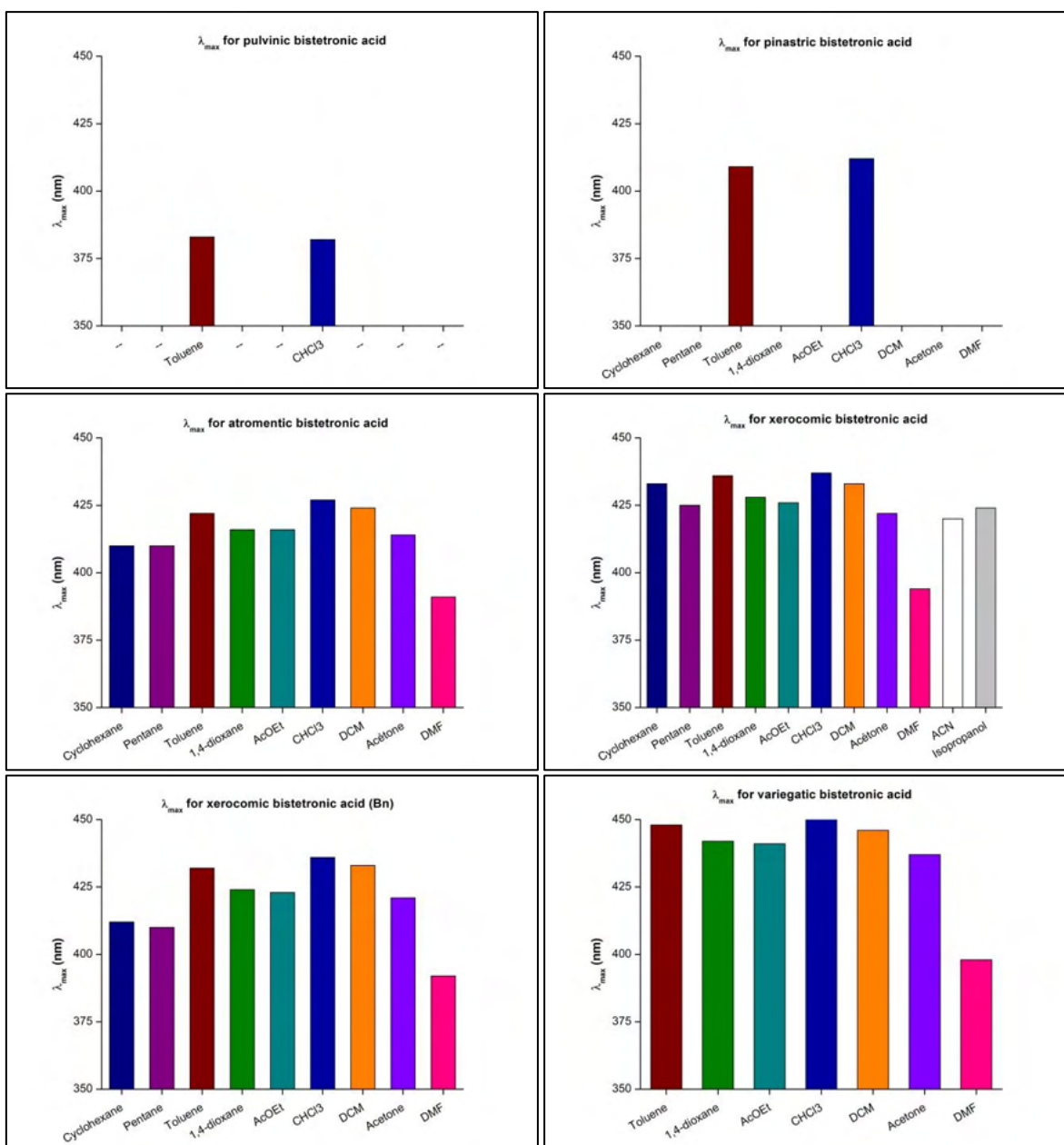


Figure 99 – Reported values of λ_{\max} for bistetronic acids in different solvents.

3.2 Molar extinction coefficients

Molar extinction coefficients were measured on the above solutions S_1 , S_2 and S_3 ($A_{\max} < 1.0$) at 25°C. The dimension of the rectangular quartz cell is $l = 1$ cm. For pentane and acetonitrile, only xerocomic acid was tested because of solubility limit.

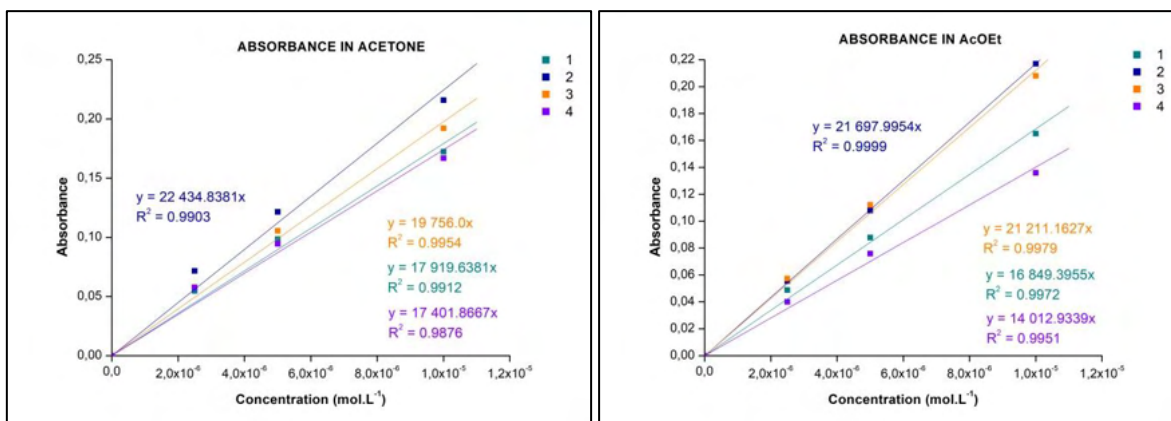


Figure 100 – Calculations of molar extinction coefficients for each compound (1 - Atro, 2 - Xéro, 3 - XéroBn and 4 - Varié) in acetone and AcOEt.

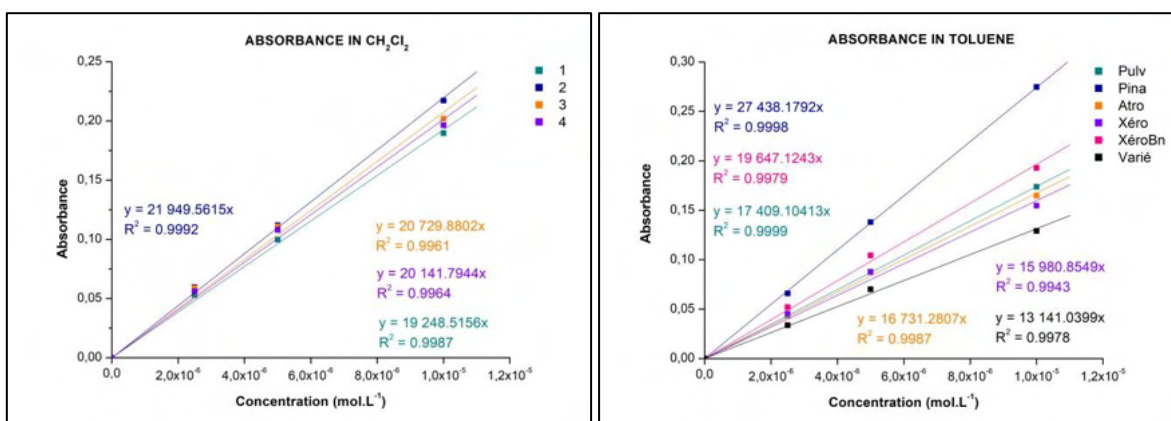


Figure 101 – Calculations of extinction coefficients for each compound (1 - Atro, 2 - Xéro, 3 - XéroBn and 4 - Varié) in CH₂Cl₂ and toluene.

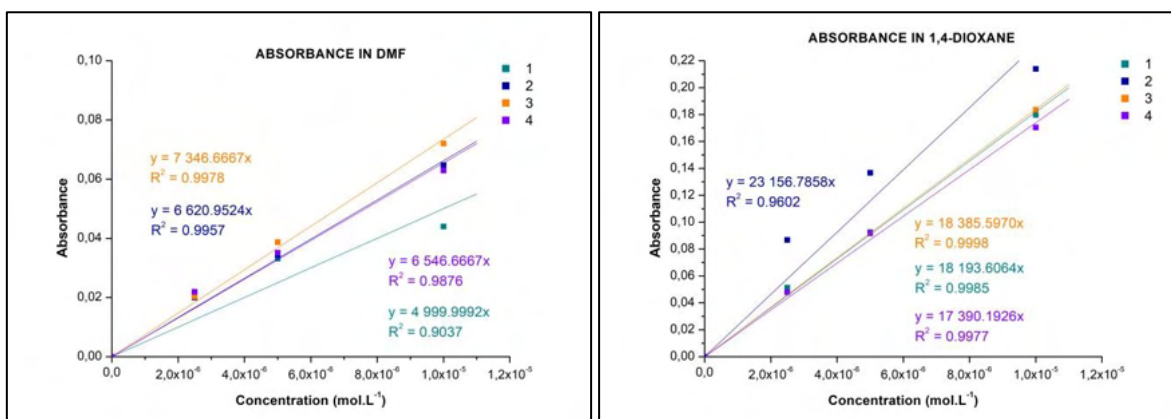


Figure 102 – Calculations of molar extinction coefficients for each compound (1 - Atro, 2 - Xéro, 3 - XéroBn and 4 - Varié) in DMF and 1,4-dioxane.

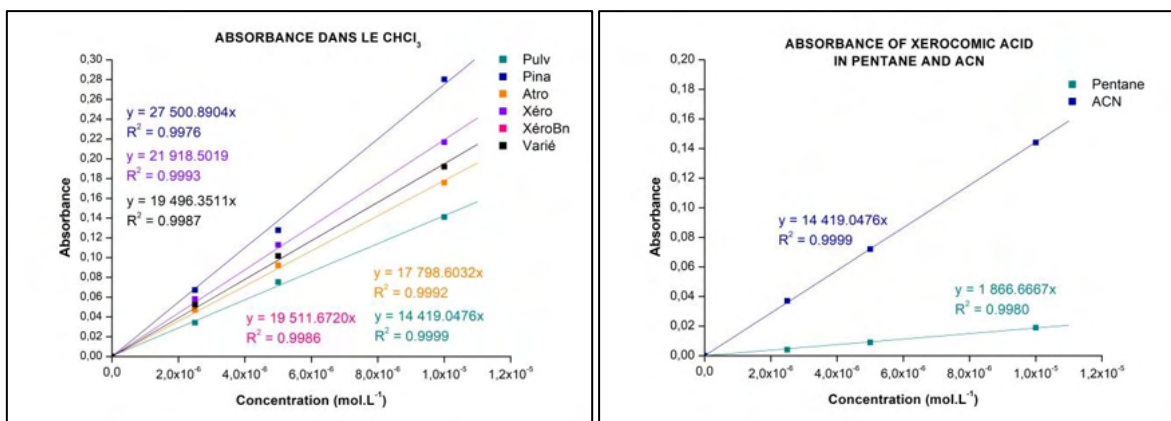


Figure 103 – Calculations of molar extinction coefficients for each compound (1, 2, 3 and 4) in CHCl₃, pentane and ACN.

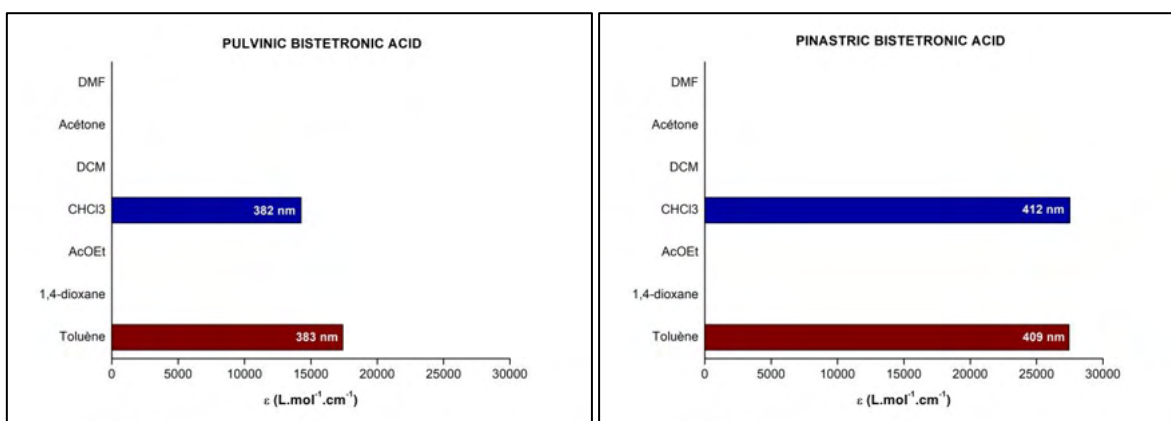


Figure 104 – Reported values of molar extinction coefficients (ϵ) for compounds Pulv and Pina in different solvents (the wavelength at which it has been calculated is reported on each histogram).

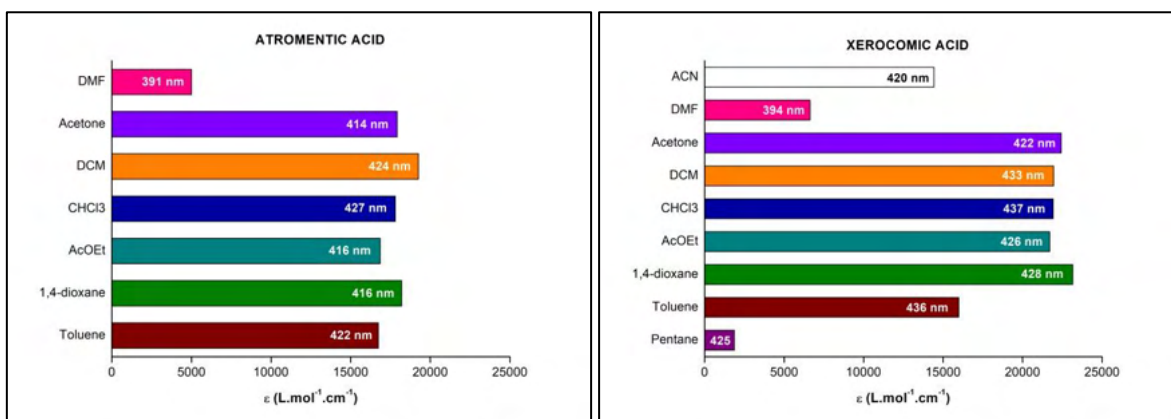


Figure 105 – Reported values of molar extinction coefficients (ϵ) for compounds Atro and Xero in different solvents (the wavelength at which it has been calculated is reported on each histogram).

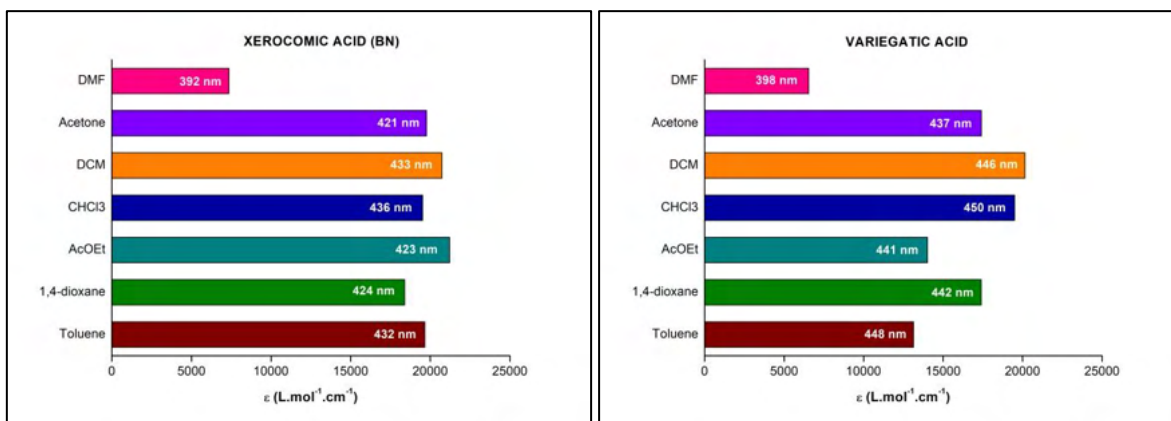


Figure 106 - Reported values of molar extinction coefficients (ϵ) for compounds XeroBn and Varie in different solvents (the wavelength at which it has been calculated is reported on each histogram).

3.3 Quantum yields

Relative quantum yields were measured on the above solutions S_2 and S_3 ($A_{\max} < 0.1$) at 25°C using *Lucifer yellow dilithium salt CH* ($\varphi_F = 0.21$ in water) as reference. Emission spectra were recorded after excitation at 427 nm.

The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield³⁸ :

$$\Phi_F^i = \frac{f_{\text{ref}}}{f_i} * \frac{F_i}{F_{\text{ref}}} * \left(\frac{n_i}{n_{\text{ref}}}\right)^2 * \Phi_F^{\text{ref}}$$

Where :

- Φ_F^i : quantum yield of compound i at λ_{exc}
- f_i : absorption factor ($f_i = 1 - 10^{-A(\lambda_{\text{exc}})}$), where $A(\lambda_{\text{exc}})$ is the absorbance of compound i at λ_{exc}
- F_i : area under the emission curve of compound i at λ_{exc}
- n_i : refractive index of solvents (at 25°C) used in measurements
- n_{ref} : refractive index of solvent where the reference compound is dissolved (*i. e.* water, $n_{\text{ref}} = 1.333$)

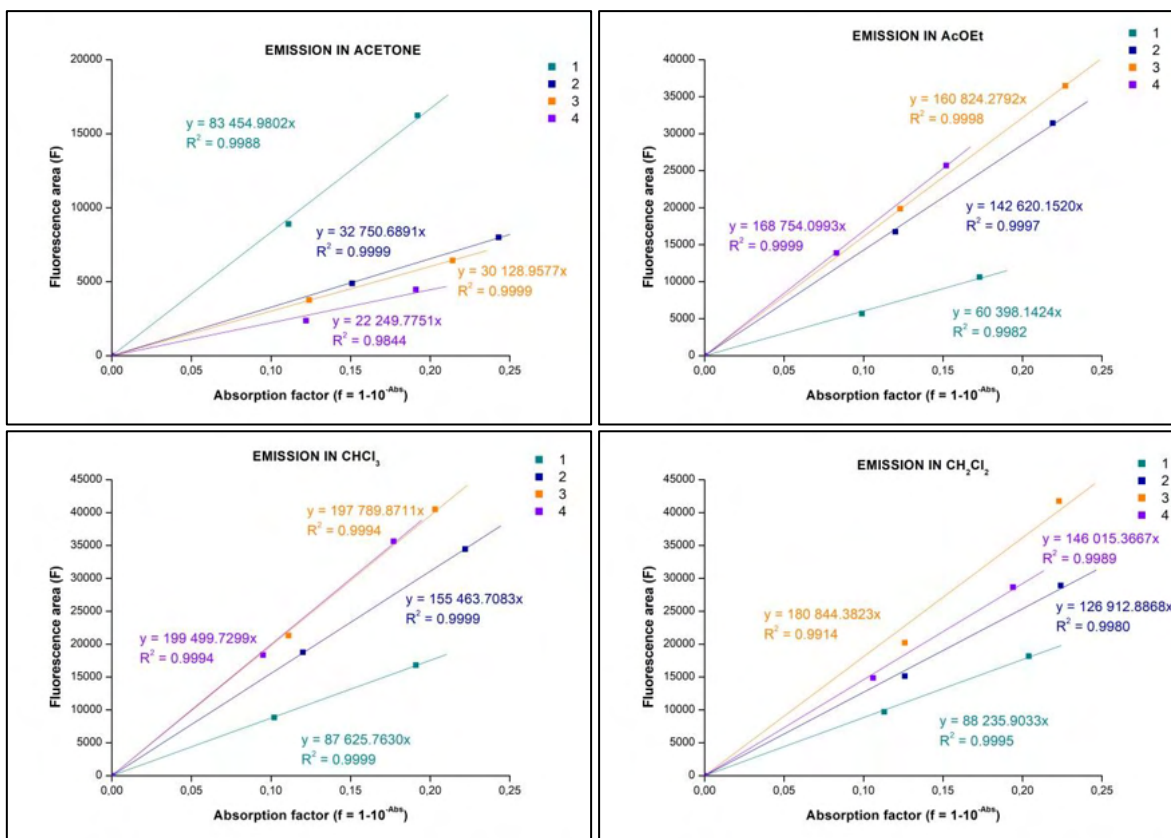


Figure 107 – Calculations of quantum yield for each compound (1 - Ato, 2 - Xero, 3 - XeroBn and 4 - Varie) in acetone, AcOEt, CHCl₃ and CH₂Cl₂. Values for compound Pina are too small to be seen on plots.

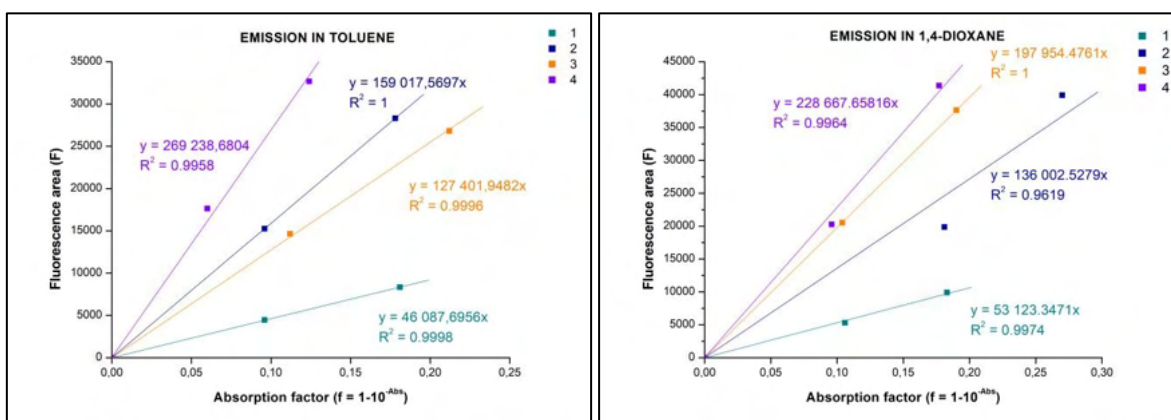


Figure 108 – Calculations of quantum yield for each compound (1 - Ato, 2 - Xero, 3 - XeroBn and 4 - Varie) in toluene and 1,4-dioxane. Values for compound Pina are too small to be seen on plots.

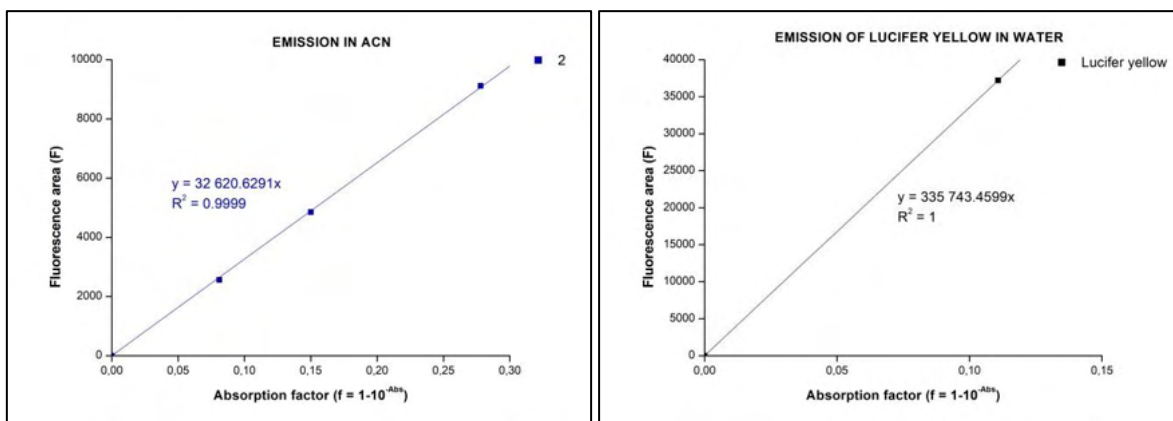


Figure 109 – Calculations of quantum yield for compound 2 (Xero) and LY in ACN and water.

RÉFÉRENCES

- 1 R. K. Acharyya, P. Pal, S. Chatterjee, S. Nanda *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 3552-3566.
- 2 Z. Ahmed, P. Langer *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2055-2063.
- 3 R. Alibés, J. Font, A. Mulá, R. M. Ortuño *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 2607-2615.
- 4 H. Alper, H. Arzoumanian, J.-F. Petrigani, M. Saldana-Maldonado *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 340-341.
- 5 H. Alper, J. K. Currie, H. des Abbayes *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 311-312.
- 6 H. Alper, A. Eisenstat, N. Satyanarayana *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7060-7061.
- 7 A. S. Amarasekara *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 6133-6183.
- 8 V. E. Amoo, S. De Bernardo, M. Weigele *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2401-2404.
- 9 M. Ando, N. Kataoka, M. Yasunami, K. Takase, N. Hirata, Y. Yanagi *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1429-1437.
- 10 H. H. Appel, J. D. Connolly, K. H. Overton, R. P. M. Bond *J. Chem. Soc.* **1960**, 4685-4692.
- 11 H. Arzoumanian, J.-F. Petrigani *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5979-5980.
- 12 M. Asaoka, N. Yanagida, N. Sugimura, H. Takei *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1980**, *53*, 1061-1064.
- 13 P. Asenjo, F. Fariña, M. V. Martín, M. C. Paredes, J. J. Soto *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1823-1842.
- 14 H. Avciyasi, H. Anil, M. Toprak *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2852-2854.
- 15 L. A. Badovskaya, V. M. Latashko, V. V. Poskonin, E. P. Grunskaya, Z. I. Tyukhteneva, S. G. Rudakova, S. A. Pestunova, A. V. Sarkisyan *Chem. Heterocycl. Compd.* **2002**, *38*, 1040-1048.
- 16 M. Balci, M. Celik, M. S. Gültekin, 'Product Subclass 2: Halogen-Substituted Benzo-1,4-Quinones', in *Category 4, Compounds with Two Carbon Heteroatom Bonds* (Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2006).
- 17 J. E. Baldwin, A. M. Fryer, G. J. Pritchard, M. R. Spyvee, R. C. Whitehead, M. E. Wood *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7465-7484.
- 18 J. Barluenga, A. de Prado, J. Santamaría, M. Tomás *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6583-6585.
- 19 C. Belil, J. Pascual, F. Serratos *Tetrahedron* **1964**, *20*, 2701-2708.
- 20 R. Bentley *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 118-138.
- 21 J. F. Blount, R.-J. L. Han, B. A. Pawson, R. G. Pitcher, T. H. Williams *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 4108-4110.
- 22 R. K. Boeckman, S. S. Ko *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7146-7149.
- 23 H.-H. Bokel, H. Marschall, P. Weyerstahl *Liebigs Ann.* **1982**, *1982*, 73-79.
- 24 C. G. Boojamra, R. C. Lemoine, J. C. Lee, R. Léger, K. A. Stein, N. G. Vernier, A. Magon, O. Lomovskaya, P. K. Martin, S. Chamberland, M. D. Lee, S. J. Hecker, V. J. Lee *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 870-874.
- 25 H. Bouges, K. Calabro, O. P. Thomas, S. Antoniotti *Molecules* **2018**, *23*, 2619.
- 26 J. Boukouvalas, F. Maltais, N. Lachance *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7897-7900.
- 27 Y. Bourdreux, E. Bodio, C. Willis, C. Billaud, T. Le Gall, C. Mioskowski *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8930-8937.
- 28 Y. Bourdreux, S. Nowaczyk, C. Billaud, A. Mallinger, C. Willis, M. Desage-El Murr, L. Toupet, C. Lion, T. Le Gall, C. Mioskowski *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 22-26.
- 29 A. Boussonnière, R. Bénétiau, J.-C. Rouaud, C. Despiaud, J. Lebreton, F. Dénès *Pure Appl. Chem.* **2016**, *88*, 215.
- 30 T. A. Brandvold, W. D. Wulff, A. L. Rheingold *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5459-5461.
- 31 D. H. Bray, D. C. Warhurst, J. D. Connolly, M. J. O'Neill, J. D. Phillipson *Phytother. Res.* **1990**, *4*, 29-35.
- 32 D. Brewer, W. A. Jerram, A. Taylor *Can. J. Microbiol.* **1968**, *14*, 861-866.
- 33 M. A. Brimble, M. T. Brimble, J. J. Gibson *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 179-184.
- 34 M. A. Brimble, E. Ireland *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 3109-3114.
- 35 M. A. Brimble, M. R. Nairn *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, 579-583.
- 36 M. A. Brimble, S. J. Stuart *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 881-885.
- 37 D. W. Brooks, H. S. Bevinakatti, E. Kennedy, J. Hathaway *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 628-632.
- 38 A. M. Brouwer *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213.
- 39 D. W. Brown, M. M. Campbell, A. P. Taylor, X.-A. Zhang *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 985-988.
- 40 S. P. Brown, N. C. Goodwin, D. W. C. MacMillan *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1192-1194.
- 41 S. L. Buchwald, Q. Fang, S. M. King *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3445-3448.
- 42 J. F. Burton, B. F. Cain *Nature* **1959**, *184*, 1326.

- 43 C. O. Gitterman, E. L. Rickes, D. E. Wolf, J. Madas, S. B. Zimmerman, T. H. Stoudt, T. C. Demny *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 305-310.
- 44 A. N. Cammidge, A. S. H. King *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5569-5572.
- 45 P. Canonne, M. Akssira, G. Lemay *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 2611-2614.
- 46 M. C. Carreño, C. G. Luzón, M. Ribagorda *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 208-216.
- 47 E. L. Carswell, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7230-7233.
- 48 G. Casiraghi, L. Colombo, G. Rassu, P. Spanu *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2565-2567.
- 49 R. M. Centko, S. Ramón-García, T. Taylor, B. O. Patrick, C. J. Thompson, V. P. Miao, R. J. Andersen *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2178-2182.
- 50 L. Chabaud, T. Jousseau, P. Retailleau, C. Guillou *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 5471-5481.
- 51 A. Chareonkla, M. Pohmakotr, V. Reutrakul, C. Yoosook, J. Kasisit, C. Napaswad, P. Tuchinda *Fitoterapia* **2011**, *82*, 534-538.
- 52 S. M. S. Chauhan, N. Jain *J. Chem. Res.* **2004**, *2004*, 693-694.
- 53 Q. Chen, H. He, P. Li, J. Zhu, M. Xiong *Biomed. Chromatogr.* **2013**, *27*, 699-707.
- 54 W. Chen, J. F. Hartwig *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15249-15252.
- 55 P. K. Chhattise, A. V. Ramaswamy, S. B. Waghmode *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 189-194.
- 56 J. Chiarello, M. M. Joullé *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 3379-3383.
- 57 J. M. Clough, G. Pattenden, P. G. Wight *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7469-7472.
- 58 X. Companyó, A. Zea, A.-N. R. Alba, A. Mazzanti, A. Moyano, R. Rios *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6953-6955.
- 59 C. Coperet, T. Sugihara, G. Wu, I. Shimoyama, E.-I. Negishi *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3422-3431.
- 60 J. Corbera, J. Font, M. Monsalvatje, R. M. Ortuno, F. Sanchez-Ferrando *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4393-4395.
- 61 R. E. Corbett, T. L. Chee *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 850-857.
- 62 A. Cowell, J. K. Stille *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 133-136.
- 63 A. Cowell, J. K. Stille *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4193-4198.
- 64 B. J. Cox, S. Jia, Z. C. Zhang, J. G. Ekerdt *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*, 426-431.
- 65 C. Cren-Olivé, P. Hapiot, J. Pinson, C. Rolando *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14027-14038.
- 66 G. T. Crisp, A. G. Meyer *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6972-6975.
- 67 D. Liao, S. Yang, J. Wang, J. Zhang, B. Hong, F. Wu, X. Lei *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**.
- 68 F. D. da Silva Araújo, L. C. de Lima Fávoro, W. L. Araújo, F. L. de Oliveira, R. Aparicio, A. J. Marsaioli *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 5225-5230.
- 69 O. Dangles, G. Fargeix, C. Dufour *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**.
- 70 N. Danieli, Y. Mazur, F. Sondheimer *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 875-876.
- 71 E. R. Darzi, N. K. Garg *Org. Lett.* **2020**, *22*, 3951-3955.
- 72 A. L. Davis, J. R. Lewis, Y. Cai, C. Powell, A. P. Davis, J. P. G. Wilkins, P. Pudney, M. N. Clifford *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1397-1402.
- 73 P. Davoli, R. W. S. Weber *J. Chromatogr. A* **2002**, *964*, 129-135.
- 74 G. De Gregorio, C. Weber, J. Gräsvik, T. Welton, A. Brandt, J. Hallett *Green Chem.* **2016**, *18*, 5456-5465.
- 75 A. de Groot, M. P. Broekhuysen, L. L. Doddema, M. C. Vollering, J. M. M. Westerbeek *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4831-4834.
- 76 A. De Groot, B. J. M. Jansen *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2034-2035.
- 77 E. D. de Silva, P. J. Scheuer *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611-1614.
- 78 P. DeShong, D. R. Sidler, P. J. Rybczynski, G. A. Slough, A. L. Rheingold *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2575-2585.
- 79 P. DeShong, D. R. Sidler, G. A. Slough *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2233-2236.
- 80 G. Desimoni, G. Faita, M. Guala, A. Laurenti, M. Mella *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3816-3824.
- 81 K. G. Dongol, R. Wartchow, H. Butenschön *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 1972-1983.
- 82 K. Doyama, T. Joh, K. Onitsuka, T. Shiohara, S. Takahashi *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 649-650.
- 83 R. L. Edwards, M. Gill *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 351-354.
- 84 R. L. Edwards, M. Gill *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1973**, 1529-1537.
- 85 P. Ellerbrock, N. Armanino, M. K. Ilg, R. Webster, D. Trauner *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 879-882.
- 86 P. Ellerbrock, N. Armanino, D. Trauner *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13414-13418.
- 87 L. Evanno, D. Lachkar, A. Lamali, A. Boufridi, B. Séon-Méniel, F. Tintillier, D. Saulnier, S. Denis, G. Genta-Jouve, J. C. Jullian, K. Leblanc, M. A. Beniddir, S. Petek, C. Debitus, E. Poupon *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *0*, 2486-2497.
- 88 L. Farrugia *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837-838.

- 89 J. M. Ferland, Y. Lefebvre, R. Deghenghi, K. Wiesner *Tetrahedron Lett.* **1966**, 7, 3617-3620.
90 F. R. Foden, J. McCormick, D. M. O'Mant *J. Med. Chem.* **1975**, 18, 199-203.
91 J. A. Ford, C. V. Wilson, W. R. Young *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 173-177.
92 J. M. Fraile, N. García, C. I. Herrerías, M. Martín, J. A. Mayoral *ACS Catal.* **2012**, 2, 56-64.
93 X. Franck, M. E. Vaz Araujo, J.-C. Jullian, R. Hocquemiller, B. Figadère *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2801-2803.
94 R. L. Frank, G. R. Clark, J. N. Coker *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 1824-1826.
95 Y. Fujiwara, V. Domingo, I. B. Seiple, R. Gianatassio, M. Del Bel, P. S. Baran *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3292-3295.
96 T. Fukuyama, L. Yang *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 6299-6300.
97 L.-S. Gan, Y.-L. Zheng, J.-X. Mo, X. Liu, X.-H. Li, C.-X. Zhou *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1497-1501.
98 X. Gan, W. Jiang, W. Wang, L. Hu *Org. Lett.* **2009**, 11, 589-592.
99 R. Garzelli, S. Samaritani, C. Malanga *Tetrahedron* **2008**, 64, 4183-4186.
100 F. Geng, J. Liu, L. A. Paquette *Org. Lett.* **2002**, 4, 71-73.
101 P. Georgantea, E. Ioannou, C. Vagias, V. Roussis *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 6920-6922.
102 A. Ghods, J. Gilbert, J. R. Baker, C. C. Russell, J. A. Sakoff, A. McCluskey *Royal Soc. Open Sci.* **2018**, 5.
103 M. Gill, W. Steglich *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**.
104 D. Goldsmith, D. Liotta, M. Saindane, L. Waykole, P. Bowen *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5835-5838.
105 A. G. González, J. Darias, J. D. Martín *Tetrahedron Lett.* **1973**, 14, 3625-3626.
106 M. L. Graziano, R. Scarpati *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 124-125.
107 W. Greene, in *Protective Groups in Organic Synthesis* (1998).
108 A. G. Griesbeck, B. Öngel, M. Atar *J. Phys. Org. Chem.* **2017**, 30, e3741.
109 W. Grimminger, W. Kraus *Liebigs Ann.* **1979**, 1979, 1571-1576.
110 P. K. Grover, T. R. Seshadri *Tetrahedron* **1958**, 4, 105-110.
111 A. R. Gulur Srinivas, T. E. Kerr-Phillips, H. Peng, D. Barker, J. Travas-Sejdic *Polym. Chem.* **2013**, 4, 2506-2514.
112 S. Guyot, J. Vercauteren, V. Cheynier *Phytochemistry* **1996**, 42, 1279-1288.
113 K.-I. Harada, K. Fujii, T. Shimada, M. Suzuki, H. Sano, K. Adachi, W. W. Carmichael *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1511-1514.
114 J. B. Harborne, in *The Flavonoids, Advances in Research since 1986* (Chapman and Hall, London, 1994).
115 L. J. Haynes *Quarterly Reviews, Chemical Society* **1948**, 2, 46-72.
116 W. He, J. Huang, X. Sun, A. J. Frontier *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 498-499.
117 Y. Hirose, T. Fujita, S. Shima, M. Nakayama *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1995**, 44, 491-497.
118 J. Hladyszowski, L. Zubik, A. Kozubek *Free Radic. Res.* **1998**, 28, 359-368.
119 G. J. Hollingworth, A. M. E. Richecoeur, J. Sweeney *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 2833-2836.
120 T. R. Hoye, G. M. Rehberg *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2841-2842.
121 L. Hu, J.-M. Gao, J.-K. Liu *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3342-3349.
122 Y. Huang, A. M. Walji, C. H. Larsen, D. W. C. MacMillan *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15051-15053.
123 Y. Huang, J. Zhang, T. R. R. Pettus *Org. Lett.* **2005**, 7, 5841-5844.
124 K. Huvaere, B. Sinnaeve, J. Van Boclaer, L. H. Skibsted *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 9261-9272.
125 A. Ichihara, N. Nio, Y. Terayama, R. Kimura, S. Sakamura *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3731-3734.
126 C. Ingham, R. Massy-Westropp, G. Reynolds *Aust. J. Chem.* **1974**, 27, 1477-1489.
127 E. Jägers, E. Hillen-Maske, W. Steglich *Zeitschrift für Naturforschung B* **1987**, 42, 1349-1353.
128 P. Janeiro, A. M. Oliveira Brett *Anal. Chim. Acta* **2004**, 518, 109-115.
129 C. W. Jefford, A. W. Sledeski, J. Boukouvalas *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 949-950.
130 C. W. Jefford, A. W. Sledeski, J.-C. Rossier, J. Boukouvalas *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 5741-5744.
131 W. A. Jerram, A. G. McInnes, W. S. G. Maass, D. G. Smith, A. Taylor, J. A. Walter *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 727-737.
132 Y.-Q. Jiang, Y.-L. Shi, M. Shi *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7202-7203.
133 T. T. Jong, P. G. Williard, J. P. Porwoll *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 735-736.
134 X. Jusseau, L. Chabaud, C. Guillou *Tetrahedron* **2014**, 70, 2595-2615.
135 X. Jusseau, P. Retailleau, L. Chabaud, C. Guillou *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 2289-2300.
136 R. Kaiser, D. Lamparsky *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 1843-1849.
137 M. Kamaya, Y. Hamada, S. Yazaki, K. Nagashima, E. Ishii *Anal. Chim. Acta* **1992**, 264, 131-136.
138 A. Karioti, A. R. Bilia, C. Gabbiani, L. Messori, H. Skaltsa *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1771-1776.
139 S. Katsumura, S. Fujiwara, S. Isoe *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5827-5830.
140 S. Katsumura, K. Hori, S. Fujiwara, S. Isoe *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 4625-4628.

- 141 F. Kavanagh, A. Hervey, W. J. Robbins *Proc Natl Acad Sci USA* **1949**, *35*, 343-349.
- 142 E. K. Kempainen, G. Sahoo, A. Valkonen, P. M. Pihko *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1086-1089.
- 143 F. Kido, Y. Noda, A. Yoshikoshi *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5509-5511.
- 144 F. Kido, Y. Noda, A. Yoshikoshi *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1209-1210.
- 145 K. H. Kim, H. S. Lee, S. H. Kim, K.-Y. Lee, J.-E. Lee, J. N. Kim *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30*.
- 146 A. M. King, S. A. Reid-Yu, W. Wang, D. T. King, G. De Pascale, N. C. Strynadka, T. R. Walsh, B. K. Coombes, G. D. Wright *Nature* **2014**, *510*, 503-506.
- 147 T. Klobb *Bull. Soc. Chim. Fr* **1898**, 389.
- 148 D. W. Knight *Contemp. Org. Synth.* **1994**, *1*, 287-315.
- 149 S. Y. Ko, J. Lerpiniere *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2101-2104.
- 150 K. Kobayashi, K. Kuwahara, K. I. Tanaka, R. Kunimura, H. Kogen *Heterocycles* **2018**, *97*, 1019-1027.
- 151 M. Kobayashi, E.-I. Negishi *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5223-5225.
- 152 B. Koch, C. Kilpert, W. Steglich *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 359-362.
- 153 F. Kögl, H. Becker, G. de Voss, E. Wirth *Liebigs Ann.* **1928**, *465*, 243-256.
- 154 M. Kitora, E.-I. Negishi *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9041-9042.
- 155 M. Kitora, E.-I. Negishi *Synthesis* **1997**, *1997*, 121-128.
- 156 A. P. Kozikowski, F. Nan, P. Conti, J. Zhang, E. Ramadan, T. Bzdega, B. Wroblewska, J. H. Neale, S. Pshenichkin, J. T. Wroblewski *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 298-301.
- 157 M. E. Krafft, J. Pankowski *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5139-5142.
- 158 M. E. Krafft, J. Pankowski *Synlett* **1991**, *1991*, 865-866.
- 159 G. A. Kraus, B. Roth *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 3129-3132.
- 160 M. Kubo, Y. Nishikawa, K. Harada, M. Oda, J.-M. Huang, H. Domon, Y. Terao, Y. Fukuyama *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1466-1469.
- 161 D. Kuhnt, T. Anke, H. Besl, M. Bross, R. Herrmann, U. Mocek, S. Bert, W. Steglich *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1413-1420.
- 162 J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. by Springer (2010).
- 163 R. C. Larock, B. Riefling, C. A. Fellows *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 131-137.
- 164 A. Le Roux, S. Meunier, T. Le Gall, J. M. Denis, P. Bischoff, A. Wagner *ChemMedChem* **2011**, *6*, 561-569.
- 165 H.-G. Lehmann, R. Wiechert *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, *7*, 300-301.
- 166 S. V. Ley, M. Mahon *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 4747-4750.
- 167 Y. Li, F. Zhang, Y. Xu, K. Matsumura, Z. Han, L. Liu, W. Lin, Y. Jia, P.-Y. Qian *Biofouling* **2012**, *28*, 857-864.
- 168 K. Liu, H. B. Wood, A. B. Jones *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5119-5122.
- 169 S. Liu, H. Dai, C. Heering, C. Janiak, W. Lin, Z. Liu, P. Proksch *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 257-261.
- 170 S. Liu, R. J. Ono, C. Yang, S. Gao, J. Y. Ming Tan, J. L. Hedrick, Y. Y. Yang *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 19355-19364.
- 171 A. Livieri, M. Boiocchi, G. Desimoni, G. Faita *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 11662-11668.
- 172 Y. Long, Y. Ding, H. Wu, C. Qu, H. Liang, M. Zhang, X. Zhao, X. Long, S. Wang, P.-T. Puno, J. Deng *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**.
- 173 M. López-Serrano, A. Ros Barceló *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1218-1224.
- 174 M. López-Serrano, A. Ros Barceló *J. Chromatogr. A* **2001**, *919*, 267-273.
- 175 X. Lu, X. Huang, S. Ma *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5963-5966.
- 176 X. Ma, J. Yu, M. Jiang, M. Wang, L. Tang, M. Wei, Q. Zhou *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 4593-4596.
- 177 I. Maeba, M. Suzuki, O. Hara, T. Takeuchi, T. Iijimar, H. Furukawa *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4521-4526.
- 178 A. Mallinger, T. Le Gall, C. Mioskowski *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1124-1129.
- 179 B. Mao, K. Geurts, M. Fañanás-Mastral, A. W. van Zijl, S. P. Fletcher, A. J. Minnaard, B. L. Feringa *Org. Lett.* **2011**, *13*, 948-951.
- 180 B. Mao, Y. Ji, M. Fañanás-Mastral, G. Caroli, A. Meetsma, B. L. Feringa *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3168-3173.
- 181 T. Mark Zabriskie, M. D. Jackson *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 85-97.
- 182 J. A. Marshall, J. Lebreton, B. S. DeHoff, T. M. Jenson *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3883-3889.
- 183 J. A. Marshall, J. Lebreton, B. S. DeHoff, T. M. Jenson *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 723-726.
- 184 M. Martin-Smith, P. de Mayo, S. J. Smith, J. B. Stenlake, W. D. Williams *Tetrahedron Lett.* **1964**, *5*, 2391-2396.
- 185 R. Massy-Westropp, M. Price *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 333-341.
- 186 Y. Matsuo, Y. Li, S. Watarumi, T. Tanaka, I. Kouno *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2051-2059.

- 187 T. Matsuura, H. Matsushima, S. Kato, I. Saito *Tetrahedron* **1972**, 28, 5119-5129.
188 T. Matsuura, A. Nishinaga, N. Yoshimura, T. Arai, K. Omura, H. Matsushima, S. Kato, I. Saito *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 1673-1676.
189 T. C. McMorris, R. Seshadri *J. Chem. Soc. D: Chem. Commun.* **1971**, 1646-1646.
190 J. L. Michel, Y. Chen, H. Zhang, Y. Huang, A. Kronic, J. Orjala, M. Veliz, K. K. Soni, D. D. Soejarto, A. Caceres, A. Perez, G. B. Mahady *J. Ethnopharmacol.* **2010**, 129, 220-226.
191 A. Mills, D. Hazafy, S. Elouali, C. O'Rourke *J. Mater. Chem. A* **2016**, 4, 2863-2872.
192 T. Mise, P. Hong, H. Yamazaki *Chem. Lett.* **1981**, 10, 993-996.
193 T. Mise, P. Hong, H. Yamazaki *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 238-242.
194 H. Miura, K. Takeuchi, T. Shishido *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 278-282.
195 K. Monde, M. Takasugi, N. Katsui, T. Masamune *Chem. Lett.* **1990**, 19, 1283-1286.
196 H. W. Moore *Chem. Soc. Rev.* **1973**, 2, 415-455.
197 H. W. Moore, D. L. Maurer, D. S. Pearce, M. S. Lee *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 1984-1989.
198 H. W. Moore, H. R. Shelden *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 4019-4024.
199 H. W. Moore, H. R. Shelden, D. W. Deters, R. J. Wikholm *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 1675-1681.
200 H. W. Moore, R. J. Wikholm *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 5049-5052.
201 R. M. Moriarty, R. K. Vaid, T. E. Hopkins, B. K. Vaid, A. Tuncay *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3019-3022.
202 T. Morikawa, T. Nishiwaki, Y. Iitaka, Y. Kobayashi *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 671-674.
203 C. Mukai, S. Hirai, I. J. Kim, M. Kido, M. Hanaoka *Tetrahedron* **1996**, 52, 6547-6560.
204 R. Nakajima, Z. Nováková, W. Tueckmantel, L. Motlová, C. Bařinka, A. P. Kozikowski *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, 9, 1099-1104.
205 E.-I. Negishi, M. Kitora *Tetrahedron* **1997**, 53, 6707-6738.
206 E.-I. Negishi, J. M. Tour *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4869-4872.
207 K. L. Ngai, L. N. Ornston, R. G. Kallen *Biochemistry* **1983**, 22, 5223-5230.
208 K. Ngamchuea, B. Tharat, P. Hirunsit, S. Suthirakun *RSC Adv.* **2020**, 10, 28454-28463.
209 D. Ngoc Quang, T. Hashimoto, Y. Hitaka, M. Tanaka, M. Nukada, I. Yamamoto, Y. Asakawa *Phytochemistry* **2003**, 63, 919-924.
210 K. C. Nicolaou, N. A. Petasis, R. E. Zipkin, J. Uenishi *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5555-5557.
211 K. A. Niederer, P. H. Gilmartin, M. C. Kozlowski *ACS Catal.* **2020**, 10, 14615-14623.
212 H. Nishikori, K. Ito, T. Katsuki *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 1165-1170.
213 A. J. E. Novak, C. E. Grigglesome, D. Trauner *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 15515-15518.
214 O. P. Mittal, T. R. Seshadri *J. Chem. Soc.* **1955**, 3053.
215 R. Okazaki, Y. Negishi, N. Inamoto *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3819-3824.
216 R. K. Olsen, W. J. Hennen, R. B. Wardle *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4605-4611.
217 D. Panda, P. P. Mishra, S. Khatua, A. L. Koner, R. B. Sunoj, A. Datta *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 5585-5591.
218 H. Pangbu, M. Takaya, Y. Hiroshi *Chem. Lett.* **1981**, 10, 989-992.
219 S. V. Pansare, E. K. Paul *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 2119-2125.
220 S. K. Park, J. Chae *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, 34, 174-178.
221 B. S. Patil, G.-R. Vasanthakumar, V. V. Suresh Babu *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7274-7280.
222 J. G. Patil, M. L. Ahire, K. M. Nitaware, S. Panda, V. P. Bhatt, P. B. K. Kishor, T. D. Nikam *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 2379-2393.
223 G. Pattenden, in *Natural 4-Ylidenebutenolides and 4-Ylidenetetronic Acids (Progress in the Chemistry of Organic Natural Products)* (Springer-Verlag/Wien, 1978).
224 G. Pattenden, N. A. Pegg, R. W. Kenyon *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 2363-2372.
225 G. Pattenden, M. W. Turvill, A. P. Chorlton *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 2357-2361.
226 R. Paulini, C. Lerner, F. Diederich, R. Jakob-Roetne, G. Zürcher, E. Borroni *Helv. Chim. Acta* **2006**, 89, 1856-1887.
227 S. I. Pennanen *Synth. Commun.* **1986**, 16, 877-882.
228 S. I. Pennanen *Acta Chem. Scand. B* **1980**, 34, 261.
229 G. Piancatelli, A. Scettri, M. D'Auria *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 1507-1508.
230 T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Orešič *BMC Bioinform.* **2010**, 11, 395.
231 T. Qin, R. P. Johnson, J. A. Porco *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 1714-1717.
232 N. M. Rageh *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2004**, 60, 103-109.
233 R. Ramage, G. J. Griffiths, J. N. A. Sweeney *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 1547-1553.
234 Y. S. Rao *Chem. Rev.* **1976**, 76, 625-694.
235 Y. S. Rao, R. Filler *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 1457-1460.
236 G. Read, L. C. Vining, R. H. Haskins *Can. J. Chem.* **1962**, 40, 2357.

- 237 J.-H. Renault *Thèse de doctorat URCA/Pharmacognosie/Reims* **1997**.
- 238 A. M. E. Richecœur, J. B. Sweeney *Tetrahedron* **2000**, *56*, 389-395.
- 239 H. G. Roth, N. A. Romero, D. A. Nicewicz *Synlett* **2016**, *27*, 714-723.
- 240 S. B. Ryu *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 229-235.
- 241 I. Saito, N. Yoshimura, T. Arai, K. Omura, A. Nishinaga, T. Matsuura *Tetrahedron* **1972**, *28*, 5131-5137.
- 242 P. A. Sakharov, N. V. Rostovskii, A. F. Khlebnikov, M. S. Novikov *Org. Lett.* **2020**, *22*, 3023-3027.
- 243 J. Saska, Z. Li, A. L. Otsuki, J. Wei, J. C. Fettingner, M. Mascal *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 17293-17296.
- 244 E. W. Schmidt, M. K. Harper, D. J. Faulkner *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 779-782.
- 245 P. Schneider, S. Bouhired, D. Hoffmeister *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 1487-1496.
- 246 R. M. Scribner *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3671-3682.
- 247 T. Seki, M. Satake, L. Mackenzie, H. F. Kaspar, T. Yasumoto *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7093-7096.
- 248 E. Shaw *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 2510-2513.
- 249 G. Sheldrick *Acta Crystallograph. A* **2008**, *64*, 112-122.
- 250 G. M. Sheldrick, 'Shelxl-97', in *Program for Crystal-Structure Refinement* (University of Göttingen, 1997).
- 251 T. K. M. Shing, V. W. F. Tai, H.-C. Tsui *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1293-1294.
- 252 T. K. M. Shing, H.-C. Tsui, Z.-H. Zhou *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3121-3130.
- 253 T. Shono, Y. Matsumura, S.-I. Yamane *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3269-3272.
- 254 H. Sies *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1058-1071.
- 255 S. Singha, Y. W. Jun, S. Sarkar, K. H. Ahn *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 2571-2581.
- 256 Y. S. Song, Y.-J. Lee, B. T. Kim, J.-N. Heo *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7427-7430.
- 257 A. Spiegel *Liebigs Ann.* **1883**, *219*, 1-56.
- 258 A. Srikrishna, G. V. R. Sharma *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6487-6488.
- 259 R. Srinivasan, H. Hiraoka *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2767-2770.
- 260 C. Stahlschmidt *Liebigs Ann.* **1877**, *187*, 177-197.
- 261 W. Steglich, H. Besl, K. Zipfel *Z. Naturforsch.* **1974**, *29 b*, 96-98.
- 262 W. Steglich, H.-T. Huppertz, B. Steffan *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 711-712.
- 263 I. W. J. Still, M. J. Drewery *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 290-295.
- 264 G. Stork, R. Mook *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3720-3722.
- 265 F. W. Sum, L. Weiler *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4401-4403.
- 266 J. Sun, H. Yang, W. Tang *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 2320-2336.
- 267 M. Szlosek, X. Franck, B. Figadère, A. Cavé *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5169-5172.
- 268 A. Takahashi, H. Yanai, M. Zhang, T. Sonoda, M. Mishima, T. Taguchi *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1259-1265.
- 269 F. M. Talontsi, B. Dittrich, A. Schüffler, H. Sun, H. Laatsch *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3174-3180.
- 270 J. Tan, W. J. C. de Bruijn, A. van Zadelhoff, Z. Lin, J.-P. Vincken *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 13879-13887.
- 271 K. Tanaka, M. Terauchi, A. Kaji *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1982**, *55*, 3935-3936.
- 272 C. W. Tang, S. A. V. Slyke *Appl. Phys. Lett.* **1987**, *51*, 913.
- 273 M. Taniguchi, J. S. Lindsey *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 290-327.
- 274 S. P. Tanis, D. B. Head *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4451-4454.
- 275 S. Tewtrakul, P. Tansakul, C. Daengrot, C. Ponglimanont, C. Karalai *Phytomedicine* **2010**, *17*, 851-855.
- 276 M. Thierry, A. Majira, B. Pegot, L. Cezard, F. Bourdreux, G. Clément, F. Perreau, S. Boutet-Mercey, P. Diter, G. Vo-Thanh, C. Lapiere, P.-H. Ducrot, E. Magnier, S. Baumberger, B. Cottyn *ChemSusChem* **2018**, *11*, 439-448.
- 277 W. Thörner *Chem. Ber.* **1878**, *11*, 533-535.
- 278 V. Tomašić, J. Makarević, M. Jokić *Thermochim. Acta* **2006**, *444*, 97-106.
- 279 S. Torii, H. Tanaka, H. Ogo, S. Yamasita *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1971**, *44*, 1079-1084.
- 280 B. M. Trost, F. D. Toste *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3543-3544.
- 281 J. H. Tsai, L. R. Takaoka, N. A. Powell, J. S. Nowick *Org. Synth.* **2002**, *78*, 220.
- 282 S. Tsuboi, H. Wada, K. Muranaka, A. Takeda *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1987**, *60*, 2917-2921.
- 283 M. Tsuda, H. Shigemori, M. Ishibashi, T. Sasaki, J. Kobayashi *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3503-3507.
- 284 B. Valeur, in *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001).
- 285 C. Vanleugenhaghe, G. Valesi, M. Pourbaix *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions* **1966**, éd. M. Pourbaix, Pergamon Press, Oxford.
- 286 P. Vanýsek *CRC Handb. Chem. Phys.* **2012**, 93rd edition.

-
- 287 M. Veverka, J. Gallovic, E. Svajdlenka, E. Veverkova, N. Pronayova, I. Milackova, M. Stefek *Chem. Pap.* **2012**, *67*.
- 288 C. Viron, R. Pennanec, P. André, M. Lafosse *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23*, 1681-1688.
- 289 J. Volhard *Liebigs Ann.* **1894**, *282*, 1-21.
- 290 S. E. Walker, J. A. Jordan-Hore, D. G. Johnson, S. A. Macgregor, A.-L. Lee *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13876-13879.
- 291 K. X. Wan, I. Vidavsky, M. L. Gross *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 85-88.
- 292 H. Y. Wang, Y. Sun, B. Tang *Talanta* **2002**, *57*, 899-907.
- 293 J. J. Warren, T. A. Tronic, J. M. Mayer *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6961-7001.
- 294 M. Watanabe, K. Shirai, T. Kumamoto *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1979**, *52*, 3318-3320.
- 295 Q. Wei, N. Fei, A. Islam, T. Lei, L. Hong, R. Peng, X. Fan, L. Chen, P. Gao, Z. Ge *Adv. Opt. Mater.* **2018**, *6*, 1800512.
- 296 K. Weinges, W. Ebert *Phytochemistry* **1968**, *7*, 153-155.
- 297 K. Weinges, W. Ebert, D. Huthwelker, H. Mattauch, J. Perner *Liebigs Ann.* **1969**, *726*, 114-124.
- 298 K. Weinges, D. Huthwelker *Liebigs Ann.* **1970**, *731*, 161-170.
- 299 P. A. Wender, N. C. Ihle, C. R. D. Correia *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5904-5906.
- 300 J. D. White, J. Kim, N. E. Drapela *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8665-8671.
- 301 R. J. Wikholm, H. W. Moore *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6152-6158.
- 302 M. Winner, A. Giménez, H. Schmidt, B. Sontag, B. Steffan, W. Steglich *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1883-1886.
- 303 E. P. Woo, F. C. W. Cheng *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3706-3707.
- 304 M. Woyciechowska, G. Forcher, S. Buda, J. Mlynarski *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11029-11031.
- 305 W. D. Wulff, S. R. Gilbertson, J. P. Springer *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 520-522.
- 306 L. Xu, L. Wang, Z. Xu, X. Zhang, Z. Zhang, Y. Qian *Int. Food Res. J.* **2021**, *139*, 109804.
- 307 Y. Xu, D. Hu, H. Zheng, D. Mei, Z. Gao *Tetrahedron* **2019**, *75*, 130539.
- 308 M. Yamamoto, H. Izukawa, M. Saiki, K. Yamada *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 560-561.
- 309 G. Yan, S. Li, J. Hu, X. Zhai, W. Ma, N. Li, K. Wang *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, *52*, 23-26.
- 310 H. Yanai, A. Takahashi, T. Taguchi *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8728-8730.
- 311 B.-Y. Yang, L.-Y. Kong, X.-B. Wang, Y.-M. Zhang, R.-J. Li, M.-H. Yang, J.-G. Luo *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 196-203.
- 312 H. Yang, S. Kim *Synlett* **2008**, *2008*, 555-560.
- 313 J. Yang, H. Huang, Z. Jin, W. Wu, J. Ye *Synthesis* **2011**, *2011*, 1984-1987.
- 314 M. Yang, F. Yin, H. Fujino, S. A. Snyder *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4515-4520.
- 315 N. Yasuda, Y. Sugimoto, M. Kato, S. Inanaga, K. Yoneyama *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1115-1119.
- 316 H. Yin, N. Jiang, C. Guo, J.-M. Gao *Nat. Prod. Res.* **2019**, 1-7.
- 317 H. Yoda, K. Shirakawa, K. Takabe *Chem. Lett.* **1989**, *18*, 1391-1392.
- 318 M. Yoshida, R. Imai, Y. Komatsu, Y. Morinaga, N. Kamigata, M. Iyoda *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 501-504.
- 319 D. A. Young, E. Young, D. G. Roux, E. V. Brandt, D. Ferreira *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 2345-2351.
- 320 M. B. Yunker, P. J. Scheuer *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 307-309.
- 321 O. V. Zakhlenjuk, V. A. Kunakh *Medicinal and Aromatic Plants X. Biotechnology in Agriculture and Forestry (Springer)* **1998**, *41*.
- 322 J. Zambrano, B. Min *Environ. Technol. Innov.* **2019**, *15*, 100382.
- 323 H. R. Zare, M. Eslami, M. Namazian, M. L. Coote *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 8080-8085.
- 324 H. Zhang, A. J. E. Novak, C. S. Jamieson, X.-S. Xue, S. Chen, D. Trauner, K. N. Houk *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6601-6608.
- 325 J. Zhang, S. Wang, Y. Bai, Q. Guo, J. Zhou, X. Lei *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 13643-13648.
-

Titre : Vers la synthèse biomimétique de pigments fongiques : la sclérocitrine et la chalcitrine ; Etude des métabolites de *Scleroderma citrinum*

Mots clés : Sclérocitrine, Chalcitrine, Acide Xérocomique, Synthèse Biomimétique, Substances Naturelles, CPC

Résumé : La sclérocitrine et la chalcitrine sont deux pigments fongiques isolés en 2004, appartenant à la famille des dimères d'acides pulviniques au même titre que la norbadione A. Les différentes hypothèses de biosynthèse proposées à l'heure actuelle s'appuient sur un processus de dimérisation en condition oxydante d'un autre métabolite fongique : l'acide xérocomique, sans que cette hypothèse ait été validée expérimentalement. Cette thèse se propose de réaliser la synthèse totale biomimétique de l'acide xérocomique et d'étudier son comportement en milieu oxydant pour réaliser la synthèse totale biomimétique de dimères pulviniques comme la sclérocitrine et la chalcitrine. Grâce à la voie de synthèse biomimétique de l'acide xérocomique développée au cours de ce travail de thèse, huit autres métabolites fongiques de la même série chimique ont été synthétisés.

L'assemblage en condition oxydante a été étudié sur trois molécules modèles : l'acide 3-(3,4-dihydroxyphenyl)tétronique, conduisant à un cycloadduit [3+2], la quercétine, conduisant au produit d'oxa-Diels-Alder et la (+)-catéchine, conduisant à la déhydrodicatéchine A.

La dernière partie de ce travail de thèse a consisté en l'étude des métabolites produits par *Scleroderma citrinum*. Les extraits bruts ont été analysés par HPLC-MS/MS et l'outil des réseaux moléculaires et purifiés par HPLC, puis purifiés par chromatographie de partage centrifuge (CPC). La sclérocitrine a été isolée, ainsi que deux analogues structuraux : la méthyl-sclérocitrine A et la méthyl-sclérocitrine B. Deux dipeptides originaux, présentant un pont urée, ont également été isolés. Leur configuration a pu être déterminée par synthèse.

Title : Towards biomimetic synthesis of fungal pigments : sclerocitrin and chalcitrin ; Study of metabolites of *Scleroderma citrinum*

Keywords : Sclerocitrin, Chalcitrin, Xerocomic Acid, Biomimetic Synthesis, Natural Products, CPC

Abstract : Sclerocitrin and chalcitrin are two fungal pigments isolated in 2004. They are pulvinic dimers and belong to the same chemical family as norbadione A. Different biosynthetic pathways have been postulated in literature, based on a dimerization process of xerocomic acid (another fungal metabolite) in oxidative conditions but to date, without experimental validation. This Ph. D thesis dealt with the biomimetic total synthesis of xerocomic acid and the study of its behavior in oxidative conditions, in order to achieve the biomimetic synthesis of pulvinic dimers, like sclerocitrin and chalcitrin. Eight fungal metabolites analog to xerocomic acid were synthesized through the synthetic pathway developed for xerocomic acid.

The oxidative dimerisation was studied on three model: 3-(3,4-dihydroxyphenyl)tetronic acid (which led to a [3+2] cycloadduct), quercetin (which led to an oxa-Diels-Alder dimer) and (+)-catechin (which led to dehydrodicatechin A).

The last salient aspect of this thesis consisted in the extraction and characterisation of metabolites from *Scleroderma citrinum*. The crude extracts were analysed by HPLC-MS/MS and molecular networking. Crude products were isolated by HPLC and by centrifugal partition chromatography (CPC). Sclerocitrin and two analogs (methyl-sclerocitrin A and methyl-sclerocitrin B) were isolated. Two new dipeptides, including an ureido linkage were also isolated. Their configuration were determined by synthesis.