Symphonia globulifera : études métabolomiques, extraction et hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A à visée antiparasitaire

Kévin Cottet

▶ **To cite this version:**

Kévin Cottet. Symphonia globulifera : études métabolomiques, extraction et hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A à visée antiparasitaire. Chimie organique. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB149 . tel-03829006

HAL Id: tel-03829006
https://theses.hal.science/tel-03829006

Submitted on 25 Oct 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.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE PARIS
ECOLE DOCTORALE MTCE

Année 2015 N°

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

COTTET Kévin

SYMPHONIA GLOBULIFERA : ÉTUDES MÉTABOLOMIQUES, EXTRACTION ET HÉMISYNTHÈSE D'ANALOGUES DE LA GUTTIFÉRONE A À VISÉE ANTIPARASITAIRE.

Thèse dirigée par le Pr. Marie-Christine LALLEMAND

soutenue publiquement le 13 Novembre 2015

Membres du jury :

Directrice de thèse :	Pr. Marie-Christine Lallemand
Rapporteurs :	Pr. Pascal Sonnet
	Pr. Ahcène Boumendjel
Examinateurs :	Dr. Anne-Emmanuelle Hay de Bettignies
	Dr. Marc Litaudon
	Pr. Erwan Poupon
	Pr. Sylvie Michel

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier lieu, remercier les membres du jury de cette thèse qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux. Veuillez trouvez ici, l'expression de toute ma plus grande gratitude :

Pr. Pascal Sonnet
Pr. Achène Boumendjel
Dr. Anne-Emmanuelle Hay de Bettignies
Dr. Marc Litaudon
Pr. Erwan Poupon
Pr. Sylvie Michel
Pr. Marie-Christine Lallemand

Je tiens à remercier, en tout premier lieu, le Pr. Marie-Christine Lallemand, sans qui, je n'aurais probablement pas fait tout cela. Merci M-C. pour m'avoir accordé votre confiance durant ces trois années de thèse.

Je remercie également nos collaborateurs, Jean Duplex Wansi, Christophe Duplais, Guillaume Odonne, pour nous avoir envoyé de la matière première végétale.

Je remercie plus spécifiquement :
Le Dr Grégory Genta-Jouve pour m'avoir initié à la métabolomique,
Le Dr Marina Kritsanida pour avoir dirigée les stagiaires de phytochimie,
Le Dr Anne Neudorffeur pour nos travaux en éléctrochimie,
Le Dr Didier Buisson pour m'avoir initié aux bio-transformations,
Le Dr Romain Duval pour avoir supervisé les travaux concernant l'imagerie,
Merci a tous, j'ai beacoup appris à votre contact.

Je remercie le Pr Leandros Skaltsounis et toute son équipe pour m'avoir acceuillis au sein de son laboratoire durant ma BDMI.

Je remercie tous les stagiaires qui ont travaillé sur ce sujet, Sara , Sylvia, Anith, Yara et Maddad. Vous avez fait du super boulot, merci.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de pharmacognosie pour votre bonne humeure et vos échanges scientifiques : Pr Sylvie Michel, Pr Brigitte Deguin, Dr Xavier Cachet, Dr Hanh Dufat, Dr Raphael Grougnet, Dr Marina Kritsanida, Dr Sabrina Boutefnouchet et Thomas Gaslonde.
Je remerciement plus particulierement le Dr François-Hugues Porée pour sa patience à la course à pied et ces conseils avisés dans tous les dommaines.

Egalement dans le laboratoire je remercie le personnel de l'ombre, Maryse, Olivier et Fabienne qui font tant de choses pour nous.

Je remercie également tous les étudiants et post-docs du laboratoire, avec qui j'ai tissé de très bons liens (Mays, Christelle, Mégane, Egor, Abou, Dang, Sergio, Wiliam, Anthony, Dean...)
Merci particulièrement à Yann Fromentin qui m'a transmis toutes ces connaissances.

Je remercie ma famille et mes amis pour leurs soutients indéfectibles. Je remercie tout particulièrement Lucille pour tout ce qu'elle a pu faire pour moi.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

µM	micro molaire
5-FU	5-FluoroUracil
AChE	AcétylCholinEstérase
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
AIBN	azobisisobutyronitrile
APTS	Acide *para*-toluène sulfonique
ASMR	Amélioration de service médicale rendu
ATP	adenosine triphosphate
BBr3	Tribromure de bore
BChE	ButyrylCholinEstérase
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD_3OD	Méthanol deutéré
$CDCl_3$	Chloroforme deutéré
CMI	Concentration minimum inhibirice
Cs_2CO_3	Carbonate de césium
CsOH	Hydroxyde de césium
d	Deutéré
DCM	Dichlorométhane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DFT	Density Functional Theory
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMAPP	diméthylallyle di phosphate
DMF	*diméthylformamide*
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
eq	Equivalent
$FeCl_3$	chlorure ferrique
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
H_2SO_4	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HSV	Herpès simplex virus
IC_{50}	Concentration inhibitrice 50%
im	Intra musculaire
iv	Intra veineuse
K_2CO_3	Carbonate de potassium
$K_3Fe(CN)_6$	Ferricyanure de potassium
KB	carcinome buccal
KOH	Hydroxyde de potassium
Li_2CO_3	Carbonate de lithium
LiOH	Hydroxyde de lithium
MeI	Iodure de méthyle
MeOH	méthanol
MEP	méthylérythritol phosphate
MnO_2	Dioxyde de manganèse
MPLC	Chromatographie liquide moyenne préssion
MVA	acide mévalonique
Na_2CO_3	Carbonate de sodium
$NaBH_4$	hydrure de bore
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
$NaHCO_3$	Hydrogénocarbonate de sodium
$NaIO_4$	Periodate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
OMS	Organisation Mondial de la santé
OsO4	Tétraoxyde d'osmium
PDA	gélose dextrosée à la pomme de terre
PKS	Polykétide synthase

PPAPs	Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols ou Acyle phloroglucinol polycyclique polyprénylé
PPM	Partie par million
PSM	Poste de sécurité microbiologique
PXR	nuclear xenobiotic receptor
rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SD	Déviation standard
SeO2	Dioxyde de sélénium
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
YMS	Milieu Yeast Malt extract Soybean

TABLES DES MATIÈRES

Avant-propos **10**

i.INTRODUCTION GENERALE **13**

i.1.Les maladies parasitaires **14**

i.1.a.Le paludisme 14

i.1.b.La leishmaniose 19

i.1.c. La trypanosomiase 21

i.2.Médecine traditionelle et *Symphonia globulifera* **24**

i.3. *Symphonia globulifera*, aspects botaniques et caractéristiques **27**

i.4. *Symphonia globulifera,* aspects phytochimiques **29**

i.5.Les PPAPs **36**

i.1.a.Voie de biosynthèse du noyau phloroglucinol portant un acyl non aromatique 37

i.1.b. Voie de biosynthèse du noyau phloroglucinol portant un acyl aromatique 38

i.1.c. Voie de biosynthèse du bicyle 39

i.6.La guttifférone A **43**

i.1.a. La guttiférone A, généralités 43

i.1.b.La guttiférone A, précisions structurales 43

i.1.c. La guttiférone A, perspectives 49

1. CHAPITRE 1 : APPROCHES MÉTABOLOMIQUES **51**

Partie 1 : Études métabolomiques comparatives des *Symphonia globulifera* **53**

1.1.1. Lieux de récoltes 53

1.1.2. Parties de plantes étudiées 53

1.1.3. Outils métabolomiques 54

1.1.4. Préparation des extraits 56

1.1.5. Aquisition des données de LC-MS 56

1.1.6. Aquisition des données de RMN 56

1.1.7. Traitement des données de LC-MS 57

1.1.8. Traitement des données de RMN 60

1.1.9. Interprétation des données 60

1.1.10. Discussion et conclusion 75

Partie 2 : Profilages métabolomiques des organes de *Symphonia globulifera* **77**

1.2.1. Matériel végétal 77

1.2.2. Préparation des extraits 78

1.2.3. Aquisition des données de LC-MS.....78
1.2.3. Traitement des données de LC-MS.....78
1.2.4. Interprétation des résultats.....78
1.2.5. Discussion et conclusion.....84
2. CHAPITRE 2 : INVESTGATIONS PHYTOCHIMIQUES.....85
Partie 1 : Recherche et isolement des métabolites actifs du *Symphonia globulifera*.....86
2.1.1. Introduction.....86
2.1.2. Activités biologiques des extraits de *Symphonia globulifera*.....86
2.1.3. Isolement des métabolites majoritaires 87
2.1.4. Activités biologiques des molécules isolées 91
2.1.5. Voies bio-synthétiques des oxy-PPAPs 93
Partie 2 : Développement d'une méthode d'isolement de la guttiférone A par CPC 95
2.2.1. Introduction.....96
2.2.2. Principe de la CPC.....96
2.2.3. Préparation des extraits 97
2.2.4. Profils chromatographiques et quantification de la guttiférone A 98
2.2.3. Mis au point d'une méthode d'isolement des PPAPs par CPC.....101
3. CHAPITRE 3 : CYCLISATIONS INTRAMOLÉCULAIRES DE LA GUTTIFÉRONE A 105
Partie 1 : Cyclisations intramoléculaires par des micro-organismes endophytes 110
3.1.1. Introduction.....110
3.1.2. Isolement des micro-organismes.....110
3.1.3. Caractéristiques des curvularia.....111
3.1.4. Bio-transformations des PPAPs par la souche SG-1.....112
Partie 2 : Cyclisations intramoléculaires par électrochimie.....115
3.2.1. Introduction.....115
3.2.2. Études de voltamétrie cycliques.....115
3.2.3. Electrolyses à potentiels contrôlés 118
3.2.4. Méthodes d'analyses pour la détermination d'un mécanisme.....120
Partie 3 : Cyclisations intramoléculaires par chimie organique 125
3.3.1. Introduction.....125
3.3.2. Oxydation dans les conditions de Lewis *et al*. 128
3.3.3. Oxydation en présence de bases faibles.....128
3.3.4. Oxydation en présence de bases fortes.....130
3.3.5. Autres agents oxydants. 130

4. CHAPITRE 4 : SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE DEUXIÈME ET TROISIÈME GÉNÉRATION 139

Partie 1 : Synthèse et évalution biologique des analogues de seconde génération.....143

4.1.1. Synthèse des analogues de seconde génération 143

4.1.2. Activités biologiques des composés 144

4.1.3. Activités sur *P. falciparum* 146

4.1.4. Activités sur *T. brucei*.....147

4.1.5. Activités sur *L. donovani* 148

4.1.6. Conclusion 150

Partie 2 : Synthèse des analogues de troisième génération 151

4.2.1. Introduction.....151

4.2.2. Réactions de métathèses croisées.....152

4.2.3. Réactions d'époxydations.....156

4.2.4. Réactions de di-hydroxylations.....157

4.2.5. Réactions de coupures oxydantes 158

4.2.6. Réactions d'oxydations allyliques terminales 163

5. CHAPITRE 5 : SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE DEUXIÈME ET TROISIÈME GÉNÉRATION 171

Partie 1 : Etudes *via* une sonde d'imagerie directe.....174

Partie 2 : Etudes *via* une sonde de protéomique.....180

6. CONCLUSION GÉNÉRALE.....190

7. PARTIE EXPERIMENTALE.....195

7.1. Appareillages et généralités 196

7.2. Tests biologiques.....198

7.3. Description des molécules.....200

7.4. Annexe 1 : tableaux des variables 272

7.3. Annexe 2 : fragmentation des molécules 292

7.4. Annexe 3 : Chromatogrammes des extraits de *Symphonia globulifera* 301

7.5. Annexe 4 : Quantification relatives des composés dans les extraits.....302

7.5. Annexe 4 : Quantification de la guttiférone A 306

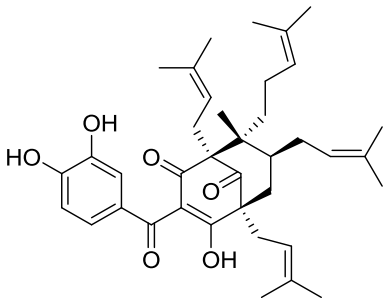
8. BIBLIOGRAPHIE 309

Avant-propos

Le manuscrit suivant, intitulé « Symphonia *globulifera* : analyses métabolomiques, extraction et hémisynthèse de la guttiférone A à visée antiparasitaire» se veut un récapitulatif de mes travaux de thèse effectués au sein du laboratoire de pharmacognosie (UMR 8638 COMETE, Université Paris Descartes).

Le laboratoire de Pharmacognosie est expert dans l'étude des produits naturels d'intérêt thérapeutique ; ma thèse effectuée grâce à une bourse du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, s'est intégrée dans ce cadre en s'efforçant d'utiliser au mieux toutes les techniques et méthodes du laboratoire. Bien que le sujet de départ se limitait à « l'hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A à visée antipaludéenne », nous avons choisi d'élargir cette étude à d'autres thématiques (métabolomique, phytochimie et imagerie), notamment autour du *Symphonia globulifera (S.g),* sa source végétale principale. Ceci nous a permis d'améliorer nos connaissances sur cette espèce, assurant ainsi une plus grande visibilité des résultats obtenus par les chercheurs qui continueront dans ce domaine.

Les maladies parasitaires telles que le paludisme, la leishmaniose et la trypanosomiase sont des fléaux pour les populations habitant sous les tropiques. Ils sont responsables chaque année de plus de 750 000 décès selon l'OMS. Il est important de noter que les populations indigènes de différents continents se servent du *Symphonia globulifera* comme remède traditionnel à ces maladies. Nous avons donc cherché à connaitre les raisons de cette utilisation. Une étude bibliographique sur le sujet révèle que les Acyles Phloroglucinols Polycycliques Polyprénylés (PPAPs) comme la guttiférone A, semblent en partie responsables de ces activités biologiques.



1

Figure 1 : Guttiférone A (**1**)

Des travaux antérieurs du laboratoire, notamment effectuées lors du doctorat du Dr. Yann Fromentin ont pu montrer, que la guttiférone A possédait une bonne activité biologique sur ces cibles parasitaires et pouvait s'extraire des graines de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.45 %. Le laboratoire a également publié une étude concernant la synthèse et l'évaluation d'une première génération d'analogues de cette molécule contre plusieurs parasites. L'indice de sélectivité de ces composés a été augmenté d'un logarithme par rapport à la guttiférone A. L'objectif de nos travaux a donc été de réaliser de nouveaux

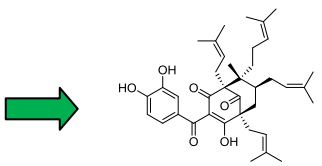
analogues, dans le but de continuer à améliorer l'activité biologique. Ainsi, plusieurs problématiques se sont posées concernant :

1. Le choix du matériel végétal
2. Les méthodes d'extraction
3. Les méthodes de modification chimique de ces composés afin d'améliorer leurs activités biologiques

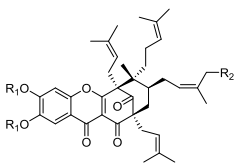
Dans ce manuscrit, est abordé en premier lieu les recherches menées par des approches métabolomiques sur ce *S.g*, afin de nous orienter vers les organes contenant la plus grande proportion de PPAPs. En conséquence, plusieurs organes ont été travaillés grâce à une approche par bioguidage et de phytochimie plus classique, ont ainsi permis d'identifier les métabolites majoritaires ainsi que leurs activités biologiques sur *P. falciparum* et *L. donovani.* Une méthode basée sur la Chromatographie de Partage Centifuge (CPC) a été ensuite développée afin d'isoler rapidement et d'une façon plus écologique, les PPAPs majoritaires. Il a été montré lors de cette étude que la guttiférone A était présente en grande quantité dans ces organes, aussi elle a été utilisée lors d'études de Relations Structures Activités (RSA).
Ces études de RSA sur la guttiférone A ont débuté par le développement de méthodes permettant l'accès à des dérivés xanthoniques. En effet, ces derniers possèdent une meilleure activité antiparasitaire, que nous avions démontrée lors d'études précédentes. Nous avons donc choisi de nous intéresser à des méthodes dites « green » comme l'utilisation de biotransformations ou l'électrochimie. Grâce à ces travaux de synthèse, différents composés xanthoniques ont été élaborés. C'est à partir de ces molécules qu'une deuxième génération d'analogues a pu être réalisée. Les modulations structurales de cette dernière, ont été effectuées sur le noyau catéchol et ont permis de considérablement améliorer l'activité antiparasitaire sur *P. falciparum* et *T. brucei*. Une troisième génération d'analogues au niveau des chaînes prénylées a été envisagée.

Parallèlement à ce travail de synthèse, deux sondes fluorescentes, une destinée à l'imagerie directe et l'autre à la protéomique ont été élaborées. Cette étude devrait permettre d'identifier les cibles protéiques de la guttiférone A dans *P. falciparum*.

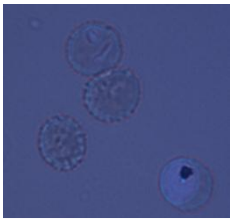
Approches métabolomiques et phytochimie



Mise au point de méthodes d'extraction



Hémisynthèse d'analogues



Tests biologiques et imagerie sur parasites.

Schéma 1 : Ligne directrice des travaux concernant la guttiférone A

INTRODUCTION GÉNÉRALE

i.1.Les Maladies parasitaires

Les maladies parasitaires ou parasitoses, sont encore responsables de millions de morts chaque année notamment dans les pays les plus pauvres. Bien qu'un certain nombre de médicaments soient déjà développés pour lutter contre ces maladies, les industries pharmaceutiques négligent le développement de nouvelles thérapies pour des raisons économiques. Le faible nombre de molécules sur le marché donne lieu à l'apparition de résistances qui, parfois ne peuvent être traitées avec les moyens thérapeutiques existants. Parfois, les traitements utilisés contre ces parasitoses présentent des effets secondaires très importants. Le développement de nouvelles molécules possédant un mode d'action original pourrait donc en partie pallier ces problèmes.

i.1.a. Le paludisme

Parmi ces parasitoses, le paludisme (ou malaria) est l'une des plus redoutables avec plus 500 000 décès en 2014 selon l'OMS[1]. Selon ce même rapport, près de la moitié de la population mondiale serait exposée au paludisme comme illustré **figure 2**.

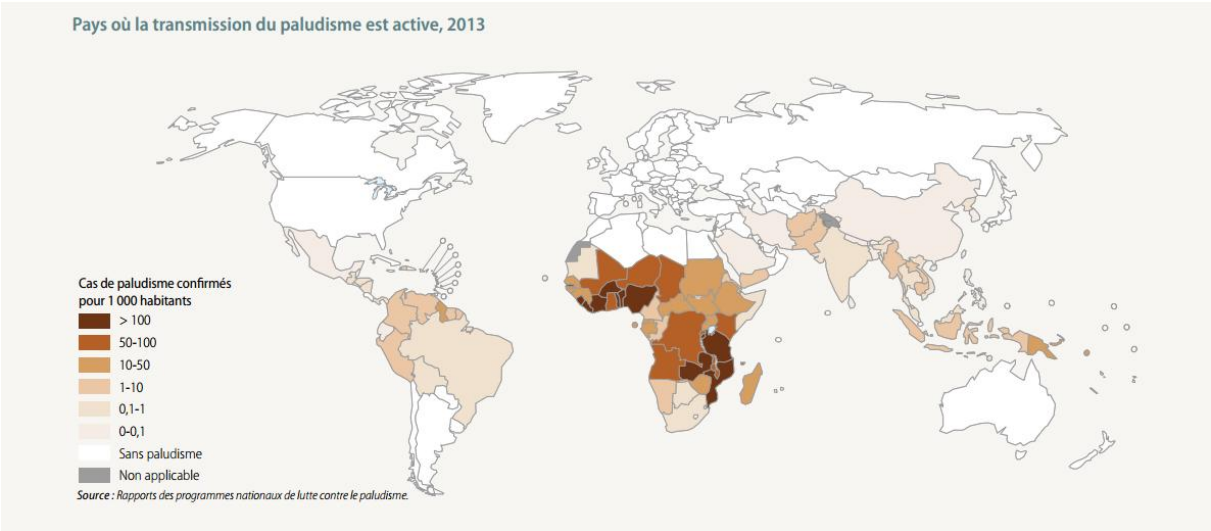


Figure 2 : Répartition de l'exposition au paludisme selon les différentes régions du monde[1]

De nombreux pays aux climats tropicaux sont touchés dont tout particulièrement l'Afrique sub-saharienne, qui représente plus de 90% des décès liés au paludisme. La mortalité de cette maladie est étroitement liée à la pauvreté des populations et touche principalement des enfants de moins de 5 ans[1].

Le paludisme est une maladie induite par un parasite du genre *Plasmodium.* Il existe plusieurs espèces comme *P.vivax, P.ovale* ou *P.malariae*, mais c'est *P. falciparum* qui se révèle être le plus mortel pour l'être humain. Ce parasite pénètre chez l'humain par l'intermédiaire de l'Anophèle femelle.

[1] Rapport Annuelle de l'OMS sur la Malaria, Genève, **2014**.

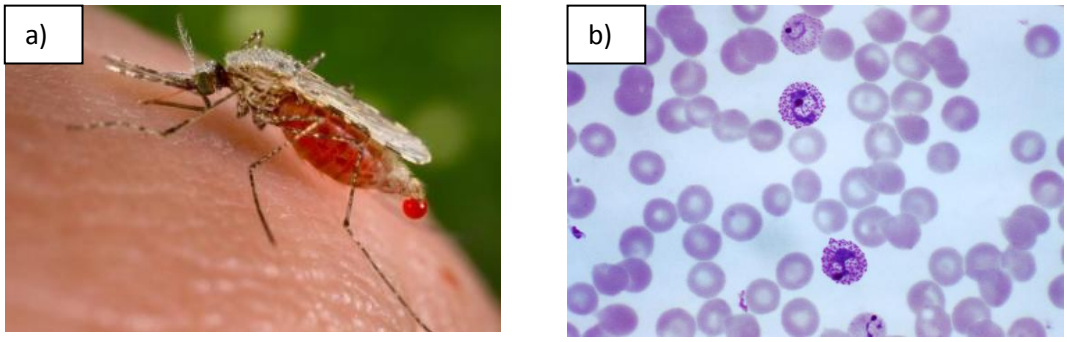


Photo 1 : Transmission du paludisme : a)Repas sanguin de l'anophèle femelle et b) hématies infectées par *Plasmodium falciparum* (© Wikipedia)

Comme illustré **figure 3**, le parasite possède deux phases de reproduction complexes[2] : une phase sexuée se déroulant chez le moustique ainsi qu'une phase asexuée chez l'homme. Lors du repas sanguin, l'anophèle femelle transmet le parasite sous forme de sporozoïte. Les cellules hépatocytaires sont rapidement infectées par le parasite sous sa forme schizogonie exo érythrocytaire (SEE). Durant le cycle hépatocytaire du parasite, les cellules hépatiques infectées vont éclater libérant ainsi les mérozoïtes capables d'infecter de nouvelles cellules amplifiant le cycle (celui-ci pouvant durer des mois). Lorsque les mérozoïtes passent dans la circulation sanguine, le stade schizogonie intra-érythrocytaire (SIE) commence avec l'infection des hématies. Il se développe alors des trophozoïtes jeunes (forme en anneau caractéristique) qui vont évoluer jusqu'au stade schizontes mûrs jusqu'à induire l'éclatement des hématies. Les schizontes libérés peuvent infecter de nouvelles hématies ou se différencier en gamétocytes mâles ou femelles. Lorsqu'un nouveau repas sanguin se présentera, les gamétocytes seront ingérés par l'anophèle. La reproduction sexuée du parasite se déroulera alors dans le tube digestif du moustique donnant lieu à de nouveaux individus sous la forme ocynète. Sous cette forme le parasite franchi la paroi du tube digestif se transformant en oocystes qui libéreront les sporozoïtes, qui depuis les glandes salivaires du moustique pourront être transmis de nouveau à l'homme lors d'un futur repas sanguin.

Le parasite peut également être transmis aux fœtus par l'intermédiaire de la femme enceinte induisant de fortes anémies chez les enfants.

[2] http://www.cdc.gov/malaria, 05-05-**2015**

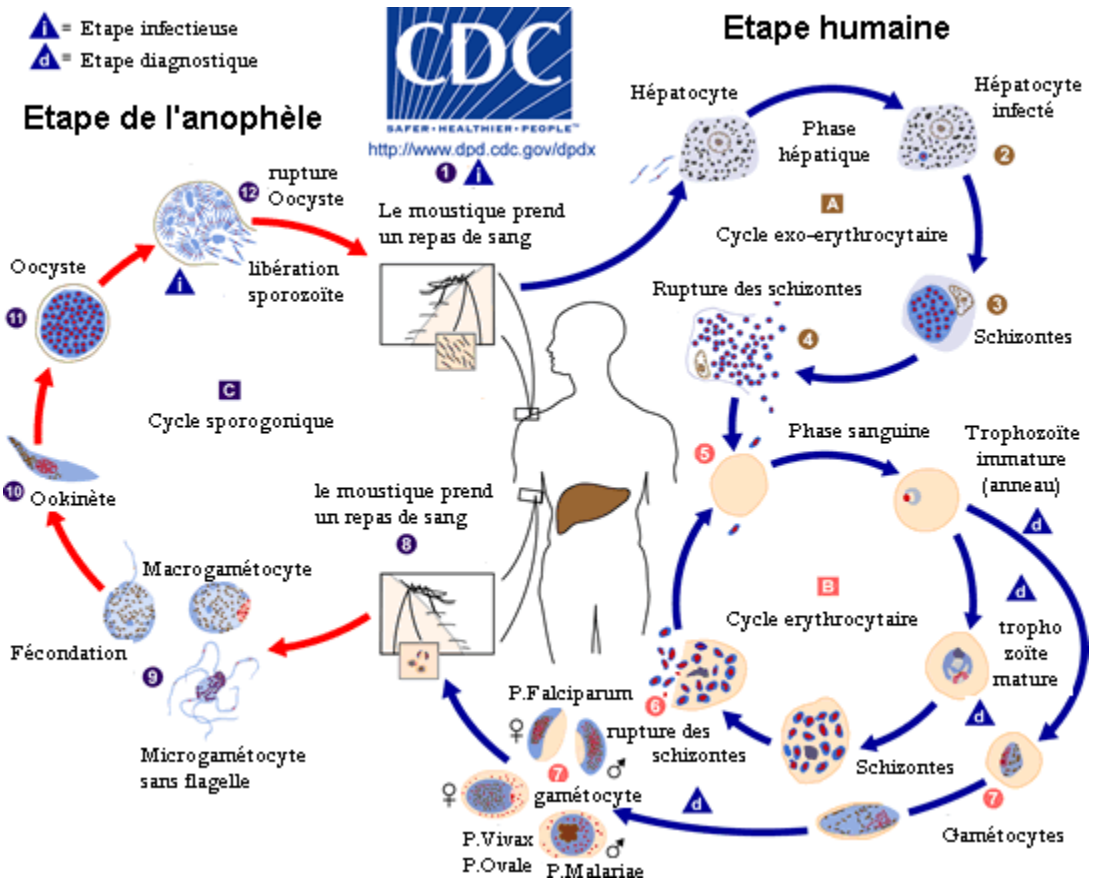


Figure 3 : Cycle parasitaire du *Plasmodium*[2]

Les conséquences de l'infection et de la destruction des cellules hépatiques et des hématies, donnent lieu à des :

- fortes anémies causées par la destruction des globules rouges,
- insuffisances rénales,
- œdèmes pulmonaires,
- extrêmes fatigues, délires, pertes de connaissances, convulsions et comas.

Les principaux axes proposés par l'OMS[1] pour lutter contre cette maladie sont, la lutte vectorielle (l'utilisation d'insecticides, le contrôle des populations de moustique) ainsi que la chimiothérapie (notamment ACT : Artemisine Combined Therapy).

Le contrôle des populations de moustiques *via* les insecticides devient de plus en plus difficile dû à l'apparition rapide et mondiale de résistances multiples aux insecticides chez l'anophèle (**Figure 4)**.

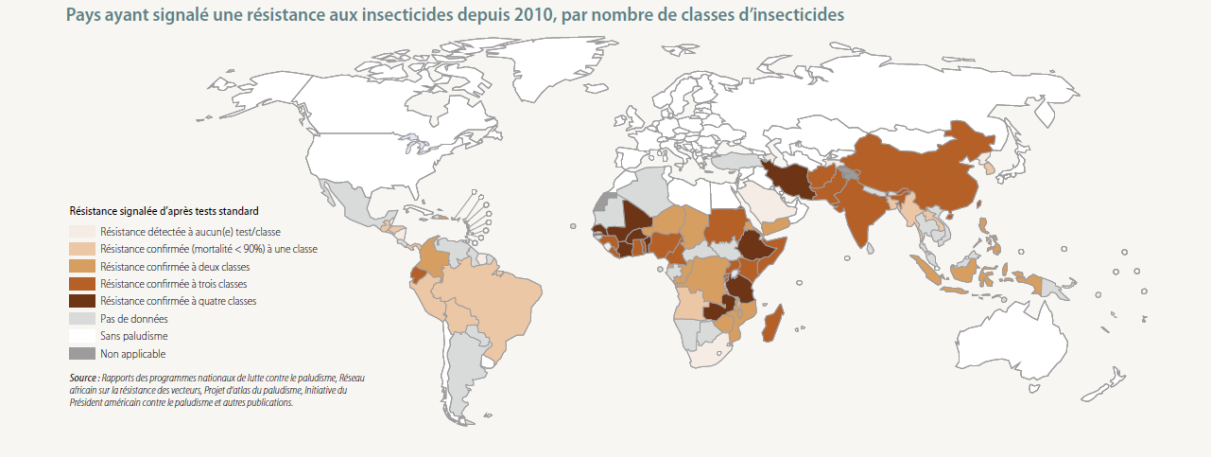
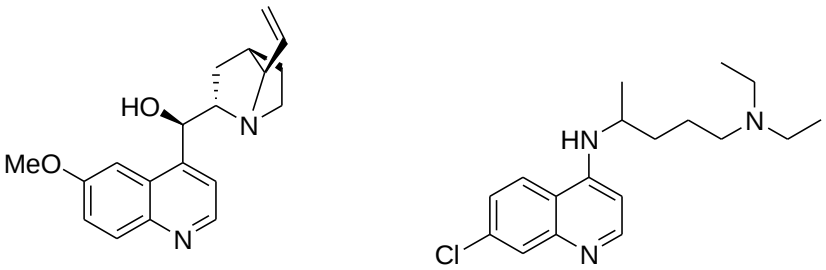


Figure 4 : Zones d'apparition des résistances aux insecticides de l'anophèle[1]

Les principaux outils thérapeutiques historiques pour lutter contre le paludisme sont la quinine **2**, isolée des écorces de quinquina (*Cinchona pubescens)* ainsi que la chloroquine **3**, analogue synthétique de la quinine (**Figure 5**).



Quinine **2** Chloroquine **3**

Figure 5 : Structures de la quinine et chloroquine

Le mode d'action de ces composés est principalement basé sur la déstabilisation des cristaux d'hémozoïne[3] : produits toxiques de dégradation de l'hème de l'hémoglobine par le parasite. L'utilisation trop massive de ces composés en mono-thérapie a donnée lieu à l'apparition de résistances (mutation de la pompe d'efflux PfCRT[4]) dans de nombreuses régions du monde (**Figure 6)**.

[3] D. J. Sullivan Jr, On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial actionProc. Natl. Acad. Sci. USA , **1996,** 93, 11865-11870.

[4] David C. Warhurst, A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant Falciparum Malaria, *N Engl J Med,* **2001**; 25, 344, 299-302.

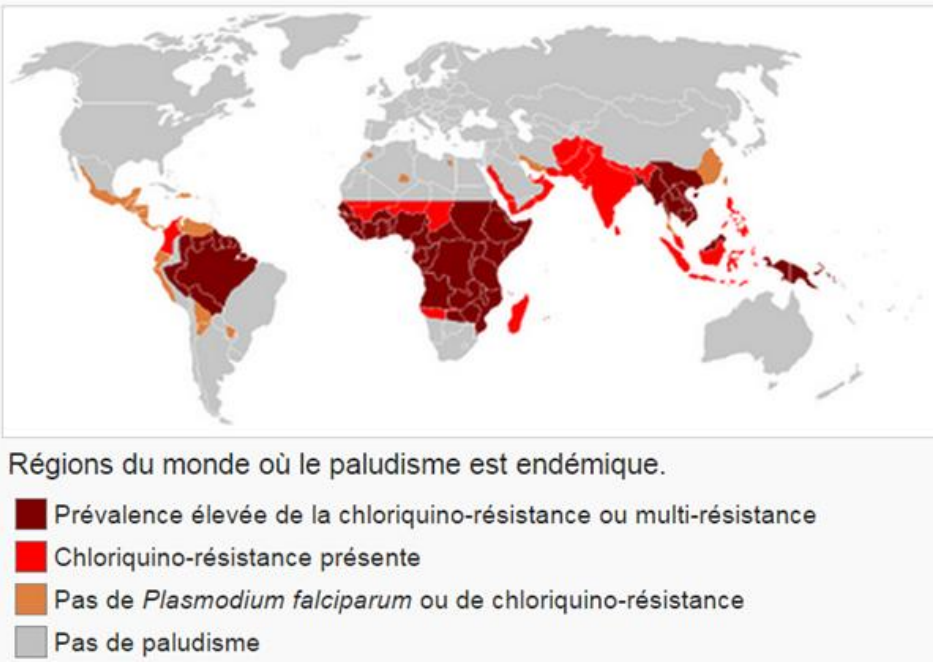


Figure 6 : Prévalence des chimio-résistances du *P. falciparum*[5]

Depuis 2001, les ACT (Artemisin Combined Therapy) sont utilisées plus largement en première intention dans les cas de paludisme. Le mode d'action de ces molécules étant différent (rupture du pont endo-péroxyde en présence du fer de l'hème dégageant des radicaux libres toxiques), cela permis de pallier la première vague de résistance à la quinine/chloroquine. L'artémisinine **4** ainsi que ces dérivés hémisynthétiques (dihydroartémisinine **5**, artésunate **6**, artéméther **7** et artééther **8**) sont associés à d'autres agents thérapeutiques afin de limiter l'apparition des résistances. À titre d'exemple, nous pouvons citer certaines spécialités comme Coartem® et Riamet®, qui combinent l'arthéméter **7** avec la luméfantrine. Par contre, l'Artequin®combine quant à lui l'Artésunate **6** et la méfloquine (**Figure 7**).

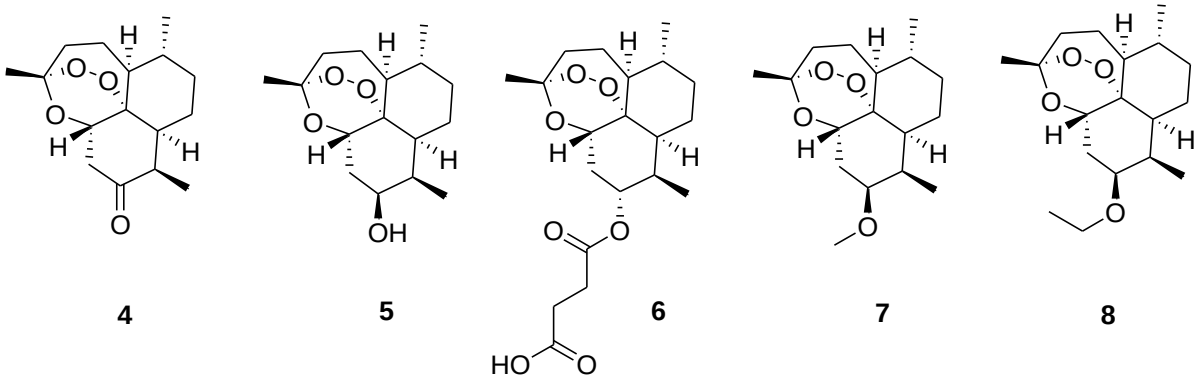


Figure 7 : L'artémisine et ces dérivés hémisynthétiques utilisés en ACT

Malgré ces nouvelles recommandations limitant l'apparition de multi-resistances, dans certaines régions du monde comme l'Asie ou la Guyane française, 10 % des cas de paludisme sont en échec thérapeutique[1]. Le développement de nouvelles molécules contre le paludisme est donc un enjeu majeur de santé publique.

i.1.b. La leishmaniose.

Comme la malaria, la leishmaniose est une maladie parasitaire. Elle est induite par l'infection de protozoaires du genre Leishmania[5] transmise par la femelle phlébotome (Diptère). Il existe une vingtaine d'espèces du genre Leishmania en fonction des zones géographiques.

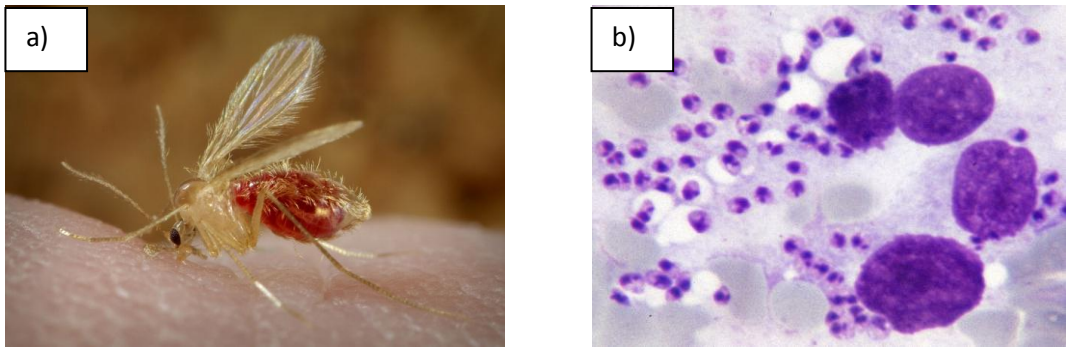


Photo 2 : Transmission de la Leishmaniose : a) Repas sanguin du phlébotome femelle, b) macrophages infectés par les parasites. (© Wikipedia)

350 millions d'habitants de pays d'Amérique du Sud et d'Asie mineurs vivent dans des zones à risques vis-à-vis de la leishmaniose (**Figure 8**). Le cycle de la leishmania est un peu plus simple que celui du plasmodium (**Figure 9**)[6].

Les parasites sous forme promastigote s'introduisent dans la circulation sanguine lors du repas sanguin du phlébotome et infestent les macrophages. Il se forme dans ces macrophages une vacuole parasitophore, où les parasites peuvent se différencier en amastigotes et se multiplier jusqu'à éclatement du macrophage. Les parasites contaminent d'autres macrophages et amplifient ainsi le cycle. Lors d'un futur repas la femelle phlébotome, ré-ingérera les macrophages infectés où les parasites continueront leur cycle de vie pour se transformer en promastigotes dans l'intestin, avant de s'accumuler dans les trompes du phlébotome pour être re-injectés dans un nouvel hôte.

Les formes cutanées (*Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis*, …) se caractérisent par des ulcérations cutanées qui en guérissant laissent des cicatrices particulièrement inesthétiques. Malgré la gravité des lésions, les incapacités engendrées par la leishmaniose cutanée n'est pas mortelle. Les formes viscérales provoquées par *Leismania donovani* et *Leishamania d. infantum* provoque une augmentation de la taille de la rate

[5] Rapport de la réunion de l'OMS contre la leishmaniose, **2010**

[6] http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis 05-05-**2015**

(splénomégalie), une anémie avec forte fièvre allant jusqu'au décès des malades. La leishmaniose viscérale est responsable d'environ 20 000 décès par an[7].

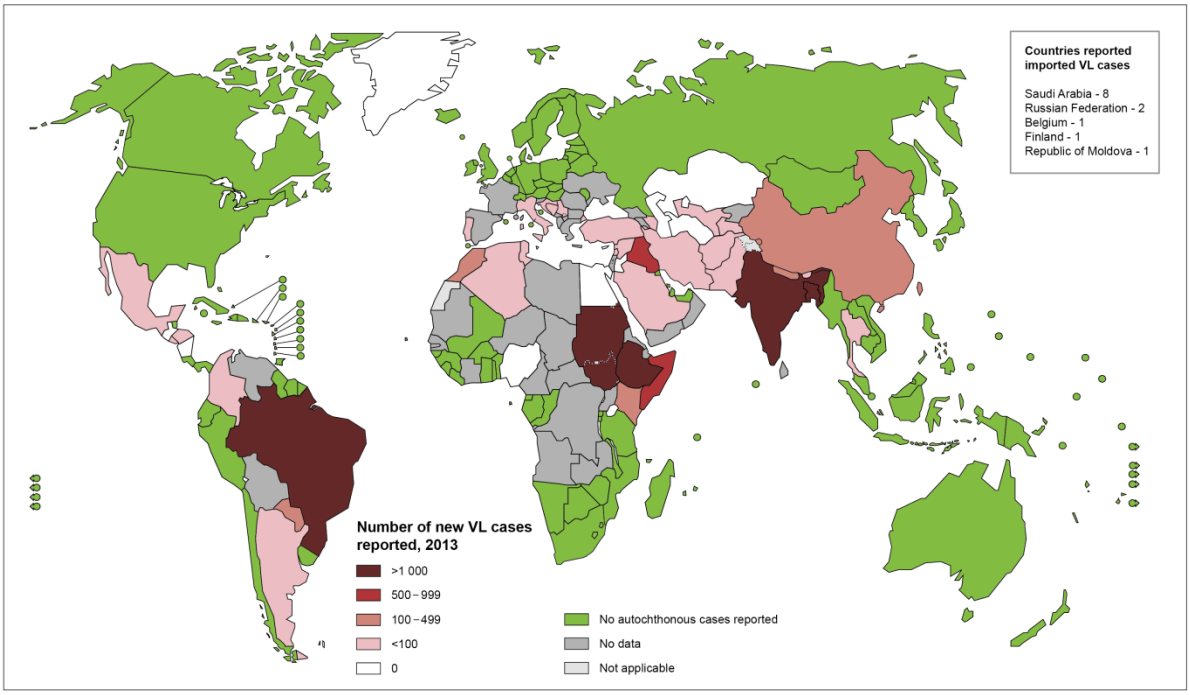


Figure 8 : Répartition des cas de leishmaniose cutanée en 2013[7]

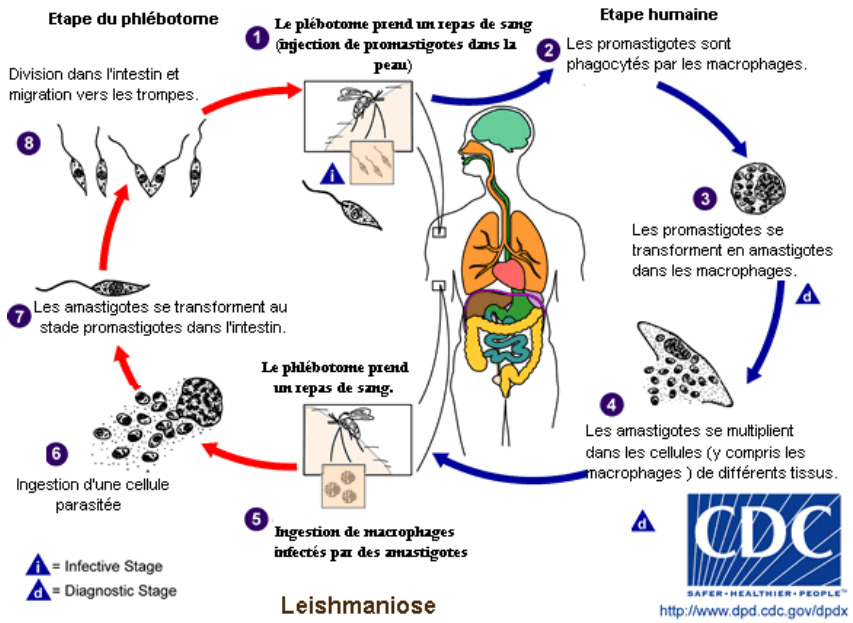


Figure 9 : Cycle de vie de *leishmania*[6]

[7] Rapport de la réunion de l'OMS contre la leishmaniose, **2015**

Les traitements actuels de la leismaniose (amphotéricine B **9**, pentamidine **10** ainsi que les organostanniques **11** et **12** (**Figure 10**) présents dans les spécialités *Glucantim* ® et *Pentostam* ® respectivement, restent très toxiques et provoquent donc de nombreux effets secondaires. Il serait donc important de développer de nouveaux principes actifs.

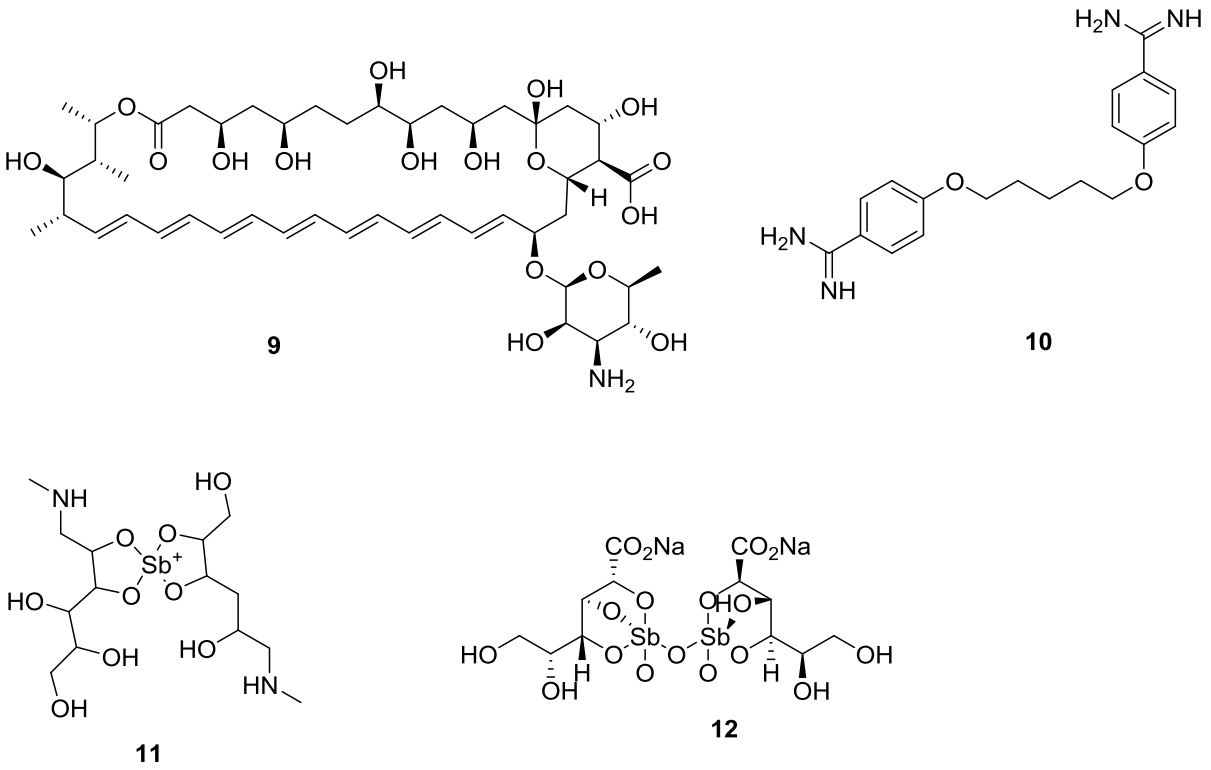


Figure 10 : Principaux principes actifs contre la leishmaniose.

i.1.c. La trypanosomiase Africaine.

La trypanosomiase africaine, aussi appelé maladie du sommeil est induite par un protozoaire du genre *Trypanosoma brucei* [8]. Le parasite s'introduit chez l'homme par la glossine (diptère) également appelé « mouche tsé-tsé ».

[8] Rapport de la réunion de l'OMS contre la trypanosomiase, Mars **2014**

Photo 3 : Transmission de la trypanosomiase : a) mouche tsé-tsé, b) parasite dans la circulation sanguine (© Wikipedia)

La trypanosomiase africaine est comme son nom l'indique endémique d'afrique, touchant majoritairement les populations d'Afrique centrale où, environ 75 millions de personnes sont actuellement exposées à la maladie (**Figure 11**).

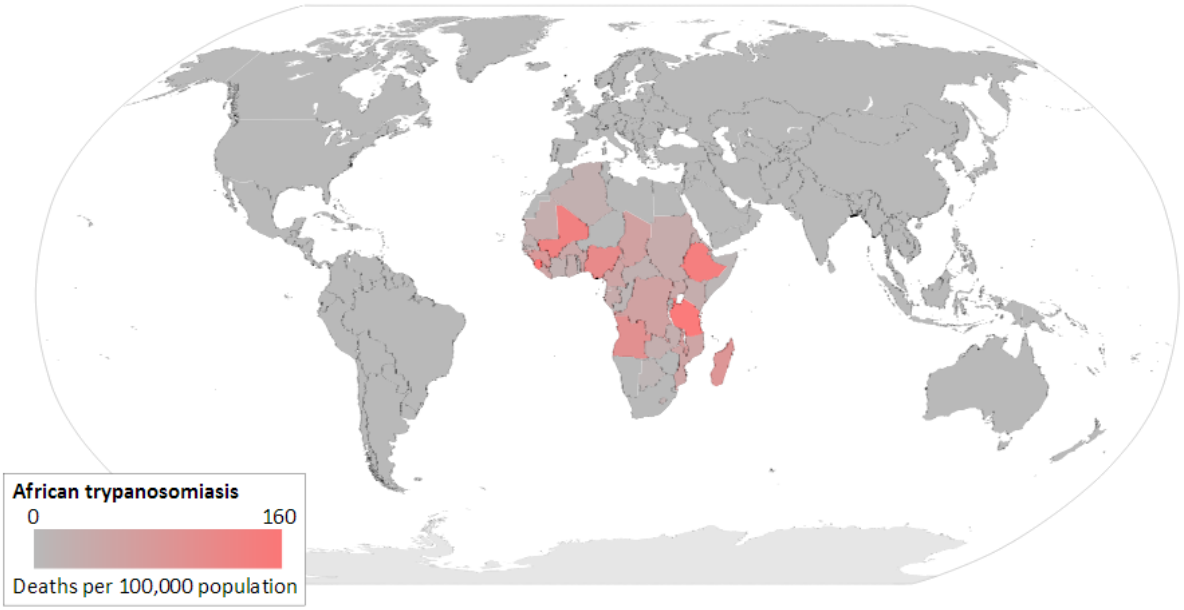


Figure 11 : Répartition mondiale de la trypanosomiase africaine [8]

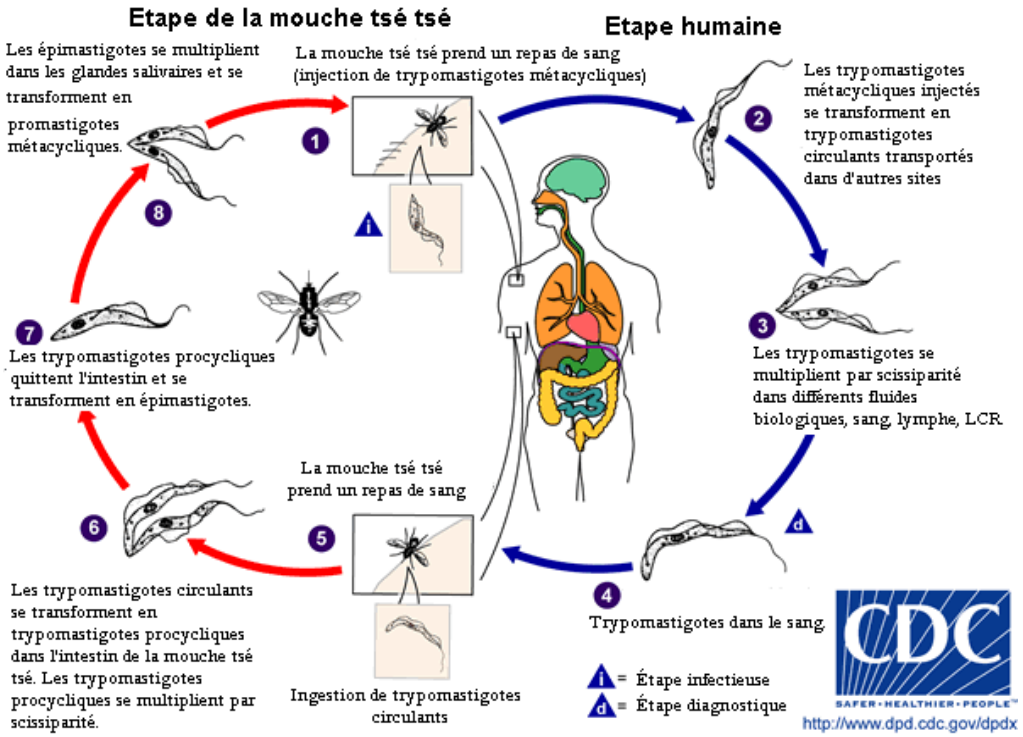


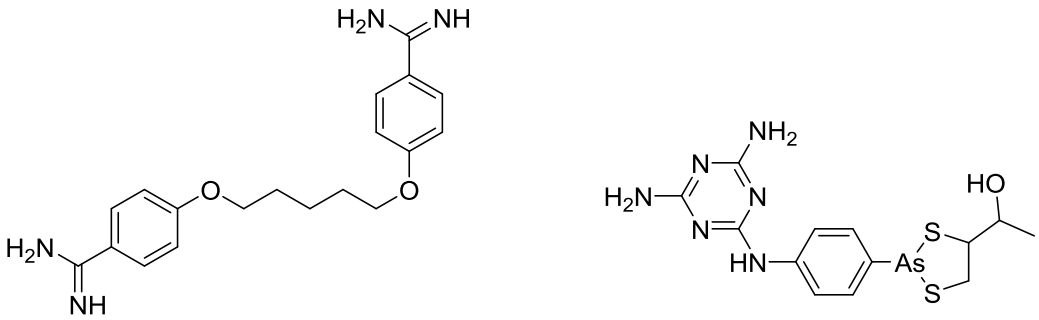
Figure 12 : Cycle de vie du *Trypanosoma brucei* [9]

Le cycle parasitaire (**Figure 12**) est relativement similaire à celui de la leishmania[9]. Les parasites pénètrent sous forme trypomastigote métacyclique dans l'hôte humain par la piqûre de la glossine et se multiplient par scissiparité dans les différents fluides (sang, lymphe, liquide Céphalo-Rachidien (LCR)). Les trypomastigotes circulants, seront re-ingérés par une glossine lors d'un repas sanguin et se transformeront en trypomastigotes procycliques dans l'intestin de la mouche. Lors de leurs migrations vers les glandes salivaires ils se transformeront en promastigoste métacyclique pour infester de nouveaux hôtes humains.

Les symptômes de la maladie[9] sont : fièvres, céphalées, douleurs articulaires dans un premier temps. En l'absence de traitement la maladie se propage loin dans le liquide céphalo-rachidien entrainant des phases de troubles neurologiques. Les symptômes sont : confusions mentales, insomnies et fatigues pouvant aller jusqu'au coma et la mort. Le CDC (Centre de contrôle des Maladies) estime que cette pathologie est responsable d'une diminution de l'espérance de vie d'environ 10 ans concernant deux millions de personnes.

Les traitements actuels contre la maladie du sommeil sont la pentamidine **10** en première intention et le mélarsoprol **13** (**Figure 13**) pour les phases neurologiques plus avancées.

[9] http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/, 05-05-**2015**



10 **13**

Figure 13 : Structures de la Pentamidine et du Mélarsoprol

De plus, les effets hypoglycémiants de la pentamidine et la présence d'arsenic dans le mélarsoprol, les rendent difficilement utilisables en raison de leurs effets secondaires prononcés.

Le développement de nouvelles molécules actives et/ou l'identification de nouveaux mécanismes d'actions contre ces trois maladies parasitaires négligées par l'industrie pharmaceutique, est un défi sanitaire majeur[10]. Les produits naturels ou dérivés hémisynthétique, ont toujours pris une part importante[11] dans la recherche de nouveaux médicaments. Ainsi dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressé aux produits naturels ou dérivés hémisynthétiques actifs sur un ou plusieurs de ces parasites.

i.2. Médecine traditionnelle et *Symphonia globulifera*.

La malaria, la leishmaniose et la trypanosomiase ne sont pas des maladies récentes. Les populations sont confrontées à ces fléaux depuis longtemps et, ont développé au fil des années des moyens de lutte avec les éléments dont ils disposaient. L'utilisation de végétaux et de leurs extraits par les populations, ont toujours été une part importante de la médecine traditionnelle. La littérature nous apprend à travers de nombreuses revues[12,13], que les plantes utilisées en médecine traditionnelle présentent de plus grandes proportions de métabolites actifs par rapport à d'autres espèces. Malgré de nombreux problèmes de standardisation, d'efficacité, d'innocuité et de biodiversité, une grande proportion des médicaments actuels est issue de plantes utilisées en médecine traditionnelle[14] .Parmi les

[10] Rapport de l'OMS sur l'amélioration des systèmes de santé, **2000**, Genève.

[11] D. J. Newman *et al*, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, J. Nat. Prod. **2007**, 70, 461-477.

[12] Merlin L. Willcox and Gerard Bodeker, Traditional herbal medicines for malaria, B.M.J.,**2004**, 329, 1156-1159.

[13] M. Randrianarivelojosia *et al*, Plants traditionally prescribed to treat *tazo (*malaria) in the eastern region of Madagascar, *Malaria Journal,* **2003**, 2, 25.

[14] D. Fabricant and N. Farnsworth, The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery, *Environmental Health Perspectives,* **2001***,* 109, 69-75.

espèces utilisées, le *Symphonia globulifera (S.g.)*[15] a attiré notre attention en raison de ces nombreux usages, notamment concernant des maladies parasitaires mis en évidence et répertoriés dans le **Tableau 1**. Cette espèce appartient à la famille des clusiacées dont la phylogénie est décrite (**Figure 14**[16]).

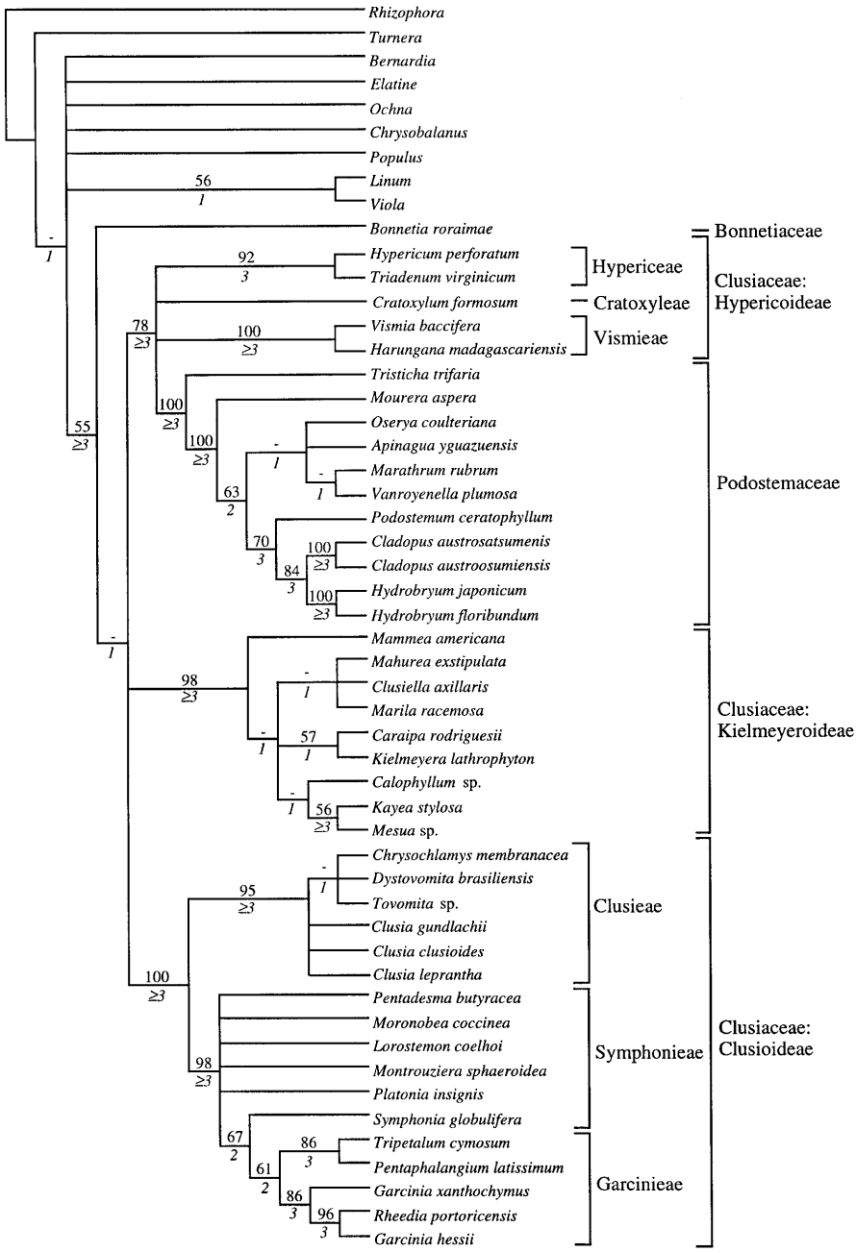


Figure 14 : phylogénie des clusiacées basée sur les séquences rbcl[16]

Sur plusieurs continents, les usages traditionnels ont montré une excellente efficacité du *S.g.* sur des cibles antiparasitaires comme la malaria ou la leishmaniose que nous ciblons. En effet, en Afrique le peuple Massango connu pour avoir gardé les pratiques médicinales dans

[15] Y. Fromentin *et al*, Symphonia globulifera, a widespread source of complexes metabolites with potent biological activities, *Planta Medica*, **2015**, 81, 02, 95-107.

[16] K. Gustafson *et al*, phylogeny based on rbcL sequences, *Inter jour of plant science*, **2002**,163, 1045-1054.

leur héritage culturel, utilisent des décoctions d'écorces de *S.g*. pour soigner les problèmes de gale (une autre maladie parasitaire). En Ouganda central, une étude réalisée par Ssegawa *et al*, a montré que parmi les questionnaires distribués dans 13 différents villages dans la province de Rakai, la décoction d'écorces est utilisée pour traiter les vers intestinaux. Plus intéressant au Cameroun, les décoctions de feuilles de *S.g* sont utilisées pour traiter la malaria.

Les applications en Amérique du Sud sont moins courantes, mais encore une fois on retrouve des décoctions d'écorces pour traiter la leishmaniose cutanée.

Entrée	Provenance	Partie de la plante	Méthode de préparation	Usage thérapeutique
	Afrique			
1	Gabon	Ecorces	Décoction	Gâle (scabiose)[17]
2	Ouganda	Ecorces	Décoction	Toux, vers intestinaux, jaunisse pré-hépatique, fièvres[18]
3	Ouganda	Latex	Brulé	Chasser les mauvais esprits [17]
4	Cameroun	Feuilles	Décoction	Antiparasitaires [19]
5	Nigeria	Feuilles	Décoction	Maladies de peaux, malaria, diabète[20]
	Amérique du Sud			
6	Panama	Feuilles	Cataplasme	Douleurs, maladies de peaux[21]
7	Bresil	Latex	Plâtre	Aider à être enceinte, élongation musculaires, fractures[22]
8	Bresil	Ecorces	Infusion	Douleurs dues aux menstruations [22]
9	Colombie	Ecores	Décoction	Leishmaniose cutanée[23]

Tableau 1 : Usage en médecine traditionnelle du *Symphonia globulifera*

Ces nombreux usages en médecine traditionnelle ont attiré l'attention des phytochimistes, conduisant ces derniers à effectuer des tests sur ces extraits. C'est l'extrait méthanolique de feuilles de *S.g*. provenant du Cameroun, qui sera testé en premier lieu en 2007, contre ces

[17] B. Akendengué *et al*., Medicinal plants used by the Masango people in Gabon, *Journal of Ethnopharmacology* (**1994**), 41, 193-200

[18] Ssegawa and JM Kasenene, Medicinal plant diversity and uses in the Sangobay area, Southern Uganda, *J. Ethnopharmacol*, **2007,** 113, 521–540.

[19] B.N. Lenta *et al*, Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules*, **2007**, 12, 1548–1557.

[20] Ajibesin K, Ekpo B, Bala D, Essien E, Adesanya S. Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. J Ethnopharmacol **2008**, 115, 387–408.

[21] Gupta MP, Solís PN, Calderón AI, Guionneau-Sinclair F, Correa M, Galdames C, Guerra C, Espinosa A, Alvenda GI, Robles G, Ocampo R. Medical ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. J Ethnopharmacol 2005; 96: 389–401.

[22] Coelho-Ferreira M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). J Ethnopharmacol **2009**, 126, 159–175.

[23] A. Lopez *et al*, Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, **2001**, 77, 189–196.

cibles parasitaires ainsi que sur cellules saines (L-6)[24]. Au cours de sa thèse, G. Marti testera également des extraits de *Symphonia globulifera* sur *Plasmodium falciparum*[25].

Entrée	organe	Cible pharmacologique	Activité	SI	référence
1	feuilles	*Plasmodium falciparum*	IC_{50} = 4.1 ±0.5 µg/mL	12.75	Lenta[26]
2	feuilles	*Trypanosoma cruzi*	IC_{50} > 30 µg/mL	> 1.5	Lenta[26]
3	feuilles	*Trypanosoma brucei rhodesiense*	IC_{50} = 11.5 ±0.5 µg/mL	4.5	Lenta[26]
4	feuilles	*Leishmania donovani*	IC_{50} = 2.1 ± 0.8 µg/mL	24.9	Lenta[26]
5	feuilles	Cytotoxicitée L-6	IC_{50} = 52.3 ±5.6 µg/mL		Lenta[26]
6	feuilles	*Plasmodium falciparum*	30% inhib. (10 mg/mL)		Marti[27]
8	feuilles	*Plasmodium falciparum*	48 % inhib. (10 mg/mL)		Marti[27]
10	écorces	*Plasmodium falciparum*	30 % inhib. (10 mg/mL)		Marti[27]
12	écorces	*Plasmodium falciparum*	45 % inhib. (10 mg/mL)		Marti[27]
14	écorces racines	*Plasmodium falciparum*	97 % inhib. (10 mg/mL)		Marti[27]
16	fleurs	*Plasmodium falciparum*	n.s.		Marti[27]
17	latex sp1	*Plasmodium falciparum*	35 % inhib. (10 mg/mL)		Marti[27]

(n.s : non significatif)

Tableau 2 : Activité antiparasitaire de l'extrait méthanolique de *Symphonia globulifera*

Ces données confirment donc la possibilité de trouver des molécules actives sur des cibles parasitaires comme *Plasmodium falciparum* et *Leishmania donovani* dans les extraits de *Symphonia globulifera.* En effet, bien qu'il existe des effets de synergie entre les métabolites, l'activité d'un extrait reflète en général la présence de composés actifs.

i.3. *Symphonia globulifera*, aspects botaniques et caractéristiques

La famille des clusiacées (Clusiaceae) également appelée guttiferae comprend une quarantaine de genres, se divisant en plus d'un millier d'espèces. Le genre Symphonia comprend 17 espèces[26], dont *Symphonia globulifera* qui est la seule espèce du genre retrouvée en dehors de Madagascar[27] d'où il serait endémique. Les analyses phylogénétiques ont pu démontrer que la dispersion des graines par les courants marins était responsable de sa large distribution à travers les Néo-tropiques[28]. En Afrique centrale,

[24] Lenta BN, Vonthron-Sénécheau C, Weniger B, Devkota KP, Ngoupayo J,Kaiser M, Naz Q, Choudhary MI, Tsamo E, Sewald N. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and Symphonia globulifera. Molecules 2007; 12: 1548–1557.

[25] G. Marti, Etudes chimiques et biologiques de *Clusiaceae* de la foret équatoriale guyanaise, *thèse de doctorat*, soutenu le 5 mai **2009**.

[26] http://www.tropicos.org. Visité le 05-05-2015

[27] C. Dick et M Heuertz , The complex biogeographic history of widespread tropical tree species, *Evolution,* **2008,** 62, 2760–2774.

[28] K. Budde *et al*, M. The ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera* L. f. (Clusiaceae) was not restricted to postulated Pleistocene refugia in Atlantic Equatorial Africa, *Heredity*, **2013**, 111, 66–76.

l'espèce a survécu à l'ère glaciaire du Pléistocène essentiellement, en étant regroupée dans les régions montagneuses proches de l'océan Atlantique. L'arrivée de *Symphonia globulifera* sur le nouveau continent est estimée à environ -1.5 million d'années avant notre ère.

De nombreux noms verniculaires désignent le *Symphonia globulifera* en fonction des régions :

- « manil marécage », ou « palétuvier jaune » en Guyane française,
- « barillo » au Guatemala et au Honduras,
- « cerillo » au Costa-Rica et au Panama,
- « machere » en Colombie,
- « mani » ou « paraman » au Venezuela,
- « mataki » au Surinam,
- « manni » en Guyane,
- « anany » au Bresil,
- « brea-caspi » au Perou,

Le *Symphonia globulifera* est un arbre de grande taille, caractérisé par un latex jaune présent dans tous les organes, une phyllotaxie opposée décussée (**Figure 15**) ainsi que d'imposantes racines aériennes caractéristiques de l'espèce (**photo 2**).

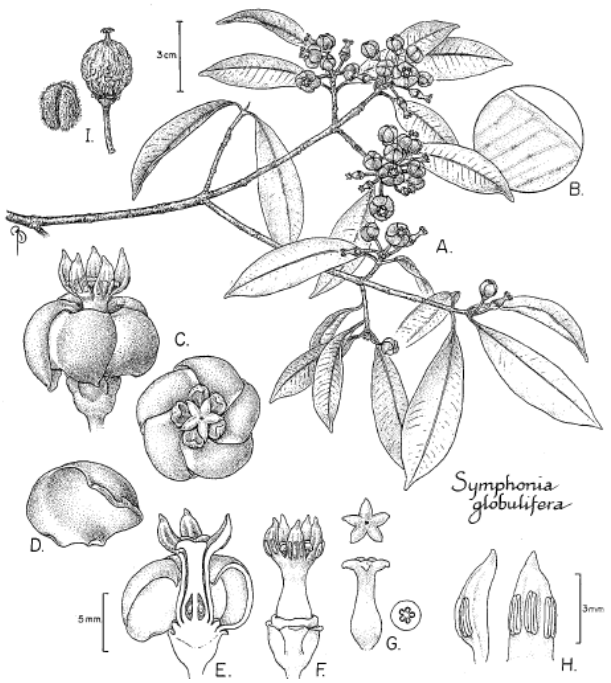


Figure 15 : Planche de *Symphonia globulifera* de Guyane Française par Gill *et al.*[29]

[29] G. Gill *et al.*, Pollination Biology of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) in Central French Guiana, *Biotropica*, **1998**, 30,139-144.

Le *Symphonia globulifera* L.f. est en fleurs à partir d'octobre. Ses fleurs rouges vifs possédent des pétales charnus organisées en sympodium et sont représentées **figure 15**. Après une éventuelle pollinisation réalisée par les oiseaux[30], les pétales tombent d'eux même et laissent place au fruit.

Le fruit ovale ou globulaire d'environ 4 à 5 cm, contient un péricarpe important lorsqu'il est jeune, le rendant charnue. Lors de la maturation de la graine, celle-ci grossie et prend peu à peu la place de ce péricarpe [27,29,31]. Ces graines sont également caractéristiques de part l'intensité de leur couleurs rouges et du latex, pouvant s'en extraire comme illustré **photo 4**.

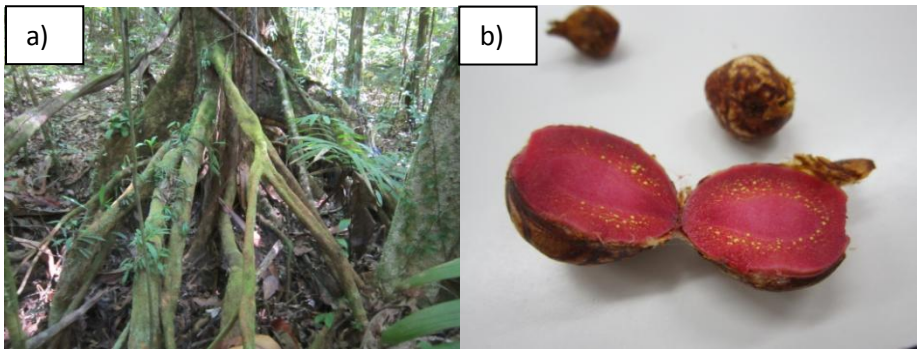


Photo 4 : a)Racines aériennes du *Symphonia globulifera*.b) Coupe de graine de *Symphonia globulifera* (© Yann Fromentin)

Cette espèce présente de nombreuses variations morphologiques, qui semblent être dépendantes de sa distribution écologique. Il existe au moins six variétés : *var. angustifolia Maguire*, *var. africana Vesque*, *var. gabonensis*, *var. guyanensis Aboul-Salim*, *var. macoubea Vesque* ainsi que and *var. major Diels*[32].

Il existe également probablement de nombreuses sous-espèces, comme en Guyane française le *Symphonia globulifera* SP1. Une des différences notable entre ces deux espèces, est que ce dernier ne pousse pas dans les bas fonds mais plutôt sur les collines, dans des zones plus sèches. Il existe également d'autres différences morphologiques comme la forme du tronc, taille des feuilles,… ainsi que la période de floraison. Cet écotype est nommé « *terra firme* » par opposition à l'écotype « *marais* ».

i.4. *Symphonia globulifera*, aspects phytochimiques

Les activités antiparasitaires intéressantes des extraits, ont donné lieu à plusieurs études phytochimiques, afin d'isoler des métabolites secondaires d'intérêts. Une quarantaine de métabolites secondaires avait donc été isolée jusqu'à maintenant. Ces métabolites se

[30] B Degen *et al*., Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana, *Heredity*, **2004**, 93, 585-591.

[27] C. Dick et M. Heuertz , The complex biogeographic histrory of widespread tropical tree species, *Evolution,* **2008,** 62, 2760–2774

[29] G. Gill *et al*., Pollination Biology of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) in Central French Guiana, *Biotropica*, **1998**, 30,139-144.

[31] A. Lemée, Flore de la Guyane française – Lechevallier, Vol. 4. Paris, **1955**.

[32] www.tropicos.org. Accédé le 05-05-**2015**

divisent en plusieurs classes phytochimiques : bisflavonoides, acide gras, terpène et benzophénone polyhydroxylé . Concernant cette dernière classe on peut citer : la maclurine, dix-neuf xanthones polyhydroxylées et/ou polyprenylées provenant de cette dernière, ainsi que 17 Acyles phloroglucinols Polyclycliques Polyprenylés (PPAPs). Certains de ces métabolites ont fait l'objet de tests biologiques variés.

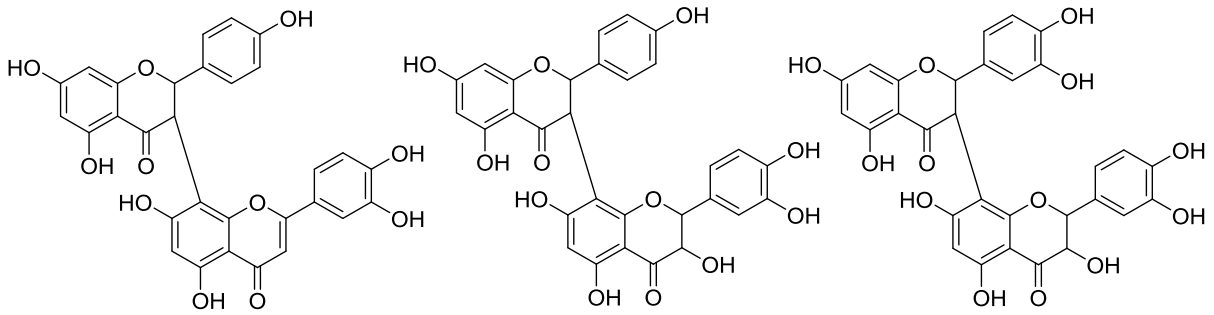
Les trois bisflavonoïdes isolés, leurs origines ainsi que leurs activités sont résumés **tableau 3** et représentés **figure 16**.

N°	nom	Partie de plante	pays	activités	référence
14	morelloflavone	feuilles	-	FAS inhibiteur	Li[33]
15	GB-2	feuilles	-	FAS inhibiteur	Li
	GB-2	tiges	Cameroun	antimicrobien	Mkounga[34]
16	GB3	tiges	Cameroun	antimicrobien	Mkounga

Tableau 3 : Bis-flavonoïdes isolés de *Symphonia globulifera*

Les bisflavonoïdes sont des métabolites couramment isolés à partir du genre Garcinia[35,36,] une espèce proche de Symphonia.

L'acide gras isolé des anthères de fleurs : le méthyl nervonate, dont les caractéristiques sont résumées et la structure représentée dans le **tableau 4** semble jouer un rôle dans la pollinisation de l'espèce[37].



14 **15** **16**

Figure 16 : Bis-flavonoïdes isolés de *Symphonia globulifera*

[33] X-C Li *et al*., Fatty Acid Synthase Inhibitors from Plants: Isolation, Structure Elucidation, and SAR Studies, *Journal of Natural Products*, **2002**, 65, 1909-1914.

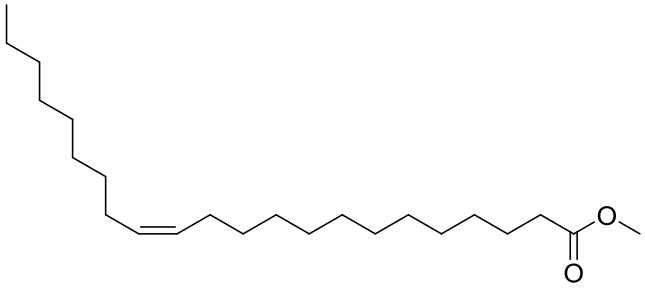
[34] P. Mkounga *et al*., Globulixanthone F, a new polyoxygenated xanthone with an isoprenoid group and two antimicrobial biflavonoids from the stem bark of *Symphonia globulifera*. *Nat Prod Comm.* , **2009**, 4, 803–808.

[35] A. Gunatilaka *et al*., 2,5-Dihydroxy-1,6-dimethoxyxanthone and biflavonoids of *Garcinia thwaitesii*, *Phytochemistry* ,**1983**, 22, 233-236.

[36] Z. Mbwambo *et al*., Antiparasitic Activity of Some Xanthones and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*, *Journal of Natural Products,* **2006**, 69, 369-372.

[37] V. Bittrich *et al*., The anther oil of *Symphonia globulifera* L.f. (Clusiaceae), *Biochemical Systematics and Ecology,* **2013**, 49, 131-134.

N°	nom	partie plante	pays	activités	référence
17	méthyle nervonate	anthères	Brésil	-	Bittrich[37]



17

Tableau 4 : Acide gras insaturé isolé de *Symphonia globulifera*

Les benzophénones et dérivés sont les métabolites secondaires majoritaires du *Symphonia globulifera*. Les profils pharmacologiques et leurs structures sont détaillés (**Tableau 5** et **Figure 17** respectivement).

N°	nom	partie plante	pays	activités	référence
18	globulixanthone C	racine	Cameroun	antimicrobien	Nkengfack[38]
19	globulixanthone D	racine	Cameroun	antimicrobien	Nkengfack
20	globulixanthone E	racine	Cameroun	antimicrobien	Nkengfack
21	gaboxanthone	graines	Cameroun	anti-plasmodium	Ngouela[39]
22	globuliferine	graines	Cameroun	anti-plasmodium	Ngouela
23	symphonine	graines	Cameroun	anti-plasmodium	Ngouela
24	globulixanthone A	racine	Cameroun	cytotoxicité KB	Nkengfack[39]
25	globulixanthone B	racine	Cameroun	cytotoxicité KB	Nkengfack
26	xanthone V1	feuilles	Cameroun	anti-leishmania	Lenta[24]
27	ananixanthone	écorce	Brésil	-	Bayma[40]
28	1,7-dihydroxyxanthone	bois	Uganda	-	Locksley[41]
29	1,5,6 -trihydroxyxanthone	bois	Uganda	-	Locksley
30	1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone	bois	Uganda	-	Locksley
		tiges	Cameroun	antimicrobien	Mkounga
31	norathyriol	bois	Uganda	-	Locksley
		tiges	Cameroun	antimicrobien	Mkounga
32	symphoxanthone	bois	Uganda	-	Locksley[42]
33	globuxanthone	bois	Uganda	-	Locksley
34	ugaxanthone	bois	Uganda	-	Locksley[43]
35	mbarraxanthone	bois	Uganda	-	Locksley
36	maclurine	bois	Uganda	-	Locksley[44]
37	gentisein	tiges	Cameroun	antimicrobien	Mkounga[34]
38	globulixanthone F	écorces	Cameroun	antimicrobien	Mkounga

Tableau 5 : Benzophénones, xanthones polyhydroxylées et/ou poly prénylées isolées de *Symphonia globulifera*

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.

[34] P. Mkounga *et al*., Globulixanthone F, a new polyoxygenated xanthone with an isoprenoid group and two antimicrobial biflavonoids from the stem bark of *Symphonia globulifera*. *Nat Prod Comm.* , **2009**, 4, 803–808.

[38] A. Nkengfack *et al*., Globulixanthones C, D and E: three prenylated xanthones with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry* **2002**, 61, 181-187.

[39] S. Ngouela *et al*., Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f, *Phytochemistry* , **2006**, 67, 302-306.

[40] J. Bayma *et al*., A prenylated xanthone from the bark of *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry,* **1998**, 38, 1159-1160.

[41] H. D. Locksley *et al*., Extractives from Guttiferae. Part II The Isolation and Structure of Four Polyhydroxyxanthones in *Symphonia globulifera* L*., Journal of the chemical society section C* ,**1966**, 430-432.

[42] H. D. Locksley *et al*., Extractives from Guttiferae. Part III.' The Isolation and Structure of Symphoxanthone and Globuxanthone from *Symphonia globulifera* L., *Journal of the chemical society section C,***1966**, 2186-2190.

[43] H. D. Locksley *et al*., Extractives from Guttiferae. Part IV.l Isolation and Structure of Ugaxanthone and M barraxanthone from *Symphonia globulifera* L., *Journal of the chemical society section C,* **1966**, 2265-2269.

[44] H. D. Locksley *et al*., Extractives from guttiferae VI : The significance of maclurin in xanthone biosynthesis, *Tetrahedron,***1967**, 23, 2229-2234.

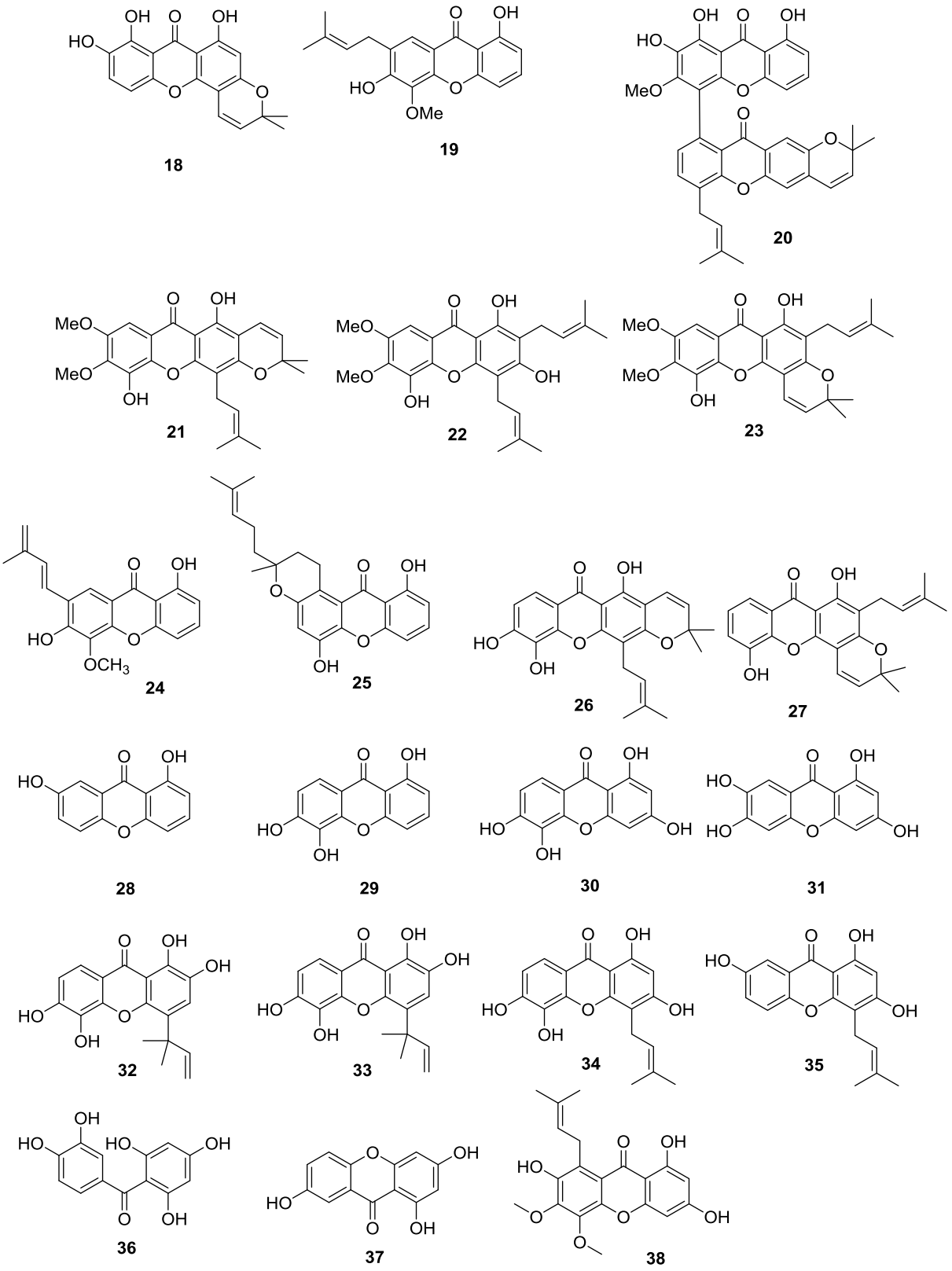


Figure 17 : Benzophénones, xanthones polyhydroxylées et/ou polyprénylées isolées de *Symphonia globulifera*

Les PPAPs sont une seconde famille de métabolites secondaires au potentiel biologique intéressant, ils sont très présents dans le *Symphonia globulifera.* 17 PPAPs différents (**Figure 18**) ont pu être isolés et testés pour leurs activités antiparasitaires (**Tableau 6**).

N°	nom	partie plante	pays	activités	référence
1	guttiférone A	graines	Cameroun	anti-plasmodium (IC_{50} = 3.17µM)	Ngouela [39]
		racine	Centrafrique	anti-VIH	Gustafson[45]
		feuilles	Cameroun	anti-leishmania	Lenta[24]
39	guttiférone B	racine	Centrafrique	anti-VIH	Gustafson[45]
40	guttiférone C	racine	Centrafrique	anti-VIH	Gustafson
41	guttiférone D	racine	Centrafrique	anti-VIH	Gustafson
42	14-déoxy-7-*épi*-isogarcinol	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 2.5µM)	Marti[46]
43	symphonone A	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 2.8µM)	Marti
44	symphonone B	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 3.3 µM)	Marti
45	symphonone C	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 2.6 µM)	Marti
46	7-*épi*-coccinone B	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 3.3 µM)	Marti
47	symphonone D	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 3.2 µM)	Marti
48	symphonone E	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 2.1 µM)	Marti
49	symphonone F	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 2.7 µM)	Marti
50	symphonone G	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 2.1 µM)	Marti
51	symphonone H	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 3.17µM)	Marti
52	symphonone I	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 3.0µM)	Marti
53	7-*épi*-garcinol	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 10.1µM)	Marti
54	7-*épi*-isogarcinol	racine	Guyane Fr	anti-plasmodium (IC_{50} = 3.2 µM)	Marti

Tableau 6 : PPAPs isolés de *Symphonia globulifera*

La majorité des PPAPs isolés de *Symphonia globulifera* présente une activité anti-plasmodiale de l'ordre du micro-molaire sur *Plasmodium* chloroquino-résistants. On pourra remarquer qu'aucun métabolite commun, isolé à partir des racines de *S.g.* provenant de Centrafrique et de Guyane française, ne fut caractérisé par les équipes de Gustafson et Marti respectivement. Il est important de noter que dans ce cas, les études furent menées sur deux écotypes différents, marais et *terra firme* pour respectivement les arbres de Centrafrique et de Guyane française. Il est donc possible que la composition phytochimique de ces deux écotypes soit différente. Une étude est également menée en parallèle par notre équipe pour confirmer cette hypothèse (projet AREVA).

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.

[39] S. Ngouela *et al*., Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f, *Phytochemistry* , **2006**, 67, 302-306.

[45] K. Gustafson *et al*., The guttiferone, HIV-Inhibitory Benzophenones From *Symphonia globulifera, garcinia livingstonei, Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 10093-10102.

[46] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), *Phytochemistry* , **2010**, 71, 964-974.

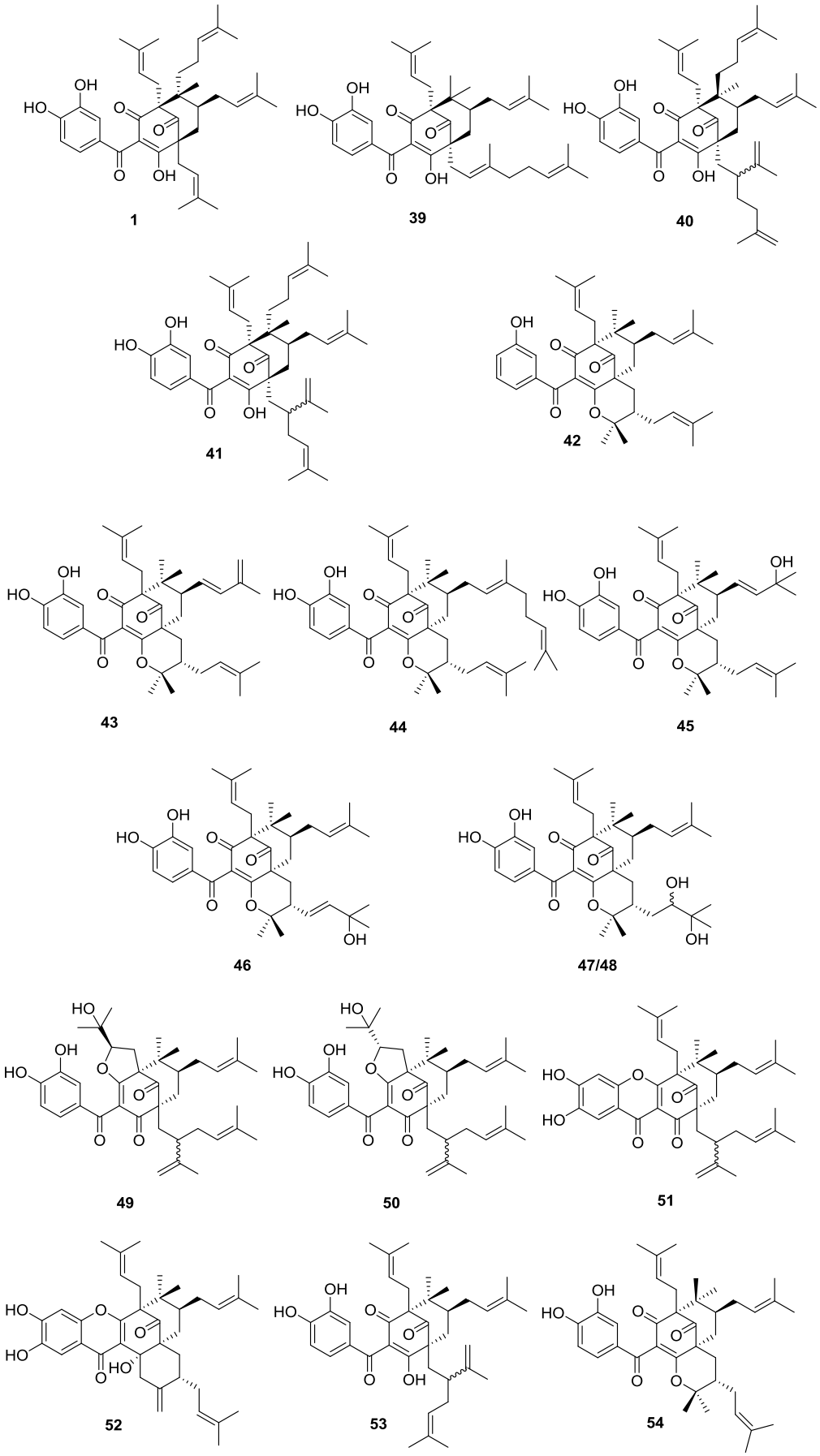


Figure 18 : PPAPs isolés de *Symphonia globulifera*

D'après ces résultats bibliographiques les PPAPs semblent être en partie responsables de l'activité antiparasitaire des extraits. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à cette classe de métabolites secondaires.

i.5. *Les PPAPs*

En 2015, environ 200 PPAPs sont répertoriés. Ces produits d'origine naturelle sont majoritairement retrouvés chez les Clusiacées ou familles apparentés, comme les Hypericacées. Le genre Garcinia est sans doute le plus fourni comme décrit dans une revue récente[47].

La structure des PPAPs est basée sur un cœur bicyclo [2.4.9] nonane-9-one ou bicyclo[2.4.8]octan-8-one substitué, par un acyle et diverses unités prénylées. Ces composés peuvent être classés en trois groupes : A, B ou C. C'est la nature de la cyclisation des unités prénylées pour former le cœur bicyclo[2.4.9]nonane-9-one, qui diverge et donne ces trois groupes. La numérotation présentée ici est celle suggérée par Grossman *et al*. dans une revue de 2006 (**Figure 19**)[48]. Toutefois, pour des raisons d'homogénéité nous avons adopté dans nos travaux sur les PPAPs de type B, la nomenclature historique de Gustafson.

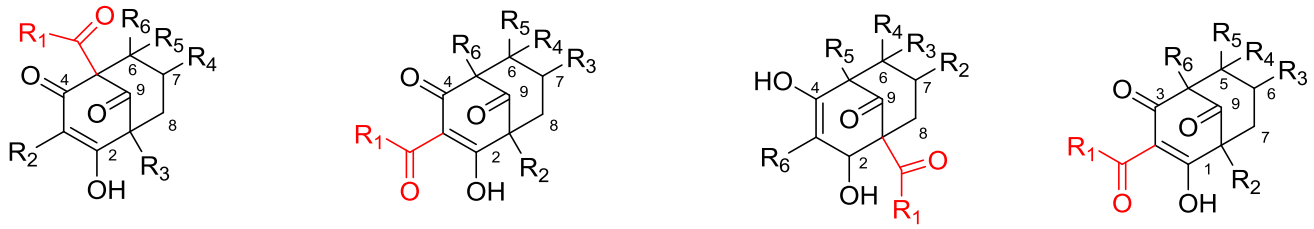


Figure 19 : Nomenclature des trois types de PPAPs

R_1 représente l'acyle et ne présente que quelques variations. Les groupements les plus courants sont les catéchols, phénols, phényles et parfois quelques motifs aliphatiques comme isobutyle ou isopropyle (**Figure 20a**).

Les groupements R_2 à R_6 sont des chaînes aliphatiques majoritairement prényles, géranyles, isogéranyles ou lavandulyles (**Figure 20b**), qui peuvent être « décorées » par diverses hydroxylations.

[47] S. Kumar *et al*., The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from Garcinia and related genera: ethno botanical and therapeutic importance, *Fitoterapia,* **2013**, 89, 86–125.
[48] R. Ciochina *et al*., Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols, *Chemical Reviews,* **2006**, 106, 3963-3986.

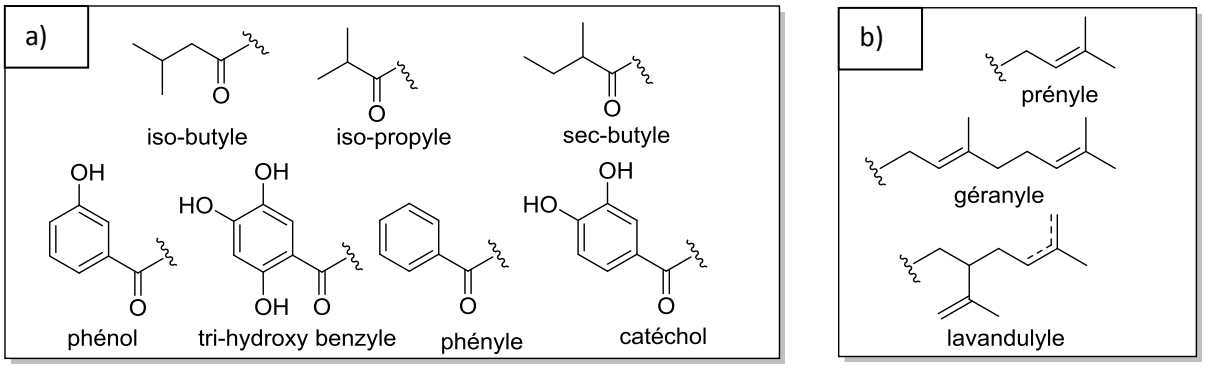


Figure 20 : Groupements principaux de R_1 (a) et des chaines R_2 à R_6

Les additions puis cyclisations des chaînes pour former ce cycle à neuf, se font sur des intermédiaires provenant de voies métaboliques multiples (mixtes). Parmi ces trois types, les voies de biosynthèse menant au noyau phloroglucinol se divisent en deux groupes, en fonction de la nature du groupement acyle. Le bicycle caractéristique est formé dans un second temps après plusieurs prénylations et cyclisations. Les régio-séléctivités de ces dernières déterminent alors le type de PPAPs : A, B ou C.

i.5.a.Voie de biosynthèse du noyau phloroglucinol des PPAPs possédant un groupement acyle non aromatique.

Il semblerait que les PPAPs possédant un groupement acyle non aromatique comme l' hyperforine **54**, proviennent de la L-valine comme illustré **schéma 2**. L'utilisation de précurseurs radiomarqués a mis en évidence l'utilisation de cet acide aminé dans la biosynthèse[49]. La transamination de celui-ci puis l'addition du cofacteur Coenzyme A ont permis à une PKS (PolyKetide Synthase)[50] de prendre en charge le synthon, insérant ainsi trois unités acétates. Une BPS (Benzophénone synthase) prendrait ensuite le relais[51], pour assurer une cyclisation de type Claisen, avant une aromatisation pour donner le noyau phloroglucinol.

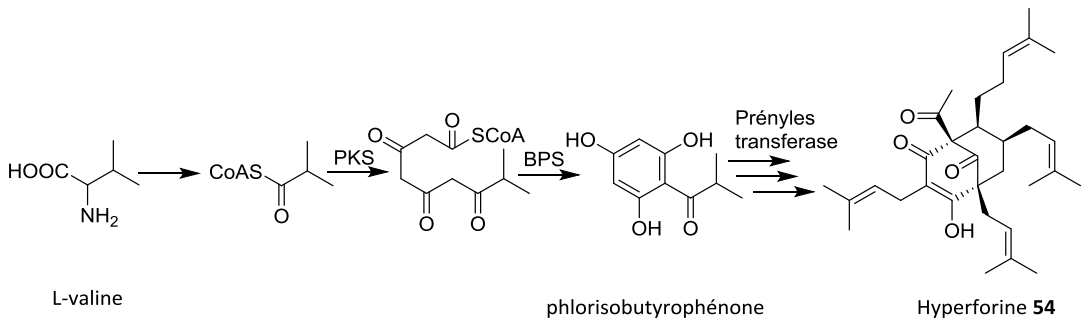


Schéma 2 : Biosynthèse de l'hyperforine

[49] K. Karppinen *et al*., Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*, *Phytochemistry,* **2007**, 68, 1038-1045.

[50] P. Klingauf *et al*., Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures, *Phytochemistry,* **2005**, 66,139-145.

[51] B. Liu et *al*, Benzophenone synthase ans chalcone synthase for hypericum androsaemum cell culture : cDNA cloning, functional expression, and site directed mutagenesis of two polyketide synthase, *Plant journal*, **2003**, 34, 847-855.

i.5.b. Voies de biosynthèse du noyau phloroglucinol des PPAPs possédant un groupement acyle aromatique.

Concernant les PPAPs possédant un groupe acyle aromatique, deux théories s'opposent. La première fait également intervenir des acides aminés (tyrosine, phénylalanine) provenant de l'acide shikimique. Dans d'autres familles, cette voie a été prouvée *via* des expériences de radio-marquage dans le cas de la formation de benzophénones polyhydroxylées [52, 53, 54] (**Schéma 3**).

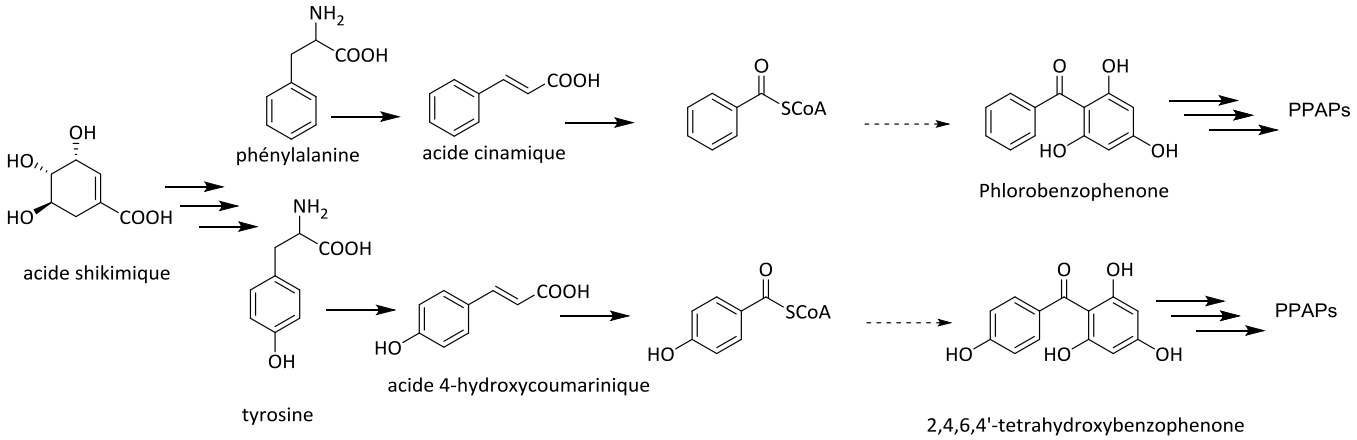


Schéma 3 : Hypothèse de biosynthèse des précurseurs de PPAPs impliquant des acides aminés

La deuxième hypothèse biosynthétique de formation de ce noyau phloroglucinol, est inspirée de la synthèse de xanthones dans le règne *« Fungi »*[55]. L'acide shikimique est transformé en acide protocathéchique, avant d'être pris en charge par une enzyme assimilable à une benzophénone synthase, pour former le cœur phloroglucinol (**Schéma 4)**.

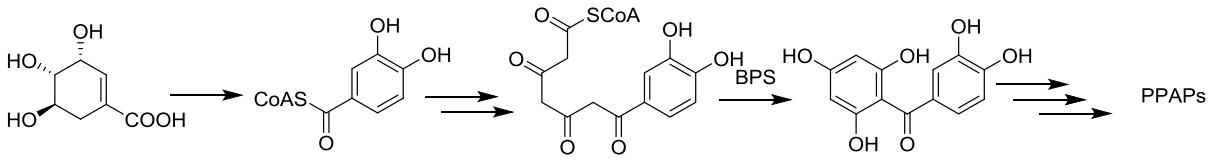


Schéma 4 : Hypothèse de biosynthèse des précurseurs de PPAPs impliquant l'acide protocatéchique

[52] M.Fujita *et al*., Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides:* intact incorporation of C6-C3 precursor into xanthone, *Tetrahedron letters*, **1977**, 51, 4503-4506.

[53] M. Fujita *et al*., Further studies on the biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides:* hydroxilation of the shikimate-derived ring**,** *Phytochemistry* ,**1981**, 20, 2183-2185.

[54] L. Beerhues *et al*., Biosynthesis of biphenyls and benzophenones - Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants, *Phytochemistry,* **2009**, 70, 1719-1727.

[55] G. Hill *et al*., Fungal Xanthone Biosynthesis. Distribution of Acetate-Derived Oxygens in Ravenelin, *Journal of the American Chemical Society,* **1982,** 104**,** 1745-1748.

La présence de flavonoïdes dans le *Symphonia globulifera*, utilisant également une voie de biosynthèse impliquant des acides aminés, rend plus probable la première hypothèse.

i.5.c. Voies de biosynthèse du bicycle des PPAPs.

L'intermédiaire benzophénolique ainsi obtenu subit alors diverses prénylations/cyclisations pour donner les trois groupes : A, B et C (**Schéma 5)**. Les unités type prényles résultantes de la voie de désoxy-xylulose[56] sont introduites par des prényls-transférases, sur ce noyau benzophénone dans un ordre bien particulier. Il semblerait que la première addition se fasse sur le carbone numéroté 3. Cette hypothèse a été validée dans le cas de la biosynthèse de l'hyperforine chez *Hypericum perforatum.* Les PPAPs de type C possèdent une prénylation sur les positions portées par les carbones 3, 5 et 1. Les PPAPs de type A et B ont subi des prénylations les positions 3, ainsi que deux fois sur la position 5. On pourrait logiquement envisager un intermédiaire commun, où une prénylation aurait eu lieu sur la position 5 puis, la différenciation se ferait par une prénylation sur les carbones 1 ou 5.

Type C : L'étape clé de la formation des PPAPs de type C est une prénylation sur le carbone numéro 1. À partir de cette chaîne partira une seconde substitution nucléophile, introduisant une nouvelle unité terpénique et formant un carbocation tri-substitué. Les électrons de la double liaison C2-C3 pourront donc s'additionner sur ce carbocation et conduire à la formation du cycle à neuf chaînons. Les PPAPs de type C sont les plus rares dans la Nature, seuls quelques composés comme les Garcinielliptones L et M sont décrits.

Type A et B : Pour les PPAPs de type A et B, un mécanisme similaire se produit après une prénylation en C5 semble probable. L'implication des doubles liaisons C1-C2 ou C4-C5 conduira à la formation de PPAPs de type A ou B respectivement. Bien que ces mécanismes ne soient pas prouvés, ils semblent forts probables si on considère les travaux récents visant à réaliser la synthèse totale de PPAPs [57],[58].Des étapes de « décoration » supplémentaires pouvant induire l'apparition de centres asymétriques: prénylation, hydroxylations ou cyclisations sur diverses positions conduisent à l'immense variété de structures existantes.

On peut conclure cette partie, concernant les voies biosynthétiques des métabolites secondaires de *Symphonia globulifera,* que de nombreux métabolites possèdent une origine commune, comme illustrée **schéma 6**.

[56] P. Adam *et al*, Biosynthesis of Hyperforin in Hypericum perforatum, *J. Med. Chem,* **2002**, 45, 21, 4786-4793.

[57] P. Nuhant *et al*, α,α'-Annulation of 2,6-Prenyl-Substituted Cyclohexanone Derivatives with Malonyl Chloride: Application to a Short Synthesis of (±)-Clusianone. Formation and Rearrangement of a Biogenetic-Like Intermediate, *Organic letters*, **2007**, 287-289.

[58] N. Simpkins, Adventures in bridgehead substitution chemistry: synthesis of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols (PPAPs), *Chem. Commun*., **2013**, 49, 1042-1051.

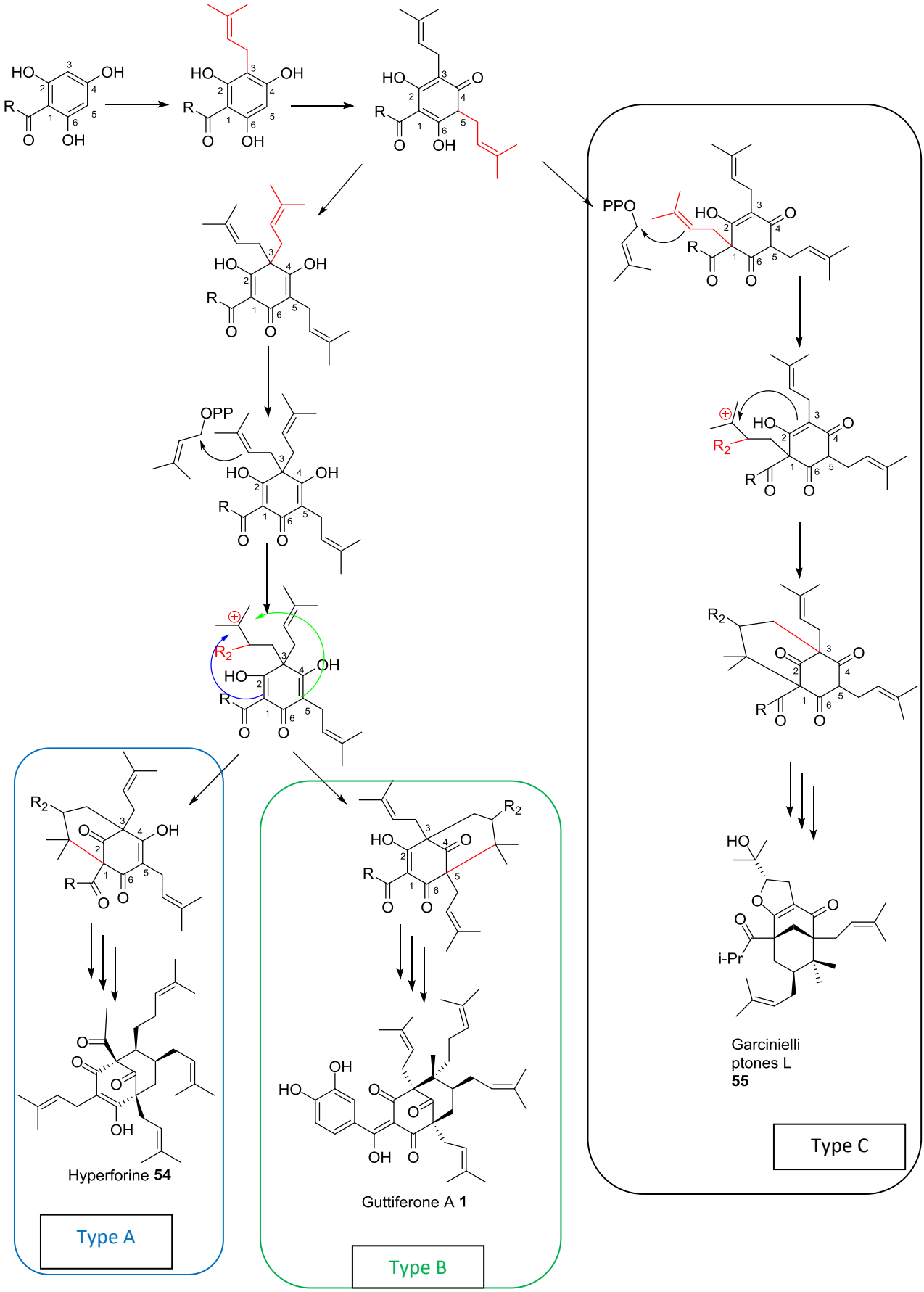


Schéma 5. Prénylation et cyclisation dans la biosynthèse des PPAPs

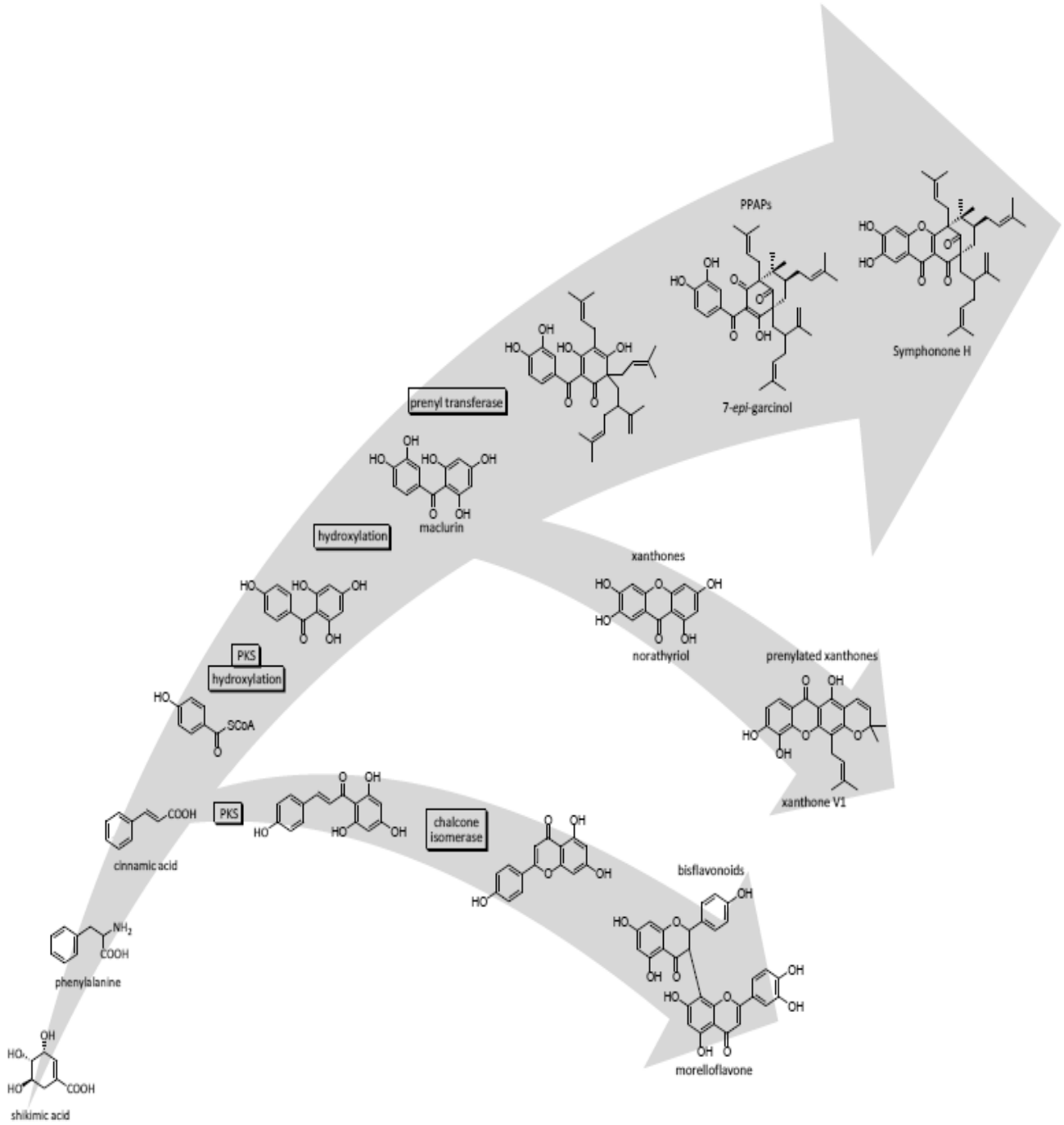


Schéma 6 : Convergences biosynthétiques des métabolites secondaires de *Symphonia globulifera*

Il semblerait que cette famille de métabolites présente de nombreux avantages concernant les études de leurs potentiels pharmacologiques. En plus d'être relativement abondants dans certains végétaux, leurs fortes diversités structurales leurs permettent d'être associées à de nombreuses activités biologiques.

Les PPAps de type A sont sans doute les plus étudiés, avec comme chef de file l'hyperforine. Extraite *d'Hypericum perforatum* (largement utilisée en phytothérapie), elle possèderait des activités antidépressives[59,60] bien que celles-ci soit actuellement controversées[61].

Concernant les deux PPAPs de type C décrits, une activité décrite anti-inflammatoire (inhibition du relargage de la *ß*-glucuronidase)[62] a été décrite pour les garcinielliptones L et M.

Les PPAPs isolés de *Symphonia globulifera*, sont tous de type B. De nombreux PPAPs sont également présents dans les *Garcinia*[47] et beaucoup sont étudiés pour leurs activités antimicrobiennes. De nombreuses autres activités ont été décrites, anti-leishmanioses (amastigote)[24], antipaludiques[46,63], anti-trypanosomiases[64], antibactériens[65] ainsi qu'anti-viraux[45] (VIH). Il faut également noter que ces composé possèdent des activités anticancéreuses décrites à travers de multiples mécanismes comme l'inhibition de l'action de la tubuline[66], des topoisomerases[67] ou encore pouvant induire l'apoptose *via* la voie des caspases[68,69,70] et autres mécanismes associés[71] .

Nous nous sommes donc concentrés sur l'obtention de ce type de molécules. Cette dernière devra être abondante et posséder une bonne activité antiparasitaire, afin de réaliser des

---

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.

[45] K. Gustafson *et al*., The guttiferone, HIV-Inhibitory Benzophenones From *Symphonia globulifera, garcinia livingstonei, Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 10093-10102

[46] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), *Phytochemistry* , **2010**, 71, 964-974

[47] S. Kumar *et al*., The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from Garcinia and related genera: ethno botanical and therapeutic importance, *Fitoterapia,* **2013**, 89, 86–125.

[59] L. Verotta *et al*., Synthesis and Biological Evaluation of Hyperforin Analogues. Part I. Modification of the Enolized Cyclohexanedione Moiety, *Journal of Natural Products*, **2002**, 65, 433-438.

[60] L. Prenner *et al*., Reduction of High-Afinity â2-Adrenergic Receptor Binding by Hyperforin and Hyperoside on Rat C6 Glioblastoma Cells Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biochemistry,* **2007**, 46*,* 5106-5113.

[61] A. Nahrstedt *et al*., Lessons Learned from Herbal Medicinal Products: The Example of St. John's Worth, *Journal of Natural Products,* **2010,** 73*,* 1015-1021.

[62] J. Weng, *et al*, Anti-inflammatory phloroglucinols and terpenoids from *Garcinia subelliptica*, *J. Nat. Prod.,* **2004**, *67*, 1796-1799.

[63] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae), *Phytochemistry* , **2009**, 70, 75-85.

[64] TM. de Almeida Alves *et al*., Biological Activities of 7-Epiclusianone, *Journal of Natural Products,* **1999**, 62, 369-371.

[65] V. Kuete *et al*., Antimicrobial components of the methanolic extract from the stem bark of *Garcinia smeathmannii* Oliver (Clusiaceae), *South African Journal of Botany,* **2007**, 73, 347-354.

[66] D. Roux *et al*., Structure-Activity Relationship of Polyisoprenyl Benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the Tubulin/Microtubule System, *Journal of Natural Products,* **2000**, 63, 1070-1076.

[67] H. Tosa *et al*., Inhibitory activity of xanthone derivatives isolated from some guttiferaeous plants against DNA topoisomerases I and II, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin,* **1997**, 45, 418-420.

[68] K. Matsumoto *et al*., Cytotoxic Benzophenone Derivatives from *Garcinia* Species Display a Strong Apoptosis-Inducing Effect against Human Leukemia Cell Lines, *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* **2003**, 26, 569-571.

[69] V. Kuetea *et al*, Cytotoxicity and modes of action of four naturally occuring benzophenones: 2,2_,5,6_ Tetrahydroxybenzophenone, guttiferone E, isogarcinol and isoxanthochymol, *Phytomedicine*, **2013**, 20, 528– 536.

[70] C. Feng et al, A new anticancer compound, Oblongifolin C, inhibits tumor growth and promotes apoptosis in HeLa cells through Bax activation, *Int. J. Cancer*, **2012**, 131, 1445–1454.

[71] G. Pardo-Andreu *et al*., The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: Ensuing energetic and oxidative stress implications, *Toxicology and Applied Pharmacolog* , **2011**, 253, 282-289.

études de relations structures-activités en vue d'augmenter son potentiel pharmacologique. La guttiférone A, déjà étudiée au sein du laboratoire, remplie tous ces critères avec un rendement d'extraction de 0.45 % et une activité antiparasitaire de l'ordre du micro-molaire.

i.6. *La guttiférone A*

i.6.a. *La guttiférone A -généralités*

Les caractéristiques concernant cette molécule sont relativement bien détaillées. Sa synthèse totale a été achevée[72], le produit naturel a été cristallisé plusieurs fois[73,74] enlevant tout doute sur sa structure relative. Son potentiel pharmacologique a également été évalué pour de nombreuses cibles. Historiquement c'est son activité anti-VIH qui mis en évidence cette molécule, puis comme de nombreux PPAPs ses activités anti parasitaires (paludisme, leishmaniose) et anti-microbiennes (*S. aureus, B. cereus, E. coli et S. typhimurium*). Comme de nombreux autres PPAPs de type B, son potentiel cytotoxique a été évalué sur plusieurs lignées et certains mécanismes cellulaires ont été mis en avant. Certaines activités sur le système nerveux central ont également été mises en lumière, notamment concernant la protection des neurones face au stress oxydant[75] ou l'inhibition des cholinésterases[24]. D'autres activités, moins courantes ont été également décrites comme la capacité à réduire d'adipogénèse pour traiter l'obésité[76] ou à réduire les lésions gastro-intestinales[77].

i.6.b. *La guttiférone A –précisions structurales*

Malgré les nombreuses synthèses totales de PPAPs, la présence d'un centre chiral supplémentaire en C6 sur la guttiférone A rendait la tâche plus difficile. C'est en 2014 que la première synthèse totale de la guttiferone A ainsi que celle de son épimère 6-epi guttiferone furent achevées en 13 étapes à partir de la nona-1,8-dien-5-one commerciale (**Schéma 7**). La benzoylation de cette cétone, suivie d'une méthylènation permettent d'accéder à l'accepteur de Mickael **57** avec un bon rendement. La cyclohexanone **58**, formée par le traitement avec le diméthyl-1,3-acétondicarboxylate, est soumise à une prénylation pour donner le produit **59** avec une bonne diastéréoséléctivité. L'addition du méthylcuprate dans les conditions de Yamamoto[78] permet encore une fois d'ajouter avec une bonne stéréosélectivité le substituant conduisant à l'obtention de **60**. Afin de mieux contrôler la

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.

[72] F. Horeischi, The Total Syntheses of Guttiferone A and 6-*epi*-Guttiferone A, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136* ,10, 4026–4030.

[73] F.T. *Martins et al,* Natural Polyprenylated Benzophenones: Keto-Enol Tautomerism and Stereochemistry, *J. Braz. Chem. Soc., **2007**,* 18, 8, 1515-1523.

[74] B. Lenta *et al*, (1R*,5R*,7R*,8S*)-3-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-4-hydroxy-8-methyl-1,5,7-tris(3-methyl-2-butenyl)- 8-(4-methyl-3-pentenyl)bicyclo[3.3.1]non-3-ene- 2,9-dione, *Acta Cryst*., **2007**, E63, 1282-1284.

[75] Y. Nunez-Figueredo *et al*, Neuroprotective Action and Free Radical Scavenging Activity of guttiferone A, a Naturally Occurring Prenylated Benzophenone, *Arzneimittel Forschung*, **2012**, 62, 12, 583-589.

[76] M., Muhammed, *U.S. Pat. Appl. Publ*., **2012**, US 20120178801 A1 20120712.

[77] R. Niero *et al*, Gastroprotective effects of extracts and guttiferone A isolated from Garcinia achachairu Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* , **2012**, 385, 1103–1109

[78] Y. Yamamoto *et al*, Selective Synthesis by Use of Lewis Acids in the Presence of Organocopper and Related Reagents. New Synthetic Methods**,** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*., **1986**, *25*, 947-959.

stéréochimie de l'addition du prényle en C5, les auteurs furent forcés de cycliser la partie sud de la molécule dans des conditions classiques de RCM (ring closure metathesis). La formation des esters protégés par la fonction « alloc » à partir des cétones se fera avec une régioselectivité moyenne induisant la formation d'un mélange **63** / **64.** Ces composés seront décarboxylés par un traitement au Pd_2 $(dba)_3$ pour donner les composés **67** et **68,** avec une bonne diastéréoselectivité pour le composé **67** désiré. La condensation de Claisen *via* l'action d'une base permet d'obtenir le tricyle [3.3.1] nonatrione **69.** L'addition de l'acyle ainsi que la fixation des unités prényls restantes, se feront avec un bon rendement pour obtenir la guttiférone A en seulement 13 étapes avec un rendement global de 13.4 %. Bien que le rendement global de cette synthèse soit exceptionnellement haut et que, la stéréochimie de chaque centres asymétrique soit parfaitement contrôlé, l'extraction de cette dernière à partir du *S.g* parait plus rentable. Cette découverte reste néanmoins très intéressante dans le cadre d'un projet de chimie médicinale. En effet, l'obtention d'analogues non accessibles par hémisynthèse, car ayant une stéréochimie différente, pourrait permettre d'améliorer le potentiel pharmacologique.

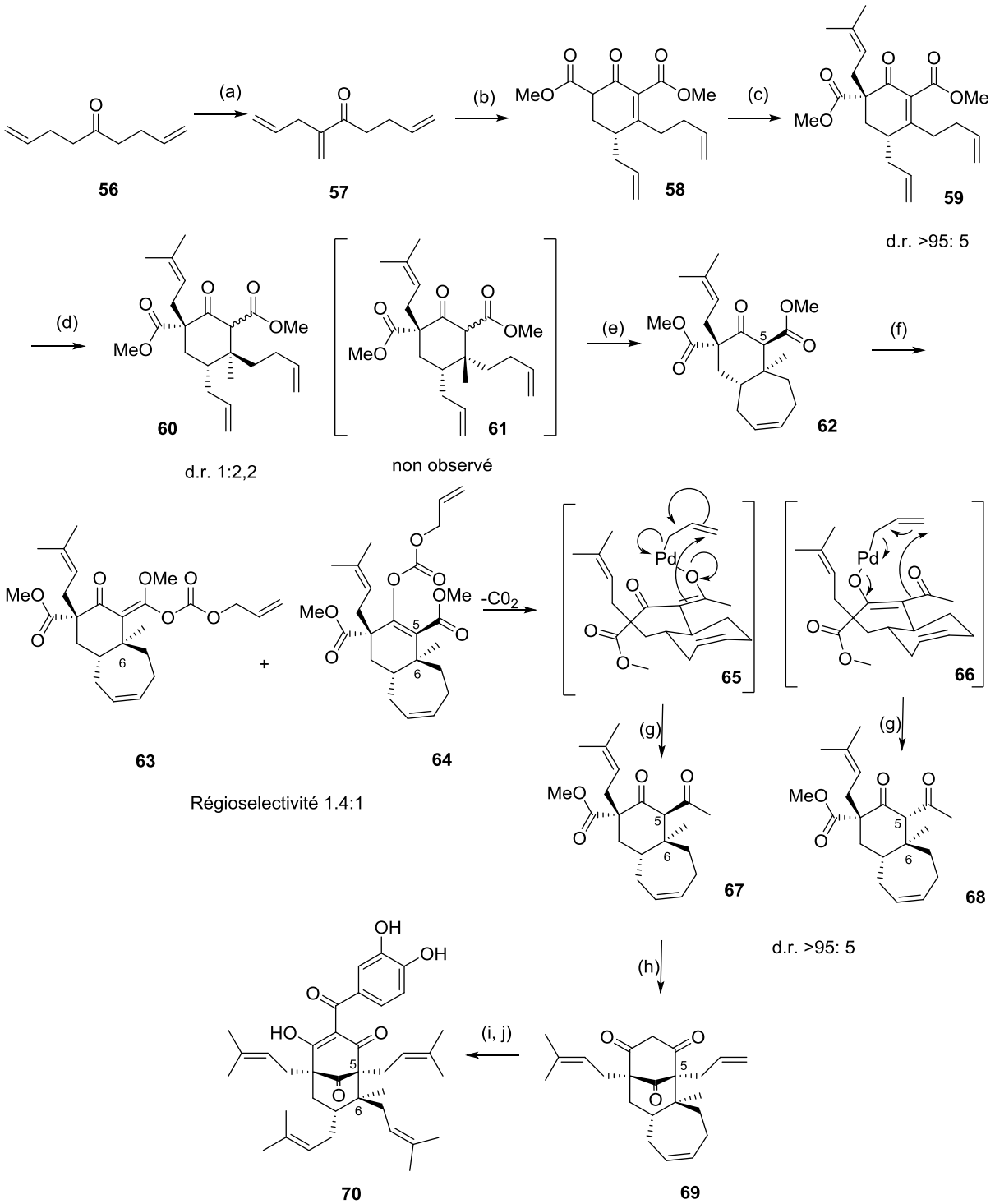


Schéma 7 : Synthèse totale de la guttiférone A

(a) LiHMDS (1.2 equiv.), cyanure de benzoyl (1.5 equiv.), THF, -78 °C – t.a., 18 h, puis K_2CO_3, CH_2O (aq.), éthanol, t.a., 18 h, 78 % (deux étapes); (b) MeMgCl (2.0 equiv.), diméthyl-1,3-acetondicarboxylate (1.0 equiv.), méthanol, 0 – 60 °C, 18 h, 89 %; (c) NaH (1.1 equiv.), MeLi (2.3 equiv.), puis NaH (1.1 equiv.), bromure de prényle (1.5 equiv.), THF, 0 °C - rt, 18 h, 48% (over 2 steps); (d) LiCl (2.0 equiv.), CuI (2.0 equiv.), MeMgBr (2.0 equiv.), Me_3SiCl (2.0 equiv.), THF, -78 °C, 4h, 89%; (e) Grubbs-II (1 mol%), CH_2Cl_2,45 °C, 2h, 94%; (f) NaH (1.1 equiv.), chloroformate d' allyl (1.5 equiv.); DMF, 0 °C – t.a., 18 h, 98%; (g) [Pd2dba3] (5 mol%), *p*-Tol3P (12 mol%), 1,4-dioxane, 60 °C, 1 h, 94%; (h) KO*t*Bu (2.0 equiv.), THF, 0 °C, 15 min, 90%; (i) Grubbs-II (1 mol%), 2-methyl-2-butene (100 equiv.), CH_2Cl_2, 45 °C, 2 h, 96%; (j) KO*t*Bu (5.0 equiv.), cyanure de 3,4-bisacetoxybenzoyl (12.5 equiv.), puis K_2CO_3, méthanol, THF, 0 °C - rt, 48 h, 58%)

Malgré ces travaux de synthèse et des études cristallographiques, il existe encore un doute sur la configuration absolue de la guttiférone A. Les paramètres de « Flack » des radiocristallographies ne permettent pas d'obtenir la configuration absolue. Les auteurs ont choisi de représenter l'énantiomère *1R, 5R, 7R, 8S,* bien que l'autre énantiomère *(1S, 5S, 7S, 8R)*, soit celui des cristallographies déposées. Les représentations spatiales et topologiques de ces derniers sont décrits **figure 21 et 22**.

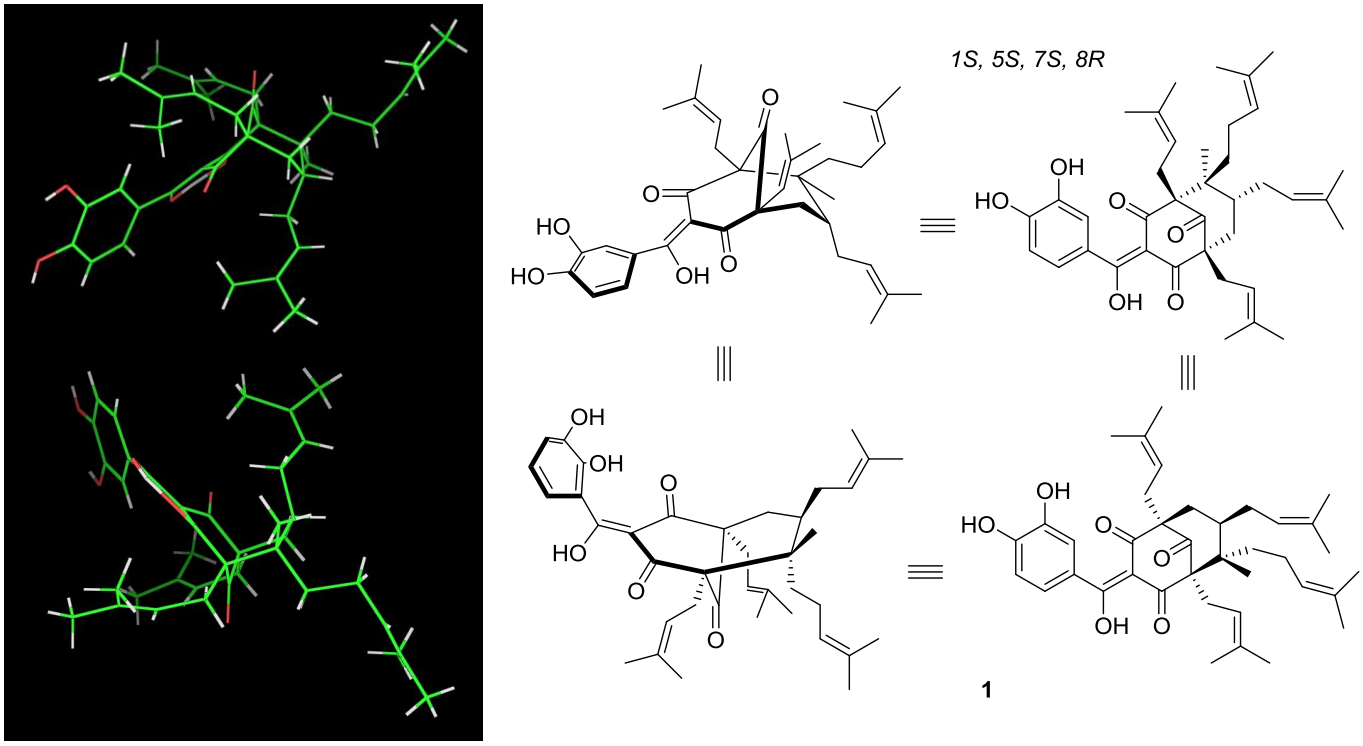


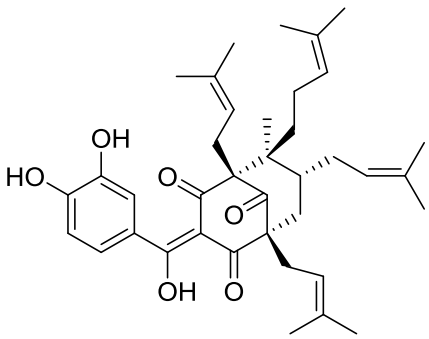
Figure 20. Représentations cristallographiques et topologique de la guttiférone A *(1S, 5S, 7S, 8R)*

Bien que certaines règles empiriques reliant stéréochimie et propriétés physico-chimiques (pouvoir rotatoire[25], spectroscopie RMN[79] et position du groupement aromatique[73] dans un cristal) aient été mises en évidence, nous ne pouvions trancher sur la stéréochimie absolue de la guttiférone A. Il faudrait faire des analyses plus approfondies, comme la cristallographie d'un analogue de la guttiférone A dont un groupement posséderait une chiralité connue.

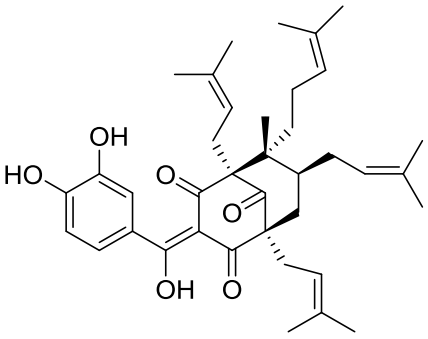
[25] G. Marti, Etudes chimiques et biologiques de *Clusiaceae* de la foret équatoriale guyanaise, *thèse de doctorat*, soutenu le 5 mai **2009**.

[73] F. *Martins et al,* Natural Polyprenylated Benzophenones: Keto-Enol Tautomerism and Stereochemistry, *J. Braz. Chem. Soc.*, ***2007***, 18, 8, 1515-1523

[79] Y. Fromentin, extraction et hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A, *thèse de doctorat*, soutenu le 27 septembre **2013.**



1S, 5S, 7S, 8R



1R, 5R, 7R, 8S

Figure 22 : les deux différents énantiomères possibles de la guttiférone A.

En plus de ne pas connaitre la configuration absolue de cette molécule, il existe chez les PPAPs de type B des équilibres céto-énoliques permanents (**Schéma 8**). En effet, ces derniers complexifient les analyses structurales. Ce phénomène peut être observé à travers des études de cristallographie, de RMN ou encore de voltamétrie[80]. A titre d'exemple, nous avons illustré ces équilibres céto-énoliques **figure 22**, lors d'expériences de spectroscopie RMN.

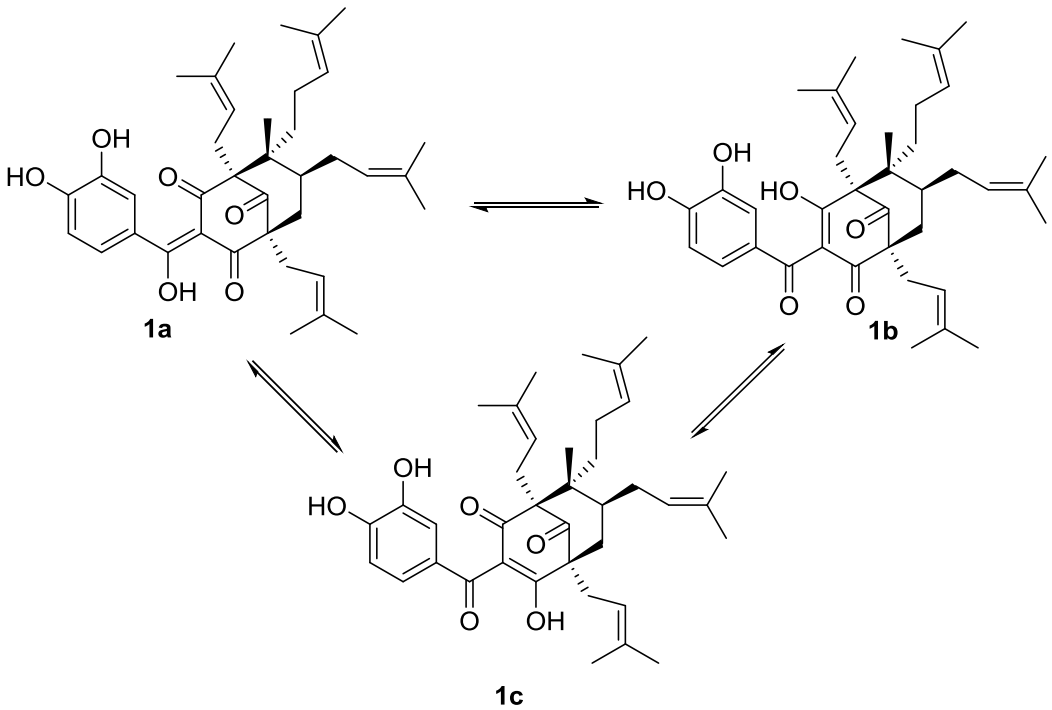


Schéma 8 : Équilibres céto-énoliques de la guttiférone A

[80] A. Nassi, Voltammetry Study of an Anti-HIV Compound by means of a Thin Organic Membrane, *International Journal of Electrochemistry*, **2013**, Article ID 902872.

Dans les solvants apolaires, (chloroforme deutéré ou le benzène deutéré) on observe trois produits : présence de trois systèmes ABX aromatiques, nombreux protons éthyléniques (**Figure 22a**). Dans les solvants polaires (méthanol, acétone, pyridine, acétonitrile), une forme moyenne apparait possédant un seul système ABX et quatre protons éthyléniques (**Figure 22b**). Pour simplifier les spectres, nous avons utilisé des solvants deutérés polaires.

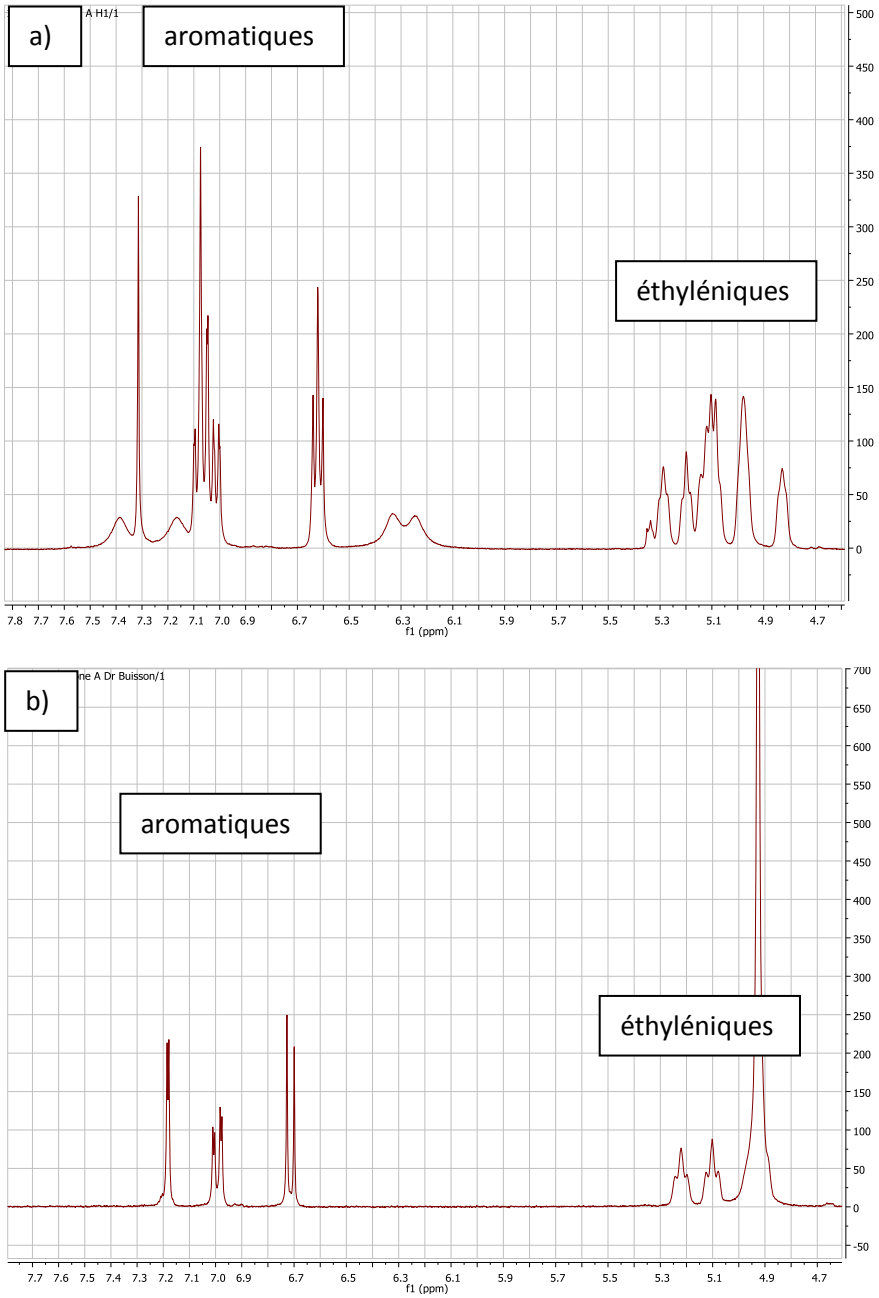


Figure 23 : Equilibres céto-énoliques de la Guttiférone A observables en RMN (4.6 à 7.8 ppm) (a) dans le $CDCl_3$; b) dans MeOD)

i.6.c. *La guttiférone A –perspectives*

Les travaux précédemment réalisés au laboratoire par le Dr. Yann Fromentin, ont montré que la guttiférone A était abondante au sein des fruits africains et qu'elle, possédait de bonnes activités pharmacologiques sur les trois cibles parasitaires. En effet, cette molécule est extraite des graines de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.45 % et montre une activité de l'ordre du micro-molaire sur *Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei* et *Leishmania donovani*. Les analogues synthétisés par notre équipe ont déjà permis d'obtenir des composés avec de meilleures activités pharmacologiques[81]. **Notre objectif a donc été de poursuivre les études de Relations Structure-Activité (RSA) en vu d'améliorer son profil pharmacologique.**

A ce stade de notre étude, nous étions convaincu du potentiel pharmacologique de la guttiférone A. Afin d'obtenir de grande quantité de cette dernière, nous devions trouver un organe du *S.g*. riche en guttiférone A. En effet, comme mentionné dans le point i.4., les métabolites secondaires du *S.g*. isolés par Gustasfson *et al.* en Afrique ne correspondent pas à ceux isolés par Marti *et al.* en Guyane française. De plus, le Dr Fromentin a pu isoler de la guttiférone A à partir d'organes provenant de ces deux continents. **Il nous paraissait donc intéressant de savoir si les compositions phytochimiques étaient différentes. Afin de répondre à cette question et d'améliorer nos connaissances du *S.g*., nous avons effectué des études métabolomiques. Cette question sera fondamentale pour la suite de nos travaux, notamment concernant le choix de la provenance de la matière première végétale.**

[81] Y. Fromentin *et al*, Synthesis of novel guttiferone A derivatives: In-vitro evaluation toward Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei and Leishmania donovani, *Euro J. Med. Chem*., **2013**, 65, 284-294.

CHAPITRE 1 : APPROCHES MÉTABOLOMIQUES

Introduction

Une des problématiques soulevée lors de la partie précédente, est l'apparente diversité phytochimique du *Symphonia globulifera* en fonction des différents lieux de récoltes. Les analyses de génomiques[28] et transcriptomiques[82] ont montré des différences chez *Symphonia globulifera,* suggérant ainsi une séparation entre deux écotypes. L'écotype « marais » est le plus représenté, vivant littéralement les pieds dans l'eau contrairement à l'écotype « *terra firme* », poussant pour sa part en hauteur sur les collines. Suite aux travaux déjà effectués au sein du laboratoire, nous avons décidé de nous concentrer sur les variations de métabolites secondaires provenant de l'écotype « marais » des différentes régions du monde.

Les analyses de métabolomiques sont des outils puissants permettant de répondre, au moins partiellement à ces questions. L'objectif de cette première partie était de savoir si les compositions phytochimiques des *S.g.* des deux régions du monde étaient différentes. Nous porterons une attention particulière à la présence de la guttiférone A, notre métabolite cible.

[28] K. Budde *et a*l, M. The ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera* L. f. (Clusiaceae) was not restricted to postulated Pleistocene refugia in Atlantic Equatorial Africa, *Heredity*, **2013**, 111, 66–76.

[82] L. Brousseau et al. High-throughput transcriptome sequencing and preliminary functional analysis in four Neotropical tree species *BMC Genomics,* **2014**, 15, 238-250.

Partie 1 : Etudes métabolomiques comparatives de *Symphonia globulifera*.

1.1.1. Lieux et conditions de récoltes

Grâce aux collaborateurs du laboratoire de Pharmacognosie à travers le monde, nous avons pu bénéficier d'aide pour la récolte des parties de *Symphonia globulifera* dans différentes régions du globe (**Figure 24**).

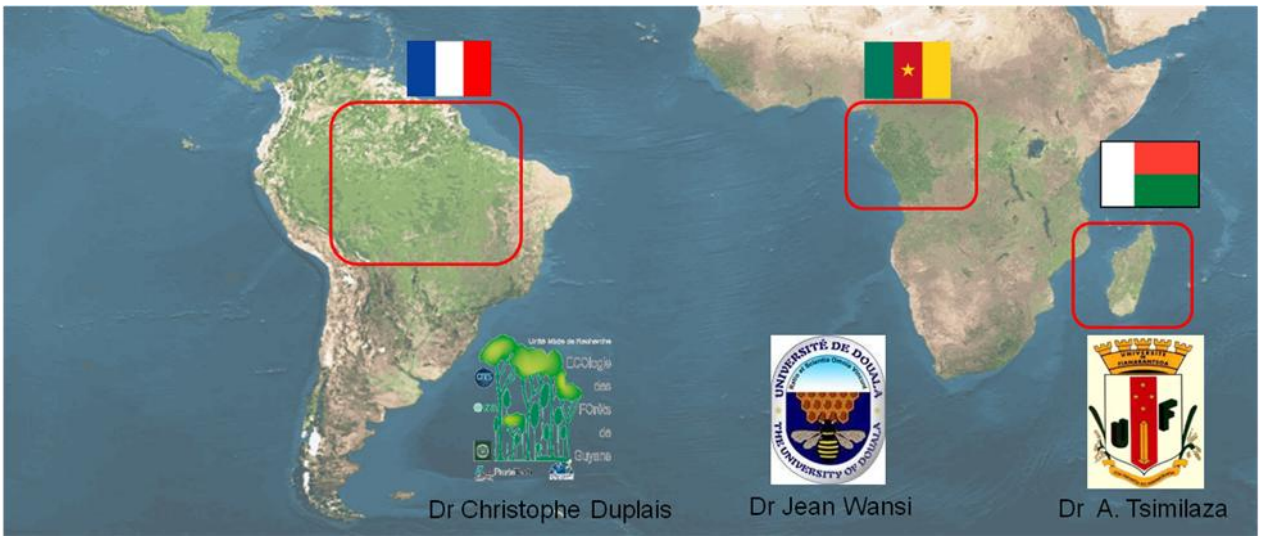


Figure 24 : Localisation des laboratoires collaborateurs

Nous avons tout d'abord envisagé de comparer les *S.g.* de ces trois régions du monde : Guyane française, Cameroun et Madagascar. Concernant la région camerounaise, le Dr Jean Wansi, de l'Université de Douala a pu récolter les parties de plantes concernées. Ces dernières furent prélevées sur le site de kribe, au bord du fleuve lobe dans un sol humide et marécageux. Leurs numéros de dépôt à l'herbarium national du Cameroun est : 50788. Concernant le continent sud-américain, les Drs Christophe Duplais et Guillaume Odonne ont récolté des échantillons en Guyane française sur le site de Macouria qui ont pour numéro de dépôt ODONNE770. Il est également important de noter que les conditions climatiques lors des récoltes furent relativement similaires. Possédant également une collaboration a Madagascar, nous avons contacté le Dr A. Tsimilaza. Cependant, notre collaborateur n'a pas pu identifier de *Symphonia globulifera* sur différents sites. Comme suggéré dans la thèse de K. Abdul-Salim en 2002[83], le *Symphonia globulifera* semble avoir disparu de son habitat originel. Une explication apportée pourrait être la forte concurrence avec les espèces du même genre, endémiques de Madagascar. Nous allons donc nous concentrer uniquement sur les deux autres sites.

1.1.2. Parties de plante étudiées

[83] K. Abdul-Salim, Systematics and Biology of Symphonia L. f. (Clusiaceae), thèse de doctorat, **2002**

Nous avons donc choisi d'étudier les organes les plus travaillées sur le plan phytochimique: les feuilles, le latex ainsi que les écorces. Ces dernières sont également utilisées en médecine traditionnelle (**Photo 5**).

Photo 5 : Parties du *Symphonia globulifera* récoltées a) latex ; b) écorces ; c) tiges et feuilles

La composition en métabolites secondaires pouvant varier en fonction de nombreux paramètres comme la période de l'année, nous avons choisi d'effectuer la récolte de ces organes à la même période : entre juin et juillet 2013. Il aurait été préférable de prélever ces mêmes échantillons à différentes périodes de l'année, afin de connaitre la périodicité des cycles de productions des métabolites, mais ceci ne fut malheureusement pas possible techniquement.

1.2.3. Outils métabolomiques.

La métabolomique est une science relativement récente qui combine des connaissances analytiques et statistiques. Tout comme la génomique et la transcriptomique, cet outil permet de répondre à des questions biologiques complexes, auxquelles un humain mettrait un temps considérable à traiter, tant la somme d'informations requises est importante. Les outils analytiques nécessaires pour apprécier le métabolome et convenir aux analyses métabolomiques, doivent posséder les qualités suivantes : réaliser des analyses avec un haut débit, une grande répétabilité ainsi qu'une bonne précision. Les techniques analytiques les plus utilisées dans ce domaine sont les chromatographies couplées aux spectroscopies de masses (LC-MS, GC-MS)[84] ainsi que la spectroscopie RMN[85]. Les techniques de LC-MS possèdent une meilleure sensibilité, permettant d'obtenir des informations sur des milliers des composés par échantillon. Plusieurs types d'informations sont obtenus lors des analyses : le temps de rétention du produit chromatographié ainsi que sa valeur de *m/z*. Si l'appareillage le permet, on peut également obtenir la fragmentation de chaque métabolite séparé et permettre ainsi l'attribution des composés. Les techniques basées sur la RMN sont quant à elles plus précises pour l'identification des métabolites. Chaque composé ayant plusieurs signaux qui lui sont spécifiques, la déconvolution totale à l'intérieur d'un extrait de tous les signaux d'un composé référence, nous assure la présence de celui-ci.

[84] K. Demter *et al*, Mass spectrometry-based metabolomics*, Mass Spectrom Rev,*. **2007**, 1, 51-78.

[85] O. Beckonert et al., Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts, **2007**, Nature Protocols, 2, 2692 – 2703.

Lors d'études de métabolomique non ciblées, l'identification des métabolites se fait généralement par comparaison avec une base de données. Celles de spectrométrie de masse sont très fournies, comprenant parfois plusieurs dizaines de milliers de composés. Concernant la spectroscopie de RMN ces dernières sont beaucoup plus limitées dû au fait que les signaux varient en fonction des solvants utilisés.

La présence de centres chiraux dans la structure de certains métabolites secondaires, ne peut être mis en évidence par les études de fragmentation en spectroscopie de masse. Nous avons donc choisi d'utiliser également la RMN afin de compléter la recherche d'information certifiant l'identification des composés. Il existe d'autres outils analytiques pouvant être utilisés comme l'UV[86] ou l'IR[87], ou une combinaison de certains d'entre eux[88]. Toutefois, l'équipement nécessaire étant souvent très couteux et très spécifique, nous nous limiterons à ces deux techniques qui sont donc très complémentaires

L'outil statistique capable d'intégrer les données obtenues est quant à lui, très dépendant de la question biologique posée.

Nous tenons à remercier le bureau des bourses doctorales de mobilité internationale (BDMI), pour m'avoir permis de me rendre au laboratoire de chimie des substances naturelles de l'Université Capodistrienne d'Athènes. Ce laboratoire dirigé par le Pr. A. Skaltsounis possède les appareillages nécessaires pour effectuer les deux volets analytiques (LC-MS et RMN) de notre étude. Nous avons pu utiliser une UPLC couplée à un appareil « orbitrap » pouvant réaliser des fragmentations (MS^n) et à un appareillage de RMN de type 600 Mhz (**photos 6)**. Les résultats obtenus avec ces des deux techniques complémentaires ont été comparés et nous ont permis d'identifier un maximum de composés.

Photo 6 : appareillage de type a) UPLC-MS^n, b) RMN 600 MHz

[86] R. Goodacre, Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *J Exp Bot.*, **2005**, 56, 245–254.

[87] M. Defernez and RH Wilson. Infrared spectroscopy: instrumental factors affecting the long-term validity of chemometrics models. *Anal Chem*., **1997**, 69: 1288–1294.

[88] K. Bingol and R. Brüschweiler, NMR/MS Translator for the Enhanced Simultaneous Analysis of Metabolomics Mixtures by NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry: Application to Human Urine, *J. Proteome Res*., **2015**, 14, 2642−2648.

1.1.4. Préparation des extraits

Chaque organe comprend plusieurs milliers de métabolites nécessaires au bon fonctionnement de la plante. Ces composés étant de nature très variée, il est impossible de pouvoir extraire de façon exhaustive tous ces composés. Le choix du ou des solvants, ainsi que de la méthode d'extraction sont donc très importants et influe sur le reflet du métabolome que l'on obtiendra. Comme notre étude n'était pas directement orientée sur une famille de métabolites, nous avons choisi un système permettant l'extraction d'un maximum de type de métabolites. Nous avons utilisé un mélange dichlorométhane / méthanol (1 :1), cette méthode étant connue pour extraire à la fois des métabolites polaires et apolaires[89].

Dans le but de réduire la variabilité au sein de la population, le matériel végétal de différents arbres a été broyé manuellement en petits morceaux et mélangé. Six réplicats de chaque partie de plantes furent donc préparés afin d'obtenir la quantité d'extrait nécessaire pour les analyses par RMN. Ce nombre élevé de réplicats permet de minimiser les erreurs et variations analytiques.

Nous avons séparé les extraits en deux phases par ajout d'eau et de dichlorométhane. La phase polaire comprenant les métabolites primaires et secondaires les plus polaires. La phase plus apolaire comprend majoritairement les métabolites secondaires comme les PPAPs, xanthones ou bisflavonoïdes.

Les six réplicats des phases polaires et apolaires provenant de chaque partie de plante, sont ensuite évaporés au speed-vac avant de préparer des échantillons à des concentrations adéquates, pour les analyses de LC-MS et RMN. Un exemplaire de contrôle qualité (QC) comprenant chaque élément à analyser en LC-MS a également été préparé pour s'assurer du bon déroulement des analyses.

1.1.5. Acquisition des données de LC-MS^n

Afin de séparer au mieux les composés en un minimum de temps, les conditions de chromatographie sur C_{18} ont été mises au point, préalablement sur l'échantillon QC en utilisant un gradient de méthanol. Etant donné le grand nombre d'échantillons à séparer, nous avons donc rajouté une phase de lavage et de rééquilibration. Dans le but de minimiser encore les erreurs analytiques, l'ordre d'analyse des échantillons a été randomisé, puis un échantillon QC ainsi qu'un blanc a été inséré tous les trois et cinq analyses respectivement.

1.1.6. Acquisition des données RMN

L'aquisition des données en RMN a été réalisé par un pulse de COSY 1D pour acquérir les signaux correspondants aux protons des extraits. 32 scans furent suffisants pour une bonne résolution des signaux.

[89] U. Roessner and DA Dias, Plant tissue extraction for metabolomics, *Methods Mol Biol*., **2013**, 1055, 21-28.

1.1.7. Traitement des données de LC-MS^n

Afin de pouvoir utiliser les données plus librement, ces dernières ont été converties « mz convertor » de proteoWizard[90] depuis leurs formats .RAW en format .MzML . Les chromatogrammes de LC-MS ont été ensuite alignés en utilisant le paquet XCMS[91], du logiciel R, avec les paramètres suivants : un ratio signal sur bruit de 3/1 pour la détection des pics, un pas de 0.2 min de temps de rétention ainsi qu'une différence d'au moins 0.05 *m/z* pour les pics en coélution. Les analyses statistiques étant précises, cette étape d'alignement des pics était indispensable au bon déroulement de l'analyse mathématique, qui ne considère que des données binaires. L'annotation de ces pics a été réalisée grâce au paquet CAMERA[92] toujours sous le logiciel R (**Figure 25**).

La matrice générée est réorganisée et annotée manuellement afin de supprimer les données inutiles et de la rendre exploitable par les logiciels d'analyses statistiques (**Figure 26**). Cette réorganisation demande de mettre dans la 1ère colonne la totalité des *m/z* détectés et de créer les ensembles d'échantillons similaires (réplicats). Une matrice sera créée pour chaque organe afin de faciliter leurs comparaisons. Une valeur spécifique ou une case vide doit également être imputée aux valeurs manquantes, afin que les logiciels puissent prendre en compte cette donnée. La présence d'une valeur = 0 dans une multiplication peut complètement fausser l'analyse. Cette matrice a été alors importée sur la plateforme web, metaboanalyst (www.metaboanalyst.ca)[93] pour les phases de traitement des données et d'analyse.

[90] http://proteowizard.sourceforge.net/

[91] C. A. Smith et al, Xcms: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Analytical Chemistry,* **2006**, 78, 779–787.

[92] C. Kuhl *et al*, Camera: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets, *Analytical* Chemistry, **2012**, 84, 283–289.

[93] J. Xia *et al.*, MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful, *Nucl. Acids Res*, **2015**, 1-7.

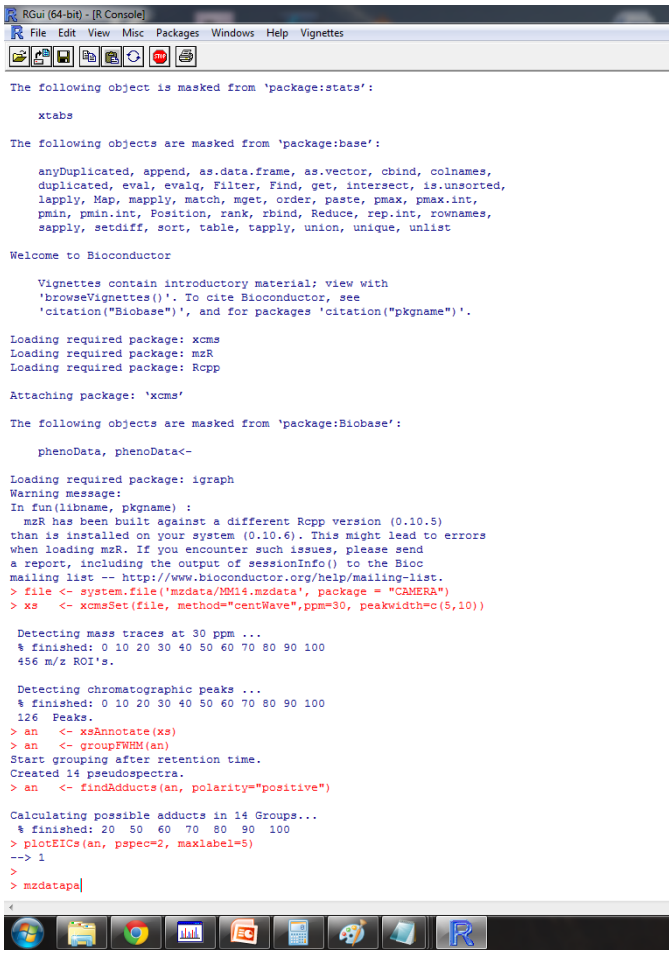


Figure 25 : Prise d'écran durant l'étape d'alignement des pics sous R.

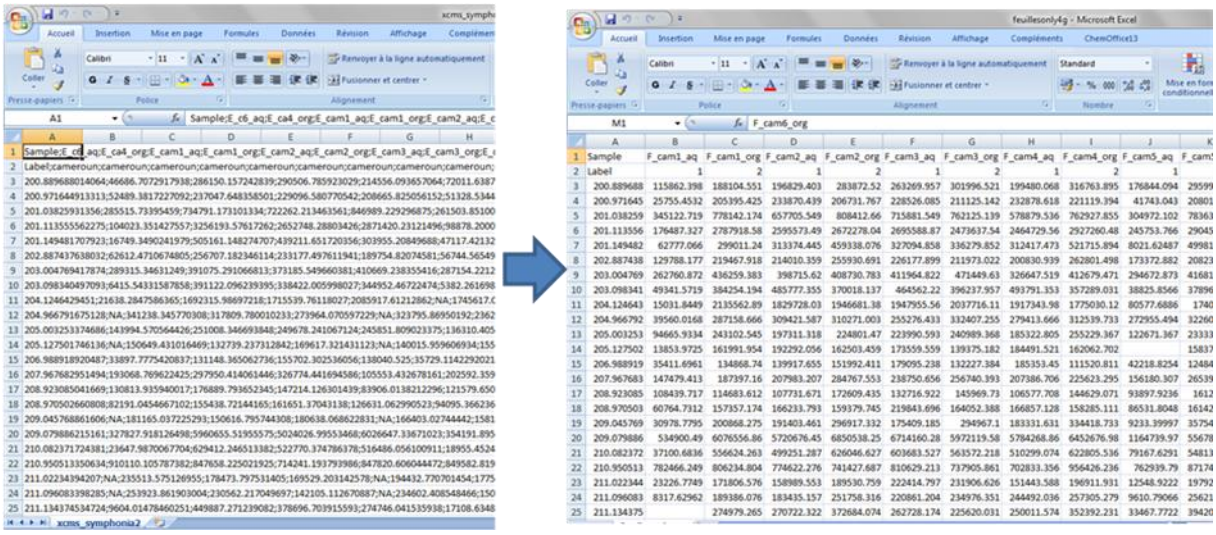


Figure 26 : Prise d'écran de la réorganisation de la matrice obtenue avec le logiciel Excel

La première étape du traitement des données, a été l'imputation des valeurs manquantes. Comme précisé précédemment, la présence d'une valeur égale à zéro dans un calcul d'analyse ou des multiplications peut rendre le résultat caduc.

Plusieurs options sont proposées par la plateforme :

- L'exclusion des variables avec des valeurs manquantes.
- Le remplacement des valeurs manquantes par de petites valeurs.
- Le remplacement des valeurs manquantes par la moyenne ou la médiane de la colonne.
- Le remplacement des valeurs manquantes par des valeurs déterminées grâce à des algorithmes tels que : KNN (K Nearest Neighbour), PPCA, BPCA (Bayesian Principal Component Analysis) ou SVD Impute (Singular Value Decomposition).

L'algorithme KNN[94], permettant de remplacer les valeurs manquantes d'une colonne, par une valeur non nulle correspondante à celles qui des colonnes présentant le plus de similarités (réplicats), présente probablement le plus d'avantages. Les données ont été ensuite transformées en leurs logarithmes afin de mettre en avant les différences les plus faibles.

L'étape suivante, la filtration des données possède deux utilités : la réduction de leur nombre qui permet de ne pas saturer les serveurs ainsi que de faire ressortir les données les plus importantes[95]. Les données furent donc filtrées en fonction de leurs gammes interquartiles. Considérant le très grand nombre de variables, une distribution normale (suivant la loi de Gauss) est attendue. Avant de procéder à une analyse statistique, une étape de normalisation sur la médiane fut nécessaire comme illustré **figure 27**.

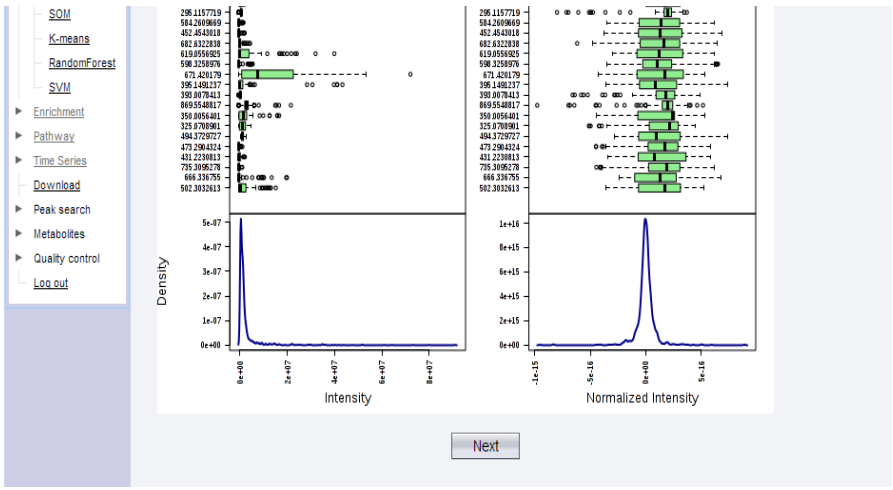


Figure 27 : Etape de normalisation

[94] O. Hrydziuszko and M. Viant, Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline, *Metabolomics,* **2012**, 8, 161–174.

[95] A. Hackstadt and A. Hess, Filtering for increased power for microarray data analysis, *BMC Bioinformatics*, **2009**, 1, 10-11

Les données furent ensuite élevées à leur logarithme, afin de mettre en avant les différences les plus minimes.

Une analyse de composantes principales (ACP) a été ensuite conduite, afin de rechercher les variables responsables des similarités/différences. En effet, cette analyse multivariée transforme les variables corrélées statistiquement en nouvelles variables décorrélées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées "composantes principales", ou « axes principaux ». Cette analyse est à la fois géométrique (les variables étant représentées dans un nouvel espace, selon des directions d'inertie maximale) et statistique (la recherche portant sur des axes indépendants expliquant au mieux la variance des données). Les graphiques générés sont représentés **figures 28 -31**.

1.1.8. Traitement des données de RMN

Après alignement des spectres RMN, ceux-ci sont découpés en « buckets » de 0.02 ppm à l'aide du logiciel Amix de Bruker. Ces « buckets » furent réorganisés dans des matrices en .csv de la même façon que pour les données de LC-MS.

Par soucis d'homogénéité, les données furent traitées avec les mêmes paramètres que les données de LC-MS sur le site metabonanalyste. Les graphiques générés sont illustrés **figures 28-31**.

1.1.9. Interprétation des données

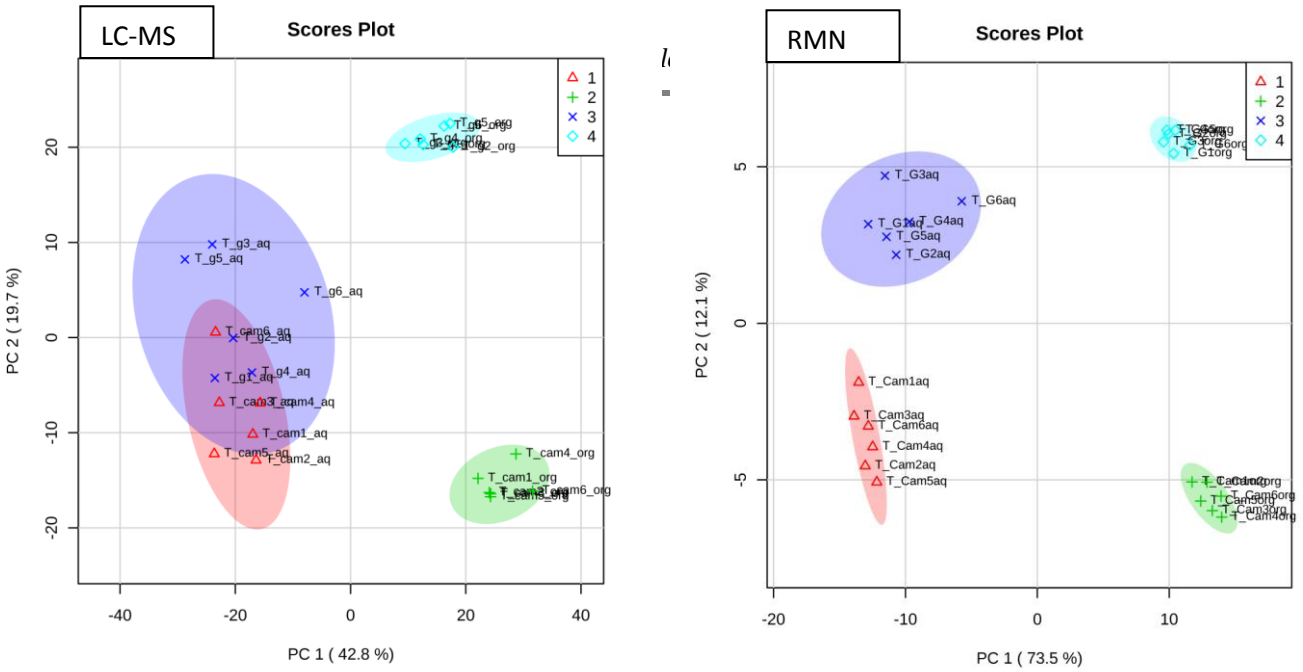


Figure 28 : ACP provenant des données de LC-MS et RMN provenant des tiges. Les ellipses représentent la zone de 95 % de confiance. Les couleurs rouge, verts, bleu et turquoise représentent respectivement les extraits polaires et apolaires provenant du Cameroun et les extraits polaires et apolaires provenant de la Guyane française.

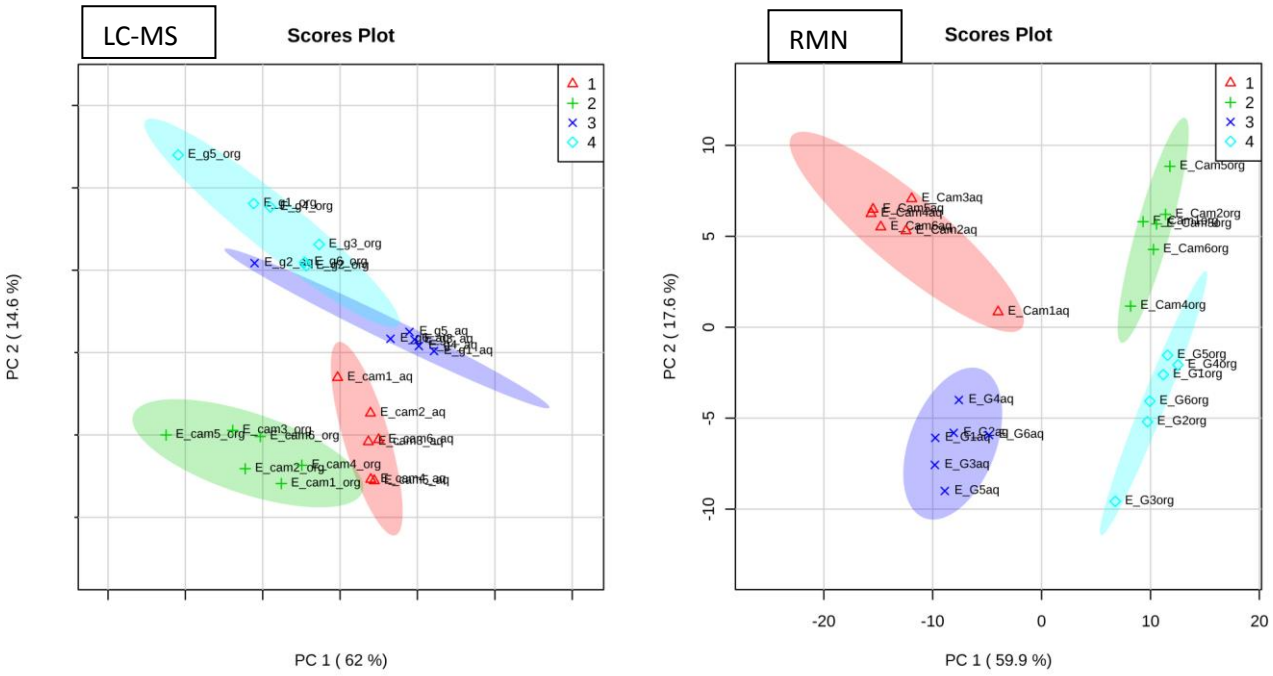


Figure 29 : ACP provenant des données de LC-MS et RMN des écorces. Les ellipses représentent la zone de 95 % de confiance. Les couleurs rouge, vert, bleu et turquoise représentent respectivement les extraits polaires et apolaires provenant du Cameroun et les extraits polaires et apolaires provenant de la Guyane française.

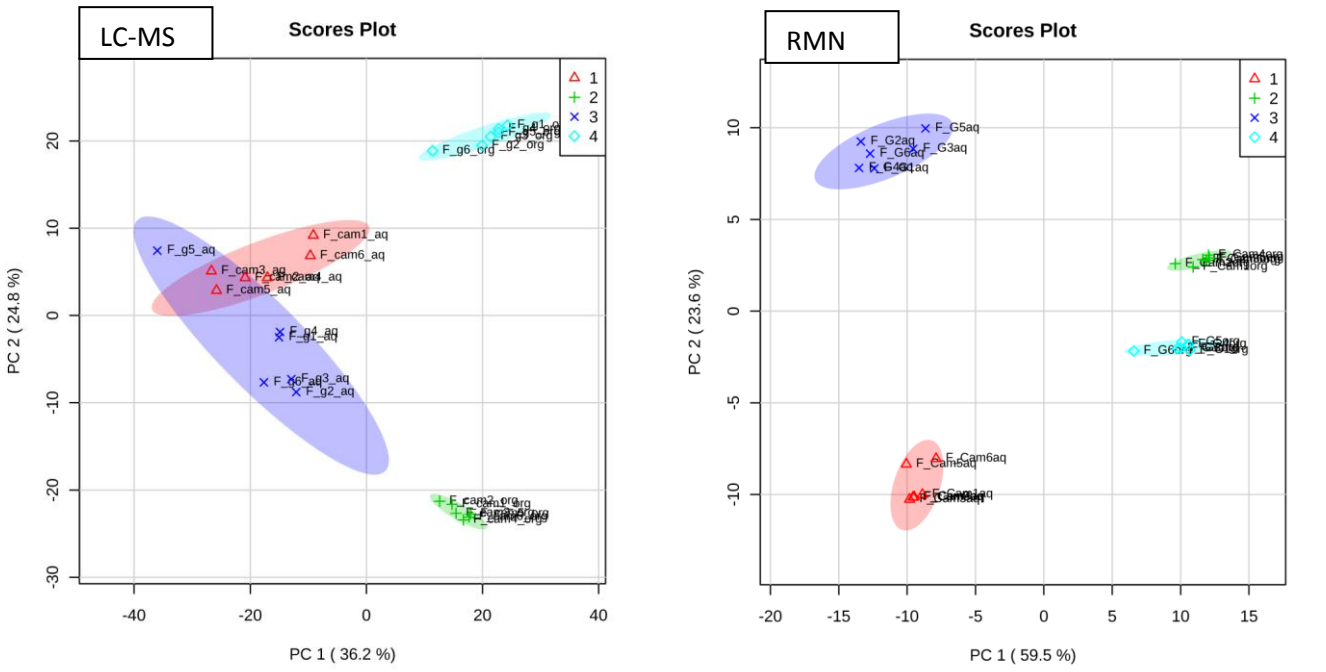


Figure 30 : ACP provenant des données de LC-MS et RMN des feuilles. Les ellipses représentent la zone de 95 % de confiance. Les couleurs rouge, vert, bleu et turquoise représentent respectivement les extraits polaires et apolaires provenant du Cameroun et les extraits polaires et apolaires provenant de la Guyane française.

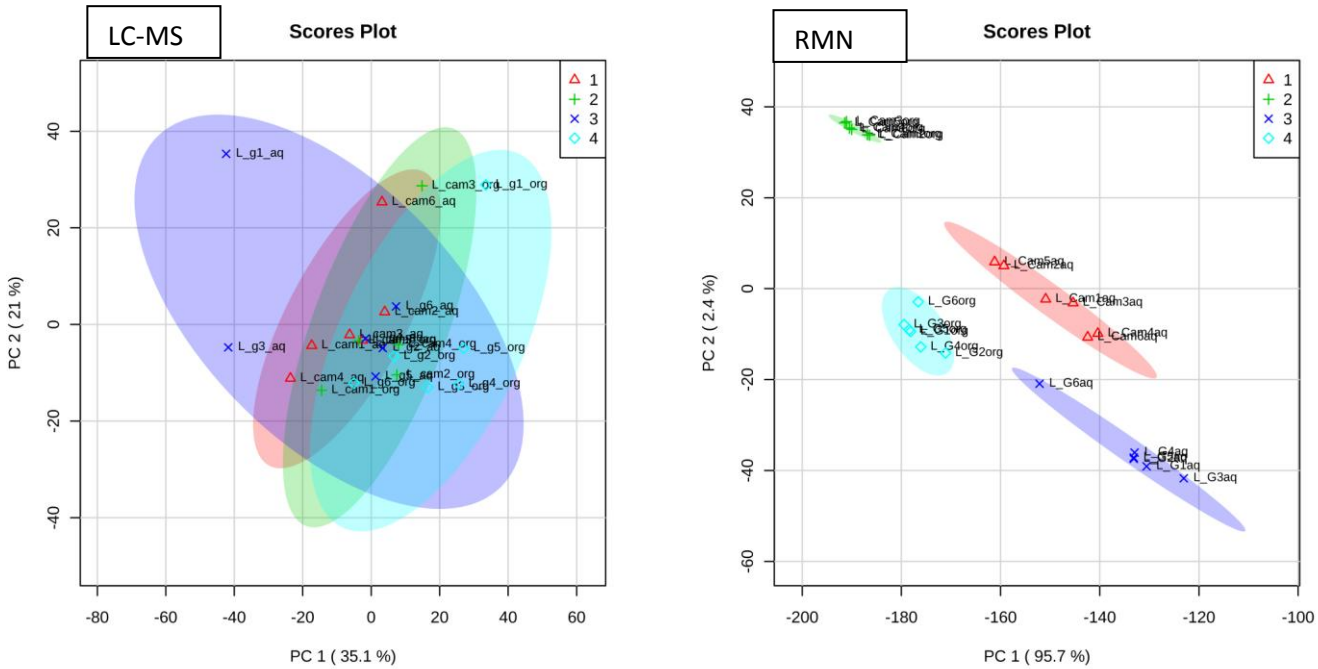


Figure 31 : ACP provenant des données de LC-MS et RMN des latex. Les ellipses représentent la zone de 95 % de confiance. Les couleurs rouge, vert, bleu et turquoise représentent respectivement les extraits polaires et apolaires provenant du Cameroun et les extraits polaires et apolaires provenant de la Guyane française.

L'observation des ACP ont permis de déduire plusieurs informations.

- Concernant les données provenant des tiges. Le recoupement et/ou la proximité des ellipses pour les métabolites secondaire des phases polaires, indiquait que la variance pourrait être expliquée majoritairement par les métabolites les plus apolaires. De plus, cette méthode était pour les deux méthodes (SM et RMN) significative car l'explication de la variance est supérieure à 75 %. Le traitement statistique des 2500 variables *m/z* et de la centaine de « buckets » a montré, pour cet organe, des résultats similaires.

- Un raisonnement équivalent a pu être appliqué aux extraits des écorces.

- Par rapport aux résultats précédents, les analyses statistiques obtenues pour les feuilles, ont suggéré une interprétation différente. La LC-MS indiquerait que la variance serait due aux métabolites secondaires apolaires. Par contre, en étudiant les données obtenues par RMN, cette fois-ci la variance serait due aux métabolites les plus polaires. Il était cependant certains que les *S.g*. provenant des différentes régions possèdent des métabolomes différents. Ce résultat n'était pas forcément surprenant au regard de la sensibilité de ces deux techniques.

- Les données provenant du latex étaient plus ambiguës. les données provenant de la spectroscopie de masse ne permettaient pas de distinguer des regroupements clairs en fonction des composantes principales une et deux. Toutefois, l'observation de l'ACP suivant les composantes principales une et trois, montrait des résultats similaires à ceux observés en RMN. Par soucis de clarté, nous n'avons pas insérer ce graphique mais comparaison nous a poussés à tout de même identifier les variables responsables des différences.

Au vue de ces résultats, il semblait évident que les *Symphonia globulifera* des différentes régions possèdent une composition phytochimique différente. Nous avons donc essayé d'identifier les métabolites responsables de ces différences et essayer d'expliquer ces différences. Pour identifier ces composés nous nous sommes servis des données de LC-MS et plus particulièrement, des données obtenus par fragmentation. Un test unidirectionnel ANOVA a donc été effectué afin de mettre en évidence les variables responsables de la variance. Les 50 variables (p > 0.001) concernant chaque partie de plantes ont été sélectionnées, classées et organisées (en utilisant l'algorithme de ward) dans des heatmaps afin de mieux observer les régio-spécificités représentées **figures 32-35**. Un code couleur représente les concentrations relatives en ions, en fonction des différents échantillons (du bleu vers le rouge pour une plus forte concentration).

Chacune de ces variables a fait l'objet d'une d'identification suivant un processus illustré **figure 36**. La valeur de *m/z* mesurée est tout d'abord comparée à la valeur théorique d'ions correspondants (en mode négatif) inclus dans deux bases de données avec une tolérance de

5 ppm. La première, dite « spécifique », comprend tous les métabolites secondaires déjà isolés *de Symphonia globulifera* ainsi que tous les PPAPs isolés jusqu'au moment de l'étude (Décembre 2014). La seconde, plus générale, est développée par le SCRIPS : « METLIN » (www.metlin.com), qui est une base de données très large de produits naturels, qui comprend parfois des informations sur la fragmentation de certains produits.

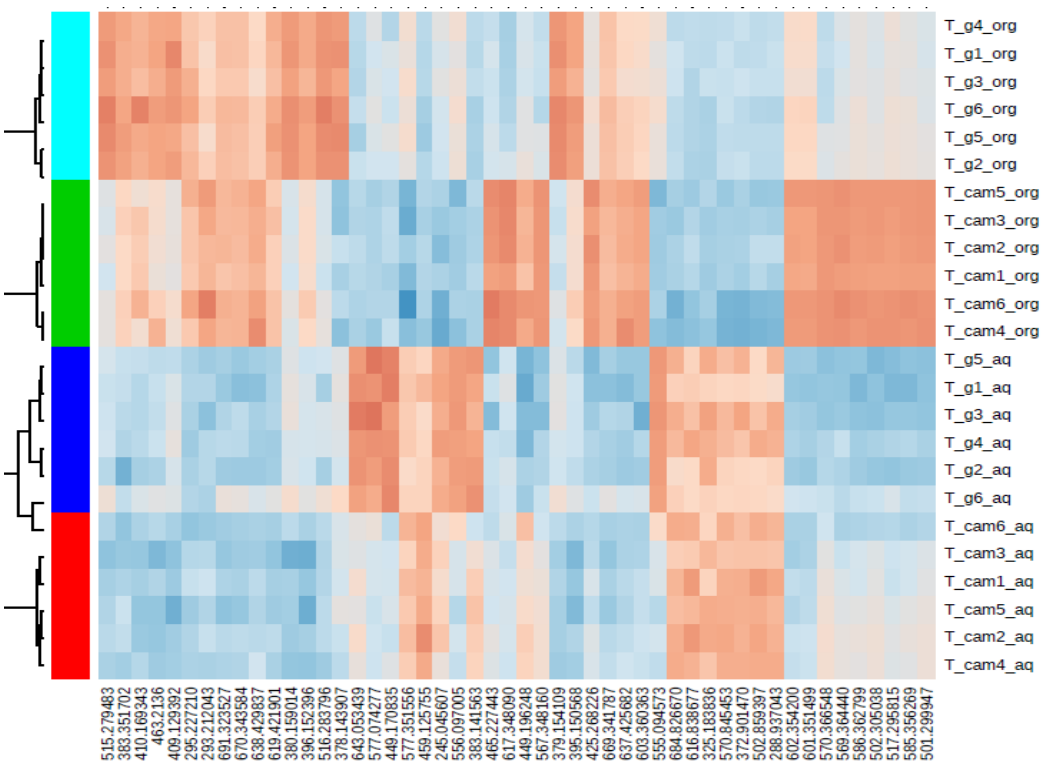


Figure 32 : Heatmap résultante de l'ACP des données LC-MS des tiges

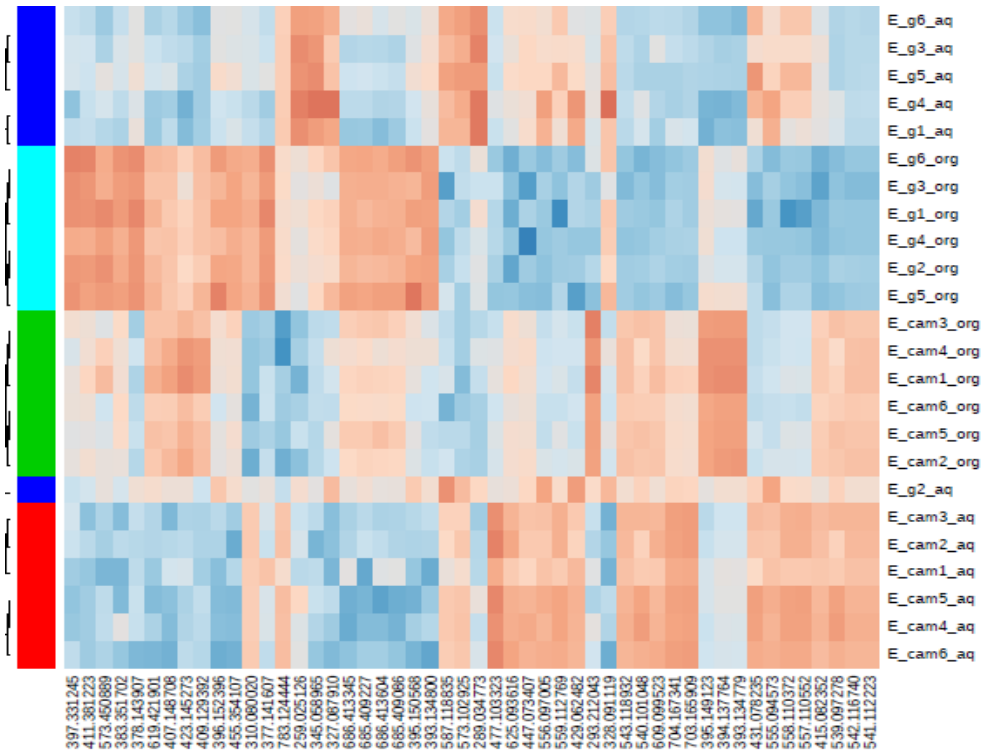


Figure 33 : Heatmap résultante de l'ACP des données LC-MS des écorces

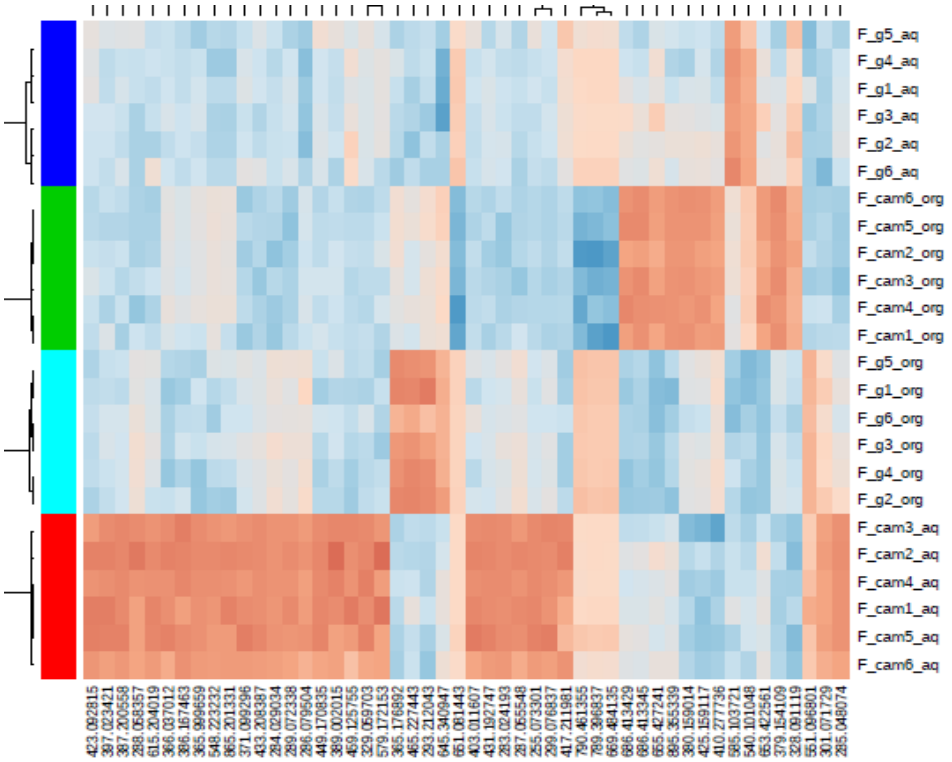


Figure 34 : Heatmap résultante de l'ACP des données LC-MS des feuilles

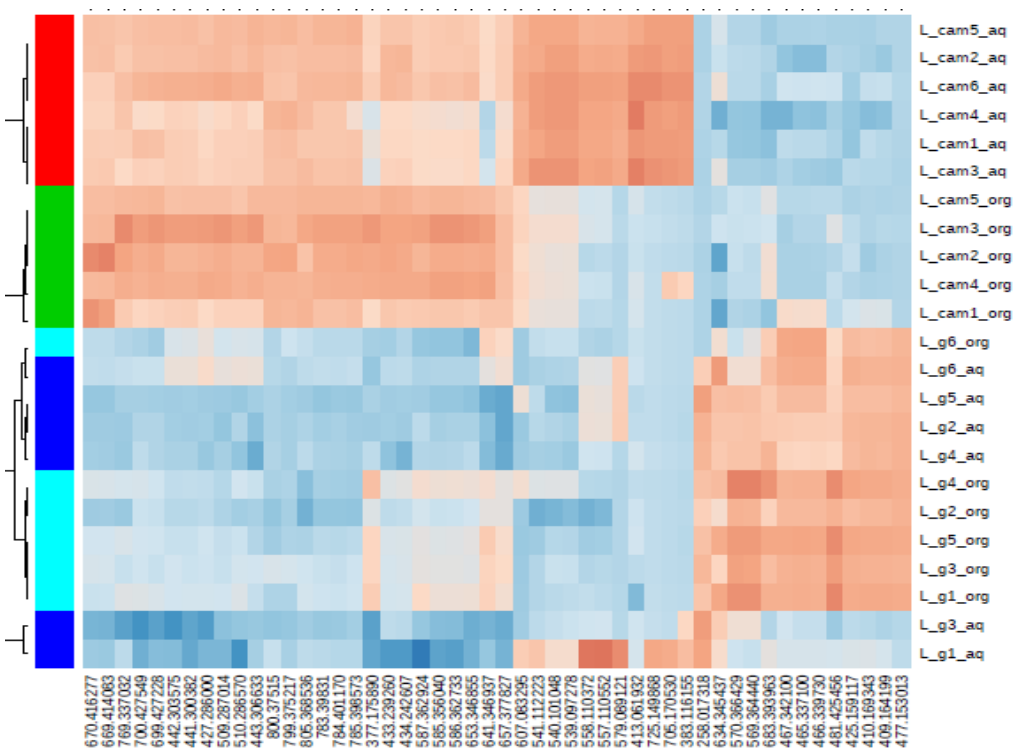


Figure 35 : Heatmap résultante de l'ACP des données LC-MS du latex

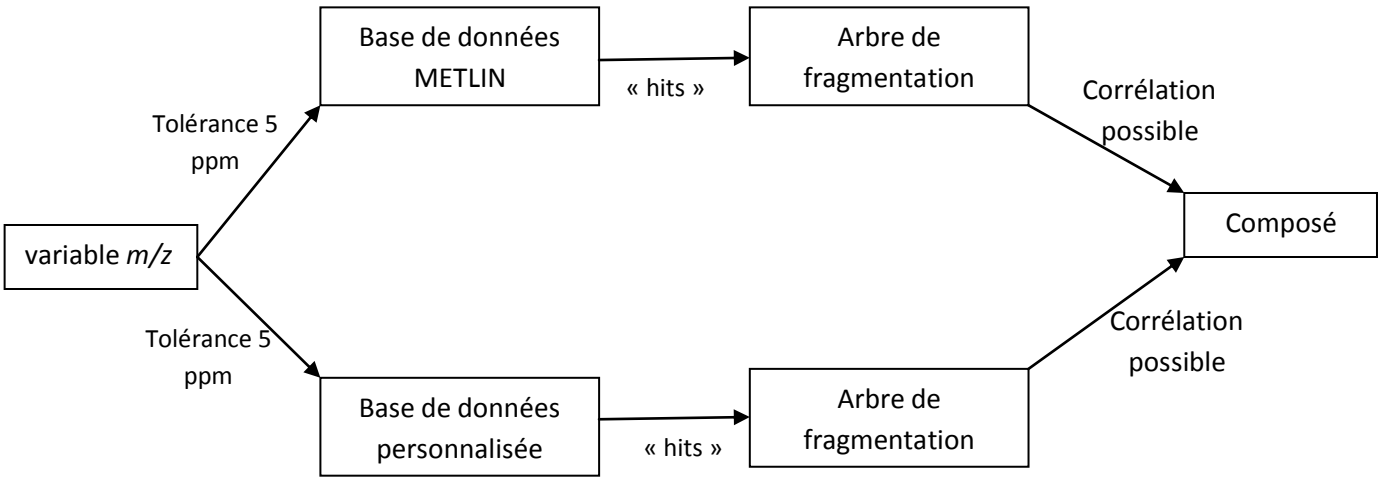


Figure 36 : Représentation du processus d'identification des variables.

Si des correspondances sont apparues, un arbre de fragmentation a donc été réalisé afin d'essayer d'identifier les métabolites en fonction de leurs structures.

Sur les 200 bio-marqueurs présents, plus de la moitié n'a pu être identifiée, faute de correspondance dans les bases de données ou de fragmentation nécessaire (cf. partie expérimentale). Certains, annotés « redondance » étaient en fait des variables correspondants au pic M+1 ou M+2, d'un composé déjà mesuré.

55 variables, dont la correspondance dans une base de données était cohérente avec les données de fragmentation, ont en revanche été possiblement identifiées avec (un niveau de certitude de trois selon le « standards for chemical analysis in metabolomics" [96]) et listés **tableaux 7-10).** La « p value » (valeur inversement proportionnelle à la proportion d'explication de la variance), leurs masses théoriques et l'erreur expérimentale mesurée ainsi que la région spécifique sont également indiquées dans ces tableaux. Certaines variables, plus spécifiques à une phase plus qu'à une région sont annotées « Aucune » dans la colonne région.

entrée	"p value"	masse	Δ ppm	composé	Région spécifique
1	2.08 x10^{-19}	299.076837	1	Acide Diméthyl fukiique	Cameroun
2	4.04 x10^{-17}	283.0241932	1	Rheine	Cameroun
3	4.22 x10^{-16}	790.4613555	0	Acide gras en C43	Guyane Fr.
4	6.96 x10^{-16}	289.0723383	1	Catéchine ou énantiomère	Cameroun
6	1.05 x10^{-14}	301.0717298	1	Héspérétine	Cameroun
7	1.68 x10^{-13}	865.2013317	1	Robinetinidol	Cameroun
8	2.83 x10^{-13}	425.1591175	0	Mangostanol	Cameroun
9	3.24 x10^{-13}	379.1541098	0	Garcinone A ou 6-Déoxy-gamma-Mangostine ou 8-Désoxygartanine	Cameroun
10	4.62 x10^{-13}	465.2274432	0	Déoxygedunine	Guyane Fr.
11	1.04 x10^{-12}	293.2120432	0	Acide gras en C18	Guyane Fr.

Tableau 7 : « putatives » composés régio-marqueurs des feuilles

[96] L. Sumner *et al*.,Proposed minimum reporting standards for chemical analysis, *Metabolomics,* **2007**, 3, 211–221.

entrée	"p value"	masse	Δ ppm	composé	Région spécifique
1	$2.98x10^{-13}$	409.1293926	2	Pré-5-méthoxydurmillone	Aucune
2	$5.44x10^{-12}$	555.094573	2	Morelloflavone	Aucune
3	$9.41x10^{-12}$	557.1105521	2	Dihydromorelloflavone	Aucune
4	$2.29x10^{-11}$	703.1659091	1	Occidentoside	Guyane Fr.
6	$3.26x10^{-11}$	397.3312456	0	Acide gras en C24	Guyane Fr.
7	$4.09x10^{-11}$	393.1348007	2	Xanthone V1	Cameroun
8	$1.10x10^{-10}$	293.2120432	0	Acide gras en C18	Cameroun
9	$2.97x10^{-10}$	395.1491237	2	Muxiangrin III	Cameroun
10	$4.87x10^{-10}$	383.3517028	0	Acide gras en C22	Guyane Fr.
11	$6.13x10^{-10}$	619.4219012	2	(3b,7b,22x)-Cucurbita-5,24-diene-3,7,23-triol 7-glucoside	Aucune
12	$1.08x10^{-9}$	407.1487087	3	9-Hydroxycalabaxanthone	Aucune
13	$2.95x10^{-9}$	783.1244448	4	C.I. "Acid Green 5"	Guyane Fr.
14	$3.07x10^{-9}$	327.0879101	1	Ugaxanthone	Guyane Fr.
15	$3.13x10^{-9}$	377.1416074	1	Déméthylcalabaxanthone	Guyane Fr.
16	$3.21x10^{-9}$	423.1452734	1	O6 Démethyle-Symphonine	Aucune
17	$1.1x10^{-8}$	259.025126	1	Norathiriol ou énantiomère	Guyane Fr.

Tableau 8 : « putatives » composés régio-marqueurs des écorces

entrée	**"p value"**	**masse**	**Δ ppm**	**composé**	**Région spécifique**
1	$3.15x10^{-16}$	379.1541098	2	6-Déoxy-gamma-mangostin ou 8-Désoxygartanin ou garcinone A	Guyane Fr.
2	$8.29x10^{-16}$	617.3480909	2	Coccinone B ou 7-epi Coccinone B	Cameroun
3	$3.77x10^{-14}$	295.2272108	1	Acide gras en C18	Cameroun
4	$4.37x10^{-14}$	380.1590147		Raphantine	Guyane Fr.
6	$2.96x10^{-13}$	619.4219012	1	(3b,7b,22x)-Cucurbita-5,24-diene-3,7,23-triol 7-glucoside	Cameroun
7	$3.92x10^{-13}$	293.2120432	1	Acide gras en C18	Cameroun
8	$3.76x10^{-13}$	555.094573	1	Morreloflavone	Guyane Fr.
9	$3.39x10^{-13}$	501.2999478	2	Kolanone	Cameroun
10	$6.73x10^{-13}$	585.3562699	0	Oblongifolin E	Cameroun
11	$7.51x10^{-13}$	567.3481605	2	Otoginine A	Cameroun
12	$8.88x10^{-13}$	245.0456071	3	1,3,9-Triméthyluric acid ou 1,3,7-Triméthyluric acid	Guyane Fr.
13	$4.22x10^{-12}$	463.2136	2	Dulciol A	Cameroun

Tableau 9 : « putatives » composés régio-marqueurs des tiges

entrée	"p value"	masse	Δ ppm	composé	Région spécifique
1	$6.68x10^{-13}$	783.39831	4	Acide Ustilagique	Cameroun
2	$2.50x10^{-11}$	669.4140838	0	Guttiférone C ou D	Cameroun
3	$2.39x10^{-9}$	433.2392601	2	Acide gras phosphorique en C21	Cameroun
4	$3.23x10^{-9}$	699.4272282	0	Guttiférone B ou Oblongifolin D	Cameroun
6	$2.08x10^{-8}$	585.3560407	0	14 -Déoxygarcinol	Cameroun
7	$2.93x10^{-8}$	725.1498687	0	Vert de Guinée	Cameroun
8	$3.72x10^{-8}$	586.362733	0	Guttiférone J	Cameroun
9	$6.05x10^{-8}$	441.3003823	2	(3beta,5alpha,9alpha,22E,24R)-5,9-Epidioxy-3-hydroxyergosta-7,22-dièn-6-one	Cameroun
10	$1.33x10^{-7}$	425.1591175	1	Mangostenol ou Mangostanol	Guyane Fr.
11	$9.63x10^{-7}$	465.3371007	2	(17Z)-1α,25-dihydroxy- 26,27-diméthyl- 17,20,22,22,23,23-hexadehydro 24a,24b-Dihomovitamin D3	Guyane Fr.
12	$1.32x10^{-6}$	467.3421005	2	Solacapine	Guyane Fr.
13	$1.46x10^{-6}$	557.1105521	2	Dihydromorelloflavone	Cameroun
14	$5.74x10^{-6}$	683.3939638	2	Goyaglycoside A	Guyane Fr.

Tableau 10 « putatives » composés régio-marqueurs du latex

Les données de fragmentations de ces composés sont disponibles dans la partie expérimentale, nous détaillerons ici à titre d'exemple, l'identification de deux composés : le pré-5-méthoxymurmillone **71** et la coccinone C/ 7-épi coccinone C **72/73,** à partir de leurs données de fragmentations.

La variable *m/z* = 409.129392 ne correspondait à aucun métabolite présent dans notre base de données spécifique, toutefois 15 métabolites furent proposés par METLIN. La perte de 28 uma, donnant l'ion le plus intense sur le spectre de MS^2 (**Figure 37**) correspondait à la contraction des cycles flavoniques et xanthoniques. Cette contraction induirait une perte de monoxyde de carbone. Cette information nous a permis d'écarter les structures indiquées **(Figure 38**). Les trois pertes successives de 15 uma sont quant à elles, caractéristiques du départ de trois unités méthoxylées. Par conséquent, dix composés ne possédant pas ces trois unités méthoxylés ont été retirés des possibilités (**Figure 37**). L'analyse du spectre de MS^3 montre une fragmentation typique d'une chaine prénylée (perte de 44, 55 et 69 uma) réduisant alors les possibilités à seulement un composé possédant cette chaîne. La perte de 120 uma, caractéristique d'une partie benzo-dimethoxy, nous a confortés dans

l'identification de la pré-5-méthoxymurmillone **71**, unique composé possédant tous les éléments précédemment décrits. Les espèces issues de la fragmentation, clés dans l'identification de **71** sont représentées **figure 36**).

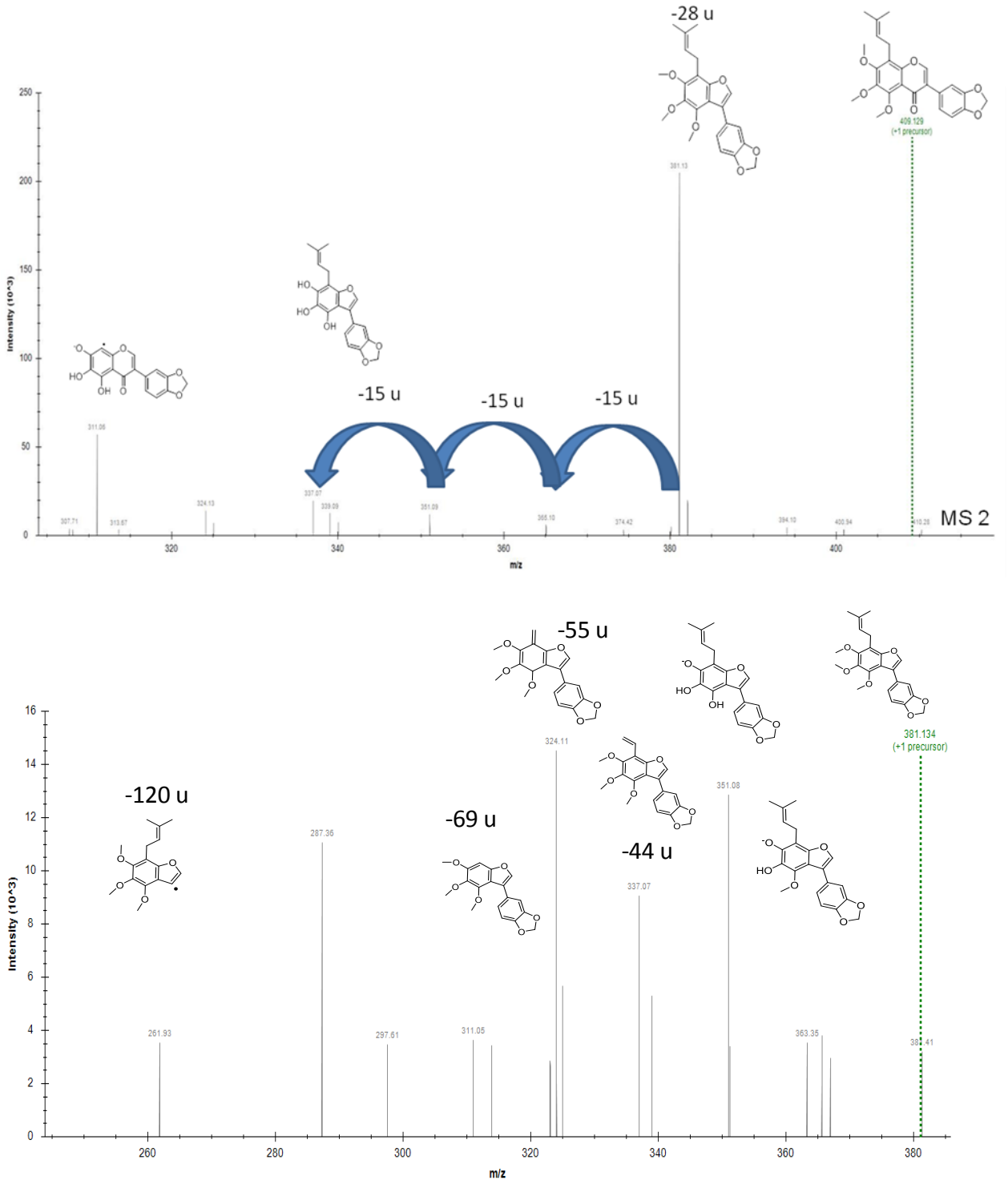


Figure 37 : Spectres de MS2 et MS3 de la variable *m/z* = 409.129392

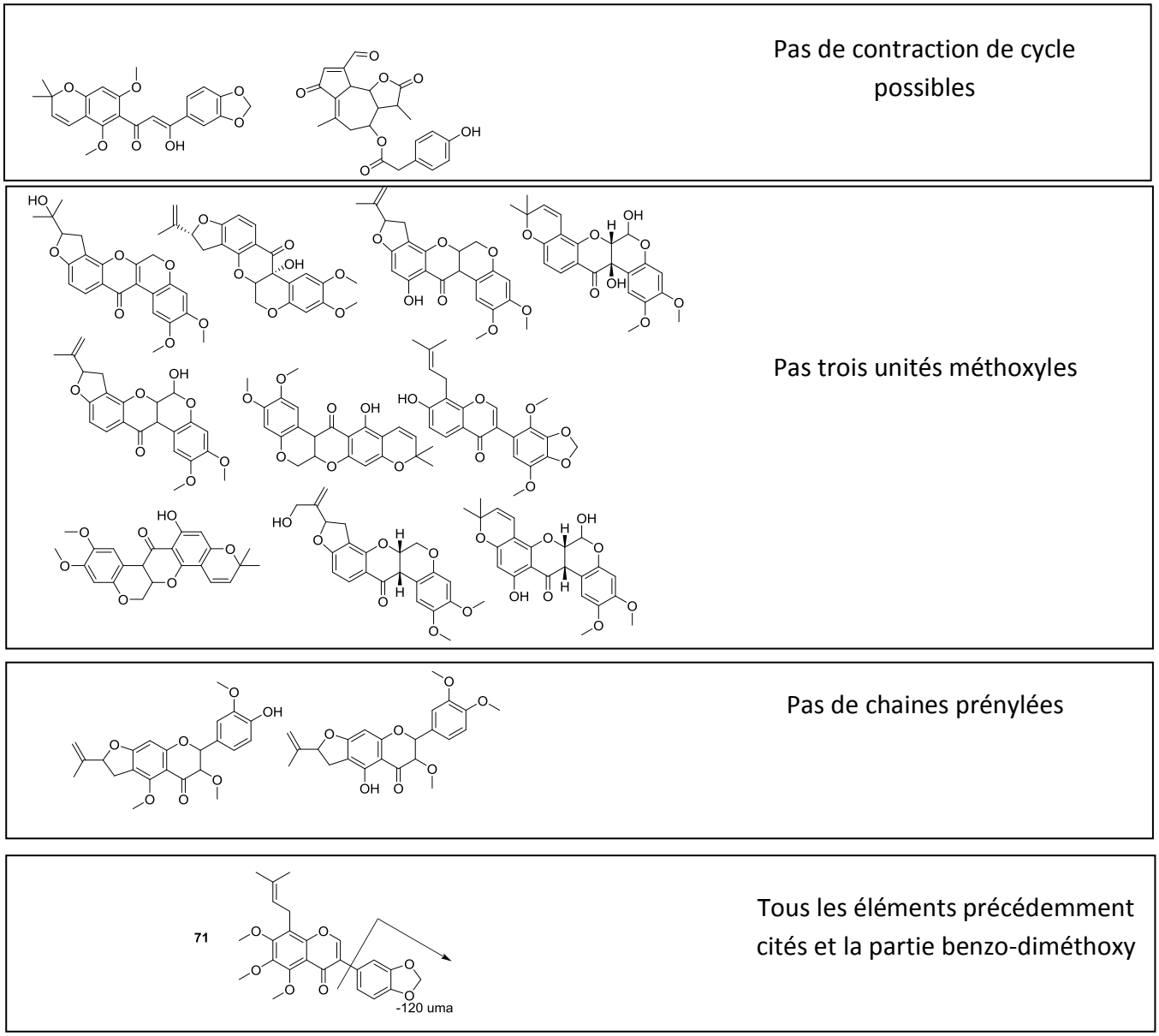


Figure 38 : Arbre de décision vers l'identification de la pré-5-méthoxymurmillone **71**.

L'identification des PPAPs a été plus complexe, notamment dûe au grand nombre d'isomères existant pour une même masse, ainsi qu'à de grandes similarités dans les arbres de fragmentations. Toutefois, nous avons essayé d'identifier grâce aux quelques règles de fragmentation déjà établies[97,98,99], le PPAP correspondant à la variable *m/z* = 617.3480909 (**Figure 39**). 15 composés de notre base de données spécifique pouvaient correspondre à ce

[97] Y. Zhou *et al*., Qualitative and quantitative analysis of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from Garcinia species using ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 68, 96-107.

[98] G.Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of Moronobea coccinea (Clusiaceae), *Phytochemistry*, **2009**, 70, 75–85.

[99] AL. Piccinelli *et al*., Fragmentation Pathways of Polycyclic Polyisoprenylated Benzophenones and Degradation Profile of Nemorosone by Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., **2009**, 20, 1688–1698.

m/z. L'ion majoritaire sur le pic de MS^2 correspond à une perte de 110 u, pouvant être attribué à la perte du noyau catéchol. Un composé ne possédant pas cet élément structural a donc été retiré de la liste. Le second le plus intense correspondait à une perte de 154 u. C'est la perte du noyau catéchol (110 u) et d'une partie de chaine prénylée (44 u) qui aura pour conséquence, la formation de cet ion d'une valeur de *m/z* = 463.32. Lors de la fragmentation de ce dernier sur un des spectres de MS^3, une seconde perte de 44 u est encore observée. Cette information nous oriente donc, vers des composés qui possèdent au moins deux unités prénylées. Quatre composés sont alors écartés (**Figure 34**). Sur ce même spectre, un ion crucial ayant un *m/z* = 378.97 nous indique une perte de 85 u. Dans ce cadre, cette perte ne pouvait que correspondre à une chaîne prénylée portant à son extrémité un groupement hydroxyle. Sept composés pouvaient alors être retirés de notre liste. Trois métabolites possèdent encore ces éléments structuraux : la coccinone B, la 7-épi coccicone B et la symphonone C. Seule la position de chaîne prénylée portant l'hydroxyle diffère ; elle est portée par le carbone 30 dans le cas des coccinones et par le carbone 7 dans le cas de la symphonone. C'est la perte de 136 u observable sur le spectre de MS^2, correspondant au départ du bicycle décrit par Zhou[97], qui nous permet d'exclure la symphonone.

Les données de fragmentation de cette variable, ne nous ont pas permis de discriminer un des diastéréoisomères. Un rétrocontrôle par déconvolution du spectre RMN d'un de ces deux composés aurait pu nous permettre d'identifier cette variable avec certitude. Malheureusement nous ne possédions pas d'échantillon de ces composés.

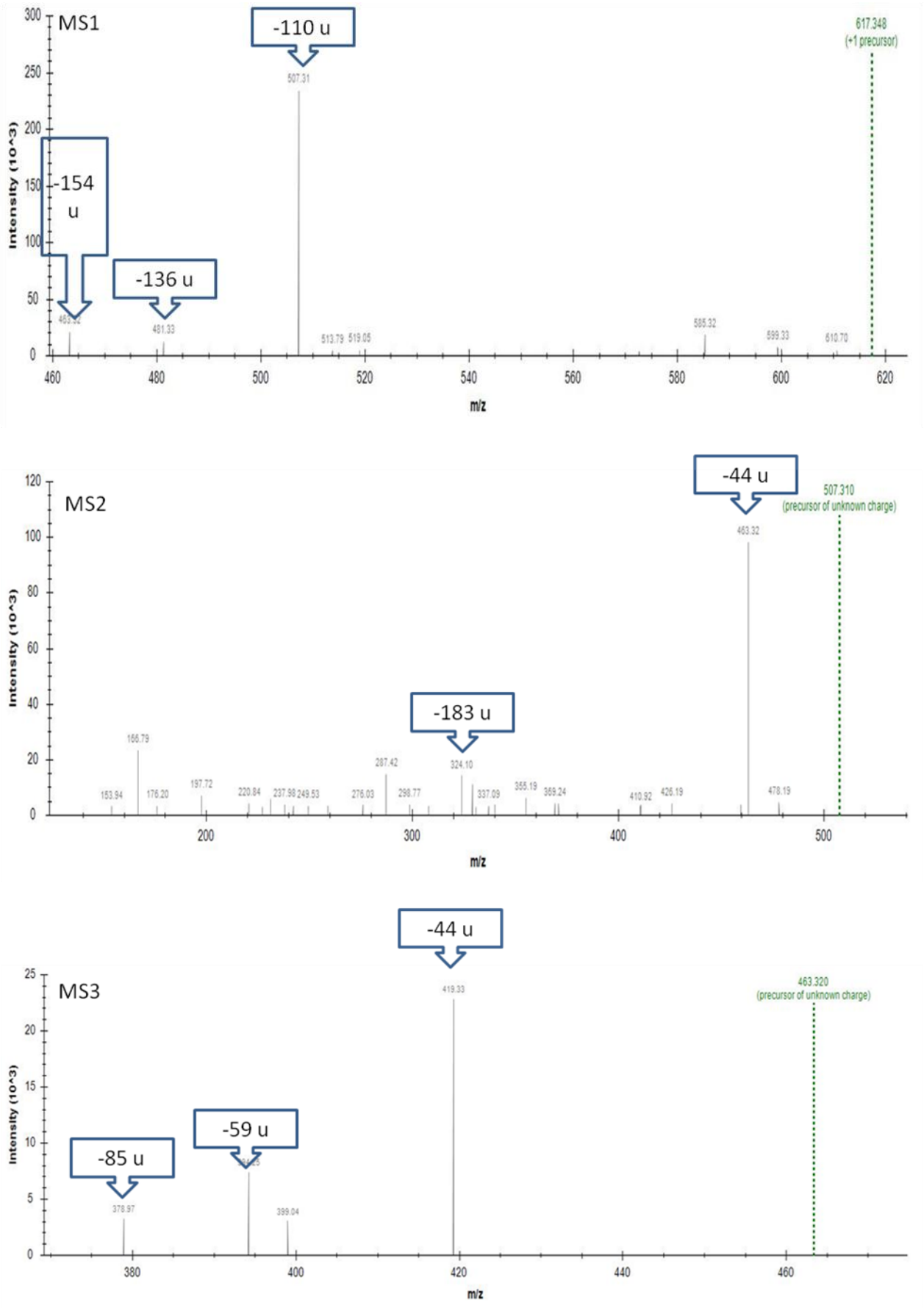
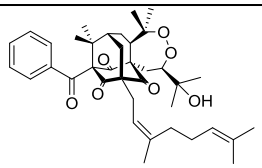
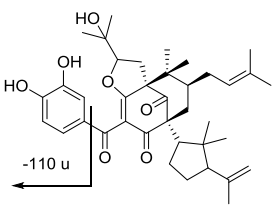


Figure 39 : Spectres de masses de la variable *m/z* = 617.3480909

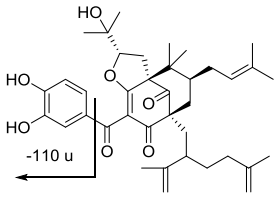


Otogirinin B

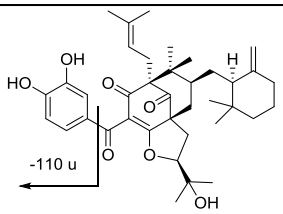
Pas le noyau catéchol



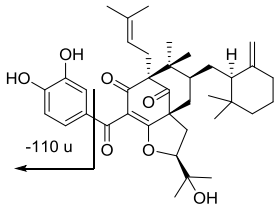
Thorelione B



Nujiangefolin C

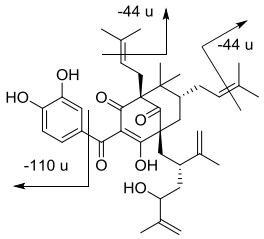


Paucinones D

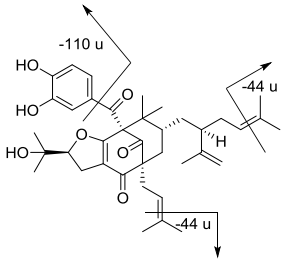


Paucinones D

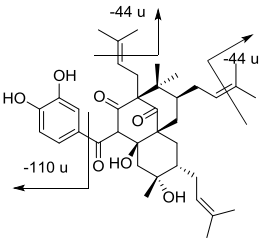
Pas deux chaines prénylées



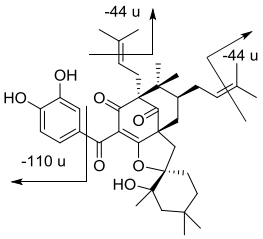
garcimultiflorone E



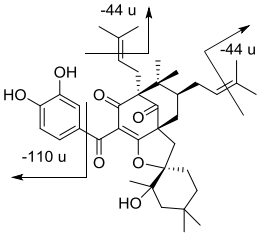
garcinialiptone C



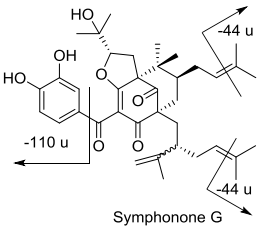
garcinialone



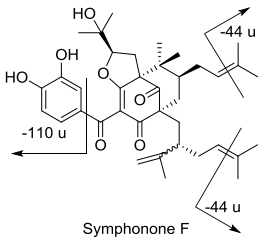
Paucinones B



Paucinones A

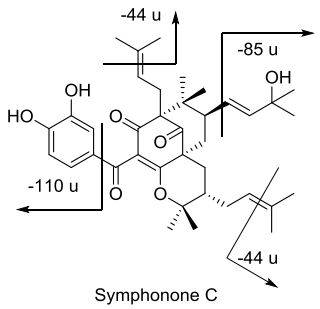


Symphonone G



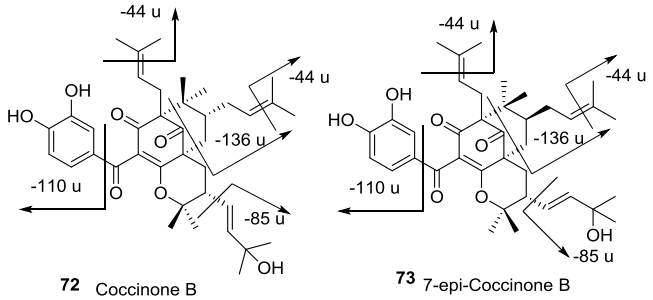
Symphonone F

Pas de groupement hydroxyle terminal sur la chaîne prényle



Symphonone C

Pas le fragment – 136 du bicycle



72 Coccinone B

73 7-epi-Coccinone B

Composés ayant tous les éléments du squelette

Figure 40 : Identification de la coccinone B **72** et 7-épi coccinone B **73** à l'aide de la fragmentation

1.1.10. Discussion et conclusion

Afin de comprendre la présence ou non de tel métabolite en fonction de la région spécifique étudiée, nous avons effectué une étude bibliographique sur chaque composé. Ces derniers appartiennent à plusieurs familles métaboliques dont les voies de biosynthèses se croisent comme les xanthones prénylées, flavonoïdes, PPAPs ; mais aussi des terpènes ou des acides gras, malheureusement aucune de ces familles n'était spécifique d'une région.

Etant donné les différences évidentes de climat entre les deux régions : des marqueurs spécifiques au stress hydrique peuvent être retrouvés dans ce genre d'études. Les acides gras identifiés ici, ne nous apprennent rien sur ce sujet. En revanche, 17 des 55 métabolites possiblement identifiés ont déjà révélés des propriétés antimicrobiennes dans la littérature (Hespéridine[100], Mangostanol[101], Catéchine[102], Xanthone V1[103], Ugaxanthones[34], Deméthylcalabaxanthone[104], Morrelloflavone[105], 9-Hydroxycalabaxanthone[106], O-6 Deméth

[34] P. Mkounga *et al*., Globulixanthone F, a new polyoxygenated xanthone with an isoprenoid group and two antimicrobial biflavonoids from the stem bark of *Symphonia globulifera*. *Nat Prod Comm.* , **2009**, 4, 803–808.

[100] BJ. Denny *et al*., Antagonistic interactions between the flavonoids hesperetin and naringenin and β-lactam antibiotics against *staphylococcus aureus*, *British Journal of Biomedical Science*, **2008,** 65, 3, 145-147.

[101] S. Deachathai *et al*, Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*, *Phytochemistry*, **2005**, 66 ,19, 2368-2375.

[102] S. Amey *et al*., Quantitative analysis of catechins in *Saraca asoca* and its correlation with antimicrobioal activity, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **2013**, 6, 421-428.

[103] J. Ngoupayo *et al*., Antimicrobial and immunomodulatory properties of prenylated xanthones from twigs of *Garcinia staudtii*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , **2009**, 17, 15, 5688-5695.

[104] Ngoupayo J. *et al*, Antimicrobial and immunomodulatory properties of prenylated xanthones from twigs of *Garcinia staudtii*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 15, 5688-5695.

Symphonin[39], Symphonone F[46], Coccinone B et 14-Déoxy garcinol[63], Kolanone[107], 6-déoxy-mangostin [108], Guttiférone B, C et D[45]).

La présence de nombreux composés antimicrobiens, suggère que cette espèce a été capable de s'adapter à des pressions microbiennes différentes. **Les micro-organismes (parasites, bactéries, virus…) étant différents au Cameroun et en Guyane française, au cours de l'évolution, l'espèce a pu s'adapter et produire des métabolites de défense adéquats**. La région camerounaise présente bien plus de bio-marqueurs que la région guyanaise. Il semble donc possible que la pression microbienne soit plus forte dans cette dernière. Comme stipulé dans l'introduction de ce chapitre, l'arrivée du premier *Symphonia globulifera* sur le continent américain date de 15 millions d'années, ainsi cette espèce a très bien pu prendre des chemins évolutifs différents en fonction des régions. Cette conclusion est tout même à modérée compte tenu du faible nombre de métabolites identifiés et actifs (17 composés).

Concernant la guttiférone A notre métabolite cible, celui-ci ne semble pas être un régio-marqueur dans les parties de plantes étudiées, aux vues des données de LC-MS. Ce résultat sous-entend que ce métabolite est retrouvé dans des concentrations similaires dans les extraits de ces deux régions. La Guyane française étant un territoire français, les agréments de transfert de matériels sont plus facilement réalisables. Considérant cet aspect pratique d'accès au matériel végétal, nous avons décidé de travailler à partir de spécimens provenant de Guyane française.

---

[105] Y-M. Lin *et al*., Biflovonoids and derivatives thereof as antiviral agents, **2002**, *United States Patent* US 6,399,654 B1.

[39] S. Ngouela *et al*., Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f, *Phytochemistry* , **2006**, 67, 302-306.

[45] K. Gustafson *et al*., The guttiferone, HIV-Inhibitory Benzophenones From *Symphonia globulifera, garcinia livingstonei, Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 10093-10102.

[46] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), *Phytochemistry*, **2010**, 71, 964-974.

[63] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae), *Phytochemistry* , **2009**, 70, 75-85.

[106] K. Trisuwan and T. Ritthiwigrom,. Benzophenone and xanthone derivatives from the inflorescences of *Garcinia cowa*, *Archives of Pharmacal Research,* **2012**, 35, 10, 1733-1738.

[107] RA. Hussain *et al*., Kolanone, a novel polyisoprenylated benzophenone with antimicrobial properties from the fruit of *Garcinia kola*, *Planta Medica*, **1984**, 44, 2, 78-81.

[108] AE. Hay et al., Antimalarial xanthones from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*, **2004**, *Life Sciences*, 75, 25, 3077-3085.

Partie 2 : Profilages métabolomiques des organes de *Symphonia globulifera*

Kumar *et al*, précisent dans leur revue sur le genre Garcinia que les PPAPs peuvent être isolés, de nombreuses parties de la plante comme les fruits, les feuilles, les fleurs ou les racines. Dans *Symphonia globulifera*, les PPAPs n'ont été caractérisés que dans les graines, feuilles et écorces de racines. Nous avons donc décidé **d'étudier les compositions phytochimiques de chacune des parties de cet arbre par une approche métabolomique en utilisant la LC-MS. Nous porterons une attention particulière à la distribution des PPAPs et plus spécifiquement de la guttiférone A, afin de pouvoir orienter nos futures investigations phytochimiques**. Les sept parties de plante étudiée sont illustrées (**photo 7**).

1.2.1. Matériel végétal

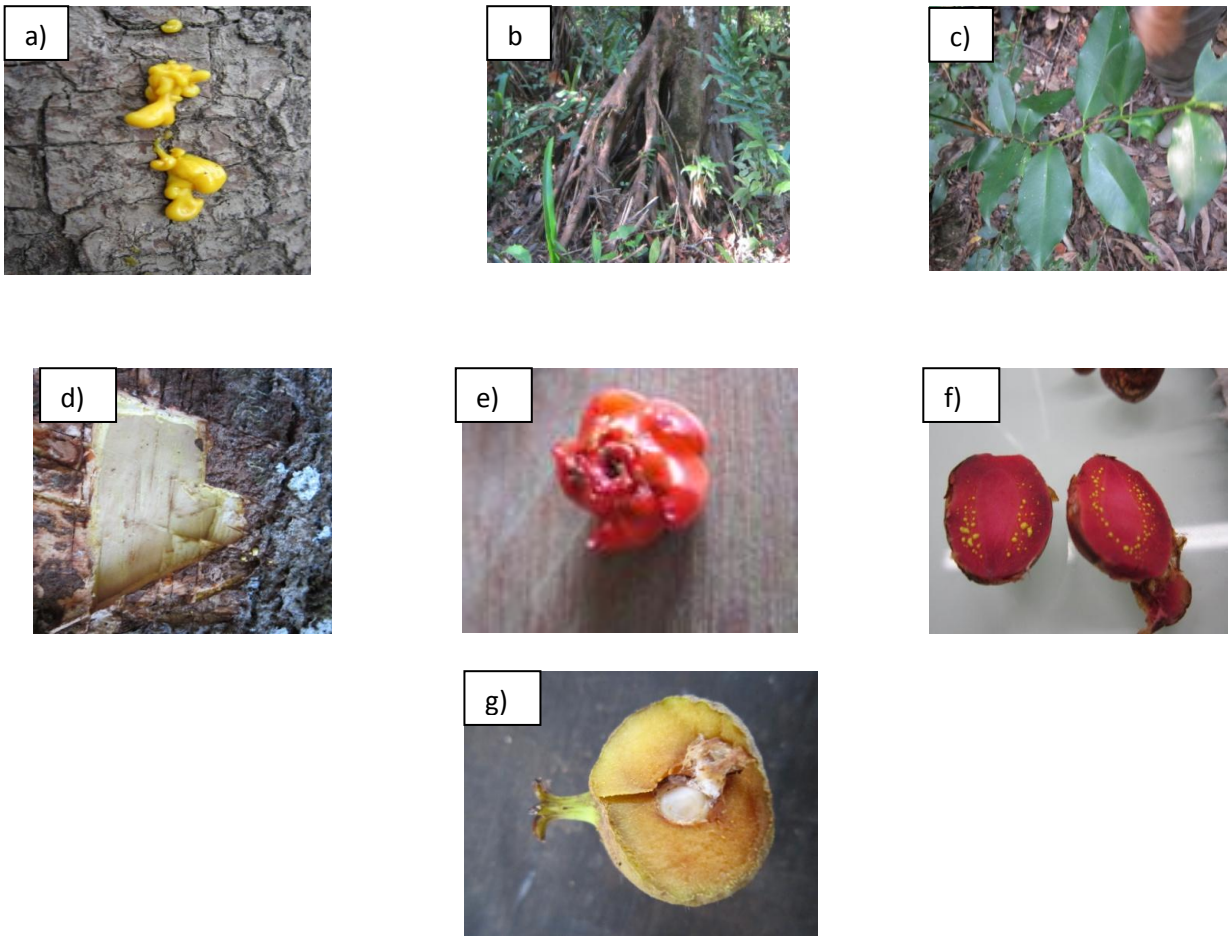


Photo 7 : Sept parties de *Symphonia globulifera* L.f. a) latex ; b) racines ; c) feuilles ; d) écorces ; e) fleurs ; f) graines ; g) péricarpe.

Les plantes ont été récoltées en novembre 2012 sur le site de Macouria (4.91874,-52.366624) et furent déposées à l'herbier national de Guyane française sous le numéro ODONNE 770.

1.2.2. Préparation des extraits

Comme nous avons décidé de cibler les métabolites relativement apolaires, nous avons choisi d'extraire avec du méthanol, puis après évaporation, l'extrait est repris par un mélange acétate d'éthyle : eau. Les phases organiques sont ensuite séchées, puis ajustées à la concentration de 0.5 mg/mL dans le méthanol pour les analyses en LC-MS.

1.2.3. Acquisition des données de LC-MS

De façon similaire aux travaux décrits (partie 1), nous avons mis au point une méthode de séparation et d'ionisation sur un appareil Aquity UPLC (Waters) couplées à un spectromètre Synapt G2-HDMS (Waters).

1.2.4. Traitement des données de LC-MS

Les fichiers obtenus sont convertis avec le format .MzML afin de pouvoir manipuler les données plus librement. Les chromatogrammes furent alignés en utilisant le paquet XCMS du logiciel R, une liste de pics fut générée avec le paquet CAMERA. Après avoir également traité la matrice [cloisonnement ou suppression des données inutiles, annotation des groupes (détails disponibles en partie expérimentale)], celle-ci a été importée dans le logiciel Mathlab pour des analyses plus approfondies. Une analyse de composantes principales incluant chaque groupe, les QCs et les blancs, fut effectuée pour vérifier qu'aucune erreur analytique ne s'était introduite durant l'analyse. Les échantillons posant problème ont été retirés le cas échéant. Une analyse de composantes principales fut effectuée pour chaque mode d'ionisation, afin de mettre en avant les similitudes et différences entre chaque partie de plante. Les graphiques résultants sont représentés **figure 41 a et b**.

1.2.5. Interprétation des données

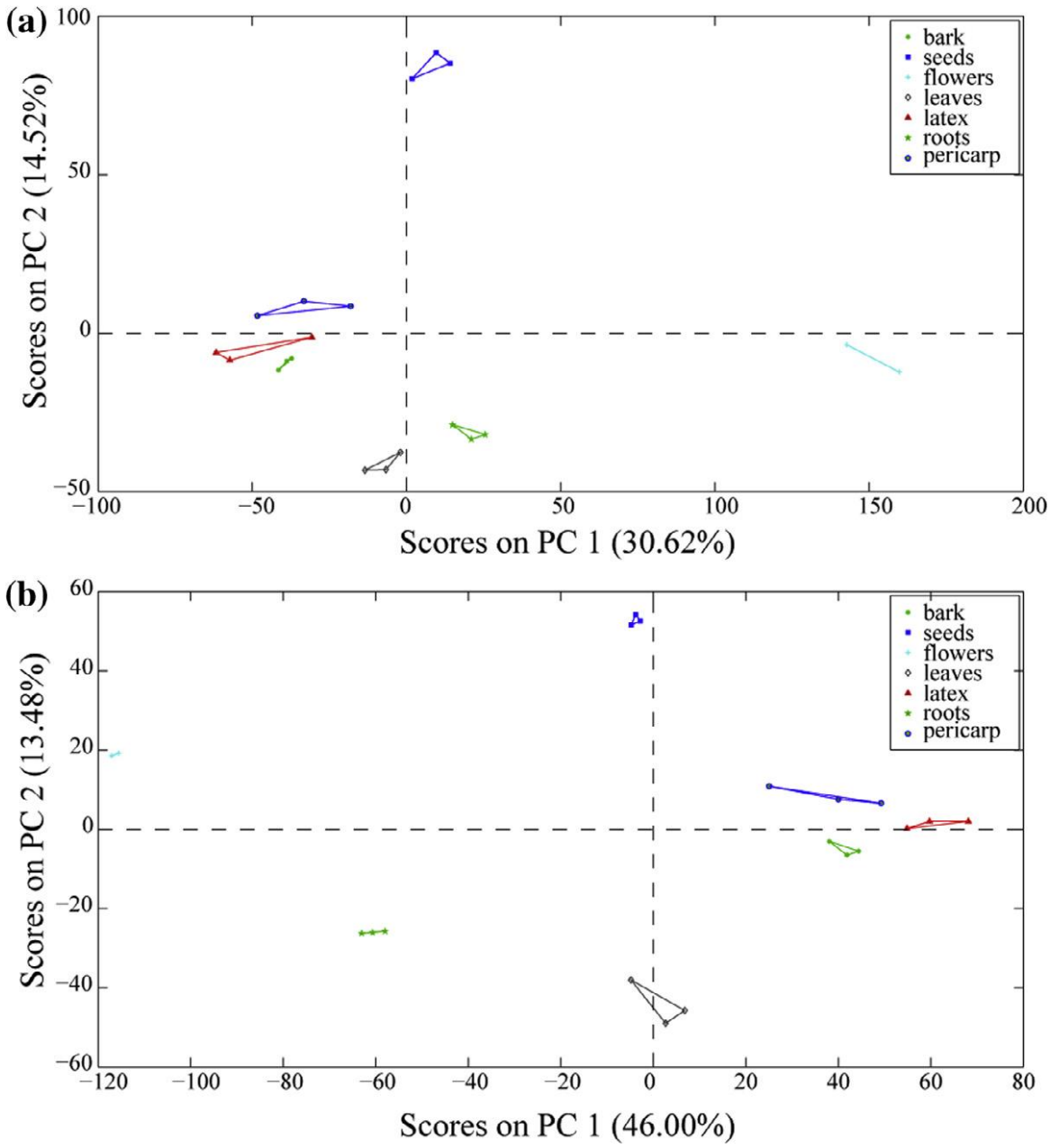


Figure 41. ACP provenant des données de LC-MS en mode a) positif ; b) négatif. légende : ronds verts : écorces, carrés bleus : graines, croix turquoises : fleurs, losanges : feuilles, triangles rouges : latex, étoiles vertes : racines, ronds bleus : péricarpes.

Pour les PCA résultant des deux modes d'ionisation, la séparation entre les organes est très claire. Celles-ci possèdent une bonne explication totale de la variance, comprise entre 45 et 59 %, entre les sept groupes respectivement pour les modes positifs et négatifs. Nous pouvons donc en conclure que chaque partie de plante possède un métabolome qui lui est propre. Dans les deux modes, on peut observer la même tendance qui tend à rapprocher les métabolomes du latex, des graines et des écorces. Ce résultat n'est pas forcément surprenant car le latex est amené à circuler dans de nombreux tissus comme les graines et les écorces (largement visible sur **photo 7-d** et **-f**). Sans parler de contamination, on pourrait imaginer que des échanges de métabolites secondaires pourraient se faire à travers ce latex.

Les résultats de l'étude précédente ont mis en évidence les probables fonctions de défense antimicrobiennes et antiparasitaires de ces composés. L'écorce étant l'un des premiers organes en contact avec les micro-organismes venant de l'extérieur, il est important pour le devenir de l'arbre de pouvoir repousser ces attaques. La graine quant à elle va devoir subir des conditions de pressions microbiennes très fortes avant de pouvoir germer et devenir un nouvel individu. La lecture des diagrammes des ACP révèle qu'il existe une grande différence à travers la composante principale 1 entre le métabolome des fleurs avec celui des autres organes.

Afin d'identifier les métabolites qui sont responsables de ces différences et similitudes, nous avons choisis d'utiliser les données des analyses en mode négatifs car elle explique une plus grande partie de la variance. Nous avons soumis les données de cette ACP à une analyse ANOVA, afin de montrer les variables *m/z* responsables. Pour plus de précision statistique et pour éviter les « faux-positifs » une analyse post-hoc de Tukey–Kramer ainsi qu'une correction de Benjamini-Hochberg (taux de faux positifs : 5%) furent appliqués. Les vingt cinq variables les plus significatives pour l'explication de la variance entre les sept parties de plantes sont représentées. Les deux-cents variables les plus significatives ont été sujettes à une identification par comparaison avec notre base de données spécifique, n'incluant que les métabolites déjà isolés de *Symphonia globuli*fera. Seuls 17 d'entre elles semblent correspondre à un métabolite déjà isolé (avec une erreur < 5ppm). Les variables correspondantes sont annotées **tableau 8** et représentées en fonction de leurs concentrations relatives dans chaque organe à travers une heatmap (**Figure 42)**. Nous avons fait le choix délibéré d'utiliser cette fois ci, uniquement une base de données restreinte, pour être plus précis quant à l'identification.

Masse observée	Formule empirique	masses exacte	diff m/z	Composés probables
228.0514	$C_{13}H_8O_4$	228.04226	4	1,7-Dihydroxyxanthone
244.0478	$C_{13}H_8O_5$	244.03717	3.5	1,5,6-Trihydroxyxanthone; gentisein
260.0421	$C_{13}H_8O_6$	260.03209	3.8	1,3,5,6-Tétrahydroxyxanthone; norathyriol
262.0587	$C_{13}H_{10}O_6$	262.04774	4.2	maclurine
312.1109	$C_{18}H_{16}O_5$	312.09977	3.6	globuxanthone; mbarraxanthone
326.0938	$C_{18}H_{14}O_6$	326.07904	4.5	globulixanthone C
328.1100	$C_{18}H_{16}O_6$	328.09469	4.6	ugaxanthone; symphoxanthone
342.1127	$C_{19}H_{18}O_6$	342.11034	3.6	globulixanthone E
394.1583	$C_{23}H_{22}O_6$	394.14164	4.7	xanthone V1
556.1245	$C_{30}H_{20}O_{11}$	556.10056	4.3	morelloflavone
574.1393	$C_{30}H_{22}O_{12}$	574.11113	3.3	GB-2
586.3935	$C_{38}H_{50}O_5$	586.36582	4.7	14-Déoxy-7-épi-isogarcinol
600.3733	$C_{38}H_{48}O_6$	600.34509	4.7	symphonone H; symphonone I; symphonone A
602.3868	$C_{38}H_{50}O_6$	602.36074	4.6	guttiférone A; 7-épi-garcinol
618.1628	$C_{37}H_{30}O_9$	618.18898	4.3	globulixanthone F; symphonone C; 26-Hydroxy-isoxanthochymol
618.3827	$C_{38}H_{50}O_7$	618.3556	4.8	symphonone F; 36-Hydroxy-isoxanthochymol; 18-épi-symphonone F; symphonone G
636.3923	$C_{38}H_{52}O_8$	636.36622	4.1	35,36-Dihydroxy-isoxanthochymol;symphonone D; symphonone E
670.4538	$C_{43}H_{58}O_6$	670.42334	4.5	guttiférone B; guttiférone C; symphonone B; guttiférone D

Tableau 8: Liste des variables potentiellement identifiés responsables de la variance

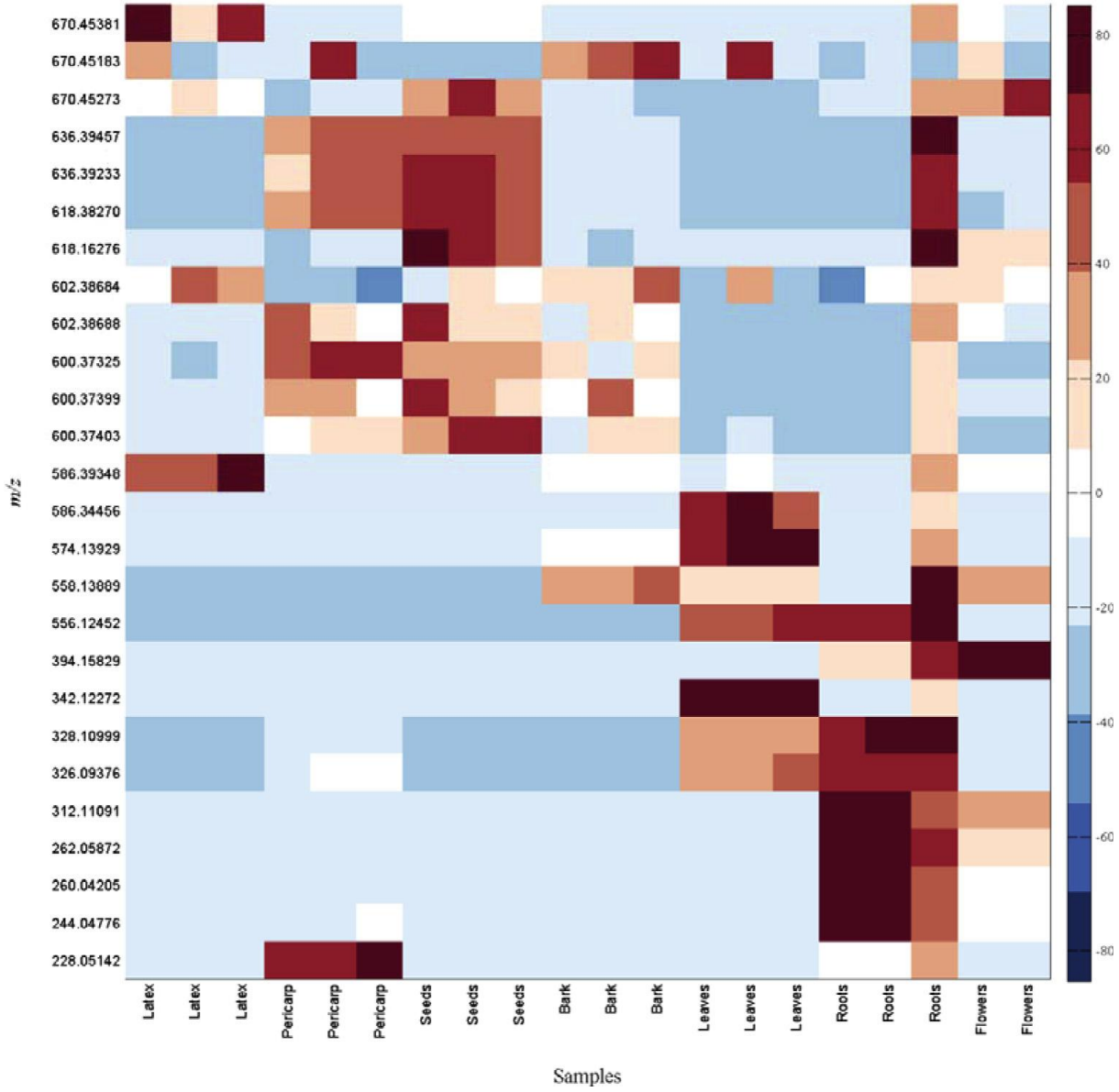


Figure 42 : Heatpmap représentant les variables responsables de la variance en fonction de leurs concentrations relatives dans les différents extraits.

Pour plus de précision sur les quantifications relatives de chacun des métabolites, des diagrammes de Tuckey sont représentés dans la partie expérimentale.

Bien que certaines variables possèdent un *m/z* très proche, (exemple : *m/z* = 670.45381, 670.45183 et 670.45273) elles ont été considérées comme différentes par le traitement statistique, dû à un temps de rétention différent. De plus, nous n'avons pas observé de saturation de la source ou de problème de contamination. Nous avons considéré donc ces variables comme trois métabolites bien distincts de même formule brute.

Le latex semble être caractérisé par la présence de trois PPAPs spécifique à cet organe : le 14-Déoxy-7-épi-isogarcinol (*m/z* = 586.3935) ; la guttiférone A ou 7-épi-garcinol (*m/z* =

602.3868) ainsi que guttiférone B, guttiférone C, symphonone B ou guttiférone D (*m/z* = 670.4538).

Les écorces renferment en faible quantité quelques PPAPs déjà cités (*m/z* = 600.3733, 602.3868 et 670.4538) ainsi qu'un métabolite encore non identifié de *m/z* = 558.13889).

Les feuilles et les racines se distinguent par la présence de composés de plus faible PM (<400) possiblement identifiables à des xanthones. De nombreuses xanthones telles que : 1,5,6-Trihydroxyxanthone ou isomères (*m/z* = 244.0478), norathyriol ou isomères (m/z =260.0421), la maclurine (*m/z* =262.0587), la globuxanthone ou isomère (*m/z* = 312.1109), la globulixanthone C (*m/z* = 326.0938) et l'ugaxanthone ou isomère (*m/z* = 328.1100) purent être identifiées. La morreloflavone (*m/z* = 556.1245) de la famille des bisflavonoïdes semble également être spécifique des racines.

Les fleurs se caractérisent des autres organes, que par la présence de xanthone V1 (m/z =394.1583), d'un composé inconnu de *m/z* = 558.13889 ainsi qu'un des PPAPs isomère de la guttiférone C.

Le péricarpe se démarque par la présence quasi exclusive de la 1,7-Dihydroxyxanthone (228.0514), ainsi que de nombreux PPAPs qu'il partage avec les graines : symphonone H, ou isomères (m/z = 600.3733) ; guttiférone A ou isomère (m/z = 602.3868) ; symphonone F, ou isomères (m/z = 618.1628) et de la symphonone D ou isomères (m/z = 636.3923).

Les graines semblent très riches en PPAPs. Elles contiennent également spécifiquement la globulixanthone F (qui n'est pas un PPAPs), symphonone C ou isomère (*m/z* = 618.1628) ainsi que les isomères de la guttiferone B cités précédemment (*m/z* = 670.4538). De plus, le défaut de masse de Kendrick (DMK) de ces différents composés, nous permet de supposer que la variable *m/z* = 618.1628 n'appartient pas à la famille des PPAPs. Le DMK se définit par la différence entre la masse nominale et la masse exacte[109]. Cette différence est donc censée augmenter de façon linéaire avec l'ajout de mêmes groupements. Une différence de DMK implique une composition élémentaire différente, pouvant refléter une différence de famille métabolique. Plus de 99 % des PPAPs isolés jusqu'à ce jour possèdent un DMK compris entre 0.3 et 0.5. Ici la variable *m/z* = 618.1628 possède un DMK de 0.16, ce qui correspond mieux aux xanthones. En effet, comme illustré **figure 43,** les défauts de masses des métabolites isolés de *Symphonia globulifera,* ont montrés que chaque famille de métabolites possède une zone qui lui est propre. Ainsi la variable *m/z* = 618.1628 est donc assigné à la globulixanthone F car elle ne peut correspondre à un PPAPs (symphonone C ou 26-Hydroxy-isoxanthochymol).

[109] L. Sleno, The use of mass defect in modern mass spectrometry , *Journal of Mass Spectrometry* , **2012**, 47, 226–236.

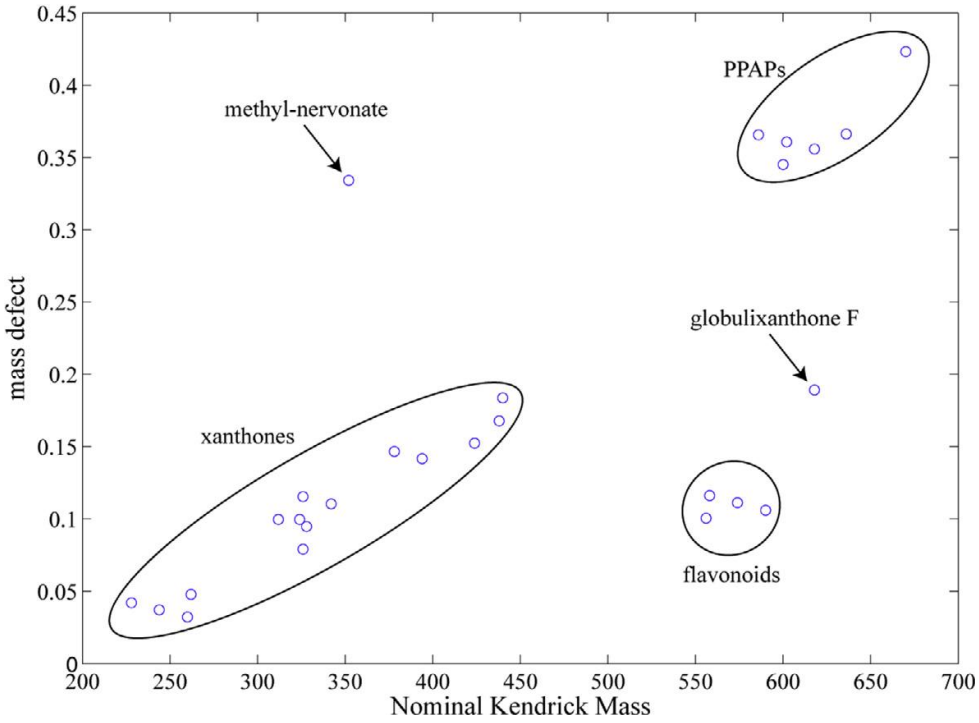


Figure 43 : Représentation des métabolites secondaires isolés de *Symphonia globulifera* en fonction de leurs PM et de leurs DMK.

1.2.6 Discussion & conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence des marqueurs spécifiques de tissu. Certains de ces métabolites ont pu être potentiellement identifiés par comparaison à une base de données**. Certaines familles de métabolites, comme par exemple les xanthones et les bisflavonoïdes, semblent plus présentes dans des parties comme les feuilles, les racines ou les fleurs. Les PPAPs et plus particulièrement la guttiférone A, se trouvent en plus grande proportion dans les parties éco-compatibles comme le latex, le péricarpe et les graines. Ces données ont donc orientées nos futures études phytochimiques vers ces organes. De plus, nous avons observé que les graines possédaient un très grand nombre de PPAPs spécifiques, encore inconnus, ce qui nous a incité à étudier les métabolites secondaires de cet organe.**

Nous avons également pu mettre en avant l'utilisation du défaut de masse de Kendrick dans l'identification des métabolites par LC-MS, permettant ainsi pour la première fois de discriminer des isomères. Cette méthode peu utilisée[110], a permis de réaliser une classification rapide des familles de métabolites, qui pourrait être appliquée à de futurs études chimio-taxonomiques.

[110] RL. Sleighter and PG. Hatcher, The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter, *J. Mass Spectrom*., **2007**, 42, 5, 559-574.

CHAPITRE 2 : INVESTIGATIONS PHYTOCHIMIQUES

Partie 1 : Recherche et isolement des métabolites actifs de *Symphonia globulifera*

2.1.1.. Introduction

Les approches métabolomiques décrites au cours du chapitre 1, ont montré qu'il existait de nombreux composés inconnus, spécifiques à chaque partie de plante. Ces composés pouvant être potentiellement actifs, nous avons décidé d'orienter nos études phytochimiques en nous basant sur les activités biologiques des extraits. Une attention particulière a été portée aux PPAPs. En effet, les métabolites isolés, de structure proches de la guttiférone A, peuvent nous renseigner sur les RSA de cette dernière. Nous avons exclu de cette étude les extraits de racines et d'écorces, organes non renouvelables ne contenant pas ou peu de PPAPs spécifiques.

2.1.2. Activités biologiques des extraits de *Symphonia globulifera*

Les extraits méthanoliques ainsi que leurs fractions plus lipophiles (Acétate d'éthyle, c.f. partie expérimentale) des organes renouvelables précédemment étudiés (feuilles, fleurs, tiges, péricarpes et latex) furent testés contre *Leishmania donovani* et *Plasmodium falciparum.* Ces choix furent motivés par les usages du *Symphonia globulifera* en médecine traditionnelle (cf i.2). Ces échantillons ont été évalués sur les cibles parasitaires précédemment décrites. Les résultats sur *P.falciparum* sont exprimés en % d'inhibition de la croissance à différentes concentrations (**Tableau 9**)**.** Les résultats sur *Leishmania donovani* (formes axéniques et intramacrophagiques) sont exprimés en valeurs d'IC_{50} dans ce même tableau. Toutes ces données ont pu être obtenues grâce aux collaborations avec les équipes du Pr. P. Loiseau (Université Paris Sud) et du Pr. P Grellier (MNH).

Les extraits de graines et de latex, plus particulièrement les fractions acétate d'éthyle, présentent des activités anti-plasmodiales intéressantes. Concernant les activités anti-leishmaniales, ces deux extraits (graines et latex) se révèlent être également les plus intéressants. On peut aussi noter, qu'il fut probable qu'il y eu perte de certains métabolites actifs lors du fractionnement. En effet, dans le cas des fleurs et des péricarpes l'extrait total est plus actif que le fractionné.

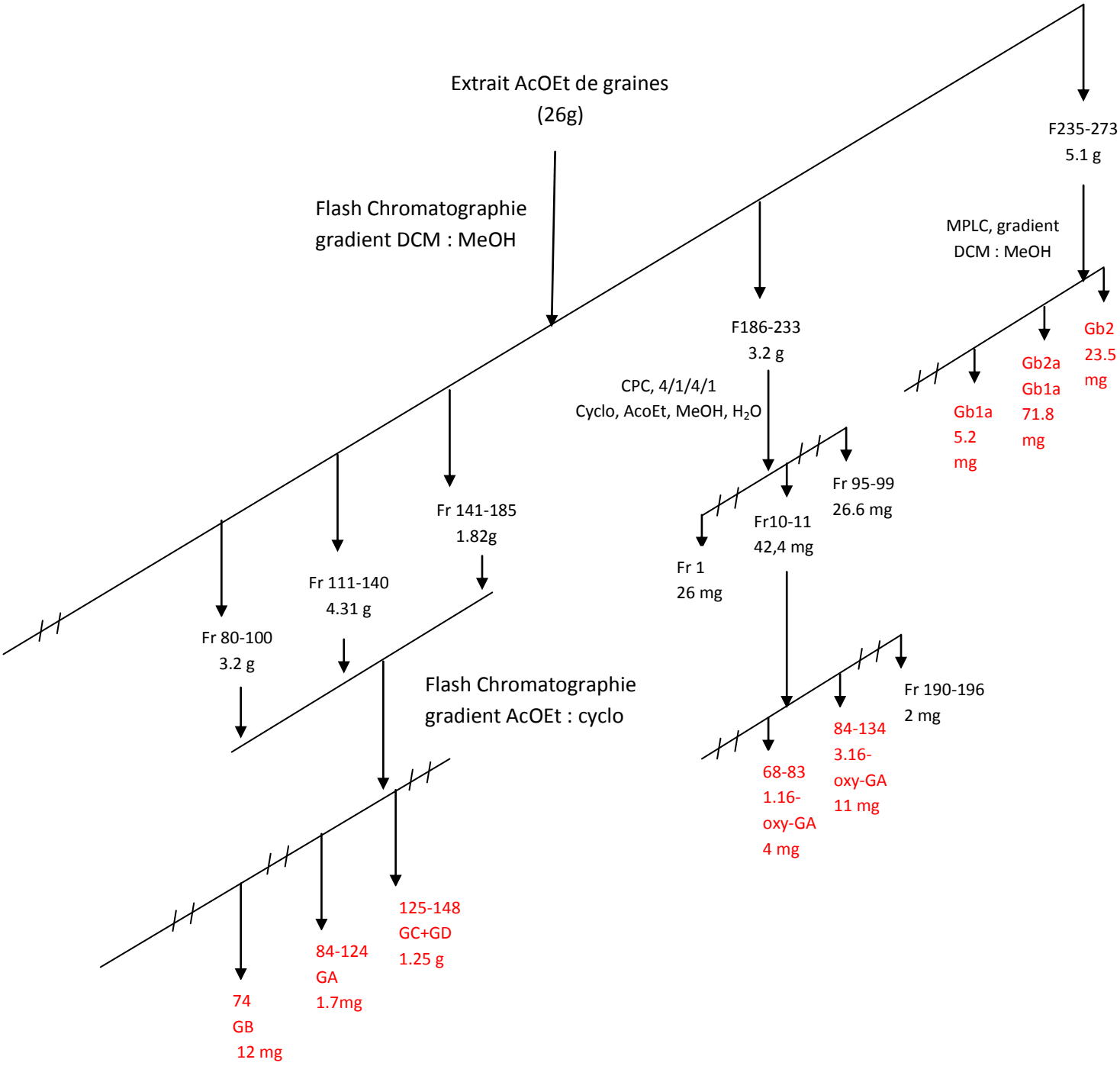
	IC50 Leishmania donovani		*Plasmodium falciparum*	
	axenic	intra macrophage	50 ug/mL	10 ug/ mL
extrait MeOH graines	6,25 ± 0,8	0,54 ± 0,16	n.d.	n.d.
extrait AcOEt graines	12,5 ±1,5	0,56 ± 0,2	99%	87%
extrait MeOH feuilles	3 ± 0,9	0,67 ± 0,06	93%	10%
extrait AcOEt feuilles	12,5 ± 1,03	16,61 ± 5,38	99%	35%
extrait MeOH fleurs	>100	>100	99%	74%
extrait AcOEt fleurs	3 ± 0,9	1,11 ±0,22	99%	31%
extrait MeOH tiges	6,25 ± 0,9	1,85 ±0,38	65%	0%
extrait AcOEt tiges	1,5 ± 0,9	0,45 ± 0,17	99%	51%
extrait MeOH latex	25 ± 4,5	0,75 ± 0,07	99%	44%
extrait AcOEt latex	3 ± 0,8	0,95 ± 0,18	99%	90%
extrait MeOH péricarpes	25 ± 3	3,47 ± 0,41	99%	90%
extrait AcOEt péricarpes	6,25 ± 0,8	1,13 ± 0,22	99%	79%

Tableau 9 : Activités biologiques des extraits de *Symphonia globulifera* sur *Leishmania donovani* et *Plasmodium falciparum*

2.1.3. Isolement de quelques métabolites des graines et du latex de *Symphonia globulifera*

Les extraits de graines et de latex furent fractionnés par plusieurs chromatographies (**Figure 44 a et b**). Les fractions contenant encore des mélanges furent ensuite purifiées par HPLC. Ce travail a abouti à l'isolement de 11 composés illustrés **figure 45**. Parmi ces molécules isolées, on retrouve les guttiférones A –D décrites par Gustafson *et al.* en 1993 (**1**-**38**-**40**), deux oxy-PPAPs (**74** et **75**), trois bisflavonoïdes (**15**, **16** et **76**) une xanthone (**77**) et un terpène (**78**). Un mélange de PPAPs dont les structures sont encore en cours de détermination, noté « st003 113-114 », a également été isolé.

a)


Extrait AcOEt de graines
(26g)
Flash Chromatographie
gradient DCM : MeOH
F235-273
5.1 g
MPLC, gradient
DCM : MeOH
Gb2
23.5
mg
Gb2a
Gb1a
71.8
mg
Gb1a
5.2
mg
F186-233
3.2 g
CPC, 4/1/4/1
Cyclo, AcoEt, MeOH, H2O
Fr 95-99
26.6 mg
Fr10-11
42,4 mg
Fr 1
26 mg
Fr 190-196
2 mg
84-134
3.16-
oxy-GA
11 mg
68-83
1.16-
oxy-GA
4 mg
Fr 141-185
1.82g
Fr 111-140
4.31 g
Fr 80-100
3.2 g
Flash Chromatographie
gradient AcOEt : cyclo
125-148
GC+GD
1.25 g
84-124
GA
1.7mg
74
GB
12 mg

b)

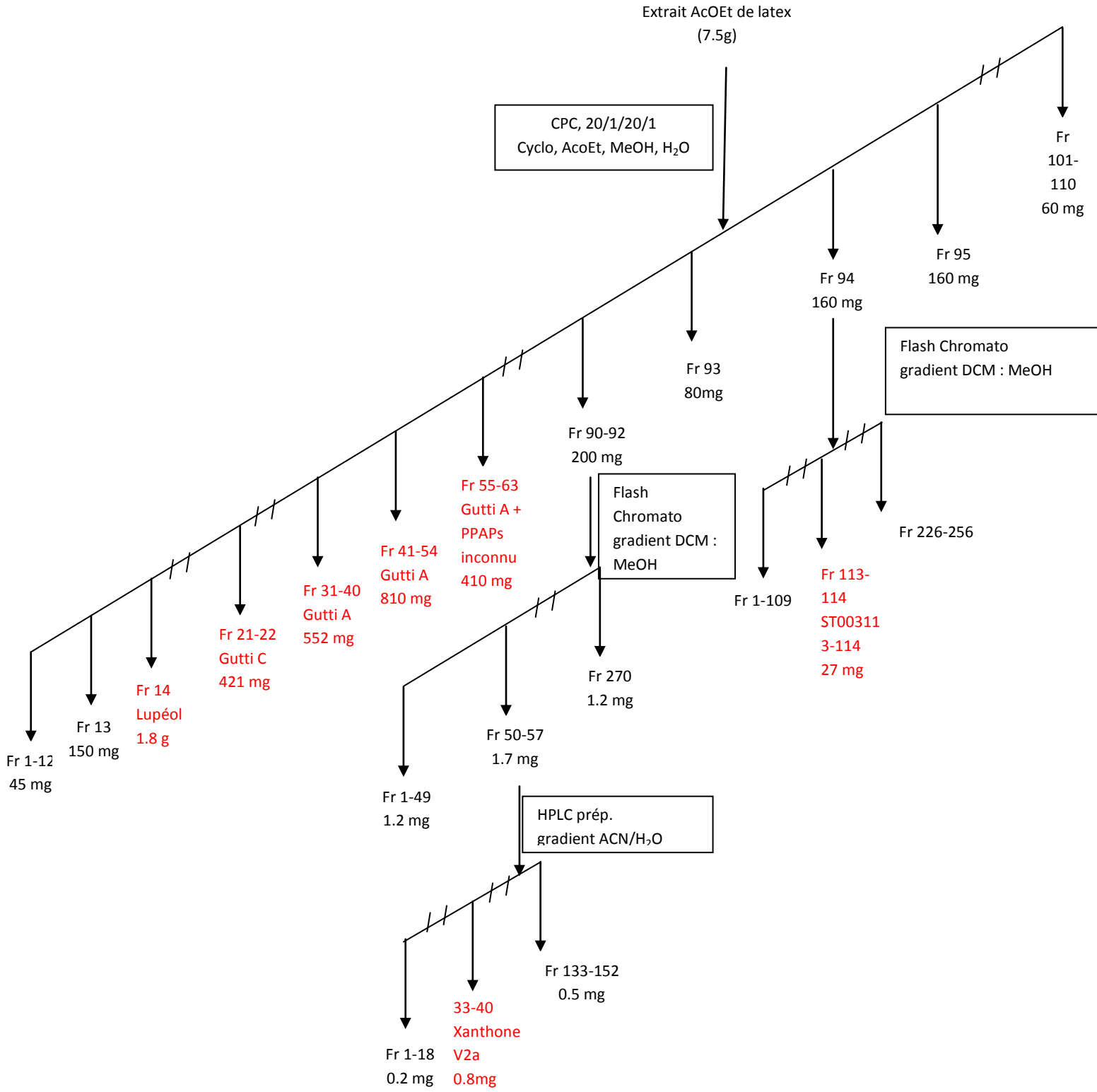


Figure 44 : arbre de fragmentation des extraits a)des graines ; b) du latex

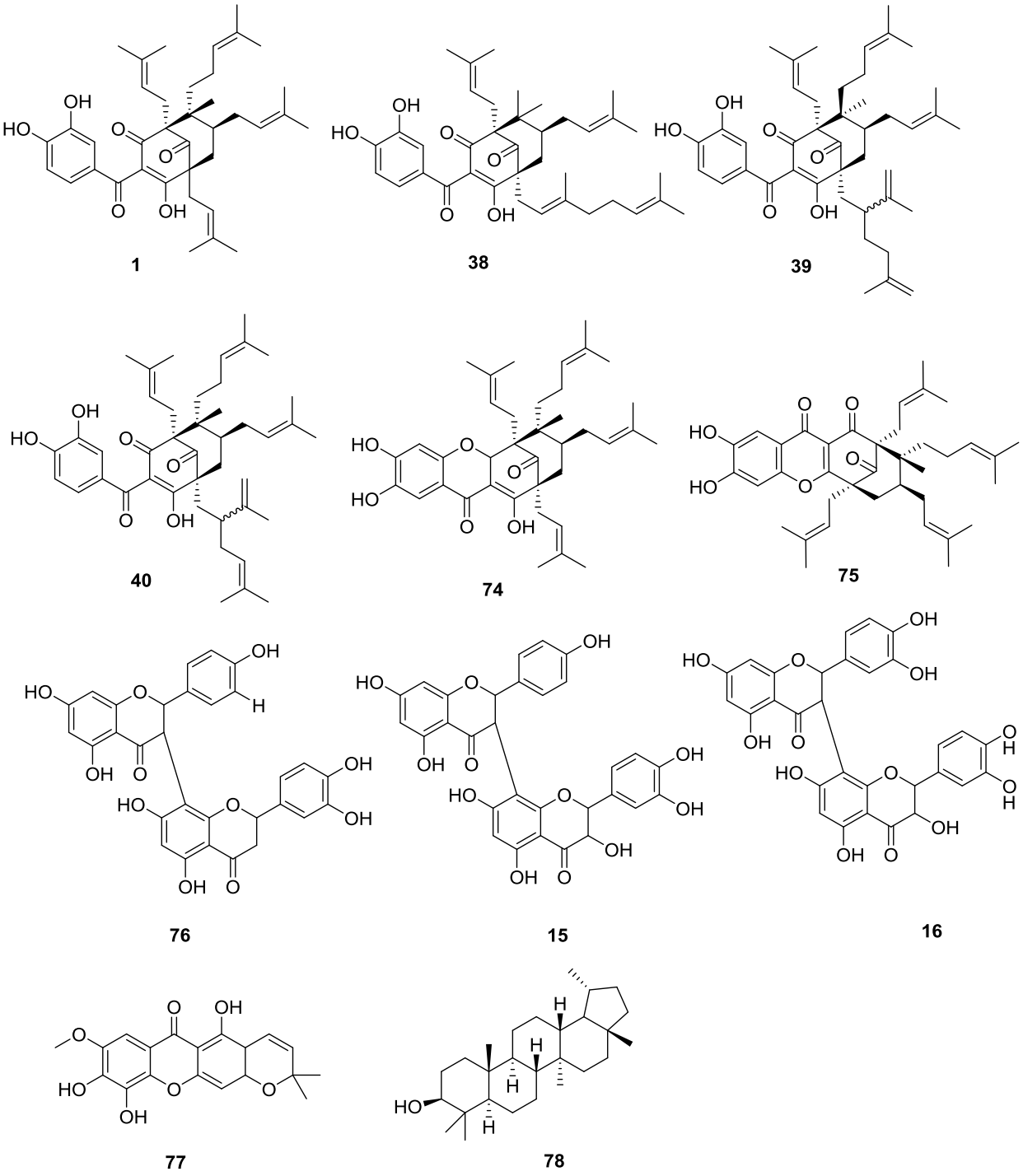


Figure 45 : Molécules isolées des graines et du latex de *Symphonia globulifera*

L'identification des composés **1**, **38**, **39**, **40**, **74**, **78**, **15**, **16**, **77** et **78** a été réalisée en comparant les données spectrales obtenues (HRMS, RMN 1D et 2D et pouvoir rotatoire) avec celles connues. Un composé non décrit dans la littérature mais décrit dans la thèse du Dr Y. Fromentin, la 1.16 oxy-guttiferone A, **75**, fut également isolé. Faute de temps, ce

dernier n'avait pas pu effectuer toutes les analyses spectrales[80]. Nous avons donc finalisé l'attribution complète de cette xanthone.

Le couplage phénolique de type 1-16 fut caractérisé par les corrélations du proton H-7 sur les spectres HMBC et NOESY. En effet, le composé 3.16-oxy-guttiférone A **74** présente une corrélation H-7/ C-1 à 194.38 ppm, alors que pour la 1.16-oxy-guttiférone A **75,** cette corrélation est retrouvée à 177.29 ppm[111], illustrant une position de cyclisation différente. Les couplages croisés H-7/C-6, C-8, C-24, H-22/C-4, C-5, C-6, C-23 et H-17/C-4 (illustrés **figure 46**) ont permis de déterminer la configuration relative de ce composé .

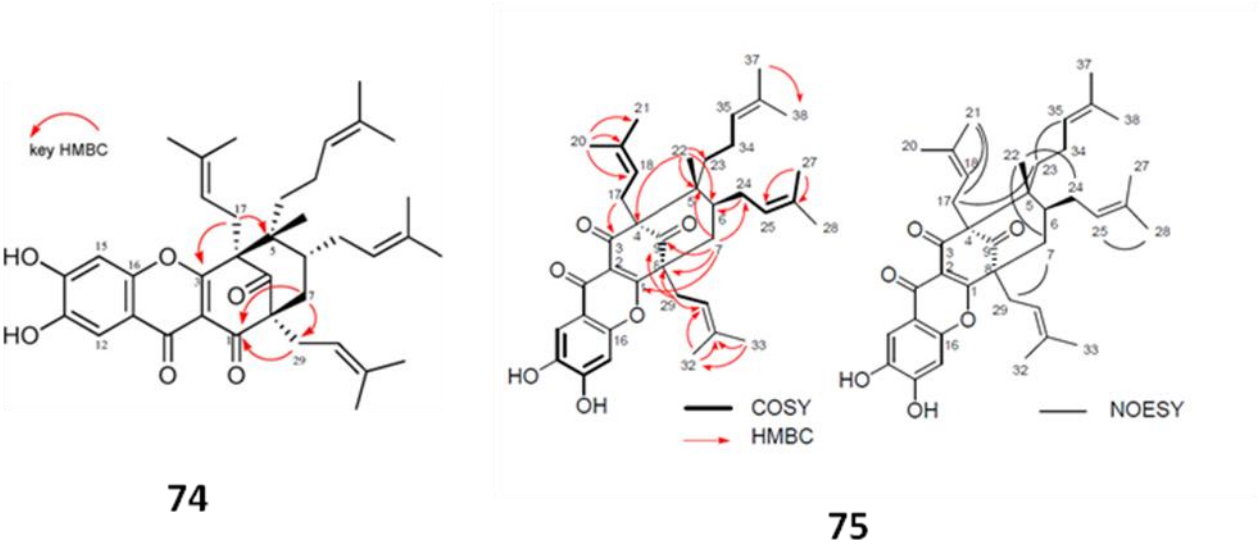


Figure 46 : Corrélations 2D de **74** et **75**.

2.1.4. Activités biologiques des molécules isolées des extraits de graines et de latex.

Ces 11 composés ainsi que le mélange « st003 113-114 » furent ensuite testés sur *P. falciparum* et *L. donovani,* comme illustré **tableau 10**. Les résultats obtenus ont montré que seules les deux xanthones **74** et **75,** avaient une meilleure activité que la guttiférone A sur les deux parasites.

[80] Y. Fromentin, extraction et hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A, *thèse de doctorat*, soutenu le 27 septembre **2013.**

[111] Y. Fromentin *et al*, Yeast-Mediated Xanthone Synthesis through Oxidative Intramolecular Cyclization, *Organic letters*, **2012**, 14, 19, 5054-5057

entrée	***Métabolites secondaires isolés à partir de l'extrait de graines***					
		Leishmania donovani		*Plasmodium falciparum*		
		axenic	intra macrophage	50 ug/mL	10 ug/ mL	IC50
1	guttiférone A	25 ± 1,5	3,54 ± 0,58	99%	97%	5.5
2	guttiférone B	50 ± 5,5	5,85 ± 1,94	n.d.	n.d.	n.d.
3	guttiférone C	25 ± 5,5	1,56 ± 0,11	n.d.	n.d.	n.d.
4	guttiférone C+D	>100	>100	99%	31%	n.d.
5	3,16 oxyguttiférone A	25 ± 2,7	0,61 ± 0,18	99%	99%	0.89
6	1,16 oxyguttiférone A	>100	5,32 ± 2,07	99%	99%	1.8
7	GB1a	>100	>100	99%	71%	n.d.
8	GB2a	>100	53,6 ± 5,8	98%	0%	n.d.
9	GB2	>100	4,38 ± 1,71	n.d.	n.d.	n.d.
	Métabolites secondaires isolés à partir de l'extrait de latex					
10	guttiférone A	25 ± 1,5	3,54 ± 0,58	99%	97%	5.5
11	guttiférone C	25 ± 5,5	1,56 ± 0,11	n.d.	n.d.	n.d.
12	st003 113-114	50 ± 2,5	17,4 ± 6,55	n.d.	n.d.	n.d.
13	xanthone V2A	>100	29,2 ± 4	n.d.	n.d.	n.d.

Tableau 10 : Activités biologiques des composés isolés des graines et du latex de *Symphonia globulifera*

Cette activité sub-micromolaire nous a conduits à considérer ces molécules, comme produits de départ pour des études de RSA. Cependant leurs faibles rendements d'extraction (0.002 %), justifiaient de développer une hémisynthèse à partir de la guttiférone A. De plus, nous avions fait l'hypothèse que cette dernière etait un précurseur bio-synthétique des oxy-guttiférone **74** et **75**. Certaines données de la littérature semblaient aller dans ce sens, notamment les travaux développés dans la partie suivante.

2.1.5. Voies biosynthétiques possibles des oxy-PPAPs

En 2008 lors d'investigations sur *G. yunnanensi*[112], l'équipe de Xu a identifié à partir du péricarpe, deux composés également très proches structuralement : la guttiférone L **79** et la garciyunnanine B **80** (**Figure 47**).

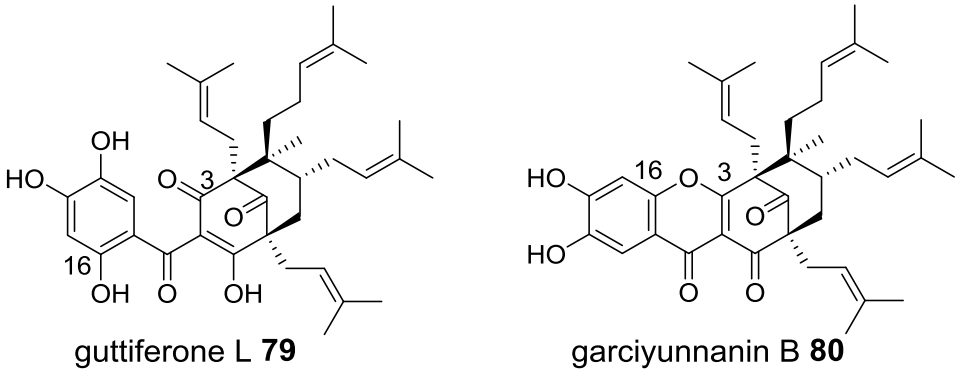


Figure 47: Composés isolés de *G. yunnanensi*

Les auteurs postulent alors que la conversion biosynthétique passerait par l'activation de l'énol en C3, afin de mener une condensation sur la position C16, donnant lieu à la formation du produit et la perte d'une molécule d'eau (**Schéma 10**).

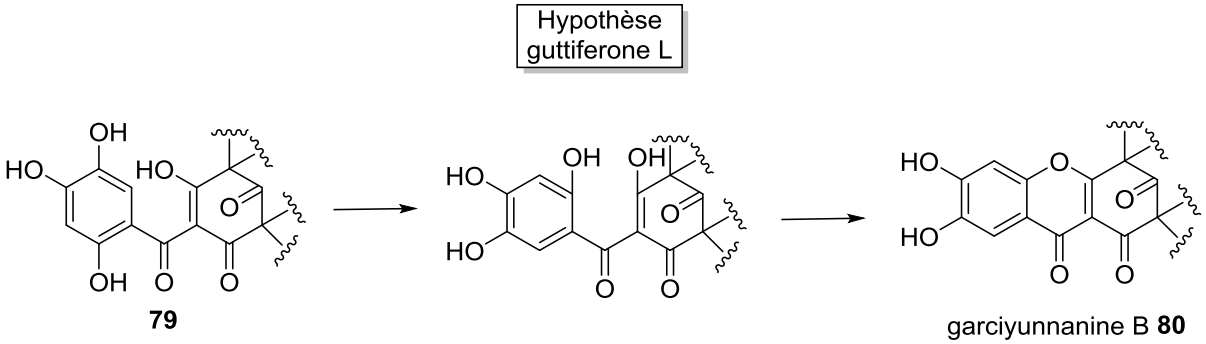


Schéma 10 : Hypothèse de biosynthèse de la garciyunnanine B par Xu *et al.*

Ce scénario semble peu probable compte-tenu du fait que la guttiférone L est le seul PPAPs tri-hydroxylé isolé, alors que plusieurs autres oxy-PPAPs ont été isolés.

Plus récemment en 2012, N'guyen et coll. proposent un mécanisme biosynthétique de la thorélione A **81**[113] (**Figure 48**) impliquant une pseudo addition de Mickael menant à la biosynthèse de l'oxy-thorélione A **82**.

[112] G. *Xu et al.,* Bioassay and Ultraperformance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Guided Isolation of Apoptosis-Inducing Benzophenones and Xanthone from the Pericarp of *Garcinia yunnanensis Hu*, *J. Agric. Food Chem*., **2008**, 56, 11144-11150.

[113] LTT. *Nguyen et al,* Polyisoprenylated acylphloroglucinols and a polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii, Tet. Lett*., **2012**, 53, 4487-4493.

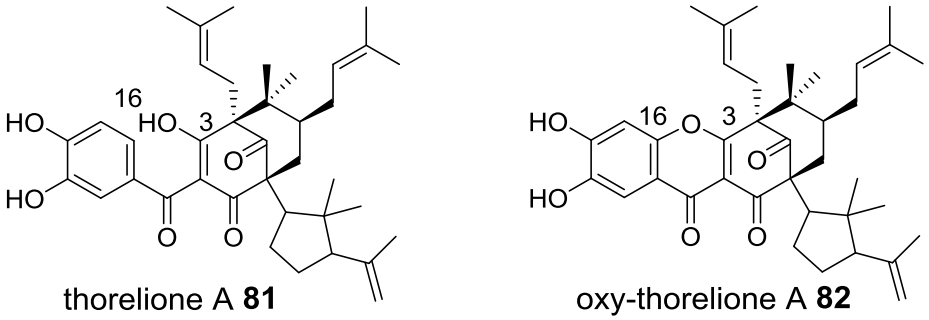


Figure 48 : Structures de la thorelione A et de l'oxy-thorelione A

L'attaque des doublets non liants de l'énol porté par le carbone numéroté 3 sur la position 16 du cycle aromatique, induirait la délocalisation d'une charge sur la cétone. Le retour à un système complètement aromatique, par la perte d'un proton, conduirait à la formation du produit désiré comme illustré **schéma 11**.

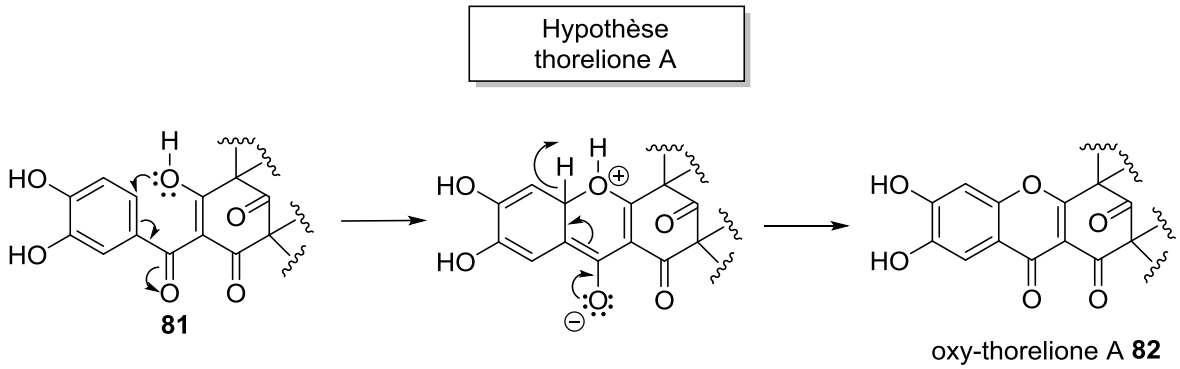


Schéma 11 : Hypothèse de biosynthèse de l'oxy-thorelione A par N'guyen *et al.*

Un troisième mécanisme est proposé par le groupe de Sang[114,115], (**Figure 49** et **Schéma 12**). Celui-ci impliquerait un intermédiaire radicalaire. L'oxydation de l'énolate en C3 en espèce « énolate radical », permettrait la création d'une liaison C_{ar}-O. Cette espèce complètement aromatique, pourrait voir les électrons résultants se déplacer pour donner une forme mono cétonique. Cette forme pourrait ensuite revenir en forme type cathécol pour donner le produit souhaité.

[114] S. Sang *et al*., Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxyl radicals and their antitumor activities. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 10095-10102.

[115] S. Sang *et al*., Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol and theirs antitumor activities, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9931-9938.

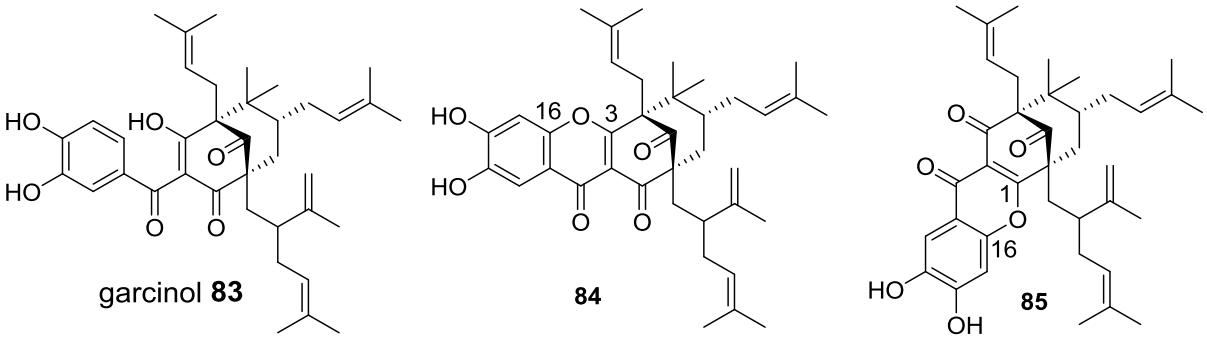


Figure 49 : Structure du garcinol et de ces dérivés cyclisés

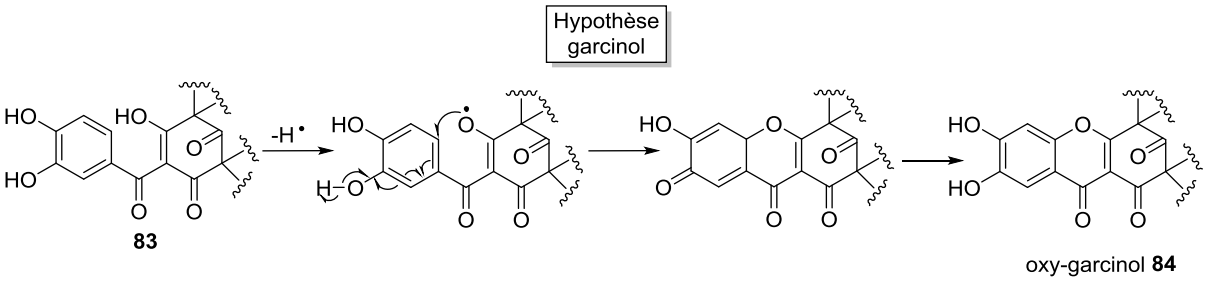


Schéma 12 : Hypothèse de biosynthèse des oxy-garcinols par Sang *et al.*

Les travaux de Huang *et coll.* [116], permettant la conversion du garcinol **83** en dérivés oxydés similaires **48** et **49** à l'aide de 2,2-Diphényl-1-(2,4,6-trinitrophényl)hydrazyl (DPPH) (un oxydant connu pour initier des réactions radicalaires) supportent ce type de mécanisme illustré **schéma 13**.

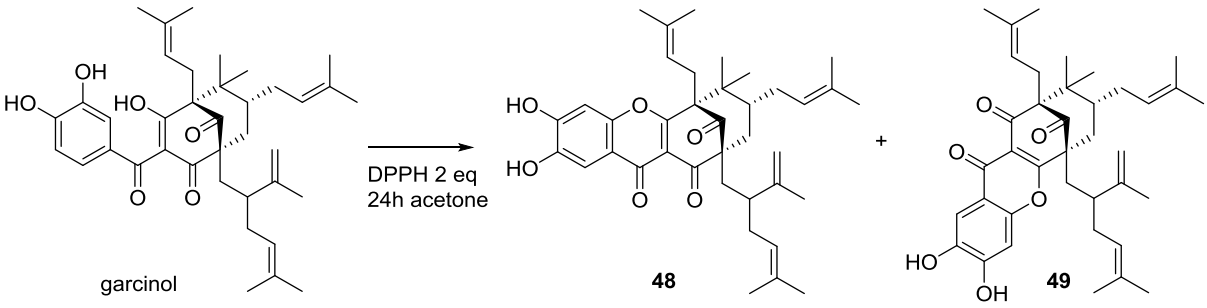


Schéma 13 : oxydation du garcinol par le DPPH

[116] SX. Huang *et al.,* Bioassay-Guided Isolation of Xanthones and Polycyclic Prenylated Acylphloroglucinols from *Garcinia oblongifolia*, J. Nat. Prod., **2009**, 72, 130-135.

Partie 2 : Développement d'une méthode d'isolement de la guttiférone A par Chromatographie de Partage Centrifuge.

2.2.1. Introduction

Comme précisé précédement, notre objectif fut de réaliser plusieurs générations d'analogues de la guttiférone A. La cyclisation intramoléculaire fut l'une des pharmacomodulations envisagées. Pour la synthèse de ces analogues, il nous fallait disposer de grandes quantités de produit de départ. Nous avons donc mis au point une méthode d'isolement rapide, efficace, écologique et adaptable à de grandes quantités. La chromatographie de partage centrifuge nous paraissait être la méthode de choix présentant tous ces avantages.

2.2.2. Principe de la CPC

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique chromatographique basée sur le principe de la chromatographie à contre-courant. Bien que la technique ait été développée il y a une cinquantaine d'années[117], ce n'est que plus récemment que les applications importantes concernant la chimie des substances naturelles furent mises au point[118,119]. La séparation des composés repose sur la différence de solubilité de ces derniers, entre une phase mobile et une phase maintenue stationnaire, à l'aide de la force centrifuge engendrée par une rotation importante. L'efficacité de cette technique est basée sur une séparation graduelle et progressive à travers de nombreuses cellules (environ un à deux milliers pour la majorité des appareils). Le principe de séparation peut fonctionner en mode ascendant (ASD) (**Figure 50)**. C'est-à-dire par injection de la phase mobile légère par le « bas » de la cellule et récupération de celle-ci après séparation par le « haut ». Le mode descendant (DSD) fonctionne sur le même principe, toutefois la phase mobile est cette fois la phase la plus dense.

[117] Y. Ito and R.L. Bowman, Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support, *Science,* **1970**, 167 , 3916, 281–283.

[118] K. Hostettmann and A. Marston, Liquid-liquid partition chromatography in natural product isolation**,** *Analytica Chimica Acta,* **1990,** 236, 63–76.

[119] B. Kedzierski*, et al.*, Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances--a review, *Acta Pol Pharm.,* **2014***,* 71, 2, 223-237.

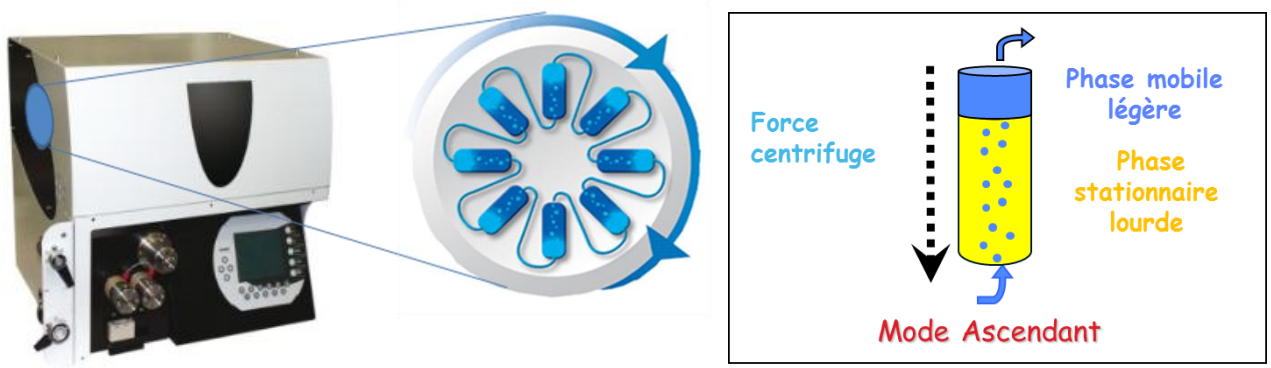


Figure 50 : Principe de fonctionnement de la CPC, (illustrations : Grégoire Audo, Armen Instruments)

L'absence de support solide présente de nombreux avantages, évitant ainsi l'adsorption irréversible, la dégradation de certaines molécules. Cette technique est également connue pour réaliser des économies de temps et de solvants, vis-à-vis des chromatographies sur gels de silice plus classiques.

Le choix de composition des systèmes bi-phasiques est primordial pour cette technique. Ainsi l'élaboration du système adéquat peut se révéler longue et fastidieuse en fonction des exigences.

L'appareil présent dans le laboratoire est un modèle construit par ARMEN instrument (SCPC-250+1000-B) possédant un rotor de 250 mL (1953 cellules jumelles) et un second de 1 000 mL (2016 cellules jumelles). Une valve incorporée à l'appareil permet de passer du mode ASD à DSD en cours d'utilisation. Ce type d'appareil est parfait pour développer une technique de purification. En effet, le petit rotor sert à rechercher le meilleur système de solvants, puisque la quantité minimale d'extrait à purifié dans les conditions « normales » est d'environ 300 mg. Le rotor plus important sert à augmenter la masse d'extrait à purifier, allant jusqu'à 20 g.

2.2.3. Préparation des extraits.

Afin d'isoler la guttiférone A, nous avons alors travaillé sur les organes semblant contenir de grandes quantités de PPAPs comme nous l'avons déterminé chapitre 1 soit : les graines, les fruits, le latex et les fleurs. Historiquement la guttiférone A avait déjà été isolée des feuilles de *Symphonia globulifera*[24], nous avons donc également travaillé cet organe afin de comparer nos résultats avec ceux de la littérature.

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.

Photo 8 : Parties de *Symphonia globulifera travaillés* par CPC

L'extraction au méthanol permet d'extraire de nombreux types de composés dont les PPAPs. Cependant cette méthode n'est pas très sélective car de nombreux composés très polaires tels que des sucres et des hétérosides sont également extraits. Afin de nous affranchir de ces derniers, nous avons donc réalisé une première purification liquide/liquide à l'aide d'un mélange acétate d'éthyle/ eau. Les rendements d'extractions sont présentés **tableau 11. Ces rendements de 5 à 55 % sont élevés et reflètent l'abondance des composés apolaires dans ces extraits.**

Parties de plantes	Péricarpe	Graines	Latex	Fleurs	Feuilles
Rendement d'extraction	11,62%	17,60%	54,60%	4,80%	5,20%

Tableau 11 : Rendement d'extraction des différents organes

2.2.4. Profils chromatographiques des extraits et quantification de la guttiférone A

Dans le but d'investiguer les compositions phytochimiques de ces extraits, nous avons réalisé des profils chromatographiques par HPLC, en nous servant de témoins obtenus lors de travaux antérieurs. Les profils chromatographiques obtenus à 254 nm (**Figure 51)** ont été réalisés à l'aide d'une colonne C18 (Phenomenex, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm) avec un gradient d'acétonitrile dans l'eau (c.f. partie expérimentale).

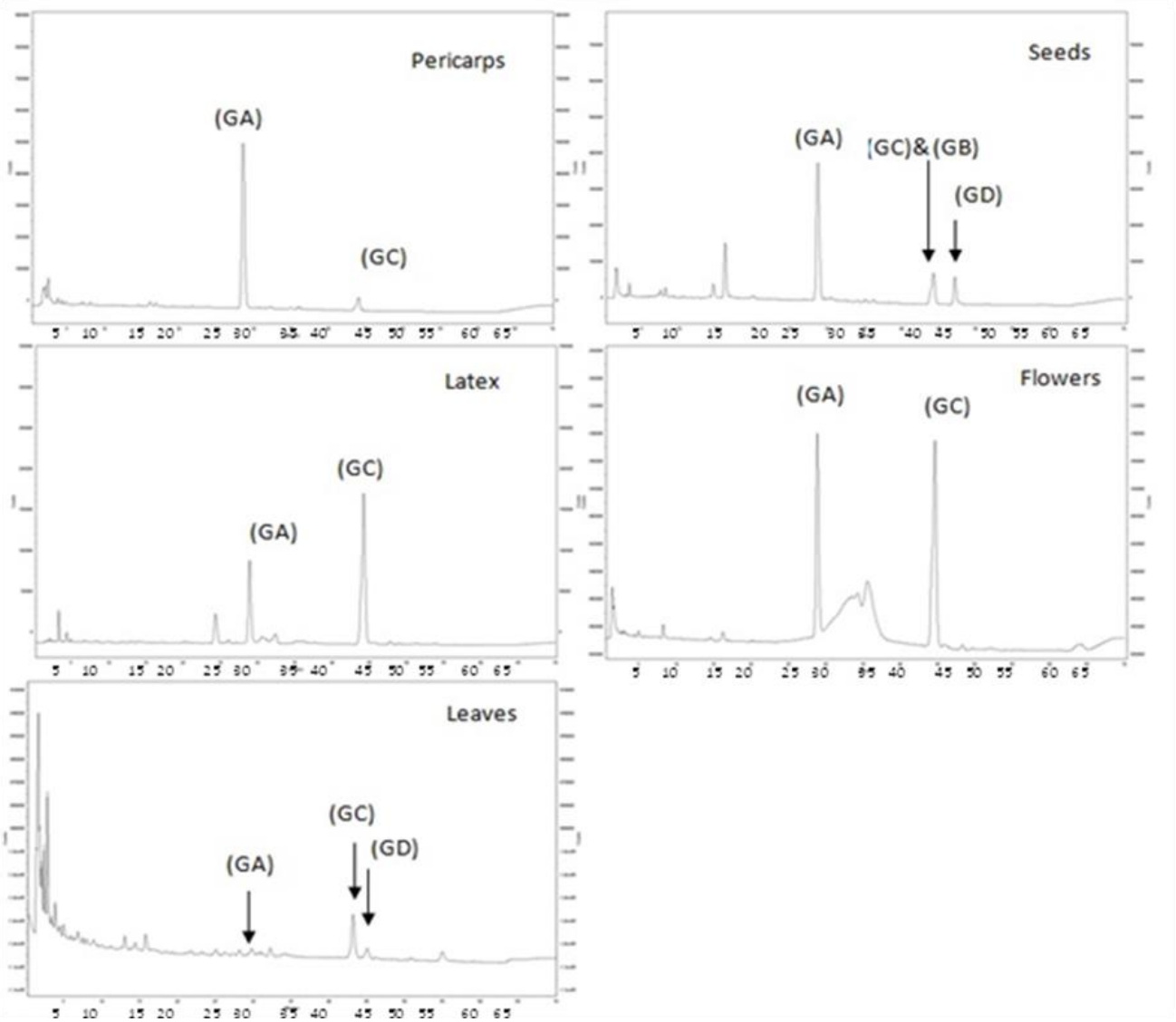


Figure 51 : Profils chromatographiques des extraits (GA : guttiférone A ; GB : guttiférone B ; GC : guttiférone C ; GD : guttiférone D.+

Aux vues des chromatogrammes, nous avons constaté que la guttiférone A, molécule d'intérêt était présente dans toutes les parties de la plante, même si elle était minoritaire dans l'extrait de feuilles. La guttiférone C etait également identifiée dans tous les extraits. Elle était majoritaire ou équivalente à la guttiférone A dans le latex et les fleurs respectivement. Il est important de noter ici que ces conditions de chromatographies couplées à l'utilisation de cette colonne précisément, semblaient permettre de distinguer la guttiférone C de la guttiférone D. En revanche dans ce système, la guttiférone B coéluait avec la guttiférone C.

Nous avons ensuite voulu quantifier la guttiférone A dans ces extraits. Nous avons donc effectué, une droite étalon comprenant cinq concentrations différentes, dont les

enregistrements ont été réalisés trois fois par jour durant trois jours, afin de minimiser les variations intra et inter journalières (**Figure 52**).

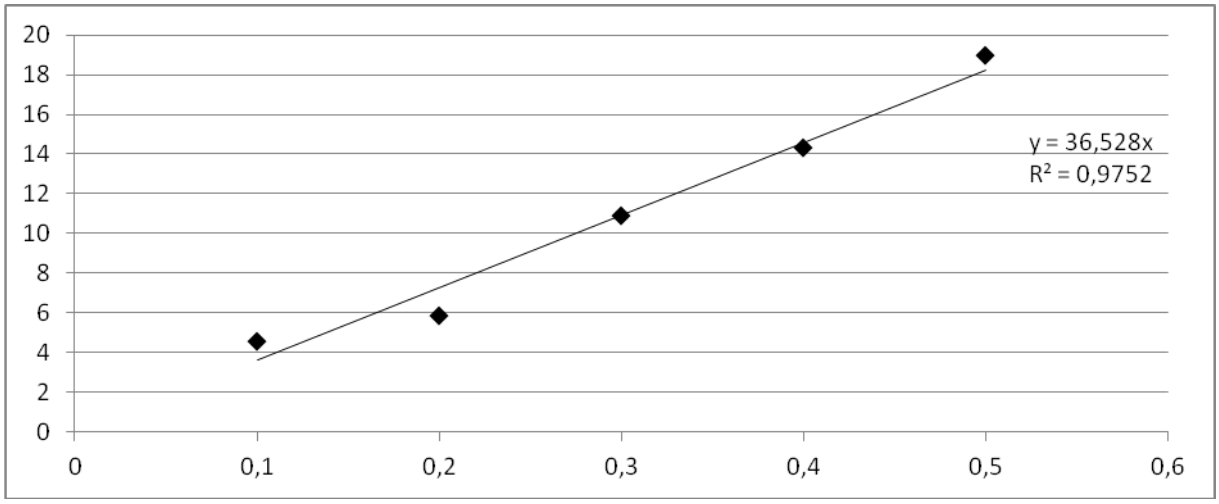


Figure 52 : Droite étalon de la guttiférone A. L'axe des x représente la concentration en mg/mL, l'axe des y est le nombre de coups (relatif à l'absorbance) (valeur divisée par 10^6)

La valeur de r^2, proche de 1, nous a incités à utiliser l'équation de régression linéaire associée à cette droite, afin de déterminer la quantité de guttiférone A présente dans chaque extrait. Chacun des extraits étudiés a été soumis à la même analyse (c.f. partie expérimentale). L'aire du pic correspondant au temps de rétention de la guttiférone A a été mesurée également sur cinq concentrations différentes, trois fois par jour durant trois jours. L'analyse des équations de régression linéaire, nous a permis de déterminer la quantité de guttiférone A, présente dans chaque extrait. Afin de normaliser ces résultats, nous avons pris en compte le rendement d'extraction respectif de chaque partie. La proportion en guttiférone A de chaque partie de plante a été exprimée en % (masse guttiférone A/ masse matière végétale sèche) (**Tableau 12)**.

Partie de plante	**Péricarpes**	**Graines**	**Latex**	**Fleurs**	**Feuilles**
Quantification par CLHP	5.40 %	3.30 %	12.17 %	1.80 %	4.20 x 10^{-4} %
r^2	0.94	0.90	0.88	0.91	0.96

Tableau 12 : Proportion estimée de guttiférone A dans chaque partie de plante (exprimé en m produit / masse matière végétale sèche)

La lecture de ce tableau permet les conclusions suivantes :

-Les feuilles ne contiennent pas ou peu de guttiférone A. Cette observation est conforme aux données retrouvées dans la littérature.REF

-Les fleurs, graines et péricarpes contiennent d'excellentes proportions de guttiférone A.

-Le latex, avec plus de 12 %, est la partie du *Symphonia globulifera* la plus riche en guttiférone A. On remarquera que la grandeur de ce chiffre est exceptionnelle et rarement observée pour des métabolites secondaires si complexes.

Néanmoins, concernant l'obtention de guttiférone A à grosse échelle, les graines et les péricarpes possèdent l'avantage de pouvoir être récoltés en quantité bien plus importante, compensant alors leurs teneurs plus faibles.

Suite à cette étude de quantification, nous avons envisagé le développement d'un système de solvants qui nous permettrait d'obtenir de grandes quantités de guttiférone A par CPC à partir de ces extraits.

2.2.5. Mise au point d'une méthode d'isolement des PPAPs par CPC

Les coefficients de distribution de composés les plus proches (guttiférone B, C et D) ont été calculés, dans plusieurs systèmes adaptés du système ARIZONA. Ces coefficients ont été estimés en fonction des rapports des aires des pics concernés en HPLC, selon la méthode inter et intra-journalière décrite précédement.

Système (cyclohexane/ acétate d'éthyle / méthanol / eau)	*Kd* 1 (GA)	*Kd* 2 (GB)	*Kd* 3 (GC& GD)	*Kd* 2/ *Kd* 3	*Kd* 1 / *Kd* 3
3 :1 :3 :1	3.03	9.09	5.56	0.61	0.55
19:1:15:5	1.04	1.35	1.23	0.92	0.84
14:1:14:1	0.56	0.55	0.60	0.93	0.93
16:1:16:1	0.44	NC	0.50	NC	0.88
18:1:18:1	0.35	0.47	0.43	0.92	0.83
20:1:20:1	0.31	0.47	0.38	0.80	0.81

Tableau 13 : Calcul des Kd des PPAPs dans différents systèmes de solvants

En général, un *Kd* se rapprochant de 1 est recommandé, mais ici un tel système (19 :1 :15 :5) ne nous a pas permis de séparer les différents PPAPs. Le rapport des coefficients de partage (Kd1/Kd3) était trop proche de 1, induisant la coélution des métabolites. Après de nombreux essais, nous avons pu déterminer que le système 20:1:20:1 était le plus apte à séparer nos composés. En effet, que cela soit sur le rotor de 250 mL ou de 1L, la séparation de ces composés entre eux et vis-à vis des autres types de métabolites, fut suffisante. Le rotor de 1L

étant bien plus résolutif que celui de 250mL, les données expérimentales présentées ont été référencées aux expériences effectuées sur ce rotor. La guttiférone A, notre molécule d'intérêt est obtenue avec un grand degré de pureté aux vues des analyses effectuées sur les fractions (estimée > 95 % par HPLC, RMN et SM). A partir des extraits de péricarpe, graines et latex, nous avons pu isoler une grande proportion de cette molécule et ce, en une seule chromatographie avec 96, 83 et 92 % de rendement respectivement.

Organe	Péricarpes	Graines	Latex	Fleurs	Feuilles
Quantification par CLHP (en %)	5.2	3.5	12.17	1.3	0.00042
Isolé par CPC (1L) (en %)	4.97	2.9	11.2	0.5	0.0005
Rendement	96 %	83 %	92 %	38 %	1.19 %

Tableau 14 : Efficacité de la technique de purification par CPC en fonction des organes (exprimé en % masse produit /masse matière végétale sèche)

Pour les extraits de fleurs, seulement 38 % de guttiférone A quantifiée sont extraites *via* l'utilisation de la CPC. Concernant cet extrait une seconde chromatographie nous permettrait certainement d'obtenir une plus grande proportion de guttiférone A. Concernant les feuilles, le pourcentage supérieur à 100 % peut être expliqué par des erreurs analytiques causées par l'utilisation de masses et valeurs top petites pour refléter avec exactitude la réalité compte-tenu de l'appareillage. Le système de solvants, nous a permis d'éluer rapidement de nombreuses molécules apolaires. Une bonne séparation par rapport aux autres métabolites des PPAPs fut observée, car ces derniers furent élués en dernier. Par chance la pureté de la guttiférone A fut quasiment similaire quelque soit l'extrait utilisé.

Cette méthode basée sur la CPC a été efficace pour l'isolement de la guttiférone A, ainsi que pour d'autres PPAPs. Nous nous sommes néanmoins demandé si cette méthode était effectivement plus efficace que celles, plus classiques décrites dans la littérature. Plusieurs chromatographies éclairs (flash) successives ont donc été réalisées sur ces mêmes extraits, afin de comparer ces deux méthodes. Il a fallu trois chromatographies (1 : gradient méthanol dans dichlorométhane ; 2 : gradient acétate d'éthyle dans le cyclohexane 3 : gradient méthanol dans dichlorométhane) afin d'obtenir la guttiférone A, avec un degré de pureté approchant celui obtenu lors de la chromatographie par partage centrifuge. Les pourcentages de produits isolés sont exprimés **tableau 15**.

Organes	Péricarpes	Graines	Latex	Fleurs	Feuilles
Silice	5.19%	1.23%	7.09%	0.50%	$2.8\ 10^{-5}$ %
vs					
CPC 1L	4.97%	2.90%	11.17%	0.50%	$5.0\ 10^{-4}$ %

Tableau 15 : Comparatif des méthodes d'isolement de la guttiférone A par chromatographie flash et CPC

Nous avons pu observer que les rendements d'isolement sont, proches (péricarpes et fleurs) ou inférieurs (graines, feuilles et latex) à ceux obtenus après une seule chromatographie par partage centrifuge. De plus, les degrés de pureté de guttiférone A obtenus par CPC sont bien supérieurs à ceux observés après chromatographies flash.

Si nous voulions comparer les deux méthodes, celle développée par CPC est :

- Plus rapide,
- Plus écologique (moins de solvant, pas de solvants chlorés, moins de silice),
- Plus efficace (obtention de plus de produit, meilleur pureté).

Nous avons également isolé d'autres PPAPs dans des proportions variables en fonction des différents extraits (**Figure 53**).

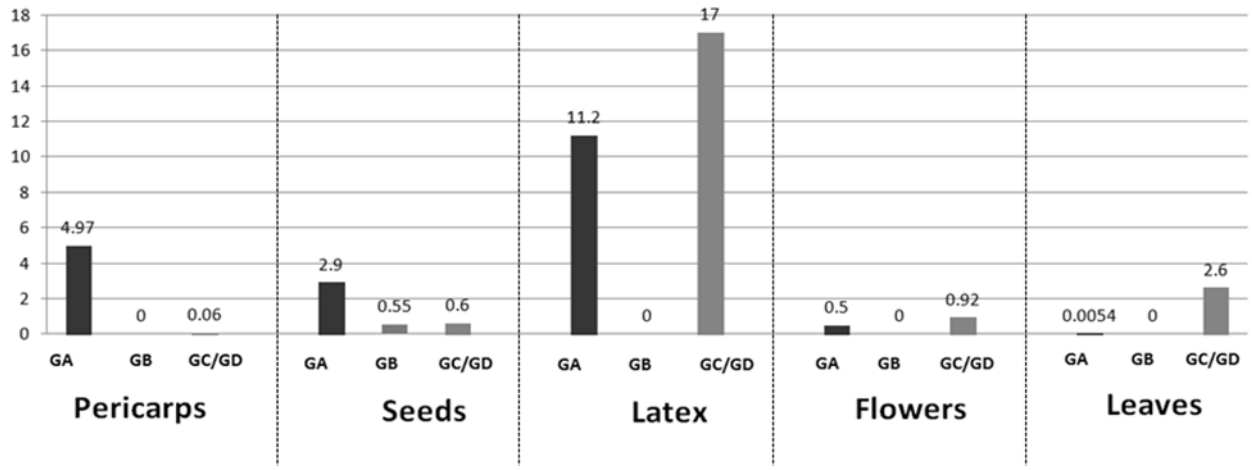


Figure 53 : Histogramme représentant le pourcentage de PPAPs isolé (masse produit / masse matière végétale sèche).

Ces derniers furent isolés avec une pureté plus que convenable (>85 %). La guttiférone B ainsi que le mélange des guttiférones C et D ont été isolés à partir des graines. La guttiférone C est isolée seule à partir de l'extrait de péricarpe et de fleur, avec une bonne pureté également. Les chromatogrammes HPLC (254 nm) des produits ainsi obtenus après une seule chromatographie sont présentés **figure 54**.

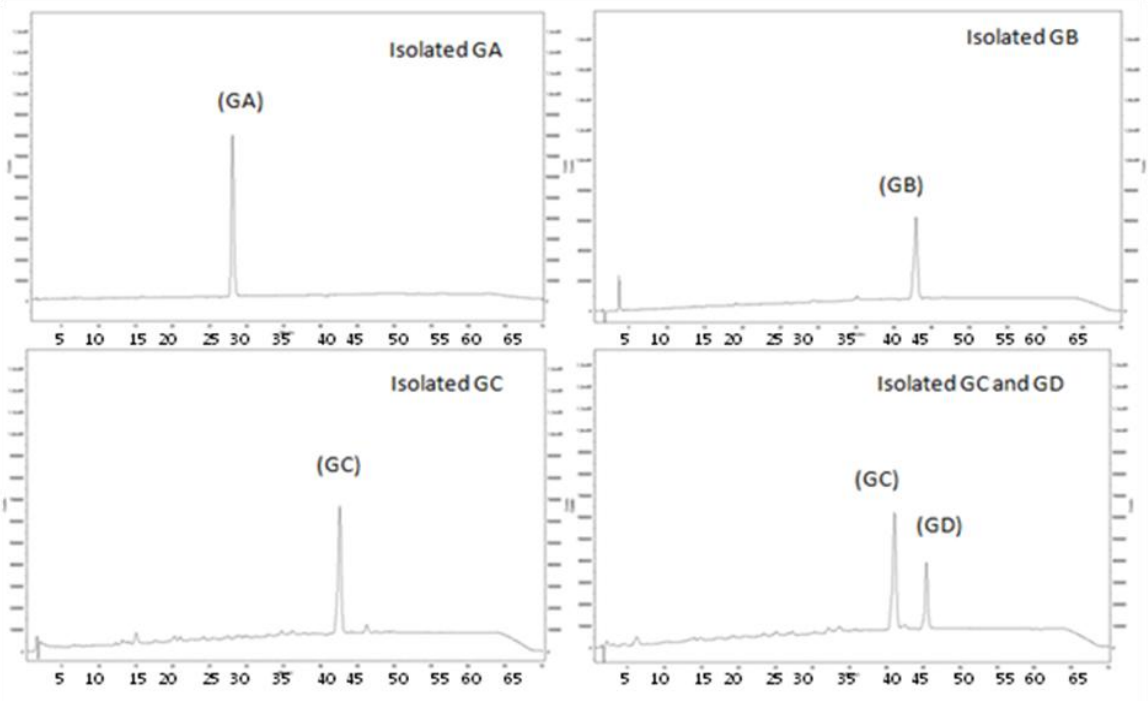


Figure 54 : Profils chromatographiques des produits isolés à partir des extrait de graines (GC+ GD, GB, GA) et péricarpes (GC seule)

Nous avons donc développé une méthode plus efficace, plus rapide, plus respectueuse de l'environnement et utilisable à grande échelle pour obtenir de grande quantité de guttiférone A. De plus, Cette méthode peut également être étendue à l'isolement d'autres PPAPs, facilitant ainsi les futures investigations phytochimiques. L'étape suivante fût donc de réaliser les nouvelles générations d'analogues à partir de cette guttiférone A naturelle.

CHAPITRE 3 : CYCLISATIONS INTRAMOLÉCULAIRES DE LA GUTTIFÉRONE A

Introduction :

Comme précisé précédemment, les oxy-PPAPs sont plus actifs que les composés ouverts sur les cibles parasitaires choisies. Nous nous sommes donc intéressés à ces molécules dans le but de synthétiser de nouvelles générations d'analogues. Des expériences préliminaires réalisées lors de la thèse du Dr Y. Fromentin, ont mis en avant l'impossibilité de cycliser les analogues de première génération comme représenté **schéma 14**. **Nous avons donc envisagé de réaliser l'hémisynthèse de ces oxy-PPAPs, puis de les fonctionnaliser afin d'obtenir notre deuxième génération d'analogues hémisynthétiques.**

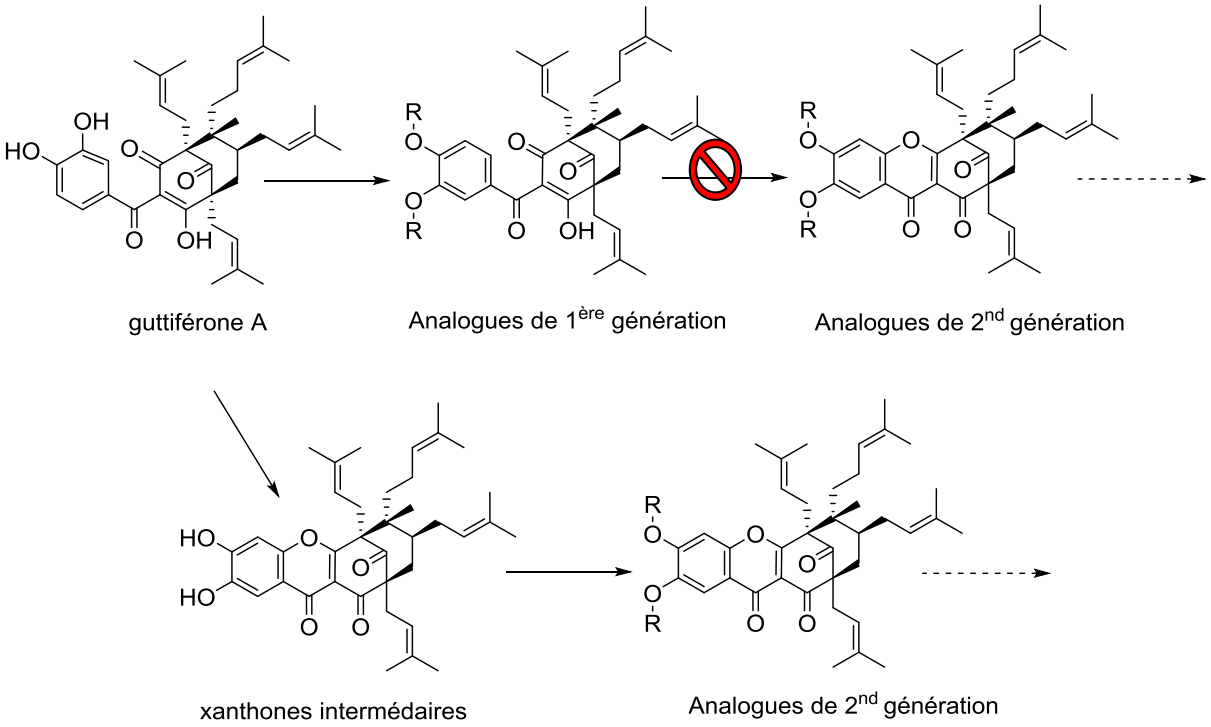


Schéma 14 : Stratégies de synthèse vers l'obtention d'analogues de deuxième génération.

La première étape de ce schéma hémisynthétique est la cyclisation du noyau benzophénone de la guttiférone A. Il nous paraissait donc particulièrement intéressant de trouver une voie d'accès à ce motif xanthonique. Cette méthodologie pourrait être également valorisée dans la synthèse d'autres composés naturels de cette famille possédant ce motif (**Figure 55**, **Tableau 16**).

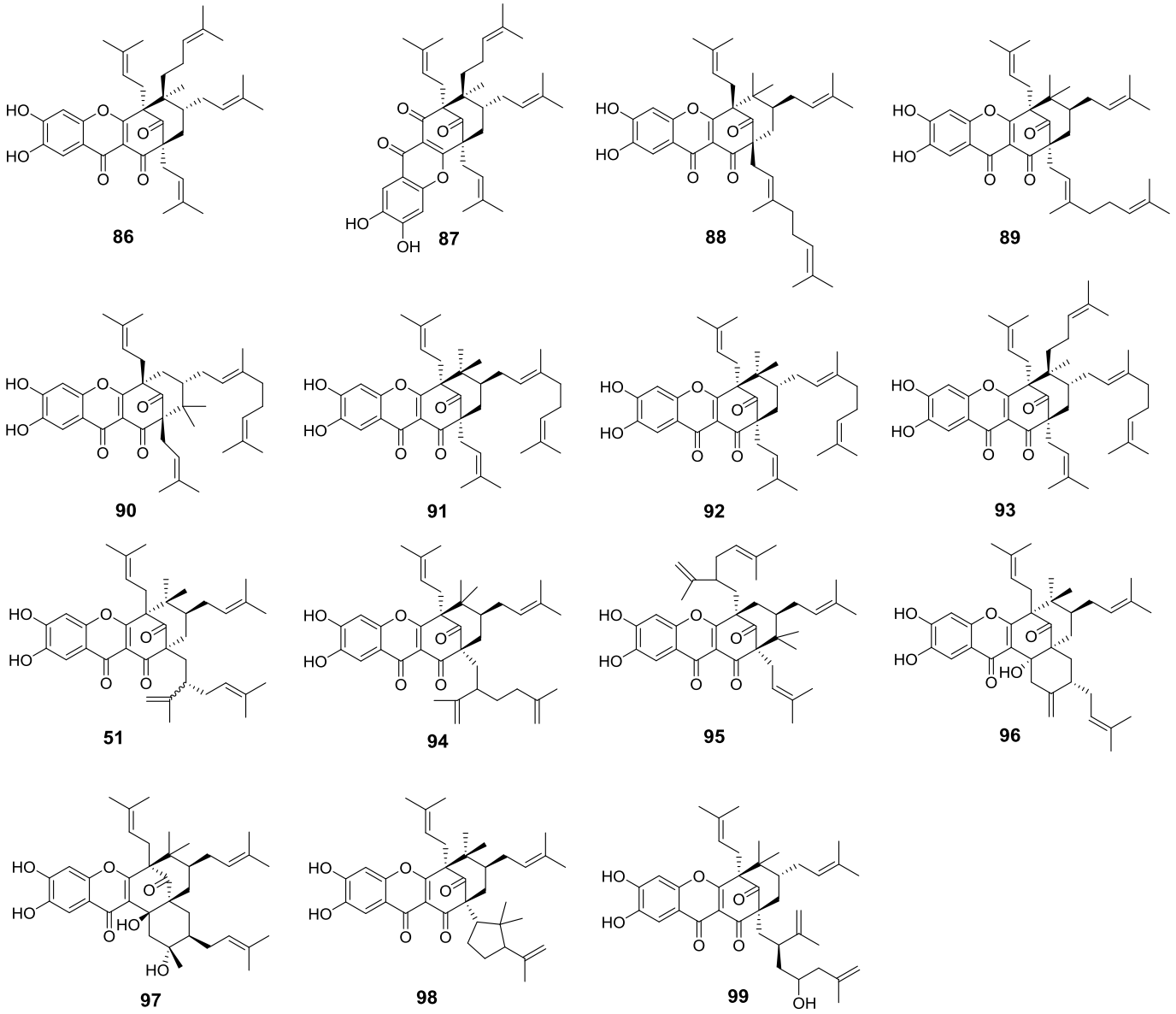


Figure 55 : PPAPs cyclisés naturels possédant le motif xanthone

N°	nom	plante	partie de plante	référence
86	oxy-guttiférone K	*Garcinia cambogia*	fruits	Milena Masullo *et al.*,[120]
87	oxy-guttiférone K2	*Garcinia cambogia*	fruits	Milena Masullo *et al.*,[121]
88	oxy-guttiférone M	*Garcinia cambogia*	fruits	Milena Masullo *et al.*,
89	oxy-guttiférone I	*Garcinia cambogia*	fruits	Milena Masullo *et al.*,
90	guttiférone O	*Garcinia afzelii*	graines	Alain Meli Lannang *et al.*,[122]
91	oblongifoline F	*Garcinia oblongifolia*	écorces	Sheng-Xiong Huang *et al.*,[116]
92	oblongifoline G	*Garcinia oblongifolia*	écorces	Sheng-Xiong Huang *et al.*,
93	garciyunnanines B	*Garcinia yunnanensis*	péricarpes	Gang Xu *et al.*,[112]
51	symphonone H	*Symphonia globulifera*	écorces de racines	Guillaume Marti *et al.*,[46]
94	nujiangéfoline A	*Garcinia nujiangensis*	feuilles	Zheng-Xiang Xia *et al.*,[123]
95	nujiangéfoline B	*Garcinia nujiangensis*	feuilles	Zheng-Xiang Xia *et al.*,
96	symphonone I	*Symphonia globulifera*	écorces de racines	Guillaume Marti *et al.*,
97	garcinialone	*Garcinia multiflora*	racines	Shih-Chang Chien *et al.*,[124]
98	oxy-thorélione A	*Calophyllum thorelii*	écorces	Le-Thu T. Nguyen *et al.*,[113]
99	Garciesculentone C	*Garcinia esculenta*	tiges	Hong Zhang *et al*[125]

Tableau 16 : oxy-PPAPs naturels

[46] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), *Phytochemistry* , **2010**, 71, 964-974.

[112] G. *Xu et al.,* Bioassay and Ultraperformance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Guided Isolation of Apoptosis-Inducing Benzophenones and Xanthone from the Pericarp of *Garcinia yunnanensis Hu*, *J. Agric. Food Chem*., **2008**, 56, 11144-11150.

[113] LTT. *Nguyen et al,* Polyisoprenylated acylphloroglucinols and a polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii, Tet. Lett*., **2012**, 53, 4487-4493.

[116] S-X. Huang *et al.,* Bioassay-Guided Isolation of Xanthones and Polycyclic Prenylated Acylphloroglucinols from *Garcinia oblongifolia*, J. Nat. Prod., **2009**, 72, 130-135.

[120] M. Masullo *et al.,* Polyisoprenylated benzophenones and an unusual polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the fruits of *Garcinia cambogia*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2008**, 56, 5205-5210.

[121] M. Masullo *et al*., Polyisoprenylated benzophenone derivatives from the fruits of *Garcinia cambogia* and their absolute configuration by quantum chemical circular dichroism calculations, *Tetrahedron,* **2010**, 66, 139-145.

[122] A. Meli Lannang *et al*., Cytotoxicity of Natural Compounds Isolated from the Seeds of *Garcinia afzelii*, *Planta Medica,* **2010**, 76, 708-712.

[123] Z-X. Xia *et al*., Bioassay-Guided Isolation of Prenylated Xanthones and Polycyclic Acylphloroglucinols from the Leaves of *Garcinia nujiangensis*, *Journal of Natural Products*, **2012,** 75, 1459-1464.

[124] S-C. Chien *et al*., A novel polyprenylated phloroglucinol, garcinialone, from the roots of *Garcinia multiflora*, *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 5276-5278.

[125] H. Zhang *et al*., Cytotoxic and Anti-Inflammatory Prenylated Benzoylphloroglucinols and Xanthones from the Twigs of *Garcinia esculenta*, J. Nat. Prod., **2014**, 77, 1700−1707.

L'objectif de ce chapitre fut de développer des méthodes efficaces, permettant l'accès aux oxy-PPAPs. Ces méthodes ont permis d'accéder à une bibliothèque d'analogues de deuxième génération plus importante, augmentant ainsi la probabilité d'obtenir des analogues intéressants. Pour cela nous avons développé plusieurs méthodes de cyclisations basées sur :

- la bio-transformation par des micro-organismes endophytes,
- les méthodes éléctro-chimiques,
- les méthodes de synthèse chimique classique.

Plus récemment, des tests préliminaires avec des micro-organismes endophytes ont montré des résultats similaires. Nous avons donc choisi de développer cette partie en premier lieu.

Partie 1 : Cyclisations de la guttiférone A par des micro-organismes.

3.1.1 Introduction

Les micro-organismes sont capables de réaliser un grand nombre de biotransformations selon les espèces étudiées[126]. Lors de précédents travaux au laboratoire, des méthodes de bio-transformation par des levures et champignons de la guttiférone A **1** en xanthones ont été développées[111]. Les micro-organismes utilisés provenaient de la bibliothèque du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Nous avons continué notre collaboration avec le Dr. D. Buisson (MCAM), en étudiant cette fois-ci les biotransformations que pouvaient effectuer des micro-organismes endophytes. Cette étude a été rendue possible grâce au Dr Y. Fromentin. En effet, ce dernier a pu récolter des feuilles fraîches de *S.g.* lors de son voyage en guyane et isoler plusieurs souches de micro-organismes endophytes.

Les micro-organismes endophytes vivent à l'intérieur du tissu végétal en symbiose ou en mutualisme avec ce dernier. Bien que leurs rôles ne soient pas complètement élucidés ils semblent être impliqués dans de nombreux rôles écologiques[127] comme la production de métabolites secondaires de défense. Les micro-organismes endophytes sont une source de production de métabolites naturels importante ; comme pour le *Taxus sp* [128] produisant le paclitaxel ou certains endophytes d'*Hypericum perforatum* produisant de l'hyperforine[129].

Il nous paraissait donc envisageable que la guttiférone A **1,** étant un métabolite secondaire de cette même plante, soit plus facilement transformable par des micro-organismes de son biotope.

3.1.2. Isolement des micro-organismes du *Symphonia globulifera*

Les feuilles fraîches furent récoltées et caractérisées en Guyane Française sur le site de Macouria, par les Dr Guillaume Odonne et Arnaud Jahn-Oyac du laboratoire des Substances Naturelles Amazoniennes. Le Dr Yann Fromentin, s'est occupé des étapes de repiquages et d'isolement des micro-organismes. 25 souches différentes (d'un point de vue macroscopique) ont pu être isolées de trois feuilles de *Symphonia globulifera*.

Les observations microscopiques des spores de ces champignons n'ont pas pu aboutir à la détermination d'espèces. Nous nous sommes alors concentrés sur micro-organisme SG-1 dont les pellets sont très particuliers (**photographie 9**).

---

111 Y. Fromentin *et al*, Yeast-Mediated Xanthone Synthesis through Oxidative Intramolecular Cyclization, *Organic letters*, **2012**, 14, 19, 5054-5057.

126 K.Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, *Springer*, 6th edition, **2011.**

127 HW Zhang *et al*, Biology and chemistry of endophytes, *Natural, Product Reports,* **2006**, 23, 753-771.

128 S. Soliman *et al*., Chemical Inhibitors Suggest Endophytic Fungal Paclitaxel Is Derived from Both Mevalonate and Non-mevalonate-like Pathways, *Journal of Natural Products,* **2011,** 74*,* 2497-2504.

129 S. Kusari *et al*., An Endophytic Fungus from *Hypericum perforatum* that Produces Hypericin, *Journal of Natural Products,* **2008,** 71*,* 159-162.

Photographie 9 : Pellets remarquable de SG1 *(copyright YF)*

Le génotypage de cette souche effectuée par le Dr Joëlle Dupont nous a indiqué que cette espèce appartient au genre Curvularia. En revanche la détermination de l'espèce n'a pas pu aboutir, celle-ci étant certainement méconnue voir inconnue. Les *Curvularia* sont des champignons connus pour vivre notamment dans les zones tropicales en symbiose avec des végétaux.

3.1.3. Caractéristiques des *Curvularia*

Le genre Curvularia comprend 17 espèces et sont généralement retrouvées dans les sols ou en tant qu'endophyte dans les tissus végétaux d'espèces tropicales. L'espèce la plus étudiée est certainement *Curvularia protuberata*, endophytes du panis (*Panicum)*. Plusieurs biotransformations effectuées par *Curvularia lunata* ont déjà été décrites dans la littérature, réalisant des oxydations [130] ou des hydroxylations sur des terpènes[131] comme illustré **schéma 15**.

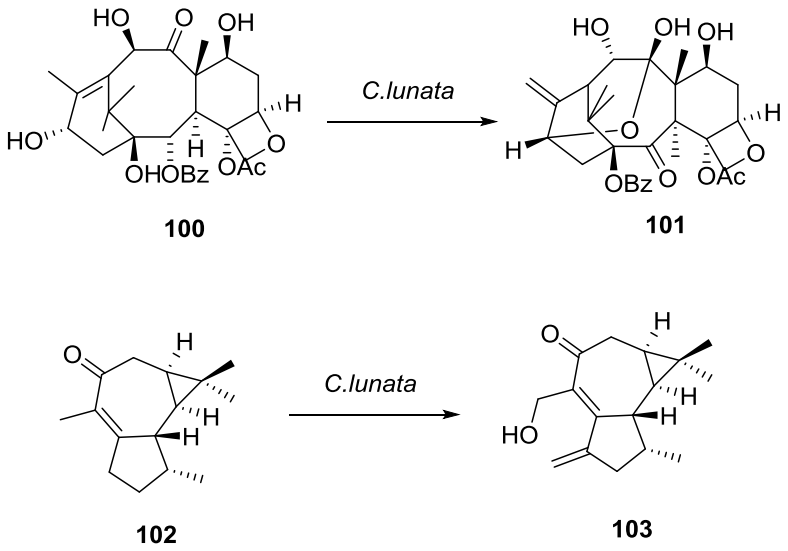


Schéma 15 : Oxydations réalisés par *Curvularia lunata*

[130] A. Arnone *et al*., Microbial transformations of the taxan ring of 10-DAB by some strains of the fungus *Curvularia lunata*: formation of the bis-abeotaxanes wallifoliol and 4-deacylwallifoliol, *J. Nat. Prod.,* **2010**, 73, 1049–1052.

[131] D. Collin and P. Reese, Biotransformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one and 3a-hydroxycadina-4,10(15)-diene by *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Phytochemistry,* **2002**, 59, 489–492.

3.1.4. Biotransformation des PPAPs avec SG1

Pour cela la souche SG1 a été mise en culture durant 72 h à 30°C. La biomasse fut ensuite récoltée par centrifugation (environ 130 g de biomasse encore humide) et resuspendue dans un tampon phosphate à pH 7.2. A ce mélange, la guttiférone A fut ajoutée dans un faible volume de DMF. Un échantillon de contrôle sans guttiférone A a également été effectué, pour s'assurer de la viabilité des micro-organismes. La bio-transformation fut effectuée à 30 °C sous agitation pendant 7 jours. Ensuite, le pH fut mesuré et correspondait à une valeur de 7.9. Après centrifugation, le surnageant fut acidifié et extrait à l'acétate d'éthyle. La biomasse fut quant à elle extraite au méthanol durant 15 minutes au sonicateur, avant d'être évaporée sous pression réduite. L'extrait méthanolique fut ensuite resolubilisé dans l'acétate d'éthyle puis deux lavages successifs avec l'HCl a permit de retirer les molécules les plus hydrosolubles. L'analyse des extraits par CLHP nous montre la présence des deux xanthones naturelles 3.16-oxy-guttiférone A **74** et 1.16-oxy-guttiférone A **75 (Schéma 16)**, à la fois dans le surnageant et dans la biomasse (**Figure 56**). En 7 jours, la conversion a été de 80 % et a permis d'obtenir **74** et **75** dans un ratio de 3.7 /1.

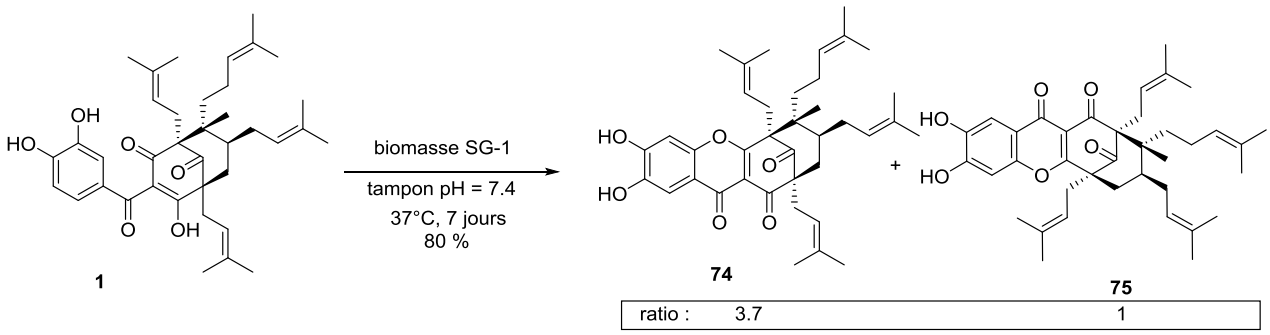


Schéma 16 : Biotransformation effectuée par le micro-organisme SG-1

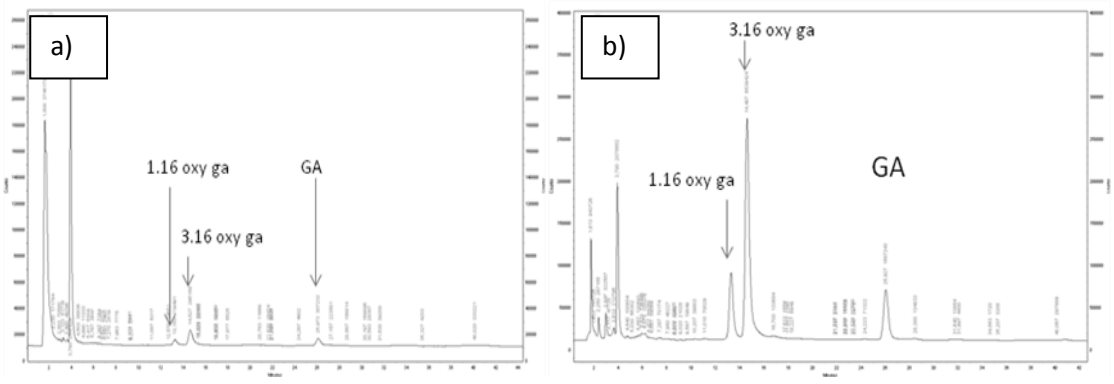


Figure 56 : Chromatogrammes CLHP à 254 nm des extraits provenant de la biomasse (a) et du surnageant (b), à des concentrations de 0.3 et 0.1 mg/mL respectivement.

Plusieurs hypothèses concernant l'enzyme responsable de cette réaction peuvent être faites :
- Cette enzyme serait sécrétée.
- Cette enzyme serait intracellulaire.
- Cette enzyme serait à la fois, sécrétée et intracellulaire.

Toutefois la lypophilie de ces produits leurs permet de passer facilement les membranes. Ceci expliquerait que l'intégration des pics de ces chromatogrammes indiquait une même proportion de **74**, **75** et **1** dans les extraits de biomasse et de surnageant. Cette remarque nous empêche de faire toute hypothèse sur la localisation de l'enzyme.

Il est important de noter que le ratio, de **74/75** de 3.7 obtenu lors de cette transformation, est très proche du ratio **74/75** observé dans l'extrait de graines (4/1)comme illustré **figure 57**.

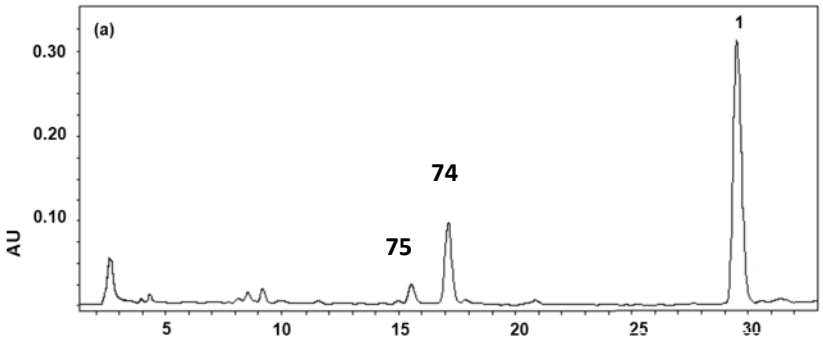


Figure 57 : Chromatogramme CLHP à 254 nm, de l'extrait de graines de *Symphonia globulifera*.

Ces ratios proches supposent que les composés isolés dans les graines de *Symphonia globulifera,* ont été obtenus *via* la même enzyme que celle impliquée dans cette bio-transformation. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables :

- Ces micro-organismes pourraient être responsables de la biosynthèse de ces composés. Cette hypothèse reste néanmoins peu probable, car les endophytes isolés proviennent des feuilles et non des graines. Il faudrait alors examiner si cette espèce est également présente dans les graines. Bien que la présence d'organismes endophytes dans les graines soit moins décrite, ces derniers existent néanmoins et peuvent jouer un rôle dans la croissance et la santé de la plante[132].

[132] S. Truyens *et al*., Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants, Environmental Microbiology Reports, **2015**, 7, 1, 40-50.

- La seconde hypothèse concernerait un transfert horizontal de gène entre plante et organismes endophytes. Ces derniers sont largement décrit[133,134] et semble être l'hypothèse la plus probable. De ce fait le matériel génétique, correspondant à l'enzyme capable de catalyser cette réaction, serait passé de la plante au micro-organisme.

Fort de ces résultats encourageants, nous avons tenté d'étendre cette méthodologie à d'autres PPAPs comme la guttiférone C. Une première expérience à l'échelle analytique a permis de mettre en évidence par CLHP la présence de composés pouvant correspondre aux produits cyclisés, avec une conversion toutefois plus faible. Malheureusement à l'échelle préparative, un problème lors de la biotransformation à été rencontré. Une odeur fortement nauséabonde ainsi qu'un pH bien plus basique (pH = 8.3) présents également dans l'échantillon témoin sans guttiférone, ont suggéré une contamination. N'ayant pu réaliser d'autres expériences car la souche originale SG-1 n'a pas pu être isolée de nouveau, nous avons arrêté nos investigations sur cette enzyme.

Nous avons grâce à des organismes endophytes, réalisé l'hémisynthèse des xanthones 3.16-oxy-guttiférone A (74) et 1.16-oxy-guttiférone A (75), dont l'activité biologique sur les parasites est sub-micromolaire. La cinétique lente de la réaction ainsi que les difficultés de réalisation de cette méthode, nous ont conduits à chercher une méthode de cyclisation intramoléculaire de ces composés, plus rapide, plus pratique et toujours éco-compatible. Nous avons donc envisagé une voie utilisant l'électrochimie.

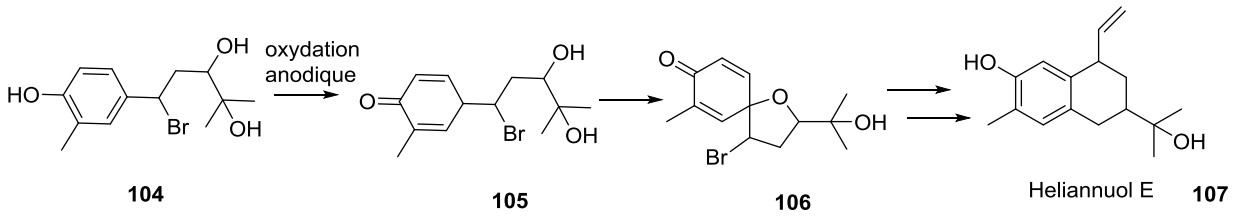
[133] *J. Gogarten and P. Jeffrey,* Townsend, Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution*, Nature Reviews Microbiology*, **2005***, 3, 679-687.*

[134] S. Taghavi *et al*., Horizontal Gene Transfer to Endogenous Endophytic Bacteria from Poplar Improves Phytoremediation of Toluene, *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, 8500–8505.

Partie 2 : Cyclisations de la guttiférone A par des méthodes électrochimiques.

3.2.1 Introduction

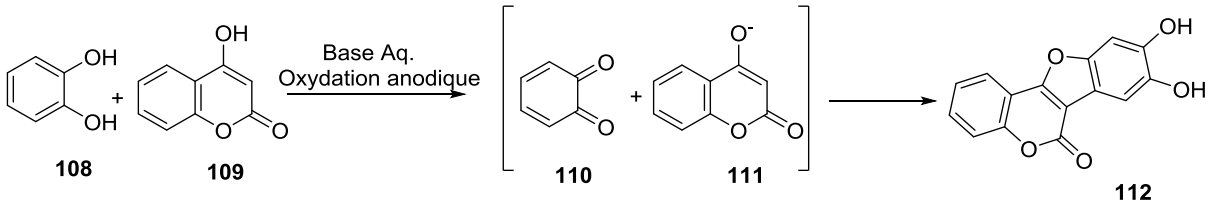
Les méthodes électro-organiques sont efficaces et respectueuses de l'environnement pour l'accès à des produits naturels complexes[135]. De récentes avancées ont pu montrer que les oxydations anodiques, se révèlent être de puissants outils, pour la réalisation de liaisons C-C ou C-O [136,137]. À titre d'exemple, la synthèse de l'héliannuol E est illustrée **schéma 17**.



104 **105** **106** **107**

Schéma 17 : Synthèse de l' Héliannuol E par couplage C-O après oxydation du phénol par méthodes électro-organiques

Ce type d'oxydation de groupement phénol ou catéchol est bien détaillé dans la littérature[138]. Il est généralement admis que pour les groupements catéchol, la réaction d'addition fait intervenir un intermédiaire ortho-di quinone (**Schéma 18**).



108 **109** **110** **111** **112**

Schéma 18 : Electro-synthèse d'un intermédiaire ortho-di quinonique suivis d'une addition *para (*synthèse de du 11,12-dihydroxycoumestan).

Il existe des méthodes d'oxydation de catéchol ou de phénol par voie chimique. Pour citer un exemple concernant les PPAPs, prennons une étude menée par l'équipe de Thierry Sevenet[66]. En 2000, les auteurs ont réalisé une oxydation sur mélange de xanthochimol/guttiférone E **112/113,** en présence de périodate de sodium (**Schéma 19).**

---

[66] D. Roux *et al*., Structure-Activity Relationship of Polyisoprenyl Benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the Tubulin/Microtubule System, *Journal of Natural Products,* **2000**, 63, 1070-1076**.**

[135] S. Waldvogel and SR. Janza, Renaissance of electrosynthetic methods for the construction of complex molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2014**, *53*, 7122-7123.

[136] E. Bernd et al., Metal- and reagent-free highly selective anodic cross-coupling reaction of phenols, *Angewandte Chemie International* Edition, **2014**, 53, 20, 5210-5213.

[137] F. Doi et al., Synthetic Studies on Bioactive Natural Products Employing Electrochemical Methodology, Synthesis of Heliannuol E, S. *Synlett,* **2002**, *4*, 533-543.

[138] Z. Grujić *et al.,* Electrochemical syntheses of heterocyles compounds-IV Syntheses with nascent quinones, *Tetrahedron Lett.,* **1976,** *17,* 4823–4824.

Cette réaction donna lieu à mélange de dérivés ortho-di-quinones avec un rendement de 55%.

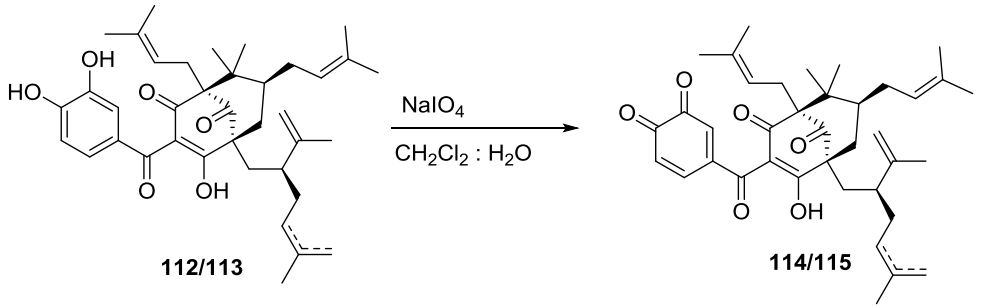


Schéma 19 : oxydation d'un mélange xanthochimol/guttiferone E en dérivé ortho-di-quinoniques

En considérant l'existence de tels composés, nous avons donc envisagé d'établir une procédure d'oxydation-annélation successives dite : « one-pot ». L'objectif de cette partie fut de mettre au point une méthode adéquate pour l'obtention des dérivés oxy-PPAPs *via* des oxydations anodiques. Pour le bon déroulement de cette partie, nous avons collaboré avec les Drs Martine Largeron et Anne Neudörffer, spécialistes de notre laboratoire en électrochimie.

3.2.2 Etudes de voltamétrie cyclique de la guttiférone A

Afin de synthétiser ce motif orthoquinonique nous avons cherché à connaitre les différents potentiels d'oxydation de la guttiférone A. Pour cela, nous avons commencé par mesurer ces derniers par voltamétrie cyclique. Cette technique permet d'étudier le potentiel redox d'espèces en solution, en observant la variation de courant à travers la solution en fonction du potentiel appliqué (**photo 10**).

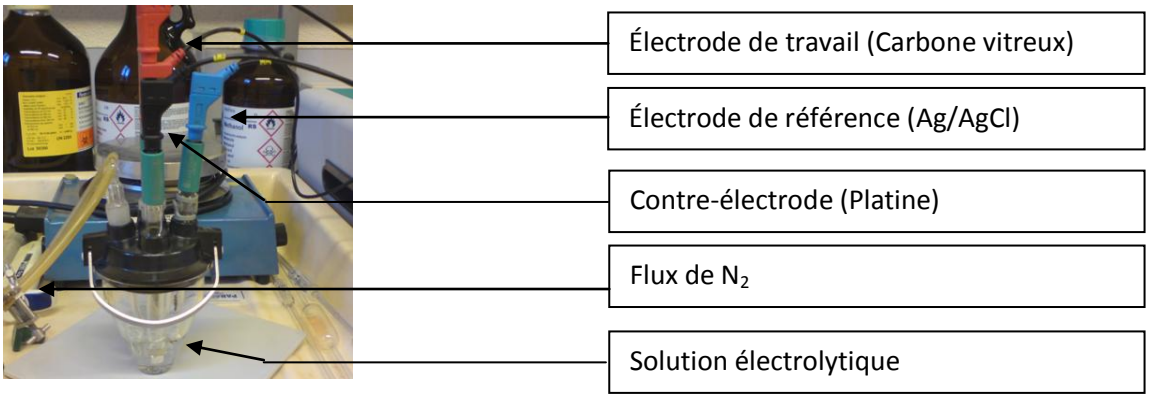


Photo 10 : Montage de voltamétrie cyclique

-Conditions standards, 0 équivalent de base

Sous sa forme neutre (**Figure 58,** courbe bleue), un pic correspondant au potentiel d'oxydation apparait distinctement à 0.8 V. Il était fortement envisageable que ce pic corresponde au potentiel d'oxydation du catéchol. Il est important de noter que cette réaction semble irréversible, car aucun potentiel « retour » n'a été observé (correspondant à la réduction de l'espèce oxydé). Ce potentiel d'oxydation était relativement élevé et proche du mur du solvant, avec le risque d'oxyder d'autres fonctions et/ou le solvant.

-Conditions basiques, 1 équivalent de base

Nous nous sommes donc orientés vers un plan d'électrosynthèse en milieu basique. En effet, ces conditions devraient permettre la déprotonation des protons phénoliques, permettant ainsi une délocalisation de la charge. Cette dernière induirait une diminution du potentiel d'oxydation de la molécule. Concernant l'ordre de déprotonation de la guttiférone A, les expériences précédentes d'alkylation en milieu basique ont montré que les protons phénoliques sont plus labiles. Aucun dérivé possédant une alkylation sur les fonctions énoles portées par le carbone 1 ou 3 n'a été observé.

Le voltamogramme obtenu après addition d'un équivalent d'hydroxyde de tétra-méthyl ammonium (TMAOH) est également présenté **figure 58, courbe rouge**. On observe une diminution de 0.15 V du potentiel d'oxydation correspondant à l'oxydation du noyau catéchol (0.65 V). Celui-ci est donc devenu plus facilement oxydable. Une nouvelle fois, aucun potentiel retour ne fut observé.

-Conditions basiques, 2 équivalents de base

Ensuite, un second équivalent de base forte arracherait un second proton conduisant à la formation d'une espèce di-chargée (**Figure 57, courbe noir)** dont le potentiel d'oxydation sera encore plus bas (0.07V). Cette fois ci, le potentiel retour est observé.

-Conditions basiques, 3 ou plus équivalents de base.

L'addition d'équivalents supplémentaires n'a pas conduit à l'apparition d'autres espèces.

-Influence du sel de fond

Afin d'examiner l'influence des contres-ions apportés par le sel de fond, différents cations ont été étudiés : Li^+, Na^+,K^+, Cs^+ et Tétraéthylamonium. Ces derniers n'ont pas montrés d'influences significatives sur le potentiel d'oxydation de la guttiférone A ainsi que sur les espèces chargées générées. Il faut également noter que les variations de concentration (10 à 100 éq), et que ces derniers n'ont pas changé les résultats mesurés. Nous avons donc réalisé des électrolyses à potentiel contrôlé, en présence d'équivalent(s) de base forte afin d'observer la réactivité de la molécule.

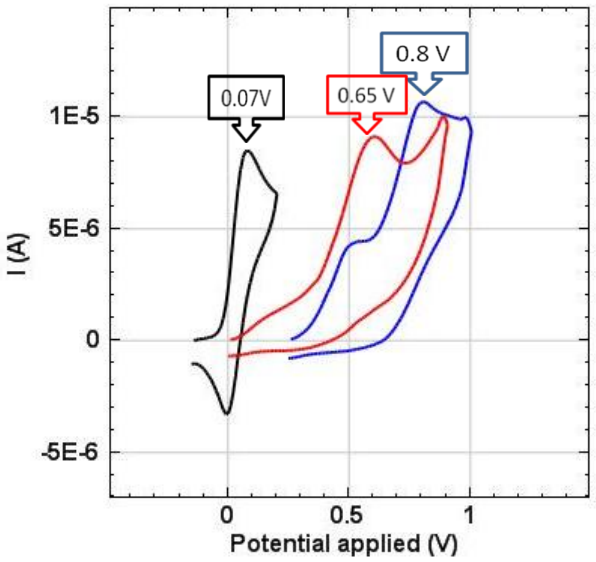


Figure 58 : Voltamogramme d'une solution à 5.0x10^{-4} M de guttiférone A entre -0.5 V et 1.5 V. Bleu foncé : forme neutre, rouge : forme déprotonée, noir : forme di-chargée.

3.2.3 Electrolyses à potentiels contrôlés

Suite aux observations précédentes, les conditions idéales théoriques seraient de se placer après ajout d'un équivalent de base, à un potentiel aux alentours des 0.65 V. Ce dernier est suffisament éloigné du mur du solvant mais permet tout de même d'oxyder la molécule.

Cependant, afin de connaitre la limite d'oxydation supérieure du système, une première électrolyse fut réalisée à 1.7 V (au pied du mur du solvant) dans l'acétonitrile. Après traitement, l'analyse du brut par CLHP et RMN nous révéla la présence de nombreux composés. Les données de spectroscopie de masse montrèrent des additions successives caractéristiques de 18 uma à partir du pic moléculaire *m/z* = 625, pouvant correspondre à **74/75** + Na^+ (**Figure 59**). Ces données nous indiquèrent la présence de xanthones, ainsi que de nombreux dérivés poly-hydroxylés. Il fut donc nécessaire pour obtenir des xanthones pures, de diminuer le potentiel d'oxydation.

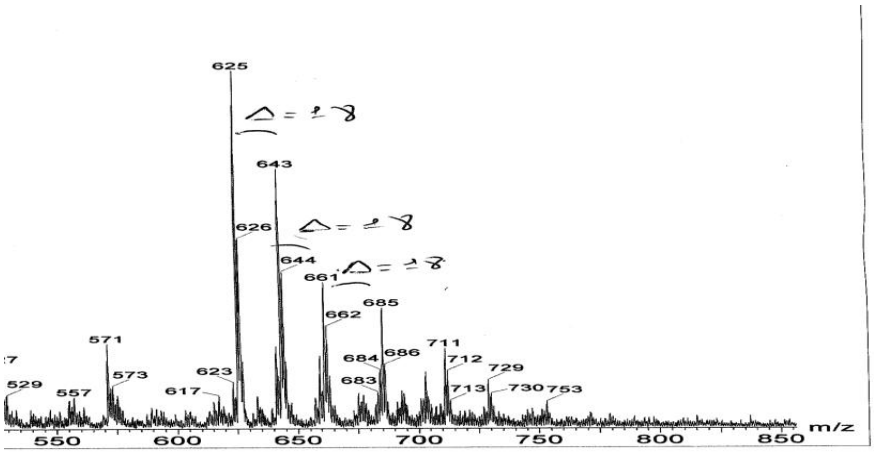


Figure 59 : Suroxydation successives lors de l'électrolyse à 1.7 F.

La vitesse de réaction étant dépendante du potentiel d'oxydation (plus celui-ci est élevé, plus les coulombs passent vite, plus rapide est la réaction), nous avons diminué progressivement le potentiel, afin d'obtenir des résultats satisfaisants. Dès 1.3 V le passage de deux faradays lors l'électrolyse, permis la synthèse des 2 xanthones naturelles **74** et **75** dans des proportions de 2.5 pour 1, avec un rendement de 14%. À partir de ce résultat modeste, nous avons cherché à optimiser les conditions de cette électro-synthèse. Nous avons également regardé si certaines conditions pouvaient influencer la régioselectivité de cette réaction. Les résultats obtenus sont résumés **tableau 17**.

Entrée	Solvant	Potentiel	Electrolyte support	Éq de base	Courant	temps	Résultats (mélange 74+75)
1	ACN	1.7 V	$LiClO_4$ (100éq)	1.1	2.0 F	20 min	Suroxydation
2	ACN	1.3 V	$LiClO_4$ (10éq)	1.1	2.0 F	7 heures	14%
3	ACN	1.3 V	$LiClO_4$ (10éq)	1.1	2.5 F	7 heures	14%
4	MeOH	1.3V	$LiClO_4$ (10éq)	1.1	2.5 F	7heure	17%
5	ACN	0.8 V	$LiClO_4$ (100éq)	1.1	1.4 F	7.5 h	40% *
6	ACN	0.8 V	$LiClO_4$ (10éq)	1.1	2.0 F	7.5 h	23%
7	MeOH	0.8 V	$LiClO_4$ (10éq)	1.1	2.5 F	7.5 h	37%
8	MeOH	0.8 V	$LiClO_4$ (100éq)	1.1	2.5 F	7.5 h + nuit	40%
9	MeOH	0.8 V	$LiClO_4$ (100éq)	2	2.0 F	7.5 h	0%
10	MeOH	0.8 V	KCl (100éq)	1.1	6.6 F	3 h	30%
11	MeOH	0.8 V	KCl (10éq)	1.1	2.0 F	6 h	34%
12	MeOH	0.30 V	$LiClO_4$ (100éq)	1.1	2.2 F	12 h	52%
13	MeOH	0.30 V	$LiClO_4$ (10éq)	1.1	2.1 F	7.5 h	58%
14	MeOH	0.30 V	LiCl (10éq)	1.1	2.1 F	7.5h	67%
15	MeOH	0.30 V	NaCl (10éq)	1.1	2.0 F	10 h	76%
16	MeOH	0.30 V	KCl (10éq)	1.1	1.9F	16 h	66%
17	MeOH	0.30 V	CsCl (10éq)	1.1	2.3 F	7.5 h	74%
18	MeOH	0.30 V	TEACl (10éq)	1.1	2.0 F	4.5 h	78%
19	MeOH	0.30 V	$TEAClO_4$ (10éq)	1.1	2.0 F	4.5 h	78%

Tableau 17 : Variation des conditions expérimentales d'électrolyses à potentiel contrôlé

Le méthanol permet dans ces conditions, une légère amélioration du rendement (**Tableau 17,** entrées 3 et 4). Suite à des phénomènes de sur-oxydation, Nous avons alors décidé de diminuer le potentiel d'oxydation à 0.8 V (**Tableau 17** entrées 5 à 11). À ce potentiel, le méthanol s'est encore révélé être un meilleur solvant que l'acétonitrile (**Tableau 17** entrées 6 et 7), nous avons alors choisi ce dernier comme solvant de référence. Lors de l'ajout d'un second équivalent de base (**Tableau 17,** entrée 5), la dégradation totale des produits a été

observée. Dans un second temps, avons fait varier les quantités et la nature des électrolytes supports (**Tableau 17** entrées 6, 8, 10 et 11), sans observer d'amélioration significative sur la cinétique ou le rendement de la réaction.

Ces rendements modestes peuvent être expliqués par un phénomène de sur-oxydation. L'observation de la dégradation des produits, supporte cette hypothèse. Ces résultats expérimentaux nous ont conduits à poursuivre la diminution du potentiel d'oxydation. Nous avons choisi d'effectuer cette réaction à la base du pic d'oxydation (0.30 V pour un pic à 0.65 V), afin d'éviter des phénomènes de suroxydation (**Tableau 17,** entrées 12 à 20).

Bien que la quantité d'électrolytes support ne semble pas faire varier la réactivité, une plus faible concentration de ces derniers facilite l'extraction, ainsi que la purification tout en diminuant la vitesse de réaction (**Tableau 17** entrées 12 et 13). Fort de cette analyse, nous avons donc décidé de prendre ces valeurs de concentrations comme références. Les électrolytes supports possédant des anions chlorures, furent capables d'améliorer le rendement global de la réaction (**Tableau 17** entrées 13 et 14). Nous avons ensuite fait varier la nature du cation (**Tableau 17** entrées 14 à 18), pour observer un phénomène de passivité à l'électrode, ralentissant la vitesse de réaction avec l'augmentation de la taille du cation jusqu'à une taille limite. On a pu estimer cette taille à environ celle d'un cation Cs^+. Les expériences réalisées avec des cations de cette taille ou de taille supérieure, ne subissent pas cette passivité (**Tableau 17** entrées 17 à 20) et conduisent à une électrolyse de cinétique similaire, à celles réalisées avec des cations Li^+. Les expériences les plus efficaces furent réalisées avec le chlorure de tétraéthylammonium, comme électrolyte support à 0.35 V. En effet, celles-ci ont conduit à une conversion quasi-totale qui, après séparation par CLHP, a permis l'obtention de **74** et **75** dans des proportions de 2.5 pour 1.

3.2.4. Méthodes d'analyses pour la determination du mécanisme.

Au cours de cette réaction, nous avons pu suivre l'évolution en spectroscopie UV des espèces en solutions (**Figure 60**) ainsi que la diminution du potentiel d'oxydation (**Figure 61**).

-Spectroscopie U-V.

La présence de deux points isosbestiques (**Figure 60 b**) a indiqué que la réaction évolue sans générer de sous produits. Ces xanthones ont été caractérisées par l'augmentation de l'absorbance à 250 et 330 nm. Toutefois, nous avons pu démontrer que ces expériences UV réalisées durant l'électrolyse, ont permis de distinguer un intermédiaire réactionnel se transformant rapidement (< 20 secondes) en xanthones. Nous avons fait l'hypothèse que ce produit pouvait très bien être l'ortho-di-quinone, intermédiaire réactionnel envisagé dans la voie de cyclisation.

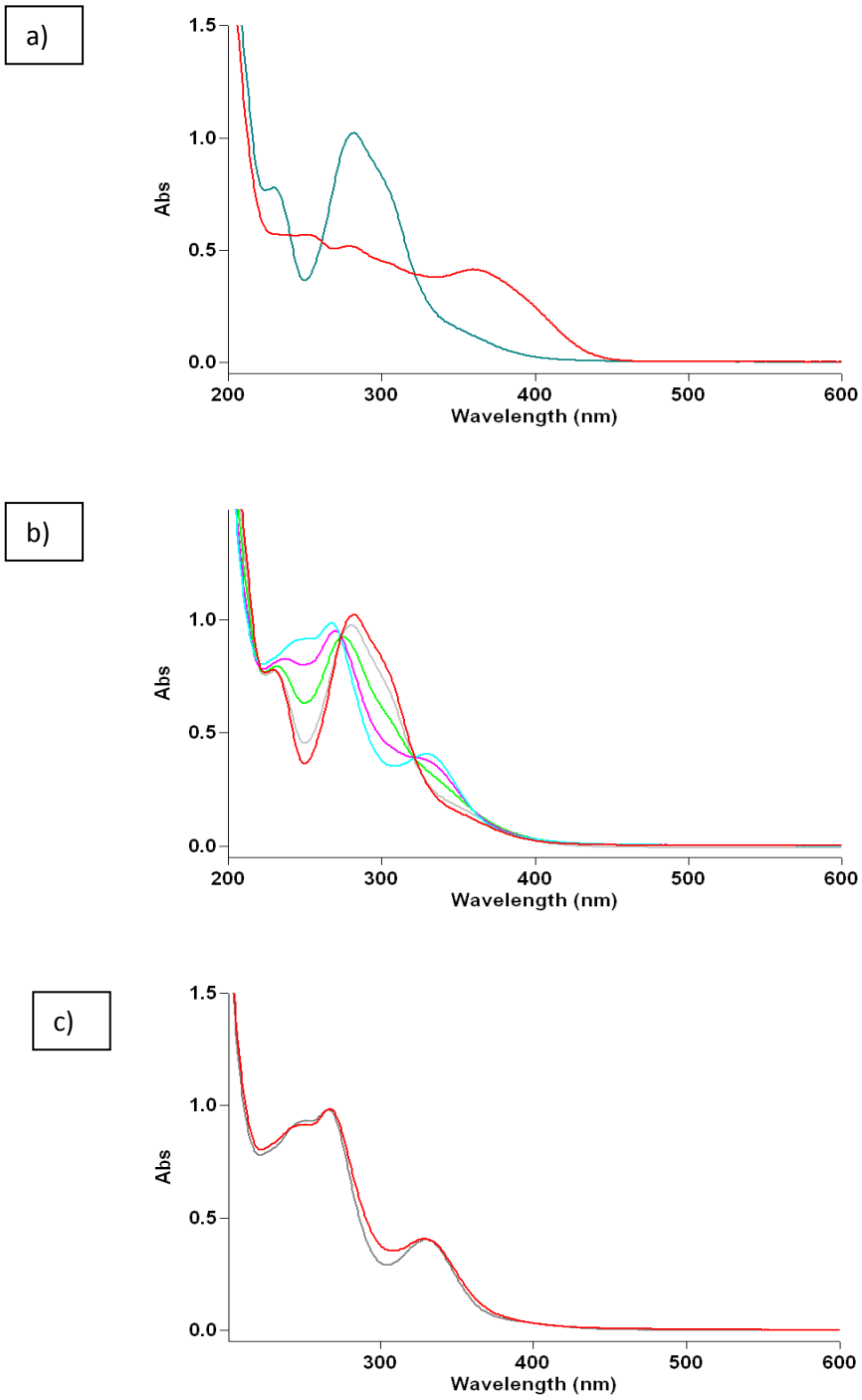


Figure 60 : Evolution des spectres UV des espèces en solutions a) rouge : guttiférone A, bleue : déprotonée ; b) 2volution de la réaction du rouge au cyan avec un pas de 0.5 F c) gris : brut avant traitement, rouge : xanthones **74** et **75**

Nous avons pu également observer que le traitement de la réaction par HCl (**Figure 60 c**) ne modifiait pas le spectre UV, suggérant ainsi que le produit obtenu était sous forme neutre.

-Voltamétrie cyclique

Lors de l'ajout d'un léger excès de base (1.1 éq), nous avons observé un pic d'oxydation à 0.1 V (**Figure 61**), correspondant à l'espèce di-chargée qui, disparait dès le passage de 0.25 Faradays. Le pic de l'oxydation de l'espèce mono-chargée (0.55V) a diminué progressivement et de façon linéaire lors du passage des électrons. Afin de comprendre l'obtention de faibles rendements lors d'électrolyses à des potentiels supérieurs à 0.3 V, nous avons enregistré un voltamogramme des xanthones synthétisées (**Figure 62**).

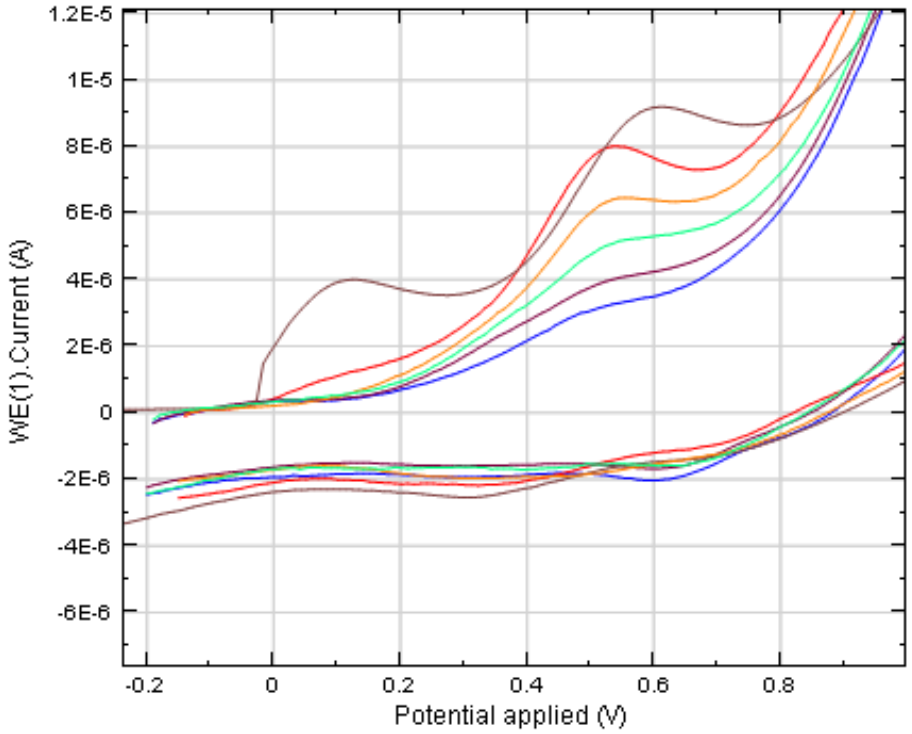


Figure 61 : Evolution du potentiel d'oxydation au cours de l'électrolyse (pas de 0.5 F). De la courbe marron (0F) à la bleue (2.0 F)

Les xanthones ainsi synthétisées possèdent un potentiel d'oxydation non négligeable à partir de 0.35 V. Toutes électrolyses à potentiel contrôlé au delà de cette limite, ont surement oxydés les xanthones formées, diminuant ainsi les rendements. Il est important de noter que la polymérisation des espèces possédant un noyau catéchol, est largement décrite dans la littérature[139].

[139] S. Sanchez-Cortes, Catechol polymerization in the presence of silver surface, *Colloids and Surfaces A*: *Physicochem*. *Eng*. *Aspects,* ***2001,*** 176, 177–184

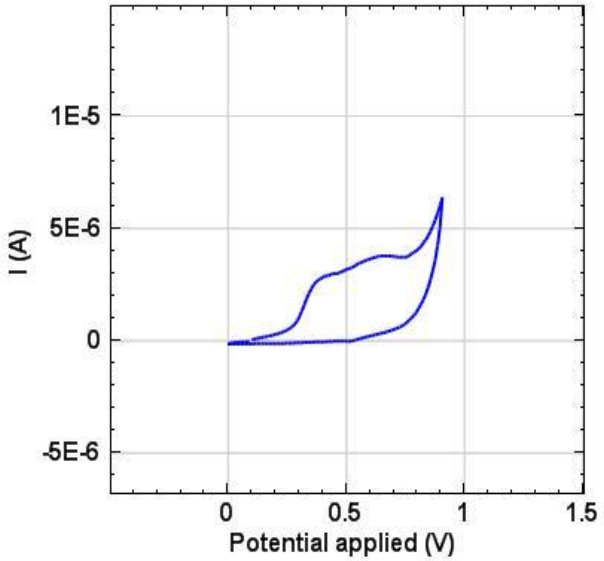


Figure 62 : Voltamogramme cyclique de **74** et **75** dans le méthanol à une concentration de 5.0×10^{-4} M entre 0 et 0.8 V

-Analyses par HPLC

Après traitement et extraction, le brut réactionnel a été analysé par CLHP (**Figure 63 a**). Celui-ci contient à plus de 90 % les xanthones **74** et **75** (proportions 2.5 : 1) naturelles, retrouvées dans une fraction de l'extrait de graines de *Symphonia globulifera* (**Figure 63 b).** Malgré tout, cette méthode ne nous a pas permis d'obtenir ces composés dans les proportions naturelles. Nous pensons donc que cette méthode mime la réaction d'oxydation, qui doit se réaliser au niveau des graines, sans toutefois être pratiquement identique.

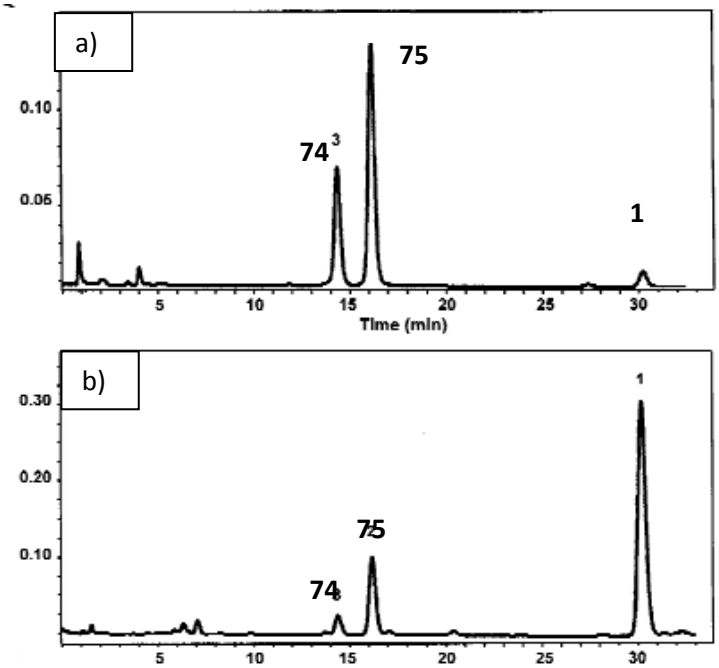


Figure 63 : chromatogramme CLHP de a) fraction de l'extrait de graines contenant 74 et 75 ; b) brut réactionnel

Les données de la littérature sur le couplage O-phénol ou O-catéchol, ainsi que nos données expérimentales (réaction complète avec deux faradays, apparition d'un intermédiaire réactionnel se convertissant rapidement et formation du produit sous sa forme neutre) ont permis de proposer le mécanisme représenté **schéma 20**.

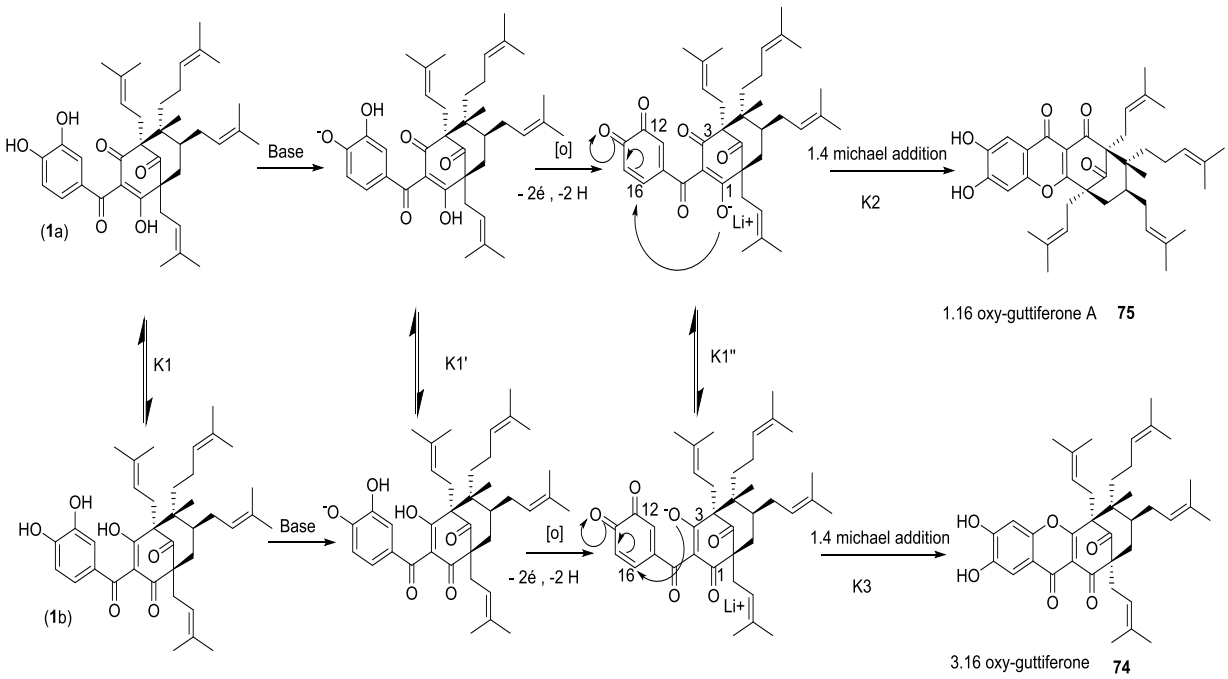


Schéma 20 : Mécanisme réactionnel convertissant la guttiferone A en Xanthones naturelles

L'équivalent de base permettrait de déprotoner la fonction phénol, portée par le carbone numéroté 13 du noyau catéchol. Cette espèce a pu s'oxyder par un potentiel d'oxydation plus faible (0.65 V au lieu de 1.1 V de la guttiférone A), en ortho-di-quinone par le passage de 2 faradays. Le passage de ces électrons entrainant également le départ de deux hydrogènes, nous laisse penser que la charge, se serait délocalisée sur une des fonctions énoles. La cyclisation se ferait ensuite par addition de Mickael de type 1,4 sur la position aromatique numéro 16. En effet, celle-ci est favorisée par rapport à une addition éventuelle sur la position 12 plus couteuse en déplacement électronique (addition 1,2). Comme mentionné lors de l'introduction générale, il existe un équilibre céto-énolique permanent entre les fonctions portées par les carbones 1 et 3. Cet équilibre doit pouvoir exister en solution à chaque étape de la réaction. La proportion de **74/75** étant identique à **1a/1b** en solution nous avons fait l'hypothèse que dans ce cas, K2 (la constante cinétique de la réaction menant à **75**) est égale à K3 la constante cinétique de la réaction menant à **74**). C'est la constante K1 définissant l'équilibre entre **1a** et **1b,** qui oriente la réaction conduisant à l'obtention de **74** et **75** dans des proportions toujours égales à 2.5/1 dans ces conditions.

Toutefois, certains auteurs suggèrent que l'absence de potentiel correspondant à la réduction de la quinone, en voltamétrie cyclique implique un mécanisme différent illustré **schéma 21**. L'oxydation du noyau catéchol, par le départ de deux électrons et d'un proton conduirait à une espèce de type phénoxonium[140]. Cet intermédiaire serait immédiatement stabilisé par l'addition d'une molécule de méthanol, expliquant ainsi l'absence de potentiel de réduction. L'intermédiaire ainsi généré pourrait subir une attaque nucléophile et induire le départ de la molécule de métanol afin de former les xanthones **74** et **75**, selon les règles d'équilibre céto-énoliques déjà précisées. Cependant, contrairement à l'équipe de Nishiyama, nous n'avons pas observé de produit intermédiaire pouvant valider cette hypothèse mécanistique.

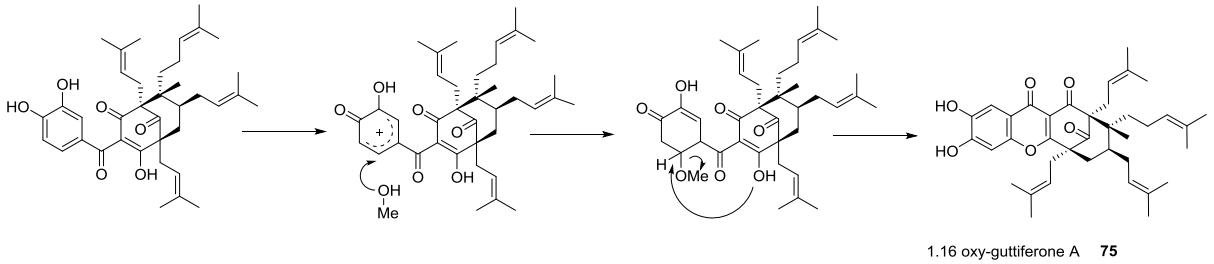


Schéma 21 : Second mécanisme réactionnel possible

Au cours de cette partie, nous avons développé une méthode biomimétique pour l'obtention des xanthones naturelles 74 et 75, à partir de la guttiférone A. La mise au point des conditions expérimentales nous a permis d'améliorer considérablement le rendement et la vitesse de réaction. Ces derniers ont été optimisés pour atteindre environ 80 % de xanthones 74/75 avec une proportion invariable de 2.5 :1 en 4.5h respectivment. Malgré le contrôle total et la robustesse de cette technique respectueuse de l'environnement, cette méthode est relativement lente et ne permet de variation de la réactivité. Afin d'obtenir d'autres analogues, comme ceux dont la cyclisation aurait eu lieu sur la position 12, nous allons étudier la réactivité de ce noyau benzophénone à l'aide de nombreux réactifs chimiques.

[140] Y.Nishihama *et al*., Oxidation of mangostins, the naturrally occurring xanthon derivatives carrying diverse biological activities. *Electrochemistry*, **2006**, 8, 609−611.

Partie 3 : Cyclisations de la guttiferone A par chimie organique.

3.3.1 Introduction

L'intérêt principal des xanthones précédement décrites, est leurs activités sur les cibles parasitaires que nous avons choisies. Au cours des deux parties précédentes de ce chapitre, nous avons décrits des méthodes capables de transformer la guttiférone A en dérivés cyclisés **74** et **75**. Toutefois, à partir de ce motif d'autres cyclisations sont possibles. En effet, comme l'illustré **figure 64**, la fermeture du cyle pourrait en théorie conduire à l'obtention de 4 xanthones. Ces dernières se classent en deux groupes : les naturelles (position de cyclisation sur le carbone 16) 3.16 et 1.16 et les non-naturelles (position de cyclisation carbone 12) 3.12 **116**, et 1.16 **117.**

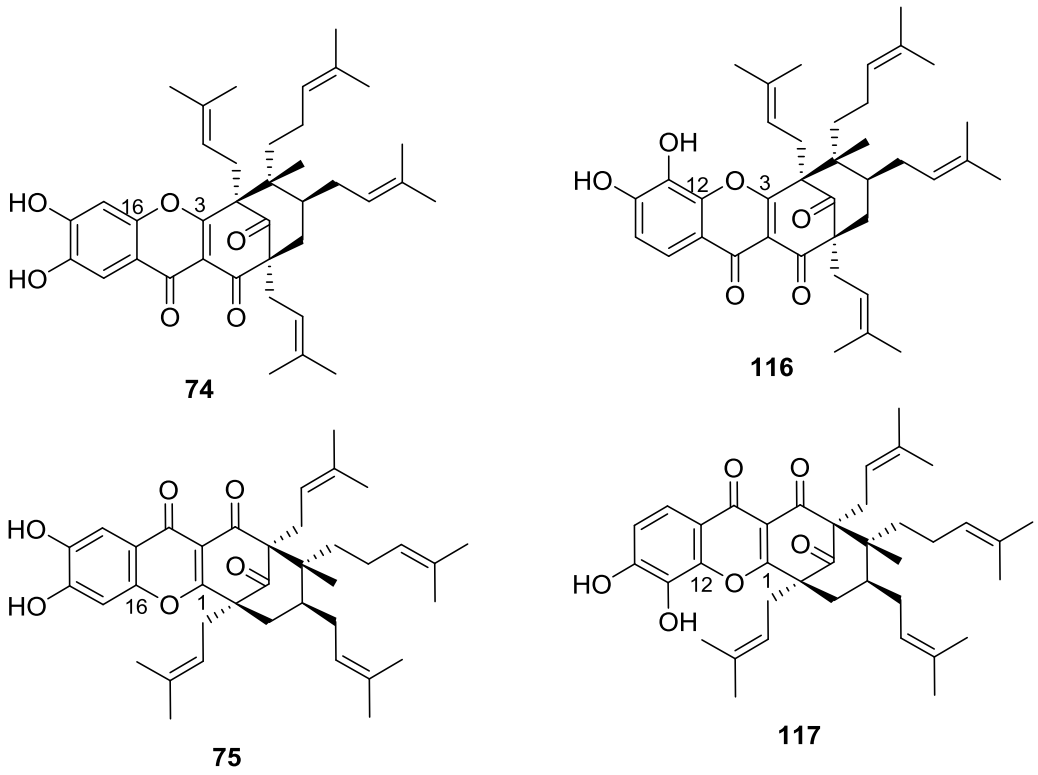


Figure 64 : Les 4 xanthones possibles à partir de la guttiférone A

Ne connaissant pas les activités biologiques des composés 116 et 117, nous avons orienté nos recherches sur une voie hémisynthétique qui permettrait l'élaboration de ces composés.

Il est possible par voie chimique, à travers le large choix de réactifs et de conditions opératoires, de faire varier les régiosélectivités de certaines cyclisations[141]. Pour la synthèse

[141] J. Clayden *et al*., Organic chemistry, 2nd edition, Oxford, 2012.

régiosélective de ces xanthones non naturelles, nous avons cherché les conditions opératoires pouvant mener à ce couplage.

A titre d'exemple, nous avons choisi de comparer les travaux des équipes de Lewis et Jefferson. Comme illustré **schéma 22,** le couplage oxydatif phénolique de **118**[142,143], en présence de ferricyanure de potassium dans un milieu alcalin a conduit à la synthèse de **119** et **120.** Ces composés sont respectivement issus d'une cyclisation en para et ortho de le la fonction phénol. Cependant, concernant la maclurine **36,** l'application de ces mêmes conditions a abouti à la synthèse de **121** uniquement. Ce dernier, issu du couplage en para, possède le motif 1, 3, 5, 7 tétrahydroxyxanthone également retrouvé dans nos xanthones naturelles 1.16 (**75**) et 3.16-oxy-guttiférone A (**75**). Il est important de noter que ce composé est également retrouvé avec son précurseur biosynthétique, la maclurine **36**, dans *Morus tinctoria L*[144].

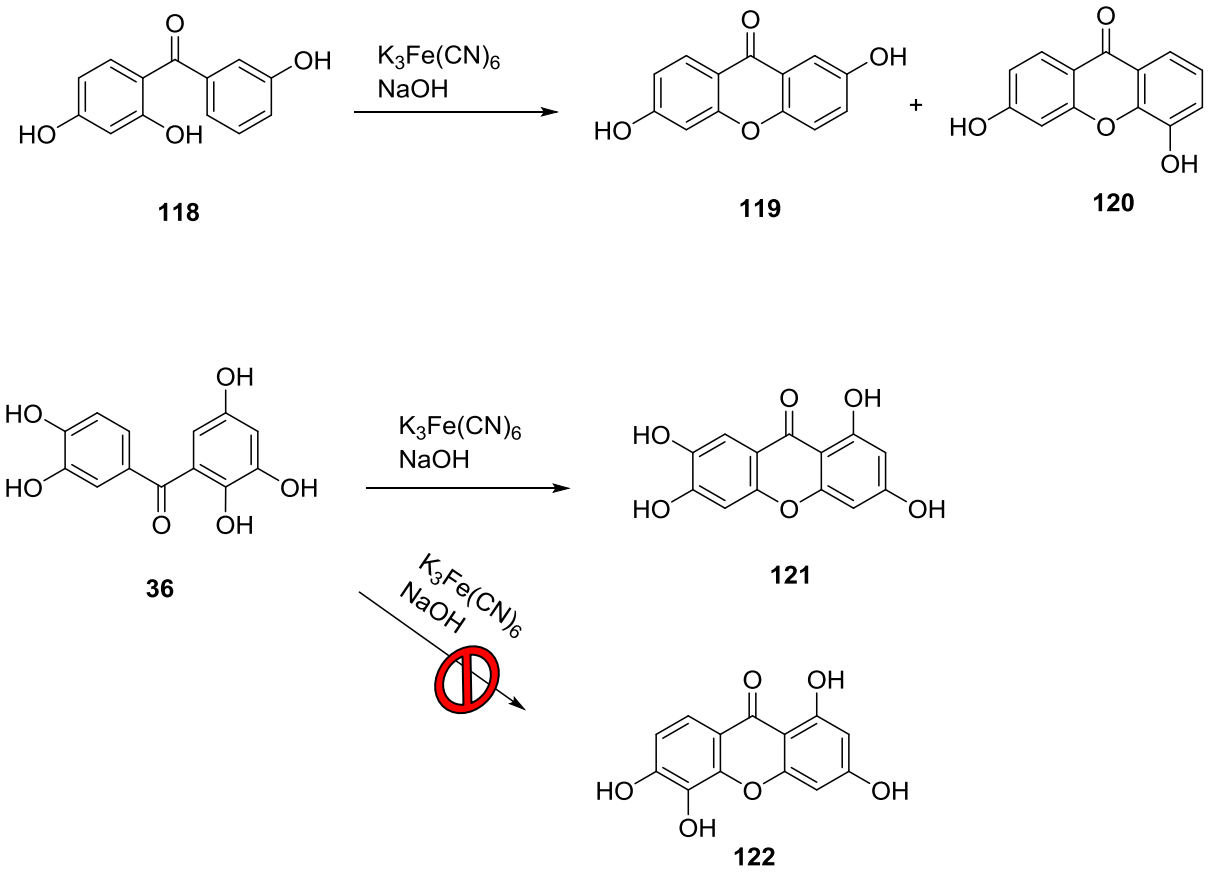


Schéma 22 : Exemples de couplages oxydatifs en ortho du phénol

142 J.R. Lewis and B.H. Warrington, Oxidative Coupling. Part VI Synthesis of Xanthones, *J.Chem. soc., **1964,*** 974**,** 5074-5077.

143 R.J. Molyneux *et al*., Oxidative coupling of apigenin, *Tetrahedron*, **1970**, 26, 1409-1416.

144 A. Jefferson and F. Scheinmann, Studies in the Xanthone Series of Jacareubin Part VIII. An Unambiguous Synthesis, J. Chem. Soc., **1966**, 175-178.

Les auteurs ont alors constaté que **122,** possédant un motif 1, 3, 5, 6 tétrahydroxyxanthone ne se formait pas dans ces conditions opératoires. Ces derniers suggèrent alors une instabilité de ce produit issu du couplage dit « ortho ». Il semblerait que la présence d'une fonction phénol adjacente désactive la réactivité de couplage « ortho ». Ce couplage, donnant l'acces au motif 1, 3, 5, 6 tétrahydroxyxanthone, permetterait d'obtenir à partir de la guttiférone A **1,** les xanthones non naturelles **116** et **117**.

Avant de développer ce chapitre nous voulions rappeler que des travaux préliminaires ont été éffectués, sur de petites quantités par le Dr. Fromentin lors de sa thèse. Les réactions décrites ici, ont toutes été re-effectuées et optimisées lors de ce doctorat.

3.3.2. Utilisation des conditions décrites par Lewis et *al.*

Les couplages oxydatifs phénoliques réalisés par Lewis *et al*., en présence de ferricyanure de potassium et de bases fortes, nous ont conduits à reprendre ces conditions opératoires : 2 h, 10 éq d'oxydants et de bases, température. Néanmoins nous avons observé la dégradation des produits mis en réaction, ce qui nous a ammenés à changer la force de la base.

3.3.3. Oxydations en présence de bases faibles

Nous avons choisi comme base faible d'utiliser un carbonate et de varier le choix de son contre-ion, en prêtant attention à ne changer qu'un paramètre à la fois. Les résultats obtenus concernant la synthèse exclusive des xanthones naturelles **74** et **75**, sont résumés **tableau 18**.

-Variation de taille du contre ion (**tableau 18,** entrées 1 à 5)
L'augmentation de la taille du cation a donc diminué la vitesse de réaction, puisque le taux de conversion est passé de 100 à 40 % en 20 minutes de réaction. Nous suggérons que cette différence de cinétique proviendrait des différences de constantes de dissociation énolate/contre-ion.

-Variation du temps de réaction (**tableau 18,** entrées 6 et 7)
Concernant le carbonate de césium et de potassium, l'augmentation de la durée de la réaction n'est pas linéaire lié au taux de conversion. Cette diminution de la réactivité semble suivre une règle exponentielle.

-Variation du nombre d'oxydant (**tableau 18,** entrées 1 et 8)
La conversion de la guttiférone A **1** en xanthone **74** et **75** requiert plus de un équivalent d'oxydant.

-Variation du nombre d'équivalents de base (**tableau 18,** entrées 1, 9 et 10)

La réaction requiert au minimum 1 équivalent de base. Toutefois, l'augmentation du nombre d'équivalent accélère la vitesse de la réaction.

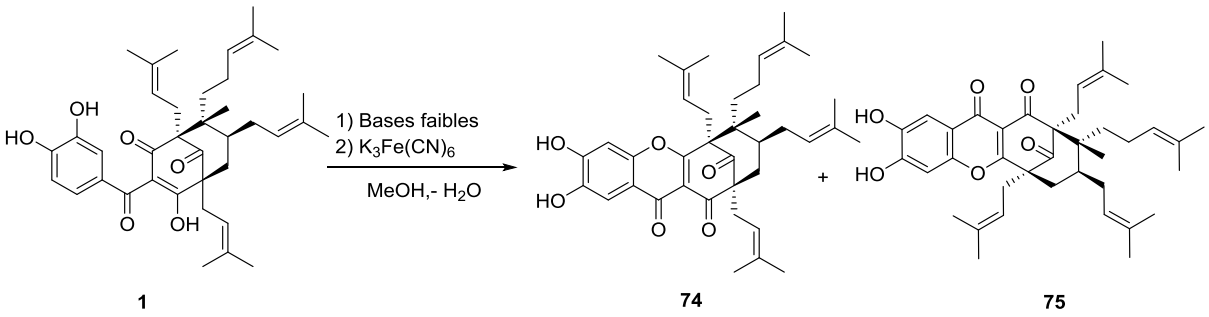
-Variation de la température (**tableau 18,** entrées 1, 11 et 12)

A ce stade, toutes ces réactions ont conduit à la formation de **74** et **75** dans des proportions de 2.5/1. Afin d'observer une variation de la régioséléctivité, nous avons varié la température de la réaction entre -5 et +80°C. Cependant, cette proportion est restée inchangée.

Entrée	Base	Reaction time	Eq ox.	Conversion (RMN)	Rendement isolé	temperature	Ratio (74)/(75)
1	Li_2CO_3 (10 eq)	20'	10	100%	**74** (61%), **75** (25%)	t.a	2.4
2	Na_2CO_3 (10 eq)	20'	10	100%	**74** (60%), **75**(25%)	t.a	2.4
3	$NaHCO_3$ (10 eq)	20'	10	90%	**74** (55%), **75** (23%), **1** (6%)	t.a	2.4
4	K_2CO_3 (10 eq)	20'	10	52%	**74** (30%), **75** (12%), **1** (45%)	t.a	2.5
5	Cs_2CO_3 (10 eq)	20'	10	40%	**74** (27%), **75** (11%), **1** (48%)	t.a	2.4
6	K_2CO_3 (10 eq)	55 h	10	70%	**74** (%), **75** (%),**1** (%)	t.a	2.5
7	Cs_2CO_3 (10 eq)	55 h	10	50%	**74** (%), **75** (%),**1** (%)	t.a	2.4
8	Li_2CO_3 (10 eq)	20'	1	0%	**1** (88%)	t.a	-
9	Li_2CO_3 (1 eq)	20'	10	90%	**74** (54%), **75** (22%), **1** (4%)	t.a	2.4
10	-	20'	10	0%	**1** (92%)	t.a	-
11	Li_2CO_3 (10 eq)	4h	10	90%	**74** (55%), **75** (21%), **1** (8%)	-5°C	2.4
12	Li_2CO_3 (10 eq)	5''	10	100%	**74** (63%), **75** (26%)	80°C	2.4

Tableau 18 : Résultats de l'oxydation par le ferricyanure de potassium en présence de bases faibles

L'utilisation, du carbonate de lithium (10 éq) en présence de ferricyanure de potassium (10 éq) dans un mélange méthanol/eau à 80 °C (**tableau 18** entrée 12), s'est révélée être la méthode optimisée pour la cyclisation en motif xanthone. Cependant, la synthèse des dérivés souhaités **108** et **109** n'a pas aboutie, mais nous avons tout-de-même pu mettre au point une méthode supplémentaire d'accès à la 3,16 et 1,16-oxy-guttiférone A (**Schéma 23**).



1 **74** **75**

Schéma 23 : Cyclisations intramoléculaires réalisées par le ferricyanure de potassium en présence de base faibles

À ce stade de notre étude, nous devions trouver une voie d'accès aux xanthones de type 1.12 et 3.12. Nous avons choisir de revenir sur l'utilisation de bases fortes, en nous basant sur travaux de Lewis *et al*., préalablement dérits dans le point 3.3.2.1., en utilisant des conditions plus douces afin d'éviter les phénomènes de dégradation.

3.3.4. Oxydations en présence de bases fortes

L'utilisation de bases fortes, telle que l'hydroxyde de lithium, dans des conditions expérimentales similaires aux bases faibles (**tableau 19,** entrées 1 et 2) a conduit à la dégradation rapide des produits. En revanche, la diminution du temps de réaction (**tableau 19,** entrée 3) a permis d'obtenir deux produits probablement issus d'une cyclisation (**Schéma 24**). L'un correspondait aux données spectroscopiques et spectrométriques de la 12-hydroxy-3,16-oxy-guttiférone A **123** décrite dans la thèse du Dr Y. Fromentin. L'autre composé possédait des caractéristiques spectrales proches. En effet, les corrélations observées en HMBC montraient des similarités avec la 1.16-oxy-guttiférone A **75**, nous suggérant une cyclisation de type 1.16. En s'appuyant sur les données de spectroscopies de masse ainsi que de RMN nous avons pu attribuer ce composé à la 12-hydroxy-1,16-oxy-guttiférone A **124**.

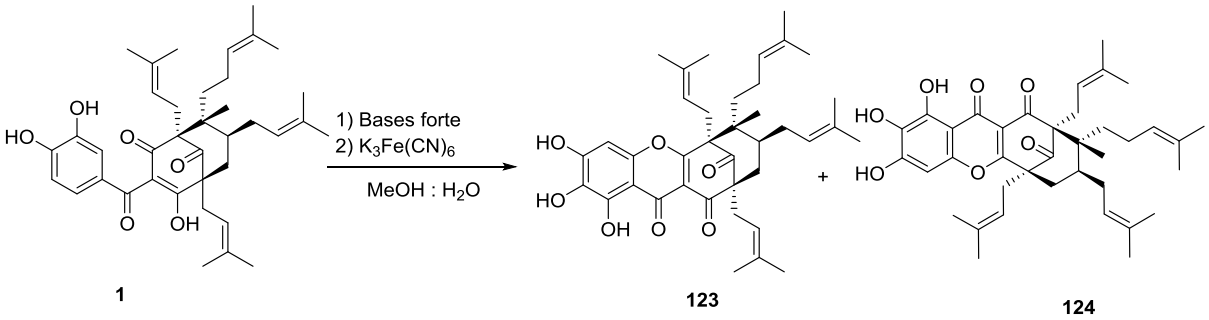


Schéma 24 : Cyclisations intramoléculaires réalisées par le ferricyanure de potassium en présence de base fortes

De façon similaire à l'étude de l'influence des bases faibles, nous avons fait varier la nature du contre-cation (**tableau 19,** entrées 4 à 7). Encore une fois, nous avons observé que la taille du cation influençait la cinétique de la réaction, sans changer réactivité. L'utilisation de différentes bases fortes telles que l'hydroxyde de tetraéthylammonium, nous a également permis d'obtenir les composés **123** et **124,** dans des proportions invariantes de 2.5/1. Afin d'éviter ce phénomène d'hydroxylation supplémentaire, nous avons réduit la force de la base en utilisant la triéthylamine (pka = 10.8) (**tableau 19,** entrées 10). L'utilisation de cette dernière ne nous a conduits qu'à l'obtention des xanthones naturelles **74** et **75**.

Entrée	Base	Temps de réaction	Eq ox.	Conversion	Rendement isolé	Ratio (118)/(119)
1	LiOH (10 éq)	20''	10	100%	degradation	-
2	LiOH (10 éq)	20''	2	100%	degradation	-
3	LiOH (10 éq)	5''	10	100%	**123** (50%), **124**(19%)	2.4
4	LiOH (2 éq)	5''	10	100%	**123** (55%), **124** (23%)	2.4
5	NaOH (2 éq)	5''	10	100%	**123** (51%), **124**(21%)	2.4
6	KOH (2 éq)	5''	10	63%	**123** (22%), **124** (9%)	2.4
7	CsOH (2 éq)	5''	10	56%	**123** (18%), **124** (7%)	2.6
8	TMAOH (2 éq)	5''	10	50%	**123** (13 %), **124** (5 %)	2.6
9	TMAOH (1 éq)	5''	10	50%	**123** (13 %), **124** (5 %)	2.6
10	NEt_3 (1 éq)	5''	10	40%	**74** (26%), **75** (10%), **1** (3%)	2.6

Tableau 19 : Résultats de l'oxydation par le ferricyanure de potassium en présence de bases fortes

L'utilisation du ferricyanure de potassium en présence de bases plus fortes, a permis de synthétiser deux nouveaux dérivés cyclisés **123** et **124**, dont nous ne connaissions pas l'activité biologique. Compte-tenu de l'analogie structurale avec **74** et **75** ainsi que leurs proportions identiques (2.5/1), nous pensions que ces derniers provenaient de la sur-oxydation de **74** et **75** respectivement. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences supplémentaires d'oxydation de **74** et **75** ont été menées dans ces conditions (**tableau 19,** entrées 4). Cependant, elles n'ont pas permis l'obtention de **123** et **124**, nous suggérant une hydroxylation antérieure à la cyclisation. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la thèse du Dr Y. Fromentin (détection du composé **125** illustré **figure 65**).

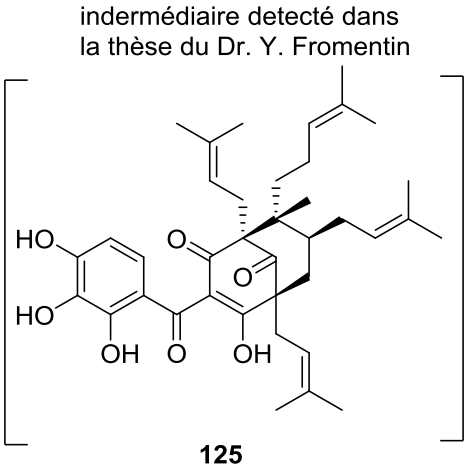


Figure 65 : Intermédiaire hydroxylé

Afin de mettre en place une méthode robuste pour l'accès à ces dérivés cyclisés en position 12, nous avons donc étudié la réactivité d'autres agents oxydants.

3.3.5. Autres agents oxydants

Plusieurs oxydants furent testés sous conditions basiques (**tableau 20,** sauf entrées 4 et 7). Différents métaux classiquement employés dans les oxydations comme le cuivre et l'argent furent utilisés (**tableau 20**, entrées 1 à 3 et 5).

Entrée	Oxydant	Potentiel E° (en V)	Temps de réaction	Solvant	Conversion	Rendement isolé	Ratio
1	$CuSO_4$ (5 éq)	0,34 V	12 h	H_2O : MeOH	27 %	**74** (16%), **75** (6%)	2.7/1
2	CuI (10 éq)	0,52 V	12 h	THF : MeOH	12 %	**NP**	2.4/1
3	$AgSO_4$ (10 éq)	0,65 V	60 h	H_2O : MeOH	20 %	**NP**	2.6/1
4	DDQ (1 éq)	0, 9V	4 h	Toluène	100 %	**74** (28%), **75** (7%), **116**(6%), **117** (19%)	1/1.5/1/1
5	Ag_2O (10 éq)	1.40 V	15 h	H_2O : MeOH	25 %	**NP**	2.5/1
6	$KMnO_4$ (10 eq)	1,51 V	20 min	H_2O : MeOH	100 %	Dégradation	-
7	CAN (2éq)	1.61 V	6 h	MeCN	30 %	**74** (17%), **75** (7 %)	2.4/1
8	AIBN (2éq)		6 h	Acétone	20 %	**74** (12%), **75** (6%)	2.4/1

NP = non purifié

Tableau 20 : Oxydations de la guttiférone A par différents oxydants

Malgré des changements de métaux, de contre-ions et de potentiels d'oxydations, aucune différence de régiosélectivité ne fut observée. Seuls les composés **74**/**75** (2.7/1) furent isolés. Nous avons également testé des initiateurs radicalaires comme le CAN (Ceric Amonium Nitrate) ou l'AIBN (Azobisisobutyronitrile) (**tableau 20**, entrée 7 et 8), donnant lieu toujours à l'obtention des xanthones naturelles. Par contre l'utilisation de la 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ), donna lieu à une variation de la régioselectivité (**tableau 20**, entrée 4). En effet, l'oxydation de la guttiférone A par la DDQ dans un solvant strictement anhydre conduit à la formation des quatre xanthones désirées **74**, **75**, **116** et **117** dans des proportions de 1 : 1.5 : 1 : 1 respectivement (**schéma 25 et Figure 66**).

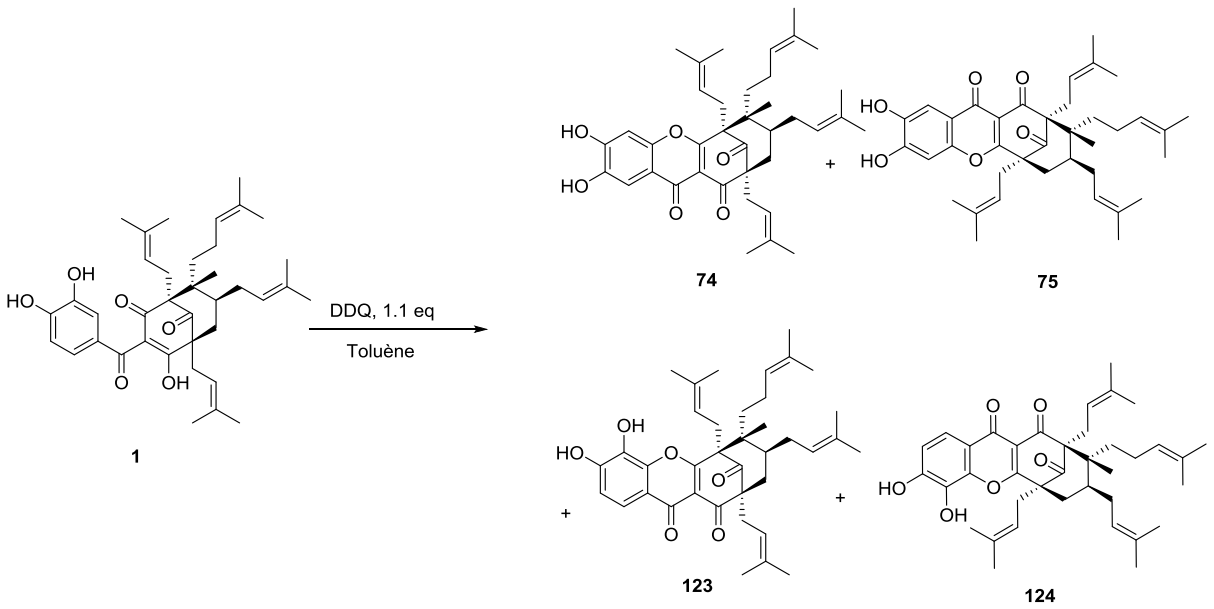


Schéma 25 : Oxydation de la guttiférone A par la DDQ

Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas pu séparer efficacement la 3,12-oxy-guttiférone A **127** de la 1.16-oxy-guttiférone A **75**. Le fractionnement du pic contenant ce mélange, nous a tout de même permis d'isoler de faibles quantités de 3.12-oxy-guttiférone A pure. Cependant, la 1.12 oxy-guttiférone A était plus facilement séparable comme illustré **figure 66**.

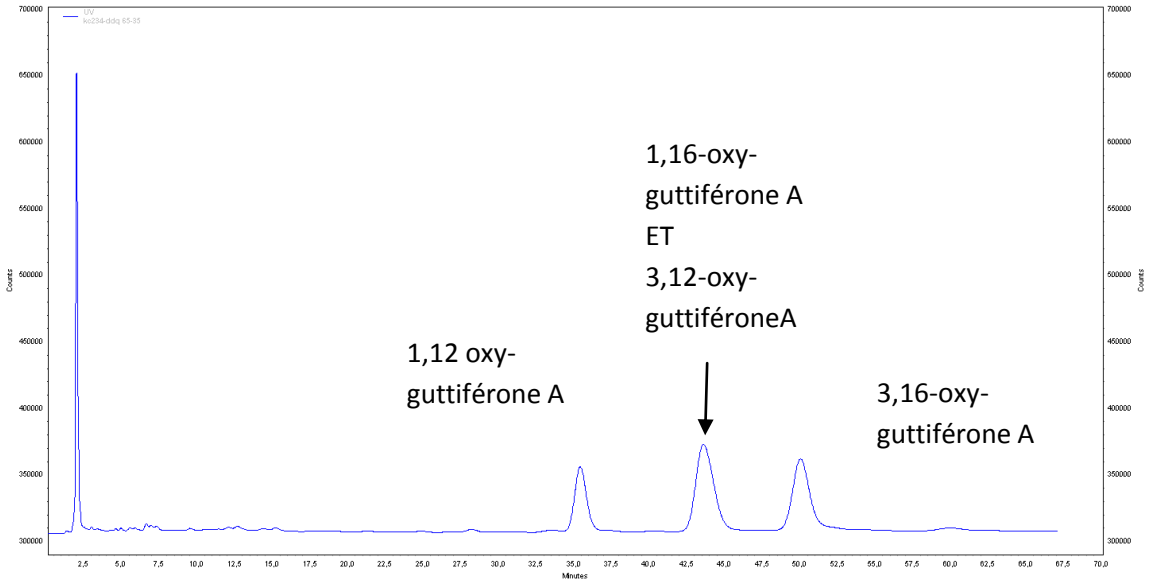


Figure 66 : Chromatogramme HPLC du brut réactionnel après oxydation de la guttiferone A par la DDQ

Le mécanisme de cette réaction n'est pas encore bien connu. Il est décrit dans la littérature que la DDQ effectue de nombreuses réactions, telles que des déshydrogénations[145, 146] , des oxydations benzyliques[147], des oxydations d'alcools[147], des couplages de type C-C [148] ainsi que des couplages phénoliques [149]. Des publications récentes font référence à des mécanismes de types radicalaires[150]. Afin de savoir si ce genre d'intermédiaires pourrait jouer dans le mécanisme de cyclisation de la guttiférone A, nous avons introduit un équivalents d'inhibiteur de radicaux dans le mélange réactionnel: le 2,2,6,6-Tétramethylpipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO)[151]. L'oxydation dans ces conditions a conduit à la

[145] M. Movassaghi et al.,Total Synthesis of (-) Himandrine, *J. Am. Chem. Soc.,* **2009**, *131*, 9648-9650.

[146] D. Walker and JD. Hiebert, 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone and its reactions, *Chem. Rev.,* **1967**, *67*, 153-195.

[147] T. Amemiya *et al*. The novel oxidation of 1-alkylazulenes to 1-acylazulenes with DDQ, *Chem. Lett,*. **1988**, 587-590.

[148] D. Cheng and W. Bao, Highly Efficient Metal-Free Cross-Coupling by C-H Activation between Allylic and Active Methylenic Compounds Promoted by DDQ *Adv. Synth. Catal*. **2008**, *350*, 1263-1266.

[149] F. Ameer *et al.,* The DDQ mediated cyclization products of some 2-hydroxy-3-(1'- alkenyl)-1,4-naphthoquinones, *Synth. Commun.,* **2002**, *32*, 369.

[150] Z-L. Wang *et al.,* DDQ-Mediated Oxidative Coupling: An Approach to 2,3-Dicyanofuran (Thiophene), *Org. Chem.*, **2014**, *79* ,3, 1156–1165.

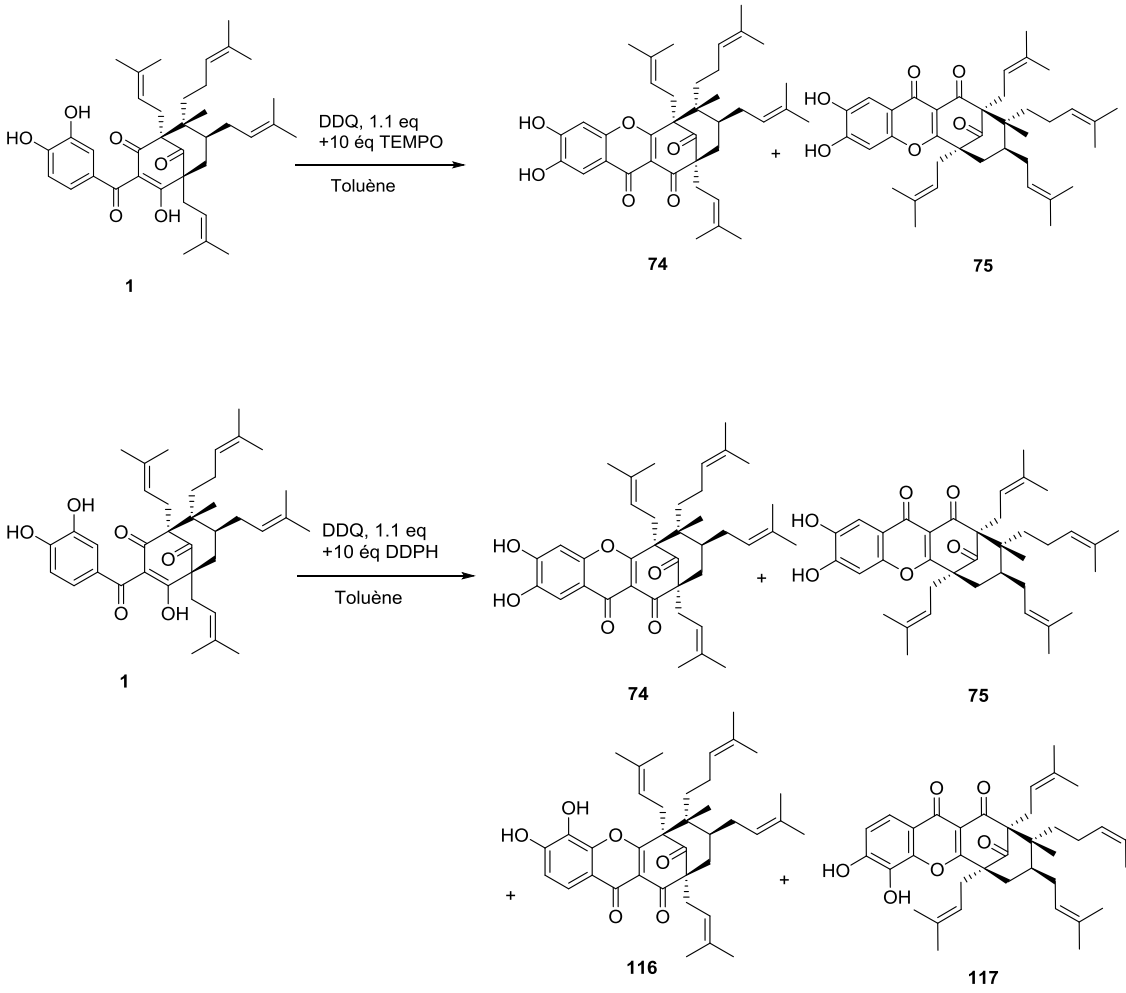
[151] F. Jiang *et al*., Free radical scavenging and anti-oxydative acitivies of an ethanol-soluble pigment prepared from fermented *Zijuan Pu-erh* tea**,** Food and Chemical Toxicology, **2013**, 59, 527-533.

formation de **74** et **75** uniquement. Deux hypothèses mécanistiques sont donc envisageables :

1) Il existe une compétition entre deux mécanismes dont l'un, radicalaire, mènerait à la formation de **116** et **117**.

2) la DDQ oxyderait le TEMPO (plus faible en potentiel d'oxydation) qui ensuite, oxyderait la guttiférone *via* un mécanisme différent, conduisant uniquement à la formation de **74** et **75**.

Des résultats similaires furent observés en remplacant le TEMPO par le DDPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). En revanche la substitution du TEMPO par le di-nitro-toluène (également connu pour être inhibiteur radicalaire[152] mais non oxydant) a conduit également dans les mêmes conditions expérimentales à la synthèse des quatre xanthones (**Schéma 26**).



[152] F. Montanari et *al*,.2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl". *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*., Ed Wiley, **2005**,

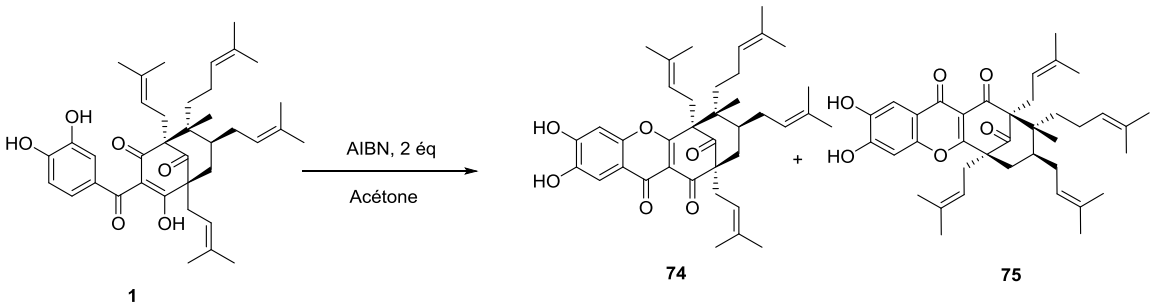


Schéma 26 : Différentes conditions opératoires pour la détermination du mécanisme

L'hypothèse d'une réaction uniquement radicalaire est assez peu probable, car des initiateurs de radicaux (AIBN et CAN) n'ont pas conduit à la synthèse des composés cyclisés en position 12. Nous pouvons donc fait l'hypothèse que, la fonction de déshydrogénation de la DDQ, joue un rôle prépondérant dans le mécanisme. Nous avons également tenté de cycliser, dans ces mêmes conditions des composés tel que **118**, dont la partie catéchol était déjà substituée (**Schéma 27**). Dans ce cas, aucun changement ne fut observé et l'augmentation de la température n'a conduit qu'à la dégradation du composé.

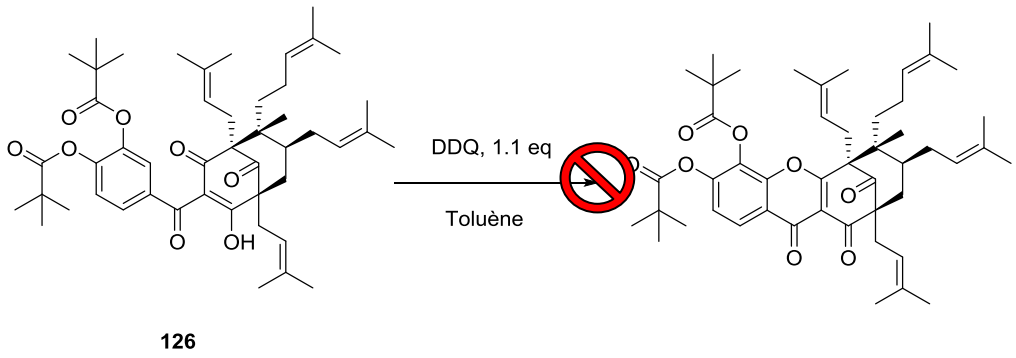


Schéma 27 : Impossibilité de cyclisation en xanthones à partir d'analogues de la guttiférone A estérifiés

Cette réaction nécessite au minimum 1 équivalent de DDQ etl'augmentation du nombre d'équivalent ne change pas la réactivité Des conditions strictement anhydres sont également requises, ainsi que la présence de phénols libres. Compte tenu de la fonction déshydrogénatrice de la DDQ nous proposons donc la compétition entre les deux mécanismes illustrés (**Schéma 28**)

Un premier mécanisme conduit au transfert de deux électrons et à la perte de deux protons conduisant à la formation de l'ortho-di quinone déjà décrite. Le second implique un radical cation formé à la suite d'un transfert mono-éléctronique par la DDQ. Un second transfert mono-électronique induit la formation d'un second radical, sur la fonction énol 1 ou 3. Un proton pourrait être arraché du noyau aromatique, retirant alors la charge positive. La cyclisation se feraitensuite par addition des radicaux libres. Sur le cycle aromatique celui-ci

pourrait se positionner soit en position 12 qui induit la formation des xanthones dites « non naturelles » 3,12 et 1,12- oxy-guttiférone A.

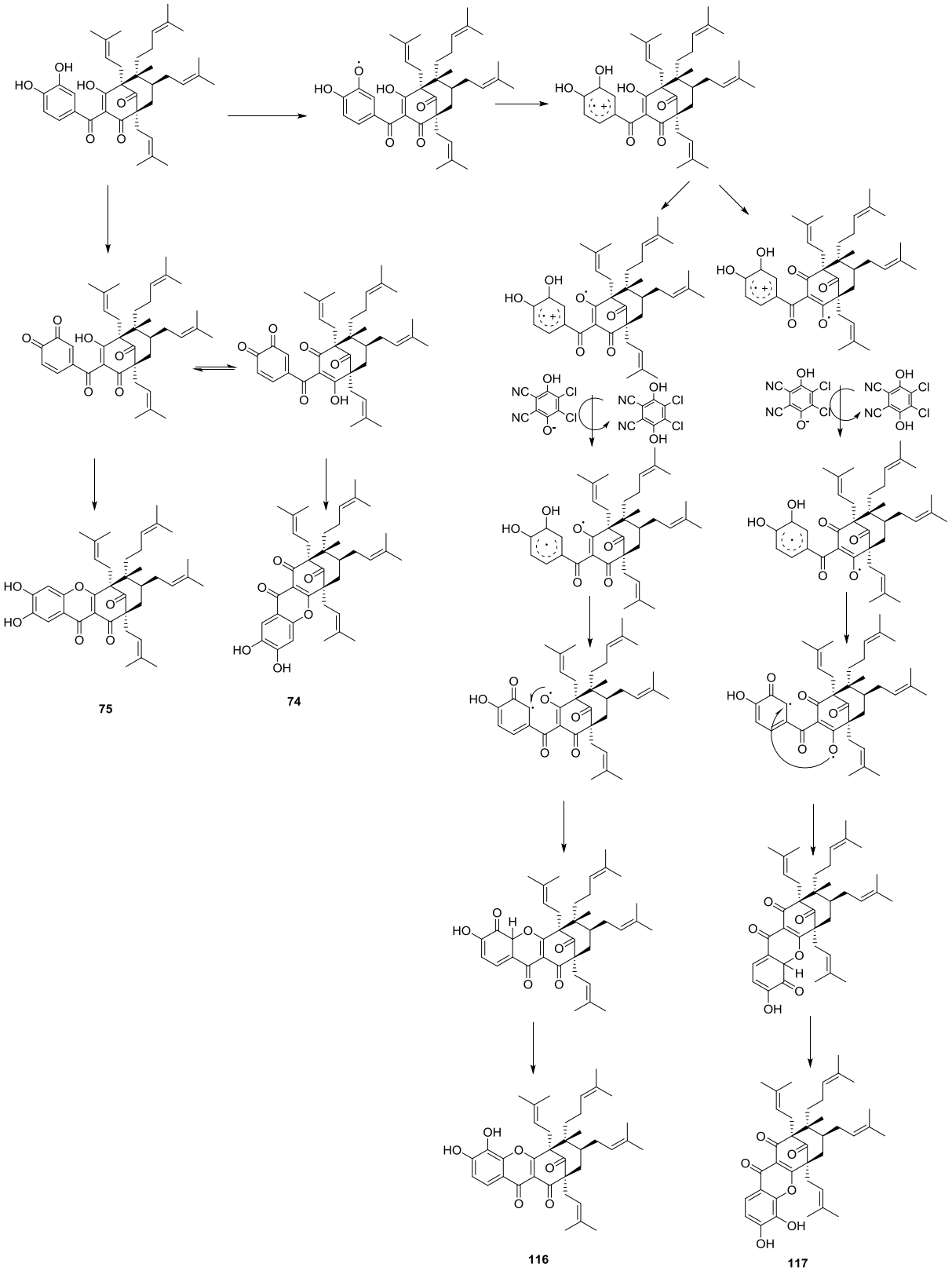


Schéma 28 : Mécanismes réactionnels pouvant expliquer la formation des xanthones 108 et 109.

En conclusion de cette partie, nous avons développé plusieurs méthodes permettant l'accès à 6 analogues xanthoniques de la guttiférone A. Les xanthones « naturelles » 74 et 75 ont été obtenues *via* l'utilisation de biotransformations, de méthode électrochimiques et de couplage oxydatifs phénoliques en présences de bases faibles. En augmentant la force de ces bases nous avons obtenues des analogues hydroxylées (123 et 124) des xanthones 74 et 75. De plus, les objectifs de cette partie ont été réalisés puisque, grâce à une oxydation en présence de DDQ, les xanthones non naturelles cyclisées en position 12 (116 et 117) ont également été hémisynthétisées. La synthèse de ces composés a rendu possible l'accès à une deuxième et troisième génération d'analogues hémisynthétiques.

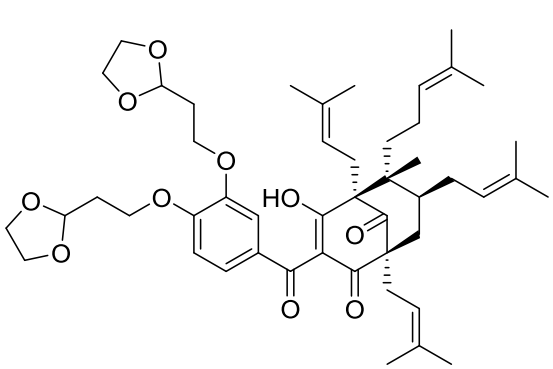
CHAPITRE 4 : SYNTHÈSE DES ANALOGUES DE DEUXIÈME ET TROISIÈME GÉNÉRATION

Introduction :

La synthèse d'analogue de seconde génération s'est basée sur les résultats de deux études de pharmacomodulations précédentes effectuées par le Dr Y. Fromentin.

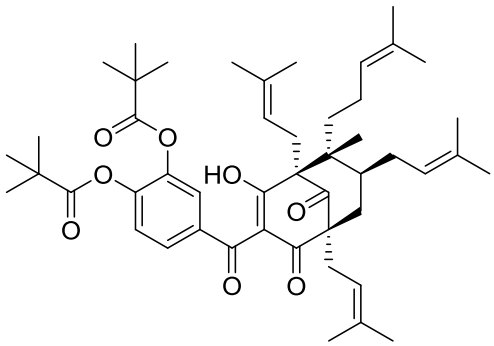
1-Modulation partie catéchol

À partir des vingt modulations étudiées par Y. Fromentin, nous avons choisi de garder celle qui ont conduit aux les meilleurs gains d'indice de séléctivité (IS). Ce fut le cas du composé **127** (**Figure 67**) qui a présenté une augmentation de l'IS d'un facteur 10 sur *P. falciparum* et *T. brucei*. Le composé **128** a quant à lui montré une augmentation de l'IS d'un facteur 5 sur *T. brucei.*



127

(13, 14,-bis-O-2-éthyle-1 ,3 dioxolane guttiférone A),



128

13,14-bis-O-pivaloyl-guttiférone A

Figure 67 : Meilleurs analogues de seconde génération

L'augmentation de cet index de sélectivité est principalement due à la diminution de la toxicité de ces composés sur les cellules VERO (**Tableau 21**).

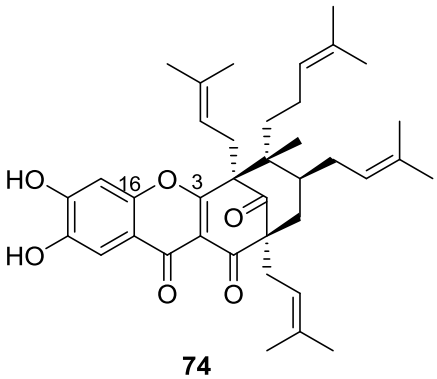
nom	IC_{50} VERO	*Plasmodium falciparum*		*Trypanosoma brucei*		*Leishmania donovani*	
		IC_{50} PF	SI	IC_{50} TB	SI	IC_{50} LD	SI
guttiférone A	7.05 ± 0.36	3.32 ± 0.45	2.1	2.95 ± 0.94	2.4	5.83 ± 0.35	1.2
127	41.65 ± 4.1	2.00	20.8	1.83 ± 0.10	22.8	41.65 ± 4.1	1.2
128	100	NC	NC	8.66 ± 0.23	11.5	NC	NC
3.16-oxy-guttiférone A (74)	NC	0.75	NC	1.25	NC	5.02	NC
1.12-oxy-guttiférone A (116)	NC	3.23	NC	2.59	NC	NC	NC

NC : Non Calculé

Tableau 21 : Evaluations biologiques des analogues de première génération et de deux xanthones

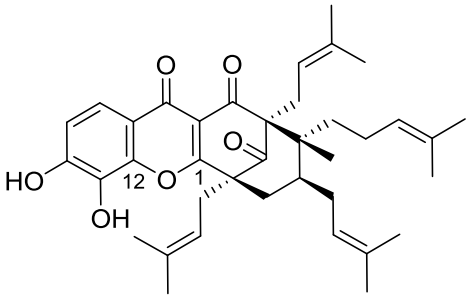
-Modulation cyclisation en xanthones

Lors d'une seconde étude, deux xanthones ont également été testées sur ces cibles parasitaires, la 3,16 et 1,12 oxy-guttiférone A **74** et **116 (Figure 68)**. Le composé **74** montra une meilleure activité sur *P.falciparum* et *T. brucei* (diminution de l'IC_{50} d'un facteur 4 et 2 respectivement) (**Tableau 21**)..



74

3.16-oxy-guttiférone A



116

1.12-oxy-guttiférone A

Figure 68 : Xanthones testées sur les cibles parasitaires

Nous avons donc envisagé de synthétiser des analogues possédant les modulations du noyau benzophénone et catéchol, comme représenté **Schéma 29**. Deux voies étaient alors possibles :

A) Fonctionalisation du noyau catéchol puis cyclisation

B) Cyclisation puis fonctionalisation du noyau catéchol

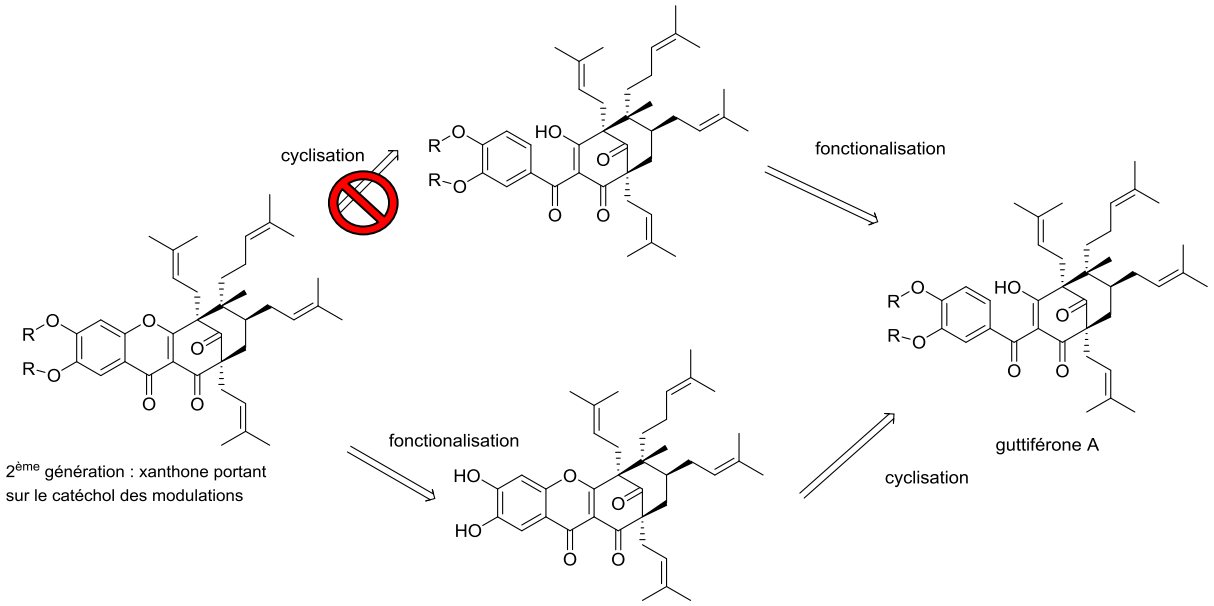


Schéma 29 : Illustration des analogues de seconde génération.

Cependant, comme montré dans des travaux antérieurs (Chapitre 3, **schéma 38**), la cyclisation est rendue impossible, si les fonctions catéchol sont substituées. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser la voie B.

Partie 1 : Synthèse et évaluations biologiques d'analogues de seconde génération

4.1.1. Synthèse des analogues de seconde génération

Les méthodologies de cyclisation développées dans le chapitre 3, nous ont permis d'accéder à des quantités suffisantes de xanthones intermédiaires. Les molécules **74**, **75**, **116** et **117** furent purifiées par CLHP préparative, avant d'être engagées dans une réaction de bis-acylation ou bis-alkylation (**Schéma 30**).

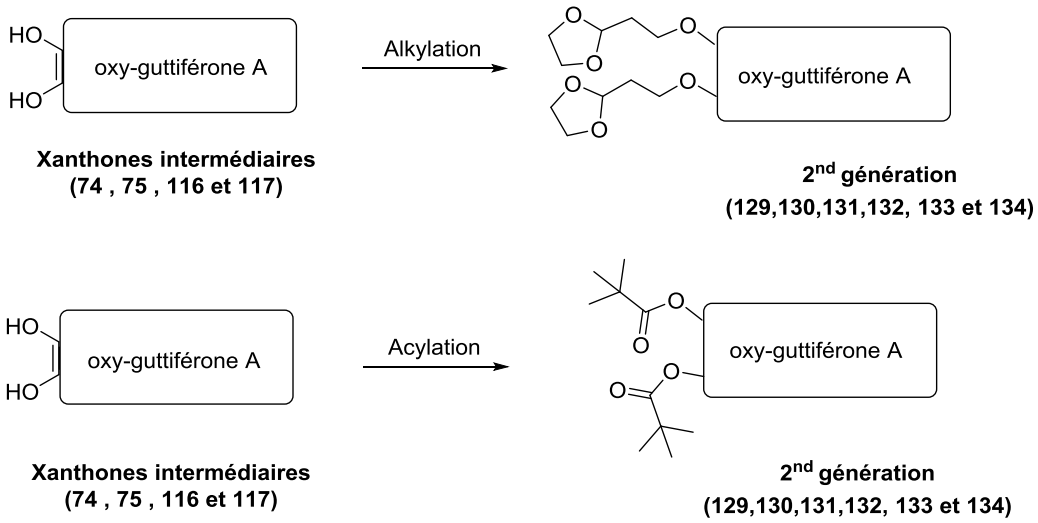


Schéma 30 : Synthèse des analogues de seconde génération à partir des xanthones intermédiaires

Les conditions expérimentales employées furent similaires à celles utilisées pour la synthèse des analogues de première génération (**tableau 22**)

entrée	produit de départ	réactifs	base	solvant	Température /temps	Composés isolés
1	**74**	2-bromoethyl-2-1,3 dioxolane (5 éq)	K_2CO_3 (10 éq) Cs_2CO_3 (10%)	Acétone anhydre	reflux 6 h	**129** (8%), **130** (68 %)
2	**75**	2-bromoethyl-2-1,3 dioxolane (5 éq)	K_2CO_3 (10 éq) Cs_2CO_3 (10%)	Acétone anhydre	reflux 6 h	**132** (6 %), **133**(75 %)
3	**116**	2-bromoethyl-2-1,3 dioxolane (5 éq)	K_2CO_3 (10 éq) Cs_2CO_3 (10%)	Acétone anhydre	reflux, 12 h	**135** (86 %)
4	**117**	2-bromoethyl-2-1,3 dioxolane (5 éq)	K_2CO_3 (10 éq) Cs_2CO_3 (10%)	Acétone anhydre	reflux, 12 h	**136** (85%)
5	**74**	Chlorure de Pivaloyle (5 éq), DMAP (cat)	-	Pyridine	t.a. 12 h	**131** (> 90%)
6	**75**	Chlorure de Pivaloyle (5 éq), DMAP (cat)	-	Pyridine	t.a. 12 h	**134** (> 90%)
7	**116**	Chlorure de Pivaloyle (5 éq), DMAP (cat)	-	Pyridine	t.a. 12 h	**137** (> 90%)
8	**117**	Chlorure de Pivaloyle (5 éq), DMAP (cat)	-	Pyridine	t.a. 12 h	**138** (> 90%)

Tableau 22 : Synthèse des analogues de deuxième génération

On pourra noter que dans le cas de l'alkylation des xanthones **74** et **75**, ayant été isolées en plus grande quantité, nous avons choisi d'arreter la réaction avant une conversion totale en produit bis-alkylé. En effet, l'obtention des composés mono-alkylés a permis d'augmenter notre chimiothèque de composés à tester. Concernant les produits de mono-acylation, ces derniers n'ont jamais pu être caractérisés ou isolés dans ces conditions. Dans un souci de clarté, nous avons représentés tous les analogues obtenus ainsi que les xanthones intermédaires (**figure 69).**

4.1.2. Activités biologiques des composés

Concernant les tests biologiques sur *P. falciparum* et *T. brucei*, ils ont été effectués par l'équipe du Pr. P. Grellier au MNHN. Concernant les tests contre *L. donovani*, ils ont été effectués par l'équipe du Pr. P. Loiseau de l'Université Paris-Sud. La première campagne concernant la guttiférone A et ses analogues de première génération, testés sur forme promastigote n'ayant pas retrouvé l'activité sub-micromolaire décrite par Lenta *et al,*. nous avons alors décidé d'étudier les activités sur la forme amastigote.

Afin de déterminer l'indice de séléctivité de ces composés, nous avons également testé leur toxicité sur cellules VERO, comme lors de la première campagne. Ces tests ont été efféctués par l'équipe du Dr T. Cresteil de la plateforme Chem-Bio-Screen.

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.

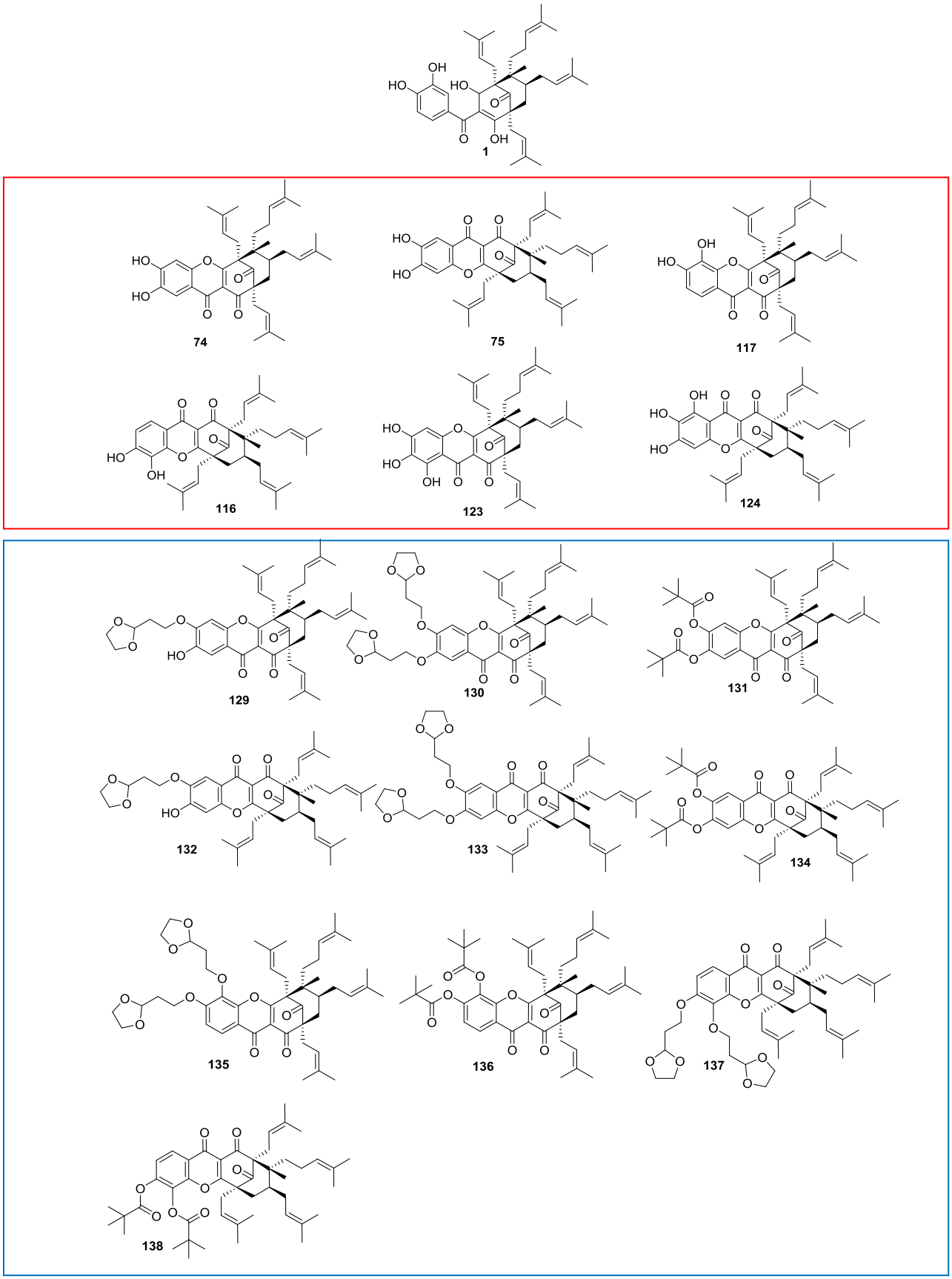


Figure 69 : Xanthones intermédiaires et analogues de seconde génération synthétisés et testés (rouge : xanthones intermédiaires ; bleu : analogues de seconde génération)

4.1.3. Tests sur *Plasmodium falciparum*

16 composés (dont 13 nouveaux) ont été testés sur une souche de *Plasmodium falciparum* FcB1/Colombia. Concernant les trois composés déjà testés : **1**, **74** et **108**, les activités observés lors de cette étude sont proches de celles décrites précédement **tableau 21.** En effet, lors de cette nouvelle campagne de tests, l'activité de la guttiférone A **1** calculée était de 5.4 µM contre 3.32 µM précédement. Dans le cas de **74** et **108** ces valeurs sont de 0.89 pour 0.75 et 5.1 pour 3.23 respectivement.

entrée	**composés**	**IC_{50} VERO**	***Plasmodium falciparum***	
			IC_{50} PF	IS
1	guttiférone A (**1**)	7.2 ± 1.5	5.4	1.3
2	3.16-oxy-guttiférone A (**74**)	3.0 ± 1.1	0.89 ± 0,21	3.4
3	14 dioxolane 3.16-oxy-guttiférone A (**129**)	32 ± 5.1	0.56 ± 0,08	57.1
4	13,14 dioxolane 3.16-oxy-guttiférone A (**130**)	23 ± 2.6	1.5 ± 0,4	15.3
5	13 ,14 pivaloyle 3.16-oxy-guttiférone A (**131**)	6.2 ± 0.53	2.3 ± 0,1	2.7
6	1.16-oxy-guttiférone A (**75**)	4.25 ± 0.68	1.8 ± 0,6	2.4
7	13,14 dioxolane 1.16-oxy-guttiférone A (**133**)	32.5 ± 8.2	2.3 ± 0,7	14.1
8	13 ,14 pivaloyle 1.16-oxy-guttiférone A (**134**)	3 ± 0.6	5.7 ± 1,3	0.5
9	3.12-oxy-guttiférone A (**108**)	3.75 ± 0.23	2.9 ± 0,7	1.3
10	13,14 dioxolane 3.12-oxy-guttiférone A (**135**)	40 ± 3.8	17.6 ± 5,5	2.3
11	13 ,14 pivaloyle 3.12-oxy-guttiférone A (**136**)	4.5 ± 0.34	0.6 ± 0,13	7.5
12	1.12-oxy-guttiférone A (**109**)	12 ± 2.4	5.1 ± 1,3	2.4
13	13,14 dioxolane 1.12-oxy-guttiférone A (**137**)	7.5 ± 0.87	5.5 ± 1,0	1.4
14	13 ,14 pivaloyle 1.12--oxy-guttiférone A (**138**)	3.5 ± 0.57	5.1 ± 1,3	0.7
15	12 hydroxy 3.16-oxy-guttiférone A (**123**)	25 ± 1.99	0.53 ± 0,04	47.2
16	12-hydroxy 1.16-oxy-guttiférone A(**124**)	8 ± 1.64	1.7 ± 0,2	4.7
17	Chloroquine (**3**)	21.0	0.111	189

Tableau 23 : Evaluations biologiques des xanthones intermédiaires et de la seconde génération d'analogues contre *P. falciparum*

Les résultats du **tableau 23** montrent que la cyclisation en xanthone a permis d'améliorer l'activité sur *P.falciparum* (**Tableau 23**, entrées 1, 2, 6, 9, 12, 15 et 16). Cependant, à l'exception du composé **123** (**Tableau 23**, entré 15), ces composés cyclisés se révèlent être en général plus toxiques sur cellules VERO. Cette toxicité a pour conséquence une augmentation très modeste des IS de ces composés par rapport à la guttiférone A.

La substitution du noyau catéchol envisagée lors de la synthèse de la seconde génération d'analogue, avait pour but de diminuer la toxicité sur cellules VERO, comme observé précédement. L'analyse des résultats nous montrent que les composés possédant les groupements dioxolanes, (**Tableau 23**, entrées 3, 4, 7, 10 et 13) ont bien subis une baisse de la toxicité sur cellules VERO (à l'exception du composé **137**, **Tableau 23**, entrée 13). Concernant les analogues possédant les groupements pivaloyles, leur toxicité n'a été que très peu réduite (**Tableau 23**, entrées 5, 8, 11 et 14).

Les dérivés xanthoniques de type 1.16 et 3.16 sont particulièrement interréssants pour deux raisons :

- ces derniers sont synthétisables avec un rendement plus élevé
- ces derniers possèdent également l'IS le plus important (**Tableau 23**, entrées 3, 4 ,7 et 15).

Plus particulièrement, le composé **129** (**Tableau 23**, entrée 3), possède le meilleur IS de la série, (IS= 57). Cet analogue, provenant d'une cyclisation de type 3.16 ne possède qu'un groupement dioxolane. Son potentiel pharmacologique est également plus interressant que le composé **127** (IS = 20), composé « lead » de la première génération.

Nous pouvons également noter que la xanthone intermédiaire **123**, présentant une hydroxylation supplémentaire par rapport à **74**, possède un IS de 47. Il serait pertinent d'effectuer des alkylations de groupements dioxolanes sur ce composé afin d'étudier l'évolution de son IS.

Même si ces valeurs sont encore relativement éloignées de la référence (chloroquine IS =184), nous avons amélioré en deux générations hémisynthétiques d'un logarithme la valeur de l'IS. Un gain supplémentaire de cet ordre de grandeur nous permettrait de rivaliser avec cette même référence. Nous pourrions poursuivre ces expériences en réalisant des tests sur modèles murins, afin de voir si ces composés seraient actifs *in vivo*. Au cours de cette étude nous avons pu démontrer nos hypothèses concernant l'implication des différents groupements sur le potentiel pharmacologique des analogues. La substitution des groupements catéchols par des groupements dioxolanes, était bien responsable de la baisse de la toxicité sur cellules VERO. La cyclisation en xanthone joue un rôle dans l'activité anti-plasmodiale, mais induit également une augmentation de la toxicité sur cellules saines.

4.1.4. Tests sur *Trypanosoma brucei*

Comme pour *Plasmodium falciparum*, nous avons pu montrer que de façon générale les dérivés cyclisés, et plus particulièrement ceux dont cette cyclisation est de type 3.16 (**Tableau 24**, entrées 2 à 8), sont plus actifs sur *T. brucei.*

L'addition des groupements dioxolanes a donc également permis l'augmentation de l'IS. Ainsi, dans cette série les composés dérivant de la 3.16 oxy-guttiférone A, mono et di estérifiés avec ce groupement (**Tableau 24**, entrées 3 et 4), présentent un IS de 457 et 143 respectivement.

Ces valeurs sont exellentes si on les compare avec l'activité du principe actif de référence : la pentamidine (IS = 11.4).Par rapport à notre composé de départ, l'indice de séléctivité a été multiplié par 400 (IS guttiférone A = 1.8). Nous pouvons exclure l'erreur expérimentale car trois composés (**Tableau 24**, entrées 3, 4 et 10) présentent un IS de cet ordre de grandeur. On peut noter que la 13,14 dioxolane 3.12-oxy-guttiférone A (**136**), possédant un IS de 93, présente une forte homologie structurale avec les dérivés de la 3.16 oxy-guttiférone A.

Comme pour *P. falciparum*, la réalisation de tests préliminaires sur modèles murins pourrait permettre de témoigner de l'efficacité *in vivo* des molécules élaborées

entrée	composés	IC_{50} VERO	*Trypanosoma brucei*	
			IC_{50} TC	IS
1	guttiférone A (**1**)	7.2 ± 1.5	3.9 ± 0.2	1.8
2	3.16-oxy-guttiférone A (**74**)	3.0 ± 1.1	1.8 ± 0.5	1.7
3	14 dioxolane 3.16-oxy-guttiférone A (**129**)	32 ± 5.1	0.07 ± 0.01	457.1
4	13,14 dioxolane 3.16-oxy-guttiférone A (**130**)	23 ± 2.6	0.16 ± 0.01	143.8
5	13 ,14 pivaloyle 3.16-oxy-guttiférone A (**131**)	6.2 ± 0.53	1.6 ± 0.2	3.9
6	1.16-oxy-guttiférone A (**75**)	4.25 ± 0.68	2.1 ± 0.1	2.0
7	13,14 dioxolane 1.16-oxy-guttiférone A (**133**)	32.5 ± 8.2	1.6 ± 0.1	20.3
8	13 ,14 pivaloyle 1.16-oxy-guttiférone A (**134**)	3 ± 0.6	3.2 ± 0.3	0.9
9	3.12-oxy-guttiférone A (**108**)	3.75 ± 0.23	6.4 ± 0.3	0.6
10	13,14 dioxolane 3.12-oxy-guttiférone A (**135**)	40 ± 3.8	0.43 ± 0.1	93.0
11	13 ,14 pivaloyle 3.12-oxy-guttiférone A (**136**)	4.5 ± 0.34	1.0 ± 0.1	4.5
12	1.12-oxy-guttiférone A (**109**)	12 ± 2.4	4.2 ± 0.2	2.9
13	13,14 dioxolane 1.12-oxy-guttiférone A (**137**)	7.5 ± 0.87	0.75 ± 0.1	10.0
14	13 ,14 pivaloyle 1.12--oxy-guttiférone A (**138**)	3.5 ± 0.57	6.8 ± 0.4	0.5
15	12 hydroxy 3.16-oxy-guttiférone A (**123**)	25 ± 1.99	1.9 ± 0.1	13.2
16	12-hydroxy 1.16-oxy-guttiférone A(**124**)	8 ± 1.64	1.4 ± 0.45	5.7
17	Pentamidine (**10**)	57.0	0.005	11.4

Tableau 24 : Evaluations biologiques des xanthones intermédiaires et de la seconde génération d'analogues contre *T. brucei*

4.1.5. Tests sur *Leishmania donovani*

Afin de mieux percevoir l'activité de nos composés sur ce parasite, les tests ont été effectués sur les formes axéniques et intra macrophagiques[24]. Pour une raison de coût de ces tests, seuls quelques composés ont pu être testés. (**Tableau 24**).

entrée	composés	IC_{50} VERO	*Leishmania donovani* axenique		*Leishmania donovani* intra macro	
			IC_{50} LD	SI	IC_{50} LD	SI
1	guttiférone A (**1**)	7.2 ± 1.5	25	0.29	3.54	2.03
2	3.16-oxy-guttiférone A (**74**)	3.0 ± 1.1	25	0.12	0.61	4.92
3	14 dioxolane 3.16-oxy-guttiférone A (**129**)	32 ± 5.1	> 100	n.c.	> 100	n.c.
4	13,14 dioxolane 3.16-oxy-guttiférone A (**130**)	23 ± 2.6	> 100	n.c.	> 100	n.c.
5	13 ,14 pivaloyle 3.16-oxy-guttiférone A (**133**)	6.2 ± 0.53	> 100	n.c.	> 100	n.c.
6	1.16-oxy-guttiférone A (**75**)	4.25 ± 0.68	>100	n.c.	5.32	0.8

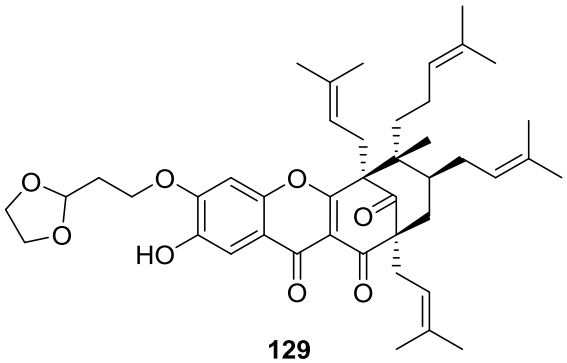
Tableau 25 : Evaluations biologiques des xanthones intermédiaires et de la seconde génération d'analogues contre *L. donovani*

Malgré ce changement de stade de developpement, nous n'avons toujours pas retrouvé l'activité sub-micromolaire attendue pour la guttiférone A (**Tableau 25,** entrée 1). La 3.16-oxy-guttiférone A fut le composé le plus efficace de cette série, avec un index de sélectivité proche de 5 (**Tableau 24,** entrée 2). Aucun analogue de seconde génération ne possédait une activité biologique suffisante pour la détermination de l'IC_{50} (**Tableau 25,** entrée 3,4 et 5).

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.

4.1.6. Conclusion des tests biologiques

Les activités biologiques de la seconde génération d'analogues hémisynthétiques de la guttiférone A sont relativement remarquables sur deux des trois parasites : *P. falciparum* et *T. brucei*. En effet, les résultats montrent que, les 2 modulations ont eu un effet synergique sur l'index de selectivité. Les modulations dioxolanes sur le noyau catéchol ont diminué la toxicité sur cellules VERO, alors que les cyclisations ont quant à elles amélioré l'activité antiparasitaire. Les composés dérivés de la 3.16-oxy-guttiférone A portant un (129) ou deux (130) motifs dioxolanes, ont montré une augmentation significative de l'IS, par rapport à la génération précédente, nous poussant à poursuivre nos études de RSA avec ces derniers. Plus particulièrement avec le composé mono alkylé 129 qui est le plus actifs sur *P. falciparum* et *T. brucei.*



129

IC_{50} VERO = 32 µM

IC_{50} *P. falciparum* = 0.56 µM IS = 57, 1

IC_{50} *T. brucei* = 0.07 µM IS = 457,1

Les modifications précédentes ont conduit à des composés très lipophiles (log D = 9), or une meilleure hydro-solubilité serait préférable, dans le cas de développement ultérieur sur modèle animal. Cette hydrophilie pourrait être apportée par des modifications des chaînes prénylées. Ces derrnières auront également pour but de contribuer à l'amélioration de l'IS.

Partie 2 : Synthèse d'analogues de troisième génération

4.2.1 Introduction

Comme l'illustré **figure 70**, la réactivité de la guttiférone A a été divisée en trois parties principales : le noyau cathécol (bleu), le cœur benzophénone (rouge) et les chaînes prénylées (marrons). Au cours des parties précédentes, nous avons modifié les noyaux catéchol et benzophénone. Afin d'introduire un nouveau groupement de façon orthogonale, nous avons pensé fonctionnaliser les chaînes prénylées.

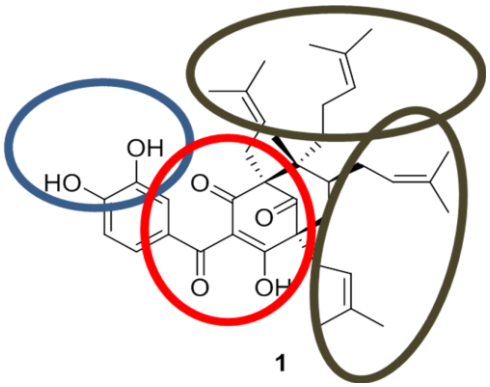


Figure 70 : Principaux groupements réactionnels de la guttiférone A.

Plusieurs axes ont été envisagés comme illustré (**Schéma 31**), la réduction des doubles liaisons, les réactions croisées de métathèses, la formation d'époxydes, di-hydroxylation, coupures oxydantes ainsi que les oxydations allyliques terminales. L'obtention de ces intermédiaires pourrait nous permettre d'introduire de nouveaux groupements afin d'améliorer l'IS et l'hydrosolubilité.

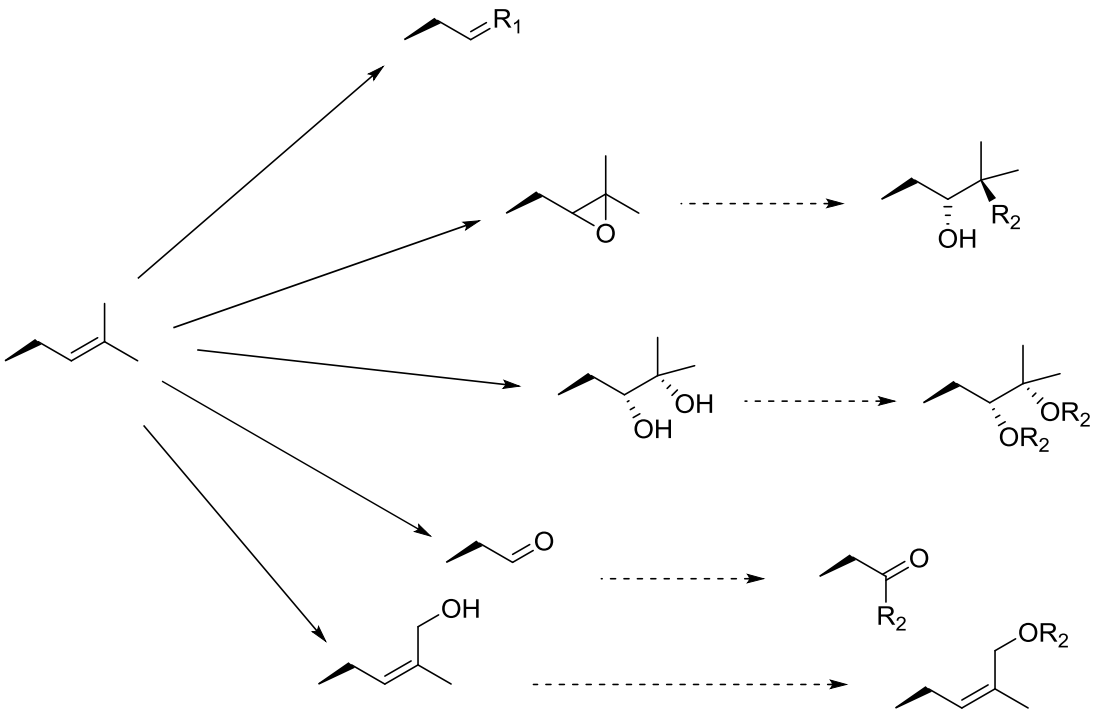


Schéma 31 : Modifications envisagées des chaines prénylées

Dans ce but, il nous faudra choisir des modifications robustes, accessibles avec de bons rendements et possédant si possible une sélectivité vis-à-vis des chaînes prénylées. En effet, la modification des quatre chaînes pourrait complètement changer les propriétées physico-chimiques de nos molécules, induisant éventuellement une perte de l'activité biologique. Si aucune sélectivité vis-à-vis de ces quatre chaînes n'est possible, la réaction doit posséder un excellent rendement pour éviter la formation de dizaines de composés intermédiaires.

Nous avons tout d'abord étudié la réactivité de la guttiférone A, dans des conditions d'introduction de groupements type éthylène par métathèse croisées. Cette option présente l'avantage de ne pas trop influencer la physico-chimie de la molécule.

4.2.2. Réactions de métathèses croisées

Les réactions de métathèses croisées (MC) ou transalkylidénation, sont des réactions de type [2+2], généralement catalysées par des métaux de transitions[153]. Elles présentent de nombreux avantages comme des rendements élevés et une sélectivité sur l'orientation de la double liaison formée (Z de préférence) satisfaisants. Il existe dans la littérature plusieurs exemples illustrant cette réactivité[154]. Nous avons choisi de développer l'exemple, de l'ouverture des doubles liaisons de cycles non contraints de la Manzamine, réalisé par l'équipe du Pr. Hamman en 2007 (**Schéma 32**).

[153] R. Grubbs, Olefin metathesis, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7117–7140.

[154] J. Winkler *et al*., Synthetic Modification of Manzamine A via Grubbs Metathesis. Novel Structures with Enhanced Antibacterial and Antiprotozoal Properties, **2007**, *Org*. *Lett*., 9, 22, 4467-4469.

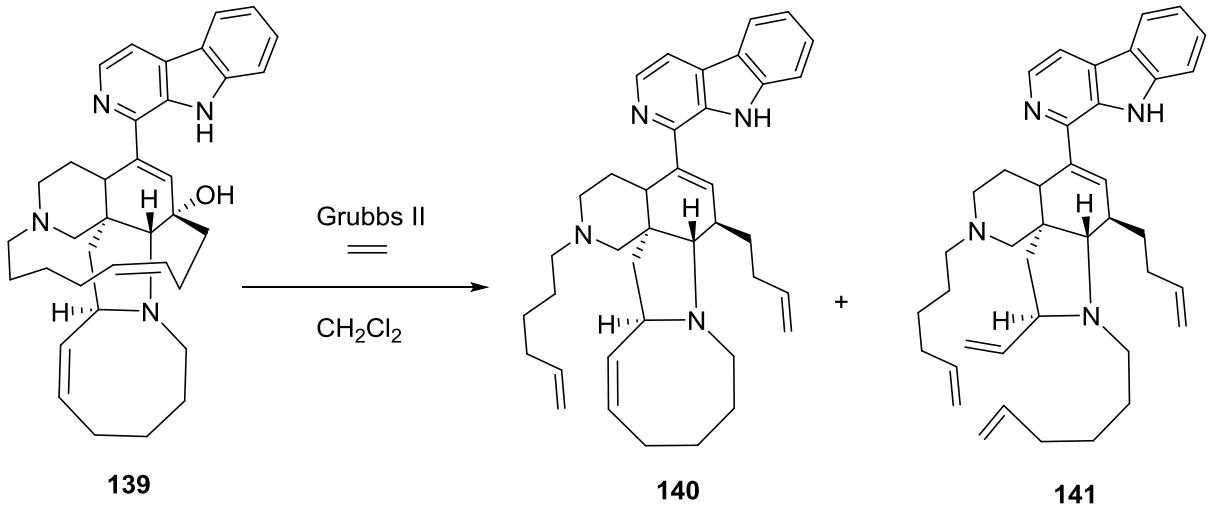


Schéma 32 : ouverture des doubles liaisons aliphatiques de la Manzamine

Cette réaction de métathèse d'ouverture de cycle est réalisée en présence du catalyseur de Grubbs de seconde génération. L'éthylène joue alors le rôle de partenaire accepteur dans la réaction. Les produits obtenus possèdent des doubles liaisons terminales (*exo*), qui pourront être également employées ultérieurement dans une seconde réaction. On pourra noter qu'il existe une forme de séléctivité dans l'ouverture de ces cycles.

Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps, à la mise au point d'une méthode de MC en présence d'éthylène, nous permettant d'accéder à un intermédiaire **142** (**Schéma 33**).

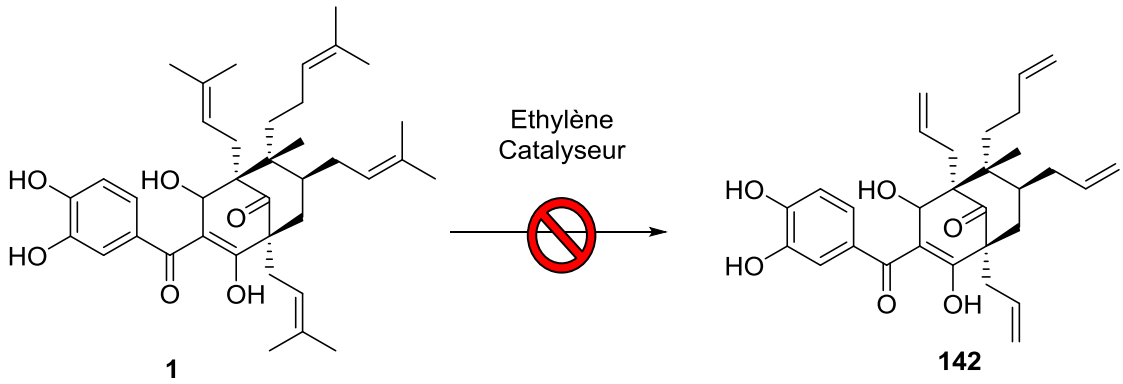


Schéma 33 : Formation d'un intermédiaire simple par MC à partir de la guttiférone A.

Comme illustré **tableau 26**, nous avons tout d'abord testé cette réaction en présence de deux catalyseurs différents (**Tableau 26,** entrées 1 et 2). Aucune formation du produit désiré

n'a été détectée. Nous avons ensuite augmenté la température de la réaction ainsi que l'activation par les micro-ondes (**Tableau 26** entrées 3 à 6), mais sans résultat concluant. Afin de palier un éventuel déficit d'éthylène solubilisé dans le solvant, nous avons réalisé un montage sous hotte, avec un flux d'éthylène permanent (**Tableau 26,** entrée 8). Mais cela n'a pas conduit à la récupération du produit désiré. L'utilisation du tolène comme solvant de réaction a également été testé dans ces conditions (**Tableau 26,** entrées 7 et 9) aboutissant aux mêmes résultats.

Entrée	Solvant	Ethylène	Catalyseur	Température	Temps	Résultat
1	CH_2Cl_2	Atm. Sat.	Grubbs II (30 % M)	t.a.	24 h	Pd de départ
2	CH_2Cl_2	Atm. Sat.	Grubbs -Oveyada (30 % M)	t.a.	24 h	Pd de départ
3	CH_2Cl_2	Atm. Sat.	Grubbs II (30 % M)	40 °C	12 h	Pd de départ
4	CH_2Cl_2	Atm. Sat.	Grubbs II (30 % M)	80 °C	2 h M-O	Pd de départ
5	CH_2Cl_2	Atm. Sat.	Grubbs II (30 % M)	80 °C	4 h M-O	Pd de départ
6	CH_2Cl_2	Atm. Sat.	Grubbs II (30 % M)	110 ° C	4 h M-O	Pd de départ
7	Toluène	Atm. Sat.	Grubbs II (30 % M)	110 ° C	3 h M-O	Pd de départ
8	CH_2Cl_2	Atm. Sat. + flux cont.	Grubbs II (30 % M)	40 °C	2 h	Pd de départ
9	Toluène	Atm. Sat. + flux cont.	Grubbs II (30 % M)	40 °C	2 h	Pd de départ

Tableau 26 : Conditions de réaction pour l'obtention de l'intermédiaire **142**

Plusieures hypothèses expliquant ce résultat furent envisagées :
-Le potentiel d'oxydation de la guttiférone A étant de 0.8 V, cette dernière pourrait réduire le catalyseur le rendant inerte.
-Le nombre important de fonctions capables de chélater les métaux pourrait également neutraliser le catalyseur.
-La complémentarité des partenaires de la réaction n'est pas suffisante (effet match-mismatch) concernant la densité électronique.

Pour éviter ces éventuels problèmes, nous avons pris comme modèle le composé **130**, car cet oxy-PPAPs, possède le noyau catéchol substitué permettant d'éviter des chélations. Nous avons également choisi un partenaire moins riche en électrons : le 1,4 di-acétyl-but-3,4-ène (**Schéma 34**).

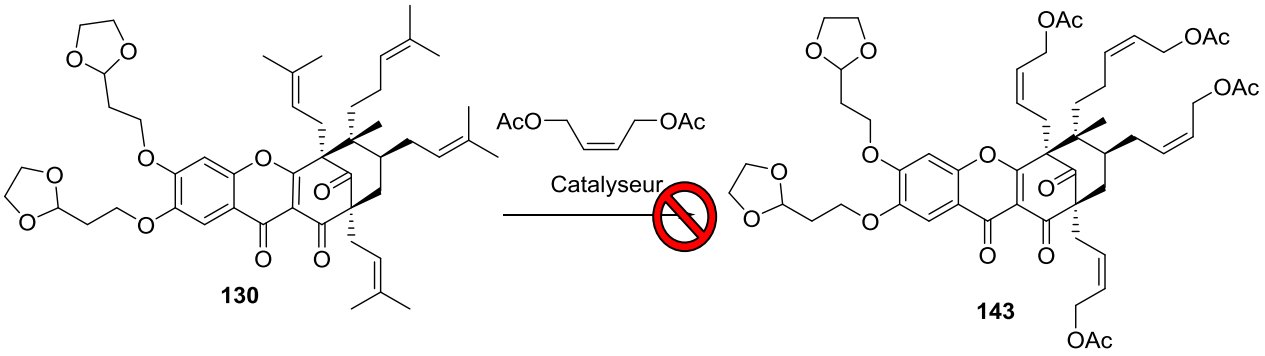


Schéma 34 : Formation d'un analogue de troisième génération à partir de **143**

Les conditions expérimentales pour l'obtention de ce composé **143** sont présentées (**Tableau 26**). Des conditions similaires aux expériences précédentes furent appliquées, en augmentant petit à petit l'énergie du système. Mais nous n'avons récupéré que du produit de dégradation ou du produit de départ. Dans l'hypothèse où le catalyseur se dégraderait, nous avons également rechargé ce dernier plusieurs fois au cours de la réaction (**Tableau 26,** entrée 3). Ces expériences n'ont pas abouti à l'obtention des composés désirés.

Entrée	Solvant	Catalyseur	Température	Temps	Résultat
1	CH_2Cl_2	Grubbs II (30 % M)	t.a.	24 h	pd de départ
2	CH_2Cl_2	Grubbs II (30 % M)	40 °C	24 h	pd de départ
3	CH_2Cl_2	Grubbs II (120 (4x30) % M)	40 °C	24 h	pd de départ
4	CH_2Cl_2	Grubbs II (30 % M)	80 °C	2 h M-O	pd de départ
5	CH_2Cl_2	Grubbs II (30 % M)	110 ° C	2 h M-O	pd de départ
6	Toluène	Grubbs II (30 % M)	110 ° C	2 h M-O	pd de départ

Tableau 27 : Conditions de réaction pour l'obtention du composé **143**

Devant l'inertie de cette réaction, nous avons tenté une autre approche passant par l'oxydation de ces chaînes prénylées (**Schéma 31**).

4.2.3. Réactions d'époxydation

L'oxydation des doubles liaisons en époxyde est une réaction connue en chimie organique et abondamment décrite dans la littérature[155]. Un des principaux avantages de cet intermédiaire est le contrôle de la stéréochimie de son produit d'ouverture[156]. Nous avons choisi d'illustré cette réactivité à travers la synthèse des analogues du (+)-bakuchiol réalisé par M.-R. Cha en 2012 (**Schéma 35**)[157].

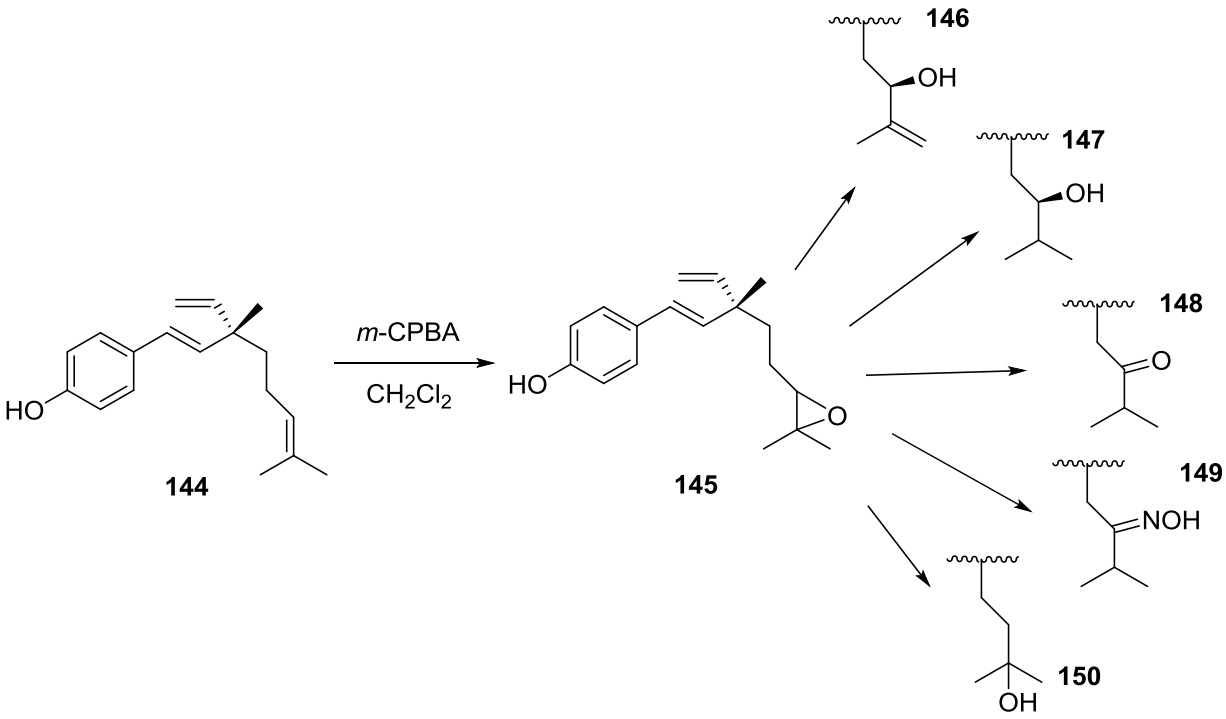


Schéma 35 : epoxydation du (+)-bakuchiol permettant lé génération de nombreux analogues

Nous avons essayé de formé le composé **151** en présence d'un peracide (l'acide métachloroperbenzoïque) (**Schéma** 3**6**).

[155] R. Johnson and B. Sharpless, *Comp. Org. Syn.*, **1991**, *7*, 389-436.

[156] E. Jacobsen, Asymmetric Catalysis of Epoxide Ring-Opening Reactions, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 421-43.1

[157] M.-R. Cha *et al*., Anti-Proliferative Effect of Synthesized Bakuchiol Analogues on Cultured Human Tumor Cell Lines, *Bull. Korean Chem. Soc*., **2012**, 33, 7, 2378-2380.

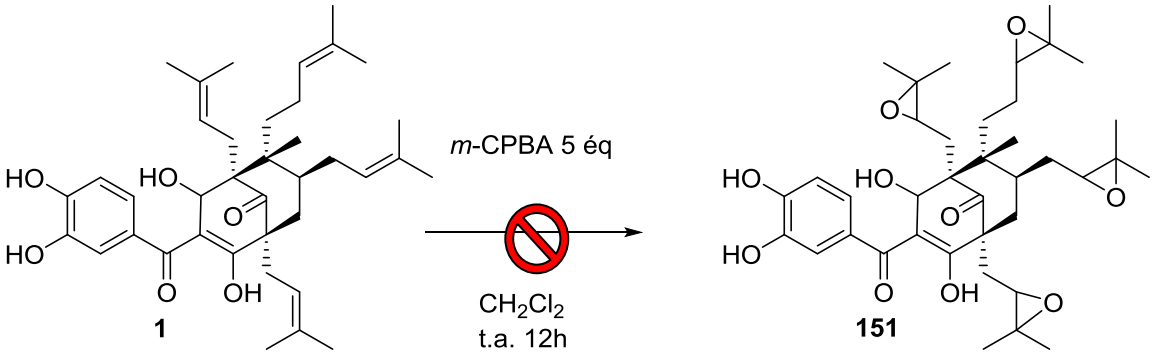


Schéma 36 : Formation d'un analogue portant des fonctions époxydes

La récupération du produit de départ après 12 heures de réaction, nous a incité à choisir une autre méthode d'oxydation des chaînes prénylées.

4.2.4. Réactions de di-hydroxylations.

Les réactions de di-hydroxylations sont également connues pour leurs efficacités en terme de rendements et de contrôle de la stéréochimie des produits d'arrivés[158]. Nous pouvons citer comme exemple les travaux de l'équipe de Smith en 2005 pour la synthèse de produits naturels poly-fonctionalisés : les Lituarines[159] **schéma 37.**

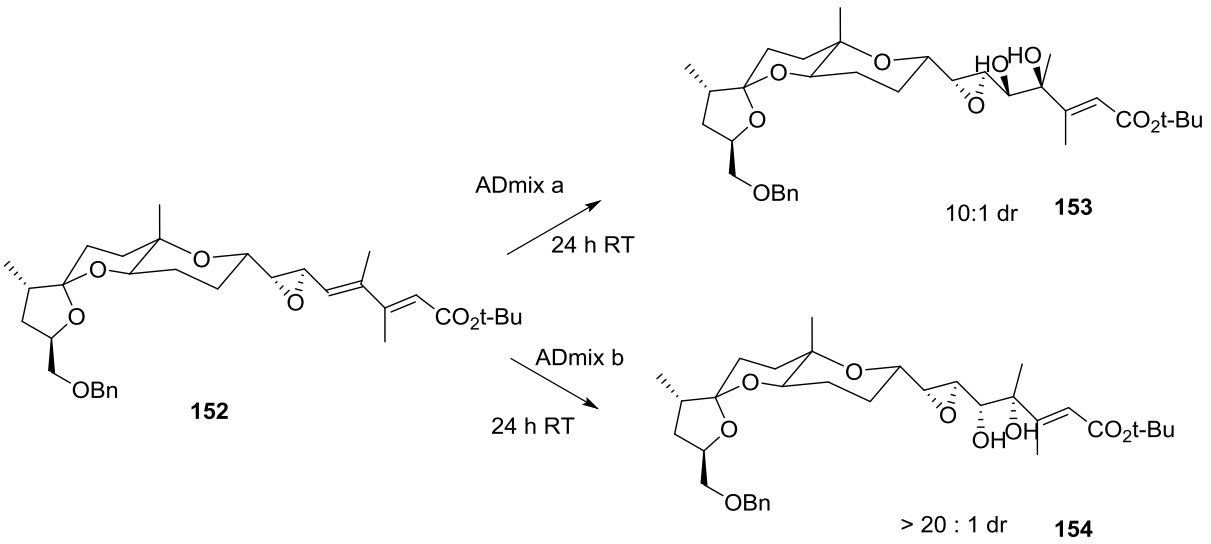


Schéma 37 : Di-hydroxylation de **152** pour la synthèse des Lituarines

[158] M. Junttila and O. HormiMethanesulfonamide: a Cosolvent and a General Acid Catalyst in Sharpless Asymmetric Dihydroxylations, *J. Org. Chem.* , **2004**, *69*, 4816-4820.

[159] A. Smith *et al*., Diversity-Oriented Synthesis of Polyketide Natural Products via Iterative Chemo- and Stereoselective Functionalization of Polyenoates: Development of a Unified Approach for the C(1−19) Segments of Lituarines A−C, Org. Lett., **2005**, 7, 1, 139-142.

Les essais préliminaires sur la guttiférone A n'ont abouti qu'à la dégradation des produits. Il est possible que l'osmium contenu dans l'Ad mix, soit capable d'oxyder la guttiférone A, puis la xanthone, conduisant à la formation de polymères insolubles. Nous avons choisi d'utiliser comme modèle la molécule **130**, oxy-PPAP, protégé des phénomènes de sur-oxydation du noyau catéchol (**Schéma 38**).

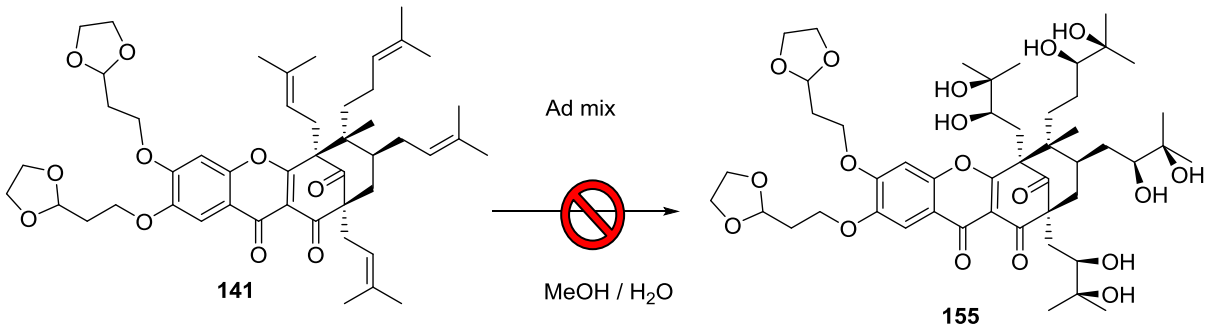


Schéma 38 : Formation de cis-diols à partir de **141**.

Entrée	Pd de départ	Réactif	Solvant	Température	Temps	Résultat
1	1	Ad mix Alpha	MeOH : H_2O	t.a.	2 h	dégradation
2	141	Ad mix Alpha	MeOH : H_2O	t.a.	12 h	pd de départ
3	141	Ad mix Beta	MeOH : H_2O	t.a.	12 h	pd de départ
4	141	$KMnO_4$	CH_2Cl_2	t.a.	12 h	pd de départ

Tableau 28 : Conditions de réaction pour l'obtention du composé **155**

De la même manière que précédemment, les conditions expérimentales mises en œuvres (**Tableau 26,**) ne nous ont pas permis de faire évoluer la réaction afin d'obtenir des produits de di-hydroxylation.

4.2.5. Réactions de coupures oxydantes.

Les réactions d'ozonolyses sont utilisées majoritairement pour oxyder les doubles liaisons aliphatiques[160]. Ces réactions peuvent également être sélectives dans certaines conditions[161], elles sont également avantageuses car elles permettent en fonction des conditions opératoires, d'accéder à différentes fonctions chimiques, à partir de l'ozonide formé, comme illustré **schéma 39**.

[160] R. Criegee, Mechanism of Ozonolysis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1975**, 14, p. 745–752.
[161] G. Bay *et al.*, A Bioinspired Approach to Tri-nor-guaianes. Synthesis of (-)-Clavukerin A, *J. Nat. Prod*. **2006**, 69, 1234-1236.

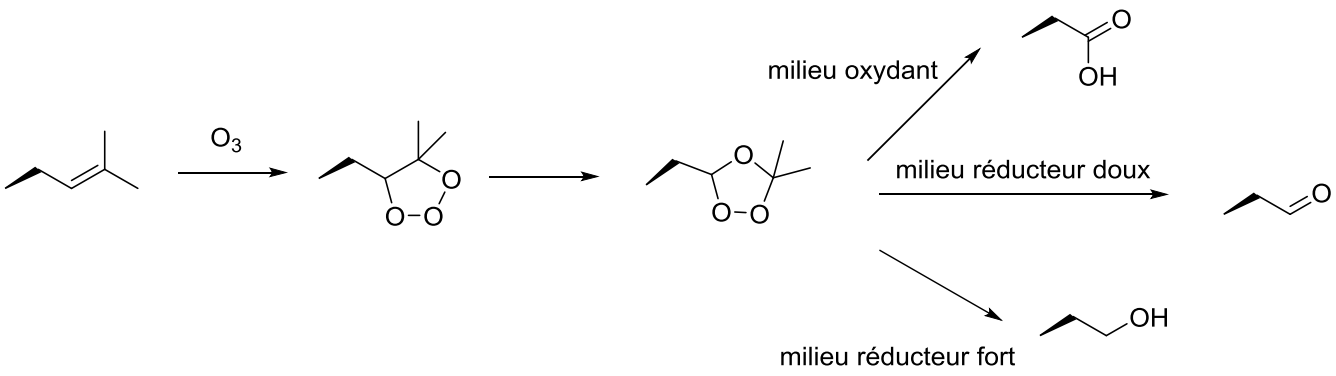


Schéma 39 : Versatilité des réactions d'ozonolyses

Nous pouvons citer en exemple la synthèse de la 24(S)-Hydroxyvitamin D2 par Merckel *et al*.[162] qui ont utilisé une étape d'ozonolyse le composé **156**. Ce dernier est un synthon poly-fonctionalisé possédant une chaîne de structure proche d'une fonction prényle comme illustré **schéma 40**.

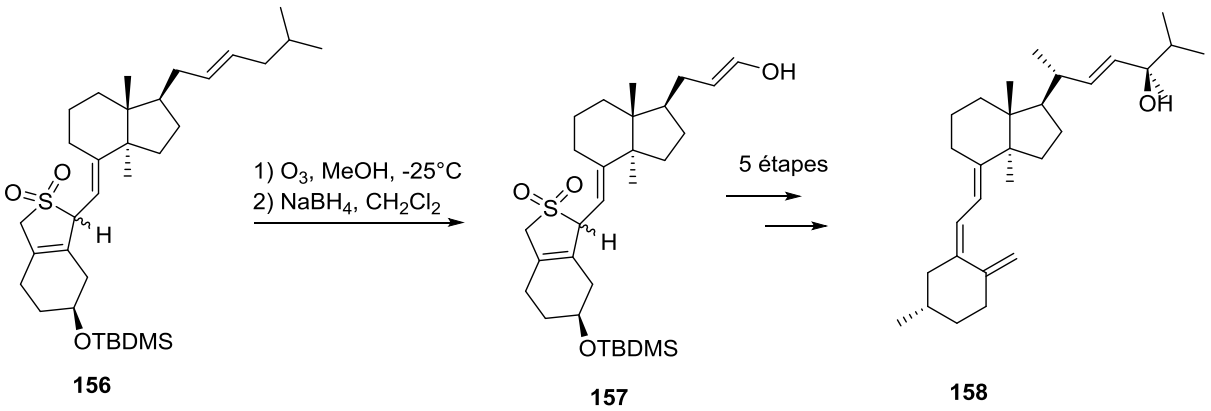


Schéma 40 : ozonolyse dans la synthèse de la 24(S)-Hydroxyvitamine D2

Faute de temps, nous n'avons pas pu essayer de transformer l'ozonide en acide carboxylique. Les résultats des traitements réactionnels provenant de **1** ou **130** (**Schéma 41**), en milieux réducteurs doux et forts, pour l'accès à des aldéhydes ou des alcools respectivement, sont présentés **tableau 29**.

[162] L. Coutts *et al.,* A stereospecific synthesis of 24(S)- hydroxyvitamin D2, a prodrug for 1a,24(S)-dihydroxyvitamin D2 *Org. Process. Res. De*V., **2002**, *6*, 246.

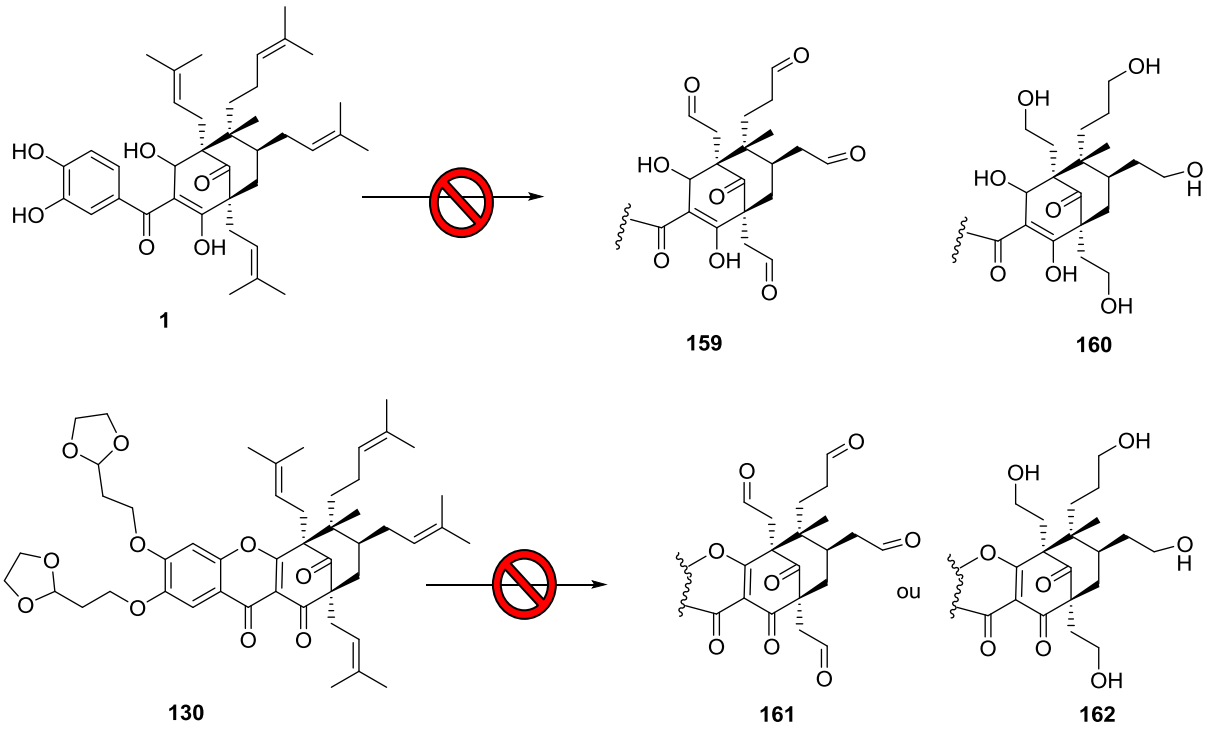


Schéma 41 : Plan d'exploration hémisynthétique concernant les réactions d'ozonolyses

Les reactions d'ozonolyse ont été réalisées avec un générateur BMT 802N réglé à une puissance de 80 V et produisant un flux de mélange O_2/O_3 avec un débit de 50 mL/min. Afin de savoir si cette réaction était terminée, nous avons utilisé le rouge de Soudan[163]. Lors des 3 premiers essais, ce réactif coloré nous a indiqué qu'il fallait plus de 2h pour que l'ozonolyse soit complète (**Tableau 29**, entrées 1 à 3). Ce temps réactionel nous parraissait très long car, en général, ce type de réaction ne dure que quelques dizaines de minutes, tout au plus[164]. Cette observation nous a conduits à suivre l'évolution de la réaction avec des expériences de RMN et de CLHP. Ces contrôles ont montré dans l'expérience **tableau 29**, entrée 4, la guttiférone A était totalement transformée en seulement 5 minutes. Des expériences supplémentaires ont également mis en évidence qu'en 5, 15 ou 30 minutes le profil chromatographique du brut réactionel était identique (**Tableau 29**, entrées 4 à 6). On pourra noter que la spectroscopie RMN à pu mettre en évidence la présence de nombreux composés possédant des fonctions aldéhydes. Malgrés nos efforts, le fractionnment du brut sur C18 n'a pu aboutir à l'isolement de composés purs. Ces résultats nous ont conduits à utiliser 5 minutes comme temps de référence.

Il nous restait ensuite à chercher le réducteur adéquat pour obtenir les dérivés alcooliques et aldéhydiques désirés. Il est possible d'obtenir les fonctions aldéhydes en traitant avec des

[163] C. Lentsche *et al*., Jatrophane Diterpenes: Preparation of the Western Fragment of Pl-3, *Eur. J. Org. Chem*., **2014**, 919–923.
[164] S. Van Ornum *et al*., Ozonolysis Applications in Drug Synthesis, Chem. Rev., **2006**, 106, 2990-3001.

réducteurs dit « doux » comme PPh_3, PMe_3 ou SMe_2 [165]. Par contre, la réduction des ozonides par des donneurs d'hydrures tels que $NaBH_4$ aboutira à la formation des alcools. A titre d'exemple, prenons le cas de l'expérience **tableau 29** entrée 7. La guttiférone A **1** a été dissoute dans le méthanol à -78°C, puis oxydée par un flux d'ozone pendant 5minutes. Ensuite, le traitement par la tri-méthyl phosphine a été effectué. Cette dernière présente l'avantage d'être volatile, et s'évapore lors de l'évaporation du solvant[166]. Des expériences de spectrométries de masse sur le brut réactionnel montrèrent la présence d'ions de valeurs m/z : 577, 551, 525 et 499. Ces derniers sont caractéristiques de la transformation de respectivement un, deux, trois et quatre chaînes prénylées en fonctions aldéhydes. En raison de la probable instabilité de ces intermédiaires, nous avons choisi de les piéger en introduisant, avant purification différentes amines (**Tableau 29**, entrée 10). L'ensemble de ces réactions n'a mené qu'à l'obtention de produits de dégradation.

Entrée	Réactif	Solvant	Temps de flux	Réducteur	Commentaires	Résultat
1	**1**	CH_2Cl_2	5 h	PPh_3	Purification sur Silice	néant
2	**1**	CH_2Cl_2	5 h	PPh_3	Purification sur CCM prep	dégradation
3	**1**	CH_2Cl_2	2 h	PPh_3	HPLC prep puis Amination	dégradation
4	**1**	MeOH	5min	$NaBH_4$	Purification HPLC prep*	mélange complexe
5	**1**	MeOH	15 min	$NaBH_4$	Purification HPLC prep*	mélange complexe
6	**1**	MeOH	30 min	$NaBH_4$	Purification HPLC prep*	mélange complexe
7	**1**	MeOH	5 min	PMe_3	Purification HPLC prep*	mélange complexe
8	**1**	CH_2Cl_2	5 min	PMe_3	Purification HPLC prep**	dégradation
9	**1**	CH_2Cl_2	5 min	Me_2S	Purification HPLC prep*	mélange complexe
10	**1**	MeOH puis THF	5 min	PMe_3	HPLC prep puis Amination (morpholine, di-éthyle amine)	dégradation

* = signaux aldéhydiques observés en RMN

** = ions caractéristiques des aldéhydes observés en SM

Tableau 29 : Conditions expérimentales des expériences d'ozonolyse sur **1**

Afin de réduire la possibilité de sur-oxydation du noyau catéchol des intermédaires, nous avons exploré la réactivité de **130**. L'ozonolyse de ce composé, dans des conditions similaires aux expériences du **tableau 23**, n'a pas pu aboutire à l'isolement de composés possédant des chaines prénylées oxydées

[165] J. Li, *Criegee mechanism of ozonolysis* , Name Reactions. Ed Springer, **2006**, 173–174.

[166] www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/324108

Entrée	Réactif	Solvant	Temps de flux	Réducteur	Commentaires	Résultat
1	**130**	CH_2Cl_2	5 min	non	-	dégradation
2	**130**	CH_2Cl_2	5 min	PMe_3	Purification HPLC prep	Mélange complexe
3	**130**	MeOH	5 min	PMe_3	-	dégradation
4	**130**	MeOH	5 min	$NaBH(OAc)_3$	Purification HPLC prep	Mélange complexe
5	**130**	MeOH	5 min	$NaBH_4$	brut fluo	Mélange complexe

Tableau 30 : Conditions expérimentales des expériences d'ozonolyse sur **130**

En revanche, le traitement par le borohydrure de sodium lors du traitement réducteur du milieu (**Tableau 30,** entrée 5) donna lieu à l'apparition d'une fluorescence intense. Cette fluorescence pourrait provenir de la présence de composés possédant une ou plusieurs conjugaisons supplémentaires. De plus, cette fluorescence n'avait pas été observée en partant de la guttiférone A, dans des conditions expérimentales similaires (**Tableau 29**, entrée 4). N'ayant pas pu isoler les composés responsable de cette fluorescence dans le millieu réactionel, nous avons décidé de réaliser cette réduction au $NaBH_4$ sur un composé cyclisé « modèle » : **75**. Celle-ci a conduit à la formation rapide d'un produit fortement fluorescent (**Schéma 42**). A l'aide de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie RMN, nous avons pu déterminer que le produit obtenu **163,** possédait deux des trois fonctions cétones réduites. Un signal caractéristique d'un proton à 4.63 ppm corrélait avec le carbone de la chaîne aliphatique à 33.76 ppm. La réduction de ces composés pourrait également developper une voie d'accès à de nouveaux analogues.

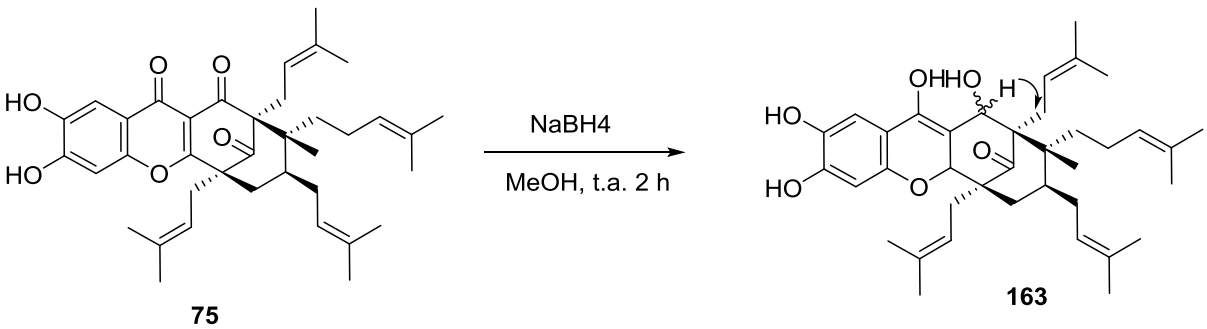


Schéma 42 : Réduction de la 1.16-Oxy-guttiférone A

Les résultats concernant l'ozonolyse ne permettant pas l'hémisynthèse d'analogues avec des chaines prénylées oxydées, nous avons donc étudié la réactivité de la guttiférone vis-à-vis des oxydations allyliques terminales.

4.2.6. Réactions d'oxydation allyliques terminales

Les oxydations allyliques terminales sont généralement conduites par le dioxyde de sélénium. Cette réaction a l'avantage de permettre, grâce à son mécanisme (**Schéma 43**), de synthétiser uniquement le produit cis-hydroxylé[167].

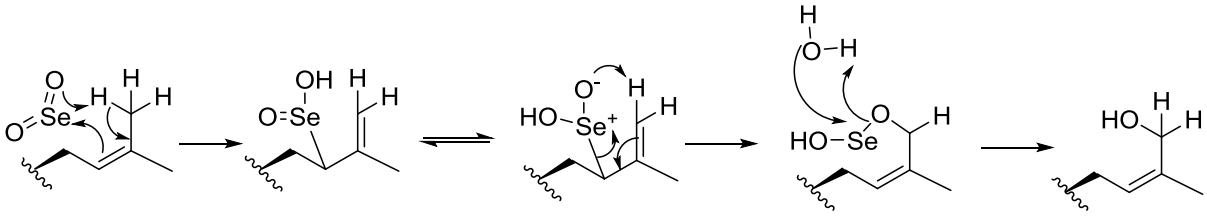


Schéma 43 : Mécanisme d'oxydation allylique terminale par le dioxyde de sélénium

Cette réaction est également largement décrite dans la littérature, nous avons choisi d'ilustré cette réactivité par les travaux de N. Koolaji *et al*., dans leurs études sur la synthèse de cinnamates O-prenylé comme illustré **schéma 44**[168].

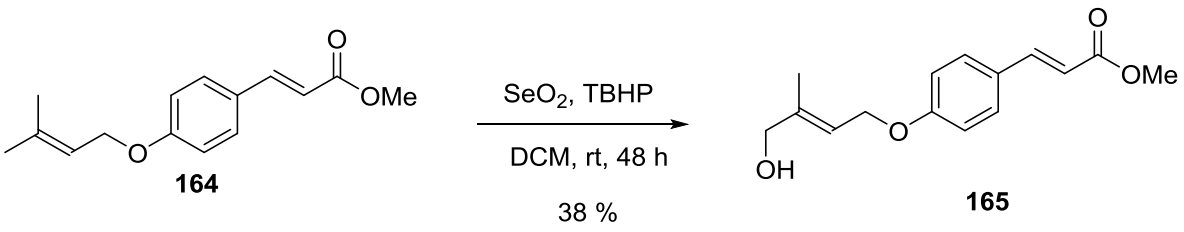


Schéma 44 : Oxydation allylique terminale d'un dérivé de l'acide cinamique

Les essais préliminaires effectués sur la guttiférone A ont montré une dégradation de cette dernière par des phénomènes de sur-oxydation des formes xanthoniques. C'est pourquoi, nous avons donc choisi d'étudier la réactivité de notre composé modèle **130**. Des essais préliminaires ont mis en évidence, grâce aux analyses par CLHP, l'apparition lente de nouveaux composés. Nous avons cherché les conditions expérimentales les plus efficaces pour l'obtention de ces derniers.

[167] U. Bhalerao and H. Rapoport, Stereochemistry of Allylic Oxidation with Selenium Dioxide. Stereospecific Oxidation of gem-Dimethyl Olefins, *Journal of the American Chemical Society, **1971**,* 93, 19, 4835-4840.

[168] N. Koolaji *et al*., Synthesis of C- and O-prenylated tetrahydroxystilbenes and O-prenylated cinnamates and their action towards cancer cells, European Journal of Medicinal Chemistry , 2013, 63, 415-422.

Nous avons tout d'abord réalisé une étude afin de savoir quel était le solvant le plus adapté à cette réaction. Neuf solvants furent testés, à reflux durant deux heures, en présence de 4.4 équivalents de dioxyde de sélénium. Les réactions ainsi effectuées, furent ensuite traitées et analysées par RMN et CLHP comme illustré **figure 71**. L'éthanol s'est montré être le meilleur solvant dans ces conditions, convertissant rapidement l'intégralité du produit de départ. Malgré le fait qu'une quantité importante de produit de dégradation soit apparue, plusieurs produits bien distincts ont également détectés. La présence de plusieurs pics à des tr = 45.6 min, 29.5 min, 21.3 min, 19.0 min et 12.0 min suggéra des réactions d'oxydations successives.

Afin de savoir si une régio-sélectivité était induite, nous avons ensuite étudié l'impact du nombre d'équivalents sur cette réaction (**Figure 72**) en gardant un temps de deux heures comme constante. L'addition d'un seul équivalent de dioxyde de sélénium, a conduit à une faible conversion, mais la formation d'un seul produit de tr = 45.6 min. L'ajout d'équivalents supplémentaires a conduit à une plus grande conversion, toutefois en provoquant la formation de plusieurs autres produits dont les temps de rétention sont 29.5 min, 21.3 min, 19.0 min et 12.0 min. L'ajout de plus de six équivalents a conduit, en revanche à la dégradation du produit. Ces résultats seraient en faveur de notre hypothèse de régio-sélectivité d'une chaine prénylées.

Les produits majoritaires de cette réaction furent ensuite isolés par HPLC préparative (**Tableau 28**). Nous avons porté une attention plus particulière au composé **166** correspondant à un *m/z* de 839.4346 obtenu pur au pic ayant un temps de rétention de 45.6min. Cette masse nous permis de conclure sur la présence d'une seule hydroxylation. La position de cette hydroxylation a été identifiée grâce les données spectroscopiques de RMN (**Schéma 52**).

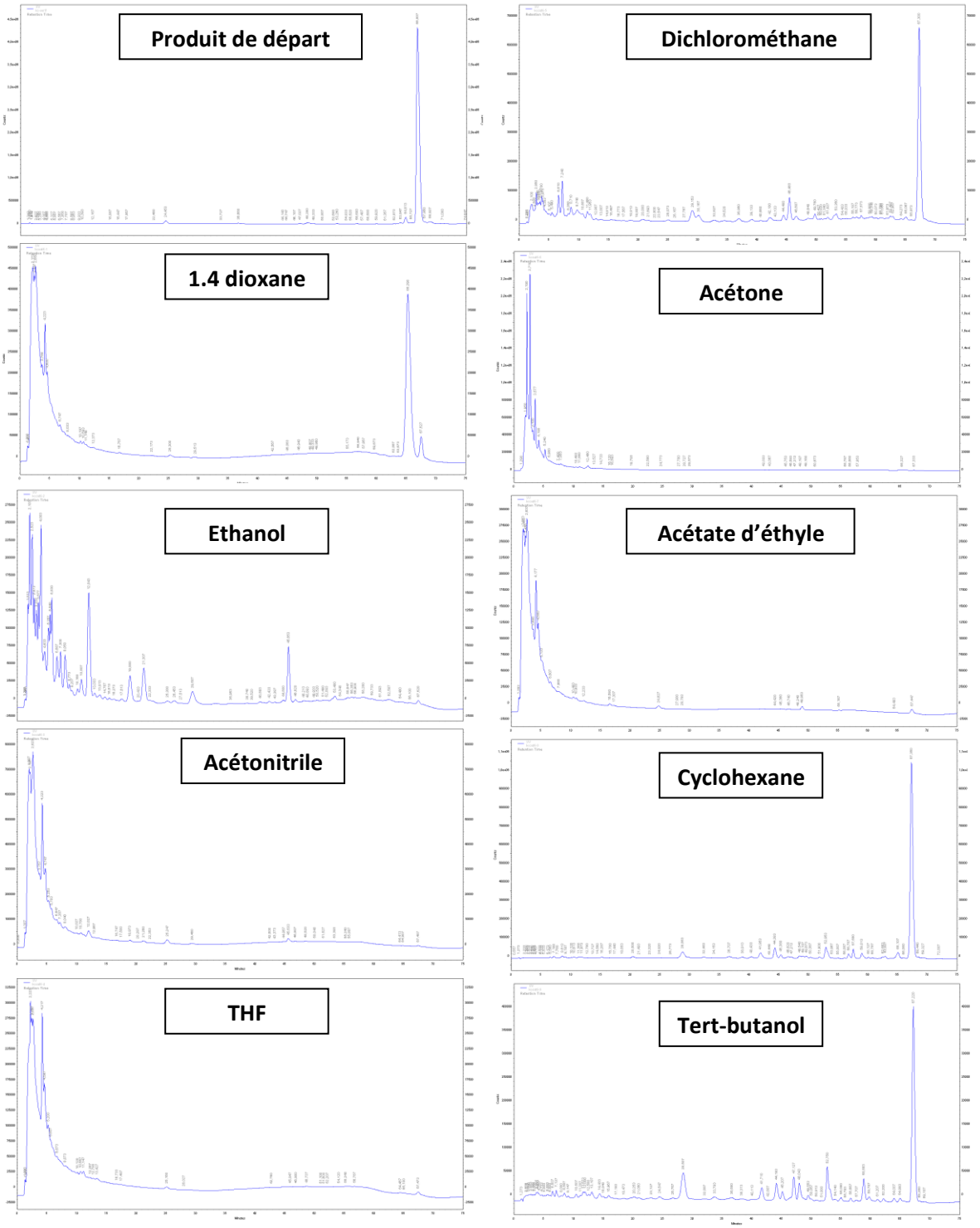


Figure 71 : Impact du solvant sur l'oxydation allylique terminale

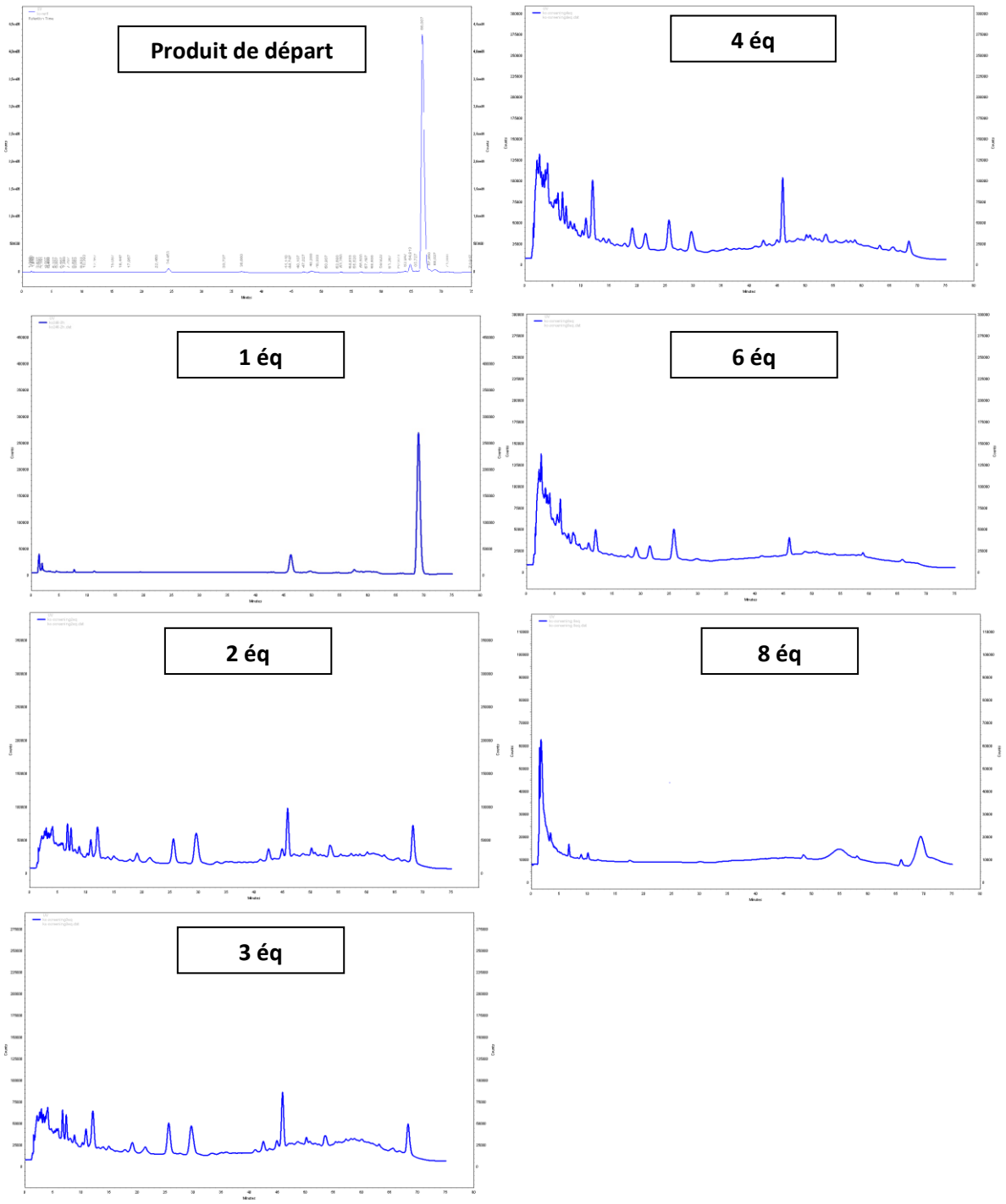


Figure 72 : Impact du nombre d'équivalents sur la réaction d'oxydation allylique terminale

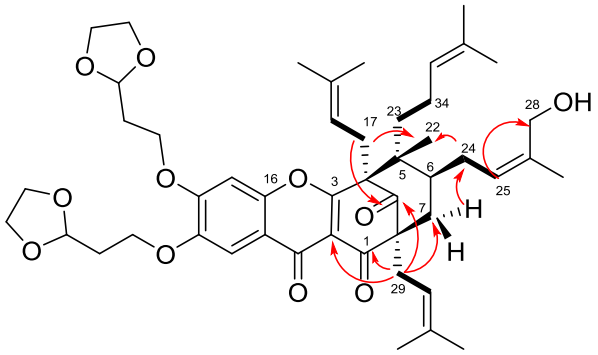


Schéma 52 : Corrélations HMBC et COSY clés pour l'identification de la position d'hydroxylation de **166**

Les protons situées sur les chaînes en C4 et C8 sont facilement reconnaissables de grâce à leurs corrélations avec le C-9 (H-17/ C-9 et H-29/C-9 à 2.99 et 2.54 ppm respectivement. Les corrélations HMBC avec le H-7 restent ici, clées pour la détermination de la structure. En effet, H-7b/C-1 (192.95 ppm), H-7a/C-24 (34.04 ppm) et H-7/C-5 (50.36 ppm) permettent de placer certains éléments du bicycle.Les corrélations croisées H-7-/C-24, H-24/C-22 (17.03 ppm), H-24/H-25 (20.05/5.42 ppm) et H-25/C-28 (3.95ppm) permettent d'attribuer la position d'hydroxylation à la chaîne prénylée en C6

Du fait des similarités électroniques de ces chaînes prénylées, la possibilité d'observer une séléctivité vis-à-vis de ces dernières était faible. Toutefois, l'obtention du composé **166**, composé mono hydroxylé, intermédiaire vers la synthèse d'analogues de troisième génération, nous a incités à optimiser cette synthèse. L'augmentation du temps de réaction jusqu'à 12h nous a permis d'augmenter la conversion de **130** jusqu'à 45 % environ pour obtenir **160** avec un rendement, après isolement par CLHP de 37 %. (**Schéma 45**). Les temps de réaction supérieurs à 12h ont conduit à une dégradation du produit.

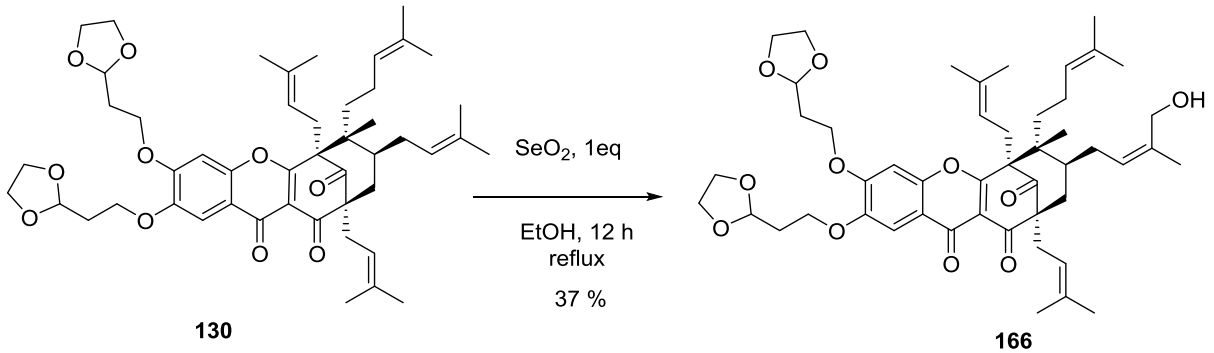


Schéma 45 : Synthèse de **160**, intermédiaire vers la 3ème génération d'analogues

Concernant les composés **167** à **172,** il serait particulièrement interréssant d'effectuer des expériences afin d'identifier les positions des oxydations observées. Faute de temps ces dernières ne seront pas exposées dans ce manuscrit.

Les résultats obtenus lors de l'oxydation de **130**, soit 45% de conversion en 160 en présence d'un seul équivalent de dioxyde de sélénium sont en faveur d'une régio selectivité de la chaine prénylée en C-6. En effet, à partir de 2 équivalents de nombreux autres produits d'oxydation sont apparus. Ces résultats démontrent en revanche le manque de sélectivité du deuxième équivalent de dioxide de sélénium. Nous avons à partir des temps de rétention et des *m/z* des produits proposés des structures (**Tableau 28**). Il est important de noter qu'en l'absence de plus d'analyses de RMN, ces structures ne sont que des hypothèses.

Notre but étant d'obtenir des analogues de troisième génération plus hydrosolubles et possédant un meilleur IS sur nos cibles parasitaires. Nous avons envisagé de synthétiser les composés tels que **173** et **174** (**Schéma 46**). Ces derniers portent des groupements piperidine ou morpholine à leurs extrémités.

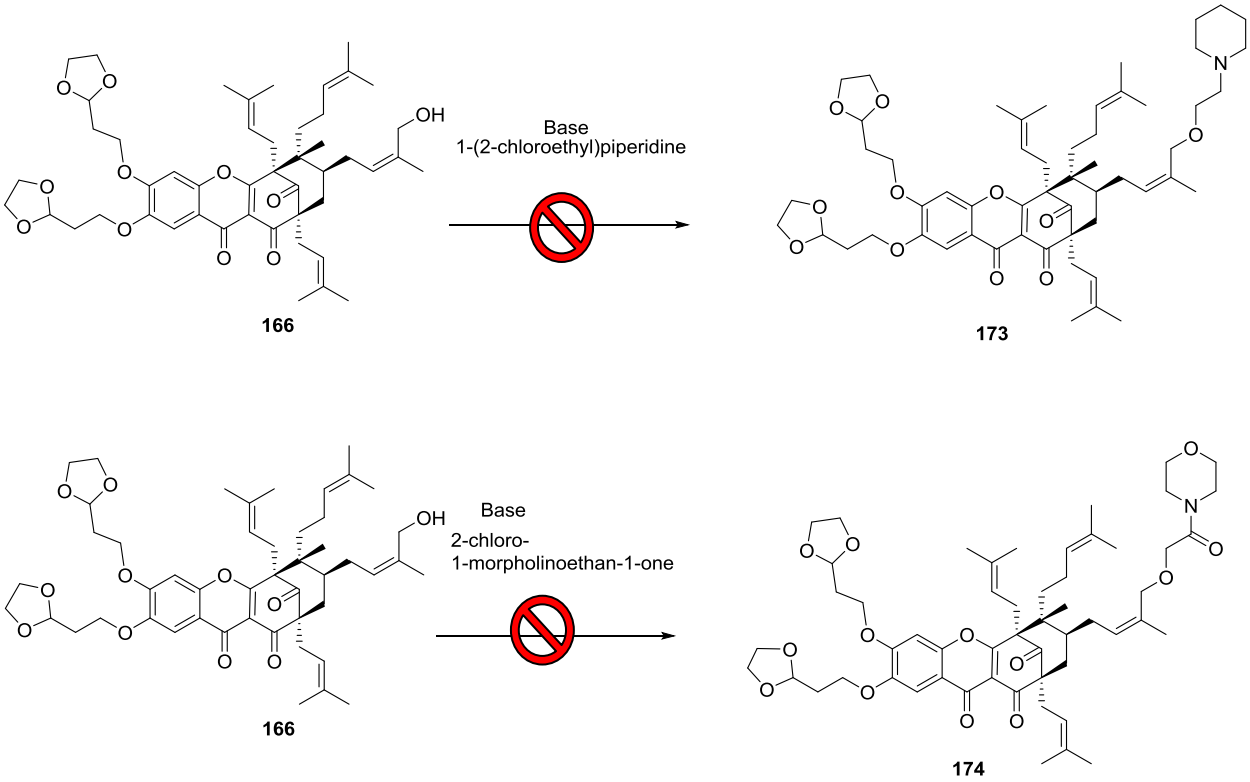


Schéma 46 : Plan de synthèse en vue d'obtenir des analogues de troisième génération.

A ce jour, l'utilisation du carbonate de césium et de l'hydrure de sodium n'ont pas permis d'obtenir ces composés. La recherche de conditions adéquates permettant de synthétiser ces analogues de troisième génération est en cours dans notre laboratoire.

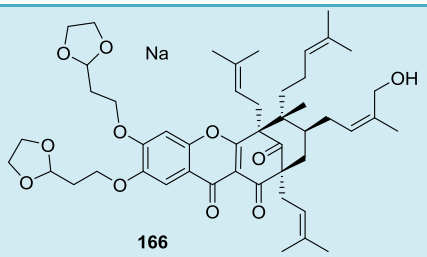
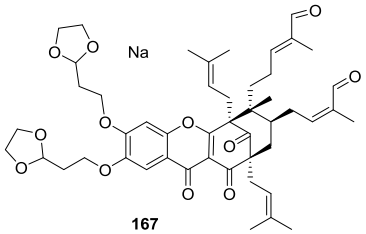
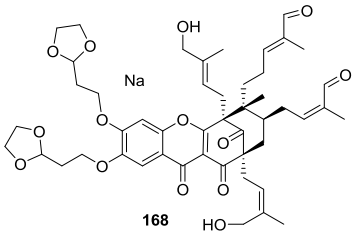
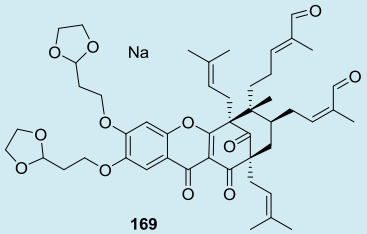
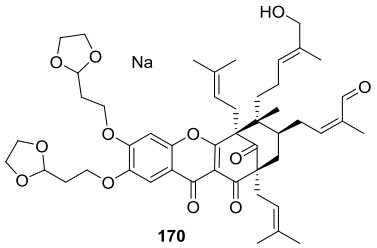
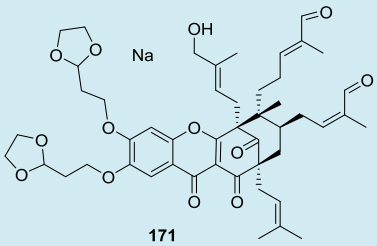
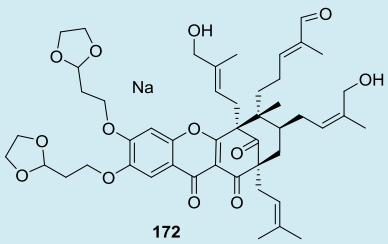
Entrée	T.r. (en min)	*m/z* observé(s)	Composés
1	45.6	839.4344	 **166** Exact Mass: 839.4346
2	29.5	839.4337 + 851.3997 + 883.4597	 **167** Exact Mass: 851.3982  **168** Exact Mass: 883.3881
3	21	851.3955	 **169** Exact Mass: 851.3982
4	19	853.4112	 **170** Exact Mass: 853.4139
5	12	867.3915 + 869.4171	 **171** Exact Mass: 867.3932  **172** Exact Mass: 869.4088

Tableau 28 : Produits d'oxydation allylique terminale

En conclusion, nous avons donc mis au point une méthode permettant d'accéder un composés oxydé : 166. Ce composé a été synthétisé *via* une oxydation allylique terminale, réalisée par le dioxyde de sélénium. L'étude de la réactivité de cette réaction a permis de mettre en évidence la régio-sélectivité de la chaîne prénylées en C6. Ce composé, servira de châssis moléculaire pour accéder à une troisième génération d'analogues, plus hydro-solubles. Cette avancée n'est toutefois pas forcément gage d'un gain d'activité. Par conséquent, afin d'orienter plus efficacement nos modulations, nous avons entrepris d'identifier les cibles pharmacologiques parasitaires de nos molécules.

CHAPITRE 5 : RECHERCHE DES CIBLES PROTÉIQUES PARASITAIRES

Introduction

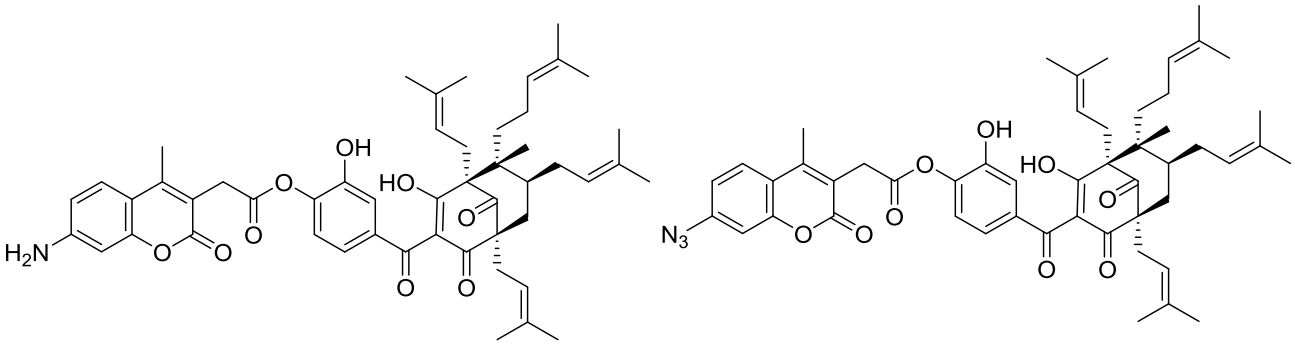
Au cours des parties précédentes, nous avons mis au point des méthodes permettant diverses modulations sur les fonctions phénols, le cœur benzophénone et les chaînes prénylées de la guttiférone A. Ces modulations ont permis d'augmenter l'activité sur nos cibles parasitaires : *P. falciparum* et *T. brucei* jusqu'à 0.56 et 0.07 µM respectivement. Toutefois, nous ne disposions pas d'informations rationnelles reliant modulations et activités biologiques. **Afin de pouvoir orienter nos futures modulations, nous avons voulu identifier une ou plusieurs cibles pharmacologiques parasitaires. Pour cela nous avons mis en place une stratégie basée sur des sondes moléculaires fluorescentes (Figure 73)**.

Des sondes basées sur l'assemblage de la guttiférone et d'une coumarine furent alors choisies. Ce fluorophore fait partie des groupements fluorescents les plus petits ; de ce fait, ils modifient moins la physico-chimie de la molécule. Plus particulièrement, les 7-amino coumarines sont extrêmement fluorescentes car elles possèdent un groupement électro-attracteur (carbonyle) et un groupement électro-donneur (amino). La combinaison de ces derniers induit un transfert de charge augmentant ainsi le rendement quantique. Leurs caractéristiques spectrales sont proches de ceux du DAPI : une longueur d'onde d'excitation vers 355 nm et une émission entre 410 et 590 nm [169]

Notre stratégie fut d'utiliser deux sondes fluorescentes, complémentaires. Une première dite « d'imagerie directe » (**175**) nous as permis de visualiser la répartition de nos molécules dans un parasite vivant. Ces informations peuvent éventuellement orienter les futures recherches vers un stade particulier de l'évolution du parasite, un organite spécifique du parasite ou une combinaison de ceux-ci. Le nombre de cibles potentielles étant très élevé, pouvoir nous focaliser sur un nombre plus restreint permet une plus grande sensibilité pour la détection.

La seconde dite « de protéomique » a pour but d'identifier une protéine responsable d'une partie de l'activité (**176**). Pour cela cette sonde a été réalisée pour se lier à une protéine proche et devenir fluorescente. En effet, une fois en contact avec un protéome, celle-ci devrait se lier de façon non covalente avec les protéines pour lesquelles les constantes d'affinité sont les plus fortes. Dans un second temps, une réaction photochimique induit la création d'une liaison covalente entre la sonde et la cible protéique. Le complexe ainsi généré devenant fluorescent et devient alors détectable, par des techniques appropriées (**Schéma 47**).

[169] C. Geoffroy-Chapotot, Élaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt biologique, et imagerie par microscopie optique en champ proche, *thèse de doctorat*, **1998**.



175 **176**

Figure 73 : Sondes pour la recherche de cibles protéique de la guttiférone A

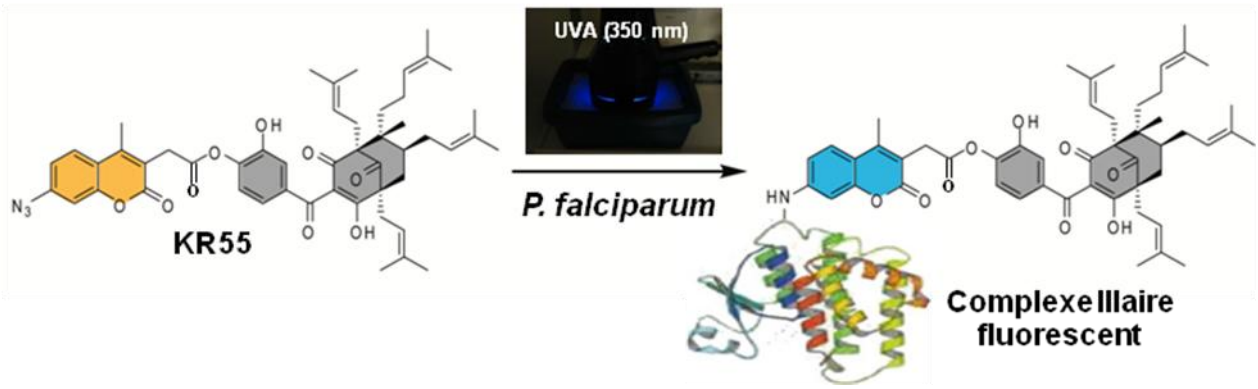


Schéma 47 : Principe de fonctionnement de la sonde « protéomique» **176**

Possédant des collaborations avec le Dr Romain Duval de l'UMR MERIT (Mères et Enfants faces aux Infections Tropicales) et avec le Pr. Philipe Grellier, tous deux spécialisés dans l'étude du Plasmodium, nous avons choisi de rechercher les cibles pharmacologiques de ce dernier.

Partie 1 : Etude par une sonde fluorescente d'imagerie « directe ».

Dans un premier temps, nous avons orienté notre recherche vers la réalisation d'une sonde fluorescente d'imagerie. Celle-ci avait pour objectif de nous permettre d'observer par microscopie si notre guttiférone A, ciblait plus spécifiquement certain stades de développement ou certain organites. Pour cela, nous avons réalisé la synthèse de cette sonde intrinsèquement fluorescente et l'avons mis en contact avec un frottis sanguin infecté par *P. falciparum*.

La synthèse de cette sonde fut entreprise dans des conditions d'acylation classique (**Schéma 48**) pour obtenir cette sonde avec un rendement modeste de 42%.

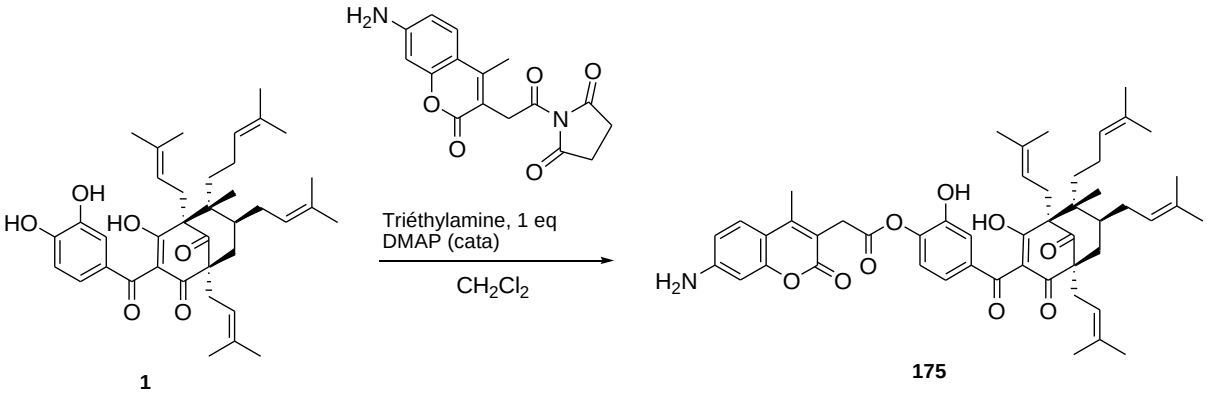


Schéma 48 : Synthèse de **165**, sonde intrinsèquement fluorescente pour l'imagerie direct

Le composé **175**, fut incubé 20 minutes à température ambiante dans un frottis sanguin infecté par *P. falciparum*. Nous avons tout d'abord essayé d'irradier à plusieurs longueurs d'ondes, afin de déterminer la plus appropriée à notre sonde (**Figure 74**). Comme supposé, la fenêtre d'irradiation entre 340 et 360 nm se révèle être la plus sélective. En effet, le rapport d'intensité de fluorescence entre les cellules infectées et les cellules saine fut de1,7.

Quelques photographies de différents stades de développement du parasite sont illustrées (**Figure 75 à 78**). Le stade trophozoite jeune, appelés aussi « ring » se reconnait à la forme circulaire des parasites, ces derniers sont également les plus petits. Le stade plus âgé est lui reconnaissable par sa forme dite : « en raquette », où les parasites représentent en général 25 % de la cellule infectée. Le stade gamétocyte est quant à lui reconnaissable de part sa forme en banane et la présence de pigments palustres. Le parasite est devenu si grand qu'il repousse les parois de l'hématie, jusqu'à éclatement.

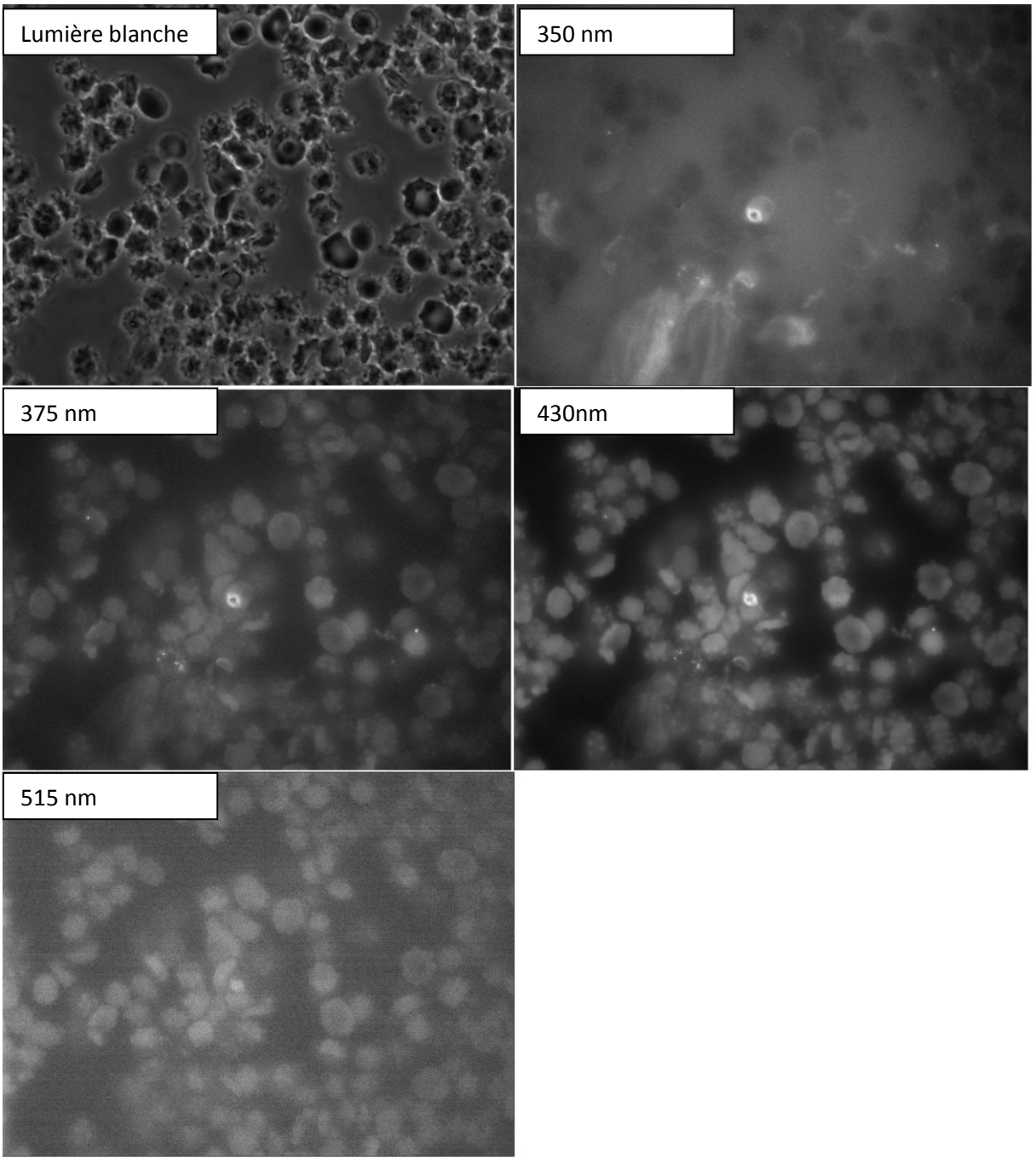


Figure 74 : Irradiation à différentes longueurs d'ondes de frottis sanguins infectés (P falciparum de stade trophozoite âgé) en présence de 50 uM de sonde **175**

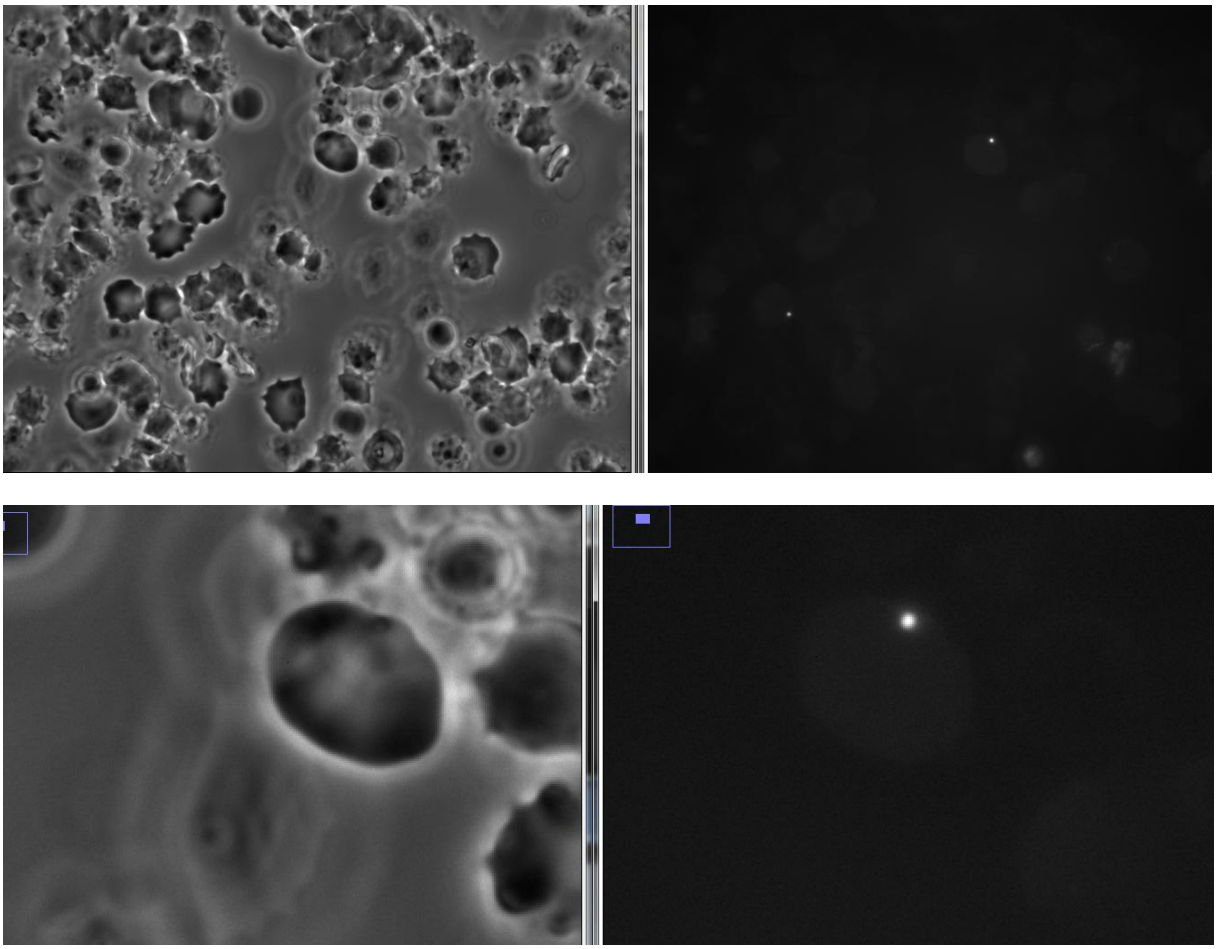


Figure 75 : Stade trophozoite jeune (ring)

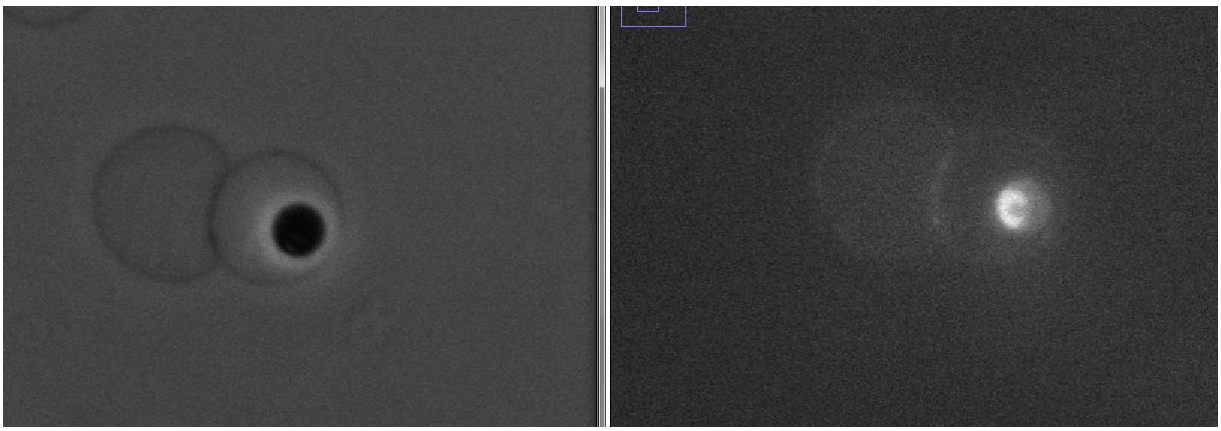


Figure 76 : Stade trophozoite âgé

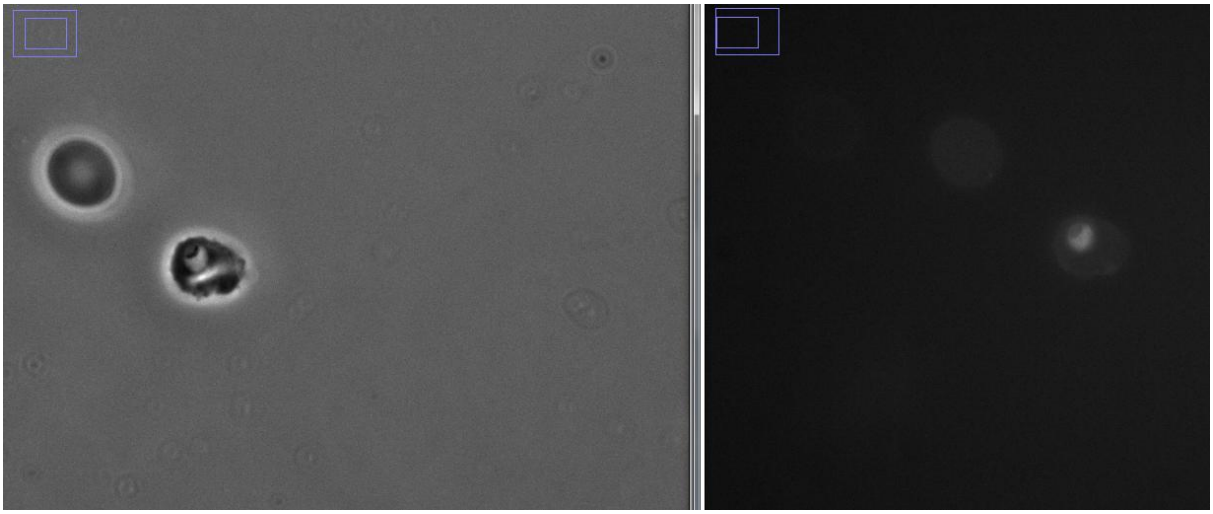


Figure 77 : Stade trophozoite âgé

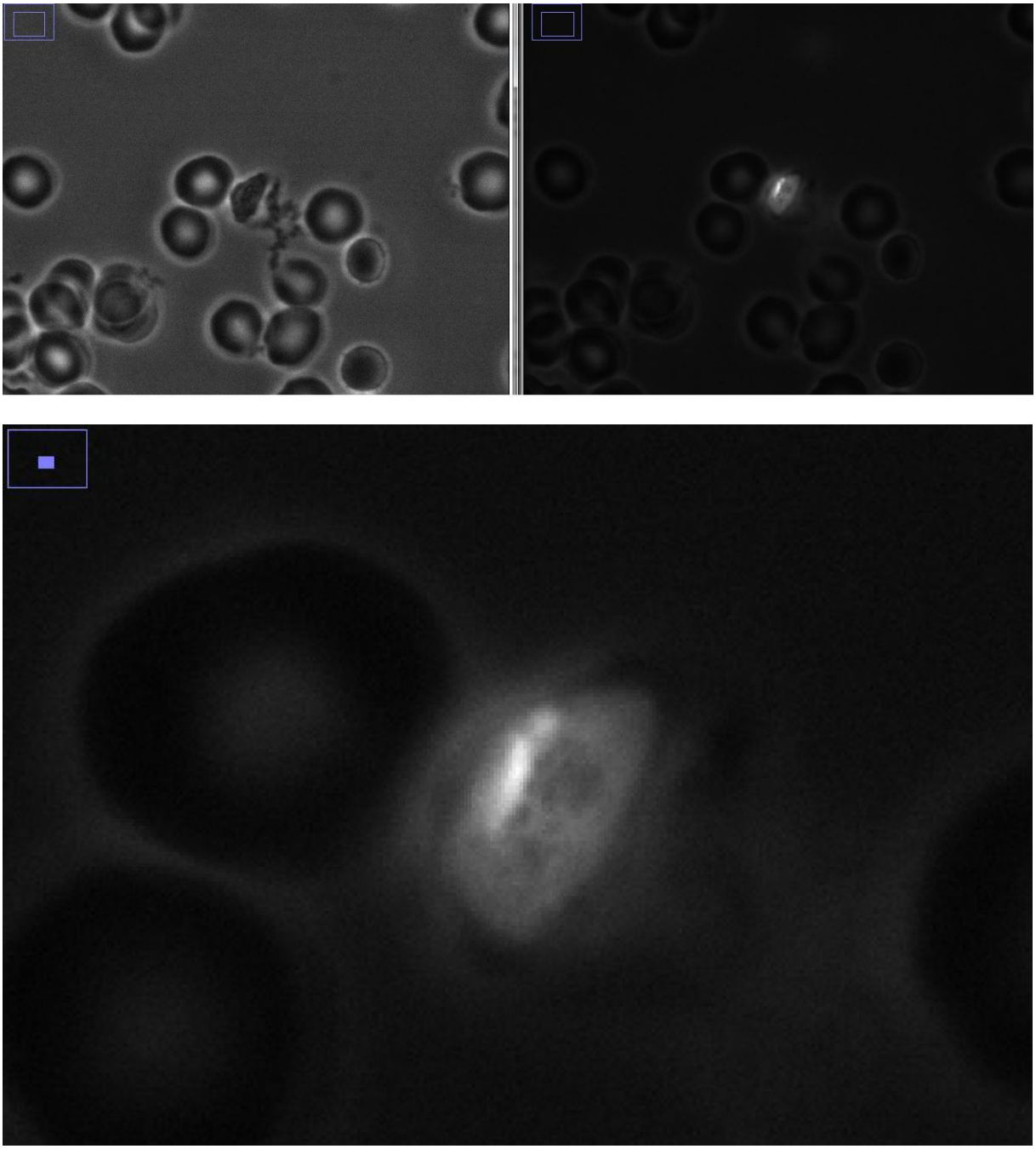


Figure 78 : Stade gamétocyte

A l'œil nu, on distingue aisément des zones plus intenses que d'autres au sein du parasite. Cependant, la sensibilité et la résolution ne semble pas suffisante pour conclure sur une spécificité particulière.

Des expériences supplémentaires sur des souches munies d'un traceur de type GFP sur la paroi de la vacuole digestive, en présence de traceurs mitochondriaux (mitoRED) sont prévues. Les différences de caractéristiques spectrales entre les fluorophores de notre sonde ainsi que des deux traceurs, nous permettrons éventuellement de mettre en évidence ou d'exclure ces organites comme cible potentielle.

Nous devons également traiter ces images, afin de retirer l'auto-fluorescence des parasites ainsi que des cristaux d'hémozoïnes comme illustré (**Figure 79**)

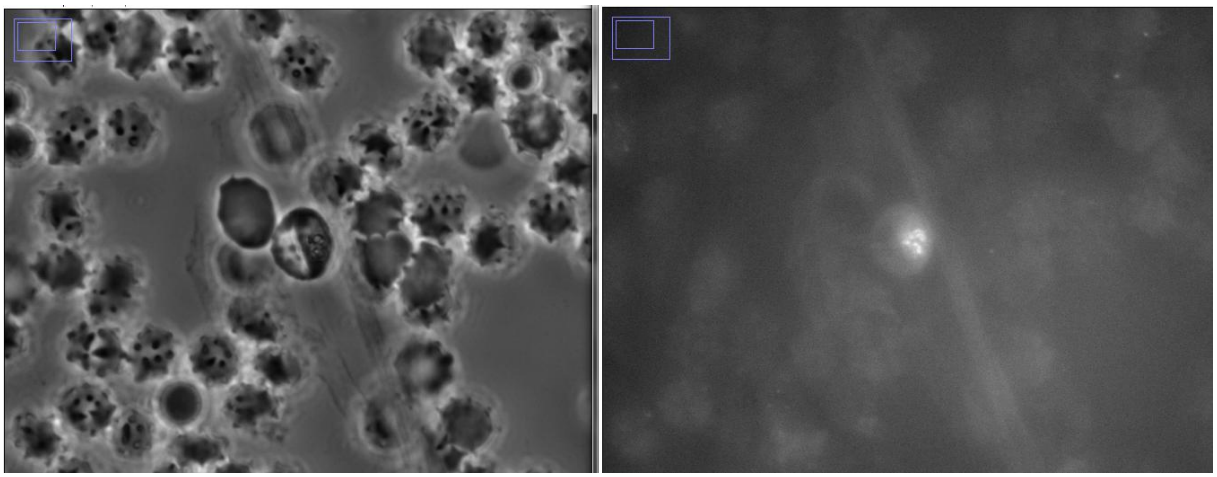


Figure 79 : Contrôle d'auto-fluorescence des cristaux d'hémozoïne

Partie 2 : Etude par une sonde fluorescente protéomique

Afin de pouvoir détecter efficacement les cibles protéiques de la guttiférone A, nous devions utiliser une sonde photoactivable. Cette dernière en présence d'UV doit être capable de se lier avec sa cible protéique de façon covalente et émettre de la fluorescence. Nous avons choisi d'utiliser des azidocoumarines (AZC) décrites par Chen en 1998[170].

Le principe de cette réaction de couplage est dirigé par la réactivité de cette AZC. Sous l'action des UV-A la fonction azido de l'étiquette se transforme en nitrène (**Schéma 49**)[171], espèce extrêmement réactive capable de s'insérer dans des liaisons CH comme celles des acides aminés des protéines environnantes[172].

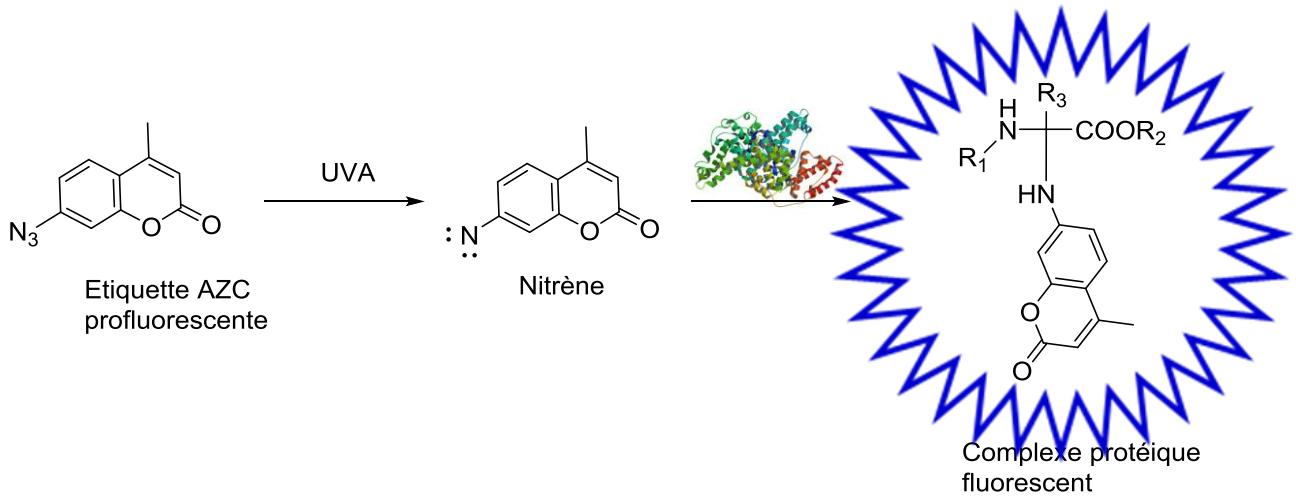


Schéma 49 : Photoactivation et insertion CH de l'étiquette AZC

Afin de prouver ce principe, nous avons d'abord observé si cette AZC pouvait se lier efficacement à une protéine contrôle et émettre de la fluorescence. Pour cela nous avons réalisé des gammes croissantes de cette étiquette en présence de BSA (Albumine de Serum Bovin), une protéine témoin. Afin de connaitre la concentration optimum de protéine dans le milieu pour une concentration donnée d'étiquette, nous avons également réalisé une gamme de concentration de BSA en gardant une concentration d'étiquette fixe. Après s'être

[170] G. Chen *et al.,* Photoaffinity labeling probe for the substrate binding site of human phenol sulfotransferase (SULT1A1): 7-azido-4-methylcoumarin, *Prot. Sci*.,, **1999,** *8*, 2151-2157.

[171] V. Voskresenska *et al*., Photoaffinity Labeling via Nitrenium Ion Chemistry: Protonation of the Nitrene Derived from a 4-Amino-3-nitrophenylazide to Afford Reactive Nitrenium Ion Pairs., *J Am Chem Soc*., **2009**, 19; 131,32, 11535–11547.

[172] G. Smolinsky and B. Feuer, Nitrene Insertion into a C-H Bond at an Asymmetric Carbon Atom with Retention of Optical Activity. Thermally Generated Nitrenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86* ,15, 3085–3088.

assuré que ni la BSA ni l'AZC n'émettait de fluorescence de façon concentration dépendante nous avons irradié notre mélange. Cette irradiation aux UV-A (360 nm) durant 40 minutes dans un bain glacé à conduit à l'augmentation de la fluorescence (435 nm) (**Figure 80 et 81**).

Cette expérience nous a permis de mettre en évidence que le maximum de fluorescence est atteint entre 10 et 20 minutes, ainsi pour les manipulations qui ont suivi nous n'avons pas irradié plus de 20 minutes. Une concentration croissante d'étiquette augmente bien l'intensité de fluorescence de façon linéaire, nous indiquant le bon déroulement de la réaction (**Figure 80**). Dans ces conditions, la quantité de BSA n'a que peu influencé sur l'intensité de fluorescence reçue.

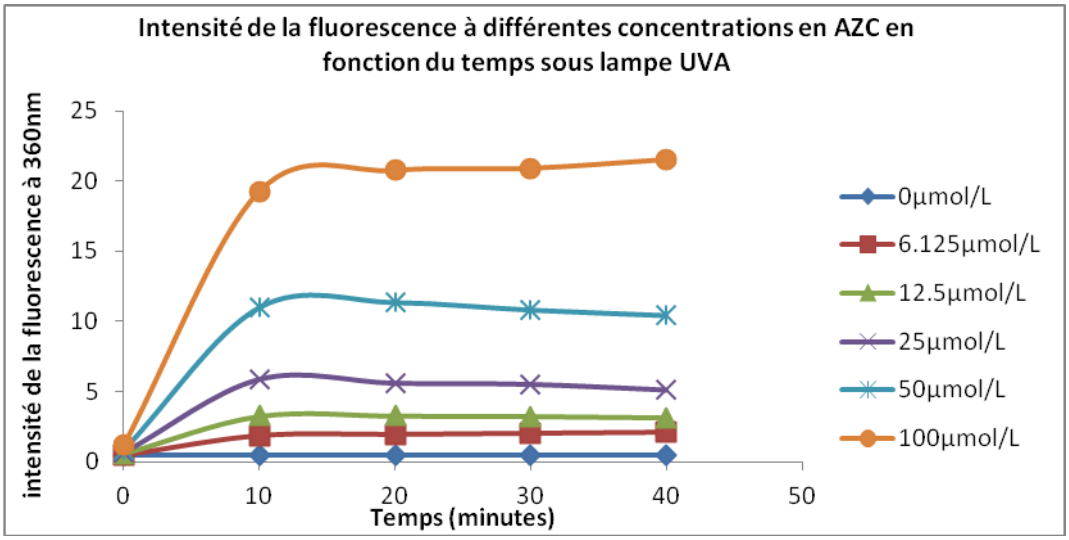


Figure 80 : Gamme de concentrations d'étiquettes AZC

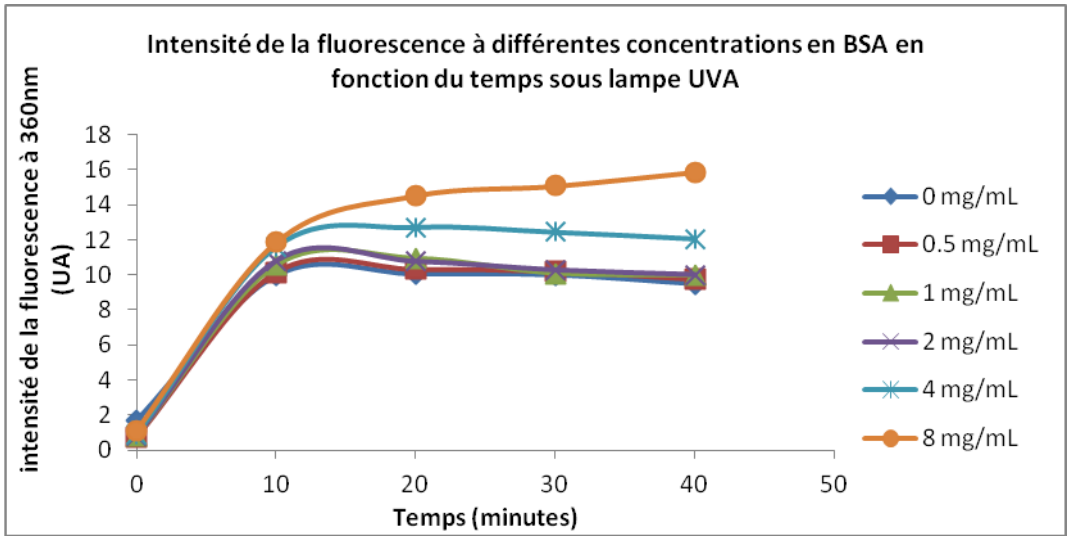


Figure 81 : Gamme de concentrations de BSA

Afin de s'assurer que l'apparition de l'espèce fluorescente était bien reliée à la formation du complexe protéique, nous avons fait migrer sur un gel d'acrylamide les expériences ainsi

réalisées. Le gel obtenu est visualisé sur lumière UV afin de percevoir la fluorescence avant une révélation au bleu de Coomassie (**Figure 82**). L'augmentation de l'intensité de la fluorescence de la BSA fut corrélée avec la concentration de l'étiquette AZC, suggérant ainsi le marquage attendu. La révélation par le bleu de Coomassie nous indiqua bien que la quantité de BSA fut égale dans chaque puit.

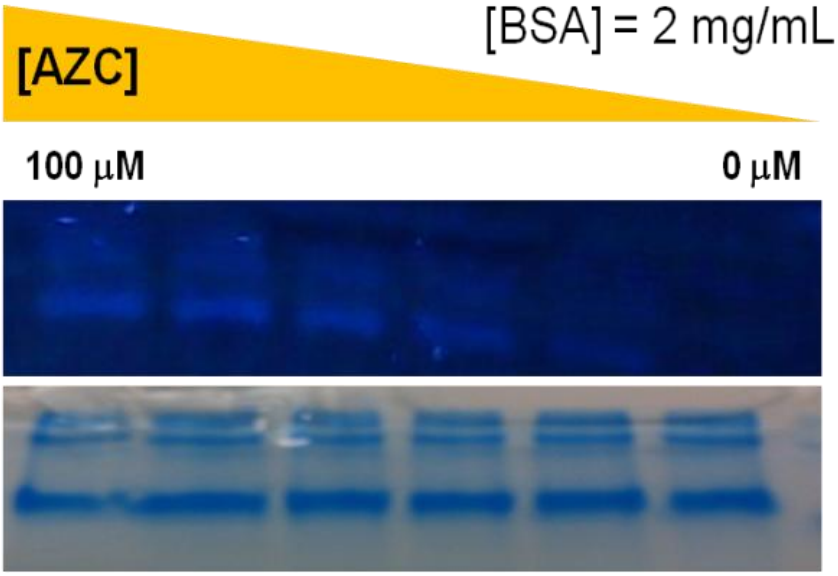


Figure 82 : Visualisation sous lumière UV et en présence de bleu de Coomassie des gels d'éléctrophorèse de BSA marqués

L'étude de ces données nous ont alors suggérés de synthétiser une sonde sur laquelle, la guttiférone A serait couplée avec l'étiquette AZC. Cette dernière fut synthétisée par acylation dans des conditions similaires à la sonde d'imagerie directe comme illustré (**Schéma 50**)

L'IC_{50} de cette molécule fut déterminée à 5.1 µM contre *P. falciparum*. Cette valeur, proche de celle de la guttiférone A sans étiquette, suppose que **176** est un bon reflet de l'activité de la guttiférone A.

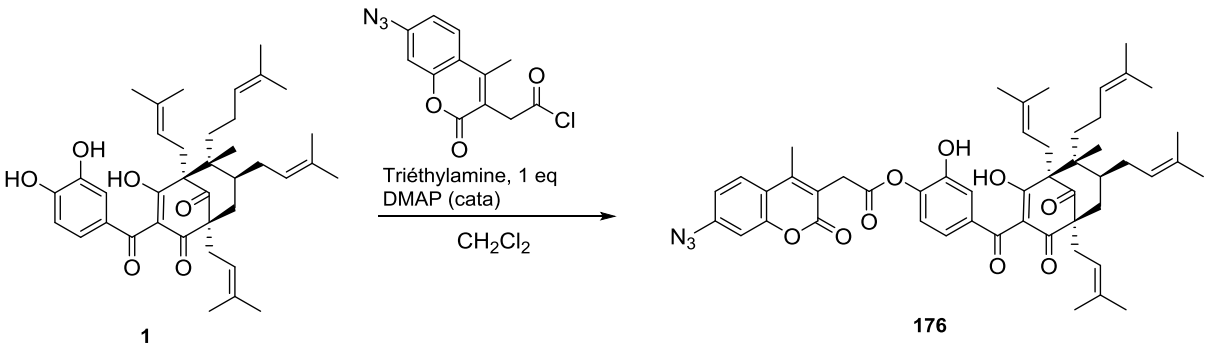


Schéma 50 : Synthèse de la sonde photoactivable **176**

Afin de vérifier si les concentrations et les affinités des protéines du parasite seront suffisantes pour le marquage fluorescent, nous avons voulu réaliser des expériences d'imagerie. La visualisation de zones fluorescentes à l'intérieur du parasite nous indiqua que le marquage fut effectué.

Après incubation de **176** dans un frottis sanguin infecté par *P.falciparum*, le mélange est ensuite irradié, dans un bain de glace, avec des UV-A durant 20 minutes. Nous avons effectué un premier contrôle négatif sur des parasites non marqués et non irradiés. (**Figure 83**). Puis, un second contrôle négatif en présence de la sonde sans photo-activation est ensuite réalisé. (**Figure 84**). Dans ce cas, une légère auto-fluorescence de la sonde fut observée au sein de *P. falciparum.* Enfin, en présence de sonde et d'irradiations, (**Figure 85**) nous avons observé au sein du parasite, une fluorescence bien supérieure à celle auto générée (**Figure 76**). Ces données confirment notre hypothèse de la formation des complexes protéiques composés de sondes et de protéines palustres. La guttiférone A possède également une fluorescence faible, mais non nulle. Dans le but de nous assurer que cette fluorescence provienne bien de notre sonde et non du noyau guttiférone, une expérience de compétition, par déplacement a été mise en place. Vingt fois plus de guttiférone A sont introduit dans un milieu similaire qui fut observé après irradiation (**Figure 83**). Cette expérience révèle qu'une fois la sonde remplacée par la guttiférone A, cette dernière n'émet que peu de fluorescence, confirmant alors les résultats de marquage mis en évidence au préalable (**Figure 84**).

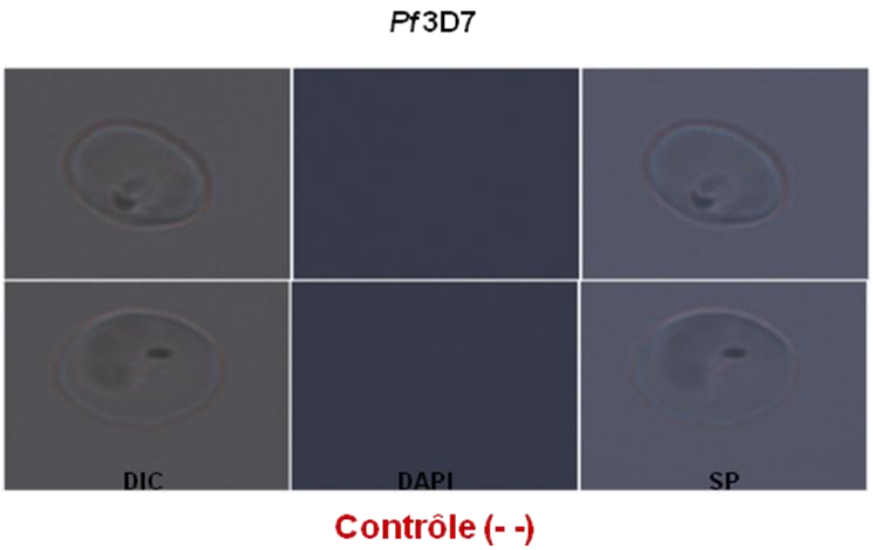


Figure 83 : Contrôle négatif de fluorescence sur *P.falciparum*

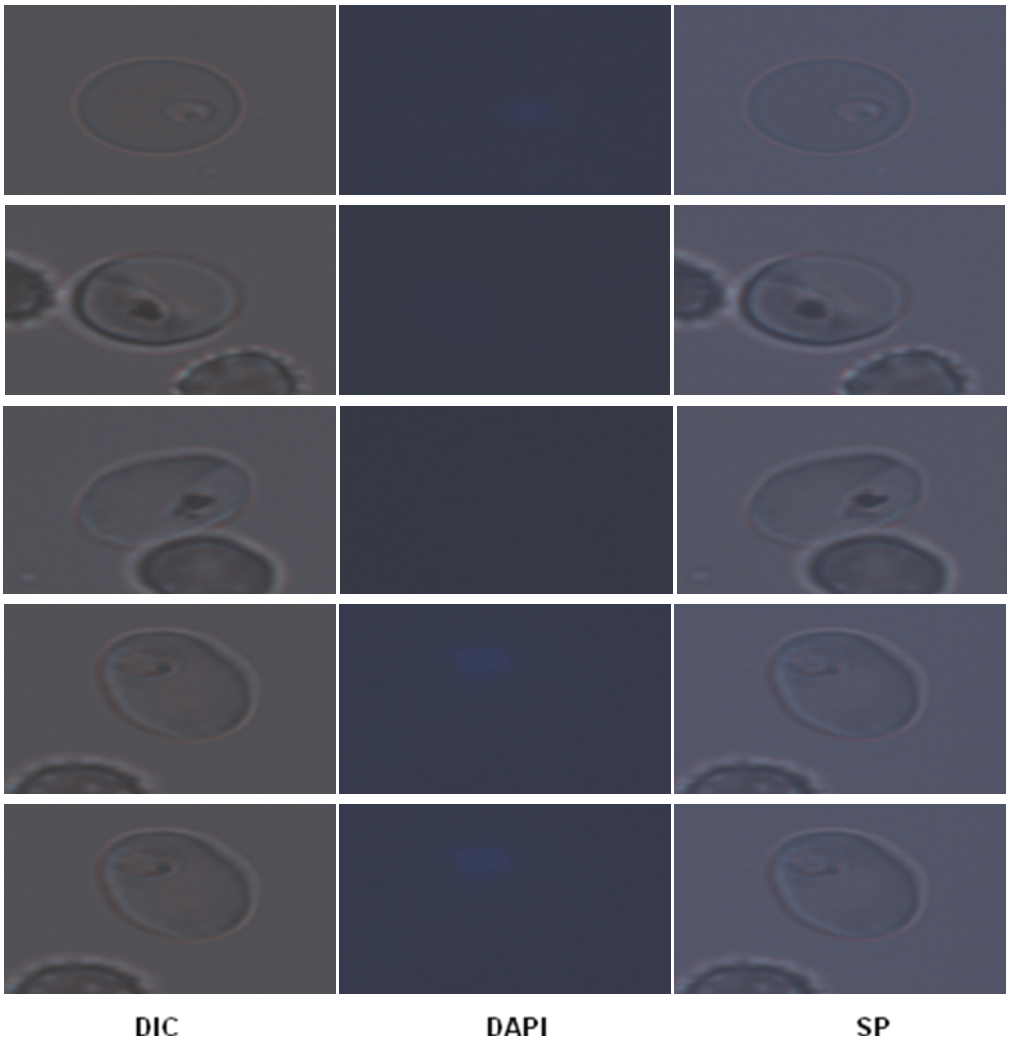


Figure 84 : Contrôle négatif de fluorescence sur *P.falciparum* en présence de sonde non irradiée

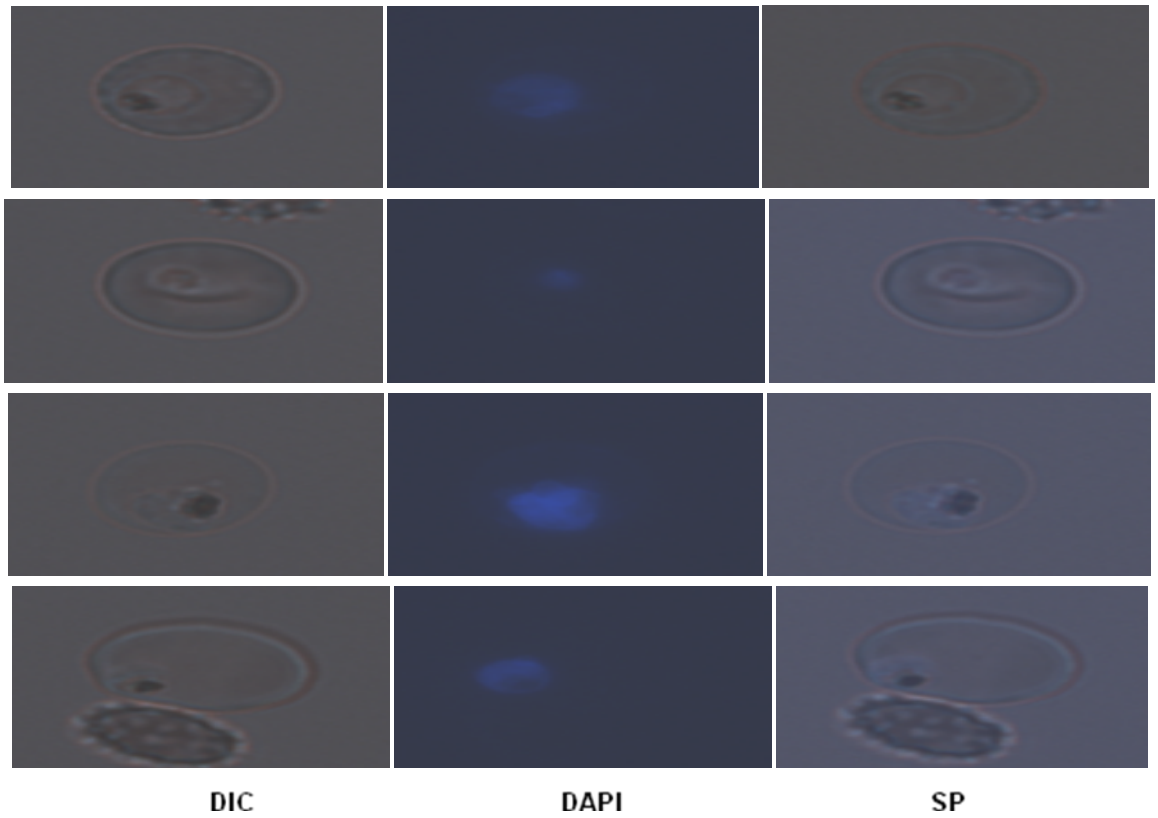


Figure 85 : Contrôle de fluorescence sur *P.falciparum* en présence de sonde irradiée

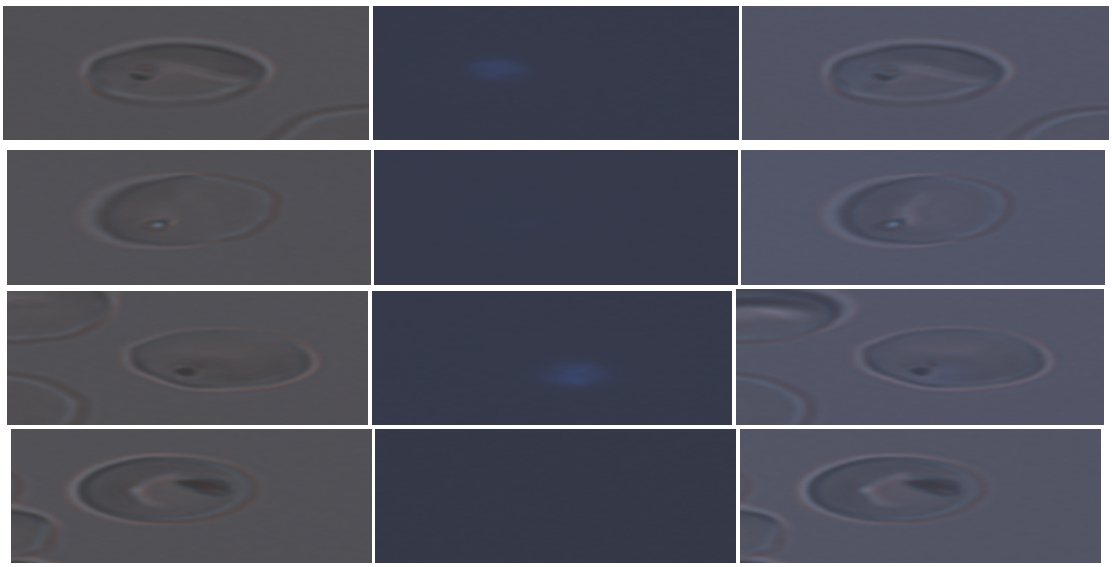


Figure 86 : Contrôle de fluorescence sur *P.falciparum* en présence de sonde irradiée et d'un large excès de guttiférone A

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à démontrer quelles étaient ces protéines marquées. Pour cela, notre sonde est mise en contact avec un lysat parasitaire. Après incubation, le mélange est irradié avec des UV-A pour photo-activer notre sonde et

réaliser l'étape de couplage protéique. Le lysat est ensuite purifié sur gel d'acrylamide et observé sous lumière UV (**Figure 87**) et révélé au bleu de Coomassie (**Figure 88**). Excitées à 366 nm, certaines protéines (**Figure 87**, flèches 1 à 4) émettent de la fluorescence proportionnelle à la concentration de la sonde, révélant ainsi un marquage avec celle-ci. Après révélation au bleu de Coomassie, nous avons pu observer que les protéines marquées par les flèches 2 à 4 (**Figure 88**), possédant un PM > 100 kDa, ont semblées être également les plus abondantes du parasitome. Une expérience de marquage par l'étiquette seule semble nécessaire afin de déterminer le spécifique du non-spécifique. Le marquage indiqué par la flèche 1 (**Figure 87 et 88**) possédant un PM d'environ 40 kDa, n'est que peu représenté dans le parasitome et a émit une forte fluorescence. L'analyse par spectrométrie de masse de cette protéine pourrait nous aiguiller vers une cible potentielle de la guttiférone A chez *P. falciparum*.

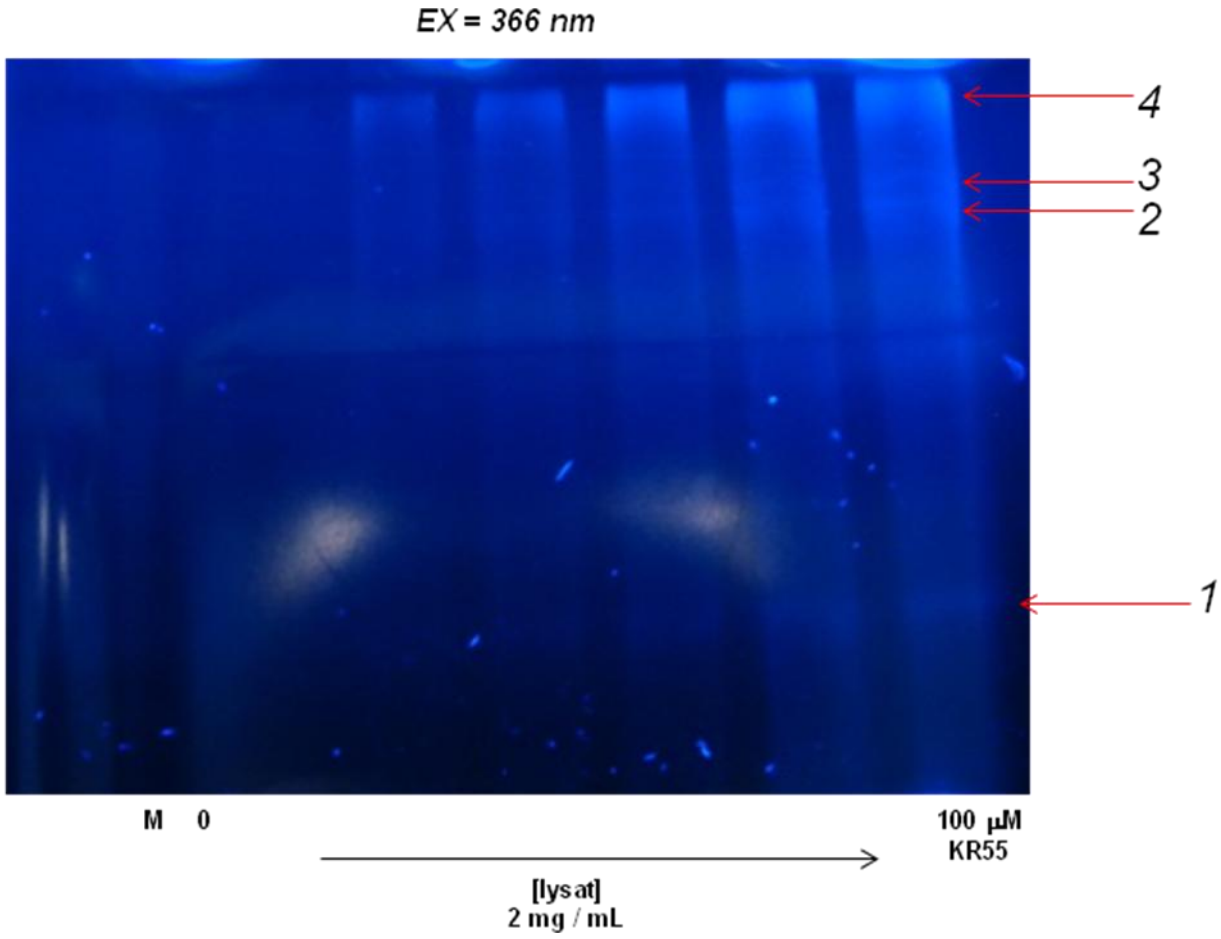


Figure 87 : Révélation sous UV du gel de protéome parasitaire marqué.

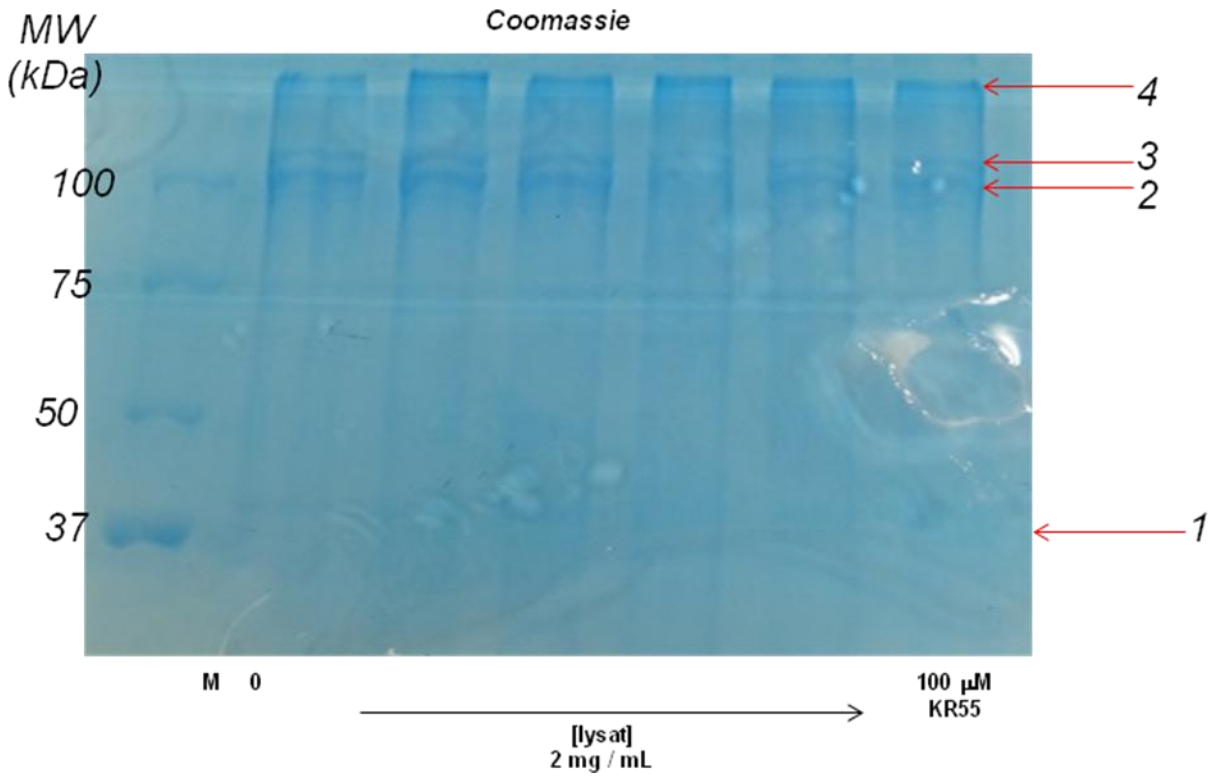


Figure 88 : Révélation au bleu de Coomassie du gel de protéome parasitaire marqué.

Afin d'optimiser les conditions expérimentales, nous avons également réalisé une gamme croissante de concentration en lysat parasitaire (**Figure 89** et **90**). Cette expérience révéla les mêmes marquages, sans problèmes expérimentaux jusqu'à 5 mg/mL de lysat parasitaire, nous donnant ainsi la possibilité de travailler à cette concentration. Le nombre de protéines ainsi visualisées étant relativement faible, d'autres paramètres expérimentaux pourront encore être améliorés. De plus, la quantité de protéome déposée dans chaque puits pourra être augmentée, la résolution du gel d'acrylamide nécessite également améliorée. Des expériences supplémentaires de marquage par l'étiquette AZC et de compétition avec la guttiférone A auront pour vocation de différencier le marquage spécifique du marquage non spécifique.

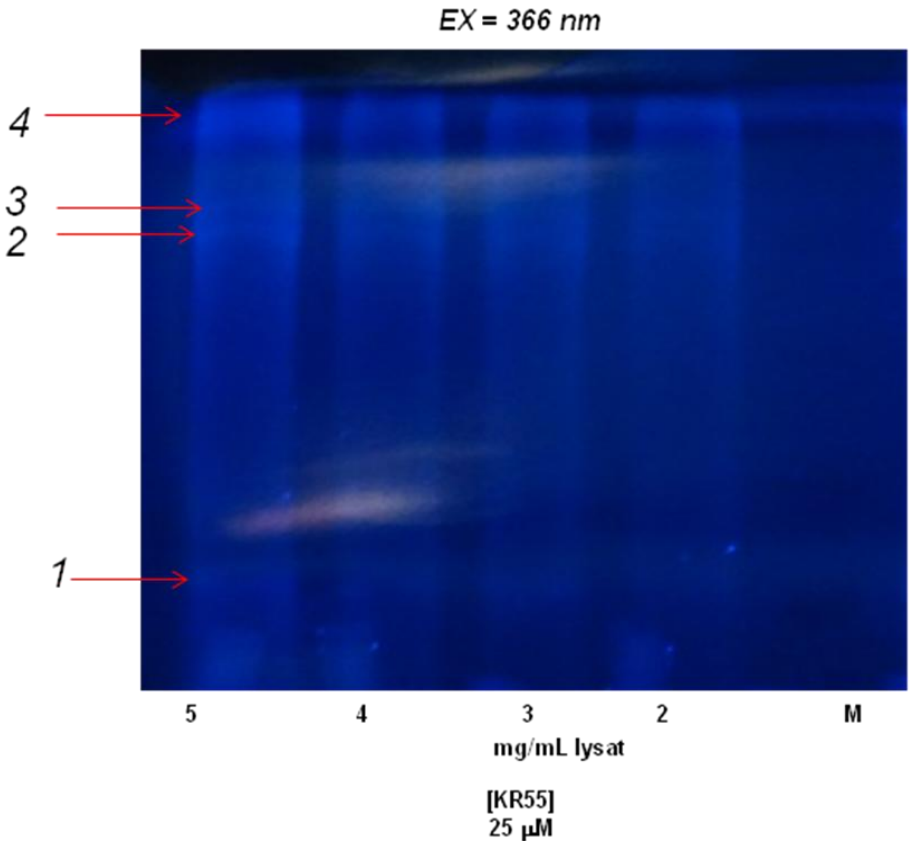


Figure 89 : Révélation sous UV du gel de protéome parasitaire marqué.

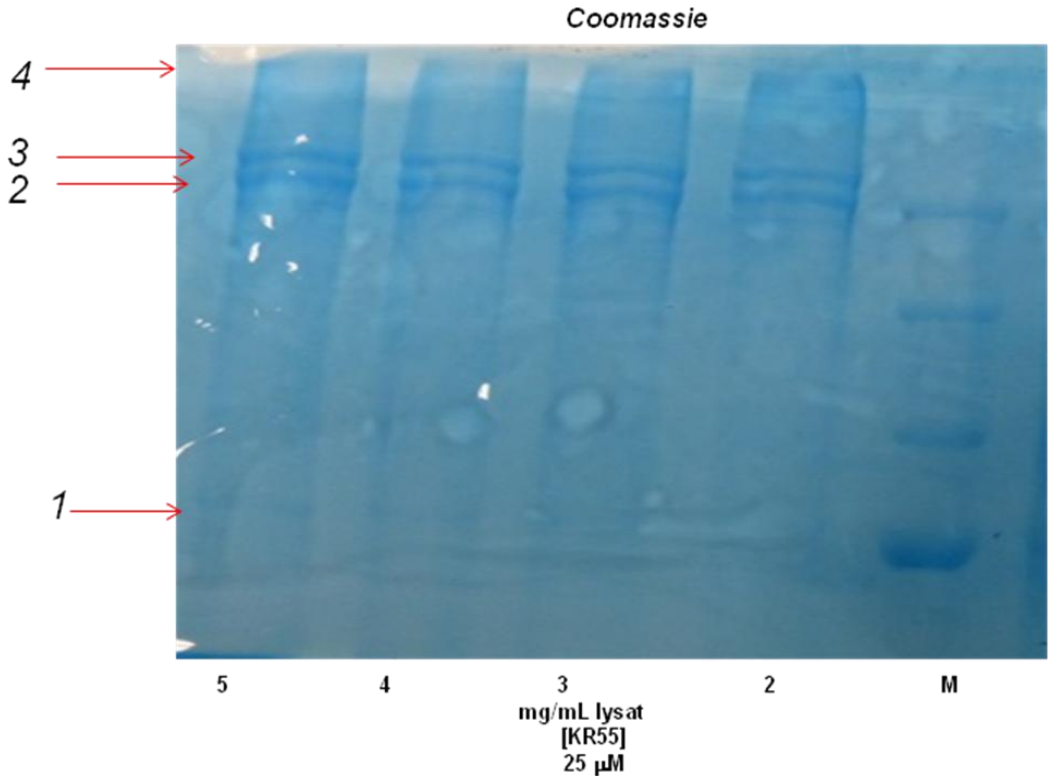


Figure 90 : Révélation au bleu de Coomassie du gel de protéome parasitaire marqué.

En conclusion de cette partie, nous avons débuté la mise au point d'une méthode de protéomique visant à identifier des cibles protéiques de la guttiférone A *chez Plasmodium falciparum.* Bien que nos résultats ne soient que préliminaires et nécessitent des ajustements (amélioration de la résolution, sensibilité, retrait du non-spécifique), il semble que certains marquages (~40 kDa) puissent refléter une protéine cible de la guttiférone A. L'amélioration des conditions expérimentales est en cours au sein de notre laboratoire. L'identification d'une ou plusieurs protéines connues, se révélant être des cibles, nous permettrait via des expériences de modélisation et de « docking » de comprendre les interactions avec nos composés. Ces informations sont nécessaires dans le cadre du développement rationnel d'analogues ; une modulation de ces derniers ainsi orienté visant l'établissement de nouvelles interactions, augmentera ainsi leurs affinités pour la cible.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Durant cette thèse, nous avons poursuivi les thématiques d'extraction et d'hémisynthèse de la guttiférone A initiées par le Dr Y. Fromentin au sein de notre laboratoire. Afin de continuer ces travaux, notre travail de recherche s'est articulé autour de ce produit naturel suivant plusieurs axes :

- **Approches métabolomiques**

  - Une première étude visant à comparer les *Symphonia globulifera* de Guyane française et du Cameroun, nous a permis de conclure que les différences phytochimiques étaient probablement dues à la pression microbienne. En effet, 17 des 55 régio-marqueurs identifiés étaient déjà décrits comme antimicrobiens. De plus, cette étude a démontré que la guttiférone A n'était pas un régio-marqueur. Nous avons donc choisi pour des raisons pratiques et administratives de continuer nos travaux, avec le matériel provenant de Guyane française.
  - Une seconde étude a établi le profil phytochimique de 7 organes de cette espèce. Les résultats obtenus montrent que les graines et le latex contiennent une plus grande proportion de PPAPs.

  L'outil métabolomique est plus rapide que les méthodes en phytochimie classique. Cependant le nombre de variables annotées reste très faible, car seules 70 des 5000 détectées ont été annotées à des composés connus. Nous pouvons donc conclure qu'un travail d'isolement des composés du *Symphonia globulifera* reste indispensable pour compléter les bases de données.

- **Études phytochimiques**

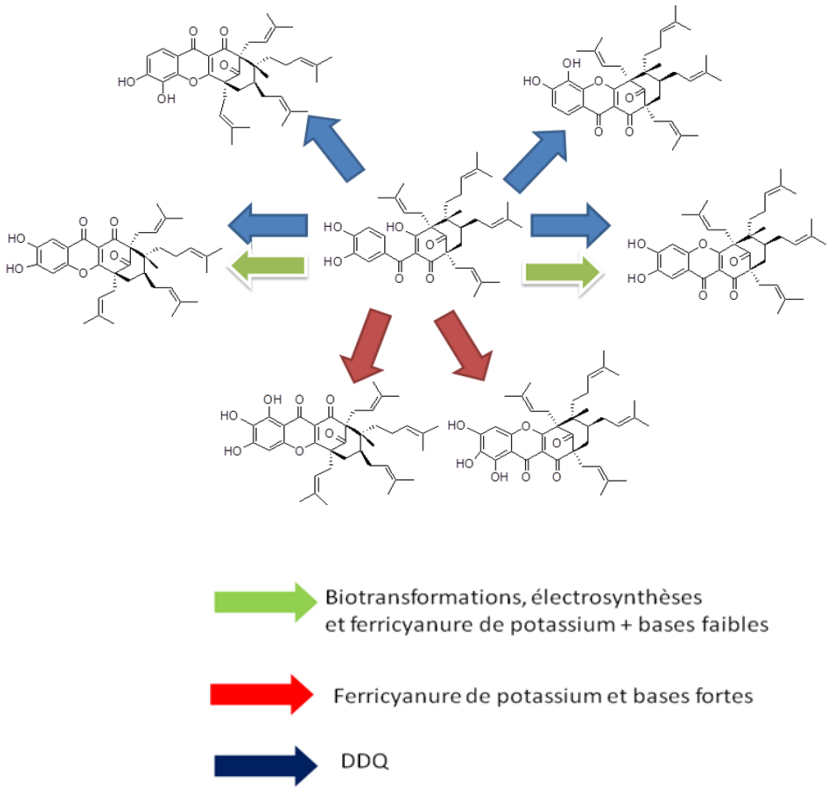
  Ces études ont été réalisées de manière bioguidée à partir des activités antiparasitaires des 6 extraits : graines, latex, fleurs, feuilles, tiges et péricarpe.

  - Les extraits de graines et du latex se sont révélés être les plus actifs sur nos cibles *Plasmodium falciparum* et *Leishmania donovani.*
  - A partir de ces 2 extraits, 11 composés ont pu être caractérisés. A partir de l'extrait de graines, 2 xanthones (3.16 et 1.16 2 oxy-guttiférone A) non abondantes à l'activité submicro-molaire ont pu être isolées.
  - En nous basant sur l'hypothèse que la guttiférone A soit le bioprécurseur de ces dérivés xanthoniques, une méthode basée sur la CPC a été développée et a permis, d'isoler de grandes quantités de ce produit naturel avec un excellent degré de pureté.

  Le développement de ces méthodes analytiques présente une avancée significative pour la recherche et l'isolement dans *Symphonia globulifera* de nouveaux composés de type PPaPs.

- **Voies d'accès au motif xanthone**

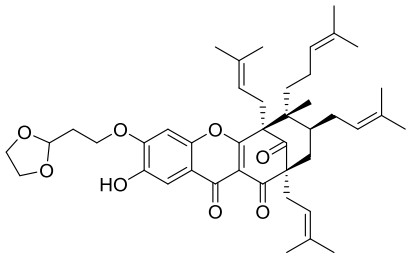
Dans le but d'obtenir ces dérivés xanthoniques plus actifs, 3 méthodes de cyclisations intramoléculaires ont été étudiées : bio-transformation, électrochimie et synthèse organique classique. Les six composés obtenus et leurs voies d'accès sont représentés ci-dessous :



Bien que le mécanisme conduisant à la SnAr sur le carbone 12 du noyau catéchol soit encore méconnu, nous envisageons des expériences de RPE afin de résoudre celui-ci.

- **Hémisynthèse des analogues de 2^{ième}**

Lors de cette étude de RSA portant sur le noyau catéchol et le motif xanthonique, le composé représenté ci-dessous possède le meilleur profil pharmacologique. En effet, son activité sur *Trypanosoma brucei* est de 0.07 µM avec un indice de sélectivité de 457.1. Ces résultats sont excellents, si on les compare au principe actif de référence la pentamidine (IS=11.4).



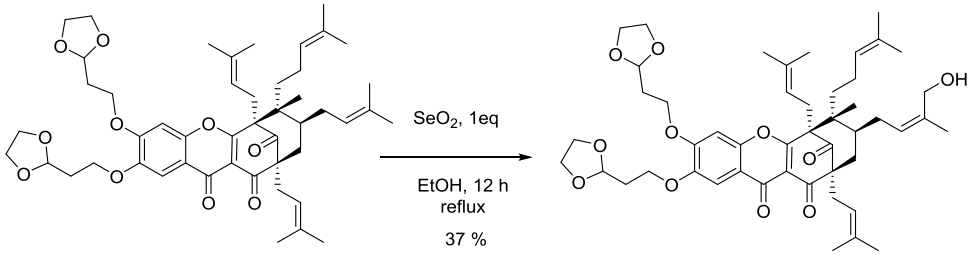
IC_{50} VERO = 32 µM

IC_{50} *P. falciparum* = 0.56 µM IS = 57, 1

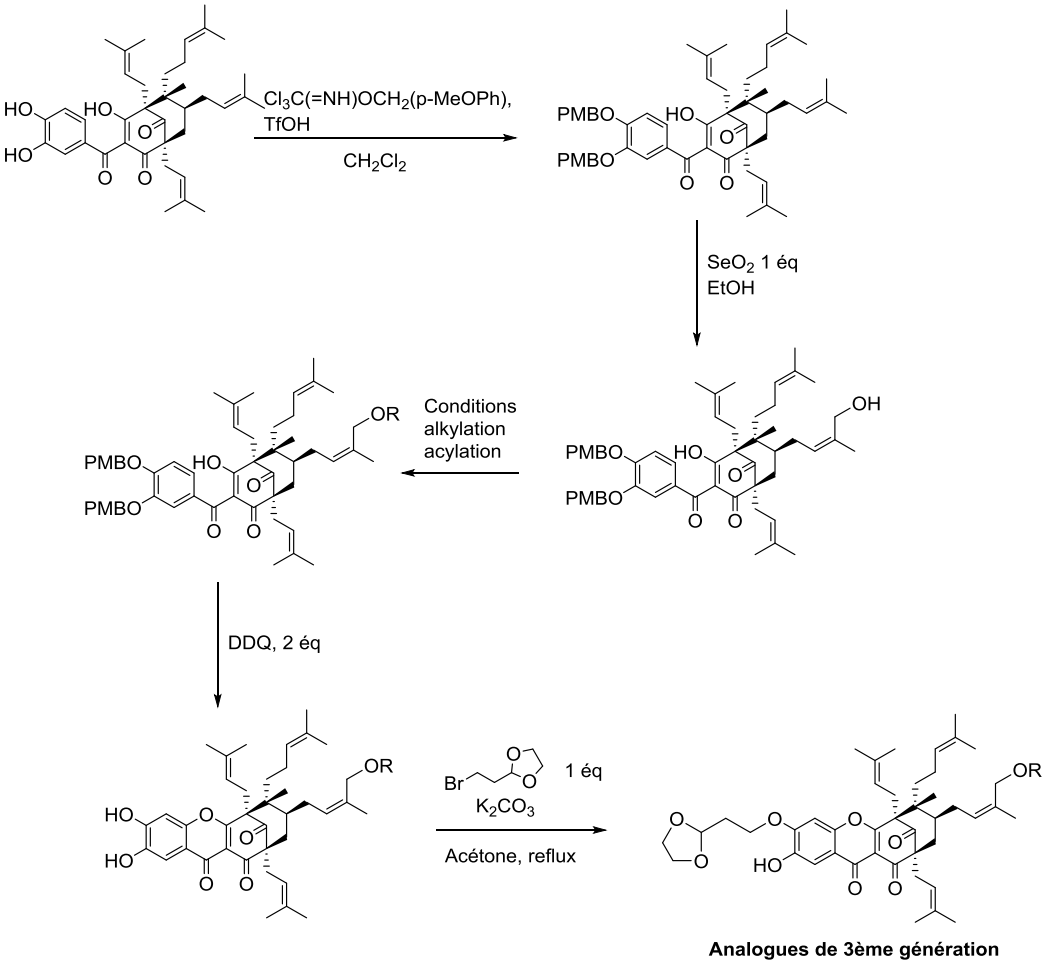
IC_{50} *T. brucei* = 0.07 µM IS = 457,1

- **Méthodologie d'accès aux analogues de 3^{ième} génération**

Après de nombreuses tentatives, l'oxydation allylique terminale n'a pu être réalisée qu'à partir de l'intermédiaire diprotégé sur les fonctions catéchol comme représenté ci-dessous :

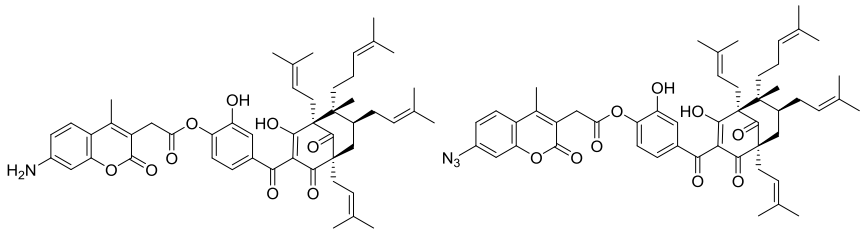


Les produits de départ de cette réaction d'oxydation doivent donc être protégés, ce qui nous conduit à envisager un autre schéma de synthèse des analogues de troisième génération.



-Recherche des cibles protéiques parasitaires

Deux sondes ont été synthétisées afin d'être utilisée dans la recherche de cible parasitaire. Ces dernières faciliteront le design rationnel des générations suivantes. De même des tests *in vivo* sur modèles murins nous permettraient de continuer à perfectionner nos connaissances sur les activités antiparasitaires de la guttiférone A.



Nous tenions à conclure ce manuscrit par le fait que ces travaux de recherches ont fait l'objet de 4 publications, ces dernières sont en annexes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1) Appareillages et généralités

Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été réalisés sur les spectromètres BRUCKER (300 MHz, 400 MHz pour la RMN ^{1}H, 75 MHz et 100 MHz pour la RMN ^{13}C). Les spectres sont décrits des champs forts vers les champs faibles. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au pic de solvant résiduel (3,33 ppm en proton et 49,0 en carbone pour le CD_3OD ; 7,26 ppm en proton et 77,16 en carbone pour le $CDCl_3$). Les constantes de couplage (*J*) sont indiquées en Hertz (Hz). Les abréviations utilisées pour indiquer la multiplicité des signaux sont : s, d, t, m, dd, dt,… et désignent respectivement un singulet, un doublet, un triplet, un multiplet, un doublet de doublet, un doublet de triplet. Les attributions sont confirmées par des analyses de spectres bidimensionnelles : COSY, HSQCed, HMBC, NOESY. Les spectres sont traités avec le logiciel TopSpin-NMR ou MestReNova.

Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption dans l'infrarouge sont enregistrés sur un spectrophotomètre NICOLET 50 FT-IR, sous forme de film liquide déposé puis séché sur une pastille de chlorure de sodium, ou sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Spectrum. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm-1. Seules les bandes caractéristiques de certaines fonctions ou groupements sont mentionnées. Leur énumération n'est pas exhaustive.

Spectrométrie de masse

Les spectres de masse (SM) sont réalisés à l'aide d'un appareil LCT KE383 Waters ou ZQ2000 Waters avec source électrospray. Le mode d'ionisation utilisé est positif ou négatif.
Les spectres de masse haute résolution (SMHR) sont réalisés grâce à un spectromètre de masse Q-tof1 Waters avec source électrospray en mode d'ionisation positif ou négatif et une trappe ionique comme analyseur. Les ions sont donnés suivant leur rapport *m/z*.

Pouvoirs rotatoires

Les pouvoirs rotatoires ([α]T°CD) sont mesurés sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 341 à la longueur d'onde 549 nm (raie D du sodium) dans les conditions indiquées : température (T°C) en °C, concentration c en mg/ml dans le solvant indiqué.

Voltamétrie cyclique et électrolyse à potentiel contrôlé

Les expériences de voltamétrie cyclique et d'électrolyses à potentiel contrôlé ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat/ galvanostat de marque Metrohm Autolab (modèle PGSTAT302N). L'électrode de travail en carbone vitreux utilisés pour les mesures fut polie avant chacune d'entre elles avec une suspension aqueuse d'alumine. Tous les potentiels exprimés par rapport à une électrode Ag/AgCl de référence, la contre électrode fut en platine. Les éléctrolyse à potentiels contrôlés ont été réalisées dans une cellule à

compartiments. L'électrode de travail, un cylindre de carbone graphite (6 cm de diamètre et 2.5 cm de hauteur) a été plongée dans le compartiment anodique. La contre éléctrode, une plaque de platine a été quant à elle été placée dans le compartiment cathodique. Un frité séparait ces deux compartiments.

Solvants pour réactions :

L'obtention de THF anhydre et du dichlorométhane anhydre s'est fait via un purificateur de solvant.

L'acétone est distillée et séchée sur tamis moléculaire 4 Å.

La pyridine anhydre est séchée sur tamis moléculaire 4 Å.

Lorsque les réactions sont effectuées sous atmosphère inerte, elles sont effectuées sous argon.

Chromatographies

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur des plaques de silice sur support d'aluminium type KIESELGEL 60 F254 Merck. Elles sont observées sous lumière UV (254 nm et 366 nm), puis révélées avec une solution de vanilline sulfurique.

Les chromatographies sur colonne de gel de silice sont réalisées avec une silice Chromatogel 60 SDS de granulométries 20-45 ou 35-70 µm, sous pression d'air (200 à 250 mbar).

Les chromatographies liquides à moyenne pression (MPLC) ont été effectuées à l'aide de pompe Büchi pumpmanager C-615, avec des colonnes Single Step ou des colonnes Interchim Puriflash. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique à été réalisée sur LaChrome Elite, sous le pilotage du logiciel EZChrome Elite.Ces analyses se feront avec une colonne Zorbax C18 SB-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) possédant une boucle d'injection de 20µL. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative a été effectuée sur une colonne Pursuit (250 × 30 mm, 10 µm) couplée à une pompe Armen munie d'une boucle d'injection de 10 mL loop injector. Les chromatogrammes furent enregistrés à 254 nm.

Les solvants de chromatographies utilisés furent tous de qualité analytique ou fraichement distillés avant utilisation.

Conditions de culture des micro-organismes

Protocole de culture en milieu liquide des microorganismes : En conditions stériles (sous PSM) les microorganismes stockés sur milieu A sont mis en suspension dans du glycérol à 30%. La suspension contenant les spores est ajoutée dans un erlenmeyer stérile contenant le milieu de culture YMS. La suspension spores/milieu YMS est mise à incuber à 27°C sous agitation (160 rpm) pendant 48 à 72 heures.

Une fois la croissance des micro-organismes obtenue dans le milieu YMS, la biomasse est récupérée et filtrée pour effectuer les biotransformations. Cette dernière est ensuite mise

en suspension dans un erlenmeyer dans le tampon phosphate pH 7,2. A partir de ce stade, les conditions stérils ne sont plus nécessaires. La guttiférone A est ajoutée en solution dans le DMF (0,3 µl de DMF par ml de tampon phosphate) pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg de substrat par ml de tampon phosphate. Les erlenmeyers sont mis à incuber à 37°C sous agitation (160 rpm) pendant le temps nécessaire. A la fin de la transformation, l'ensemble est mis à centrifuger. Le surnageant aqueux est récupéré, acidifié avec de HCl 1M puis extrait à l'acétate d'éthyle. La biomasse est reprise dans le méthanol, agité et extraite aux ultrasons pendant 10 minutes. Après centrifugation, le méthanol est récupéré puis évaporé à sec. Le résidu est repris dans un mélange acétate d'éthyle/eau.

2) Evaluations biologiques des composés

Plasmodium falciparum

La souche résistante à la chloroquine de *Plasmodium falciparum* FcB1/Colombia a été maintenue *in vitro* sur des érythrocytes humains en milieu RPMI-1640 additionné de 8% (v/v) de sérum humain inactivé par la chaleur à 37 °C sous une atmosphère de CO_2 de 3%, 6% O_2 et 91% N_2. La sensibilité aux médicaments in vitro a été mesurée par l'incorporation de [^{3}H]-hypoxanthine. Des solutions de stock de médicaments ont été préparées dans le DMSO. Les composés ont été dilués en série double avec 100 µl du milieu de culture dans des plaques à 96 puits. Les cultures de parasites asynchrones (100 µl, 1% de parasitémie et 1% d'hématocrite) ont ensuite été ajoutées à chaque puits et incubées pendant 24h à 37 °C avant l'ajout de 0.5µCi de [^{3}H]-hypoxanthine (GE Healthcare, 1 à 5 Ci.mmol/mL) par puits. Après une nouvelle incubation de 24 h, les plaques ont été congelées et décongelées. Les lysats cellulaires ont ensuite été collectés sur des filtres en fibres de verre et comptés dans un spectromètre à scintillation liquide. L'inhibition de la croissance pour chaque concentration de médicament a été déterminée par comparaison de la radioactivité incorporée dans la culture traitée avec celle de la culture témoin maintenue sur la même plaque. La CI_{50} a été obtenue à partir des courbes de concentration-réponse drogue et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ± écarts-types déterminés à partir de trois expériences indépendantes.

Trypanosma brucei

Les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei* (souche 93) ont été cultivées dans un milieu HMI9 supplémenté avec 10% de FCS à 37 °C sous une atmosphère de 5% de CO_2. Dans toutes les expériences, les cultures de cellules en phase logarithmique ont été récoltées par centrifugation à 3000 xg et utilisées immédiatement. Les dosages des médicaments ont été basés sur la conversion d'un colorant redox-sensibles (REMA) par des cellules viables en un produit fluorescent. Les solutions de stock de médicaments ont été préparées dans le DMSO. Les formes sanguines *T. b. brucei* ($3x10^4$ cellules/ml) ont été cultivées comme décrit ci-dessus dans des plaques à 96 puits (200 µl par puits) soit en l'absence ou en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs et avec une concentration finale de DMSO qui n'a pas dépassé 1%. Après une incubation de 72 h, on ajoute une solution resazurin dans chaque

puits à la concentration finale de 45 µM. La fluorescence a été mesurée à 530 nm d'excitation et 590 longueurs d'onde d'émission de nm après une nouvelle de 4 heures d'incubation. Chaque concentration de l'inhibiteur a été testée en triple. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance du parasite a été calculé en comparant la fluorescence de parasites maintenus en présence de médicament à celui de l'absence de la drogue. Le DMSO a été utilisé comme témoin négatif. Les concentrations provoquant une inhibition de croissance de 50% (IC_{50}) ont été déterminées à partir des courbes de concentration-réponse à la drogue. La valeur de CI_{50} est la moyenne +/- l'écart type de trois expériences indépendantes.

Leishmania donovani

La souche *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3, aussi appelée LV9) a été utilisée pour les expériences *in vitro*. Des formes promastigotes ont été cultivées dans le milieu M-199 dans lequel 40 mM d'HEPES, 100 mM d'adénosine, 0.5 mg L^{-1} d'haemine, 10% de FBS et 50 µg mL^{-1} de gentamycine furent ajoutés. Cette culture a été effectuée à 26 °C in dans un environnement pauvre en lumière et dans une atmosphère à 5% CO_2. La différentiation des promastigotes (1×10^6 promastigotes dans 5 mL) en amastigotes axéniques a été réalisé par l'ajout du milieu spécifique (15 mM de KCl; 8 mM de glucose; 5 mM de glutamine, 1 M-199, 2.5% de peptone BBL™ trypticase™, 4 mM de haemine et 20% de FBS). Le pH a ensuite été ajusté à 5.5 pour la suite des expériences. Les amastigotes axéniques ont été cultivé à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO_2. Toutes les expériences furent réalisées dans la phase de croissance logarithmique des parasites. Les macrophages de souris RAW 264.7 furent maintenus dans un milieu DMEM dans lequel 10% de FBS fut ajouté. Ces cellules on été réparties dans des plaques 96 puits dans 100 µL de DMEM, avec une densité de 5×10^3 cellules par puits. Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2, le milieu de culture a été remplacé par 100 µL de DMEM contenant une suspension de forme amastigotes de *L. donovani* (10^6 cellules/mL). Après une incubation de 24 h dans les mêmes conditions que précédement, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM contenant le produit à tester. Une nouvelle incubation de 48 dans les mêmes conditions fut ensuite réalisée. La viabilité des amastigotes dans les macrophages fut déterminée par incorporation du SYBR® green I (Invitrogen, France), un marqueur fluorescent au contact de l'ADN parasitaire. Les cellules ont donc été lisées, puis l'ADN génotypé par PCR sans protocole d'isolement (Euromedex, France). Dans une plaque 96 puits, 10 µL de lysat parasitaire à été ajouté a 40 µL de réactif pour PCR contenant du SYBR® green I. La fluorescence fut ensuite comparée à une gamme étalon. Les concentrations sont exprimées en IC_{50} après 2 jours d'incubation.

Cellules VERO

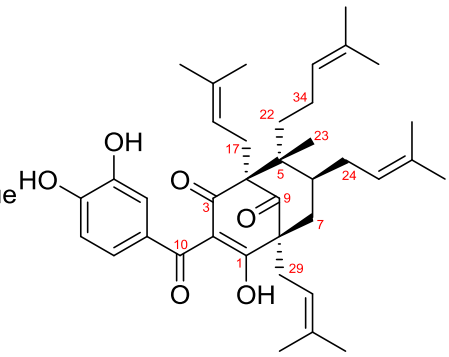
Cellules Vero (rein de singe vert d'Afrique) ont été cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco supplémenté avec 25 mM de glucose, 10% (v / v) sérum de veau foetal, 100 UI de pénicilline, la streptomycine 100µg/ml et 1,5 pg / ml Fungizone et maintenu sous 5 % de

CO_2 à 37 ° C. Des plaques de 96 puits ont été ensemencées avec 1300 cellules Vero par puits dans 200 µl de milieu. Vingt-quatre heures plus tard, les produits chimiques dissous dans le DMSO ont été ajoutés pour 72h à une concentration finale dans un volume fixe de DMSO. (Concentration finale de 1%). Les contrôles ont reçu un volume égal de DMSO. Le nombre de cellules viables mesuré à 490 nm avec le réactif MTS (Promega, Madison, WI) et les CI_{50} ont été calculés comme étant la concentration du composé provoquant une inhibition de 50% de la prolifération cellulaire.

3) Descriptions des molécules

Guttiférone A **1**

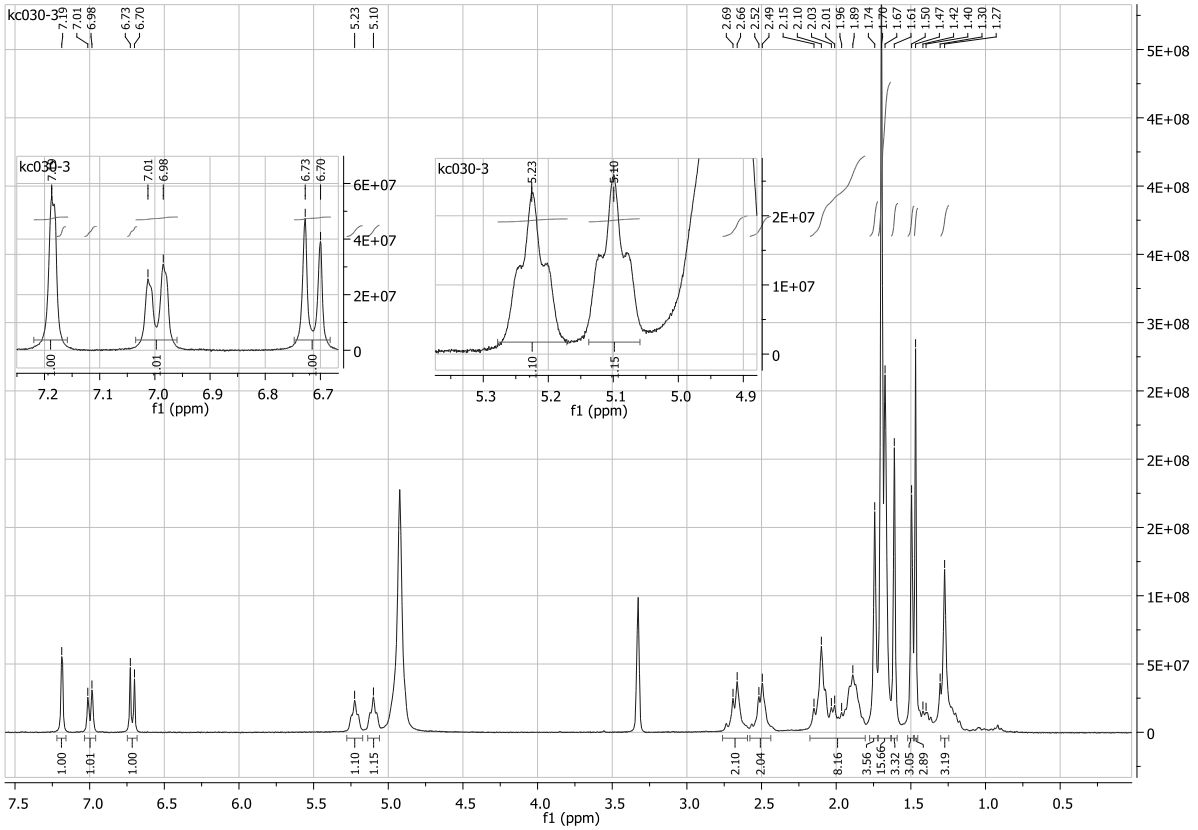
1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



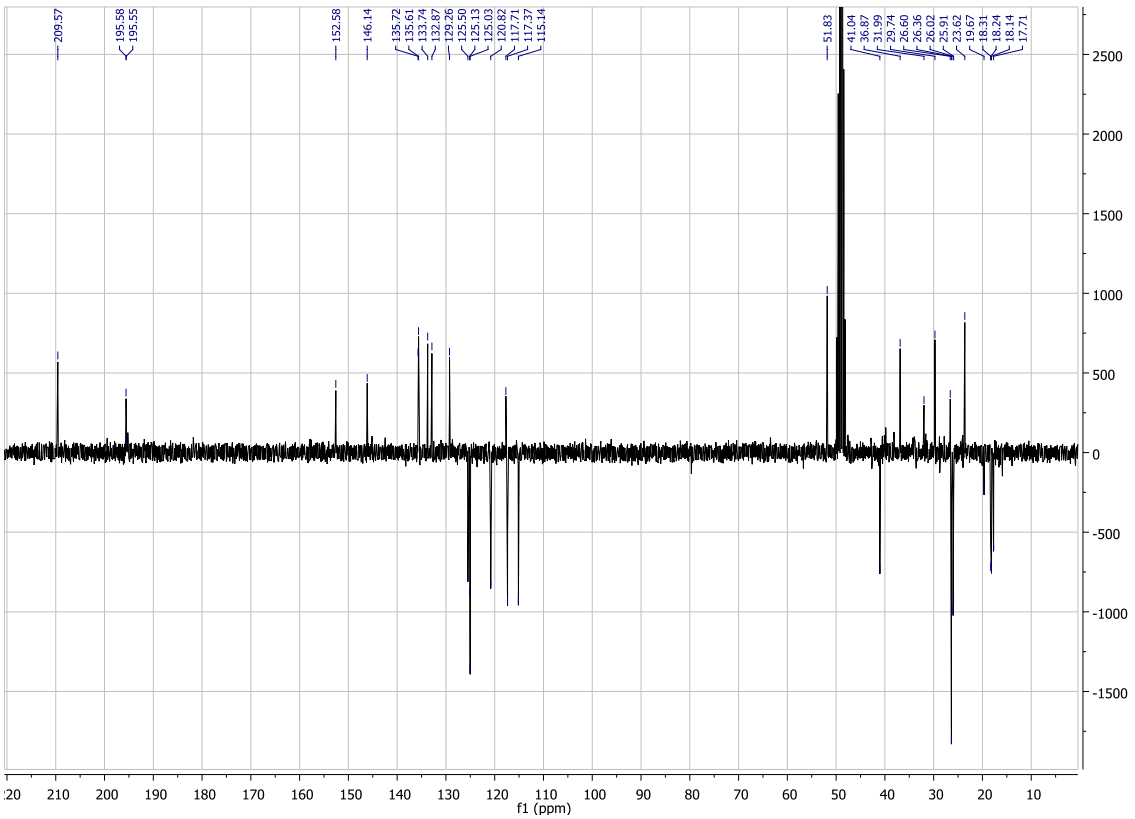
- **Isolée** à partir du fractionnement des extrait méthanolique par CPC (20 : 1 : 20 : 1) de : graines, péricarpes, fleurs, latex et feuilles de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 2.9, 4.97, 0.5%, 11.2 et 0.00054 % respectivement
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{50}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +34 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 601 (M-H)

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.19 (s, 1H), 6.97 (dd, J = 8.4/2.2 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.20 (t, J = 6.97 Hz,1H), 5.07 (t, J = 6.97 Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 2.48 (m, 2H), 2.11 (m,1H), 2.08 (m, 2H), 2.01 (m, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.84 (m, 1H), 1.73 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.68 (s, 9H), 1.66 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.41 (m, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.22 (m, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 209.5 (C-9), 195.5 (C-10), 195.4 (C-1), 195.1 (C-3), 152.5 (C-14), 146.1 (C-13), 135.7 (C-31), 135.65 (C-19), 133.7 (C-26), 132.8 (C-36), 129.3 (C-11), 125.4 (C-25), 125.1 (C-35), 125.0 (C-16), 120.8 (C-30), 120.7 (C-18), 117.7 (C-2), 117.3 (C-12), 115.1 (C-15), 68.8 (C-4), 62.1 (C-8), 51.9 (C-5), 41.1 (C-6), 40.1 (C-7), 36.90 (C-23), 31.95 (C-29), 29.80 (C-24), 26.60 (C-17), 26.3 (C-28;C-32), 25.09 (C-37), 26.00 (C-20), 23.7 (C-34), 19.67 (C-22), 18.27 (C-21), 18.21 (C-33), 18.14 (C-27), 17.70 (C-38).



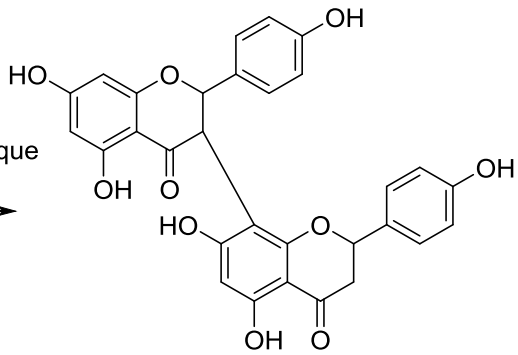
Spectre ^{1}H RMN de la guttiférone A **1**



Spectre ^{13}C RMN de la guttiférone A **1**

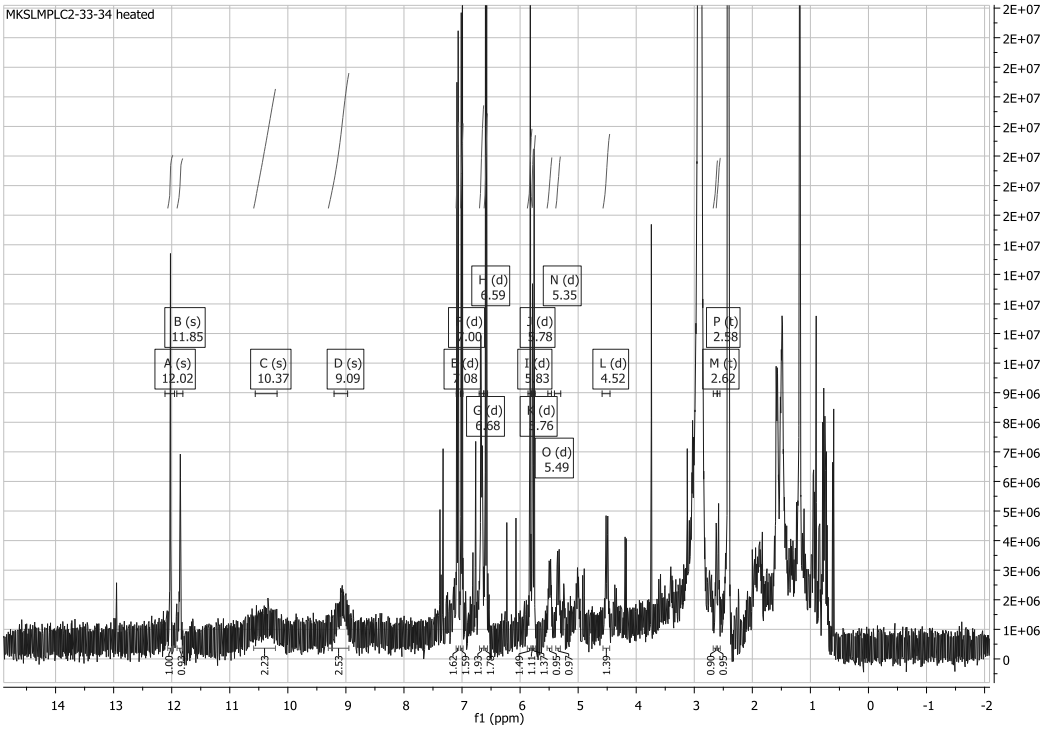
Gb1a **15**

1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



- **Isolée** à partir du fractionnement des extrait méthanolique des graines,de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.02 %.
- **Aspect** : poudre jaune/brune
- **Formule brute** : $C_{30}H_{22}O_{10}$
- **SM** : (ESI) *m/z* 541 (M-H)

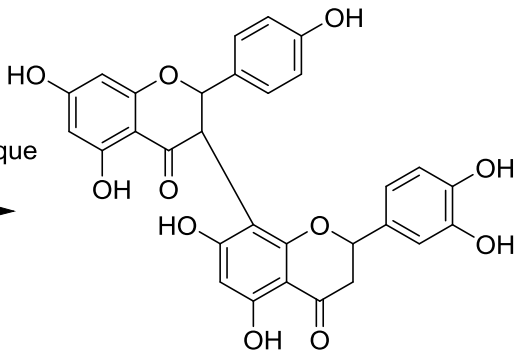
^{1}H-NMR (400MHz, DMSO-d_6, 80ºC)δ (ppm) = 12,13 (s, 1H), 11,96 (s, 1H), 10,37 (s, 2H), 9,09 (s,2H), 7,08 (d, J=8,5 Hz, 2H, H-2"'et H-6"'), 7,00 (d, J=8,5 Hz, 2H, H-2' et H-6'), 6,68 (d, J=8,5 Hz, 2H, H-3'et H-5'), 6,59 (d, J=8,5 Hz, 2H, H-3"' et H-5"'), 5,83 (d, J=2,1 Hz, 1H, H-6), 5,78 (d, J=5,8 Hz, 1H, H-6'), 5,76 (d, J=3,8 Hz, 1H, H-8), 5,49 (d, J=11,80 Hz, 1H, H-2), 5,35 (m, 1H, H-2'), 4,52 (d, J=11,80 Hz, 1H, H-3), 2,62 (m, 1H, H-3'), 2,58 (m, 1H, H-3').



Spectre ^{1}H RMN de la Gb1a **15** dans le dmso à 80 °c

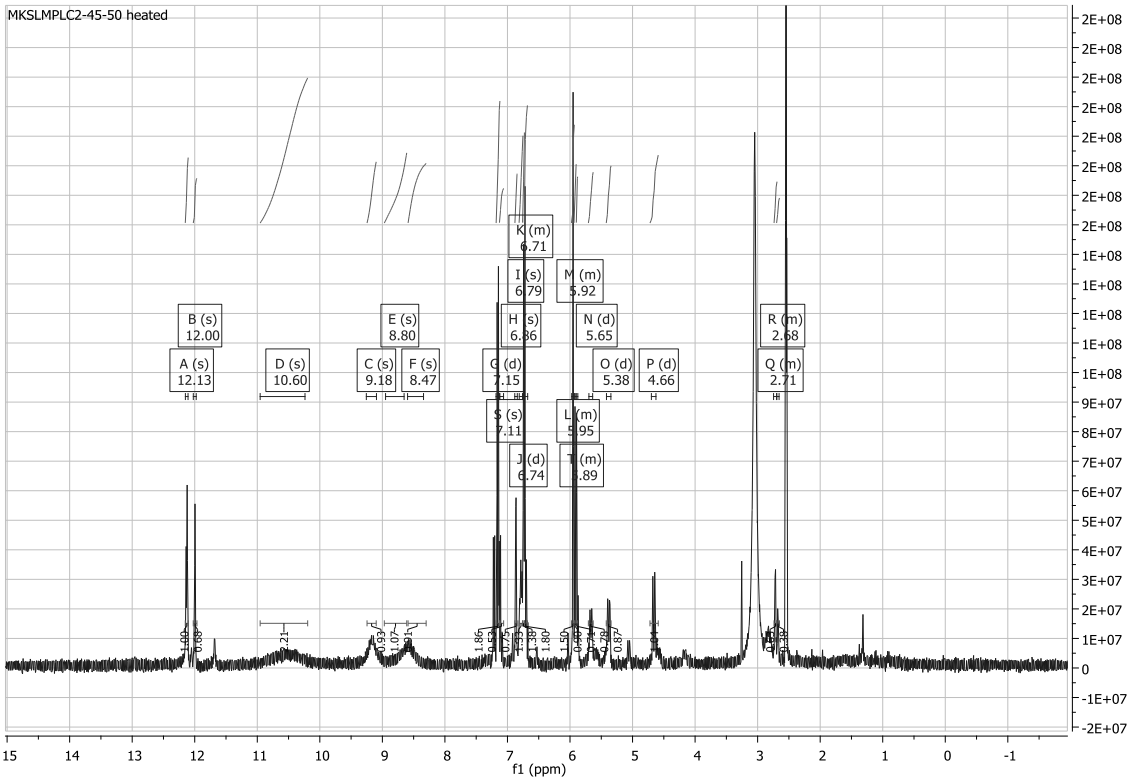
Gb2a **16**

1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



- **Isolée** à partir du fractionnement des extrait méthanolique des graines,de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.28 %.
- **Aspect** : poudre jaune/brune
- **Formule brute** : $C_{30}H_{22}O_{11}$
- **SM** : (ESI) *m/z* 557 (M-H)

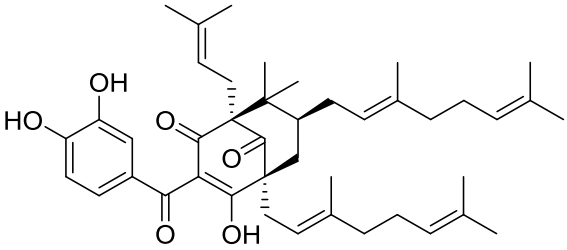
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 80ºC) : δ (ppm) : 12,13 (1H br. s,), 12,00 (1H, br. s), 10,60 (2H, br. s), 9,18 (1H, br. s), 8,80 (1H, br. s), 8,47 (1H, br. s), 7,14 (d, 2H, J=9,45Hz, H-2' et H-6'), 6,86 (s, 1H, H-6"'), 6,79 (d, 1H,J=20,73 Hz, H-2"'), 6,74 (m, 1H, J=8,5 Hz, H-5"'), 6,71 (m, 2H, J=8,5 Hz, H-3'et H-5'), 5,95 (m, 1H, H-8), 5,92 (m, 1H, H-6"), 5,89 (m, 1H, H-6), 5,65 (m, 1H, J=12,0 Hz, H-2), 5,38 (d, 1H, J=12,0 Hz, H-3), 4,66 (d, 1H, J=12,1 Hz, H-2"), 2,71 (m, 1H, H-3"), 2,68 (m, 1H, H-3").



Spectre ^{1}H RMN de la Gb2a **15** dans le dmso à 80 °c

Guttiférone B **38**

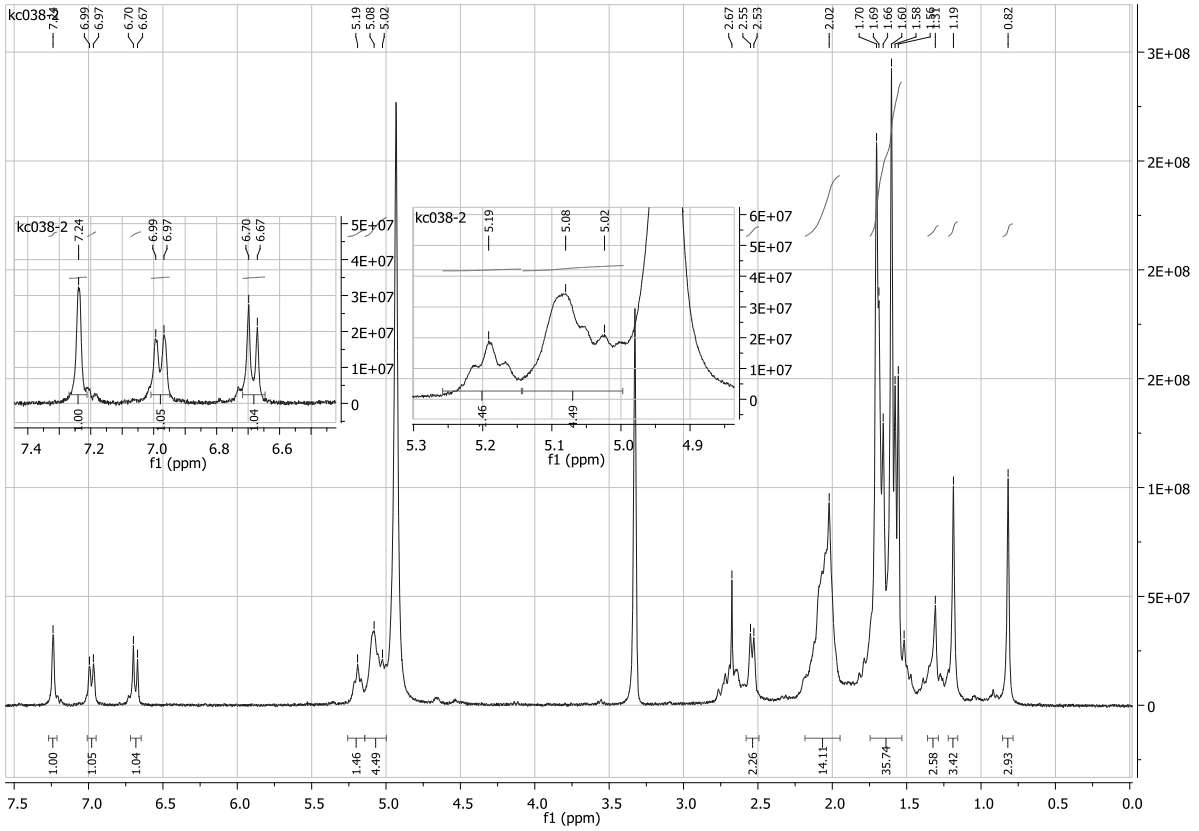
1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



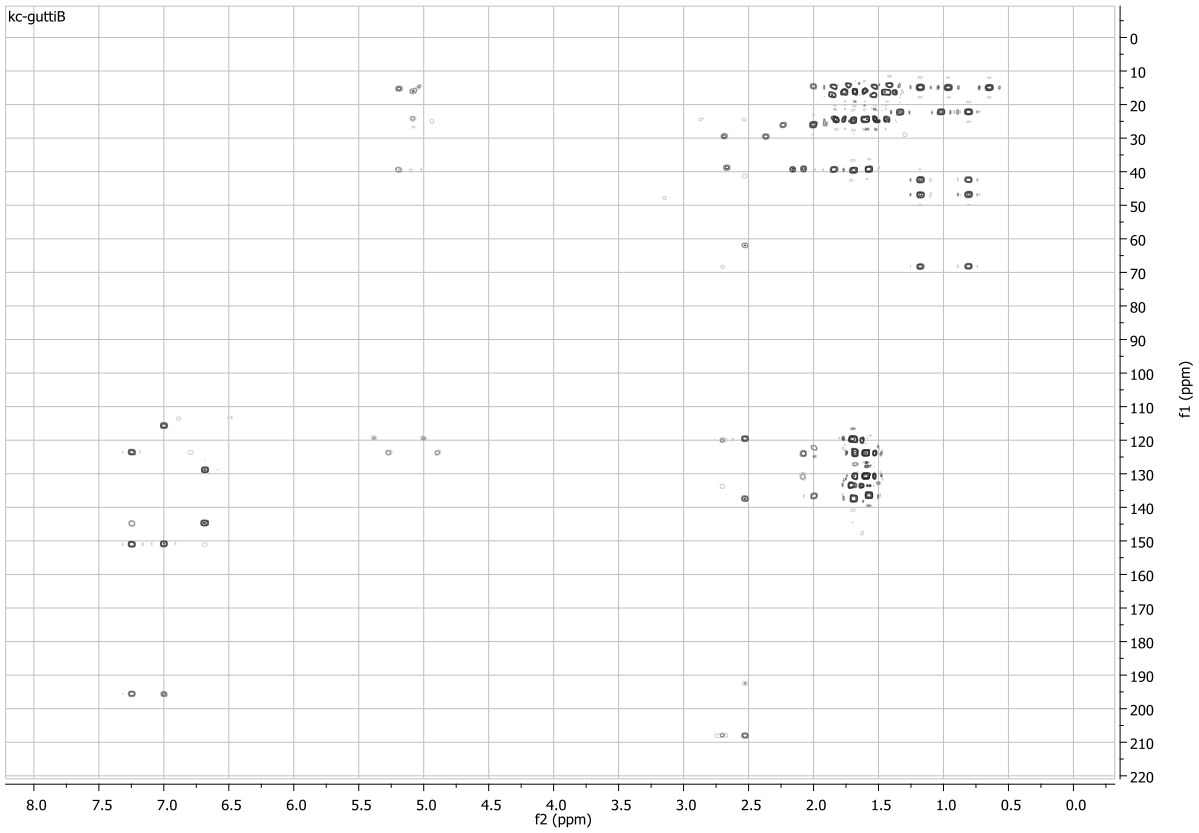
- **Isolée** à partir du fractionnement des extraits méthanolique par CPC (20 : 1 : 20 : 1) des graines de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 2.9 %.
  12 g de fraction acétate d'éthyle provenant de l'extrait méthanolique de graines sont purifiés par CPC en utilisant le système 20/1/20/1 (Cyclohexane, Acétate d'éthyle, Méthanol, Eau). Les fractions sont contrôlées par CCM et celles contenant la guttiférone B sont rassemblées pour donner 0.35 g de cette dernière.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{43}H_{58}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : -42 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 669 (M-H)

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.24 (s, 1H), 6.98 (dd, J = 8.4/2.2 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.19 (t, J = 6.97 Hz,1H), 5.08 (t, J = 6.97 Hz, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.83 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 2.53 (m, 2H), 2.08 (m,2H), 2.04 (m, 2H), 2.01 (m, 1H), 1.70 (s, 9H), 1.69 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.60 (s, 9H), 1.58 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.31 (m, 2H), 1.19 (s, 3H), 0.82 (m, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 208.8 (C-9), 196.4(C-10), 192.0 (C-1), 191.8 (C-3),-152.4 (C-14), 146.2 (C-13), 138.9 (C-31), 137.8 (C-26), 135.3 (C-19), 132.2 (C-36), 129.9 (C-11), 125.2 (C-16), 125.1 (C-35), 125.0 (C-40), 123.9 (C-25), 120.6 (C-30), 121.1 (C-18), 119.1 (C-2), 117.2 (C-12), 115.0 (C-15), 69.7 (C-4), 63.5 (C-8), 48.1 (C-5), 44.2 (C-6), 43.1 (C-7), 41.0 (C-27), 40.8 (C-32), 31.2 (C-29), 29.20 (C-24), 27.7 (C-34), 27.5 (C-39), 26.3 (C-20), 26.1 (C-16), 26.0 (C-37), 25.9 (C-42), 23.8 (C-21), 17.8 (C-43), 17.8 (C-38), 16.9 (C-33), 16.5 (C-22), 16.3 (C-28).



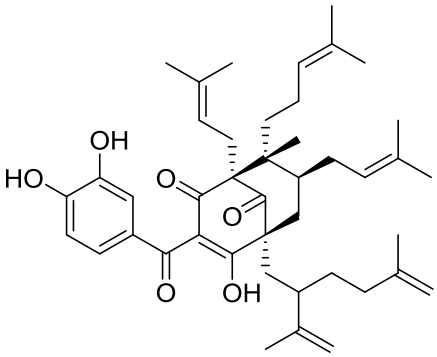
Spectre ^{1}H RMN de la guttiférone B **38**



Spectre HMBC de la guttiférone B **38**

Guttiférone C **39**

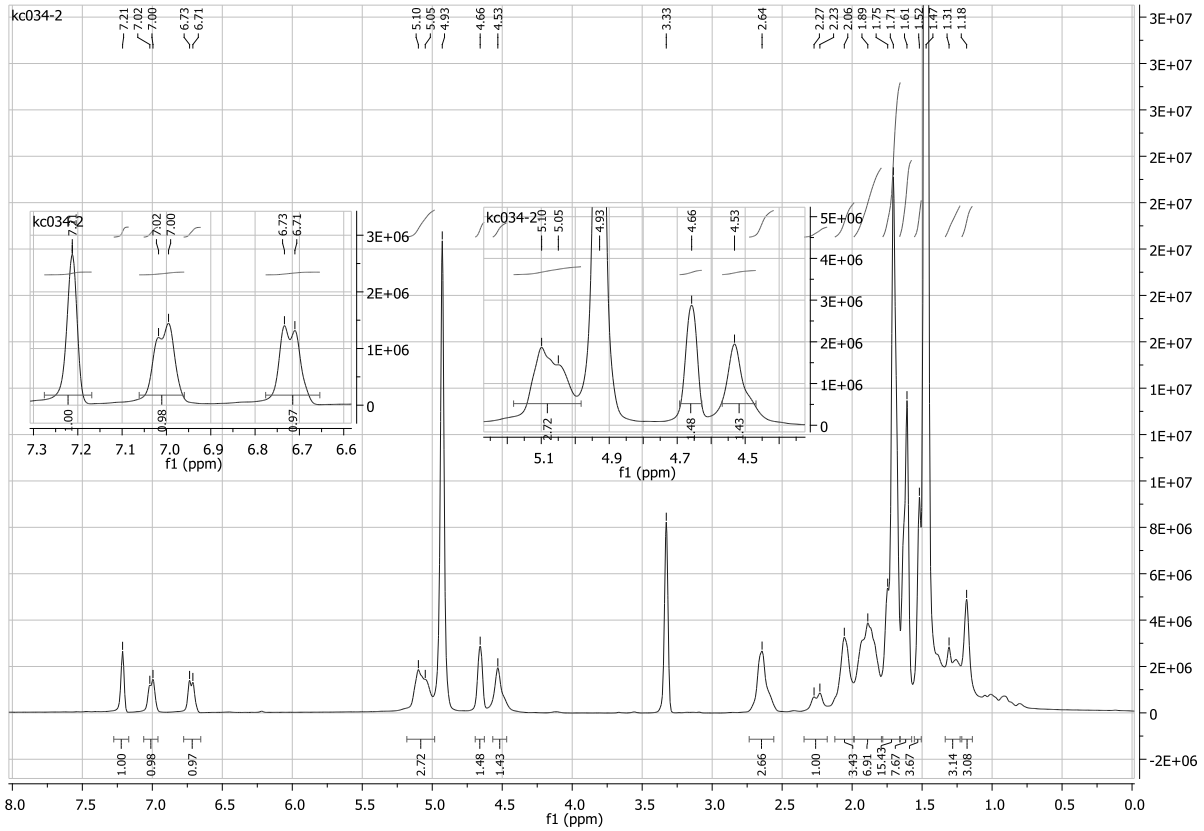
1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



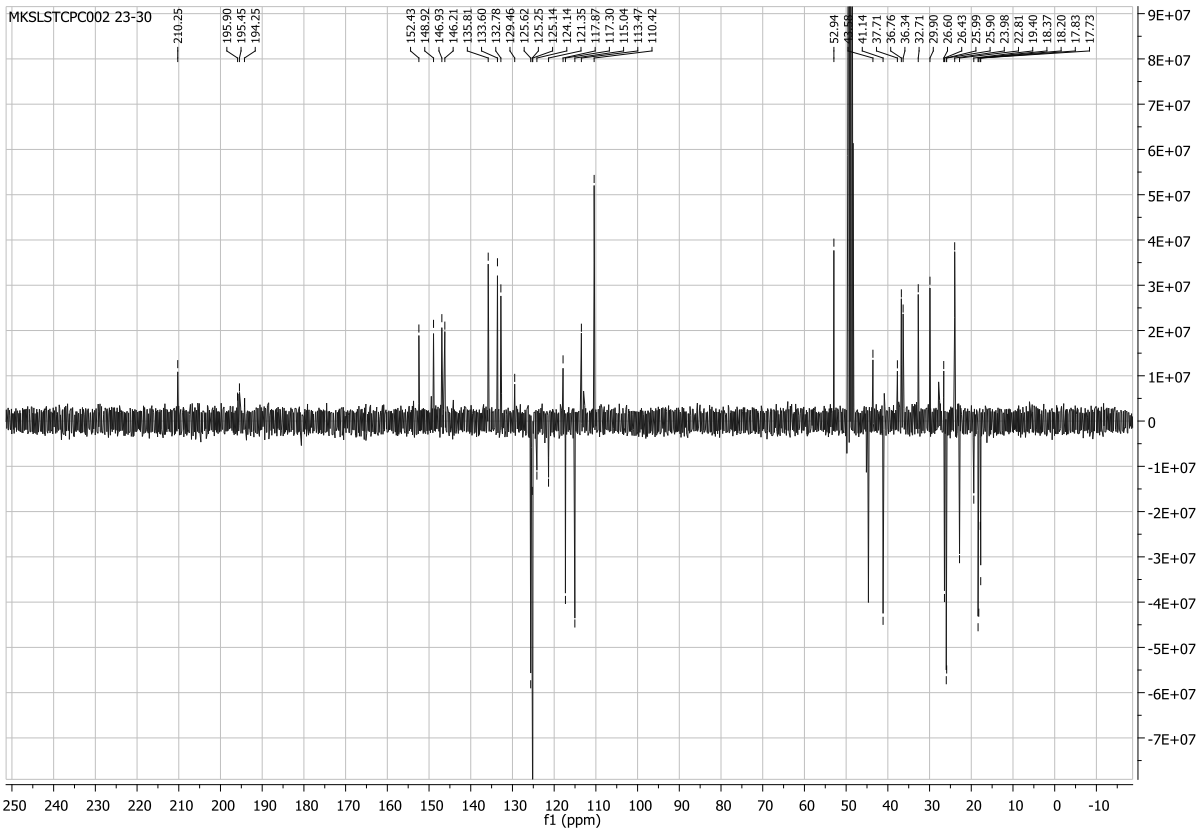
- **Isolée** à partir du fractionnement des extraits méthanolique par CPC (20 : 1 : 20 : 1) des fleurs de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.5 %.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{43}H_{58}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : 84 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 669 (M-H)

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.18 (m, 1H, H-12), 6.98 (m, 1H, H-16), 6.69 (m, 1H, H-15), 5.08 (m,1H, H-40), 5.02 (m, 1H, H-18), 4.89 (m, 1H, H-25), 4.63 (m, 1H, H-37), 4.51 (m, 1H, H-32), 2.62 (m, 2H, H-17), 2.55 (m, 2H, H-30), 2.22 (m,1H, H-7b), 2.02 (m, 2H, H7a), 1.98 (m, 1H, H-29b), 1.90 (m, 2H, H-29a et H-7a), 1.88 (m, 1H, H-35), 1.84 (m, 2H, H-39), 1.81 (m, 1H, H-35), 1.80 (m, 1H, H-6), 1.71 (s, 3H, H-20), 1.67 (s, 3H, H-38), 1.65 (s, 3H, H-27), 1.64 (s, 3H, H-42), 1.60 (s, 3H, H-33), 1.57 (s, 3H, H-43), 1.56 (s, 3H, H-21), 1,48 (s, 3H, H-34a), 1.48 (m, 1H, H-28), 1.40 (m, 1H, H-34b), 1.36 (m, 1H, H23a), 1.22 (m, 1H, H23b), 1,16 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 210.21 (C-9), 196.0 (C-10), 195.6 (C-1), 195.3 (C-3), 152.4 (C-14), 146.2 (C-13), 148.9 (C-31), 146.9 (C-36), 135.8 (C-19), 133.6 (C-26), 132.8 (C-41), 129.4 (C-11), 125.1 (C-16), 125.6 (C-25), 125.1 (C-40 et C-16), 121.26 (C-18), 117.9 (C-2), 117.3 (C-12), 115.0 (C-15), 113.4 (C-32), 110.4 (C-37), 70.5 (C-4), 60.2 (C-8), 53.9 (C-5), 44.7 (C-30), 43.6 (C-7), 41.2 (C-6), 37.7 (C-29), 36.8 (C-35), 36.42 (C-23), 32.08 (C-34), 29.98 (C-24), 26.60 (C-17), 26.44 (C-20), 26.0 (C-27), 25.90 (C-42), 24.01 (C-39), 22.8 (C-38), 19.4 (C-22), 18.4 (C-21), 18.21 (C-28), 17.8 (C-33), 17.70 (C-43).



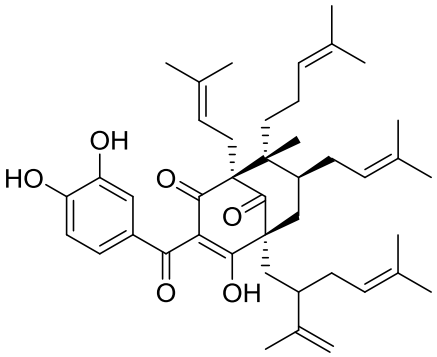
Spectre ^{1}H RMN de la guttiférone C **39**



Spectre ^{13}C RMN de la guttiférone C **39**

Guttiférone D **40** (en mélange)

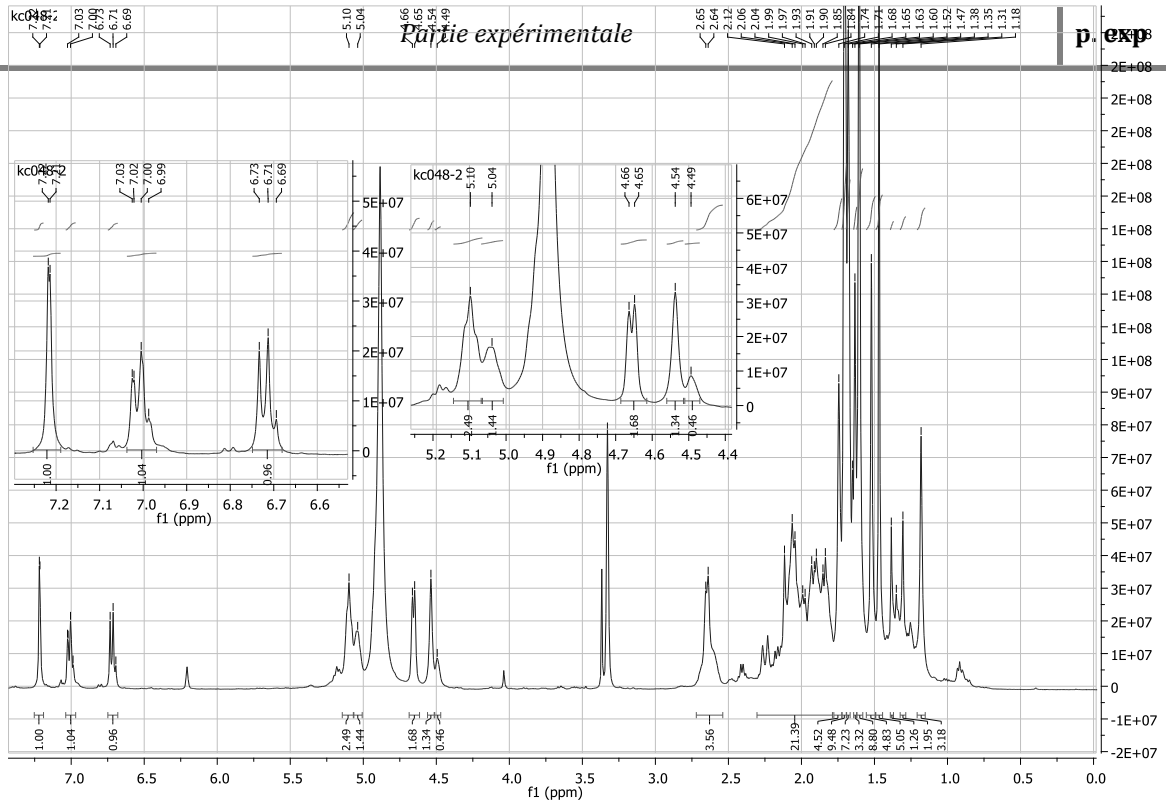
1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



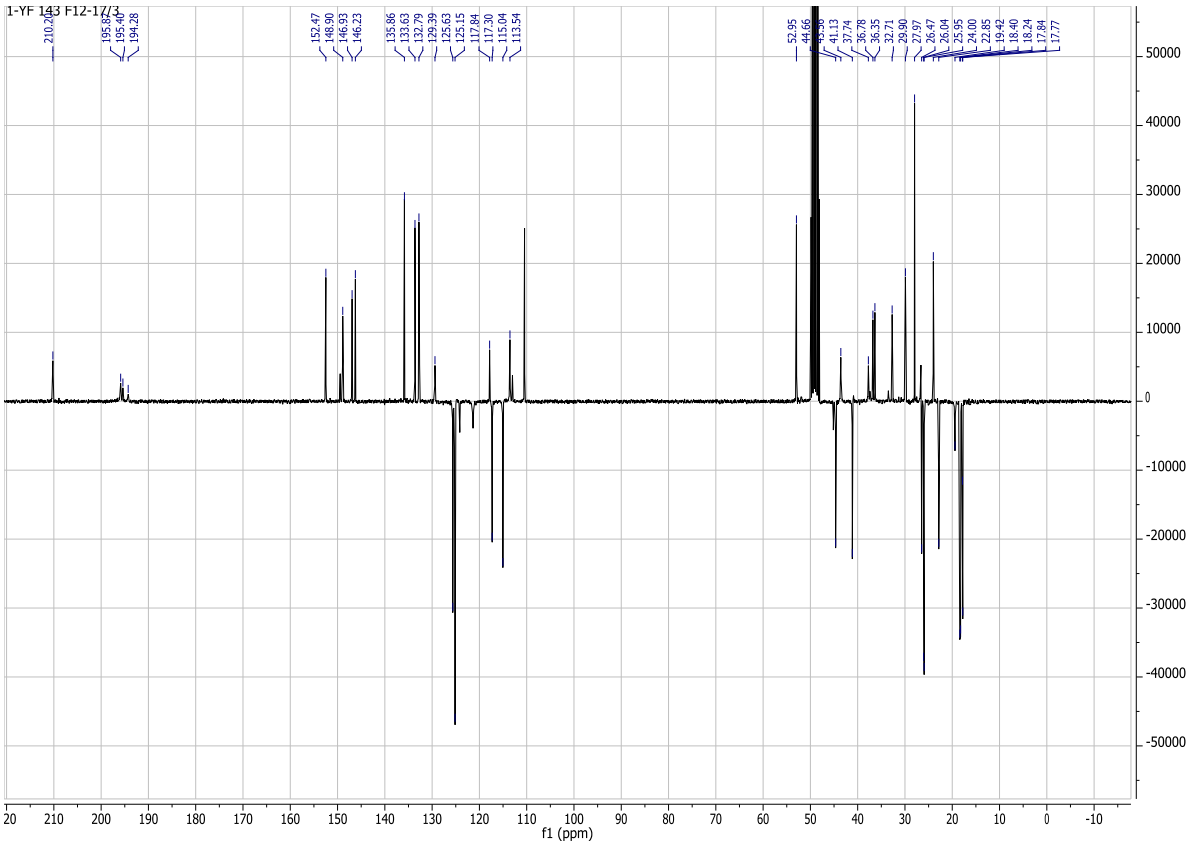
- **Isolée** à partir du fractionnement des extrait méthanolique par CPC (20 : 1 : 20 : 1) des graines, de *Symphonia globulifera* en mélange avec la guttiférone C.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{43}H_{58}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : 89 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 669 (M-H)

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.18 (m, 1H, H-12), 6.98 (m, 1H, H-16), 6.69 (m, 1H, H-15), 5.08 (m,1H, H-40), 5.02 (m, 1H, H-18), 4.89 (m, 1H, H-25), 4.63 (m, 1H, H-37), 4.51 (m, 1H, H-32), 2.62 (m, 2H, H-17), 2.55 (m, 2H, H-30), 2.22 (m,1H, H-7b), 2.02 (m, 2H, H7a), 1.98 (m, 1H, H-29b), 1.90 (m, 2H, H-29a et H-7a), 1.88 (m, 1H, H-35), 1.84 (m, 2H, H-39), 1.81 (m, 1H, H-35), 1.80 (m, 1H, H-6), 1.71 (s, 3H, H-20), 1.67 (s, 3H, H-38), 1.65 (s, 3H, H-27), 1.64 (s, 3H, H-42), 1.60 (s, 3H, H-33), 1.57 (s, 3H, H-43), 1.56 (s, 3H, H-21), 1,48 (s, 3H, H-34a), 1.48 (m, 1H, H-28), 1.40 (m, 1H, H-34b), 1.36 (m, 1H, H23a), 1.22 (m, 1H, H23b), 1,16 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 210.21 (C-9), 196.0 (C-10), 195.6 (C-1), 195.3 (C-3), 152.4 (C-14), 146.2 (C-13), 148.9 (C-31), 146.9 (C-36), 135.8 (C-19), 133.6 (C-26), 132.8 (C-41), 129.4 (C-11), 125.1 (C-16), 125.6 (C-25), 125.1 (C-40 et C-16), 121.26 (C-18), 117.9 (C-2), 117.3 (C-12), 115.0 (C-15), 113.4 (C-32), 110.4 (C-37), 70.5 (C-4), 60.2 (C-8), 53.9 (C-5), 44.7 (C-30), 43.6 (C-7), 41.2 (C-6), 37.7 (C-29), 36.8 (C-35), 36.42 (C-23), 32.08 (C-34), 29.98 (C-24), 26.60 (C-17), 26.44 (C-20), 26.0 (C-27), 25.90 (C-42), 24.01 (C-39), 22.8 (C-38), 19.4 (C-22), 18.4 (C-21), 18.21 (C-28), 17.8 (C-33), 17.70 (C-43).



Spectre ^{1}H RMN de la guttiférone C **40**

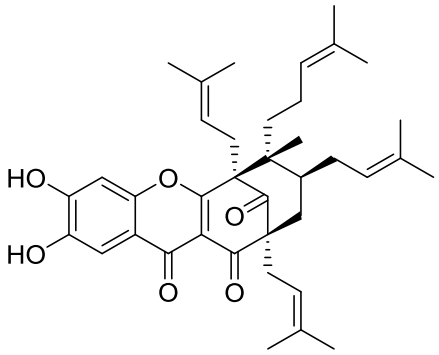


Spectre ^{13}C RMN de la guttiférone D **40**

3,16-oxy-guttiférone A **74**

1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement

ou bio-transformations
ou électrosynthèse
ou chimie organique



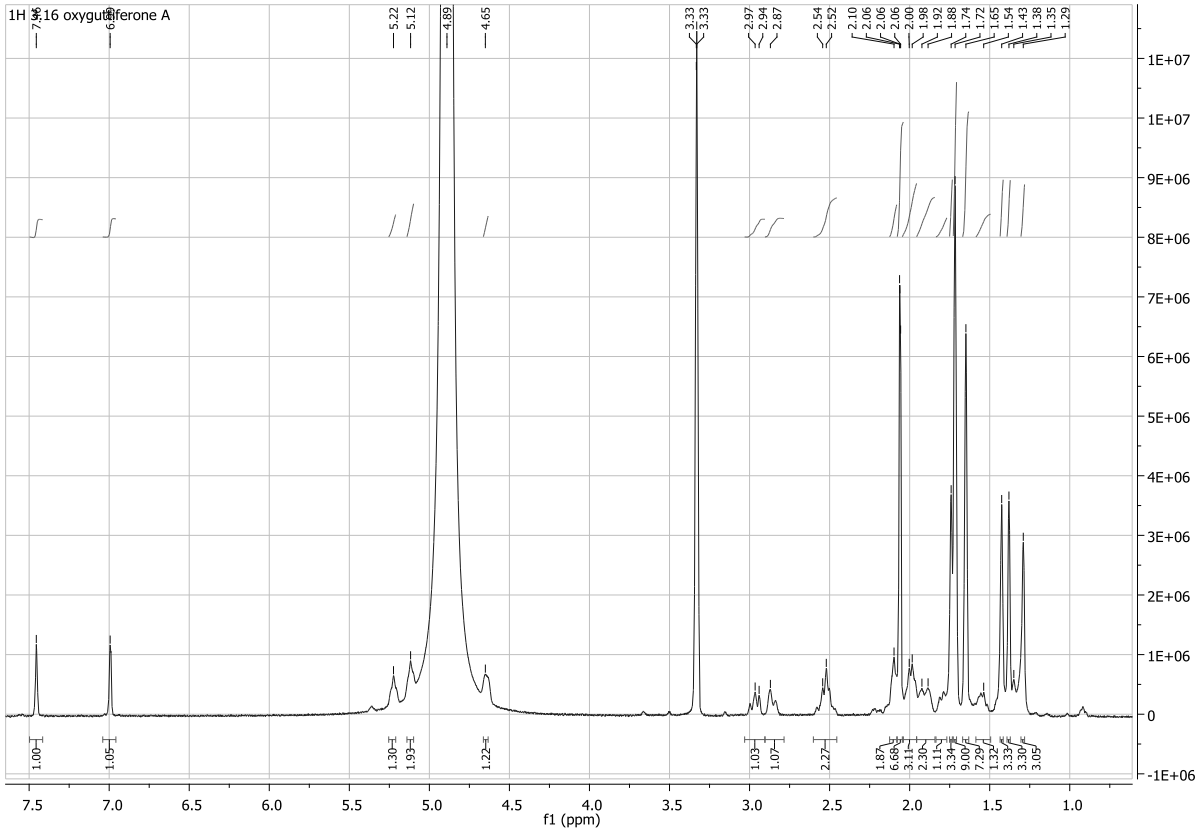
- **Isolée** à partir du fractionnement de l'extrait méthanolique des graines de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.029 %.
- **Bio-transformé** La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq) sont diluées dans 2mL de DMF et ajouté dans un milieu YMS contenant la biomasse du micro-organisme SG1. Apres une semaine de culture à 37 °C, la biomasse et le surnageant sont extraits, acidifiés par des solvants organiques. Après plusieurs lavages à l'HCL 1M les extraits sont purifiées par HPLC pour obtenir **74** avec un rendement de 50 %.
- **Electro-Synthèse** : La guttiferone A (60.7 mg, 0.1 mmol) est dissoute dans 200mL de méthanol contenant du Et4N+ Cl− (165.5 mg, 1 mmol) et Me4N+ OH− (42 µL d'une solution à 25 wt % dans le MeOH, 0.1 mmol). Cette solution fut oxydé sous flux d'azote a température ambiante par une électrode en carbone graphite (Eox = +0.35 V vs Ag/ AgCl). Après une oxydation complète (2.0 F mol−1), une solution d'HCL (0.1 mol L−1 , 100 mL) fut ajoutée à la solution méthanolique. Ce brut réactionnel fut concentré jusqu'à 100 mL sous pression réduite à 40°C et extrait par de AcEtO (2 × 50 mL). Les phases organiques furent séchées sur Na_2SO_4 et évaporées. Le brut réactionel fut purifié par HPLC préparative (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H2O + 0.1% HCO2H), 75:25 → 95:5 sur50 min), pour obtenir **74** avec un rendement de 53%.
- **Synthèse** : La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq), le carbonate de lithium (49 mg, 6.6 10^{-4} mol, 10 éq) et le ferricyanure de potassium (217 mg, 6.6 10^{-4} mol, 10 éq) sont dissouts dans un mélange méthanol/eau et placés sous atmosphère inerte et agitation. Après 20 minutes, le milieu réactionnel est acidifié (HCl 1M) puis extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis

évaporée à sec. Elle est enfin purifiée par HPLC (gradient ACN/H2O) pour obtenir **75** avec un rendement de 51 **%**

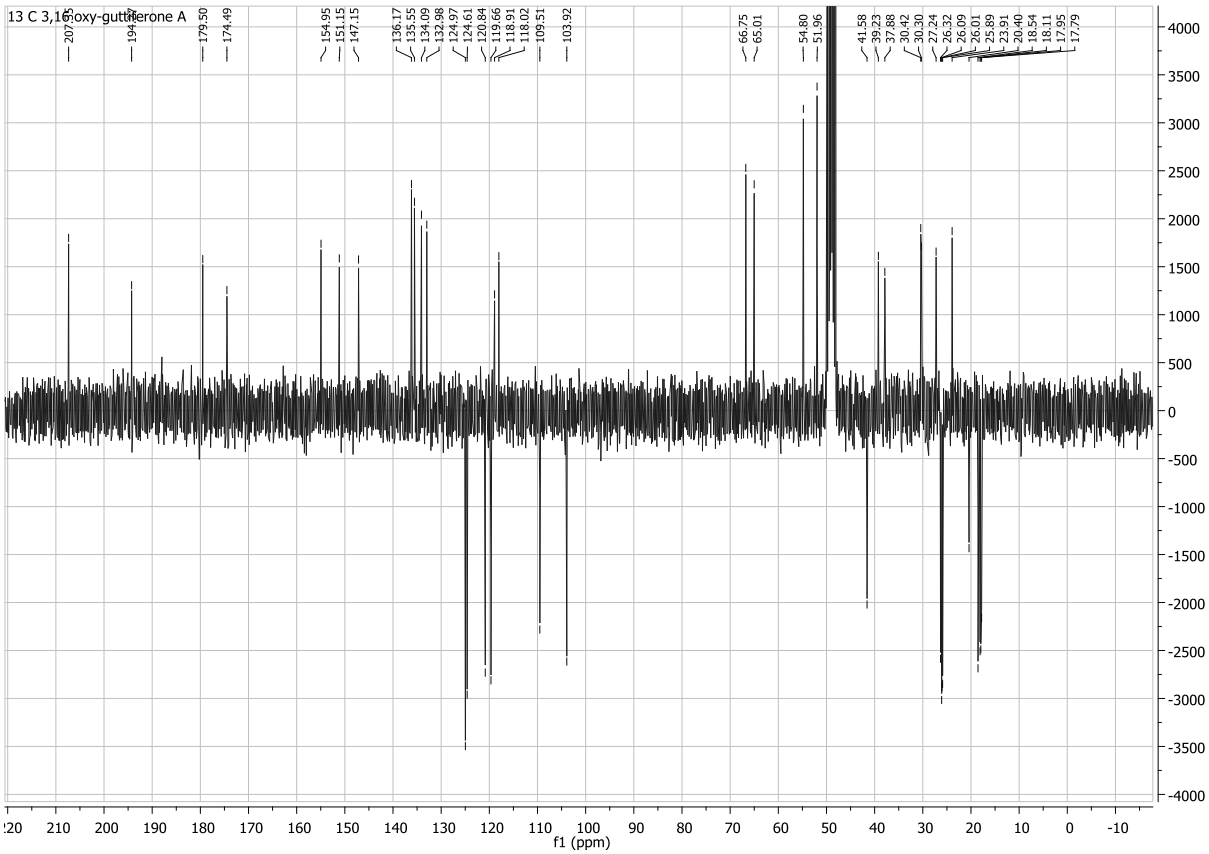
- **Synthèse** : La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq) et le DDQ (18mg, 8 10^{-5} mol, 1.2 éq) sont placés sous atmosphère inerte et sous agitation. 5mL de toluène préalablement distillé est rajouté .La réaction est arrêtée après 12 heures d'agitation a température ambiante par ajout d'eau. Après évaporation du toluène sous pression réduite, la phase organique est extraite de nombreuses fois par un mélange DCM/eau, séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à sec. Le brut réactionnel à purifier par HPLC préparative (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ H_2O , 75:25 → 95:5 sur 50 min) pour obtenir **75** (*Tr* = 26 min) avec un rendement de 28 %.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{48}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +44 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 599.3373 (M-H)

^{1}H RMN (400MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7,44(s, 1H, H-15), 6,95 (s, 1H, H-12), 5,23 (t,*J*=7,69 Hz, 1H, H-30), 5,11 (t,*J*=6,93 Hz, 1H, H-35), 4,89 (m,1H, H-25), 4,58 (m, 1H, H-18), 2,95 (m, 2H, H-17), 2,51 (t,*J*=7,57 Hz, 2H, H-29), 2,09 (t,*J*=5,64 Hz, 2H, H-7), 1,97 (m,2H, H-34), 1,93 (m, 2H, H-24), 1,88 (m,1H, H-6), 1,73 (s,3H, H-20), 1,72 (s, 9H, H-32, H-33, H-38), 1,64 (s,6H, H-37, H-28),1,54 (d,*J*=7,38 Hz, 2H, H-23), 1,42 (s,3H, H-21), 1,37 (s,3H, H-27), 1,29 (s,3H, H-22).

NMR 13C Jmod (75 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 207.39 (C-9), 194.38 (C-1), 179.52 (C-3), 174.49 (C-10), 154.96 (C-14), 151.15 (C-12), 147.15 (C-15), 136.17(C-19), 135.54 (C-31), 134.09 (C-26), 132.98 (C-36), 124.98 (C-35), 124.60 (C-25), 120.83 5c-30),119.67 (C-18), 118.91 (C-2), 118.02 (C-11), 109.52 (C-16), 103.92 (C-13), 66.75 (C-8), 65.02 (C-4),51.96 (C-5), 41.58 (C-6), 39.24 (C-7), 37.89 (C-23), 30.42 (C-24), 30.30 (C-29), 27.40 (C-17), 26.32(C-38), 26.10 (C-28), 26.03 (C-33), 25.90 (C-21), 23.91 (C-34), 20.41 (C-22), 18.65 (C-20), 18.12(C-32), 17.95 (C-27), 17.79 (C-37)



Spectre ^{1}H RMN de la 3.16-oxy-guttiférone A **74**

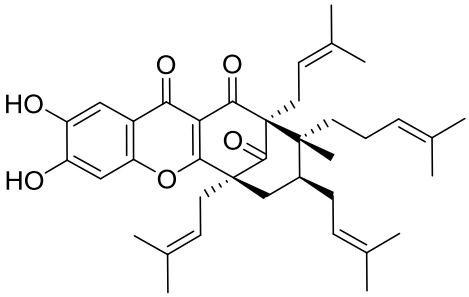


Spectre ^{13}C RMN de la 3.16-oxy-guttiférone A**74**

1,16-oxy-guttiférone A **75**

1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement

ou bio-transformations
ou électrosynthèse
ou chimie organique



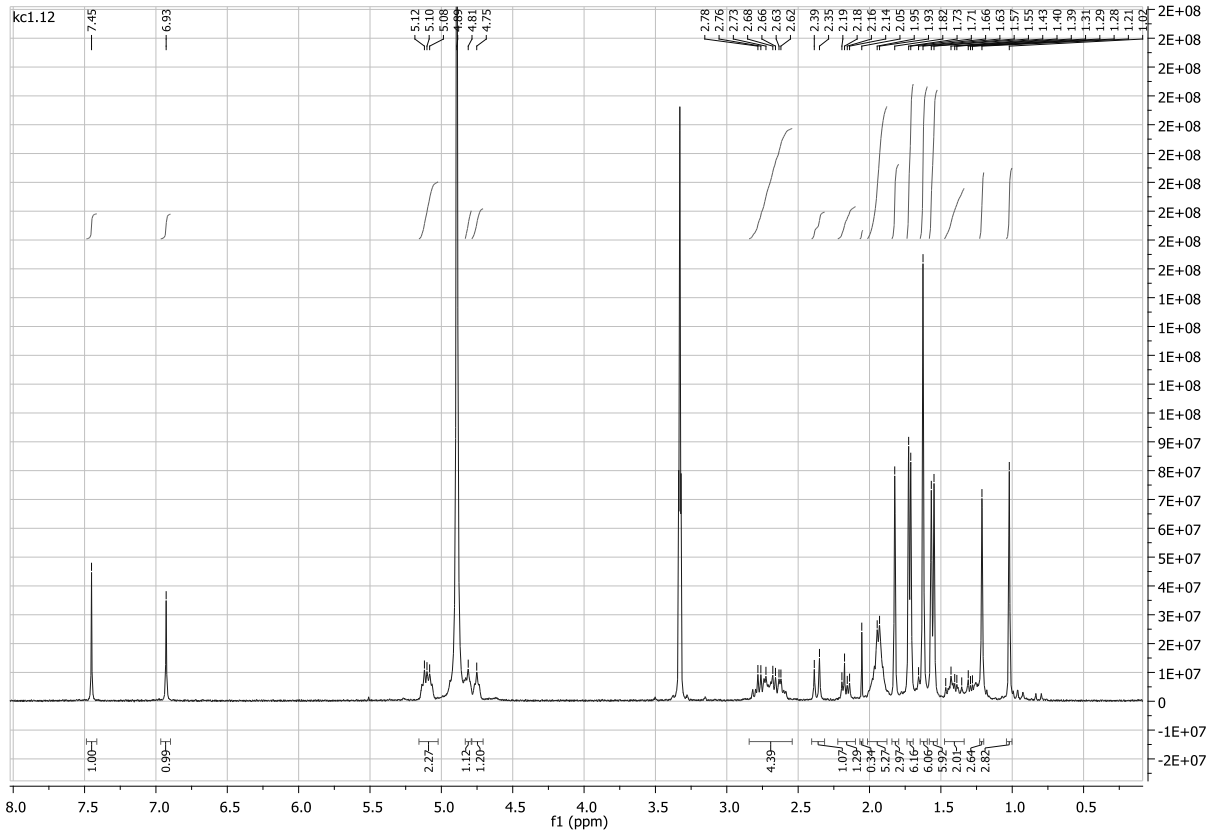
- **Isolée** à partir du fractionnement de l'extrait méthanolique des graines de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.007 %.
- **Bio-transformé** La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq) sont diluées dans 2mL de DMF et ajouté dans un milieu YMS contenant la biomasse du micro-organisme SG1. Apres une semaine de culture à 37 °C, la biomasse et le surnageant sont extraits, acidifiés par des solvants organiques. Après plusieurs lavages à l'HCL 1M les extraits sont purifiées par HPLC pour obtenir **75** avec un rendement de 12.5 %.
- **Electro-Synthèse** : La guttiférone A (60.7 mg, 0.1 mmol) est dissoute dans 200mL de méthanol contenant du Et4N+ Cl− (165.5 mg, 1 mmol) et Me4N+ OH− (42 µL d'une solution à 25 wt % dans le MeOH, 0.1 mmol). Cette solution fut oxydé sous flux d'azote a température ambiante par une électrode en carbone graphite (Eox = +0.35 V vs Ag/ AgCl). Après une oxydation complète (2.0 F mol−1), une solution d'HCL (0.1 mol L−1 , 100 mL) fut ajoutée à la solution méthanolique. Ce brut réactionnel fut concentré jusqu'à 100 mL sous pression réduite à 40°C et extrait par de AcEtO (2 × 50 mL). Les phases organiques furent séchées sur Na2SO4 et évaporées. Le brut réactionel fut purifié par HPLC préparative (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min), pour obtenir **75** (tr = 22.2min) avec un rendement de 25%.
- **Synthèse** : La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq), le carbonate de lithium (49 mg, 6.6 10^{-4} mol, 10 éq) et le ferricyanure de potassium (217 mg, 6.6 10^{-4} mol, 10 éq) sont dissouts dans un mélange méthanol/eau et placés sous atmosphère inerte et agitation. Après 20 minutes, le milieu réactionnel est acidifié (HCl 1M) puis extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis

évaporée à sec. Elle est enfin purifiée par HPLC (gradient ACN/H2O) pour obtenir **75** avec un rendement de 25 **%**

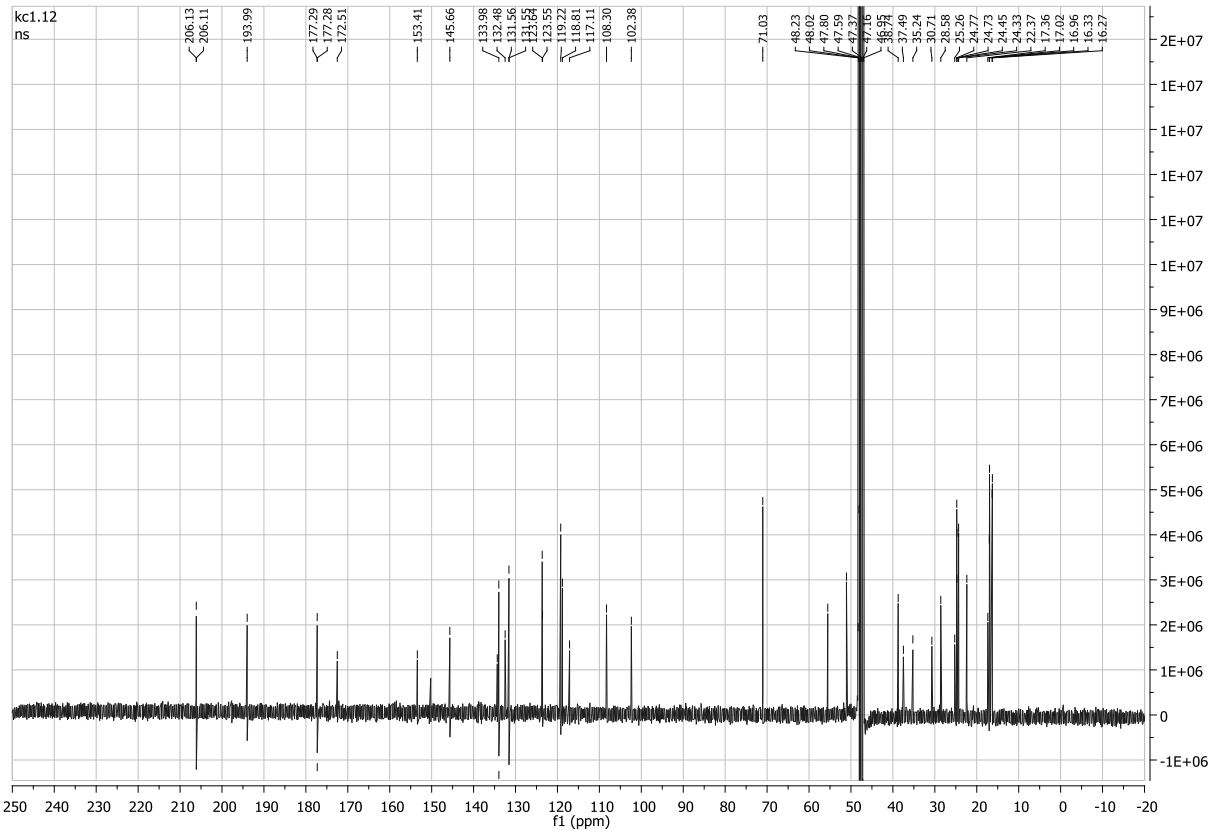
- **Synthèse** : La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq) et le DDQ (18mg, 8 10^{-5} mol, 1.2 éq) sont placés sous atmosphère inerte et sous agitation. 5mL de toluène préalablement distillé est rajouté .La réaction est arrêtée après 12 heures d'agitation a température ambiante par ajout d'eau. Après évaporation du toluène sous pression réduite, la phase organique est extraite de nombreuses fois par un mélange DCM/eau, séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à sec. Le brut réactionnel à purifier par HPLC préparative (gradient ACN/H2O) pour obtenir **75** avec un rendement de 7 %.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{48}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +53 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 599.3369 (M-H)

RMN 1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.45 (s,1H), 6.93 (s,1H), 5.11 (t, 1H, J = 8.6 Hz), 5.08 (t,1H, J = 8.5 Hz), 4.80 (t,1H, J = 6.35 Hz), 4.75 (t,1H, J = 6.95 Hz), 2.74 (d,2H, J = Hz), 2.65 (m, 2H) 2.37 (d, 1H, J = 14 Hz), 2.17 (dd, 1H, J = 7 et 14 Hz), 1.97 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.95 (m, 2H), 1.90 (m, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.61 (s,3H), 1.55 (s, 3H), 1.43 (m, 1 H), 1.27 (m, 1 H), 1.21 (s, 3H), 1.02 (s, 3H).

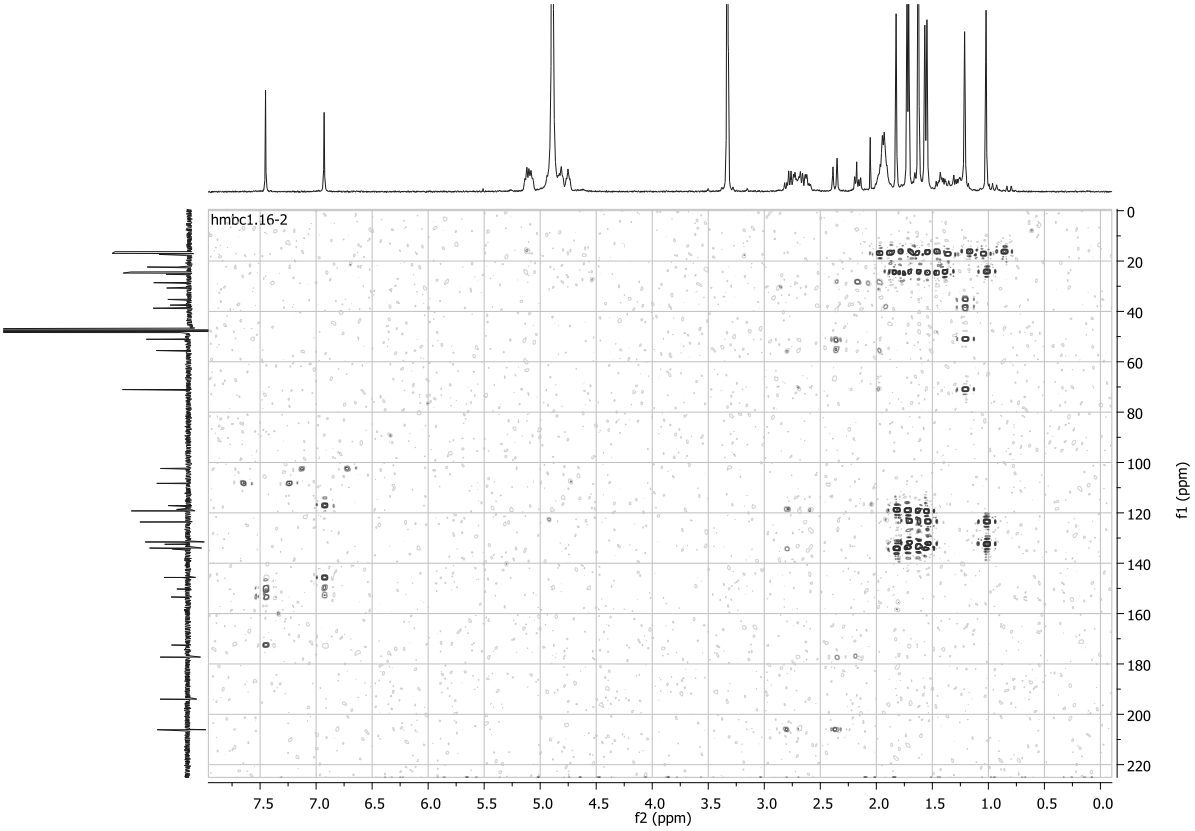
RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 206.1 (C-9), 194.0 (C-1), 177.3 (C-3), 172.5 (C-10), 153.4 (C-16), 150.2 (C-14), 145.66 (C-13), 134.4 (C-31), 134.0 (C-19), 132.5 (C-26), 131.1 (C-36), 123.6 (C-25), 123.6 (C-35), 119.2 (C-18), 118.6 (C-2), 117.11 (C-11), 108.30 (C-12), 102.4 (C-15), 71.0 (C-4), 55.5 (C-5), 38.7 (C-6), 37.5 (C-7), 35.2 (C-23), 30.7(C-29), 28.6 (C-24), 25.2 (C-17), 24.8 (C-33), 24.7 (C-21), 24.5 (C-37), 24.3 (C-28), 22.37 (C-34), 17.4 (C-22), 17.02 (C-32), 16.33 (C-27), 16.27 (C-38).



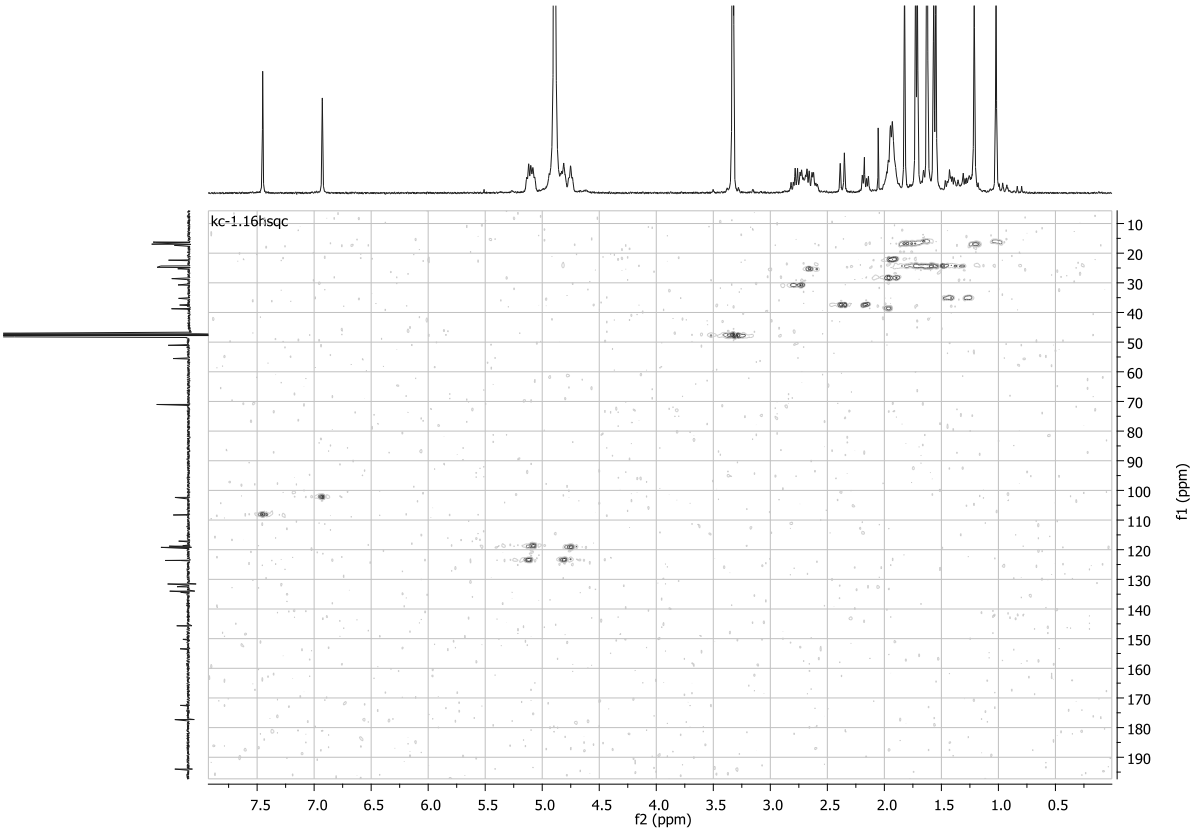
Spectre ^{1}H RMN de la 1.16-oxy-guttiférone A **75**



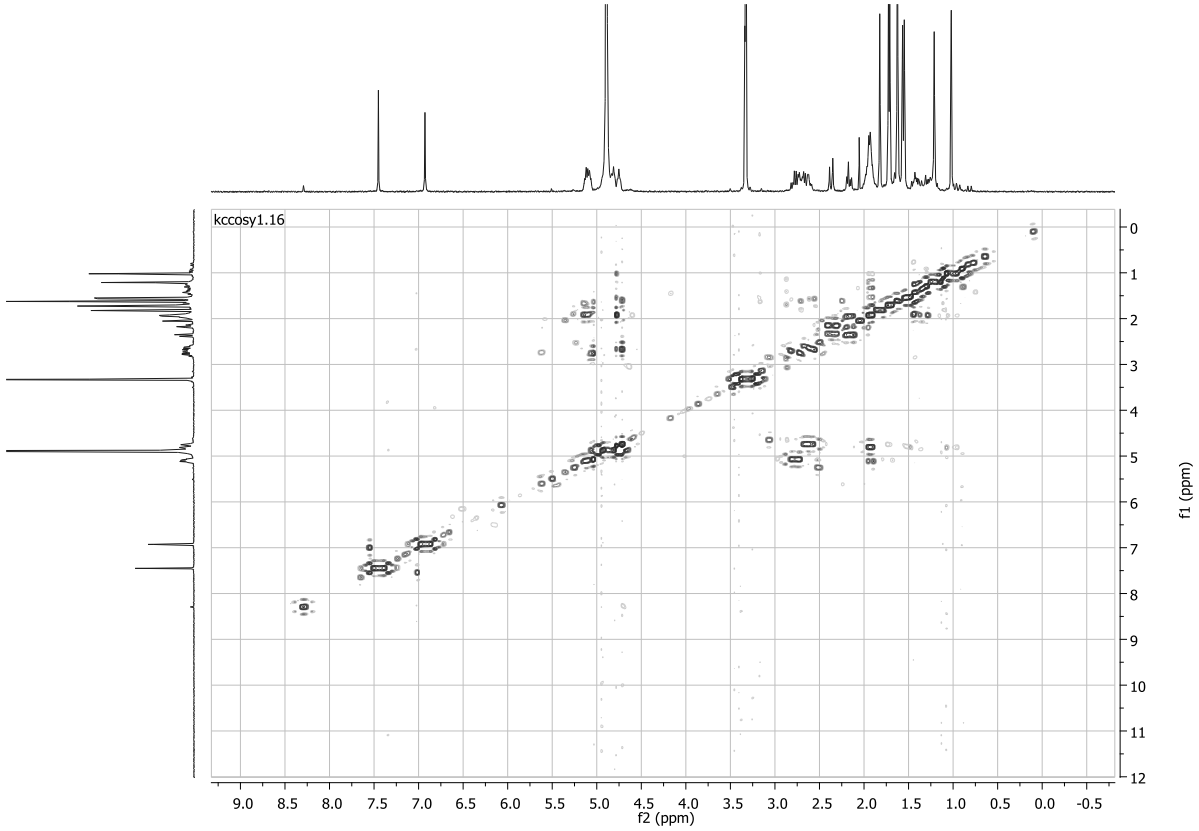
Spectre ^{13}C RMN de la 1.16-oxy-guttiférone A**75**



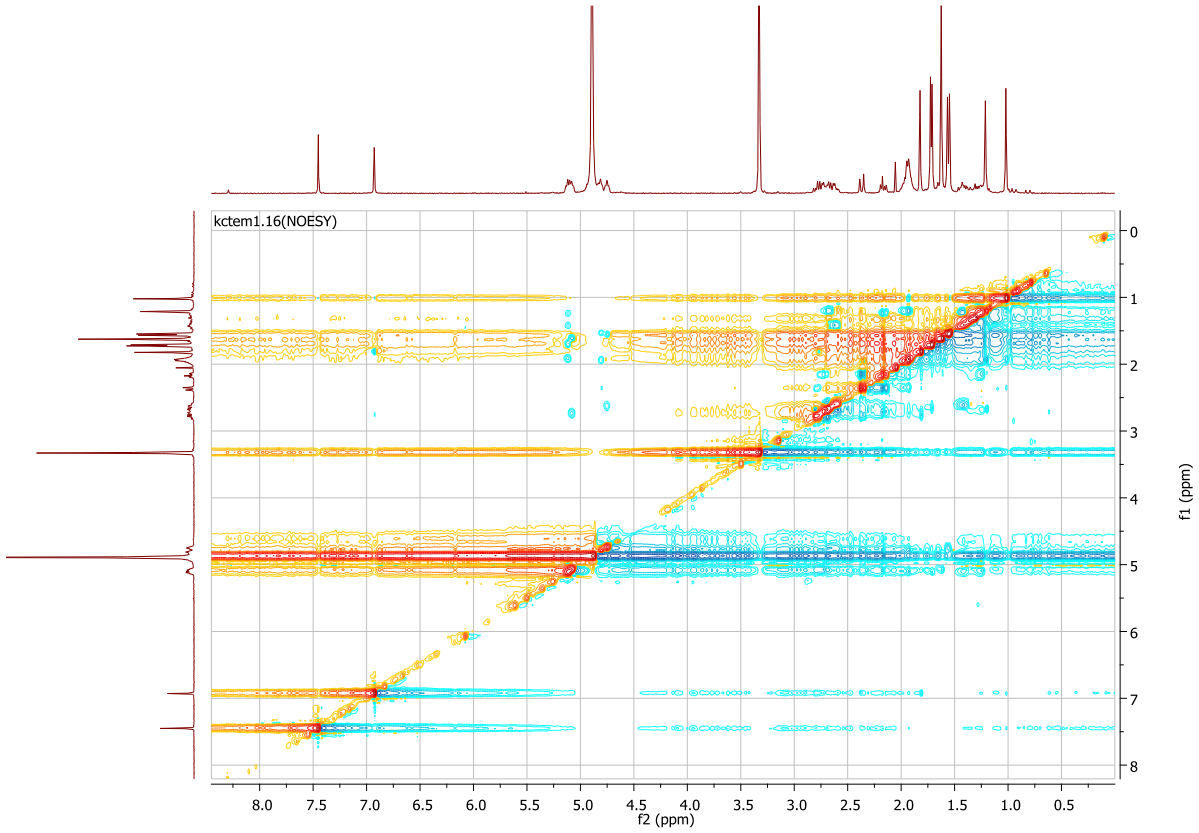
Spectre HMBC de la 1.16 oxy-guttiférone A **75**



Spectre HSQC de la 1.16 oxy-guttiférone A **75**



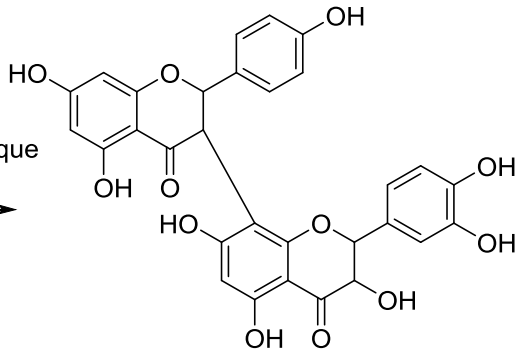
Spectre COSY de la 1.16 oxy-guttiférone A **75**



Spectre NOESY de la 1.16 oxy-guttiférone A **75**

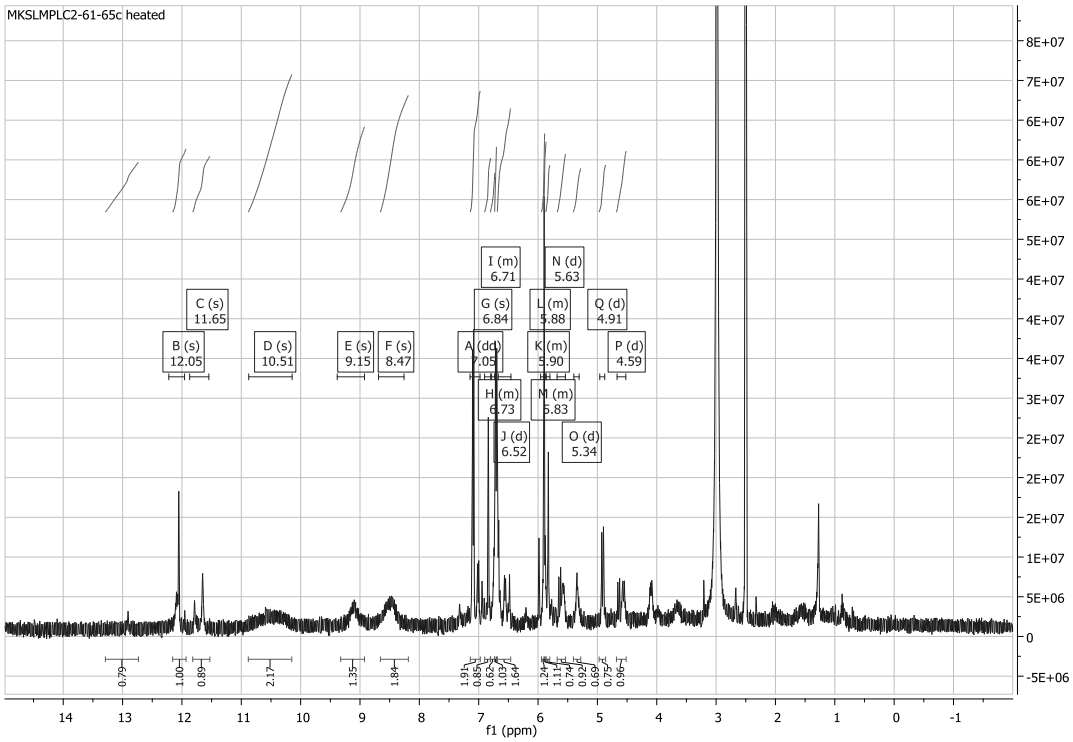
Gb2 **76**

1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



- **Isolée** à partir du fractionnement des extraits méthanolique des graines de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 0.09 %.
- **Aspect** : poudre jaune/brune
- **Formule brute** : $C_{30}H_{22}O_{12}$
- **SM** : (ESI) *m/z* 573 (M-H)

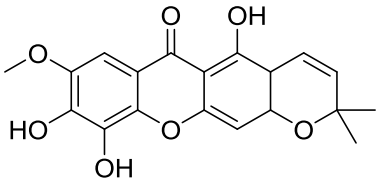
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 80ºC) : δ (ppm) : 12,91 (1H br. s,), 12,05 (1H, br. s), 11,65 (1H, br. s), 10,51 (2H br. s,), 9,15 (1H, br. s), 8,47 (2H, br. s), 7,05 (dd, 2H, J=9,14 Hz/J=9,14 Hz, H-2' et H-6'), 6,84 (s, 1H, H-6"'), 6,73 (m, 1H, H-2"'), 6,71 (m, 1H, H-5"'), 6,52 (m, 2H, H-3'et H-5'), 5,90 (m, 1H, H-8), 5,88 (m, 1H, H-6"), 5,83 (m, 1H, H-6), 5,63 (d, 1H, J=18,11 Hz, H-2), 5,34 (d, 1H, J=18,11 Hz, H-3), 4,91 (d, 1H, J=12,36 Hz, H-2"), 4,59 (d, 1H, J=12,36 Hz, H-3").



Spectre ^{1}H RMN de la Gb2 **76** dans le dmso à 80 °c

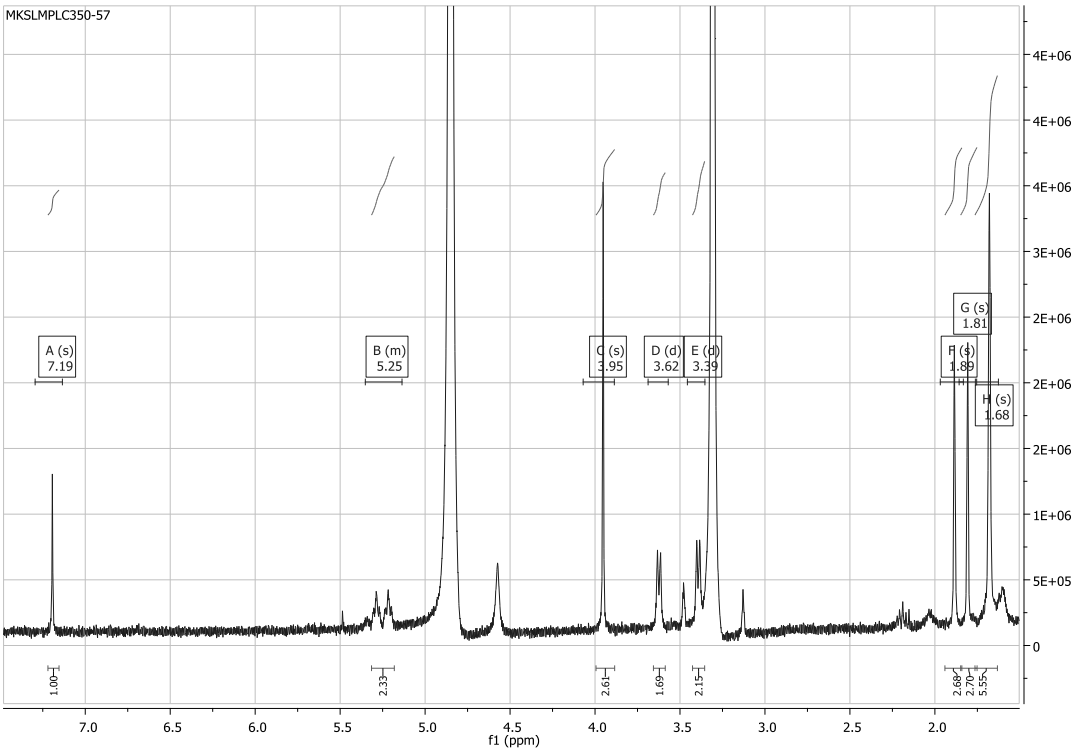
Xanthone V2a **77**

1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



- **Isolée** à partir du fractionnement de l'extrait méthanolique de latex, de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 1.15 %.
- **Aspect** : poudre jaune/brune
- **Formule brute** : $C_{24}H_{26}O_7$
- **SM** : (ESI) *m/z* 425.1605 (M-H)

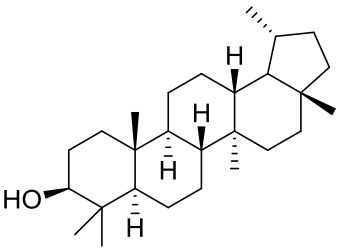
^{1}H-NMR (400MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7,19 (s, 1H, H-8), 5,25 (m, 2H -2CH), 3,95 (s, 3H, H-7, -OCH_3), 3,62 (d, 2H, J = 7,7 Hz, -CH_2), 3,39 (d, 2H, J = 7,7 Hz, -CH_2), 1,89 (s, 3H, -CH_3), 1,81 (s, 3H, -CH_3), 1,68 (s, 6H, -2CH_3).



Spectre ^{1}H RMN de la xanthone V2 **77**

Lupeol **78**

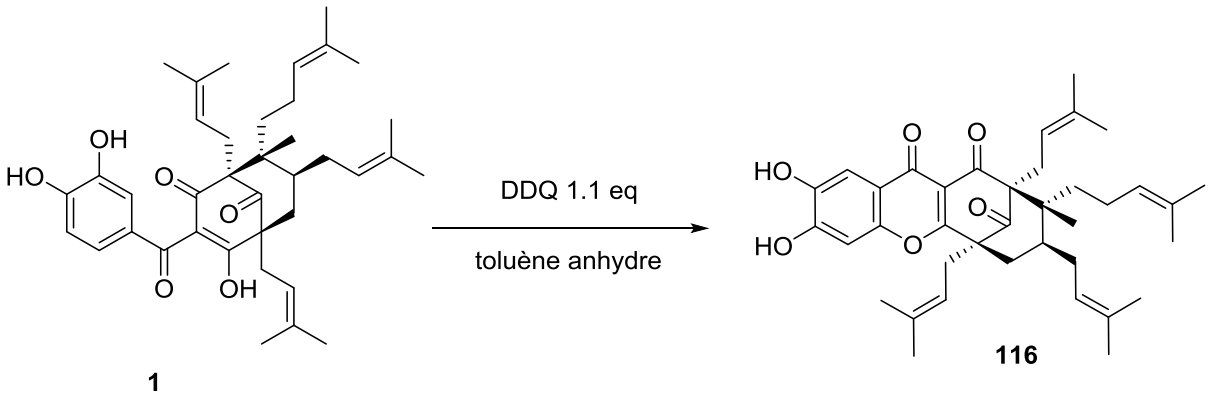
1) Extraction Méthanolique
2) Fractionnement



- **Isolée** à partir du fractionnement de l'extrait méthanolique de latex, de *Symphonia globulifera* avec un rendement de 1.2 %.
- **Aspect** : poudre blanche
- **$[\alpha]_D$** : +26 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **Formule brute** : $C_{27}H_{46}O$
- **SM** : (ESI) *m/z* 409 (M+ Na)

^{1} H NMR (CDCl3) δ 0.77, 0.80, 0.84, 0.95, 0.97, 1.03 and 1.70 (each 3H, s, H-23, 24, 25, 26 27, 28, and 30), 2.38 (1H, dt, J) 4.0 and 9.6 Hz, H-19), 3.19 (1H, dd, J) 4.8 and 11.6 Hz H-3), 4.57 (1H, brs, H-29b), 4.68 (1H, brs, H-29a)

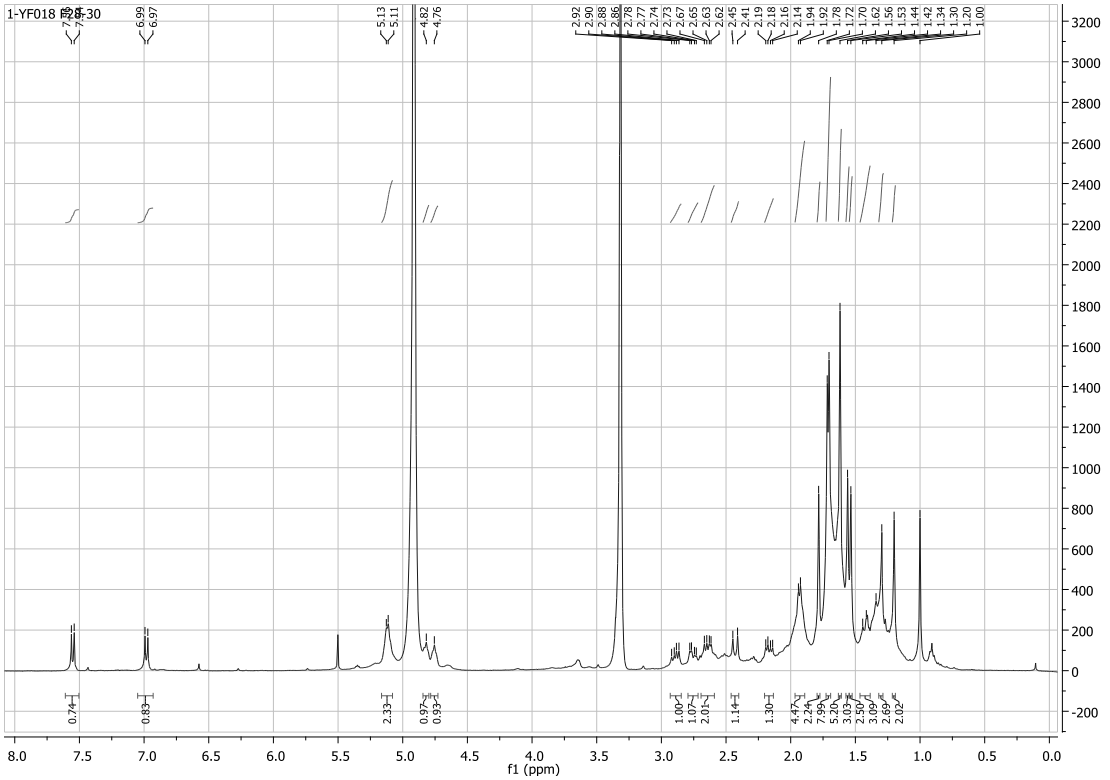
1.12 oxy-guttiférone A **116**



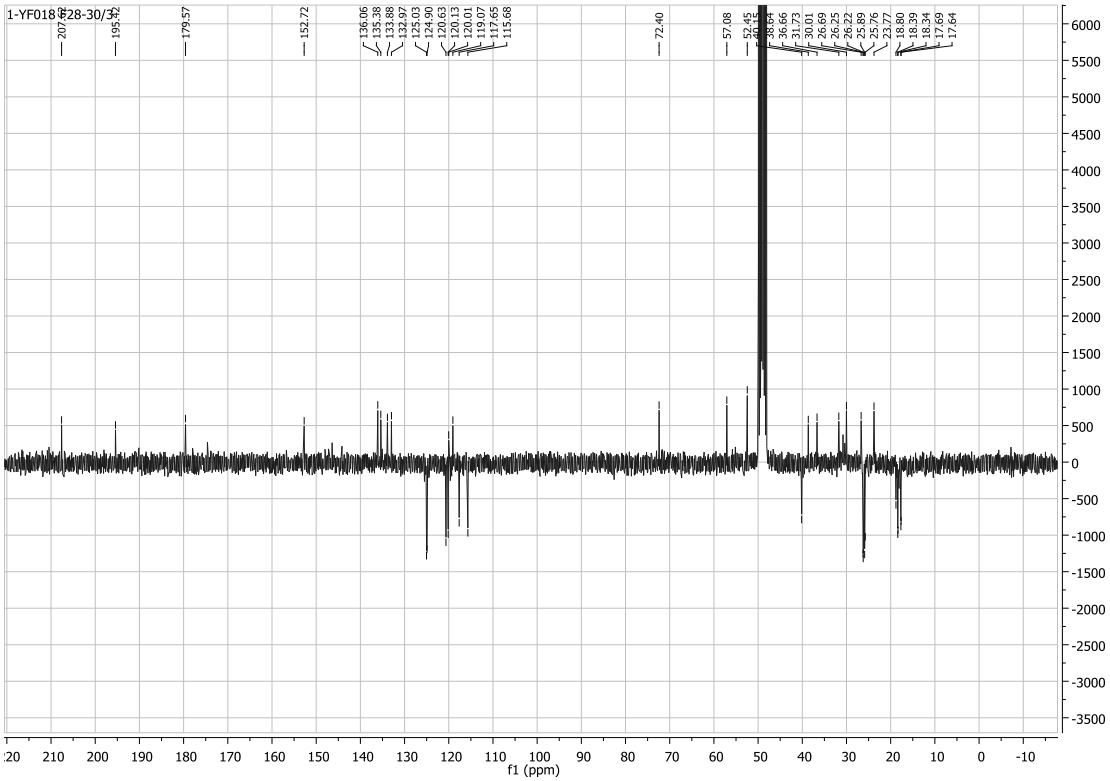
- **Synthèse** : La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq) et le DDQ (18mg, 8 x10^{-5} mol, 1.2 éq) sont placés sous atmosphère inerte et sous agitation. 5mL de toluène préalablement distillé est rajouté .La réaction est arrêtée après 12 heures d'agitation a température ambiante par ajout d'eau. Après évaporation du toluène sous pression réduite, la phase organique est extraite de nombreuses fois par un mélange DCM/eau, séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à sec. Le brut réactionel à purifier par HPLC préparative (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min) pour obtenir **116** (tr = 18 min)avec un rendement de 19 %.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{48}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +55 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 623.3359 (M+ Na)

RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) : 7.54 (d, *J* = 8.20 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.20 Hz, 1H), 5.12 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.81 (m, 1H), 4.74 (m, 1H), 2.89 (dd, *J* = 15.26-8.05 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 15.00-2.76, 1H), 2.64 (dd, *J* = 15.14-5.34 Hz, 2H), 2.42 (d, *J* = 14.30 Hz, 1H), 2.17 (dd, *J* = 14.22-6.88 Hz, 1H), 1.95 (m, 1H), 1.92 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.41 (m, 1H), 1.24 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 0.99 (s, 3H).

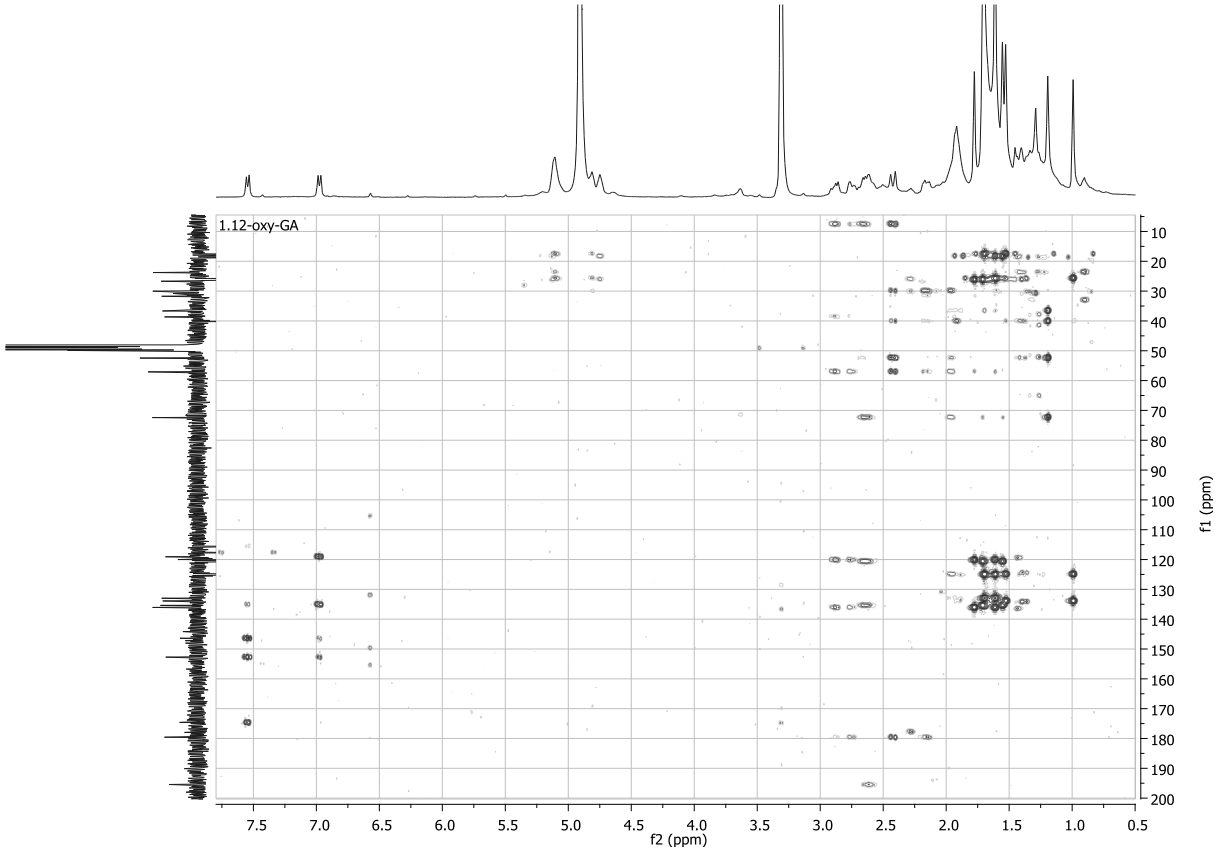
RMN ^{13}C Jmod (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) : 207.62 (C-9), 195.42 (C-3), 179.57 (C-1), 174.61 (C-10), 152.72 (C-14), 146.41 (C-16), 136.06 (C-31), 135.38 (C-19), 135.10 (C-15), 133.88 (C-36), 132.97 (C-26), 125.03 (C-25), 124.90 (C-35), 120.63 (C-18), 120 .13 (C-30), 120.02 (C-2), 119.07 (C-11), 117.65 (C-12), 115.68 (C-13), 72.4 (C-4), 57.08 (C-8), 52.45 (C-5), 40.15 (C-6), 38.64 (C-7), 36.66 (C-23), 31.73 (C-29), 30.01 (C-24), 26.69 (C-17), 26.25 (C-32), 25.76 (C-37), 26.22 (C-20), 25.89 (C-28), 25.76 (C-37), 23.79 (C-34), 18.80 (C-22), 18.39 (C-33), 18.34 (C-21), 17.69 (C-27), 17.64 (C-38).



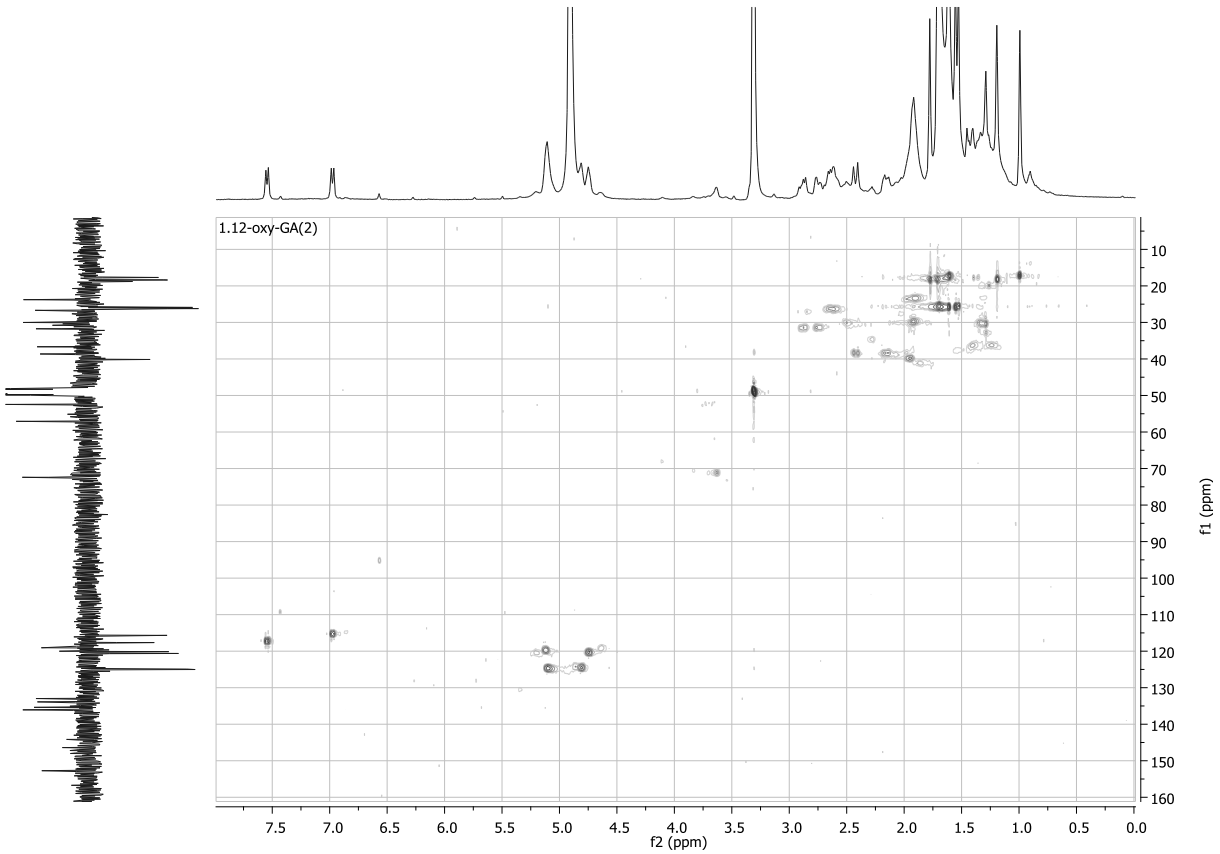
Spectre ^{1}H RMN de la 1.12-oxy-guttiférone A **116**



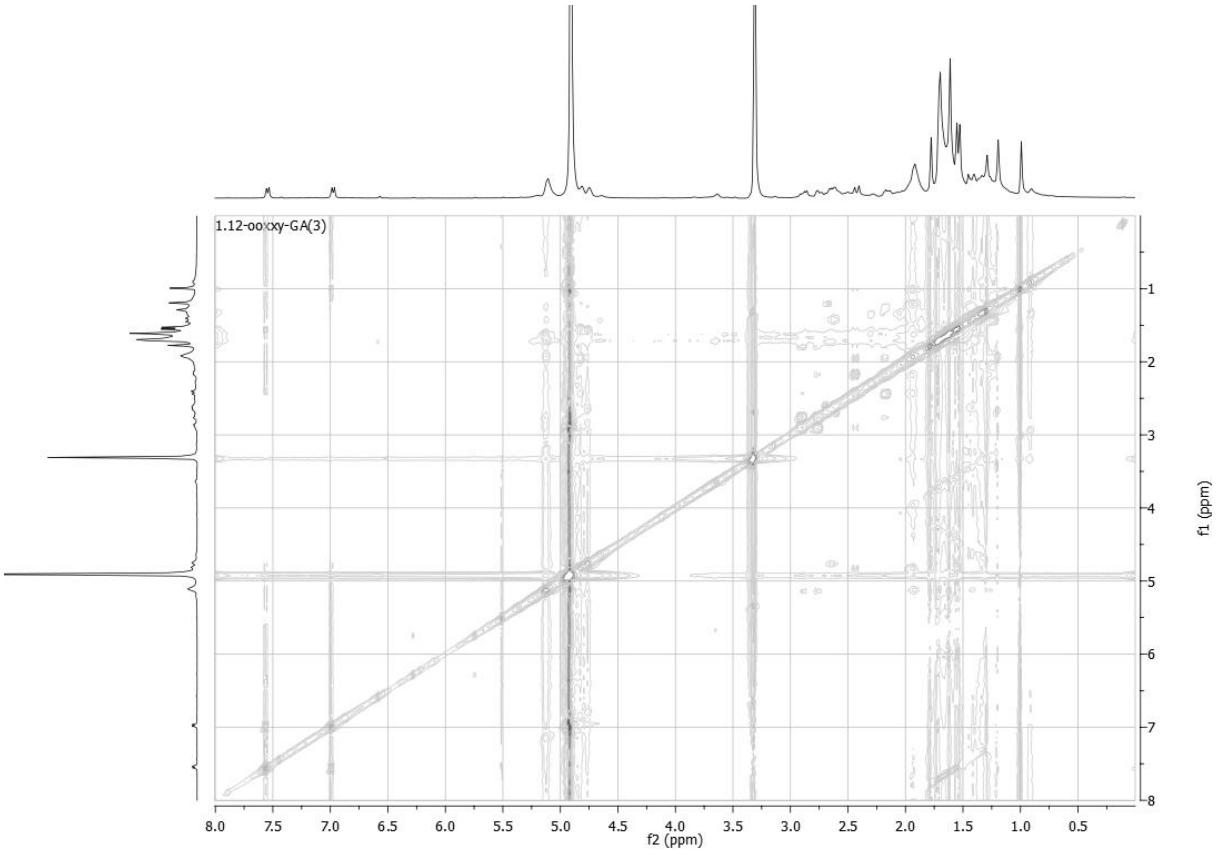
Spectre ^{13}C RMN de la 1.12-oxy-guttiférone A **116**



Spectre HMBC de la 1.12-oxy-guttiférone A **116**

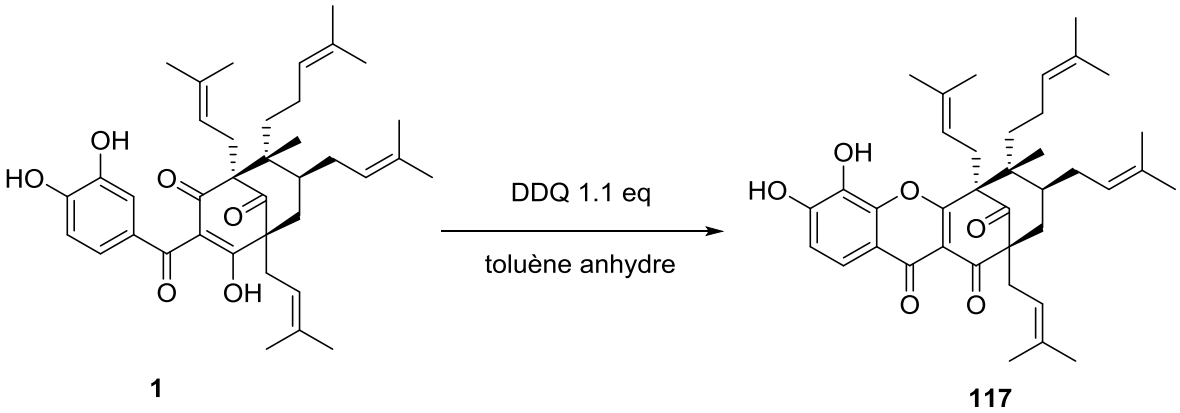


Spectre HSQC de la 1.12-oxy-guttiférone A **116**



Spectre NOESY de la 1.12-oxy-guttiférone A **116**

3.12 oxy-guttiférone A **117**

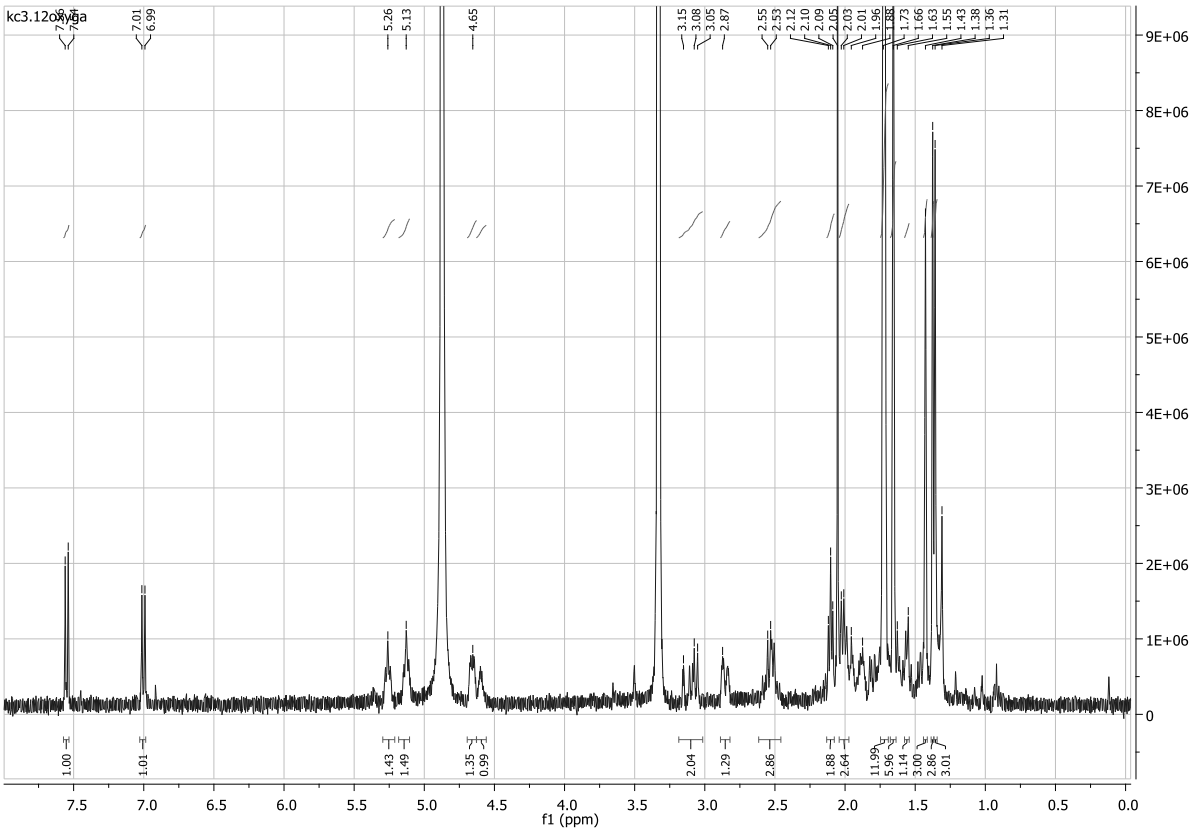


1 **117**

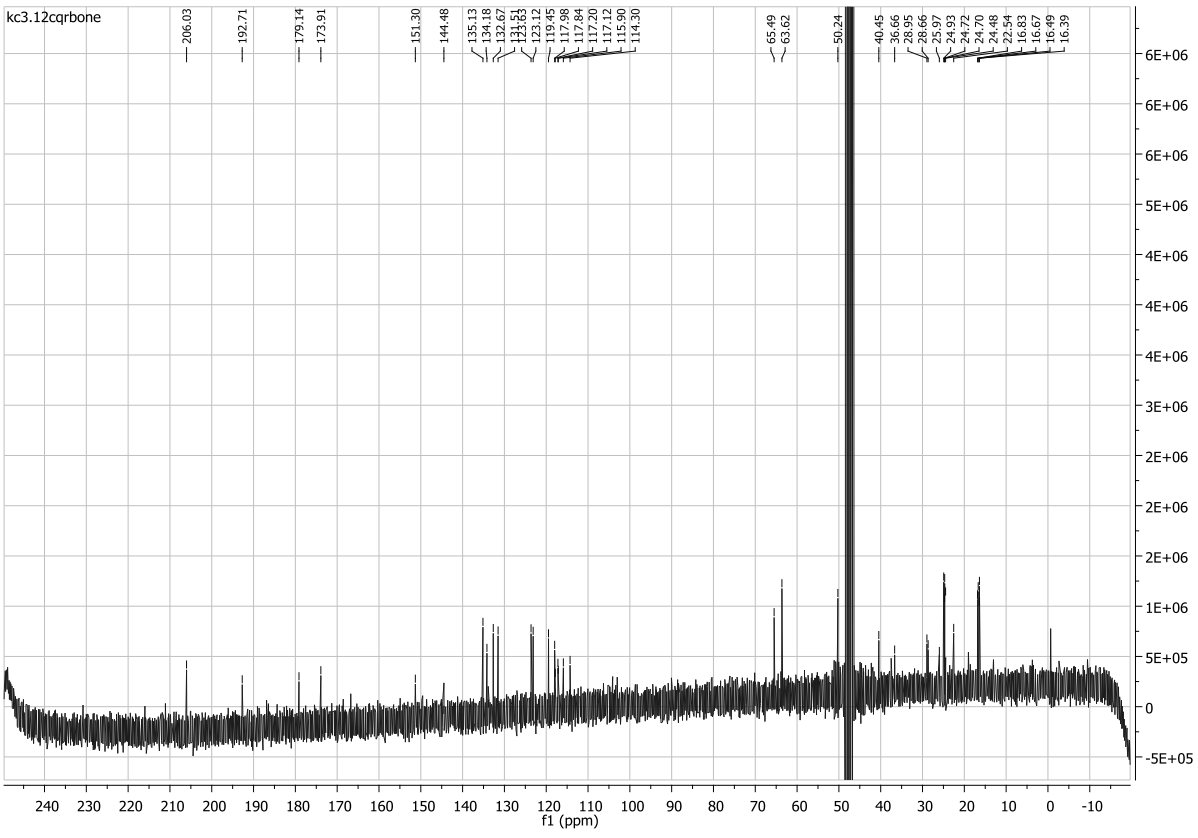
- **Synthèse** : La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq) et le DDQ (18mg, 8x 10^{-5} mol, 1.2 éq) sont placés sous atmosphère inerte et sous agitation. 5mL de toluène préalablement distillé est rajouté .La réaction est arrêtée après 12 heures d'agitation a température ambiante par ajout d'eau. Après évaporation du toluène sous pression réduite, la phase organique est extraite de nombreuses fois par un mélange DCM/eau, séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à sec. Le brut réactionel à purifier par HPLC préparative (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur 50 min) pour obtenir **117** (tr= 22 min) avec un rendement de 7%.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{48}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +48 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 623.3359 (M+ Na)

RMN 1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm) : 7.54 (d, J = 8.20 Hz, 1H, H-16), 7.00 (d, J = 8.20 Hz, 1H, H-15), 5.26 (m, 1H, H-30), 5.12 (m, 1H, H-25), 4.76 (m, 1H, H-35), 4.65 (m, 1H, H-18), 3.07 (m, 1H) , 2.94-2.86 (m, 2H, H-17), 2.59-2.49 (m, 2H, H-29), 2.10 (t, J= 5.65Hz, H-7), 2.02 (m, H-24), 1.90-1.85 (m,H-6), 1.82 (d, H-34), 1.72 (s, 12H, H-27 et H-37 et H-21 et H-33), 1.66 (s, 6H, H-38 et H-28), 1.58-1.54 (m, 3H, H-23) , 1.43 (s, 3H, H-32), 1.38 (s, 3H, H-20), 1.36 (s, 3H, H-22), 1.21 (m, 2H, H-34)

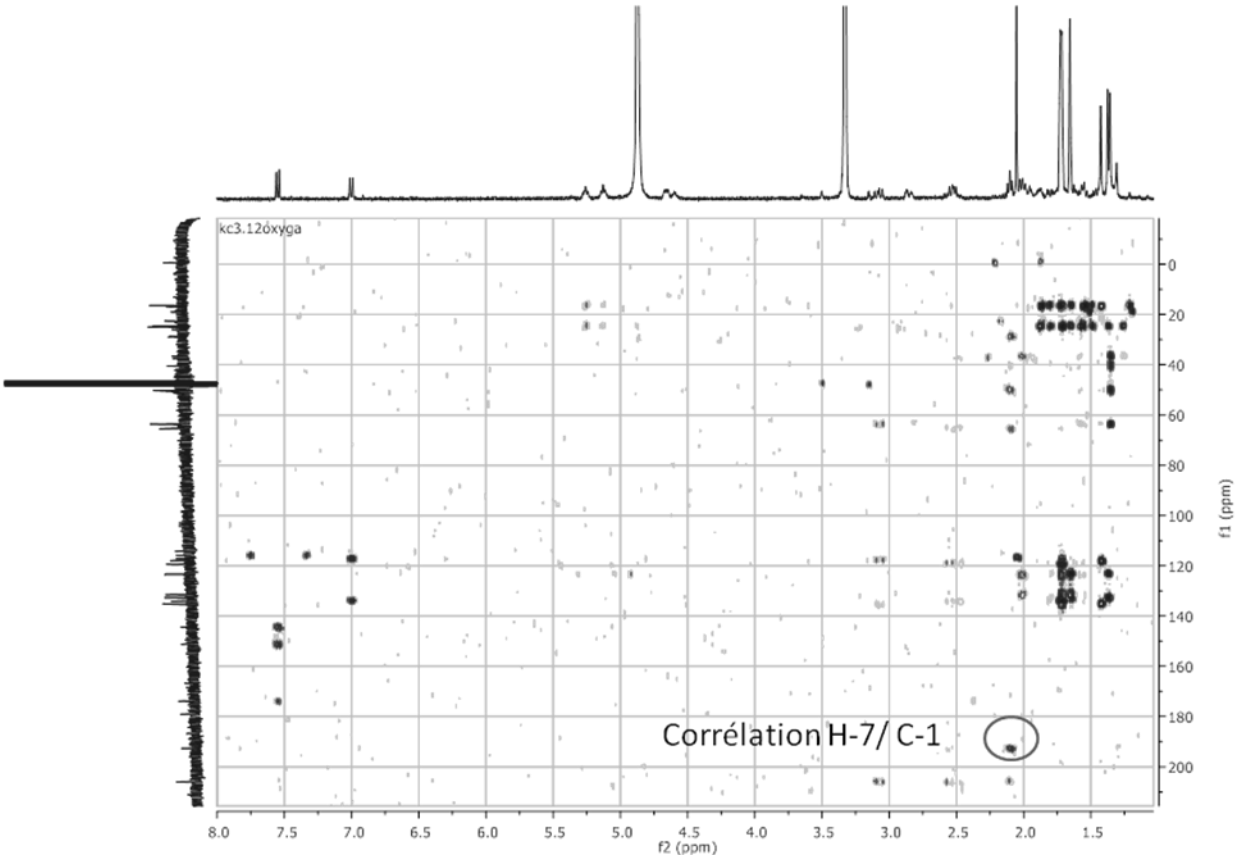
RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 206.03 (C-9) , 192.71 (C-1) , 179.14 (C-3), 173.91 (C-10), 151.30 (C-14), 144.48 (C-12), 135.13 (C-19), 134.18 (C-31), 133.86 (C-13), 132.67 (C-36), 131.51 (C-26), 123.63 (C-25), 123.12 (C-35), 119.45 (C-30), 117.98 (C-18), 117.84 (C-2), 117.20 (C-11), 117.12, 115.90 (C-16), 114.30 (C-15), 65.49 (C-8), 63.62 (C-4), 50.24 (C-5), 40.45 (C-6), 36.66 (C-7), 28.95 (C-34), 28.66 (C-29), 24.93 (C-28), 24.72 (C-38), 24.70 (C-32), 24.48 (C-21), 22.54 (C-28), 16.83(C-37), 16.67 (C-27), 16.49 (C-22), 16.39 (C-33).



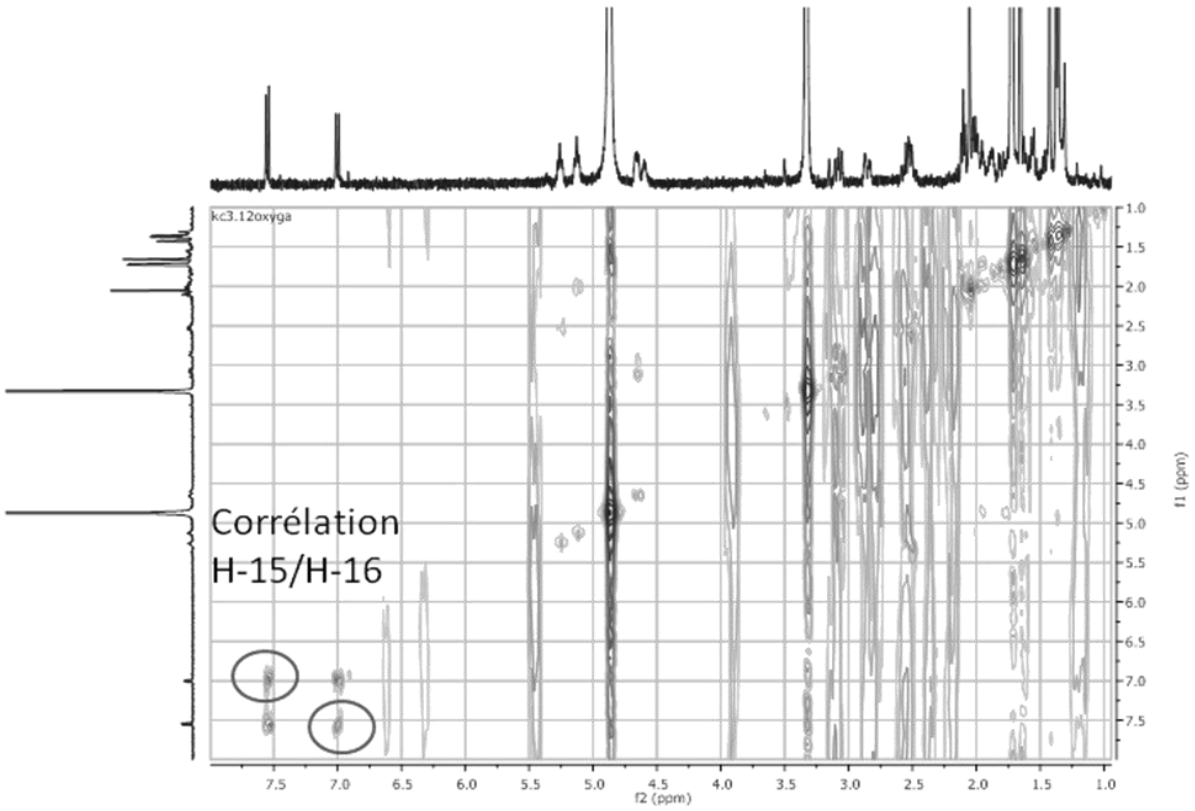
Spectre ^{1}H RMN de la 3.12-oxy-guttiférone A **117**



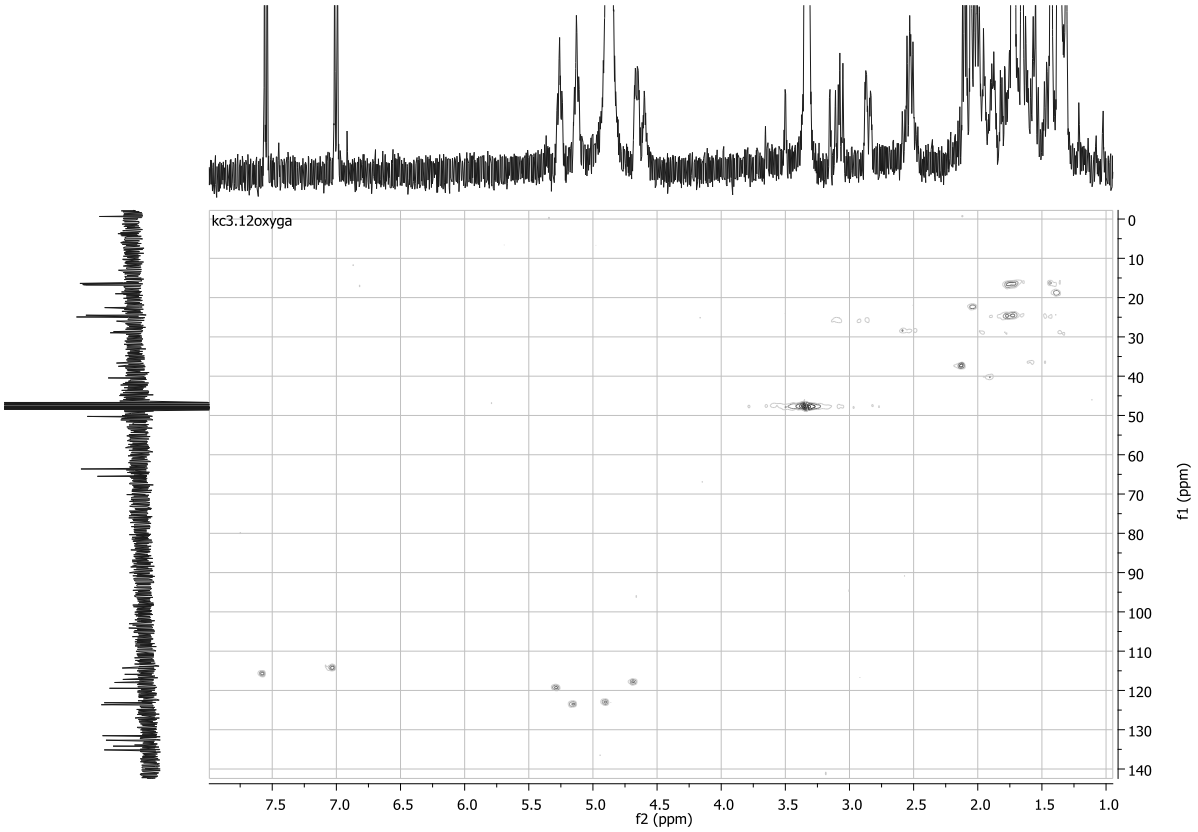
Spectre ^{13}C RMN de la 3.12-oxy-guttiférone A **117**



Spectre HMBC de la 3.12 oxy-guttiférone A **117**

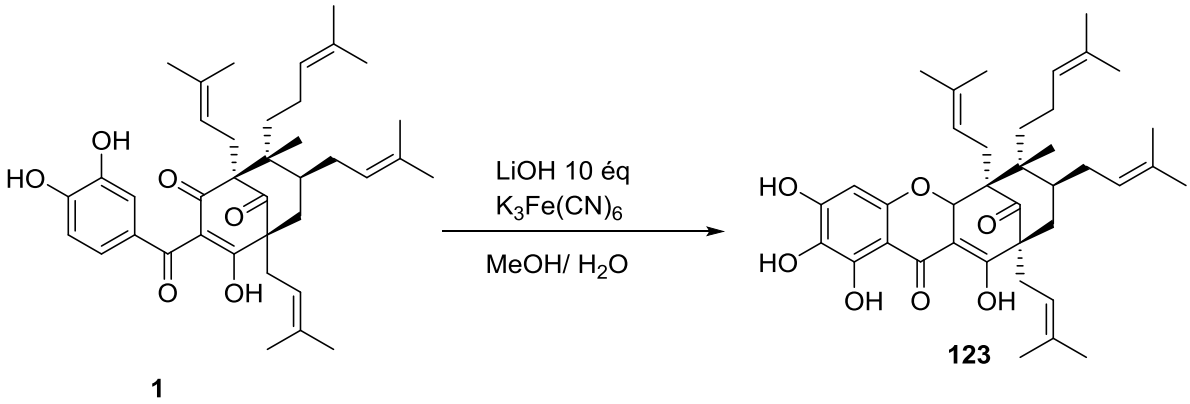


Spectre NOESY de la 3.12 oxy-guttiférone A **117**



Spectre HSQC de la 3.12 oxy-guttiférone A **117**

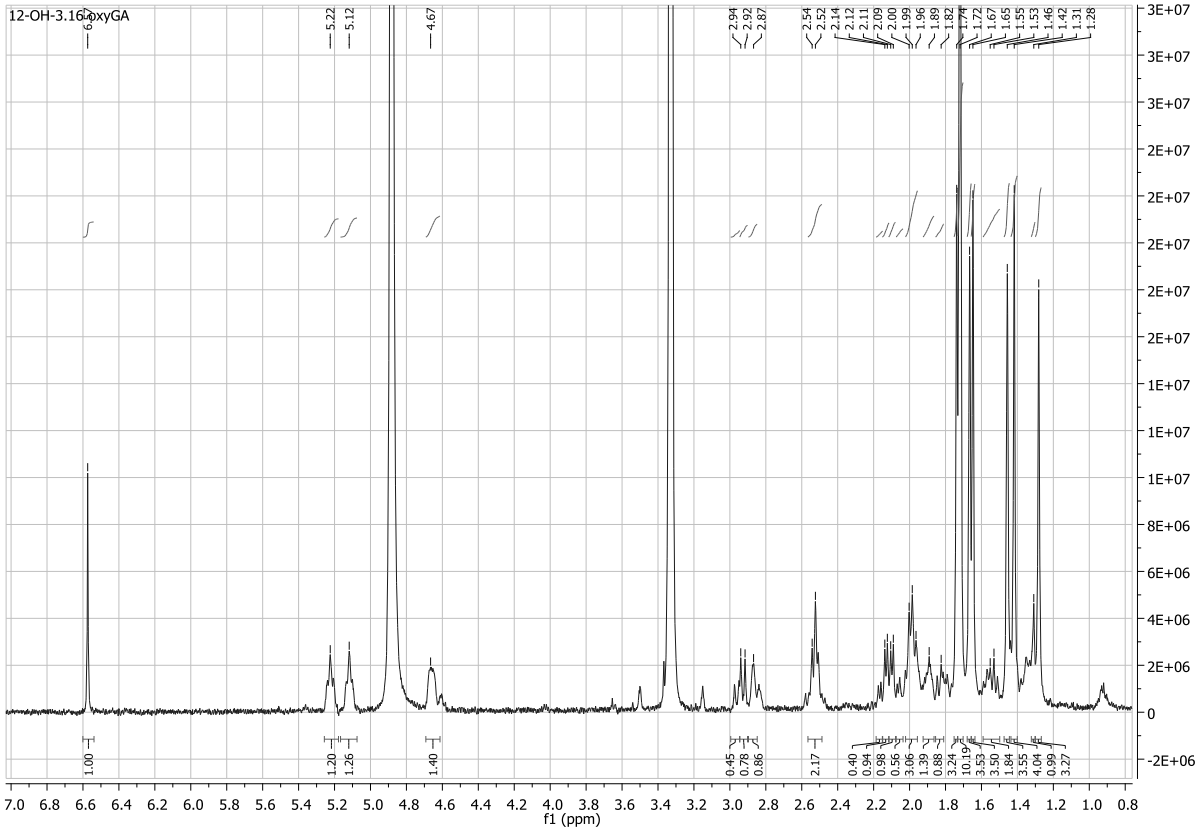
12-hydroxy-3.16-oxyguttiférone A **123**



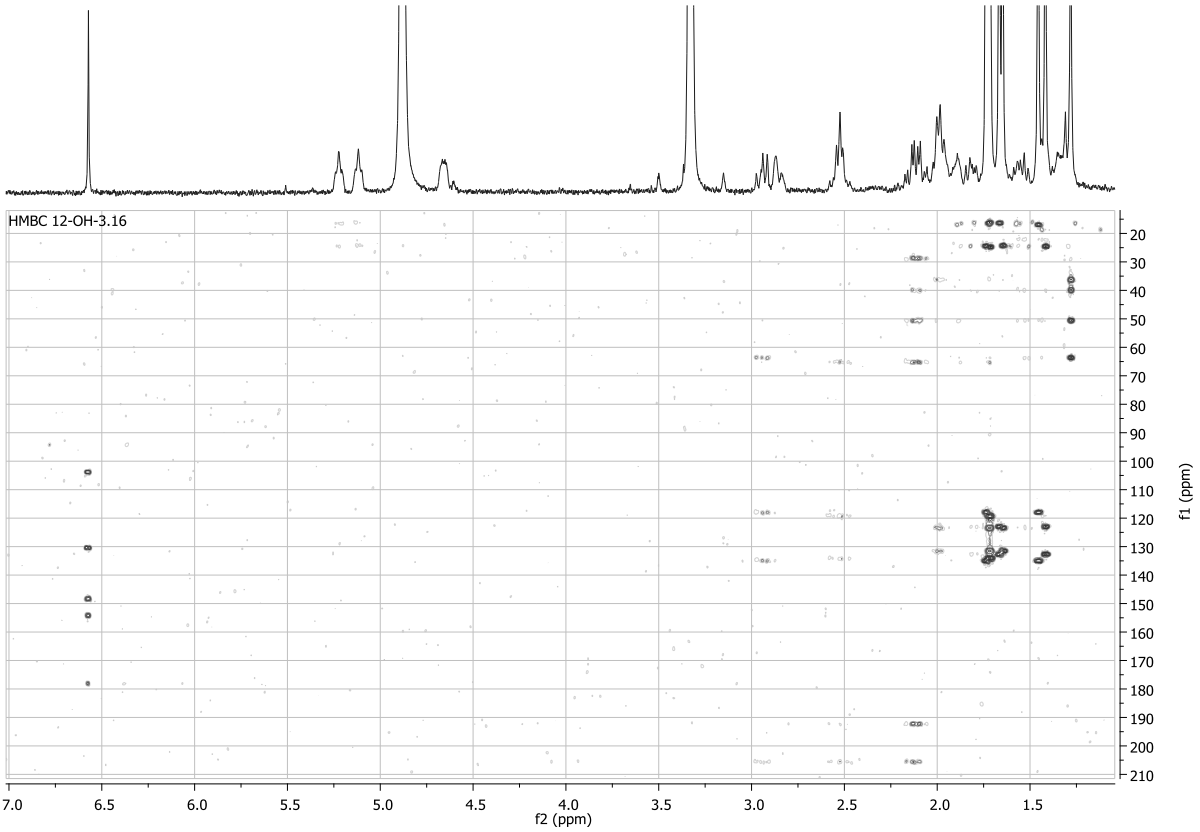
- **Synthèse** La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq),) et le ferricyanure de potassium (217 mg, 6.6 10^{-4} mol, 10 éq) sont dissouts dans un mélange méthanol/eau et placés sous atmosphère inerte et agitation. L'hydroxyde de lithium (31 mg, 1.2 10^{-4} mol, 2 éq) et ajouté en solution gouttes à gouttes sur 1minutes. Après 5 minutes, le milieu réactionnel est acidifié (HCl 1M) puis extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à sec. Elle est enfin purifiée par HPLC (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min) pour obtenir **123** avec un rendement de 55 **%**
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{48}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +55 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 623.3359 (M+ Na).

RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) : 6.55 (s, 1H), 5.20 (t, J = 7.57 Hz, 1H), 5.09 (t, J = 7.41 Hz, 1H), 4.86 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 2.91 (dd, *J* = 13.73/8.95, 1H), 2.85 (m, 1H), 2.51 (m, 2H), 2.09 (dd, *J* = 13.76/4.99 Hz, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.95 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.70 (s, 9H), 1.65 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.52 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.44 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.26 (s, 3H).

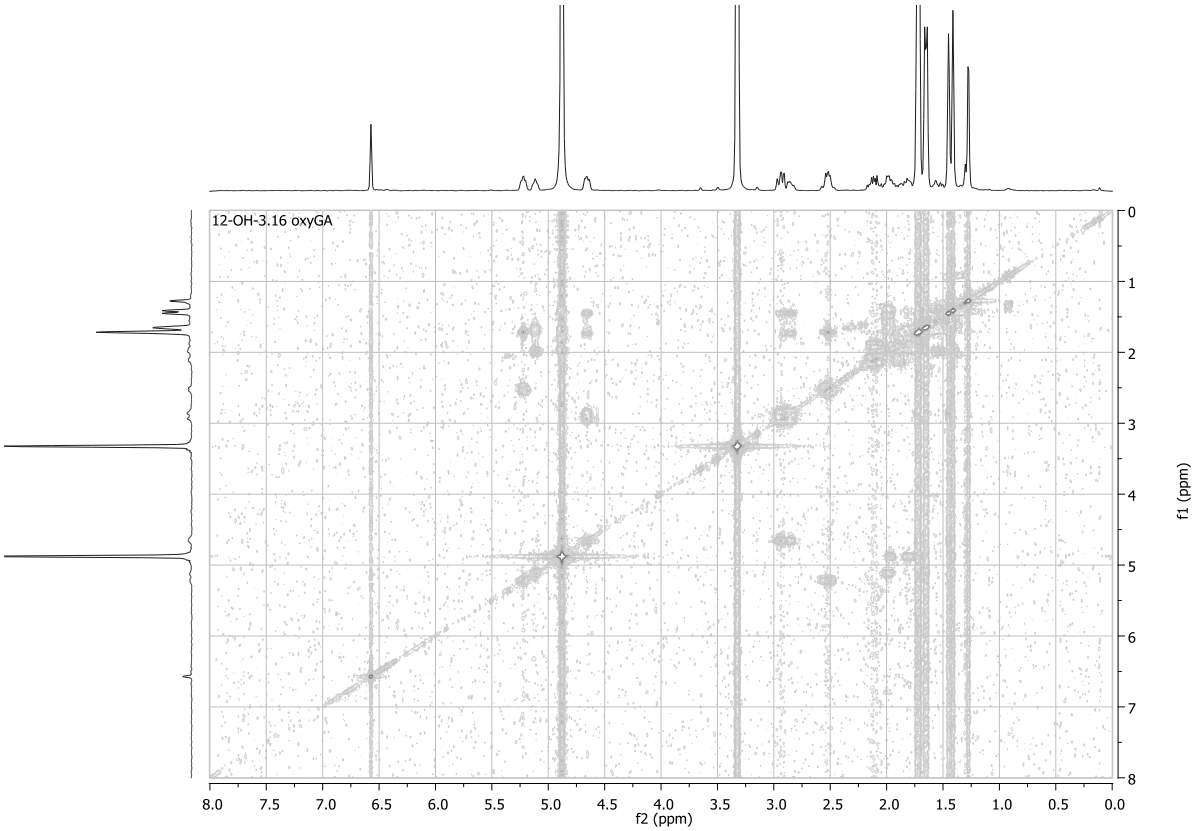
RMN ^{13}C Jmod (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) : 207.31 (C-9), 193.93 (C-1), 180.53 (C-3), 179.80 (C-10), 155.73 (C-16), 149.65 (C-14), (C-12), 136.42 (C-19), 135.66 (C-31), 134.18 (C-26), 132.97 (C-36), 131.97 (C-13), 124.94 (C-35), 124.50 (C-25), 120.71 (C-30), 119.48 (C-18), 117.76 (C-2), 105.51 (C-11), 95.44 (C-15), 66.73 (C-8), 65.22 (C-4), 52.12 (C-5), 41.56 (C-6), 39.20 (C-7), 37.86 (C-23), 30.45 (C-24), 30.26 (C-29), 27.20 (C-17), 26.10 (C-33), 26.06 (C-37), 25.83 (C-28), 25.71 (C-21), 23.95 (C-34), 20.30 (C-22), 18.15 (C-20), 17.99 (C-32), 17.96 (C-27), 17.61 (C-38).



Spectre ^{1}H de 12-hydroxy-3.16-oxyguttiférone A **123**

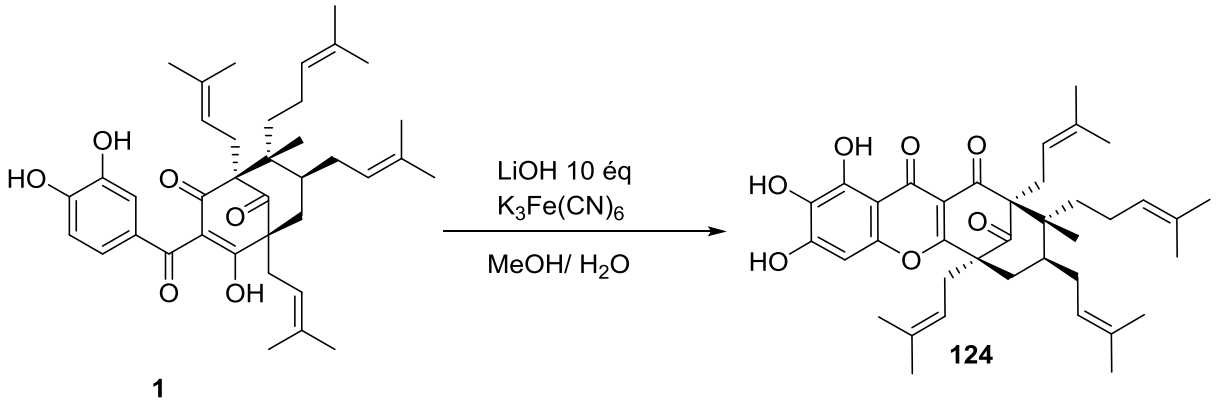


Spectre HMBC de 12-hydroxy-3.16-oxyguttiférone A **123**



Spectre NOESY de 12-hydroxy-3.16-oxyguttiférone A **123**

12-hydroxy-1.16-oxyguttiférone A **124**

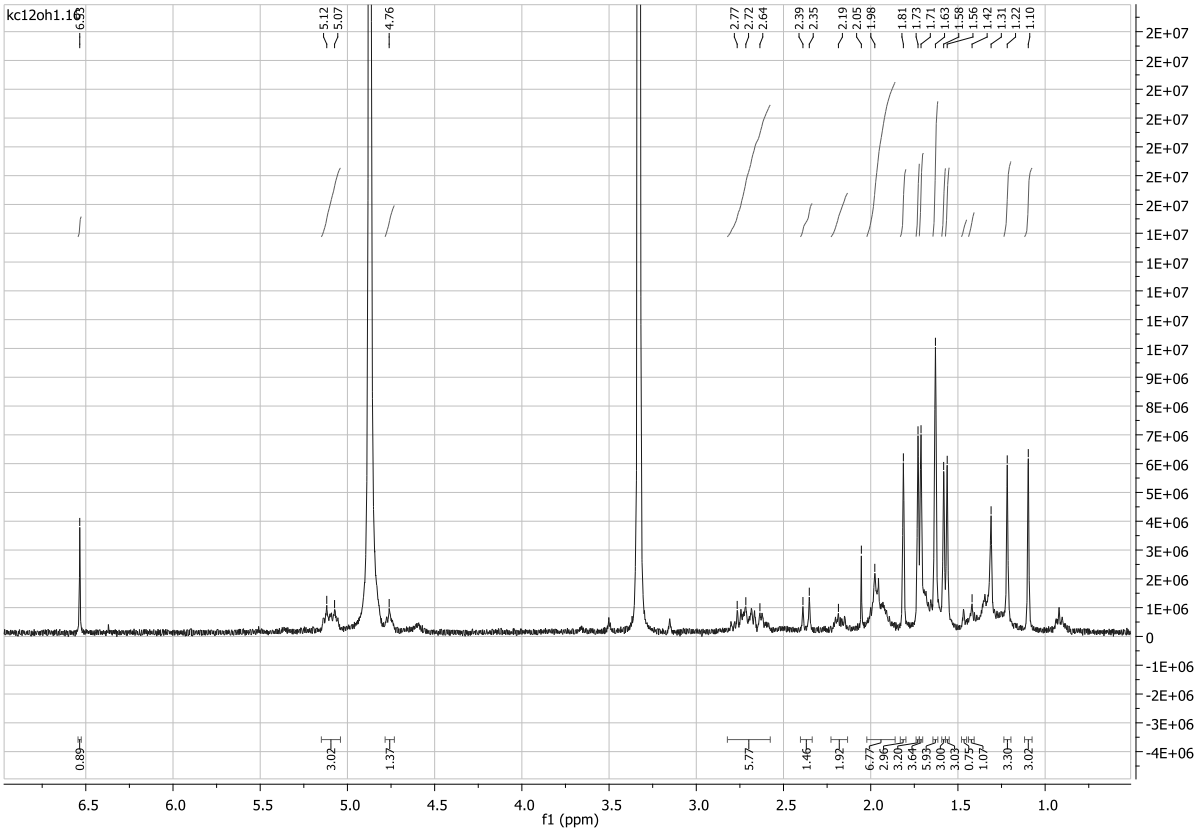


1 **124**

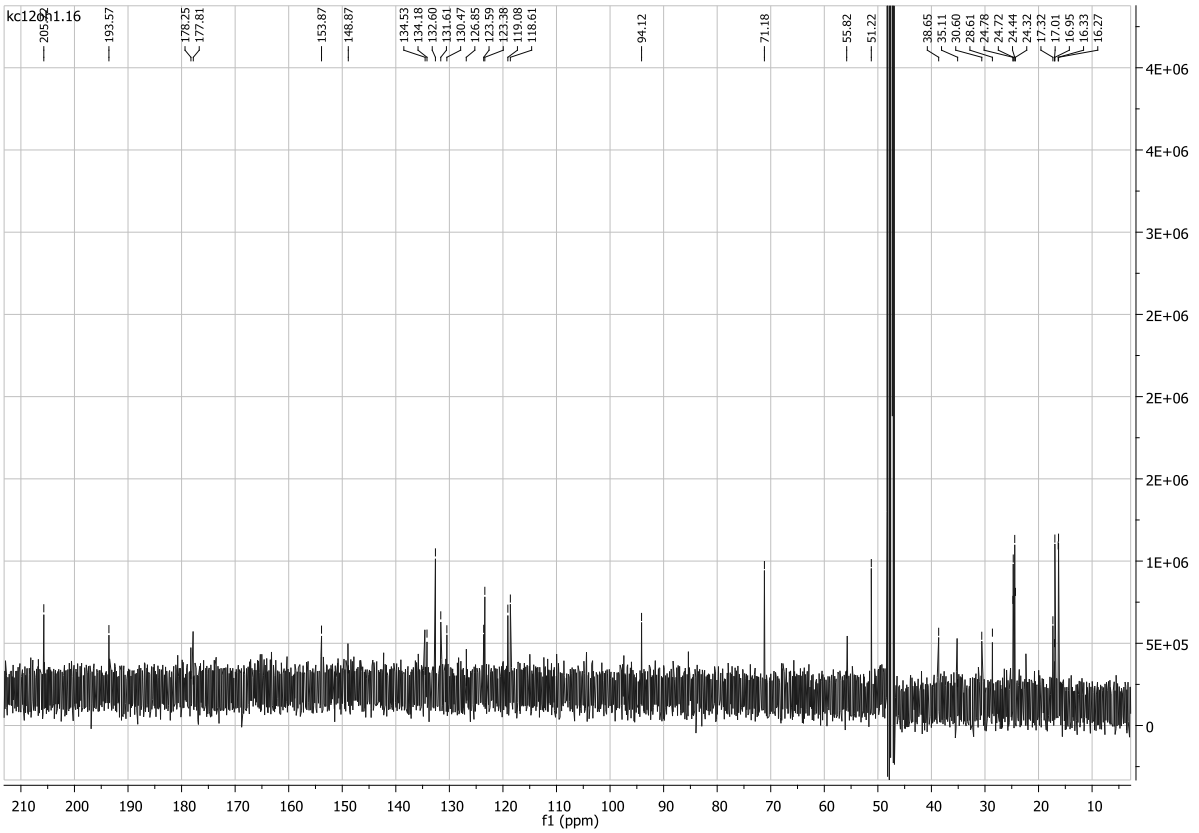
- **Synthèse** La guttiférone A (40mg, 6.6 10^{-5} mol, 1 éq),) et le ferricyanure de potassium (217 mg, 6.6 10^{-4} mol, 10 éq) sont dissouts dans un mélange méthanol/eau et placés sous atmosphère inerte et agitation. L'hydroxyde de lithium (31 mg, 1.2 10^{-4} mol, 2 éq) et ajouté en solution gouttes à gouttes sur 1minutes. Après 5 minutes, le milieu réactionnel est acidifié (HCl 1M) puis extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à sec. Elle est enfin purifiée par HPLC (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min) pour obtenir **124** avec un rendement de 19 **%**
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{48}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +84 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 623.3359 (M+ Na)

RMN 1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 6.53 (s,1H, H-15), 5.12 (t, 1H, J = 8.6 Hz, H-35), 5.07 (t,1H, J = 8.5 Hz, H-30), 4.82 (t,1H, J = 6.35 Hz, H-25), 4.76 (t,1H, J = 6.95 Hz, H-18), 2.77 (d,2H, J = Hz, H-29), 2.69 (m, 2H, H-17) 2.37 (d, 1H, J = 14 Hz, H7b), 2.17 (dd, 1H, J = 7 et 14 Hz, H-7a), 1.96 (m, 1H, H-34), 1.96 (m, 1H, H-6), 1.95 (m, 2H, H-24), 1.90 (m, 1H), 1.81 (s, 3H, H-32), 1.73 (s, 3H, H-20), 1.71 (s, 3H, H-37), 1.61 (s,6H, H-21 et H-38), 1.58 (s, 3H, H-33), 1.56 (s, 3H, H-28) 1.43 (m, 1 H), 1.27 (m, 1 H), 1.21 (s, 3H, H-22), 1.09 (s, 3H, H-27).

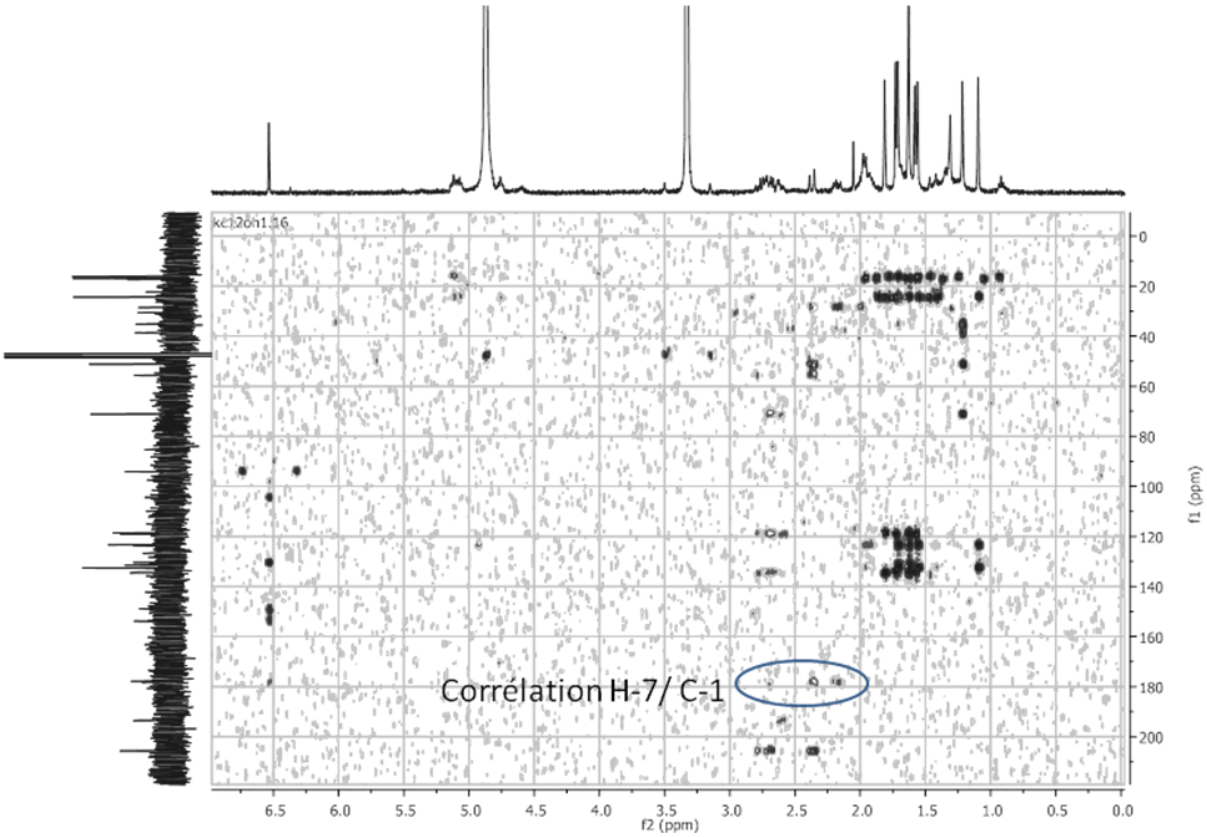
RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 206.72 (C-9), 193.57 (C-1), 177.3 (C-3), 178.25 (C-10), 177.81 (C-12), 153.87 (C-16), 150.2 (C-14), 148.87 (C-13), 134.53 (C-31), 134.18 (C-19), 132.6 (C-26),-131.61 (C-36), 130.47 (C-25), 126.85 (C-35), 123.59 (C-18), 123.38 (C-2), 119.08 (C-11) 118.61 (C-20), 94.12 (C-15), 71.18(C-4), 55.82 (C-8),51.22 (C-5) 38.55 (C-6), 37.5 (C-7), 35.11 (C-23), 30.6(C-29), 28.61 (C-24), 24.78 (C-17), 28.72 (C-33), 24.78 (C-21), 24.72 (C-37), 24.44 (C-28), 24.32 (C-34), 17.32 (C-22), 17.01 (C-32), 16.33 (C-27), 16.27 (C-38).



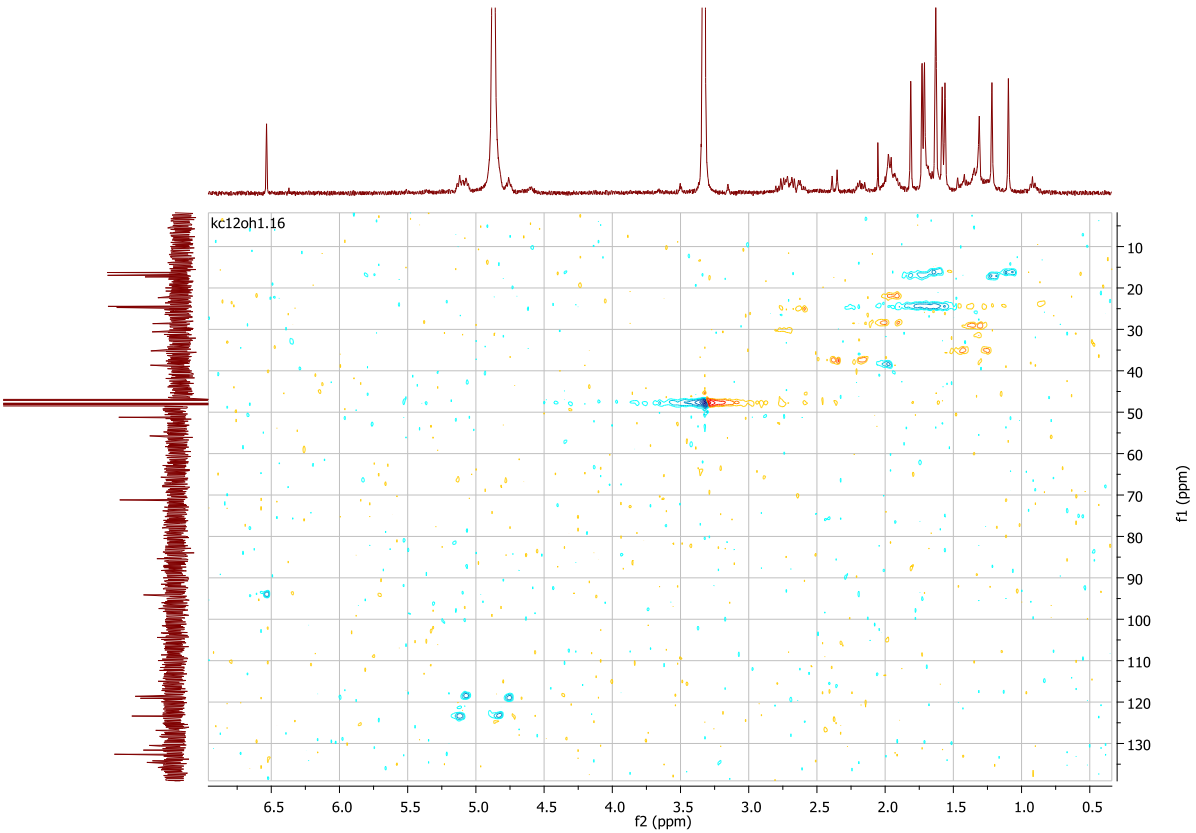
Spectre ^{1}H RMN de la 12-hydroxy-1.16-oxy-guttiférone A **124**



Spectre ^{13}C RMN de la 12-hydroxy-1.16-oxy-guttiférone A **124**

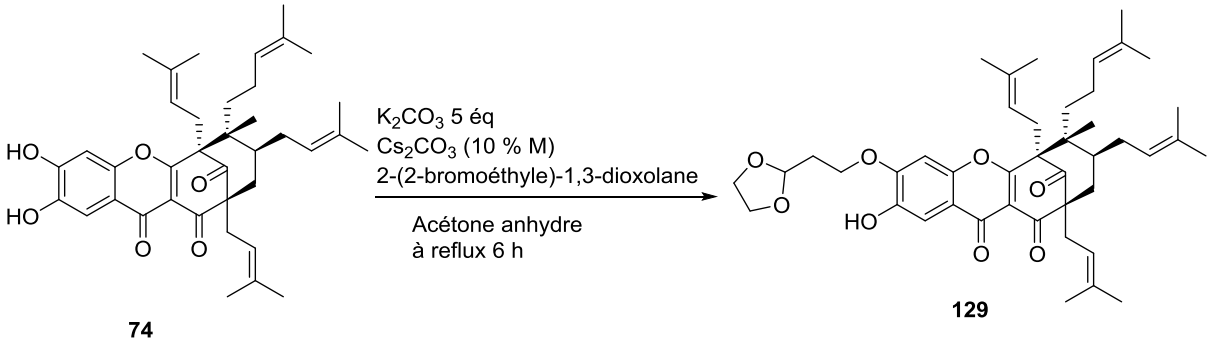


SpectreHMBC RMN de la 12-hydroxy-1.16-oxy-guttiférone A **124**



SpectreHSQC RMN de la 12-hydroxy-1.16-oxy-guttiférone A **124**

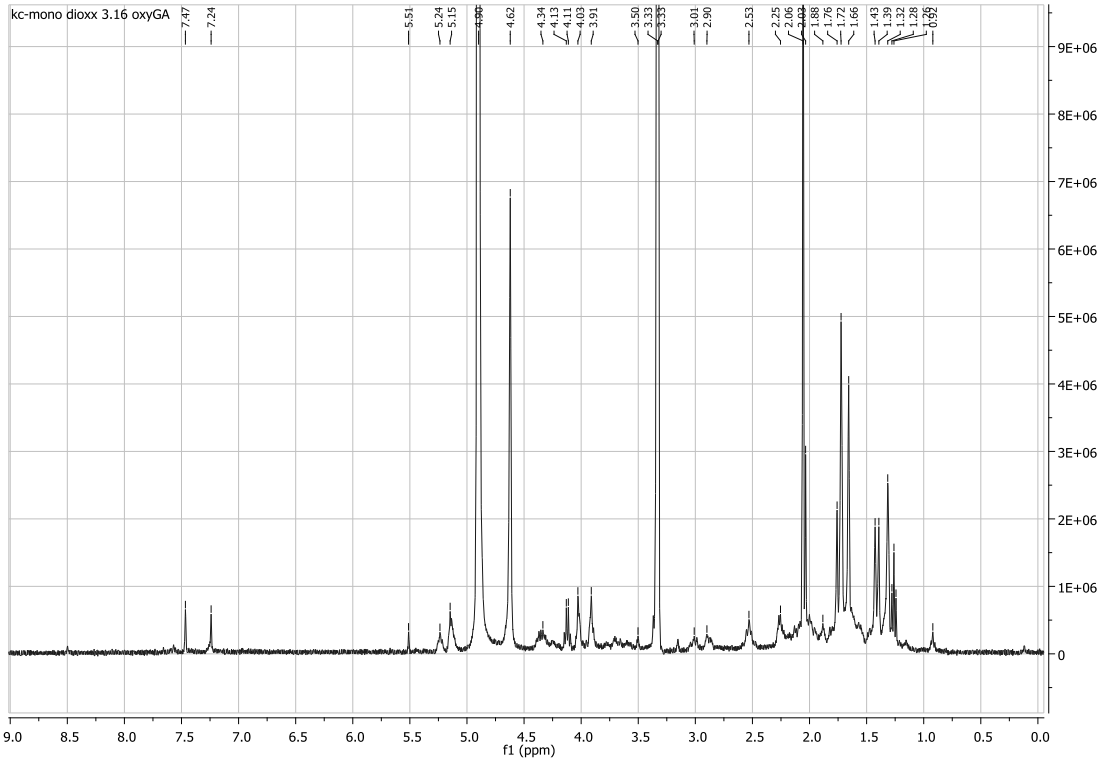
14-mono dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **129**



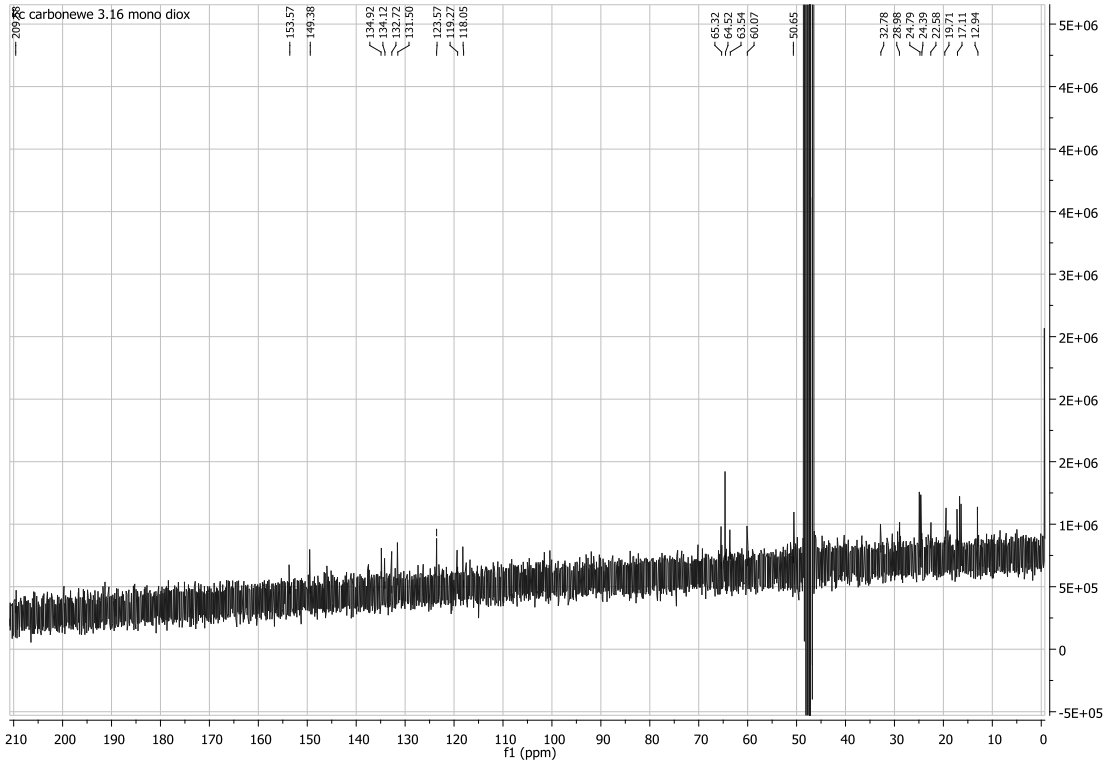
- **Synthèse** À une solution sous agitation de **74** (20 mg, 0.033 mmol) dans l'acétone anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte le 2-(2-bromoéthyle)-1,3-dioxolane (20 µl, 0.165 mmol), le carbonate de potassium (45 mg, 0.33 mmol) et le carbonate de césium (10 mg, 0.033 mmol). La réaction est arrêtée apres 6 h de reflux avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C 18 débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min)) pour obtenir **129** (tr = 36 min) avec un rendement de 8 %
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{43}H_{56}O_8$
- **$[\alpha]_D$** : +34 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 723.3861 (M+ Na)

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.47 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 5.24 (m, 2H), 5.15 (m, 3H), 4.33 (m, 4H), 4.12 (m, 3H), 4.03 (m, 3H), 3.91 (m, 3H), 3.5 (m, 1H), 3.01 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.63 (m, 4H), 2.06 (s, xH), 2.04 (s, xH), 1.76 (s, xH), 1.72 (s, xH), 1.66 (s, xH), 1.41 (d, xH), 1.31 (s, xH), 1.26 (t, xH).

RMN 13C (400 MHz, MeOD) : acquisition d'un carbone plus long en cours.

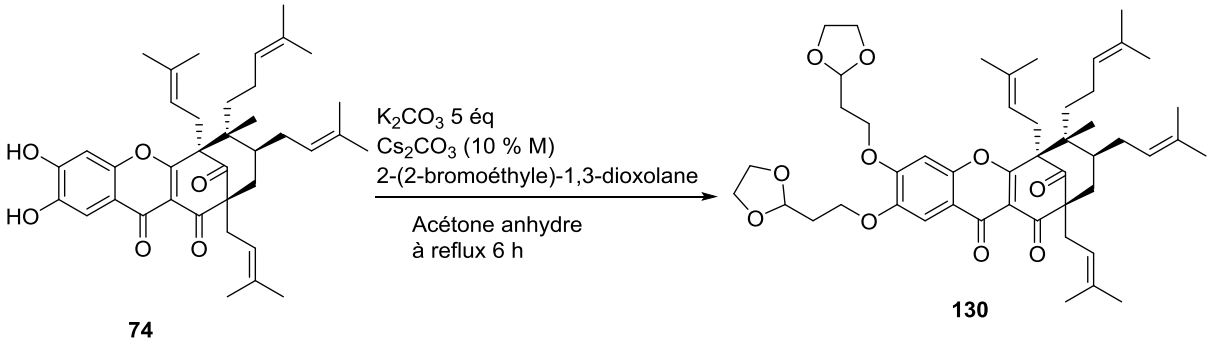


Spectre ^{1}H RMN 14-mono dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **129**



Spectre ^{13}C RMN 14-mono dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **129**

13, 14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **130**

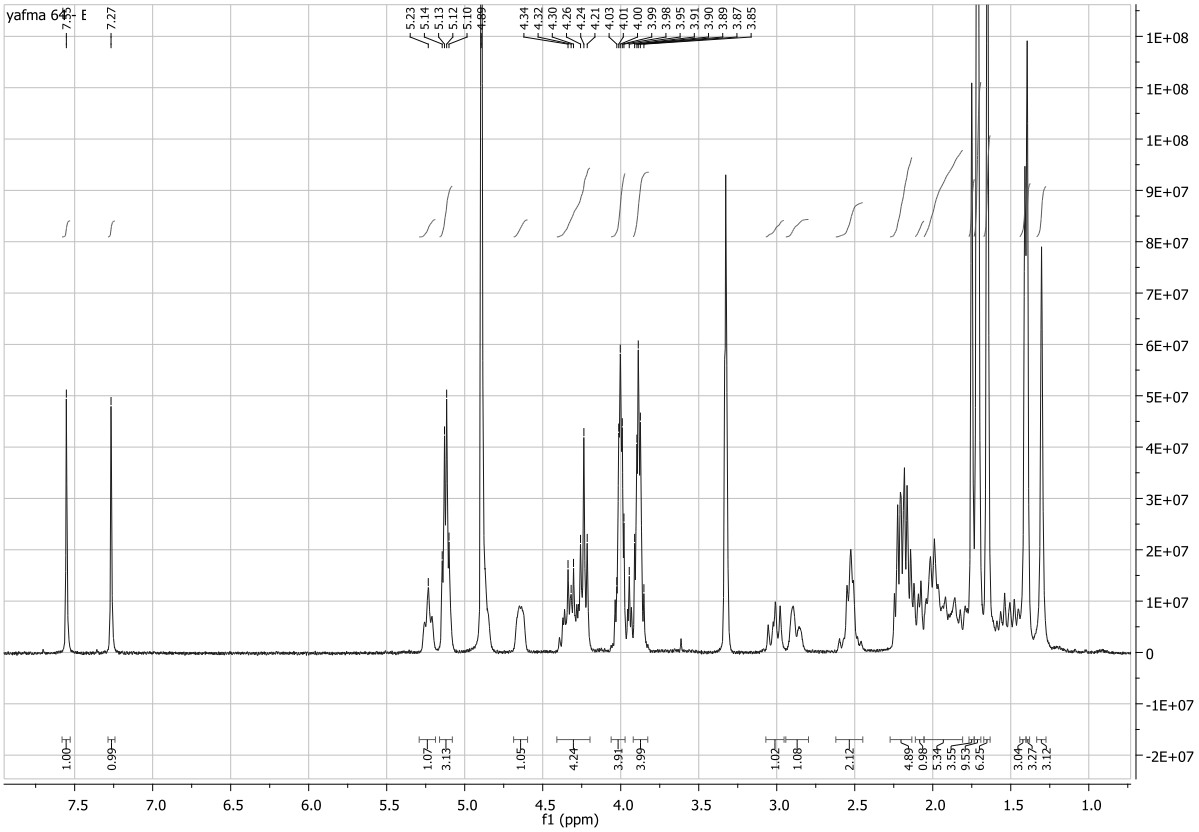


74 **130**

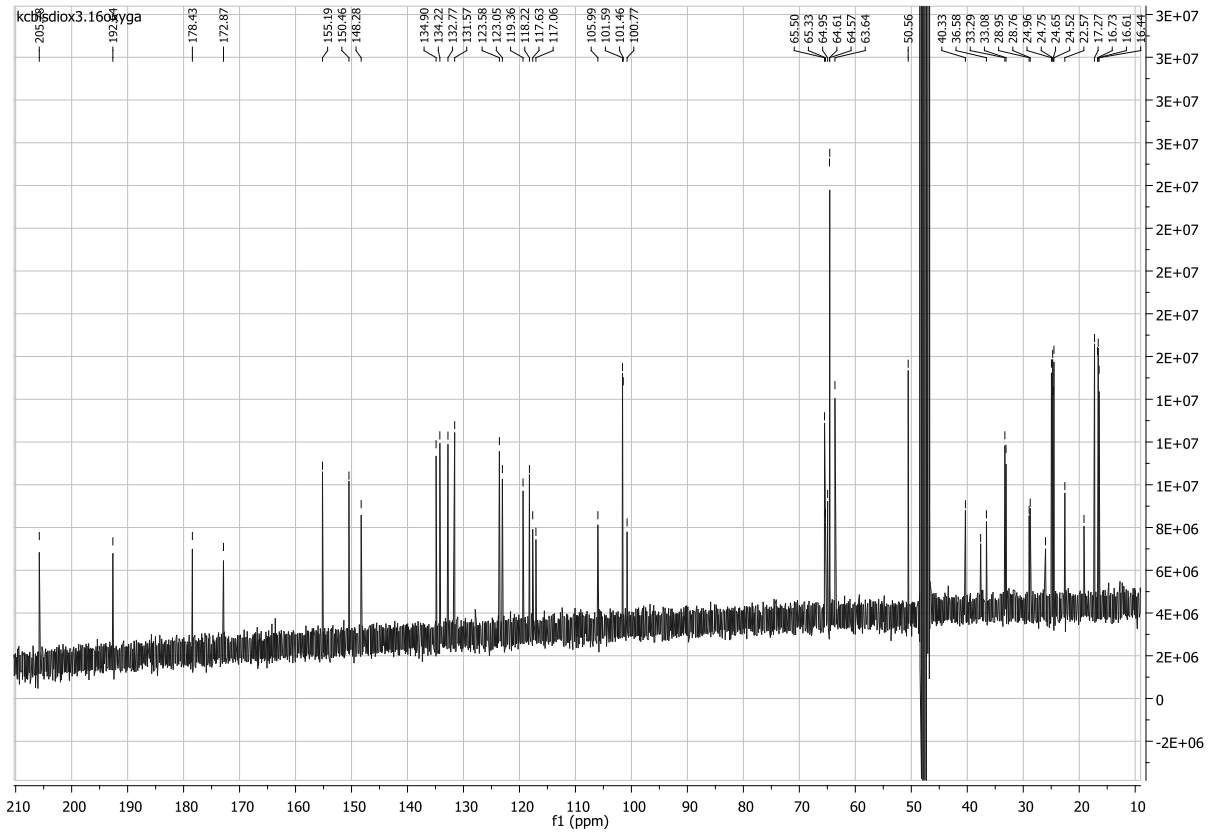
- **Synthèse** : À une solution sous agitation de **74** (20 mg, 0.033 mmol) dans l'acétone anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte le 2-(2-bromoéthyle)-1,3-dioxolane (20 µl, 0.165 mmol), le carbonate de potassium (45 mg, 0.33 mmol) et le carbonate de césium (10 mg, 0.033 mmol). La réaction est arrêtée apres 6 h de reflux avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C 18 (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min)) pour obtenir **130** (tr = 42 min) avec un rendement de 75 %
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_{10}$
- **$[\alpha]_D$** : +31 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 823.4398 (M+ Na)

RMN 1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.55 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 5.23 (t, J=6.72 Hz, 1H), 5.12 (q, J= 4-9.28 Hz, 3H), 4.64 (s, 1H), 4.32 (m, 2H), 4.24 (t, J=6.72 Hz, 2H), 4,00 (m, 4H), 3.89 (m, 4H), 3.38 (m, 3H), 3.01 (m, 1H), 2.88 (m, 1H), 2.53 (m, 2H), 2.20 (m, 5H), 2.09 (m, 1H), 1.99 (m, 3H), 1.86 (m, 2H), 1.75 (s, 3H), 1.71 (s, 9H), 1.65 (s, 6H), 1.40 (m, 6H), 1.30 (s, 3H).

RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 205.78, 192.64, 178.43, 172.88, 155.19, 150.47, 148.28, 134.90, 134.22, 132.77, 131.57,123.59, 123.06, 119.37, 118.22, 117.64, 117.06, 106.00, 101.59, 101.46, 100.78, 65.50, 65.34, 64.96, 64.62, 64.60, 63.65, 50.56, 46.72, 40.34, 37.62, 36.58, 33.29, 33.08, 28.95, 28.77, 26.04, 24.97, 24.75, 24.66, 24.52, 22.58, 19.16, 17.27, 16.62, 16.45

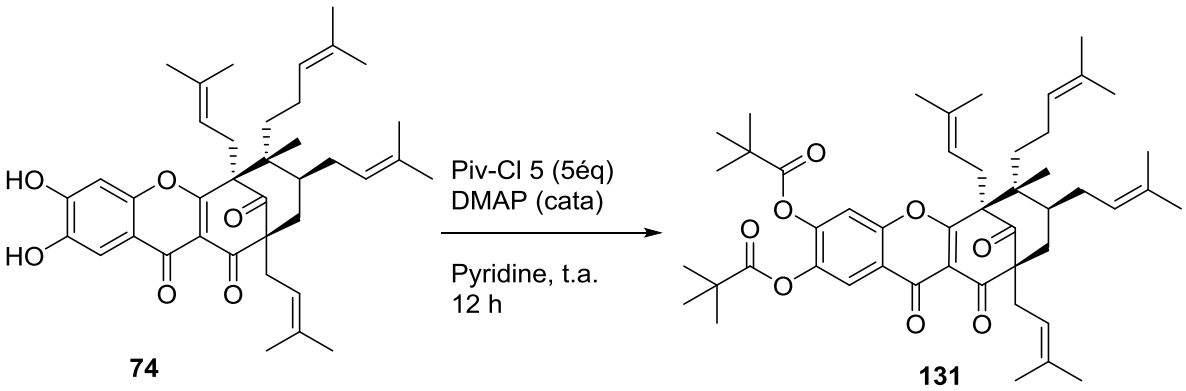


Spectre ^{1}H RMN 13, 14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **130**



Spectre ^{13}C RMN 13, 14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **130**

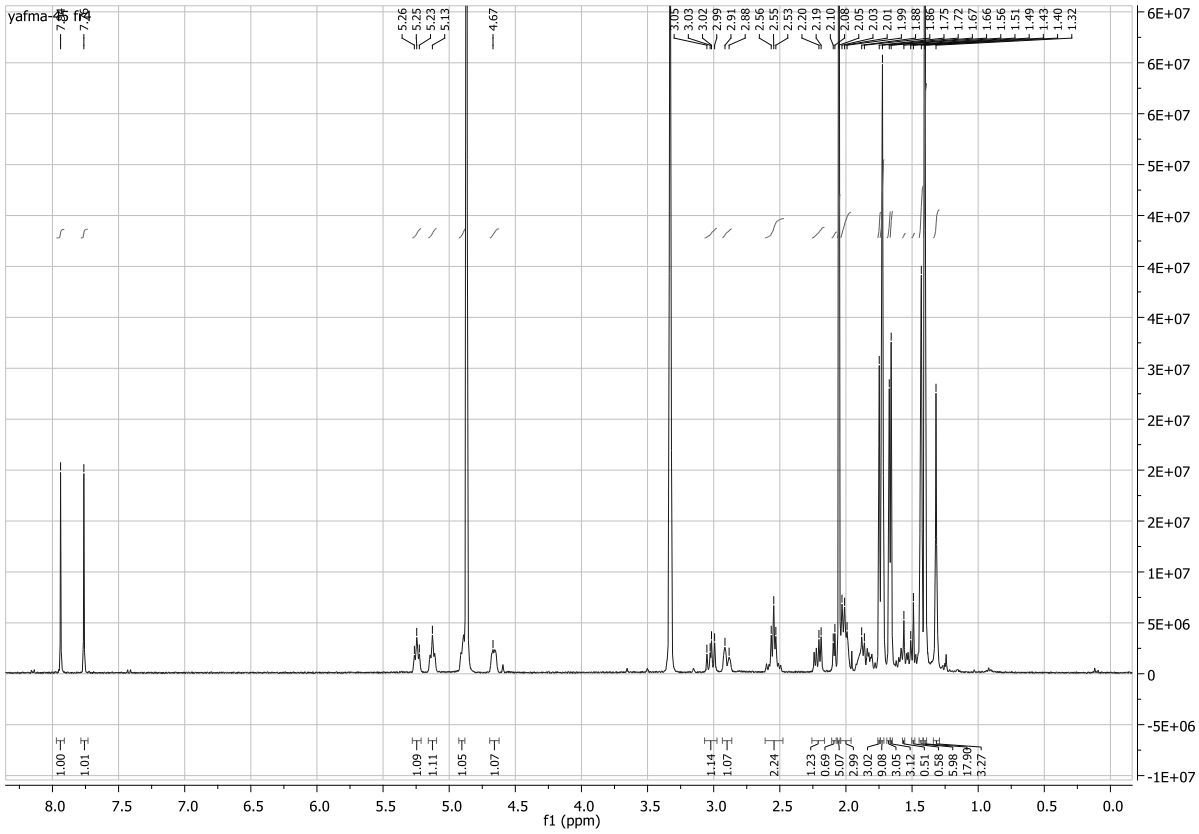
13, 14-bis pivaloyle, 3.16-oxy-guttiférone A **131**



- **Synthèse :** À une solution sous agitation de **74** (30 mg, 0.051 mmol) dans la pyridine anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte (argon) le chlorure de pivaloyl (63 µl, 0.51 mmol), et le DMAP (quantité catalytique). La réaction est faite à température ambiante pendant 12 heures. La réaction est arrêtée avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau trois fois, séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C18 (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min)pour obtenir **131** (tr = 48 min) avec un rendement de 90%.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_{10}$
- **$[\alpha]_D$** : +31 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 823.4398 (M+ Na)

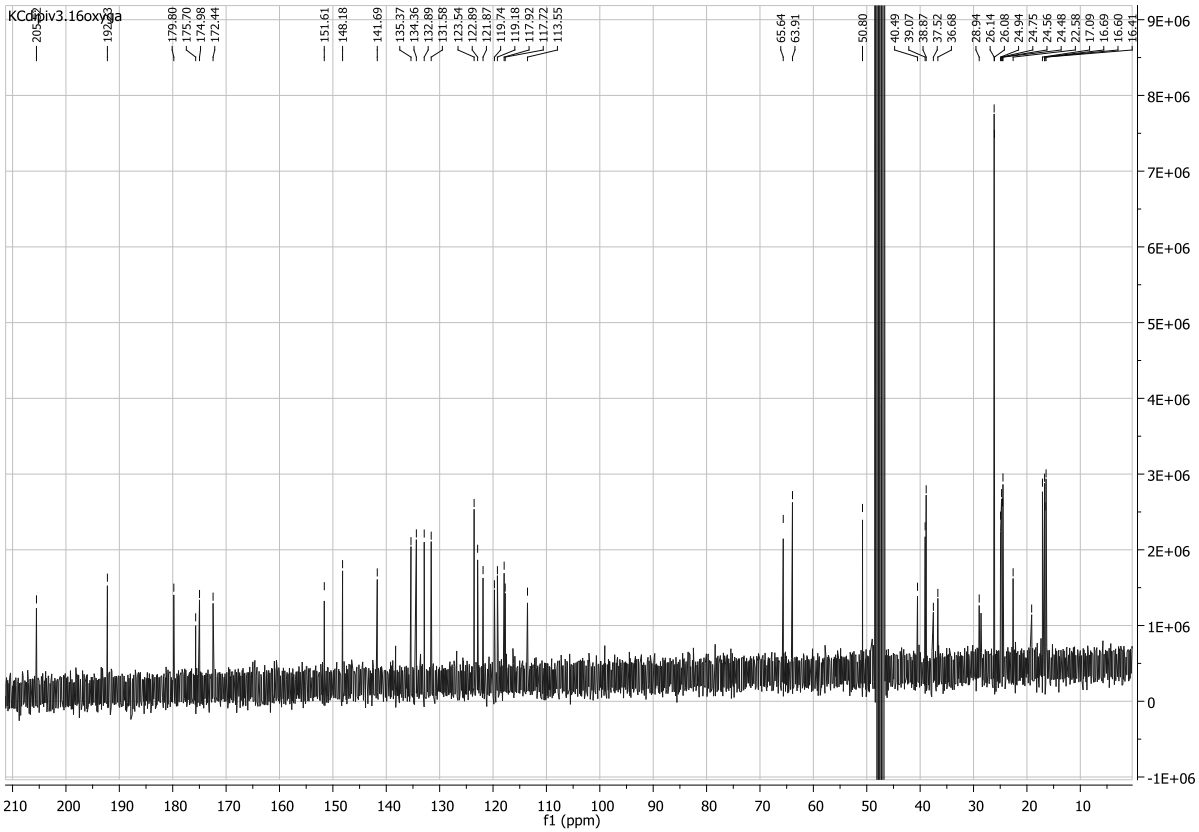
RMN1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.94 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 5.25 (t, J=7.70 Hz, 1H), 5.13 (t, J=6.64 Hz, 1H), 4.67 (m, 1H), 3.01 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.55 (m, 2H), 2.20 (m, 1H), 2.09 (d, J=5.09 Hz, 1H), 2.05 (s, 5H), 2.01 (m, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.70 (s, 9H), 1.67 (d, J=5.94 Hz, 6H), 1.40 (s, 18H), 1.43 (s, 6H), 1.32 (s, 3H).

RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 205.52, 192.23, 179.80, 175.70, 174.98, 172.44, 151.61, 148.18, 141.69, 135.37, 134.36, 132.89, 131.58, 123.54, 122.89, 121.87, 119.74, 119.18, 117.92, 117.72, 113.55, 65.64, 63.91, 50.80, 40.49, 39.07, 38.87, 37.52, 36.68, 28.94, 26.14, 26.08, 24.94, 24.75, 24.56, 24.48, 22.58, 19.11, 17.09, 16.69, 16.60, 16.41



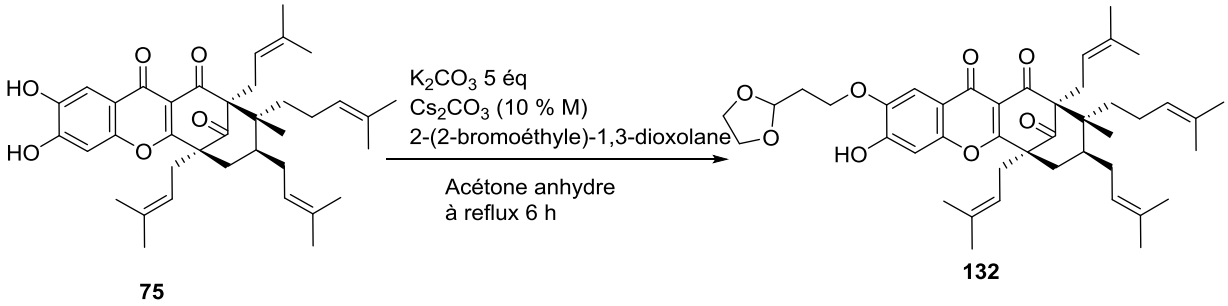
Spectre ^{1}H RMN 13,14-bis pivaloyle, 3.16-oxy-guttiférone A

131



Spectre ^{13}C RMN 13,14-bis pivaloyle, 3.16-oxy-guttiférone A **131**

14-mono dioxolane, 1.16-oxy-guttiférone A **132**

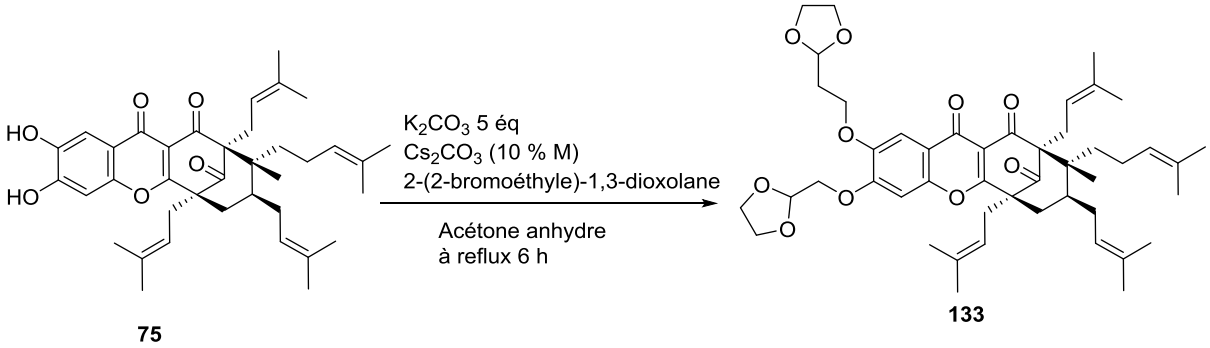


75 **132**

- **Synthèse** À une solution sous agitation de **75** (20 mg, 0.033 mmol) dans l'acétone anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte le 2-(2-bromoéthyle)-1,3-dioxolane (20 µl, 0.165 mmol), le carbonate de potassium (45 mg, 0.33 mmol) et le carbonate de césium (10 mg, 0.033 mmol). La réaction est arrêtée apres 6 h de reflux avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C 18 (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min)) pour obtenir **132** (tr = 37 min) avec un rendement de 6 %
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{43}H_{56}O_8$
- **$[\alpha]_D$** : +33 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 723.3861 (M+ Na)

Acquisition d'un meilleur signal RMN pour interpretation

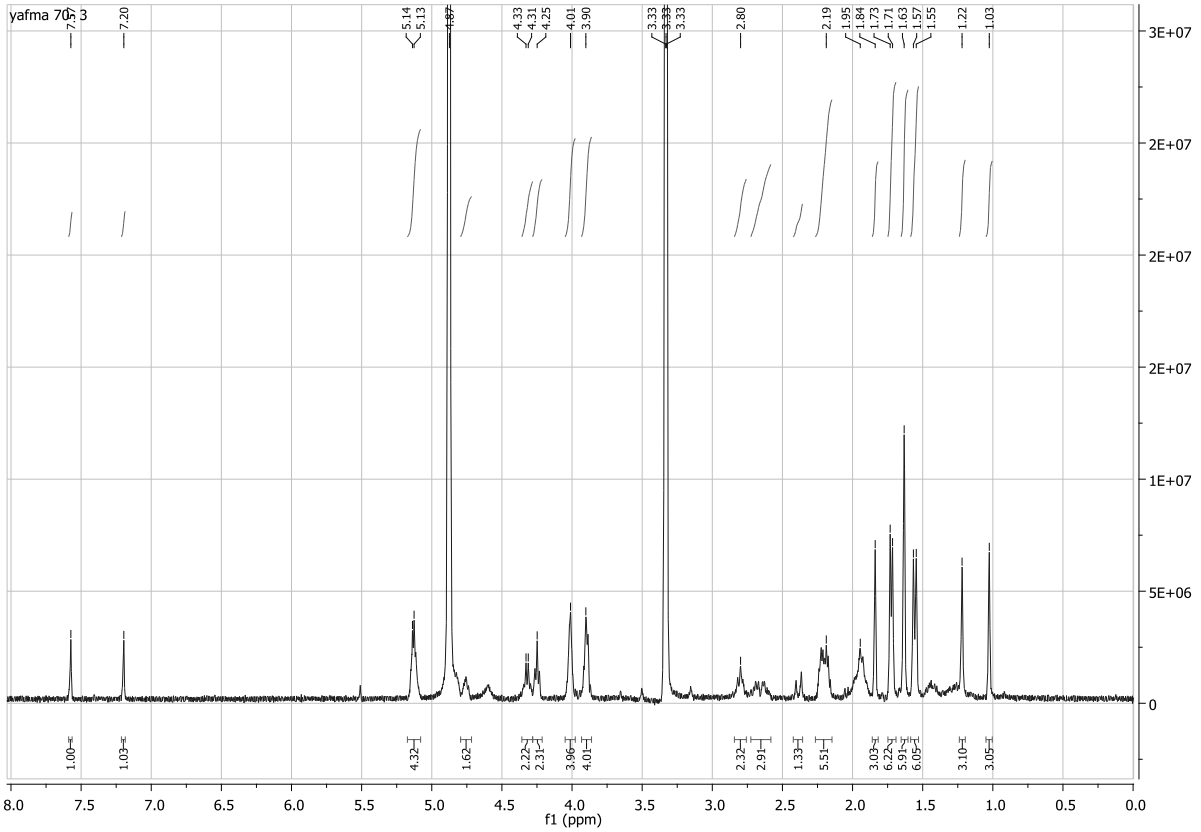
13,14-bis dioxolane, 1,16-oxy-guttiférone A **133**



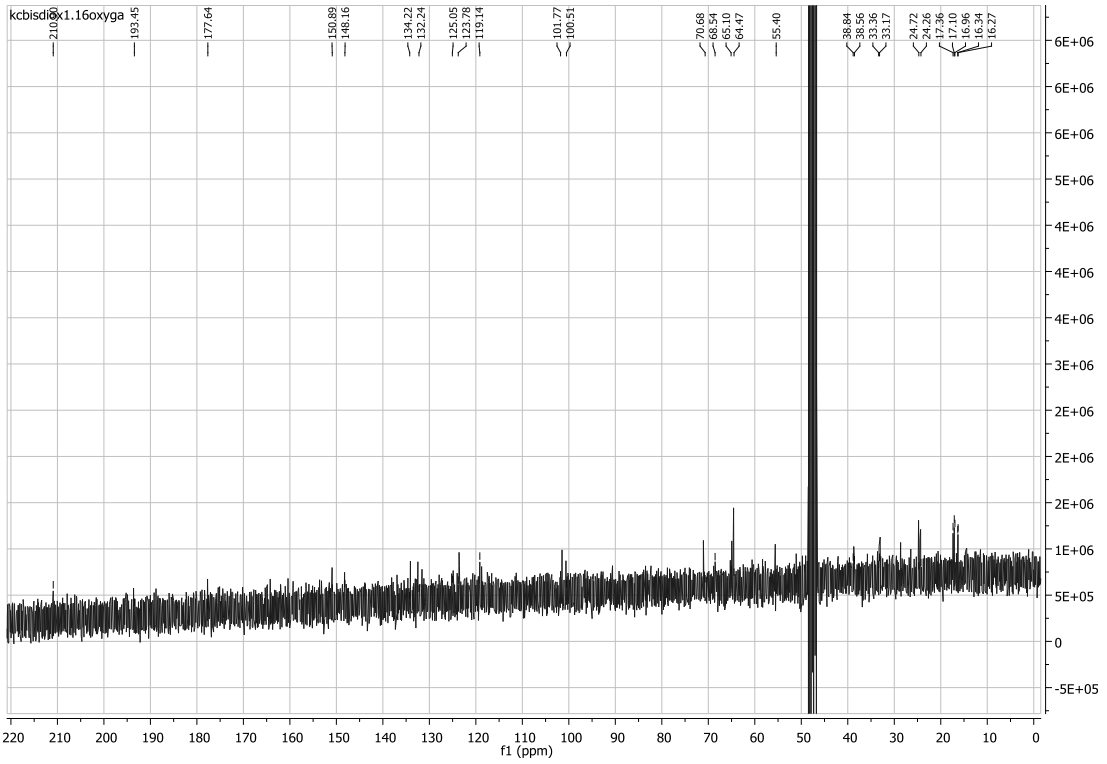
75 **133**

- **Synthèse** À une solution sous agitation de **75** (20 mg, 0.033 mmol) dans l'acétone anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte le 2-(2-bromoéthyle)-1,3-dioxolane (20 µl, 0.165 mmol), le carbonate de potassium (45 mg, 0.33 mmol) et le carbonate de césium (10 mg, 0.033 mmol). La réaction est arrêtée apres 6 h de reflux avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C 18 (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min)) pour obtenir **133** (tr = 42 min) avec un rendement de 68 %
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_{10}$
- **$[\alpha]_D$** : +37 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 823.4398 (M+ Na)

RMN 1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.57 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 5.14 (m, 4H), 4.76 (m, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.32 (m, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.01 (m, 4H), 3.90 (m, 4H), 2.80 (m, 2H), 2.65 (m, 3H), 2.37 (d, 1H), 2.20 (m, 5H), 1.95 (m, 6H), 1.84 (s, 3H), 1.72 (d, 6H), 1.63 (s, 6H), 1.56 (d, 6H), 1.22 (s, 3H), 1.03 (s, 3H).

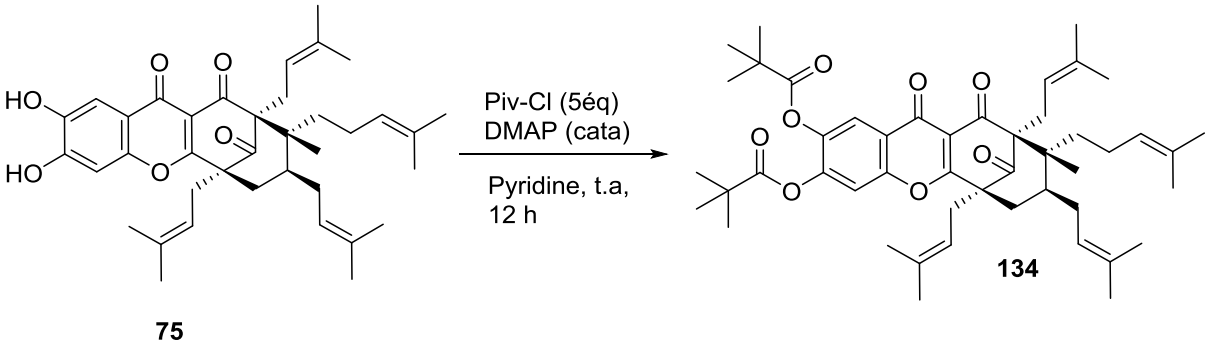


Spectre ^{1}H RMN 13,14-bis dioxolane, 1.16-oxy-guttiférone A **133**



Spectre ^{13}C RMN 13,14-bis dioxolane, 1.16-oxy-guttiférone A **133**

13,14-bis pivaloyle,1.16-oxy-guttiférone A **134**

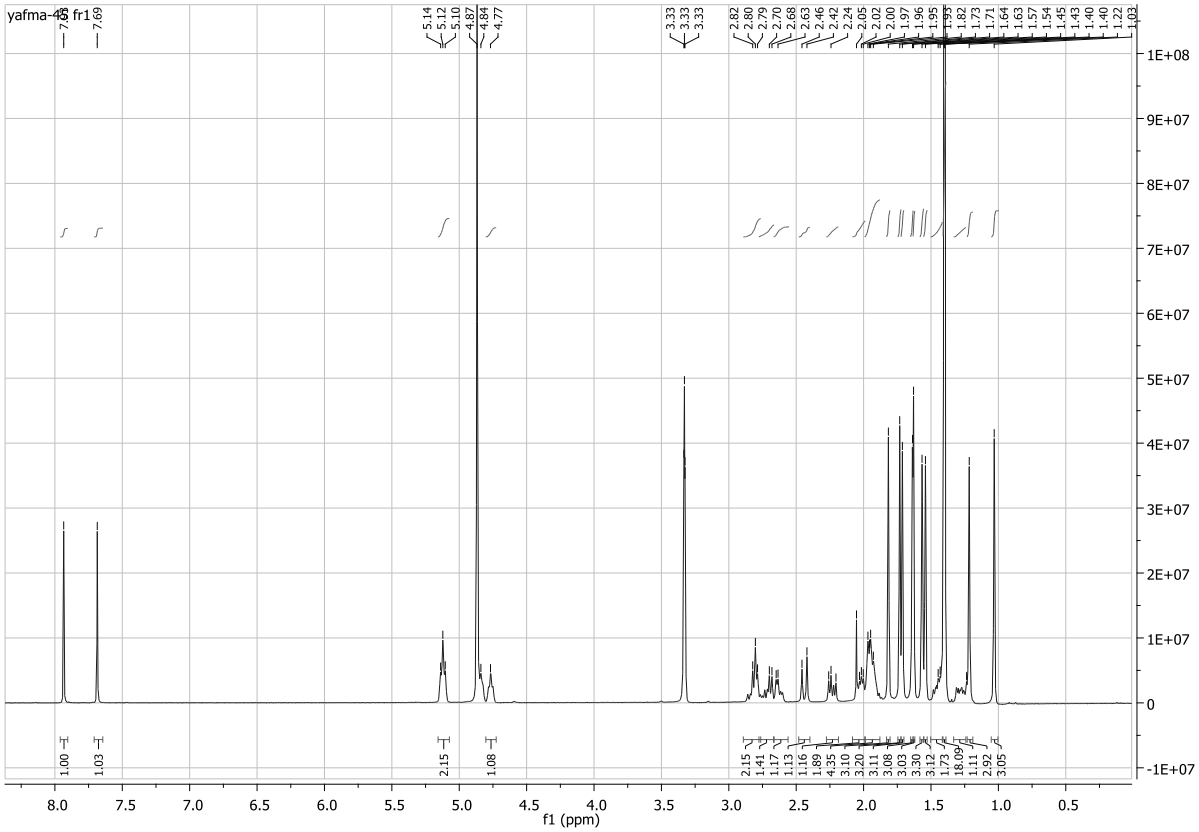


75

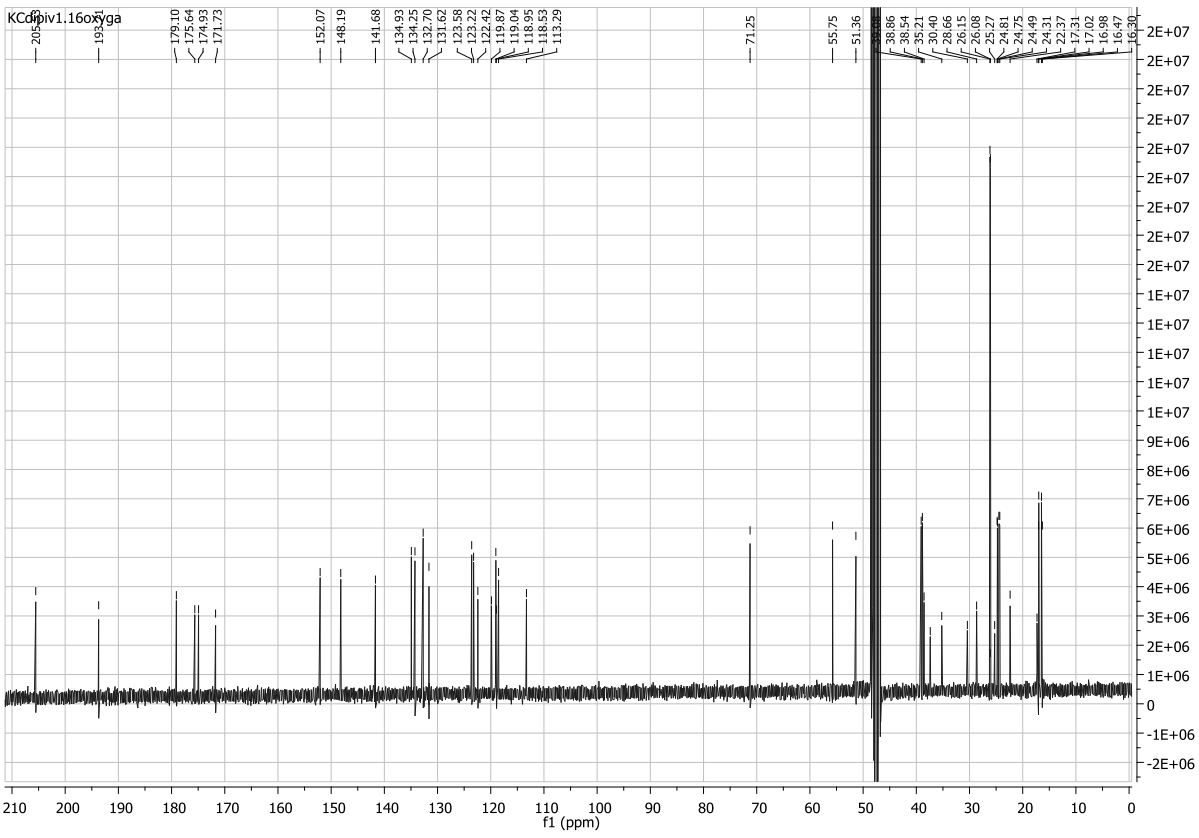
- **Synthèse :** À une solution sous agitation de **75** (30 mg, 0.051 mmol) dans la pyridine anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte (argon) le chlorure de pivaloyl (63 µl, 0.51 mmol), et le DMAP (quantité catalytique). La réaction est faite à température ambiante pendant 12 heures. La réaction est arrêtée avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau trois fois, séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C18 pour obtenir **134** avec un rendement de > 90%.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_8$
- **$[\alpha]_D$** : +64 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 791.4510 (M+ Na)

RMN1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.93 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 5.12 (t, J=6.50 Hz, 2H), 4.77 (t, J=6.50 Hz, 1H), 2.80 (m, 2H), 2.67 (m, 2H), 2.44 (d, J= 15 Hz, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.05 (s, 1H), 2.02 (t, J= 5.64 Hz, 1H), 1.95 (m, 4H), 1.82 (s, 3H) 1.72 (d, J= 7.61 Hz, 6H), 1.63 (d, J=3.26 Hz, 6H), 1.56 (d, J=9.39 Hz, 6H), 1.44 (m, 2H), 1.40 (s, 18H), 1.22 (s, 3H), 1.03 (s, 3H).

RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 205.53, 193.71, 179.10, 175.64, 174.93, 171.73, 152.07, 148.19, 141.68, 134.93, 134.25, 132.70, 131.62, 123.58, 123.22, 122.42, 119.87, 119.04, 118.95, 118.53, 113.29, 71.25, 55.75, 51.36, 39.08, 38.86, 38.54, 37.38, 35.21, 30.40, 28.66, 26.15, 26.10, 26.08, 25.27, 24.81, 24.75, 24.49, 24.31, 22.37, 17.31, 17.02, 16.98, 16.47, 16.30

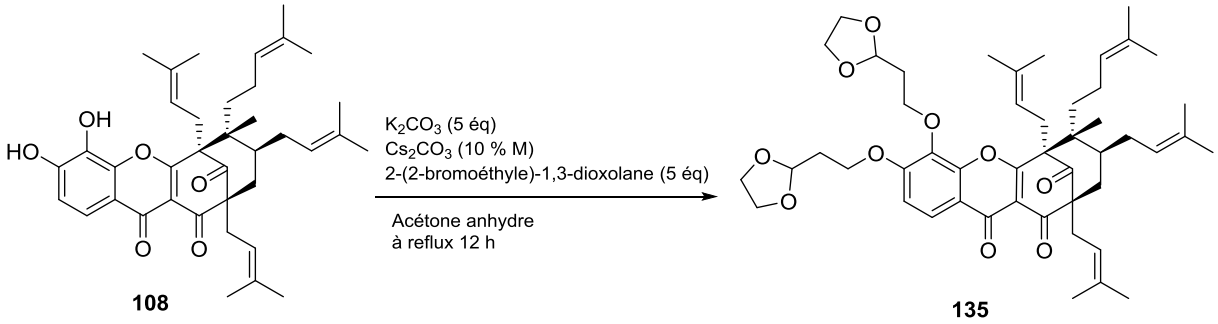


Spectre ^{1}H RMN 13,14-bis pivaloyle,1.16-oxy-guttiférone A **134**



Spectre ^{13}C RMN 13,15-bis pivaloyle,1.16-oxy-guttiférone A **134**

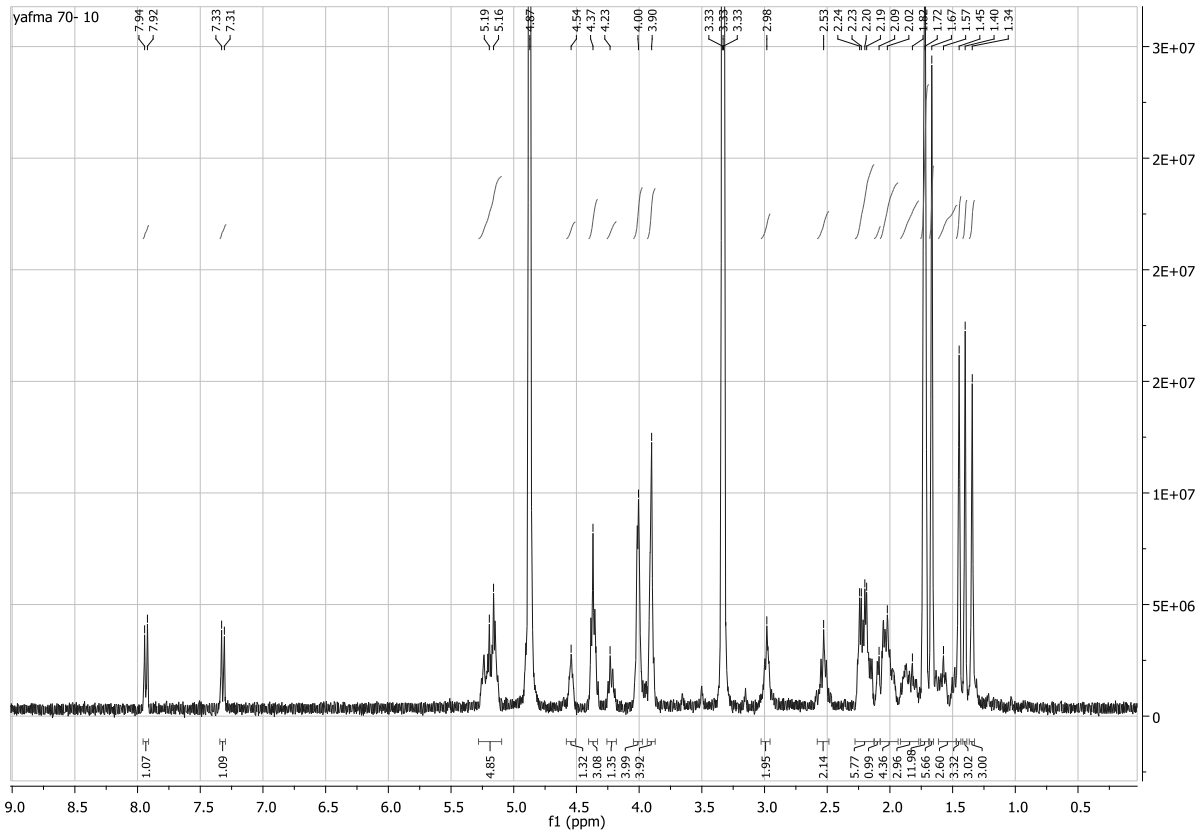
13,14-bis dioxolane-3.12-oxy-guttiférone A **135**



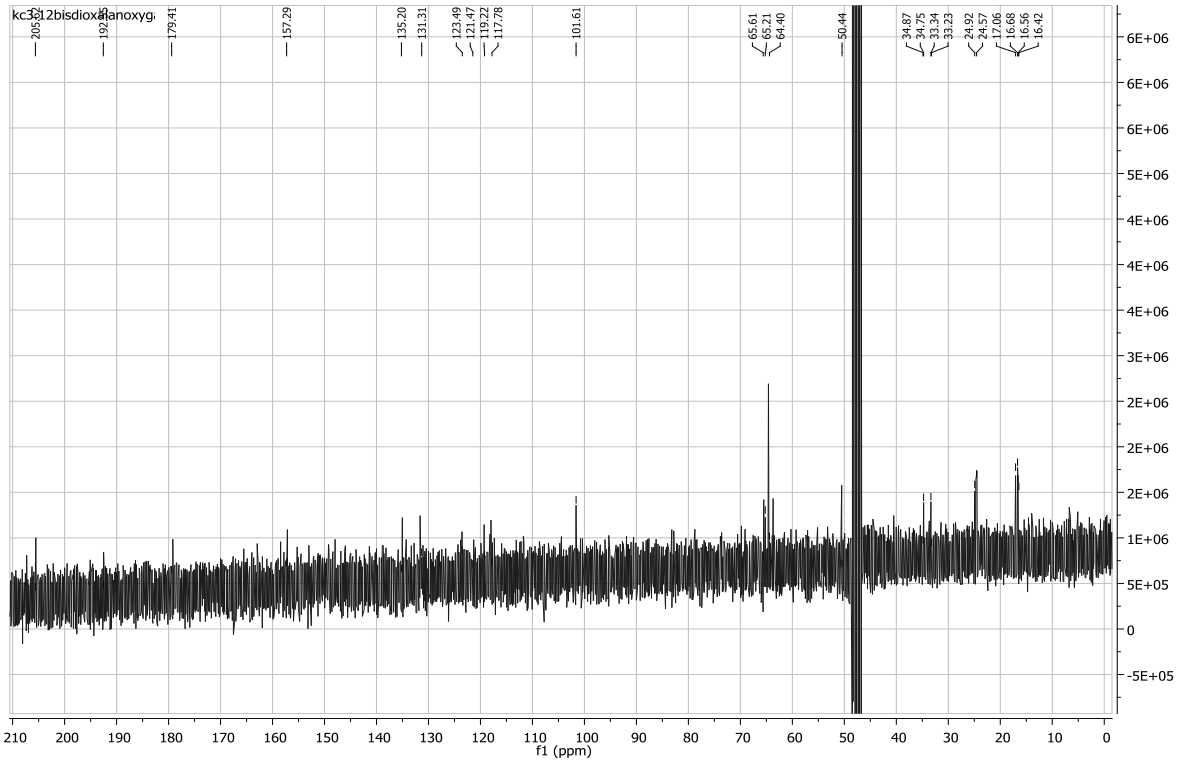
- **Synthèse** À une solution sous agitation de **108** (10 mg, 0.016 mmol) dans l'acétone anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte le 2-(2-bromoéthyle)-1,3-dioxolane (10 µl, 0.08 mmol), le carbonate de potassium (22 mg, 0.16 mmol) et le carbonate de césium (5 mg, 0.016 mmol). La réaction est arrêtée apres 6 h de reflux avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C 18 (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min)) pour obtenir **135**(tr = 44 min) avec un rendement de 86 %
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_{10}$
- **$[\alpha]_D$** : +36 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 823.4398 (M+ Na)

RMN1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.93 (d, J=9.03 Hz, 1H), 7.32 (d, J=9.03 Hz, 1H), 5.19 (m, 5H), 4.54 (m, 1H), 4.37 (t, J=6 Hz, 3H), 4.23 (m, 1H), 4.00 (m, 4H), 3.90 (m, 4H), 2.98 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 2.20 (m, 5H), 2.09 (m, 1H), 2.02 (m, 4H), 1.82 (m, 3H), 1.72 (s, 12H), 1.67 (s, 6H), 1.45 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.34 (s, 3H).

RMN 13C : experience plus longue en cours.

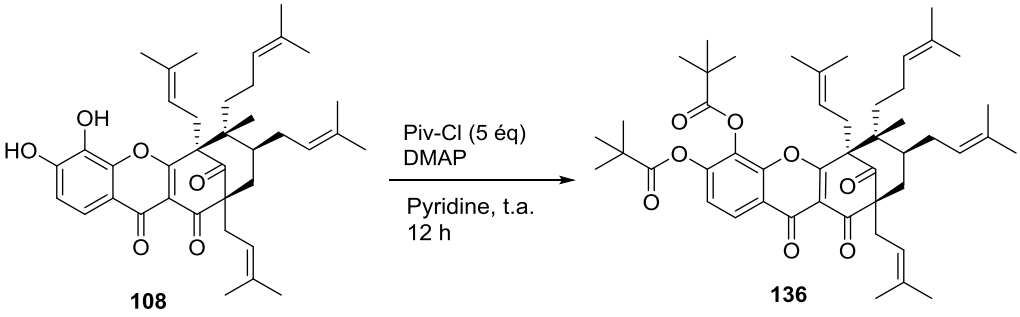


Spectre ^{1}H RMN 13,14-bis dioxolane-3.12-oxy-guttiférone A **135**



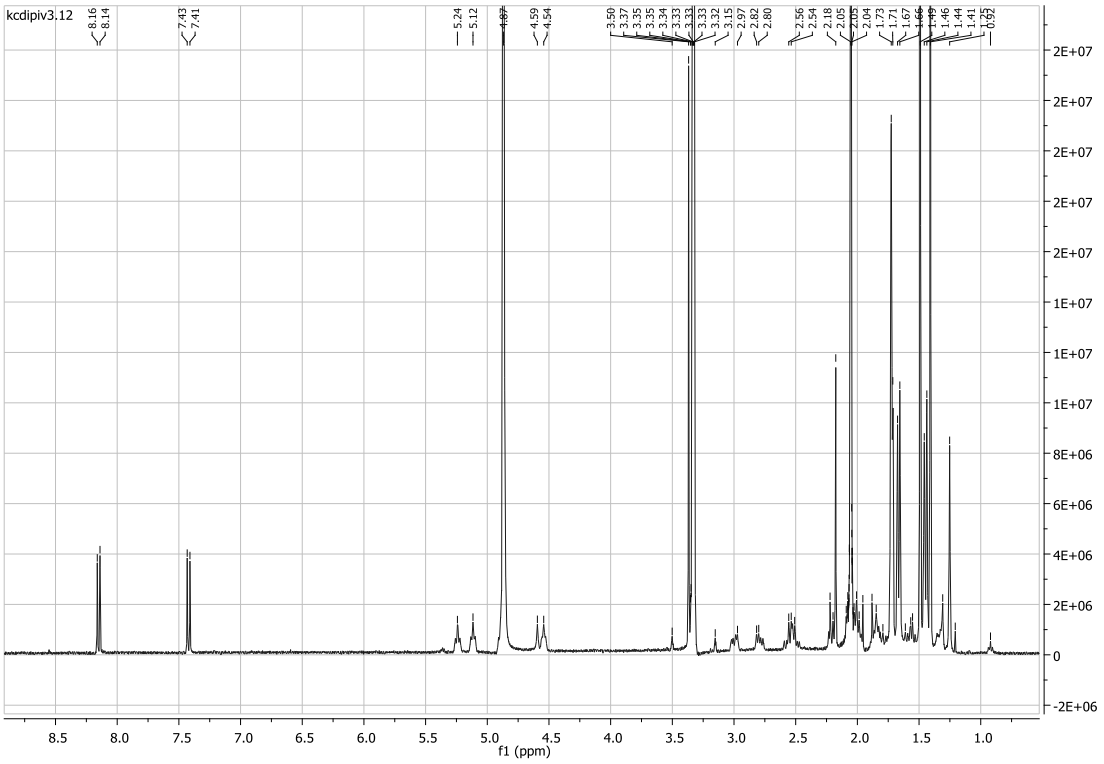
Spectre ^{13}C RMN 13,14-bis dioxolane-3.12-oxy-guttiférone A **135**

13,14-bis pivaloyle,3,12-oxy-guttiférone A **136**

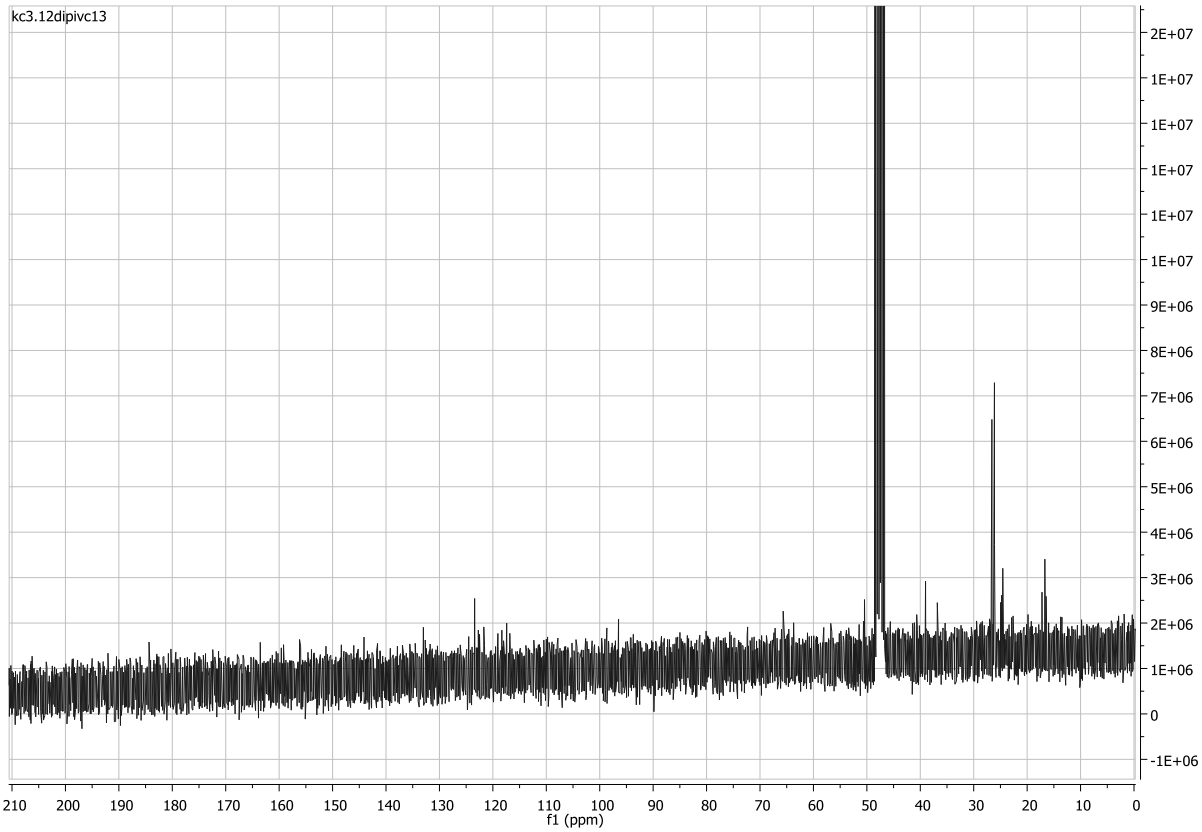


- **Synthèse :** À une solution sous agitation de **108** (30 mg, 0.051 mmol) dans la pyridine anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte (argon) le chlorure de pivaloyl (63 µl, 0.51 mmol), et le DMAP (quantité catalytique). La réaction est faite à température ambiante pendant 12 heures. La réaction est arrêtée avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau trois fois, séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C18 pour obtenir **136** avec un rendement de > 90%.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_8$
- **$[\alpha]_D$** : +61 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 791.4510 (M+ Na)

RMN^{1}H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 8.15 (d, J=9 Hz, 1H), 7.42 (d, J= 9Hz, 1H), 5.24 (t, 1H), 5.12 (t, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.54 (t, 1H), 3.0 (dd, 1H), 2.79 (dd, 1H), 2.54 (m, 3H), 2.20 (m, 3H), 1.73 (m, 12H), 1.67 (d, 7H), 1.49 (s, 9H), 1.45 (d, 7H), 1.41 (s, 9H).

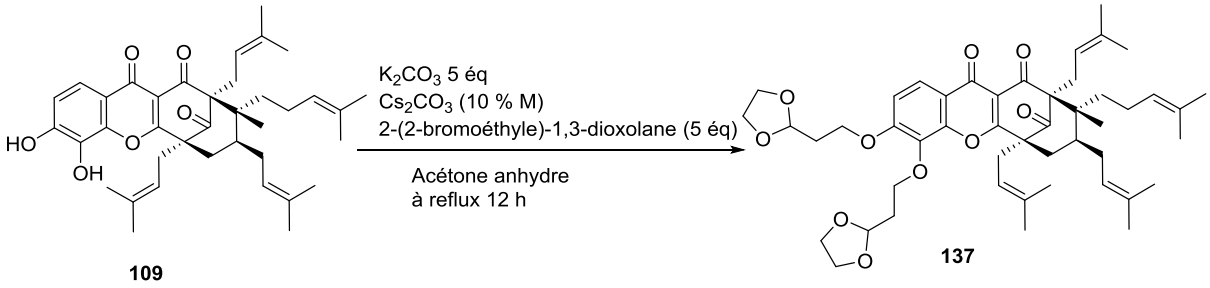


Spectre ^{1}H RMN 13,14-bis pivaloyle,3,12-oxy-guttiférone A **136**



Spectre ^{13}C RMN 13,14-bis pivaloyle,3,12-oxy-guttiférone A **136**

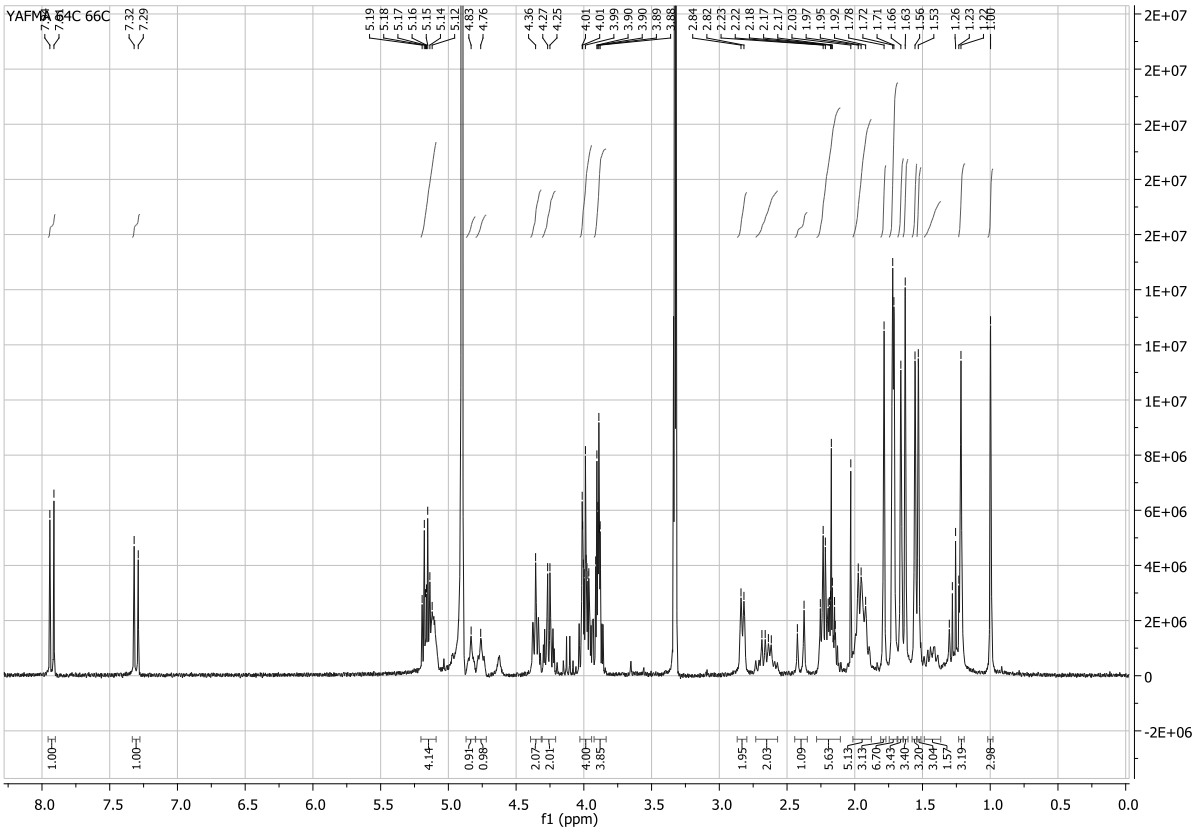
13,14-bis dioxolane,1.12-oxy-guttiférone A **137**



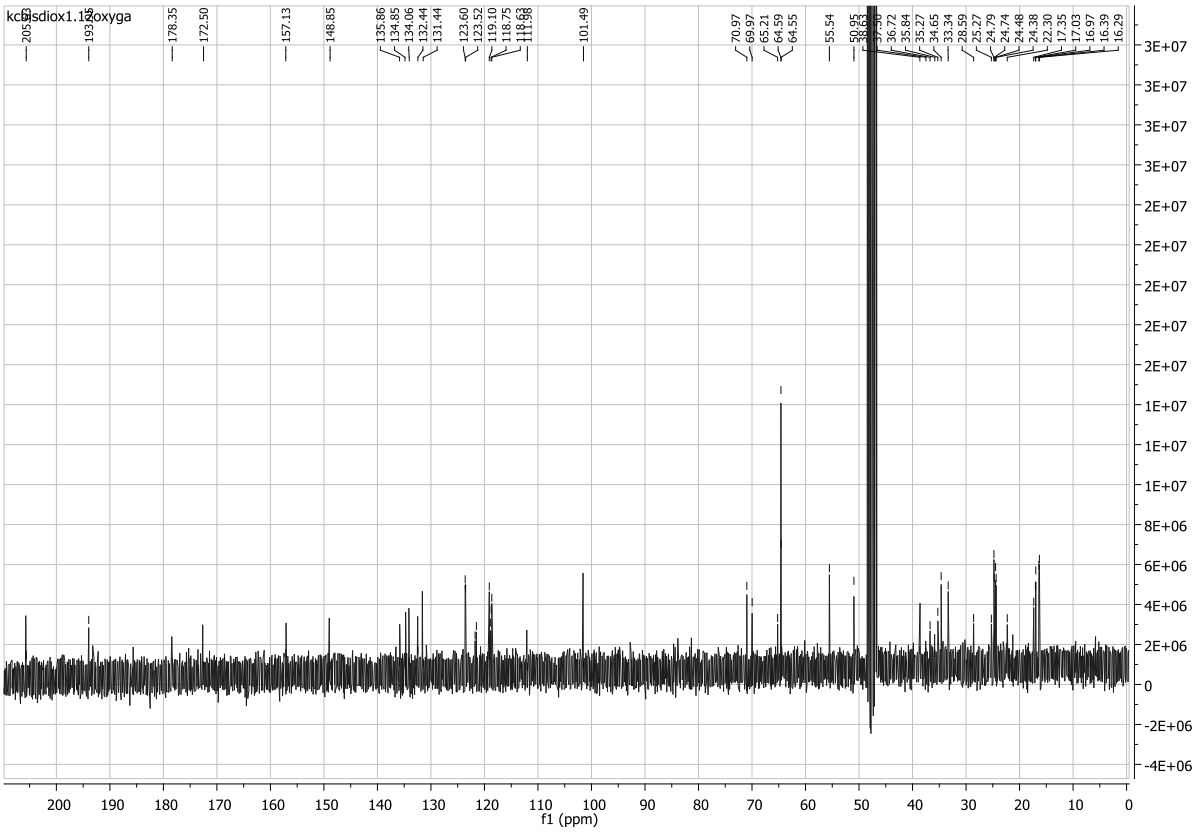
- **Synthèse** À une solution sous agitation de **109** (20 mg, 0.033 mmol) dans l'acétone anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte le 2-(2-bromoéthyle)-1,3-dioxolane (20 µl, 0.165 mmol), le carbonate de potassium (45 mg, 0.33 mmol) et le carbonate de césium (10 mg, 0.033 mmol). La réaction est arrêtée apres 6 h de reflux avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C 18 (débit 20 mL/min, éluents MeCN/ (H_2O), 75:25 → 95:5 sur50 min)) pour obtenir **137** (tr = 42 min) avec un rendement de 83 %
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{43}H_{56}O_8$
- **$[\alpha]_D$** : +73 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 723.3861 (M+ Na)

RMN1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.92 (d, J=9.1 Hz, 1H), 7.30 (d, J= 9.1 Hz, 1H), 5.16 (m, 4H), 4.83 (t, J= 6.27 Hz, 1H), 4.76 (t, J=5.73 Hz, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.26 (m 2H), 3.97 (m, 4H), 3.87 (m, 4H), 2.82 (d, J=5.62 Hz, 2H), 2.65 (m, 2H), 2.40 (d, J=14 Hz, 1H), 2.20 (m, 5H), 1.95 (m, 6H), 1.78 (s, 3H), 1.71 (d, J=3.6 Hz, 6H), 1.66 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.54 (d, J=6.73 Hz, 6H), 1.43 (m, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.00 (s, 3H).

RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 205.72, 193.95, 178.43, 172.65, 149.00, 134.74, 134.13, 132.48, 131.61, 123.61, 123.52, 121.52, 119.10, 118.76, 118.63, 112.09, 101.60, 70.97, 69.98, 65.22, 64.60, 55.54, 48.16, 47.80, 47.75, 47.59, 47.31, 47.23, 47.11, 47.03, 47.01, 46.74, 38.60, 36.73, 35.28, 34.65, 33.34, 28.59, 25.27, 24.80, 24.75, 24.50, 24.39, 22.30, 17.36, 16.97, 16.40, 16.30.

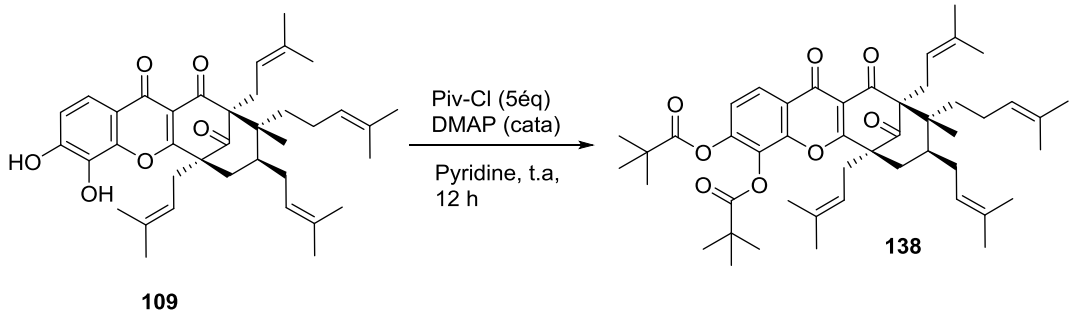


Spectre ^{1}H RMN 13,14-bis dioxolane,1.12-oxy-guttiférone A **137**



Spectre ^{13}C RMN 13,14-bis dioxolane,1.12-oxy-guttiférone A **137**

13, 14-Bis pivaloyle-1,12-oxy-guttiférone A **138**

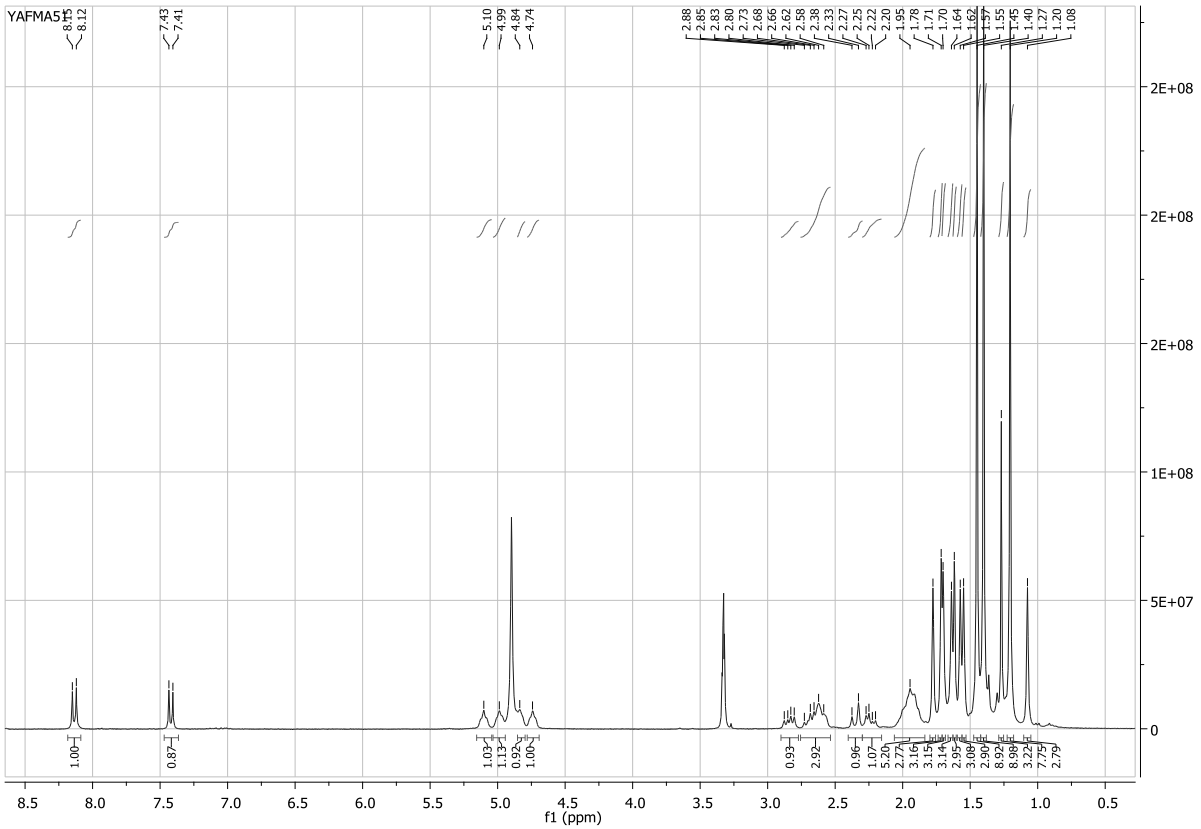


109 **138**

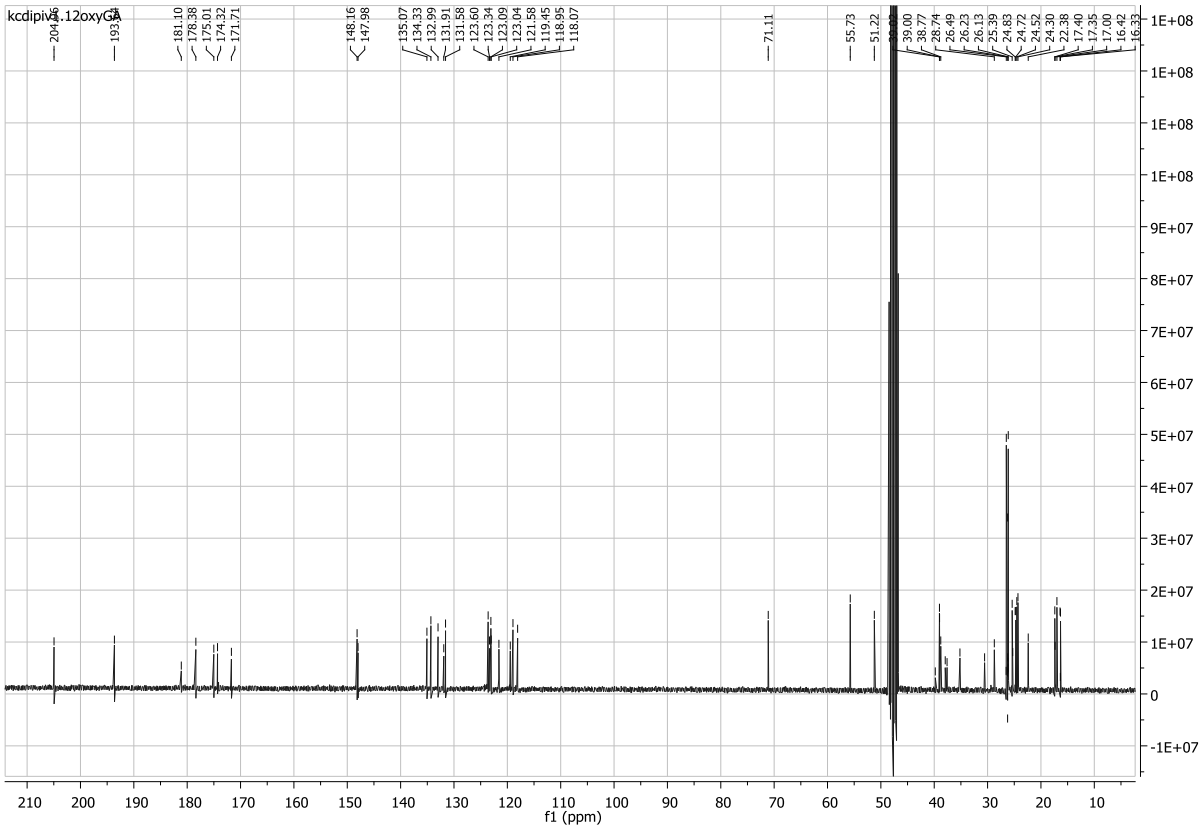
- **Synthèse :** À une solution sous agitation de **109** (30 mg, 0.051 mmol) dans la pyridine anhydre sont ajoutés sous atmosphère inerte (argon) le chlorure de pivaloyl (63 µl, 0.51 mmol), et le DMAP (quantité catalytique). La réaction est faite à température ambiante pendant 12 heures. La réaction est arrêtée avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau trois fois, séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C18 pour obtenir **138** avec un rendement de > 90%.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_8$
- **$[\alpha]_D$** : +67 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 791.4510 (M+ Na)

RMN1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 8.13 (d, J=9.80 Hz, 1H), 7.42 (d, J=8.93 Hz, 1H), 5.10 (t, J=6.40 Hz, 1H), 4.99 (t, J=5.56 Hz, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.74 (t, J=4.89 Hz, 1H), 2.84 (m, 1H), 2.66 (m, 3H), 2.35 (d, J=14.49 Hz, 1H), 2.24 (m, 1H), 1.95 (m, 5H), 1.78 (s, 3H), 1.70 (d, J=4.72 Hz, 6H), 1.63 (d, J=5.96 Hz, 3H), 1.56 (d, J=7.53 Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.40 (s, 9H), 1.20 (s, 8H), 1.08 (s, 3H).

RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 204.96, 193.64, 181.10, 178.38, 175.01, 174.32, 171.71, 148.16, 147.98, 135.07, 134.33, 132.99, 131.91, 131.58, 123.60, 123.34, 123.09, 123.04, 121.58, 119.45, 118.95, 118.07, 71.11, 55.73, 51.22, 39.80, 39.02, 39.00, 38.77, 37.94, 37.59, 35.18, 30.56, 28.74, 26.51, 26.49, 26.25, 26.25, 26.23, 26.21, 26.19, 26.18, 26.16, 26.13, 25.39, 25.29, 24.83, 24.72, 24.52, 24.30, 22.38, 17.40, 17.35, 17.00, 16.42, 16.36, 16.33.

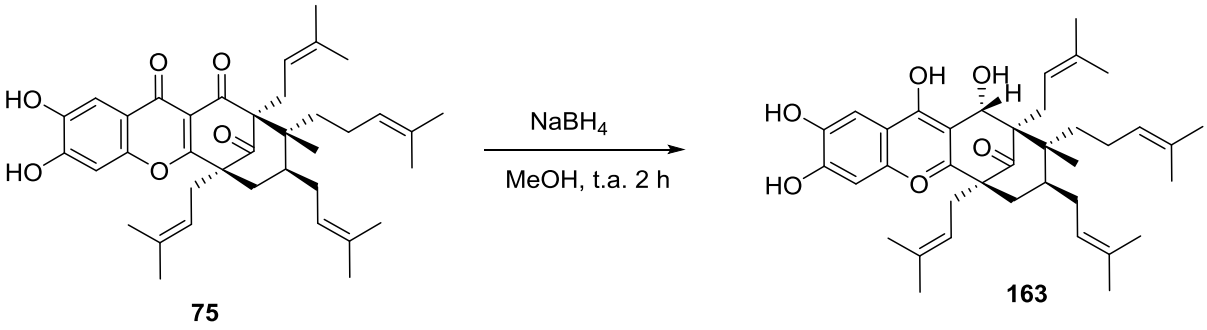


Spectre ^{1}H RMN 13, 14-Bis pivaloyle-1,12-oxy-guttiférone A **138**



Spectre ^{13}C RMN 13, 14-Bis pivaloyle-1,12-oxy-guttiférone A **138**

163

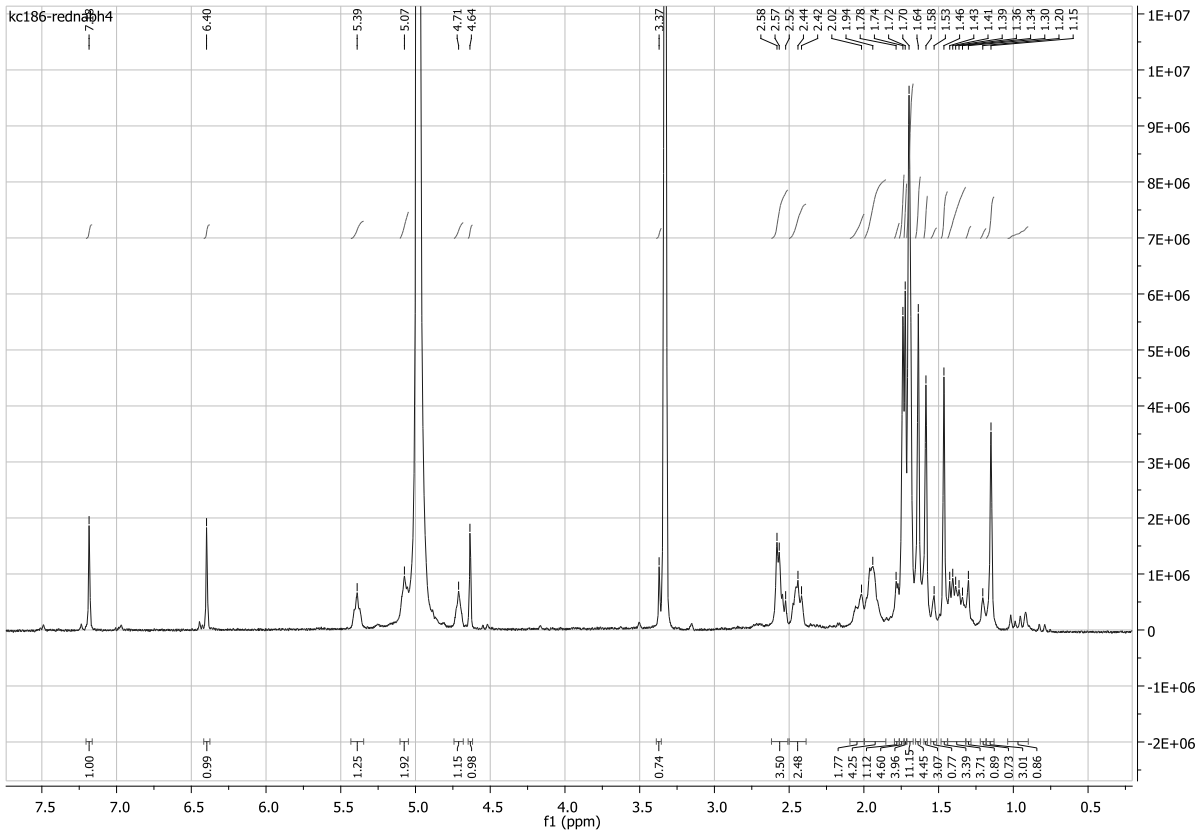


75 **163**

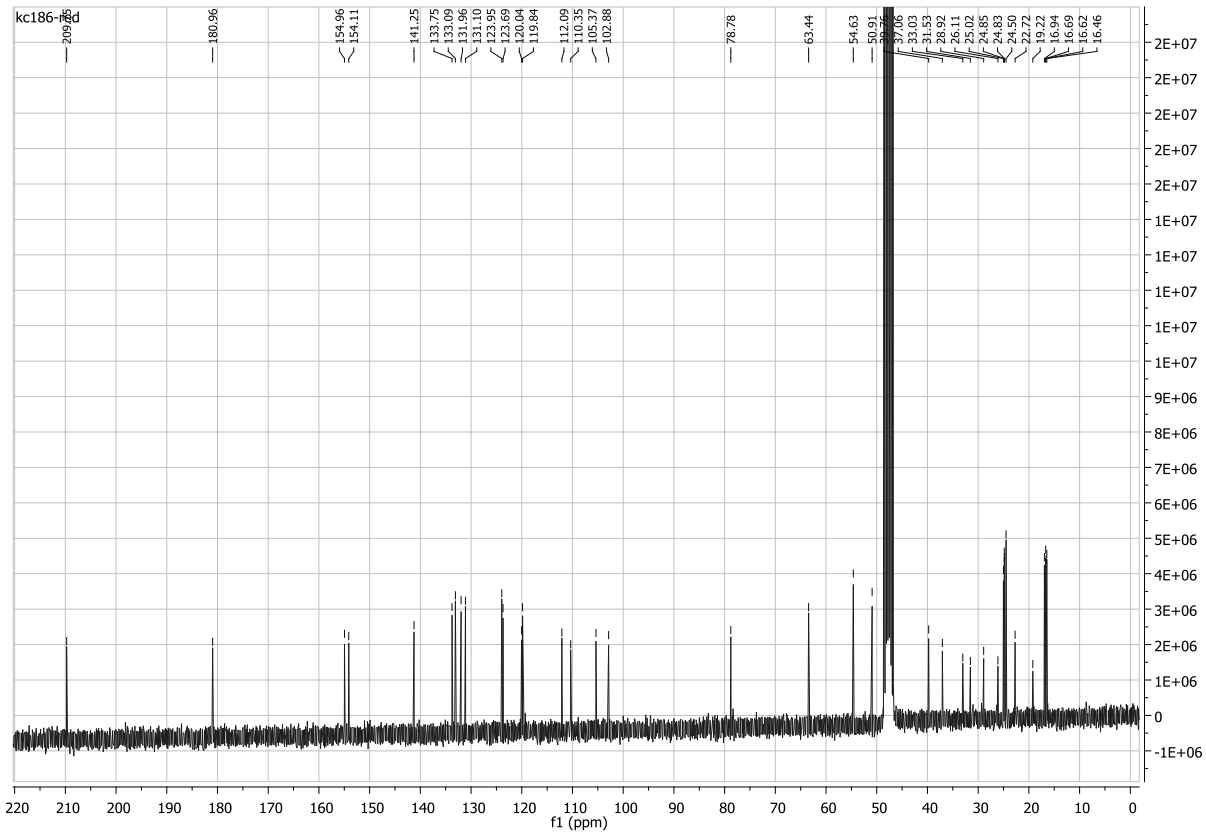
- **Synthèse :** À une solution sous agitation de **75** (15 mg, 0.026 mmol) dans le méthanol (5 mL) a 0°C est ajouté 2 équivalents de $NaBH_4$ (1.2 mg, 0.052 mmol) La réaction est faite à température ambiante pendant 12 heures. La réaction est arrêtée avec de l'acide chlorhydrique 1M, puis extraite au dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau trois fois, séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C18 pour obtenir **163** avec un rendement > 90%.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{38}H_{41}O_6$
- **$[\alpha]_D$** : +87 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z :* 602.3756 (M-H)

RMN 1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.18 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.39 (, 1H), 5.07 (t, 1H), 4.71 (t, 1H), 4.64 (s, 1H), 2.57 (m, 4H), 2.48-2.40 (m, 2H), 2.08-1.99 (m, 2H), 1.99-1.89 (m, 4H), 1.78 (d, 1H), 1.74 (s, 3H), 1.72 (s, 3h), 1.70 (s, 9H), 1.64 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.53 (s, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.43-1.34 (m, 3H), 1.30 (s, H), 1.15 (s, 3H), 1.03 (q, 1H)

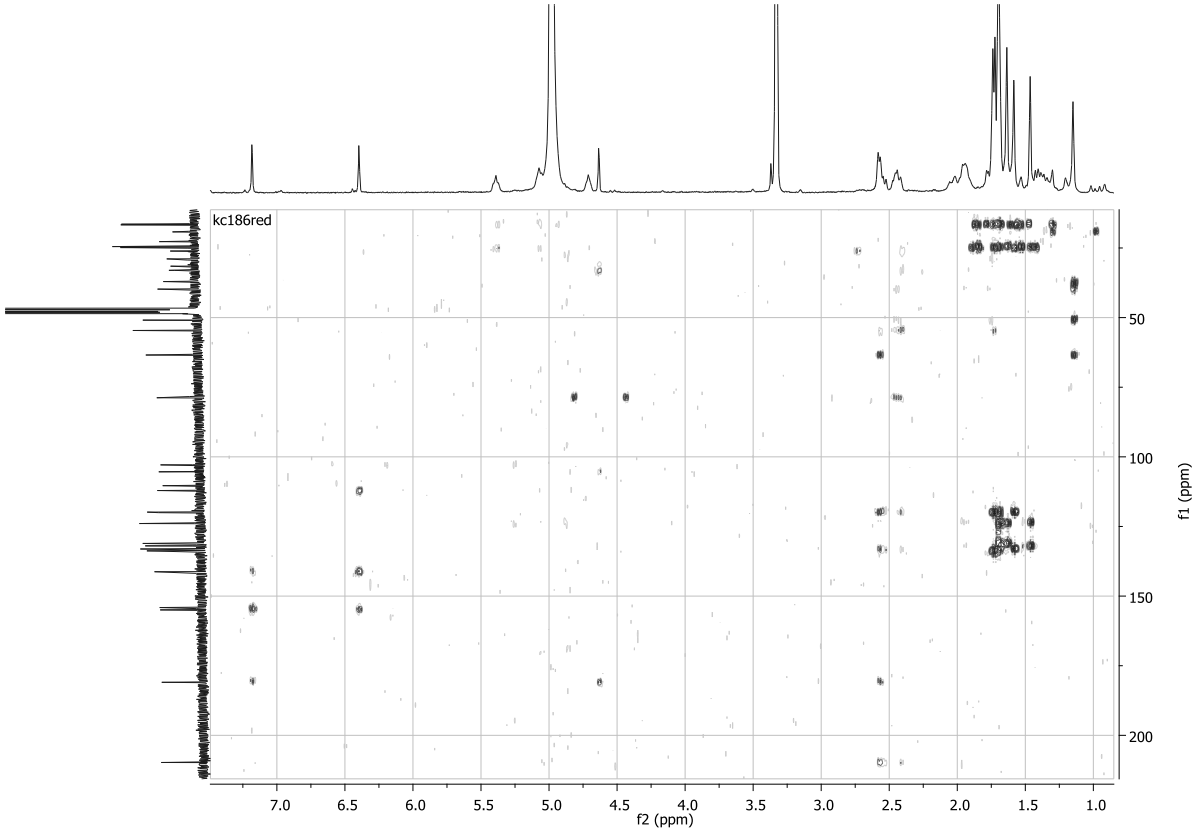
RMN 13C (400 MHz, MeOD): 209.76 (C-9), 181.76 (C-1), 154.96 (C-16), 154.11 (C-14), 141.25 (C-13), 133.75 (C-31), 133.09 (C-19), 131.96 (C-26), 131.10 (C-36), 123.95, 123.69, 120.04, 119.84, 112.09, 110.35, 106.37, 102.88, 78.78, 63.44, 54.63, 50.91, 39.76, 37.06, 33.03, 31.53, 28.92, 26.11, 25.02, 24.85, 24.83, 24.50, 22.72, 19.22, 16.94 (C-22), 16.69 (C-32), 16.62 (C-27), 16.46 (C-38).



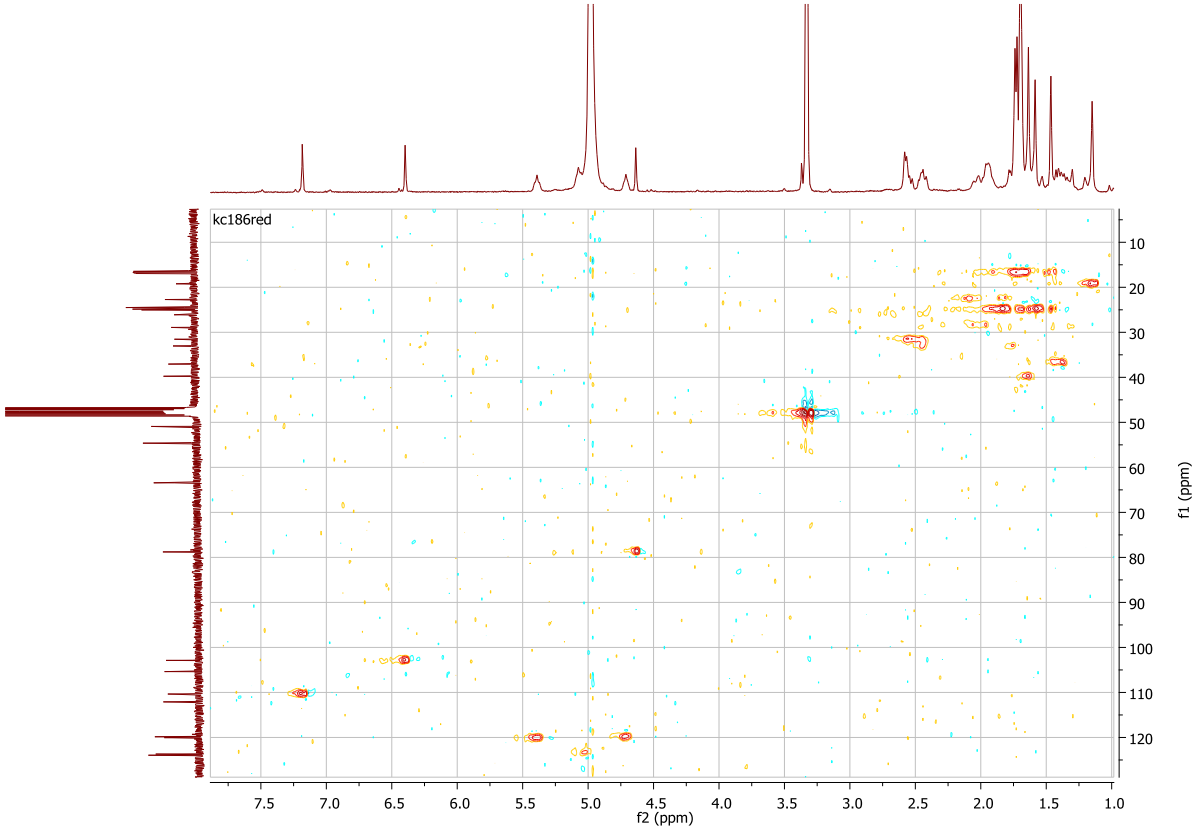
Spectre ^{1}H de **163**



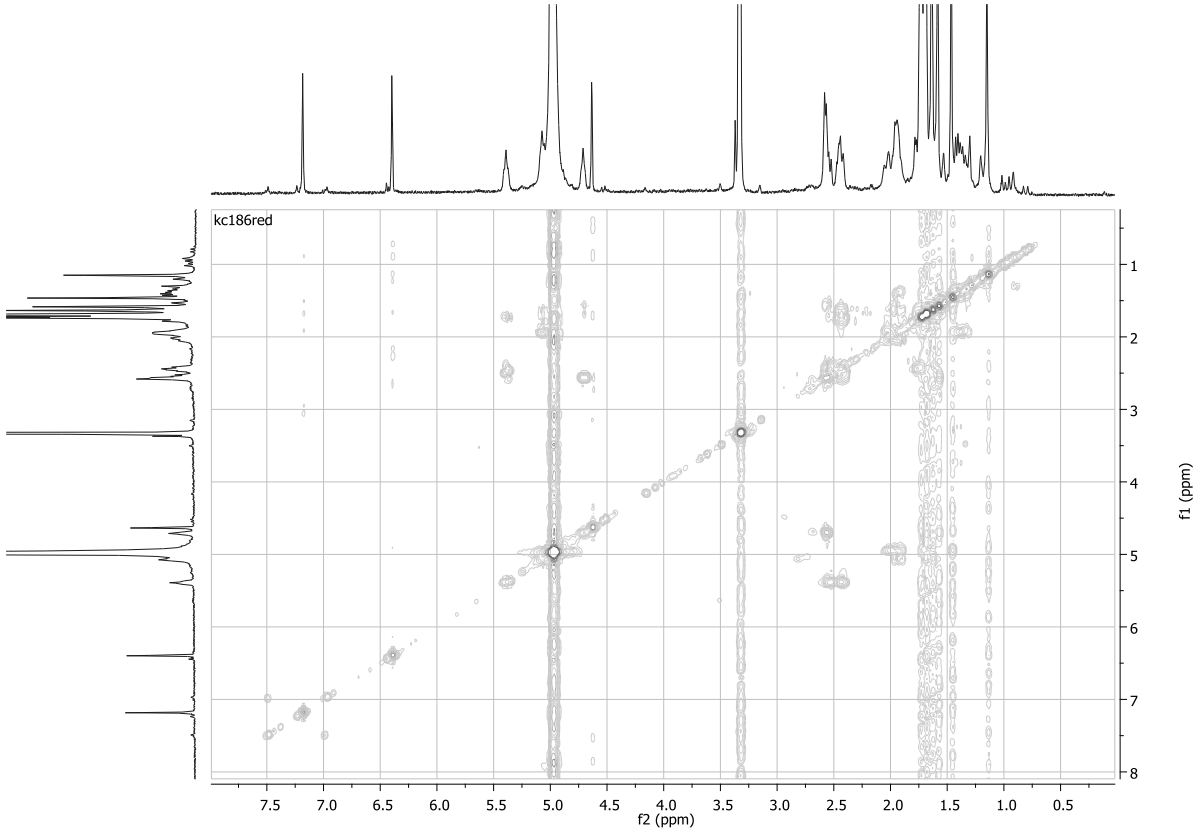
Spectre ^{13}C RMN de **163**



Spectre HMBC de **163**

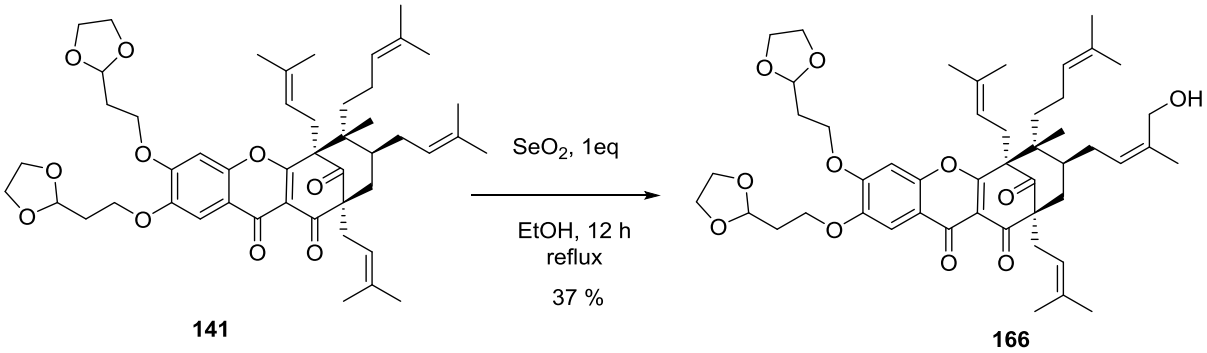


Spectre HSQC de **163**



Spectre NOESY de **163**

28-hydroxyle-13,14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **166**

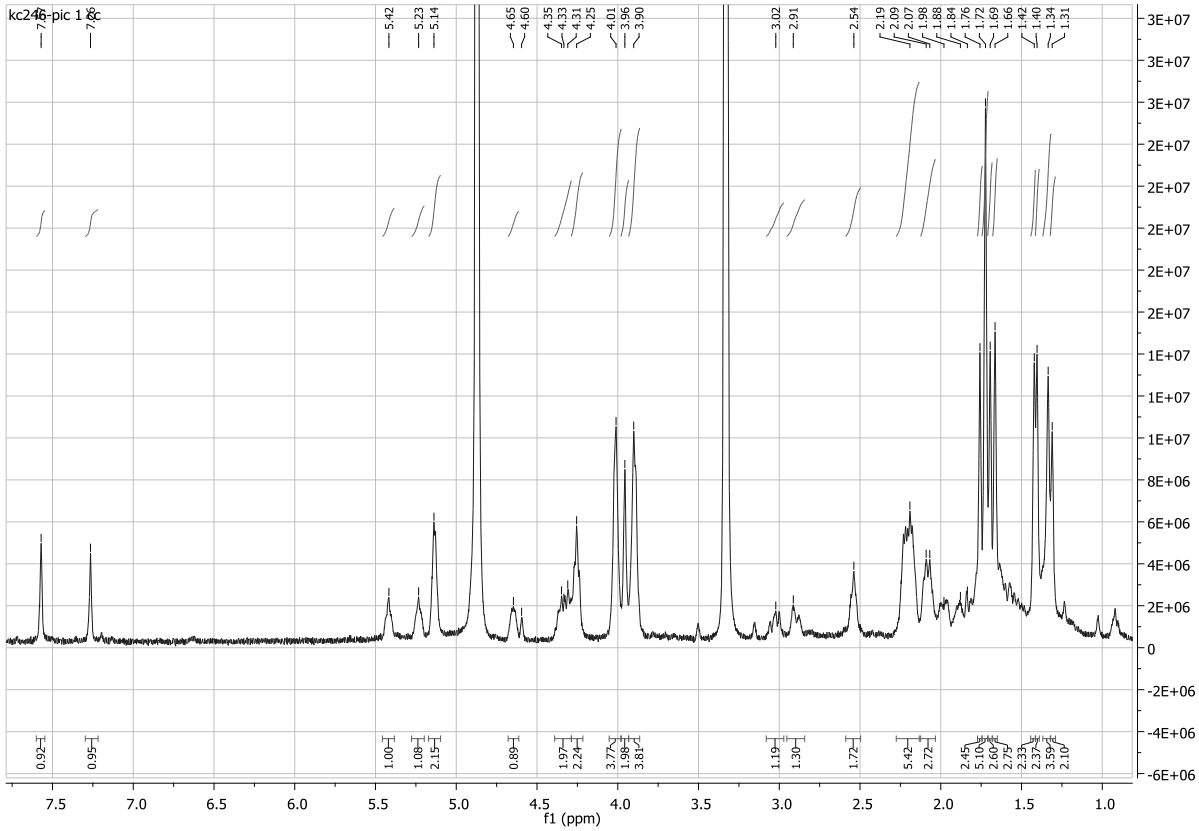


141 **166**

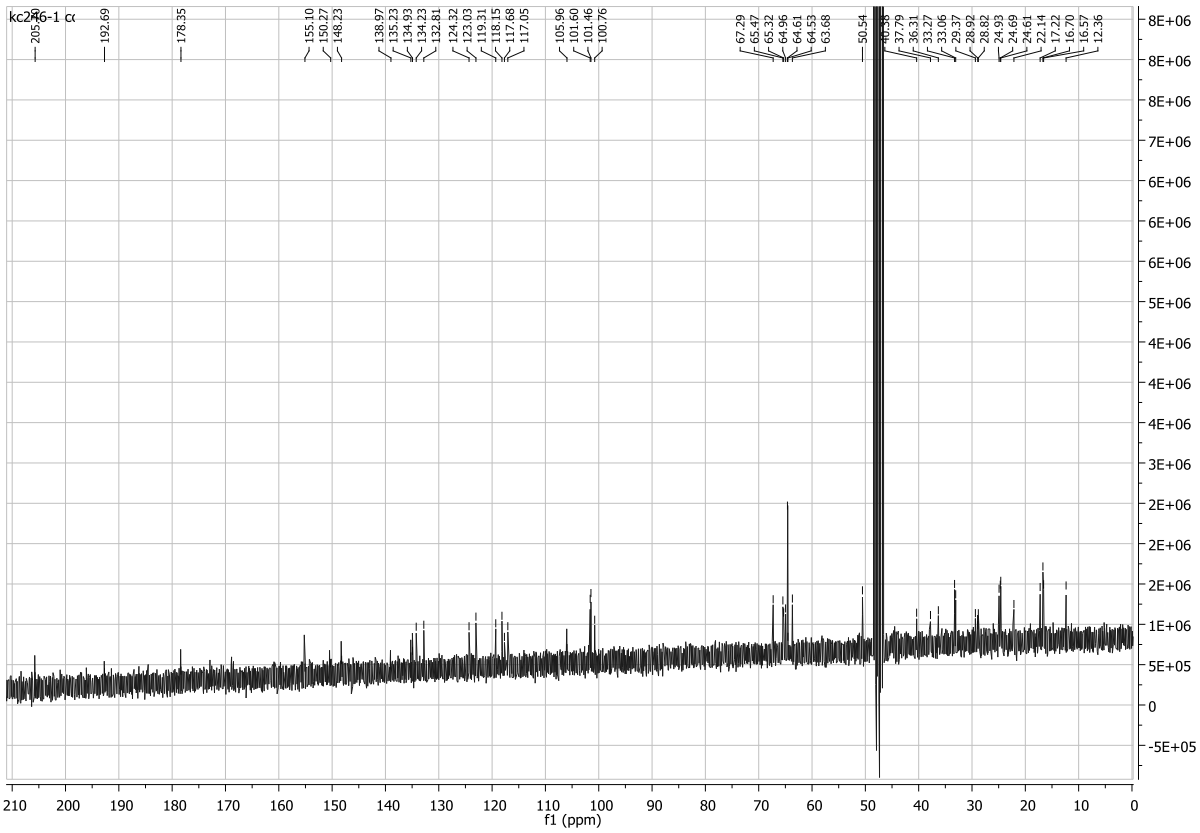
- **Synthèse :** 20 mg de **141** (1éq, 2.5x10^{-5} mol)ainsi que 2.6 mg de SeO_2(1éq, 2.5x10^{-5} mol) sont dissouts dans 5 mL d'éthanol à reflux. Au bout de 12h, la réaction est arrêtée et plongée dans un bain glacé. Les produits sont alors extraits par de grands volumes de solvants préalablement refroidis (6 x 20 mL DCM/HCl 1M) en prenant soin de ne pas prendre le sélénium précipité dans la phase organique. La phase organique est lavée à l'eau froide trois fois, séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur colonne C18 pour obtenir **166** avec un rendement de 37 %.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{48}H_{64}O_{11}$
- **$[\alpha]_D$** : +110 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 839.4344 (M+ Na)

RMN1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.57 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 5.42 (t, 1H), 5.23 (t, 1H), 5.14 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.35.4.31 (m, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.01 (m, 4H), 3.96 (2H), 3.90 (m, 4H), 3.02 (1H), 3.02 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.54 (t, 2H), 2.19 (m, 5H), 2.09-2.07 (m, 3H); 1.76 (s, 3H), 1.72 (s, 6H), 1.69 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.31 (s, 3H)

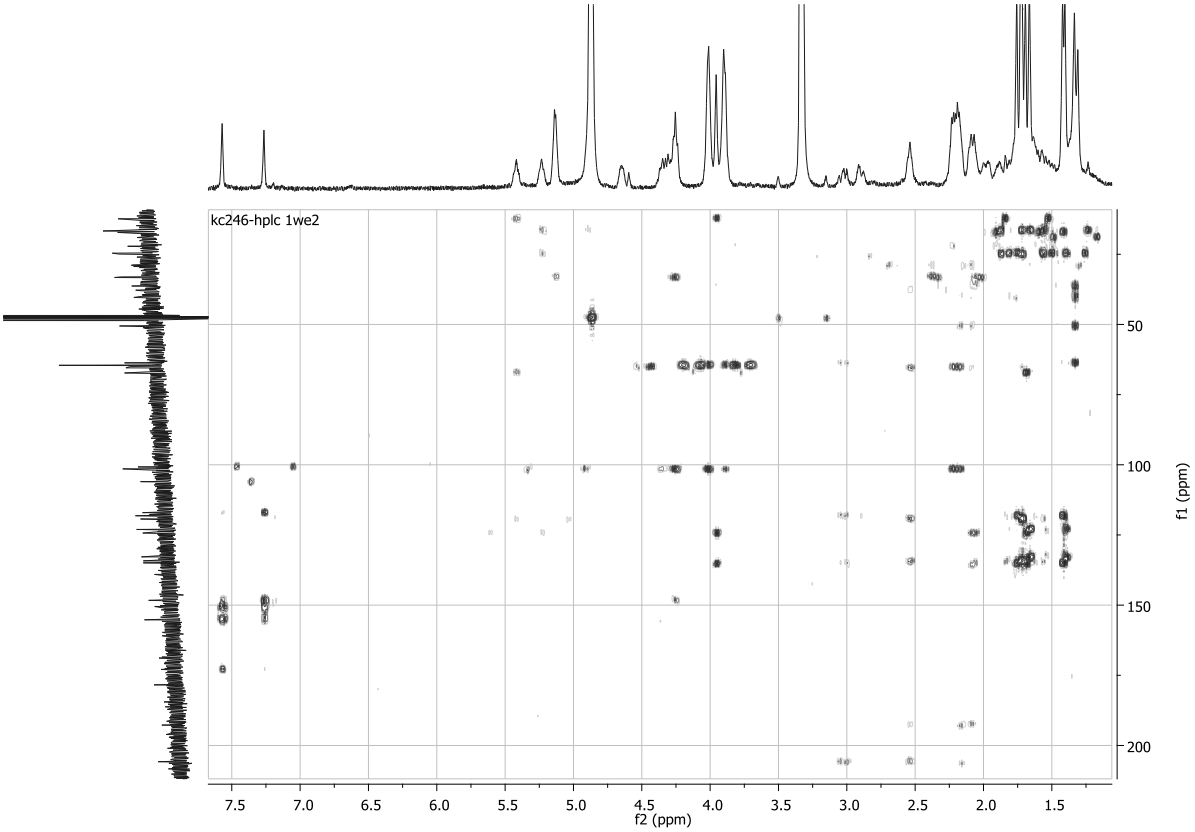
RMN 13C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 206.70, 192.69, 178.35, 155.10, 154.30, 150.27, 148.23, 138.97, 135.23, 134.23, 132.81, 124.32, 123.03, 119.31, 118.12, 117.68, 117.05, 105.96, 101.60, 101.46, 67.29, 65.47, 65.32, 64.97, 64.61, 64.63, 63.68, 50.54, 40.38, 37.79, 36.31, 33.27, 33.06, 29.37, 28.92, 28.82, 24.93, 24.69, 24.61, 22.14, 17.72, 16.70, 16.57, 12.36.



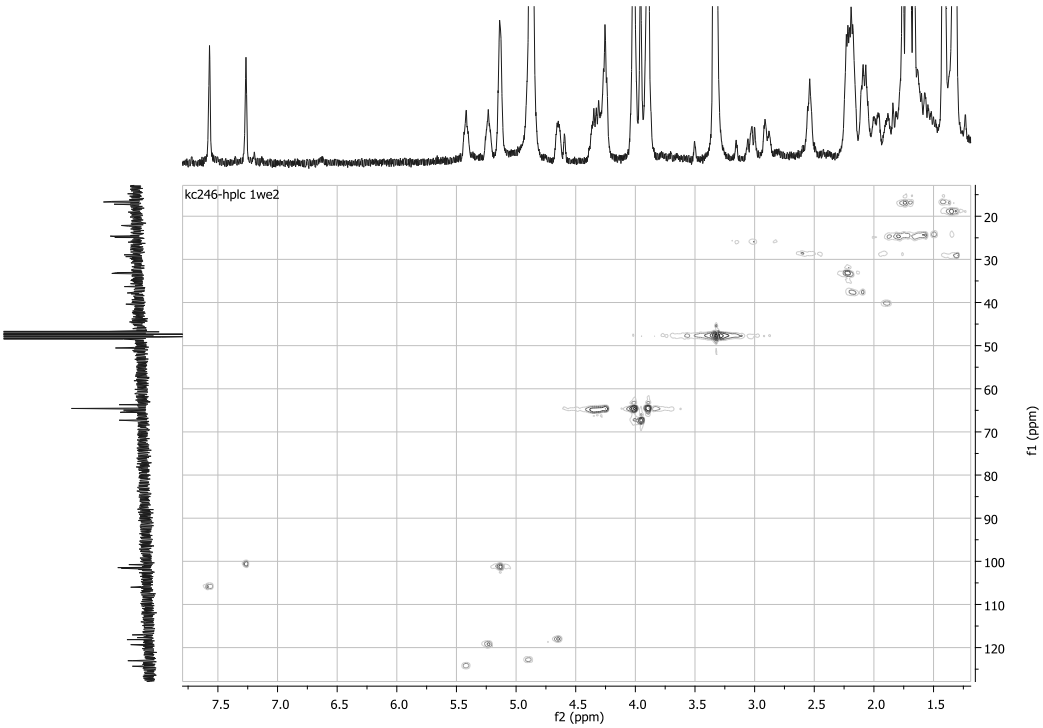
Spectre ^{1}H RMN 28-hydroxyle-13,14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **166**



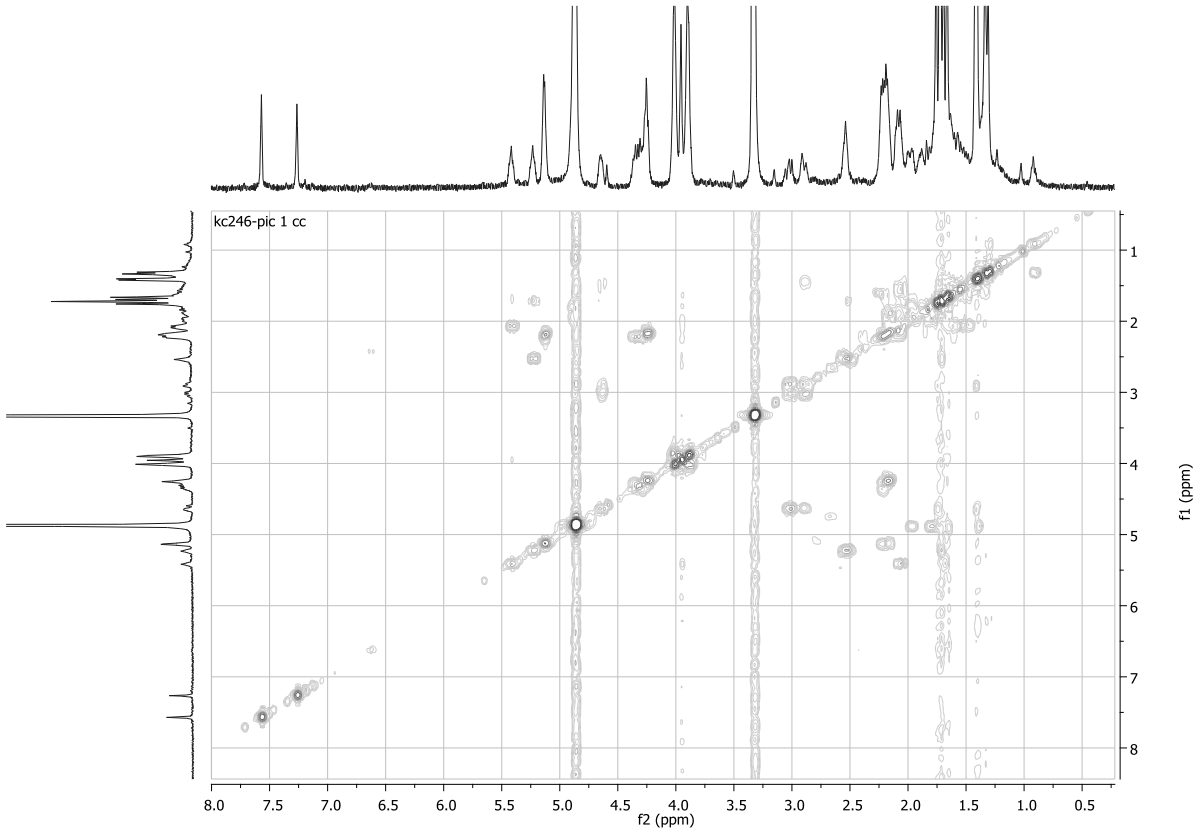
Spectre ^{13}C RMN 28-hydroxyle-13,14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **166**



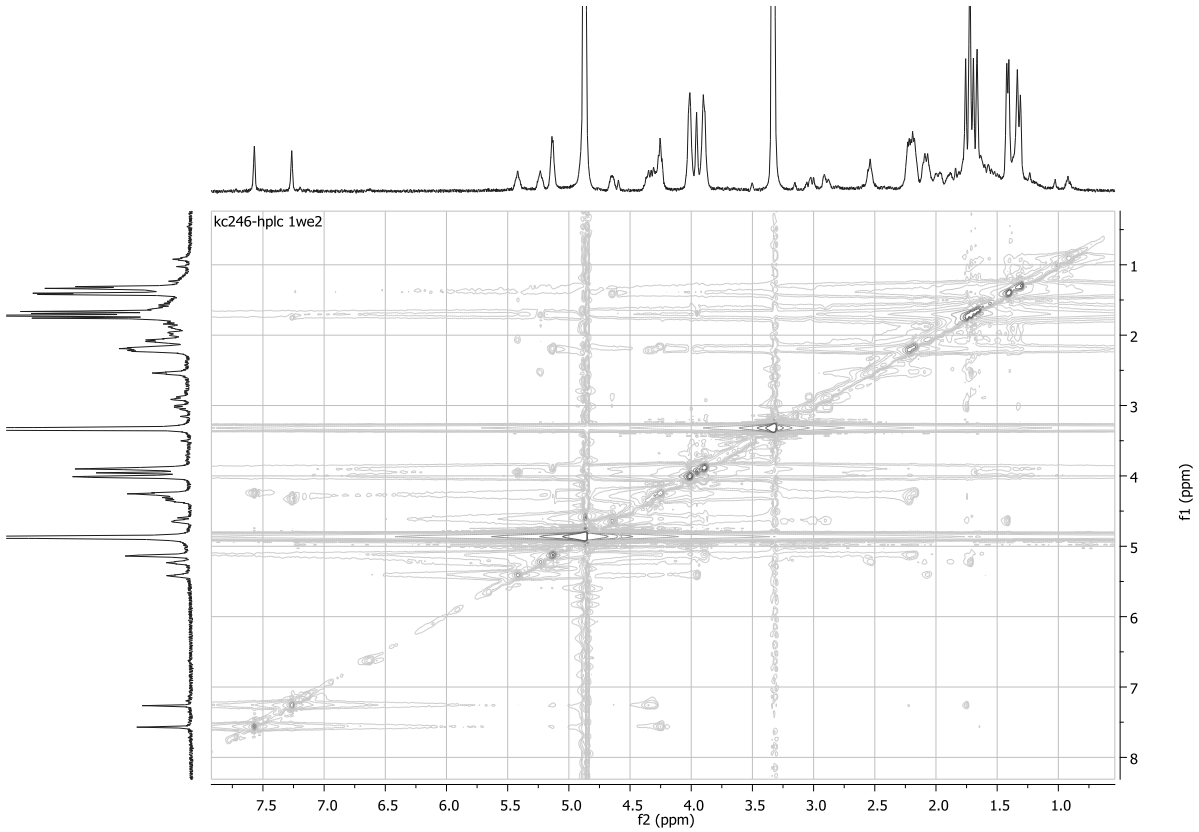
Spectre HMBC 28-hydroxyle-13,14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **166**



Spectre 28-hydroxyle-13,14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **166**

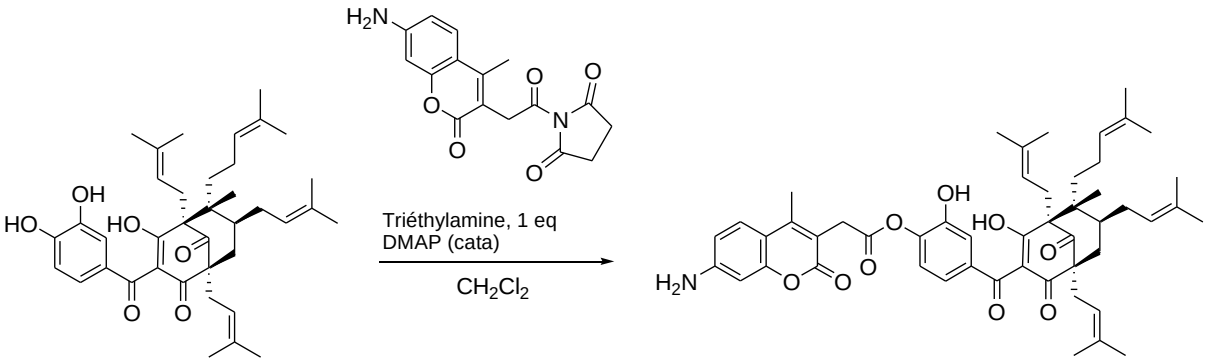


Spectre COSY 28-hydroxyle-13,14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **166**



Spectre NOESY 28-hydroxyle-13,14-bis dioxolane, 3.16-oxy-guttiférone A **166**

Sonde d'imagerie directe **175**

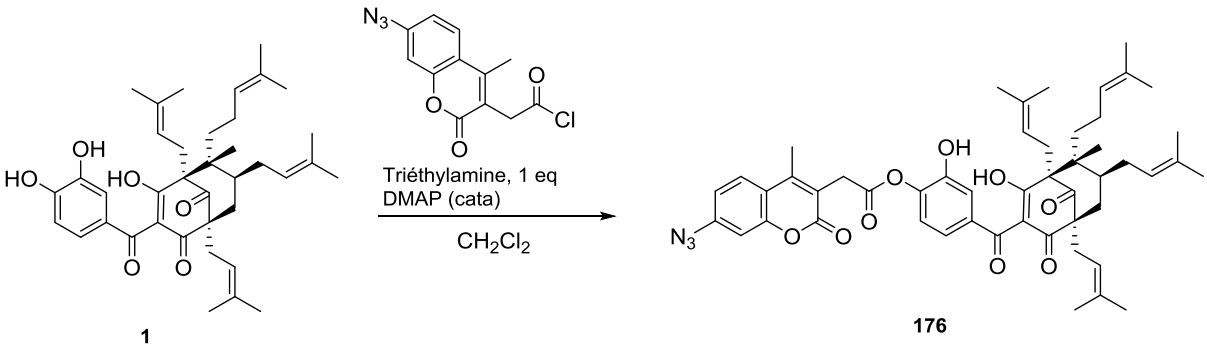


1 **175**

- **Synthèse** : 2 mg de guttiférone A (1 éq, 3.3 x 10-6 mol), 1 mg de 2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetyl chloride (1.2 éq, 3.96 x 10-6 mol) ainsi qu'une pointe de spatule de DMAP sont dissouts dans 0.5 mL de dichlorométhane anhydre. Un équivalent de triéthylamine est ajouté dans le dichlorométhane. La réaction est arrêtée par addition d'une solution de HCl 1M, puis extraite 3 fois à l'acétate d'éthyle. Après évaporation sous pression réduite, le brut est chromatographié sur gel de silice (gradient DCM -> MeOH) pour obtenir **175** avec un rendement de 32 %.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{50}H_{59}NO_9$
- **$[\alpha]_D$** : +12 $dm^{-1}\ g^{-1}\ cm^3$
- **SM** : (ESI) *m/z* 817.4184 (M-H)

La faible quantité de produit isole, n'a permis une caracérisation par spéctrométrie de masse

Sonde protéomique **176**

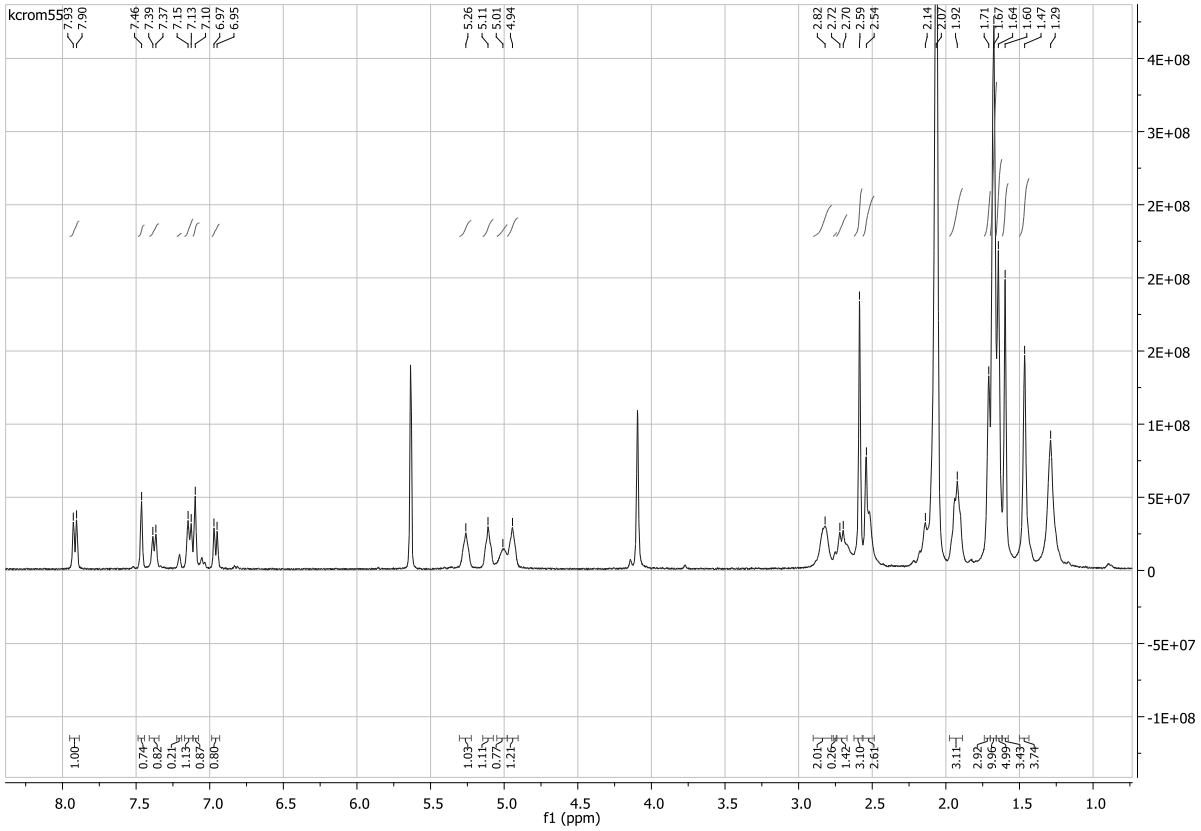


1 176

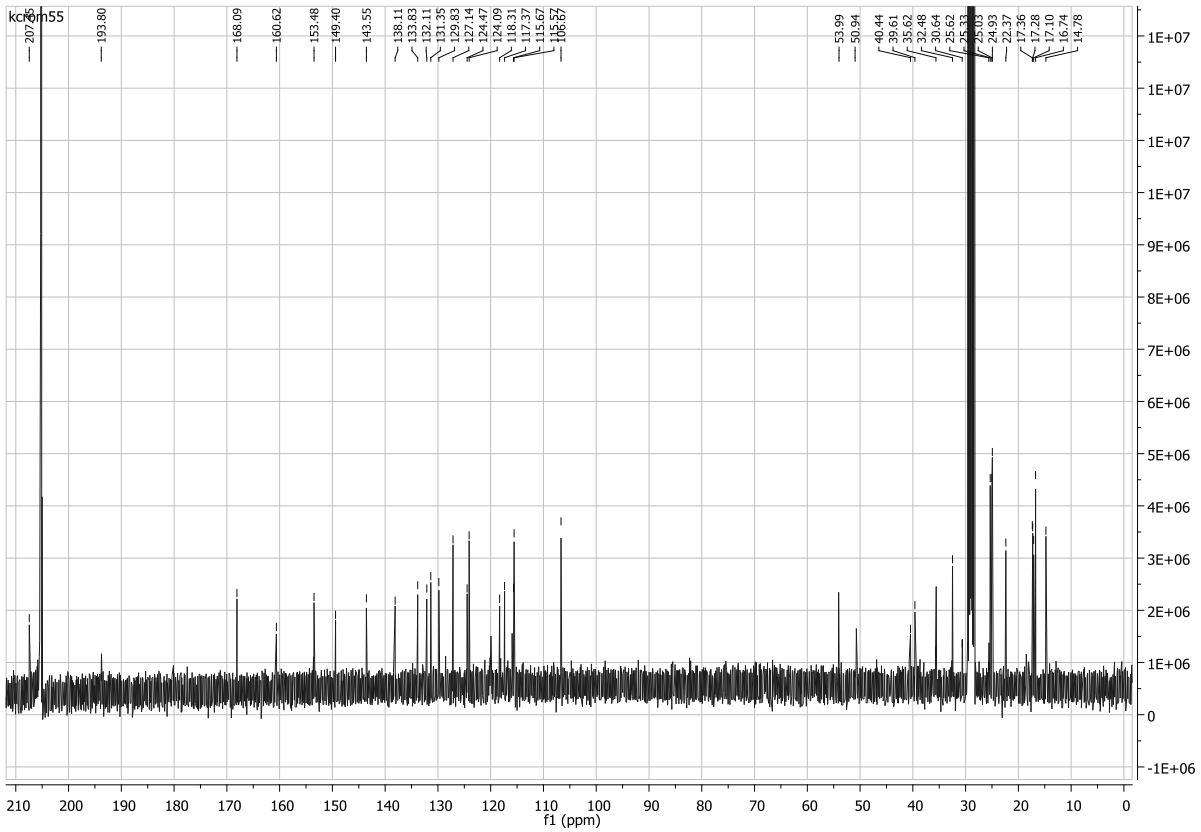
- **Synthèse** 10 mg de guttiférone A (1 éq, 1.6 x 10-5 mol), 5 mg de 2-(7-azino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetyl chloride (1.2 éq, 2.0 x 10-5 mol) ainsi qu'une pointe de spatule de DMAP sont dissouts dans 0.5 mL de dichlorométhane anhydre. Un équivalent de triéthylamine est ajouté dans le dichlorométhane. La réaction est arrêtée par addition d'une solution de HCl 1M, puis extraite 3 fois à l'acétate d'éthyle. Après évaporation sous pression réduite, le brut est chromatographié sur gel de silice (gradient DCM -> MeOH) pour obtenir **176** avec un rendement de 37 %.
- **Aspect** : Huile jaune
- **Formule brute** : $C_{50}H_{59}N_3O_9$
- **$[\alpha]_D$** : +83 dm^{-1} g^{-1} cm^3
- **SM** : (ESI) *m/z* 843.4039 (M-H)

RMN1H (400 MHz, Acétone d6): δ (ppm): 7.91 (d, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.38(d, 1H), 7.14 (d, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.96 (d, 1H), 5.26 (t, 1H), 5.11 (t, 1H), 5.01 (br, 1H), 4.94 (t, 1H), 2.82 (br, 2H), 2.71 (d, 2H), 2.54 (br, 2H), 2.14 (s, 1H), 1.92 (m, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.67 (s, 9H), 1.64 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.29 (s, 3H).

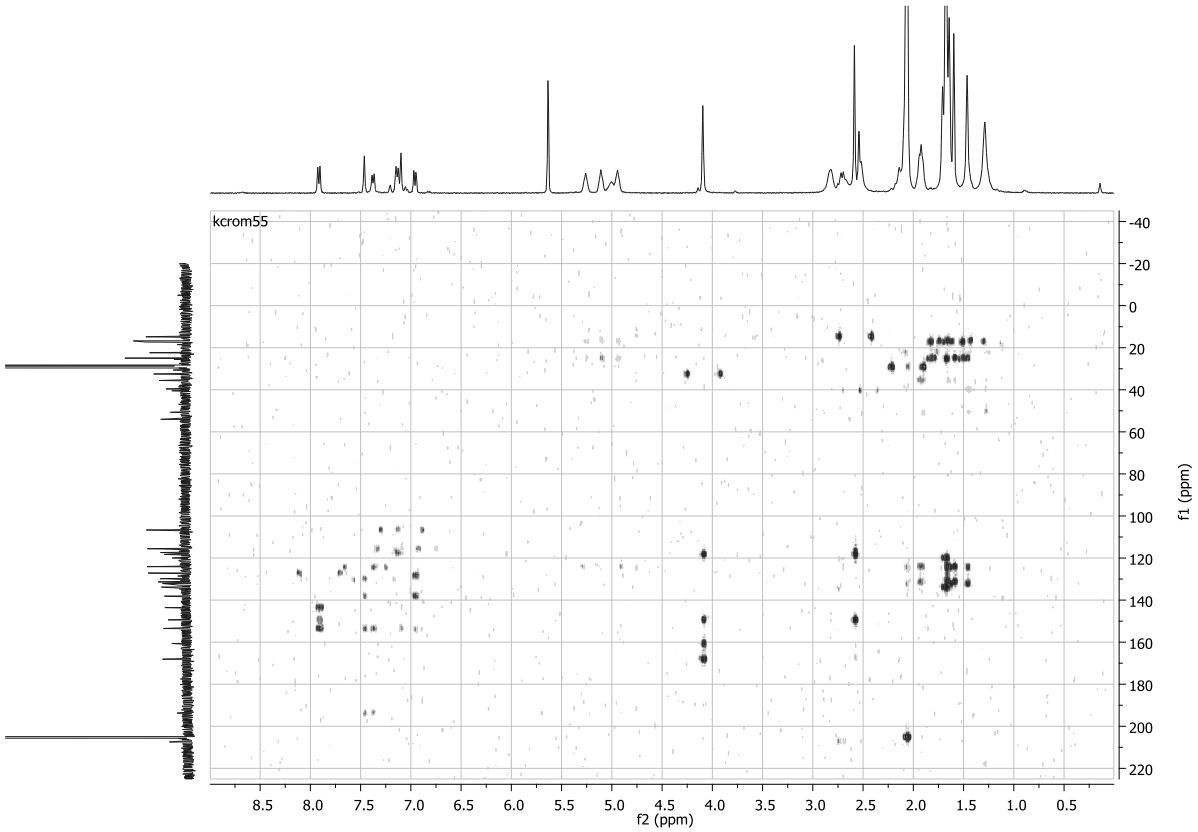
RMN 13C (400 MHz, Acétone d6) : δ (ppm) : 207.45, 193.76, 168.09, 160.62, 153.48, 149.40, 143.55, 138.11, 133.83, 132.11, 131.55, 129.83, 127.14, 124.47, 119.87, 118.31, 117.37, 115.67, 115.57, 106.67, 54.06, 50.70, 41.35, 39.61, 35.57, 32.44, 30.64, 35.62, 25.33, 25.03, 24.93, 22.37, 17.36, 17.28, 17.10, 16.74, 14.78.



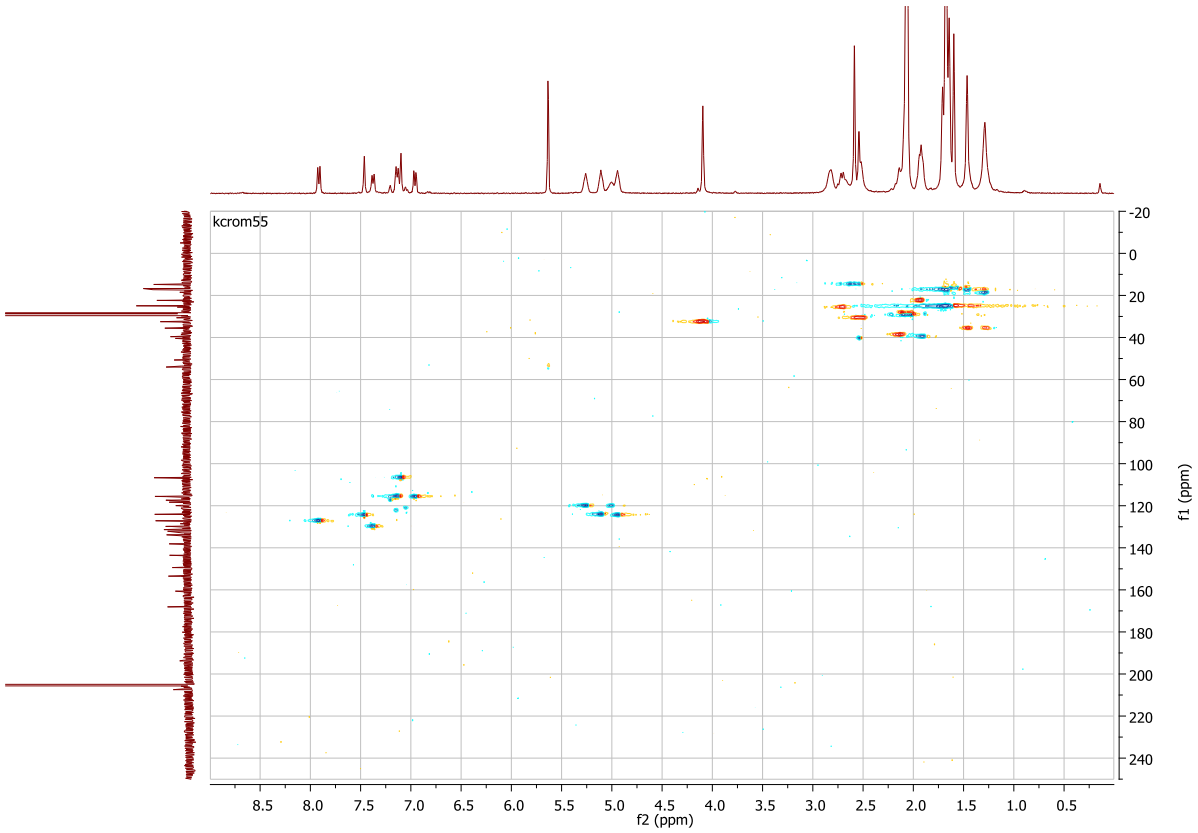
Spectre ^{1}H de **176**



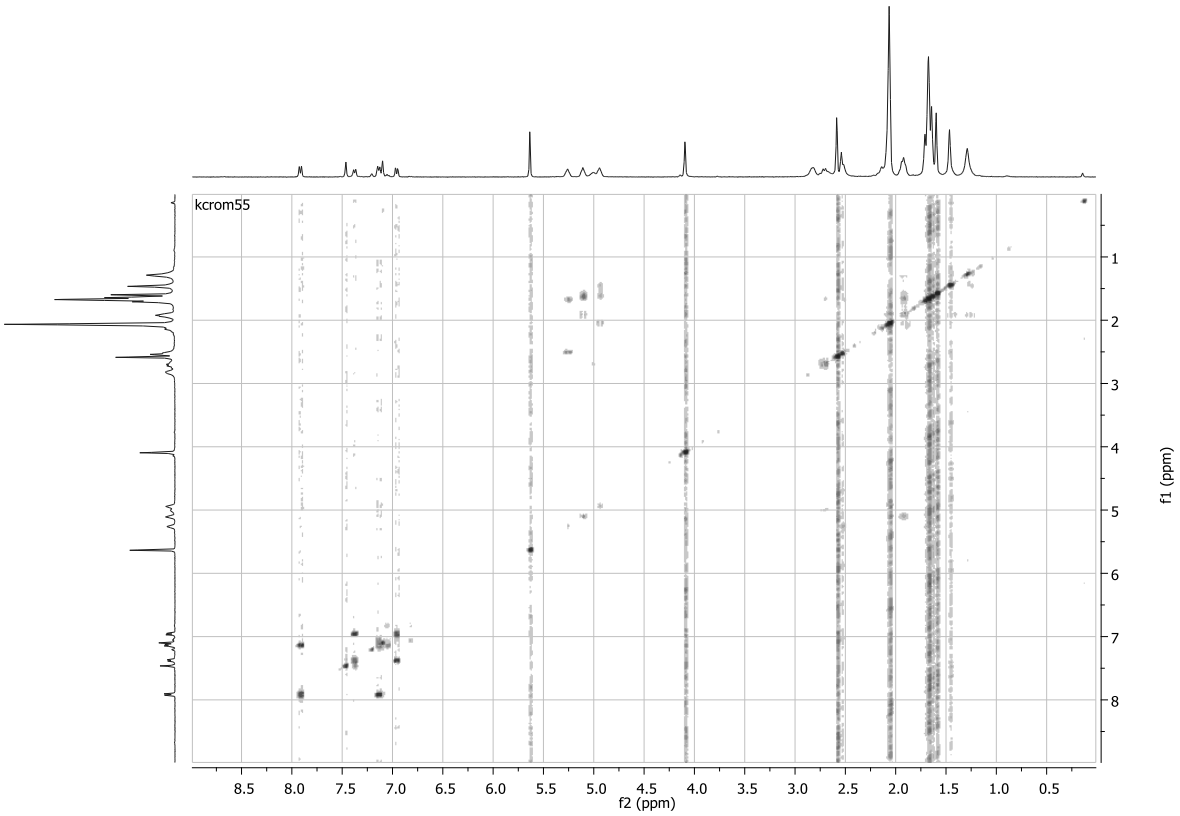
Spectre ^{13}C de **176**



Spectre HMBC de **176**



Spectre HSQC de **176**



Spectre COSY de **176**

ANNEXE 1 : Identification des variables

Entry	p-value	MS 1	MS 2	MS 3	Metlin aswn	Home-made DB	compound	d ppm
1	2.08E-19	299.076837	284.03 269.04 197.33 166.64		5	0	Dimethyl fukiic acid	1
2	1.08E-17	651.081444	not frag		14	0	unidentified	
3	2.45E-17	431.1927476	385.19 341.07 324.16 311.06	324.15 287.42 223.13 205.12 166.88 153.09	190	0	peptide	
4	3.95E-17	255.0733016	not frag		5	0	unidentified	
5	4.02E-17	284.0290346			/	/	283+1	
6	4.04E-17	283.0241932	255.03 166.77	241.15 227.02 211 183.05	8	0	**Rhein**	1
7	1.11E-16	387.2005582	343.29 287	324 287 197	71	0	unidentified	
8	1.76E-16	286.0795044			/	/	frag de 301.07	
9	2.08E-16	329.0597036	324.08 287.43 197 167	287.43 197 166	9	3	unidentified	
10	3.69E-16	433.2083872	387	324 287.44	232	0	unidentified pept	

				225 166				
			313 166					
11	4.22E-16	790.4613555			4	0	**fatty acid**	0
12	6.93E-16	289.0723383	245.08 205.05 179	227 203 187 161	39	0	**Catechin** or isomer	2
13	8.52E-16	386.1674638	not frag		1	0	unidentified compound	
14	8.55E-16	669.4841351	not frag		1	6	unidentified compound	
15	1.27E-15	366.0370121	not frag		1	0	unidentified compound	
16	1.44E-15	371.0992963	353.09 324.93 287.43 231.05 166.88	 197.68 167.87	8	0	unidentified compound	
17	1.49E-15	423.0928156	not frag		10	1	unidentified compound	
18	1.79E-15	789.3968376	not frag		1	0	unidentified compound	
19	2.25E-15	397.0234216	not found		0	0	unidentified compound	
20	4.35E-15	287.0555483					286.07+1	
21	1.05E-14	301.0717298	286 283 257 242 199	258 242 215 199	40	0	**Hesperetin**	0
22	1.58E-14	328.0911197	not frag		3	4	unidentified	
23	1.70E-07	548.2232322	not frag		2	0	unidentified	
24	4.36E-14	449.170835	not frag		208	0	unidentified	

25	4.36E-14	285.0480748	257 241 217 199 166	166 155	3	0	unidentified	
26	6.83E-14	540.1010488	NM	NM	0	0	unidentified	
27	6.95E-14	686.4133453	Not frag		2	0	unidentified	
28	9.86E-14	653.422561	Not frag		12	0	unidentified	
29	1.27E-13	403.011607	NM	NM	1	0	unidentified	
30	1.68E-13	865.2013317	847.19 739.19 713.15 695.14 587.12 577.14 407.07	562.78 324.14 287.37 197.93	6	0	**Robinetinidol-(4alpha->8)-catechin-(6->4alpha)-robinetinidol**	1
31	2.05E-13	655.4272417	NM	NM	0	0	unidentified	
32	2.61E-13	615.2040194	not frag		1	0	unidentified	
33	2.76E-13	365.1768929	351.29 324.13 321.19 287.13 253.05 219.14 166.7 145.03	150.09 128.1 81.03	2	0	unidentified	
34	2.83E-13	425.1591175	410.14 367.08	367.08 353.08 347.5 324.12	214	0	**Mangostanol**	2

			355.08 324.12					
35	2.95E-13	585.1037215	not frag		6	0	unidentified	
36	3.24E-13	379.1541098	364.13 355.09 324.1	281.05 269.05 197.72 166.78	10	0	**6-Deoxy-gamma-mangostin** or **8-Desoxygartanin** or **Garcinone A**	0
37	4.62E-13	465.2274432	397.22 355.19 341.1 197.73 166.78	324.14 287.42 231.12	2	0	**Deoxygedunin**	1
38	6.01E-13	389.0020155	Not frag		1	0	unidentified	
39	6.23E-13	417.2119815	Not frag		4	0	unidentified	
40	8.41E-13	686.4134299	Not frag		2	0	unidentified	
41	1.04E-12	293.2120432	Not frag		45	0	**fatty acid**	0
42	1.08E-12	895.3553391	Not frag		1	0	unidentified	
43	1.20E-12	365.9996594	Not frag		1	0	unidentified	
44	1.35E-12	288.0583578	Not frag		3	0	unidentified	
45	1.98E-12	380.1590147	Not frag		29	0	unidentified	
46	2.09E-12	459.1257556	Not frag		94	0	unidentified	
47	2.21E-12	410.2777364	Not frag		0	0	unidentified	
48	3.14E-12	551.0968019	Not frag		21	0	unidentified	
49	5.34E-12	645.3409472	Not frag		0	0	unidentified	
50	6.34E-12	579.1721532	Not frag		50	0	unidentified	

Top 50 des variables extraites des feuilles

Entry	p-value	MS 1	MS 2	MS 3	Metlin aswn	Home-made DB	compound	d ppm
1	7.73E-15	799.3752172	not frag		1	0	unidentified compound	
2	1.34E-13	784.4011703			/	/	**ustilagic acid +1**	4
3	4.75E-13	800.37515	not frag		0	0	unidentified compound	
4	6.68E-13	783.39831	737.39 329 287.43	693 600 531.19 475 463.12 324	3	0	**ustilagic acid**	4
5	4.64E-12	413.0619323	385.07 369 324	324 287 166.82	6	0	Unidentified	
6	2.06E-11	785.3985736			/	/	**ustilagic acid +2**	4
7	2.50E-11	669.4140838	642.41 491.39 533.4 369	 369 324 287	0	6	**gutti c /D** fra -178 c acyl + chaine c 6	0
8	6.06E-11	670.4162778			/	/	**gutti c /D +1**	
9	1.02E-10	805.3685368	not frag		0	0	unidentified compound	
10	1.89E-09	434.242607			/	/	433.+1	
11	2.39E-09	433.2392601	364 321 309 296	 243 287 266 166	4	0	**fatty phosphoric acid**	2

			253				
12	3.23E-09	699.4272282	625 533.4 463	 478 341 324 287 166 	0	6	**Guttiférone b or oblonfolin d**	
13	3.76E-09	769.3370321	not frag		0	0	unidentified compound	
14	8.23E-09	509.2870149	not frag		112	0	unidentified compound	
15	1.16E-08	540.1010488			/	/	539 +1	
16	1.30E-08	539.0972785	445 433 413 387 324	 385 369 325 287 166 	10	0	unidentified	
17	2.08E-08	585.3560407	541 393 379 325	 287.4 231.07 166	42	3	**14 -deoxygarcinol**	2
18	2.27E-08	258.017318	not frag		6	0	unidentified compound	
19	2.72E-08	700.4275497	not frag		1	0	unidentified compound	
20	2.93E-08	725.1498687	563 324 287.4	 287 166 197 	1	0	**vert de guinée** CAS: 4680-78-8	1
21	3.05E-08	443.3066331	not frag		53	0	unidentified compound	
22	3.72E-08	586.362733	555 541 439.22	 	42	3	**guttiferone j**	2

			417 393	363 247 166				
23	6.05E-08	441.3003823	423 413 304 179.07	 166 151	3	0	**(3beta,5alpha,9alpha,22E,24R)e 5,9-Epidioxy-3-hydroxyergosta-7,22-dien-6-on**	2
24	7.66E-08	442.3035753			/	/	441 +1	
25	9.49E-08	653.3468559	not frag		1	0	unidentified compound	
26	1.33E-07	425.1591175	410.14 381 287 197.67 166.78	367.08 355.08 324 287	214	0	**Mangostenol** ou **Mangostanol**	0
27	1.50E-07	657.3778274	not frag		0	0	unidentified compound	
28	1.83E-07	541.1122232			/	/	frag from 621.0702	
29	2.88E-07	510.2865709	not frag		3	0	unidentified compound	
30	4.85E-07	383.1161552	324 303.16 239.14 166.78	 287.38 259.17 244.15 197.93	119	0	unidentified compound	
31	5.51E-07	569.3644403	500.85 475.78 427.61 377.17 287.45	 355.84 333.18 324.1 287.45	0	0	unidentified	
32	6.39E-	410.169343	not		1	0	unidentified	

	07		frag			compound	
33	8.47E-07	481.4254567	324.11 287.44 271.23 253.22 227.2	166.78 197.69	1	0	unidentified compound	
34	8.75E-07	641.3469371	not frag		0	0	unidentified compound	
35	9.63E-07	465.3371007	396.27 381.25 353.21 327.2 313.18 245.12	287.2 283.21 242.1 175.04	2	0	**17Z)-1α,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-17,20,22,22,23,23-hexadehydro 24a,24b-dihomovitamin D3 /**	1
36	1.11E-06	466.3397304	^^+1				**vitamine D3 +1**	
37	1.15E-06	705.1705307	not frag		2	0	unidentified compound	
38	1.22E-06	477.1530137	not frag		163	0	unidentified compound	
39	1.28E-06	409.1641999	not frag		57	0	unidentified compound	
40	1.32E-06	579.0891212	not frag		1	0	unidentified compound	
41	1.32E-06	467.3421005	397.27 382.25 354.22 328.2 314.18 246.12	313.18 283.21 260.14 166.78	15	0	**Solacapine**	2
42	1.44E-06	427.2860007	not frag		15	0	unidentified compound	
43	1.46E-06	557.1105521	463.06 451.07 431.07	403.08 387.09			**Dihydromorelloflavone**	2

				269.05				
			405.1					
			403.08					
44	1.81E-06	558.110372			/	/	**dihydro morello +1**	
45	1.83E-06	587.3629241	not frag		7	0	unidentified compound	
46	2.70E-06	607.0832955	not frag		0	0	unidentified compound	
47	4.59E-06	377.1758902	not frag		9	3	unidentified compound	
48	5.74E-06	683.3939638	639.4		2	0	**Goyaglycoside A**	2
			556.32				pas sur du tout	
			515.24					
			491.2					
			447.18					
			403.19	334.12				
				324.1				
				287.44				
49	5.94E-06	634.3454374	not frag		24	0	peptide	
50	6.13E-06	570.3664293	not frag		4	0	unidentified compound	

Top 50 des variables extraites du latex

Entry	p-value	MS 1	MS 2	MS 3	Metlin aswn	Home-made DB	compound	d ppm
1	2.66E-16	643.0534399	NM	NM	0	0	unidentified	
2	3.15E-16	379.1541098	324.1 281.05	281.05 269.02 166	10	0	**6-Deoxy-gamma-mangostin** or **8-Desoxygartanin**	2 2
3	8.29E-16	617.3480909	599 481	437 425 419	0	7	**Symphonone G/H**	2
4	1.41E-15	459.1257556	Not frag.		94	0	unidentified	
5	4.68E-15	449.170835					frag de 601.35	
6	7.8497E-15	601.351499	539.35	447 395 347 231 355 285	5	14	unidentified	0
7	8.82E-15	396.1523962	NM	NM			394.15 +2	
8	1.22E-14	602.3542004	NM	NM			601.35 +1	
9	1.25E-14	409.1293926	NM	NM	0	0	unidentified	
10	1.40E-14	577.0742776	NM	NM	0	0	unidentified	
11	1.65E-14	395.1505684	380 351 340 324 387 166	 152 124	14	0	unidentified	
12	3.12E-14	515.2794833	Not frag.		103	0	unidentified	
13	3.77E-14	295.2272108	Not frag.		52	0	**Fatty acid**	2
14	4.37E-14	380.1590147	364 352 343 335 324 230		29	0	**Raphantine**	2
15	5.29E-14	570.8454538	Not frag.		0	0	unidentified	
16	2.72E-13	577.3515564	Not frag.		49	1	unidentified	
17	2.96E-13	619.4219012	600.34		4	2	**(3b,7b,22x)-Cucurbita-5,24-diene-3,7,23-triol 7-glucoside**	

			575.37 560.31 509.31 483.35 465.3	437.44 324.11 287.38 197.5 166.81				
18	3.33E-13	425.2682263	397 355 288 220 165	137 121	3	0	unidentified	
19	3.62E-13	293.2120432	Not frag.		45	0	**Fatty acid**	0
20	3.76E-13	555.094573	429.06 311.06	401.07 385.07 357.08 324.09 295.03 166 256.04 242.04	11	1	**Morreloflavone**	0
21	5.39E-13	501.2999478	457.31 363.6 309.16	389.25 321.4 287.4 319.17 285.11 145.03 281.12 231.07 145.03	67	0	**Kolanone**	0
22	5.84E-13	586.3627999	NM	NM			**Oblongifolin E + 1**	
23	6.73E-13	585.3562699	542.37 450.24 380.16 326.11	166.82 287.41 324.1 231.07 166.3 161.02	14	9	**Oblongifolin E**	2
24	7.51E-13	567.3481605	523.35 489.25 455.23 431.22 375.16 361.16		1	3	**Otoginine A**	1

			307.1	289.09 279.1 229.05 166.79 145.03				
25	7.51E-13	556.0970057	NM	NM	0	0	**Morreloflavone +1**	
26	8.41E-13	637.4256829	NM	NM	0	0	unidentified	
27	8.88E-13	245.0456071	227.03 201.06 187 183.05 161.03	 197.08 166.78 159.05	12	0	**1,3,9-Trimethyluric acid** or **1,3,7-Trimethyluric acid**	2
28	9.02E-13	638.4298377	NM	NM	0	0	unidentified	
29	9.21E-13	449.1962482	NM	NM	48	0	unidentified	
30	1.10E-12	570.3665488	Not frag.		4	0	unidentified	
31	1.13E-12	684.8266706	NM	NM	0	0	unidentified	
32	1.15E-12	569.3644403	NM	NM	0	0	unidentified	
33	1.84E-12	378.1439079	Not frag.		18	3	unidentified	
34	1.90E-12	372.9014705	NM	NM	0	0	unidentified	
35	2.50E-12	325.1838361	Not frag.		8	4	unidentified	
36	2.64E-12	669.3417873	Not frag.		2	6	unidentified	
37	2.74E-12	465.2274432	397.23 355.19 341.1 324.1 287.4 231.07	 324.11 311.2 286.16 243.12 166.77	110	0	unidentified/peptide?	
38	3.04E-12	616.8386777	NM	NM	0	0	unidentified	
39	3.09E-12	691.3235279	Not frag.		1	0	unidentified	
40	3.39E-12	502.3050385	Not frag.		102	0	unidentified	
41	3.55E-12	603.3603632	NM	NM	0	0	601.35+2	
42	4.16E-12	517.2958158	473.3 379.16 337.11 325.11	 297.11	49	9	PPAPs identifiable ou pas inconnu vu la masse et le - 192	

				256.04 231.07 161.03 309.11				
43	4.22E-12	463.2136	407.15 351.09 365.1 324.1 287.46	352.1 324.1 287.43 166.81	4	0	**Dulciol A**	2
44	4.67E-12	516.2837965	Not frag.		177	0	Unidentified compound	
45	4.78E-12	383.3517028	Not frag.		7	0	Unidentified compound	
46	5.14E-12	383.1415633	Not frag.		7	0	Unidentified compound	
47	5.79E-12	288.9370433	Not frag.		1	0	Unidentified compound	
48	5.82E-12	670.3435849	Not frag.		0	0	Unidentified compound	
49	6.00E-12	502.8593976	Not frag.		0	0	Unidentified compound	
50	6.85E-12	410.169343	Not frag.		1	0	Unidentified compound	

Top 50 des variables extraites des tiges

entrée	p-value	MS 1	MS 2	MS 3	Réponses METLIN	Réponses maison	composé	dppm
1	6.89E-18	415.0823525	295.09 269.09 321.04 371.09 387.09		10	0	unidentified	
2	1.17E-15	411.3812233	393.13 353.1 324.06 338.08 287.35 197.93 166.88	309.04 295.06 287.37 279.07 166.88	7	0	unidentified	
3	1.34E-15	310.0800209	Not frag.		1	0	unidentified	
4		573.102925	447.07 324.08 287.43 166.79	429.06 419.08 324 287 197	5	1	unidentified	
5	3.78E-14	625.0936167	Not frag.		2	0	unidentified	
6	1.00E-13	542.1167406	NM	NM	/	/	541 +1	
7	1.20E-13	541.1122232	447.07 435.07 415.08	396 321 309 295.0	21	0	unidebtified	

			389.1	3 269				
8	1.29E-13	543.1189325			0	0	541+2	
9	2.26E-13	477.1033238	Not frag.		78	0	unidentified	
10	3.98E-13	409.1293926	381.13 337.07 166.87	351 337 324 287 261 197.7 166.78	17	0	**Pre-5-methoxydurmillone**	2
11	4.27E-13	378.1439079	NM	NM	18	0	377.14 +1	
12	1.54E-12	455.3541076	405 375 345 324.11 287.4 253 197 166	281 269	46	0	unidentified	
13	5.44E-12	555.094573	429.06 461.05 449.05 403.08 311 166	401 385.07 357 324 295 166.78	11	1	**<u>morelloflavone</u>** **(ou Ephedrannin A)**	2
14		557.1105521	451.07 431.07	403.08	23	1	**dihydromorelloflavone?** = gb2a	

			403.08	387.09 269.05				
15	1.79E-11	609.0995239	Not frag.		3	0	unidentified	
16	2.28E-11	556.0970057	NM	NM	/	/	**morelloflavone +1**	
17	2.29E-11	703.1659091	609.12 577.13 541.11 523.1 415.08	447.07 435.07 415.08 166.88 321 309 295	5	0	**occidentoside**	1
18	3.26E-11	397.3312456	Not frag.		3	0	**fatty acid**	0
19	4.09E-11	393.1348007	378.11 377.1 376.13 375.12 363 324.9 287.42 166.78	361 324 287 166	21	1	**xantone V1**	2
20	8.93E-11	558.110372			/	/	**dihydro moreloflavone+1**	
21	1.10E-10	293.2120432			45	0	fatty acid	0
22	1.60E-10	704.1673417	NM		/	/	**occidentoside +1**	3
23	1.76E-10	559.1127695	Not frag.				unidentified	
24	2.97E-10	395.1491237	363.88 339	324.12	24	0	**Muxiangrin III**	2

			309.04 297.04	287.36 166.87				
25	3.59E-10	447.0734073	Not frag.		1	0	**unindentified**	
26	4.87E-10	383.3517028	Not frag.		7	0	**Acide gras**	0
27	6.13E-10	619.4219012	625.43 599 559 533.4 324 287	489.41 423.32 341.21 324 287	4	0	**(3b,7b,22x)-Cucurbita-5,24-diene-3,7,23-triol 7-glucoside**	2
28	1.08E-09	407.1487087	392.12 324.11 287.4 197 166.79	377 364 349	15	0	**9-Hydroxycalabaxanthone**	1
29	1.36E-09	395.1505684	375.15 339.09 324 309	324.09 287.1 166.79	30	0	unidentified	
30	1.38E-09	396.1523962	NM		/	/	395+1	
31	1.41E-09	540.1010488	NM		0	0	539+1	
32	1.49E-09	539.0972785	495.11 445.06		10	0	inconnu	

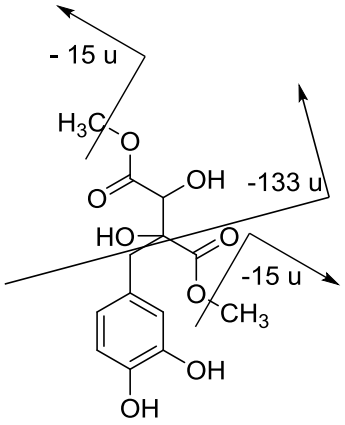
			433.05 413.06 387.09	385.07 369.08 295.03				
33	1.95E-09	394.1377644	NM	NM	/	/	393+1	
34	2.28E-09	393.1347796	378.11 377.1 375.12 363.09 349.67 335.09 324.08	360.08 345.07 333.44 324.09	20	1	Xanthone V1 encore? frag de 423.14	
35	2.95E-09	783.1244448	714.41 703.17 621.07 577.14 541.11 415.08	541.11 415.08 364.08 287.4	3	0	**C.I. Acid Green 5** ou **Fd&c blue no. 1, aluminum lake**	1
36	3.07E-09	327.0879101	309.08 287.45 283.02 271.02	253.5 242.2 232 197.88 166.7	74	4	**Ugaxanthone**	0

			258.02	8			
37	3.13E-09	377.1416074	359.13 322.08 304.07 241.12	309.43 287.42 243.03 197.69 166.78	7	3	**Demethylcalabaxanthone**	5
38	3.21E-09	423.1452734	408.12 393.1 365.07 324.13	393.1 379.08 365.08 324.12 287	99	1	**O6 demeth- Symphonin**	0
39	3.63E-09	685.4092278	667.39 641.42 616.34 589.35 571.35 559.34 549.39 531.38 409.24	494.19 432.32 324.1 287.44 166.81	2	0	unidentified	
40	4.21E-09	431.0782352	Not frag.		1	0	unidentified	
41	9.01E-09	685.4090869	Not frag.		2	0	unidentified	

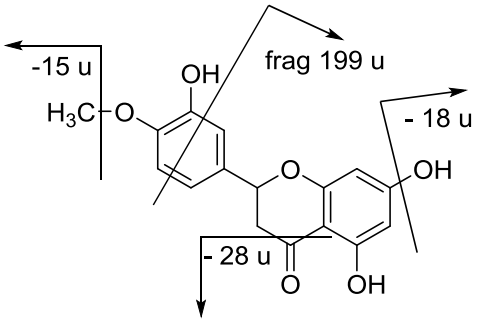
42	9.70E-09	289.0347738	Not frag.		0	unidentified	
43	1.11E-08	259.025126	241.14 231.03 215.+03 203.04 187.04	197.68 166.77	6	3	**norathiriol ou isomere**	1
44	1.52E-08	328.0911197	Not frag.		/	/	**ugaxanthone+1**	
45	1.53E-08	686.4133453	NM		/	/	685+1	
46	2.11E-08	573.4508892	Not frag.		5	1	unidentified	
47	2.25E-08	345.0589658	Not frag.		47	0	unidentified	
48	2.33E-08	587.118835	Not frag.		7	0	unidentified	
49	2.87E-08	429.0624821	Not frag.		2	0	unidentified	
50	3.04E-08	686.4136042	Not frag.		/	/	685+1	

Top 50 des variables extraites des écorces

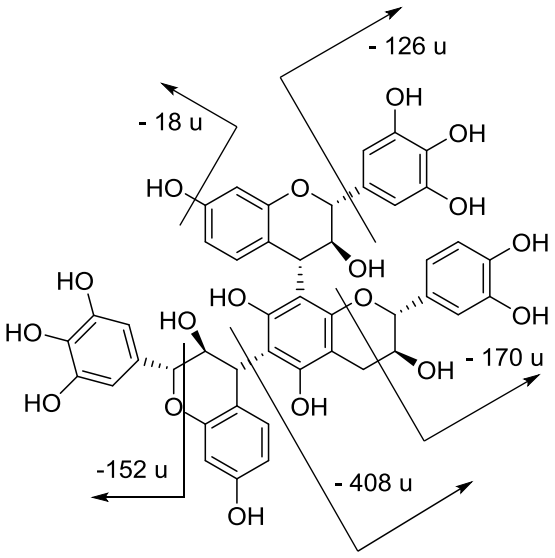
ANNEXE 2 : Fragmentation des molécules assignées



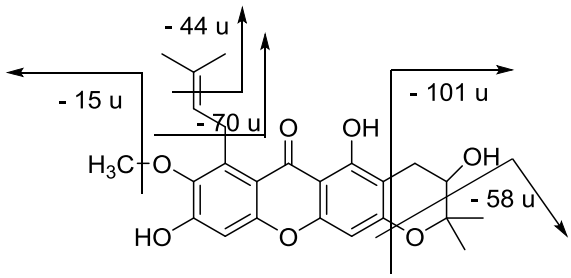
Dimethyl fukiic acid



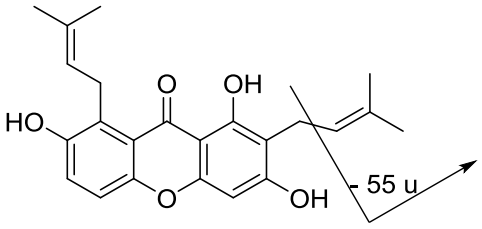
Hesperetin



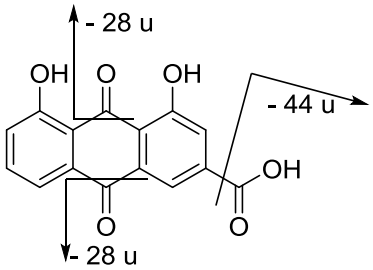
Robiniditiol



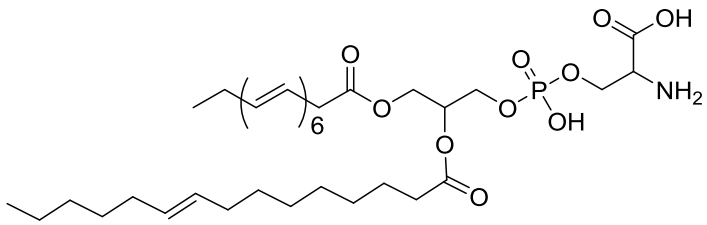
Mangostanol



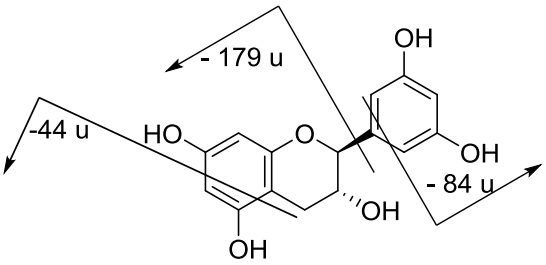
Garcinone A



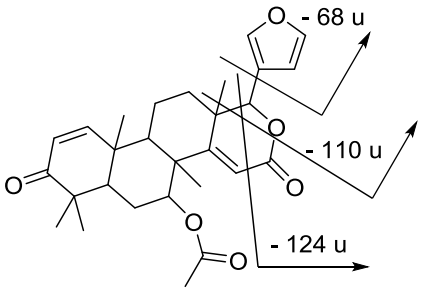
Rhein



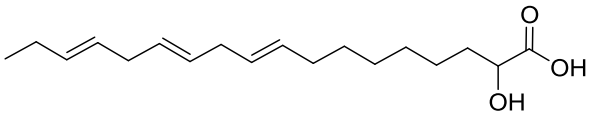
Acide phosoprique gras en C43
4,6,10-Trioxa-5-phosphaoctacosa-19,22-dienoic acid, 2-amino-5-?hydroxy-11-oxo-8-[[(9Z,12Z)-1-oxo-9,12-octadecadien-1-yl]oxy]-,5-oxide, (2S,19Z,22Z)



Catechin

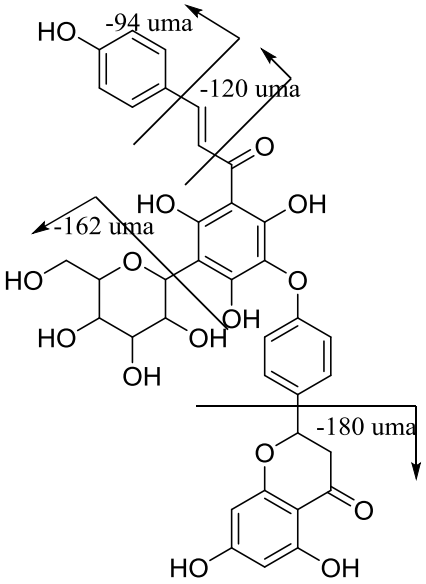


DEOXYGEDUNIN

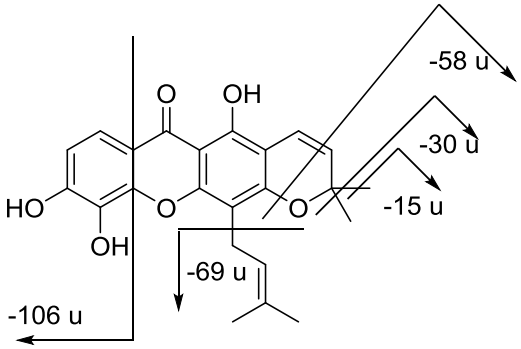


C-18 Fatty acid

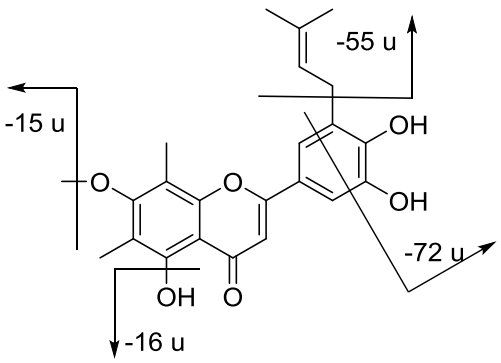
Fragmentation des composés possiblement identifiés des feuilles de *Symphonia globulifera*



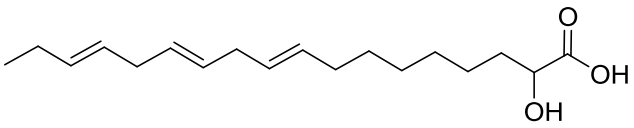
Occidentoside



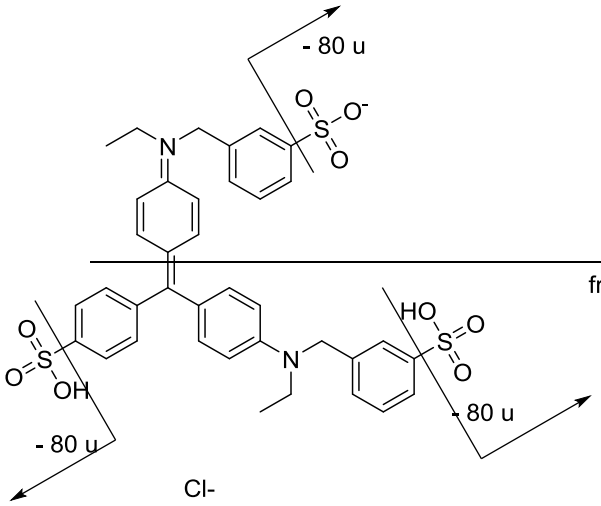
Xanthone V1



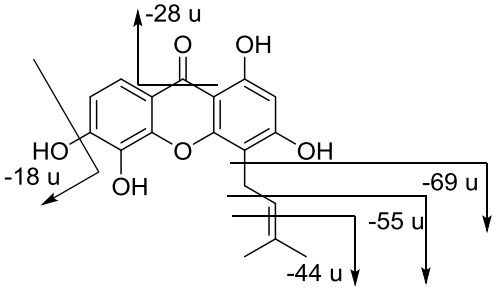
Muxiangrin III



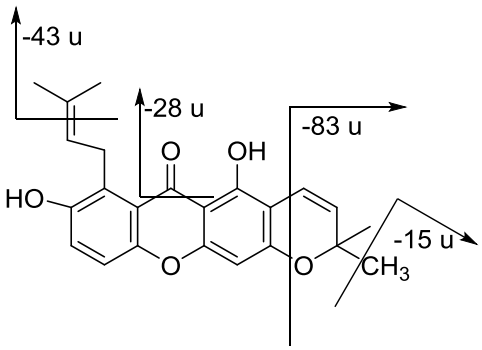
C-18 Fatty acid



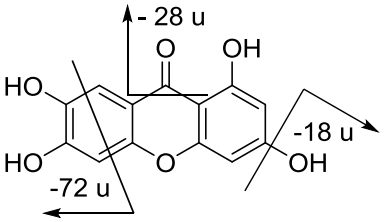
C.I. Acid Green 5



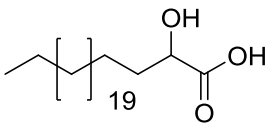
Ugaxanthones



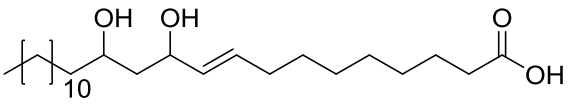
Demethylcalabaxanthone



Norathiriol

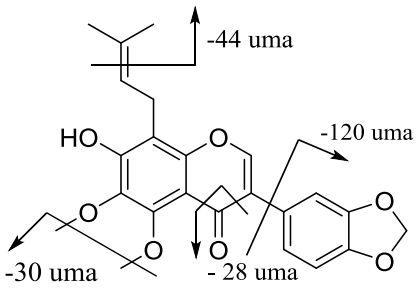


C 24 fatty acid

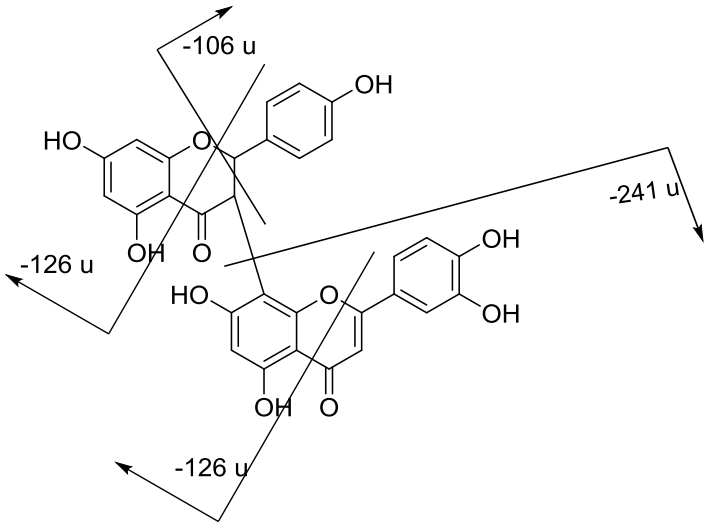


C 22 fatty acid

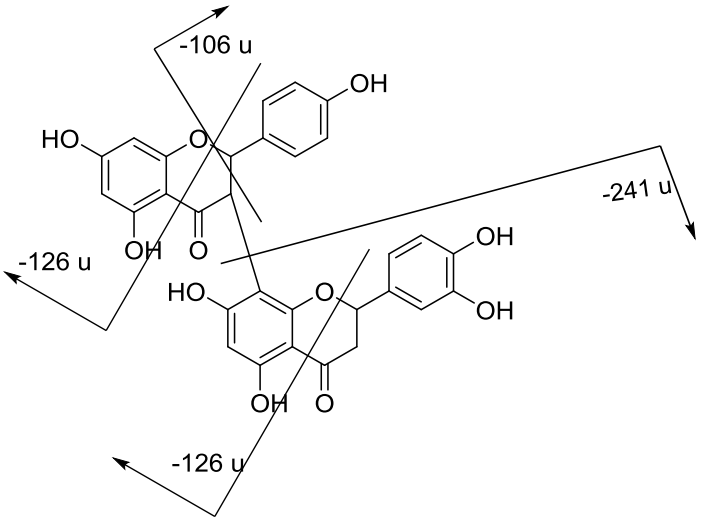
Fragmentation des composés possiblement identifiés des écorces de *Symphonia globulifera*



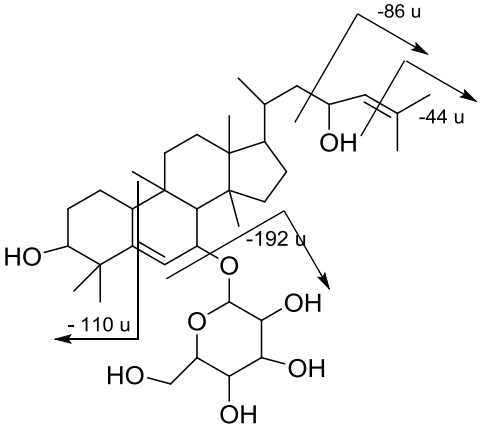
Pre-5-methoxydurmillone



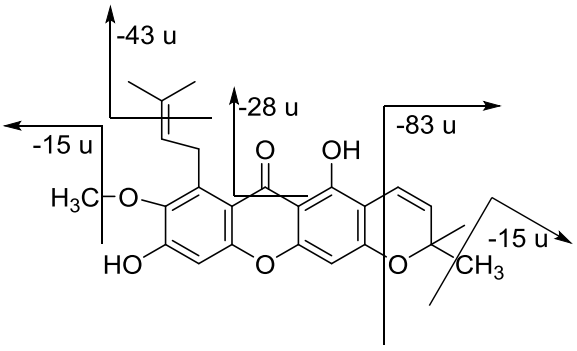
Morrelloflavone



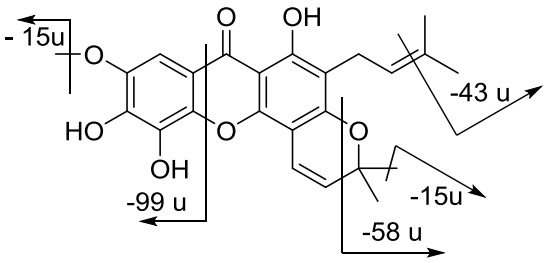
Di-hydro-morrelloflavone



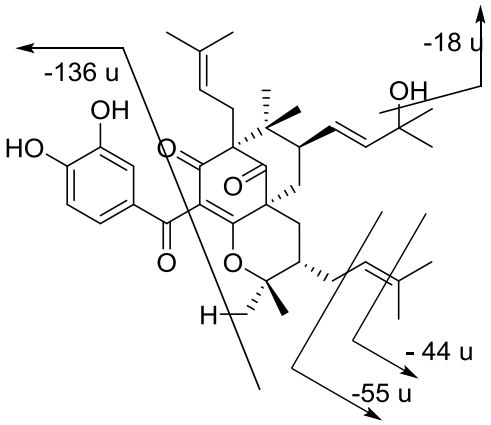
(3b,7b,22x)-Cucurbita-5,24-diene-3,7,23-triol 7-glucoside



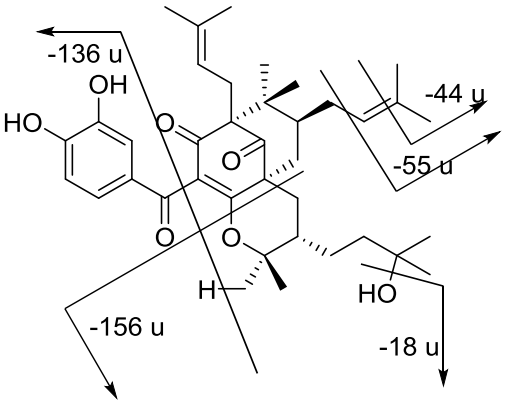
9-Hydroxycalabaxanthone



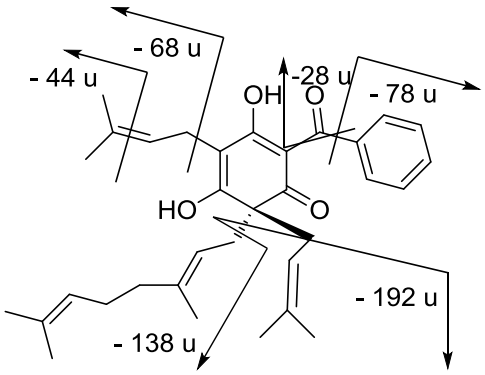
O6 Demeth -Symphonin



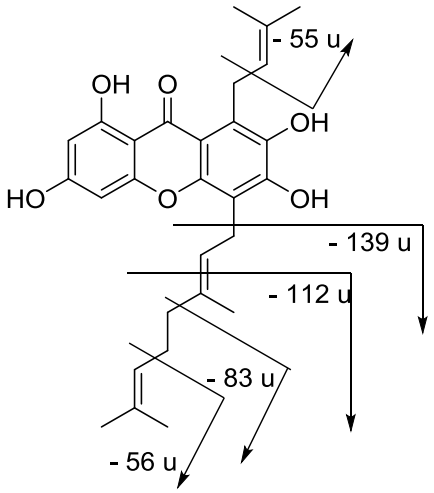
Symphonone F



Coccinone C

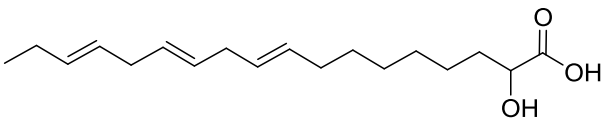


Kolanone

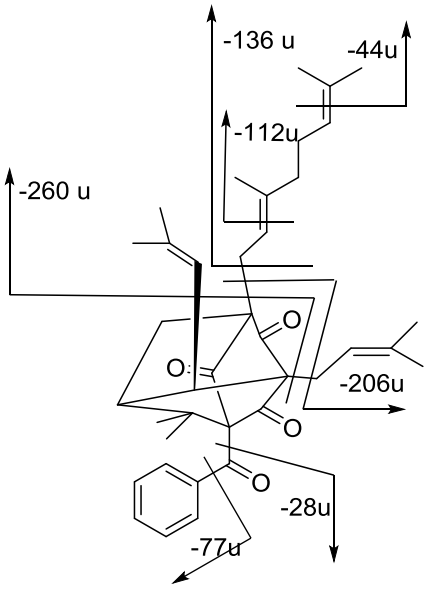


Dulciol A

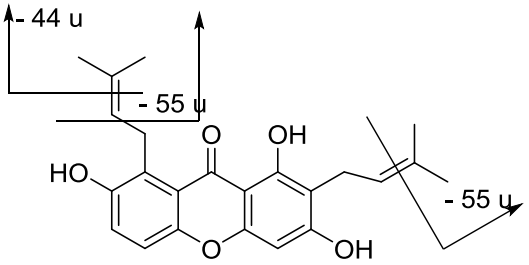
Fragmentation des composés possiblement identifiés des tiges de *Symphonia globulifera*



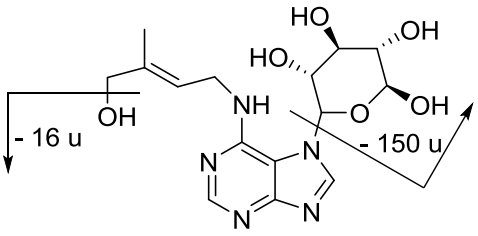
C-18 Fatty acid



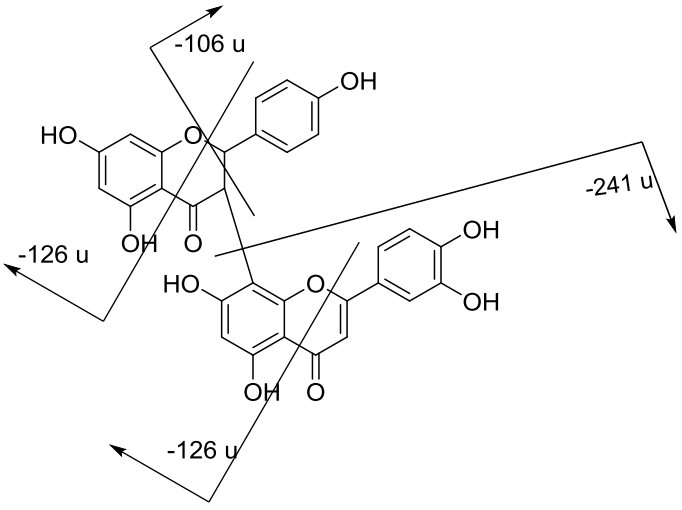
Otoginine A



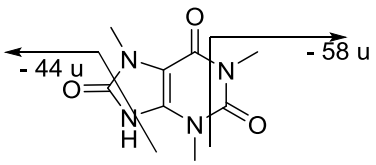
6-deoxy-mangostin



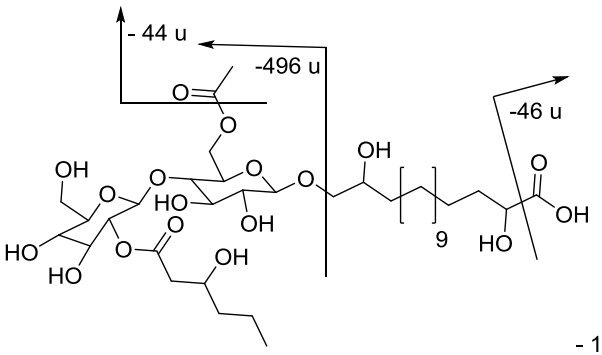
Raphantine



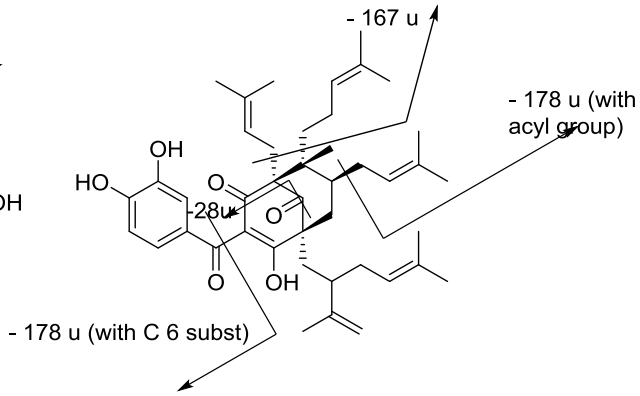
Morreloflavone



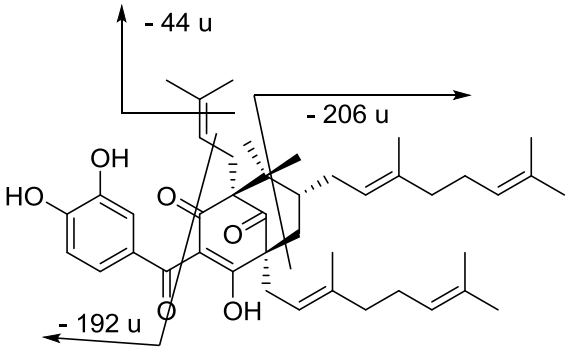
1,3,9-Trimethyluric acid



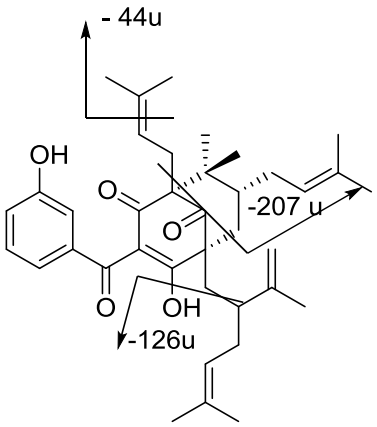
Ustilagic acid



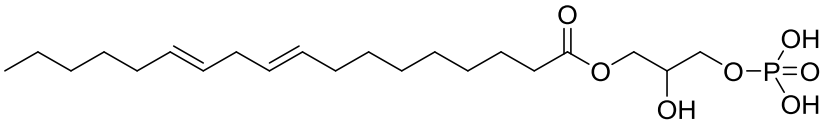
Guttiferone C / D



Guttiferone B

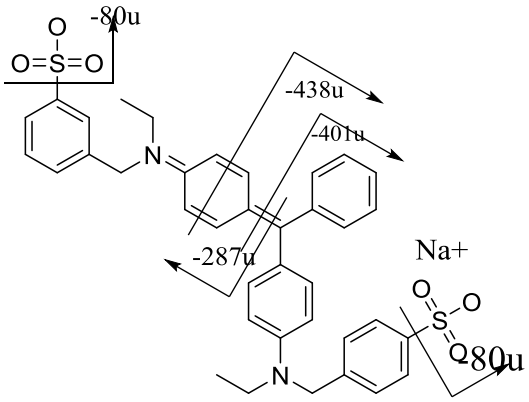


14-Deoxy Garcinol

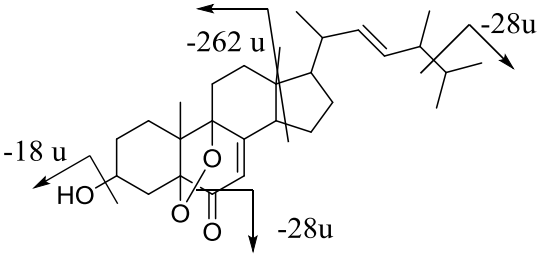


fatty phosphoric acid

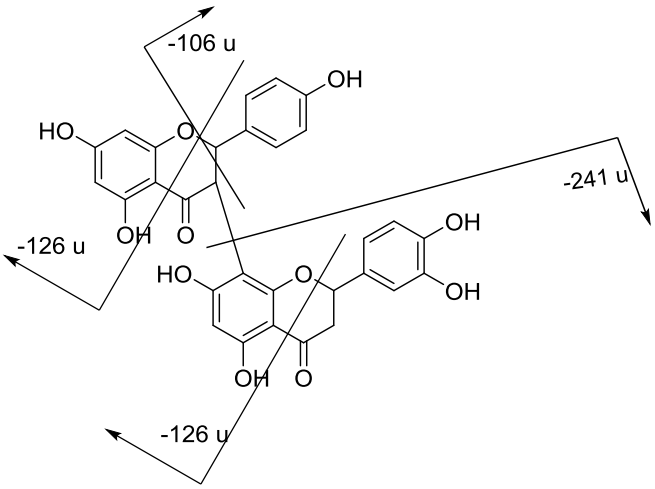
.



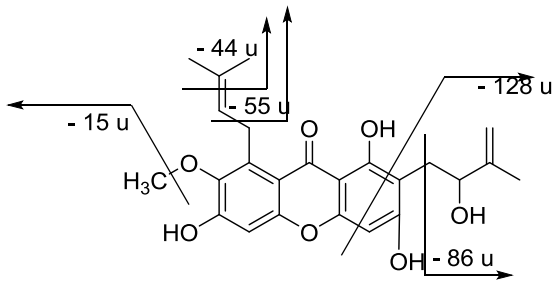
Guinea green



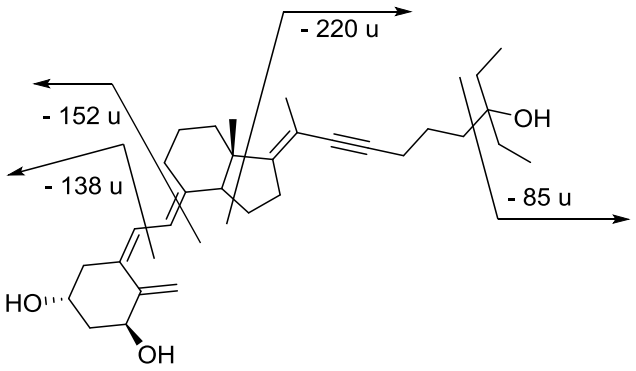
(3beta,5alpha,9alpha,22E,24R)-5,9-Epidioxy-3-hydroxyergosta-7,22-dien-6-one



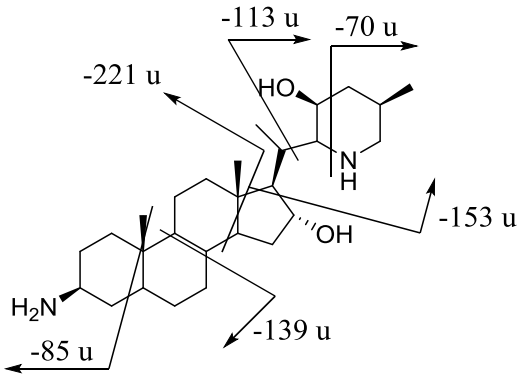
Di-hydro-morreloflavone



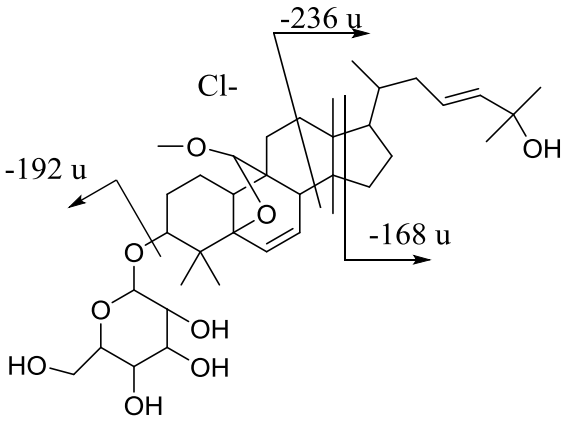
Mangostenol



Dihomovitamin D3



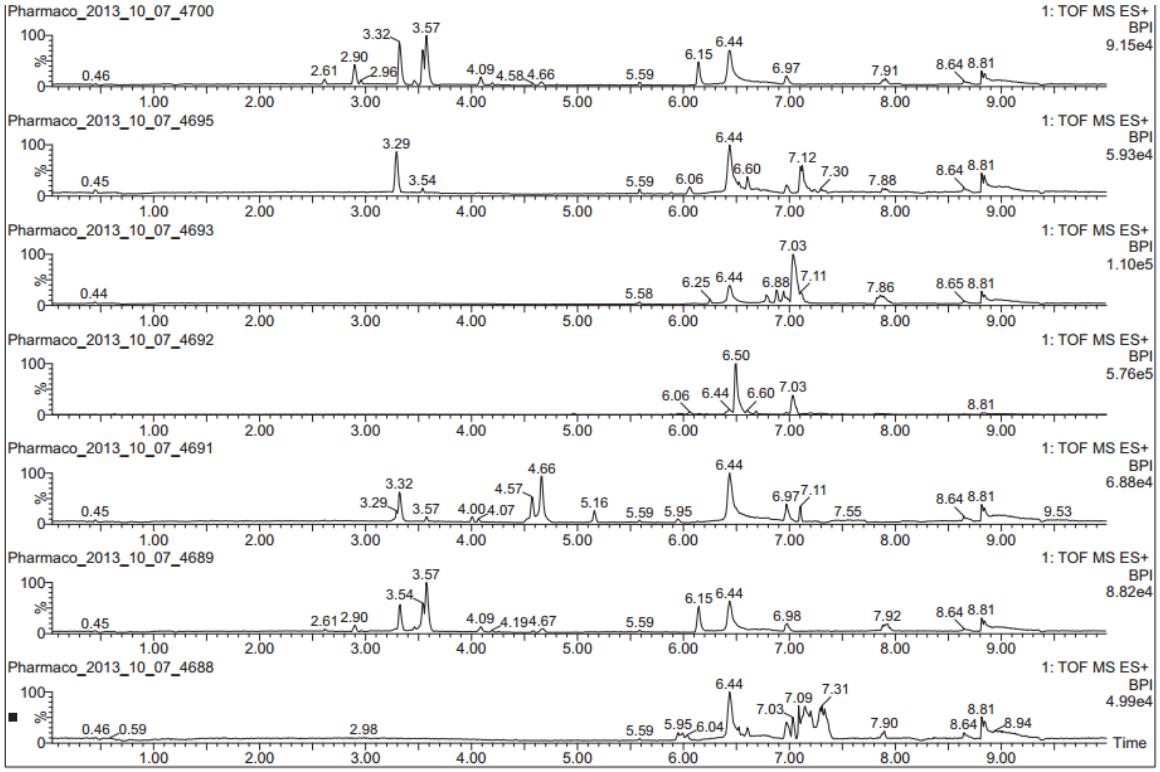
Solacapine

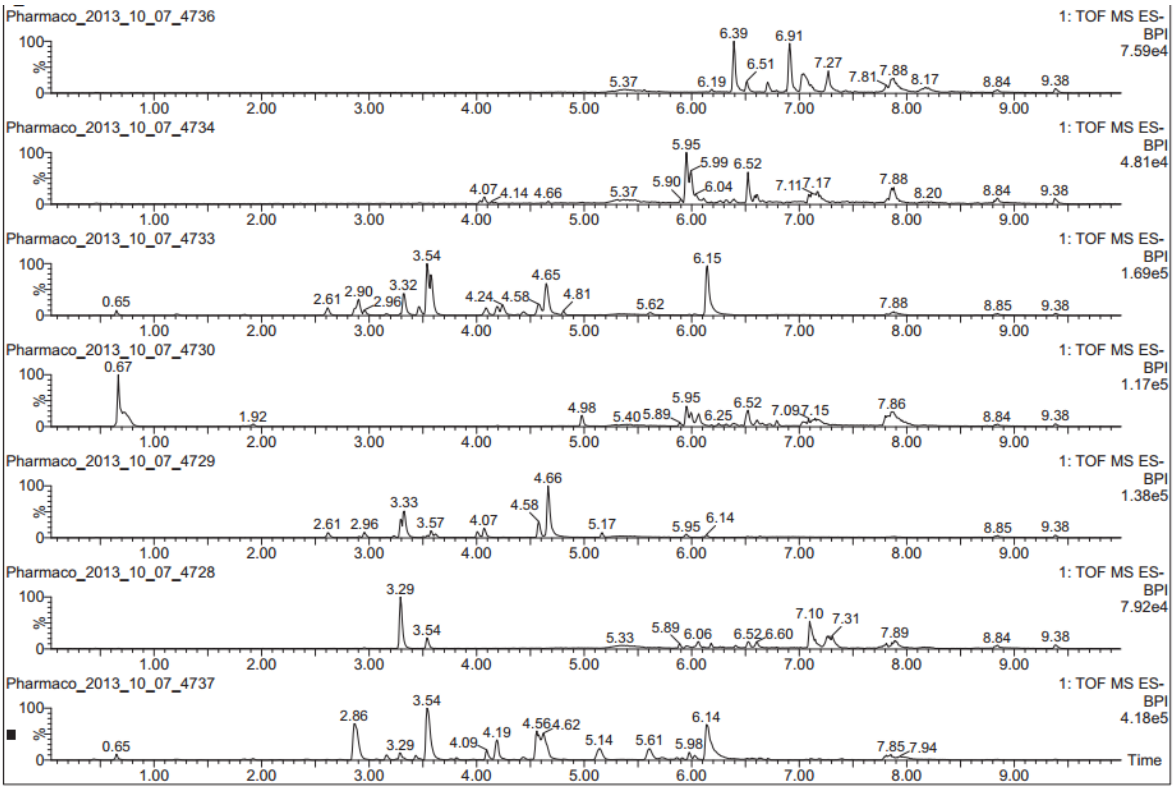


Goyaglycoside A

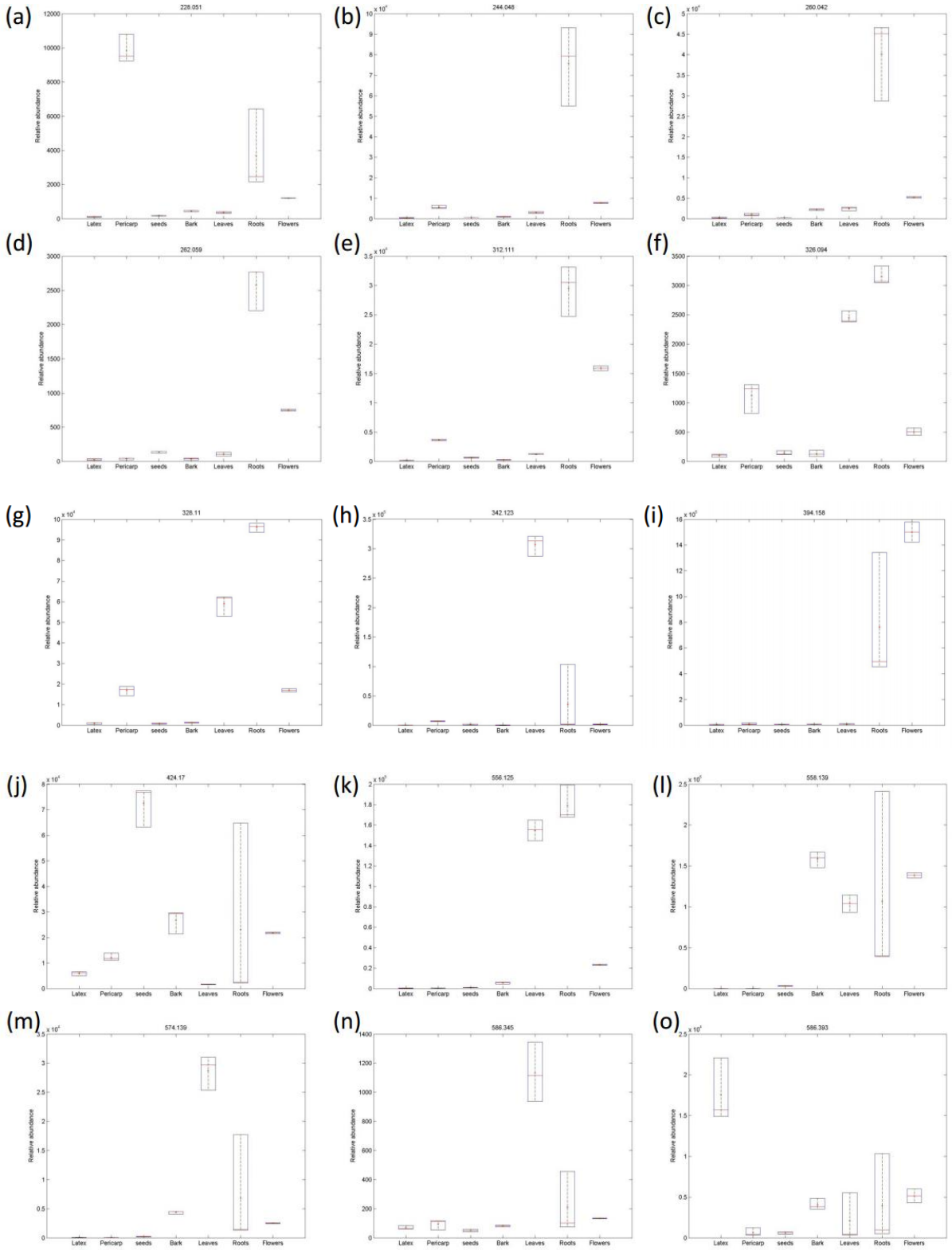
Fragmentation des composés possiblement identifiés du latex de *Symphonia globulifera*

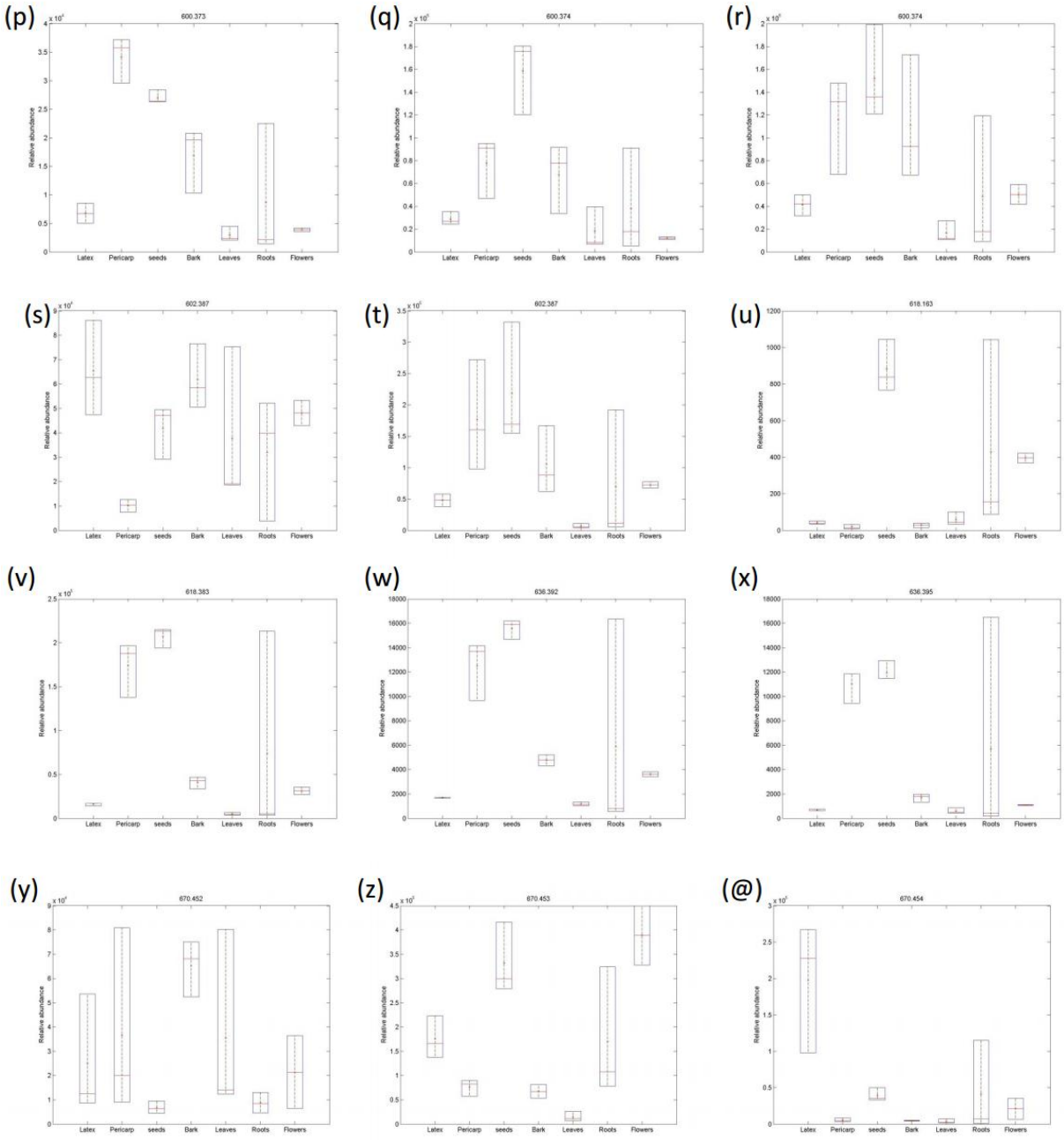
ANNEXE 3 : Chromatogrammes des extraits de *Symphonia globulifera*





ANNEXE 4 : Quantification relative des composés

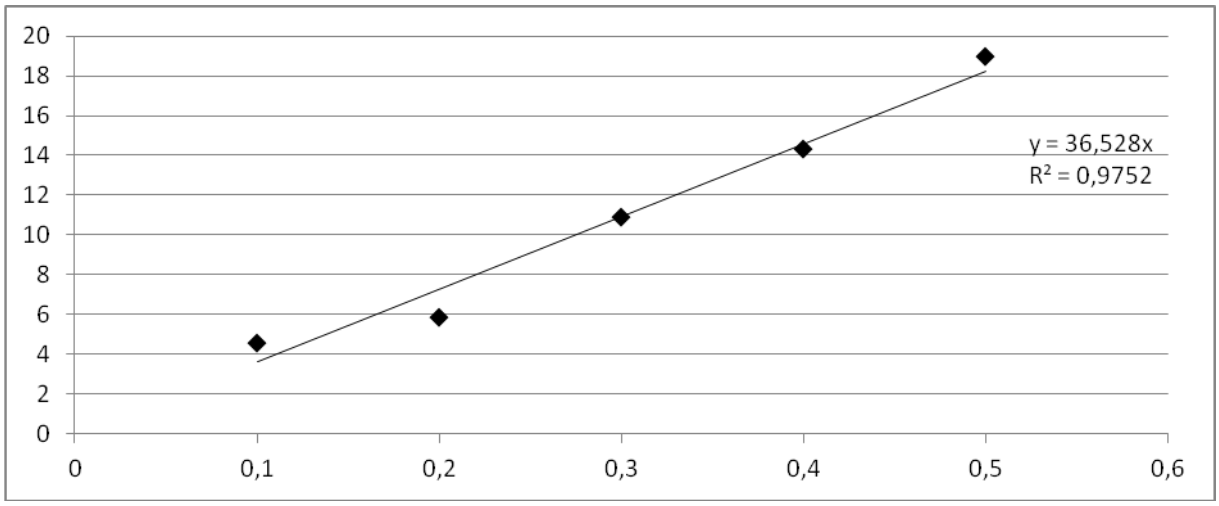



(p)
600.373
(q)
600.374
(r)
600.374
(s)
602.387
(t)
602.387
(u)
618.163
(v)
618.383
(w)
636.392
(x)
636.395
(y)
670.452
(z)
670.453
(@)
670.454
Relative abundance
Latex
Pericarp
seeds
Bark
Leaves
Roots
Flowers

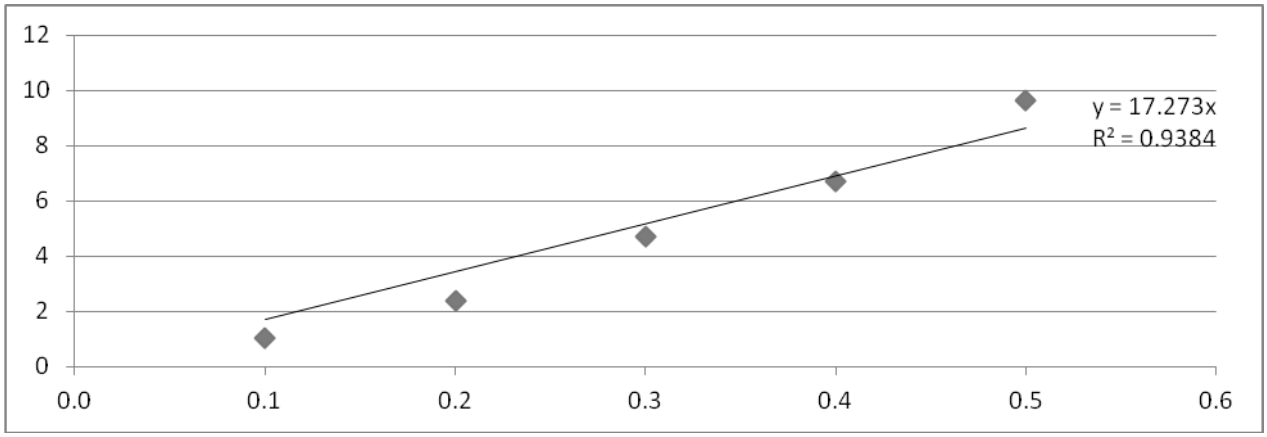
ANNEXE 5 : Quantification de la guttiférone A dans les extraits.

The quantity of GA in the ethyl acetate extract was calculated by HPLC. Following the method described in part "*HPLC quantification of guttiferone A in different organs of Symphonia globulifera."* the GA content for each extract was calculated using the calibration curves. No trace of guttiferone A has been observed by TLC into the aqueous phase during the extraction.

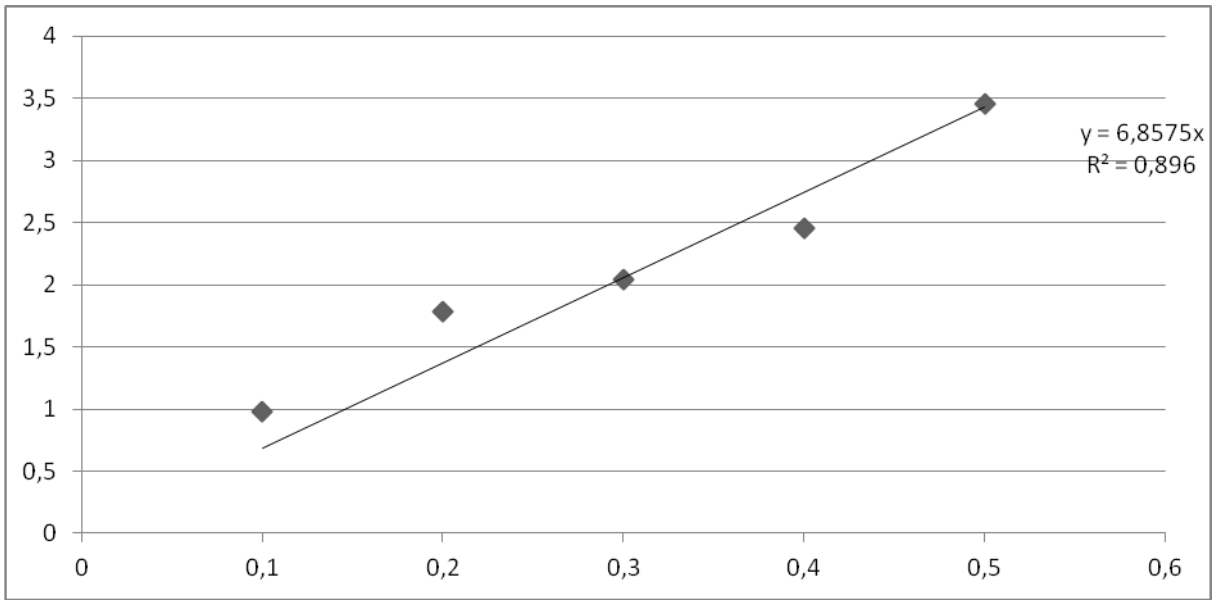
A first calibration curve was set to ensure the linearity in the concentration range of interest (0.1 to 0.5 mg/mL). Each concentration was measured three times on three different days in order to exclude variance from intra and inter day. Then a calibration curve was with the same principle set for each plant part. Linear regression curves with an r^2 >0.88 were set to reduce experimental errors induced by concentrations. Comparisons of plant parts linear regression curves with the GA calibration curve were established to deduce the GA content.



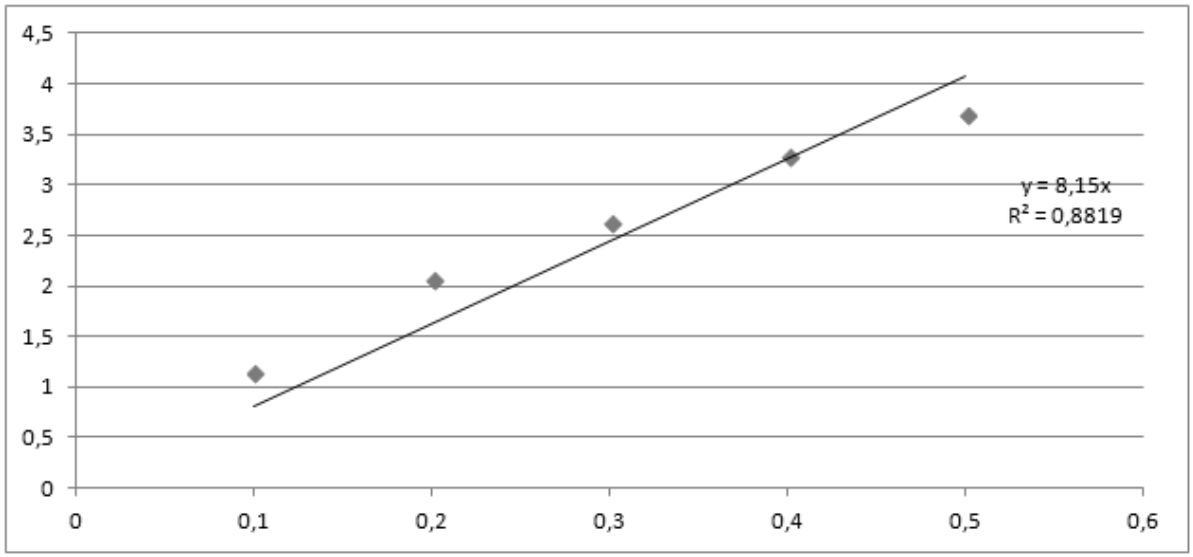
Guttiferone A calibration curve (Y value divided by 10^6). On the X and Y axes respectively represented samples concentrations and number of counts (at 254 nm).



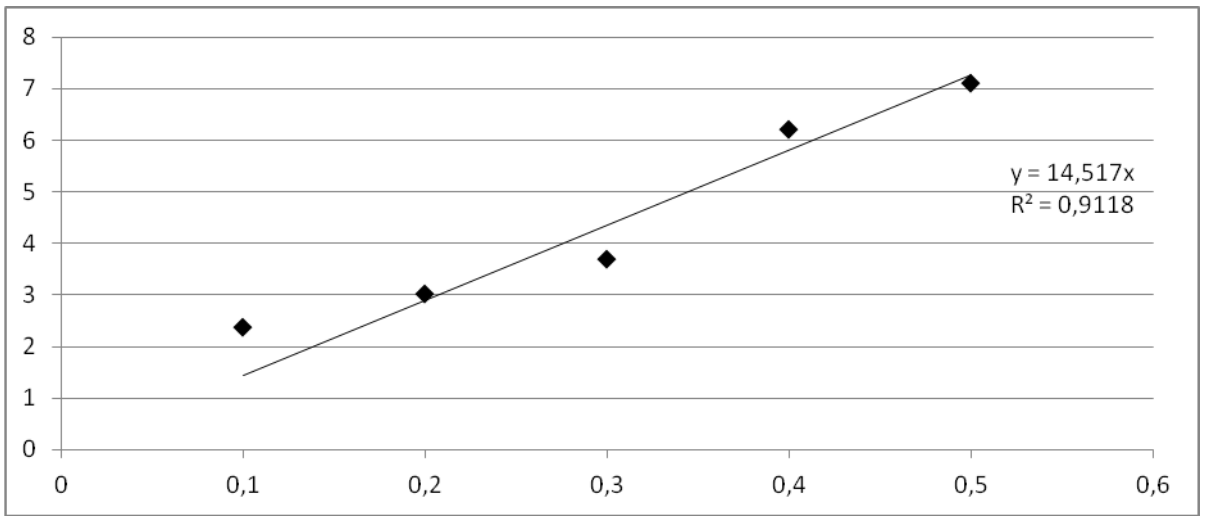
Calibration curve for pericarps ethyl acetate extracts (Y value divided by 10^6). On the X and Y axes respectively represented samples concentrations and number of counts (at 254 nm).



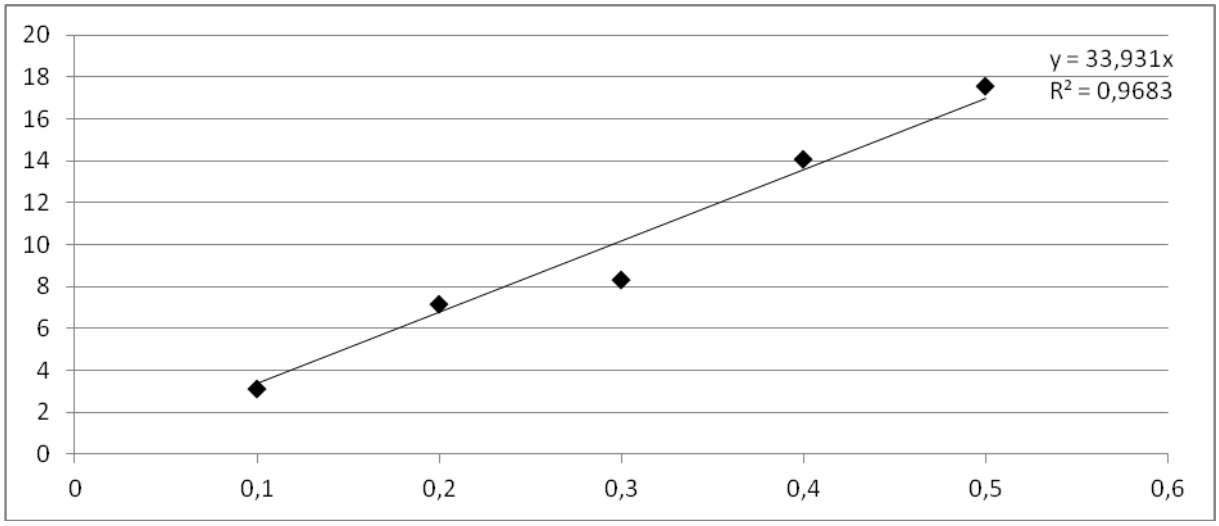
Calibration curve for seeds ethyl acetate extracts (Y value divided by 10^6). On the X and Y axes respectively represented samples concentrations and number of counts (at 254 nm).



Calibration curve for latex ethyl acetate extracts (Y value divided by 10^6). On the X and Y axes respectively represented samples concentrations and number of counts (at 254 nm).



Calibration curve for flowers ethyl acetate extracts (Y value divided by 10^6). On the X and Y axes respectively represented samples concentrations and number of counts (at 254 nm).



Calibration curve for leaves ethyl acetate extracts (Y value divided by 10^4). On the X and Y axes respectively represented samples concentrations and number of counts (at 254 nm).

GA concentration (mg/mL)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)	Recovery (%)
0,1	0,66	3,20	118.0 %
0,2	0,64	5,60	82.0 %
0,3	0,68	2.00	96.5 %
0,4	0,64	3,30	100.5 %
0,5	0,65	0,90	99.6 %

Intra and inter day RSD.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Rapport Annuelle de l'OMS sur la Malaria, Genève, **2014.**
[2] http://www.cdc.gov/malaria, 05-05-**2015**
[3] D. J. Sullivan Jr,. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 11865-11870
[4] David C. Warhurst, A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant Falciparum Malaria, *N Engl J Med,* **2001**, 25, 344, 299-302.
[5] Rapport de la réunion de l'OMS contre la leishmaniose, **2010**
[6] http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis 05-05-**2015**
[7] Rapport de la réunion de l'OMS contre la leishmaniose, **2015**
[8] Rapport de la réunion de l'OMS contre la trypanosomiase, Mars **2014**
[9] http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/, 05-05-**2015**
[10] Rapport de l'OMS sur l'amélioration des systèmes de santé, **2000**, Genève.
[11] D. J. Newman *et al*, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *J. Nat. Prod*., **2007**, 70, 461-477
[12] M. Willcox and G.Bodeker, Traditional herbal medicines for malaria, B.M.J.,**2004**, 329, 1156-1159
[13] M. Randrianarivelojosia *et al*, Plants traditionally prescribed to treat *tazo (*malaria) in the eastern region of Madagascar, *Malaria Journal,* **2003**, 2, 25
[14] D. Fabricant and N. Farnsworth, The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery, *Environmental Health Perspectives,* **2001***,* 109, 69-75.
[15] Y. Fromentin *et al*, Symphonia globulifera, a widespread source of complexes metabolites with potent biological activities, Planta Medica, **2015**, 81, 02, 95-107.
[16] K. Gustafson *et al*, phylogeny based on rbcL sequences, Inter jour of plant science, **2002**,163, 1045-1054
[17] B. Akendengué *et al*., Medicinal plants used by the Masango people in Gabon, *Journal of Ethnopharmacology* (**1994**), 41, 193-200
[18] S. Ssegawa and JM Kasenene, Medicinal plant diversity and uses in the Sangobay area, Southern Uganda, *J. Ethnopharmacol*, **2007,** 113, 521–540.
[19] B.N. Lenta *et al*, Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules*, **2007**, 12, 1548–1557.
[20] K. Ajibesin *et al.,.* Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *J Ethnopharmacol* , **2008**, 115, 387–408.
[21] MP Gupta *et al.,* R. Medical ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. *J Ethnopharmacol* , **2005**, 98, 389–401.
[22] M Coelho-Ferreira et al., Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). J Ethnopharmacol **2009**, 126, 159–175.
[23] A. Lopez *et al*, Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, **2001**, 77, 189–196.

[24] B. Lenta *et al*., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and *Symphonia globulifera*, *Molecules,* **2007**, 12, 1548–1557.
[25] G. Marti, Etudes chimiques et biologiques de *Clusiaceae* de la foret équatoriale guyanaise, *thèse de doctorat*, soutenu le 5 mai **2009**.
[26] http://www.tropicos.org. Visité le 05-05-**2015**
[27] C. Dick et M. Heuertz , The complex biogeographic history of widespread tropical tree species, *Evolution,* **2008,** 62, 2760–2774.
[28] K. Budde *et a*l., M. The ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera* L. f. (Clusiaceae) was not restricted to postulated Pleistocene refugia in Atlantic Equatorial Africa, *Heredity*, **2013**, 111, 66–76.
[29] G. Gill *et al*., Pollination Biology of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) in Central French Guiana, *Biotropica*, **1998**, 30,139-144.
[30] B. Degen *et al*., Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana, *Heredity*, **2004**, 93, 585-591
[31] A. Lemée. Flore de la Guyane française , **1955**, Lechevallier, Vol. 4. Paris
[32] www.tropicos.org. Accédé le 05-05-**2015**
[33] X-C Li *et al*., Fatty Acid Synthase Inhibitors from Plants: Isolation, Structure Elucidation, and SAR Studies, *Journal of Natural Products*, **2002**, 65*,* 1909-1914.
[34] P. Mkounga *et al*., Globulixanthone F, a new polyoxygenated xanthone with an isoprenoid group and two antimicrobial biflavonoids from the stem bark of *Symphonia globulifera*. *Nat Prod Comm.* , **2009**, 4, 803–808.
[35] A. Gunatilaka *et al*., 2,5-Dihydroxy-1,6-dimethoxyxanthone and biflavonoids of *Garcinia thwaitesii*, *Phytochemistry* ,**1983**, 22, 233-236.
[36] Z. Mbwambo *et al*., Antiparasitic Activity of Some Xanthones and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*, *Journal of Natural Products,* **2006**, 69, 369-372.
[37] V. Bittrich *et al*., The anther oil of *Symphonia globulifera* L.f. (Clusiaceae), *Biochemical Systematics and Ecology,* **2013**, 49, 131-134.
[38] A. Nkengfack *et al*., Globulixanthones C, D and E: three prenylated xanthones with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry* **2002**, 61, 181-187.
[39] S. Ngouela *et al*., Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f, *Phytochemistry* , **2006**, 67, 302-306.
[40] J. Bayma *et al*., A prenylated xanthone from the bark of *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry,* **1998**, 38, 1159-1160.
[41] H. D. Locksley *et al*., Extractives from Guttiferae. Part II The Isolation and Structure of Four Polyhydroxyxanthones in *Symphonia globulifera* L*., Journal of the chemical society section C* ,**1966**, 430-432.
[42] H. D. Locksley *et al*., Extractives from Guttiferae. Part III.' The Isolation and Structure of Symphoxanthone and Globuxanthone from *Symphonia globulifera* L., *Journal of the chemical society section C,* **1966**, 2186-2190.

[43] H. D. Locksley *et al*., Extractives from Guttiferae. Part IV.l Isolation and Structure of Ugaxanthone and M barraxanthone from *Symphonia globulifera* L., *Journal of the chemical society section C,* **1966**, 2265-2269.
[44] H. D. Locksley *et al*., Extractives from guttiferae VI : The significance of maclurin in xanthone biosynthesis, *Tetrahedron,* **1967**, 23, 2229-2234.
[45] K. Gustafson *et al*., The guttiferone, HIV-Inhibitory Benzophenones From *Symphonia globulifera, garcinia livingstonei, Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 10093-10102.
[46] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), *Phytochemistry* , **2010**, 71, 964-974.
[47] S. Kumar *et al*., The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from Garcinia and related genera: ethno botanical and therapeutic importance, *Fitoterapia,* **2013**, 89, 86–125.
[48] R. Ciochina *et al*., Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols, *Chemical Reviews,* **2006**, 106, 3963-3986.
[49] K. Karppinen *et al*., Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*, *Phytochemistry,* **2007**, 68, 1038-1045.
[50] P. Klingauf *et al*., Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures, *Phytochemistry,* **2005**, 66,139-145.
[51] B. Liu et *al.*, Benzophenone synthase ans chalcone synthase for hypericum androsaemum cell culture : cDNA cloning, functional expression, and site directed mutagenesis of two polyketide synthase, *Plant journal*, **2003**, 34, 847-855.
[52] M.Fujita *et al*., Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides:* intact incorporation of C6-C3 precursor into xanthone, *Tetrahedron letters*, **1977**, 51, 4503-4506.
[53] M. Fujita *et al*., Further studies on the biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides:* hydroxilation of the shikimate-derived ring**,** *Phytochemistry,* **1981**, 20, 2183-2185.
[54] L. Beerhues *et al*., Biosynthesis of biphenyls and benzophenones - Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants, *Phytochemistry* **2009**, 70, 1719-1727.
[55] G. Hill *et al*., Fungal Xanthone Biosynthesis. Distribution of Acetate-Derived Oxygens in Ravenelin, *Journal of the American Chemical Society,* **1982,** 104**,** 1745-1748.
[56] P. Adam *et al.*, Biosynthesis of Hyperforin in Hypericum perforatum, *J. Med. Chem,* **2002**, 45, (21), 4786-4793.
[57] P. Nuhant *et al.*, α,α'-Annulation of 2,6-Prenyl-Substituted Cyclohexanone Derivatives with Malonyl Chloride: Application to a Short Synthesis of (±)-Clusianone. Formation and Rearrangement of a Biogenetic-Like Intermediate, *Organic letters*, 2007, 287-289.
[58] N. Simpkins, Adventures in bridgehead substitution chemistry: synthesis of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols (PPAPs), *Chem. Commun*., **2013**, 49, 1042-1051.
[59] L. Verotta *et al*., Synthesis and Biological Evaluation of Hyperforin Analogues. Part I. Modification of the Enolized Cyclohexanedione Moiety, *Journal of Natural Products*, **2002**, 65, 433-438.

[60] L. Prenner *et al*., Reduction of High-Afinity â2-Adrenergic Receptor Binding by Hyperforin and Hyperoside on Rat C6 Glioblastoma Cells Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biochemistry,* **2007**, 46*,* 5106-5113.
[61] A. Nahrstedt *et al*., Lessons Learned from Herbal Medicinal Products: The Example of St. John's Worth, *Journal of Natural Products,* **2010,** 73*,* 1015-1021.
[62] J. Weng, *et al*, Anti-inflammatory phloroglucinols and terpenoids from *Garcinia subelliptica*, *J. Nat. Prod.,* **2004**, *67*, 1796-1799.
[63] G. Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae), *Phytochemistry* , **2009**, 70, 75-85.
[64] TM de Almeida Alves *et al*., Biological Activities of 7-Epiclusianone, *Journal of Natural Products,* **1999**, 62, 369-371.
[65] V. Kuete *et al*., Antimicrobial components of the methanolic extract from the stem bark of *Garcinia smeathmannii* Oliver (Clusiaceae), *South African Journal of Botany* ,**2007**, 73, 347-354.
[66] D. Roux *et al*., Structure-Activity Relationship of Polyisoprenyl Benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the Tubulin/Microtubule System, *Journal of Natural Products,* **2000**, 63, 1070-1076.
[67] H. Tosa *et al*., Inhibitory activity of xanthone derivatives isolated from some guttiferaeous plants against DNA topoisomerases I and II, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin,* **1997**, 45, 418-420.
[68] K. Matsumoto *et al*., Cytotoxic Benzophenone Derivatives from *Garcinia* Species Display a Strong Apoptosis-Inducing Effect against Human Leukemia Cell Lines, *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* **2003**, 26, 569-571.
[69] V. Kuetea *et al.*, Cytotoxicity and modes of action of four naturally occuring benzophenones: 2,2_,5,6_ Tetrahydroxybenzophenone, guttiferone E, isogarcinol and isoxanthochymol, *Phytomedicine*, **2013**, 20, 528**–** 536
[70] C. Feng *et a*l., A new anticancer compound, Oblongifolin C, inhibits tumor growth and promotes apoptosis in HeLa cells through Bax activation, *Int. J. Cancer*, **2012**, 131, 1445**–** 1454.
[71] G. Pardo-Andreu *et al*., The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: Ensuing energetic and oxidative stress implications, *Toxicology and Applied Pharmacology* , **2011**, 253, 282-289.
[72] F. Horeischi *et al*., The Total Syntheses of Guttiferone A and 6-*epi*-Guttiferone A, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136* ,10, 4026**–**4030.
[73] F. *Martins et al,* Natural Polyprenylated Benzophenones: Keto-Enol Tautomerism and Stereochemistry, *J. Braz. Chem. Soc., **2007**,* 18, 8, 1515-1523.
[74] B. Lenta *et al*, (1R*,5R*,7R*,8S*)-3-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-4-hydroxy-8-methyl-1,5,7-tris(3-methyl-2-butenyl)- 8-(4-methyl-3-pentenyl)bicyclo[3.3.1]non-3-ene- 2,9-dione, *Acta Cryst*., **2007**, E63, 1282-1284.

[75] Y. Nunez-Figueredo *et al.*, Neuroprotective Action and Free Radical Scavenging Activity of guttiferone A, a Naturally Occurring Prenylated Benzophenone Arzneimittel Forschung, **2012**, 62, 12, 583-589.
[76] M., Muhammed, *U.S. Pat. Appl. Publ*., **2012**, US 20120178801 A1 20120712.
[77] R. Niero *et al*, Gastroprotective effects of extracts and guttiferone A isolated from Garcinia achachairu Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* , **2012**, 385, 1103–1109.
[78] Y. Fromentin *et al*, Synthesis of novel guttiferone A derivatives: In-vitro evaluation toward Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei and Leishmania donovani, *Euro J. Med. Chem*., **2013**, 65, 284-294.
[79] Y. Yamamoto *et al*, Selective Synthesis by Use of Lewis Acids in the Presence of Organocopper and Related Reagents. New Synthetic Methods**,** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*., **1986**, *25*, 947-959.
[80] Y. Fromentin, extraction et hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A, *thèse de doctorat*, soutenu le 27 septembre **2013.**
[81] **:** A. Nassi, Voltammetry Study of an Anti-HIV Compound by means of a Thin Organic Membrane, *International Journal of Electrochemistry*, **2013**, Article ID 902872.
[82] **:** L. Brousseau et al. High-throughput transcriptome sequencing and preliminary functional analysis in four Neotropical tree species
BMC Genomics, **2014**, 15, 238-250.
[83] K. Abdul-Salim, Systematics and Biology of Symphonia L. f. (Clusiaceae), thèse de doctorat, **2002**
[84] : K. Demter *et al*, Mass spectrometry-based metabolomics*, Mass Spectrom Rev,.* **2007**, 1, 51-78.
[85] : O. Beckonert et al., Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts, **2007**, Nature Protocols, 2, 2692 – 2703.
[86] R. Goodacre , Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *J Exp Bot.*, **2005**, 56, 245–254.
[87] M. Defernez and RH Wilson. Infrared spectroscopy: instrumental factors affecting the long-term validity of chemometrics models. *Anal Chem*., **1997**, 69: 1288–1294.
[88] K. Bingol and R. Brüschweiler, NMR/MS Translator for the Enhanced Simultaneous Analysis of Metabolomics Mixtures by NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry: Application to Human Urine, *J. Proteome Res*., **2015**, 14, 2642−2648.
[89] U. Roessner and DA Dias, Plant tissue extraction for metabolomics, *Methods Mol Biol*., **2013**, 1055, 21-28.
[90] http://proteowizard.sourceforge.net/
[91] C. A. Smith *et al*, Xcms: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Analytical Chemistry,* **2006***,* 78, 779–787.

[92] C. Kuhl *et al*, Camera: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets, *Analytical Chemistry*, **2012**, 84, 283–289.
[93] J. Xia *et al.*, MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful, *Nucl. Acids Res*, **2015**, 1-7.
[94] O. Hrydziuszko and M. Viant, Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline, *Metabolomics,* **2012***,* 8, 161–174.
[95] A. Hackstadt and A. Hess, Filtering for increased power for microarray data analysis, *BMC Bioinformatics*, **2009**, 1, 10-11.
[96] L. Sumner *et al*.,Proposed minimum reporting standards for chemical analysis, *Metabolomics,* **2007**, 3, 211–221.
[97] Y. Zhou *et al*., Qualitative and quantitative analysis of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from Garcinia species using ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 68, 96-107.
[98] G.Marti *et al*., Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of Moronobea coccinea (Clusiaceae), *Phytochemistry*, **2009**, 70 , 75–85.
[99] AL. Piccinelli *et al*., Fragmentation Pathways of Polycyclic Polyisoprenylated Benzophenones and Degradation Profile of Nemorosone by Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., **2009**, 20, 1688–1698.
[100] BJ. Denny *et al*., Antagonistic interactions between the flavonoids hesperetin and naringenin and β-lactam antibiotics against staphylococcus aureus, *British Journal of Biomedical Science*, **2008,** 65, 3, 145-147.
[101] S. Deachathai *et al*, Phenolic compounds from the fruit of Garcinia dulcis, *Phytochemistry*, **2005**, 66 ,19, 2368-2375.
[102] S. Amey *et al*., Quantitative analysis of catechins in Saraca asoca and its correlation with antimicrobioal activity, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **2013**, 6, 421-428.
[103] J. Ngoupayo *et al*., Antimicrobial and immunomodulatory properties of prenylated xanthones from twigs of *Garcinia staudtii*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , **2009**, 17, 15, 5688-5695.
[104] Ngoupayo J. *et al*, Antimicrobial and immunomodulatory properties of prenylated xanthones from twigs of *Garcinia staudtii*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 15, 5688-5695.
[105] Y-M. Lin *et al*., Biflovonoids and derivatives thereof as antiviral agents, **2002**, *United States Patent* US 6,399,654 B1.
[106] K. Trisuwan and T. Ritthiwigrom,. Benzophenone and xanthone derivatives from the inflorescences of *Garcinia cowa*, *Archives of Pharmacal Research,* **2012**, 35, 10, 1733-1738.
[107] RA. Hussain *et al*., Kolanone, a novel polyisoprenylated benzophenone with antimicrobial properties from the fruit of *Garcinia kola*, *Planta Medica*, **1984**, 44, 2, 78-81.
[108] AE. Hay et al., Antimalarial xanthones from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*, **2004**, *Life Sciences*, 75, 25, 3077-3085.

[109] L. Sleno, The use of mass defect in modern mass spectrometry , *Journal of Mass Spectrometry* , **2012**, 47, 226–236.
[110] RL. Sleighter and PG. Hatcher, The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter, *J. Mass Spectrom*., **2007**, 42, 5, 559-574.
[111] Y. Fromentin *et al*, Yeast-Mediated Xanthone Synthesis through Oxidative Intramolecular Cyclization, *Organic letters*, **2012**, 14, 19, 5054-5057.
[112] G. *Xu et al.,* Bioassay and Ultraperformance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Guided Isolation of Apoptosis-Inducing Benzophenones and Xanthone from the Pericarp of *Garcinia yunnanensis Hu*, *J. Agric. Food Chem*., **2008**, 56, 11144-11150.
[113] LTT. *Nguyen et al,* Polyisoprenylated acylphloroglucinols and a polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii, Tet. Lett*., **2012**, 53, 4487-4493.
[114] S. Sang *et al*., Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxyl
radicals and their antitumor activities. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 10095-10102.
[115] S. Sang *et al*., Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol and theirs antitumor activities, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9931-9938.
[116] S-X. Huang *et al.,* Bioassay-Guided Isolation of Xanthones and Polycyclic Prenylated Acylphloroglucinols from *Garcinia oblongifolia*, J. Nat. Prod., **2009**, 72, 130-135.
[117] Y. Ito and R.L. Bowman, Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support, *Science,* **1970**, 167 , 3916, 281–283.
[118] K. Hostettmann and A. Marston, Liquid-liquid partition chromatography in natural product isolation**,** *Analytica Chimica Acta***, 1990,** 236, 63–76.
[119] B. Kedzierski*, et al.*, Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances--a review, *Acta Pol Pharm.,* **2014***,* 71, 2, 223-237.
[120] M. Masullo *et al.,* Polyisoprenylated benzophenones and an unusual polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the fruits of *Garcinia cambogia*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2008**, 56, 5205-5210.
[121] M. Masullo *et al*., Polyisoprenylated benzophenone derivatives from the fruits of *Garcinia cambogia* and their absolute configuration by quantum chemical circular dichroism calculations, *Tetrahedron,* **2010**, 66, 139-145.
[122] A. Meli Lannang *et al*., Cytotoxicity of Natural Compounds Isolated from the Seeds of *Garcinia afzelii*, *Planta Medica,* **2010**, 76, 708-712.
[123] Z-X. Xia *et al*., Bioassay-Guided Isolation of Prenylated Xanthones and Polycyclic Acylphloroglucinols from the Leaves of *Garcinia nujiangensis*, *Journal of Natural Products*, **2012,** 75, 1459-1464.
[124] S-C. Chien *et al*., A novel polyprenylated phloroglucinol, garcinialone, from the roots of *Garcinia multiflora*, *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 5276-5278.
[125] H. Zhang *et al*., Cytotoxic and Anti-Inflammatory Prenylated Benzoylphloroglucinols and Xanthones from the Twigs of *Garcinia esculenta*, J. Nat. Prod., **2014**, 77, 1700−1707.

[126] K.Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, *Springer*, 6th edition, **2011.**
[127] HW Zhang *et al*, Biology and chemistry of endophytes, *Natural, Product Reports,* **2006**, 23, 753-771.
[128] S. Soliman *et al*., Chemical Inhibitors Suggest Endophytic Fungal Paclitaxel Is Derived from Both Mevalonate and Non-mevalonate-like Pathways, *Journal of Natural Products,* **2011,** 74*,* 2497-2504.
[129] S. Kusari *et al*., An Endophytic Fungus from *Hypericum perforatum* that Produces Hypericin, *Journal of Natural Products,* **2008,** 71*,* 159-162
[130] A. Arnone *et al*., Microbial transformations of the taxan ring of 10-DAB by some strains of the fungus Curvularia lunata: formation of the bis-abeotaxanes wallifoliol and 4-deacylwallifoliol, *J. Nat. Prod.,* **2010**, 73, 1049–1052**.**
[131] D. Collin and P. Reese, Biotransformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one and 3a-hydroxycadina-4,10(15)-diene by *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Phytochemistry,* **2002**, 59, 489–492.
[132] S. Truyens *et al*., Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants, Environmental Microbiology Reports, 2015, 7, 1, 40-50.
[133] *J. Gogarten and P. Jeffrey,* Townsend, Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution*, Nature Reviews Microbiology*, **2005***, 3, 679-687.*
[134] S. Taghavi *et al*., Horizontal Gene Transfer to Endogenous Endophytic Bacteria from Poplar Improves Phytoremediation of Toluene, *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, 8500–8505.
[135] S. Waldvogel and SR. Janza, Renaissance of electrosynthetic methods for the construction of complex molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2014**, *53*, 7122-7123.
[136] E. Bernd et al., Metal- and reagent-free highly selective anodic cross-coupling reaction of phenols, *Angewandte Chemie International* Edition, **2014**, 53, 20, 5210-5213.
[137] F. Doi et al., Synthetic Studies on Bioactive Natural Products Employing Electrochemical Methodology, Synthesis of Heliannuol E, S. *Synlett,* **2002**, *4*, 533-543.
[138] Z. Grujić *et al.,* Electrochemical syntheses of heterocyles compounds-IV Syntheses with nascent quinones, *Tetrahedron Lett.,* **1976,** *17,*4823–4824.
[139] S. Sanchez-Cortes, Catechol polymerization in the presence of silver surface, *Colloids and Surfaces A*: *Physicochem*. *Eng*. *Aspects, **2001**,* 176, 177–184
[140] Y.Nishihama *et al*., Oxidation of mangostins, the naturrally occurring xanthon derivatives carrying diverse biological activities S. Electrochemistry, **2006**, 8, 609−611.
[141] J. Clayden *et al*., Organic chemistry, 2nd edition, Oxford, **2012.**
[142] J.R. Lewis and B.H. Warrington, Oxidative Coupling. Part VI Synthesis of Xanthones, *J.Chem. soc., **1964,*** 974**,** 5074-5077.
[143] R.J. Molyneux *et al*., Oxidative coupling of apigenin, *Tetrahedron*, **1970**, 26, 1409-1416.
[144] A. Jefferson and F. Scheinmann, Studies in the Xanthone Series of Jacareubin Part VIII. An Unambiguous Synthesis, J. Chem. Soc., **1966**, 175-178.
[144] A. Jefferson and F. Scheinmann, Studies in the Xanthone Series of Jacareubin Part VIII. An Unambiguous Synthesis, J. Chem. Soc., **1966**, 175-178.

[145] M. Movassaghi et al.,Total Synthesis of (-) Himandrine, *J. Am. Chem. Soc.,* **2009**, *131*, 9648-9650.
[146] D. Walker and JD. Hiebert, 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone and its reactions, *Chem. Rev.,* **1967**, *67*, 153-195.
[147] T. Amemiya *et al*. The novel oxidation of 1-alkylazulenes to 1-acylazulenes with DDQ*, Chem. Lett,.* **1988**, 587-590.
[148] D. Cheng and W. Bao, Highly Efficient Metal-Free Cross-Coupling by C-H Activation between Allylic and Active Methylenic Compounds Promoted by DDQ *Adv. Synth. Catal*. **2008**, *350*, 1263-1266.
[149] F. Ameer *et al.,* The DDQ mediated cyclization products of some 2-hydroxy-3-(1'-alkenyl)-1,4-naphthoquinones, *Synth. Commun.,* **2002**, *32*, 369.
[150] Z-L. Wang *et al.,* DDQ-Mediated Oxidative Coupling: An Approach to 2,3-Dicyanofuran (Thiophene), *Org. Chem.*, **2014**, *79* ,3, 1156–1165.
[151] F. Jiang *et al*., Free radical scavenging and anti-oxydative acitivies of an ethanol-soluble pigment prepared from fermented *Zijuan Pu-erh* tea**,** Food and Chemical Toxicology, **2013**, 59, 527-533.
[152] F. Montanari et *al*,.2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl". *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*., Ed Wiley, **2005**,
[153] R. Grubbs, Olefin metathesis, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7117–7140.
[154] J. Winkler *et al*., Synthetic Modification of Manzamine A via Grubbs Metathesis. Novel Structures with Enhanced Antibacterial and Antiprotozoal Properties, **2007**, *Org*. *Lett*., 9, 22, 4467-4469.
[155] R. Johnson and B. Sharpless, *Comp. Org. Syn.,* **1991**, *7*, 389-436.
[156] E. Jacobsen, Asymmetric Catalysis of Epoxide Ring-Opening Reactions, *Acc. Chem. Res.,* **2000**, 33, 421-43.1
[157] M.-R. Cha *et al*., Anti-Proliferative Effect of Synthesized Bakuchiol Analogues on Cultured Human Tumor Cell Lines, *Bull. Korean Chem. Soc*., **2012**, 33, 7, 2378-2380.
[158] M. Junttila and O. HormiMethanesulfonamide: a Cosolvent and a General Acid Catalyst in Sharpless Asymmetric Dihydroxylations, *J. Org. Chem.* , **2004**, *69*, 4816-4820.
[159] A. Smith *et al*., Diversity-Oriented Synthesis of Polyketide Natural Products via Iterative Chemo- and Stereoselective Functionalization of Polyenoates: Development of a Unified Approach for the C(1−19) Segments of Lituarines A−C*, Org. Lett*., **2005**, 7, 1, 139-142.
[160] R. Criegee, Mechanism of Ozonolysis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1975**, 14, p. 745–752
[161] G. Bay *et al*., A Bioinspired Approach to Tri-nor-guaianes. Synthesis of (-)-Clavukerin A, *J. Nat. Prod*. **2006**, 69, 1234-1236.
[162] L. Coutts *et al.,* A stereospecific synthesis of 24(S)- hydroxyvitamin D2, a prodrug for 1a,24(S)-dihydroxyvitamin D2 *Org. Process. Res. De*V.*,* **2002**, *6*, 246.
[163] C. Lentsche *et al*., Jatrophane Diterpenes: Preparation of the Western Fragment of Pl-3, *Eur. J. Org. Chem*., **2014**, 919–923.

[164] S. Van Ornum *et al*., Ozonolysis Applications in Drug Synthesis, Chem. Rev., **2006**, 106, 2990-3001.
[165] J. Li, *Criegee mechanism of ozonolysis* , Name Reactions. Ed Springer, **2006**, 173–174.
[166] www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/324108
[167] U. Bhalerao and H. Rapoport, Stereochemistry of Allylic Oxidation with Selenium Dioxide. Stereospecific Oxidation of gem-Dimethyl Olefins, *Journal of the American Chemical Society, **1971**,* 93, 19, 4835-4840.
[168] N. Koolaji *et al*., Synthesis of C- and O-prenylated tetrahydroxystilbenes and O-prenylated cinnamates and their action towards cancer cells, European Journal of Medicinal Chemistry , 2013, 63, 415-422.
[169] C. Geoffroy-Chapotot, Élaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt biologique, et imagerie par microscopie optique en champ proche, *thèse de doctorat*, **1998**.
[170] G. Chen *et al.,* Photoaffinity labeling probe for the substrate binding site of human phenol sulfotransferase (SULT1A1): 7-azido-4-methylcoumarin, *Prot. Sci*.,, **1999**, *8*, 2151-2157.
[171] V. Voskresenska *et al*., Photoaffinity Labeling via Nitrenium Ion Chemistry: Protonation of the Nitrene Derived from a 4-Amino-3-nitrophenylazide to Afford Reactive Nitrenium Ion Pairs., *J Am Chem Soc*., **2009**, 19; 131,32, 11535–11547.
[172] G. Smolinsky and B. Feuer, Nitrene Insertion into a C-H Bond at an Asymmetric Carbon Atom with Retention of Optical Activity. Thermally Generated Nitrenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86* ,15, 3085–3088.