



Hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A

Pauline Menelle

► To cite this version:

Pauline Menelle. Hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A. Chimie organique. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB065 . tel-04223162

HAL Id: tel-04223162
<https://theses.hal.science/tel-04223162>

Submitted on 29 Sep 2023

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 MTCI

Année 2018

N°

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

MENELLE Pauline

Hémisynthèse d'analogues de guttiférone A

Thèse dirigée par le Pr. Marie-Christine LALLEMAND

soutenue publiquement le 21 Novembre 2018

Membres du jury :

Directrice de thèse :	Pr. Marie-Christine Lallemant
Rapporteurs :	Dr. Véronique Eparvier
	Pr. Marie-Claude Viaud-Massuard
Examineurs :	Dr. Didier Buisson

Remerciements

Je tenais à remercier en premier lieu les membres du jury Mme Véronique Eparvier, Pr. Marie-Claude Viaud-Massuard et Dr Didier Buisson, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus grande gratitude.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr. Marie-Christine Lallemand pour m'avoir permis de réaliser ces travaux, pour les avoir encadrés. Même si je ne poursuis pas sur cette voie, j'ai aimé ce que j'ai fait pendant ces trois années. Merci pour votre bienveillance, vos conseils et votre (trop) franc-parler !

Un grand merci à Dr. Didier Buisson pour m'avoir accueillie au Muséum National d'Histoire Naturelle, pour avoir encadré une partie de ces travaux et pour m'avoir formé aux biotransformations.

Je remercie le Dr. Romain Duval pour avoir encadrer les travaux concernant la recherche des cibles. J'ai beaucoup appris en travaillant avec toi.

Je remercie le Dr. Jérôme Quintin, avec qui j'ai collaboré pour les travaux de biotransformations.

Je remercie les stagiaires qui ont travaillé à mes côtés : Kévin Le Divellec, William Zouaoui et Quentin Robert.

Je remercie le Dr. Soizic Prado de m'avoir ouvert les portes des son laboratoire et toute l'équipe MCAM pour leur accueil, les étudiants du laboratoire pour les moments très sympas passés là-bas, et Laura pour m'avoir formée sur les manipulations de micro-organismes.

Je remercie toute l'équipe de Pharmacognosie, Pr. Sylvie Michel, Pr. Brigitte Deguin, Dr. Xavier Cachet, Dr. Hanh Dufat, Dr. Sabrina Boutefnouchet, Dr. Marina Kritsanida, Dr. Raphael Grougnet, Dr. Anne Neudorffer, Dr. Martine LARGERON, Chouaha Bouzidi, et plus particulièrement : Dr. Thomas Gaslonde, le McGyver du labo, pour toute l'aide qu'il m'a apporté, Dr. François-Hugues Porée, pour son humour couci-couça, ses jeux de mots (Paul-in, Paul-out restera le favori !), ses blagues dont j'ai souvent été l'objet (...), et ses conseils bienveillants ☺, Dr. Dang Thai, pour sa bonne humeur, son sourire, son humour et son soutien.

*Merci aux personnes sans qui ce labo ne tourne pas rond :
Olivier, qui nous facilite tant la vie au laboratoire,
Maryse, qui nous chouchoute comme une maman, merci pour ton si grand cœur,
Alexandre et Ghislaine.*

Je remercie Pascale Leproux pour les analyses de spectrométrie de masse.

Un grand merci à Yann et Kévin, toujours présents et prêts à donner de judicieux conseils.

Je remercie Ludivine qui m'a beaucoup aidé à m'adapter au monde de la recherche.

Je remercie Claire pour les bons moments passés pendant les enseignements de chimie analytique. Je remercie également Doriane pour sa joie de vivre, son énergie (débordante) et son humour.

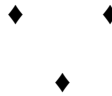
*A tous les doctorants du laboratoire de Pharmacognosie, nous avons passé trois ans ensemble (deux pour certains), merci d'avoir égayé le quotidien. Et plus particulièrement à :
Camille, qui a fait une coloc' de bureau parfaite et m'a même adopté sur sa paillasse, je pense qu'on aurait dû poursuivre sur notre idée d'une thèse en binôme,*

*Mégane, qu'on a pas beaucoup vu mais avec qui on a partagé l'épreuve la plus difficile : la rédaction !
Rodolphe, qui grogne, râle et rouspète mais avec qui j'ai tellement rit ! Et partagé équitablement des paquets de gâteaux...*

William, pour les aimables propositions d'actes chirurgicaux en tout genre !

Et bien sur un immense merci à Bichon, Binomette, Chaton, Claire, Laura et Margaux qui n'ont pas idée à quel point elles m'ont aidé tout au long de ses trois années♥. Une attention particulière pour Laura qui a, en plus, écopé de la tâche ardue de corriger mon orthographe approximative !

A ma famille, à Thibault, merci du fond du cœur.



Liste des abréviations

°C	degrés Celsius
µg/mL	microgramme par millilitre
µL	microlitre
µM	micromolaire
Å	Angström
Å ²	Angström carré
AChE	AcétylCholinEstérase
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACT	Artemisin Combined Therapy
Acyl-CoA	Acyl-coenzyme A
AIBN	Azobisisobutyronitrile
ARN	Acide Ribonucléique
AZC	Azidocoumarine
BChE	ButyrylCholinEstérase
BPAPs	Phloroglucinols acylés polyprénylés bicycliques
BSA	Albumine de sérum bovin
CC ₅₀	Concentration cytotoxique 50 %
CCC	Chromatographie Contre Courant
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl ₃	chloroforme deutéré
COSY	Correlation Spectroscopy
CPC	Chomatographie de partage centrifuge
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
d-chloroforme	chloroforme deutéré
DCM	Dichlorométhane
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
d-méthanol	méthanol deutéré
DMF	Diméthylformamide
DMPA	2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DP	degrés de polymérisation
EC ₅₀	Concentration Efficace médiane
EDCI	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ee	excès énantiomérique
eq	équivalents
FAS	Acide Gras Synthase
FID	Détecteur a ionisation de flamme

g/mol	gramme par mole
GA	Guttiférone A
GB	Guttiférone B
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GC	Guttiférone C
GD	Guttiférone D
h	heure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IS	Indice de sélectivité
ISYEB	Institut de systématique, Evolution et Biodiversité
Kd	Coefficient de partition
KOtBu	Tert-butylate de potassium
LC	Leishmaniose cutanée
LC-MS	Chromatographie en phase Liquide – Spectrométrie de masse
LiHMDS	Lithium Bis(trimethylsilyl)amide
LV	Leishmaniose viscérale
M	molaire
m/m	masse/masse
Malonyl-CoA	Malonyl-coenzyme A
MCAM	Molécule de communication et adaptation des micro-organismes
MeOD	méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
mg	milligramme
mg/mL	milligramme par millilitre
MHz	Mégahertz
MIC	Concentration minimale inhibitrice
min	minute
mL	millilitre
mL/min	millilitre par minute
mmol	millimole
MNHN	Muséum National d'Histoire Naturelle
MPAPs	Phloroglucinol acylés polyprénylés monocycliques
NEt ₃	Triéthylamine
nm	nanomètre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pd ₂ dba ₃	Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)
PDA	Pomme de terre, Dextrose, Agar

PdB	peroxyde de benzoyle
PPAPs	Phloroglucinol Acylé polycyclique polyprénylé
ppm	partie par million
PSM	Poste de sécurité microbiologique
p-Tol ₃ P	Tri(o-tolyl)phosphine
RB	Rhodamine B
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
rpm	rotations par minute
SM	Spectrométrie de masse
SRB	Sulflorhodamine B
TA	Température Ambiante
TEA	Triéthylamine
THA	Trypanosomiasme Humaine Africaine
THF	Tetrahydrofurane
TsCl	Chlorure de tosyle
U/mL	Unités par millilitre
UV	Ultra Violet
v/v	volume/volume
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
YMS	Yeast, Malt extract, Soybean
δ	Déplacement chimique

Sommaire

Remerciements	- 3 -
Liste des abréviations	- 5 -
Sommaire	- 8 -
Avant propos	- 11 -
Introduction	- 17 -
I. <i>Les maladies parasitaires</i>	<i>- 17 -</i>
I.1 Le paludisme	- 17 -
I.2 Trypanosomiase Humaine Africaine	- 22 -
I.3 La leishmaniose	- 28 -
I.4 Conclusion	- 30 -
II. <i>A propos du Symphonia globulifera</i>	<i>- 31 -</i>
II.1 Caractéristiques botaniques	- 31 -
II.2 Médecine traditionnelle	- 33 -
II.3 Caractéristiques phytochimiques	- 35 -
II.3.1 Le stérol	- 36 -
II.3.2 Le triterpène	- 36 -
II.3.3 L'acide gras	- 37 -
II.3.4 Les bisflavonoïdes	- 37 -
II.3.5 Les benzophénones et les xanthones	- 38 -
II.3.6 Les PPAPs	- 41 -
III. <i>Autour des PPAPs</i>	<i>- 43 -</i>
III.1 Classification	- 44 -
III.2 Biogénèse	- 46 -
III.3 Activité des PPAPs	- 49 -
IV. <i>La guttiférone A 1</i>	<i>- 50 -</i>
IV.1 Origines	- 50 -
IV.2 Structure	- 51 -
IV.3 Synthèse totale	- 53 -
IV.4 Activités	- 56 -
IV.5 Perspectives	- 57 -
Purification et hémisynthèse par voie chimique	- 61 -
I. <i>Extraction et purification de la guttiférone A 1</i>	<i>- 61 -</i>
I.1 Généralités autour de la CPC	- 61 -
I.1.1 Principe	- 61 -
I.1.2 Séparation de produits naturels	- 63 -
I.2 Travaux antérieurs	- 63 -
I.3 Travaux personnels	- 64 -
I.3.1 Dosage des phases utilisées en CPC	- 65 -
I.3.2 Purification des guttiférones par CPC	- 68 -
II. <i>Hémisynthèse d'analogues de guttiférones par voie chimique</i>	<i>- 69 -</i>

II.1	Oxydation à l'iode hypervalent	- 70 -
II.2	Oxydation <i>via</i> la tyrosinase	- 76 -
II.2.1	La tyrosinase dans la littérature	- 77 -
II.2.2	Application à la guttiférone A 1	- 78 -
II.3	Synthèse de l'analogue de troisième génération	- 79 -
II.3.1	Cyclisation intramoléculaire	- 81 -
II.3.2	Synthèse du 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone A 114	- 82 -
II.3.3	Synthèse du 28-hydroxy-13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone 116	- 83 -
II.4	Cyclisation intramoléculaire de la guttiférone C	- 83 -
III.	Conclusion	- 88 -
Hémisynthèse de guttiférones par biotransformations		- 93 -
I.	<i>Hémisynthèse d'analogue de guttiférones par biotransformations</i>	- 93 -
I.1	Introduction	- 93 -
I.1.1	Les biotransformations	- 93 -
I.1.2	Les biotransformations de chaînes prényles	- 98 -
I.2	Les travaux antérieurs	- 101 -
I.2.1	Screening de la collection de micro-organisme du MNHN	- 101 -
I.2.2	Les endophytes	- 102 -
I.2.3	Isolement des endophytes de <i>Symphonia globulifera</i>	- 105 -
I.2.4	Initiation des biotransformations de guttiférone A par les endophytes de <i>Sg.</i>	- 106 -
I.2.5	Caractéristiques des <i>Curvularia</i> sp et des <i>Bipolaris</i> sp.	- 107 -
I.3	Travaux personnels	- 109 -
I.3.1	Matériel et méthodes	- 110 -
I.3.2	Etude de la stabilité des guttiférones dans différents tampons	- 111 -
I.3.3	Etude sur <i>Rhodotorula buffonii</i>	- 114 -
I.3.4	Culture des endophytes	- 117 -
I.3.5	Criblage des endophytes	- 119 -
I.3.6	Etude du pH sur SG1	- 123 -
I.3.7	Métabolisation à pH contrôlé	- 125 -
I.3.8	Autres essais autour de <i>Bipolaris cactivora</i>	- 126 -
I.4	Conclusion	- 128 -
f.		- 131 -
Recherche de cibles protéiques parasitaires		- 133 -
I.	<i>Introduction</i>	- 133 -
II.	<i>Travaux préliminaires</i>	- 133 -
III.	<i>Nouvelle stratégie</i>	- 137 -
III.1	Généralités	- 137 -
III.2	Synthèse de la guttiférone A « taguée »	- 140 -
III.2.1	Synthèse du tag	- 140 -
III.2.2	Synthèse de la guttiférone A taguée	- 141 -
III.3	Synthèse du fluorophore-thiol	- 142 -
III.4	Photoaddition thiol-ène	- 146 -
III.4.1	Généralités	- 146 -
III.4.2	Exemples de la littérature	- 148 -
III.4.3	Application à la guttiférone A 1	- 150 -

IV. Conclusion	- 153 -
f.....	- 155 -
Conclusion générale	- 157 -
Partie Expérimentale.....	- 163 -
I. Appareillages et généralités.....	- 163 -
II. Dosage des guttiférones A et C dans le latex	- 165 -
III. Description des molécules.....	- 167 -

Avant propos

Les maladies parasitaires sont un fléau pour les populations tropicales. C'est un domaine très peu exploré par les grandes industries pharmaceutiques, il y a donc peu de traitements commerciaux à l'heure actuelle. De plus, l'utilisation de ces traitements reste aléatoire à cause des sévères effets secondaires qu'ils provoquent. La faible diversité de traitement a également conduit à l'apparition de souches de parasites résistants. Il y a donc un réel besoin de molécules innovantes dans le domaine des antiparasitaires.

Ce manuscrit présentera les travaux que j'ai effectués au cours de ma thèse sur le sujet « Hémisynthèse d'analogues de guttiférone A **1** ». Cette thèse a été effectuée au laboratoire de Pharmacognosie, de la Faculté de Paris. Ce laboratoire est spécialisé dans l'étude des plantes médicinales et des produits naturels. À ce titre une famille de produits naturels, les PPAPs, est particulièrement étudiée au laboratoire pour leurs structures originales et leurs activités antiparasitaires intéressantes.

Les thèses précédentes des Dr. Yann Fromentin et Kevin Cottet ont porté sur la guttiférone A **1** qui s'est révélé un PPAP particulièrement intéressant pour plusieurs raisons¹ :

- ses activités antiparasitaires sont prometteuses ;
- une excellente méthode d'extraction à partir de latex de *Symphonia globulifera* a été mise au point avec un rendement de 12 %, ce qui permet d'accéder à de grandes quantités de matière première ;
- plusieurs séries d'analogues de guttiférone A **1** ont déjà été synthétisées. Une première série de composés a été obtenue par modification du cœur phloroglucinol et plus précisément par cyclisation intramoléculaire pour donner des composés de la famille des xanthones. Une deuxième série de composés a été obtenue par modification de la partie catéchol et plus particulièrement par alkylation et acylation des phénols. Leurs activités antiparasitaires ont été testées sur *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* et *Leishmania donovani*. Les structures des analogues de guttiférone A **1** les plus actifs de chaque série sont représentées Figure 1.

¹ K. Cottet et al., *Symphonia globulifera* : études métabolomiques, extraction et hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A a visée antiparasitaire, *thèse de doctorat*, soutenue le **13 novembre 2015**.

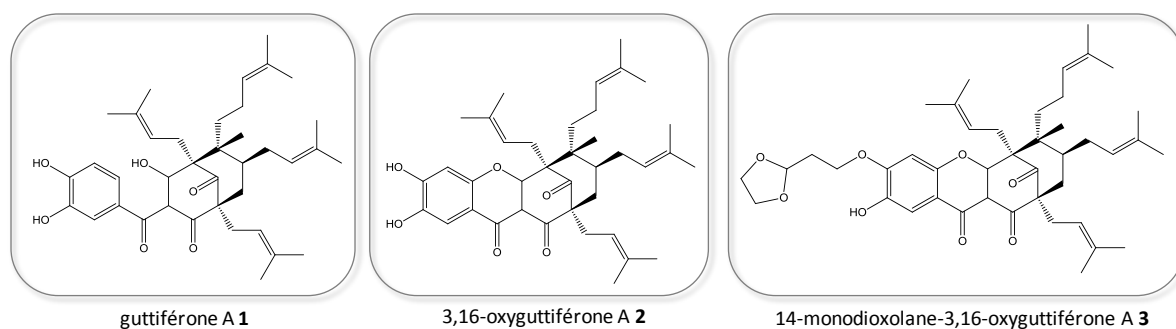


Figure 1 : Structure de la guttiférone A et de ses analogues

Les activités de ces composés sont récapitulées dans le Tableau 1. Les activités de la guttiférone A **1** contre ces trois parasites sont intéressantes, car elles sont de l'ordre du micromolaire. Ces activités ont été améliorées avec la synthèse d'analogues et particulièrement des composés **2** et **3**. La toxicité sur les cellules VERO a été diminuée, l'activité contre *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei* a été augmentée et l'indice de sélectivité a été nettement amélioré. Ces résultats sont particulièrement marqués en ce qui concerne *Trypanosoma brucei* : l'IC₅₀ a été diminuée d'un facteur 10 et l'indice de sélectivité a été grandement amélioré, passant d'environ 2 à 457.

Tableau 1 : Activité de la guttiférone A et de ses analogues. IS : Indice de Sélectivité

Composé	IC ₅₀ cellules VERO (μM)	<i>Plasmodium falciparum</i>		<i>Trypanosoma brucei</i>		<i>Leishmania donovani</i> (forme promastigote)	
		IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)	IS
guttiférone A 1	7	5,4	1,3	3,9	1,8	5,8	1,2
2	3	0,89	3,4	1,8	1,7	25	0,12
3	32	0,56	57,1	0,07	457	>100	n.c.

Ces résultats fortement encourageant nous ont conduits à continuer la synthèse de nouveaux analogues de la guttiférone A **1**. Les deux premières séries d'analogues ayant portées sur deux parties différentes de la molécule, nous avons envisagé une troisième série d'analogues qui vise à modifier la dernière partie de la molécule, soit les chaînes prényles (Figure 2). L'objectif de cette thèse sera donc de synthétiser une troisième génération d'analogues de la guttiférone A **1**, afin de tester leur activité antiparasitaire pour compléter l'étude en pharmacomodulation.

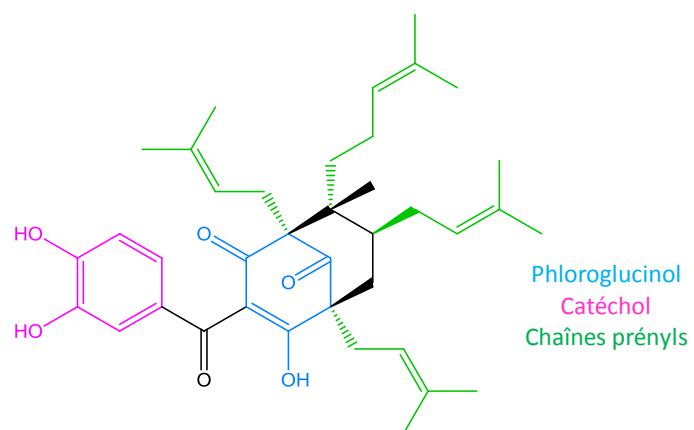


Figure 2 : Guttiférone A 1

Introduction générale

Introduction

Les travaux réalisés lors de cette thèse portent sur l'hémisynthèse d'analogues de la guttiférone A **1** à visée antiparasitaire. Cette molécule, appartenant à la famille des PPAPs, est isolée à partir du latex de *Symphonia globulifera*, arbre tropical. Cette partie détaillera l'état de l'art concernant les maladies parasitaires, mais également le *Symphonia globulifera* ainsi que les PPAPs.

I. Les maladies parasitaires

Les maladies parasitaires que nous développerons dans cette partie, sont celles sur lesquelles les analogues de guttiférone A déjà synthétisés ont été testés, soient les trois maladies parasitaires suivantes : le paludisme, la trypanosomiase et la leishmaniose.

I.1 Le paludisme

Le paludisme est la parasitose la plus répandue dans le monde. L'OMS compte 216 millions de cas en 2016, répartis dans 91 pays. Les cas de paludisme recensés par l'OMS sont en baisse depuis 2010 (237 millions de cas). Cependant, cette baisse s'est nettement ralentie depuis 2014, voire une légère hausse a été constatée dans certaines régions, notamment dans la région américaine. La Figure 3 représente l'évolution des cas de paludisme depuis 2010. On remarque que plusieurs pays n'ont pas connu de cas de paludisme depuis 2013, comme l'Algérie et l'Égypte en Afrique, l'Argentine et le Paraguay en Amérique du sud et la Turquie, la Syrie et l'Irak au Moyen-Orient. Ces résultats sont très encourageants mais cette baisse n'est limitée qu'à quelques pays².

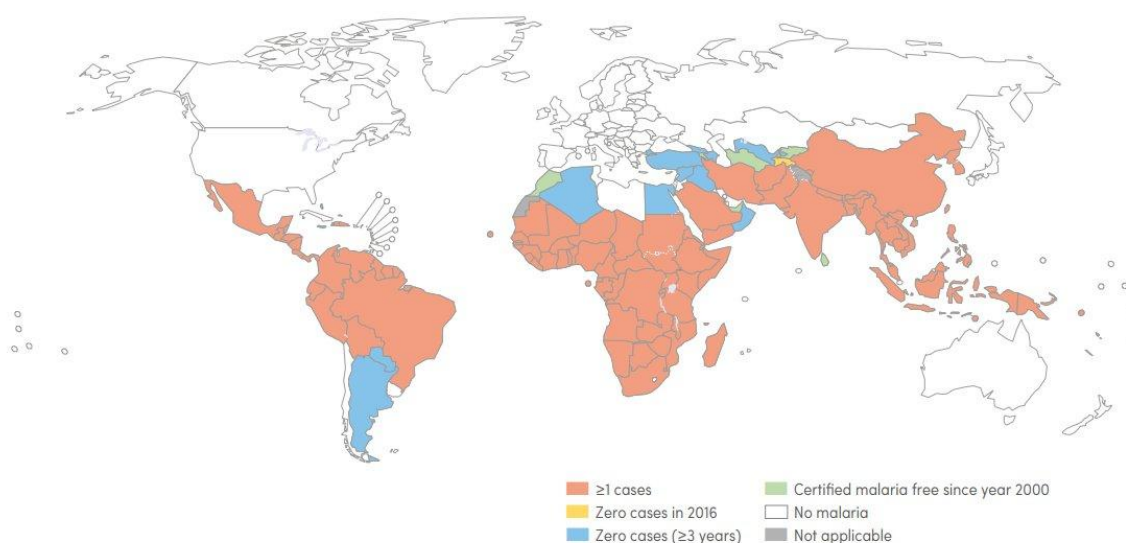


Figure 3 : Répartitions des cas de paludisme en 2010 et l'évolution de leurs statuts jusqu'en 2016²

² Rapport sur le paludisme dans le monde 2017, OMS, <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/fr/>.

De nouveaux traitements sont toujours nécessaires car sur ces 216 millions de cas, 445 000 patients sont décédés en 2016. L'Afrique est une région particulièrement touchée par le paludisme, comptant à elle seule 80 % des cas et 91 % des décès².

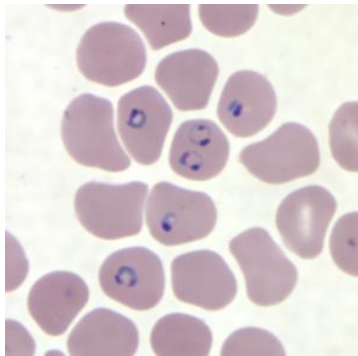


Figure 4 : Hématies infestées par *P. falciparum*

À ce jour, le paludisme est principalement dû à deux parasites : *Plasmodium falciparum* (99 % des cas en Afrique) et *Plasmodium vivax* (64 % des cas en Amérique et 40 % des cas en Asie du sud-est)². Ces parasites ont un cycle de développement complexe, comprenant une phase de reproduction asexuée chez l'Homme et une phase de reproduction sexuée chez le moustique. Ils sont transmis par la piqûre du moustique anophèle femelle. Quand un moustique infecté pique un humain, il lui injecte la forme infectieuse du parasite (sporozoïte) directement dans le sang. En moins de 30 minutes, le parasite gagne le foie et infecte les hépatocytes. C'est à cet endroit qu'il se multiplie par mitose pour former des milliers de copies (mérozoïtes) qui seront déversées dans la circulation sanguine. Ces mérozoïtes infestent les globules rouges pour devenir des trophozoïtes, qui ont une forme d'anneau caractéristique (Figure 4)³, puis continuent leurs maturations jusqu'à devenir des schizontes multi-nucléaires. Ces schizontes mûrs vont produire de nouveaux mérozoïtes qui vont infester d'autres globules rouges et le cycle continu ainsi. C'est ce stade du développement du parasite qui provoque les symptômes du paludisme comme la fièvre, la fatigue et peut conduire jusqu'au coma, voire la mort du patient. Pour une raison encore inconnue, après une période de temps variable, certains mérozoïtes asexués vont devenir des gamétocytes et être ingérés par un moustique lors d'une prochaine piqûre. Démarre alors une phase de développement du parasite chez le moustique. Les gamétocytes vont devenir des gamètes et une phase de reproduction sexuée a lieu, qui va donner naissance à un zygote qui va lui-même devenir un ookinete, puis un oocyte pour finir par déverser des sporozoïtes qui vont migrer dans la salive du moustique, et qui seront transmis à un humain lors de la prochaine piqûre. Ce cycle de développement est illustré Figure 5.

³ <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>, consulté le 09/08/2018

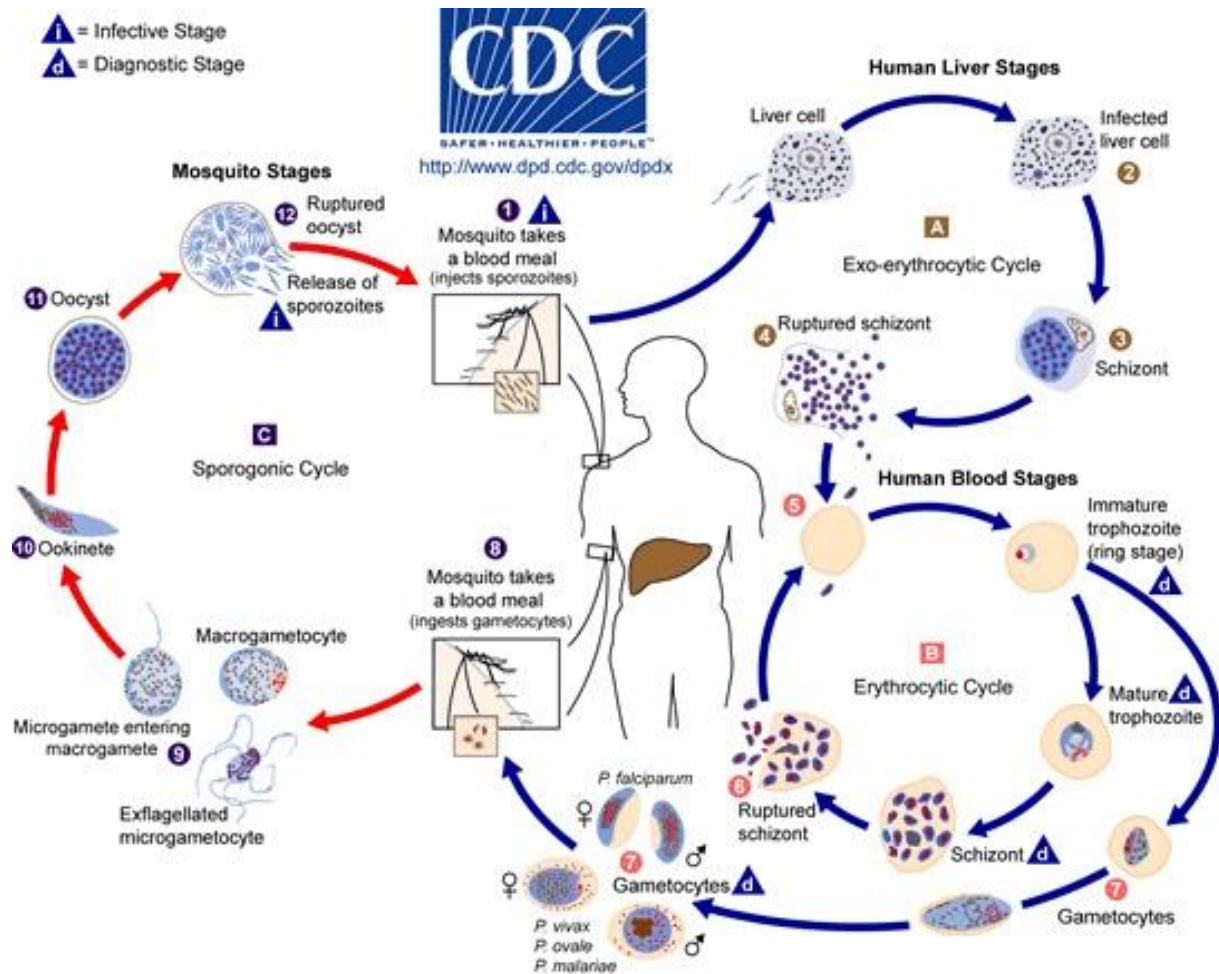


Figure 5 : Cycle parasitaire des Plasmodium sp.⁴

Une technique pour lutter contre cette maladie est de lutter contre le vecteur grâce à des insecticides. Malheureusement l'anophèle développe de plus en plus de résistances aux pesticides et cette méthode n'est donc plus suffisante (Figure 6).

Afin de lutter contre ce fléau, l'OMS a mis en place une *Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030*. Cette action pose un cadre pour accélérer la disparition du paludisme. Elle vise à réduire le nombre de cas de 90 % d'ici à 2030⁵. De nombreux efforts sont mis en œuvre pour éradiquer cette maladie. Ceux-ci passent par la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques².

⁴ <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>, consulté le 07/08/2018.

⁵ Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030, <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/fr/>, consulté le 23/08/2018.

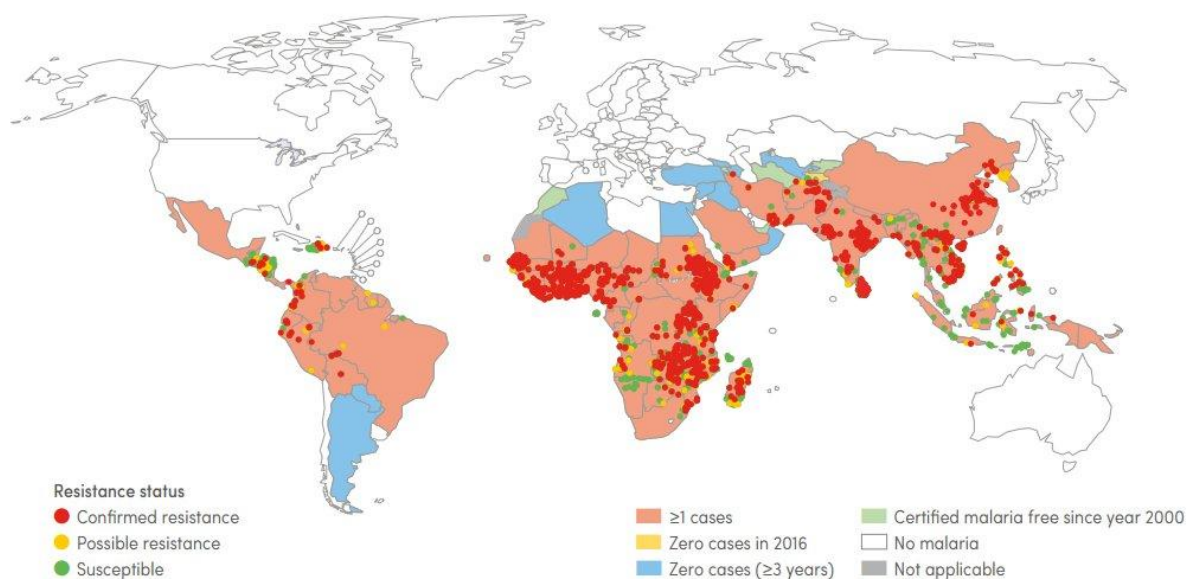


Figure 6 : Zones dans lesquels l'anophèle a développé des résistances aux insecticides en 2016²

Les produits naturels sont très fortement utilisés pour lutter contre le paludisme. Les traitements historiques sont la quinine **4**, extraite de l'écorce de quinquina (*Cinchona pubescens*) et la chloroquine **5**, un de ses dérivés synthétiques (Schéma 1). Ces composés inhibent la polymérisation de l'hème de l'hémoglobine et empêchent ainsi la reproduction du parasite⁶. L'utilisation massive de ces composés a entraîné l'apparition de parasites résistants. Il a donc fallu trouver de nouveaux traitements.

Les produits naturels sont également une vaste source d'inspiration pour créer des dérivés avec des propriétés complémentaires, car plusieurs dérivés de produits naturels sont commercialisés à ce jour. Quelques exemples sont représentés Schéma 1. Il ne fait nul doute à l'heure d'aujourd'hui que les produits naturels prennent une place importante dans la découverte de nouvelles molécules anti-palludiques⁷.

⁶ D.J. Sullivan Jr, On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action, *PNAS*, **1996**, 93, 11865-11870.

⁷ E. Fernandez-Alvaro *et al.*, Antimalarial chemotherapy: natural product inspired development of preclinical and clinical candidates with diverse mechanisms of action, *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 5587-5603.

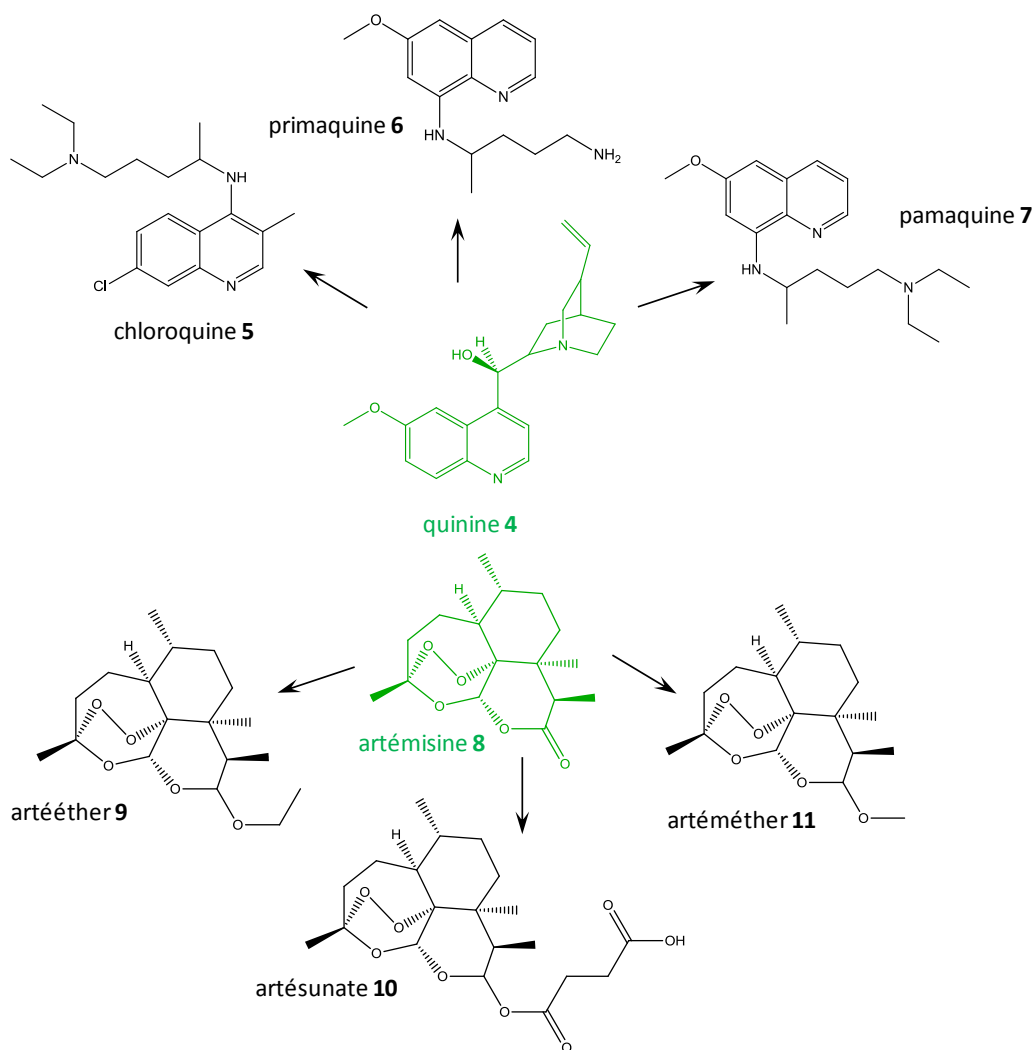


Schéma 1 : Exemple de produits naturels et de leurs dérivés utilisés comme antipaludéens

Actuellement, le traitement le plus utilisé pour lutter contre le paludisme est l'ACT, Artemisin combined therapy. Il s'agit de coupler l'artémisine **8** ou un de ses dérivés avec d'autres molécules actives, afin d'éviter l'apparition de résistance. L'artémisine **8** est un produit naturel isolé de l'*Artemisia annua* ou armoise annuelle, par l'équipe de Pr. Tu en 1981⁸. C'est une lactone sesquiterpénique dont le mécanisme d'action n'est pas connu à ce jour. Le squelette de l'artémisine **8** a également inspiré de nombreux dérivés semi-synthétiques tels que l'artésunate **10**, l'artéméthér **11** ou l'artééthér **9** qui sont utilisés en ACT (Schéma 1). La spécialité Coartem® par exemple est un mélange d'artéméthér **11** et de luméfántrine **12**. L'Arfloquin quant à elle, combine l'artésunate **10** avec la méfloquine **13** (Figure 7).

⁸ Y. Tu *et al.*, Studies on the constituents of *Artemisia annua*, *Yao Xue Xue Bao*, **1981**, 16, 366–370.

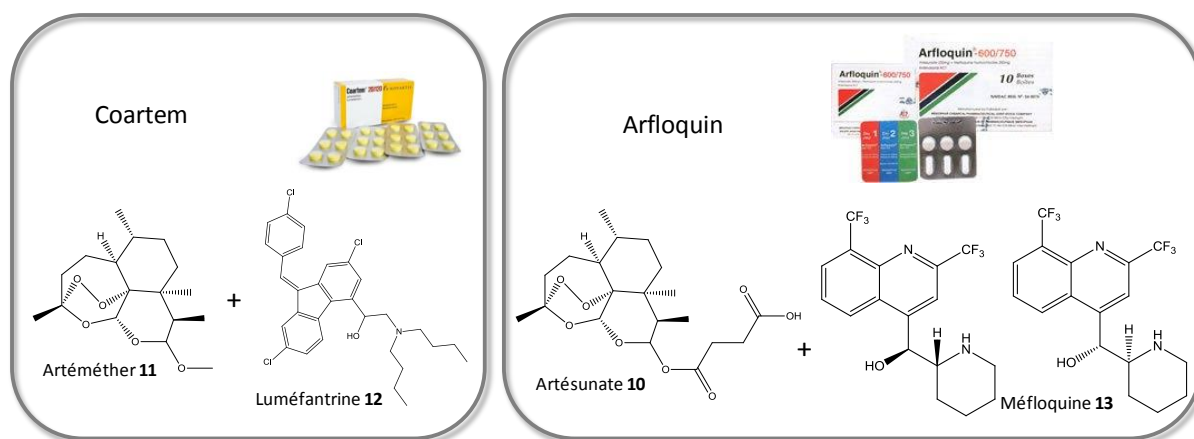


Figure 7 : Différents traitements commerciaux contre le paludisme

Un vaccin contre le paludisme est actuellement en développement. Les essais cliniques de phase III sont terminés et ont permis de baisser significativement le nombre de cas de paludisme, de 36.3 % chez les enfants de 5 à 17 mois et de 25.9 % chez les bébés de 6 à 12 semaines. En avril 2017, l'OMS a choisi trois pays pour lancer une première campagne de vaccination en 2018 (Malaria Vaccine Implementation Program). Les résultats de cette première campagne serviront au déploiement du vaccin sur le continent Africain entier par la suite⁹.

I.2 Trypanosomiase Humaine Africaine

La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil, est une maladie parasitaire. Elle se présente sous deux formes, dues à deux parasites¹⁰ :

- *Trypanosoma brucei gambiense*, que l'on retrouve plutôt en Afrique de l'ouest et en Afrique centrale. Il est responsable de la forme chronique de la maladie : les patients peuvent être infestés par le parasite pendant des mois voire des années sans qu'aucun symptôme ne se manifeste. Cette forme représente 97 % des cas de maladie du sommeil recensés.
- *Trypanosoma brucei rhodesiense* qui se trouve dans l'est de l'Afrique. Il déclenche une forme aigüe de la maladie. Les symptômes apparaissent quelques semaines après l'infection.

Cette maladie menace la population de 36 pays d'Afrique subsaharienne. Ces deux formes sont présentes sur deux territoires géographiques distincts (Figure 8). L'Ouganda est le seul pays où les deux formes de la maladie coexistent¹⁰.

⁹ L. Han *et al.*, RTS,S/AS01 Malaria vaccine efficacy is not modified by seasonal precipitation : results from a phase 3 randomized controlled trial in Malawi, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, article n°7200.

¹⁰ [http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)), consulté le 07/08/2018.

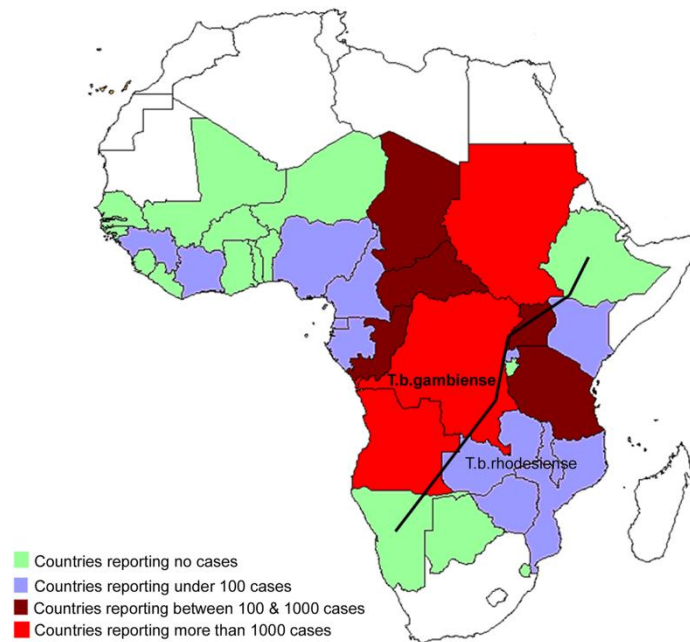


Figure 8 : Présence géographique des deux parasites et nombre de cas de THA rapportés en 2008¹¹

En 1998, 40 000 cas de THA ont été recensés officiellement, mais l'OMS estime le nombre réel de cas à 300 000. En effet, la population touchée par cette maladie vit souvent dans des zones reculées d'Afrique, ce qui limite l'accès aux services médicaux et donc aux diagnostics et aux soins. Après de nombreux efforts, le nombre de cas notifiés passe sous la barre des 10 000 en 2009. En 2015, seulement 2804 cas sont recensés, mais le nombre réel est estimé à encore 20 000¹⁰.

Trypanosoma brucei se transmet uniquement par piqûre d'une mouche tsé-tsé infestée (Figure 9)¹². Il existe plusieurs espèces appartenant au genre *Glossina spp.* Le parasite se loge dans les glandes salivaires de la mouche et se développe dans les tissus sous cutanés chez l'Homme après une piqûre. Il atteint ensuite le système lymphatique et sanguin. C'est la phase I de la maladie, qui se caractérise par de la fièvre, des maux de tête et des douleurs articulaires. Le parasite va ensuite passer la barrière hémato-encéphalique pour se loger dans le système nerveux central. Ceci peut arriver après une période plus ou moins longue en fonction du parasite concerné : de quelques semaines pour *Trypanosoma brucei rhodesiense* à plusieurs mois voire plusieurs années pour *Trypanosoma brucei gambiense*. C'est la phase II de la maladie qui commence, avec l'apparition de symptômes neurologiques comme une modification du comportement ou un état confusionnel. Une modification du rythme circadien intervient



Figure 9 : Mouche tsé-tsé (*Glossina morsitans*)

© Cirad / J. Janelle

¹¹ EM Fèvre *et al.*, The Burden of Human African Trypanosomiasis, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2008**, 2, e333.

¹² <https://www.ird.fr/ird.fr/la-mediatheque/fiches-d-actualite-scientifique/456-maladie-du-sommeil-le-genome-de-la-mouche-tse-tse-decode>, consulté le 08/08/2018.

également, ce qui a donné son nom à la maladie du sommeil. Les patients somnolent la journée et n'arrivent pas à dormir la nuit¹³.

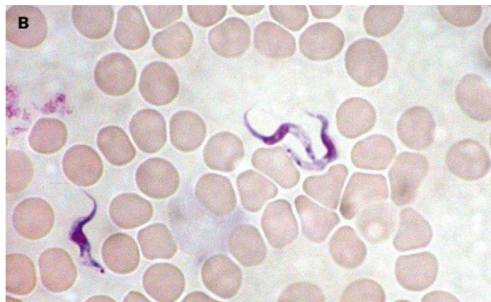


Figure 10 : *T. brucei* dans le sang vu au microscope

Le cycle de vie complet du parasite est représenté Figure 11. C'est un des rares parasites à vivre dans le milieu extracellulaire (Figure 10¹³). En effet, il est ainsi totalement exposé à la réponse immunitaire du corps hôte. Pour tromper la vigilance du système immunitaire, ce parasite est capable de modifier ses protéines de surface d'une génération à une autre. Plus de 1000 gènes différents codent pour ses protéines de surface variables dans le génome de *T. brucei*¹³.

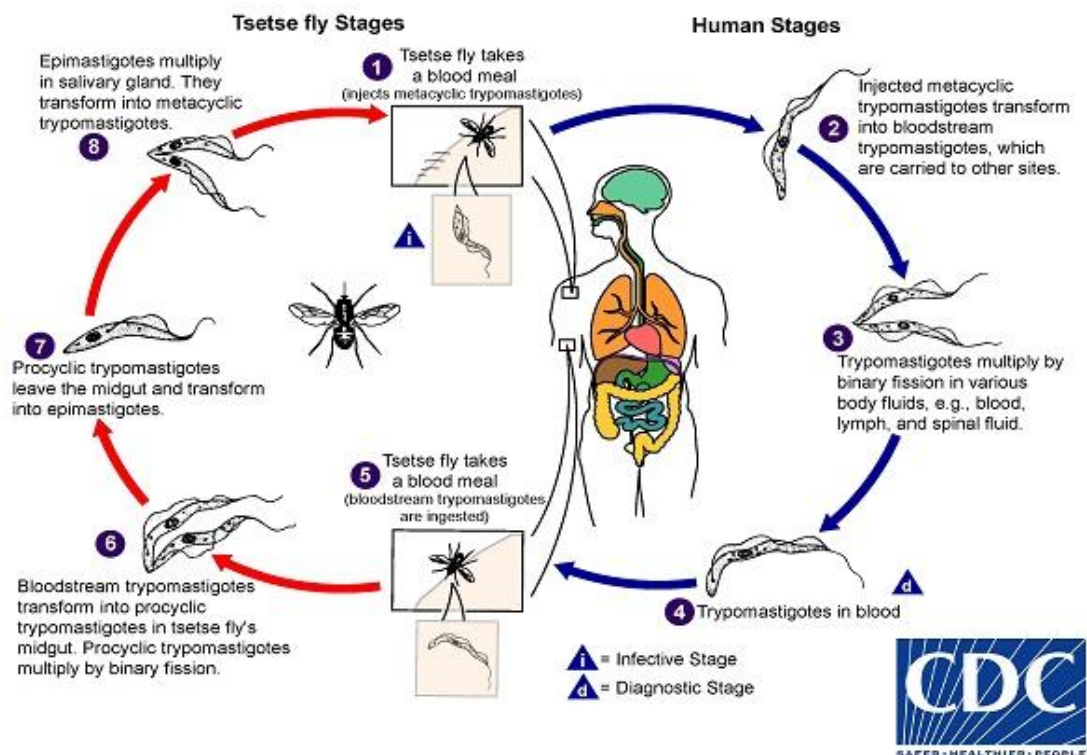


Figure 11 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*¹⁴

Les traitements pour combattre la THA sont très limités : il n'existe que quatre traitements actuellement sur le marché, dont trois ont été développés il y a plus de 50 ans (Figure 12). Le mélarsoprol **15** et l'éflomithine **16** sont les seuls à traverser la barrière hémato-encéphalique et donc, à pouvoir être utilisés en phase II de la maladie puisque qu'au cours de cette phase,

¹³ M. Barrett *et al.*, The Trypanosomiasis, *The Lancet*, **2003**, 362, 1469-1480.

¹⁴ <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>, consulté le 07/08/2018

le parasite se localise dans le système nerveux central de son hôte. De plus, l'éflornithine n'est efficace que sur *Trypanosoma brucei gambiense*. Ces traitements sont loin d'être idéaux. Ils doivent être administrés par perfusion sur une longue période, ce qui nécessite l'accès aux services médicaux pour le patient. Ils ont aussi de graves effets secondaires. La nécessité de trouver de nouveaux traitements est donc indiscutable¹⁵.

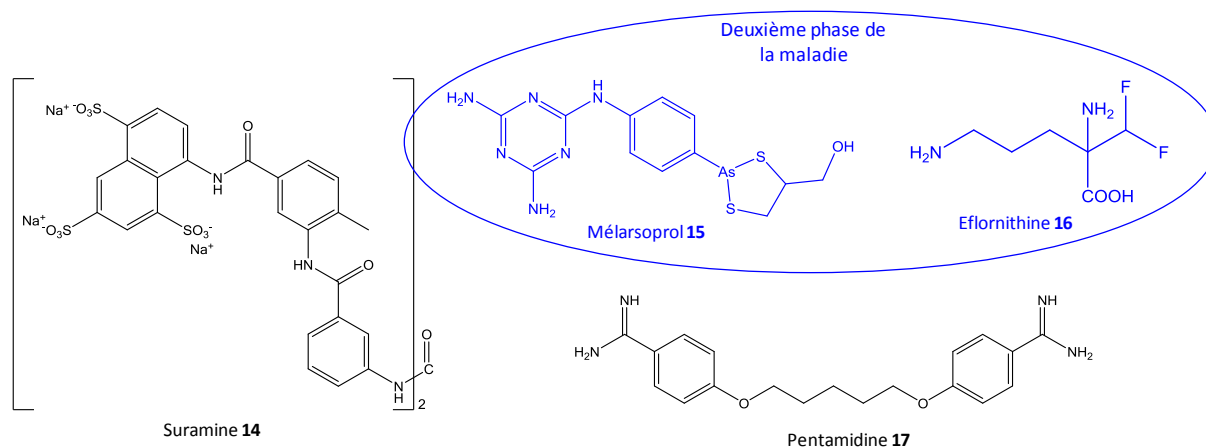


Figure 12 : Traitements commerciaux contre la TAA

Les produits naturels sont une piste de recherche intéressante pour trouver de nouveaux traitements contre la TAA. En effet, de nombreuses revues recensent les produits naturels et leurs dérivés ayant des propriétés anti-trypanosomiales^{15,16}. Quelques exemples sont représentés Figure 13 et Tableau 2.

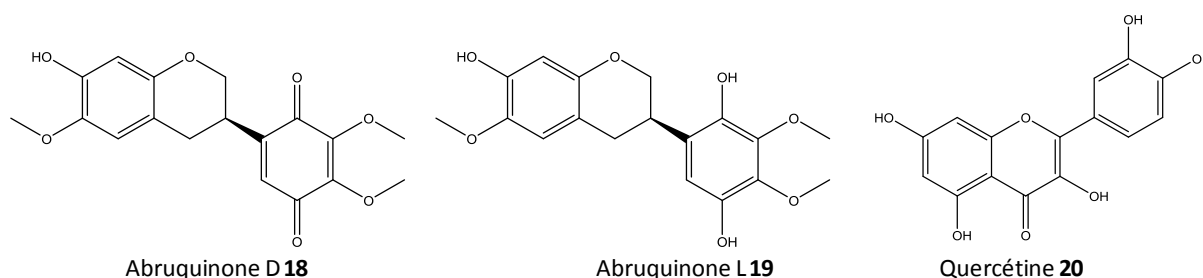


Figure 13 : Structures de quelques produits naturels avec de bonnes activités anti-trypanosomiales¹⁶

¹⁵ S. Hoet *et al.*, Natural product active against African trypanosomes: a step towards new drugs, *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, 21, 353-364.

¹⁶ L. Bashir *et al.*, African natural products with potential anti-trypanosomal properties: a review, *Int. J. Biochem. Res. Rev.*, **2015**, 7, 45-79.

Tableau 2 : Produits naturels avec de bonnes activités anti-trypanosomales¹⁶

Entrée	Composé	Plante	Famille de plante	Partie de plante	Parasite	IC ₅₀ (μmol/L)
1	18	<i>Abrus precatorius</i>	<i>Leguminosae</i>	plante entière	<i>T. brucei rhodesiense</i>	10
2	19	<i>Abrus precatorius</i>	<i>Leguminosae</i>	plante entière	<i>T. brucei rhodesiense</i>	20
3	20	<i>Rapanea lancifolia</i>	<i>Myrsinaceae</i>	Branches	<i>T. brucei brucei</i>	13,2

Les travaux d'A. Ibezim et *al.* ont particulièrement attirés notre attention¹⁷. Ils ont mené une étude de docking sur des produits naturels isolés de plantes africaines qui possédaient de potentielles activités anti-trypanosomales. Le docking est une technique très utilisée dans le domaine des médicaments, pour calculer les interactions entre une molécule bioactive et une cible thérapeutique. Cela permet de prédire l'activité d'un composé.

Les plantes africaines sont un formidable réservoir de molécules actives sur *Trypanosoma brucei*, puisque les auteurs ont recensé 321 produits naturels et dérivés de produits naturels isolés à partir de plantes africaines ayant des activités anti-trypanosomales.

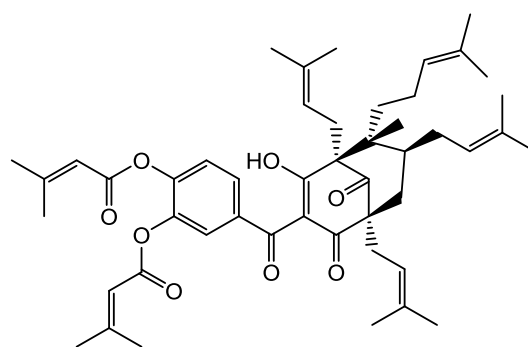
L'étude a été menée sur six cibles anti-*Trypanosoma* identifiées dans la littérature. Elles sont récapitulées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Cible thérapeutique de *Trypanosoma brucei* modélisées dans l'étude de A. Ibezim et al.

Entrée	Cible	Rôle
1	Uridylyltransférase	Régule la production d'ARN non codant
2	Farnesyl diphosphatesynthétase	Catalyse la synthèse de farnesyldiphosphate pour la biogénèse d'isoprénoides
3	Ornithine décarboxylase	Catalyse la décarboxylation de l'ornithine en putrescine pour la synthèse de polyamide
4	Adénosine kinase	Catalyse le transfert des gamma-phosphates entre l'adénosine triphosphate vers l'adénosine monophosphate
5	14a-déméthylase	Catalyse la biosynthèse des stérols
6	Triose phosphate isomérase	Catalyse la conversion entre le glyceraldéhyde 3-phosphate et la dihydroxyacétone phosphate

¹⁷ A. Ibezim et *al.*, Binding of anti-*Trypanosoma* natural products from African flora against selected drug targets : a docking study, *Med. Chem. Res.*, **2017**, 26, 562-579.

Trois méthodes différentes ont été utilisées : « affinity dG », « Alpha HB », « London dG ». Pour toutes les cibles, sauf la 14 α -déméthylase, chaque méthode donne un composé différent ayant le meilleur score d'affinité. Il y a donc trois composés avec un « top score » par cible. Pour la 14 α -déméthylase, les méthodes Alpha HB et London dG attribuent le meilleur score au même composé : le 13,14-bis-O-3,3-diméthylacryloylate-guttiférone A **21** (Figure 14). Selon la méthode « affinity dG », c'est la guttiférone A **1** qui possède le meilleur score pour interagir avec la cible stérol 14 α -déméthylase.



13,14-bis-O-3,3-diméthylacryloylate-guttiférone A **21**

Figure 14 : structure de la 13,14-bis-O-3,3-diméthylacryloylate-guttiférone A

Il n'y a donc que deux « top composés » pour cette cible, avec des structures très proches. Les auteurs se sont intéressés aux propriétés physicochimiques de ces composés, présentées dans le Tableau 4. Ces deux composés enfreignent deux des quatre règles de Lipinski (valeurs en gras dans le Tableau 4), ils sont donc administrables par voie orale selon les auteurs. Néanmoins leurs importantes aires totales de surface polaire les empêcheront probablement de franchir la barrière hémato-encéphalique, ils ne pourront donc pas être utilisés comme traitement de la phase II de la maladie. En effet, pour pouvoir traverser la barrière hémato-encéphalique, il est préférable que les composés aient une aire totale de surface polaire inférieure à 90 Å² ¹⁸.

Tableau 4 : Propriétés physicochimiques de la guttiférone A **1** et de **21**

Composé	Masse molaire (g/mol)	Nombre d'accepteurs de liaison H	Nombre de donneurs de liaison H	LogP	Aire totale de surface polaire (Å ²)
21	767	8	1	9,88	245,12
Guttiférone A 1	602	6	3	8,53	259,9

Ces résultats prometteurs ont confortés nos travaux montrant que la guttiférone A **1** et ses analogues sont particulièrement actifs sur *Trypanosoma brucei* : l'IC₅₀ du composé **3** est de 0.07 μ M avec un indice de sélectivité de 457. Ce constat nous a encouragé à synthétiser de nouveaux analogues de guttiférone A **1** et à tester leurs activités sur *Trypanosoma brucei*.

¹⁸ A Stephen *et al.*, Structure-Brain Exposure Relationships, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 7559-7583.

I.3 La leishmaniose

La leishmaniose est une maladie parasitaire due aux parasites du genre *Leishmania sp*, qui compte plus de 20 espèces. Elle est transmise par la piqûre de la femelle phlébotome. L'OMS estime entre 700 000 et 1 million le nombre de cas par an et entre 20 000 et 30 000 le nombre de décès¹⁹.

Trois formes de leishmaniose coexistent, en fonction de l'espèce du parasite²⁰ :

- La leishmaniose cutanée (LC) : c'est la forme la plus fréquente avec entre 600 000 et 1 million de nouveaux cas par an. Elle provoque des ulcères cutanés, souvent à l'endroit de la piqûre par le moustique. Ces ulcères se soignent mais laissent des traces chez les patients, allant de la cicatrice profonde et définitive au handicap sévère. Cette forme est due aux parasites *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*...
- La leishmaniose viscérale (LV) : c'est la forme la plus agressive de la maladie, elle est mortelle en l'absence de traitement. L'OMS estime entre 50 000 et 90 000 le nombre de nouveaux cas par an. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une perte de poids et un gonflement de la rate et du foie. *L. donovani* et *L. infantum* sont responsables de la LV.
- La leishmaniose cutanéomuqueuse : cette forme se caractérise par une destruction partielle ou totale des muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. L'infection par *L. panamensis* ou *L. braziliensis* provoque cette forme de la maladie.

La Figure 15 montre la répartition géographique des cas de leishmaniose. Les populations les plus touchées par cette maladie sont des populations pauvres situées dans des zones tropicales.

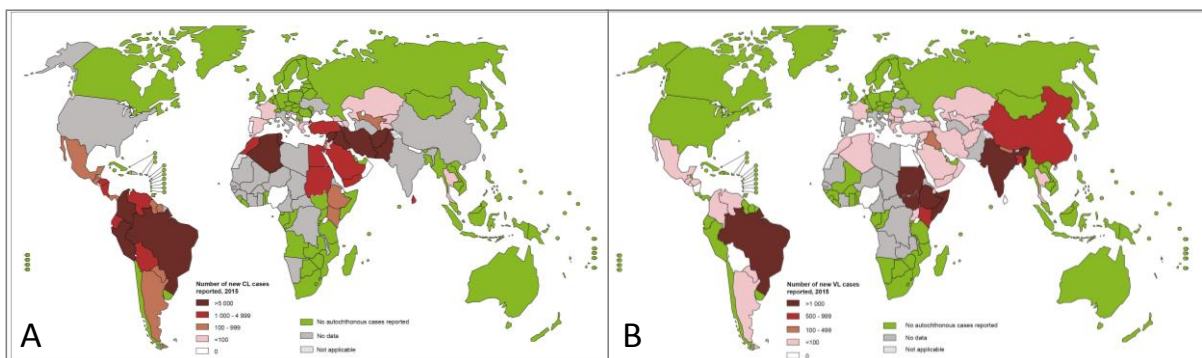


Figure 15 : Répartition des cas de leishmaniose dans le monde. A : Leishmaniose cutanée. B : Leishmaniose viscérale.²¹

Le cycle de vie des *Leishmania sp.* est représenté Figure 17. Après une piqûre par un phlébotome femelle, le parasite sous forme promastigote s'introduit dans la circulation

¹⁹ <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, consulté le 09/08/2018.

²⁰ Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010

²¹ <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>, consulté le 09/08/2018

sanguine humaine et infeste les macrophages (Figure 16)²². Il se forme alors une vacuole dans laquelle les parasites peuvent se développer en amastigotes et se multiplier jusqu'à éclatement du macrophage. Les amastigotes vont alors coloniser un autre macrophage et le cycle se poursuit ainsi. Lors d'une prochaine piqûre par un phlébotome, le parasite va être transféré à l'insecte. Il va alors se développer dans son intestin puis s'accumuler dans sa trompe, de façon à être réinjecter lors de la prochaine piqûre.

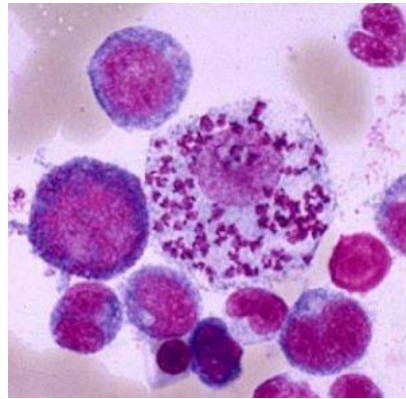


Figure 16 : Macrophage infesté par *Leishmania* sp.

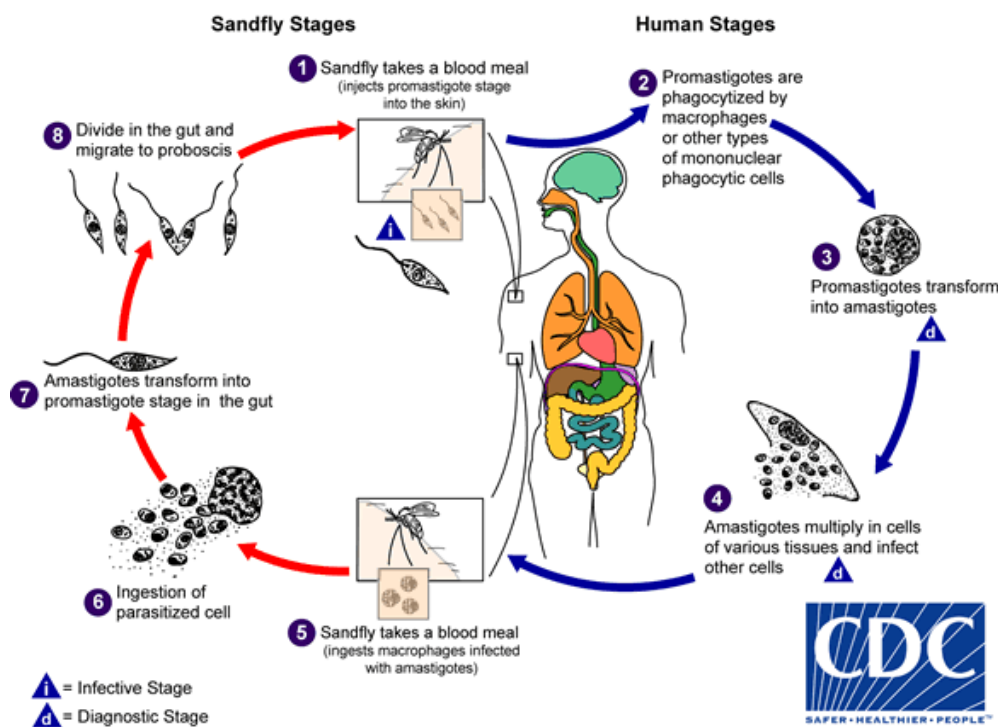


Figure 17 : Cycle de vie de *Leishmania* sp.²³

²² C. Leblanc *et al.*, Leishmaniose viscérale sans splénomégalie. A propos d'un cas chez un nourrisson, *Archive de pédiatrie*, **2016**, 23, 378-381.

²³ <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>, consulté le 22/08/2018

Les médicaments utilisés en première intention dans le traitement des leishmanioses sont le stibugluconate de sodium **22** (spécialité Pentostam®) et l'antimoniote de méglumine **23** (spécialité Glucantime®), deux organostanniques (Figure 18) qui s'administrent par voie parentérale. Ces médicaments sont toutefois loin d'être idéaux de par leur voie d'administration compliquée pour des populations pauvres d'Afrique, qui n'ont pas accès aux services médicaux. Ils sont également chers et provoquent de graves effets secondaires. La pentamidine **17** (Figure 12) et l'amphotéricine B **24** (Figure 18) peuvent également être utilisées mais présentent les mêmes désavantages²⁴.

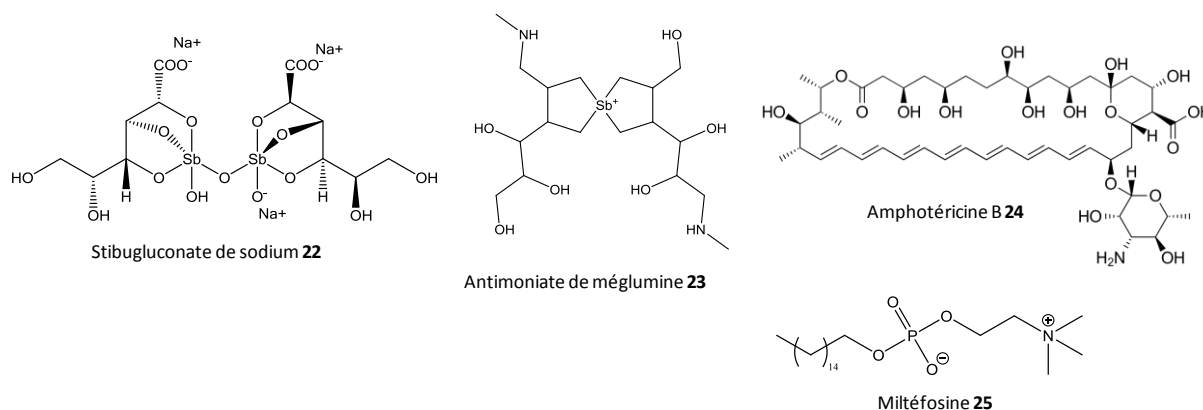


Figure 18 : Traitements commerciaux utilisés contre la leishmaniose

La miltéfossine **25** est le premier médicament anti-leishmaniose administré par voie orale. Il est très efficace pour lutter contre la LC, mais malheureusement des résistances sont en train d'émerger. Il y a donc, là encore, un réel besoin de nouveaux traitements²⁴.

I.4 Conclusion

Le développement de nouveaux traitements pour ces trois maladies est globalement négligé par l'industrie pharmaceutique pour des raisons économiques. Or ces trois maladies ont un réel besoin de médicaments innovants pour différentes raisons : l'apparition de résistances aux traitements existants, la toxicité élevée des traitements actuels, ou encore l'élargissement de l'offre thérapeutique. Nous avons vu que les produits naturels étaient une vaste réserve de molécules pour lutter contre ces trois parasites. Avec cet objectif, la guttiférone A **1** a attiré l'attention de notre équipe pour ses propriétés antiparasitaires intéressantes et notamment son fort potentiel contre *Trypanosoma brucei*, comme nous l'avons vu précédemment avec les travaux d'A. Ibezim et al.¹⁷ En effet, la guttiférone A **1** et un de ses analogues **21** semblent être parmi les « top composés » pour lutter contre ce parasite d'après une étude de docking. La guttiférone A **1** est un produit naturel que nous avons donc étudié plus en détail. Elle est isolée à partir d'un arbre tropical, le *Symphonia globulifera*.

²⁴ M. Andrade et al., Essential oils : in vitro activity against Leishmania amazonensis, cytotoxicity and chemical composition, *BMC Complement. Altern. Med.*, **2016**, 16:444.

II. A propos du *Symphonia globulifera*

II.1 Caractéristiques botaniques

Le *Symphonia globulifera* appartient à la famille des Clusiaceae (ou Guttiferae). Cette famille regroupe environ 1000 espèces, réparties en une quarantaine de genres selon Angiosperm Phylogeny Website²⁵. Le genre *Symphonia* comprend 27 espèces²⁶.

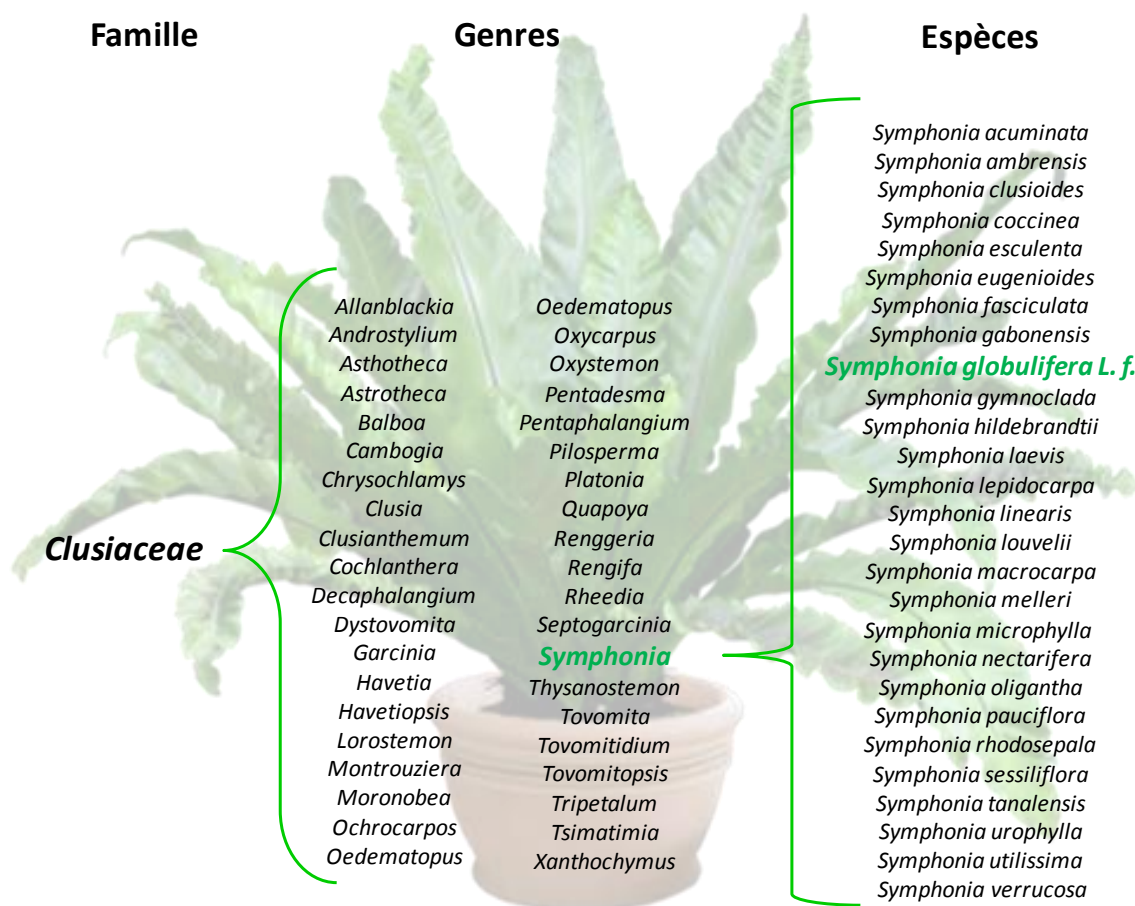


Figure 19: Détails des genres et des espèces de *Clusiaceae* et de *Symphonia*

En 2008, sur 16 espèces de *Symphonia* recensées, le *Symphonia globulifera* était le seul que l'on pouvait trouver en dehors de l'île de Madagascar²⁷, d'où le genre *Symphonia* serait endémique. Le *Symphonia globulifera* est quant à lui largement distribué dans les zones tropicales : Amérique du sud, Amérique latine et Afrique centrale (Figure 20).

²⁵ <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, consulté le 13/08/2018.

²⁶ <http://www.tropicos.org/Name/40008463>, consulté le 13/08/2018.

²⁷ C. Dick *et al.*, The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species, *Evolution*, **2008**, 62, 2760-2774.



Figure 20 : Zones dans lesquelles on trouve des *Symphonia globulifera*²⁸

Le *Symphonia globulifera* peut être reconnu par une combinaison de caractéristiques : des feuilles simples opposées (Figure 20-G), un latex jaune et brillant et de grandes racines aériennes (Figure 21 C et E). C'est un arbre de très grande taille (entre 20 et 30 m).

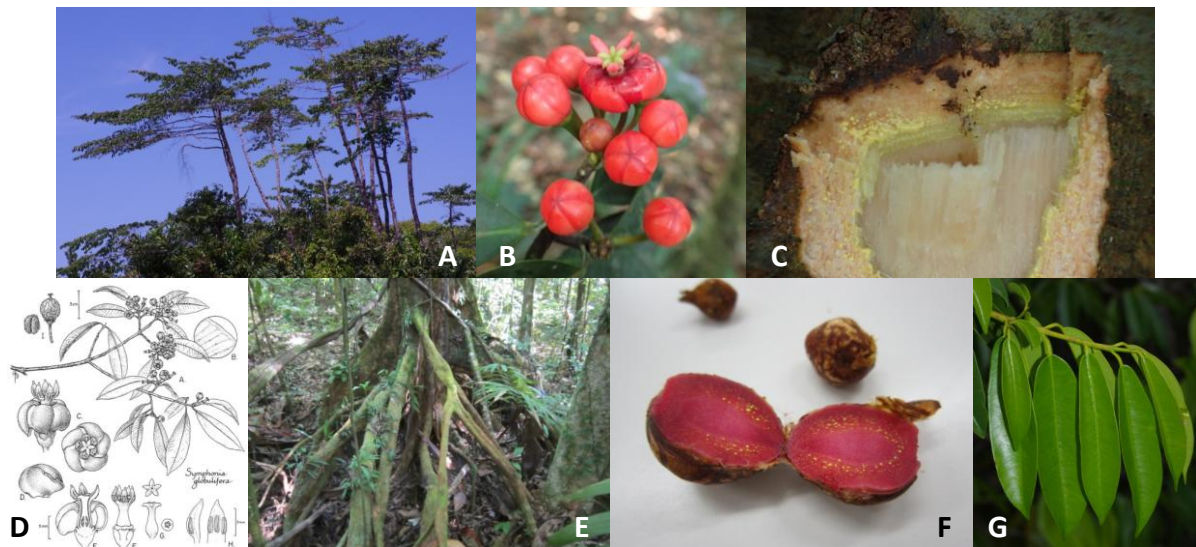


Figure 21 : Caractéristiques morphologiques du *S. globulifera*. A: Arbre entier²⁹. B: fleurs³⁰. C: Latex jaune suintant du tronc³⁰. D : Planche par Gill et al³¹. E: Racines aériennes (photo par Dr. Y. Fromentin). F: Graine (photo par Dr. Y. Fromentin). G : Feuilles²⁹

²⁸ <http://www.tropicos.org/Name/40008463?tab=maps>, consulté le 13/08/2018.

²⁹ <http://www.lachaussetterouge.fr/2017/01/symphonia-globulifera-manil-marecage.html>, consulté le 13/08/2018

³⁰ <http://www.tropicos.org/ImageSearch.aspx>, consulté le 13/08/2018

³¹ Gill et al., Pollination biology of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), in Central French Guiana, *Biotropica*, 1998, 30, 139-144.

Le *Symphonia globulifera* fleurit au cours de la saison sèche. Ses fleurs sont petites et rouges, elles possèdent des pétales charnus qui leur donnent une forme ronde, comme le montre la Figure 21-B. Ces fleurs sont polonisées par les oiseaux et notamment le colibri. Les pétales tombent ensuite pour laisser place au fruit. Ces fruits à noyaux, d'environ 4 à 5 cm, sont ingérés et disséminés par les singes et les chauves-souris²⁷.

Le *Symphonia globulifera* présente des variations morphologiques, qui semblent dépendre de son environnement. Ces changements concernent la taille des fleurs ou des feuilles par exemple²⁷. Cette espèce se divise d'ailleurs en six variétés : *Symphonia globulifera* var. *africana*, *Symphonia globulifera* var. *angustifolia*, *Symphonia globulifera* var. *gabonensis*, *Symphonia globulifera* var. *globulifera*, *Symphonia globulifera* var. *macoubea* et *Symphonia globulifera* var. *major*. Il existe également deux sous espèces : *Symphonia globulifera* subsp. *globulifera* et *Symphonia globulifera* subsp. *Guayanensis*³².

II.2 Médecine traditionnelle

Le paludisme, la THA et la leishmaniose sont des maladies très anciennes. Elles touchent le plus souvent des populations peu développées qui n'ont pas toujours accès à la médecine dite « moderne ». C'est pourquoi ces populations se sont tournées vers cette culture de médecine traditionnelle, à base de plantes notamment. Les plantes utilisées en médecine traditionnelle ont beaucoup inspirées les scientifiques dans la recherche de traitements contre les maladies parasitaires^{33,34}. En effet, ces plantes contiennent très souvent des composés avec de bonnes activités antiparasitaires. Dans une revue, D. Fabricant *et al.* recensent 122 composés, isolés de 94 espèces de plantes, dont la structure est élucidée et qui sont utilisés comme médicaments. Parmi eux, 80 % ont une indication thérapeutique identique ou très proche de l'utilisation en médecine traditionnelle³⁵.

Le *Symphonia globulifera* est largement utilisé en médecine traditionnelle sur plusieurs continents, en Afrique et en Amérique, pour différents usages. Au Cameroun notamment, les feuilles de *S. globulifera* sont utilisées en décoction contre les maladies parasitaires et en Colombie, ce sont les écorces que l'on utilise pour traiter la leishmaniose cutanée. Les autres usages concernent d'autres pathologies. Tous les usages sont regroupés dans le Tableau 5.

³² <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Symphonia+globulifera&commonname=>, consulté le 14/08/2017.

³³ M. Willcox *et al.*, Traditional herbal medicines for malaria, *Br. Med. J.*, **2004**, 329, 1156-1159

³⁴ M. Randrianarivelosia *et al.*, Plants traditionally prescribed to treat tazo (malaria) in the eastern region of Madagascar, *Malaria journal*, **2003**, 2;

³⁵ D. Fabricant *et al.*, The value of plants used in traditional medicine for drug discovery, *Environmental Health Perspectives*, **2001**, 109, 69-75.

Tableau 5 : Usage en médecine traditionnelle du *Symphonia globulifera*

Entrée	Provenance	Usage thérapeutique	Partie de plante	Méthode de préparation
AFRIQUE				
1 ³⁶	Gabon	Gale	Ecorces	Décoction
2 ³⁷	Ouganda	Toux, vers intestinaux, jaunisse pré-hépatique, fièvre	Ecorces	Décoction
3 ³⁷	Ouganda	Chasser les mauvais esprits	Branches	Brulée (comme de l'encens)
4 ³⁸	Cameroun	Antiparasitaires	Feuilles	Décoction
5 ³⁹	Nigéria	Maladie de peaux	Feuilles	Décoction
AMERIQUE DU SUD				
6 ⁴⁰	Panama	Douleurs	Feuilles	Cataplasme
7 ⁴¹	Brésil	Augmenter la fertilité des femmes, élongation musculaire, fracture	Latex	Platre
8 ⁴¹	Brésil	Infections vaginales	Ecorces	Infusion
9 ⁴²	Colombie	Leishmaniose cutanée	Ecorces	Décoction

L'utilisation massive de cette plante par plusieurs peuples disséminés dans plusieurs régions éloignées du monde a attiré l'attention des scientifiques pour mener plus de recherches. Les premiers extraits de *S. globulifera*, principalement les extraits méthanoliques, ont donc été testés en 2007 contre différents parasites, afin de savoir s'ils avaient une réelle activité. L'activité contre des cellules humaines saines a également été testée afin d'évaluer sa toxicité. Les extraits d'autres parties de la plante ont ensuite été testés contre *P. falciparum*, notamment d'écorce, qui était une autre partie de la plante très utilisées en médecine traditionnelle.

³⁶ B. Akendengué *et al.*, Medicinal plants used by the Masago people in Gabon, *J. Ethnopharmacol.*, **1994**, 41, 193-200.

³⁷ S. Segawa *et al.*, Medicinal plant diversity and uses in the Sangobay area, Southern Uganda, *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, 113, 521-540.

³⁸ B. Lenta *et al.*, Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*, *Molecules*, **2007**, 12, 1548-1557.

³⁹ K. Ajibesin *et al.*, Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria, *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 115, 387-408.

⁴⁰ M. Gupta *et al.*, Medical ethnobotany of the Teribes of Boca del Toro, Panama, *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 96, 389-401.

⁴¹ M. Coelho-Ferreira, Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Murada, Para State (Brazil), *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, 126, 159-175.

⁴² A. Lopez *et al.*, Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 77, 189-196.

Tableau 6 : Activités antiparasitaires des extraits méthanoliques de *Symphonia globulifera*

Entrée	Organe	Cible	Activité	SI
1 ⁴³	Feuilles	<i>Plasmodium falciparum</i>	IC ₅₀ = 4,1 µg/mL	12,75
2 ⁴³	Feuilles	<i>Trypanosoma cruzi</i>	IC ₅₀ > 30 µg/mL	
3 ⁴³	Feuilles	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	IC ₅₀ = 11,5 µg/mL	4,5
4 ⁴³	Feuilles	<i>Leishmania donovani</i>	IC ₅₀ = 2, µg/mL	24,9
5 ⁴³	Feuilles	Cytotoxicité cellule L6	IC ₅₀ = 52,3 µg/mL	
6 ⁴⁴	Feuilles	<i>Plasmodium falciparum</i>	30 % d'inhibition (10 mg/mL)	
7 ⁴⁴	Feuilles	<i>Plasmodium falciparum</i>	48 % d'inhibition (10 mg/mL)	
8 ⁴⁴	Ecorces	<i>Plasmodium falciparum</i>	30 % d'inhibition (10 mg/mL)	
9 ⁴⁴	Ecorces	<i>Plasmodium falciparum</i>	45 % d'inhibition (10 mg/mL)	
10 ⁴⁴	Ecorces de racines	<i>Plasmodium falciparum</i>	97% d'inhibition (10 mg/mL)	
11 ⁴⁴	Fleurs	<i>Plasmodium falciparum</i>	Non significatif	
12 ⁴⁴	Latex	<i>Plasmodium falciparum</i>	35 % d'inhibition (10 mg/mL)	

Ces résultats intéressants confirment que les extraits ont une réelle activité antiparasitaire. Plusieurs études ont donc été menées afin d'isoler les composés présents dans ces extraits pour pouvoir tester leurs activités sous forme pure. En effet, il est possible que l'activité soit due à une synergie de plusieurs composés, mais il est également très probable que les composés isolés possèdent des activités prometteuses.

II.3 Caractéristiques phytochimiques

Les activités intéressantes de cette plante ont conduit les chercheurs à étudier la phytochimie du *Symphonia globulifera*. Plusieurs équipes ont isolé et identifié ses métabolites secondaires. Une quarantaine de composés ont ainsi été identifiés à partir de cette plante, dont 33 étaient nouveaux au moment de leur découverte. Ces métabolites appartiennent à plusieurs familles chimiques : acides gras insaturés, stérols, triterpènes, bisflavonoïdes, benzophénones, xanthones et phloroglucinols acylés polycycliques polyprénylés (PPAPs).

⁴³ B. Lenta *et al.*, In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol*, **2007**, 111, 8-12.

⁴⁴ G. Marti, Etudes chimiques et biologiques de *Clusiaceae* de la forêt équatoriale guyanaise, *thèse de doctorat*, soutenu le 5 mai **2009**.

II.3.1 Le stérol

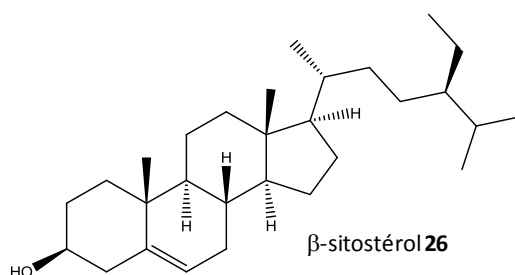


Figure 22 : Stérol isolé du *S. globulifera*

Un seul stérol a été isolé du *Symphonia globulifera* à ce jour : le β-sitostérol **26** (Figure 22). Il a été isolé à partir des graines de plantes originaires du Cameroun⁴⁵. Ce stérol est un produit naturel bien connu et identifié dans de nombreuses plantes de différentes familles^{46,47,48}.

II.3.2 Le triterpène

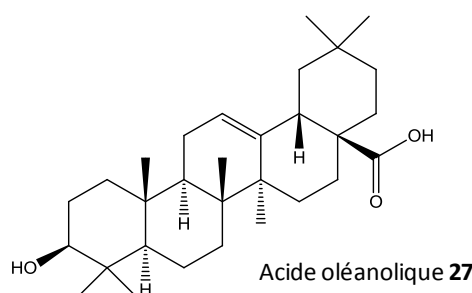


Figure 23 : Triterpène isolé du *S. globulifera*

À notre connaissance, un seul triterpène a été isolé du *Symphonia globulifera* : l'acide oléanolique **27** (Figure 23). Il a été isolé à partir des graines de plantes originaires du Cameroun⁴⁵. C'est aussi un produit naturel largement décrit dans la littérature et isolé à partir de nombreuses plantes de familles variées⁴⁹.

⁴⁵ B. Lenta *et al.*, Symphonin: a new prenylated pyranoxanthone with antimicrobial activity from the seeds of *Symphonia globulifera* (Guttiferae), *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, **2004**, 18, 175-180.

⁴⁶ J. Kulip *et al.*, Aromatic and steroid compounds from *Smilax braceata* C. Presl. (Smilacaceae), a bornean medicinal herb, *Nat. Prod. Chem. Res.*, **2015**, 3, 184-185.

⁴⁷ R. Nathawat *et al.*, Identification and qualitative analysis of β-sitosterol and some phytoestrogens in in vivo and in-vitro samples of *Lepidium sativum*: asemi-arid bone healing plant, *Biochemistry and Pharmacology*, **2015**, 4.

⁴⁸ U. Pimentel da Silva *et al.*, Allelopathic activity and chemical constituents of extracts from roots of *Euphorbia heterophylla* L, *Nat. Prod. Res.*, **2018**, ahead of print.

⁴⁹ T. Ayeleso *et al.*, Oleanolic acid and its derivatives: biological activities and therapeutic potential in chronic diseases, *Molecules*, **2017**, 22, 1915/1-1915/16.

II.3.3 L'acide gras

Un seul acide gras a été isolé à partir du *Symphonia globulifera* : le méthyl-nervonate **28**. Il a été isolé à partir des fleurs de plantes originaires du Brésil⁵⁰. Sa structure est présentée Figure 24.

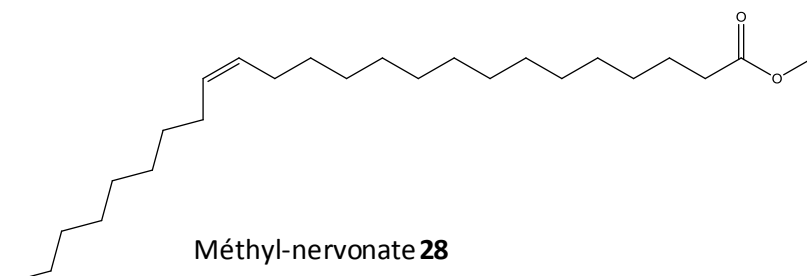


Figure 24 : Méthyl-nervonate, isolé à partir du *S. globulifera*

Ce composé est le principal constituant de l'huile d'anthere. Cette huile est souvent destinée à attirer les oiseaux ou les insectes pollinisateurs. Dans le cas du *Symphonia globulifera*, son rôle n'est pas encore très clair.

Ce composé est un acide gras naturel déjà connu mais rare au moment de sa découverte puisqu'il n'avait été identifié que dans trois autres plantes : *Echinacea angustifolia*⁵¹, *Senecio stebianus*⁵² et *Durio zibethinus*⁵³. Il a depuis été identifié dans quatre espèces de *Camelina* : *C. sativa*, *C. rumelica*, *C. microcarpa*, *C. hispida*⁵⁴.

II.3.4 Les bisflavonoïdes

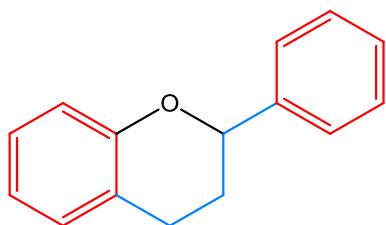


Figure 25 : Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une famille de produits naturels partageant un squelette commun : deux unités benzènes reliées par une chaîne à trois carbones (Figure 25). Cette chaîne est souvent fermée en hétérocycle. Les bisflavonoïdes sont des dimères de flavonoïdes.

Trois bisflavonoïdes ont été isolés à partir du *Symphonia globulifera*. Ils sont listés dans le Tableau 7 et leurs structures sont représentées Figure 26.

⁵⁰ V. Bittrich *et al.*, The Anther oil of *Symphonia globulifera* L.f. (Clusiaceae), *Biochem. Sys. Ecol.*, **2013**, 49, 131-134.

⁵¹ L. Dahui *et al.*, Antifungal activity of extracts by supercritical carbon dioxide extraction from roots of *Echinacea angustifolia* and analysis of their constituents using a gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS), *J. Med. Plants Res.*, **2011**, 5, 5605-5610.

⁵² R. Tundis *et al.*, Studies on the potential antioxidant properties of *Senecio stebianus* Lacaita (Asteraceae) and its inhibitory activity against carbohydrate-hydrolysing enzymes, *Nat. Prod. Res.*, **2012**, 26, 393-404.

⁵³ I. Jaswir *et al.*, Retention of volatile components of durian fruit leather during processing and storage, *J. Food Process. Preserv.*, **2008**, 32, 740-750.

⁵⁴ P. Tomasi *et al.*, Characterization of leaf cuticular waxes and cutin monomers of *Camelina sativa* and closely-related *Camelina* species, *Ind. Crops Prod.*, **2017**, 98, 130-138.

Tableau 7 : Bisflavonoïdes présents dans le *Symphonia globulifera*

Entrée	Composé	Partie de plante	Pays d'origine	Activité
1 ⁵⁵	Morelloflavone 29	Feuilles	Pérou	FAS inhibiteur (IC ₅₀ = 30 µg/mL)
2 ⁵⁵	GB-3 31	Feuilles	Pérou	FAS inhibiteur (IC ₅₀ = 23 µg/mL)
3 ⁵⁶	GB-2 30	Tiges	Cameroun	Antimicrobienne
4 ⁵⁶	GB-3 31	Tiges	Cameroun	Antimicrobienne

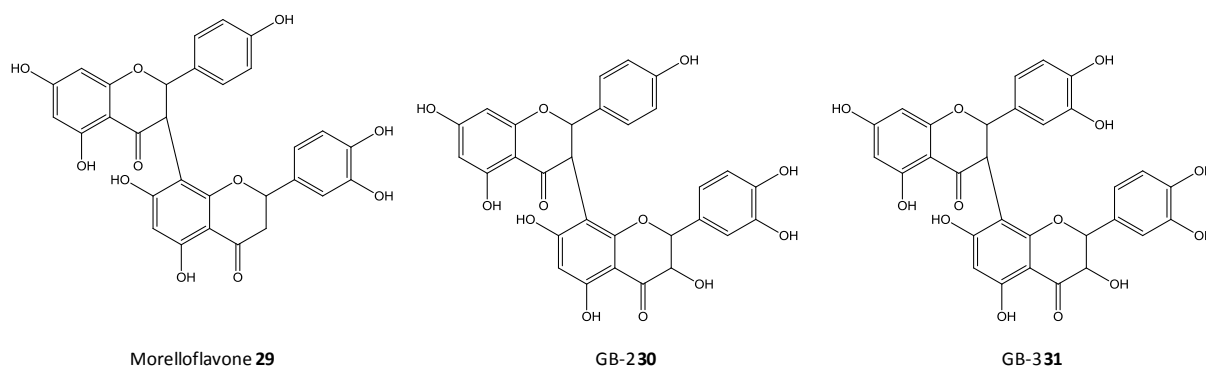


Figure 26 : Bisflavonoïdes isolés du *S. globulifera*

Ces composés, ainsi que de nombreux autres bisflavonoïdes, ont été fréquemment isolés à partir d'espèces de *Garcinia*, un genre proche du *Symphonia*^{57,58}.

II.3.5 Les benzophénones et les xanthones

Les structures générales des xanthones et des benzophénones sont rappelées Figure 27.

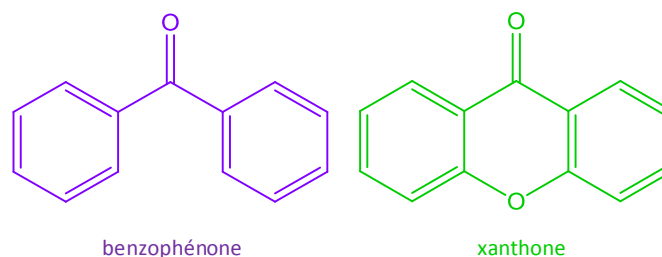


Figure 27 : Structures générales des benzophénones et des xanthones

⁵⁵ X.-C. Li *et al*, Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation, and SAR studies, *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1909-1914.

⁵⁶ P. Mkounga *et al.*, Globulixanthone F, a new polyoxygenated xanthone with an isoprenoid group and two biflavonoids from the stem bark of *Symphonia globulifera*, *Nat. Prod. Comm.*, **2009**, 4, 803-808.

⁵⁷ W. Bandaranayake *et al.*, Biflavonoids and xanthenes of *Garcinia terpenophylla* and *G. echinocarpa*, *Phytochemistry*, **1975**, 14, 1878-1880.

⁵⁸ Z. Mbwambo *et al.*, Antiparasitic activity of some xanthenes and biflavonoids from the root bark of *Garcinia Livingstonei*, *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 369-372.

Tableau 8 : Benzophénones et xanthones isolés du *S. globulifera*

Entrée	Composé	Partie de plante	Pays d'origine	Activité
1 ⁵⁹	Ugaxanthone 32	Bois	Ouganda	
2 ⁵⁹	Mbarraxanthone 33	Bois	Ouganda	
3 ⁶⁰	Euxanthone 34	Bois	Ouganda	
4 ⁶⁰	1,5,6-trihydroxyxanthone 38	Bois	Ouganda	
5 ⁶⁰	1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone 37	Bois	Ouganda	
6 ⁶⁰	1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone 35	Bois	Ouganda	
7 ⁶¹	Symphoxanthone 39	Bois	Ouganda	
8 ⁶¹	Globuxanthone 36	Bois	Ouganda	
9 ⁶²	Maclurine 42	Bois	Ouganda	
10 ⁶³	Ananixanthone 40	Ecorces	Brésil	
11 ⁶⁴	Globulixanthone A 41	Ecorce de racines	Cameroun	Antitumorale
12 ⁶⁴	Globulixanthone B 46	Ecorce de racines	Cameroun	Antitumorale
13 ⁶⁵	Globulixanthone C 47	Ecorce de racines	Cameroun	Antimicrobienne
14 ⁶⁵	Globulixanthone D 44	Ecorce de racines	Cameroun	Antimicrobienne
15 ⁶⁵	Globulixanthone E 43	Ecorce de racines	Cameroun	Antimicrobienne
16 ⁴⁵	Symphonine 45	Graines	Cameroun	Antimicrobienne
17 ⁶⁶	Globuliférine 50	Graines	Cameroun	Antimicrobienne
18 ⁶⁷	Gaboxanthone 48	Graines	Cameroun	Antiplasmodiale
19 ⁶⁸	Xanthone V1 49	Feuilles	Cameroun	Antileishmaniale

⁵⁹ H. Locksley *et al.*, Extractives from Guttiferae. Part IV. Isolation and structure of ugaxanthone and mbarraxanthone from *Symphonia globulifera* L., *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 2265-2269.

⁶⁰ H. Locksley *et al.*, Extractives from Guttiferae. Part II. The isolation and structure of four polyhydroxyxanthenes in *Symphonia globulifera*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 430-432.

⁶¹ H. Locksley *et al.*, Extractives from Guttiferae. Part III. The isolation and structure of Symphoxanthone and Globuxanthone from *Symphonia globulifera*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 2186-2190.

⁶² H. Locksley *et al.*, Extractives from Guttiferae. Part VI. The significance of maclurin in xanthenes biosynthesis, *Tetrahedron*, **1967**, 23, 2229-2234.

⁶³ J. Bayma *et al.*, A prenylated xanthone from the bark of *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry*, **1998**, 49, 1159-1160.

⁶⁴ A. Nkengfack *et al.*, Globulixanthone A and B, two new cytotoxic xanthenes with isoprenoid groups from the root bark of *Symphonia globulifera*, *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 734-736.

⁶⁵ A. Nkengfack *et al.*, Globulixanthone C, D and E: three prenylated xanthenes with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry*, **2002**, 61, 181-187.

⁶⁶ S. Ngouela *et al.*, A prenylated xanthone with antimicrobial activity from the seeds of *Symphonia globulifera*, *Nat. Prod. Res.*, **2005**, 19, 23-27.

⁶⁷ S. Ngouela *et al.* Anti-plasmodial and antioxidant activities of the constituents of the seeds shells of *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry*, **2006**, 67, 302-306.

⁶⁸ B. Lenta *et al.*, Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*, *Molecules*, **2007**, 12, 1548-1557.

Les benzophénones et les xanthones sont les métabolites secondaires les plus représentés dans le *Symphonia globulifera*, avec 19 composés isolés à ce jour. Ils sont récapitulés Tableau 8 et leurs structures sont représentées Figure 28.

Les *Clusiaceae* sont une famille très riche en métabolites secondaires de type benzophénone et xanthone. La littérature scientifique regorge d'exemples, anciens comme récents, de benzophénones et de xanthones isolés à partir de *Clusiaceae*^{69,70,71}.

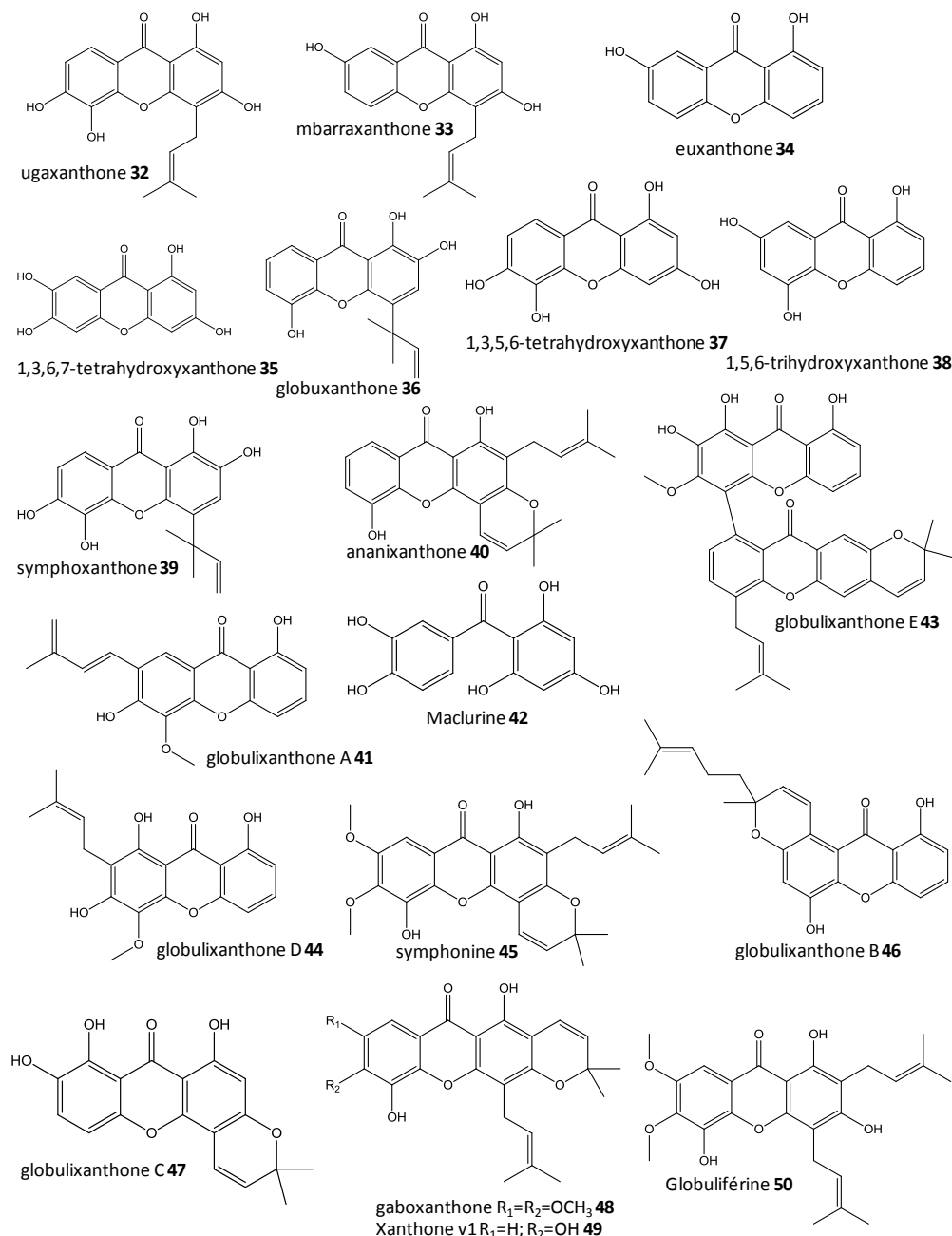


Figure 28 : Structures des benzophénones et des xanthones isolées du *S. globulifera*

⁶⁹ A. Rama Rao *et al.*, Camboginol and Cambogin, *Tett. Lett.*, **1980**, 21, 1975-1978.

⁷⁰ R. Fuller *et al.*, Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*, *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 130-132.

⁷¹ J.-P. Dzoyem *et al.*, Anti-inflammatory activity of benzophenone and xanthone derivatives isolated from *Garcinia* species, *Phytochem. Lett.*, **2015**, 14, 153-158.

II.3.6 Les PPAPs

Les phloroglucinols acylés polycycliques polyprénylés (PPAPs) sont une sous famille de benzophénones. 17 PPAPs ont été isolés à partir du *Symphonia globulifera*. Ils sont recensés Tableau 9 et leurs structures sont représentées Figure 29.

Tableau 9 : Récapitulatif des PPAPs isolés à partir de *S. globulifera*

Entrée	Composé	Partie de plante	Pays d'origine	Activité
1	guttiférone A 1	Feuilles	Cameroun	IC ₅₀ =0,16 µM contre <i>L. donovani</i> ⁷²
				IC ₅₀ =7,3 µM contre cellules saines L6 ³⁸
		Racine	Centrafrique	Anti-VIH (EC ₅₀ =1-10 µg/mL) ⁷²
		Graines	Cameroun	IC ₅₀ =3,17 µM contre <i>P. falciparum</i> ⁶⁷
2 ⁷²	guttiférone B 53	Racines	Centrafrique	Anti-VIH (EC ₅₀ =1-10 µg/mL)
3 ⁷²	guttiférone C 51	Racines	Centrafrique	Anti-VIH (EC ₅₀ =1-10 µg/mL)
4 ⁷²	guttiférone D 52	Racines	Centrafrique	Anti-VIH (EC ₅₀ =1-10 µg/mL)
5 ⁷³	7-epi-isogarcinol 54	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =3,2 µM contre <i>P. falciparum</i>
6 ⁷³	14-deoxy-7-epi-garcinol 55	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =2,5 µM contre <i>P. falciparum</i>
7 ⁷³	Symphonone A 56	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =2,8 µM contre <i>P. falciparum</i>
8 ⁷³	Symphonone B 57	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =3,3 µM contre <i>P. falciparum</i>
9 ⁷³	Symphonone C 58	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =2,6 µM contre <i>P. falciparum</i>
10 ⁷³	7-epi-coccinone B 59	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =3,3 µM contre <i>P. falciparum</i>
11 ⁷³	Symphonone D 60	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =2,1 µM contre <i>P. falciparum</i>
12 ⁷³	Symphonone E 61	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =2,7 µM contre <i>P. falciparum</i>
13 ⁷³	7-epi-garcinol 62	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =10,1 µM contre <i>P. falciparum</i>
14 ⁷³	Symphonone F 63	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =3,2 µM contre <i>P. falciparum</i>
15 ⁷³	Symphonone G 64	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =2,1 µM contre <i>P. falciparum</i>
16 ⁷³	Symphonone H 65	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =3 µM contre <i>P. falciparum</i>
17 ⁷³	Symphonone I 66	Ecorces de racines	Guyane Française	IC ₅₀ =6,7 µM contre <i>P. falciparum</i>

⁷² K. Gustafson et al., The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia*, *Clusia rosea*, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 10093-10102

⁷³ G. Marti et al., Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (*Clusiaceae*), *Phytochemistry*, **2010**, 71, 964-974.

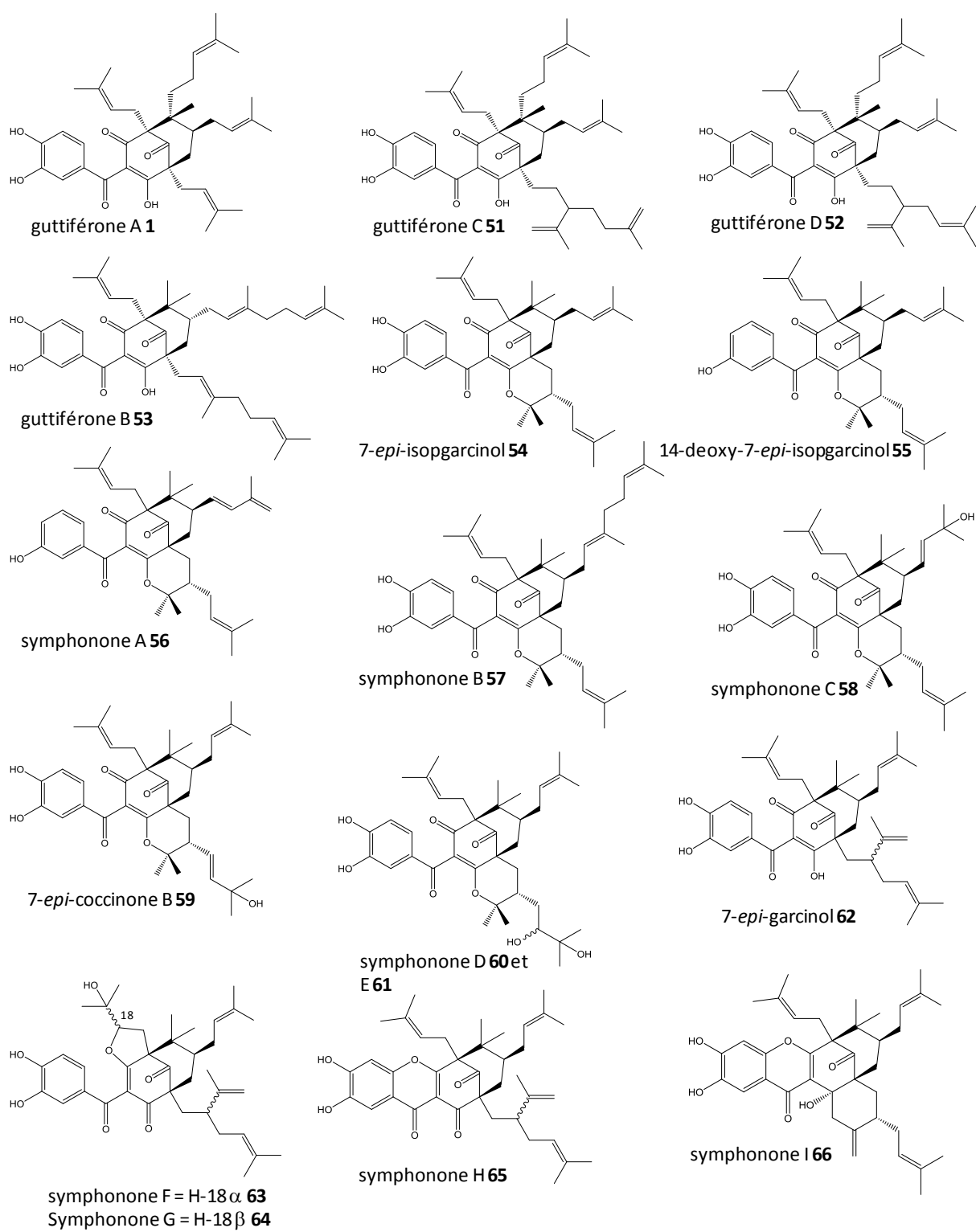


Figure 29 : Structures des PPAPs isolés du *S. globulifera*

Parmi ces 17 composés, 15 étaient nouveaux au moment de leur isolement à partir du *Symphonia globulifera*. Seuls le 7-épi-isogarcinol et le 7-épi-garcinol avaient déjà été caractérisés dans le *Moronobea coccinea*, qui appartient aussi à la famille des *Clusiaceae*⁷⁴.

Ces PPAPs ont été isolés par deux équipes, celle de G. Marti travaillant sur des plants de *S. globulifera* de Guyane Française⁷³ et celle de K. Gustafson sur des plants de Centrafrique⁷². On remarque qu'aucun composé n'est commun aux deux équipes. La phytochimie du *S. globulifera* dépendrait donc de son environnement, ce qui a été confirmé par une étude menée lors d'une thèse précédente dans notre laboratoire^{75,76}.

La majorité des PPAPs présentés ci-dessus ont une activité anti-parasitaire intéressante. Il est possible que l'activité antiparasitaire des extraits de *Symphonia globulifera* soit due aux PPAPs. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à cette famille de molécules.

III. Autour des PPAPs

Les PPAPs sont une famille de produits naturels possédant un cœur phloroglucinol plus ou moins complexe, substitué par des chaînes latérales isoprényles ou géranyles. L'hyperforine **87** a été le premier PPAP isolé d'*Hypericum perforatum*, ou millepertuis, en 1971 par A. Gurevich *et al*⁷⁷.

Depuis, de nombreux PPAPs ont été identifiés dans plusieurs plantes, mais les déterminations structurales n'étaient pas aisées du fait des moyens disponibles et de la proximité des propriétés physico-chimiques des différents PPAPs. Jusqu'en 2005, seuls 119 PPAPs ont pu être décrits dans la littérature. Avec les nouvelles techniques de séparation et d'analyse, c'est 421 nouveaux PPAPs qui ont été isolés et décrits entre 2005 et aujourd'hui. Tous ces PPAPs ont été isolés de plantes appartenant à la famille des *Clusiaceae* dont une large majorité appartenant aux genres *Hypericum* ou *Garcinia*⁷⁸. Les PPAPs sont donc une famille en plein essor, et de nouveaux composés sont encore à découvrir, ce qui permettra d'enrichir la chimiothèque des PPAPs déjà large et diversifiée^{79, 80}.

⁷⁴ G. Marti *et al.*, Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae), *Phytochemistry*, **2009**, 70, 75-85.

⁷⁵ K. Cottet *et al.*, Comparative metabolomic study between African and Amazonian *Symphonia globulifera* by tandem LC-HRMS, *Phytochem. Lett.*, **2017**, 20, 309-315.

⁷⁶ K. Cottet *et al.*, Comparative LC-MS-based metabolite profiling of the ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera*, *Phytochemistry*, **2014**, 108, 102-108.

⁷⁷ A. Gurevich *et al.*, Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum*, *Antibiotiki*, **1971**, 16, 510-513.

⁷⁸ X.-W. Yang *et al.*, Research progress of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols, *Chem. Rev.*, **2018**, 118, 3508-3558.

⁷⁹ Y.-R. Zeng *et al.*, Hypermonins A and B, two 6-norpolyprenylated acylphloroglucinol with unprecedented skeletons from *Hypericum monogynum*, *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, 16, 4195-4198.

⁸⁰ L.-M. Kong *et al.*, seco-polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols with unusual carbon skeletons from *Hypericum ascyron*, *Tett. Lett.*, **2017**, 58, 2113-2117.

III.1 Classification

Jusqu'à récemment, la classification utilisée pour caractériser les PPAPs était celle proposée par R. Ciochina and R. Grossman en 2006⁸¹. Celle-ci était basée sur la position du groupement acyle sur le cœur phloroglucinol et distinguait ainsi trois catégories : type A, type B et type C (Figure 30).

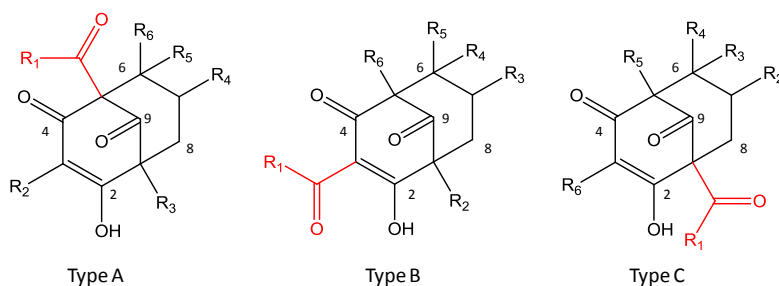


Figure 30 : Structures des trois types de PPAPs

Les PPAPs offrent une grande diversité structurale au regard du nombre de molécules que contient cette famille. Cependant les substituants R_1 à R_6 sont souvent les mêmes. Les groupements acyles (R_1) sont pour la majorité des catéchols, des phénols ou des phényles et plus rarement des motifs aliphatiques. Les chaînes latérales R_2 à R_6 sont des chaînes aliphatiques type prényle, géranyle ou lavandulyle (Figure 31). Ces chaînes peuvent éventuellement être hydroxylées.

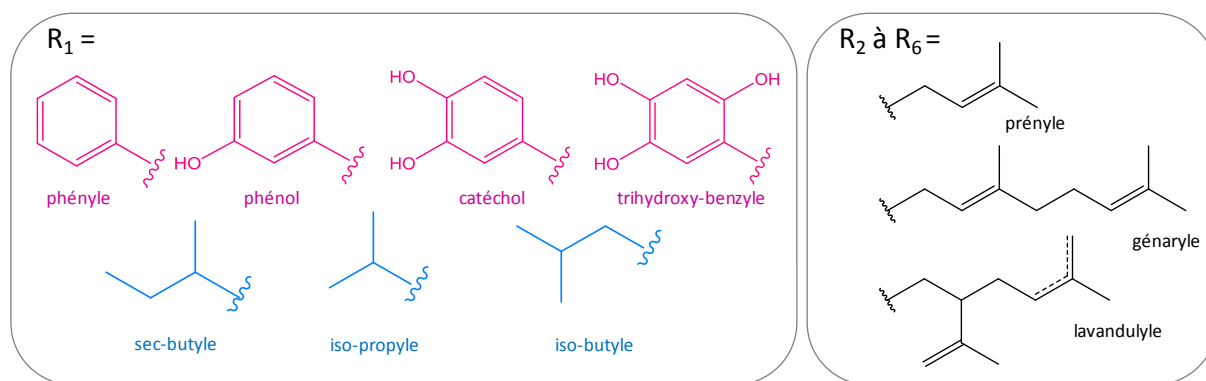


Figure 31 : Groupements principaux pour le groupement acyle R_1 et pour les chaînes latérales R_2 à R_6

La némososone, isolée en 1996 par C. de Oliveira *et al.*⁸², est d'abord classée dans les PPAPs de type C avec le groupement acyle en position 1. Sa structure sera révisée en 2001 par O. Cuesta-Rubio *et al.*⁸³ : le groupement acyle est finalement en position 5, ce qui fait de la némososone un PPAPs de type A (Schéma 2). Ses dérivés hydroxy-némososone et 7-épi-

⁸¹ R. Ciochina *et al.*, Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3963-3986.

⁸² C. de Oliveira *et al.*, Floral resins of *clusia* spp.: Chemical composition and biological function, *Tet. Lett.*, **1996**, 37, 6427-6430.

⁸³ O. Cuesta-Rubio *et al.*, Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 279-283.

némorosone seront également révisés et deviendront des PPAPs de type A⁸⁴. Les PPAPs de type C étaient peu nombreux et toutes leurs structures ont été finalement révisées pour le type A correspondant. Le type C n'existe plus⁷⁸.

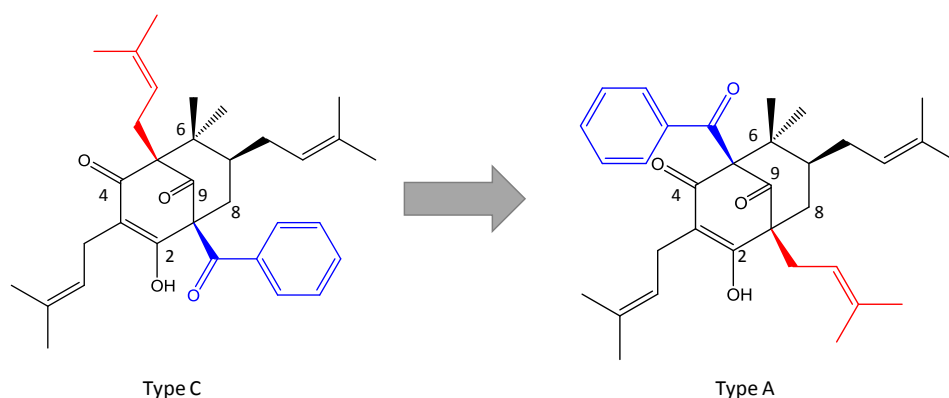


Schéma 2 : Révision de structure de la némorosone 67 d'un type C à un type A⁸³

X.-W. Yang et al.⁷⁸ propose une autre classification dans leur revue en 2018 en trois catégories : les phloroglucinols acylés polyprénylés bicycliques (BPAPs), les « caged-PPAPs » avec un squelette adamantane ou homo-adamantane et les autres PPAPs. Les types A et B restent utilisés comme sous-groupes des BPAPs.

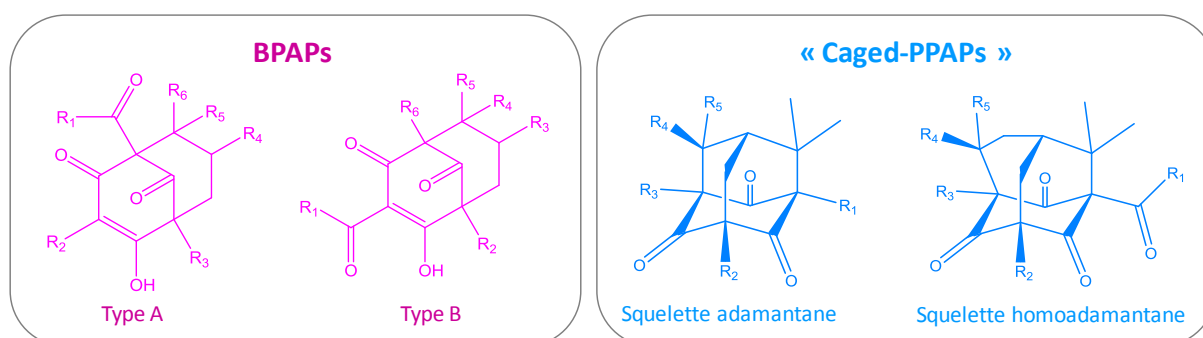


Figure 32 : Nouvelle classification des PPAPs, proposée par X.-W. Yang et al.⁷⁸

Cette classification est illustrée Figure 32. Dans le groupe des « caged-PPAPs », l'acyle peut se positionner en R₁ soit en R₃ sur le squelette adamantane. Sur le squelette homoadamantane, il est en position R₁ dans tous les composés identifiés jusqu'à maintenant. Le groupe des autres PPAPs possède des squelettes variés et n'est donc pas représenté Figure 32. On en trouve cependant de deux types différents : les PPAPs spirocycliques avec un cœur octahydrospiro-[cyclohexan-1,5'-indene] et les PPAPs dits « compliqués » obtenus par cycloadditions [4+2] à partir de phloroglucinol acylés polyprénylés monocycliques (MPAPs).

La répartition des PPAPs dans les différents groupes est illustrée à la Figure 33.

⁸⁴ V. Bittrich et al., Floral resin of *Tovomitopsis saldanhae* (Guttiferae) and 7-epi-némorosone : Structural revision, *J. Biosci.*, **2003**, 58, 643-648.

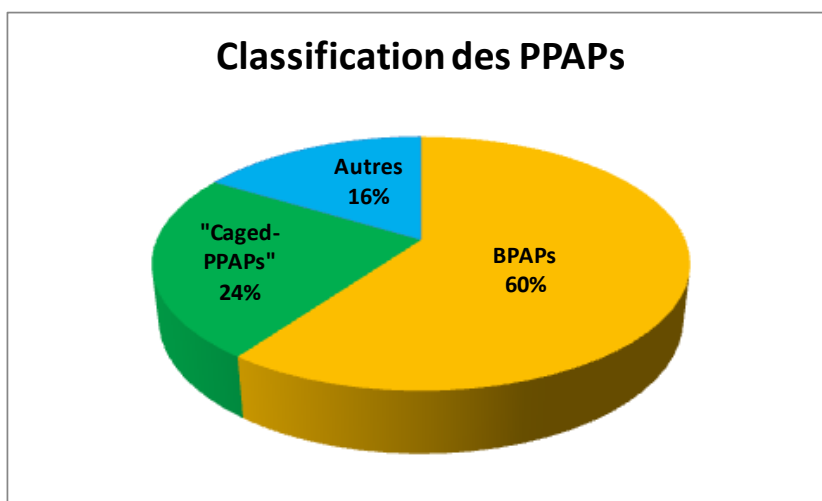


Figure 33 : Répartition des PPAPs dans les différentes catégories

III.2 Biogénèse

La biogénèse des PPAPs est un processus complexe comprenant beaucoup d'étapes. Une première partie de biosynthèse est commune à tous les PPAPs. Le cœur de la structure est obtenu par la condensation d'un acyl-CoA et de trois malonyl-CoA. Le composé intermédiaire **68** subit ensuite une cyclisation intramoléculaire de type Claisen. Ces deux étapes sont assurées par des enzymes « Polyketide synthetase » de type III, telles que la benzophénone synthétase ou la isobutyrophénone synthétase en fonction de la nature du groupement R_1 ⁸⁵. La prénylation du phloroglucinol acylé donne naissance à un phloroglucinol acylé prénylé monocyclique (MPAPs).

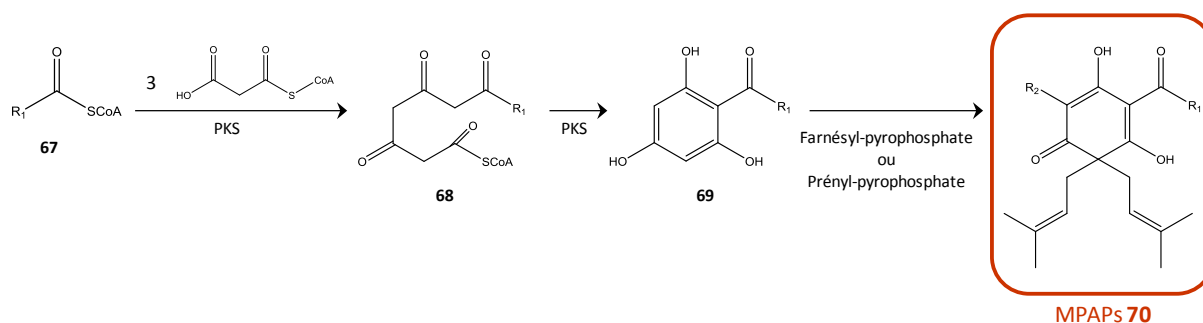


Schéma 3 : Biosynthèse des MPAPs⁷⁸

La synthèse de l'acyl-CoA **67** dépend de la nature de R_1 . Dans le cas de R_1 aliphatiques, l'acyl-CoA est synthétisé à partir d'acides aminés type valine ou isoleucine. L'implication de ces acides aminés dans la voie de biosynthèse a été démontrée par des expériences de radiomarquage sur la biosynthèse de l'hyperforine⁸⁶.

⁸⁵ P. Klingauf *et al.*, Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 139-145.

⁸⁶ K. Karppinen *et al.*, Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*, *Phytochemistry*, **2007**, 68, 1038-1045.

Dans le cas de R_1 aromatiques, la biogénèse débute avec les acides aminés phénylalanine **71** et tyrosine **75** comme substrat. Ils sont ensuite transformés en acide correspondant, puis en acyl-CoA pour donner une phlorobenzophénone *via* le mécanisme que nous avons vu précédemment (Schéma 4). La biosynthèse de la phlorobenzophénone **74** à partir de phénylalanine **71** a été étudiée sur *Hypericum androsaemum*⁸⁷. Les biosynthèses de l'iriflophénone **78** et de la maclurine **42** ont quant à elles été étudiées chez *Anemarrhena asphodeloides*. La biosynthèse de la maclurine a été testée à partir de l'acide caféique, mais sans succès. La maclurine est donc obtenue à partir de l'iriflophénone **78** hydroxylée en position 3⁸⁸ par un cytochrome P450 monooxygénase⁸⁷.

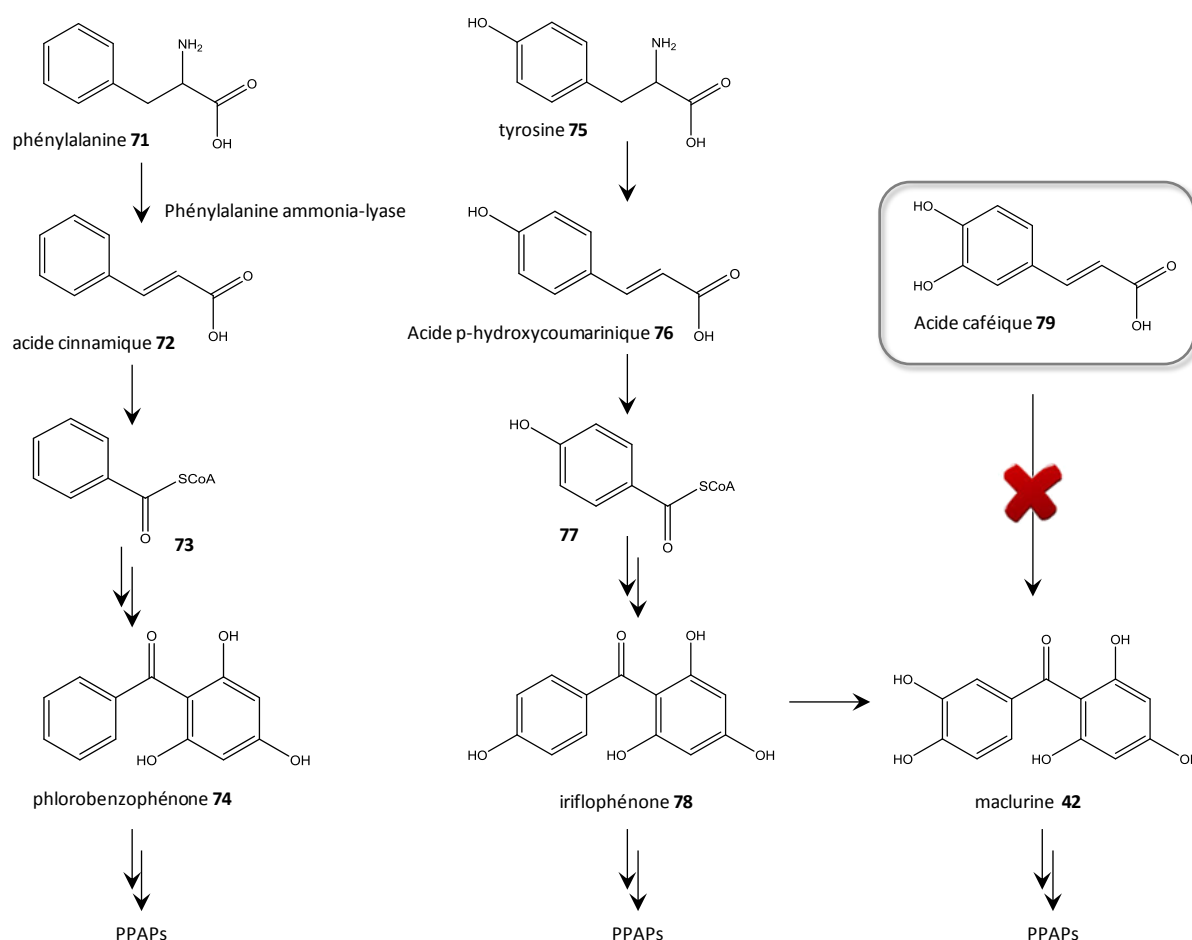


Schéma 4 : Biosynthèse de l'acyl-CoA aromatique

La fin de la biosynthèse est représentée Schéma 5. Les unités types géranyl-pyrophosphate ou farnésyl-pyrophosphate sont introduites sur le cycle *via* des prényl-transférases⁸⁹.

⁸⁷ B. Liu *et al.*, Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures : cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases, *The Plant Journal*, **2003**, 34, 847-855.

⁸⁸ M. Fujita *et al.*, Further studies on the biosynthesis of the mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*: hydroxylation of the shikilate-derived ring, *Phytochemistry*, **1981**, 20, 2183-2185.

⁸⁹ X.-W. Yang *et al.*, Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol congeners possessing diverse structures from *H. perforatum*, *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 885-895.

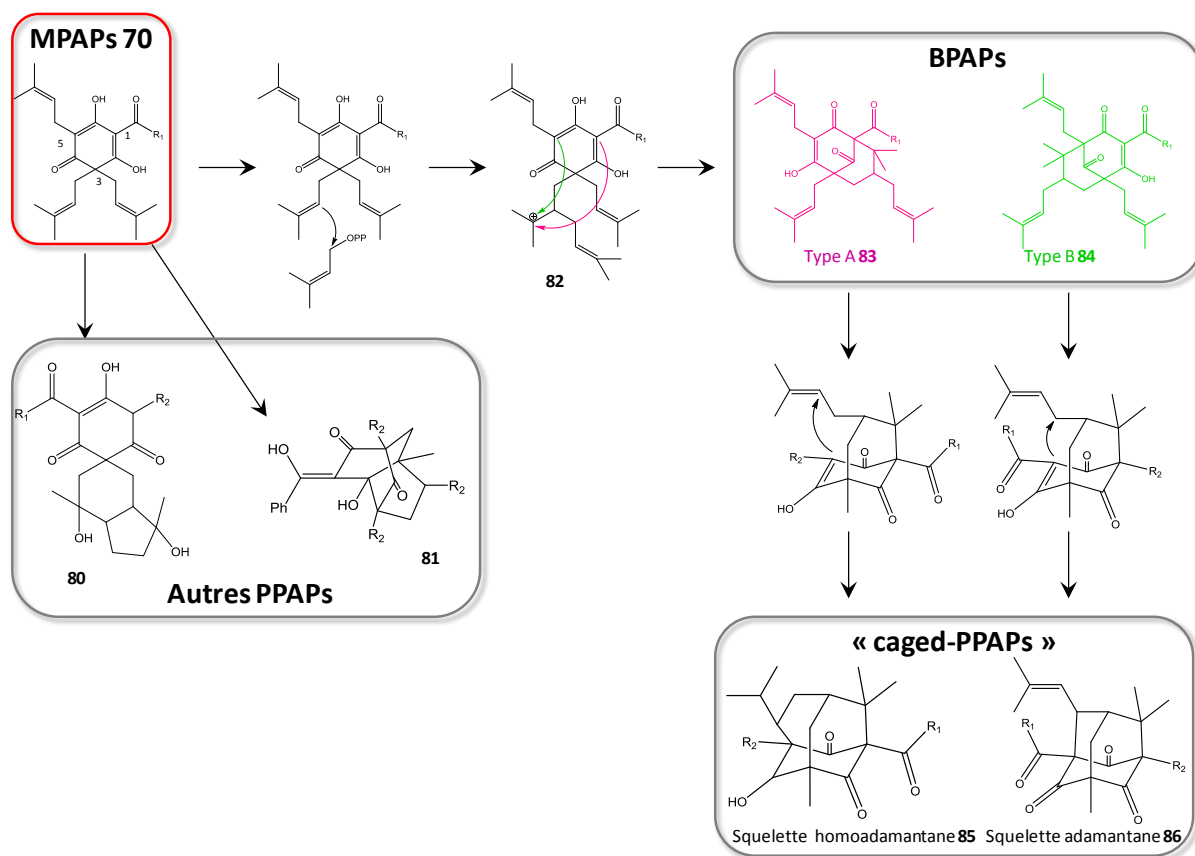


Schéma 5 : Prénylation de cyclisation dans la synthèse des PPAPs

Dans le *Symphonia globulifera*, de nombreux métabolites secondaires possèdent une origine commune et pas seulement les PPAPs, mais également les bisflavonoïdes et les xanthones. Le Dr Yann Fromentin a proposé un schéma représentant cette convergence (Figure 34)⁹⁰.

⁹⁰ Y. Fromentin *et al.*, *Symphonia globulifera*, a widespread source of complex metabolites with potent biological activities, *Planta. Med.*, **2015**, 81, 95-107.

Parmi tous les PPAPs connus à ce jour, on trouve bien d'autres activités comme des antioxydants (garcinielliptone FC)⁹⁴, des antimicrobiens (7-epi-clusianone)⁹⁵, des neuroprotecteurs⁹⁶.

Le laboratoire de Pharmacognosie s'est donc intéressé plus en détail à cette famille de molécules. Il recherchait une molécule avec de bonnes activités antiparasitaires et qui devra être facilement accessible afin de synthétiser des dérivés. La guttiférone A **1** possède des activités antiparasitaires de l'ordre du micromolaire et son rendement d'extraction du latex de *S. globulifera* est de 12 %, grâce à un procédé mis au point dans notre laboratoire⁹⁷. Il m'a donc été proposé de continuer cette étude portant sur la guttiférone A **1**.

IV. La guttiférone A 1

La guttiférone A **1** est un BPAPs naturel de type B. Elle a été isolée pour la première fois en 1992 à partir du *Symphonia globulifera* par Gustafson *et al*⁷². Ses propriétés anti-VIH initialement découvertes et son squelette original ont attiré l'attention des chercheurs. La guttiférone A a fait l'objet de nombreuses études : sa structure, sa synthèse totale, d'autres activités seront développées dans cette partie.

IV.1 Origines

La guttiférone A **1** a été isolée initialement à partir des racines de *Symphonia globulifera* en 1992, mais a été retrouvée dans d'autres espèces de plantes. Toutes ces plantes appartiennent à la famille des *Clusiaceae* et plus précisément au genre *Garcinia* (Tableau 10).

⁹² S. Sosa *et al.*, Tropical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *H. perforatum*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2007**, 59, 703-709.

⁹³ B. Schiavone *et al.*, Anticancer and antibacterial activity of hyperforin and its derivatives, *Anti-cancer Agents Med. Chem.*, **2014**, 14, 1397-1401.

⁹⁴ J. Costa *et al.*, Evaluation of antioxidant effects *in vitro* of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart., *J. Med. Plants Res.*, **2011**, 5, 293-299.

⁹⁵ L. Almeida *et al.*, Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*, *Phytomedicine*, **2008**, 15, 886-891.

⁹⁶ W. Gao *et al.*, Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol congeners from *Hypericum monogynum*, *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79, 1538-1547.

⁹⁷ K. Cottet *et al.*, Isolation of guttiferones from renewable parts of *Symphonia globulifera* by centrifugal partition chromatography, *Planta. Med.*, **2015**, 81, 1-5.

Tableau 10 : Plantes dans lesquelles la guttiférone A 1 a été détectée

Entrée	Plante	Partie de plante	Origine
1 ⁷²	<i>Symphonia globulifera</i>	Racine	Centreafrique
2 ⁷²	<i>Garcinia livingstonei</i>	Plante entière	Tanzanie
3 ⁹⁸	<i>Garcinia macrophylla</i>	Brindilles	Suriname
4 ³⁸	<i>Symphonia globulifera</i>	Feuilles	Cameroun
5 ⁹⁹	<i>Garcinia aristata</i>	Fruit frais	Cuba
6 ⁹⁹	<i>Garcinia achachairu</i>	Graines	Brésil

IV.2 Structure

La guttiférone A 1 a été cristallisée par plusieurs équipes^{100,101}. Sa structure relative ne fait donc plus aucun doute. Au cours de cette thèse, la numérotation utilisée est la numérotation historiquement mise en place par Gustafson *et al.*⁷² Elle est présentée Figure 36.

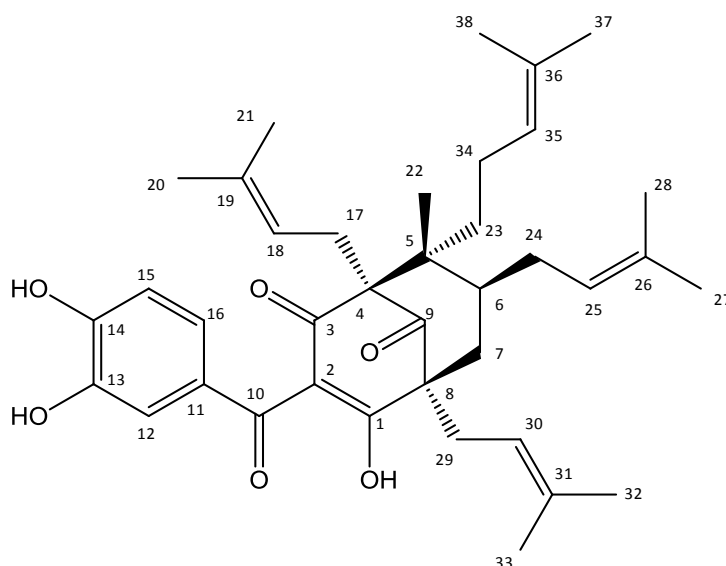


Figure 36 : Numérotation de la guttiférone A 1

Il existe un équilibre céto-énolique permanent entre les carbones 1, 3 et 10 (Schéma 6). Cet équilibre a rendu les études structurales compliquées. Il peut être étudié de diverses manières, par RMN ou voltamétrie notamment¹⁰².

⁹⁸ R. Williams *et al.*, A novel cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname rainforest, *Planta Med.*, **2003**, 69, 864-866.

⁹⁹ L. Monzote *et al.*, Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone A, *Phytother. Res.*, **2011**.

¹⁰⁰ F.T. Martins *et al.*, Natural Polyisoprenylated Benzophenones: Keto-Enol Tautomerism and Stereochemistry, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2007**, 18, 1515-1523

¹⁰¹ 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.

¹⁰² A. Nassi *et al.*, Voltammetry study of an anti-HIV compound by means of a thin organic membrane, *Int. J. Electrochem.*, **2013**, article ID902872.

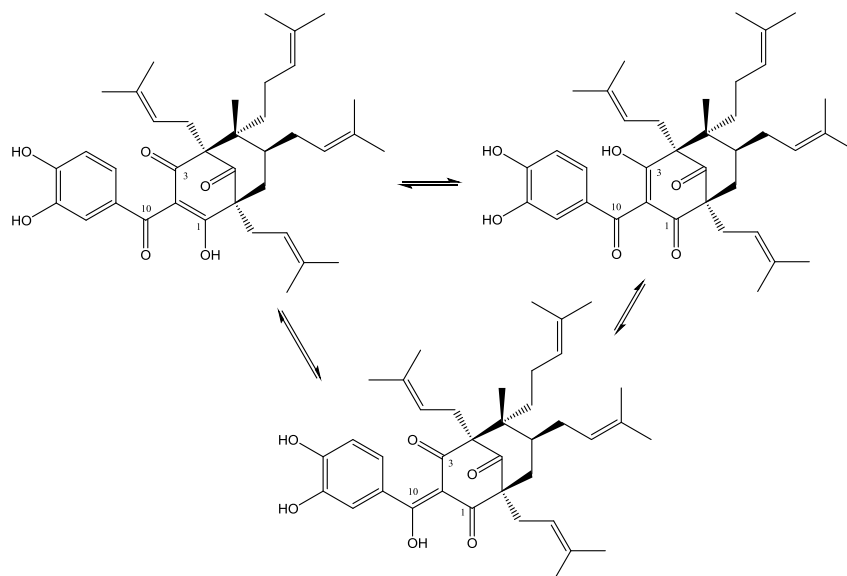


Schéma 6 : Equilibre céto-énolique de la guttiférone A 1

Au sein de notre laboratoire, des précédents travaux ont mis en évidence cet équilibre par RMN (Figure 37). Dans les solvants apolaires tels que le d-chloroforme, on observe trois systèmes ABX au niveau des protons aromatiques et donc trois produits. Il y a aussi de nombreux protons éthyléniques. Dans les solvants polaires, tels que le d-méthanol, une forme est favorisée par rapport aux deux autres et le spectre est plus simple. On n'observe alors plus qu'un seul système ABX et deux protons éthyléniques. Pour simplifier les études, les spectres RMN de guttiférone A 1 et de ses dérivés seront faits dans le d-méthanol tout au long de cette thèse.

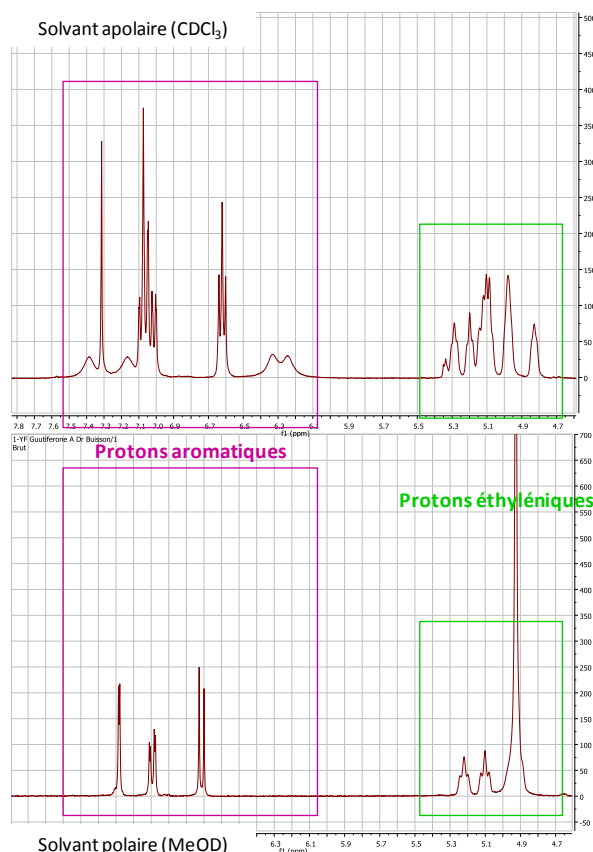


Figure 37 : Equilibre céto-énolique mis en évidence par RMN¹⁰³

IV.3 Synthèse totale

La structure complexe bicyclique des PPAPs, ainsi que la présence de plusieurs chaînes latérales prénylées et d'un groupement acyle rend leur synthèse totale particulièrement délicate. De plus, 90 % des PPAPs possèdent trois centres stéréogéniques en C-1, C-5 et C7. La guttiferone A **1** possède un challenge de plus à relever : un quatrième centre stéréogénique en C-6.

La synthèse totale de la guttiferone A **1** a été publiée par F. Horeischi *et al.* en 2014¹⁰⁴. C'est une synthèse en 13 étapes avec un excellent rendement global de 13.4 %. Le produit de départ de cette synthèse est la 1,8-nonadien-5-one **88**, produit commercial. La benzylation puis la méthylation de ce substrat donne l'accepteur de Michael **89**. Ce composé réagit alors avec le diméthyl-1,3-acétonedicarboxylate pour donner le cyclohexanone **90**. L'isoprénylation de ce composé conduira au composé **91** espéré avec une diastéréosélectivité très satisfaisante (ratio diastéréoisomérique : >95/5). La méthylation du C-6 du composé **91** en utilisant les conditions de Yamamoto se fait de façon *cis* par rapport au substituant adjacent sur le C-7. Cette réaction est parfaitement stéréosélective et donne

¹⁰³ K. Cottet, *Symphonia globulifera: études métabolomiques, extraction et hémisynthèse d'analogues de la guttiferone A à visée antiparasitaire, these de doctorat, soutenue le 13 novembre 2015.*

¹⁰⁴ F. Horeischi *et al.*, The total synthesis of guttiferone A and 6-*epi*-guttiferone A, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 4026-4030.

le composé désiré **92** avec la bonne conformation du C-6. Cette première partie de synthèse est représentée Schéma 7.

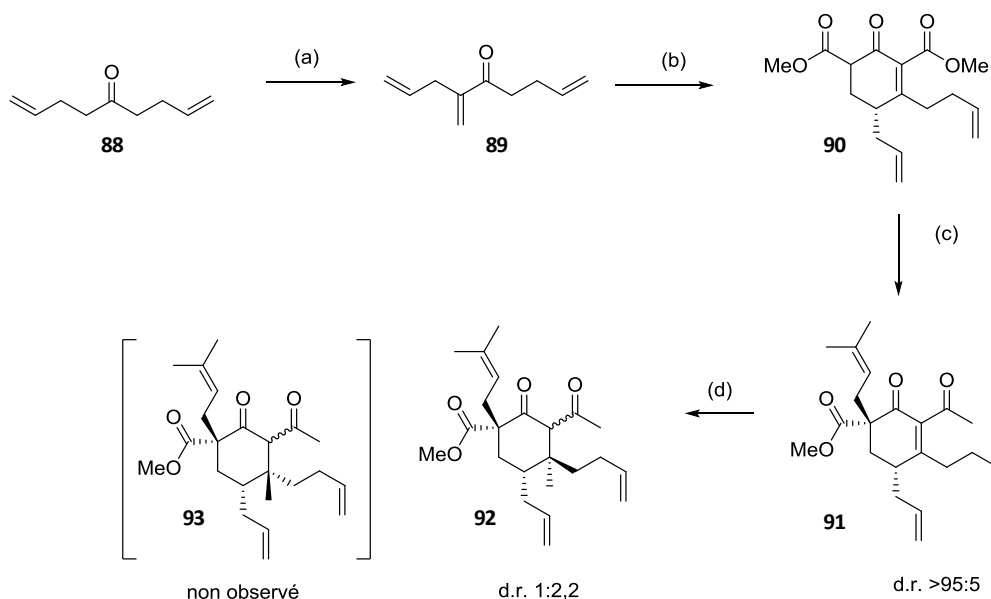


Schéma 7 : Synthèse totale de la guttiférone A 1 par F. Horeischi et al., Partie 1

LiHMDS (1.2 eq), benzoyl cyanide (1.5 eq), THF, -78°C – ta, 18 h, puis K_2CO_3 , CH_2O (aq), éthanol, ta, 18 h, 78 % (deux étapes); (b) CH_3MgCl (2.0 eq), diméthyl-1,3-acetonedicarboxylate (1.0 eq), méthanol, $0-60^{\circ}\text{C}$, 18 h, 89 %; (c) NaH (1.1 eq), CH_3Li (2.3 eq), puis NaH (1.1 eq), prenyl bromide (1.5 eq), THF, 0°C to ta, 18 h, 48 % (pour les 2 étapes); (d) LiCl (2.0 eq), CuI (2.0 eq), CH_3MgBr (2.0 eq), $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ (2.0 eq), THF, -78°C , 4 h, 89 %.

A partir de ce composé clé **92**, les auteurs ont tenté une première stratégie de décarboxylation allylante catalysée au palladium. Malheureusement le produit principal obtenu est le composé **95**, possédant la mauvaise configuration relative C-1/C-5 pour pouvoir ensuite procéder à la condensation de Claisen (Schéma 8). Cette mauvaise conformation en C-5 peut être due à la gêne stérique engendrée par les substituants en C-1 et C-6.

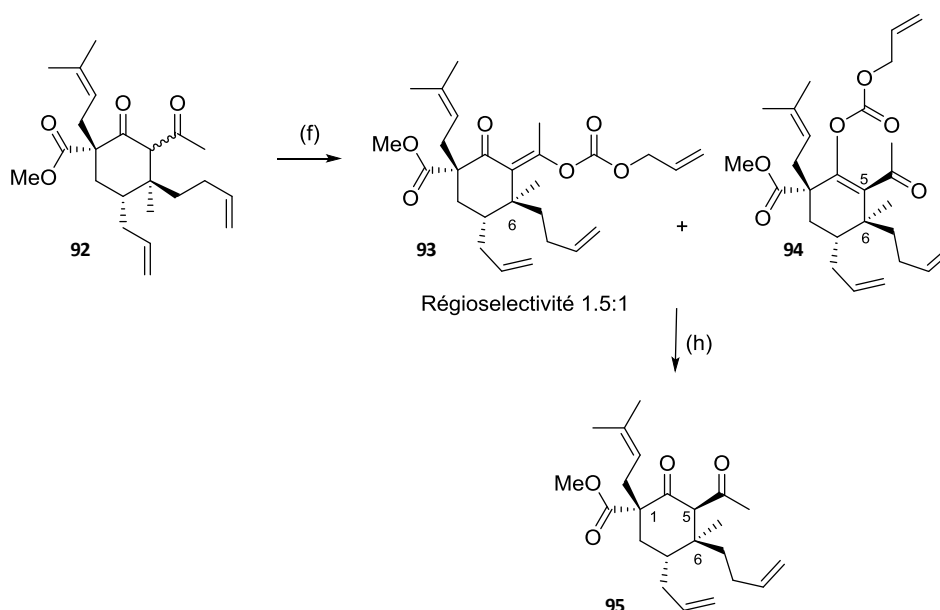


Schéma 8 : Synthèse totale de la guttiférone A 1 par F. Horeischi et al., Partie 2

(f) NaH (1.1 eq), allyl chloroformate (1.5 eq), DMF, 0 °C to rt, 18 h, 98 %; (h) [Pd₂dba₃] (5 mol %), p-Tol₃P (12 mol %), 1,4-dioxane, 60 °C, 1 h, 92 %.

Pour limiter cette gêne stérique, les auteurs ont imaginé une seconde stratégie à partir du composé **92** : former un deuxième cycle « protecteur » à partir des substituants homo-allyles en C-6 et C-7 (Schéma 9). Ce cycle est obtenu par métathèse et conduit au composé **96**. La même décarboxylation allylante que précédemment est ensuite réalisée pour donner le composé attendu **100**. Une condensation de Claisen est ensuite réalisée pour former la structure bicyclique caractéristique de la guttiférone A **1** du composé **101**. Le cycle « protecteur » est ouvert par métathèse croisée pour donner les deux chaînes latérales prényles. L'acylation a lieu en dernier lieu pour donner le composé final : la guttiférone A **1**.

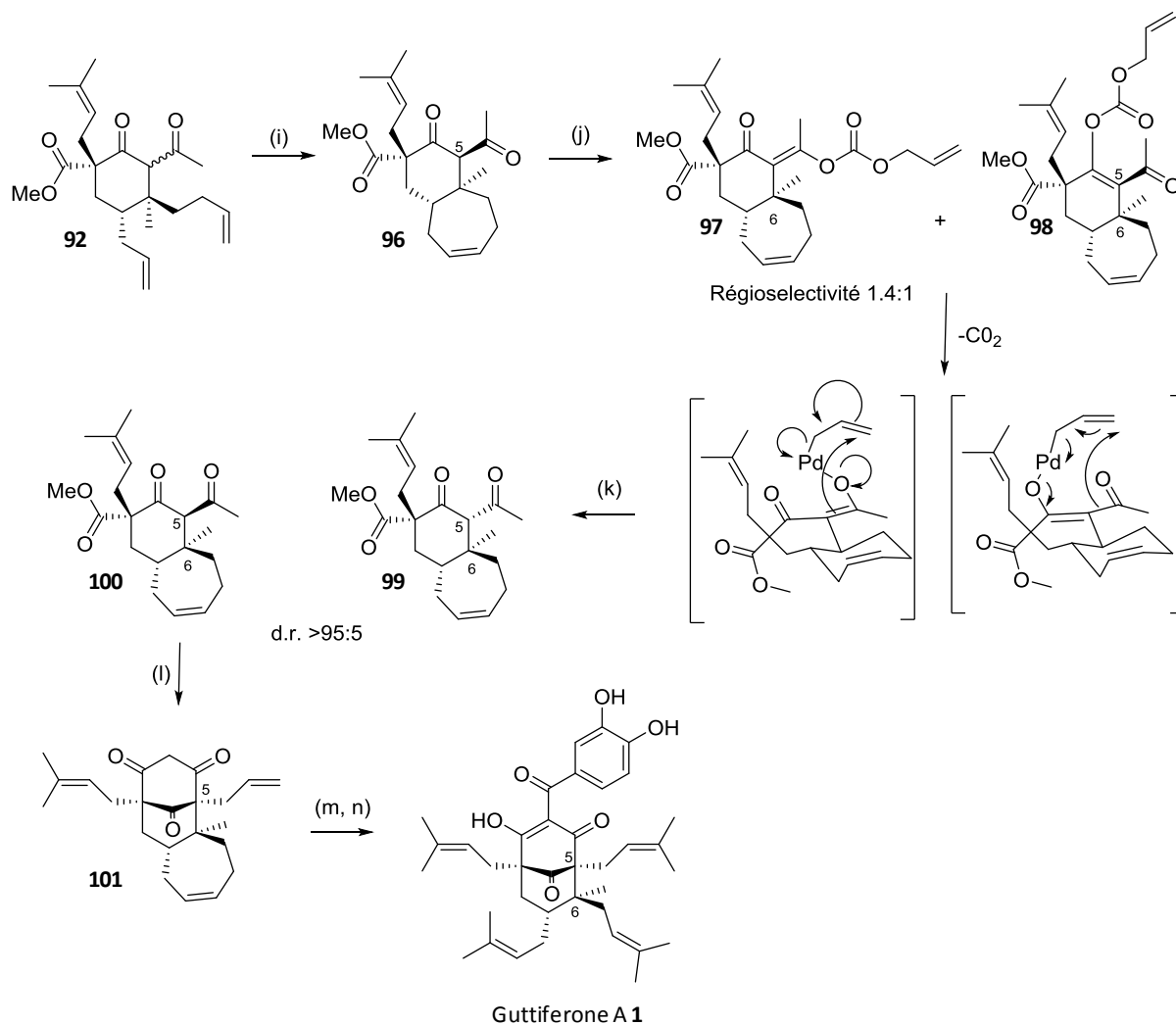


Schéma 9 : Synthèse totale de la guttiférone A 1 par F. Horeischi et al., Partie 3

(i) Grubbs-II (1 mol %), CH₂Cl₂, 45 °C, 2 h, 94%; (j) NaH (1.1 eq), allyl chloroformate (1.5 eq); DMF, 0 °C à ta, 18 h, 98%; (k) [Pd₂dba₃] (5 mol %), p-Tol₃P (12 mol %), 1,4-dioxane, 60 °C, 1 h, 94%; (l) KOtBu (2.0 eq), THF, 0 °C, 15 min, 90%; (m) Grubbs-II (1 mol %), 2-methyl-2-butène (100 eq), CH₂Cl₂, 45 °C, 2 h, 96%; (n) KOtBu (5.0 eq), 3,4-bis-acetoxybenzoyl cyanide (12.5 eq), puis K₂CO₃, méthanol, THF, 0 °C à ta, 48 h, 58%.

IV.4 Activités

La guttiférone A 1 a été testée contre de nombreuses cibles biologiques et plusieurs activités intéressantes ont été trouvées. Elles sont récapitulées Tableau 11.

Tableau 11 : Activités biologiques de la guttiférone A 1 référencées dans la littérature

Entrée	Activité	Cible	Valeur
1 ⁷²	Antivirale	VIH	1 (1,6 µM) < EC ₅₀ < 10 µg (=16,6 µM)
2 ⁹⁸	Anticancer	Lignée cellulaire A2780 - Cancer des ovaires	IC ₅₀ = 6,8 µg/mL (=11,2 µM)
3 ¹⁰⁵	Effet génotoxique	Leukocytes, foie, moelle osseuse, cerveau chez la souris	
4 ³⁸	Antileishmanial	<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 0,16 µM
5 ³⁸	Cytotoxicité	Cellules L6	IC ₅₀ = 7,3 µM
6 ³⁸	Inhibiteur de cholinestérase	AChE	IC ₅₀ = 0,88 µM
7 ³⁸	Inhibiteur de cholinestérase	BChE	IC ₅₀ = 2,77 µM
8 ⁹⁹	Antibactérien	<i>Staphylococcus aureus</i>	IC ₅₀ = 7,5 µM
9 ⁹⁹	Antibactérien	<i>Trichophyton rubrum</i>	IC ₅₀ = 19,6 µM
10 ⁹⁹	Antiparasitaire	<i>P. falciparum</i>	IC ₅₀ = 0,3 µM
11 ⁹⁹	Antiparasitaire	<i>T. cruzi</i>	IC ₅₀ = 11,8 µM
12 ⁹⁹	Antiparasitaire	<i>T. brucei</i>	IC ₅₀ = 13,5 µM
13 ⁹⁹	Antiparasitaire	<i>L. infantum</i>	IC ₅₀ = 13,5 µM
14 ⁹⁹	Antiparasitaire	<i>L. amazonensis</i>	IC ₅₀ = 15,6 µM
15 ⁹⁹	Cytotoxicité	Cellules MR-5	CC ₅₀ = 12,0 µM

La guttiférone A 1 est donc une molécule aux multiples possibilités. Au laboratoire, nous avons décidé de nous concentrer sur ses activités antiparasitaires.

IV.5 Perspectives

La guttiférone A 1 est donc une molécule très prometteuse, tant par son squelette original, son abondance naturelle, la possibilité d'obtenir des quantités de matières premières importantes et ses activités intéressantes. Tous ces critères en font un sujet d'étude intéressant. De plus, lors de travaux précédents, plusieurs générations d'analogues ont déjà été synthétisées et ces analogues ont permis d'améliorer les activités antiparasitaires. Nous avons donc décidé de poursuivre ces travaux et de continuer l'hémisynthèse de dérivés de guttiférone A 1. Mais avant de développer les perspectives d'hémisynthèse par biotransformation, nous allons détailler dans la partie suivante l'obtention innovante des châssis moléculaires de départ ainsi que l'hémisynthèse par voie chimique. Une troisième partie sera ensuite consacrée à la recherche des cibles de la guttiférone A 1 chez *Plasmodium falciparum*.

¹⁰⁵ P. Terrazas *et al.*, Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in defferent cells of mice, *PLOS One*, **2013**, 8, e76485.

Partie 1 :

Purification et hémisynthèse par voie chimique

Purification et hémisynthèse par voie chimique

Au cours de cette thèse, plusieurs études ont été menées sur la guttiférone A **1**. Cette partie présentera les travaux d'extraction, de purification et d'hémisynthèse par voie chimique.

I. Extraction et purification de la guttiférone A 1

Notre objectif d'extraction et de purification est de disposer de la plus grande quantité de guttiférone A **1** possible afin de pouvoir mener toutes les études qui seront présentées dans la suite de cette thèse. Pour ceci, il a fallu trouver une méthode simple, rapide, reproductible et transposable en grande quantité, et donc pas trop consommatrice de solvant. La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) a été choisie car elle répondait à tous ces critères.

I.1 Généralités autour de la CPC

I.1.1 *Principe*

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide à contre-courant. Cette technique a été développée par Yoichiro Ito dans les années 1970¹⁰⁶.



Figure 38 : Disque composant le rotor de la CPC

La colonne utilisée est appelée rotor. Il s'agit d'un empilement de disques comme celui représenté à la Figure 38¹⁰⁷. Ceux-ci sont creusés de multiples petites cellules qui vont agir comme des ampoules à décanter en série. Ces disques sont assemblés les uns sur les autres et l'axe de rotation se situe verticalement au centre des disques.

Elle repose sur un système liquide biphasique, et donc l'utilisation d'au moins deux solvants non miscibles. Une phase sera maintenue stationnaire dans l'appareil grâce à la force centrifuge due à la rotation du rotor. La phase mobile sera éluée à travers la phase stationnaire par une pompe. Les composés sont élués d'une phase à l'autre. La séparation est basée sur le coefficient de partition (K_d), soit la différence de solubilité des composés dans les deux phases.

La mise en place de la séparation se fait en plusieurs étapes qui sont illustrées Figure 39. Tout d'abord le rotor est rempli avec la phase stationnaire, sur l'exemple la phase inférieure.

¹⁰⁶ Y. Ito *et al.*, Countercurrent chromatography : liquid-liquid partition chromatography without solid support, *Science*, **1970**, 167, 281-283.

¹⁰⁷ <http://www.kromaton.com/fr/la-cpc/technologies>

La phase mobile, la phase légère sur l'exemple, est ensuite pompée à travers la phase stationnaire et va chasser la phase stationnaire pour occuper un certain volume dans chaque cellule. Après un volume donné de phase stationnaire chassée, le système va arriver à un état d'équilibre de telle sorte qu'il n'y ait plus que de la phase mobile qui soit pompée en sortie de colonne. Le volume de phase stationnaire restant dans le rotor est appelé volume de rétention de phase stationnaire et est calculé en pourcentage du volume total du rotor. Ce volume est propre à chaque système de solvants.

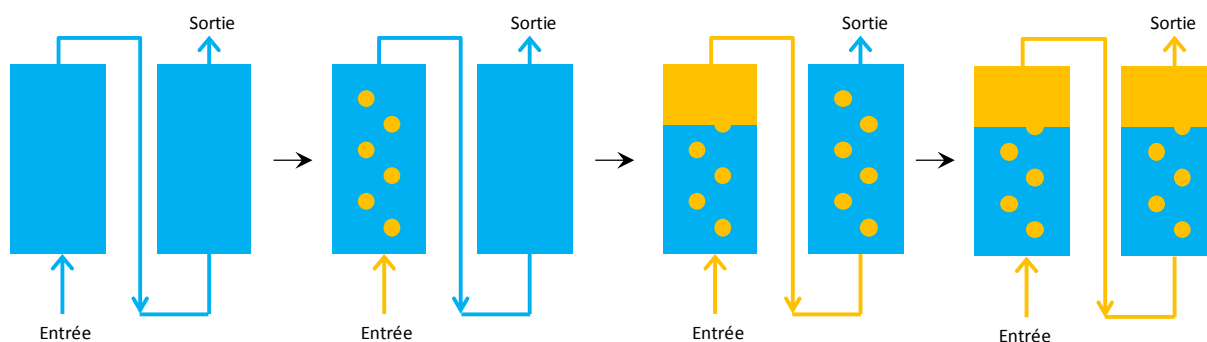


Figure 39 : Principe de la CPC

Dans cet exemple, la phase mobile est la phase supérieure et la phase stationnaire est la phase inférieure, c'est le mode ascendant. L'inverse peut également être utilisé, il s'agit du mode descendant.

Plusieurs paramètres influencent la séparation comme le système de solvants utilisé, la vitesse de rotation du rotor et le débit de phase mobile. Deux critères permettent de choisir le système de solvants¹⁰⁸ :

- Le coefficient de partition du composé à purifier doit être idéalement le plus proche de 1 possible, mais compris entre 0.2 et 5 ;
- La séparation des deux phases après mélange doit être rapide, idéalement moins de 30 secondes.

La CPC est une méthode transposable à grande échelle, elle permet la séparation de composés d'une vaste gamme de polarité. L'absence de phase solide empêche l'adsorption définitive des composés et la totalité de l'échantillon injecté peut être récupéré. Les quantités de solvants mis en jeu lors des purifications sont également moindres qu'avec une colonne classique HPLC¹⁰⁸.

¹⁰⁸ B. Kedzierski *et al.*, Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances – a review, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **2014**, 71, 223-227.

I.1.2 Séparation de produits naturels

La séparation des produits naturels est un domaine majeur de l'utilisation de la chromatographie liquide à contre-courant (CCC). En effet entre 2003 et 2013, 75 % des publications à propos de CCC traitaient de ce sujet¹⁰⁹. En effet, cette technique est particulièrement adaptée à la séparation des produits naturels pour plusieurs raisons :

- Facilité de la transposition à grande échelle ;
- Large gamme de solvants utilisables ;
- Récupération de la totalité de l'échantillon.

Les solvants les plus utilisés dans la séparation des produits naturels sont l'eau, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'hexane et le butanol. Beaucoup d'autres solvants peuvent néanmoins être utilisés dans des cas plus isolés¹⁰⁹.

En théorie un système de solvants pour la CPC doit être composé d'au moins deux solvants non miscible, mais ce cas de figure est assez rare. La majorité des publications font référence à des systèmes de trois ou quatre solvants¹⁰⁹.

Les travaux de X. Cao *et al*¹¹⁰ ont particulièrement attirés notre attention car ils ont développé une méthode de purification de l'hyperforine **87** par CCC, une technique très proche de celle de la CPC. L'hyperforine est un PPAPs, de type BPAPs, comme la guttiférone **A 1**.

Leur technique est originale car ils changent le système de solvants en cours de purification : ils utilisent tout d'abord un système heptane/méthanol/acétonitrile (1.5/0.5/0.5), puis un système légèrement différent heptane/méthanol (1.5/1). Ils utilisent la phase inférieure en phase mobile. La pureté de l'hyperforine obtenue grâce à cette méthode est de 98 %.

La CCC est donc une technique adaptée à la purification des PPAPs.

I.2 Travaux antérieurs

Au vu des nombreux avantages que possèdent la CPC pour la purification des produits naturels, une méthode de purification de la guttiférone **A 1** à partir d'extrait de latex a été développée dans notre laboratoire au cours de la thèse du Dr Kevin Cottet⁹⁷.

Plusieurs extraits méthanoliques de différentes parties de plantes ont été étudiés pour mettre au point cette purification. Le latex s'est révélé la partie de plante la plus riche avec 12 % de guttiférone **A 1** (quantification par HPLC). Le latex contient également une grande

¹⁰⁹ J. Brent Friesen *et al.*, Countercurrent separation of natural products: an update, *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 1765-1796.

¹¹⁰ X. Cao *et al.*, Isolation and purification of series bioactive components from *Hypericum perforatum* L. by counter-current chromatography, *J. Chromatogr. B.*, **2011**, 879, 480-488.

quantité de guttiférone C et de la guttiférone B et D. Les coefficients de partition de ces quatre molécules ont donc été étudiés dans plusieurs systèmes de solvants inspirés du système ARIZONA. Les résultats sont représentés Tableau 12.

Tableau 12 : Calcul des Kd des guttiférones présentes dans le latex de *S. globulifera*

Entrée	Système (cyclohexane/acétate d'éthyle/méthanol/eau)	Kd1 (GA)	Kd2 (GB)	Kd3 (GC et GD)
1	3/1/3/1	3,03	9,09	5,56
2	19/1/15/5	1,04	1,35	1,23
3	14/1/14/1	0,56	0,55	0,6
4	16/1/16/1	0,44	NC	0,5
5	18/1/18/1	0,35	0,47	0,43
6	20/1/20/1	0,31	0,47	0,38

La valeur optimale de Kd est de 1 et le système (19/1/15/5) (entrée 2 du Tableau 12) semble être le système le plus adapté au premier abord. Malheureusement Kd2 et Kd3 sont trop proche de Kd1 et la séparation avec ce système est mauvaise. D'autres systèmes ont donc été testés, jusqu'à trouver le système optimal (20/1/20/1) (entrée 6 du Tableau 12).

Les résultats obtenus avec ce système sont excellents. En effet, la quantification par HPLC a révélé 12.2 % de guttiférone A **1** dans le latex. Après une purification par CPC, le rendement de purification est de 11.2 %.

Une nouvelle technique de purification de la guttiférone A **1** a donc été mise en place. Elle est plus rapide, plus efficace et moins couteuse en solvant que la technique de purification classique par chromatographie sur gel de silice.

I.3 Travaux personnels

La technique décrite précédemment présentant de nombreux avantages par rapport à la purification classique de la guttiférone A **1** sur chromatographie par gel de silice, elle a continué à être utilisée au cours de cette thèse.

L'appareil utilisé au laboratoire est appareil ARMEN instrument SCPC-250+1000-B, possédant un rotor de 250 mL et un rotor de 1 L. Les quantités de solvants utilisées restent conséquentes, notamment à cause des multiples rinçages et à la longueur des injections. De plus, lors de la préparation du système de solvants, nous obtenons 42% de phase inférieure et 58 % de phase supérieure. Nous utilisons la phase inférieure en phase stationnaire et la phase supérieure en phase mobile, nous avons donc besoin de plus de phase supérieure que de phase inférieure. Malheureusement comme nous ne connaissons pas la répartition des solvants dans chaque phase, nous ne pouvons pas préparer une phase indépendamment. Dans notre cas, il y a donc du gâchis de phase inférieure. Pour remédier à ce problème, nous avons décidé de doser les solvants dans chacune des phases.

I.3.1 Dosage des phases utilisées en CPC

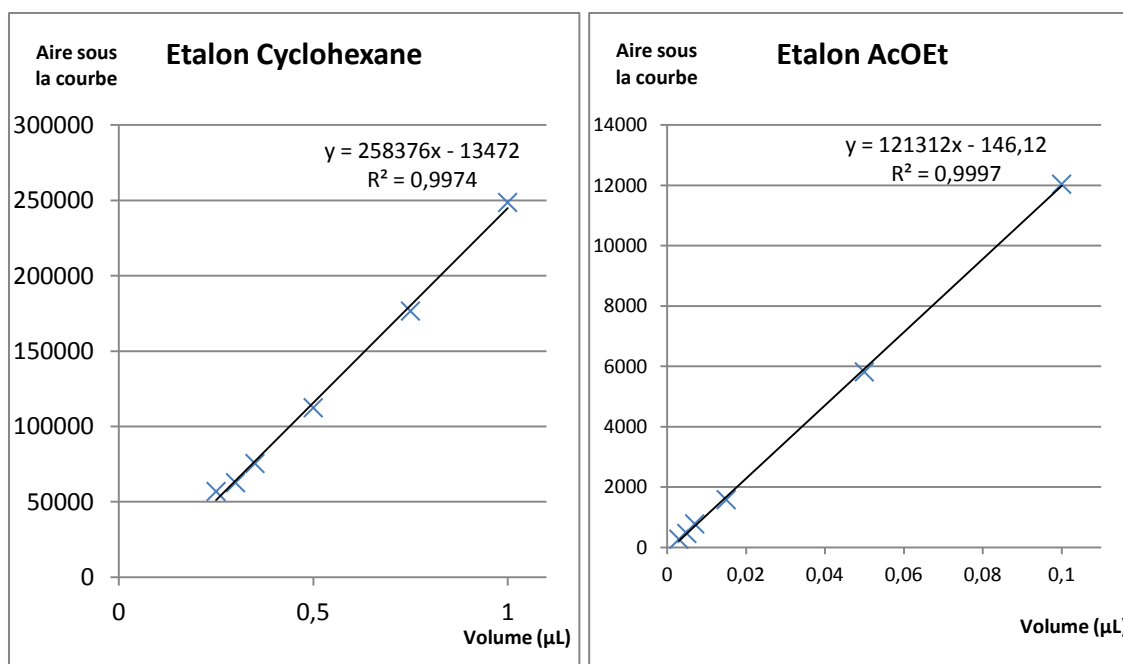
I.3.1.1 Etalonnage des solvants organiques par GC

Le dosage des solvants organiques (cyclohexane, méthanol et acétate d'éthyle) s'est fait par GC. Nous avons utilisé une colonne Agilent technologies DB-WAX et un détecteur FID intégré. Nous avons réalisé une gamme d'étalonnage pour chaque solvant, qui ont tous été dilués dans l'acétone car c'est un solvant dans lequel ils étaient tous solubles. Les conditions utilisées pour les différentes injections sont représentées Tableau 13.

Tableau 13 : Conditions de GC pour le dosage des phases de CPC

Injection	1 µL
Température du four	35°C
Durée d'un run	6 min
Débit d'hélium	1.2 mL/min

Les courbes d'étalonnage sont représentées Figure 40. Le système étant composé de beaucoup de cyclohexane et méthanol et de très peu d'eau et d'acétate d'éthyle, nous avons fait l'étalonnage du cyclohexane entre 0.25 µL et 1 µL, du méthanol entre 0.003 µL et 0.75 µL et de l'acétate d'éthyle entre 0.003 µL et 0.1 µL.



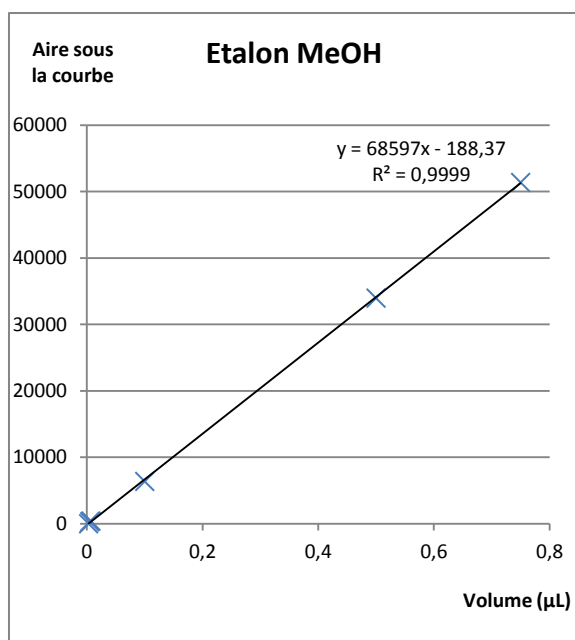


Figure 40 : Courbes d'étalonnage des différents solvants

Les coefficients R^2 sont satisfaisants car très proches de 1, nous avons donc utilisé ces équations de régression linéaire pour calculer la quantité des différents solvants dans chaque injection.

I.3.1.2 Dosage des solvants organiques par GC

Les deux phases ont ensuite été injectées séparément, sur six jours différents et par deux opérateurs différents afin que les résultats soient le plus fidèles possible à la réalité. Les résultats sont représentés Tableau 14 et Tableau 15.

Tableau 14 : Résultats du dosage de la phase supérieure (A : Aire sous la courbe)

Entrée	Phase Supérieure	MeOH		AcOEt		Cyclohexane		Quantité totale (µL)
	Date	A	Quantité injectée (µL)	A	Quantité injectée (µL)	A	Quantité injectée (µL)	
1	Session 1 - Opérateur 1	1531,3	0,025	1792,2	0,016	287863,6	1,17	1,207
2	Session 2 - Opérateur 1	1302,4	0,022	1564,8	0,014	237326	0,97	1,007
3	Session 3 - Opérateur 1	1439	0,024	1600,7	0,014	233803	0,96	0,995
4	Session 1 - Opérateur 2	1314	0,022	1594,7	0,014	233797,5	0,96	0,993
5	Session 2 - Opérateur 2	1284,2	0,021	1716,9	0,015	244268,9	1,00	1,034
6	Session 3 - Opérateur 2	878,1	0,016	1675,2	0,015	245093,9	1,00	1,031
7	Moyennes		0,021		0,015		0,977	1,012

Les résultats de l'entrée 1 du Tableau 14 sont aberrants car le volume total calculé du total des solvants est bien supérieur à 1 μL , quantité censée être injectée. Ces résultats ne seront donc pas pris en compte dans le calcul des moyennes. Les autres résultats sont cohérents les uns par rapport aux autres. La composition retenue pour la phase supérieure est donc de 97.7 % de cyclohexane, 2.1 % de méthanol et 1.5 % de d'acétate d'éthyle. Ces pourcentages sont exprimés en v/v. Ces résultats sont en accord avec les résultats attendus : la phase supérieure était a priori composée très majoritairement de cyclohexane et la phase inférieure de méthanol. L'acétate d'éthyle se partage ensuite entre les deux phases et l'eau se concentre principalement dans la phase inférieure. En effet, selon ses pourcentages, l'eau n'est présente que sous forme de trace dans la phase supérieure. Ces résultats seront confirmés dans la partie I.3.1.3.

Tableau 15 : Résultats du dosage de la phase inférieure (A : aire sous la courbe)

Entrée	Phase Inférieure	MeOH		AcOEt		Cyclohexane		Total Injecté (μL)
	Date	A	Quantité injectée (μL)	A	Quantité injectée (μL)	A	Quantité injectée (μL)	
1	Session 1 - Opérateur 1	52593,7	0,769	3310,9	0,028	28255	0,161	0,959
2	Session 2 - Opérateur 1	53598,4	0,784	3545,9	0,030	25948,6	0,153	0,967
3	Session 3 - Opérateur 1	52943	0,775	3521,8	0,030	28504,1	0,162	0,967
4	Session 1 - Opérateur 2	54302,9	0,794	3653,3	0,031	25034,8	0,149	0,975
5	Session 2 - Opérateur 2	53411	0,781	3739,7	0,032	26111,6	0,153	0,967
6	Session 3 - Opérateur 2	54635,8	0,799	3743,8	0,032	24280,9	0,146	0,977
7	Moyennes		0,784		0,031		0,154	0,969

Tous les résultats ici sont cohérents entre eux. Ils sont également cohérents avec les résultats attendus. La composition retenue pour la phase inférieure est de 78.4 % de méthanol, 3.1 % d'acétate d'éthyle et 15.4 % de cyclohexane. Ce qui fait un total de 96.9 %, on peut donc supposer que l'eau représente les 3 % restant. Cette hypothèse sera vérifiée à la partie I.3.1.3.

I.3.1.3 Dosage de l'eau

L'eau a été dosée à l'aide d'un appareil de Karl Fisher. Les résultats sont représentés Tableau 16 et Tableau 17.

Tableau 16 : Résultats du dosage de l'eau dans la phase supérieure

Phase supérieure	Concentration en ppm	Concentration en % (m/m)	Concentration en % (v/v)
Essai 1	162,9	0,016	0,013
Essai 2	169,8	0,017	0,013

L'hypothèse émise dans la partie I.3.1.2 sur la quantité d'eau dans la phase supérieure était juste : elle ne contient que 0.013 % d'eau. **La composition finale retenue pour la phase supérieure est donc 97.7 % de cyclohexane, 2.1 % de méthanol et 1.5 % de d'acétate d'éthyle.**

Tableau 17 : Résultats du dosage de l'eau dans la phase inférieure

Phase inférieure	Concentration en ppm	Concentration en % (m/m)	Concentration en % (v/v)
Essai 1	54800	5,48	4,44
Essai 2	58285	5,83	4,72
Essai 3	55529	5,55	4,50
Essai 4	59087	5,91	4,79
		Moyenne	4,61

La teneur en eau moyenne est de 4.6 %. Cette teneur est supérieure à l'hypothèse faite à la partie I.3.1.2, qui n'était que de 3.1 %. La composition de la phase inférieure a donc été recalculée en tenant compte de la teneur en eau mesurée. **La composition finale retenue est de 77.2 % de méthanol, 15.2 % de cyclohexane, 4.5 % d'eau et 3.1 % d'acétate d'éthyle.**

I.3.2 Purification des guttiférones par CPC

Afin d'obtenir la guttiférone A **1** pure, un extrait méthanolique est tout d'abord réalisé à partir du latex brut de *Symphonia globulifera*. Le latex est macéré une nuit dans le méthanol (0.1 g/mL), puis la solution obtenue est filtrée. Le résidu de filtration est repris dans le méthanol pour une seconde macération et l'opération est répétée deux fois. Les filtrats sont rassemblés et évaporés. L'extrait est alors repris dans un mélange eau/acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau plusieurs fois pour éliminer les impuretés polaires, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée. Le rendement d'extraction du latex est de 45 %.

Cet extrait est analysé par HPLC, les composants majoritaires sont la guttiférone A **1** et la guttiférone C **51** (Figure 41). Ils ont été dosés pour vérifier que la composition est similaire avec le latex utilisé lors des travaux précédents. Les courbes d'étalonnage sont fournies dans la partie expérimentale.

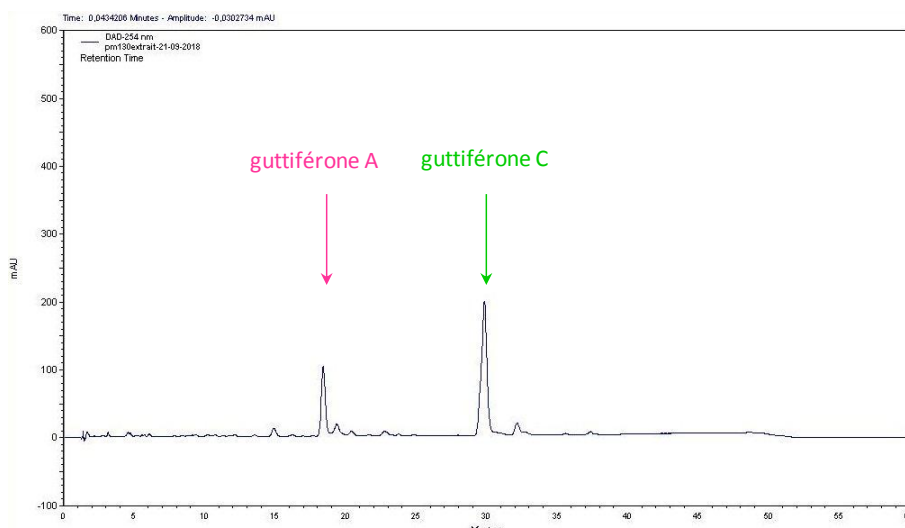


Figure 41 : Chromatogramme HPLC de l'extrait méthanolique de latex de *Symphonia globulifera*

Le résultat des dosages est présenté dans le Tableau 18. Il semblerait que le latex que nous ayons utilisé au cours de cette thèse soit moins riche en guttiférone A **1** que celui que le laboratoire a reçu précédemment. Ceci peut s'expliquer par des différences de zones et de périodes de récolte. En effet, le latex utilisé par le Dr. Cottet avait été fourni par les Drs Christophe Duplais et Guillaume Odone à partir de *Symphonia globulifera* du site de Macouria en Guyane française. Le latex utilisé dans cette étude provient également de Guyane française, mais il a été fourni par une entreprise spécialisée, il est difficile d'obtenir plus de précisions sur le lieu de collecte.

Tableau 18 : Dosage des guttiférones dans l'extrait de latex

	Quantification dans l'extrait de latex	Quantification dans le latex	Teneur dans le latex dans les travaux précédents	Rendement d'extraction
Guttiférone A 1	14.5 %	6.5 %	12.2 %	45 %
Guttiférone C 51	32 %	14 %	/	

La méthode présentée dans la partie I.2 a été utilisée pour la purification du latex. Le rendement de purification de la guttiférone A **1** à partir du latex est de 13 % et celui de la guttiférone C est de 30 % par rapport à l'extrait de latex, et donc respectivement 5.9 % et 13.5 % par rapport au latex. Ces rendements nous ont paru faibles au premier abord en comparaison des rendements obtenus par le Dr Cottet, mais compte tenu de la teneur plus faible en guttiférone A **1** de ce latex, les rendements de purification sont plutôt bons.

II. Hémisynthèse d'analogues de guttiférones par voie chimique

L'un des objectifs de cette thèse était d'obtenir des analogues de guttiférone A **1** afin d'évaluer leurs activités antiparasitaires.

II.1 Oxydation à l'iode hypervalent

Les travaux de L. Wang et al. sur l'oblongifoline C **102** ont particulièrement attirés notre attention¹¹¹. L'oblongifoline C **102** est un PPAPs, et plus précisément un BPAPs avec une structure très proche de celle de la guttiférone A **1**. Cette étude porte sur la synthèse d'analogues d'oblongifoline C et l'évaluation de leur activité inhibitrice de c-Met. Plusieurs dérivés sont synthétisés dont deux particulièrement originaux, qui sont représentés Schéma 10.

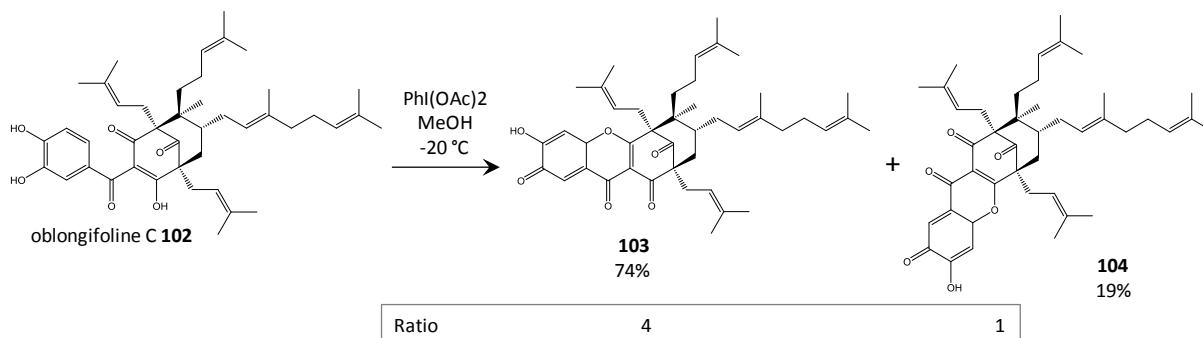


Schéma 10 : Oxydation à l'iode hypervalent de l'oblongifoline C

Les composés **103** et **104** sont obtenus par oxydation à l'iode hypervalent. La méthode utilisée, mise au point par Wipf et al.¹¹², utilise le diacétate d'iodobenzène (3.3 eq) dans le méthanol. La réaction est agitée pendant 1 h à -20 °C. Après traitement et purification par HPLC préparative le composé **103** est obtenu avec un rendement de 74 % et le composé **104** est obtenu avec un rendement de 19 %.

De la même manière, nous avons donc décidé d'appliquer ces conditions à la guttiférone A **1** afin d'obtenir les 3,16-oxyguttiférone A **2b** et 1,16-oxyguttiférone A **105b** sous les formes présentées dans le Schéma 11.

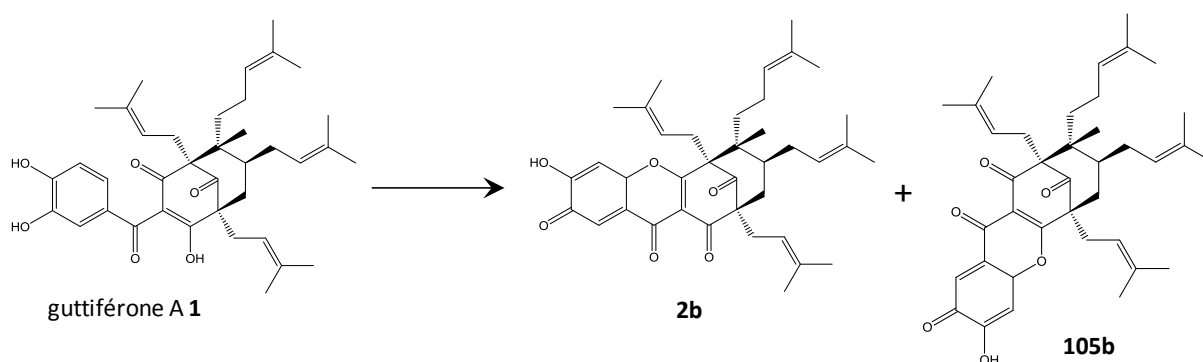


Schéma 11 : Oxydation à l'iode hypervalent appliquée à la guttiférone A 1

¹¹¹ L. Wang et al., Synthesis and biological evaluation of oblongifolin C derivatives as c-Met inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 4120-4128.

¹¹² P. Wipf et al., Studies on the synthesis of *Stemona* alkaloids ; stéréosélective preparation of the hydroindole ring system by oxidative cyclization of tyrosine, *Tett. Lett.*, **1992**, 33, 5477-5480.

Les conditions de réactions sont récapitulées dans le Tableau 19. L'entrée 1 du tableau correspond aux conditions utilisées par L. Wang et al. Dans un premier temps nous avons appliqué exactement les mêmes conditions, ce qui a conduit à la dégradation de la guttiférone A **1** (entrée 2). Nous avons ensuite abaissé la température de -20 °C à -50 °C et la réaction est laissée sous agitation seulement 15 minutes, mais là encore, la guttiférone A **1** se dégrade (entrée 3). La quantité de diacétate d'iodobenzène est donc diminuée de 3.3 équivalents à 1.3 et la réaction est traitée après seulement 5 min. Les formes déjà rencontrées de la 1,16-oxyguttiférone A **105** et de la 3,16-oxyguttiférone A **2** apparaissent mais il reste du produit de départ (entrée 4). La réaction est donc laissée sous agitation plus longtemps et nous observons alors une suroxydation de la 3,16-oxyguttiférone A **2** en 12-hydroxy-guttiférone A **106**, malgré la présence résiduelle de produit de départ (entrée 5). Dans l'objectif de consommer tout le produit de départ, la réaction est laissée sous agitation pendant 2 h. Après cette période il reste toujours du produit de départ, on ajoute donc 0.5 équivalent supplémentaire de diacétate d'iodobenzène (entrée 6). La conversion est alors de 100 %, mais nous n'obtenons toujours que les formes classiques des composés **2** et **105**. Pour essayer de suroxyder ces composés, nous avons donc ajouté du diacétate d'iodobenzène une troisième fois (entrée 7), mais les composés obtenus sont toujours les **2** et **105**. La réaction est assez sensible car dans les mêmes conditions, mais en ajoutant 3.9 équivalents de réactif au lieu de 3.3 on forme le composé suroxydé **106** (entrée 8). Lorsque l'on atteint les 4.9 équivalents de réactif en 4 ajouts successifs, la guttiférone A **1** se dégrade (entrée 9). Dans l'objectif de suroxyder totalement la 1,16-oxyguttiférone A **105** et la 3,16-oxyguttiférone A **2**, nous avons utilisé 4.9 équivalents en 5 ajouts successifs (entrée 11) et 4.5 équivalents en 3 ajouts successifs (entrée 12). Malheureusement ces deux tentatives n'ont aboutis qu'à de la dégradation. Nous n'avons donc pas réussi à suroxyder totalement les oxyguttiférones A. Les produits de la réaction sont présentés Figure 42. La 12-hydroxy-1,16-oxyguttiférone A n'a pas été observée.

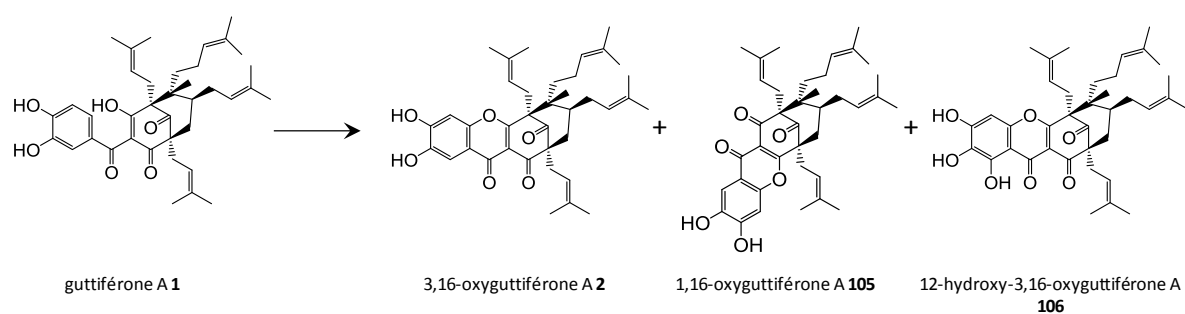


Figure 42 : Oxydation de la guttiférone A **1** avec de l'iode hypervalent

Tableau 19 : Conditions de réaction d'oxydation de la guttiférone A 1 avec de l'iode hypervalent

Entrée	Méthode d'addition	Diacétate d'iodobenzène (eq)	Température (°C)	Temps (min)	Résultats
1¹¹¹	En deux fois 5 min d'intervalle	3,3	-20	60	
2	En deux fois 5 min d'intervalle	3,3	-20	60	Dégradation
3	En deux fois 5 min d'intervalle	3	-50	15	Dégradation
4	Une fois	1,3	-50	5	105 2 1
5	Une fois	1,2	-50	15	105 2 106 1
6	En deux fois 2 h d'intervalle	1,3 + 0,5	-50	150	105 2
7	1er ajout T0 2eme ajout 1h 3eme ajout 1h30	1,2 1 1,1	-50	120	105 2
8	1er ajout T0 2eme ajout 30 min 3eme ajout 1h	1,2 1,3 1,4	-50	90	105 2 106 1
9	1er ajout T0 2eme ajout 30 min 3eme ajout 1h 4eme ajout 1h30	1 1,4 1,4 1,1	-50	150	Dégradation
10	1er ajout T0 2eme ajout 30 min 3eme ajout 1h 4eme ajout 1h30	1 1,3 0,7 0,5	-50	180	105 2 106 1
11	1er ajout T0 2eme ajout 30 min, 3eme ajout 1h 4eme ajout 1h30 5eme ajout 2h	0,8 1,1 1,1 1,1 0,8	-50	135	Dégradation
12	1er ajout T0 2eme ajout 30 min, 3eme ajout 1h	1,3 1,7 1,5	-50	120	Dégradation
13	1er ajout T0 2eme ajout 30 min 3eme ajout 1h	1 1,1 1,1	-50	120	105 2

Malgré de multiples tentatives, nous n'avons donc pas obtenu les composés **2b** et **105b** sous la forme souhaitée. Après une étude plus en détails des spectres RMN des composés **103** et **104** obtenus par L. Wang, il est possible qu'ils aient commis une erreur sur la structure des composés qu'ils décrivent et qu'ils soient plutôt présents sous la forme décrite dans la Figure 43.

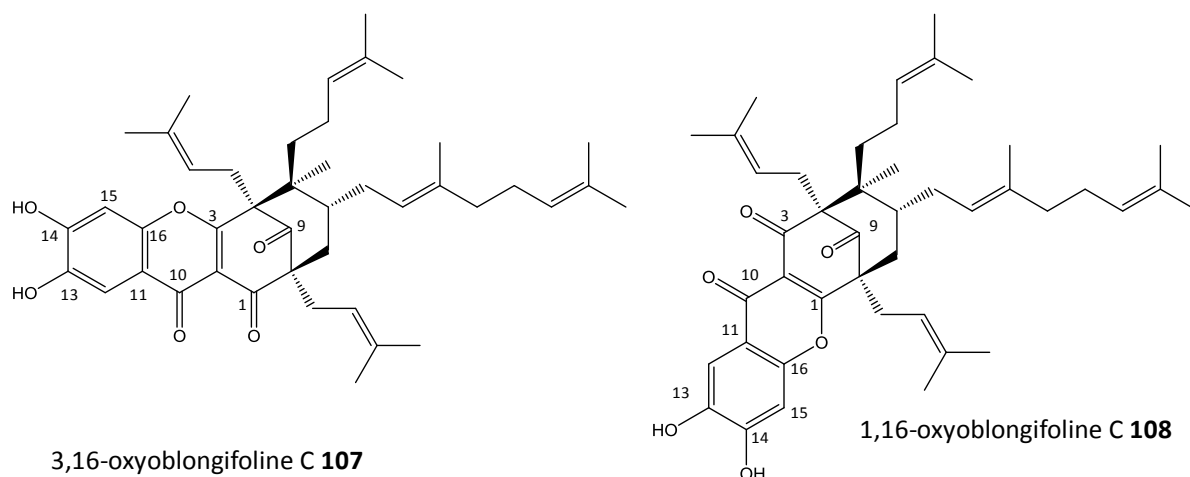


Figure 43 : Structure proposée des produits obtenus par L. Wang et al.

En effet, l'hydrogène 16 du composé **103** n'apparaît pas sur le spectre proton (Figure 44). De plus, seuls deux pics sont présents sur le spectre ^{13}C dans la zone des 170-180 ppm correspondant aux carbones 1 et 10. Le carbone 13 de la structure dessinée par les auteurs devrait se trouver dans cette zone (Figure 45). En revanche, on observe trois pics dans la zone 145-155 ppm, qui pourraient correspondre aux carbones 13, 14 et 16, qui seraient trois carbones aromatiques liés à un oxygène.

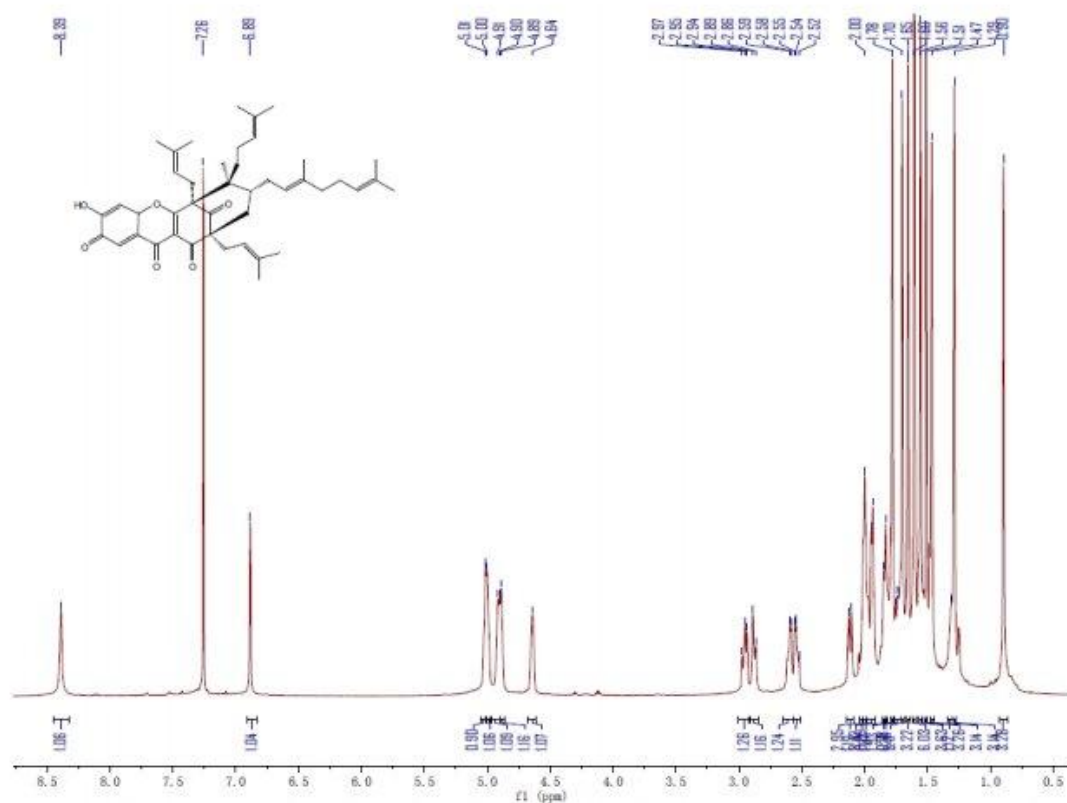


Figure 44 : Spectre RMN ^1H du composé 103

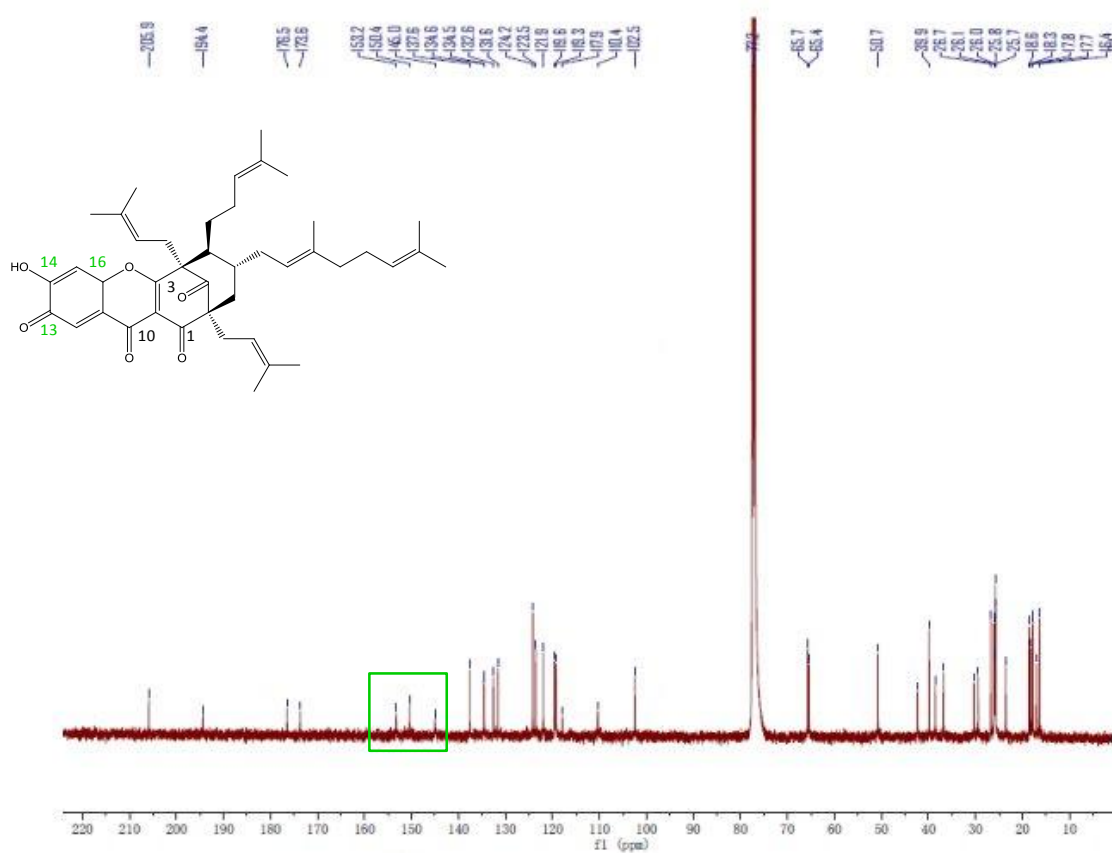


Figure 45 : Spectre RMN ^{13}C du composé 103

Chemical structure of compound 10 is shown in the top left. The ¹H NMR spectrum (CDCl₃) shows peaks from 0.5 to 8.5 ppm. Integration values are provided below the baseline.

Chemical Shift (ppm)	Integration
8.4	1.06
7.1	1.01
5.0	1.0
4.8	1.24
4.6	1.4
4.4	1.60
4.2	1.35
2.8	1.0
2.6	1.05
2.2	2.22
2.0	2.0
1.8	2.0
1.6	2.0
1.4	2.0
1.2	2.0
1.0	2.0
0.8	2.0
0.6	2.0

- 75 -

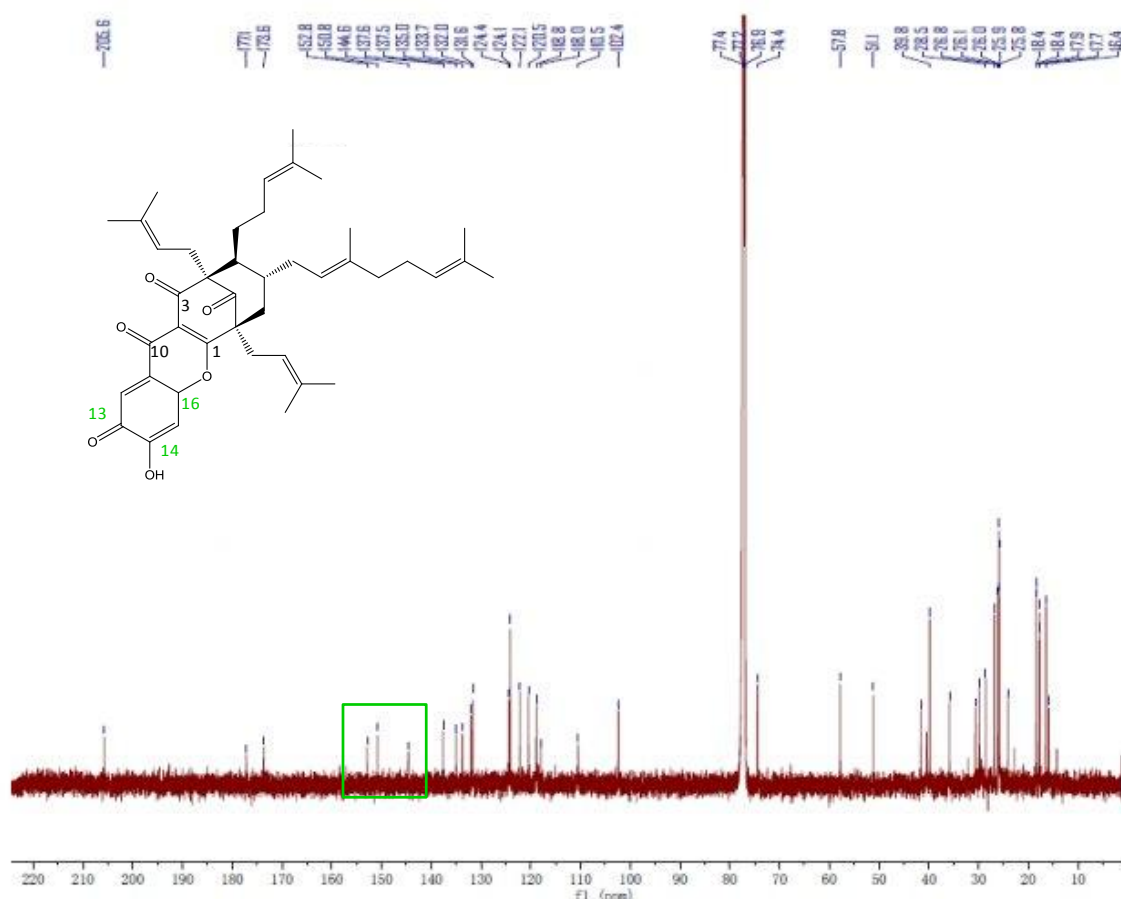


Figure 47 : Spectre RMN ^{13}C du composé 104

La forme catéchol doit être beaucoup plus stable, il n'est sans doute pas possible d'observer la forme céto-phénolique.

II.2 Oxydation via la tyrosinase

Au cours des thèses précédentes, plusieurs méthodes ont été envisagées pour obtenir les deux oxyguttiférones A, notamment la synthèse organique, l'électrochimie¹¹³ et les biotransformations (voir I.2). La 3,16-oxyguttiférones A **2** et la 1,16-oxyguttiférone A **105** ont toujours été obtenues dans des proportions de 2.5/1 respectivement. Nous avons décidé de tester la voie enzymatique pour essayer d'obtenir sélectivement une oxyguttiférone. Pour cela nous avons choisi la tyrosinase, une enzyme capable d'oxyder les phénols et les catéchols.

¹¹³ K. Cottet *et al.*, Polycyclic Polyprenylated Xanthenes from *Symphonia globulifera*: Isolation and Biomimetic Electrosynthesis, *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 2136-2140.

II.2.1 La tyrosinase dans la littérature

La tyrosinase, ou catéchol oxydase, est une enzyme largement décrite dans la littérature. Elle intervient notamment dans la synthèse de la mélanine à partir de la tyrosine¹¹⁴. Elle catalyse deux types de réactions :

- hydroxylation des phénols en o-diphénols ;
- oxydation des o-diphénols en quinones.

Cette enzyme est très exploitée dans l'industrie, car elle est efficace à faible concentration et sur une vaste gamme de pH et de températures¹¹⁵. Elle est utilisée, par exemple, pour dégrader les composés phénoliques cancérigènes dans le traitement des eaux usagées¹¹⁶.

Les travaux de H. Xiong et al. ont particulièrement attiré notre attention. Ils ont étudié l'oxydation de quatre molécules, la ractopamine, la ritodrine, l'isoxsuprine et le fénotérol, par la tyrosinase dans le but de développer un test de discrimination visuel permettant de les différencier¹¹⁷. Ces molécules ont toutes subi une oxydation du catéchol, puis une cyclisation intramoléculaire de type addition de Mickael, pour former un hétérocycle. Certaines ont subi une deuxième oxydation du catéchol après la cyclisation intramoléculaire pour former une orthodiquinone.

En adaptant le mécanisme proposé par H. Xiong et al. à la guttiférone A **1**, nous espérons former une des oxyguttiférone A, à priori la 3,16-oxyguttiférone **2** dont la formation semble favorisée, ou le nouveau composé **109** (Schéma 12).

¹¹⁴ A. Sanchez-Ferrer *et al.*, Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1247, 1-11.

¹¹⁵ K. Yamada *et al.*, Removal of p-alkylphenols from aqueous solutions by combined use of mushroom tyrosinase and chitosan beads, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2006**, 70, 2467-2475.

¹¹⁶ K. Yamada *et al.*, Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads, *Biotechnol. Prog.*, **2005**, 21, 823-829.

¹¹⁷ H. Xiong *et al.*, Visual discrimination of phenolic group β_2 -agonists and the ultrasensitive identification of their oxidation products by use of a tyrosinase-based catalytic reaction, *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 4729-4738.

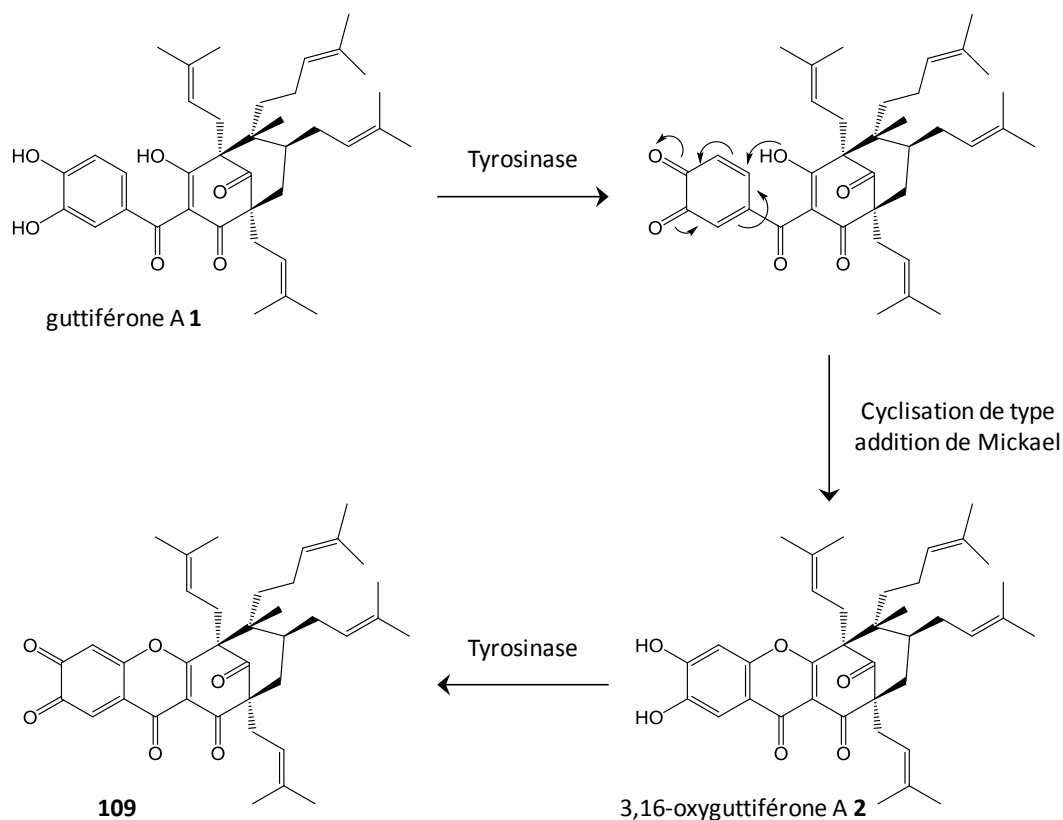


Schéma 12 : Mécanisme proposé de réaction de la guttiférone A 1 avec la tyrosinase

II.2.2 Application à la guttiférone A 1

Après une étude des conditions utilisées dans la littérature pour les réactions avec la tyrosinase, nous avons élaboré un protocole. Toutes les réactions ont été menées dans une solution de tampon phosphate. Toutes les conditions de réactions sont récapitulées Tableau 20. La concentration en enzyme est indiquée en unités/mL (U/mL). Les concentrations en tyrosinase utilisées étant variées, nous avons décidé dans un premier lieu de tester une vaste gamme de concentrations : de 22 U/mL à 888 U/mL (entrée 1 à 5 du Tableau 20). Toutes ces tentatives n'ont mené qu'à la récupération du produit de départ. Nous avons donc encore augmenté la concentration en enzyme et chauffé à 37 °C le milieu réactionnel pour nous rapprocher au maximum des conditions physiologiques, mais encore une fois, aucun produit ne se forme.

Nous avons alors changé le pH du milieu réactionnel, passant de 7.4 à 6.5. La réaction est donc relancée à température ambiante avec trois concentrations différentes : 50, 150 et 300 U/mL. Le milieu réactionnel a également été chauffé à 37 °C (entrée 7 à 10 du Tableau 20). Malheureusement aucune transformation n'est observée.

Nous avons également ajouté un co-solvant afin d'améliorer la solubilité de la guttiférone A 1, cette dernière n'étant pas soluble dans l'eau. Nous avons donc ajouté 1 % de DMSO et de méthanol (entrée 11 et 12 du Tableau 20), mais seul produit de départ est récupéré après plusieurs heures. La quantité d'enzyme est alors augmentée et plusieurs concentrations de

guttiférone A **1** sont testées (entrée 13 à 16 du Tableau 20), mais aucun nouveau produit n'apparaît. Le milieu réactionnel est chauffé à 40 °C, mais le résultat est le même que précédemment.

Tableau 20 : Conditions utilisées pour la réaction avec la tyrosinase

Entrée	Concentration guttiférone A 1 (mg/mL)	Concentration enzyme (U/mL)	pH	Température	Co-solvant (% v/v)	Résultat
1	0,5	22	7,4	TA		Guttiférone A 1
2	0,5	44	7,4	TA		Guttiférone A 1
3	0,5	88	7,4	TA		Guttiférone A 1
4	0,5	22	7,4	TA		Guttiférone A 1
5	0,5	888	7,4	TA		Guttiférone A 1
6	0,5	1150	7,4	37°C		Guttiférone A 1
7	0,5	50	6,6	TA		Guttiférone A 1
8	0,5	148	6,5	TA		Guttiférone A 1
9	0,5	300	6,6	TA		Guttiférone A 1
10	0,5	148	6,5	37 °C		Guttiférone A 1
11	0,5	148	6,5	TA	DMSO (1 %)	Guttiférone A 1
12	0,5	148	6,5	TA	Méthanol (1 %)	Guttiférone A 1
13	0,5	860	6,6	TA		Guttiférone A 1
14	0,25	860	6,6	TA	DMSO (10 %)	Guttiférone A 1
15	0,5	860	6,6	TA	DMSO (10 %)	Guttiférone A 1
16	1	860	6,6	TA	DMSO (10 %)	Guttiférone A 1
17	0,5	860	6,6	40°C		Guttiférone A 1

Malgré les multiples tentatives d'oxydation de la guttiférone A **1** *via* la tyrosinase, aucun produits n'a été formé et nous avons toujours récupéré seulement le produit de départ. Nous en avons donc conclu qu'il était impossible de faire réagir la guttiférone A **1** avec la tyrosinase : la géométrie de la molécule n'était probablement pas compatible avec le site actif de l'enzyme.

II.3 Synthèse de l'analogue de troisième génération

Nous avons vu dans l'avant propos que différents analogues de guttiférone A **1** ont déjà été synthétisés. Une première génération de composés a été obtenue en modifiant le cœur phloroglucinol, puis la deuxième génération en modifiant le catéchol (Schéma 13).

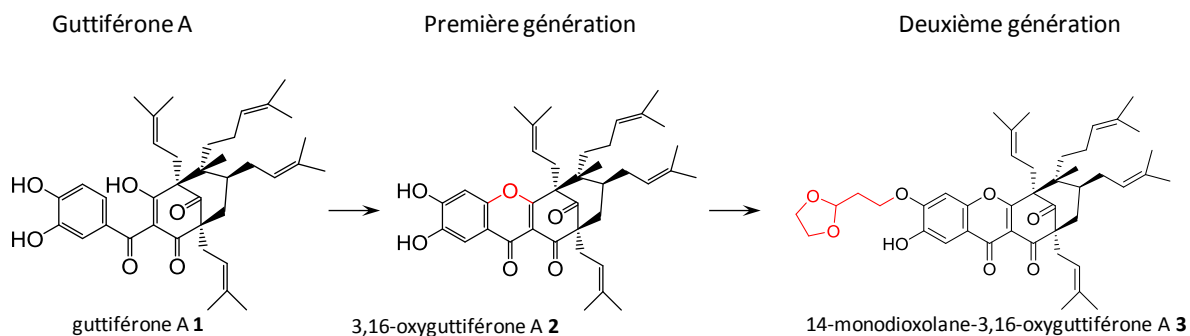


Schéma 13 : Chefs de file des analogues de première et deuxième génération

L'activité biologique contre les parasites des analogues de la guttiférone A, a été améliorée au fil des générations, notamment concernant la THA. En effet, le chef de file de cette série, le composé **3**, a une activité de l'ordre du nanomolaire et surtout un indice de sélectivité de 450. Nous avons donc décidé de continuer cette voie et de synthétiser une troisième génération d'analogues en modifiant les chaînes prényles. Dans l'optique de développer un médicament antiparasitaire, nous allons plutôt essayer d'oxyder les chaînes prényles pour augmenter l'hydrosolubilité de la molécule. En effet, un bon candidat médicament doit avoir une relativement bonne hydrosolubilité pour faciliter l'administration au patient. La guttiférone A et ses dérivés présentés ci-dessus sont lipophiles et donc peu soluble dans l'eau.

Plusieurs méthodes sont envisagées pour oxyder les chaînes prényles de la guttiférone A : la métathèse croisée¹¹⁸, l'époxydation¹¹⁹ et l'ozonolyse¹²⁰. Durant la thèse du Dr. Kevin Cottet, ces méthodes ont été testées (Schéma 14), mais elles ont conduit à la dégradation ou à la récupération du produit de départ¹.

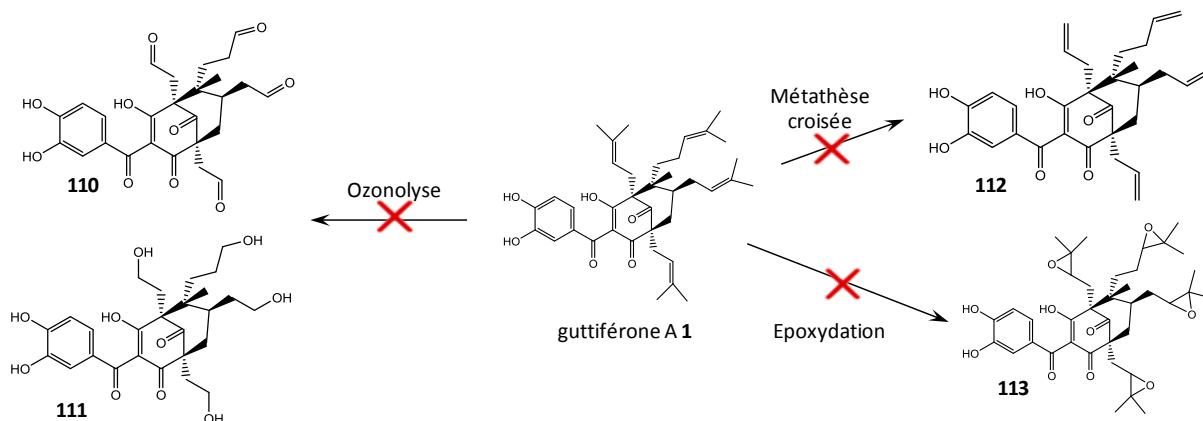


Schéma 14 : Récapitulatif des tentatives d'oxydation des prényles de la guttiférone A 1

¹¹⁸ J. Winkler *et al.*, Synthetic modification of manzamine A via Grubbs methathesis. Novel structures with enhanced antibacterial and antiprotozoal properties, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 4467-4469.

¹¹⁹ M.-R. Cha *et al.*, Anti-proliférative effect of synthesized bakuchiol analogues on cultured human tumor cell lines, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2012**, 33, 2378-2380.

¹²⁰ L. Coutts *et al.*, A stereospecific synthesis of 24(S)-hydroxyvitamin D₂, a prodrug for 1a,24(S)-dihydroxyvitamin D₂, *Org. Process. Res. Dev.*, **2002**, 6, 246.

La métathèse croisée et l'ozonolyse ont aussi été tentées sur l'oxyguttiférone A protégée sur sa partie catéchol **114**, ainsi qu'une di-hydroxydation avec de l'Ad mix¹²¹ et une hydroxylation avec de l'oxyde de sélénium¹²² (Schéma 15). Seule l'hydroxylation utilisant l'oxyde de sélénium a conduit à la formation du produit désiré **116** avec un rendement 37 %. Cette réaction n'a été réalisée qu'une seule fois, le rendement n'a donc pas pu être optimisé et la quantité de produit obtenue était trop faible, pour réaliser les tests d'activités antiparasitaires. L'objectif de cette partie est donc de resynthétiser ce composé en plus grande quantité pour pouvoir réaliser ces tests.

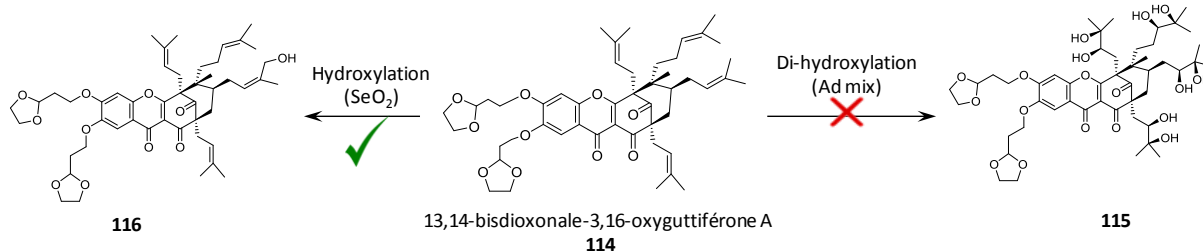


Schéma 15 : Récapitulatif des tentatives d'oxydation des prényles de l'oxy-guttiférone A 1 protégée

II.3.1 Cyclisation intramoléculaire

Dans le but de synthétiser l'analogue de 3^{ème} génération, nous avons tout d'abord commencé par la première étape permettant d'obtenir les analogues de première génération : la cyclisation intramoléculaire de la guttiférone A permettant d'obtenir les deux dérivés de type xanthone 1,16-oxyguttiférone A **105** et 3,16-oxyguttiférone A **2**.

La méthode développée par le Dr Kevin Cottet au cours de sa thèse a donc été réutilisée, c'est-à-dire l'utilisation de 10 équivalents de carbonate de lithium et 10 équivalents de ferricyanure de potassium dans un mélange méthanol/eau (proportions 1/4)¹. La 1,16-oxyguttiférone A **105** et la 3,16-oxyguttiférone A **2** ont bien été obtenues avec des rendements de 19 % et 59 % respectivement (Schéma 16).

Par rapport aux travaux réalisés par le Dr Cottet, la 12-hydroxy-1,16-oxyguttiférone A **117** et la 12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone **106** sont apparues avant la consommation totale du réactif de départ. Nous avons donc observé jusqu'à 3 % et 6 % de 12-hydroxy-1,16-oxyguttiférone A **117** et 12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone **106** respectivement (Schéma 16). Les raisons qui ont conduit à l'apparition de ces composés avant la disparition totale du réactif de départ n'ont pas pu être déterminées.

¹²¹ 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 lutarines A-C, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 139-142.

¹²² N. Koolaji *et al.*, Synthesis of C- and O-prenylated tetrahydroxystilbenes and O-prenylated connamates and their action towards cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 63, 415-422.

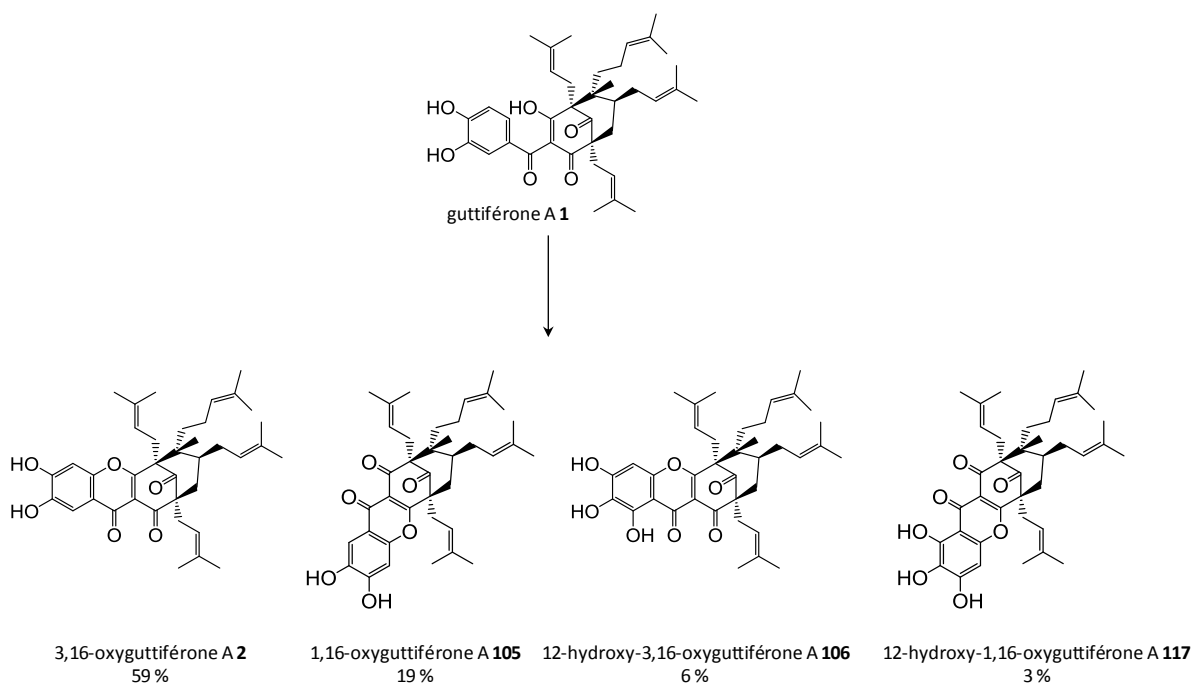


Schéma 16: Cyclisation intramoléculaire de la guttiférone A 1

II.3.2 Synthèse du 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone A 114

La deuxième étape correspond à la synthèse du chef de file des analogues de deuxième génération : le 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone A. Nous avons réutilisé les conditions mises au point par le Dr Cottet lors de sa thèse : 1 équivalent de carbonate de césium, 10 équivalents de carbonate de potassium et 5 équivalents de 2-(2-bromoéthyle)-1,3-dioxolane¹. La réaction est réalisée dans l'acétone à reflux, pendant six heures sous atmosphère inerte (Schéma 17).

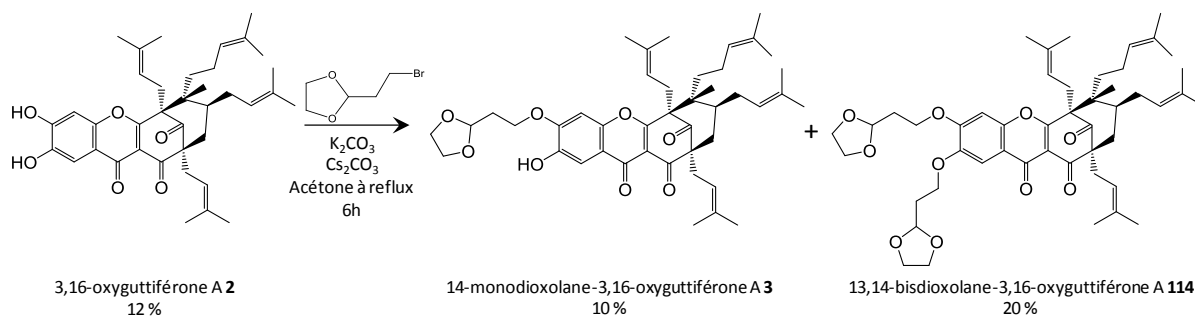


Schéma 17 : Synthèse du 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone A

La 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone A 114 a été obtenue, après purification par HPLC préparative, avec un rendement de 20 %, bien moins bon que dans les travaux du Dr. Cottet, qui l'obtenait avec un rendement de 75 %. La 14-monodioxolane-3,16-oxyguttiférone A 3 a quant à elle été obtenue avec un rendement de 10 %, comparable au rendement obtenu lors des travaux précédents. Le produit de départ a également été récupéré avec un rendement

de 10 %. Les 52 % restant correspondent à de la dégradation, ainsi qu'à des pertes lors de la purification.

II.3.3 Synthèse du 28-hydroxy-13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone **116**

La dernière étape de synthèse correspond à l'hydroxylation d'une chaîne prényle du 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone A **114** (Schéma 18).

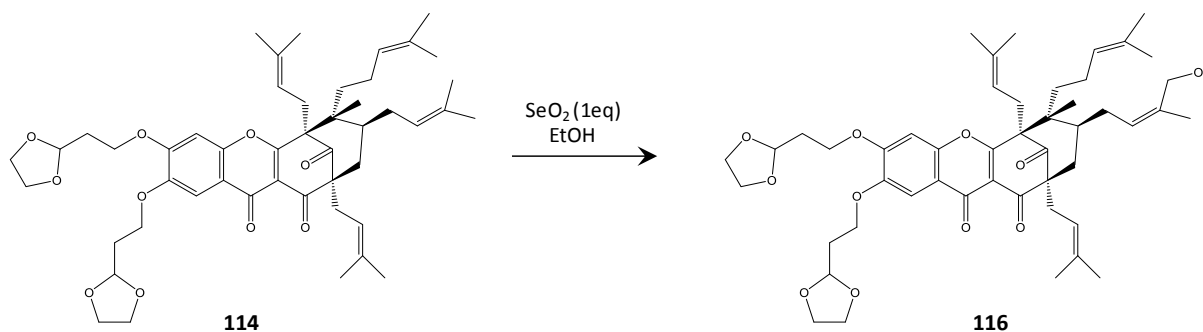


Schéma 18 : Hydroxylation du 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiférone A avec de l'oxyde de sélénium

Les premiers essais se sont révélés infructueux, le composé désiré ne s'est pas formé et le produit de départ a été récupéré. La quantité de d'oxyde de sélénium a été augmentée à deux équivalents et toujours pas de réaction. Ce résultat est très étonnant car au cours de la thèse du Dr Cottet, cette réaction avait été au contraire difficile à contrôler. Au-delà d'un équivalent, beaucoup de sous produits apparaissent¹.

D'autres essais ont été réalisés, un changement de lot d'oxyde de sélénium a également été effectué. Lors de ces tentatives, le produit désiré **116** a finalement été obtenu dans les conditions initiales (1 eq d'oxyde de sélénium) mais avec un taux de conversion faible de 8 % par rapport au 37 % obtenu par le Dr. Cottet¹. Malheureusement les quantités engagées n'ont pas permis la purification du brut réactionnel avec un si faible taux de conversion.

II.4 Cyclisation intramoléculaire de la guttiférone C

Nous avons décidé d'appliquer la même stratégie de cyclisation intramoléculaire à la guttiférone C **51** pour obtenir la 1,16-oxyguttiférone C **118** et la 3,16-oxyguttiférone C **119**. Les mêmes conditions que pour la guttiférone A ont été appliquées à la guttiférone C : 10 équivalents de ferricyanure de potassium et 10 équivalents de carbonate de lithium dans un mélange méthanol/eau (1/4). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 20 minutes. Après traitement et purification, trois produits ont été obtenus : les deux oxyguttiférones attendues et la 12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone C **120** (Schéma 19). Comme pour la cyclisation intramoléculaire de la guttiférone A **1** (voir II.3.1), la 12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone **120** apparaît avant la consommation complète de la guttiférone C **51**. En revanche, le produit de suroxydation de la 1,16-oxyguttiférone C **118** n'a pas été observé. Le ratio entre les deux oxyguttiférones C est de 5.5/1. La forme 3,16-oxyguttiférone C **119** est nettement favorisée, dans le cas de la guttiférone A le ratio n'était que de 2.5/1.

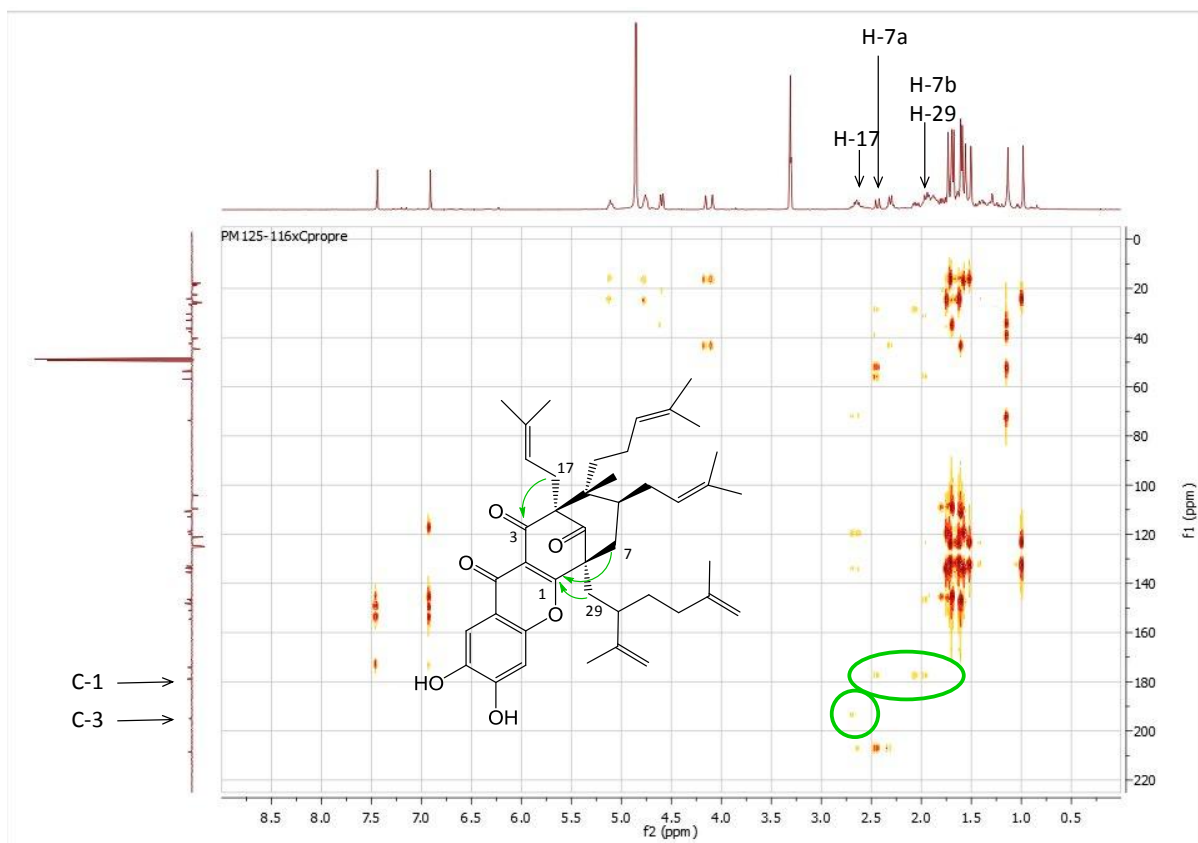


Figure 49 : Spectre RMN HMBC de la 1,16-oxyguttiférone C 118

Le spectre ^1H RMN de la 3,16-oxyguttiférone C **119** est représenté Figure 50. Comme précédemment, seuls deux protons aromatiques apparaissent et non plus trois, ce qui confirme la cyclisation intramoléculaire. La masse exacte de l'ion $[\text{M}+\text{Na}]$ est de 691.3985 g/mol, ce qui correspond à une masse exacte de molécule de 668.4087 g/mol. Cette masse est la même que son isomère 1,16-oxyguttiférone C **118**. La cyclisation de la position 16 sur le carbone 3 est confirmée par les corrélations HMBC entourées sur la Figure 51.

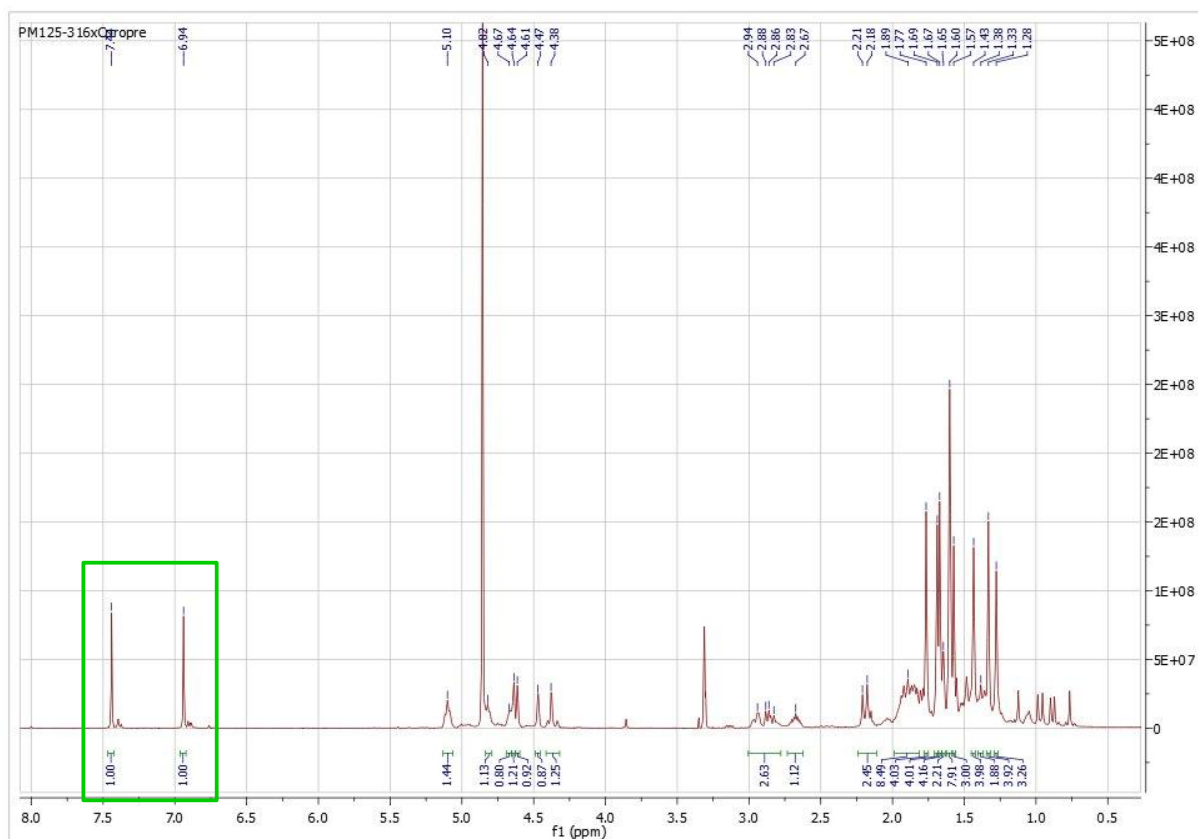


Figure 50 : RMN ^1H de la 3,16-oxyguttiférone C 119

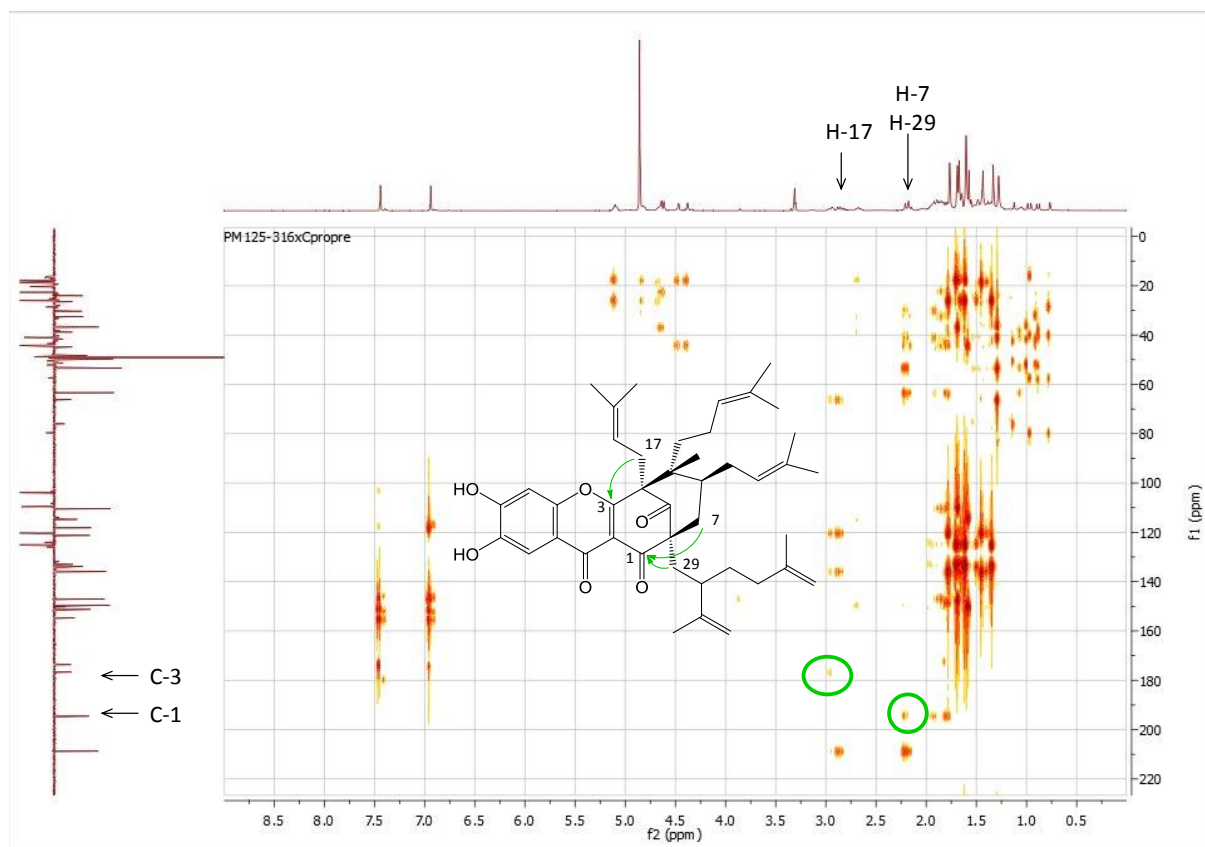


Figure 51 : Spectre RMN HMBC de la 3,16-oxyguttiférone C 119

Le spectre ^1H RMN de la 12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone **C 120** est présenté Figure 52. La disparition d'un proton entre 6 et 8 ppm montre bien la substitution sur le cycle aromatique. Le spectre HMBC est représenté Figure 53. L'absence de corrélation entre le proton aromatique et le carbone 10 prouve que le proton aromatique est en position 15 et que l'hydroxylation a bien eu lieu en position 12. La masse exacte de ce composé est de 683.3945 [M-H], ce qui confirme la présence d'un oxygène supplémentaire par rapport à la 3,16-oxyguttiférone **C 119**.

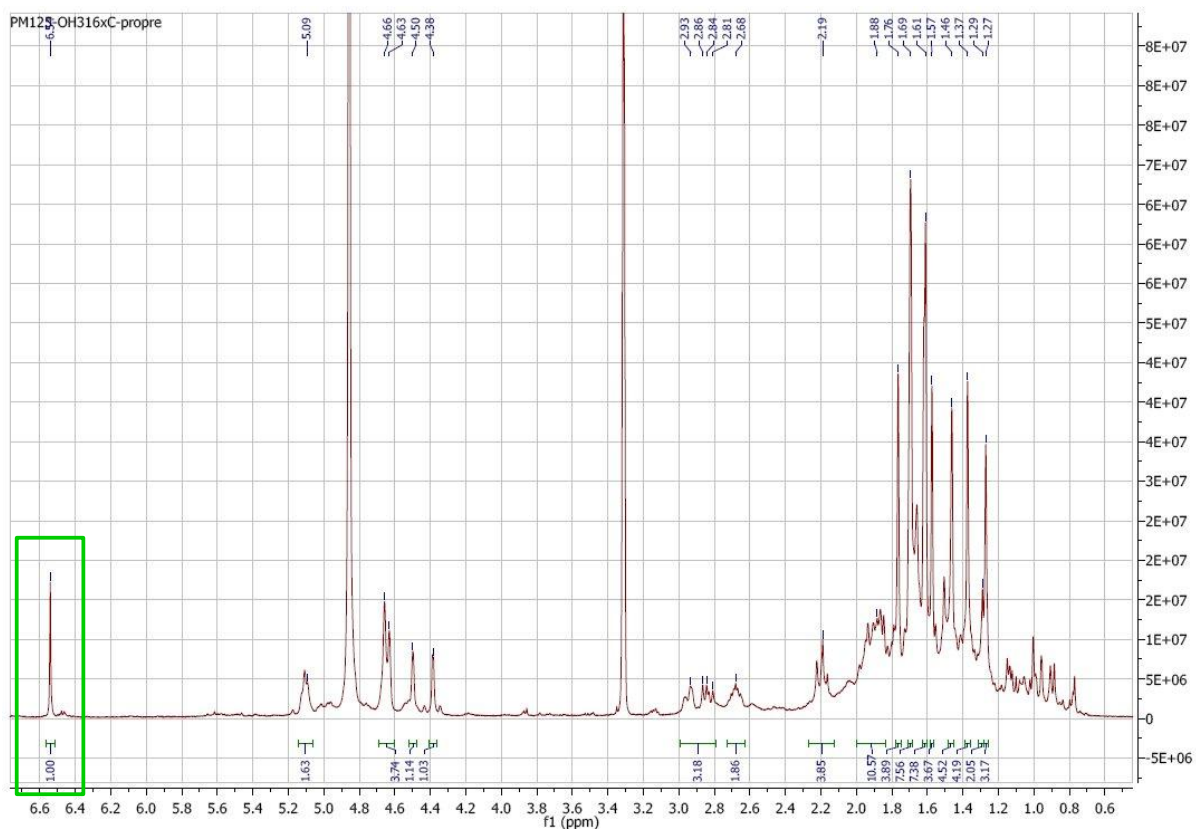


Figure 52: ^1H RMN de la 12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone **C 120**

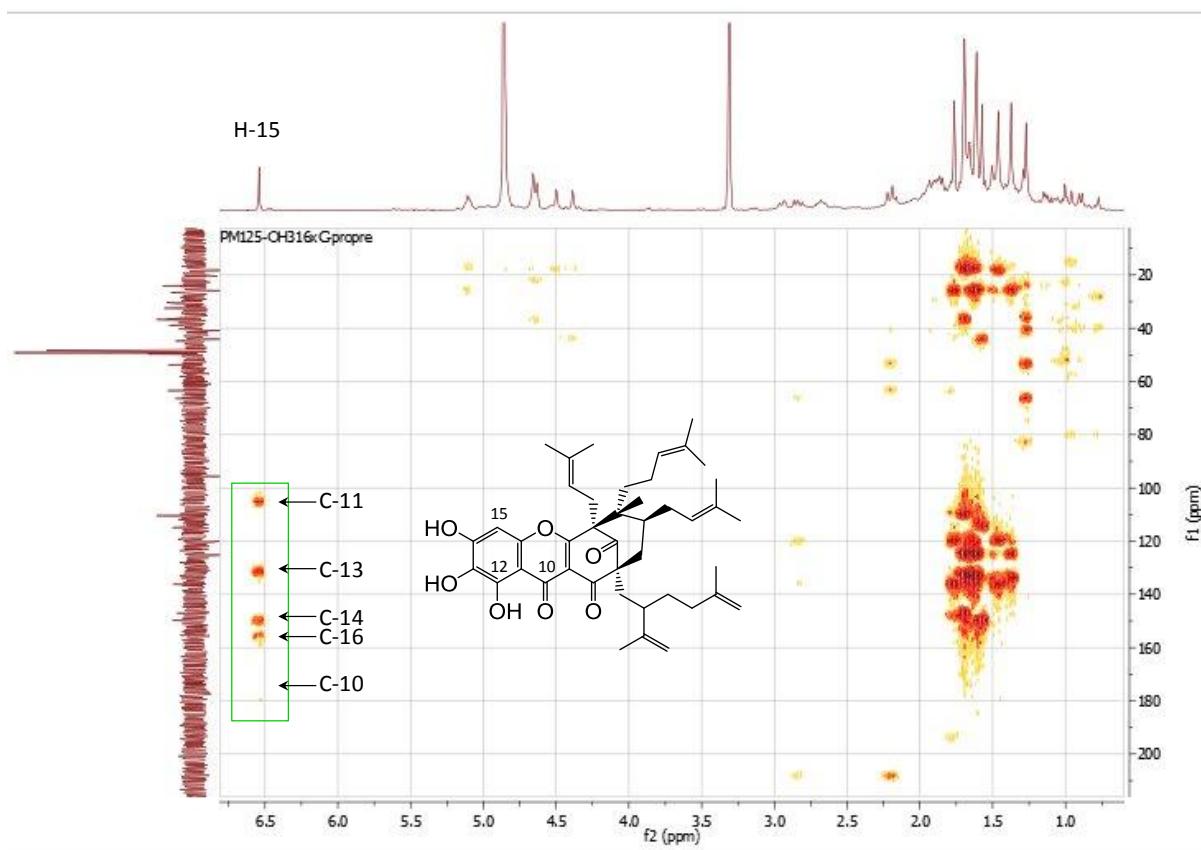


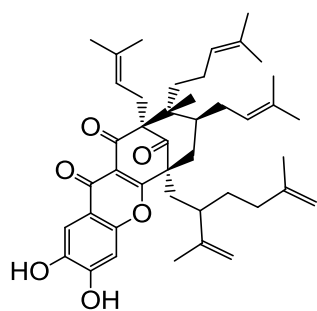
Figure 53 : Spectre HMBC de la 12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone C 120

III. Conclusion

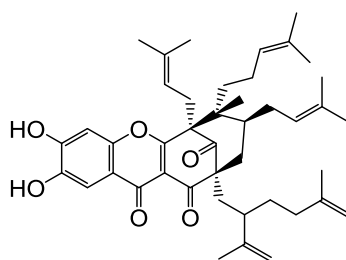
La matière première a été purifiée par CPC avec la méthode développée par le Dr. Kévin Cottet. Les rendements que nous avons obtenus, 6.5 % et 14 % respectivement pour la guttiférone A et C à partir du latex, sont moins bons que ceux qu'il avait obtenus, c'est-à-dire 12 % et 17 %. Il semblerait que le latex dont nous disposons soit moins riche en guttiférone A. Nous ne pouvons pas comparer les teneurs en guttiférone C car celle-ci n'avait pas été dosée précédemment.

Les différentes méthodes testées pour l'hémisynthèse de la guttiférone A n'ont malheureusement pas abouti. La synthèse du composé hydroxylé en position 28 sur une chaîne prényle **116** n'a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes pour réaliser les tests biologiques.

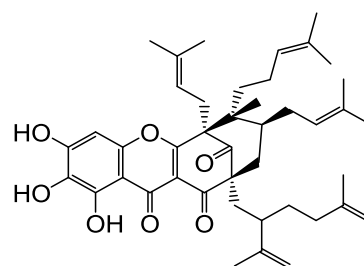
Deux oxyguttiférone C et une hydroxy-oxyguttiférone ont été synthétisées (Figure 54).



1,16-oxyguttiférone C **118**



3,16-oxyguttiférone C **119**



12-hydroxy-3,16-oxyguttiférone C **120**

Figure 54 : Analogues de guttiférone C

Les résultats de l'hémisynthèse par voie chimique a conduit à la synthèse de plusieurs composés mais avec de faibles rendements. Nous avons donc envisagé d'autres méthodes.

Partie 2 :

Hémisynthèse de guttiférones par biotransformations

Hémisynthèse de guttiférones par biotransformations

Les travaux d'hémisynthèse présentés dans la partie précédente n'ont pas permis d'aboutir aux analogues modifiés sur les chaînes prényles espérés. Cette partie présentera les travaux d'hémisynthèse *via* une autre méthode que nous avons envisagée : les biotransformations de guttiférone A **1** et C **51**.

I. Hémisynthèse d'analogue de guttiférones par biotransformations

I.1 Introduction

I.1.1 *Les biotransformations*

Les bioconversions se définissent par l'usage de systèmes biologiques pour induire des modifications structurales sur des molécules qui ne sont pas leurs substrats naturels¹²³. Ce terme regroupe deux méthodologies différentes :

- La biocatalyse qui est l'utilisation d'enzymes purifiées ;
- Les biotransformations qui utilisent les organismes entiers.

Le panel de micro-organismes disponibles pour les biotransformations est vaste et diversifié. Il peut s'agir de bactéries, levures ou champignons. Ils ont l'avantage d'effectuer des modifications structurales qui sont souvent chimio-, régio- et stéréo-sélectives grâce à leur système enzymatique^{124,125}. Les biotransformations existaient bien avant que l'Homme décide de s'en servir. La transformation de matière organique en pétrole est par exemple due à des bactéries anaérobies¹²⁶.

Un des domaines dans lequel l'Homme utilise le plus les micro-organismes est le secteur de l'agroalimentaire. Nous pouvons citer comme exemples : la levure dans le pain ou les pâtisseries, la fermentation du lait pour la fabrication des yaourts¹²⁷ et la fabrication du fromage.

¹²³ N. Sultana, Microbial biotransformation of bioactive and clinically usefull steroids and some salient features of steroids and biotransformation, *Steroids*, **2018**, 136, 76-92.

¹²⁴ K. Borges *et al.*, Stereoselective biotransformation using fungi as biocatalysts, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 385-397.

¹²⁵ L. Andrade *et al.*, Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, **2004**, 31, 129-135.

¹²⁶ R. Buick *et al.*, Archean oil: evidence for extensive hydrocarbon generation and migration 2.5-3.5 Ga, *AAPG Bulletin*, **1998**, 82, 50-69

¹²⁷ A. Sigdel *et al.*, Phytochemicals and syneresis of osmo-dried mulberry incorporated yoghurt, *Food Science & Nutrition*, **2018**, 6, 1045-1052.

On peut également ajouter le biocontrôle dans le domaine de l'agriculture, avec l'utilisation de micro-organismes pour protéger les cultures. C'est une solution alternative à l'utilisation de pesticides chimiques. Par exemple, *Verticillium lecanii* est utilisé pour lutter contre les aleurodes (petites mouches blanches)¹²⁸. Dans le domaine de l'environnement, les micro-organismes sont déjà très utilisés, dans les stations d'épuration par exemple, pour leur capacité à piéger les métaux lourds notamment. Il s'agit alors de biorémédiation. Mais leur potentiel prometteur n'est pas encore totalement exploité. Des études récentes montrent leur capacité à dégrader certains plastiques, le polyéthylène par exemple¹²⁹.

De très nombreux secteurs font désormais appel aux micro-organismes. En effet, ils ont beaucoup d'avantages. Tout d'abord, ils sont supposés avoir une capacité illimitée d'adaptation aux nouveaux environnements et sont capables de métaboliser une grande variété de substrats comme source de carbone et d'hydrogène. Ensuite, ils font appel à des conditions réactionnelles dites « douces », c'est-à-dire température et pression ambiante, ce qui réduit la consommation d'énergie et les coûts de production. Ils sont donc un atout pour la production industrielle, car les procédés faisant appel aux biotransformations ont un faible impact environnemental : en plus de consommer moins d'énergie que certaines réactions de chimie classique, les déchets industriels sont également réduits. Tous ces procédés les impliquant se regroupent sous le terme « biotechnologie ».

L'industrie pharmaceutique est un domaine majeur de l'utilisation des micro-organismes. À cet effet, deux options s'envisagent :

- étudier les propres métabolites secondaires du micro-organisme, on parle alors de fermentation ;
- utiliser la capacité des micro-organismes à transformer les molécules, pour créer des analogues inédits, qu'on ne peut éventuellement pas obtenir par chimie classique.

L'isolement et la caractérisation des métabolites secondaires des micro-organismes peuvent permettre l'obtention d'un grand nombre de molécules nouvelles avec de potentielles activités biologiques. 31 600 métabolites secondaires de micro-organismes ont été décrits dans la littérature depuis 1900¹³⁰. Certain d'entre eux sont même commercialisés comme la pénicilline et ses dérivés. En 2005, 22 000 métabolites décrits possédaient des activités biologiques, 45 % d'entre eux ont été isolés d'actinomycètes, 38 % de champignons et les 17 % restant d'autres types de bactéries¹³¹.

¹²⁸ T. Alavo, The insect pathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and its use for pests control : a review, *JEBAS*, **2015**, 3, 337-345.

¹²⁹ S. Sen *et al.*, Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE) : a review, *J. Environ. Chem. Eng.*, **2015**, 3, 462-473.

¹³⁰ L. Carrano *et al.*, the relevance of chemical dereplication in microbial natural product screening, *J. Appl. Bioanal.*, **2015**, 1, 55-67.

¹³¹ J. Berdy, Bioactive microbial metabolites, *J. Antibiot.*, **2005**, 58, 1-26.

Concernant la seconde option, la capacité des micro-organismes à biotransformer des substrats qu'ils ne côtoient pas naturellement est de plus en plus étudiée¹³². En effet comme nous l'avons vu précédemment ils font appel à des conditions de réaction dites « douces » et plus respectueuses des principes de « chimie verte ». Les réactions souvent chimio-, régio- et stéréospécifiques sont également un avantage indéniable pour le domaine pharmaceutique, car les énantiomères peuvent avoir des effets complètement différents : rappelons l'exemple très médiatisé du thalidomide, un anti-nauséeux commercialisé à la fin des années 1950. Il était énormément prescrit aux femmes enceintes car très efficace. Malheureusement la molécule était présente sous sa forme racémique, soit la présence des deux formes énantiomériques *R* et *S* dans les comprimés. Une forme était belle et bien anti-nauséuse, mais l'autre était fortement tératogène. De nombreux bébés sont nés avec de graves malformations et le médicament a très vite été retiré du marché. Les biotransformations, capables de produire un seul énantiomère, sont donc un outil clé pour l'industrie pharmaceutique.

De nombreuses biotransformations régio et stéréo-sélectives ont été décrites dans la littérature. Ces réactions sont diverses : hydroxylation, sulfoxydation, époxydation, oxydation de Baeyer-Villiger... Les micro-organismes vont produire un seul produit à partir d'un substrat. Pour obtenir plusieurs isomères, deux stratégies sont décrites dans la littérature : modifier le substrat ou varier les micro-organismes. Nous pouvons citer à titre d'exemple les travaux de B. Nagy et al. Cette équipe a développé une méthode pour obtenir le (*R*)-bufuralol et le (*S*)-bufuralol après une légère modification du substrat¹³³. Cette molécule présente un grand intérêt pharmaceutique mais les deux énantiomères n'ont pas les mêmes activités : la forme *S* est un β -bloquant recommandé pour le traitement de l'hypertension alors que la forme *R* est un marqueur d'activité hépatique. Cette méthode est basée sur une étape de biotransformation de deux cétones prochirales **121** et **125** par *Saccharomyces cerevisiae* pour donner les alcools correspondants avec d'excellents excès énantiomériques de 98 % et 96 %. Cette stéréospécificité s'explique certainement par l'encombrement lié au groupement acétyle.

¹³² L. Bianchini *et al.*, Microbial biotransformation to obtain new antifungals, *Front. Microbiol.*, **2015**, 6, article 1433.

¹³³ B. Nagy *et al.*, New chemo-enzymatic approaches for the synthesis of (*R*)- and (*S*)-bufuralol, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2014**, 25, 1316-1322.

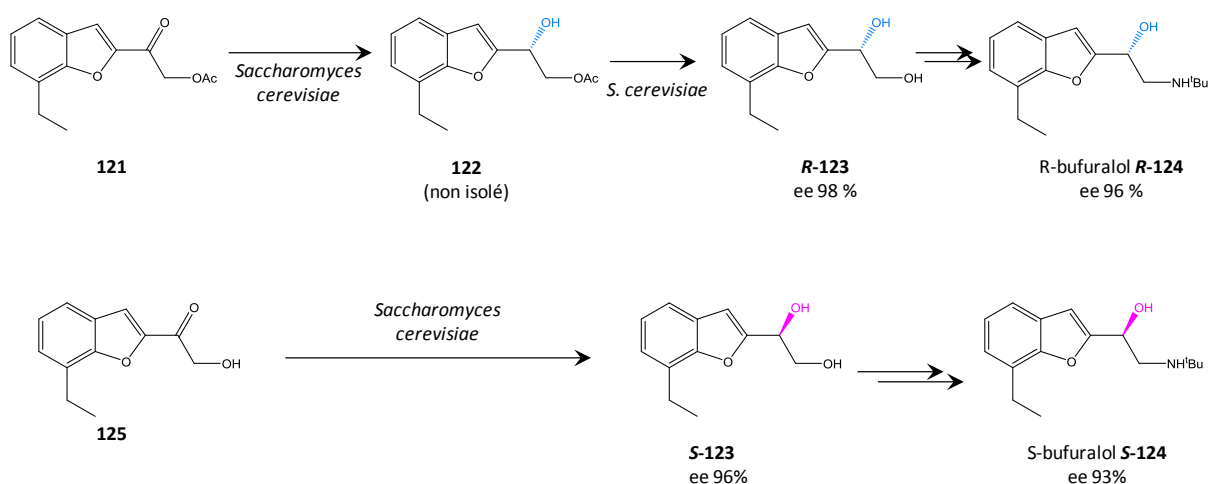


Schéma 20 : Réduction stéréosélective par *S. cerevisiae* pour la synthèse du bufuralol¹³³

La diversité d'isomères obtenue par changement de micro-organisme peut être illustrée par les travaux de D. Buisson *et al.* qui portent sur la réduction stéréocontrôlée des β -cétoesters aliphatiques^{134,135}. La levure *Saccharomyces cerevisiae* ne produit que la forme *R* de l'alcool correspondant alors que le champignon *Geotrichum candidum* ne produit que la forme *S*. Les deux produits sont obtenus avec l'excellent excès énantiomériques de 99 % (Schéma 21).

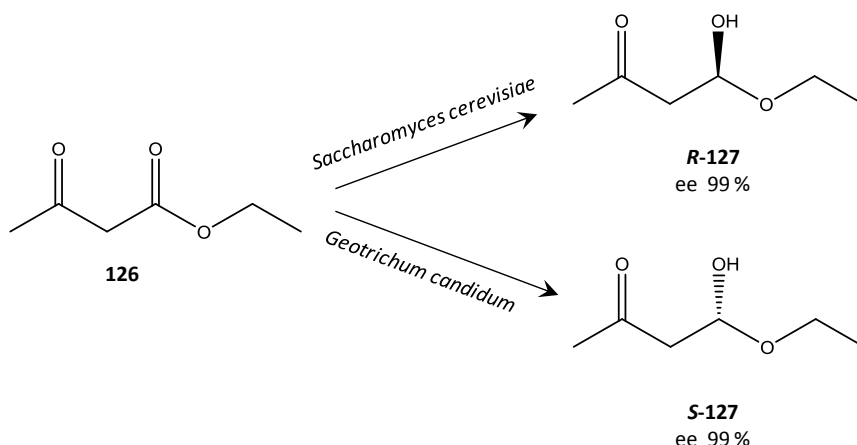


Schéma 21 : Réduction stéréosélectives des β -cétoesters aliphatiques

La réduction des β -cétoesters cycliques a elle aussi été étudiée, par C. Abalain *et al.* et une fois encore, le changement de micro-organisme permet d'obtenir trois isomères sur les quatre possibles (Schéma 22)¹³⁶.

¹³⁴ D. Buisson *et al.*, Stereocontrolled reduction of β -ketoesters by *Geotrichum candidum*. Preparation of D-3-hydroxyalkanoates, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, 2, 987-988.

¹³⁵ D. Buisson *et al.*, A study of the stereocontrolled reduction of aliphatic β -ketoesters by *Geotrichum candidum*, *Biocatalysis*, **1992**, 5, 249-265.

¹³⁶ C. Abalain *et al.*, selective synthesis of 1- and 3-carbomethoxy 2-tetralol stereoisomers by microbial reduction of the corresponding tetralones, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 2983-2996.

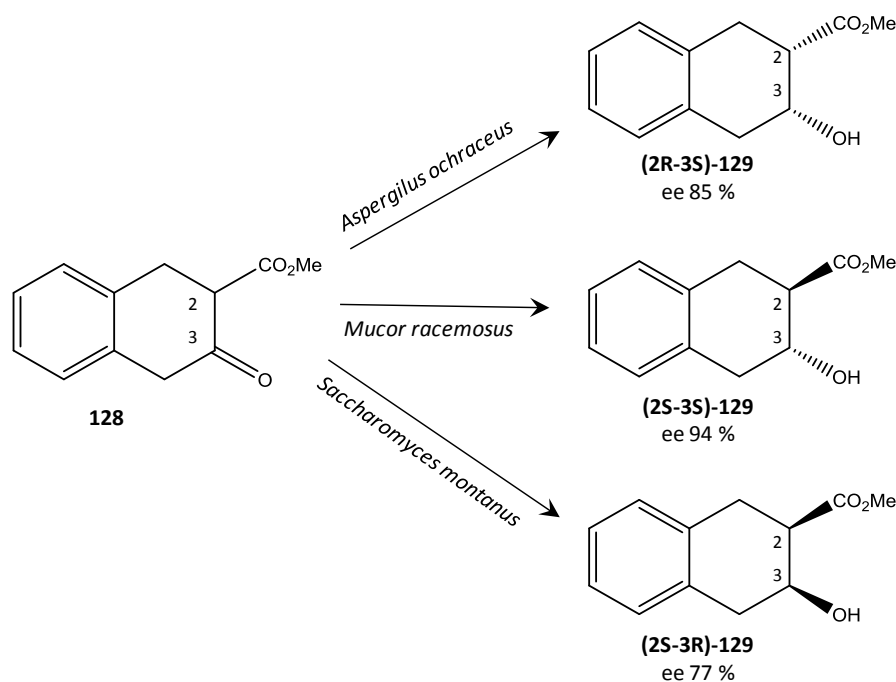


Schéma 22 : Réduction stéréosélective des cétoesters cycliques

Les biotransformations permettent de créer une large bibliothèque d'analogues de molécules d'intérêt pharmaceutique déjà décrites. Des molécules actuellement commercialisées sont encore étudiées par biotransformation. Il en résulte des analogues déjà connus mais aussi de nouveaux analogues jamais décrits. Nous pouvons citer deux exemples :

- La prednisone **130** est couramment utilisée dans le traitement de l'asthme sévère, des maladies des reins, etc ... La biotransformation de la prednisone par *Cunninghamella elegans* produit deux métabolites : le composé **131**, déjà connu et le composé **132**, métabolite inédit qui possède une meilleure activité inhibitrice de la lipoxgénase que la prednisone (Schéma 23)¹³⁷.

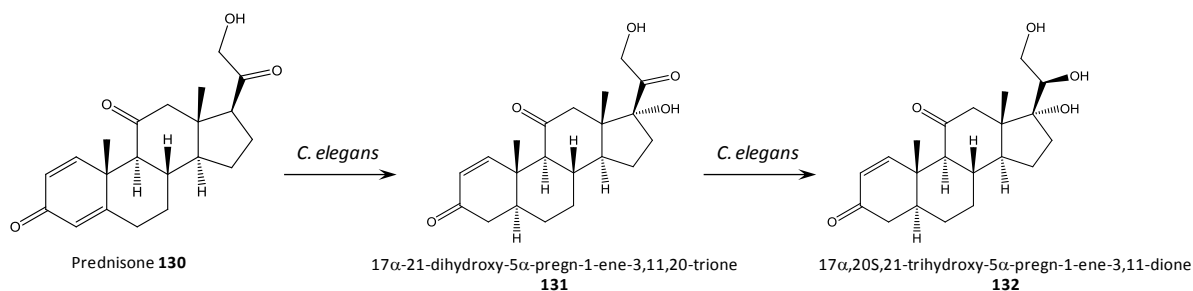


Schéma 23 : Métabolisme de la prednisone par *C. elegans*

- La Trimegestone® **133** est un analogue de progestérone utilisé pour traiter les syndromes dus à la ménopause, et notamment dans la prévention de l'ostéoporose

¹³⁷ N. Sultana, Microbial biotransformation of bioactive and clinically usefull steroids and some salient features of steroids and biotransformation, *Steroids*, **2018**, 136, 76-92.

post-ménopause. L'équipe de R. Azerad et al. a étudié les biotransformations de cette molécule par différents micro-organismes¹³⁸. De nombreux métabolites ont été observés et notamment ceux présentés Schéma 24 qui présentent de meilleures activités mimétiques de la progestérone que le composé parent.

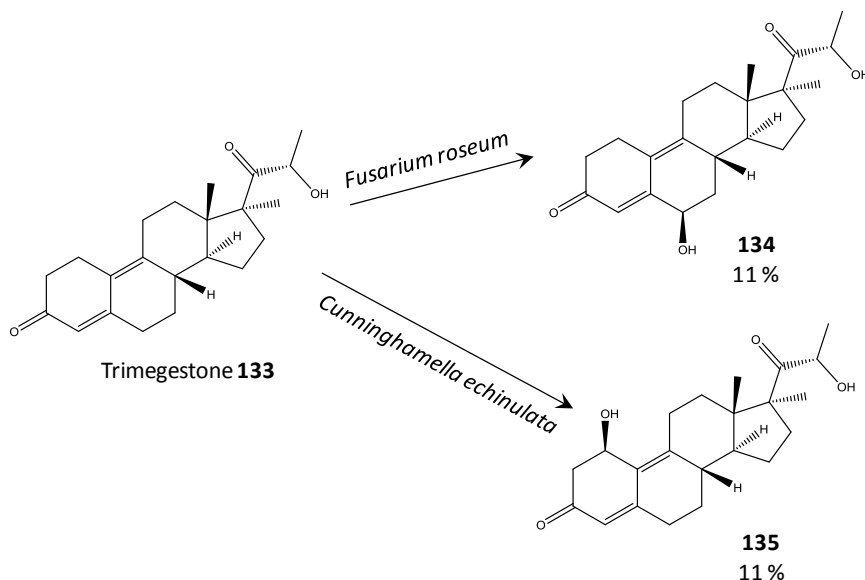


Schéma 24 : Biotransformation de la Trimegestone

L'utilisation des biotransformations dans l'industrie pharmaceutique ne se limite pas à la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Elles sont également utilisées pour prédire le métabolisme des médicaments chez les mammifères. Ce concept a été décrit pour la première fois par R. Smith et J. Rosazza en 1974¹³⁹. Ils ont choisi onze micro-organismes décrits dans la littérature comme étant capables de métaboliser les composés aromatiques, parmi lesquels deux espèces d'*Aspergillus*, deux espèces de *Cunninghamella*, deux espèces de *Streptomyces* et une espèce de *Curvularia*. Treize composés aromatiques modèles dont le métabolisme chez le mammifère est bien décrit ont également été sélectionnés. Les résultats montrent que pour onze des treize composés étudiés, les métabolites observés par biotransformation corrèlent très bien avec les métabolites identifiés dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de métabolismes de mammifère.

I.1.2 Les biotransformations de chaînes prényles

Nous avons vu dans la partie II.3 que le Dr Kevin Cottet a tenté de nombreuses méthodes pour oxyder les chaînes prényles de la guttiférone A, mais un seul produit d'oxydation a été obtenu, le composé **116**. Les chaînes prénylées de la guttiférone A semblent avoir une

¹³⁸ R. Azerad et al., Microbial models of drug metabolism: microbial transformation of trimegestone (RU27987), a 3-Keto- $\Delta^{4,9(10)}$ -19-norsteroid drug, *Bioorg Med. Chem.*, **1999**, 7, 232-2341.

¹³⁹ R. Smith *et al.*, Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic Hydroxylation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1974**, 161, 551-558.

réactivité particulière et compliquée. Les méthodes de chimie classique ne sont pas reproductives pour les oxyder. Nous nous sommes donc intéressés aux biotransformations.

Notre idée était de biotransformer les chaînes prényles de la guttiférone A. Deux réactions principales sont envisageables :

- l'hydroxylation sur les méthyles des prényles pour former un alcool allylique ;
- l'époxydation de la double liaison. Cet époxyde peut ensuite être hydrolysé en diol ou subir une cyclisation intramoléculaire par l'attaque d'un hydroxyde voisin.

Ces réactions ont déjà été décrites dans la littérature. Le Tableau 21 récapitule certains exemples.

L'étude de l'entrée 1 du Tableau 21 porte sur la biotransformation de la kurarinone **136**. Deux métabolites sont formés : un diol issu de l'hydrolyse d'un époxyde **137** et un produit d'hydroxylation sur un méthyle **138**.

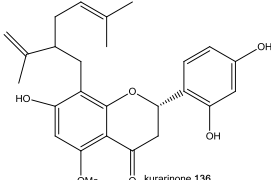
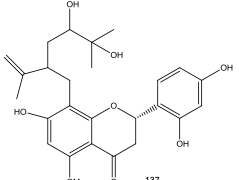
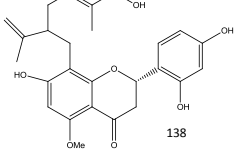
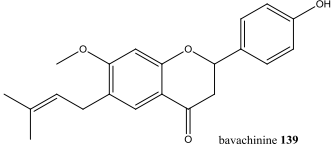
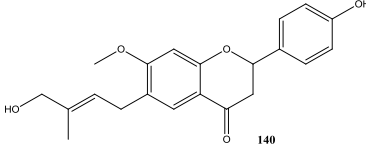
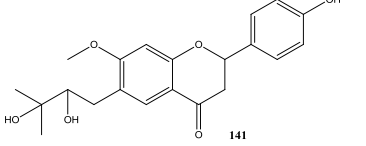
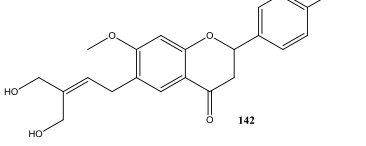
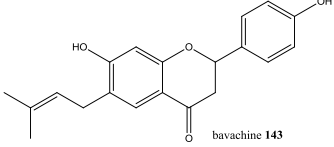
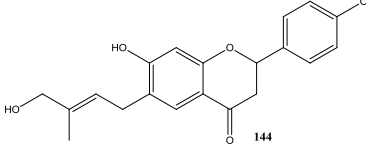
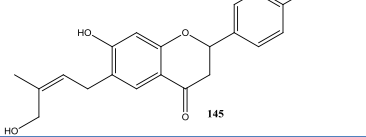
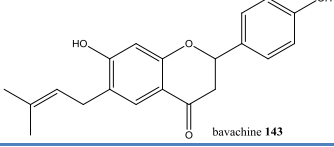
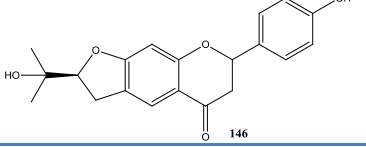
La biotransformation de la bavachinine **139** a été étudiée par deux champignons : *Cunninghamella blakesleeana* et *Cunninghamella elegans*. Ces deux souches ont produit le diol issu de l'hydrolyse de l'époxyde formé sur la double liaison **141** et un produit hydroxylé sur un méthyle **140**. La souche *C. elegans* est capable de suroxyder ce dernier métabolite pour produire un composé hydroxydé sur chaque méthyle **142** (entrée 2 du Tableau 21).

La biotransformation de la bavachine **143** par *Cunninghamella blakesleeana* et *Cunninghamella elegans* a produit deux composés d'hydroxylation méthylrique **144** et **145** (entrée 3 du Tableau 21). La biotransformation de la bavachine **143** a également été étudiée par un champignon, *Absidia coerulea* et d'autres métabolites ont été obtenus, tous issus de l'époxydation de la double liaison. L'époxyde a ensuite été hydrolysé, pour former le composé **148**, ou a subi l'attaque du groupement hydroxyle voisin, ce qui a entraîné la fermeture du cycle furanique pour former les composés **146** et **147** (entrée 4 du Tableau 21).

Les travaux de A. Bartmanska *et al.* (entrée 5 du Tableau 21) ont également attiré notre attention car un seul produit est formé avec un bon rendement de 51.5 %.

Il est intéressant de constater que les produits obtenus par biotransformation diffèrent selon le micro-organisme utilisé et qu'un même micro-organisme peut produire plusieurs produits d'hydroxylation : l'hydroxylation peut avoir lieu sur les méthyles ou sur la double liaison. Les biotransformations sont donc une source de diversité chimique.

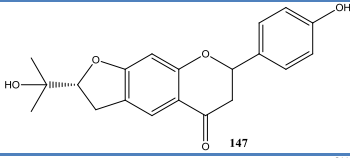
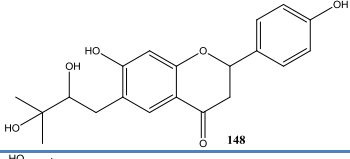
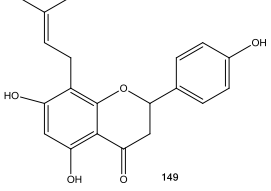
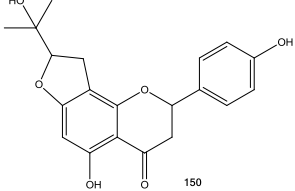
Tableau 21 : Exemples des biotransformations de chaînes prényles décrites dans la littérature

Entrée	Substrat	Produit	Microorganisme	Rendement
1 ¹⁴⁰	 kurarinone 136	 137	<i>Cordyceps militaris</i>	R=OH 1.3% R=OMe 2.1%
		 138		2.7%
2 ¹⁴¹	 bavachinine 139	 140	<i>C. blakesleeana</i>	<i>C. elegans</i> 18% 15%
		 141	7%	11%
		 142	/	5%
3 ¹⁴¹	 bavachine 143	 144	<i>C. blakesleeana</i>	<i>C. elegans</i> 2% 3%
		 145	5%	6%
4 ¹⁴²	 bavachine 143	 146	<i>Absidia coerulea</i>	21.8%

¹⁴⁰ X.-C. Ma *et al.*, Preparative isolation and purification of four prenylflavanones from microbial biotransformation of kurarinone by high-speed counter-current chromatography, *Sep. Purif. Technol.*, **2010**, 76, 140-145.

¹⁴¹ S. Ma *et al.*, Microbial transformation of prenylflavonoids from *Psoralea corulifolia* by using *Cunninghamella Blakesleeana* and *C. elegans*, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **2015**, 118, 8-15.

¹⁴² F. Han *et al.*, Microbial transformation of bavachin by *Absidia Coerulea*, *Phytochem. Lett.*, **2016**, 18, 136-139.

		31.3 %
		19.4 %
5 ¹⁴³		
		<i>Fusarium equiseti</i> 51.5%

I.2 Les travaux antérieurs

Comme nous l'avons vu précédemment, les biotransformations semblent être une technique prometteuse pour synthétiser des analogues difficiles à obtenir par chimie classique. Le Dr Yann Fromentin a entrepris lors de sa thèse la biotransformation de la guttiférone A *via* des micro-organismes¹⁴⁴. Le laboratoire de Pharmacognosie ne disposant pas des installations nécessaires pour réaliser les cultures des micro-organismes et les biotransformations, ces travaux ont été réalisés en collaboration et sous la direction du Dr Didier Buisson du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN).

I.2.1 Screening de la collection de micro-organisme du MNHN

À notre connaissance, le Dr. Yann Fromentin a été le premier à étudier et publier une méthode de biotransformations de PPAPs¹⁴⁵. Un criblage avait donc été effectué car aucune famille de micro-organismes ne pouvait être privilégiée. Tous les types de micro-organismes ont donc été criblés. Ce travail a porté sur 53 souches de micro-organismes (35 levures, 12 champignons et 6 bactéries). La conclusion de cette étude montre que seules trois levures biotransforment la guttiférone A, sur les 53 souches testées. Ce résultat ne permet cependant pas de conclure quant à la capacité des champignons et des bactéries à biotransformer la guttiférone A **1** car le nombre de souches testées est trop faible. Lors des premiers criblages, seules les levures ont donné des résultats, les efforts se sont donc concentrés sur cette famille de micro-organisme.

¹⁴³ A. Bartmanska *et al.*, Biotransformation of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin, *J. Biosci.*, **2010**, 65, 603-606.

¹⁴⁴ Y. Fromentin, Extraction et Hemisynthèse d'analogues de guttiférone A, thèse de doctorat, **soutenue le 27 septembre 2013**.

¹⁴⁵ Y. Fromentin *et al.*, Yeast-mediated xanthone synthesis through oxidative intramolecular cyclization, *Org. Lett.*, **2012**, 14, 5054-5057.

Le produit formé par ces trois souches est le même : la 3,16-oxyguttiférone A **2** (Schéma 25). La souche donnant les meilleurs résultats est *Rhodoturula buffonii*.

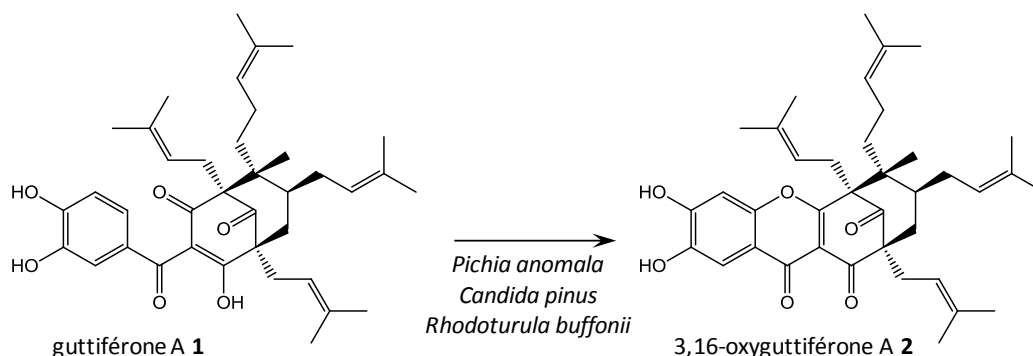


Schéma 25 : Biotransformation de la guttiférone A 1 par des levures

Les trois souches ont produit le même composé : la 3,16-oxyguttiférone A **2**. Aucun micro-organisme utilisé n'a donc modifié les chaînes prényles jusqu'ici. Il faudrait donc continuer le criblage de la collection du laboratoire MCAM. Ce travail est colossal et sans garantie de résultat. Une approche bioguidée a donc été envisagée à travers une étude de biotransformation par les endophytes de *Symphonia globulifera*. En effet, ces micro-organismes vivent au sein des tissus de la plante. Ils sont donc entourés en permanence par les métabolites secondaires de la plante et certains peuvent avoir adaptés leur système enzymatique à ces composés et seraient donc plus à même de les transformer¹⁴⁶.

1.2.2 Les endophytes

Les endophytes sont des micro-organismes vivant en symbiose dans les plantes. Ils participent ainsi activement au système métabolique de la plante. Bien que leur rôle ne soit pas encore totalement élucidé, un certain nombre de fonctions leur a d'ores et déjà été attribué, comme la production de métabolites de défense¹⁴⁷.

Les endophytes présentent un intérêt dans le domaine pharmaceutique, notamment pour la production de produits naturels bioactifs peu abondant dans la plante d'origine. Prenons le taxol à titre d'exemple. Il s'agit d'un antitumoral actuellement sur le marché, isolé par M. Wani, en 1971, de *Taxus bravifolia*, un if du Pacifique¹⁴⁸. Cette molécule agit sur la dépolymérisation de la tubuline pendant la division cellulaire. La quantité de taxol contenue dans la plante est faible : 0.01 – 0.03 % de la matière sèche, ce qui rend son coût élevé.

¹⁴⁶ A. Agusta *et al.*, Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe sp.* Isolated from a tea plant, *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, 53, 1565-1569.

¹⁴⁷ HW. Zhang *et al.*, Biology and chemistry of endophytes, *Natural Product Reports*, **2006**, 23, 753-771.

¹⁴⁸ M. Wani *et al.*, Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus bravifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 2325-2327.

Plusieurs études ont montré que certains endophytes de plusieurs ifs sont capables de produire du taxol : *Taxomyces andreanae* isolé de *Taxus brevifolia*¹⁴⁹ ou *Pestalotiopsis microspora* isolé de *Taxus wallachiana*¹⁵⁰.

Une autre étude a également montré que les endophytes de *Torreya grandifolia*, arbre de la famille *Taxaceae* (selon la classification APG III), comme les *Taxus sp*, peuvent également produire du taxol en faible quantité. Cette production peut être nettement augmentée par l'addition d'activateurs connus, le meilleur activateur ici étant l'acide benzoïque. Le taxol n'a pourtant jamais été identifié dans le *Torreya grandifolia*, ni dans aucun autre arbre du genre *Torreya*. Cette étude soulève la question de la sollicitation par la plante de la production de métabolites par les endophytes¹⁵¹.

Les biotransformations de produits naturels ont été étudiées aussi bien par des endophytes de la plante d'origine du produit, comme par d'autres endophytes. Les endophytes de *Huperzia serrata* ont notamment été étudiées par Z.-H. Gao *et al.* pour les biotransformations d'acide asiatique, un triterpène pentacyclique extrait du *Centella asiatica*. La souche étudiée est *Pestalotiopsis microspora*, et la réaction a conduit à la formation de six métabolites dont cinq n'avaient jamais été décrits dans la littérature¹⁵². Ces métabolites sont décrits dans le Schéma 26.

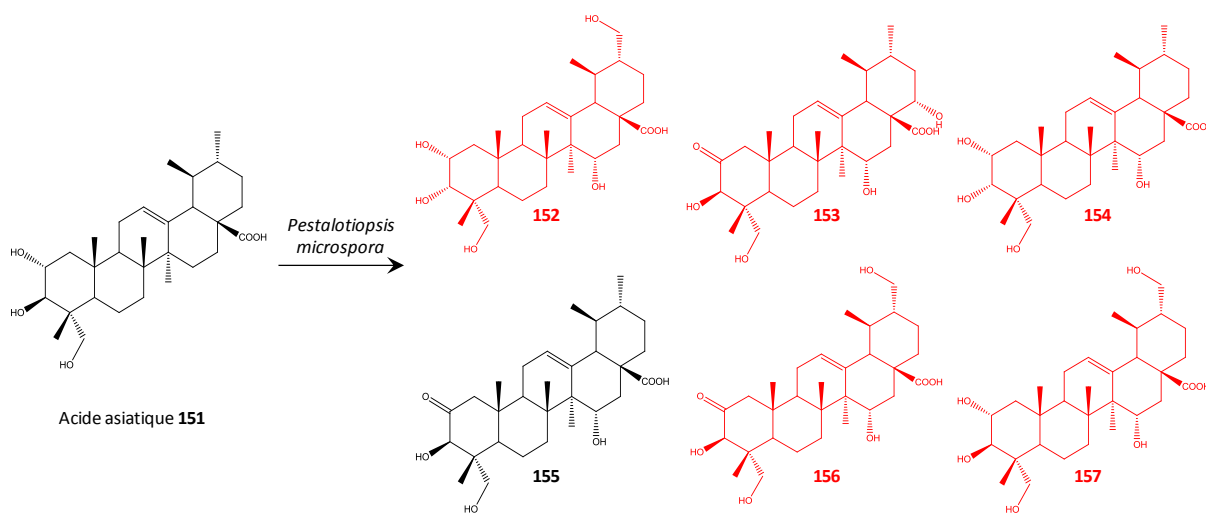


Schéma 26 : Biotransformation de l'acide asiatique par *Pestalotiopsis microspora*, un endophyte d'*Huperzia serrata*

Y.-M. Ying *et al.* ont quant à eux étudié les endophytes de cette même plante, *Huperzia serrata* mais pour la biotransformation de l'huperzine A, alcaloïde extrait de la

¹⁴⁹ A. Stierle *et al.*, Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew, *Science*, **1993**, 230, 2014-216.

¹⁵⁰ G. Strobel *et al.*, Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*, *Microbiol.*, **1996**, 142, 435-440.

¹⁵¹ L. Jy *et al.*, The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia sp* from *Torreya grandifolia*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 20, 259-264.

¹⁵² Z.-H. Gao *et al.*, Selective oxidation-reduction and esterification of asiatic acid by *Pestalotiopsis microspora* and anti-HCV activity, *Phytochem. Lett.*, **2017**, 19, 108-113.

plante hôte. Le squelette original et rigide de cette molécule rendait les modifications par chimie classique difficiles. Après avoir étudié les biotransformations par la bactérie *Streptomyces griseus*¹⁵³, les endophytes ont été envisagés. Parmi les 49 endophytes testés, *Ceriporia lacerate* a été sélectionné pour les réactions à l'échelle préparative. Cette transformation a conduit à la formation de huit produits, dont quatre inédits (Figure 55)¹⁵⁴. Ces travaux ont particulièrement attirés notre attention car nous avons suivi la même stratégie avec la guttiférone A **1** : tout d'abord les biotransformations par des micro-organismes d'une collection puis par les endophytes de la plante de laquelle est extraite la molécule.

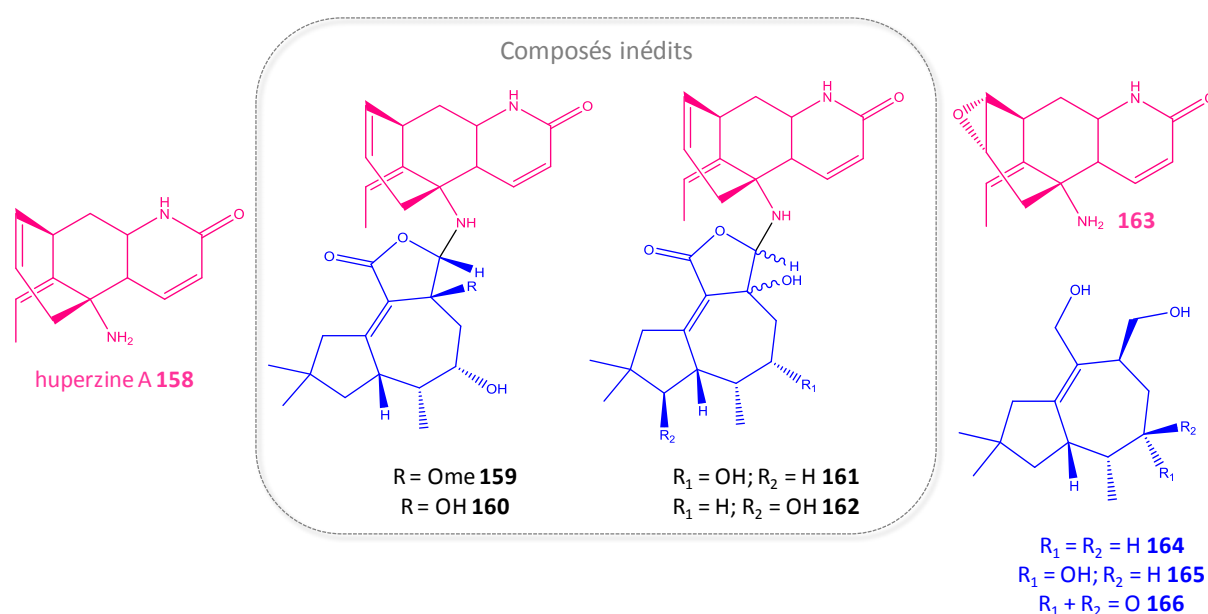


Figure 55 : Biotransformation de l'huperzine A par *C. lacerate*

Cette même équipe a isolé une série de dérivés sesquiterpénoidiques de trémulane du *Ceriporia lacerate*, au cours d'une étude précédente¹⁵⁵. Il est intéressant de noter que les produits formés par biotransformation d'huperzine A **158** par *C. lacerate* possèdent un squelette original sesquiterpène-alkaloïde, composé d'une partie huperzine A, substrat exogène, mais aussi une partie trémulane qui doit venir de l'endophytes lui-même. L'endophyte aurait donc couplé le substrat exogène sur ses propres métabolites.

De nombreuses autres études de biotransformation de produits naturels par des endophytes de la même plante mettent en évidence la capacité des endophytes à biotransformer les métabolites de leur plante hôte. Nous pouvons citer les travaux récents de Y. Fu *et al.*, qui portent sur la biotransformation des métabolites secondaires de *Panax ginseng* par des

¹⁵³ X. Zhang *et al.*, Microbial transformation of (-)-huperzine A, *Tett. Lett.*, **2010**, 51, 3840-3842.

¹⁵⁴ Y.-M. Ying *et al.*, Biotransformation of huperzine A by a fungal endophytes of *Huperzia serrata* furnished sesquiterpenoid-alkaloid hybrids, *J. Nat. Prod.*, **2014**, 77, 2054-2059.

¹⁵⁵ Y.-M. Ying *et al.*, Ceriponols A-K, tremulane sesquiterpenes from *Ceriporia lacerate* HS-ZJUT-C13A, a fungal endophyte of *Huperzia serrata*, *Phytochemistry*, **2013**, 95, 360-367.

endophytes isolés de cette même plante¹⁵⁶. Plusieurs ginsenosides ont été isolés à partir de *Panax ginseng*, dans différentes proportions. Certains composés mineurs, comme le Rg3 **168**, possèdent de très bonnes activités anti-tumorales, bien meilleures que les ginsenosides majoritaires. Plusieurs méthodes chimiques ont été testées pour convertir les ginsenosides majoritaires en minoritaires, mais elles ont toutes des désavantages comme des réactions secondaires, l'épimérisation ou la dégradation. Pour outrepasser ces désavantages, des endophytes ont été testés. Une bactérie endophyte, identifiée comme *Burkholderia* sp, s'est révélée capable de biotransformer le ginsenoside majoritaire Rb1 **167** en Rg3 **168** avec un excellent rendement de 98 % (Schéma 27).

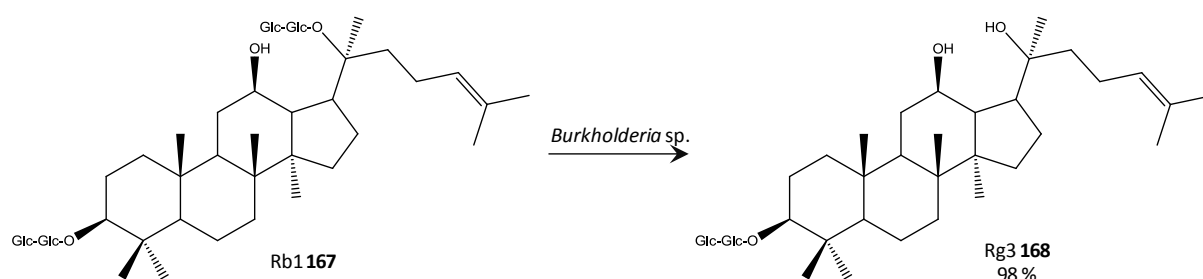


Schéma 27 : Biotransformation du ginsenoside Rb1 en Rg3 par une bactérie endophyte de *Panax ginseng*

I.2.3 Isolement des endophytes de *Symphonia globulifera*

L'isolement des micro-organismes endophytes de *Symphonia globulifera* a été réalisé par le Dr Yann Fromentin lors de son voyage en Guyane. Les feuilles ont été récoltées par Guillaume Odonne et Arnaud Jahn-Oyac, du laboratoire des Substances naturelles amazoniennes, sur le site de Macouria.

Les feuilles sont arrivées au laboratoire deux heures après la récolte. Elles ont été alors lavées à l'eau, puis ont subi un protocole de stérilisation afin d'éliminer les micro-organismes de surface pour être sûr de n'isoler que les micro-organismes qui vivent dans les tissus végétaux (Schéma 28).

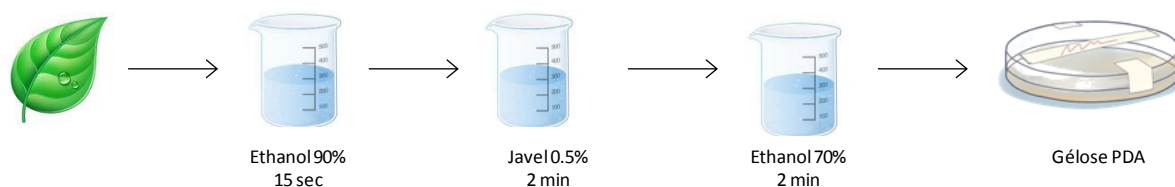


Schéma 28 : protocole de stérilisation des feuilles de *Symphonia globulifera*

Les feuilles ont ensuite été coupées et disposées à plat sur une gélose PDA (pomme de terre, dextrose, agar). Après quelques jours d'incubation, des micro-organismes se sont développés à partir des bords des sections de feuilles.

¹⁵⁶ Y. Fu *et al.*, Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside Rg3 by endophytic bacterium *Burkholderia* sp. GE 17-7 isolated from *Panax ginseng*, *J. Appl. Microbiol.*, **2017**, 122, 1579-1585.

Les souches ont ensuite été repiquées plusieurs fois, jusqu'à ce qu'elles soient pures, d'un point de vue macroscopique. Cette opération a conduit à l'isolement de 25 souches, qui seront repérées par les codes SG1 à SG25.

Les observations microscopiques des spores n'ont pas permis l'identification de ces souches.

1.2.4 Initiation des biotransformations de guttiférone A par les endophytes de *Sg*.

Les biotransformations de guttiférone A par des endophytes de *S. globulifera* ont été initiées brièvement par le Dr. Yann Fromentin et poursuivies par le Dr Kévin Cottet. Ces travaux ont été effectués au MNHN, sous la direction Dr Didier Buisson.

La première souche testée a été la souche SG1. Elle a été incubée avec la guttiférone A **1** à 30 °C dans du tampon phosphate pH 7.2. Après 7 jours, la conversion de la guttiférone A **1** est de 80 % et deux métabolites sont apparus : les deux xanthones 3,16-oxyguttiférone A **2** et 1,16-oxyguttiférone A **105** (Schéma 29). Ces deux xanthones sont naturellement présentes dans les graines de *S. globulifera*, mais ont été isolées en quantités très faibles (0.029 % et 0.007 % respectivement)¹⁵⁷. De plus, le ratio obtenu entre les deux composés 3,16-oxyguttiférone A/1,16-oxyguttiférone A est de 3.7/1, le même que le ratio entre les deux composés dans la plante.

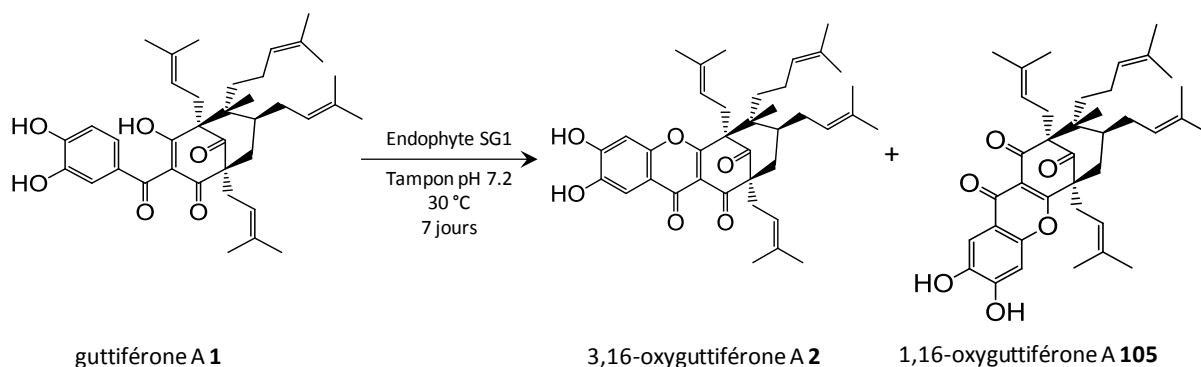


Schéma 29 : Biotransformation de la guttiférone A **1** par un endophytes de *Sg*

Ces premiers résultats encourageant nous ont amenés à poursuivre ces recherches. En effet, ils soulèvent la question de l'implication des endophytes dans la synthèse des deux xanthones naturelles au sein de la plante.

L'endophyte SG1, donnant de bons résultats, a tout d'abord été identifié comme une espèce de *Curvularia* sp. Ce travail a été effectué par le Dr. Joëlle Dupont, de l'équipe ISYEB UMR 7245 du MNHN. Après une étude approfondie, il s'est avéré que l'endophyte SG1 est *Bipolaris cactivora*. Les genres *Bipolaris* et *Curvularia* sont très proches, il est donc difficile de les distinguer.

¹⁵⁷ K. Cottet *et al.*, Polycyclic polyprenylated xanthones from Symphonia Globulifera : isolation and biomimetic electrosynthesis, *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 2136-2140.

I.2.5 Caractéristiques des *Curvularia* sp et des *Bipolaris* sp.

La différenciation entre les genres *Curvularia* et *Bipolaris* a fait débat¹⁵⁸. Plusieurs champignons de ces genres ont été isolés en tant qu'endophytes de plantes tropicales, comme le *Symphonia globulifera*. Certains exemples sont récapitulés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Synthèse des *Curvularia* sp. isolés de plantes en tant qu'endophytes dans la littérature

Entrée	Souche	Plante hôte	Origine de la plante hôte
1 ¹⁵⁹	<i>Curvularia</i> CATDLF5	<i>Catharanthus roseus</i> (pervanche de madagascar)	Cultivé sous serre à partir de graine de la <i>National gene bank for medicinal and aromatic plant</i> , Lucknow, India
2 ¹⁶⁰	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Hugonia mystax</i>	Puthupattu, sud de l'Inde
3 ¹⁶¹	<i>Curvularia</i> <i>lunata</i>	<i>Tinospora cordifolia</i>	Pondichéry, Inde
4 ¹⁶²	<i>Curvularia</i> sp	<i>Theobroma cacao</i>	Sulawesi du sud, Indonésie
5 ¹⁶³	<i>Curvularia</i> M12	<i>Murraya koenigii</i>	Rajshahi, Bangladesh
6 ¹⁶⁴	<i>Bipolaris</i> <i>sorokiniana</i>	<i>Costus speciosus</i>	Sri Lanka
7 ¹⁶⁵	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Amaranthus spinosus</i>	Jaipur, Inde
8 ¹⁶⁶	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Sapindus saponaria</i>	Brésil
9 ¹⁶⁷	<i>Bipolaris</i> sp. GU017499.1	<i>Eichhornia crassipes</i>	Brésil
10 ¹⁶⁷	<i>Bipolaris</i> <i>sorokiniana</i>	<i>Eichhornia crassipes</i>	Brésil
11 ¹⁶⁷	<i>Bipolaris</i> <i>papendorffii</i>	<i>Eichhornia crassipes</i>	Brésil
12 ¹⁶⁷	<i>Bipolaris</i> <i>papendorffii</i>	<i>Eichhornia azurea</i>	Brésil

¹⁵⁸ H. Madrid et al., Novel *Curvularia* species from clinical specimens, *Persoonia*, **2014**, 33, 48-60.

¹⁵⁹ S. Pandey et al., Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis, *Sci. Rep.*, **2016**.

¹⁶⁰ G. Abirami et al., Antioxidant activity of endophytic fungi isolated from *Hugonia mystax* L., *JAIR*, **2016**, 5, 10-13.

¹⁶¹ B. Nayak, Biodiversity of phyllophane and endophytic fungi studied on the medicinal plant *Tinospora cordifolia*, *Int. J. Chemical Concepts*, **2015**, 1, 109-113.

¹⁶² A. Nur et al., Investigation of endophytic fungi towards vascular streck dieback *Oncobasidium theobromae* on seedling of cocoa plant, *JABS*, **2015**, 9, 86-89.

¹⁶³ M. Mondol et al., Metabolites from endophytic fungus *Curvularia* sp. M12 act as mobility inhibitors against *Phytophthora capsici* zoospores, *J. Nat. Prod.*, **2017**, 80, 347-355.

¹⁶⁴ M. Mallique Qader et al., Bioactive sesquiterpenes from endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* isolated from a popular medicinal plant *Costus speciosus*, *Mycology*, **2017**, 8, 17-20.

¹⁶⁵ S. Sharma et al., Isolation and identification of a novel endophyte from a plant *Amaranthus spinosus*, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **2015**, 4, 785-798.

¹⁶⁶ R. Alberto et al., Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species, *GMR*, **2016**, 15, gmr15049016.

¹⁶⁷ T. Almeida et al., Molecular characterisation of endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.), *GMR*, **2015**, 14, 4920-4931.

Plusieurs biotransformations par des *Curvularia sp.* ont été décrites dans la littérature, de molécules bioactives mais également de dégradation de polyéthylène¹⁶⁸. Les substrats sont le plus souvent des terpènes, notamment des sesquiterpènes¹⁶⁹ ou des triterpènes (stéroïdes¹⁷⁰). On trouve des réactions d'oxydation, d'hydroxylation ou d'époxydation. Les travaux d'A. Cano-Flores *et al.*, sur l'époxydation ont particulièrement attirés notre attention car c'est ce genre de réaction que nous aimerions reproduire sur la guttiférone A **1** (Schéma 30)¹⁷¹.

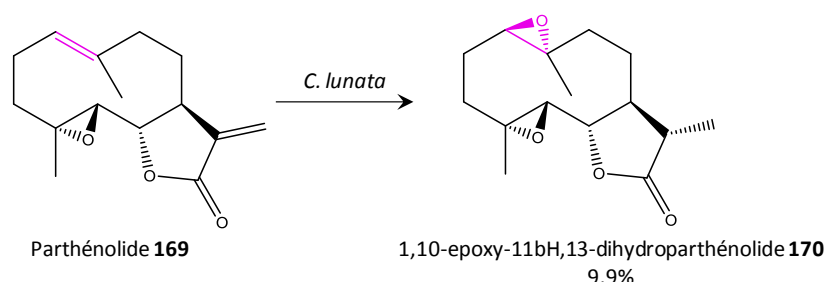


Schéma 30 : Epoxydation de la parthénolide par *C. lunata*

À partir d'un même substrat, *Curvularia lunata* est capable de produire des métabolites différents en fonction des conditions, comme le montre deux études de l'équipe de R. Azerad. Le composé **171** en présence de *Curvularia lunata* peut subir deux types de réaction : une réduction stéréosélective pour donner le composé **173** en présence de glucose¹⁷² ou une oxydation de Baeyer-Villiger pour former la lactone **172** dans un milieu sans glucose¹⁷³ (Schéma 31). Il est donc possible d'obtenir de la diversité chimique avec *Curvularia lunata* à partir d'un même substrat en faisant varier les conditions.

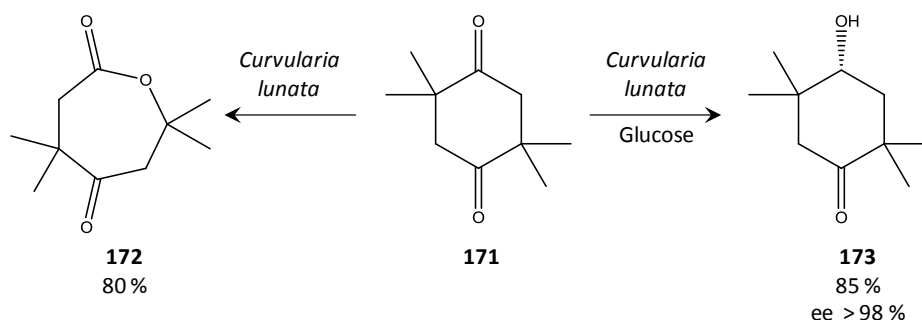


Schéma 31 : Biotransformation de la 2,2,5,5-tétraméthyl-1,4-cyclohexadione par *Curvularia lunata*

¹⁶⁸ H. Sowmya *et al.*, Polyethylene degradation by fungal consortium, *Int. J. Environ. Res.*, **2015**, 9, 823-830.

¹⁶⁹ O. Dwight *et al.*, Biotransformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one and 3a-hydroxycadina-4,10(15)-diene by *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Phytochem.*, **2002**, 59, 489-492.

¹⁷⁰ A. Al-Aboudi *et al.*, Fungal biotransformation of diuretic and antihypertensive drug spironolactone with *Gibberella fujikuroi*, *Curvularia lunata*, *Fusarium lini*, and *Aspergillus alliaceus*, *Steroids*, **2017**, 128, 15-22.

¹⁷¹ A. Cano-Flores *et al.*, Transformation of some sesquiterpene lactones by filamentous fungi and cytotoxic evaluations, *Chem. Biodiversity*, **2017**, 14, e1700211.

¹⁷² J. D'Angelo *et al.*, A short, efficient, highly selective synthesis of (1*R*,3*S*)-*cis*-chrysanthemic acid through the microbiological reduction of 2,2,5,5-tetramethyl-1,4-cyclohexanedione, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 40-45.

¹⁷³ R. Azerad *et al.*, Stereoselective synthesis of (1*R*,3*S*)-*cis*-chrysanthemic acid through the microbiological reduction of 2,2,5,5-tetramethyl-1,4-cyclohexanedione, *Tett. Lett.*, **1984**, 25, 6005-6006.

Des biotransformations de molécules d'intérêt thérapeutique par des champignons du genre *Bipolaris* ont également été décrites dans la littérature, et notamment dans les travaux de R. Limberger *et al.* sur la biotransformation de (-)- α -bisabolol **174** (Schéma 32)¹⁷⁴. L'oxyde de bisabolol B **176** est obtenu avec l'excellent rendement de 84 %. Compte tenu de la présence du 4'-5'-bisabolol époxyde **175**, époxydé sur la chaîne prényle, l'oxyde de bisabolol B est probablement obtenu par ouverture de l'époxyde par l'alcool en position 1'.

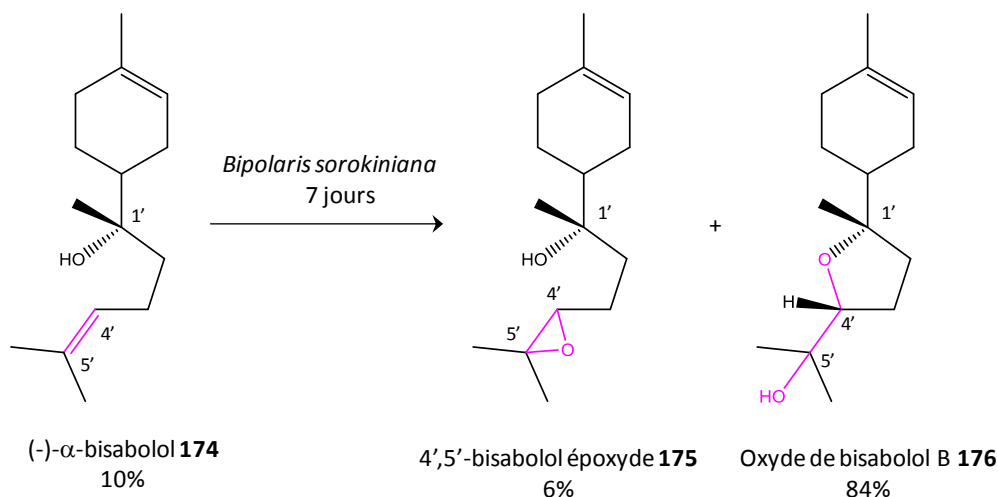


Schéma 32 : Biotransformation du (-)- α -bisabolol par *Bipolaris sorokiniana*

Ces résultats nous encouragent à poursuivre les travaux de biotransformation par les endophytes de *Symphonia globulifera* dans le but d'obtenir de nouveaux analogues de guttiférone A **1** oxydés sur les chaînes prényles.

I.3 Travaux personnels

Les résultats obtenus par les deux doctorants précédents étant encourageants, nous avons décidé de poursuivre les investigations sur les biotransformations de guttiférone A **1** et notamment par les endophytes de *Symphonia globulifera*. Ces travaux ont été réalisés sous la direction du Dr Didier Buisson du MNHN et en collaboration avec le Dr Jérôme Quintin.

La guttiférone C **51** est un autre métabolite majoritaire isolé du *Symphonia globulifera*. Nous avons trouvé pertinent de mener cette étude simultanément sur la guttiférone A **1** et la guttiférone C **51** (Figure 56).

¹⁷⁴ R. Limberger *et al.*, The ability of *Bipolaris sorokiniana* to modify geraniol and (-)- α -bisabolol as exogenous substrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 61, 552-555.

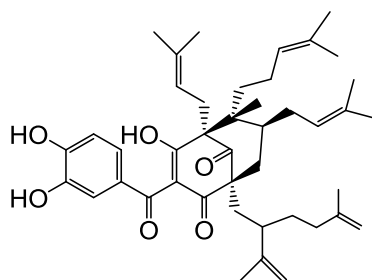


Figure 56 : Guttiférone C 51

Une étude de la stabilité des guttiférone A **1** et C **51** dans différentes solutions tampons sera d'abord exposée, puis les études préliminaires sur les biotransformations par *R. buffonii* seront présentées et enfin les travaux de biotransformation par les endophytes de *S. globulifera* seront abordés

I.3.1 Matériel et méthodes

Toutes les expériences ont été conduites dans les mêmes conditions : les souches ont été cultivées dans un milieu de culture classique YMS pendant deux à trois jours. La biomasse est ensuite filtrée sur de la gaze, pesée puis reprise dans une solution tampon appropriée. Le substrat est ensuite ajouté (2 mg pour les tests analytiques, 50 mg pour les tests préparatifs). La réaction est suivie quotidiennement par HPLC analytique (Schéma 33).

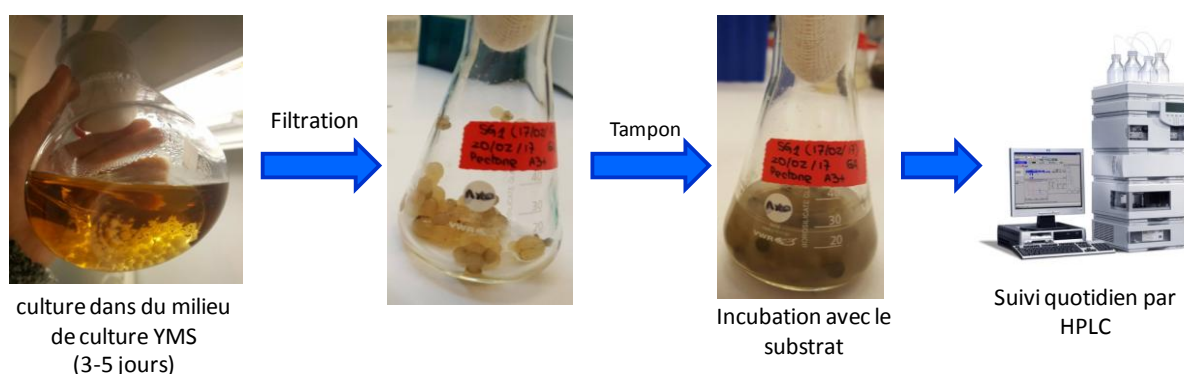


Schéma 33: Protocole pour les essais de biotransformation

Pour les prélèvements quotidiens, deux types de traitements ont été appliqués en fonction de la nature de l'essai : avec ou sans micro-organismes (Schéma 34).

Les prélèvements quotidiens sur les essais avec micro-organismes étaient de 800 μ L. Ils étaient centrifugés. Le surnageant aqueux était très chargé et donc fastidieux à traiter pour être injecté dans de bonnes conditions en HPLC. De plus, les premiers résultats ne révélaient aucun composé sur les chromatogrammes. Nous avons donc arrêté de les analyser. 800 μ L de méthanol était ajouté sur le culot biomasse. Le culot était remis en suspension, soniquer pendant 10 min pour extraire la biomasse, puis centrifugé à nouveau. Le surnageant méthanolique était alors injecté en HPLC.

Les prélèvements quotidiens sur les essais sans micro-organisme étaient de 400 μL . Ils étaient ensuite extraits par 200 μL d'acétate d'éthyle. L'agitation se fait grâce à un vortex. La phase organique est ensuite récupérée et évaporée à sec. Le résidu est repris dans 400 μL de méthanol et injecté en HPLC.

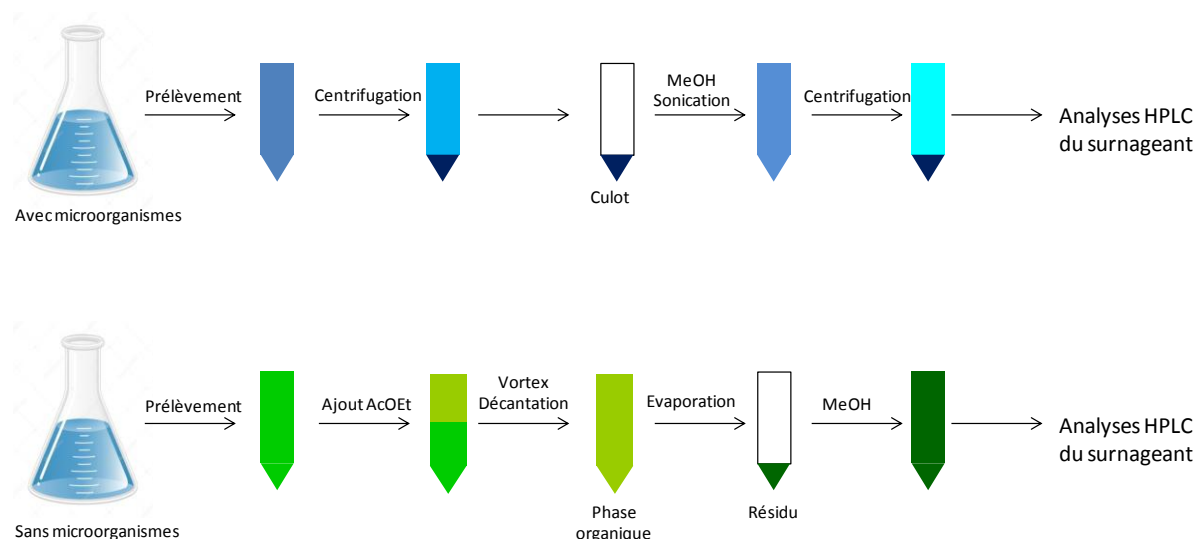


Schéma 34 : Traitement des prélèvements quotidiens

I.3.2 Etude de la stabilité des guttiférones dans différents tampons

Afin de réaliser les biotransformations dans les meilleures conditions possibles, nous avons étudié la stabilité des guttiférones A **1** et C **51** à plusieurs pH et dans différentes solutions tampons. Cette étude permettra de prouver qu'en présence d'endophytes, les produits qui pourraient éventuellement apparaître seront uniquement dus au métabolisme et non à une cyclisation spontanée.

Nous avons testé trois pH différents : 6, 7 et 8. En effet, les micro-organismes vivent en milieu biologique, donc dans des pH relativement neutres. Il ne nous a pas semblé judicieux de tester des pH trop extrêmes.

Nous avons également comparé deux solutions tampons différentes, couramment utilisées en milieu biologique : le tampon phosphate de concentration 0.066 M et le tampon phosphate/citrate 0.2 M. Les guttiférones ont été laissées sous agitation dans des solutions tampons stériles, dans les mêmes conditions que lors des incubations avec les micro-organismes. Les résultats sont présentés Figure 57 et Figure 58.

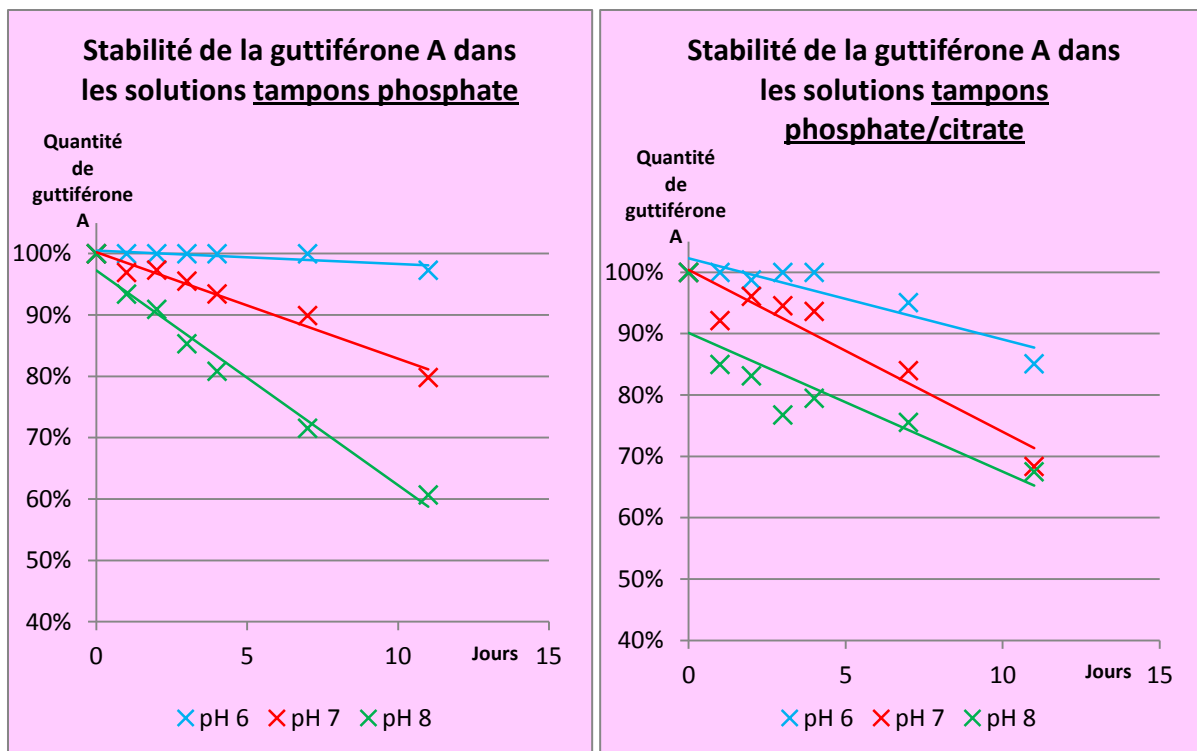


Figure 57 : Etude de stabilité de la guttiférone A 1 dans différentes solutions tampons

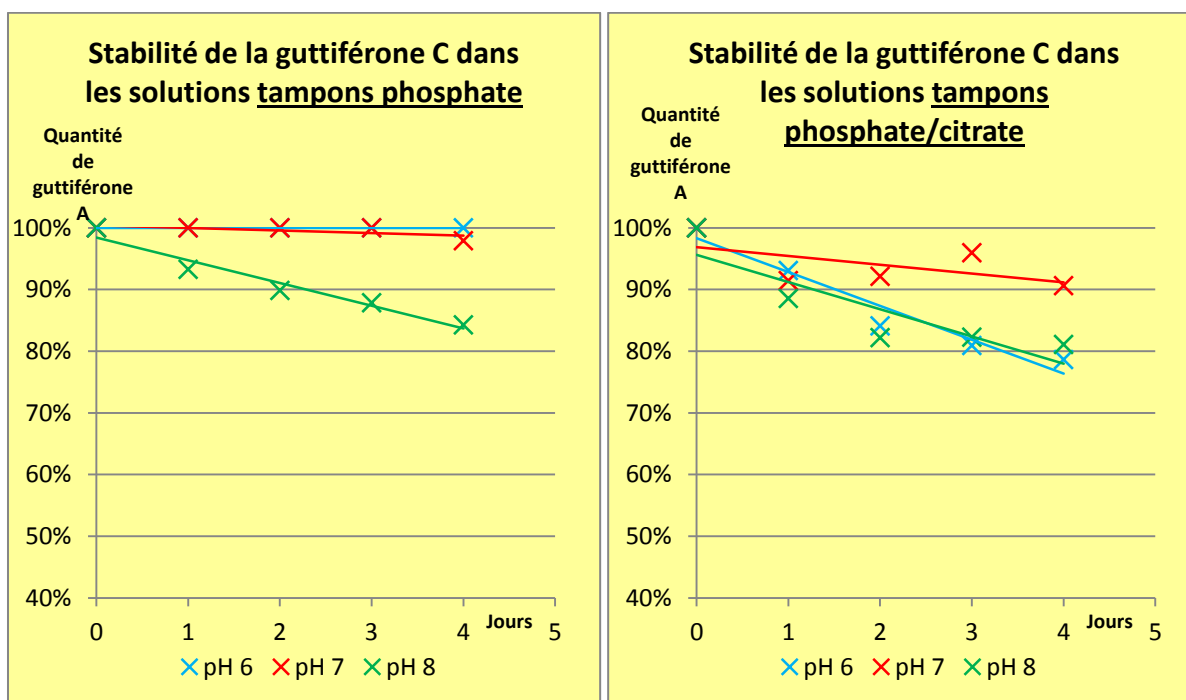


Figure 58: Etude de stabilité de la guttiférone C dans différentes solutions tampons

Les graphiques représentent le pourcentage de guttiférone présent dans le milieu réactionnel en fonction du temps. Ces proportions ont été calculées sur la base des aires des pics sur les chromatogrammes HPLC. On remarque que dans le tampon phosphate à pH 6, la

guttiférone A **1** est très stable. A pH 8 par contre, la proportion de guttiférone A **1** diminue très vite. Après sept jours il ne reste déjà qu'un peu plus de 70 % de guttiférone A **1**. Dans le tampon phosphate/citrate, la guttiférone A **1** est beaucoup moins stable, même à pH 6. Ce type de solution tampon n'est donc pas adapté pour les biotransformations de guttiférone A **1**.

La disparition de la guttiférone A **1** correspond en fait à une cyclisation intramoléculaire spontanée. La 1,16-oxyguttiférone A **105** et la 3,16-oxyguttiférone A **2** apparaissent dans les milieux (Figure 59-A)

Les résultats sont similaires sur la guttiférone C **51** dans le tampon phosphate. Elle est stable dans le tampon pH 6, mais pas dans le tampon pH 8 car après 4 jours il ne reste que 84 % de guttiférone C **51**. Elle n'est pas stable, quelque soit le pH, dans le tampon phosphate/citrate, ce type de solution tampon n'est donc pas du tout adapté pour cette étude.

La disparition de la guttiférone C **51** correspond également à sa cyclisation en 1,16-oxyguttiférone C **118** et 3,16-oxyguttiférone C **119** (Figure 59-B).

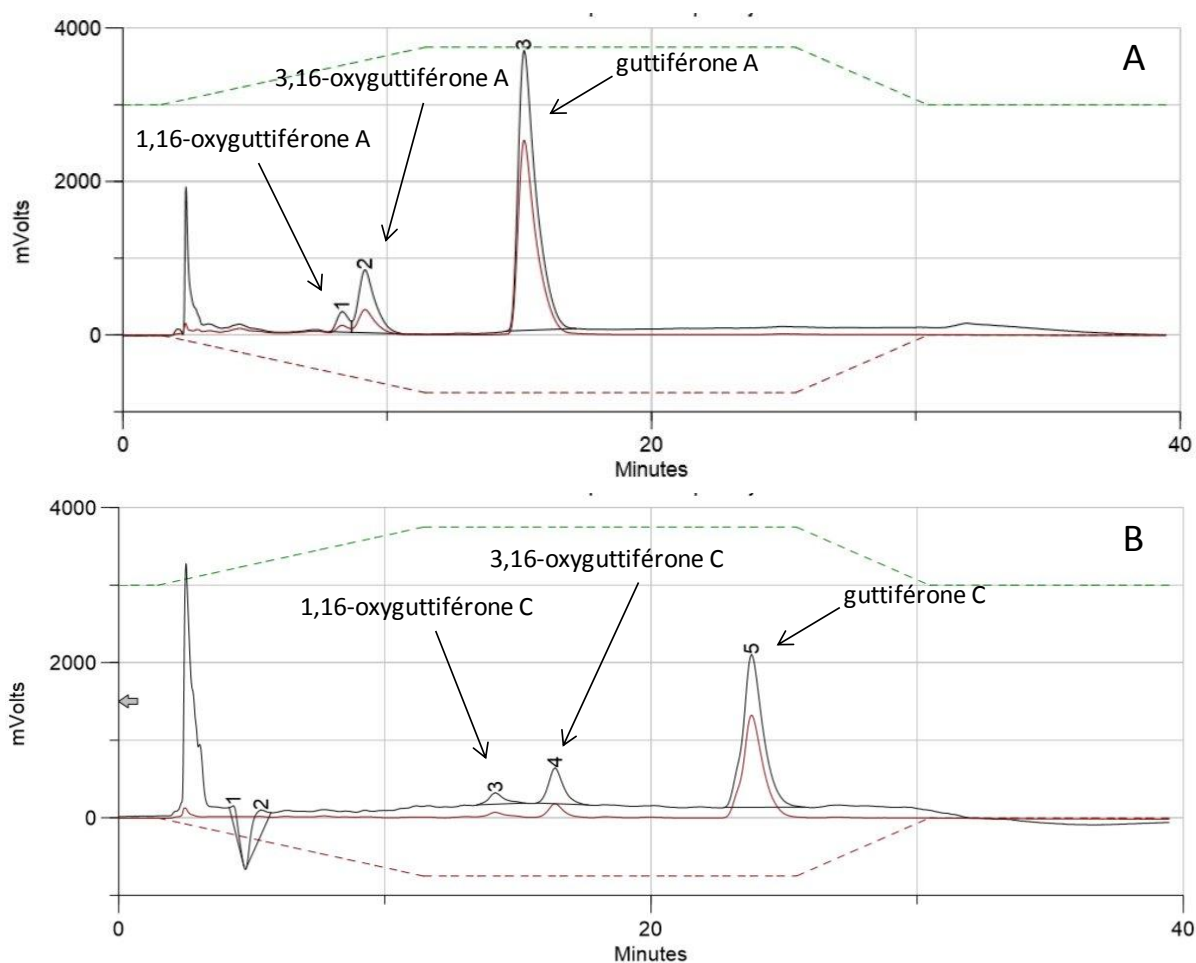


Figure 59: Chromatogramme des milieux réactionnels après 4 jours dans le tampon phosphate/citrate pH 8

Les guttiférone n'ayant pas le même comportement dans les deux solutions tampons à même pH, cette cyclisation spontanée n'est peut-être pas uniquement due à la valeur du pH. Les solutions tampons utilisées sont préparées à partir d'eau permutée, sa composition dépend de l'usure de la cartouche. Il est envisageable qu'il y ait des traces de métaux dans l'eau permutée qui favorisent la réaction de cyclisation.

La suite de l'étude se fera donc dans le tampon phosphate (0.066 M) à pH 6. Le pH sera contrôlé pendant les biotransformations car s'il excède 7, la cyclisation intramoléculaire peut être spontanée et ne pourra plus être imputable seulement aux micro-organismes.

1.3.3 Etude sur *Rhodotorula buffonii*

Nous avons également vu précédemment que *Rhodotorula buffonii* produisait la 3,16-oxyguttiférone A **2** à partir de guttiférone A **1**. Nous avons voulu aller plus loin en étudiant l'influence du pH sur production d'oxyguttiférone A par *R. buffonii*. L'étude a également été menée sur la guttiférone C **51** ce qui nous a permis de savoir si, sur le même modèle que la guttiférone A **1**, *R. buffonii* allait produire deux oxyguttiférone C.

Dans chaque essai, 4 g de levure ont été incubés avec 2 mg de substrat dans 20 mL de la solution tampon appropriée. Les solutions tampons testées ont été phosphate et phosphate/citrate, à pH 6, 7 et 8.

Des chromatogrammes d'analyses des milieux réactionnels après 4 jours sont présentés Figure 60 et Figure 61 à titre d'exemple : tous les chromatogrammes présentaient les mêmes pics et donc les mêmes produits, mais en différentes proportions. Deux nouveaux produits sont apparus pour la guttiférone A **1** comme pour la guttiférone C **51**, plus polaires que le substrat de départ.

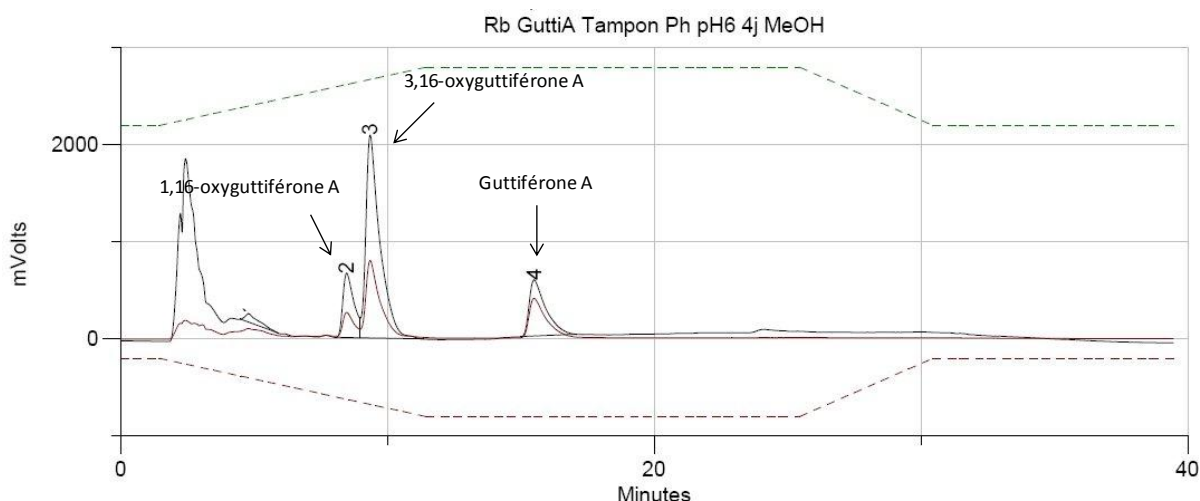


Figure 60 : Résultat de biotransformation de guttiférone A **1** par *R. buffonii* après 4 jours

Les deux métabolites formés à partir de la guttiférone A **1** sont bien la 1,16-oxyguttiférone A **105** et la 3,16-oxyguttiférone A **2**.

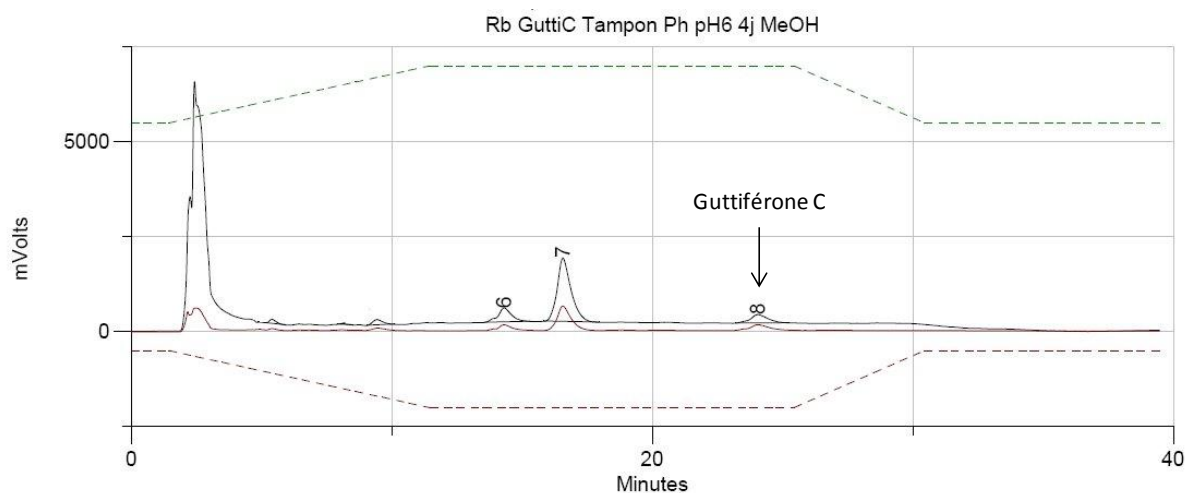
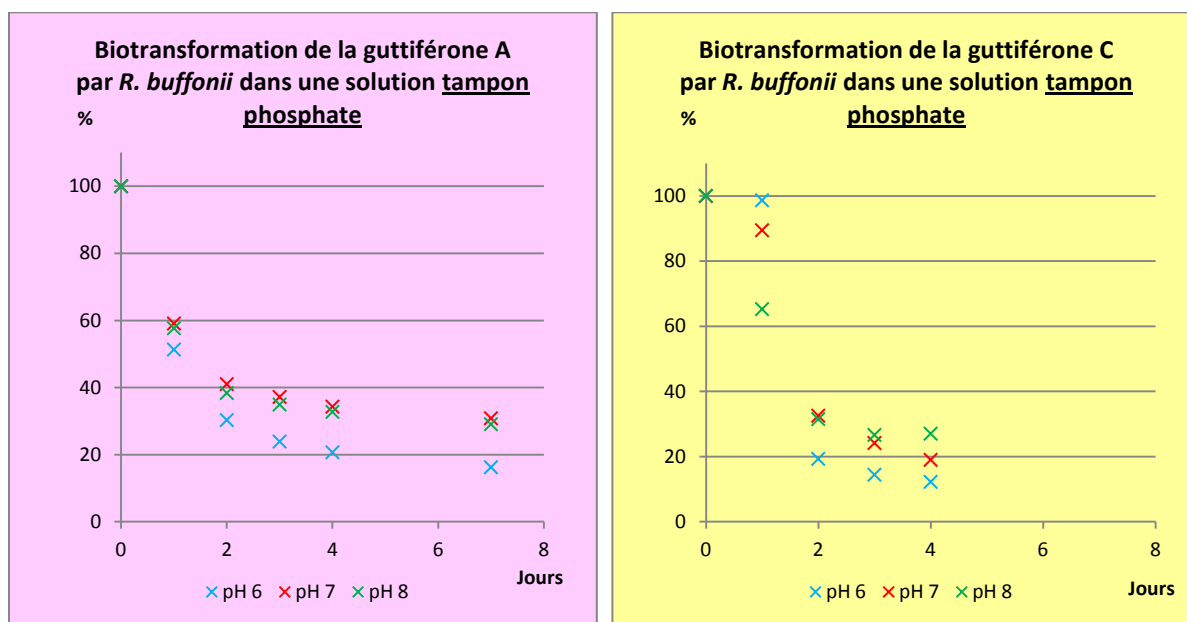


Figure 61 : Résultat de biotransformation de guttiferone C par *R. buffonii* après 4 jours

Les métabolites qui apparaissent sont la 1,16-oxyguttiférone C **118** et la 3,16-oxyguttiférone C **119**.

Les résultats de tous les essais sont présentés dans la Figure 62, sous forme de graphiques représentant la quantité de guttiferone en fonction du temps.



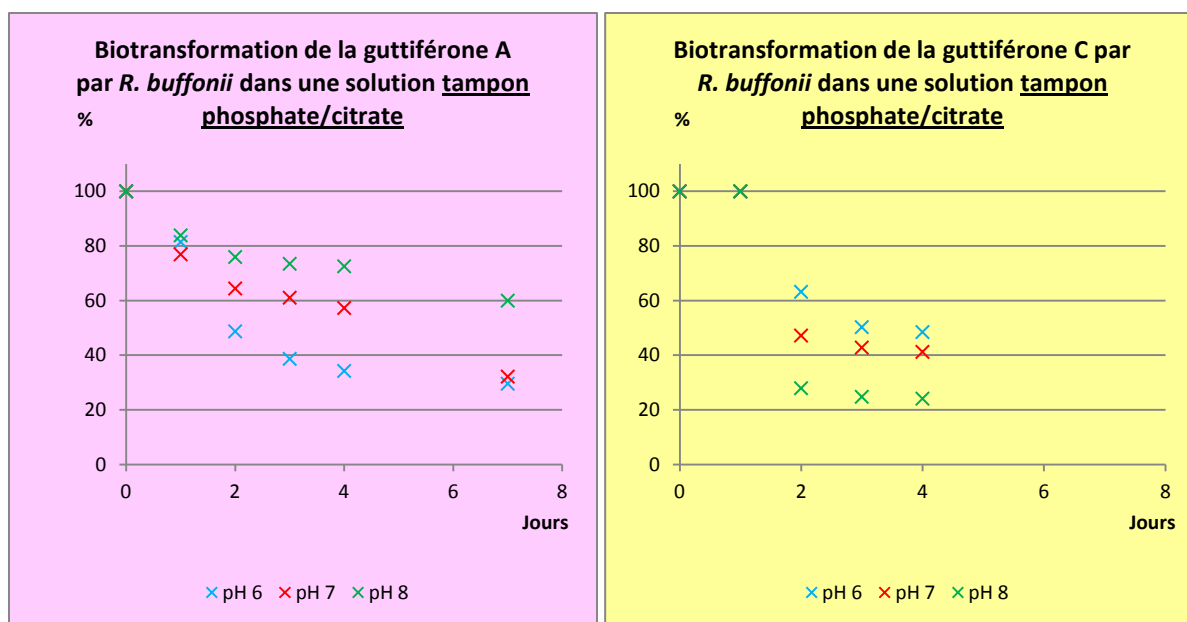


Figure 62 : Résultats de la biotransformation des guttiférone par *R. buffonii* dans différents tampons

En ce qui concerne la guttiférone A **1**, dans une même solution tampon, les résultats semblent meilleurs si le pH est bas. En effet, quelque soit la solution tampon utilisée, les transformations sont plus rapides à pH 6 et le taux de conversion après 7 jours est plus élevé (84 % de conversion à pH 6, contre 70 % de conversion à pH 8 dans le tampon phosphate).

A pH 6, la réaction est un peu plus rapide dans le tampon phosphate que dans le tampon phosphate citrate : le taux de conversion de la guttiférone A **1** après 2 jours est de 70 % dans le tampon phosphate et n'est que de 51 % dans le tampon phosphate/citrate.

Les conclusions pour la guttiférone C **51** sont les mêmes. La réaction est plus rapide dans le tampon phosphate : 80 % de conversion à 2 jours à pH 6 dans le tampon phosphate contre 40 % de conversion dans le tampon phosphate/citrate. Dans le tampon phosphate, les résultats à pH 6 sont les meilleurs : la réaction est plus rapide et le taux de conversion est meilleur.

Les résultats dans le tampon phosphate étant meilleurs pour les deux substrats, les proportions des produits formés dans ce tampon sont présentées dans la Figure 63. Pour les deux substrats, nous avons effectivement plus de produits formés à pH 6 qu'à des pH supérieurs.

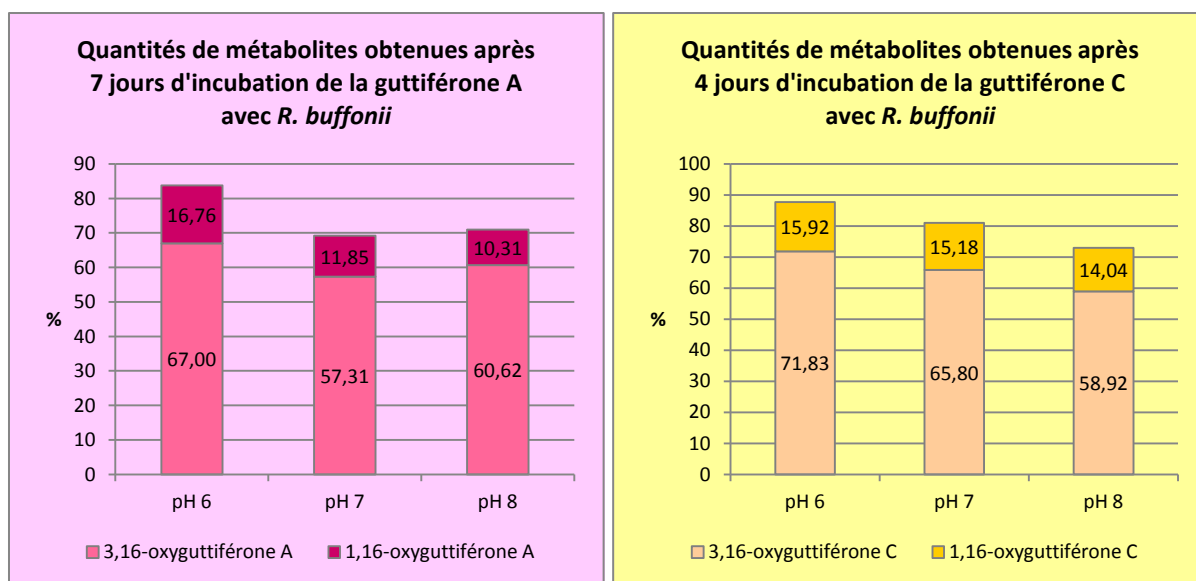


Figure 63 : Quantités des différents métabolites de guttiférone formés après incubation avec *R. buffonii*

Le Tableau 23 récapitule les ratios entre les deux oxyguttiférone formées. Il semblerait que le pH ait une influence sur ce ratio en ce qui concerne la guttiférone A **1**. En effet, le ratio augmente avec la valeur du pH. En ce qui concerne la guttiférone C **51**, ce ratio est assez constant malgré les variations de pH.

Tableau 23 : Récapitulatif des ratios entre les différents métabolites formés

Substrat	Guttiférone A 1			Guttiférone C 51		
Valeur de pH	6	7	8	6	7	8
Ratio 3,16-oxyguttiférone/1,16-oxyguttiférone	4	4,8	5,9	4,5	4,3	4,2

Les meilleures conditions pour les biotransformations de guttiférone par la levure *R. buffonii* sont donc le tampon phosphate pH 6. Ces résultats sont en accord avec ceux de la partie II. 2. sur la stabilité des guttiférone, puisqu'elles sont très stables dans ce tampon.

1.3.4 Culture des endophytes

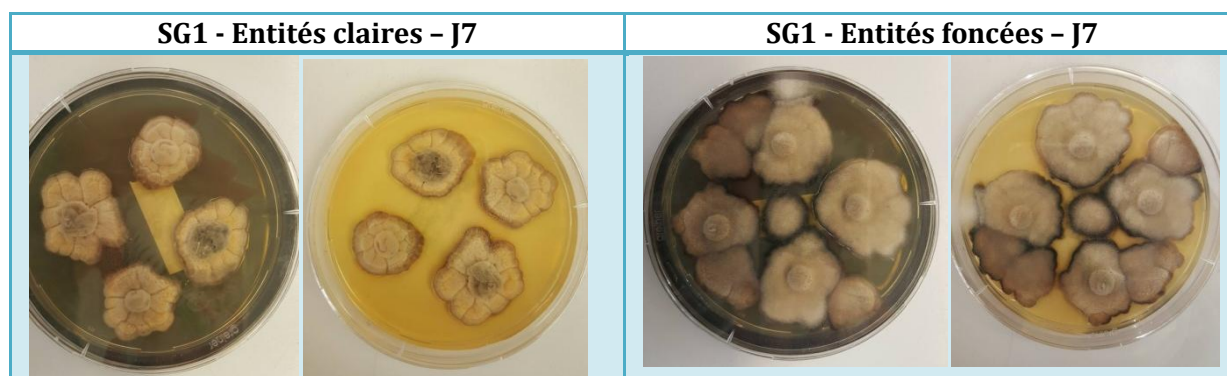
Afin d'étudier les biotransformations de guttiférone par les endophytes de *S. globulifera*, il a fallu les faire pousser. Les souches sont conservées au réfrigérateur à 4 °C dans des tubes de gélose penchée. Les micro-organismes et les spores sont remis en suspension grâce à du glycérol (20 % ou 50 %) stérile. Ils sont ensuite mis en culture dans du milieu liquide YMS, sous agitation et à température contrôlée (25 °C).

Nous avons du faire face à de nombreux problèmes lors de la culture des endophytes.

Lorsque nous avons fait pousser SG1 en milieu YMS liquide, deux types d'entités sont apparus : des amas noirs et des amas blancs. La purification des souches avait été effectuée

de façon macroscopique, il peut donc y avoir encore deux souches différentes dans ce que nous avons appelé « SG1 ». Pour vérifier ceci, nous avons mis en culture les entités noires et les entités blanches sur deux boîtes de pétri distinctes. Nous pourrions ainsi comparer les morphologies des champignons. Les résultats de la culture après 7 jours sont présentés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Résultats de la culture des "entités foncées" et des "entités claires" de SG1 après 7 jours



La même boîte a été prise en photo sur fond noir et sur fond blanc. Les entités foncées semblent pousser plus vite mais les morphologies des champignons sont comparables. La différence d'aspect que nous avons observé n'était probablement due qu'à l'âge des entités qui changent de morphologie au cours de leur croissance.

On remarque cependant la coloration noire à la lisière du champignon lorsqu'il est en contact avec une autre colonie. Cette coloration n'apparaît pas à la lisière en bord de boîte, zone qui n'est en contact avec aucune autre colonie. Cette coloration est peut-être due à un mécanisme de défense. Il serait intéressant de comparer les métabolites produits dans les différentes zones de la bordure du champignon. Faute de temps, je n'ai pas pu réaliser cette étude au cours de cette thèse.

Les autres problèmes concernaient la culture. Beaucoup de souches ne se développaient pas correctement. Les conditions ont été changées : température, aération et luminosité principalement. Mais malheureusement nous avons réussi à récupérer des quantités suffisantes de seulement six souches :

- SG1
- SG2
- SG5
- SG8
- SG10
- SG17

1.3.5 Criblage des endophytes

Comme nous l'avons vu précédemment, 25 souches d'endophytes ont été isolées des feuilles de *Symphonia globulifera*. Nous avons donc voulu tester leur capacité à biotransformer la guttiférone A **1** et la guttiférone C **51**. Nous espérions aussi la formation de nouveaux métabolites.

Suite à des problèmes de culture, comme nous l'avons vu précédemment, seulement six souches d'endophytes ont pu être testées. Toutes les souches ont été capables de biotransformer les guttiférone A **1** et C **51**. Elles ont également toutes produites les quatre mêmes métabolites : deux métabolites de guttiférone A **1** et deux métabolites de guttiférone C **51**. Les chromatogrammes des résultats finaux des biotransformations par SG8 de la guttiférone A **1** (Figure 64) et C **51** (Figure 65) sont donnés à titre d'exemple. Tous les chromatogrammes avaient la même allure : les produits présents dans le milieu réactionnel étaient les mêmes mais dans des proportions différentes.

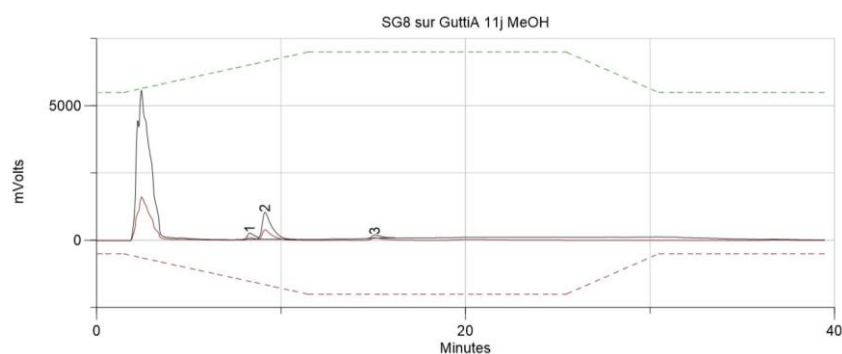


Figure 64 : Chromatogramme de la métabolisation de la guttiférone A **1** par SG8 après 8 jours

Les métabolites de la guttiférone A **1** sont la 1,16-oxyguttiférone A **105** et la 3,16-oxyguttiférone A **2** avec des temps de rétention de 8.3 min et 9.1 min respectivement. Le pic à 15.0 min correspond à la guttiférone A **1** qui n'a pas été biotransformée.

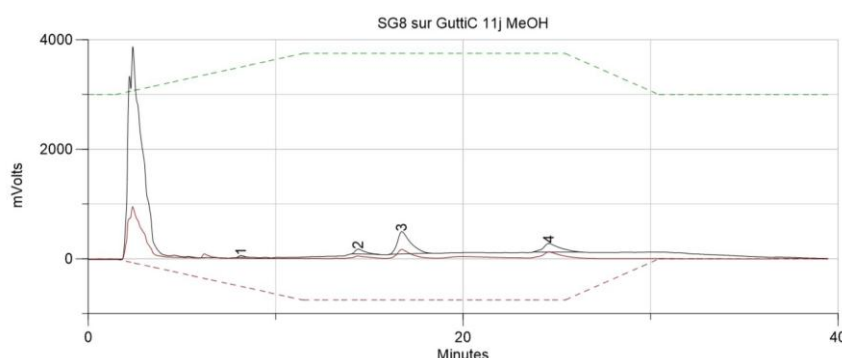
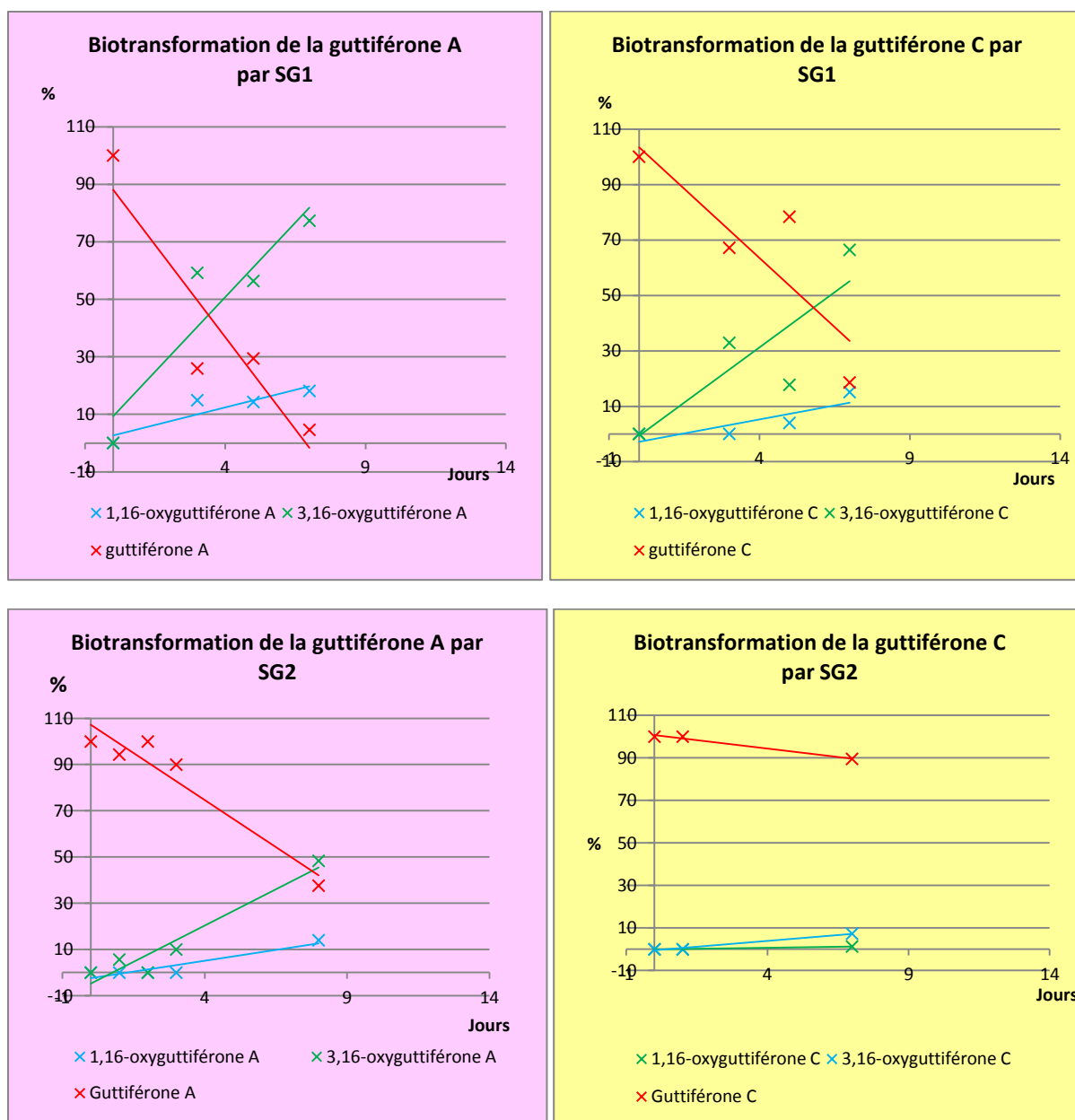
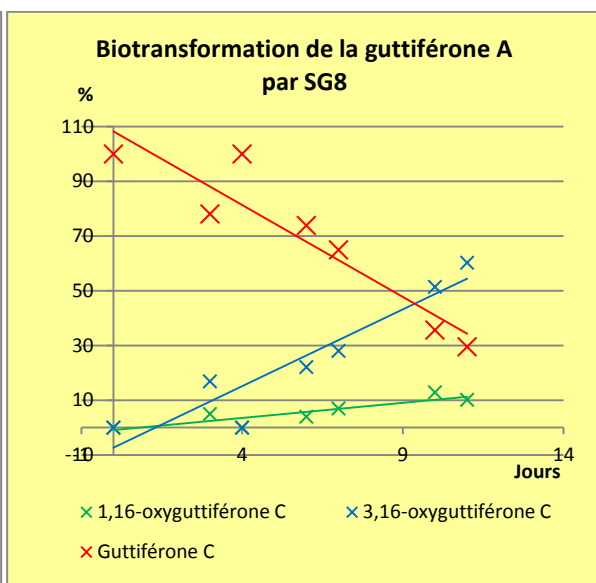
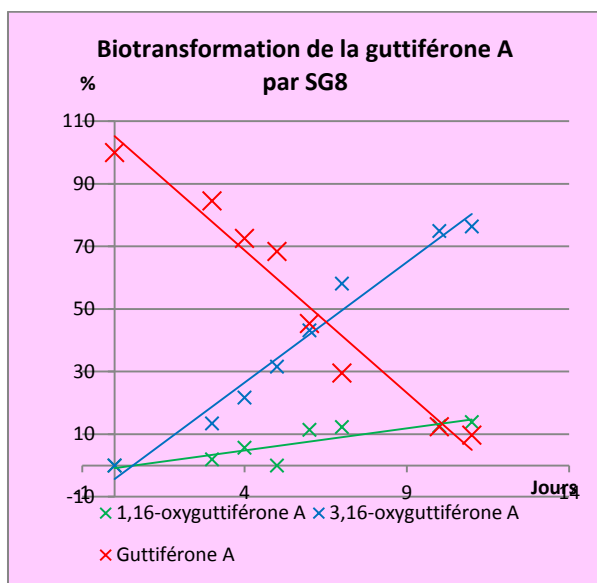
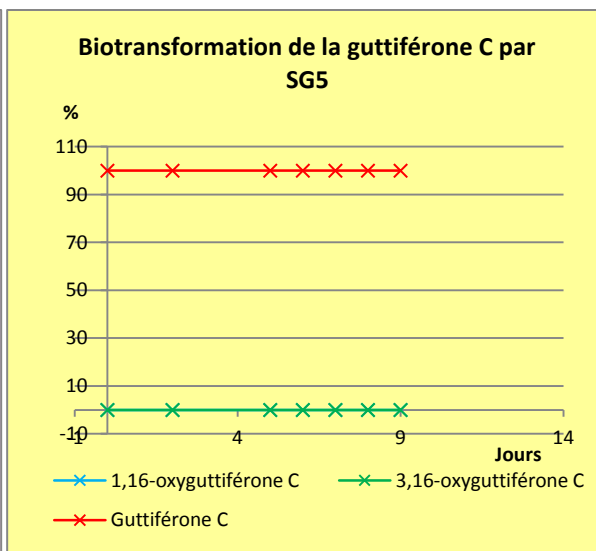
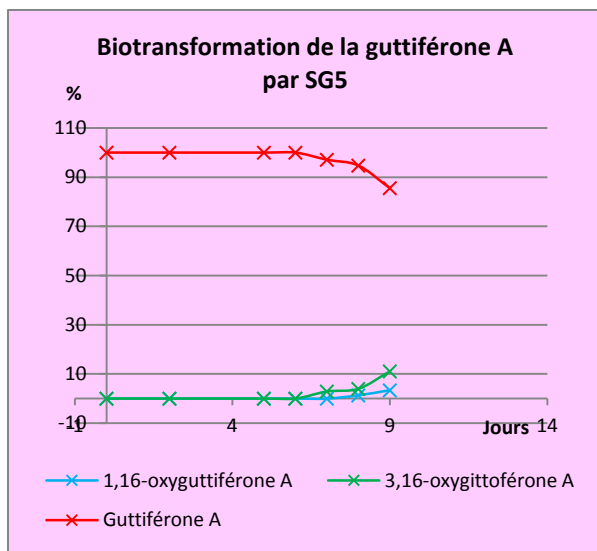


Figure 65 : Chromatogramme de la métabolisation de la guttiférone C **51** par SG8 après 8 jours

Les produits obtenus par biotransformation de la guttiférone C **51** sont la 1,16-oxyguttiférone C **118** et la 3,16-oxyguttiférone C **119** avec des temps de rétention de 14.4 min et 16.7 min respectivement. Le pic à 24.6 min correspond à la guttiférone C **51**.

Les résultats du suivi quotidien des transformations sont présentés Figure 66 sous forme de graphique.





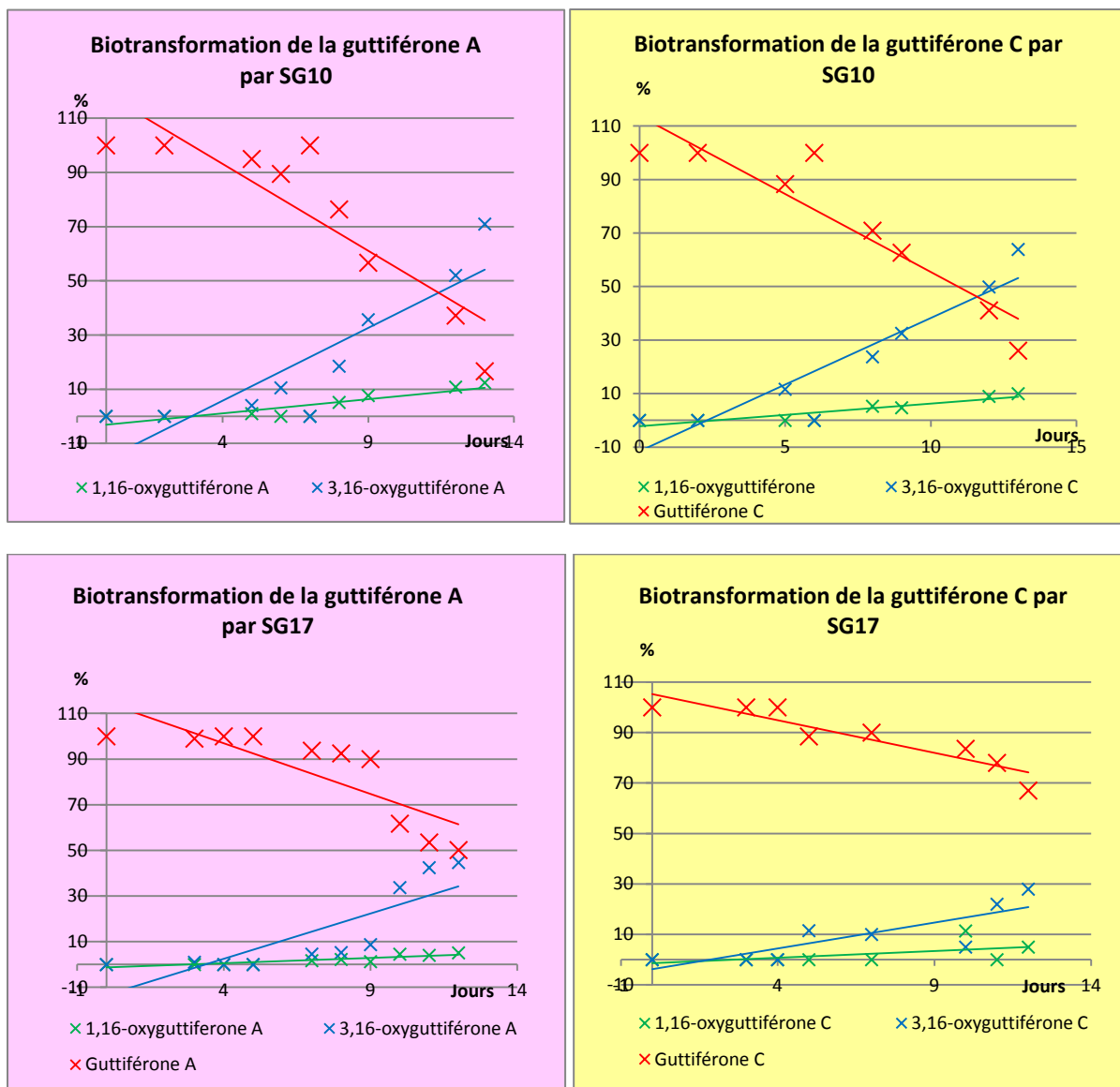


Figure 66 : Biotransformations des guttiférone A et C par plusieurs endophytes de *Sg*.

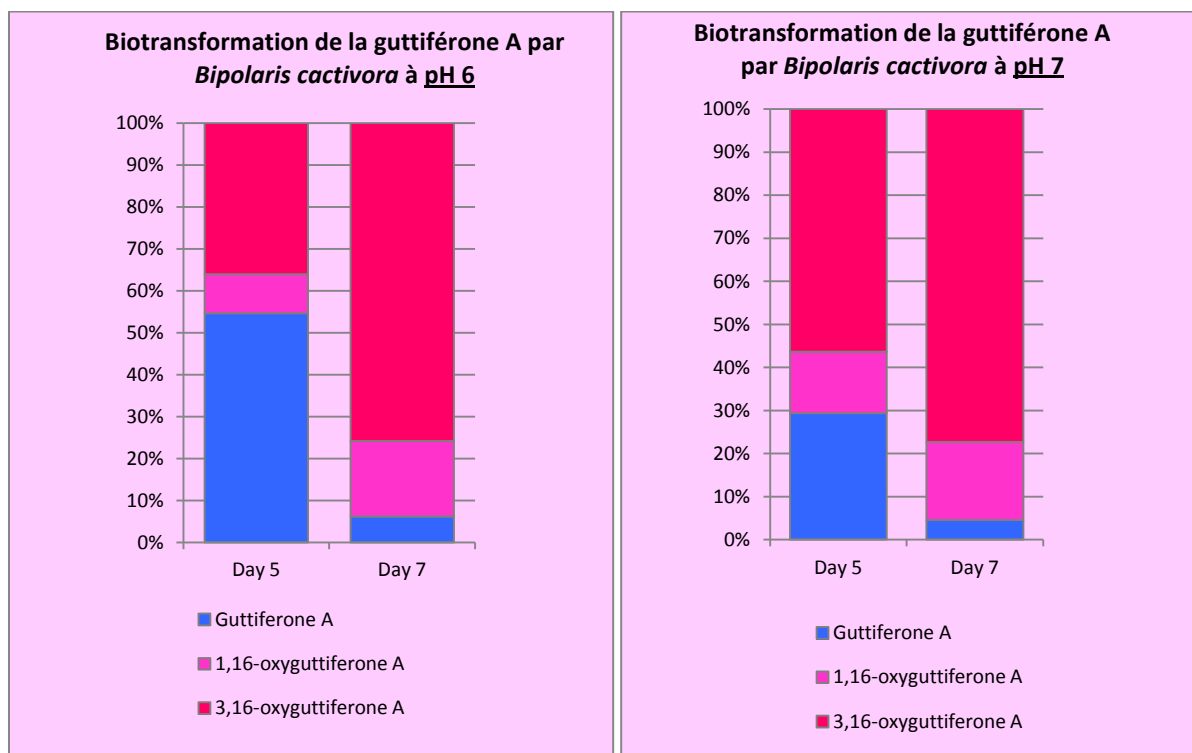
Seule la souche SG5 ne semble pas capable de biotransformer les guttiférone. Des métabolites de guttiférone A **1** apparaissent après 7 jours, mais cela semble être plutôt de la cyclisation spontanée que de la métabolisation par le champignon.

Pour SG1, SG8, SG10 et SG17, la métabolisation de la guttiférone C **51** est toujours plus lente que la métabolisation de la guttiférone A **1**. SG1, SG8 transforment les guttiférone plus rapidement que SG10 et SG17. SG2 transforme la guttiférone A **1** relativement rapidement, alors que la transformation de la guttiférone C **51** est bien plus lente.

C'est la souche SG1 qui montre les meilleurs résultats : la culture est facile, la transformation est rapide et le taux de conversion après 7 jours est excellent : 95 % pour la guttiférone A **1** et 81 % pour la guttiférone C **51**.

I.3.6 Etude du pH sur SG1

Comme lors de l'étude précédente sur *R. buffonii*, nous avons étudié l'influence du pH sur la biotransformation des guttiférones par *Bipolaris cactivora*. Ceci nous permettra de trouver les conditions optimales pour produire les oxyguttiférones par biotransformation. Nous avons vu dans les parties précédentes que les biotransformations ne sont pas très efficaces dans les solutions tampons phosphate/citrate et que les guttiférones n'y étaient pas très stables. Nous avons également observé que les oxyguttiférones apparaissent spontanément dans des pH supérieurs à 7. Nous avons donc étudié les biotransformations par *Bipolaris cactivora* dans des solutions tampons phosphate à pH 6 et 7. Les résultats sont présentés dans la Figure 67. La biotransformation de la guttiférone A **1** semble plus rapide à pH 7 qu'à pH 6 mais les résultats après 7 jours sont équivalents. Le pH ne semble en revanche pas avoir d'influence sur la biotransformation de la guttiférone C **51**.



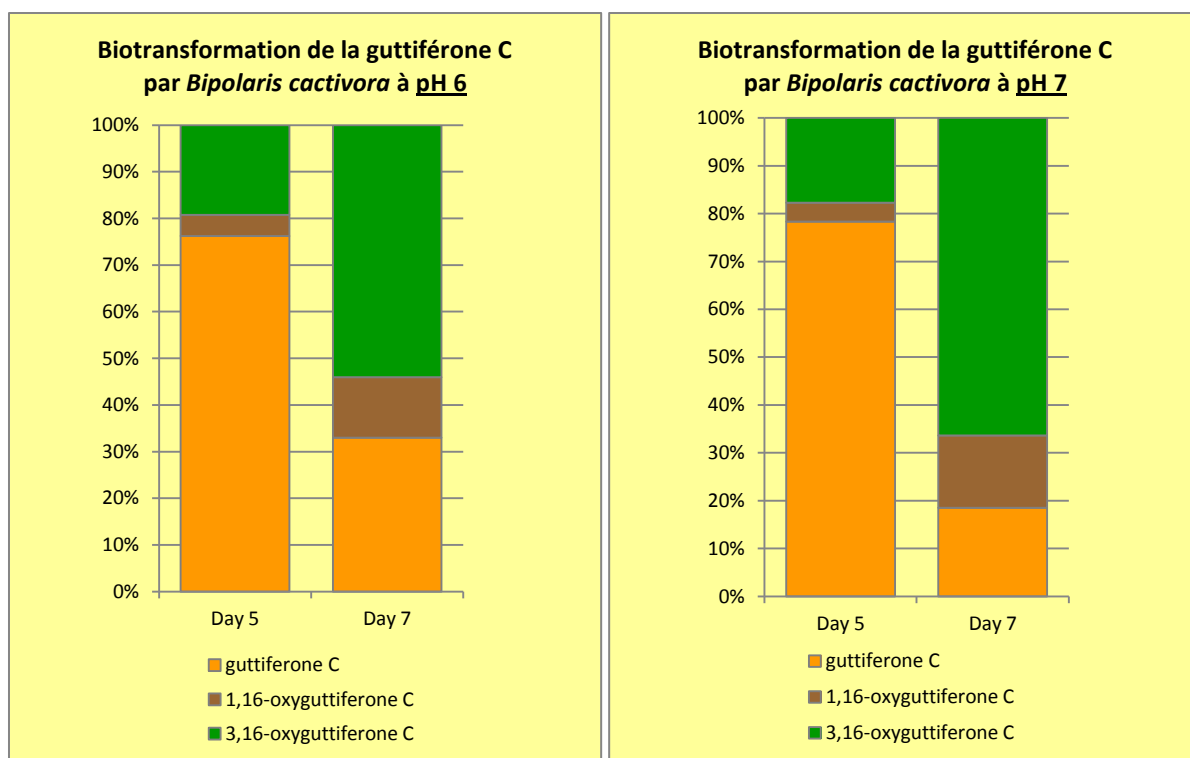


Figure 67 : Biotransformations de guttiférones par *Bipolaris cactivora* à différents pH

Nous avons contrôlé le pH au cours de cette étude et nous nous sommes aperçu qu'il augmentait avec le temps (Tableau 25). Les essais avec un pH initial de 6 ont augmenté d'environ 1.5 points après 7 jours et les essais avec un pH initial de 7 ont augmenté de 1.3 points après la même durée. Cette augmentation est bien due à la présence du micro-organisme car le pH est stable dans les essais témoins.

Tableau 25 : Mesure des pH lors de la biotransformation des guttiférones par *Bipolaris cactivora*

Substrat	guttiférone A 1						guttiférone C 51				
	<i>Bipolaris cactivora</i>		Témoin sans micro-organisme				<i>Bipolaris cactivora</i>		Témoin sans micro-organisme		
pH théorique	6	7	6	7	8		6	7	6	7	8
Jour 0	6,1	7,0	6,1	7,0	8,1		6,1	7,0	6,1	6,8	8,0
Jour 3	6,4	7,1	6,1	7,1	8,2		6,4	7,1	6,1	6,8	8,1
Jour 5	6,8	7,4	6,1	7,1	8,2		7,3	7,5	6,1	6,8	8,1
Jour 7	7,5	8,4	6,1	7,1	8,3		7,8	8,4	6,2	6,8	8,1

Afin d'être sûr que la cyclisation n'est due qu'aux micro-organismes, il a donc fallu contrôler le pH tout au long de l'incubation.

I.3.7 Métabolisation à pH contrôlé

Pour pouvoir contrôler le pH tout au long de la métabolisation, nous avons utilisé un bioréacteur. Le pH est maintenu à 6 à l'aide d'un pH-stat par ajout d'acide chlorhydrique 0.1 M. L'aération et l'agitation sont également meilleures que dans un erlenmeyer.

Les résultats de la biotransformation en fermenteur sont présentés Figure 68, ainsi que ceux en erlenmeyer pour pouvoir comparer les deux méthodes. On remarque que pour la guttiférone A **1** comme pour la guttiférone C **51**, la biotransformation en fermenteur est nettement plus rapide.

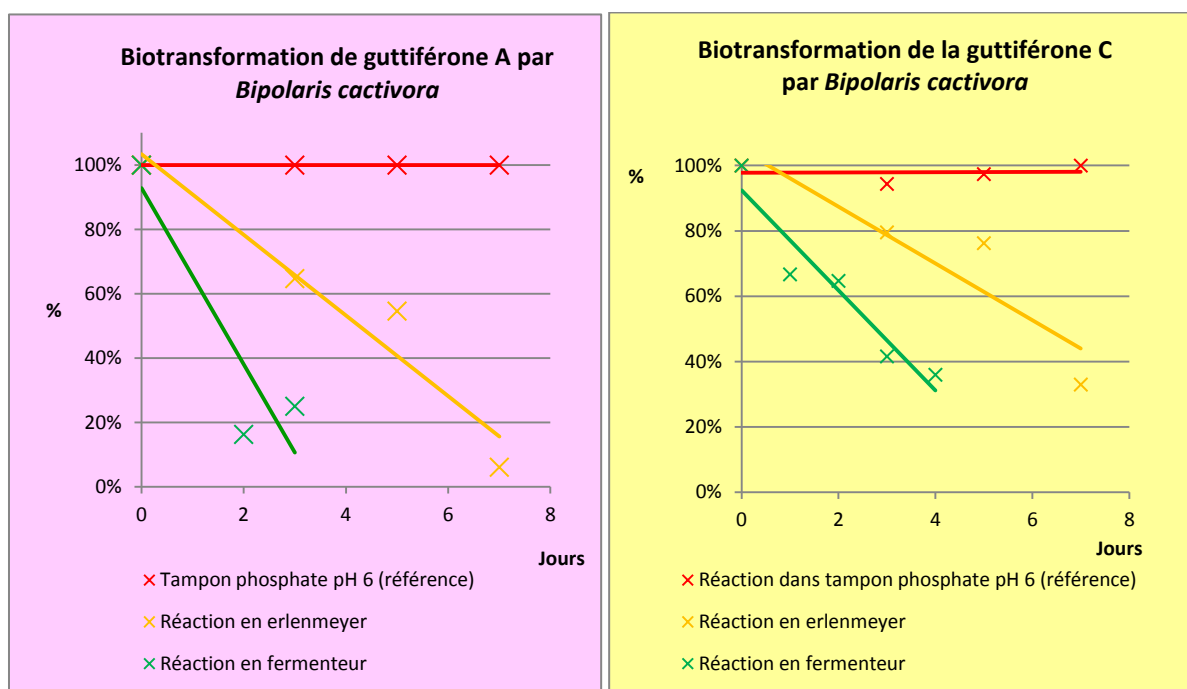


Figure 68 : Biotransformation de guttiférone A par *Bipolaris cactivora* dans différents contenants

Les proportions des différents métabolites obtenus sont reportées Tableau 26. Ces proportions sont calculées à partir des aires des pics sur les chromatogrammes HPLC. La biotransformation de guttiférone A **1** en fermenteur est arrêtée après 3 jours, celle de la guttiférone C **51** est laissée un jour de plus, car la transformation de la guttiférone C **51** est plus lente.

Tableau 26 : Proportions des différents composés présents dans les milieux réactionnels lors des biotransformations par *Bipolaris cactivora* M : 3,16-oxyguttiférone A/1,16-oxyguttiférone A. P : 3,16-oxyguttiférone C/1,16-oxyguttiférone C.

Temps (jours)	Guttiférone A 1				Guttiférone C 51			
	Erlenmeyer		Fermenteur		Erlenmeyer		Fermenteur	
	Guttiférone A 1	M	Guttiférone A 1	M	Guttiférone C	P	Guttiférone C	P
3	64.7	27.6/7.7	25	58/17	79.5	18/2.5	41.6	43.2/15.2
4							36	49.5/14.5
5	54.7	36/9.3			76.2	4.5/19.3		
7	6.2	75.8/18			33	54/13		

Les réactions en fermenteur ont été conduites sur 50 mg de substrat. La purification par HPLC préparative a conduit à isoler 4.2 mg de 1,16-oxyguttiférone A **105**, 15.3 mg de 3,16-oxyguttiférone A **2** and 13.8 mg de guttiférone A **1** restante. **Les rendements sont de 8.4 %, 30 % et 27% respectivement.** Concernant la biotransformation de la guttiférone C **51**, la purification a permis d'isoler 4.8 mg de 1,16-oxyguttiférone C **118**, 6 mg de 3,16-oxyguttiférone C **119** et 4.2 mg de guttiférone C **51**. **Les rendements sont de 9.6 %, 12 %, 8.4 % respectivement.** Ces rendements modestes peuvent s'expliquer par une difficulté à extraire la totalité des composés de la biomasse et par des pertes lors de la purification.

Tableau 27 : Ratios obtenus entre les deux oxyguttiférones après la réaction en fermenteur

	Ratio 2/105	Ratio 119/118
Erlenmeyer (7 jours)	4.2/1	4.1/1
Fermenteur (à l'arrêt de la réaction)	3.4/1	3.4/1

Le Tableau 27 donne les ratios entre les deux oxyguttiférones obtenues en fonction des conditions de réaction. On remarque que pour les deux substrats, ce ratio est plus élevé en erlenmeyer qu'en fermenteur.

Les oxyguttiférones A sont naturellement présentes dans les graines et le latex de plante en très faibles quantités (< 0.03 %). Elles ont été quantifiées avec un ratio de 4/1 dans les graines de *Symphonia globulifera*. Les ratios obtenus par biotransformation sont proches du ratio naturel. Ce constat nous amène à nous demander si les endophytes sont impliqués dans la présence d'oxyguttiférones A dans la plante.

Une analyse par LC-MS de l'extrait méthanolique de latex a également révélé la présence naturelle des oxyguttiférones C dans la plante. Elles n'ont malheureusement pas pu être quantifiées donc nous ne connaissons pas le ratio naturel entre les deux molécules.

1.3.8 Autres essais autour de *Bipolaris cactivora*

Afin d'investiguer l'implication des endophytes sur la présence d'oxyguttiférones dans la plante, nous avons incubé *Bipolaris cactivora* avec la guttiférone A **1** et la guttiférone C **51**, car l'endophyte est en contact avec les deux substrats simultanément dans la plante. Les deux substrats ont été introduits dans des proportions 1:1. Les résultats sont présentés Figure 69. Les deux substrats ont été biotransformés par l'endophyte et les quatre oxyguttiférones sont apparues. Ces résultats sont toujours cohérents avec l'hypothèse d'une implication des endophytes dans la présence d'oxyguttiférones dans la plante car les quatre oxyguttiférones sont naturellement présentes dans la plante. On remarque que les oxyguttiférones A apparaissent plus vite que les oxyguttiférones C. Il semblerait que la guttiférone A **1** ait une meilleure affinité avec l'enzyme responsable des biotransformations que la guttiférone C **51**. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les oxyguttiférones A sont présentes en plus grande quantité dans le latex de *Symphonia globulifera* que les

oxyguttiférones C, alors qu'il y a plus de guttiférone C **51** que de guttiférone A **1** dans le latex. En effet, les oxyguttiférones C n'y sont présentes que sous forme de traces détectées par LC-MS.

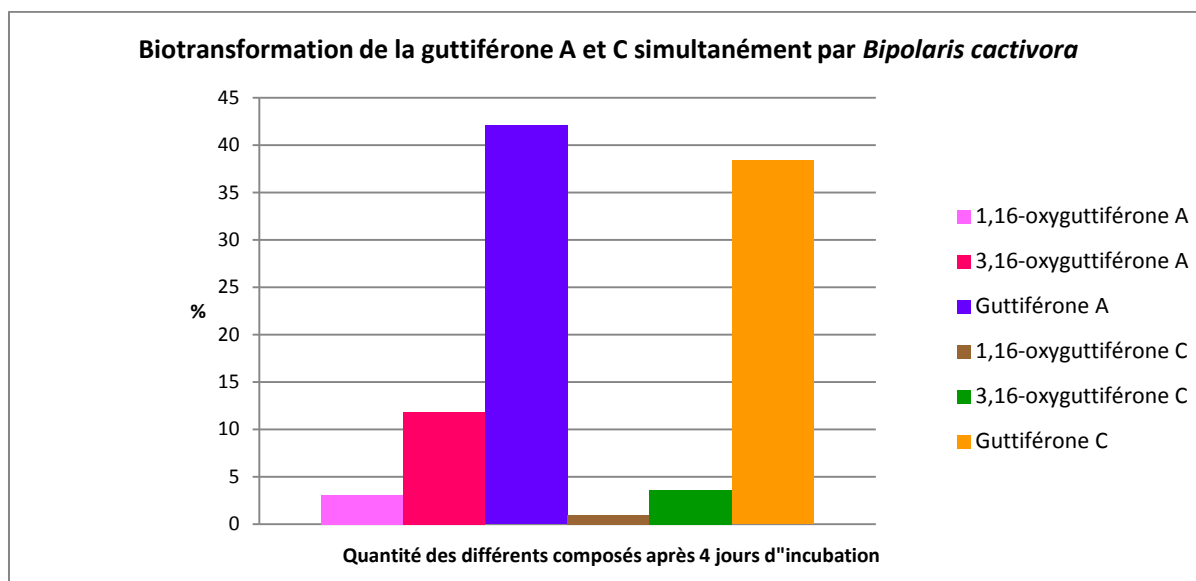


Figure 69 : Quantité des différents composés après 4 jours d'incubation de guttiférone A et C ensemble avec *Bipolaris cactivora*.

Afin de totalement répondre à la question de l'origine des oxyguttiférones dans la plante, il faudrait cultiver des *Symphonia globulifera* sans endophytes, dans des conditions stériles. Après plusieurs années de culture, les extraits de ses plants pourraient être étudiés pour rechercher les oxyguttiférones. L'équipe de S. Pandey *et al.* a mené une expérience similaire sur *Catharanthus roseus*, avec des plants « naturels » et des plants sans endophytes afin de les comparer¹⁷⁵. Les résultats de cette étude montrent que les endophytes participent activement au développement de la plante en favorisant la biosynthèse de certains métabolites secondaires clés (des pigments de photosynthèse par exemple). Cependant, c'est une expérience très difficile à mener car elle demande beaucoup de moyens et de temps et nous ne disposons pas au laboratoire des infrastructures nécessaires pour réaliser une telle expérience.

Au cours de la thèse du Dr. Yann Fromentin, les investigations sur les biotransformations de guttiférone A **1** par la levure *R. buffonii* se sont poursuivies par une étude sur l'enzyme responsable de la cyclisation. Les résultats avaient alors montré que l'enzyme était excrétée. Nous avons mené un test similaire pour comparer les résultats (Schéma 35). Pour cela, *Bipolaris cactivora* a été cultivée dans du milieu YMS pendant 3 jours. La masse fongique a ensuite été filtrée mais le filtrat est conservé. La guttiférone A **1** est ajoutée dans le milieu de culture. Si l'enzyme est excrétée, elle sera présente dans ce milieu de culture et la guttiférone A **1** sera biotransformée malgré l'absence de masse fongique.

¹⁷⁵ S. Pandey *et al.*, Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis, *Sci. Rep.*, **2016**, 6:26583.

La masse fongique filtrée précédemment a été reprise dans du tampon phosphate pH 6 et de la guttiferone A **1** a été ajoutée également pour servir de témoin.

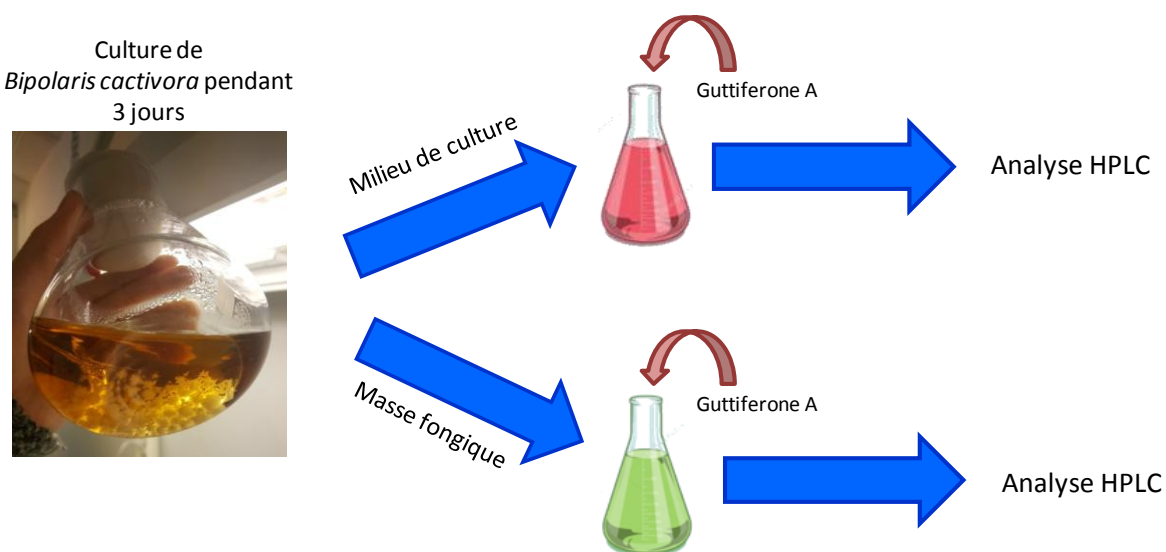


Schéma 35 : Protocole de test sur l'enzyme responsable de la biotransformation de la guttiferone A **1**

Les résultats de cette expérience n'ont montré aucune biotransformation dans l'essai avec le milieu réactionnel. L'essai témoin avec la masse fongique reprise dans le tampon phosphate montre bien l'apparition des oxyguttiférones A. Les chromatogrammes des milieux réactionnels après 9 jours sont présentés Figure 70.

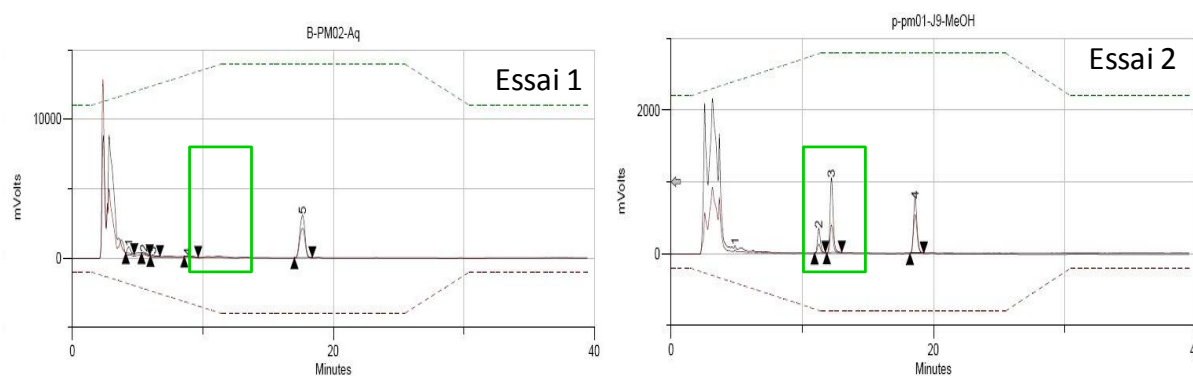


Figure 70 : Chromatogramme des milieux réactionnels 1 et 2 après 9 jours

L'enzyme n'est donc pas excrétée et la biotransformation a lieu dans les cellules. Les guttiférones A et C traversent donc la membrane des cellules de *Bipolaris cactivora*. Il ne s'agit donc probablement pas de la même famille d'enzyme responsable des biotransformations de guttiferone chez *R. buffonii* et chez *Bipolaris cactivora*.

I.4 Conclusion

Les biotransformations font partie d'un secteur prometteur pour synthétiser de nouveaux composés bioactifs. Nous avons étudié les biotransformations de guttiferone A **1** et C **51** par

différents micro-organismes, notamment par la levure *R. buffonii* et par les endophytes de *Symphonia globulifera*. Les mêmes produits de métabolisation ont été obtenus dans tous les essais menés : deux oxyguttiférones A et deux oxyguttiférones C. Nous n'avons obtenu aucun composé avec des chaînes prényles oxydées comme nous l'espérions. En revanche la capacité des endophytes à produire les xanthones naturellement présentes dans la plante pose la question de leur origine *in vivo* et de l'implication des endophytes dans leur formation chez la plante.

Nous avons optimisé la réaction de cyclisation intramoléculaire des guttiférones en xanthones pour trouver les meilleures conditions : en fermenteur bien aéré et sous agitation efficace avec un pH maintenu à 6 tout au long de la réaction.

Les oxyguttiférones C n'avaient jamais été décrites auparavant.

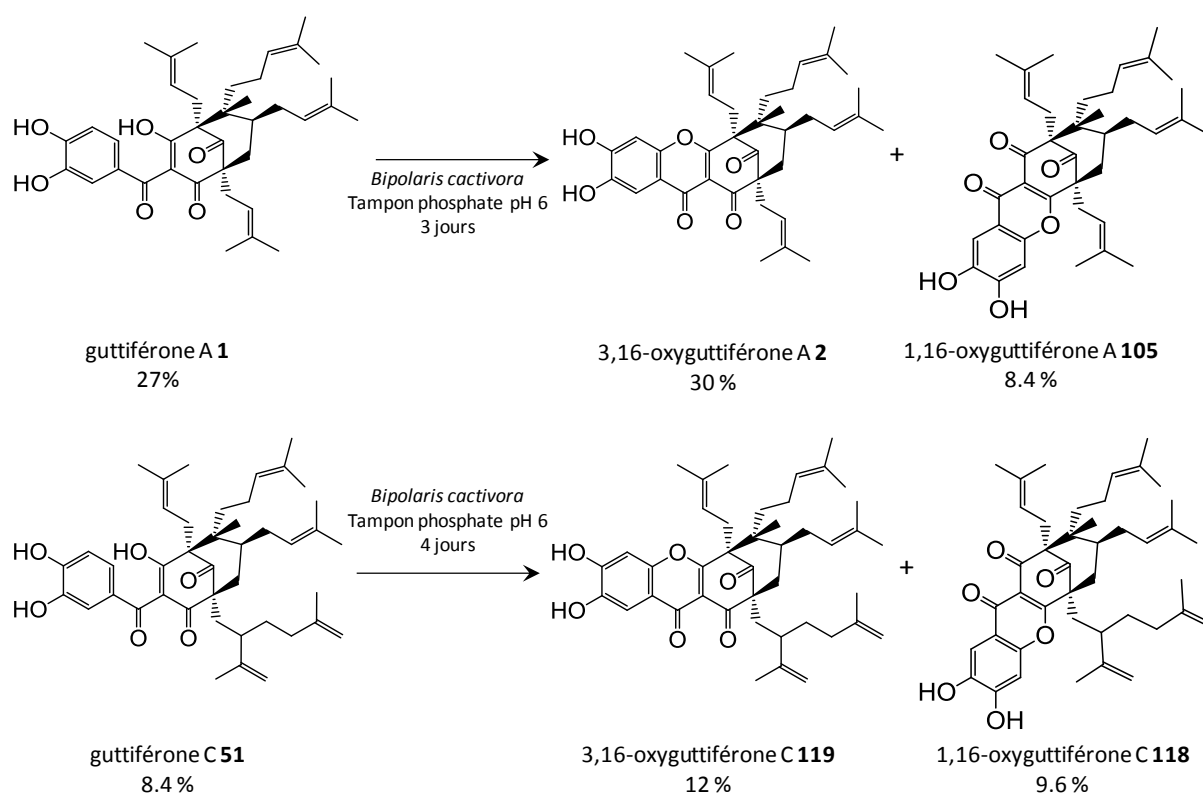


Schéma 36: Biotransformations des guttiférones A et C par *Bipolaris cactivora*

Pour poursuivre sur cette voie, une étude a été initiée au laboratoire du MNHN sur les biotransformations de la guttiférone A **1** par les endophytes d'*Hypericum perforatum*. En effet, cette plante largement décrite dans la littérature produit un métabolite secondaire particulièrement intéressant : l'hyperforine **87** (Figure 71). Cette molécule est un BPAP comme la guttiférone A **1** mais elle possède un acyle aliphatique, et non un catéchol. La partie prénylée est similaire à celle de la guttiférone A **1**. Les endophytes d'*Hypericum perforatum* ont peut-être adapté leur système enzymatique pour biotransformer les chaînes

prényles. Les biotransformations de guttiférone A **1** par les endophytes d'*Hypericum perforatum* peuvent donc mener à des modifications des ses chaînes. Ces travaux ont fait l'objet du stage de master II de Daouda NDaye mais les résultats n'ont pas été publiés.

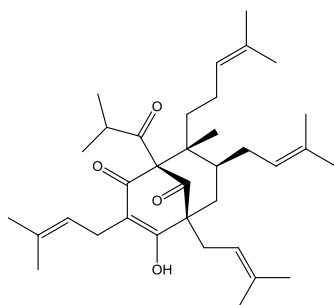


Figure 71 : Structure de l'hyperforine 87

Partie 3 :

Recherche de cibles
protéiques
parasitaires

Recherche de cibles protéiques parasitaires

I. Introduction

Comme présenté dans les précédents chapitres de cette thèse, différentes modulations ont été réalisées sur la guttiférone A **1**. Il est important de noter que certains analogues synthétisés ont augmenté les activités sur *P. falciparum* et *T. brucei* avec des IC₅₀ de 0.56 et 0.07 μ M respectivement. Mais ne connaissant pas la cible, il est impossible de prédire si les futures modifications seront favorables ou non à l'activité. La connaissance des cibles au niveau du parasite permettrait d'utiliser la modélisation moléculaire et ainsi d'optimiser la pharmacomodulation. Lors de travaux précédents, le Dr Kévin COTTET a entrepris sous la direction du Dr Romain DUVAL, la recherche des cibles protéiques de la guttiférone A **1**, afin d'orienter les modulations. Les travaux de recherche effectués par le Dr Romain Duval portent sur *P. falciparum* et c'est donc sur ce parasite que la recherche a été effectuée.

Cette partie s'organisera en deux parties : tout d'abord un rappel des travaux préliminaires effectués par le Dr Kevin Cottet, ensuite les travaux réalisés lors de cette thèse autour d'une nouvelle stratégie.

II. Travaux préliminaires

Dans cette partie, nous rappellerons les travaux préliminaires réalisés par le Dr K. Cottet¹. Deux sondes ont été envisagées : une sonde dite « d'imagerie directe » et une sonde dite « de protéomique ». Pour ces deux sondes, une étiquette type coumarine a été choisie. Ce type de sonde est couramment utilisé pour des applications biologiques. En effet, la plupart des dérivés de coumarine absorbent bien en dessus des 330 nm, ce qui permet une excitation en dehors des limites d'absorption des protéines. Elles émettent une fluorescence dans le domaine vert-bleu (410 – 590 nm). Leurs propriétés optiques ont aussi été beaucoup étudiées et sont facilement modulables en fonctions des substituants. Elles possèdent également un bon rendement quantique^{176,177, 178}.

¹⁷⁶ C. Geoffroy-Chapotot, Elaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt biologique, et imagerie par microscopie optique en champs proche, *thèse de doctorat*, soutenue le **13 octobre 1998**.

¹⁷⁷ B. Wagner, The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems, *Molecules*, **2009**, *14*, 14010210.

¹⁷⁸ V. Traven *et al.*, New reactions, functional compounds, and materials in the series of coumarin and its analogs, *Russ. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *61*, 1327-1347.

Les sondes dérivées de coumarine sont tout à fait adaptées à l'imagerie dans les cellules vivantes, elles ont été utilisées dans plusieurs études, notamment pour des sondes spécifiques de la cystéine. On peut notamment citer les travaux de Z. Lui *et al.*, qui ont développé une sonde pour détecter deux phénomènes au sein de cellules vivantes : le stress oxydant (par la présence d'acide hypochloreux) et la réduction cystéine/homocystéine (Schéma 37)¹⁷⁹.

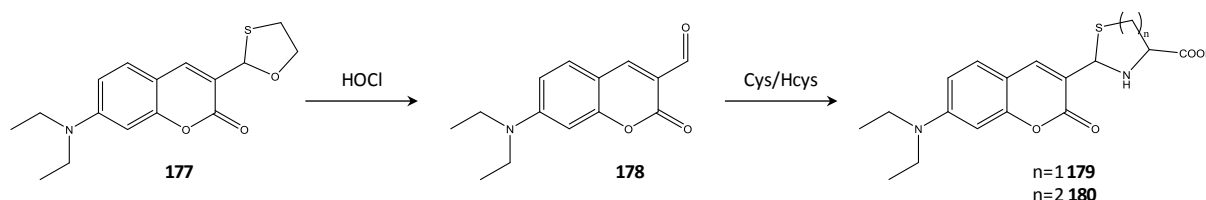


Schéma 37: Sonde dérivée de coumarine développée par Lui et al.

On peut également citer les travaux de Zeng *et al.*, qui ont développé une sonde fluorescente pour la détection rapide de cystéine dans les cellules vivantes (Schéma 38).

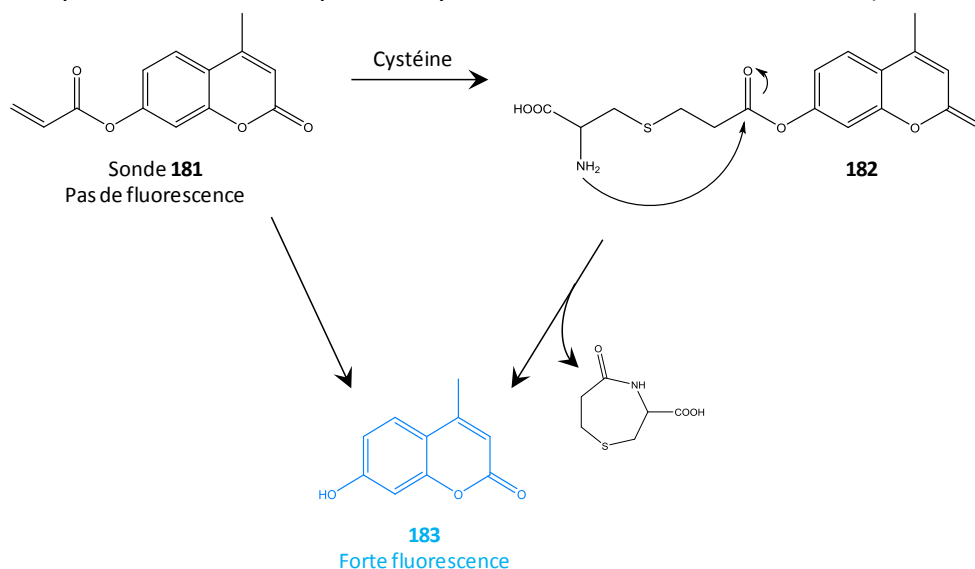


Schéma 38 : Sonde dérivée de coumarine développée par Zeng et al.

Comme il n'existe aucune étude préliminaire sur la protéine cible de la guttiférone A **1**, les possibilités étaient extrêmement vastes. Pouvoir visualiser la répartition de la guttiférone A **1** au sein de la cellule aurait pu permettre d'orienter les recherches ultérieures vers un stade de l'évolution du parasite ou un organe. Les recherches auraient alors été plus fines et d'une plus grande sensibilité. Une sonde « d'imagerie directe » **184**, intrinsèquement fluorescente (motif 7-aminocoumarine), a donc été synthétisée (Figure 72) et l'observation microscope de la fluorescence émise par la sonde pourrait nous indiquer dans quelle partie du parasite la guttiférone A **1** se localise préférentiellement.

¹⁷⁹ Z. Liu *et al.*, A novel fluorescent probe for imaging the process of HOCl oxidation and Cys/Hcy reduction in living cells, *RSC Adv.*, **2018**, 8, 9519-9523.

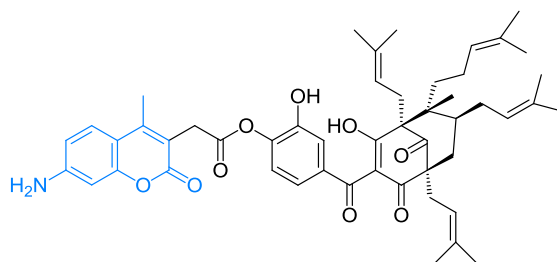


Figure 72 : Sonde dite "d'imagerie directe" 184

La sonde a été incubée dans un frottis sanguin infecté par *P. falciparum*, puis excitée à 350 nm (canal DAPI). Les résultats ont été observés sur différents stades de développement du parasite. Malheureusement, ils n'ont pas permis de conclure à une localisation particulière de la molécule dans le parasite¹.

La sonde «protéomique» avait pour but d'identifier les protéines cibles de la guttiférone A **1**. Cette sonde photoactivable fluorogénique (motif 7-azidocoumarine) devait être capable de se lier de façon covalente à la protéine cible, en présence d'UV et d'émettre de la fluorescence post-bioincorporation. La sonde serait incubée avec le lysat de parasite puis photoactivée, puis suite à une migration sur un gel SDS-PAGE, les zones fluorescentes correspondraient aux protéines cibles de la sonde.

L'approche du laboratoire de Pharmacognosie a été de se baser sur les travaux de *Chen et al.*, qui ont développé une sonde dérivée de coumarine pour étiqueter une protéine d'intérêt. Cette protéine est préalablement génétiquement taguée avec une courte séquence peptidique contenant deux cystéines. Deux groupements maléimides sont greffés sur la coumarine et permettent de réagir sélectivement avec le tag peptidique et non avec le glutathion, autre peptide contenant une fonction thiol présent dans les cellules (Schéma 39)¹⁸⁰. Cette technique est rapide et efficace pour détecter des protéines d'intérêt. L'idée de greffer une coumarine sur la guttiférone A **1**, qui va ensuite aller interagir avec sa protéine cible était donc viable.

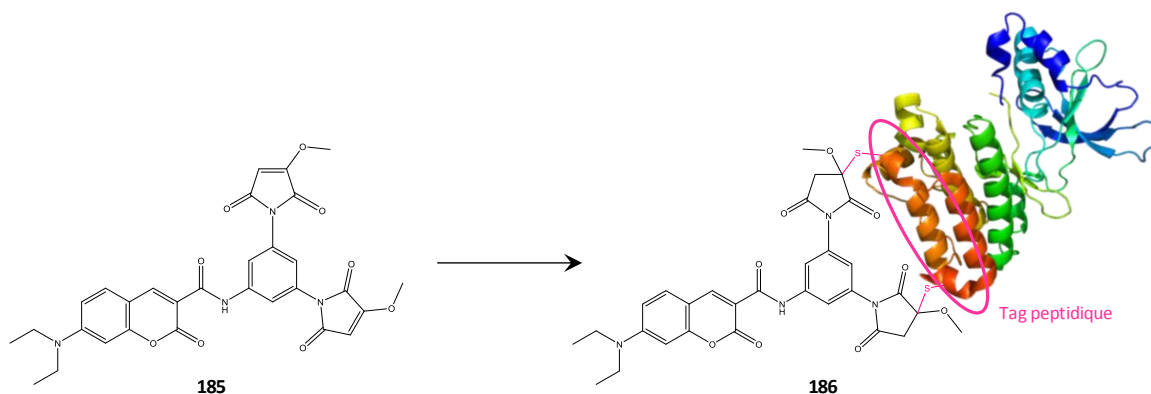


Schéma 39 : Sonde coumarinique pour étiquetage de protéines par *Chen et al.*

¹⁸⁰ Y. Chen *et al.*, Coumarin-based fluorogenic probes for no-wash protein labeling, *Angew. Chem.*, **2014**, 126, 14005-14008.

Une étiquette azidocoumarine **187** (AZC) a donc été choisie¹⁸¹. Sous l'action des UV-A, la fonction azido de cette étiquette se transforme en nitrène **188**¹⁸², espèce extrêmement réactive capable de s'insérer dans une liaison CH (Schéma 40)¹⁸³.

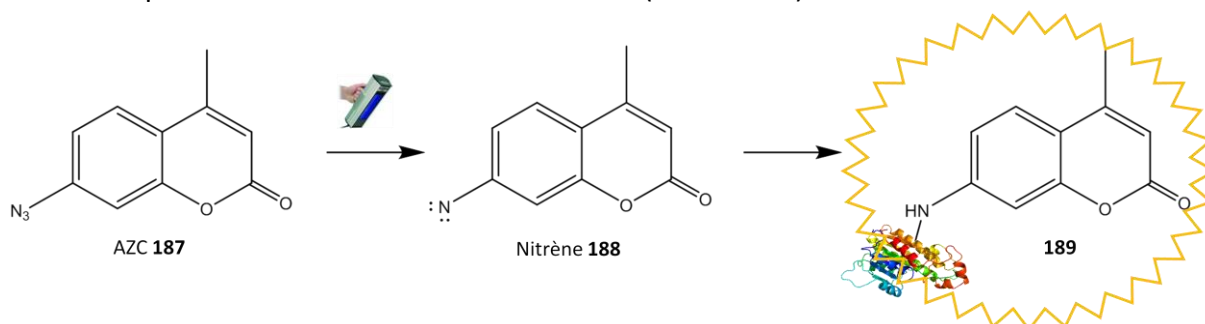


Schéma 40 : Photoactivation et insertion CH de l'étiquette AZC

La stratégie attendue pour cette sonde était qu'elle aille se fixer au niveau des sites actifs. Ensuite, sous l'action des UV, la fonction nitrène se lierait de manière covalente à son entourage, c'est-à-dire la protéine cible. Le complexe, étant fluorescent, serait ensuite facilement identifiable sur un gel SDS-PAGE.

À notre connaissance cette stratégie n'a été utilisée dans la littérature que sur le motif AZC lui-même, qui est un inhibiteur compétitif de la phénolsulfotransférase¹⁸⁴. Pour prouver que l'étiquette AZC pouvait se lier à une protéine et émettre de la fluorescence, cette dernière a été incubée et irradiée seule avec une protéine témoin (l'albumine de sérum bovin, BSA). Une gamme de concentration en AZC a été réalisée, ainsi qu'une gamme de concentration BSA. Ces réactions ont ensuite subi une migration sur gel SDS-PAGE. L'augmentation de l'intensité de la fluorescence fut corrélée avec l'augmentation de la concentration en AZC, ce qui suggère la formation du complexe attendu.

Au vu de ces résultats encourageants, la sonde « protéomique » **190** a été synthétisée (Figure 73). Son IC₅₀ contre *P. falciparum* est de 5.1 µM. Celle de la guttiférone A **1** étant de 5.4 µM, l'ajout de l'étiquette AZC ne semble pas avoir trop perturbé l'activité de la molécule. La sonde devrait donc *a priori* se fixer sur les mêmes cibles que la guttiférone A **1**, même si une validation de spécificité pharmacologique (blocage compétitif par un excès de guttiférone A **1**) sera nécessaire pour vérifier cet aspect. Si cela se confirme, les protéines

¹⁸¹ 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.

¹⁸² V. Voskresenska *et al.*, Photoaffinity labeling via nitrenium ion chemistry : protonation of the nitrène derived from a 4-amino-3-nitrophenylazide to afford reactive nitrenium ion pairs, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 19, 131-132, 11535-11547.

¹⁸³ G. Smolinsky *et al.*, 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.

¹⁸⁴ Chen *et al.*, Photoaffinity labeling probe for the substrate binding site of human phenol sulfotransferase SULT1A1:7-Azido-4-methylcoumarin, *Protein Science*, **1999**, 8, 2151-2157.

identifiées, bien que repérées à l'aide de la sonde, seront bien également les cibles de la guttiférone A **1**.

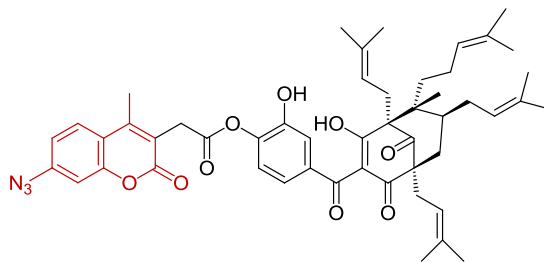


Figure 73 : Sonde "protéomique" 190

Après incubation de la sonde protéomique dans un frottis sanguin infecté par *P. falciparum* durant 20 min puis irradiation (lampe UV 100 W, 350 nm), une fluorescence est détectée dans le lysat, indiquant que le motif AZC a bien été phototransformé en motif 7-aminocoumatine, bioincorporé ou pas. Le lysat est développé sur gel d'acrylamide pour visualiser les protéines auxquelles s'est liée la sonde, montrant la présence de nombreuses bandes fluorescentes. Malheureusement, l'expérience répétée en présence d'un excès (20x stoechiométrique) de guttiférone A **1** native ne change pas notablement ce profil, avec une absence d'extinction des bandes. Cela indique malheureusement que la sonde établisse beaucoup de liaisons non spécifiques par rapport au principe actif et se lie avec plus de protéines que seulement les protéines cibles. La taille de l'étiquette est peut-être trop importante par rapport à la taille de la guttiférone A **1**, ce qui modifie ses propriétés en dépit d'une IC_{50} conservée, montrant les limites de l'évaluation quantitative de l'activité biologique (IC_{50}) par rapport à l'évaluation qualitative (profils SDS-PAGE).

III. Nouvelle stratégie

Ce chapitre sera organisé en quatre parties. Une première partie présentera la stratégie générale. Une deuxième partie relatara la synthèse de la guttiférone A **1** taguée. La troisième partie présentera la synthèse du fluorophore thiol. Une dernière partie expliquera la mise au point des conditions de réaction entre la guttiférone A **1** et le thiol.

III.1 Généralités

Suite à ces résultats, le Dr Romain Duval a élaboré une nouvelle stratégie. Cette stratégie repose sur l'ajout d'un tag beaucoup plus « discret » que le motif AZC sur la guttiférone A **1**, mais permettant toujours de se lier de manière covalente à la protéine cible dans une première étape. Dans une seconde étape, un fluorophore sera fixé chimiosélectivement sur le complexe afin de pouvoir visualiser les protéines marquées. Cette stratégie évite l'ajout de groupements trop volumineux sur les composés actifs et limite ainsi la modification des propriétés physicochimiques du composé d'intérêt. Nous nous sommes notamment

intéressés aux travaux de A. Lubin *et al.* Ils ont développé une sonde pour identifier les protéines cibles du composé BIX-01294 **191**, diaminoquinazoline possédant des activités antipaludiques prometteuses (Figure 74)¹⁸⁵.

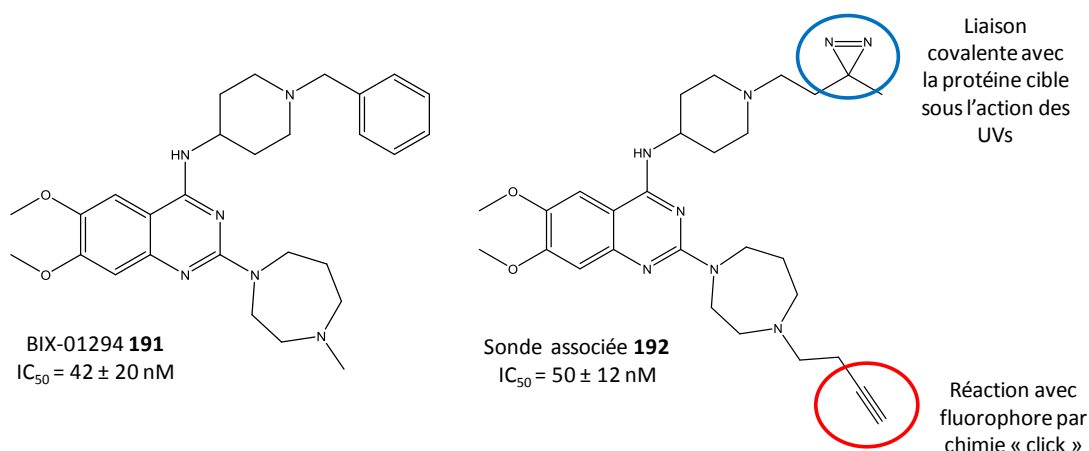


Figure 74 : Sonde d'identification de protéines cibles par photo-crosslinking

Pour réaliser la sonde associée **192**, deux parties ont été ajoutées. Le groupement diazirine a été ajouté pour, dans un premier temps, se lier de manière covalente à la protéine cible sous l'action des UV. En effet, sous l'action de l'irradiation, la fonction diazirine va former un carbène et libérer une molécule de diazote. Les carbènes sont très réactifs et vont s'insérer rapidement dans une liaison X-H, où X peut tout aussi bien être un carbone qu'un hétéroatome (Schéma 41)¹⁸⁶. Dans un deuxième temps, la partie alcyne va réagir avec un groupement azide couplé à un fluorophore. Cette réaction de chimie « click » classique va former un cycle triazolique. Une migration sur gel SDS-PAGE permettra de visualiser les protéines cibles.

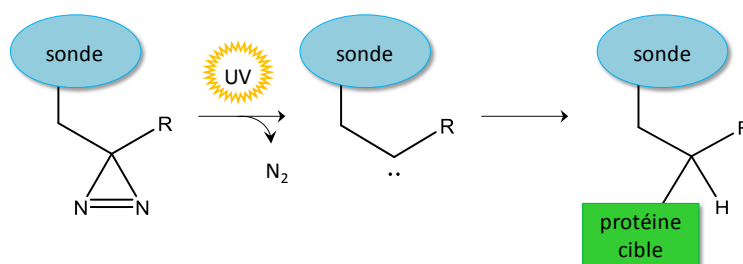


Schéma 41 : mécanisme de liaison de la fonction diazirine avec la protéine cible

L'alcyne a également réagi avec un groupement azide couplé à une biotine. Le complexe peut ensuite être fixé sur des billes de streptavidine. Les protéines cibles ont ainsi pu être enrichies puis identifiées par LC-MS.

¹⁸⁵ A. Lubin *et al.*, Development of a photo-cross-linkable diaminopyrimidine inhibitor for target identification in *P. falciparum*, *ACS Infect. Dis.*, **2018**, 4, 523-530.

¹⁸⁶ A. MacKinnon *et al.*, Target identification by diazirine photo-cross-linking and click chemistry, *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, **2009**, 1, 55-73.

Dans l'optique d'appliquer la même stratégie à la guttiférone A **1**, l'approche suivante est imaginée (Schéma 42). Un petit tag (trois carbones et un groupe azido) sera ajouté sur la guttiférone A **1** pour former la sonde **193**. En présence de lysat de *P. falciparum*, elle va se lier au niveau de ses sites actifs et sous l'effet de l'irradiation UV, le groupement azido va se transformer en nitrène et se lier de manière covalente aux protéines environnantes. Le complexe covalent [guttiférone A – protéine cible] **194** établi, le fluorophore est ajouté dans une deuxième étape et ainsi ne perturbe pas l'affinité de la sonde **193** pour ses cibles. Le fluorophore possédant une fonction thiol, la liaison entre le fluorophore et la sonde **193** se fera par photoaddition thiol-ène sur une des chaînes prényles de la sonde **193**. Cette réaction est dite bioorthogonale, c'est-à-dire suffisamment chimiosélective pour être réalisée dans un milieu biologique complexe.

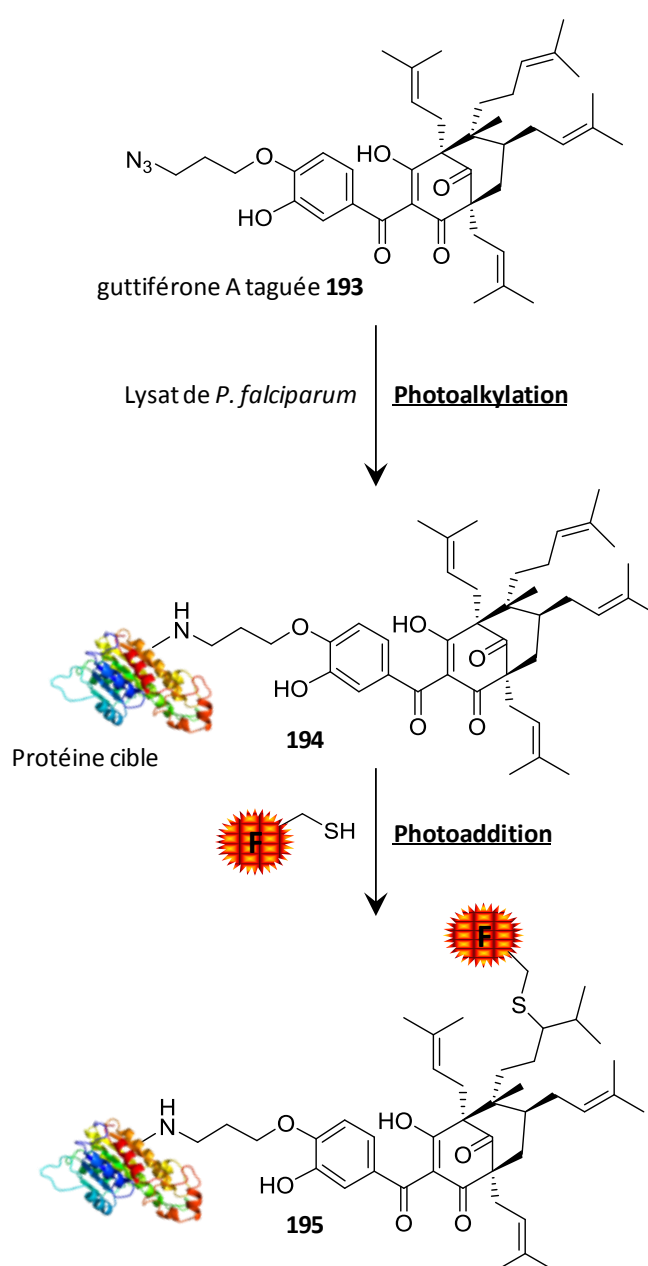


Schéma 42 : Nouvelle stratégie de recherche de cibles protéiques

III.2 Synthèse de la guttiférone A « taguée »

La première étape de cette étude repose sur la synthèse de la guttiférone A taguée **193**. Elle a été réalisée en deux étapes : d'abord la synthèse du tag, suivi de l'alkylation de la guttiférone A **1**.

III.2.1 Synthèse du tag

La première stratégie élaborée pour la synthèse du tag était une stratégie « one-pot » en deux étapes (Schéma 43).

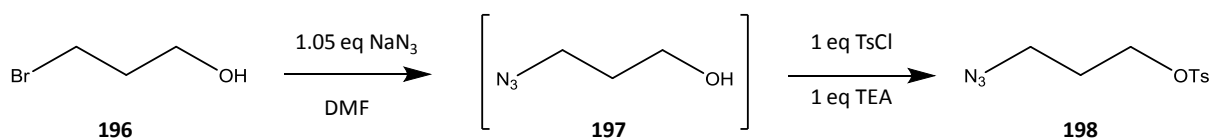


Schéma 43 : Première stratégie de synthèse du tag

Dans un premier temps, le brome du 3-bromopropanol **196** est substitué par un groupement azido. Cette réaction est largement décrite dans la littérature et les rendements sont globalement excellents¹⁸⁷. Nous nous sommes inspirés des travaux de F. Sebest *et al.* qui obtient le 6-azidohexan-1-ol **200** à partir du 6-bromohexan-1-ol **199** avec un rendement de 85 %¹⁸⁸ (Schéma 44).

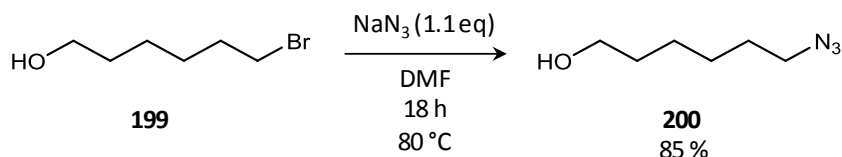


Schéma 44 : Synthèse du 6-azidohexan-1-ol par F. Sebest *et al.*

L'alcool est ensuite tosylé. Cette réaction est également une réaction très courante et qui possède de bons rendements, notamment sur les substrats aliphatiques¹⁸⁹.

La réaction représentée Schéma 43 a donc été mise en œuvre. La substitution du brome par le groupement azido est réalisée à température ambiante, sous atmosphère inerte pendant trois heures. Elle est considérée comme totale. Le DMF est évaporé à sec et le résidu est repris dans le DCM pour la tosylation.

Malheureusement, après plusieurs tentatives dans les mêmes conditions, le produit final obtenu après purification n'était pas le produit désiré, la RMN ne montrant aucun proton

¹⁸⁷ S. Alvarez *et al.*, A practical procedure for synthesis of alkyl azides at ambient temperature in DMSO in high purity and yield, *Synthesis*, **1997**, 413-414.

¹⁸⁸ F. Sebest *et al.*, Ring-expanded N-heterocyclic carbenes for copper-mediated azide-alkyne click cycloaddition reactions, *Chem. Cat. Chem.*, **2018**, 10, 2041-2045.

¹⁸⁹ V. Polic *et al.*, Regioselective epoxidations by cytochrome P450 3A4 using a theobromine chemical auxiliary to predictably produce N-protected β - ou γ -amino epoxides, *Adv. Synth. Catal.*, **2017**, 359, 3983-3989.

aliphatique. Le produit formé peut être TsN_3 avec un rendement de 37%. La RMN correspond à ce produit. Globalement, ces réactions sont difficiles à suivre en CCM du fait du manque de révélation des dérivés bromo-alcools.

Une autre méthode a donc été envisagée à partir du 1,3-dibromopropane **201** (Schéma 45)¹⁹⁰. Le produit attendu est le 1-azido-3-bromopropane **202**, mais la réaction ne pouvant pas être sélective, le 1,3-diazidopropane **203** est également formé.

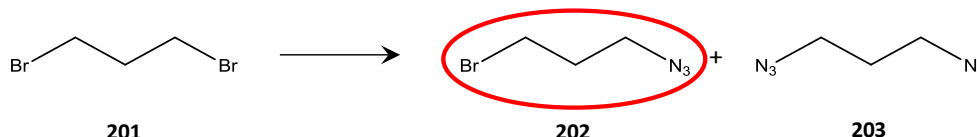


Schéma 45 : Deuxième stratégie de synthèse du tag

Le composé **202** a été difficile à purifier. Dans un premier temps, il semblait se dégrader sur colonne de silice, il a donc fallu trouver d'autres méthodes de purification. La colonne de florisil s'est révélée trop peu résolutive, les trois composés **201**, **202** et **203** sortaient en mélange. Même problème avec la distillation, les points d'ébullition des trois produits devant être trop proches. Finalement la purification a été effectuée sur colonne de silice, mais le rendement de 16 % après purification est extrêmement faible. Cependant, l'objectif de cette étude étant la synthèse de la guttiférone A taguée **193**, nous avons ici assez de matière pour continuer la synthèse. Cette réaction n'a donc pas été optimisée.

III.2.2 Synthèse de la guttiférone A taguée

La synthèse de la sonde a été effectuée dans les conditions d'alkylation de la guttiférone A **1** décrite dans les travaux de thèse du Dr Kevin Cottet (Schéma 46)¹.

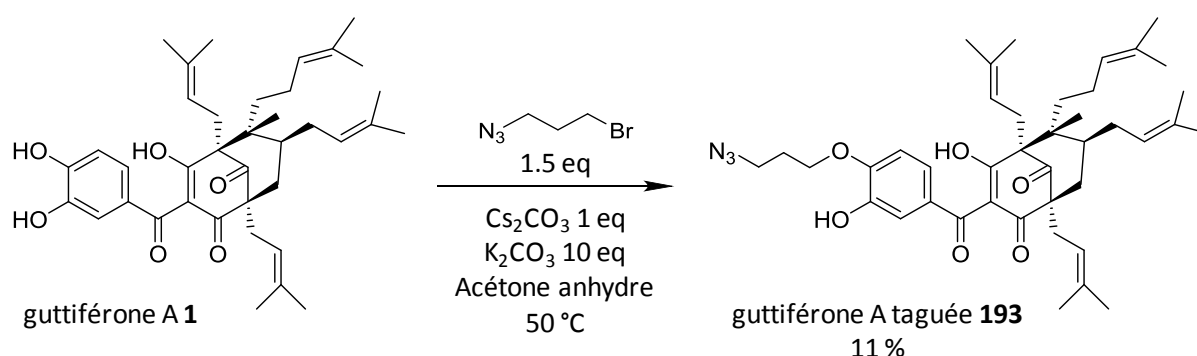


Schéma 46 : Synthèse de la sonde "guttiférone A taguée"

La conversion est totale après 6 h de réaction et trois produits sont formés. Le brut réactionnel a nécessité deux purifications pour conduire à la guttiférone A taguée **193** avec

¹⁹⁰ H. D. Agnew *et al*, Iterative in situ click chemistry creates antibody-like protein-capture agents, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4944-4948.

un rendement faible de 11 %. On récupère également 30 % de produit de départ **1** et 8 % de guttiférone A bis-alkylée.

III.3 Synthèse du fluorophore-thiol

Pour visualiser les protéines qui se sont liées à la guttiférone A **1**, il a fallu mettre au point un fluorophore-thiol afin de faire réagir le thiol avec les chaînes prényles de la guttiférone A **1**.

Pour synthétiser ce fluorophore-thiol, nous avons choisi de reproduire la même stratégie que celle utilisée par Weinrich *et al.*, dans ces travaux cités précédemment, pour fixer un groupement thiol sur une surface solide¹⁹¹. Il s'agit de faire réagir un fluorophore sur chaque groupement amine d'une cystamine **204** (pour former un dimère **205**), et ensuite réduire le pont disulfure pour obtenir la fonction thiol du composé **206** (Schéma 47). Le dimère présente l'avantage d'être plus stable s'il doit être conservé. La réduction du pont disulfure se fera juste avant l'utilisation pour éviter que la fonction thiol ne s'oxyde.

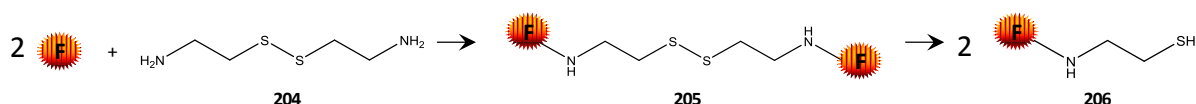


Schéma 47 : pour la synthèse du fluorophore-thiol

Dans les travaux de Weinrich *et al.*, la première étape consiste à faire réagir un acide carboxylique fixé sur la surface avec l'amine de la cystamine, une réaction type couplage peptidique. Ils utilisent le diisopropylcarbodiimide comme agent de couplage et le diisopropylethylamine comme catalyseur, dans le DMF. La réduction du pont disulfure se fait ensuite avec du dithioerythritol (agent réducteur) en présence de TEA.

Nous avons choisi de synthétiser un fluorophore à base de sulforhodamine B. C'est un colorant communément utilisé pour les tests de cytotoxicité¹⁹². Ce test est très sensible, possède un très bon rapport signal-sur-bruit et permet de tester un grand nombre de composés. De plus la coloration apparaît rapidement et reste stable.

Ce fluorophore a déjà été utilisé comme sonde de détection pour des hydrocarbures aromatiques polycycliques. La sulforhodamine B a été couplée à un 3-hydroxybenzo[a]pyrène, *via* une courte chaîne aliphatique pour former la sonde **207** (Figure 75). Malheureusement la voie de synthèse de ce composé n'est pas décrite¹⁹³.

¹⁹¹ D. Weinrich *et al.*, Oriented immobilization of farnesylated proteins by thiol-ene reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1252-1257.

¹⁹² P. Skehan *et al.*, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl Cancer Inst.*, **1990**, 82, 1107-1112.

¹⁹³ A. Hupstat *et al.*, Novel intramolecular energy transfer probe for detection of benzo[a]pyrene metabolites in a homogeneous competitive fluorescence immunoassay, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, 1666-1673.

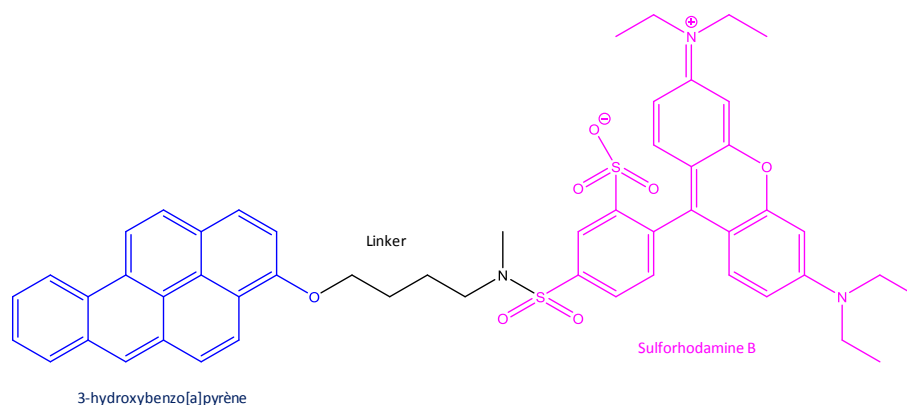


Figure 75 : Sonde dérivée de sulforhodamine B 207

Nous avons donc décidé d'appliquer la stratégie du Schéma 47 à la sulforhodamine B **208** (Schéma 48) car c'est un colorant très émissif, et qui forme des produits hydrosolubles qui seront donc plus facilement manipulables lors des tests biologiques ultérieurs.

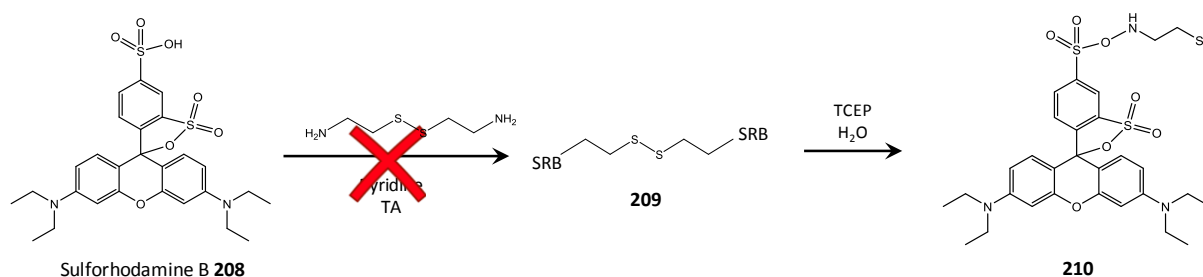


Schéma 48 : Première stratégie de synthèse du fluorophore-thiol

Après deux heures de réaction, il n'y a toujours aucun nouveau produit dans le milieu réactionnel. Nous avons arrêté la manipulation.

La synthèse d'un fluorophore à base de sulforhodamine B **208** n'ayant pas abouti, nous avons tenté une autre approche. Cette réaction nécessitant des ajustements, nous nous sommes tournés vers un substrat plus accessible car moins cher : la rhodamine B **211**. Cette molécule ne possède pas de groupement sulfonate, elle est donc moins hydrosoluble, mais ses propriétés émissives sont similaires à celles de la sulforhodamine B **208**. Nous avons tenté de synthétiser un dimère du même type qu'avec la sulforhodamine B **208**, mais à partir de rhodamine B base **211** (Schéma 49).

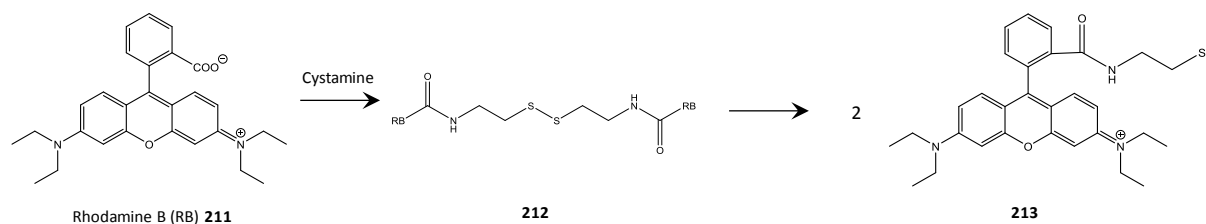


Schéma 49 : du fluorophore-thiol à base de rhodamine B

Les conditions pour réaliser ce couplage se rapprochent d'un couplage peptidique. C'est une réaction largement décrite dans la littérature. Elle sera sans doute plus facile à mettre en œuvre que le couplage sur la fonction sulfonate espéré précédemment avec la sulforhodamine. L'agent de couplage utilisé est le DCC (1 eq) et le catalyseur choisi est le DMAP (0.1 eq).

Ces premières conditions nous ont conduits à la formation d'un composé autre que le dimère attendu. Nous avons observé la formation de N-acylurée **215**, qui est un produit secondaire bien connu lors des couplages peptidiques, surtout avec l'utilisation de DCC¹⁹⁴. Il est dû à un réarrangement intramoléculaire de la O-acylurée **214** (Schéma 50). Cette réaction secondaire se produit lorsque la durée de vie de la O-acylurée **214** est trop longue, donc quand la réaction entre la O-acylurée **214** et le catalyseur est lente. Pour remédier à ce problème, la concentration du catalyseur peut être augmentée¹⁹⁵.

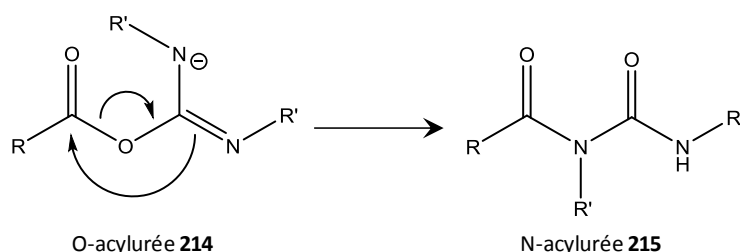


Schéma 50 : Mécanisme de la formation de N-acylurée

Malgré les multiples tentatives, nous n'avons pas réussi à obtenir le bon dimère avec cette méthode (entrées 1-6 du Tableau 28). Nous avons tenté de prendre des réactifs qui favorisent moins l'apparition de N-acylurée **215**¹⁹⁴.

Tableau 28 : Récapitulatif des conditions tentées pour synthèse du fluorophore-thiol

Entrée	RB base (eq)	Cystamine (eq)	DCC (eq)	DMAP (eq)	Solvant	Remarques		
1	1	0,5	1	0,1	Dry ACN			
2	1	0,25	0,5	0,2	Dry ACN	Excès d'acide		
3	1	0,3	0,5	0,1	Dry ACN			
4	1	0,3	0,6	0,1	Dry ACN			
5	1	0,25	0,5	0,25	Dry ACN			
6	1	0,3	0,5	0,3	Dry ACN	Thermostaté à 25°C		
	RB base (eq)	RB HCl (eq)	HOBt (eq)	EDCI (eq)	Cystamine (eq)	Et ₃ N (eq)	Solvant	Remarques
7		1	1,1	1,1	0,6	5	Dry DMF	50 °C

¹⁹⁴ C. Montalbetti *et al*, Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827-10852.

¹⁹⁵ Wiener *et al*, An improved method for the catalytic preparation of t-butyl esters of carboxylic and fatty acids, *J. Mol. Cat.*, **1986**, 37, 45-52.

8	1	1,1	1,1	0,5	2,1	Dry DCM
9	1	1,1	1,1	0,6	5	Dry DCM
10	1	1,1	1,1	0,6	3	Dry DCM

En nous basant sur les travaux de Baud *et al*, nous avons utilisé l'EDCI (1.1 eq) et l'HOBt (1.1 eq) dans le DCM¹⁹⁶. La cystamine est ajoutée après 10 min afin de réduire le risque de formation d'N-acylurée. Malheureusement après plusieurs tentatives en faisant varier différents paramètres, nous n'avons toujours pas réussi à obtenir le dimère souhaité (entrées 7-10 du Tableau 28). Le réarrangement intramoléculaire de la O-acylurée est connu pour être rapide dans le DMF, nous avons donc ensuite testé le DCM, dans lequel ce réarrangement est plus lent¹⁹⁵. Nous avons également utilisé de la triéthylamine pour neutraliser la cystamine vendue sous forme acide, ainsi que la rhodamine B HCl. Une quantité suffisante pour activer les réactifs est nécessaire, mais un excès favoriserait l'apparition de la N-acylurée¹⁹⁵. Malheureusement ces différents essais n'ont pas permis d'aboutir à la formation du composé souhaité.

Pour finir, nous avons abandonné la rhodamine B et ses dérivés pour nous concentrer sur un autre fluorophore et un autre type de réaction. Le 4-chloro-7-sulfobenzofurazane d'ammonium est une très bonne sonde décrite en 1982 par J. Andrews *et al*. Elle est hydrosoluble, non cytotoxique et possède un bon rendement quantique de fluorescence. C'est également un réactif spécifique des thiols¹⁹⁷.

Pour la synthèse de ce fluorophore nous nous sommes intéressés aux travaux de D. Rotili *et al*. qui ont synthétisé une large bibliothèque d'analogues de 4-chloro-7-sulfobenzofurazan **216**¹⁹⁸. Ce sont des composés qui agissent sur la glutathione-S-transferase. Nous pouvons notamment nous focaliser sur la synthèse de l'analogue **217** décrit Schéma 51, qui est très similaire à la réaction que nous souhaitons mettre en œuvre.

¹⁹⁶ Baud *et al*, Highly ligand efficient and selective N-2-(thioethyl)picolinamide histone deacetylase inhibitors inspired by the natural product psammaphin A, *Chem. Med. Chem.*, **2013**, 8, 149-156.

¹⁹⁷ J. Andrews *et al.*, Ammonium 4-chloro-7-sulfobenzofurazan : a new fluorogenic thiol-specific reagent, *Biochem. Biophys.*, **1982**, 1, 386-396.

¹⁹⁸ D. Rotili *et al.*, Synthesis and structure-activity relationship of new cytotoxic agents targeting human glutathione-S-transferases, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 89, 156-171.

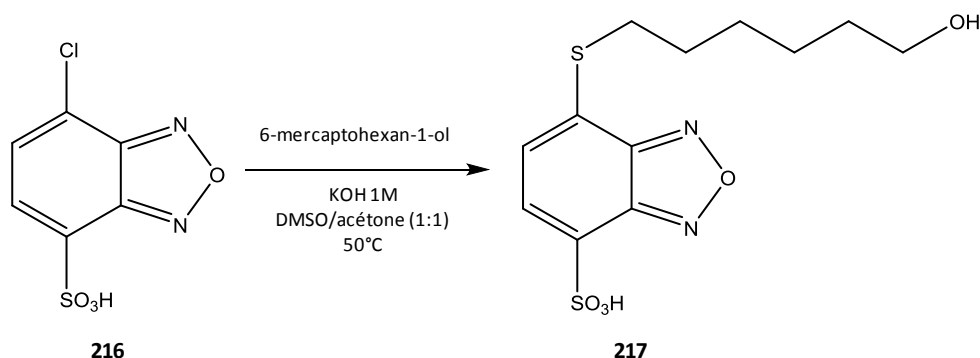


Schéma 51 : Synthèse d'un dérivé de 4-chloro-7-sulfobenzofurazan

Nous avons adapté les conditions à la sonde que nous voulions synthétiser. Nous avons choisi un « linker » avec une longue chaîne pour que le fluorophore-thiol puisse réagir avec les phényles de la guttiférone A **1** même si elle est très encombrée par sa protéine cible (Schéma 52).

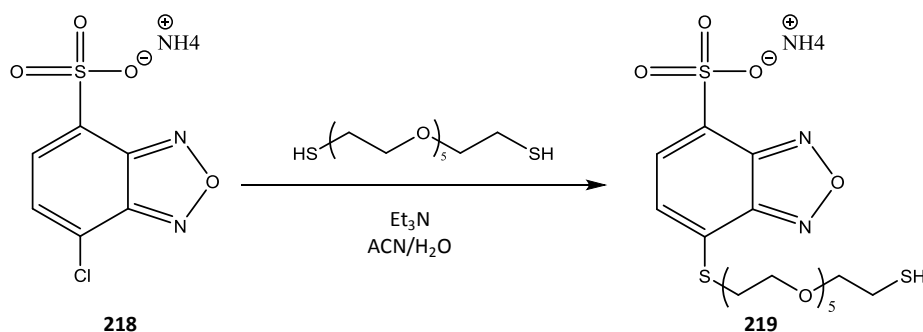


Schéma 52 : Synthèse du fluorophore-thiol

L'hexa(éthylène glycol) dithiol est diluée dans l'ACN. Le 7-chloro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate d'ammonium **218** est dissous dans l'eau et ajouté goutte à goutte. Ainsi le dithiol est toujours en large excès, ce qui évite que la deuxième fonction thiol ne réagisse et forme un dimère. On favorise ainsi l'apparition du composé souhaité **219**. Il est obtenu avec un rendement de 86 %.

III.4 Photoaddition thiol-ène

III.4.1 Généralités

La réaction thiol-ène est bien connue dans la littérature, notamment dans le domaine des matériaux. Elle réunit notamment toutes les conditions pour être considérée comme une réaction de « chimie clic »¹⁹⁹ :

- Très bon rendement, avec des produits secondaires (s'il y en a) éliminables par des moyens autre que la chromatographie ;
- Régio- et stéréospécificité ;

¹⁹⁹ C. E. Hoyle *et al*, Thiol-ene click chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1540-1473.

- Non sensible à l'oxygène ou l'eau ;
- Conditions de réaction douces, pas de solvant ou eau ;
- Orthogonalité avec d'autres réactions courantes ;
- Adaptable à beaucoup de composés de départ.

Elle est souvent utilisée pour former des films de protection ou des polymères réticulés²⁰⁰ ou des dendrimères²⁰¹.

C'est une réaction radicalaire. Le mécanisme est représenté Schéma 53. Le radical thiyl **221** est tout d'abord formé grâce à un initiateur et à une irradiation. Ce radical va ensuite réagir avec une double liaison carbone-carbone pour former un radical porté par un carbone **222**. Celui-ci peut subir deux réactions différentes²⁰² :

- Une étape de « croissance de chaîne », qui est utilisée en polymérisation. Le radical **222** subit l'attaque d'une autre double liaison carbone-carbone. Un nouveau radical **223** va ainsi se former, etc ...
- Une étape de « step growth », réaction qui nous concerne pour cette étude. Le radical porté par le carbone réagit avec un thiol pour former un nouveau radical thiyl et le produit désiré **224**.

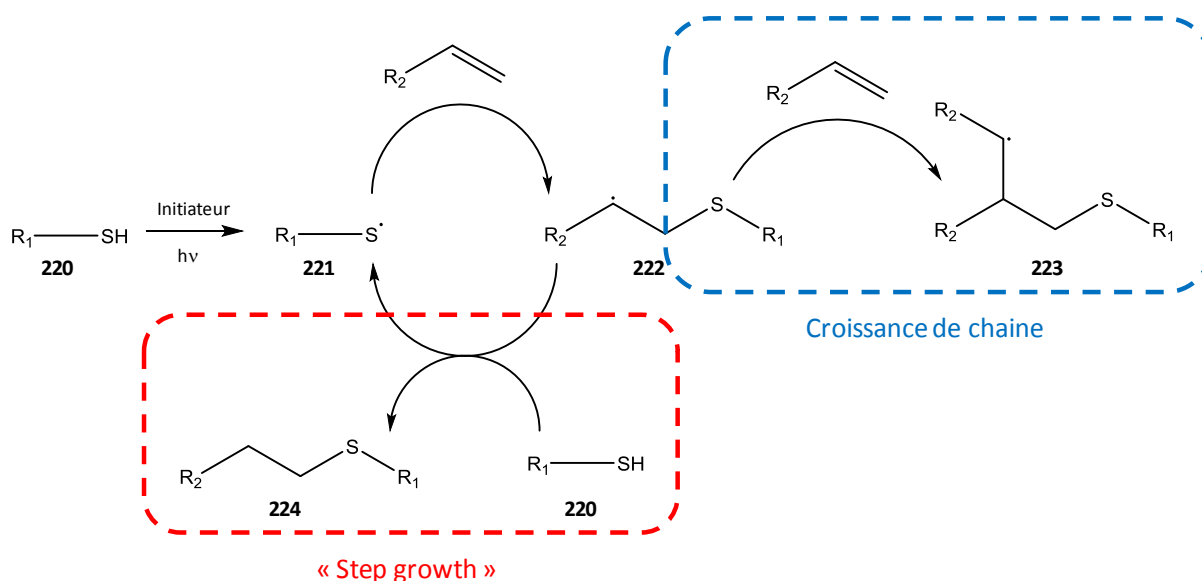


Schéma 53 : Mécanisme de la réaction de photoaddition thiol-ène

²⁰⁰ S. Mongkhontreerat *et al*, UV initiated thiol-ene chemistry : a facile and modular synthetic methodology for the construction of functional 3D networks with tunable properties, *J. Mater. Chem. A*, **2013**, 1, 13732-13737.

²⁰¹ Killops *et al*, Robust, efficient and orthogonal synthesis of dendrimers *via* thiol-ene "click" chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 5062-5064.

²⁰² Z. Xu *et al*, Click chemistry and material selection for in situ fabrication of hydrogels in tissue engineering applications, *ACS biomater. Sci. Eng.* **2018**.

III.4.2 Exemples de la littérature

La réaction de photoaddition thiol-ène est largement décrite dans la littérature, surtout sur des doubles liaisons terminales²⁰⁰. Les conditions opératoires utilisées dans la littérature sont récapitulées dans le Tableau 29. Nous nous inspirerons de ces conditions pour établir notre protocole par la suite.

Tableau 29 : résumé des conditions pour réaction thiol-ene dans la littérature. DP : degrés de polymérisation

Entrée	[Ene] mmol/mL		[Thiol] mmol/mL	Solvant	Temps irradiation	Longueur d'onde (nm)	Initiateur de radicaux
1 ²⁰³	DP 25	0,02	0,23	1,4-dioxane	2*30 min	360	Irgacure 184 1%
	DP 46	0,01	0,23	1,4-dioxane	2*30 min	360	Irgacure 184 1%
	DP 70	0,006	0,23	1,4-dioxane	2*30 min	360	Irgacure 184 1%
	DP 25	0,02	0,47	1,4-dioxane	2*30 min	360	Irgacure 184 1%
	DP 46	0,01	0,47	1,4-dioxane	2*30 min	360	Irgacure 184 1%
	DP 70	0,006	0,47	1,4-dioxane	2*30 min	360	Irgacure 184 1%
2 ²⁰⁴	0,09		0,29	THF	10 min	365	DMPA (0,01 mmol)
3 ²⁰⁵	0,11		0,15	Ethanol 96 %	20 min	365	Iragacure 12959 0,5 % wt
4 ²⁰⁶				Tampon pH 7,4	10 min	365	
5 ²⁰⁷	1.1		5	DCM	15 – 50 h	365	2-hydroxy-2- methylpropiophénone (0.07 eq)

Il existe cependant quelques exemples de photoaddition thiol-ène sur des doubles liaisons au sein d'une chaîne. On peut notamment citer les travaux de Weinrich *et al.* (Entrée 4 du Tableau 29), qui se sert de cette réaction pour immobiliser des protéines sur une surface fixe

²⁰³ K. Olofsson *et al.*, Facile synthesis of dopa-functional polycarbonates *via* thiol-ene-coupling chemistry towards self healing gel, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **2016**, 54, 2370-2378.

²⁰⁴ E.-M. Schön *et al.*, N-Cyclohexyl-11-(octylthio)undecanamide, *Molbank*, **2010**, 3, M689.

²⁰⁵ K. Olofsson *et al.*, Soft hydrogels from tetra-funtional PEGs using UV-induced thiol-ene coupling chemistry : a structure-to-property study, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 30118-30128.

²⁰⁶ D. Weinrich *et al.*, Oriented immobilization of farnesylated proteins by thiol-ene reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1252-1257.

²⁰⁷ C. Fu *et al.*, Effect of structure on the properties of polyurethanes based on aromatic cardanol-based polyols prepared by thiol-ene coupling, *Prog. Org. Coat.*, **2015**, 83, 19-25.

(Schéma 54). Un groupement farnésyl est préalablement ajouté sur les protéines. Des groupements thiols sont fixés sur la surface. La réaction d'immobilisation thiol-ène a lieu sur la dernière double liaison en bout de chaîne, qui a une structure similaire aux prényles de la guttiférone A **1**.

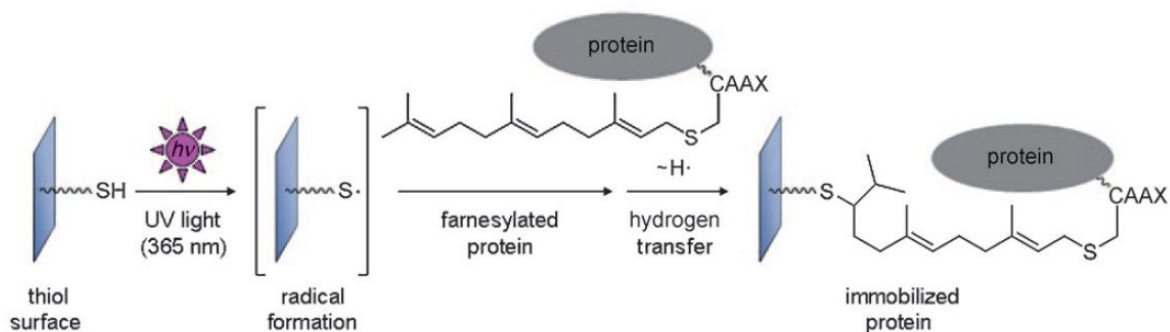


Schéma 54 : Mécanisme supposé de la photoaddition thiol-ène sur un farnésyl²⁰⁶

La réaction de photoaddition est faite dans un tampon contenant du dithioérythritol (2.5 nM) et du glycérol (20 %) pour empêcher que la surface et les protéines ne sèchent. Le milieu réactionnel est irradié entre 10 et 20 min à 365 nm.

On peut également citer les travaux de Fu *et al* (entrée 5 du Tableau 29), qui additionnent le 2-mercaptoéthanol sur le cardanol **227** et ses dérivés dans le but d'obtenir des polyols aromatiques adaptés pour la synthèse de polyuréthane (Schéma 55).

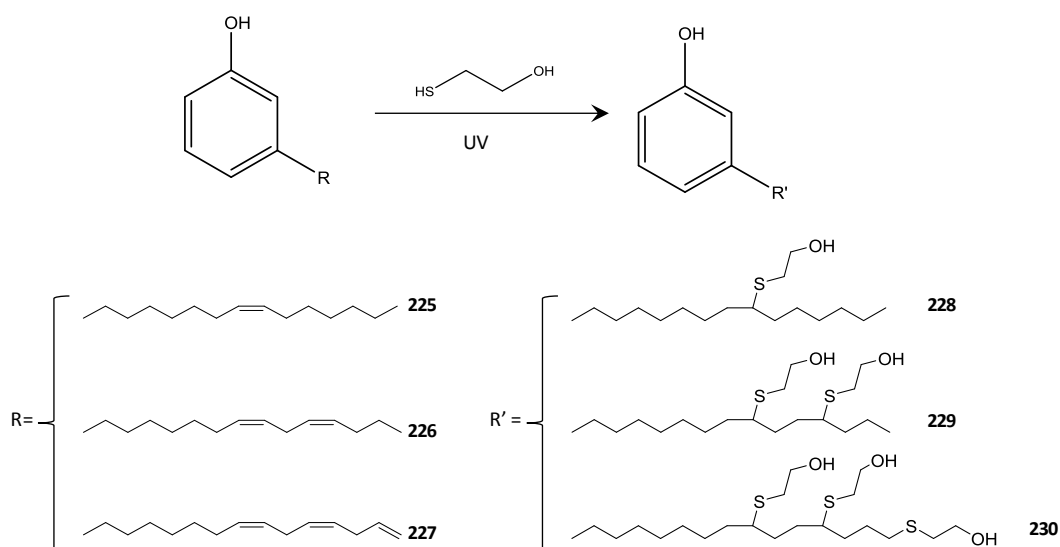


Schéma 55 : Synthèse des polyols par Fu et al.²⁰⁷

Le substrat est dissout dans le DCM (1.1 mol/L) avec du 2-mercaptoéthanol (4.5 eq) et un initiateur de radicaux (2-hydroxy-2-méthylpropiophénone). Le mélange réactionnel est irradié entre 15 heures et 50 heures en fonction des substrats. Les rendements obtenus sont compris entre 78 et 81 %.

III.4.3 Application à la guttiférone A **1**

Pour notre étude, la réaction entre la guttiférone A **1** et le fluorophore doit être adaptable en milieu biologique donc une réaction thiol-ène semble appropriée. De plus, notre stratégie repose sur le fait de faire réagir un fluorophore avec la guttiférone A **1** après fixation de celle-ci à sa cible. Deux options s'offraient donc à nous : rajouter un groupement sur la guttiférone A **1** pour mettre en place une réaction ou utiliser les fonctions disponibles sur la molécule. Utiliser les prényles pour cette étape nous faisait économiser une étape de synthèse et serait une approche élégante. Le deuxième avantage est que la sonde guttiférone A **1** est d'autant moins transformée que ses propriétés sont proches de celles de la guttiférone A **1** et donc, l'identification des protéines cibles sera plus spécifique (Schéma 56).

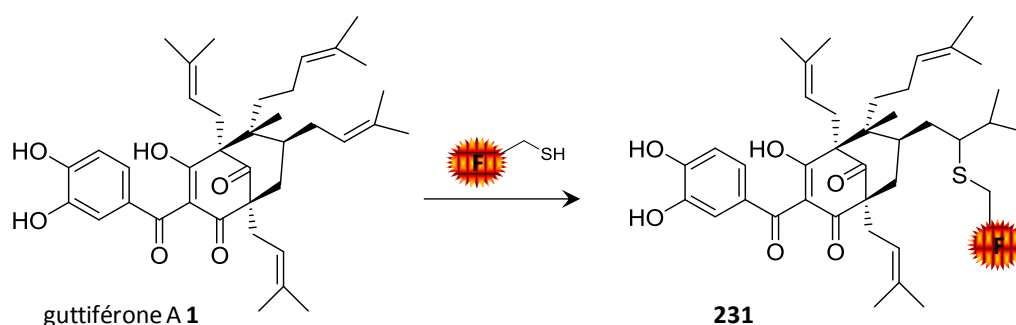


Schéma 56 : Photo-addition thiol-ène sur les prényles de la guttiférone A **1**

Nous voulons donc faire réagir un thiol sur l'une (au moins) des chaînes prényles de la guttiférone A **1**. Le composé **231** est donné à titre indicatif, en supposant que cette chaîne prényle soit la plus réactive mais il est difficile de prévoir quel composé nous obtiendrons.

Avant de mettre au point les conditions, la réaction est testée avec un thiol modèle, le phénylethanthiol. Dans l'objectif de tester le plus grand nombre de conditions possibles pour optimiser la réaction au mieux, les tests sont réalisés en plaque 96 puits sous un volume de 300 μ L.

Les conditions testées sont récapitulées dans le Tableau 30. Chaque entrée a été testée dans 5 solvants différents : toluène, n-propanol, éthanol, THF et 1,4-dioxane. Ces conditions ont été choisies en nous basant sur les conditions de la littérature, récapitulées dans le Tableau 30, vu précédemment.

Tableau 30 : Conditions testées pour la photo additions thiol-ène

Reactifs : 0,5 mg guttiferone A et 10 eq de phényléthanethiol		
Entrée	Initiateur de radicaux	Quantité d'initiateur (eq)
1	DMPA	0,05
2	DMPA	0,1
3	DMPA	0,2
4	DMPA	0,3
5	AIBN	0,05
6	AIBN	0,1
7	AIBN	0,2
8	AIBN	0,3
9	AIBN	1
10	Péroxyde de benzoyle	0,1
11	Péroxyde de benzoyle	0,3
Solvants : Toluene, n-prOH, EtOH, THF, 1,4-dioxane		

Les milieux réactionnels sont irradiés pendant 2 h (lampe UVA, 100 W, 350 nm). La réaction est suivie par CCM toutes les 30 min. Même en augmentant la quantité de DMPA, aucune réaction ne s'est produite entre la guttiferone A **1** et le thiol dans aucun des cinq solvants (entrées 1 à 4).

Nous avons décidé d'utiliser un autre initiateur de radicaux. En effet pour être efficace un photo-initiateur doit satisfaire plusieurs critères²⁰⁸ :

- Une forte absorption à la longueur d'onde utilisée
- Une durée de vie suffisamment courte du radical formé pour éviter des réactions parasites
- Un bon rendement quantique de formation de radicaux
- Une grande réactivité entre l'amorceur et les réactifs.

Il existe également plusieurs types de photo-initiateurs : type I et type II.

Les photo-initiateurs de type I subissent une coupure de Norrish. Ce sont en général des cétones aromatiques qui, sous l'action de la lumière, subissent une rupture homolytique de la liaison en α du carbonyle. On a alors formation de deux radicaux libres (Schéma 57).

²⁰⁸ M.-A. Tehfé, Etude de nouveaux systèmes amorceurs pour les polymérisations radicalaires ou cationiques, thèse de doctorat, soutenue le 16 septembre 2011, Université de Haute Alsace.

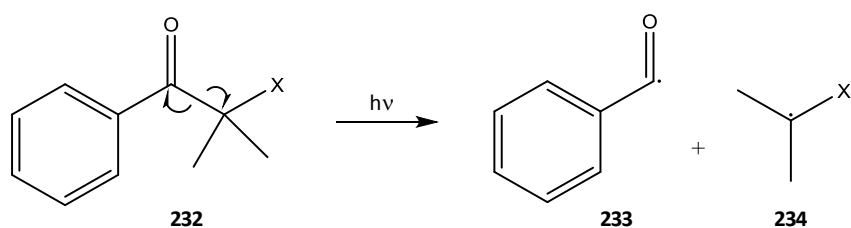


Schéma 57: Mécanisme de formation des radicaux à partir de photoamorceur de type I

Les photo-initiateurs de type II ne subissent pas de rupture. La formation du radical passe par l'arrachement d'un hydrogène à un donneur. Il y a alors formation d'un radical cétyle, et du radical correspondant au donneur d'hydrogène. L'arrachement peut se faire de façon directe (DH), c'est le cas avec les alcools par exemple. Elle peut aussi se faire par transfert d'électron, puis par transfert de proton (AH), comme c'est le cas avec les amines (Schéma 58).

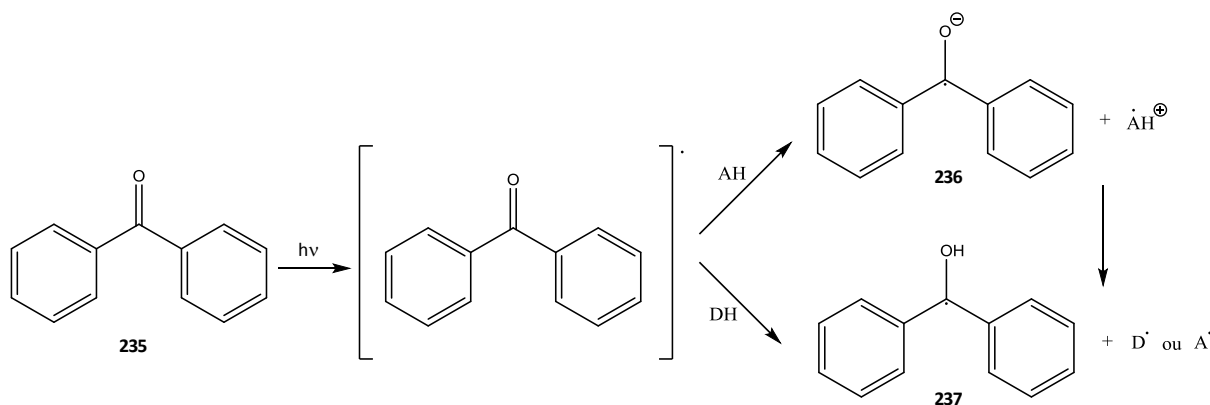


Schéma 58 : Mécanisme de formation de radicaux à partir de photoamorceurs de type II

Dans le cas des photo-initiateurs de type II, l'amorçage de la réaction se fait par le radical du donneur d'hydrogène ($D^\bullet$ ou $A^\bullet$).

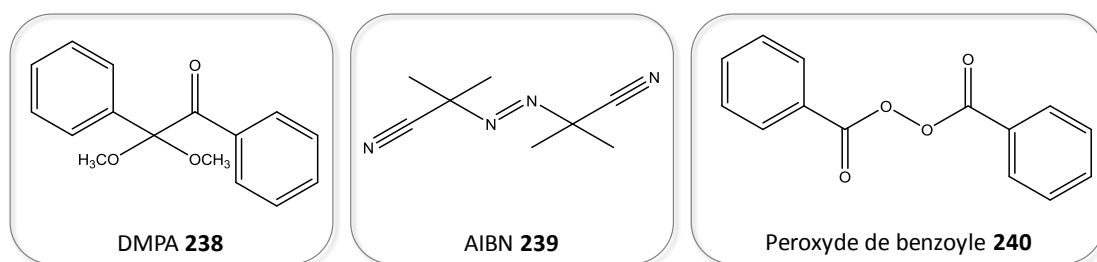


Figure 76 : Structures des initiateurs de radicaux

Un changement d'initiateur peut donner de meilleurs résultats. Les structures des différents initiateurs de radicaux sont représentées Figure 76. Ils sont tous de type I. Nous avons alors testé un autre initiateur plus courant, l'AIBN **239**, avec le même protocole. Une fois de plus, même en augmentant progressivement la quantité d'AIBN **239**, aucune réaction ne se produit (entrées 5 à 9). Les conditions de l'entrée 9 ont également été testées sur deux modèles de molécules contenant des prényles, le farnésol et le géraniol (Figure 77). Aucune réaction n'a été observée.

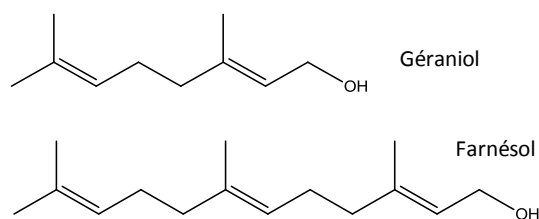


Figure 77 : Géraniol et farnésol

Nous avons décidé de tester un autre initiateur commun, avec une structure plus proche de celle du DMPA **238** : le peroxyde de benzoyle **240** (PdB), qui produit le même radical benzoyle, connu pour sa grande réactivité sur les dérivés acryliques. Les conditions de l'entrée 10 sont appliquées avec le même protocole d'irradiation que précédemment. Les conditions de l'entrée 10 sont également testées sur géraniol **241** et farnésol **242**. Ces derniers disparaissent totalement après 1h d'irradiation dans le THF, par contre la guttiférone A **1** ne semble toujours pas réagir. Le géraniol **241** et le farnésol **242** ne réagissent pas non plus dans les autres solvants. Comme les modèles semblent réagir, nous avons poursuivi cette piste et augmenté la quantité d'initiateur avec la guttiférone A **1** (entrée 11). Malheureusement toujours aucune réaction n'a lieu.

Cette réaction a été lancée sur plus grande échelle sur le géraniol **241** (100 mg) et le farnésol **242** (100 mg) afin d'isoler et de caractériser les produits pour vérifier que la réaction qui a lieu est bien celle désirée. Les mêmes conditions ont été utilisées : 10 équivalents de 2-phényléthane thiol, 0.1 équivalent de peroxyde de benzoyle et 20 mL de THF. Le milieu réactionnel est refroidi avec de la glace et irradié avec la même lampe que précédemment. L'avancement de la réaction est contrôlé toutes les 30 min et la température du milieu est mesurée. Comme le volume de milieu réactionnel est plus important, la température reste autour des 10 °C grâce au bain de glace. Après 1 h 15 aucune réaction n'est observée, nous avons donc retiré la glace pour que le milieu réactionnel se réchauffe, comme dans les essais en plaque 96 puits. La réaction est arrêtée après 3 h 15, la température du milieu réactionnel a atteint les 45 °C.

Malheureusement, la réaction semblait artificielle, car sur plus grande quantité, aucun nouveau produit n'a été formé.

Par manque de temps, les investigations sur le couplage thiol-ène n'ont pas pu être poursuivies.

IV. Conclusion

Afin de concevoir des analogues optimisés de guttiférone A **1** à visée antiparasitaire de manière rationnelle, il serait intéressant de connaître la cible d'action de cette dernière. Dans ce but, une sonde photoactivable fluorogénique avait été synthétisée lors de travaux précédents. Malheureusement celle-ci n'avait pas permis la détermination des cibles car trop peu spécifique. Une nouvelle stratégie a donc été imaginée : ajouter un tag plus discret

sur la guttiférone A **1** qui lui permette de se lier de manière covalente à la protéine cible et venir faire réagir un fluorophore sur la guttiférone A **1** dans un second temps.

Nous avons réussi à synthétiser la guttiférone A taguée **119**, ainsi que le fluorophore-thiol **219**. Malheureusement la dernière étape de cette étude n'a pas pu être menée jusqu'au bout car nous n'avons pas réussi à mettre au point les conditions de la thiol-ène photoaddition.

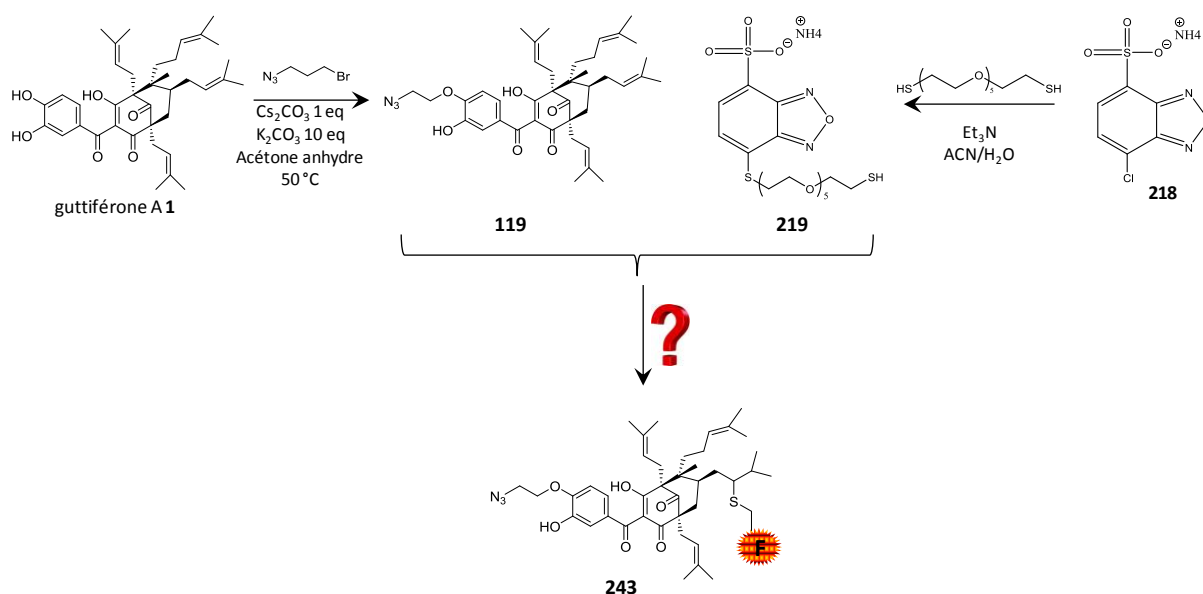


Schéma 59 : Récapitulatifs et perspectives à propos de la recherche des cibles de la guttiférone A **1**

Aucune des conditions de photoaddition que nous avons tenté sur les chaînes prényles de la guttiférone A **1** n'a fonctionné. De plus, lors de travaux précédents, beaucoup d'autres réactions ont été tentées sur ces chaînes prényles, et la grande majorité n'a pas abouti (voir partie 2 II.3). Ces chaînes prényles semblent donc avoir une réactivité particulière. Par manque de temps, l'étude n'a pas pu être menée jusqu'au bout mais il serait intéressant de poursuivre les essais pour faire réagir la sonde et le fluorophore synthétisés.

Conclusion générale

Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous avons poursuivi les travaux initiés par les Dr Yann Fromentin et Kévin Cottet. En effet, comme nous l'avons vu la guttiférone A **1** est une molécule particulièrement intéressante de part plusieurs aspects :

- Ces activités antiparasitaires intéressantes
- La facilité à obtenir des quantités de produits importantes *via* une méthode de purification développée au laboratoire.

Deux générations d'analogues de cette molécule ont été synthétisées précédemment, une première génération de composés ayant subi des modifications sur le cœur phloroglucinol, et une deuxième génération dans laquelle les modifications portaient sur la partie catéchol. Les structures des composés possédant les meilleures activités sont rappelées Figure 78, composés **1**, **2** et **3**.

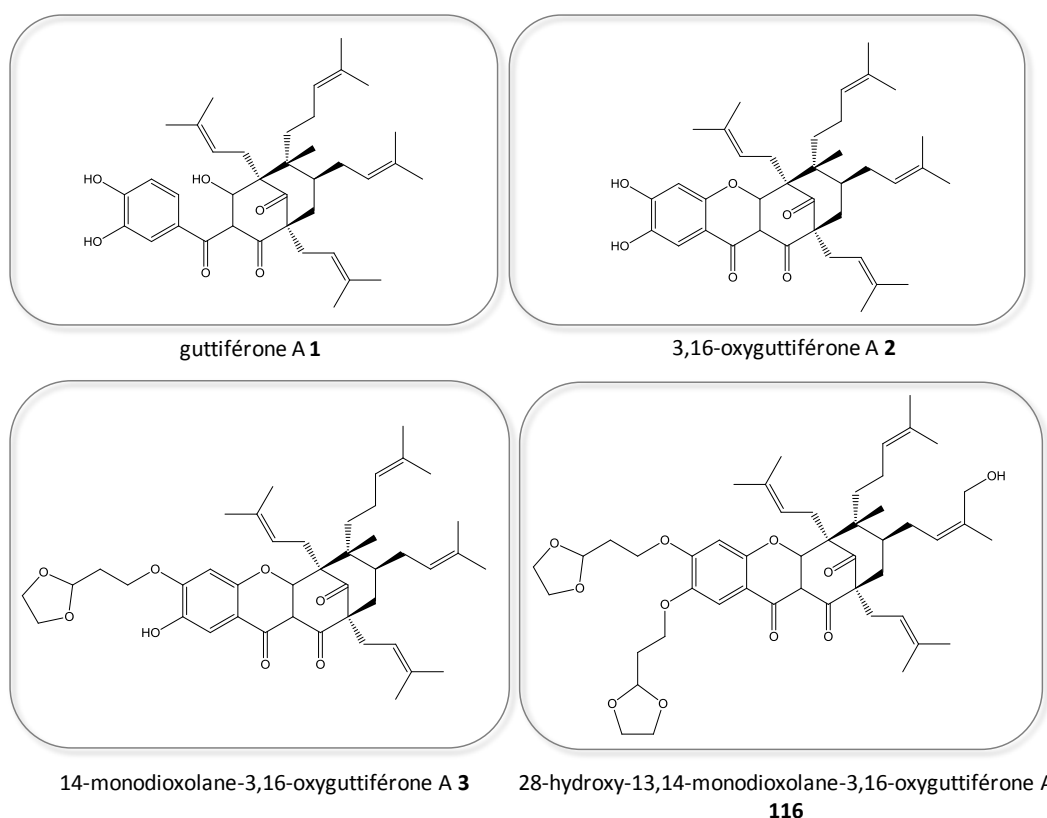


Figure 78 : Structure de la guttiférone A **1** et de ses analogues

Durant sa thèse, le Dr Kévin Cottet a également tenté d'oxyder les chaînes phényles de la guttiférone A **1** par de multiples méthodes, mais seul le composé oxydé **116** a été obtenu. Faute de temps, la faible quantité de produit synthétisée n'a pas permis de réaliser les tests biologiques. Malheureusement nous n'avons pas réussi à synthétiser une quantité de produit suffisante au cours de cette thèse pour réaliser les différents tests antiparasitaires.

Après les nombreuses méthodes par voie chimique qui ont été tentées pour modifier ces chaînes prényles, nous nous sommes intéressés aux biotransformations par les endophytes de *Symphonia globulifera*. En effet, ces endophytes vivant en contact permanent avec les métabolites, ils ont peut-être développés un système enzymatique capable de les biotransformer. Plusieurs souches d'endophytes ont été isolées de *Symphonia globulifera* par le Dr Yann Fromentin, et nous en avons donc testé plusieurs. Toutes les souches se sont révélées capables de biotransformer la guttiférone A **1**, de façon plus ou moins efficace. La souche donnant les meilleurs résultats a été identifiée comme *Bipolaris cactivora*. Malheureusement aucun métabolite nouveau n'est apparu. Les produits de biotransformation de la guttiférone A **1** sont la 1,16-oxyguttiférone A **105** et la 3,16-oxyguttiférone A **2**, deux composés naturellement présents dans la plante. De plus, le ratio observé entre les deux métabolites est le même que celui observé dans la plante. Cette constatation nous a amené à nous questionner vis-à-vis de l'origine des oxyguttiférone A chez le *Symphonia globulifera*. Cependant pour valider totalement cette hypothèse il faudrait étudier les extraits de plants de *Symphonia globulifera* sans endophyte et obtenir ce genre de plant est très compliqué. Nous n'avons pas les moyens au laboratoire de réaliser ce genre de manipulation.

L'étude a été menée en parallèle sur la guttiférone C, un autre PPAPs extrait du *Symphonia globulifera* et les résultats sont comparables. Les réactions de biotransformation ont été optimisées et après purification nous obtenons la 1,16- et la 3,16-oxyguttiférone A avec des rendements de 8.4 et 30 % respectivement, ainsi que la 1,16- et la 3,16-oxyguttiférone C avec des rendements de 9.6 et 12 % respectivement (Schéma 60).

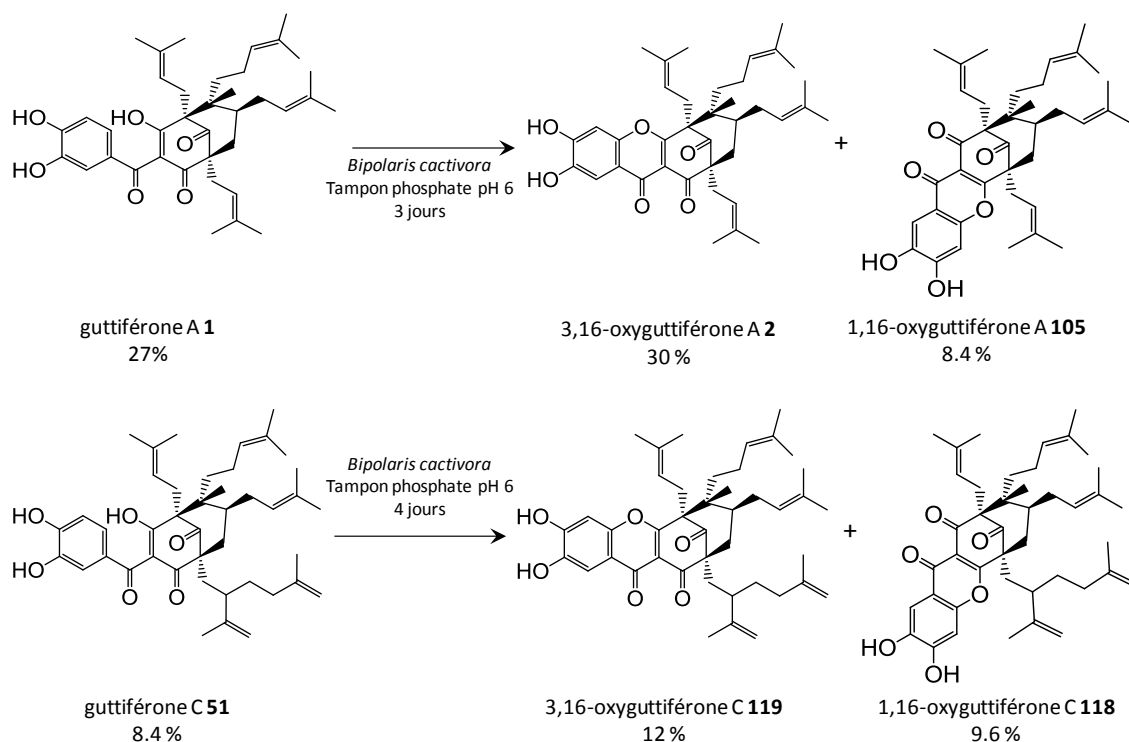


Schéma 60: Biotransformations des guttiférone A et C par *Bipolaris cactivora*

Les études de biotransformation pourront être poursuivies en utilisant les endophytes d'*Hypericum perforatum*. En effet, ceux-ci étant en contact avec l'hyperforine **87**, ils ont pu développer un système enzymatique adapté à la transformation des chaînes prényles. Ce travail a fait l'objet du stage de master II de Daouda NDaye (résultats non publiés).

La dernière partie de cette thèse portait sur la recherche des cibles parasites chez *Plasmodium falciparum*, ce qui permettrait d'orienter les pharmacomodulations sur la guttiférone A **1**. Une première sonde avait été synthétisée par le Dr. Kévin Cottet, mais elle n'avait pas permis d'aboutir à la cible de la guttiférone A **1** car trop de liaisons non spécifiques se formaient avec les protéines du parasite. Une autre approche a donc été imaginée au cours de cette thèse : l'ajout d'un tag discret sur la guttiférone A **1**, qui viendrait lier la molécule de manière covalente à la protéine cible. Le fluorophore sera lié à la guttiférone A **1** dans un second temps par une photoaddition thiol-ène sur une chaîne prényle.

La sonde de guttiférone A « taguée » **193** a donc été synthétisée, ainsi que le fluorophore avec un groupement thiol **219**. Malheureusement faute de temps nous n'avons pas pu mettre au point les conditions de photoaddition thiol-ène (Schéma 61). Cette étude n'a donc pas abouti à l'élucidation des cibles parasites de la guttiférone A **1**.

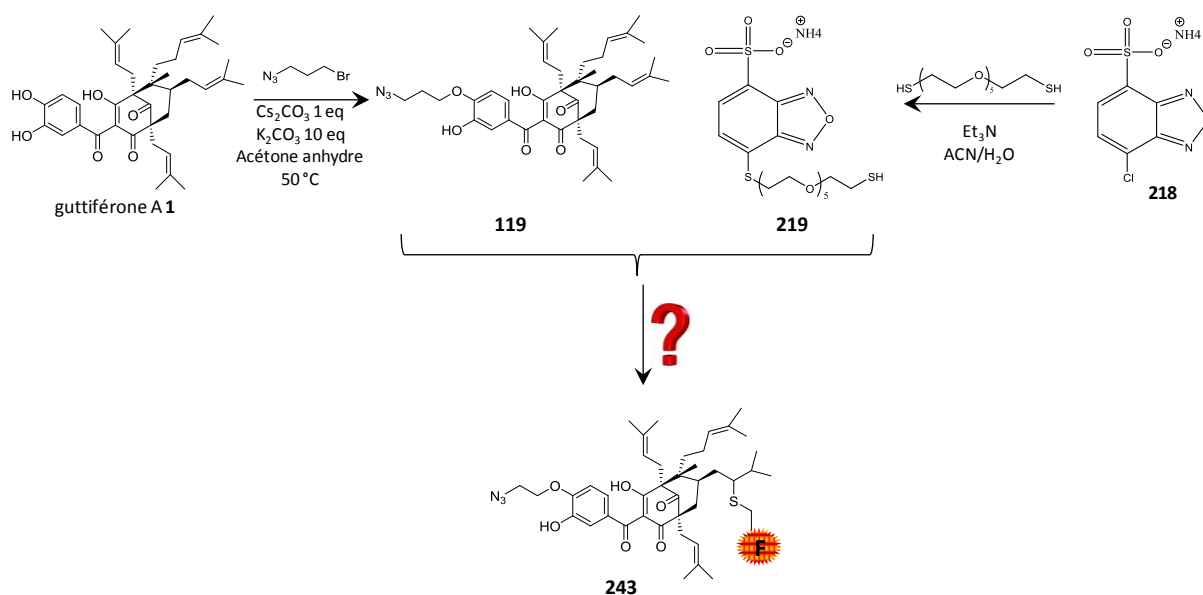


Schéma 61 : Récapitulatif de l'avancement des recherches de cibles parasites de la guttiférone A **1**

Nous tenions à conclure ce manuscrit par le fait que ces travaux de recherches ont conduit à la publication de deux articles^{209,210}.

²⁰⁹ P. Menelle *et al.*, Progress on PPAPs cyclisation : guttiferone A as a case study, *Tett. Lett.*, **2017**, 58, 4876-4879.

²¹⁰ P. Menelle *et al*, Biotransformation of guttiferone A and C, secondary metabolites of *Symphonia globulifera* by *Bipolaris cactivora* an endophytic fungus isolated from its leaves, *en soumission*

Partie expérimentale

Partie Expérimentale

I. 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 ^1H , 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. Les spectres sont traités avec le logiciel TopSpin-NMR ou MestReNova.

Spectrométrie de masse

Les spectres de masse (MS) 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 ($[\alpha]_D^{T^\circ\text{C}}$) 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 en $^\circ\text{C}$, concentration c en mg/ml dans le solvant indiqué.

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.

L'acétonirile 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 d'acide phosphomolibdique.

Les chromatographies en phase gazeuse ont été réalisées sur un appareil Agilent Technologies 7820A GC système avec détecteur FID intégré. Cet appareil a été associé avec un injecteur Agilent G4513A. Le générateur d'hydrogène est un appareil Parker Balson.

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).

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique a 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 $\times$ 4.6 mm, 5 μm) possédant une boucle d'injection de 20 μL .

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative a été effectuée sur une colonne Pursuit (250 $\times$ 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, sauf mention d'une autre longueur d'onde.

Les solvants de chromatographies utilisés furent tous de qualité analytique et filtrés avant utilisation.

Préparation des solutions tampons et milieux de culture pour les des micro-organismes

Le milieu A est préparé avec 20 g de glucose, 5 g de bacto peptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g d'extrait de malt et 20 g d'agar pour un litre d'eau distillée.

Le milieu YMS est préparé avec 4 g d'extrait de levure, 10 g d'extrait de malt et 5 g de peptone de soja pour un litre d'eau distillée. 40 mL de glucose à 40 % sont ajoutés après la stérilisation du milieu.

Le tampon phosphate utilisé a été préparé à partir de deux solutions mères : une solution de Na_2HPO_4 à 0.066 M et une solution de KH_2PO_4 à 0.066 M. Les proportions pour 20 mL sont indiquées dans le Tableau 31.

Tableau 31 : Préparation des solutions de tampon phosphate

pH	Volume solution de Na_2HPO_4 0,066 M (mL)	Volume de solution de KH_2PO_4 0,066 M (mL)
6	2,5	17,5
7	12,2	7,8
8	18,9	1,1

Le tampon phosphate/citrate utilisé a été préparé à partir de deux solutions mères : une solution d'acide citrique à 0.5 M et une solution de Na_2HPO_4 à 0.5 M. Les proportions pour 20 mL sont indiquées dans le Tableau 32.

Tableau 32 : Préparation des solutions de tampon phosphate/citrate

pH	Volume de solution de Na_2HPO_4 à 0,5 M (mL)	Volume de solution d'acide citrique à 0,5 M (mL)	Eau distillée (mL)
6	5	1,4	13,6
7	6,6	0,7	12,7
8	7,8	0,1	12,1

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 20 %. 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 (130 rpm) pendant 48 à 72 heures.

Une fois la croissance des micro-organismes obtenue dans le milieu YMS, la biomasse est récupérée par filtration pour effectuer les biotransformations. Cette dernière est ensuite mise en suspension dans un erlenmeyer dans une solution tampon appropriée. A partir de ce stade, les conditions stériles ne sont plus nécessaires. La guttiférone A ou la guttiférone C sont ajoutée en solution dans le DMF (30 μl de DMF par mg de substrat) pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg de substrat par ml de tampon phosphate. Les erlenmeyers sont mis à incuber à 27°C sous agitation (130 rpm) pendant le temps nécessaire. A la fin de la transformation, l'ensemble est mis à centrifuger. Le surnageant aqueux est récupéré puis extrait à l'acétate d'éthyle. La biomasse est reprise dans le méthanol, agitée 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.

II. Dosage des guttiférones A et C dans le latex

La courbe d'étalonnage de la guttiférone A a été réalisée avec 4 échantillons de 0.005 à 0.05 mg/mL dans le méthanol. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 254 nm. La courbe d'étalonnage est présentée Figure 79.

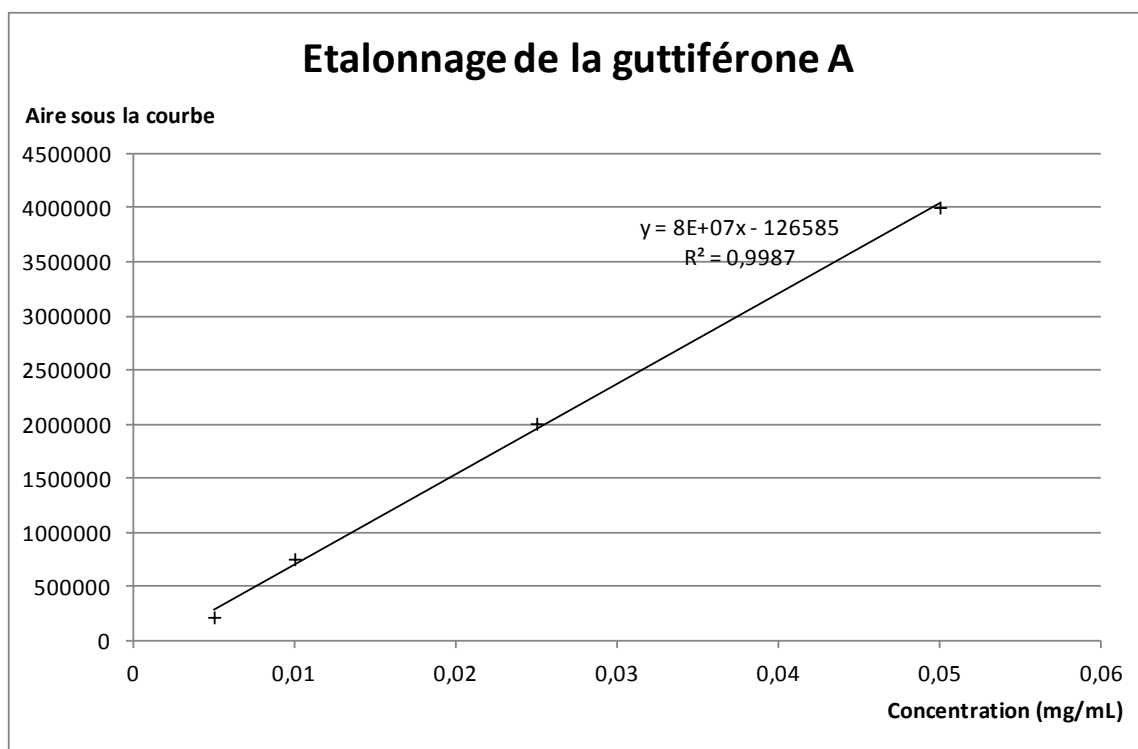


Figure 79 : Courbe d'étalonnage de la guttiférone A

La courbe d'étalonnage de la guttiférone C a été réalisée avec 4 échantillons de 0.01 à 0.1 mg/mL dans le méthanol. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 254 nm. La courbe d'étalonnage est présentée Figure 80.

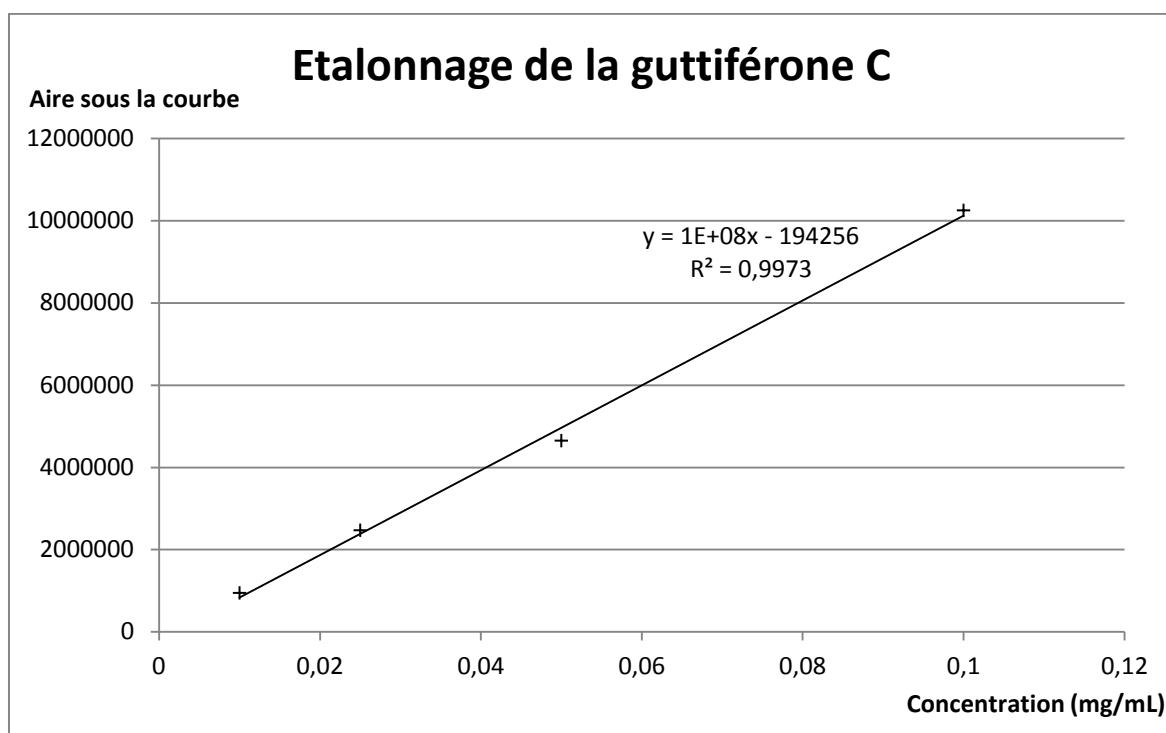
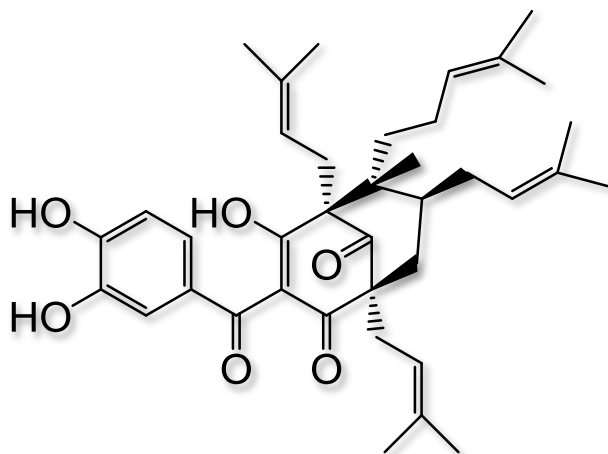


Figure 80 : Courbe d'étalonnage de la guttiférone C

III. Description des molécules

Guttiferone A 1



Isolated from latex of *Symphonia globulifera* by CPC with a system methanol/water/cyclohexane/Ethyle acetate (20:1:20:1) with 6.5 % yield.

Aspect : Yellow solid

Formula : $C_{38}H_{50}O_6$

$[\alpha]_D : +34 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^3$

SM : (ESI) m/z 601 [M-H]

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.17 (d, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H, H-12), 6.98 (dd, $J = 8.5/2 \text{ Hz}$, 1H, H-16), 6.70 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, H-15), 5.21 (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H-30), 5.08 (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H-35), 4.98 – 4.88 (m, 2H, H-25, H-18), 2.65 (m, 2H, H-17), 2.48 (m, 2H, H-29), 2.11 (m, 1H, H-7 proR), 2.08 (m, 2H, H-24), 2.00 (m, 1H, H-7 proS), 1.93 – 1.79 (m, 3H, H-34, H-6), 1.72 (s, 3H, H-32), 1.69 (s, 9H, H-21, H-33, H-37), 1.66 (s, 6H, H-20, H-27), 1.60 (s, 3H, H-38), 1.48 (s, 3H, H-28), 1.45 (m, 1H, H-23 proS), 1.29 (s, 1H, H-23 proR), 1.26 (m, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 209.7 (C-9), 195.7 (C-10), 195.4 (C-1), 195.1 (C-3), 152.6 (C-14), 146.2 (C-13), 135.7 (C-31), 135.6 (C-19), 133.8 (C-26), 132.9 (C-36), 129.4 (C-11), 125.5 (C-25), 125.1 (C-35), 125.0 (C-16), 120.9 (C-30), 120.8 (C-18), 117.8 (C-2), 117.4 (C-12), 115.2 (C-15), 68.8 (C-4), 62.1 (C-8), 51.8 (C-5), 41.1 (C-6), 40.1 (C-7), 36.9 (C-23), 32.0 (C-29), 29.8 (C-24), 26.6 (C-17), 26.3 (C-28;C-32), 26.00 (C-20), 25.9 (C-37), 23.6 (C-34), 19.7 (C-22), 18.3 (C-21), 18.2 (C-33), 18.1 (C-27), 17.7 (C-38).

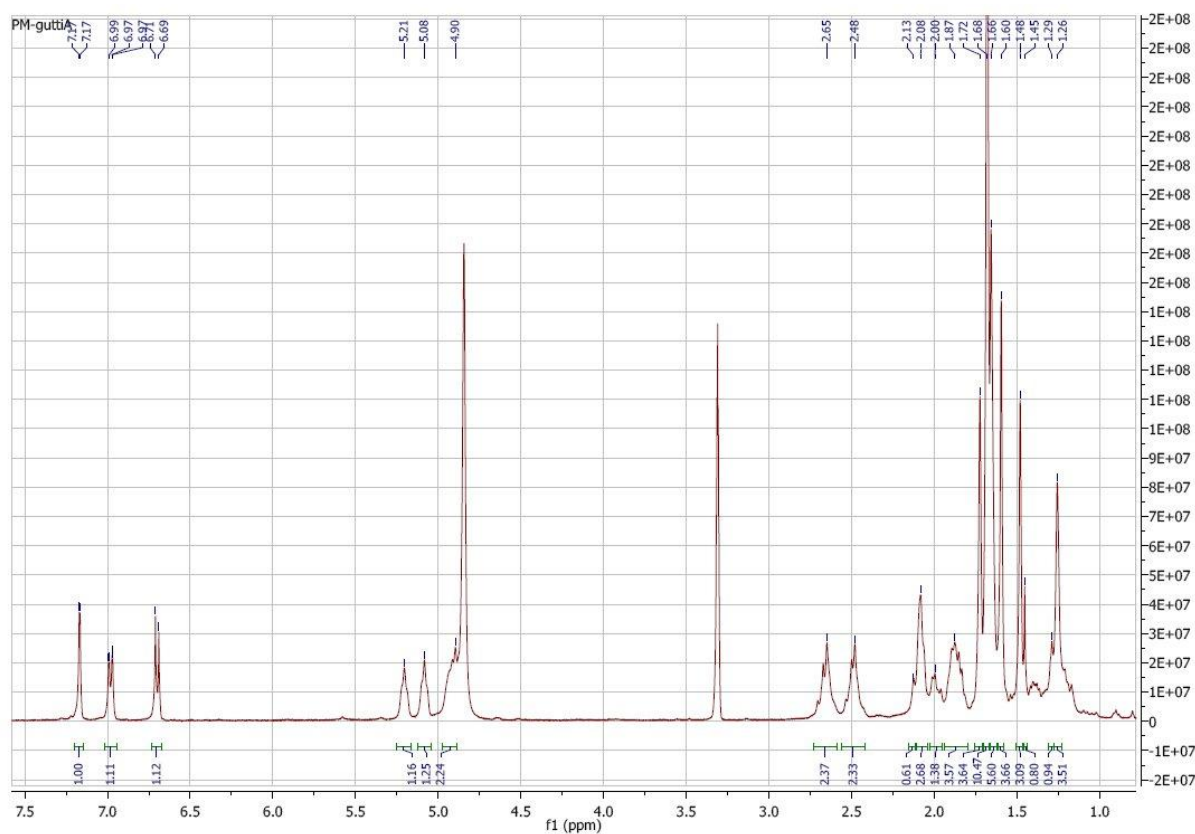


Figure 81 : NMR ^1H spectrum of guttiferone A (CD_3OD)

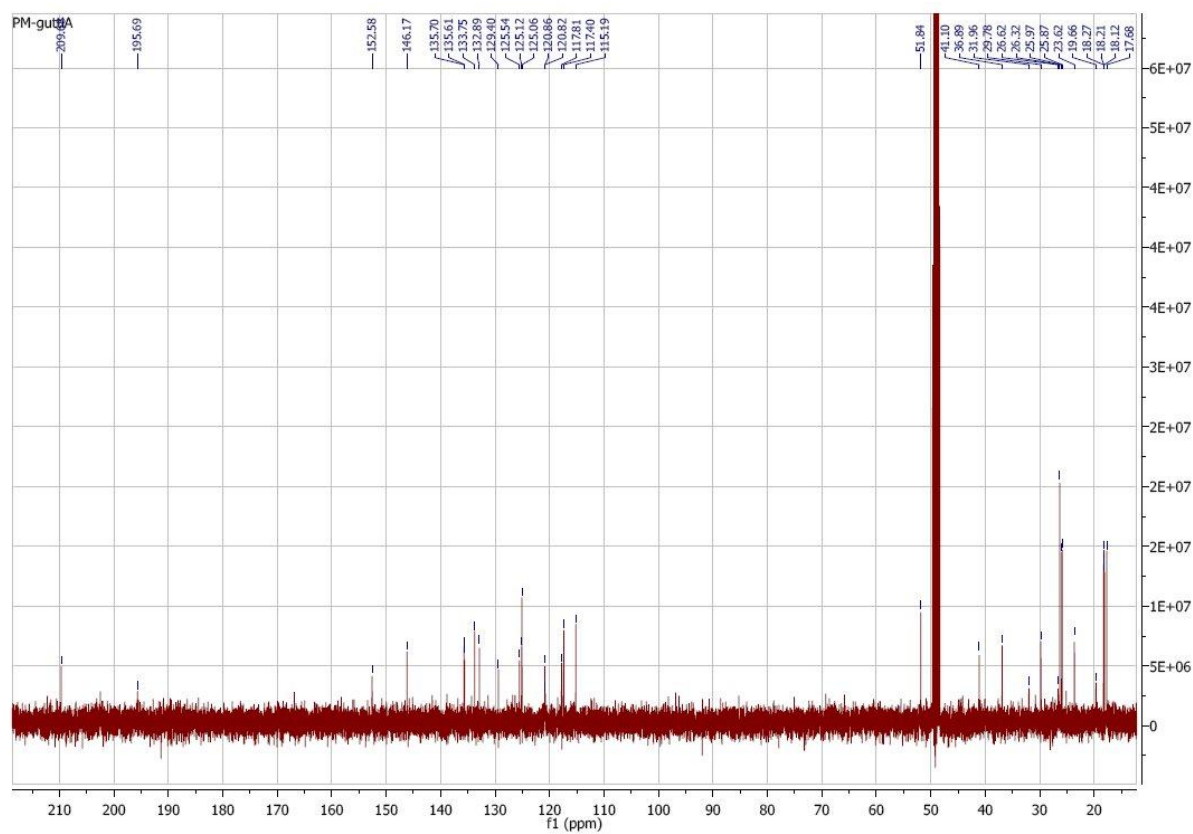


Figure 82 : NMR ^{13}C spectrum of guttiferone A (CD_3OD)

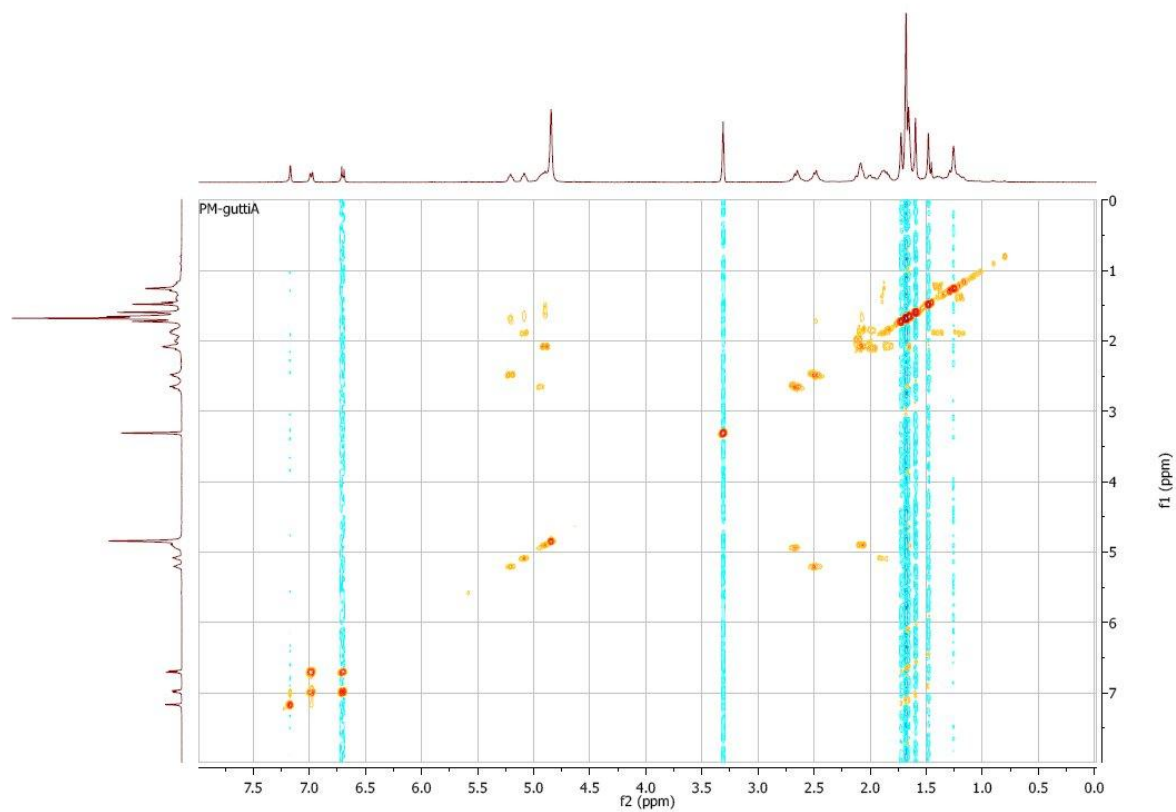


Figure 83 : COSY spectrum of guttiferone A (CD_3OD)

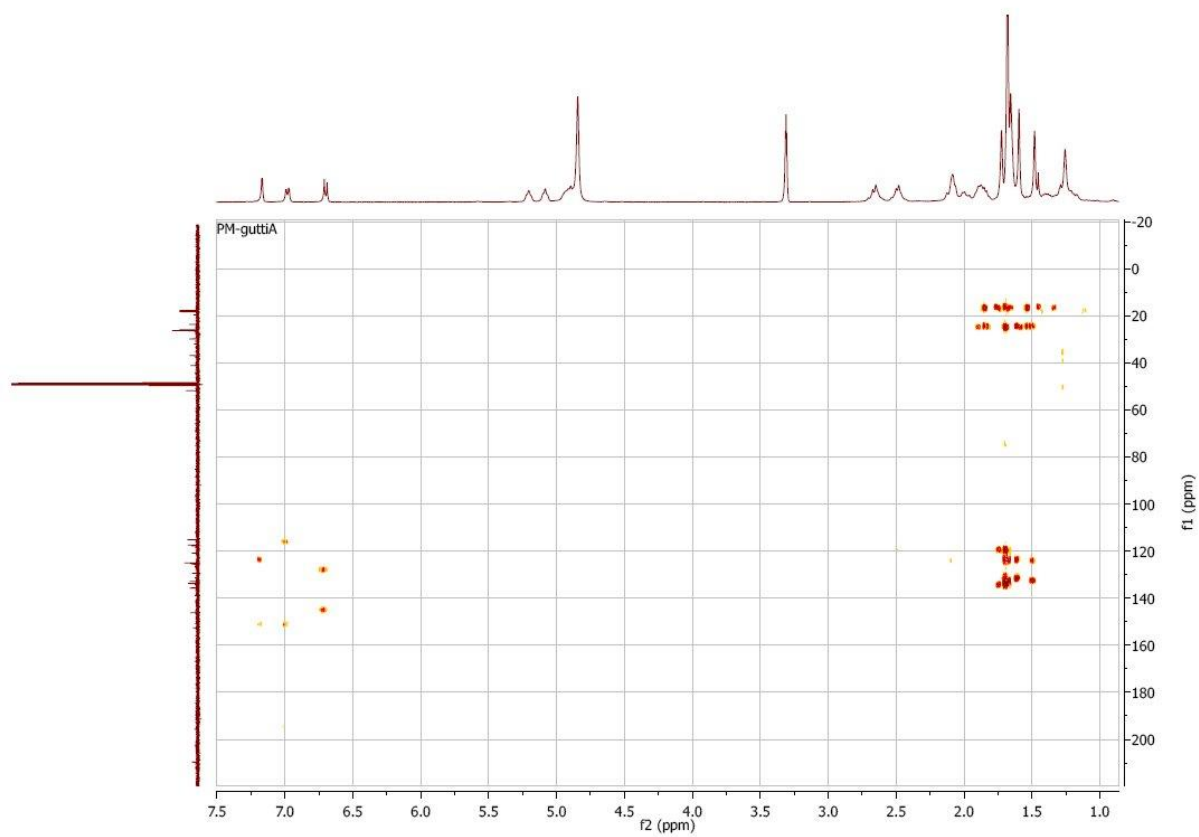


Figure 84 : HMBC spectrum of guttiferone A (CD_3OD)

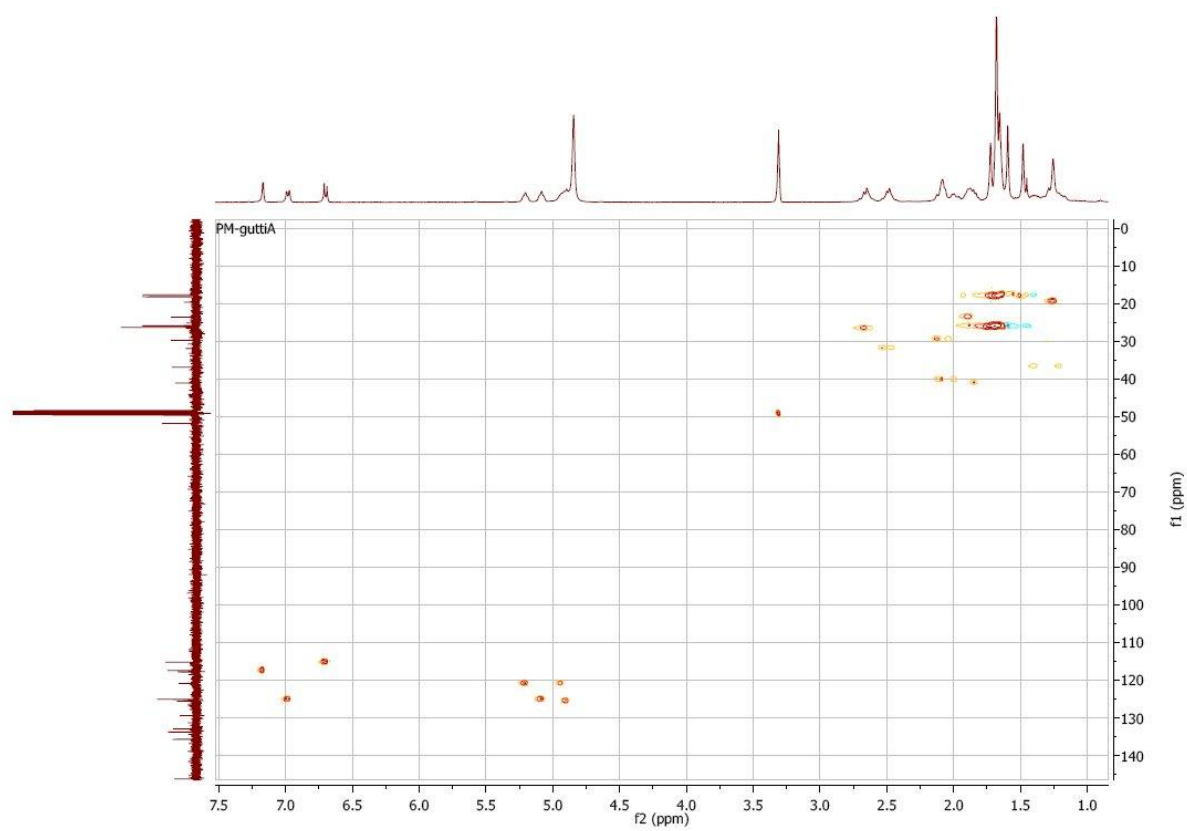
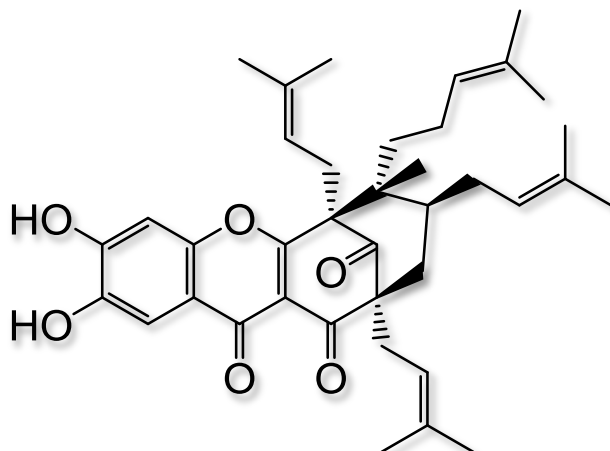


Figure 85 : HSQC spectrum of guttiferone A (CD_3OD)

3,16-oxyguttiferone A 2



Biotransformation: Once the microorganism grown in cultivation medium, biomass was recovered by gauze-filtration. 0.06 M phosphate buffer (pH = 6.00) is added to the biomass (85 g) for a total volume of 500 mL, and guttiferone A is added (50 mg in 1.5 mL of DMF) under agitation. pH is maintained at 6.2 and temperature at 27 °C for a week. In the end, suspension was gauze-filtered and aqueous supernatant recovered, acidified with HCl 1 M, then extracted with an ethyl acetate. Biomass pellet was resuspended in an equivalent volume of methanol and sonicated for 10 minutes. After centrifugation, the extraction was repeated 2 times on the pellet, and the pooled methanolic extracts was evaporated under reduced pressure. Dry residue was resuspended in an ethyl acetate/water mixture under stirring. Once recovered, organic phase was then pooled with the one from aqueous supernatant extraction, dried over magnesium sulfate, then evaporated to dryness with a rotary evaporator. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield the product **2** (30 %).

Synthesis : Guttiferone A (40 mg, $6.6 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 eq), lithium carbonate (49 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) and potassium ferricyanide (217 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) are dissolved in a methanol/water mixture and placed under argon. After stirring for 20 minutes, hydrochloric acid 1 M was added and the reaction mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield the product **2** (29 %).

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1 % HCOOH
Gradient	78/22 to 81/19 over 25 min 81/19 to 100/0 over 30 min
Flow	45 mL/min
Retention time	29 min

Aspect : yellow lacquer

Formula : C₃₈H₄₈O₆

[α]_D : +44 dm⁻¹ g⁻¹ cm³

MS : (ESI) *m/z* 599.3373 [M-H]

¹H 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 (100 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-13), 147.15 (C-16), 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 (C-30), 119.67 (C-18), 118.91 (C-2), 118.02 (C-11), 109.52 (C-15), 103.92 (C-12), 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).

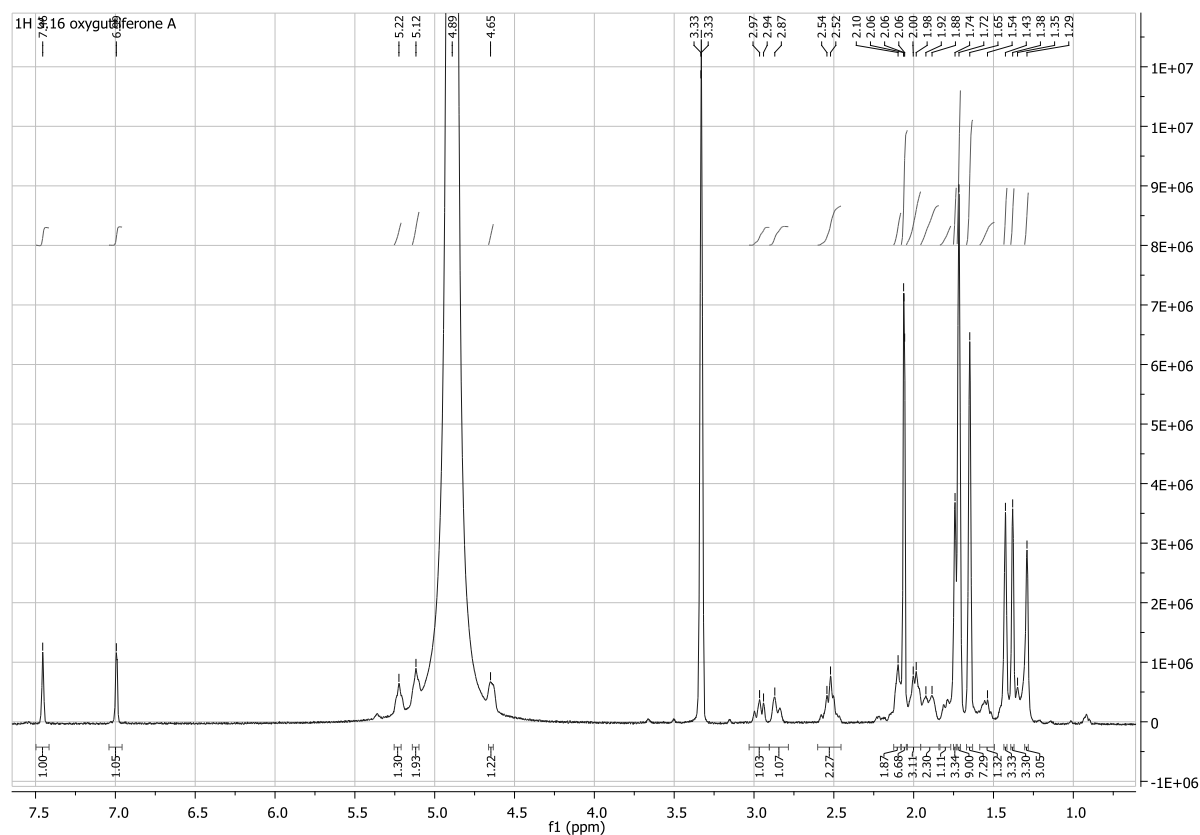


Figure 86 : NMR ¹H spectrum of 3,16-oxyguttiferone A (CD₃OD)

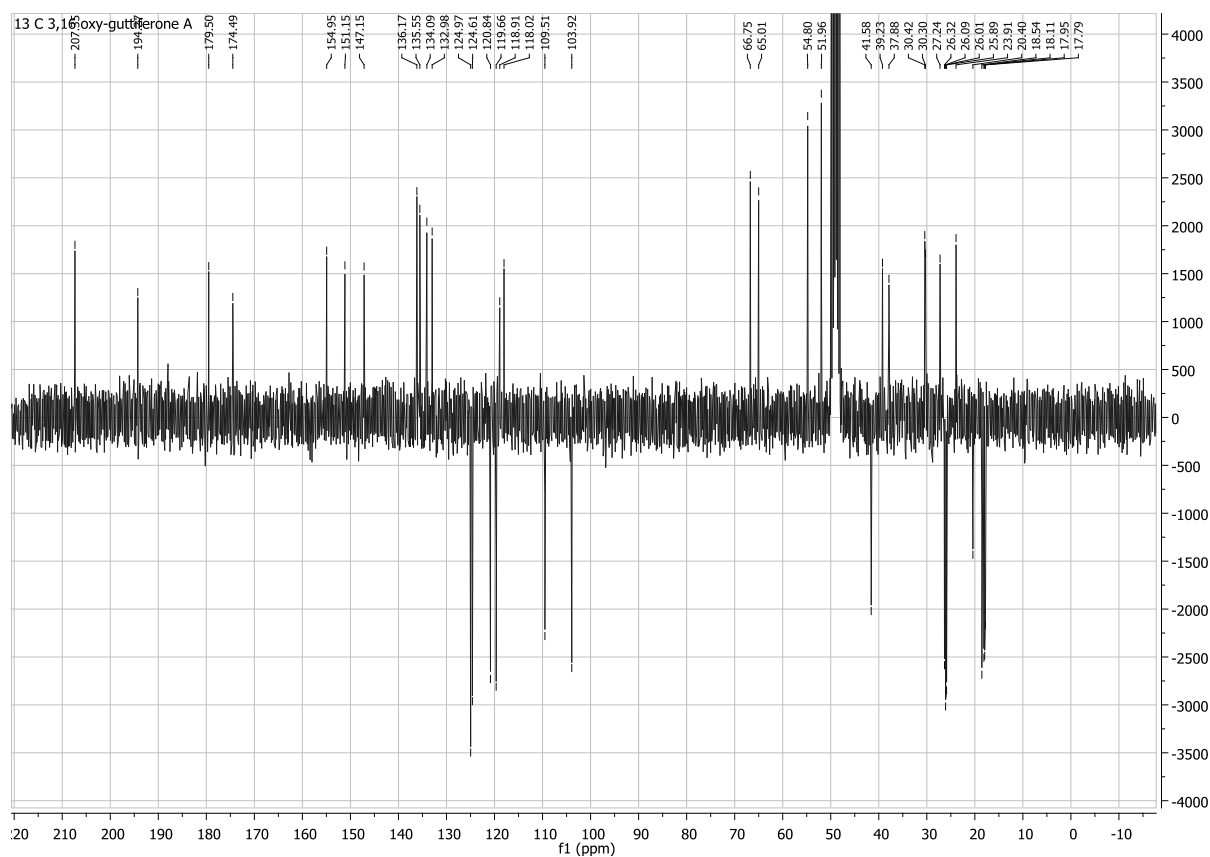
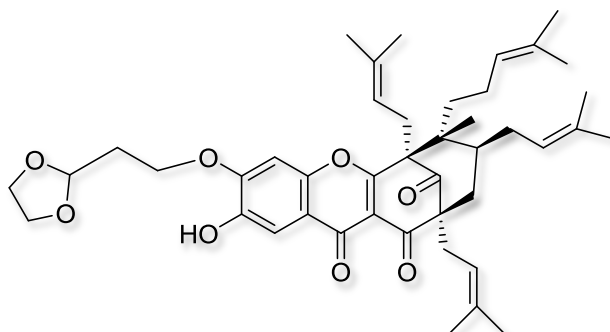


Figure 87 : NMR ¹³C spectrum of 3,16-oxyguttiferone A (CD₃OD)

14-monodioxolane-3,16-oxyguttiferone A 3



Synthesis: 3,16-oxyguttiferone A, 2-(2-bromoethyle)-1,3-dioxolane (5 eq), potassium carbonate (10 eq) and cesium carbonate (1 eq) are dissolved in dry acetone and refluxed for 6 h. Hydrochloric acid (1 M) was added and the reaction mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. Dry crude was purified by preparative HPLC to yield **3** (10 %)

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1 % HCOOH
Gradient	85/15 to 96/4 over 25 min
Flow	45 mL/min
Retention time	19 min

Aspect: yellow lacquer

Formule brute : $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{O}_8$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}}$: $+34 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^3$

SM : (ESI) m/z 723.3861 $[\text{M}+\text{Na}]$

RMN ^1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.44 (s, 1H, H-15), 7.23 (s, 1H, H-12), 5.23 (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H-30), 5.13 (t, $J = 5 \text{ Hz}$, 2H, H-35, H-41), 4.89 (m, 1H, H-25), 4.67-4.58 (m, 1H, H-18), 4.41-4.25 (m, 2H, H-39), 4.05-3.85 (m, 5H, H-42, H-43), 3.06-2.80 (m, 2H, H-17), 2.51 (t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 2H, H-29), 2.25 (q, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H, H-40), 2.09 (t, $J = 5.64 \text{ Hz}$, 2H, H-7), 1.97 (m, 2H, H-34), 1.93 (m, 2H, H-24), 1.88 (m, 1H, H-6), 1.74 (s, 3H, H-20), 1.70 (s, 9H, H-32, H-33, H-38), 1.64 (s, 6H, H-37, H-28), 1.53 (s, 2H, H-23), 1.41 (s, 3H, H-21), 1.37 (s, 3H, H-27), 1.30 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 205.9 (C-9), 192.7 (C-1), 178.4 (C-3), 173.1 (C-10), 153.7 (C-14), 149.5 (C-13), 146.5 (C-16), 134.9 (C-19), 134.2 (C-31), 132.7 (C-26), 131.6 (C-36), 123.8 (C-35), 123.1 (C-25), 119.4 (C-30), 118.2 (C-18), 117.6 (C-2), 117.5 (C-11), 108.2 (C-15), 101.5 (C-41), 100.4 (C-12), 65.4 (C-8), 65.3 (C-39), 64.6 (C-42, C-43), 63.6 (C-4), 50.6 (C-5), 40.3 (C-6), 37.7 (C-7), 36.6 (C-23), 32.9 (C-40), 29.0 (C-24), 28.8 (C-29), 26.0 (C-17), 24.9 (C-38), 24.7 (C-28), 24.6 (C-33), 24.5 (C-21), 22.5 (C-34), 19.10 (C-22), 17.2 (C-20), 16.7 (C-32), 16.6 (C-27), 16.4 (C-37).

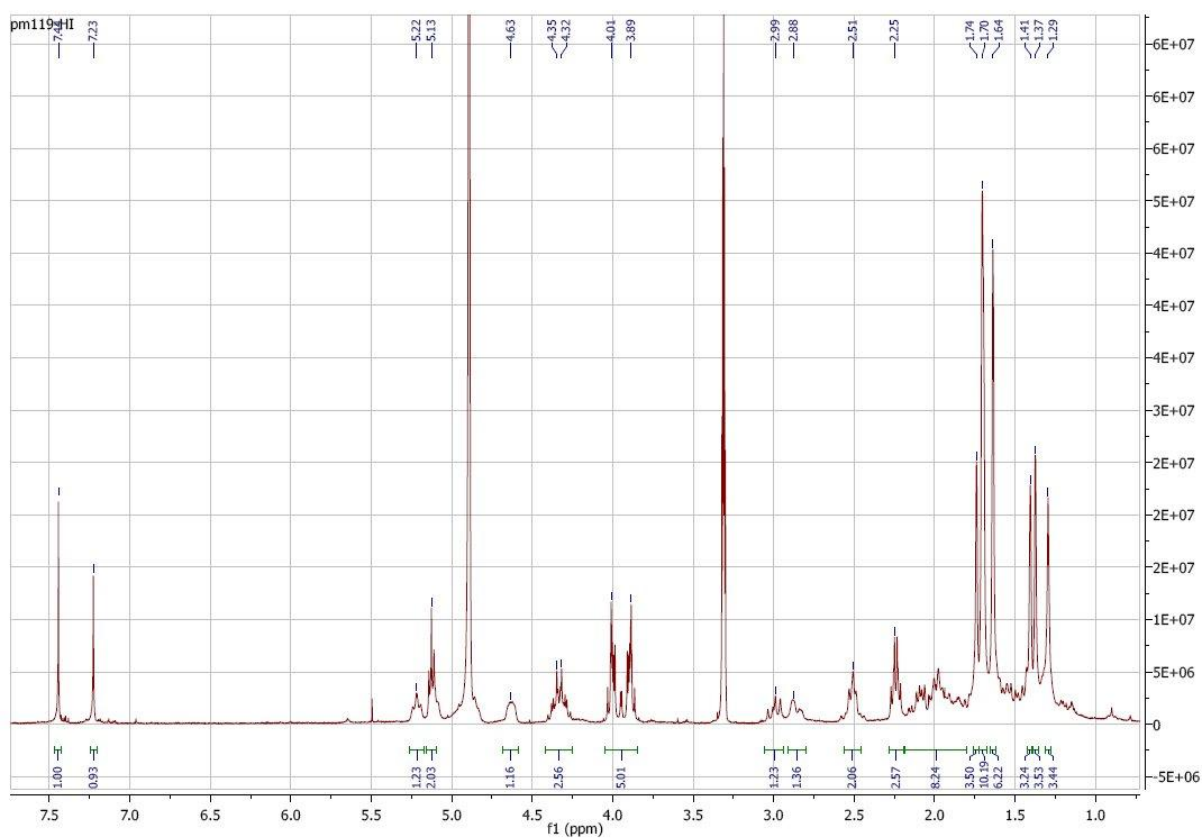


Figure 88 : NMR ^1H spectrum of 14-monodioxolane-3,16-oxyguttiferone A (CD_3OD)

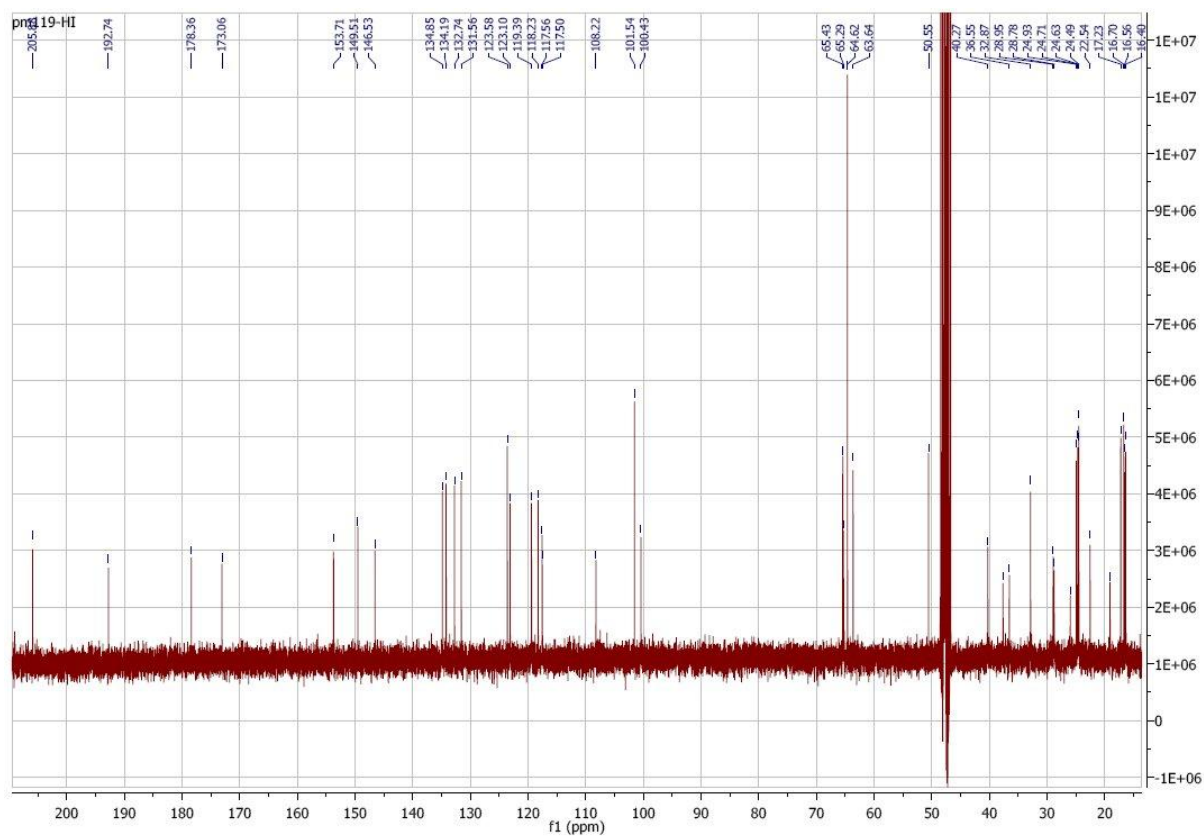


Figure 89 : NMR ^{13}C spectrum of 14-monodioxolane-3,16-oxyguttiferone A (CD_3OD)

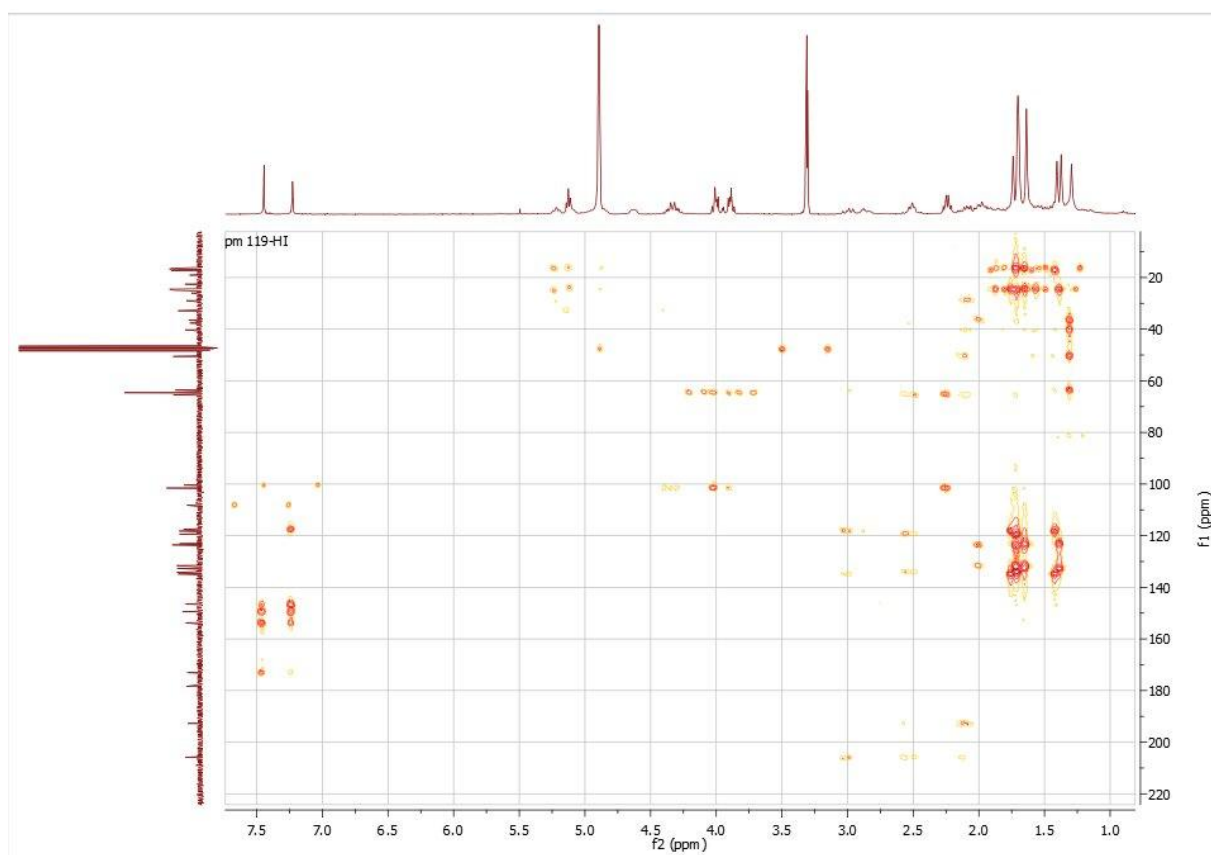


Figure 90 : HMBC spectrum of 14-monodioxolane-3,16-oxyguttiferone A (CD_3OD)

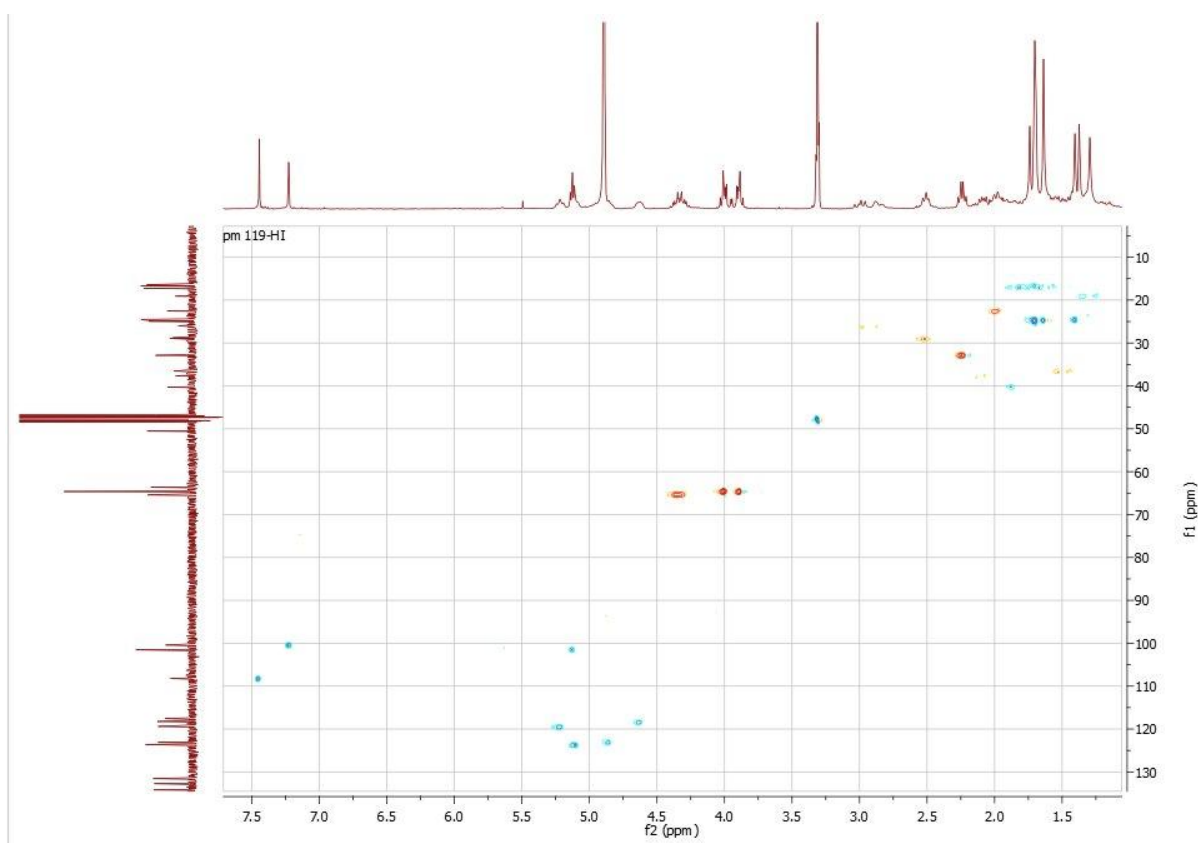
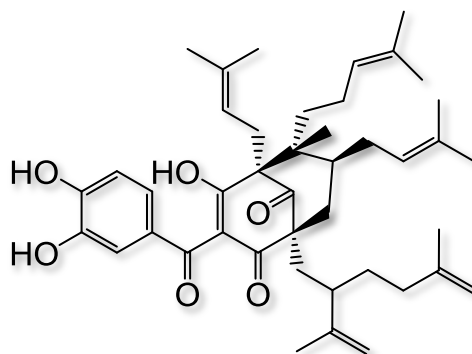


Figure 91 : HSQC spectrum of 14-monodioxolane-3,16-oxyguttiferone A (CD_3OD)

Guttiférone C 51



Isolated from latex of *Symphonia globulifera* by CPC with a system methanol/water/cyclohexane/Ethyle acetate (20:1:20:1) with 14 % yield

Aspect : yellow oil

Formule brute : $C_{43}H_{58}O_6$

$[\alpha]_D^{20^\circ C}$: + 105 $dm^{-1} g^{-1} cm^3$ (14 mg/mL in methanol)

SM : (ESI) m/z 669 [M-H]

RMN 1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 7.18 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-12), 6.99 (dd, $J=2Hz/8Hz$, 1H, H-16), 6.71 (d, $J=8Hz$, 1H, H-15), 5.08 (m, 1H, H-40), 5.02 (m, 1H, H-18), 4.89 (m, 1H, H-25), 4.64 (m, 2H, H-37), 4.51 (m, 2H, H-32), 2.69-2.52 (m, 4H, H-17, H-30), 2.23 (d, $J=13Hz$, 1H, H-7proR), 2.10-2.00 (m, 3H, H-24, H-29a), 1.96-1.77 (m, 7H, H-6, H-7proS, H-29b, H-35, H-39), 1.73 (s, 3H, H-20), 1.69 (s, 9H, H-27, H-38, H-42), 1.66 (s, 3H, H-33), 1.62 (s, 3H, H-43), 1.59 (s, 5H, H-21, H-34), 1.50 (s, 3H, H-28), 1.17 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 209.4 (C-9), 196.0 (C-10), 195.7 (C-1), 195.6 (C-3), 152.5 (C-14), 149.0 (C-31), 147.0 (C-36), 146.3 (C-13), 135.8 (C-19), 133.6 (C-26), 132.8 (C-41), 129.6 (C-11), 125.6 (C-25), 125.2 (C-40 et C-16), 121.4 (C-18), 118.0 (C-2), 117.3 (C-12), 115.1 (C-15), 113.5 (C-32), 110.4 (C-37), 69.2 (C-4), 58.6 (C-8), 52.9 (C-5), 44.7 (C-30), 43.6 (C-7), 41.2 (C-6), 37.7 (C-29), 36.8 (C-35), 36.4 (C-23), 32.7 (C-34), 30.0 (C-24), 26.6 (C-17), 26.4 (C-20), 26.0 (C-27), 25.9 (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).

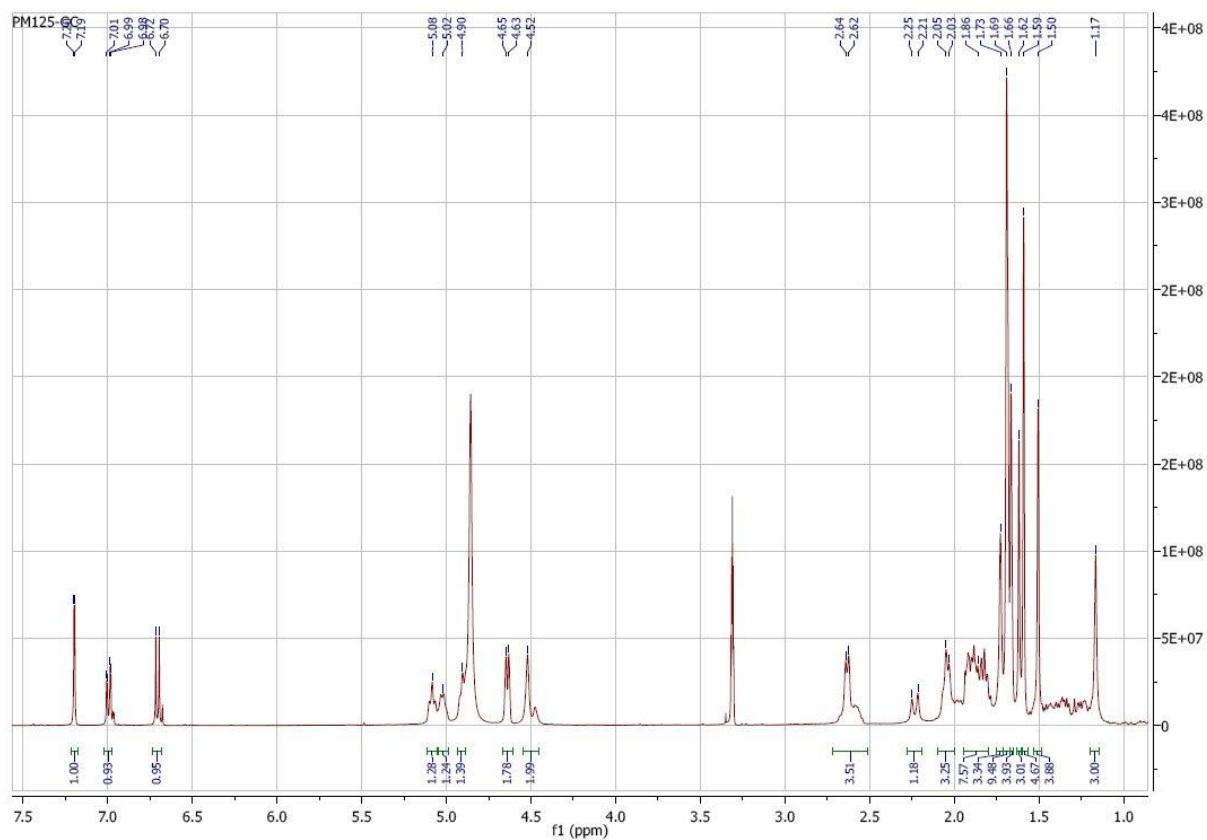


Figure 92 : NMR ^1H spectrum of guttiferone C (CD_3OD)

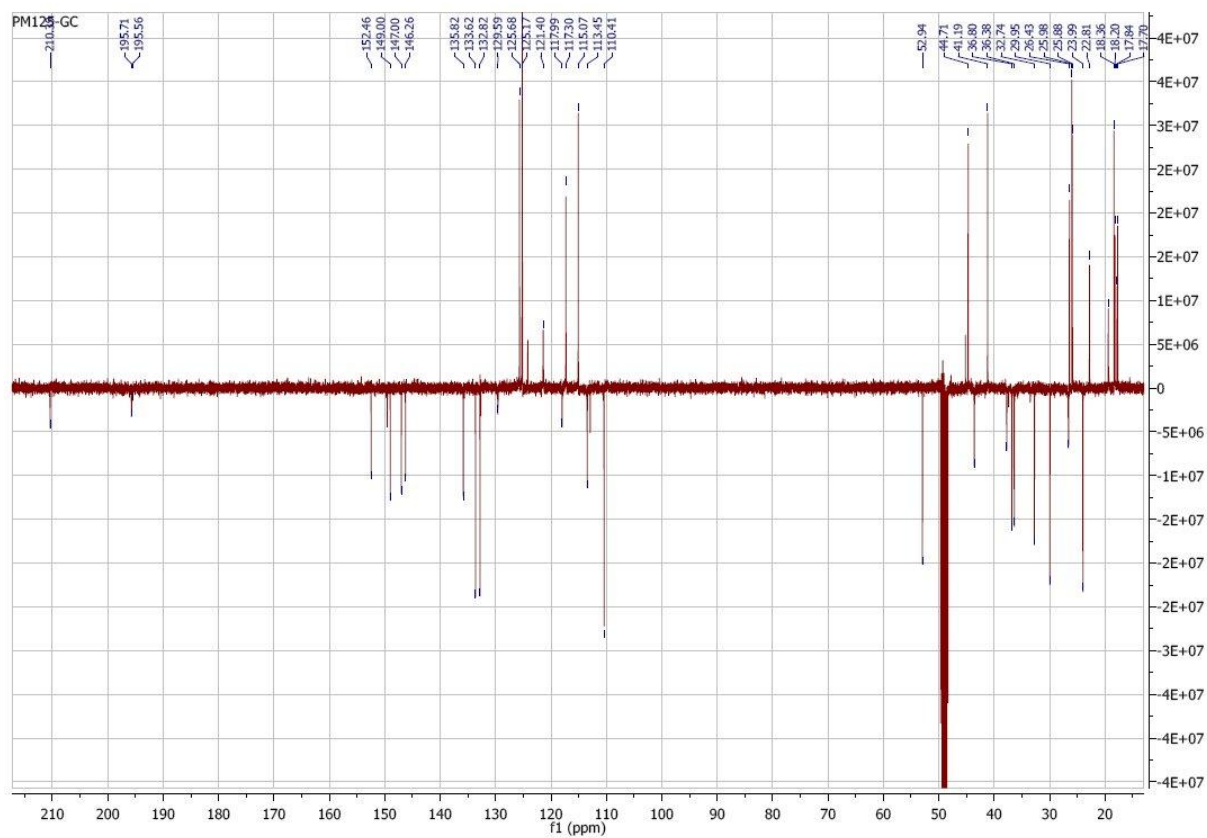


Figure 93 : NMR ^{13}C spectrum of guttiferone C (CD_3OD)

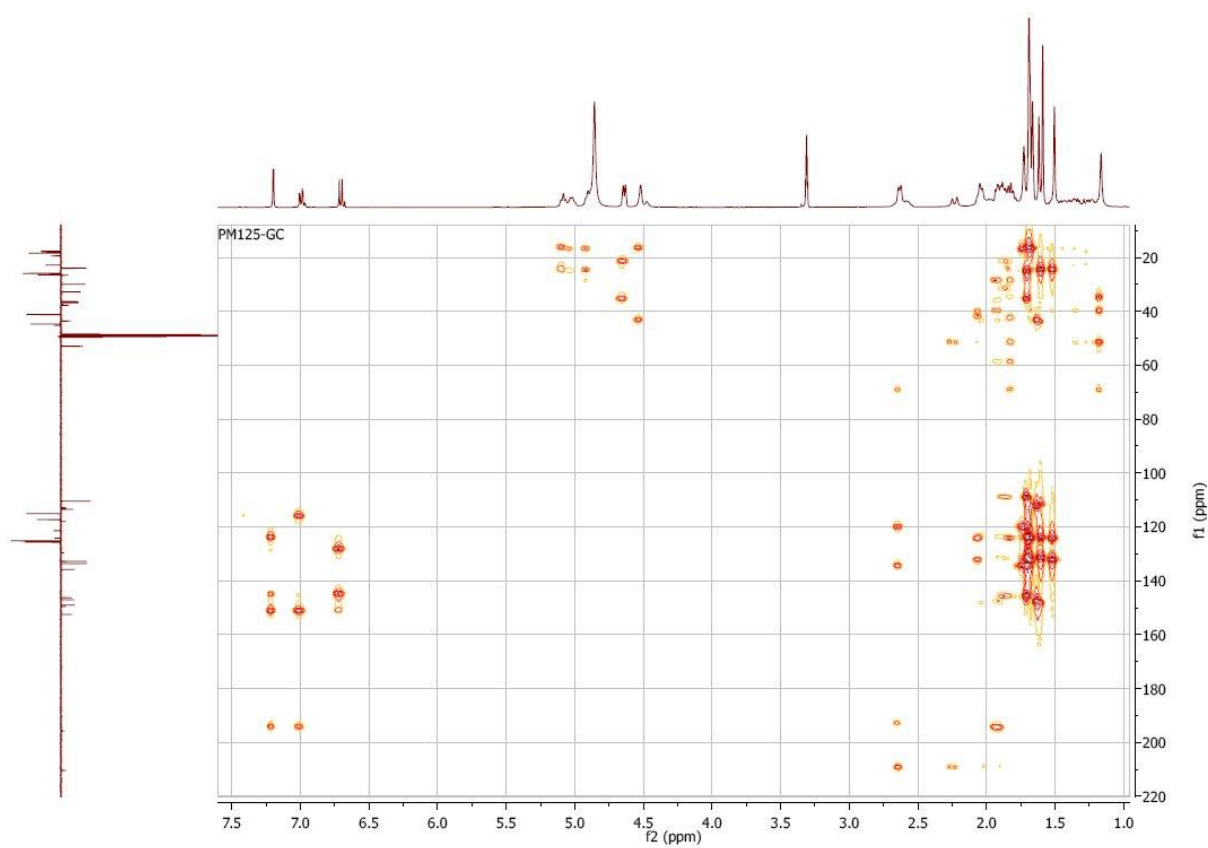
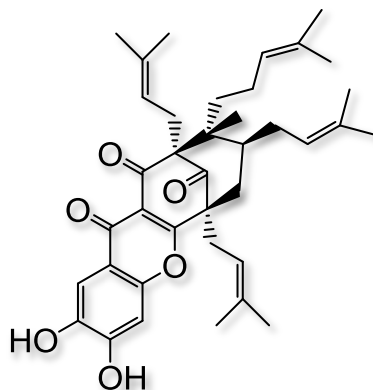


Figure 94 : HMBC spectrum of guttiferone C (CD_3OD)

1,16-oxyguttiferone A 105



Biotransformation: Once the microorganism grown in cultivation medium, biomass was recovered by gauze-filtration. 0.06 M phosphate buffer (pH = 6.00) is added to the biomass (85 g) for a total volume of 500 mL, and guttiferone A is added (50 mg in 1.5 mL of DMF) under agitation. pH is maintained at 6.2 and temperature at 27 °C for a week. In the end, suspension was gauze-filtered and aqueous supernatant recovered, acidified with HCl 1 M, then extracted with an ethyl acetate. Biomass pellet was resuspended in an equivalent volume of methanol and sonicated for 10 minutes. After centrifugation, the extraction was repeated 2 times on the pellet, and the pooled methanolic extract was evaporated under reduced pressure. Dry residue was resuspended in an ethyl acetate/water mixture under stirring. Once recovered, organic phase was then pooled with the one from aqueous supernatant extraction, dried over magnesium sulfate, then evaporated to dryness with a rotary evaporator. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield 1,16-oxyguttiferone A (8.4 %).

Synthesis: Guttiferone A (40mg, $6.6 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 eq), lithium carbonate (49 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) and potassium ferricyanide (217 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) are dissolved in a methanol/water mixture and placed under argon. After stirring for 20 minutes, hydrochloric acid 1M was added and the reaction mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield 1,16-oxyguttiferone A (10 %).

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1 % HCOOH
Gradient	78/22 to 81/19 over 25 min 81/19 to 100/0 over 30 min
Flow	45 mL/min
Retention time	25 min

Aspect : yellow lacquer

Formula : $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_6$

$[\alpha]_D: +53 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^3$

MS : (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, $J = \text{Hz}$), 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 ^{13}C (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).

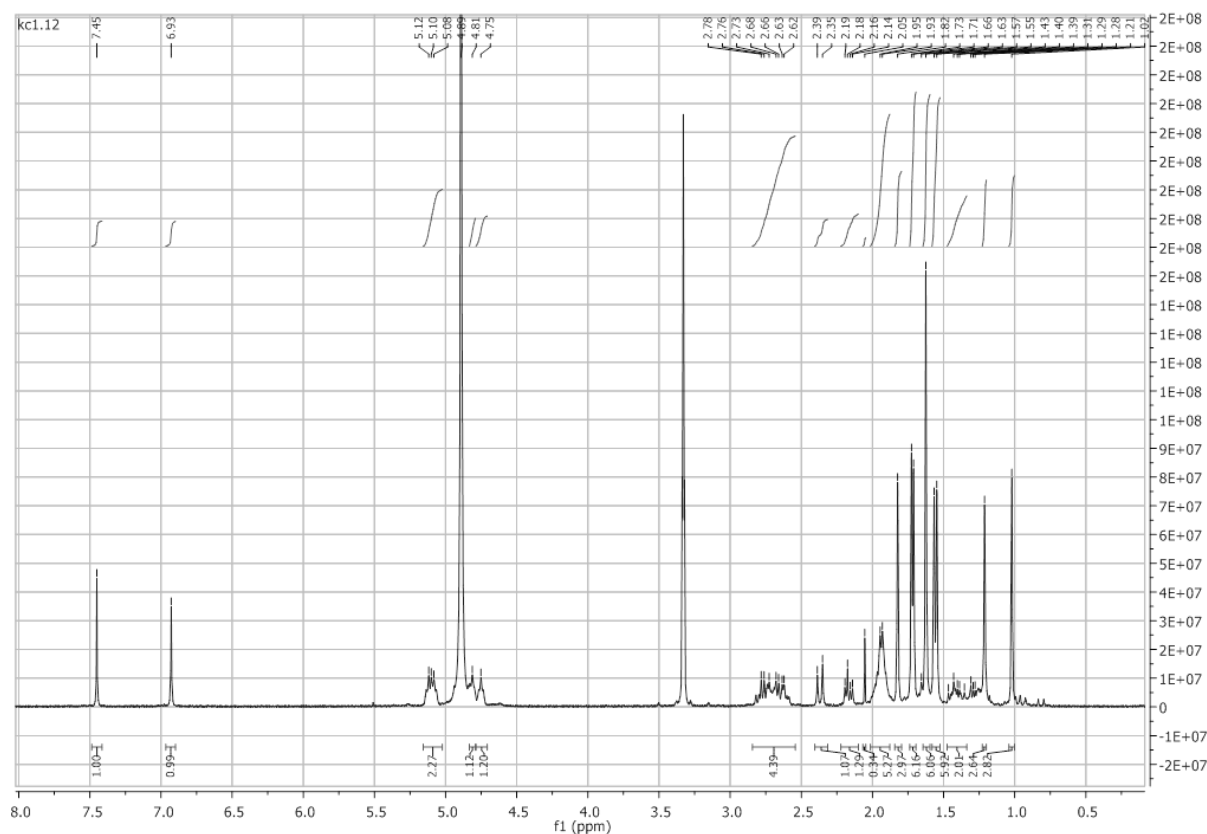


Figure 95 : NMR ^1H spectrum of 1,16-oxyguttiferone A (CD_3OD)

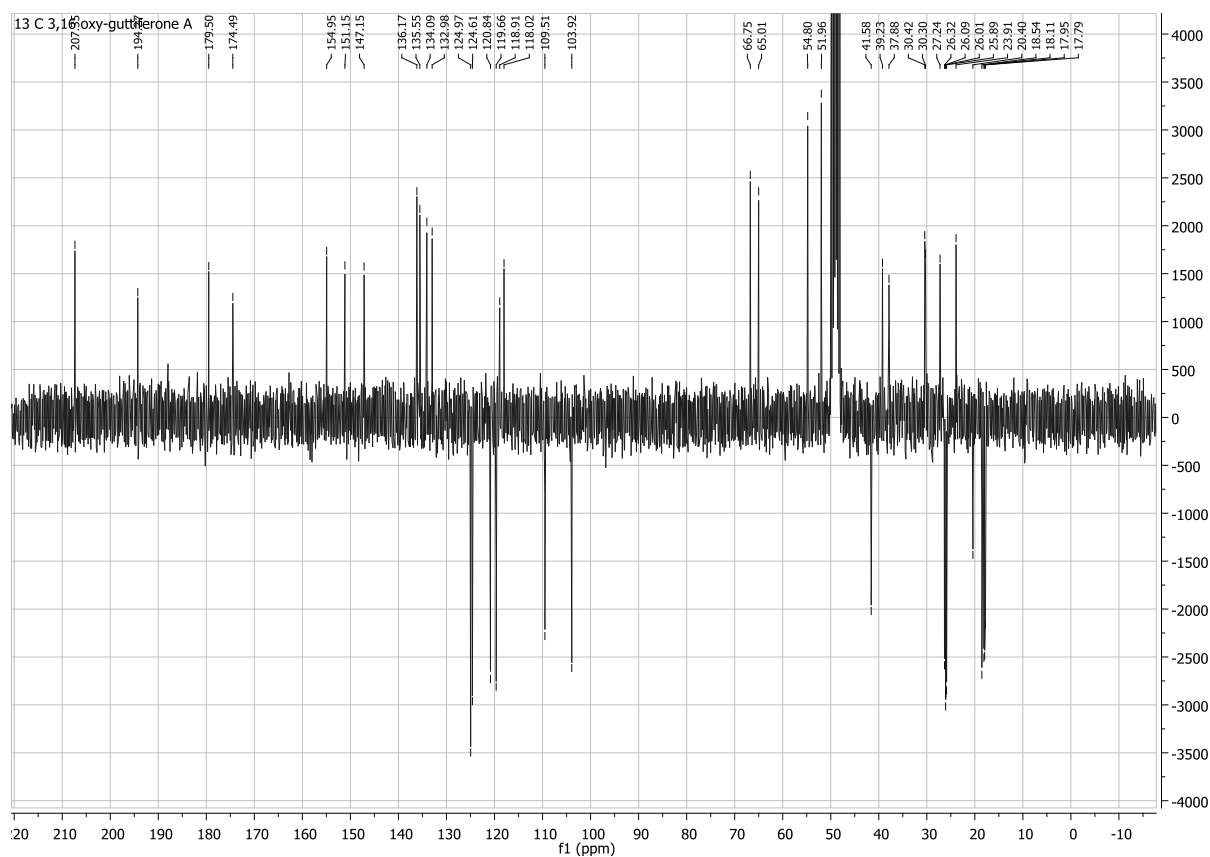
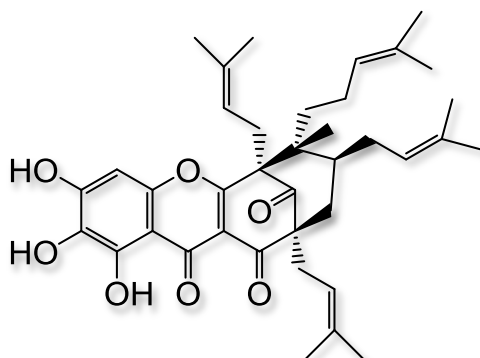


Figure 96 : NMR ¹³C spectrum of 1,16-oxyguttiferone A (CD₃OD)

12-hydroxy-3,16-guttiferone A 106



Synthesis : Guttiferone A (40 mg, $6.6 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 eq), lithium carbonate (49 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) and potassium ferricyanide (217 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) are dissolved in a methanol/water mixture and placed under argon. After stirring for 20 minutes, hydrochloric acid 1M was added and the reaction mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield 12-hydroxy-3,16-guttiferone A (6 %).

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1 % HCOOH
Gradient	78/22 to 81/19 over 25 min 81/19 to 100/0 over 30 min
Flow	45 mL/min
Retention time	37 min

Aspect: yellow lacquer

Formula: $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_6$,

$[\alpha]_{\text{D}}$: $+55 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^3$

MS: (ESI) m/z 623.3359 $[\text{M}+\text{Na}]$

NMR ^1H (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) : 6.55 (s, 1H, H-15), 5.21 (t, $J = 7.57$ Hz, 1H, H-30), 5.10 (t, $J = 7.41$ Hz, 1H, H-35), 4.86 (m, 1H, H-25), 4.60-4.67 (m, 1H, H-18), 2.91 (dd, $J = 13.73/8.95$, 1H, H-29), 2.79-2.87 (m, 1H, H-29), 2.51 (t, $J=8.40$ Hz, 2H, H-17), 2.09 (qd, $J = 14.54/5.5$ Hz, 2H, H-7), 1.91-2.01 (m, 2H, H-34), 1.84-1.90 (m, 1H, H-24), 1.75-1.81 (m, 1H, H-24), 1.72 (s, 3H, H-20), 1.70 (s, 9H, H-32, H-33, H-38), 1.65 (s, 3H, H-37), 1.63 (s, 3H, H-28), 1.48-1.58 (m, 2H, H-23), 1.44 (s, 3H, H-21), 1.40 (s, 3H, H-27), 1.26 (s, 3H, H-22).

NMR ^{13}C Jmod (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) : 207.10 (C-9), 193.82 (C-1), 180.54 (C-3), 179.79 (C-10), 155.43 (C-16), 149.78 (C-14), (C-12), 136.54 (C-19), 135.67 (C-31), 134.18 (C-26), 133.06 (C-36), 131.89 (C-13), 124.96 (C-35), 124.55 (C-25), 120.73 (C-30), 119.49 (C-18), 117.78 (C-2), 105.46 (C-11), 95.62 (C-15), 66.78 (C-8), 65.20 (C-4), 52.21 (C-5), 41.54 (C-6), 39.30 (C-7), 37.89 (C-23), 30.42 (C-24), 30.26 (C-29), 27.27 (C-17), 26.33, 26.13 (C-33), 26.02

(C-37), 25.89 (C-28), (C-21), 23.92 (C-34), 20.36 (C-22), 18.15 (C-20), 17.99 (C-32), 17.96 (C-27), 17.61 (C-38).

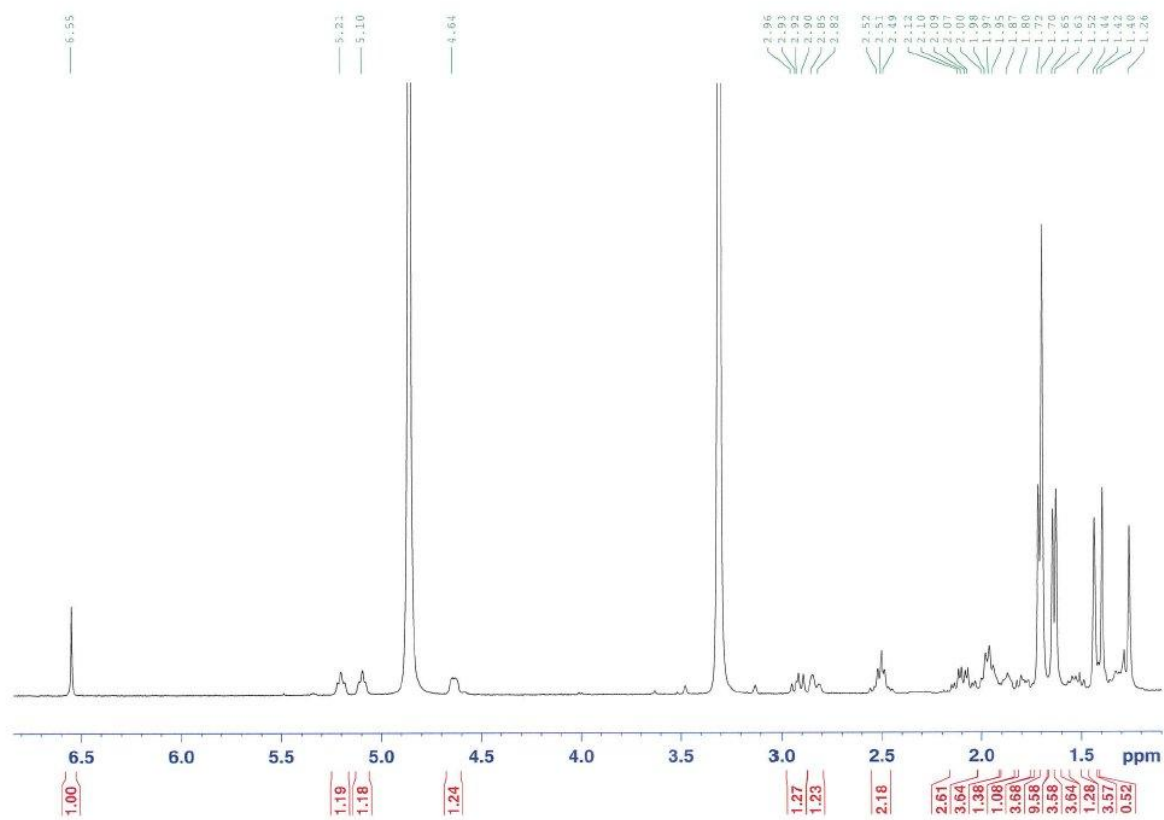


Figure 97 : NMR ^1H spectrum of 12-hydroxy-3,16-guttiferone A (CD_3OD)

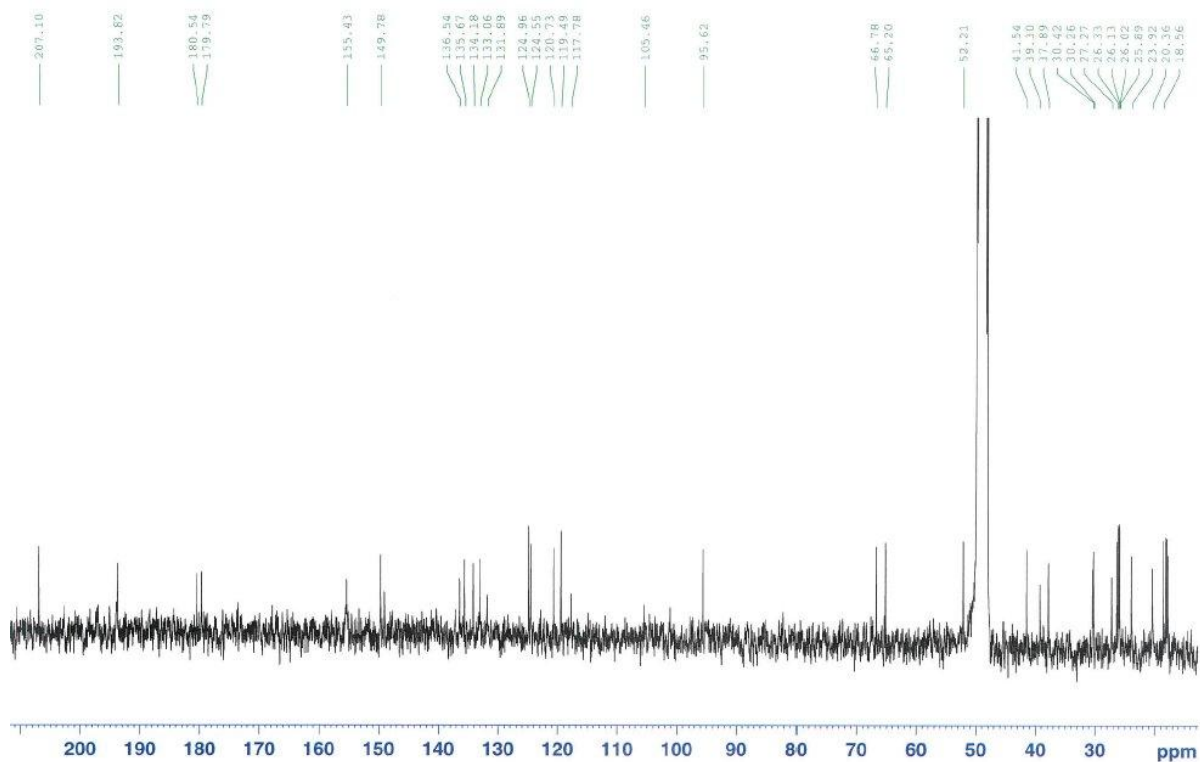


Figure 98 : NMR ^{13}C spectrum of 12-hydroxy-3,16-guttiferone A (CD_3OD)

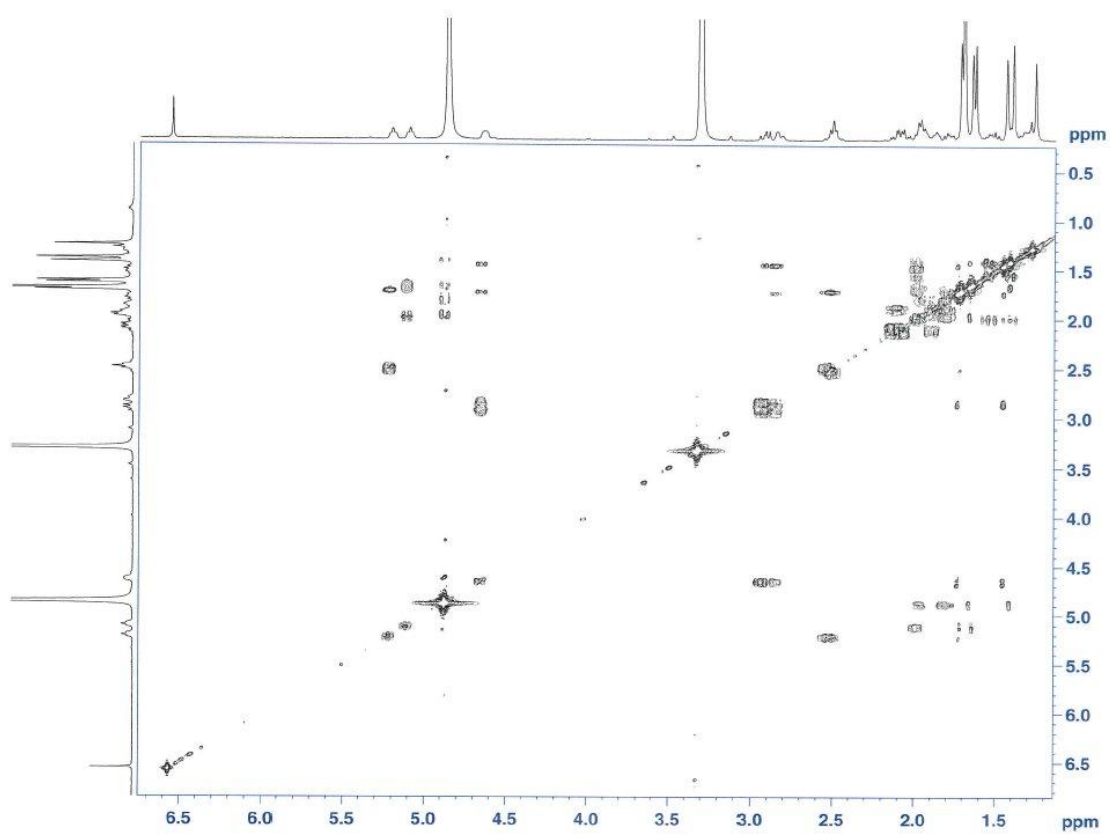


Figure 99 : COSY spectrum of 12-hydroxy-3,16-guttiferone A (CD_3OD)

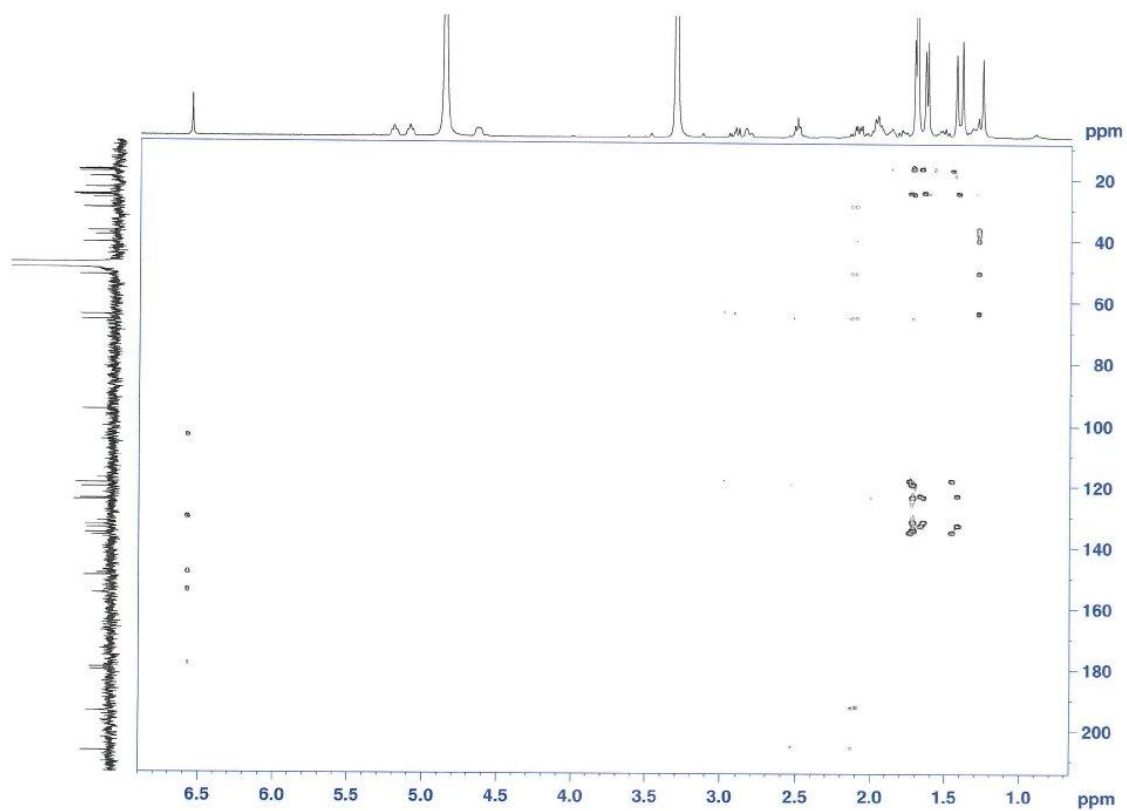


Figure 100 : HMBC spectrum of compound 12-hydroxy-3,16-guttiferone A (CD₃OD)

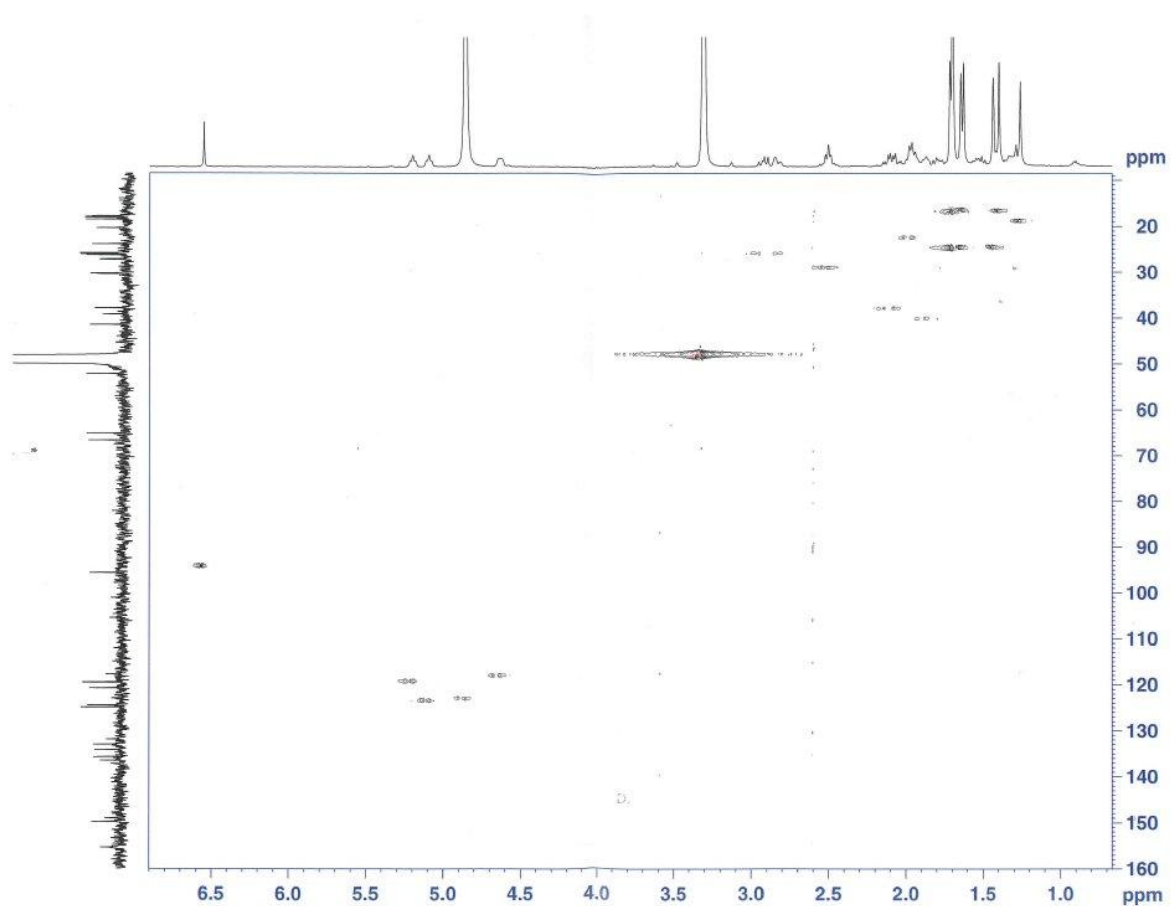
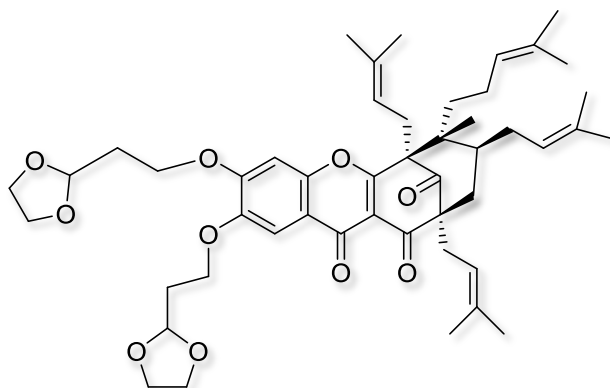


Figure 101 : HSQC spectrum of 12-hydroxy-3,16-guttiferone A (CD₃OD)

13,14-bisdioxolane-3,16-guttiferone A 114



Synthesis: 3,16-oxyguttiférone A, 2-(2-bromoethyle)-1,3-dioxolane (5 eq), potassium carbonate (10 eq) and cesium carbonate (1 eq) are dissolved in dry acetone and refluxed for 6 h. Hydrochloric acid (1 M) was added and the reaction mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. Dry crude was purified by preparative HPLC to yield 13,14-bisdioxolane-3,16-gutiferone A (20 %)

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1 % HCOOH
Gradient	85/15 to 96/4 over 25 min
Flow	45 mL/min
Retention time	23 min

Aspect : yellow laquer

Formule brute : $\text{C}_{48}\text{H}_{64}\text{O}_{10}$

$[\alpha]_{\text{D}}$: $+31 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^3$

MS : (ESI) m/z 823.4398 $[\text{M}+\text{Na}]$

RMN ^1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm): 7.55 (s, 1H, H-15), 7.27 (s, 1H, H-12), 5.23 (t, $J=6.72$ Hz, 1H, H-30), 5.12 (q, $J=4-9.28$ Hz, 3H, H-35, H-41, H-46), 4.89 (m, 1H, H-25), 4.64 (m, 1H, H-18), 4.41-4.20 (m, 4H, H-39, H-44), 4.05-3.84 (m, 8H, H-42, H-43, H-47, H-48), 3.09-2.81 (m, 2H, H-17), 2.53 (m, 2H, H-29), 2.18 (m, 4H, H-40, H-45), 2.09 (m, 2H, H-7), 2.05-1.81 (m, 5H, H-34, H-24, H-6), 1.75 (s, 3H, H-20), 1.71 (s, 9H, H-32, H-33, H-38), 1.65 (s, 6H, H-37, H-38), 1.54 (m, 2H, H-23), 1.41 (m, 3H, H-21), 1.39 (s, 3H, H-27), 1.30 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 205.8 (C-9), 192.6 (C-1), 178.4 (C-3), 172.9 (C-10), 155.2 (C-13), 150.5 (C-13), 148.3 (C-16), 134.9 (C-19), 134.2 (C-31), 132.8 (C-26), 131.6 (C-36), 123.6 (C-35), 123.1 (C-21), 119.4 (C-30), 118.2 (C-18), 117.6 (C-2), 117.1 (C-11), 106.0 (C-15), 101.6 (C-41), 101.5 (C-46), 100.8 (C-12), 65.5 (C-8), 65.3 (C-39), 65.0 (C-44), 64.6 (C-42, C-43), 64.5 (C-47, C-48), 63.6 (C-4), 50.6 (C-5), 40.3 (C-6), 37.6 (C-7), 36.6 (C-23), 33.1 (C-40),

29.0 (C-24), 28.8 (C-29), 26.0 (C-17), 25.0 (C-38), 24.8 (C-28), 24.7 (C-33), 24.5 (C-21), 22.6 (C-34), 19.2 (C-22), 17.3 (C-20), 16.6 (C-32), 16.6 (C-27), 16.4 (C-37).

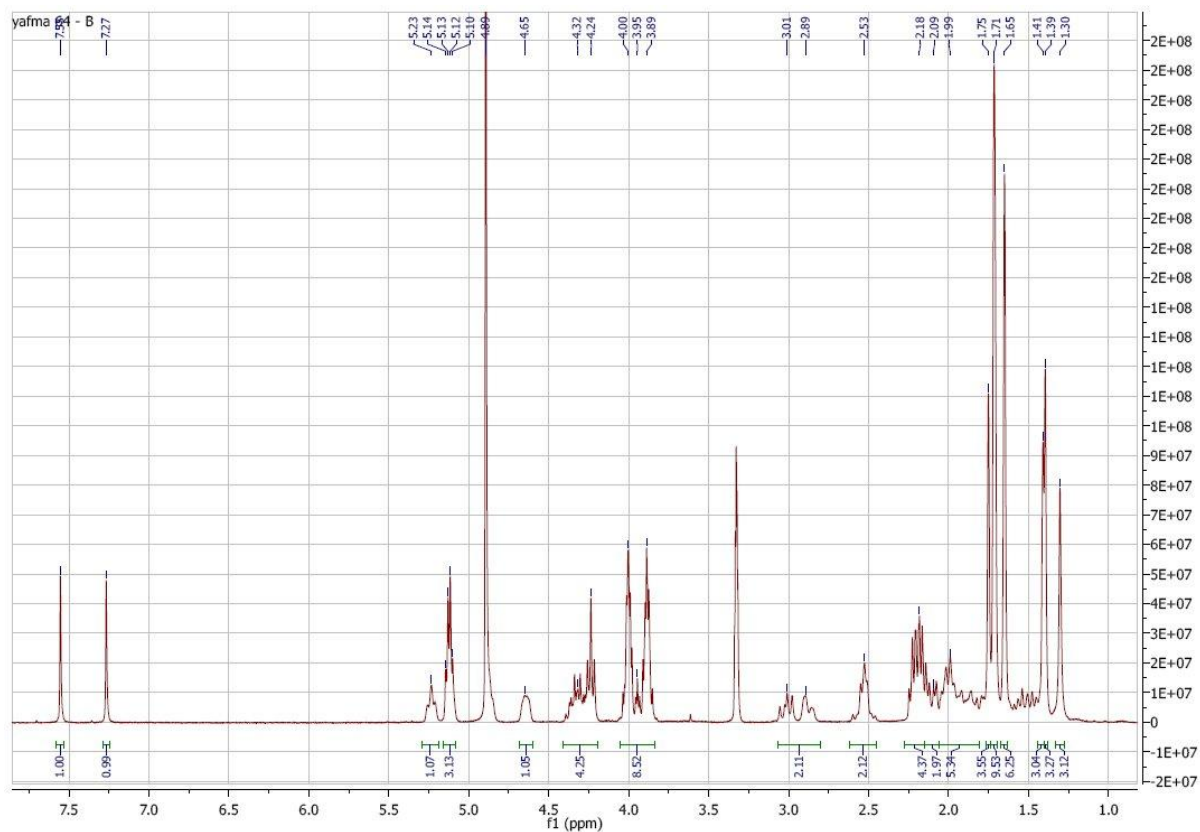


Figure 102 : NMR ^1H spectrum of 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiferone A (CD_3OD)

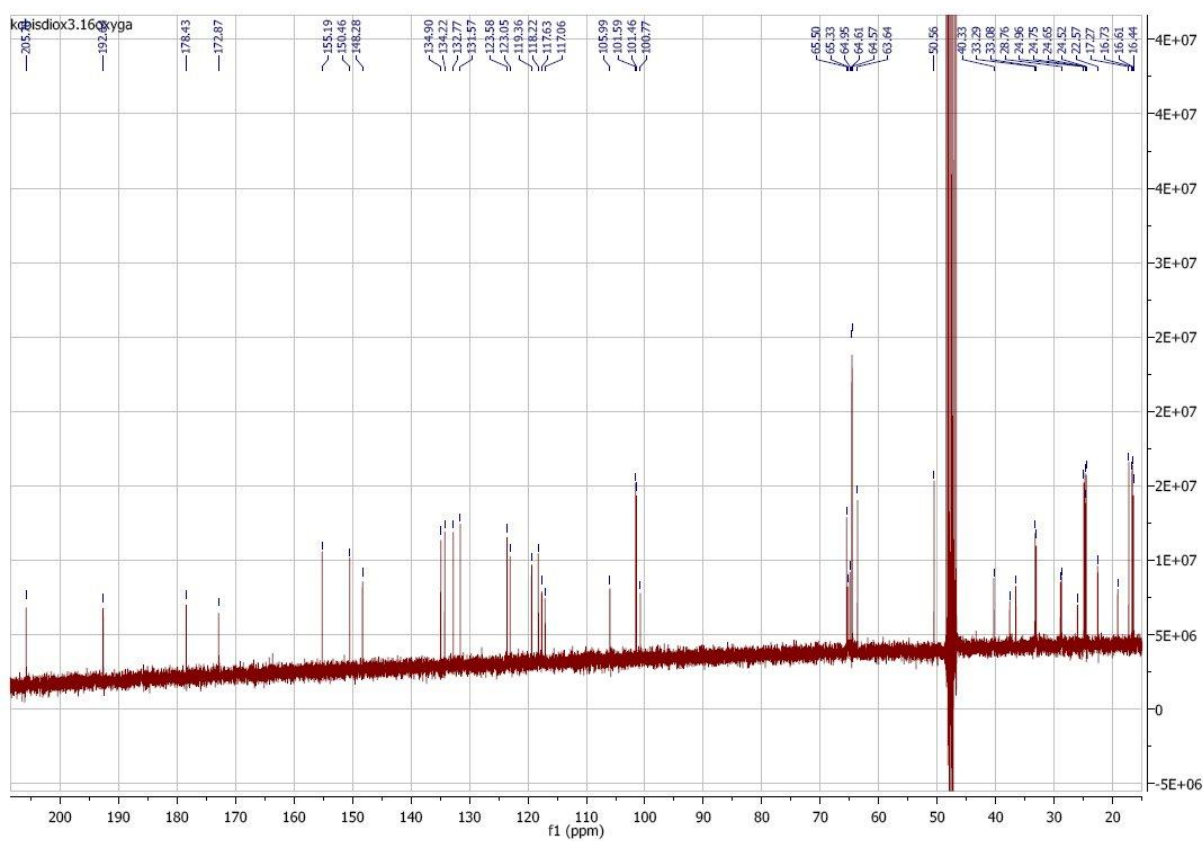
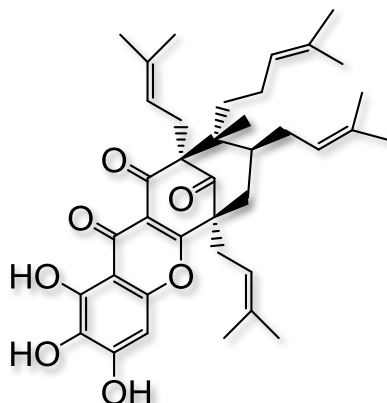


Figure 103 : : NMR ¹³C spectrum of 13,14-bisdioxolane-3,16-oxyguttiferone A (CD₃OD)

12-hydroxy-1,16-guttiférone A 117



Synthesis: Guttiferone A (40 mg, $6.6 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 eq), lithium carbonate (49 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) and potassium ferricyanide (217 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 10 eq) are dissolved in a methanol/water mixture and placed under argon. After stirring for 20 minutes, hydrochloric acid 1 M was added and the reaction mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield 12-hydroxy-1,16-guttiferone A (3 %).

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1% HCOOH
Gradient	78/22 to 81/19 over 25 min 81/19 to 100/0 over 30 min
Flow	45 mL/min
Retention time	34 min

Aspect: yellow laquer

Formula: $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_6$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}}$: $+84 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^3$

MS: (ESI) m/z 623.3359 $[\text{M}+\text{Na}]$

NMR ^1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 6.53 (s, 1H, H-15), 5.12 (t, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-35), 5.08 (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 (m, 2H, H-29), 2.69 (m, 2H, H-17), 2.37 (d, 1H, $J = 14$ Hz, H-7b), 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), 1.63 (s, 6H, H-21 et H-38), 1.58 (s, 3H, H-33), 1.56 (s, 3H, H-28), 1.42 (m, 1H), 1.31 (m, 1H), 1.22 (s, 3H, H-22), 1.10 (s, 3H, H-27).

NMR ^{13}C (100 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).

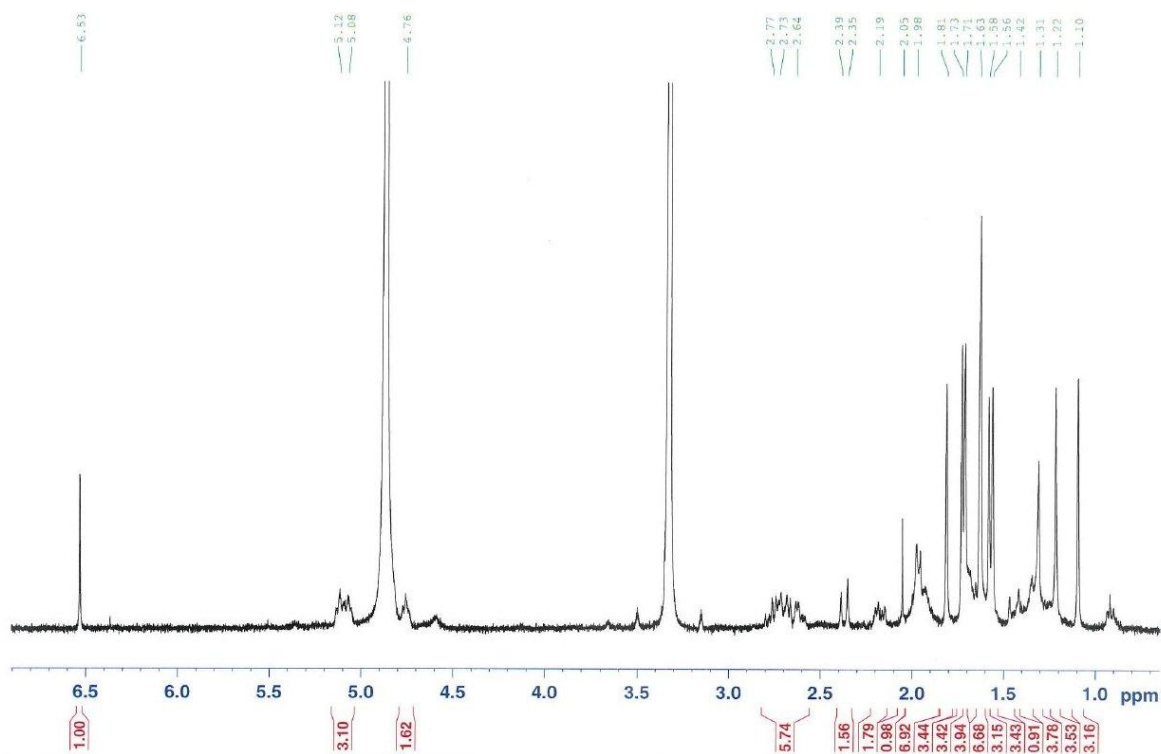


Figure 104 : NMR ^1H spectrum of 12-hydroxy-1,16-guttiferone A (CD_3OD)

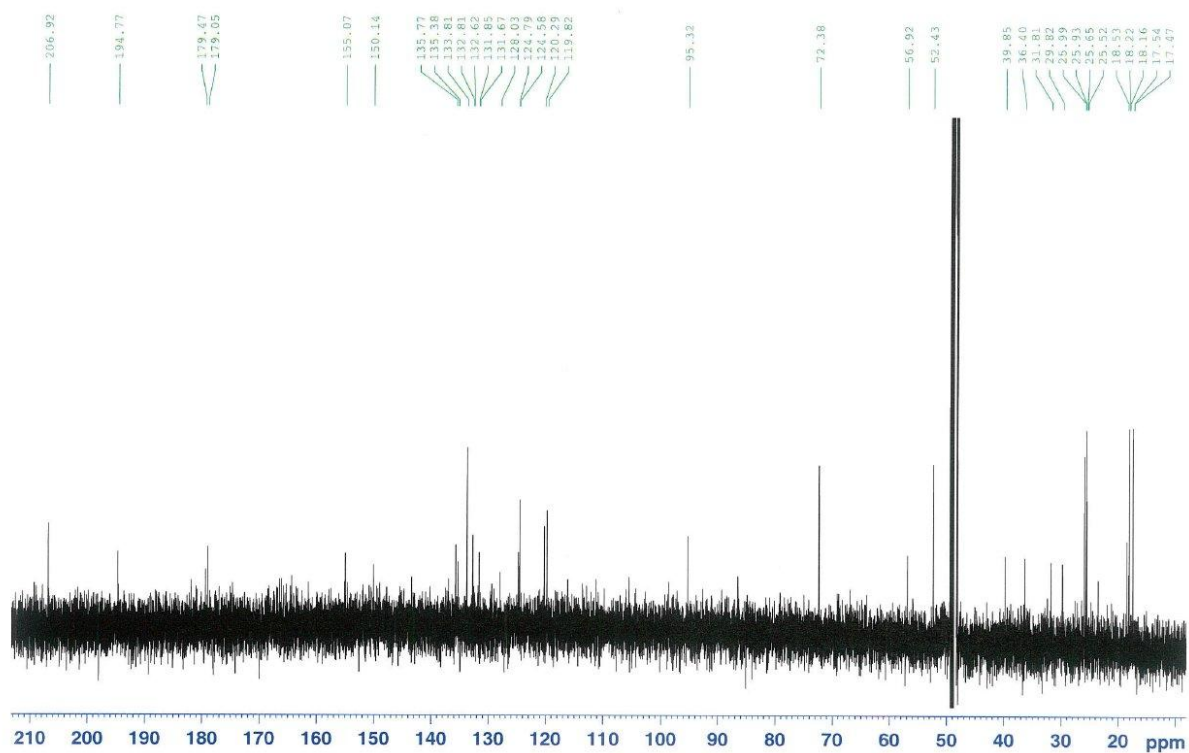


Figure 105 : NMR ^{13}C spectrum of 12-hydroxy-1,16-guttiferone A (CD_3OD)

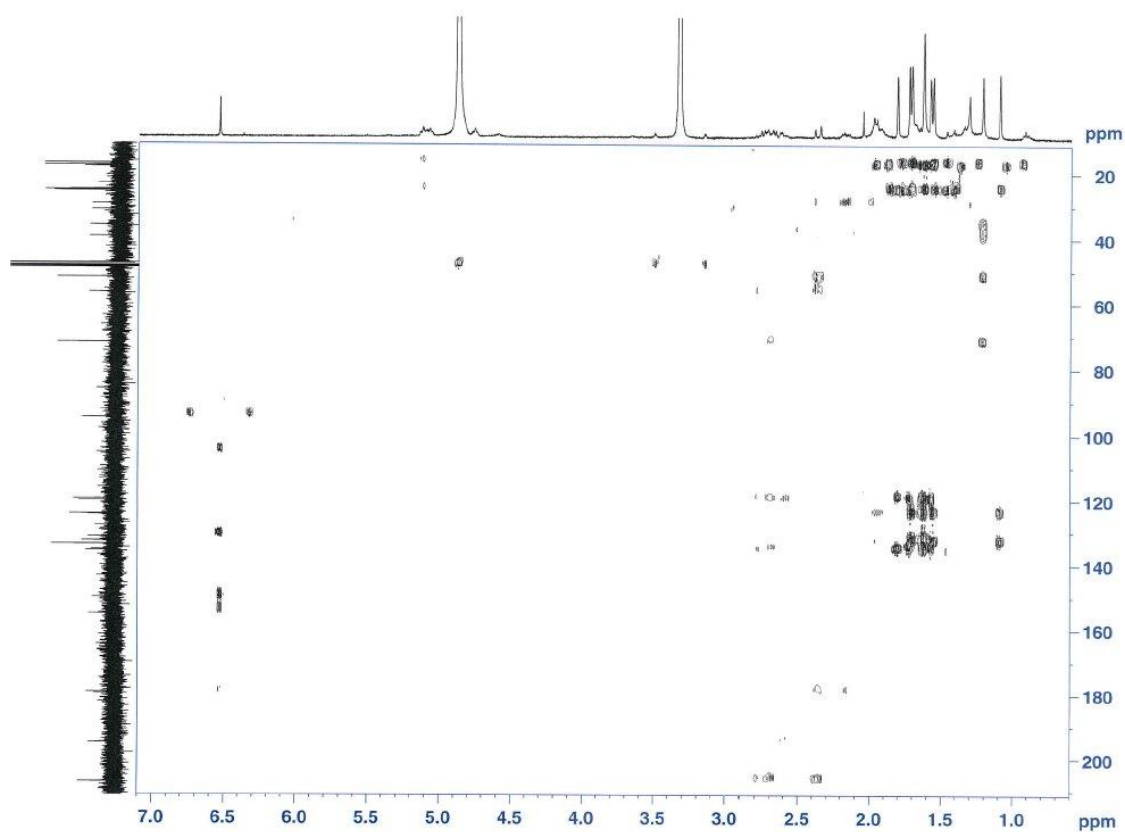


Figure 106 : HMBC spectrum of 12-hydroxy-1,16-guttiferone A (CD_3OD)

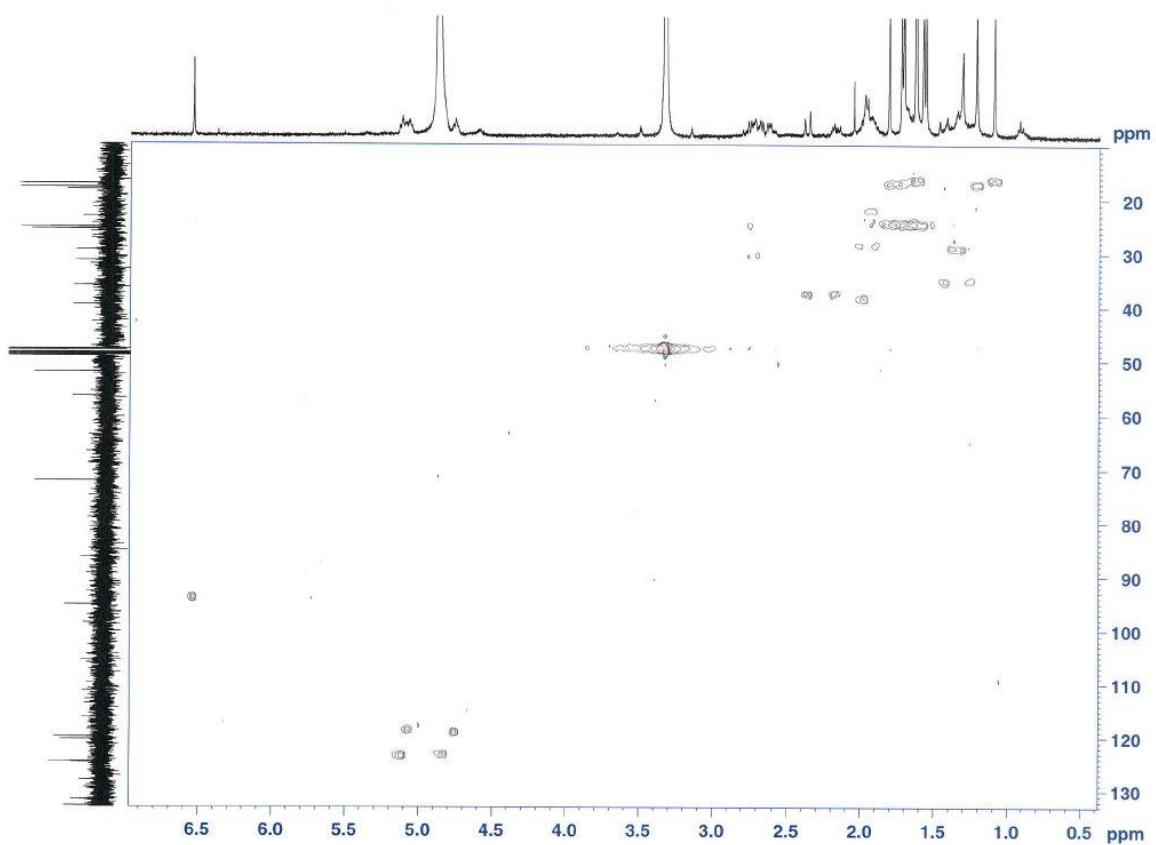
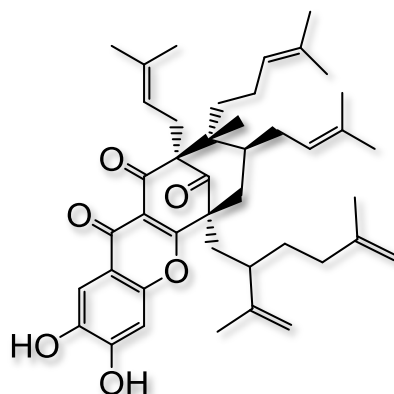


Figure 107 : HSQC spectrum of 12-hydroxy-1,16-guttiferone A (CD₃OD)

1,16-oxyguttiférone C 118



Synthesis: Guttiferone C (163 mg, 220 μ mol, 1 eq), lithium carbonate (183.6 mg, 10 eq) and potassium ferricyanide (806 mg, 10 eq) was dissolved in a MeOH/water mix (2/8) and putted under argon. The mix was stirred at room temperature. After 20 min, hydrochloric acid 1M was added to acidify the reaction mixture. The solution was extracted with DCM. The combined organic layer was washed with brine, dry over MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by preparative HPLC to yield the product (11.6 %).

Biotransformation: Once the microorganism grown in cultivation medium, biomass was recovered by gauze-filtration. 0.06 M phosphate buffer (pH = 6.00) is added to the biomass (85 g) for a total volume of 500 mL, and guttiferone A is added (50 mg in 1.5 mL of DMF) under agitation. pH is maintained at 6.2 and temperature at 27 °C for a week. In the end, suspension was gauze-filtered and aqueous supernatant recovered, acidified with HCl 1 M, then extracted with an ethyl acetate. Biomass pellet was resuspended in an equivalent volume of methanol and sonicated for 10 minutes. After centrifugation, the extraction was repeated 2 times on the pellet, and the pooled methanolic extracts was evaporated under reduced pressure. Dry residue was resuspended in an ethyl acetate/water mixture under stirring. Once recovered, organic phase was then pooled with the one from aqueous supernatant extraction, dried over magnesium sulfate, then evaporated to dryness with a rotary evaporator. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield the product (9.6 %).

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1 % HCOOH
Gradient	88/12 to 100/0 over 25 min 100/0 for 10 min
Flow	45 mL/min
Retention time	18 min

Aspect: yellow lacquer

Formula: $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{O}_6$

Exact mass: (ESI) m/z 667.3976 [M-H]

$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = +47 \text{ g}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{dm}^{-1}$ (7.5 mg/mL in MeOH)

RMN ^1H (400 MHz, MeOD), δ (ppm) : 7.44 (s, 1H, H-12), 6.91 (s, 1H, H-15), 5.11 (t, $J = 7$ Hz, 1H, H-40), 4.76 (m, 2H, H-25 and H-18), 4.61 (s, 1H, H-37), 4.58 (s, 1H, H-37), 4.16 (s, 1H, H-32), 4.09 (m, 1H, H-32), 2.65 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-17), 2.44 (d, $J=14$ Hz, 1H, H-7), 2.30 (m, 2H, H-29 and H-30), 2.05 (dd, $J=14$ Hz and 7 Hz, 1H, H-7), 2.01-1.75 (m, 8H, H-6, H-29, H-35, H-24, H-39), 1.73 (s, 3H, H-21), 1.70 (s, 3H, H-42), 1.67 (s, 3H, H-38), 1.63 (m, 2H, H-34), 1.61 (s, 3H, H-43), 1.59 (s, 3H, H-33), 1.56 (s, 3H, H-20), 1.51 (s, 3H, H-27), 1.39 (m, 2H, H-23), 1.14 (s, 3H, H-22), 0.98 (s, 3H, H-28).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD), δ (ppm): 208.4 (C-9), 194.9 (C-3), 178.9 (C-1), 174.1 (C-10), 154.6 (C-16), 151.0 (C-14), 148.1 (C-31), 147.0 (C-36), 146.5 (C-13), 135.4 (C-19), 133.8 (C-26), 132.9 (C-41), 125.1 (C-25), 124.8 (C-40), 121.0 (C-2), 119.9 (C-18), 118.8 (C-11), 112.9 (C-32), 110.7 (C-37), 109.6 (C-12), 104.1 (C-15), 73.6 (C-4), 57.0 (C-8), 53.7 (C-5), 44.7 (C-30), 42.4 (C-7), 40.3 (C-6), 37.7 (C-29), 36.3 (C-35), 36.2 (C-23), 32.9 (C-34), 30.4 (C-24), 26.5 (C-17), 26.2 (C-20), 25.9 (C-27), 25.7 (C-42), 24.2 (C-39), 22.6 (C-38), 20.4 (C-22), 18.7 (C-21), 18.5 (C-28), 17.9 (C-33), 17.7 (C-43).

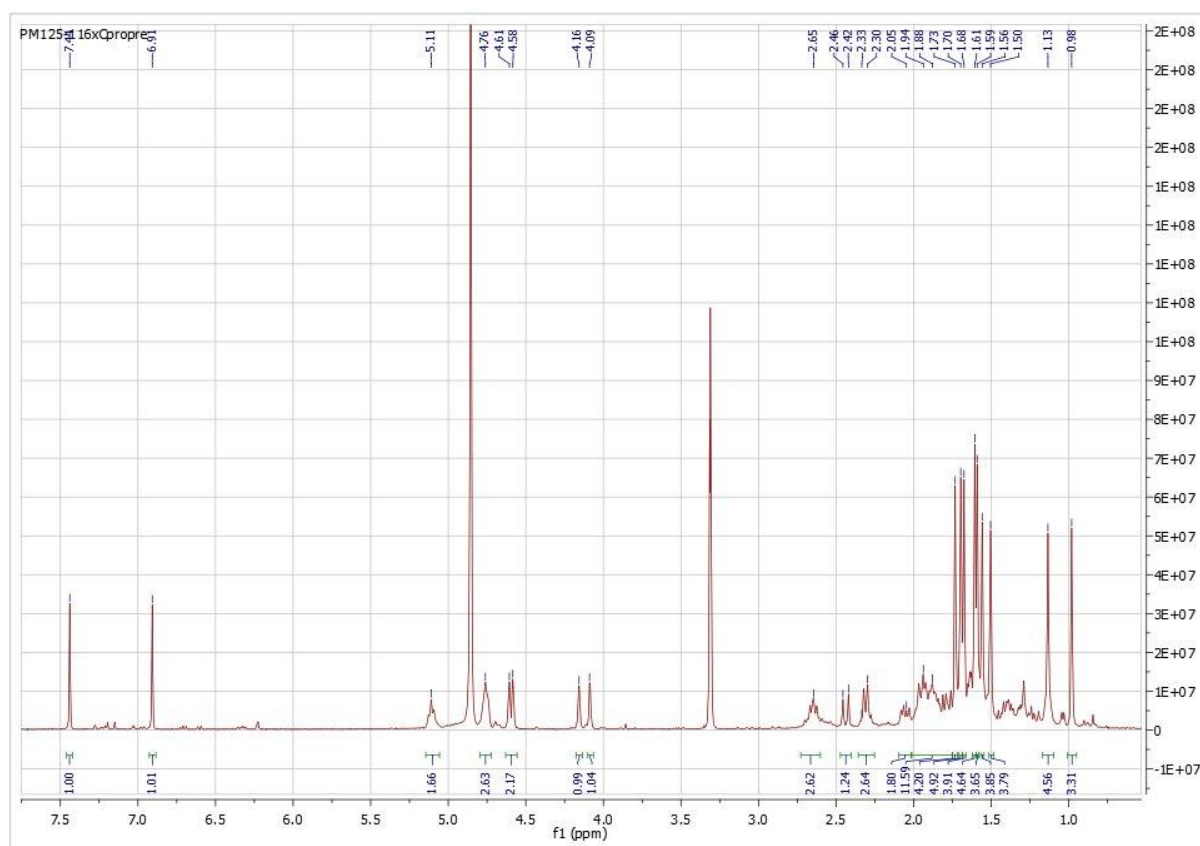


Figure 108 : NMR ^1H spectrum of 1,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

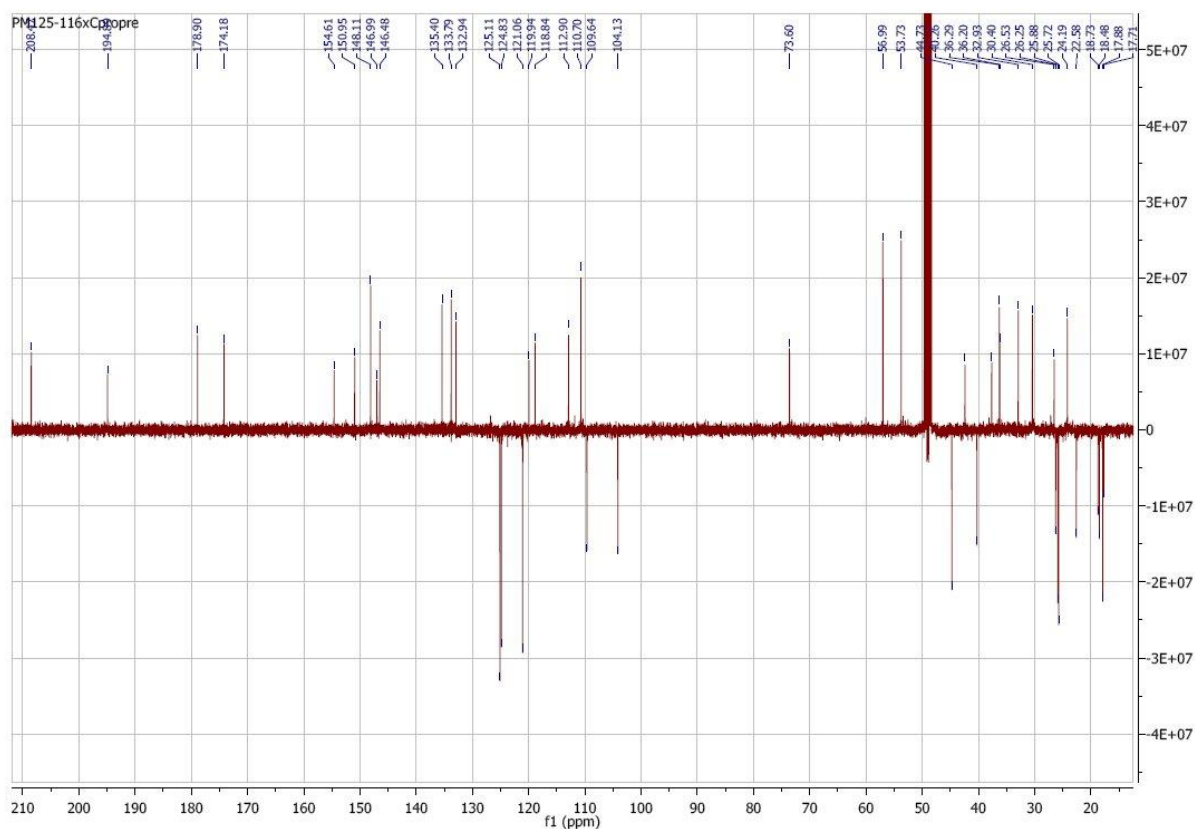


Figure 109 : NMR ^{13}C spectrum of 1,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

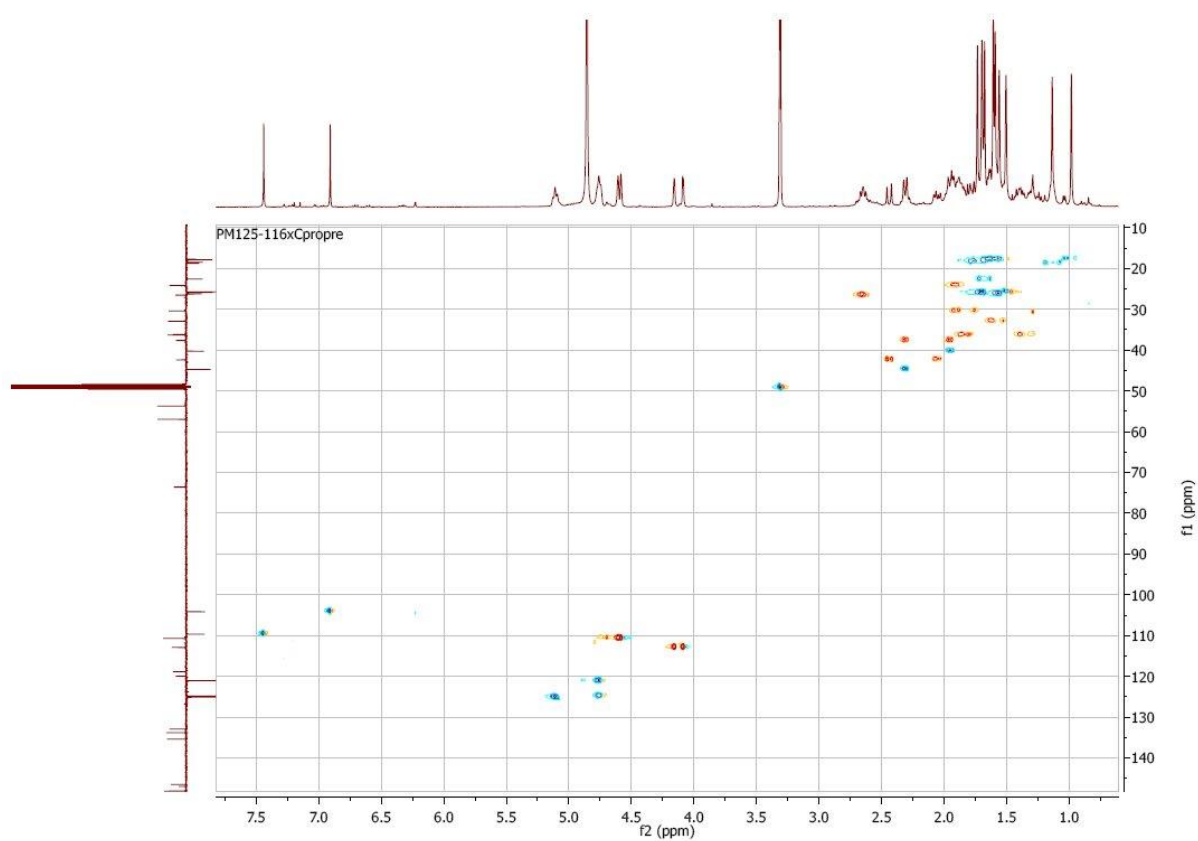


Figure 110 : HSQC spectrum of 1,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

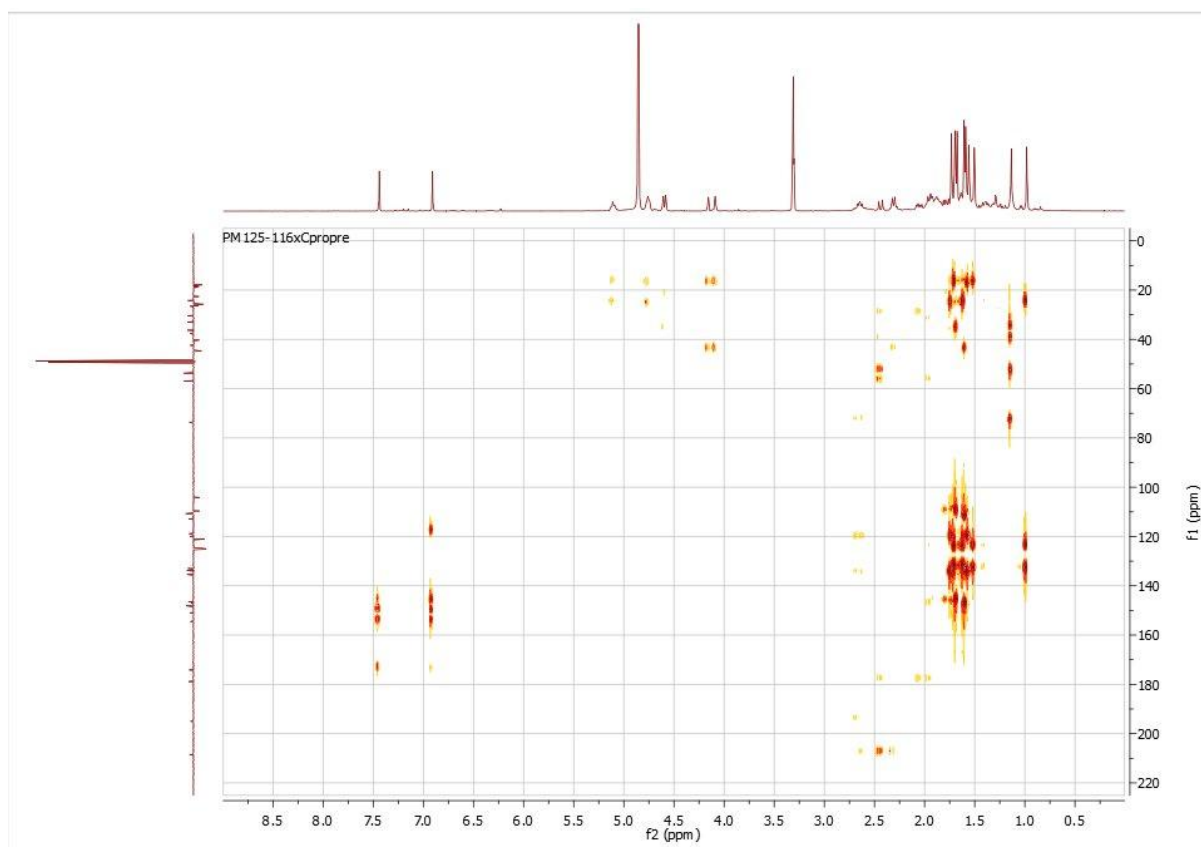
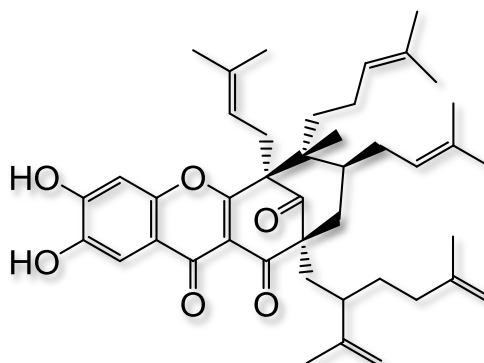


Figure 111 : HMBC spectrum of 1,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

3,16-oxyguttiférone C 119



Synthesis : Guttiferone C (163 mg, 220 μ mol, 1 eq), lithium carbonate (183.6 mg, 10 eq) and potassium ferricyanide (806 mg, 10 eq) was dissolved in a MeOH/water mix (2/8) and putted under argon. The mixture was stirred at room temperature. After 20 min, hydrochloric acid 1M was added to acidify the reaction mixture. The solution was extracted with DCM. The combined organic layer was washed with brine, dry over MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by preparative HPLC to yield the product (23 %).

Biotransformation: Once the microorganism grown in cultivation medium, biomass was recovered by gauze-filtration. 0.06 M phosphate buffer (pH = 6.00) is added to the biomass (85 g) for a total volume of 500 mL, and guttiferone C is added (50 mg in 1.5 mL of DMF) under agitation. pH is maintained at 6.2 and temperature at 27 °C for a week. In the end, suspension was gauze-filtered and aqueous supernatant recovered, acidified with HCl 1 M, then extracted with an ethyl acetate. Biomass pellet was resuspended in an equivalent volume of methanol and sonicated for 10 minutes. After centrifugation, the extraction was repeated 2 times on the pellet, and the pooled methanolic extracts was evaporated under reduced pressure. Dry residue was resuspended in an ethyl acetate/water mixture under stirring. Once recovered, organic phase was then pooled with the one from aqueous supernatant extraction, dried over magnesium sulfate, then evaporated to dryness with a rotary evaporator. Dry crude residue was purified by HPLC chromatography to yield the product (12 %).

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1% HCOOH
Gradient	88/12 to 100/0 over 25 min 100/0 for 10 min
Flow	45 mL/min
Retention time	21 min

Aspect: yellow lacquer

Formula: $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{O}_6$

Exact mass: (ESI) m/z 691.3985 [$\text{M}+\text{Na}$]

$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -18 \text{ g}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{dm}^{-1}$ (27.9 mg/mL)

RMN ^1H (400 MHz, MeOD), δ (ppm) : 7.44 (s, 1H, H-12), 6.94 (s, 1H, H-15), 5.10 (t, $J = 7$ Hz, 1H, H-40), 4.82 (m, 1H, H-25), 4.67 (m, 1H, H-18), 4.64 (s, 1H, H-37), 4.61 (s, 1H, H-37), 4.47 (s, 1H, H-32), 4.38 (m, 1H, H-32), 3.01-2.77 (m, 2H, H-17), 2.67 (heptuplet, $J = 5$ Hz, 1H, H-30), 2.24-2.12 (m, 4H, H-7, H-29), 2.00-1.78 (m, 10H, H-6, H-23, H-24, H-35, H-39), 1.77 (s, 3H, H-21), 1.69 (s, 3H, H-42), 1.67 (s, 3H, H-38), 1.60 (s, 6H, H-43, H-27), 1.57 (s, 3H, H-33), 1.43 (s, 3H, H-20), 1.38 (s, 2H, H-34), 1.33 (s, 3H, H-28), 1.28 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD), δ (ppm): 208.7 (C-9), 194.5 (C-1), 176.7 (C-3), 173.7 (C-10), 154.7 (C-16), 151.3 (C-14), 150.2 (C-31), 149.5 (C-36), 146.9 (C-13), 135.9 (C-19), 133.7 (C-26), 133.0 (C-41), 125.3 (C-25), 125.0 (C-40), 121.3 (C-2), 120.31 (C-18), 118.2 (C-11), 114.7 (C-32), 110.4 (C-37), 109.6 (C-12), 103.9 (C-15), 63.3 (C-4), 53.4 (C-8), 51.5 (C-5), 44.8 (C-7), 44.1 (C-30), 41.0 (C-6), 38.8 (C-29), 36.8 (C-35), 36.5 (C-23), 32.5 (C-34), 30.3 (C-24), 26.5 (C-17), 26.1 (C-20), 26.0 (C-27), 25.9 (C-42), 24.1 (C-39), 22.6 (C-38), 20.4 (C-22), 18.7 (C-21), 18.0 (C-28), 17.9 (C-33), 17.8 (C-43)

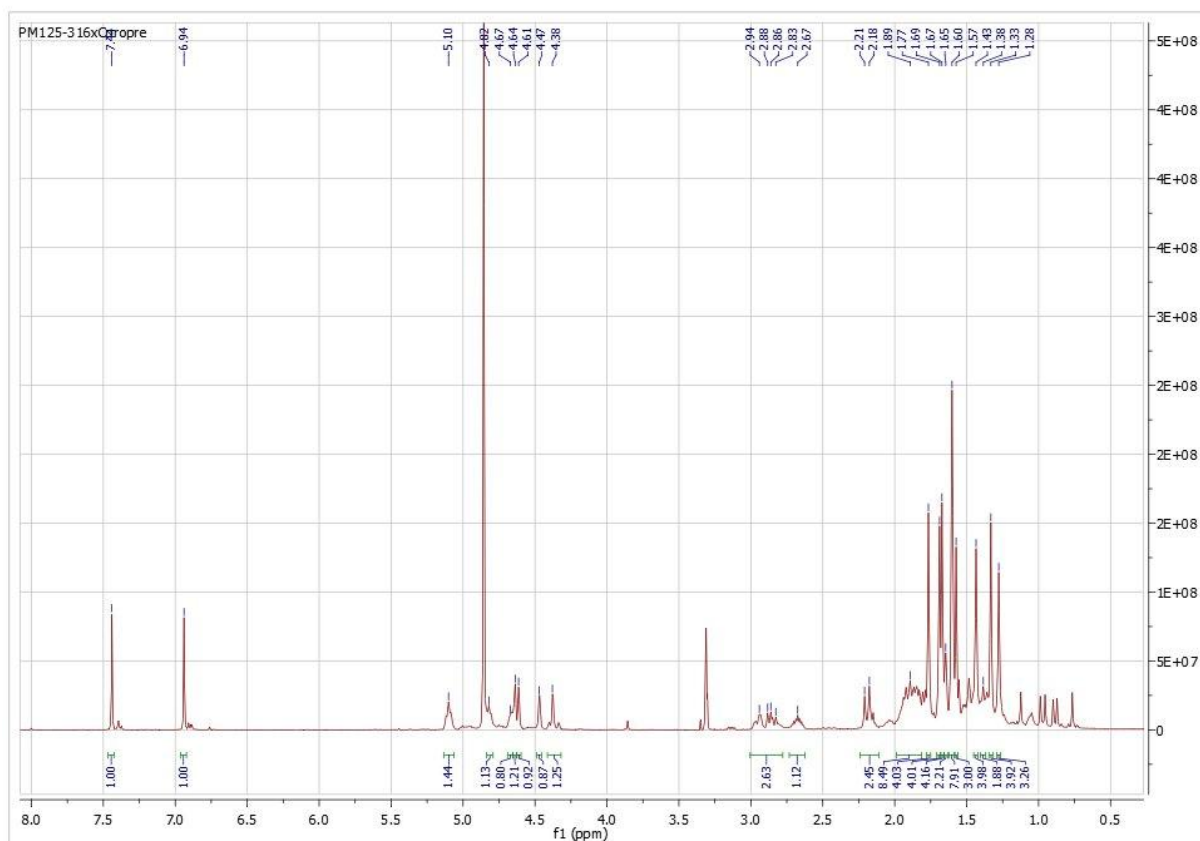


Figure 112 : NMR ^1H spectrum of 3,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

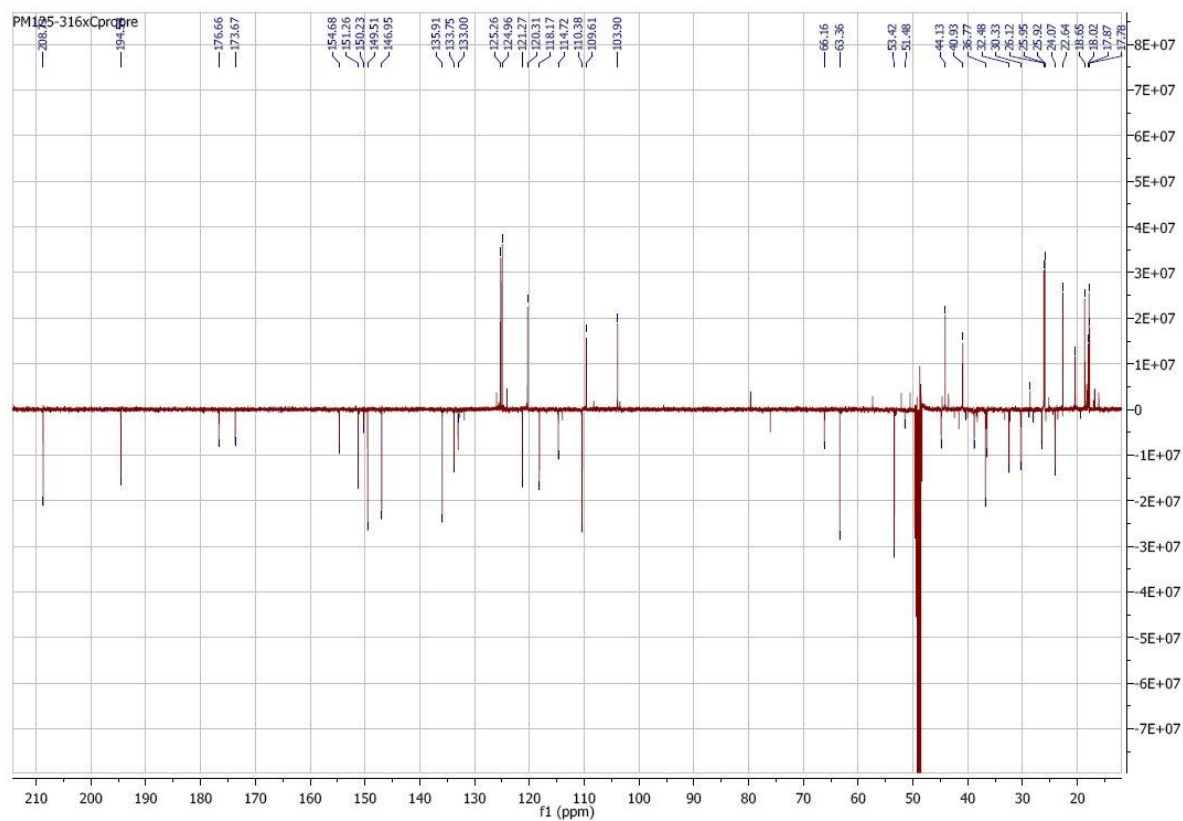


Figure 113 : NMR ^{13}C spectrum of 3,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

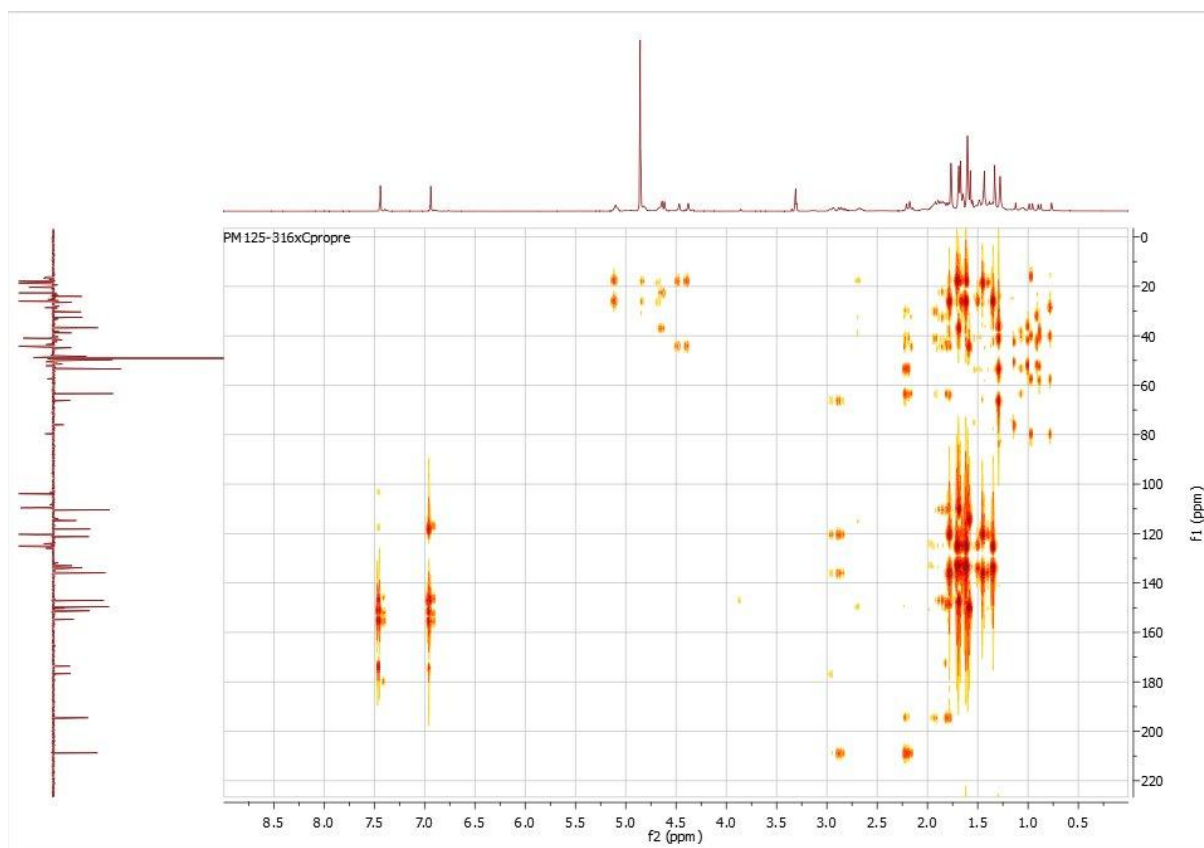


Figure 114 : HMBC spectrum of 3,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

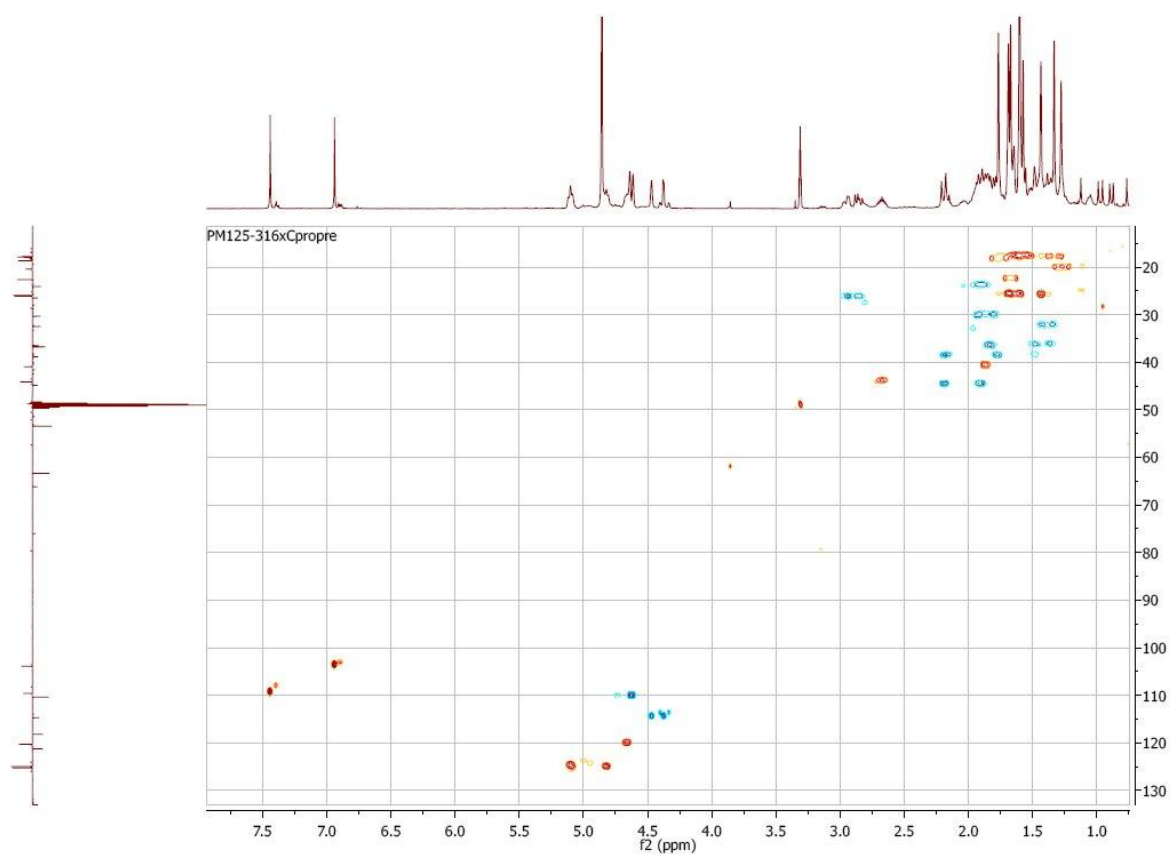
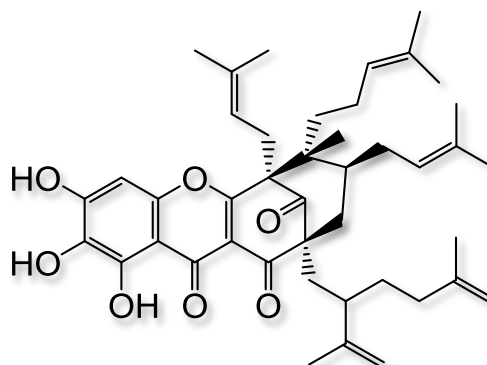


Figure 115 : HSQC spectrum of 3,16-oxyguttiférone C (CD₃OD)

12-hydroxy-3,16-oxyguttiferone C 120



Synthesis: Guttiferone C (163 mg, 220 μ mol, 1 eq), lithium carbonate (183.6 mg, 10 eq) and potassium ferricyanide (806 mg, 10 eq) was dissolved in a MeOH/water mix (2/8) and putted under argon. The mixture was stirred at room temperature. After 20 min, hydrochloric acid 1 M was added to acidify the reaction mixture. The solution was extracted with DCM. The combined organic layer was washed with brine, dry over MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by preparative HPLC to yield the product (8 %).

Eluent	(ACN/ H_2O) + 0.1 % HCOOH
Gradient	88/12 to 100/0 over 25 min 100/0 for 10 min
Flow	45 mL/min
Retention time	22.4 min

Aspect: yellow lacquer

Formula: $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{O}_7$

Exact mass: (ESI) m/z 683.3945 [M-H]

$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -11.6 \text{ g}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{dm}^{-1}$ (6.3 mg/mL)

RMN ^1H (400 MHz, MeOD), δ (ppm) : 6.54 (s, 1H, H-15), 5.09 (t, $J = 6$ Hz, 1H, H-40), 4.85 (m, 1H, H-25), 4.69-4.60 (m, 3H, H-18, H-37), 4.50 (s, 1H, H-32), 4.38 (m, 1H, H-32), 3.00-2.79 (m, 2H, H-17), 2.68 (m, 1H, H-30), 2.25-2.14 (m, 4H, H-7, H-29), 2.00-1.83 (m, 10H, H-6, H-23, H-24, H-35, H-39), 1.76 (s, 3H, H-21), 1.69 (s, 6H, H-42, H-38), 1.61 (s, 6H, H-43, H-27), 1.57 (s, 3H, H-33), 1.46 (s, 3H, H-20), 1.37 (s, 3H, H-28), 1.29 (s, 2H, H-34), 1.27 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD), δ (ppm): 208.7 (C-9), 194.2 (C-1), 176.7 (C-3), 173.7 (C-10), 155.1 (C-16), 150.0 (C-14), 149.8 (C-31), 147.0 (C-36), 136.5 (C-19), 133.9 (C-26), 133.1 (C-41), 131.1 (C-13), 125.2 (C-25), 124.9 (C-40), 120.1 (C-18), 114.8 (C-32), 110.4 (C-37), 105.3 (C-11), 95.55 (C-15), 66.4 (C-4), 63.4 (C-8), 53.6 (C-5), 44.8 (C-7), 44.1 (C-30), 41.0 (C-6), 38.8 (C-

29), 36.7 (C-35), 36.5 (C-23), 32.5 (C-34), 30.3 (C-24), 26.5 (C-17), 26.1 (C-20), 26.0 (C-27), 25.9 (C-42), 24.0 (C-39), 22.5 (C-38), 20.3 (C-22), 18.6 (C-21), 18.0 (C-28), 17.8 (C-33), 17.7 (C-43).

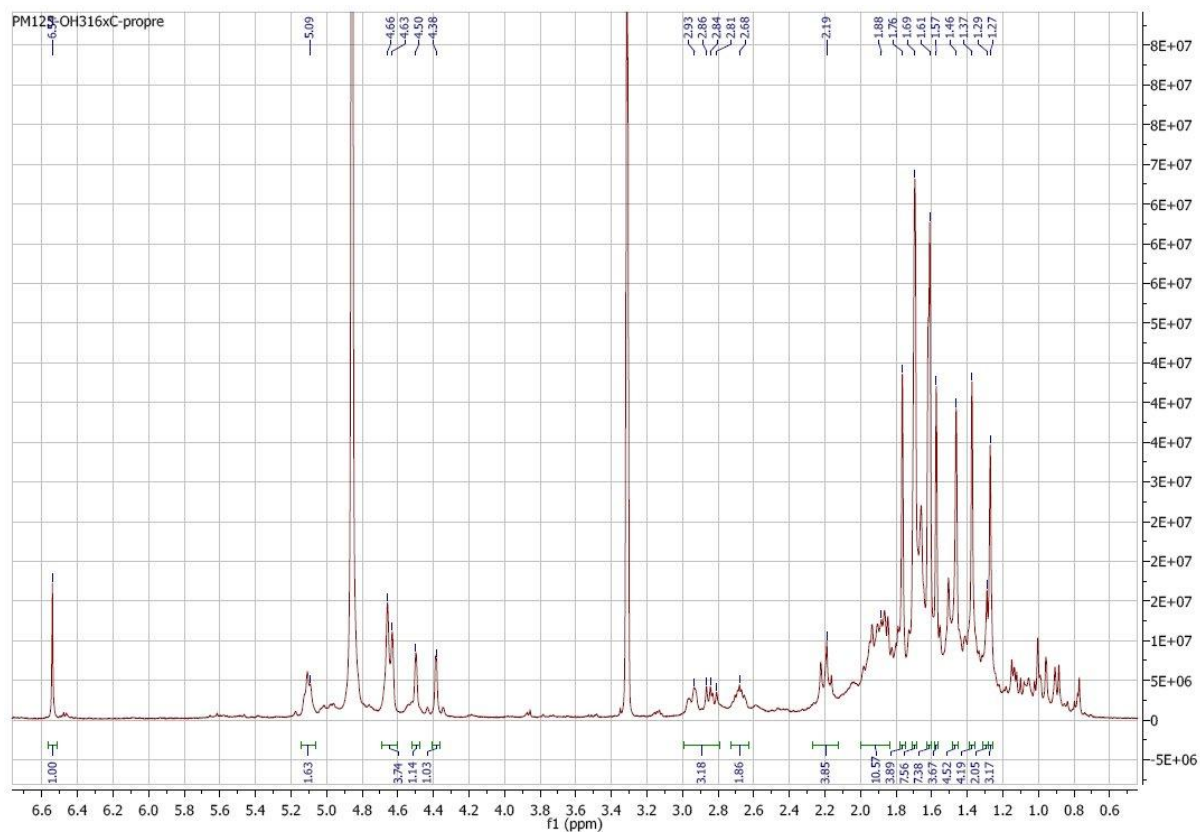


Figure 116 : NMR ^1H spectrum of 12-hydroxy-3,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

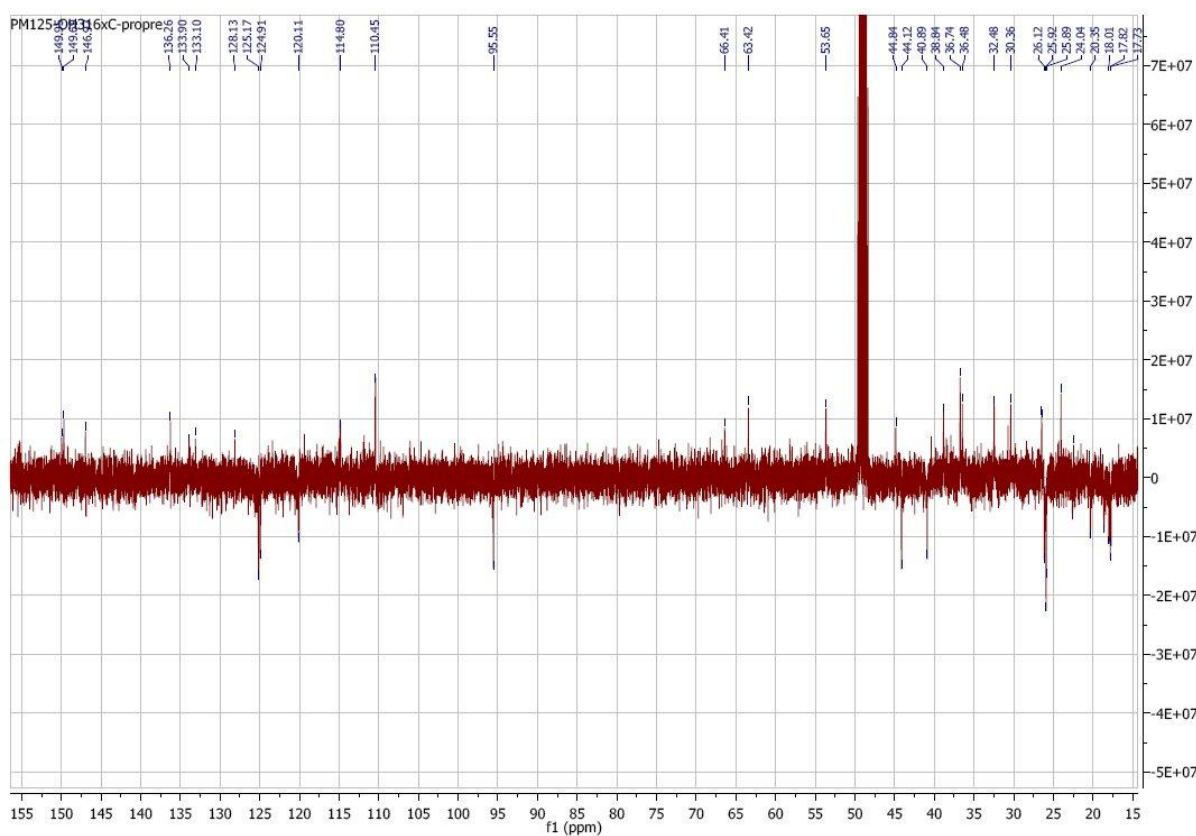


Figure 117 : NMR ^{13}C spectrum of 12-hydroxy-3,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

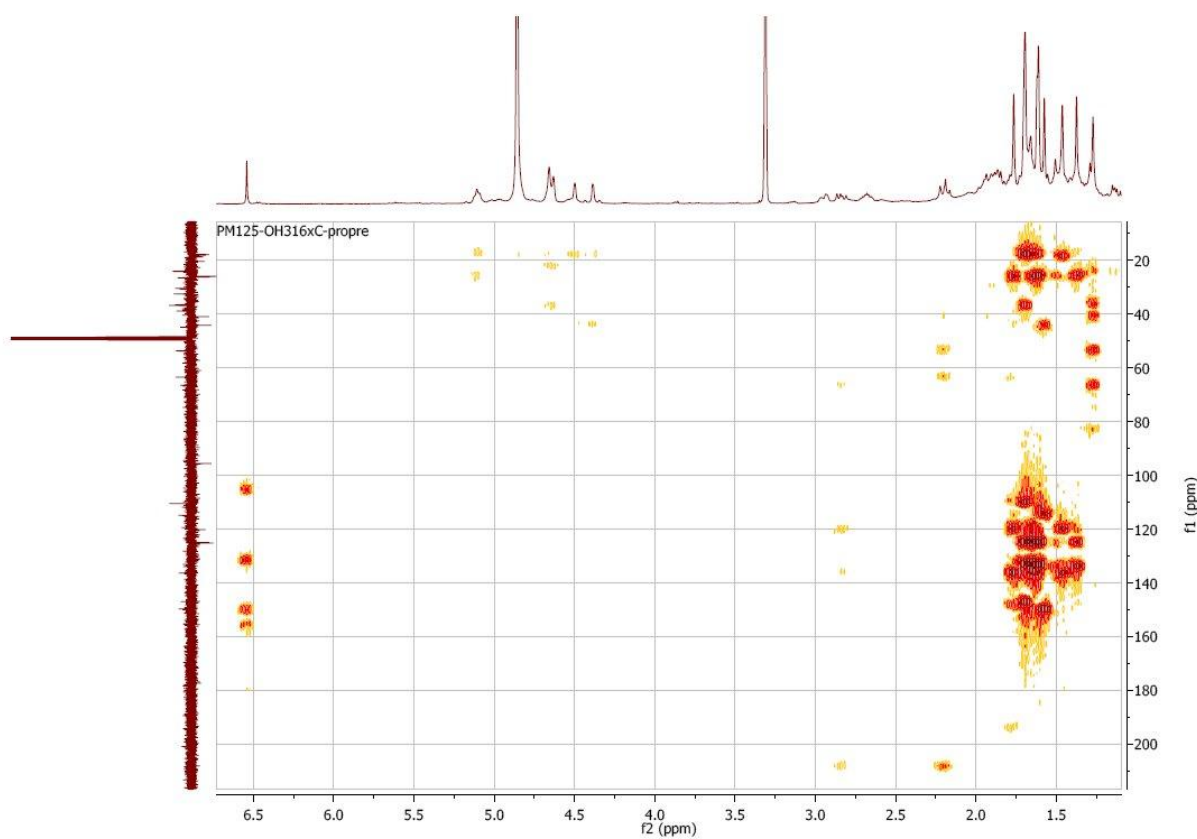


Figure 118 : HMBC spectrum of 12-hydroxy-3,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

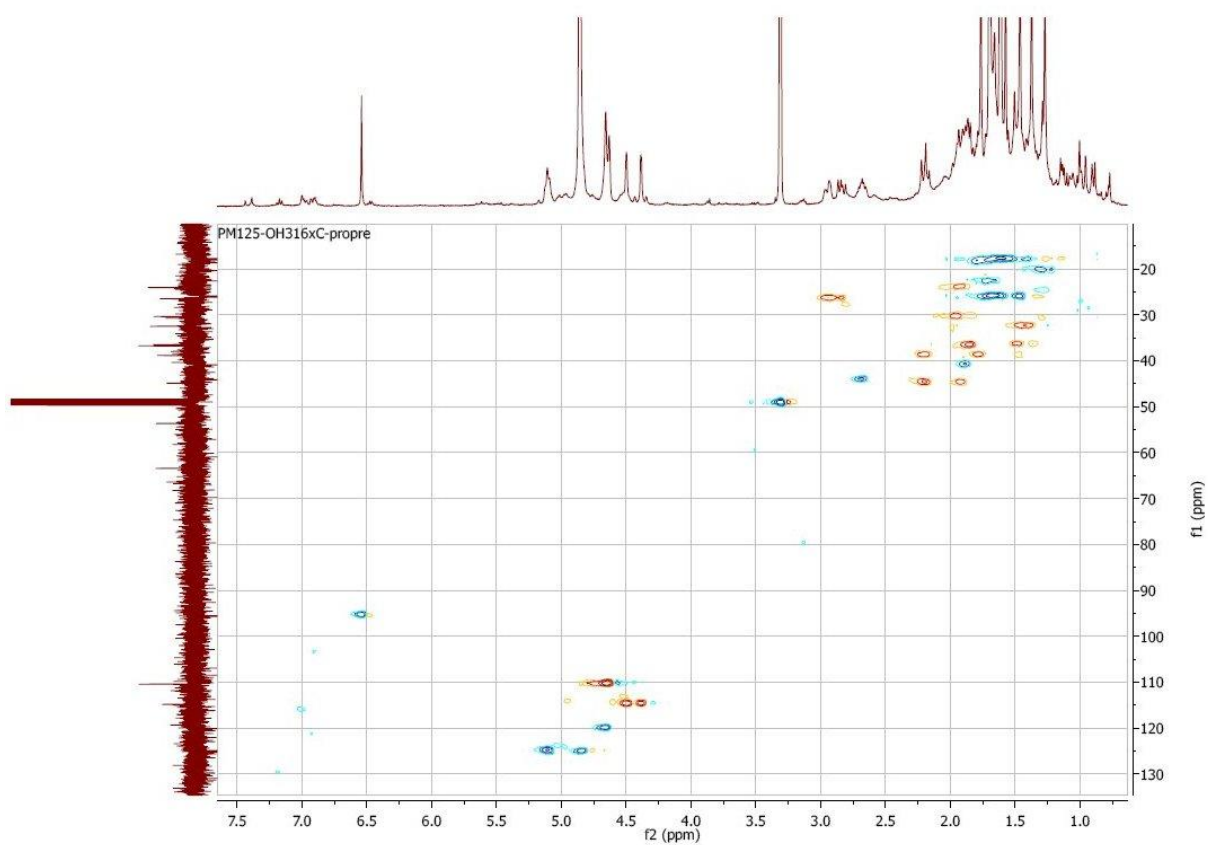
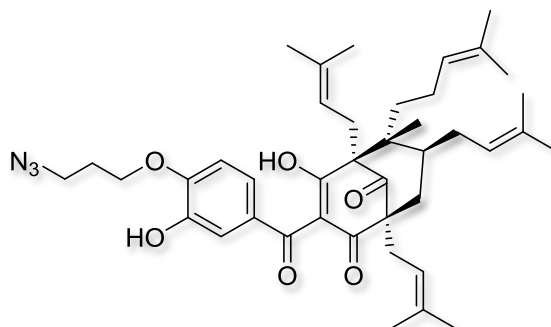


Figure 119 : HSQC spectrum of 12-hydroxy-3,16-oxyguttiferone C (CD_3OD)

Tagged guttiferone A - 14-(3-azidopropoxy)-guttiférone A 193



Synthesis: Guttiferone A (10 mg, 16.6 μmol) was dissolved in dry acetone and placed under argon. Cesium carbonate (6.5 mg, 20 μmol , 1.2 eq), potassium carbonate (23 mg, 166 μmol , 10 eq) and 1-azido-3-bromopropane (4 mg, 24.4 μmol , 1.5 eq) were added. The mixture was stirred for 6 hours at reflux. Reaction was quenched with hydrochloric acid 1M and extracted with DCM. The combined organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated under reduce pressure. Crude was purified by two silica gel chromatographies. Eluent for the first one DCM/Cyclohexane 50/50 to DCM 100%. Eluent for the second one: DCM/cyclohexane 70/30. The target compound was obtained as a yellow oil (10.5 % yield).

Aspect: yellow oil

Chemical Formula: $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_6$

Exact Mass: (ESI) m/z 708.3988 [M+Na]

RMN ^1H (400 MHz, MeOD), δ (ppm): 7.13 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-16), 7.11 (s, 1H, H-12), 6.90 (d, $J=8$ Hz, 1H, H-15), 5.23 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, H-30), 5.11 (t, $J=7$ Hz, 1H, H-35), 4.95 (m, 1H, H-18), 4.89 (m, 1H, H-25), 4.20 (t, $J=6$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 2.74-2.60 (m, 2H, H-17), 2.57-2.45 (m, 2H, H-29), 2.17-1.81 (m, 9H, H-6, 7, 24, 34, 40), 1.75 (s, 3H, H-32), 1.70 (s, 9H, H-21, 33, 37), 1.68 (s, 3H, H-27), 1.62 (s, 3H, H-20), 1.50 (s, 3H, H-38), 1.42 (m, 1H, H-23S), 1.35 (s, 1H, H-23R), 1.31 (s, 3H, H28), 1.27 (s, 3H, H-22).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD), δ (ppm): 211.7 (C-9), 196.9 (C-10), 195.8 (C-1), 195.7 (C-3), 152.6 (C-14), 147.1 (C-13), 135.5 (C-31), 133.5 (C-19), 133.4 (C-26), 132.7 (C-36), 129.3 (C-11), 125.4 (C-25), 125.3 (C-35), 124.9 (C-16), 120.7 (C-30), 120.6 (C-18), 117.3 (C-2), 117.2 (C-12), 112.0 (C-15), 97.6, 82.4, 66.8 (C-4), 66.7 (C-39), 66.0 (C-8), 51.7 (C-5), 49.5 (C-41), 40.9 (C-6), 39.6 (C-7), 36.7 (C-23), 31.7 (C-29), 30.6 (C-40), 29.6 (C-24), 29.4 (C-17), 27.8 (C-20), 26.1 (C-27), 25.8 (C-32), 25.7 (C-37), 23.4 (C-34), 19.4 (C22), 18.1 (C-33), 18.0 (C-21), 17.9 (C-28), 17.5 (C-38).

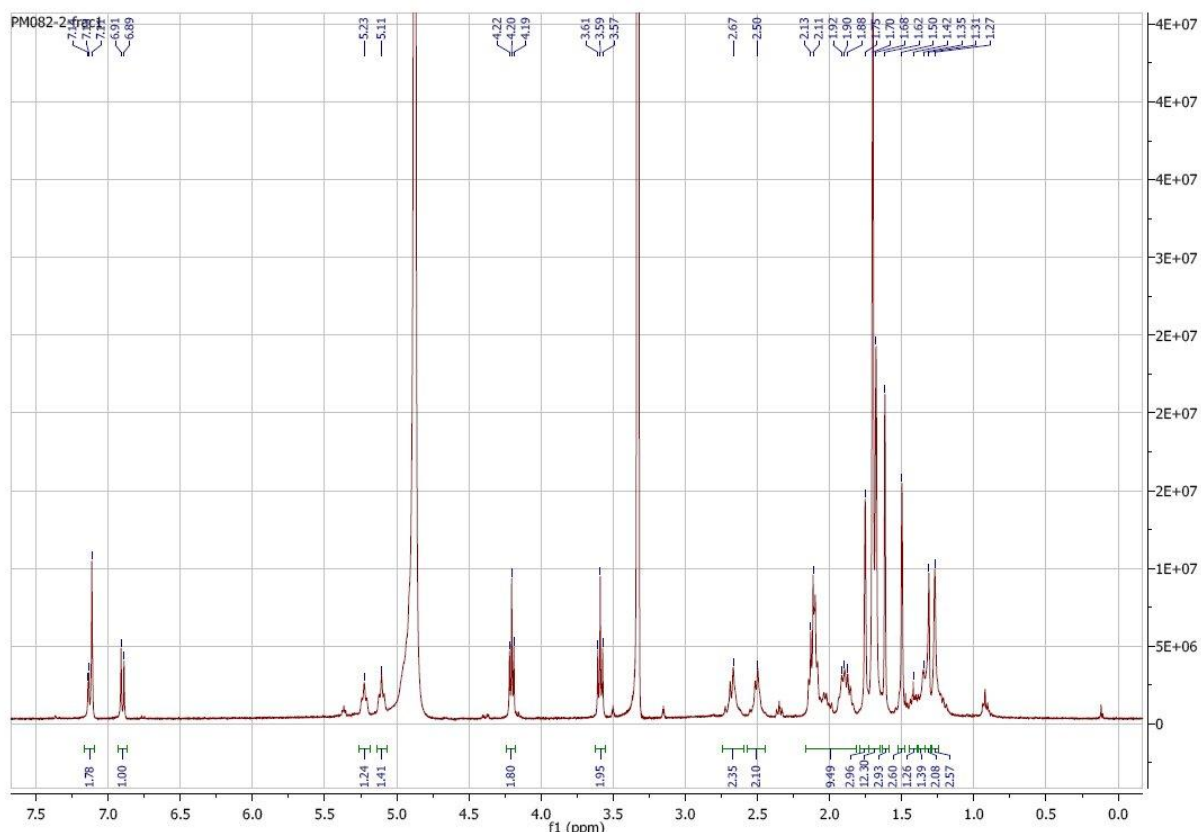


Figure 120 : NMR ^1H of 14-(3-azidopropoxy)-guttiferone A

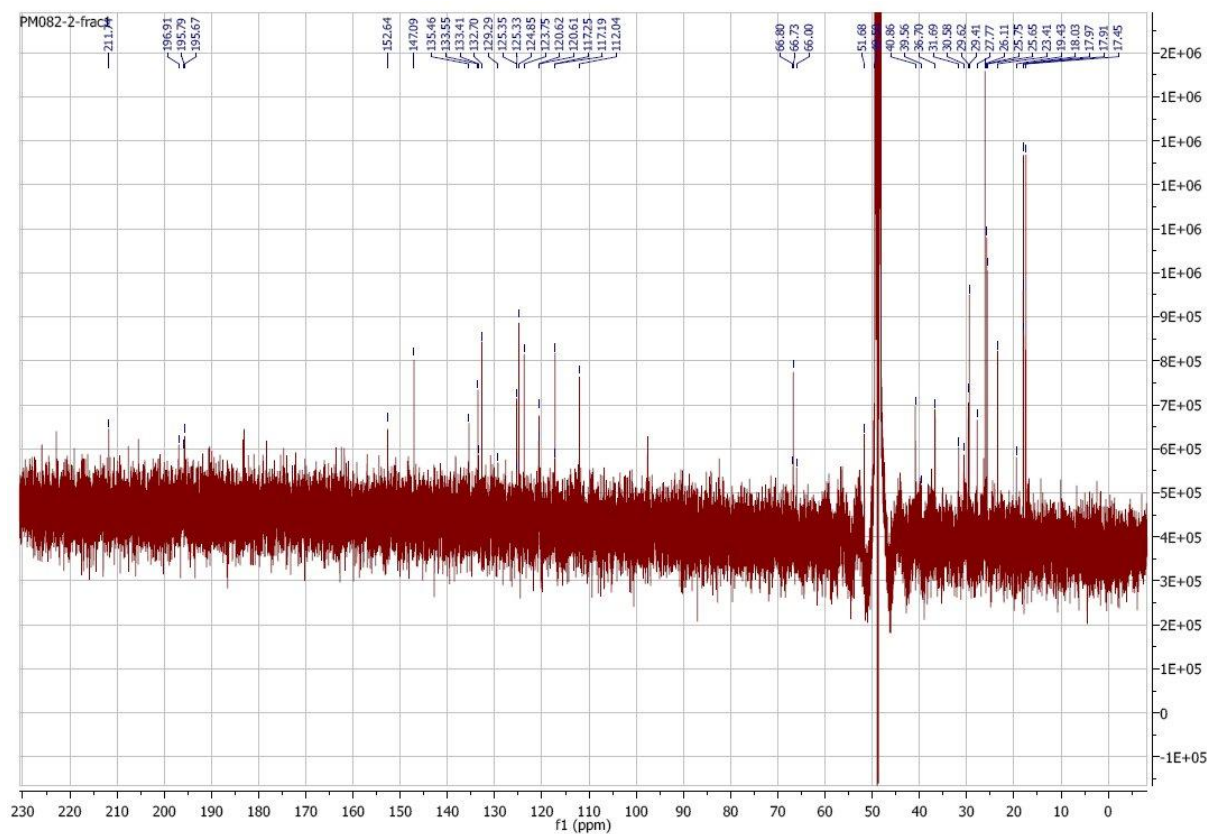
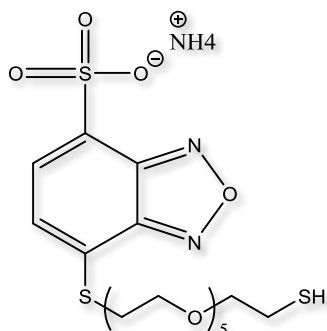


Figure 121 : NMR ^{13}C spectrum of 14-(3-azidopropoxy)-guttiferone A

4-(mercapto-Hexa(ethylene glycol)thiol)-7-sulfobenzofurazan ammonium salt 219



Synthesis: Hexa(ethylene glycol)dithiol (0.695 mmol, 5 eq) was dissolved in 1 mL of acetonitrile. NEt₃ was added (19.5 μ L, 1 eq). 4-Chloro-7-sulfobenzofurazan ammonium salt was dissolved in 1 mL of water and added to the previous solution dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The crude was evaporated under reduced pressure and purified by preparative HPLC to yield the expected product (86 %).

Eluent	(ACN/H ₂ O) + 0.1 % TFA
Gradient	20/80 to 40/60 over 25 min
Flow	45 mL/min
Retention time	13 min
Detection	220 nm

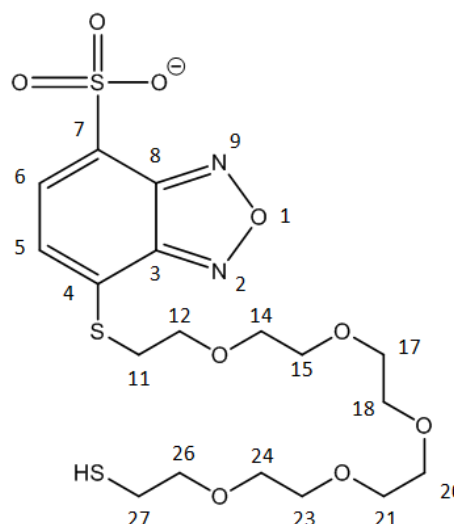
Aspect: yellow lacquer

Formula: C₁₈H₂₇N₂O₉S₃⁻

Exact mass: (ESI) *m/z* 511.0889

RMN ¹H (400 MHz, MeOD), δ (ppm) : 7.83 (d, J=7.3 Hz, 1H, H-6), 7.39 (d, J=7.3 Hz, 1H, H-5), 3.83 (t, J=6.0 Hz, 2H, H-11), 3.68-3.52 (m, 18H), 3.46 (t, J=6.2 Hz, 2H, H-27).

RMN ¹³C (400 MHz, MeOD), δ (ppm) : 150.40 (C-3), 146.92 (C-8), [132.34-132.32] (C-4/C-7), 131.63 (C-6), 125.73 (C-5), 74.02 (C-26), 73.56 (C-12), [71.57, 71.54, 71.52, 71.50, 71.46, 71.31] (C15 à C23), 70.32 (C-24), 62.18 (C-14), 32.28 (C-11), 24.65 (C-27).



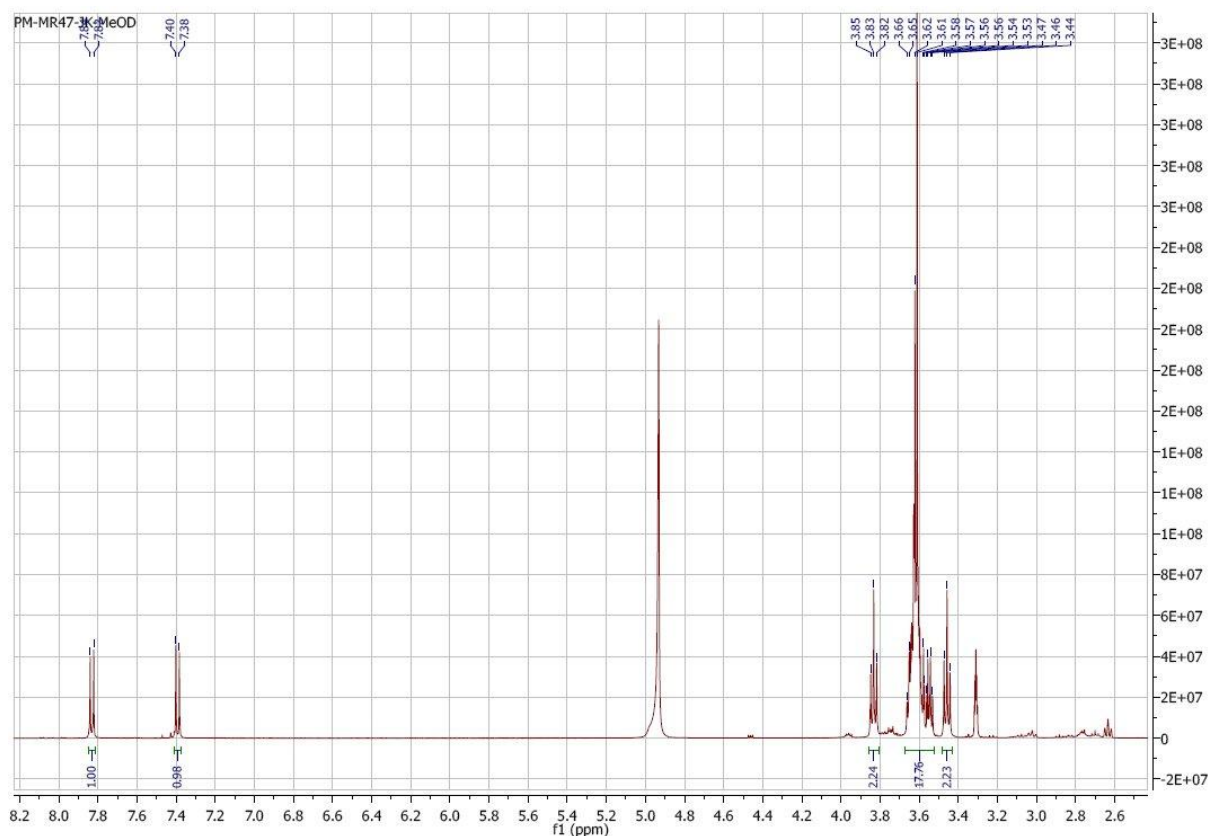


Figure 122 : NMR ^1H spectrum of 4-(mercapto-Hexa(ethylene glycol)thiol)-7-sulfobenzofurazan ammonium salt

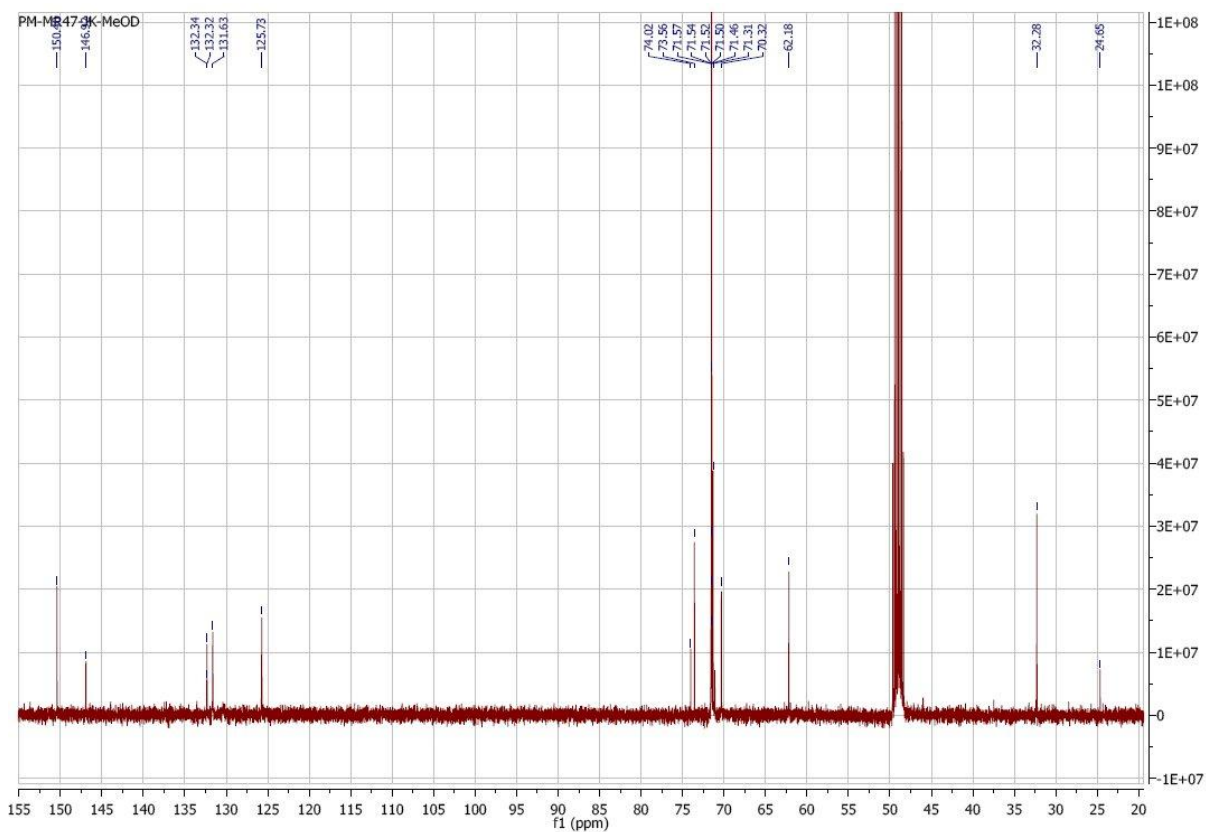


Figure 123 : NMR ^{13}C spectrum of 4-(mercapto-Hexa(ethylene glycol)thiol)-7-sulfobenzofurazan ammonium salt