
UNIVERSITE LILLE I
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
UFR DE CHIMIE

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Spécialité : Chimie Organique et Macromoléculaire

Par

Clémence QUEFFELEC

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2007

<p>SYNTHESE DE DERIVES NATURELS DE L'ACIDE CAFEIQUE, INHIBITEURS DE L'INTEGRASE DU VIH-1</p>

Directeur de thèse : Pr. Philippe COTELLE

JURY :

Président :	Dr. Francine AGBOSSOU-NIEDERCORN
Rapporteurs :	Dr. Didier DESMAELE Pr. Christian PERIGAUD
Examineurs :	Dr. Jean-François MOUSCADET Pr. Philippe COTELLE

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Université des Sciences et Technologies de Lille au sein du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (UMR CNRS 8009) dirigé par Monsieur Christian Rolando, Directeur de Recherches au CNRS. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Philippe COTELLE qui a dirigé ce travail. Sa disponibilité permanente au cours de ces trois années m'a permis de bénéficier de sa grande rigueur scientifique et de ses compétences en synthèse organique. Ses conseils avisés m'ont toujours été d'une aide précieuse et efficace et, grâce à lui, ces dernières années ont été extrêmement formatrices.

La présence de Fabrice BAILLY, Maître de conférence à l'USTL, m'a également été très profitable. Je le remercie de tout cœur d'avoir co-encadré ce travail et de m'avoir toujours apporté son aide que ce soit à la paillasse ou au cours de la rédaction de ce manuscrit.

J'exprime également mes plus respectueux remerciements à :

- Madame Francine AGBOSSOU-NIEDERCORN, Directeur de Recherches au CNRS, pour avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de cette thèse,
 - Monsieur Didier DESMAELE, Directeur de Recherches au CNRS, pour avoir accepté de faire parti du jury de cette thèse et d'en être rapporteur,
 - Monsieur Christian PERIGAUD, Professeur à l'Université de Montpellier 2, pour avoir accepté de faire parti du jury de cette thèse et d'en être rapporteur,
 - Monsieur Jean-François MOUSCADET, Directeur de Recherches au CNRS, pour avoir accepté de faire parti du jury de cette thèse et d'examiner ce travail. Je le remercie également ainsi que toute son équipe d'avoir réalisé les tests d'activité exposés dans ce travail.
-

Je tiens également à remercier Madame la Professeur Myriam Witvrouw et Monsieur le Professeur Zeger Debyser à l'Université Catholique de Leuven, ainsi que toute leur équipe d'avoir réalisé les tests d'activité exposés dans ce travail.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire avec qui j'ai passé trois années très agréables : Mélanie D., Virginie P., Cédric M., Magali L., David D., Adina R., Hervé V., Eric B., Muriel B., Stéphane L., Eric D., ainsi que Messieurs Pierre Grandclaudon, Professeur à l'ENSCL et Axel Couture, Directeur de Recherches au CNRS.

Ce travail a été principalement financé par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et aussi l'Université de Lille 1 et le CNRS. Je remercie aussi le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour la bourse de doctorat.

SOMMAIRE

A. LE VIRUS D'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE	6
1. <i>Découverte du VIH</i>	6
2. <i>Présentation générale</i>	6
3. <i>Le cycle répliatif des VIH et sa régulation</i> ^{8,9}	10
a. Le cycle répliatif du VIH-1	11
b. Cibles thérapeutiques	15
c. L'émergence de résistance	17
4. <i>Les inhibiteurs du VIH-1</i>	17
a. Les inhibiteurs d'entrée	17
b. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	19
c. Les inhibiteurs de l'intégrase	26
d. Les inhibiteurs de la transcription	27
e. Les inhibiteurs de la protéase	28
B. L'INTEGRASE DU VIH-1	31
1. <i>La structure de l'enzyme</i>	31
a. Le domaine N-terminal	32
b. Le domaine catalytique central	33
c. Le domaine C-terminal	34
2. <i>Le rôle de l'intégrase</i>	35
a. La coupure de dinucléotides	36
b. Le transfert de brins	37
3. <i>Les inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1</i>	38
a. Les α,γ -dicétoacides	38
b. Les hétérocycles de type 8-hydroxyquinoléines	43
c. Les polyphénols	47
A. LES ACIDES SALVIANOLIQUES D ET E	93
1. <i>Synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique D (26)</i>	93
2. <i>Synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique E (33)</i>	97
B. LES DERIVES DE LA SAGECOUMARINE	103
1. <i>Synthèse de l'acide 3-hydroxy-4-(6,7-dihydroxycoumarin-3-oxy)cinnamique, 41</i>	103
a. Cyclocondensation du sésamol formylé et d'un phénoxyacétamide	103
b. Cycloadditions du sésamol formylé avec le dérivé phénoxyacétique	106
c. Aldolisation intramoléculaire de l'ester	108
2. <i>Synthèse de l'acide 3-(6,7-dihydroxycoumarin-4-oxy)-4-hydroxycinnamique, 57</i>	112
a. Cyclocondensation avec le sésamol formylé	112
b. Aldolisation intramoléculaire de l'ester intermédiaire	113
C. LE TOURNEFOLAL ET LES ACIDES TOURNEFOLIQUES A ET B	114
1. <i>Synthèse du tournefolal (72) et de l'acide tournefolique A (74)</i>	116
2. <i>Synthèse de l'acide tournefolique B (79)</i>	122
D. L'ACIDE FUKIIQUE	124

E. RESULTATS BIOLOGIQUES	127
1. Les acides salvianoliques D et E	128
2. Les dérivés de sagedcoumarine	132
3. L'acide fukiique	133
A. SYNTHÈSE DES ACIDES SALVIANOLIQUES D ET E	147
1. Synthèse du 3-allyloxy-4-méthoxybenzaldéhyde, 2	147
2. Synthèse de la 2-allylisovanilline, 3	148
3. Synthèse du 2-allyl-3-hydroxyméthyl-6-méthoxyphénol, 4	149
4. Synthèse du 3-acétoxy-1-acétoxyméthyl-2-allyl-4-méthoxybenzène, 5	150
5. Synthèse de l'acide (2-acétoxy-6-acétoxyméthyl-3-méthoxy)phénylacétique, 6	151
6. Synthèse de la 5-hydroxy-6-méthoxyisochroman-3-one, 7	152
7. Synthèse de la 4-(3,4-diméthoxybenzylidène)-5-hydroxy-6-méthoxy-isochroman-3-one, 30	153
8. Synthèse du 2-(2-hydroxy-6-hydroxyméthyl-3-méthoxyphényl)-3-(3,4-diméthoxyphényl)propénoate de méthyle, 31	154
9. Synthèse du (2,3-diméthoxyphényl)méthanol, 12	155
10. Synthèse du 1-bromo-2-bromométhyl-3,4-diméthoxybenzène, 18	156
11. Synthèse du (6-bromo-2,3-diméthoxyphényl)acétonitrile, 19	157
12. Synthèse de l'acide 6-bromo-2,3-diméthoxyphénylacétique, 20	158
13. Synthèse du (6-bromo-2,3-diméthoxyphényl)acétate de méthyle, 21	159
14. Synthèse du 2-allyl-3,4-diméthoxybenzaldéhyde, 22	160
15. Synthèse du 2-allyl-3,4-diméthoxy-1-(diméthoxyméthyl)benzène, 23	161
16. Synthèse de l'acide (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétique, 24	162
17. Synthèse du (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétate de méthyle, 10	164
18. Synthèse de l'acide 3-[3,4-diméthoxy-2-(2-méthoxy-2-oxoéthyl)phényl]acrylique, 25	165
19. Synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique D, 26	166
20. Synthèse du (2,3-diméthoxy-6-diméthoxyméthylphényl)acétate de méthyle, 34	167
21. Synthèse du 3-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(6-formyl-2,3-diméthoxyphényl) acrylate de (E)-méthyle, 37	168
22. Synthèse de l'acide (E)-3-(2-((E)-1-(3,4-diméthoxyphényl)-3-méthoxy-3-oxoprop-1-èn-2-yl)-3,4-diméthoxyphényl)acrylique, 38	170
23. Synthèse de l'acide (E)-2-(6-((E)-2-carboxyvinyl)-2,3-dihydroxyphényl)-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylique (partie acide de l'acide salvianolique E)	172
B. SYNTHÈSE DES DERIVES DE LA SAGECOUMARINE	174
1. Synthèse du 2-hydroxy-4,5-(méthylènedioxy)benzaldéhyde, 43	174
2. Synthèse du N,N-diéthylbromoacétamide, 49	175
3. Synthèse du (E)-3-(4-(2-(diéthylamino)-2-oxoéthoxy)-3-méthoxyphényl)acrylate de méthyle, 44	176
4. Synthèse du 4-hydroxy-3-méthoxycinnamate de méthyle, 47	177
5. Synthèse du (E)-3-(4-carbométhoxy-4-méthoxy-phényl)-acrylate de méthyle, 50	178
6. Synthèse du (E)-3-(4-(2-(6-formylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-3-méthoxyphényl)acrylate de méthyle, 51	179
7. Synthèse du (E)-3-(3-méthoxy-4-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5,g]chromèn-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle, 42	181

8. Synthèse de l'acide (E)-3-(4-(6,7-dihydroxy-2-oxo-2H-chromén-3-yloxy)-3-hydroxyphényl)acrylique, 41.....	182
9. Synthèse du 3-hydroxy-4-méthoxycinnamate de méthyle, 52.....	184
10. Synthèse du (E)-3-(3-carbométhoxy-4-méthoxy-phényl)acrylate de méthyle, 54.....	185
11. Synthèse du (E)-3-(3-(2-(6-formylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-4-méthoxyphényl)acrylate de méthyle, 55.....	186
12. Synthèse du (E)-3-(4-méthoxy-3-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromén-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle, 56.....	188
13. Synthèse de l'acide (E)-3-(3-(6,7-dihydroxy-2-oxo-2H-chromén-3-yloxy)-4-hydroxyphényl)acrylique, 57.....	189
C. SYNTHÈSE DU TOURNEFOLAL ET DES ACIDES TOURNEFOLIQUES A ET B.....	191
1. Synthèse du 2-acétoxy-3-méthoxybenzaldéhyde, 64.....	191
2. Synthèse du 2-acétoxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde, 65.....	192
3. Synthèse du 6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde, 66.....	192
4. Synthèse du (6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphényl)méthanol, 67.....	193
5. Synthèse du 1-bromo-2-bromométhyl-3-hydroxy-4-méthoxybenzène, 68.....	194
6. Synthèse du bromure de (6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphénylméthyl)triphénylphosphonium, 69... ..	195
7. Synthèse du 4-bromo-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane, 70.....	196
8. Synthèse du 4-formyl-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane, 61.....	198
9. Synthèse du 3-[7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofuran-4-yl]acrylate d'éthyle, 73.....	200
10. Synthèse du 2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde, 75.....	202
11. Synthèse du (E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy)éthylène, 76E et du (Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy)éthylène, 76Z.....	203
12. Synthèse du (E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène, 77E et du (Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène, 77Z.....	205
13. Synthèse du (Z)-1-bromo-4,7,8-triméthoxydibenzo[b,f]oxépine, 78.....	207
D. SYNTHÈSE DE L'ACIDE FUKIIQUE.....	208
1. Synthèse de la 4-[1-(3,4-diméthoxyphényl)méthylidène]-2-méthyl-4H-oxazol-5-one, 80.....	208
2. Synthèse de l'acide 3,4-diméthoxyphénylpyruvique, 81.....	209
3. Synthèse du 3,4-diméthoxyphénylpyruvate de méthyle, 82.....	210
4. Synthèse du (3,4-diméthoxybenzyl)maléate de diméthyle et du (3,4-diméthoxybenzyl)fumarate de diméthyle, 83Z et 83E.....	211
5. Synthèse du (2S,3R) et du (2R,3S)-3-(3,4-diméthoxybenzyl)tartrate de diméthyle et du (2S,3S) et du (2R,3R)-3-(3,4-diméthoxybenzyl)tartrate de diméthyle, 84Z et 84E.....	212
6. Synthèse de l'acide fukii ou acide rac-2,3-dihydroxy-3-(3,4-dihydroxybenzyl)tartrique, 85.....	214
E. RÉSULTATS BIOLOGIQUES.....	215
1. Mode opératoire pour les tests <i>in vitro</i>	215
a. Mode opératoire du Professeur Zeger Debyser (labo ZD).....	215
b. Mode opératoire du Docteur Jean-François Mouscadet (labo JFM).....	216
2. Mode opératoire pour les tests sur cellules.....	216
a. Sur cellules MT-4.....	216
b. Sur cellules HeLa-β-gal-CD ₄ ⁺	217

Avertissement : Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, la numérotation concernant les molécules du chapitre « le VIH, l'intégrase et leurs inhibiteurs » est indépendante de celle des autres chapitres. La numérotation des citations est indépendante pour chaque chapitre.

INTRODUCTION GENERALE

Apparu il y a une vingtaine d'années (les premiers cas ont été recensés en 1980 aux Etats-Unis)^{1,2}, le SIDA s'est considérablement répandu à travers le monde et sa propagation perdure encore aujourd'hui. Les dernières estimations réalisées en 2004 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) révèlent qu'entre 36 et 44,3 millions d'individus vivent présentement avec le VIH-1 à travers le monde³. Le nombre d'infections prend de l'ampleur dans toutes les régions du globe, mais particulièrement en Asie et en Europe orientale, où ce nombre a grimpé de 50% depuis 2002. Ces tendances montrent qu'il y a encore d'importantes lacunes dans la riposte au VIH/SIDA et que des démarches pragmatiques demeurent nécessaires pour vaincre cette maladie. Ces approches passent inévitablement par la prévention et la conception d'agents antirétroviraux efficaces.

Les approches classiques utilisant un unique agent thérapeutique pour le traitement de la maladie se sont rapidement révélées insuffisantes en raison d'une rapide tolérance du virus. En effet, les enzymes de réplication du VIH ont la particularité de commettre un plus grand nombre d'erreur que les enzymes de réplication des gènes des organismes supérieurs. Cette caractéristique, associée à un taux de réplication extrêmement élevé et à une forte production virale, rend compte de la capacité du virus à s'adapter à son environnement et donc à survivre.

De ce fait, la lutte contre le virus s'est tournée vers l'association de médicaments antiviraux agissant de manière additive ou synergique pour permettre une action antivirale plus puissante et limiter les chances du virus de trouver une combinaison de mutations compatible avec sa survie. D'année en année, l'arsenal thérapeutique contre le VIH s'est considérablement enrichi avec comme cible principale la transcriptase inverse et la protéase du VIH. L'inhibition de ces deux enzymes constitue donc actuellement la base de la plupart des thérapies anti-SIDA.

Néanmoins, en vue d'améliorer ces multithérapies, des agents anti-VIH dirigés vers d'autres cibles participant au cycle de vie du VIH sont devenus nécessaires. En mars 2003, le premier médicament anti-SIDA dirigé vers une autre cible que la transcriptase inverse et la protéase a été mis sur le marché. Il s'agit du Fuzéon, un inhibiteur de fusion (empêchant l'entrée du virus dans la cellule hôte). L'intégrase, la troisième enzyme du patrimoine

génétique du virus, est aussi une cible prometteuse car cette enzyme catalyse une étape essentielle dans la réplication du virus: l'intégration du génôme viral dans l'ADN de la cellule-hôte.

De nombreuses molécules issues du règne végétal ont été identifiées comme agents anti-VIH-1 et de nombreuses revues sur ce sujet ont mis en lumière leur grande diversité structurale. Quelques polyphénols naturels, appartenant à la famille des lignanes, ont été identifiés lors de vastes screenings de plantes utilisées en médecine traditionnelle.

Les esters de l'acide caféique, tels que le CAPE, l'acide chicorique, l'acide rosmarinique ou les acides 3,5-dicafeoyl et 3,4,5-tricafeoylquiniques et les oligomères de l'acide caféique sont reconnus pour leurs propriétés anti-intégrase.

Dans le cadre de plusieurs projets soutenus par l'ANRS, notre équipe s'est intéressée à la synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'intégrase du VIH-1. Pour ma part, j'ai été chargée de la synthèse de dérivés naturels de l'acide caféique afin d'évaluer leur activité anti-intégrase.

Dans ce mémoire, j'évoquerai d'abord l'état des recherches contre le VIH-1 et plus particulièrement les connaissances actuelles sur l'intégrase et ses inhibiteurs. Les travaux effectués au laboratoire sont présentés dans une deuxième partie où seront développées les synthèses des parties acides des acides salvianoliques D, E, des dérivés de la sagecoumarine, du tournefolal, des acides tournefoliques A et B et de l'acide fukiique. Enfin, je présenterai les résultats concernant l'activité anti-intégrase de l'ensemble de ces molécules.

1- Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis* pneumonia among homosexual men- New York City and California.

Centers for Disease Control *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **1981**, *30*, 305-308.

2- *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence for a new acquired cellular immunodeficiency.

Gottlieb, M.S.; Schroff, R.; Schanker, H.M.; Weisman, J.D.; Phan, P.T.; Wolf, R.A.; Saxon, A.S. *New Engl. J. Med.* **1981**, *305*, 1425-1431.

3- Le point sur l'épidémie de SIDA. 2003, UNAIDS. <http://www.unaids.org>.

Chapitre 1 : Le VIH, ses inhibiteurs et l'intégrase

A. LE VIRUS D'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

1. Découverte du VIH

L'épidémie du SIDA est, en 2007, largement entrée dans sa troisième décennie. C'est en effet à la fin de l'année 1980 que sont rapportés les premiers cas suspects de déficiences immunitaires graves parmi les populations homosexuelles américaines.¹ Ceci mène à la fin de l'année 1981 à une première définition d'un syndrome de l'immunodéficience acquise,² qui deviendra le SIDA. A cette époque, la forte tendance du SIDA à sévir parmi les populations homosexuelles² lui vaut dans un premier temps le nom de « Gay Related Immune Deficiency » (GRID).^{3,4} Les premiers cas de déficiences immunitaires chez les consommateurs de drogues injectables sont cependant identifiés dès décembre 1981.⁵ Un peu plus d'un an après, le virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIH), responsable du SIDA, est identifié par le professeur Montagnier.

La structure de ce virus, alors appelé LAV (lymphadenopathy Associated Virus), est décrite pour la première fois en mai 1983, dans la revue Science.⁶ Ses caractéristiques sont très proches de celles du HTLV (Human T cell Lymphotropic Virus), découvert lui par le professeur Gallo en 1980.⁷ Il n'adoptera le nom de VIH qu'en 1986. Durant cette même année, l'équipe du professeur Montagnier identifie un deuxième virus, structurellement très proche du VIH-1, le VIH-2 (localisé principalement en Afrique de l'Ouest).

2. Présentation générale^{8,9}

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent causal du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) dont le nom provient de la constatation d'un effondrement de l'immunité cellulaire chez les patients infectés.

- Le VIH appartient à la famille des rétrovirus¹⁰ qui sont les seuls organismes vivants capables de fabriquer de l'ADN à partir d'ARN grâce à une enzyme qui leur est spécifique : la transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (RT) qui réalise l'étape de rétrotranscription. Or, cette enzyme ne corrige pas les mésappariements (*misincorporation*) comme l'ADN polymérase cellulaire. Par conséquent, plusieurs erreurs surviennent lors de la rétrotranscription, occasionnant un taux élevé de mutations dans l'ADN rétroviral.

Cette famille des rétrovirus,¹¹ très répandus parmi les diverses espèces animales, est divisée en trois sous-groupes selon le type d'infections qu'ils causent (cytopathique (lytique) ou non cytopathique (oncogène)) et la structure de leur génome:

- Les Oncovirus sont des virus transformants. Ce sont les rétrovirus les plus répandus et ils peuvent induire des tumeurs ou des leucémies.
- Les Spumavirus sont des virus « non pathogènes ». Identifiés chez de nombreux mammifères, dont l'homme, ces virus provoquent des infections inapparentes.
- Les Lentivirus sont des virus cytopathogènes. D'abord isolés chez l'animal, ils sont responsables de maladies à évolution lente. Le VIH-1 (forme du VIH répandue en Europe, aux Etats-Unis, en Afrique centrale et orientale et en Asie) et le VIH-2 (forme du VIH essentiellement présente en Afrique de l'Ouest) font partie de ce sous-groupe. Ces virus sont exogènes, non oncogènes et infectent principalement les cellules du système immunitaire. Un autre caractère distinctif de cette sous-famille, particulièrement pour le VIH, consiste en leur capacité d'infecter des cellules au repos et/ou en différenciation terminale. Leurs génomes contiennent l'information pour tous les gènes essentiels et accessoires nécessaires à l'expression des protéines virales dans les cellules infectées.

Antigéniquement distinct du VIH-1,¹² le VIH-2 est également moins pathogène. Cependant, ils présentent tous les deux une structure et une morphologie sensiblement identiques. Les VIH se présentent schématiquement sous la forme de particules sphériques de 90 à 120 nm de diamètre, sorte de boule hérissée de pics aux pointes arrondies. Ces particules sont entourées d'une enveloppe dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines transmembranaires (TM ou gp41) et les glycoprotéines d'enveloppe externe (SU ou gp120) (Cette dernière protéine interviendra dans l'arrimage du virus sur sa cible (les récepteurs CD4 des lymphocytes T4 par exemple)).

L'intérieur de la particule virale est tapissé de molécules correspondant aux protéines de la matrice (MA ou p17), cette matrice étant elle-même recouverte d'une membrane constituée de 2 couches lipidiques. Cette matrice contient également la protéase virale (PR).

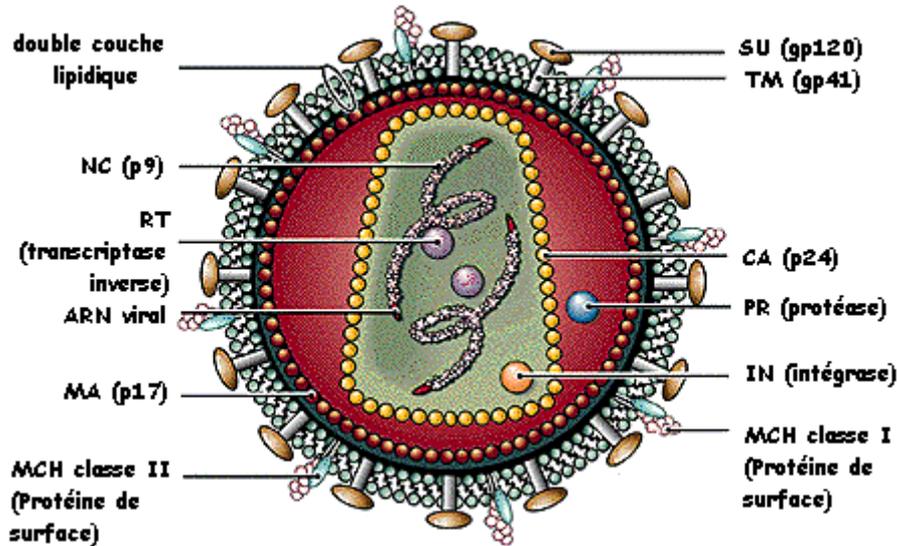


Figure 1- Structure du VIH-1¹³

Au centre de la sphère, la capsid virale est constituée de protéines (CA p24). A l'intérieur du petit cône sont présents deux chaînes d'ARN et deux des trois enzymes nécessaires à la reproduction du virus (la transcriptase inverse ou RT et l'intégrase ou IN).

Chaque molécule d'ARN viral est flanquée à chaque extrémité d'une région répétitive R (Long Terminal Repeat LTR) et de régions appelées U5 et U3. Elle est constituée d'environ 10000 nucléotides dont une majeure partie correspond aux trois gènes rétroviraux classiques appelés *gag*, *pol* et *env*.¹⁴ C'est à partir de ces trois gènes que sont respectivement synthétisées les protéines internes du virus (MA ou p17, CA ou p24, NC ou p7 et NC ou p9), les trois enzymes virales (PR, RT et IN) et les glycoprotéines (SU ou gp120 et TM ou gp41).

Le gène *gag* code pour des protéines de structure. Le précurseur Gag (Pr55), produit après la traduction de l'ARNm, se clive en quatre protéines : la matrice (p17), la capsid (p24), la nucléocapsid (p7) et le polypeptide (p6). Le gène *pol* contient l'information génétique pour la synthèse des enzymes responsables de la transcription inverse de l'ARN en ADN, l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte et la maturation des virus. Le clivage du précurseur Pol permet la formation de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la protéase. La glycoprotéine gp120 et la protéine transmembranaire gp41 sont toutes les deux issues du clivage du précurseur Env (gp160) lequel provient de la traduction du gène portant le même nom.

Une des particularités du VIH-1 consiste à posséder plusieurs autres gènes. Ces gènes codent pour des protéines qui interviennent dans la réplication du virus. Parmi ces protéines se trouvent *tat* et *rev* qui permettent respectivement d'augmenter la transcription des gènes et l'expression des protéines virales. D'autres protéines participent également à différentes étapes du cycle viral dont *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*.¹⁵ Le tableau ci-dessous résume les fonctions de chacune des protéines virales dans le cycle réplcatif du VIH-1.

Tableau 1

Gènes	Protéines et fonctions
<i>gag</i> (Group Specific Antigen)	Protéines de structure
<i>pol</i> (polymérase)	Transcriptase inverse, protéase, intégrase
<i>env</i> (enveloppe)	gp120 :attachement/gp41 : fusion
<i>tat</i> (Transactivator)	Régulateur positif de la transcription
<i>rev</i> (Regulator of Viral Expression)	Export des transcrits non épissés hors du noyau
<i>vif</i> (Viral Infectivity)	Empêche la désamination de l'ADN viral
<i>vpr</i> (Viral Protein R)	Transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire
<i>vpu</i> (Viral Protein U)	Réduit l'expression du CD4
<i>nef</i> (Negative Regulation Factor)	Augmente l'infectivité et réduit l'expression CD4

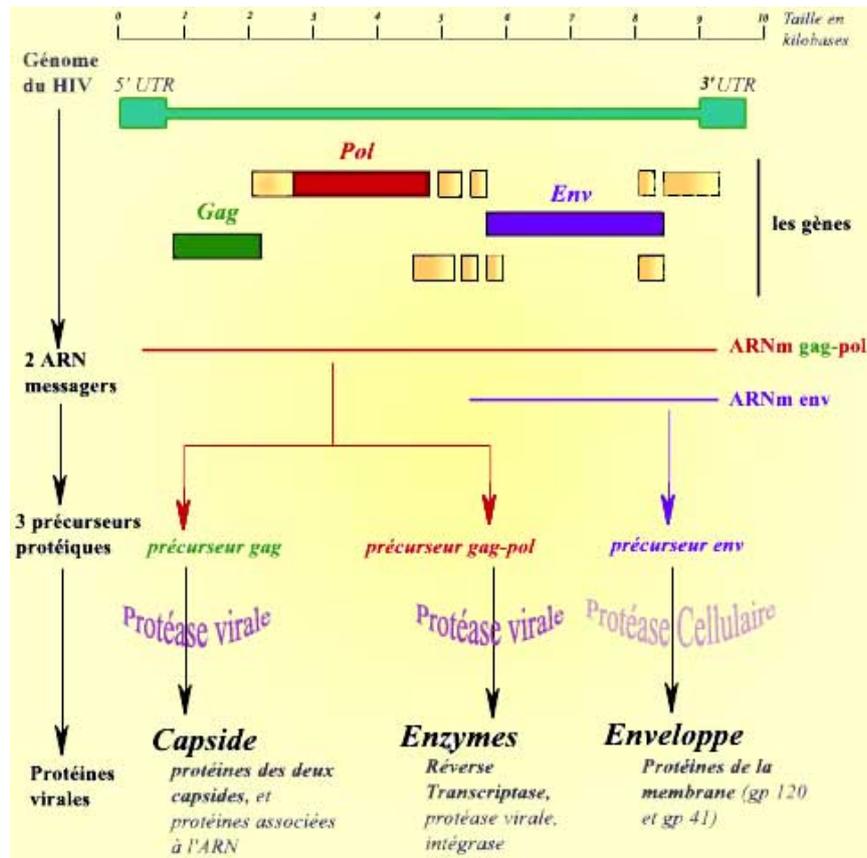


Figure 2- Organisation du génome du VIH-1¹⁶

3. Le cycle répliatif des VIH et sa régulation^{8,9}

L'intrusion du VIH-1 chez l'hôte entraîne inévitablement une bataille entre le virus et les cellules du système immunitaire. Sa capacité à s'établir et à déjouer les défenses du système immunitaire résulte d'une stratégie efficace de sa part où les protéines cellulaires participent activement. Le virus s'ajuste à la cellule hôte et adapte son cycle viral selon le type cellulaire ciblé.

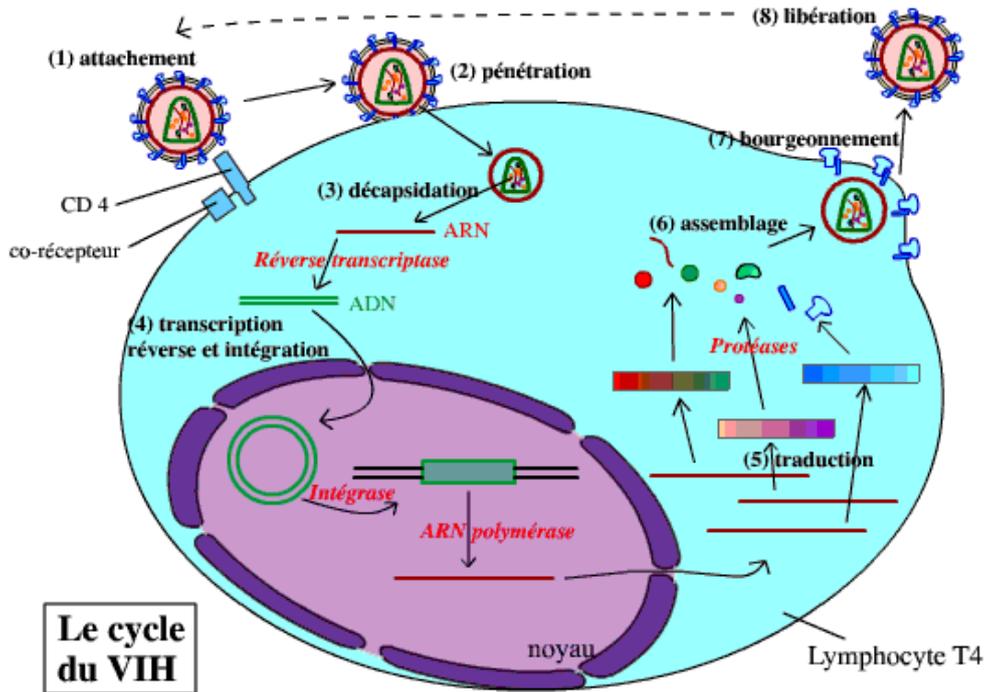


Figure 3- Cycle de réplication du VIH-1¹⁷

a. Le cycle réplcatif du VIH-1

Le cycle de reproduction des VIH comporte des événements précoces qui aboutissent à l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte et des événements plus tardifs dont résulte la formation de nouveaux virions. Le cycle réplcatif du VIH-1 ne diffère pas des autres rétrovirus et les principales étapes s'y déroulent selon les mêmes principes de base.

◆ Événements précoces du cycle réplcatif

Les événements précoces comportent trois étapes majeures : la reconnaissance et l'entrée du virus dans la cellule hôte, la rétrotranscription du génome viral et son intégration dans le génome de la cellule.

▪ **Reconnaissance et entrée du virus :**

L'entrée du virus dans la cellule s'effectue grâce à une reconnaissance spécifique et forte entre la glycoprotéine externe du VIH, la SU ou gp120 et son récepteur de haute affinité, la molécule CD4.¹⁸ Cette dernière caractérise les lymphocytes T-auxiliaires (lymphocytes Th ou CD4⁺) mais est également présente sur les macrophages, les cellules dendritiques des ganglions, de la rate et de l'épiderme ainsi que sur les cellules microgliales du cerveau (macrophages résidents du système nerveux central). L'interaction entre la molécule CD4 et la gp120 induit un changement conformationnel de cette dernière permettant la reconnaissance de régions particulières de cette protéine (boucle V3) par d'autres protéines de surface cellulaire appelées co-récepteurs (CCR5 sur les macrophages ou CXCR4 sur les lymphocytes Th). Il se forme un complexe trimérique CD4-gp120-co-récepteurs indispensable pour permettre à la glycoprotéine gp41 d'exercer son activité fusionnante. Il y a entrée du VIH dans le cytoplasme de la cellule hôte où la capsid se désagrège et libère le génome.

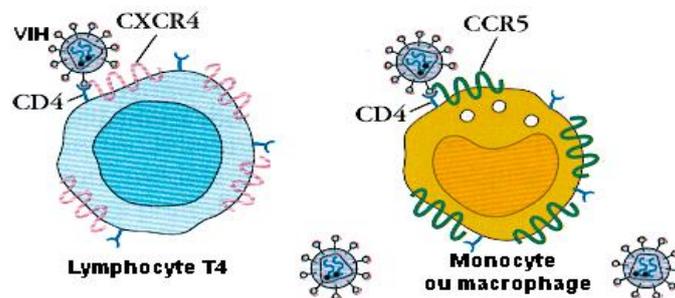


Figure 4- Co-récepteurs¹⁹

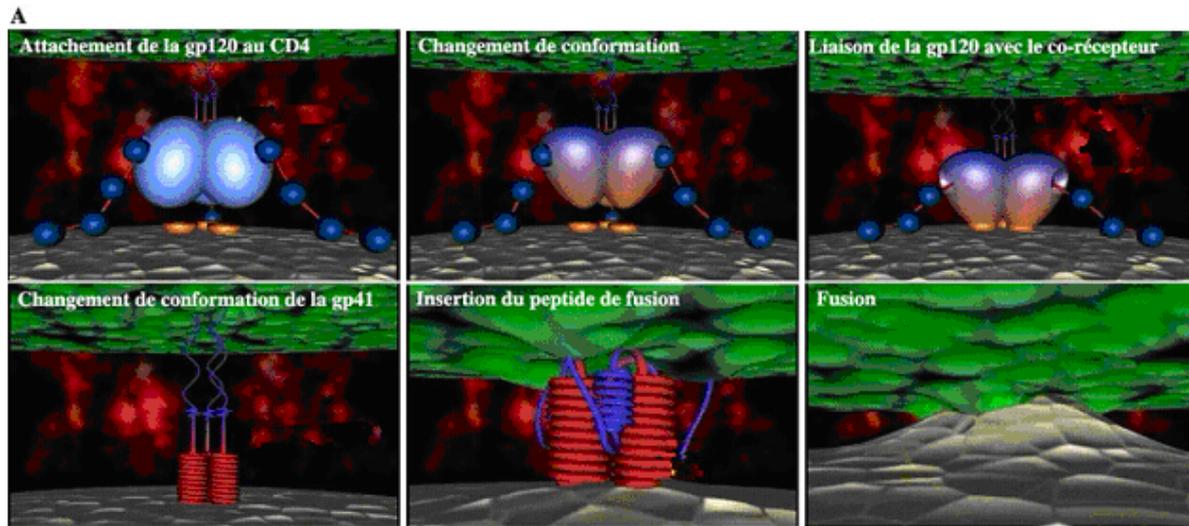


Figure 5- Fusion²⁰

▪ **Rétrotranscription et intégration :**

Lorsque l'enveloppe virale fusionne avec la membrane plasmique ou vésiculaire, la capside se retrouve dans le cytoplasme. Par un mécanisme encore nébuleux, la structure de la capside se déstabilise et son contenu se libère dans l'environnement intracellulaire. Cette étape est suivie d'une étape importante effectuée par la transcriptase inverse (RT). L'enzyme copie l'ARN en ADN simple brin, hydrolyse le brin d'ARN et copie l'ADN simple brin pour former un ADN bicaténaire. Au cours de cette étape au mécanisme très complexe, deux régions identiques (U3 et U5) sont formées à chaque extrémité du génome viral. C'est au niveau de ces régions appelées Long Terminal Repeat (LTR) que ce dernier, sous forme d'ADN, s'intègre dans le génome de la cellule infectée. Cette intégration nécessite le transport de l'ADN sous forme d'un complexe nucléoprotéique dans le noyau de la cellule et le clivage de l'ADN viral au niveau des LTR et de l'ADN cellulaire. L'ensemble de ce processus est réalisé par une deuxième enzyme : l'intégrase virale.

◆ **Étapes tardives du cycle réplcatif**

Les étapes ultérieures à cette intégration constituent les étapes tardives du cycle réplcatif.

▪ **Les étapes transcriptionnelles :**

La transcription de l'ADN proviral est réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire. La synthèse de l'ARN viral est déclenchée à partir d'une extrémité (LTR 5') qui sert de promoteur et se termine à l'autre extrémité (LTR 3'). Cette synthèse est initiée lors de l'interaction de facteurs cellulaires avec le promoteur (LTR 5') qui contrôlent ainsi la multiplication du virus dans la cellule hôte.

La présence de ces facteurs cellulaires dans le noyau de la cellule infectée dépend souvent de l'état d'activation cellulaire qui est elle-même stimulée par des signaux transmis au niveau de la membrane de la cellule. Ces signaux sont produits lors de l'interaction de la cellule infectée avec d'autres cellules de son environnement ou encore lors de l'interaction de facteurs solubles (lymphokines ou cytokines) présents dans cet environnement avec la membrane de la cellule infectée.

La régulation de l'expression des gènes dépend de la coopération de facteurs cellulaires mais également de l'activité des protéines régulatrices virales. Au début de l'expression du provirus, les gènes de régulation seuls sont exprimés. Puis les protéines régulatrices et des facteurs cellulaires orientent l'activité de l'ARN polymérase vers la transcription des gènes codant les protéines de structure et les enzymes, au détriment des protéines de régulation.

La protéine de régulation *tat* du VIH-1 joue un rôle important dans la synthèse de l'ARN viral en interagissant avec le complexe constitué par le promoteur (LTR 5') et les facteurs cellulaires qui y sont déjà fixés. C'est un activateur puissant de la transcription et ce processus aboutit donc à la fabrication d'une quantité importante d'ARN viral dans le noyau de la cellule infectée. Le transport de cet ARN dans le cytoplasme est, quant à lui, sous le contrôle d'une deuxième protéine de régulation du VIH-1 : la protéine *rev*.

▪ **Les étapes post-transcriptionnelles :**

Les ARN messagers viraux (ARNm) sont alors traduits en protéines virales dans le cytoplasme grâce à la machinerie cellulaire. Les ARNm donnent naissance, selon leur taille, soit aux protéines de régulation du VIH soit aux protéines constitutives des VIH issues des gènes *gag*, *pol* et *env*. Ces dernières sont synthétisées sous forme de protéines de fusion (polyprotéines) qui sont clivées soit par la troisième enzyme virale (la protéase) pour les polyprotéines *gag* et *pol*, soit par des protéases cellulaires pour la polyprotéine *env*.

Ces dernières étapes sont suivies d'un assemblage des protéines virales et de deux molécules d'ARN viral à proximité de la membrane cellulaire. Celle-ci se met alors à bourgeonner pour libérer dans la circulation sanguine de nouveaux petits virus.

b. Cibles thérapeutiques

La connaissance approfondie du cycle de réplication du VIH permet de mettre en évidence diverses étapes, chacune offrant la possibilité de combattre l'action du virus à l'aide d'un agent thérapeutique.

Les principales cibles thérapeutiques sont :

- L'inhibition de l'entrée du virus dans la cellule
- L'inhibition de la transcriptase inverse
- L'inhibition de l'intégrase
- L'inhibition de la transcription
- L'inhibition de la protéase

Initialement, le traitement, appelé la monothérapie, était constitué d'une seule classe d'inhibiteurs. Mais l'émergence rapide de résistance du virus a rendu ce traitement inopérant. Par conséquent, la multithérapie, appelé HAART (highly active antiretroviral treatment), est maintenant le traitement classique. Ce traitement consiste en la combinaison d'un inhibiteur de protéase ou d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse en association avec deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse. En 2003, un médicament appartenant à une nouvelle classe d'anti-SIDA, les inhibiteurs de fusion, a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration),²¹ ce qui permet d'augmenter le nombre de combinaisons médicamenteuses et ainsi de mieux adapter la thérapie au patient.

Tableau 2- Médicaments antiSIDA approuvés par la FDA^{22,23}

Année d'approbation	Nom	Nom générique	Industrie
◆ Inhibiteurs de fusion			
2003	Fuzeon	Enfuvirtide (T-20)	Roche Pharmaceuticals & Trimeris
Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse			
1987	Retrovir	Zidovudine (AZT)	GlaxoSmithKline
1991	Videx	Didanosine (ddI)	Bristol-Myers Squibb
1992	Hivid	Zalcitabine (ddC)	Roche Pharmaceuticals
1994	Zerit	Stavudine (d4T)	Bristol-Myers Squibb
1995	Epivir	Lamivudine (3TC)	GlaxoSmithKline
1998	Ziagen	Abacavir	GlaxoSmithKline
2000	Videx EC	Didanosine (ddI)	Bristol-Myers Squibb
2003	Emtriva	Emtricitabine (FTC)	Gilead Sciences
Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse			
2001	Viread	Tenofovir disoproxil	Gilead Sciences
Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse			
1996	Viramune	Nevirapine	Boehringer Ingelheim
1997	Rescriptor	Delavirdine (DLV)	Pfizer
1998	Sustiva	Efavirenz	Bristol-Myers Squibb
Inhibiteurs de la protéase			
1996	Norvir	Ritonavir	Abbott Laboratories
1996	Crixivan	Indinavir (IDV)	Merck
1997	Viracept	Nelfinavir	Pfizer
1997	Fortovase	Saquinavir Mesylate	Roche Pharmaceuticals
1999	Agenerase	Amprenavir	GlaxoSmithKline
2000	Kaletra	Lopinavir + Ritonavir	Abbott Laboratories
2003	Reyataz	Atazanavir	Bristol-Myers Squibb
2003	Lexiva	Fosamprenavir	GlaxoSmithKline
2005	Aptivus	Tipranavir	Boehringer Ingelheim
2006	Prezista	Darunavir	Tibotec
Médicaments contenant plusieurs principes actifs			
1997	Combivir	Lamivudine + Zidovudine	GlaxoSmithKline
2000	Trizivir	Abacavir + Lamivudine + Zidovudine	GlaxoSmithKline
2004	Epzicom	Abacavir + Lamivudine	GlaxoSmithKline
2004	Truvada	Emtricitabine + Tenofovir	Gilead Sciences
2006	Atripla	Efavirenz + Emtricitabine + Tenofovir DF	Bristol-Myers Squibb + Gilead Sciences

c. L'émergence de résistance

Les enzymes de réplication du VIH ont la particularité de commettre un nombre d'erreurs relativement important en comparaison aux enzymes de réplication des gènes. La transcriptase inverse ne « relit » aucune des copies qu'elle exécute et commet en moyenne une erreur sur 10000 nucléotides qu'elle assemble. Le génome du VIH comprenant environ 10000 nucléotides, il existe en moyenne une différence entre deux virus frères. Cette particularité, associée à un taux de réplication extrêmement rapide (un virus moyennement rapide peut produire près de 10000 virus fils par jour, c'est-à-dire être à l'origine de mille milliards de virus en quatre jours), rend compte de la capacité du virus à s'adapter à son environnement. La sélection ne conserve que les mutations favorables, les défavorables ne permettant pas au mutant de se reproduire. Il y a donc sélection de variants antigéniques lui permettant d'échapper progressivement à la réponse immune ou de mutants résistants lui permettant d'échapper plus rapidement à l'action des antiviraux. L'émergence de souches mutantes étant directement liée à la capacité de réplication du virus, on comprend bien pourquoi une activité virale extrêmement puissante est nécessaire pour empêcher la production de mutants résistants. C'est pourquoi l'association de médicaments antiviraux peut permettre une action antivirale plus puissante et minimiser les chances du virus de trouver une combinaison de mutation compatible avec sa survie. Devant l'impossibilité actuelle d'éradiquer le virus, il convient de continuer à compléter les traitements actuels en bloquant le virus lors d'un maximum d'étapes clés de son cycle répliatif.

4. Les inhibiteurs du VIH-1

a. Les inhibiteurs d'entrée

Un seul des médicaments de cette large classe de cibles potentielles a obtenu l'approbation de la FDA : l'enfuvirtide (ENF) ou T-20, commercialisé sous le nom de Fuzeon®. ENF est un peptide synthétique de 36 résidus qui contient une séquence dérivée de la région C34 de la gp41.^{24,25} Ce médicament représente une réelle innovation en matière de traitement contre le SIDA car il est le premier inhibiteur de fusion à avoir vu le jour, créant ainsi une nouvelle classe d'inhibiteurs dans la lutte contre cette maladie. Bien que puissant, ENF n'est utilisé qu'en thérapie de secours à cause d'une production coûteuse et d'une utilisation lourde, le patient devant subir deux injections sous-cutanées par jour de ce produit.

De plus, des résistances spécifiques au T-20 par mutation au niveau de la gp41 ont été mises en évidence à la fois *in vitro*²⁶ et *in vivo* en monothérapie.²⁷

Plusieurs molécules sont à un stade d'essais cliniques plus ou moins avancé. Certains inhibiteurs spécifiques du CCR5 ont démontré une puissante activité antivirale comme le maraviroc **1**, le SCH-D ou SCH350634 **2**²⁸ ou encore le peptide T **3** (octapeptide reproduisant le fragment 185-192 de la gp120 riche en thréonine). De même, le PRO-140, un inhibiteur monoclonal est en essai clinique de phase I. L'AMD070 de structure proche de l'AMD3100 **4**, est un inhibiteur spécifique du co-récepteur CXCR4 et est en phase clinique II.²³ Le TNX-355 est un anticorps monoclonal qui se lie à un épitope du domaine 2 du récepteur CD4 à la surface de la cellule, il est un essai clinique de phase II.

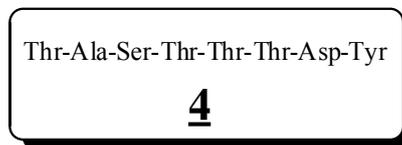
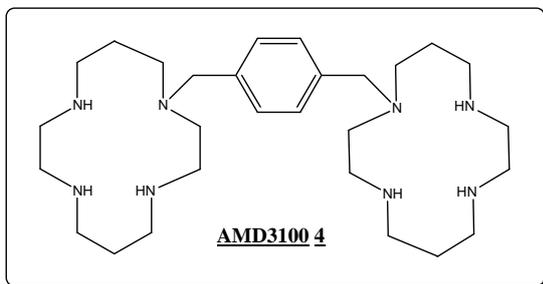
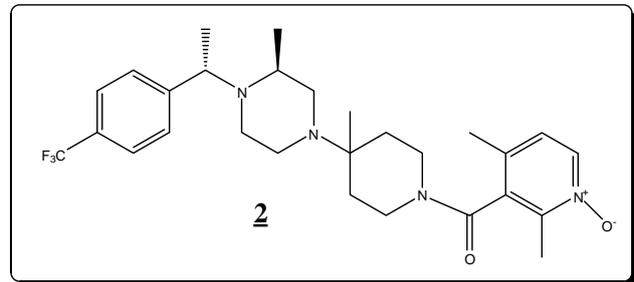
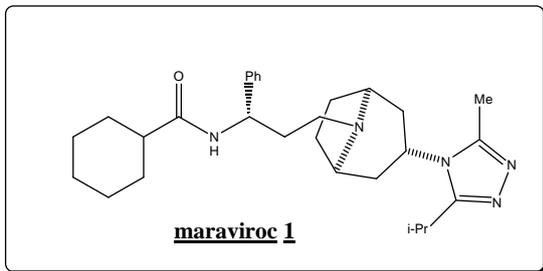


Tableau 3 : Inhibiteur d'entrée en essai clinique

Nom	Cible	Essai clinique
maraviroc	CCR5	Phase II/III
SCH-D	CCR5	Phase II
Peptide T	CCR5	Phase II
PRO-140	CCR5	Phase I
AMD070	CXCR4	Phase II
TNX-355	CD4	Phase II

b. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

La transcriptase inverse est l'enzyme virale responsable de la transformation de l'ARN viral mono brin en ADN viral double brin. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse peuvent être classés en deux catégories : les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques (NRTI / NtRTI) et les inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTI).

◆ Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la RT

▪ NRTIs :

Les composés de cette classe d'inhibiteurs représentent la première famille d'antirétroviraux à avoir été mise sur le marché pour traiter le HIV. Ces composés sont des analogues nucléosidiques avec un mécanisme d'action relativement simple : métabolisés en dérivés 5'-triphosphates dans le cytoplasme de la cellule, ils deviennent ligands compétitifs de la RT qui les incorpore à l'ADN natif. L'absence de groupement 3'-OH, essentiel à la formation de la liaison 3'-5' phosphodiester avec le nucléotide suivant lors de l'élongation de la chaîne d'ADN viral induit une terminaison de chaîne précoce.²⁹

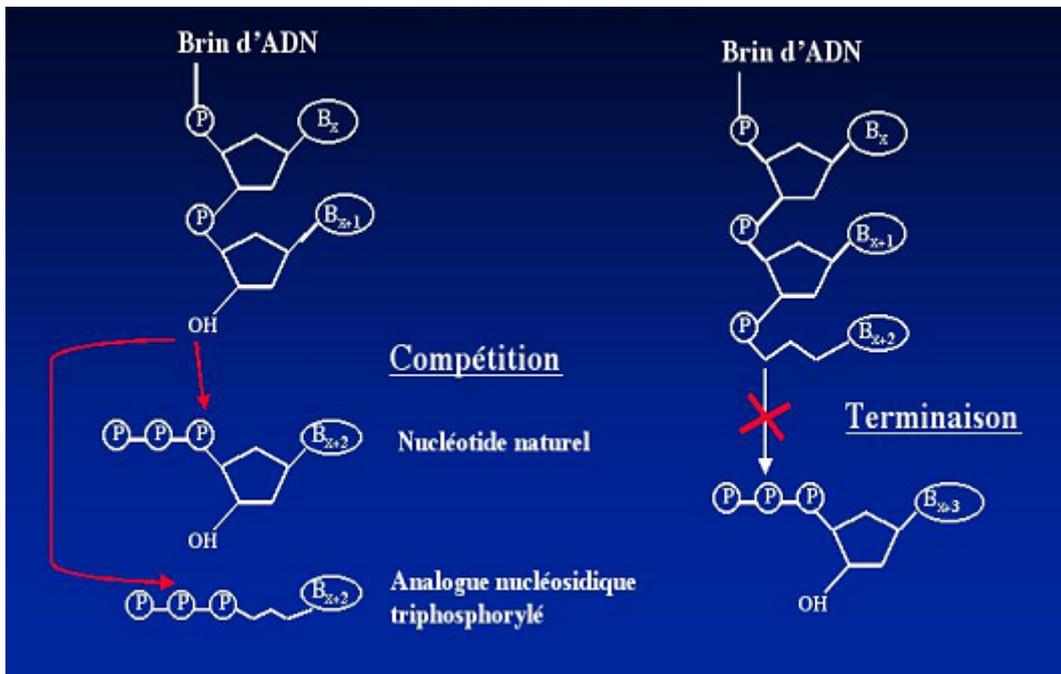
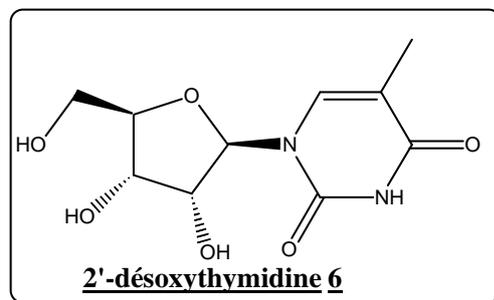
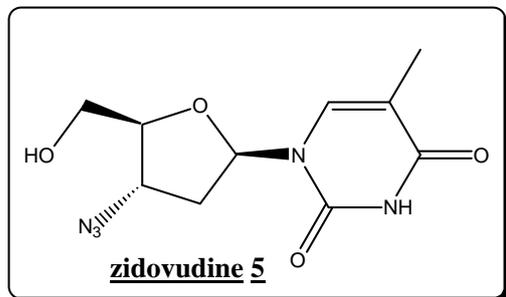


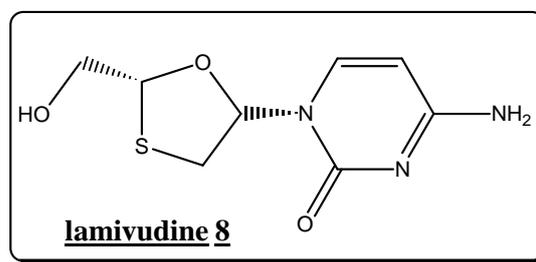
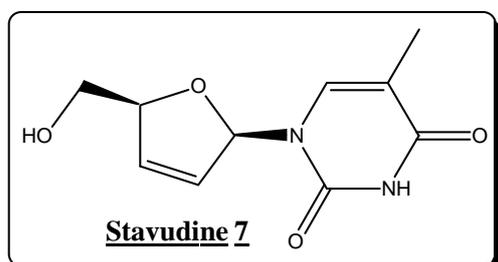
Figure 6- Mécanisme d'action des NRTIs³⁰

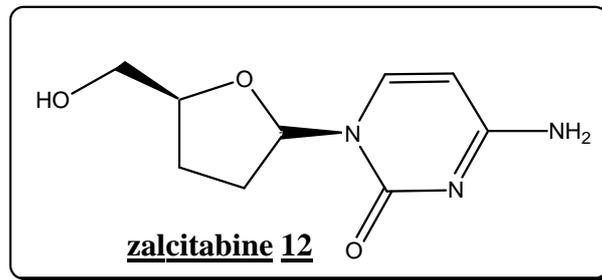
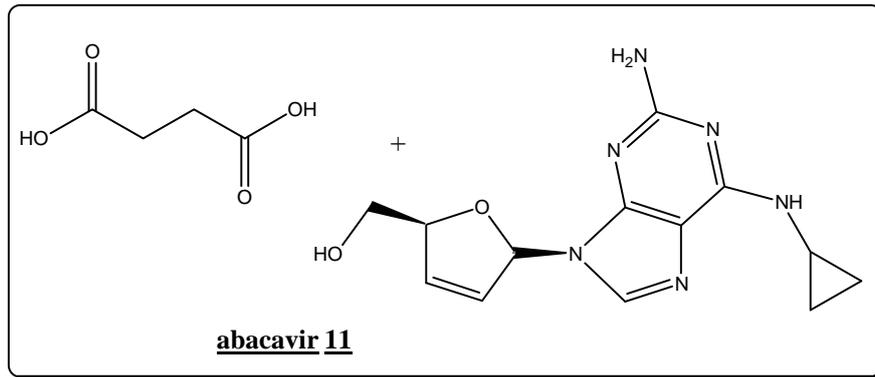
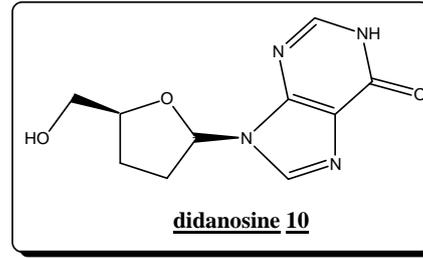
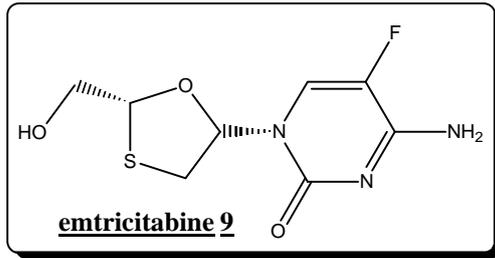
A l'heure actuelle, il existe sept molécules anti-SIDA qui sont des NRTIs. La première molécule efficace utilisée dans la lutte contre le SIDA³¹ est la zidovudine **5** (3'-azido-3'-désoxythymidine ou AZT), molécule connue depuis 1964,³² analogue de la 2'-désoxythymidine **6**.



Comme la thymidine, l'AZT est phosphorylé par la thymidine kinase cellulaire et transformé en nucléoside triphosphate (réaction de triple phosphorylation) dans la cellule infectée. Cette étape de triple phosphorylation varie selon les cellules et dépend de la phase du cycle cellulaire, par exemple les monocytes et les macrophages en phase de repos mitotique ne peuvent pas suffisamment phosphoryler ces analogues nucléosidiques même s'ils ont une grande affinité enzymatique. Cette étape est indispensable et nécessite un certain degré d'activité cellulaire. L'AZT triphosphate entre en compétition avec la thymidine triphosphate pour agir sur le site actif de la transcriptase inverse et bloque l'élongation de la chaîne d'ADN viral. En effet, cette molécule (AZT triphosphate) est utilisée préférentiellement par la transcriptase inverse et très peu par les polymérases cellulaires. Il s'agit donc d'un inhibiteur compétitif relativement spécifique de la transcriptase inverse. L'infection de la cellule par le virus est bloquée, cependant l'activité des cellules de l'organisme est préservée. De ce fait, l'AZT empêche l'infection de nouvelles cellules mais n'a aucun effet sur les virus déjà intégrés.

Les autres NRTIs ont un fonctionnement similaire. Il s'agit de la Stavudine **7** (2',3'-didéhydro-3'-désoxythymidine ou d4T),³³ la lamivudine **8** (2'-déoxy-3'-thiacytidine ou 3TC),^{34,35} l'emtricitabine **9** (2',3'-didéoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine ou (-)-FTC),^{36,37} la didanosine (ddI)³⁸ **10**, l'abacavir **11**³⁹ et la zalcitabine (2',3'-dideoxycytidine ddC) **12**.





Malheureusement, ces composés agissent également dans les processus naturels de multiplication cellulaire. Leur toxicité, en particulier envers les mitochondries, a été mise en évidence chez l'adulte et l'enfant et l'apparition de résistances est inévitable. Pour retarder celle-ci, ces médicaments sont utilisés en bithérapie ou multithérapie, c'est-à-dire associés à d'autres médicaments agissant de manières différentes.

Le grand défi dans la conception de nouveaux NRTIs n'est pas de trouver de nouveaux composés qui inhibent le HIV mais plutôt l'identification de médicaments qui limitent la toxicité et plus important encore qui n'ont pas de résistances croisées avec les autres médicaments. Quatre molécules sont en phase clinique. Il s'agit de l'elvucitabine **13** qui présente une activité contre les HIV mutants résistants à la lamivudine et à l'AZT,⁴⁰ de l'apricitabine **14**, le racivir (racémique de l'emtricitabine **9**) et le KP-1461 **15**.⁴¹

L'énantiomère de l'emtricitabine est environ 10 à 20 fois moins actif que l'emtricitabine mais il est sélectif de différentes mutations du VIH-1 dans les lymphocytes.

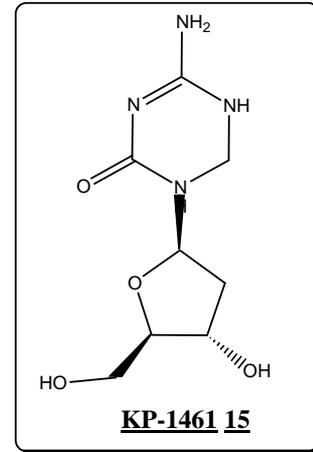
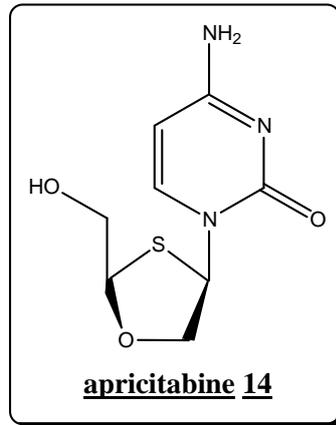
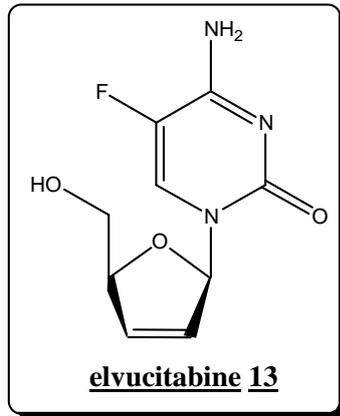


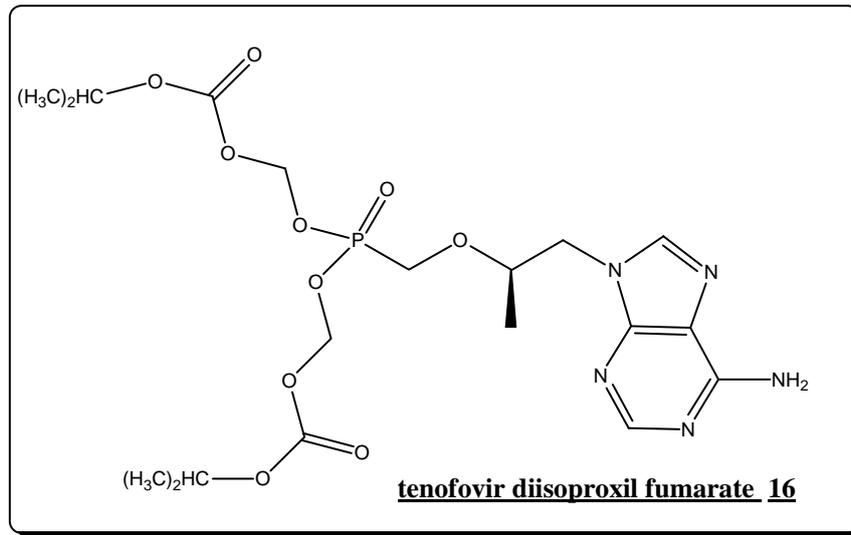
Tableau 4 : NRTi en essai clinique

Nom	Cible	Essai clinique
Elvucibine	RT	Phase II/III
Apricitabine	RT	Phase IIb
Racivir	RT	Phase I/II
KP-1461	RT	Phase Ib

▪ **NtRTIs :**

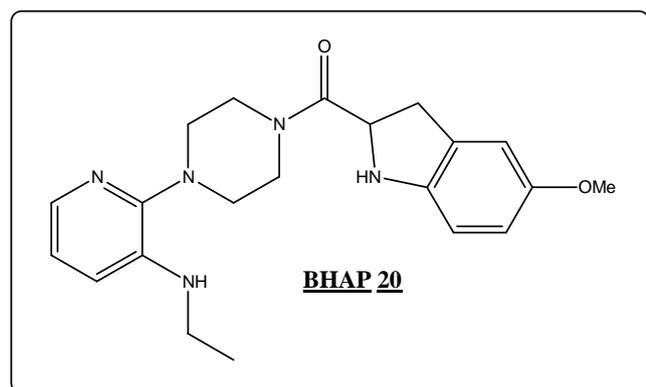
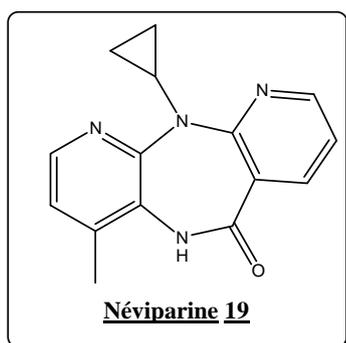
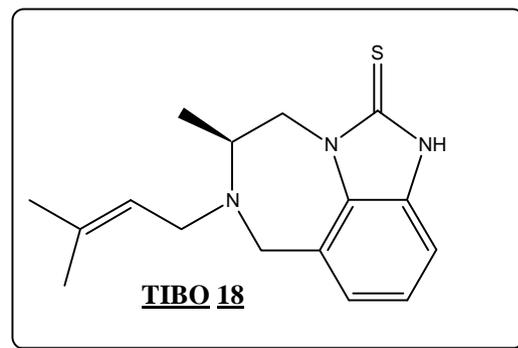
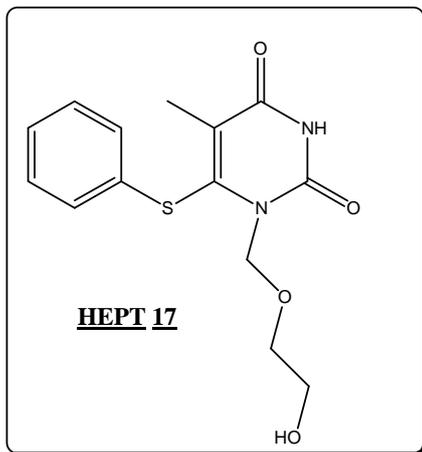
Les NtRTIs sont semblables aux NRTIs dans leur mécanisme d'action mais ils contiennent déjà un groupement sous forme de phosphonate ce qui diminue le nombre d'étapes d'activation intracellulaire nécessaires pour les rendre actifs. A la place des trois étapes de phosphorylation obligatoire, ces composés ne subissent que deux étapes de phosphorylation pour être convertis en métabolites actifs.

Un seul médicament, un prodrug, tenofovir diisoproxil fumarate **16**,^{42,43} commercialisé sous le nom de Viread®, a été accepté par la FDA et est devenu important dans le traitement par les antirétroviraux, en particulier en combinaison avec un NRTi (emtricitabine) et un NNRTi (efavirenz) donnant lieu à la commercialisation de Truvada® (tenofovirDF et emtricitabine) par Gilead et d'Atripla® (tenofovirDF, emtricitabine et efavirenz) par Merck et Gilead.

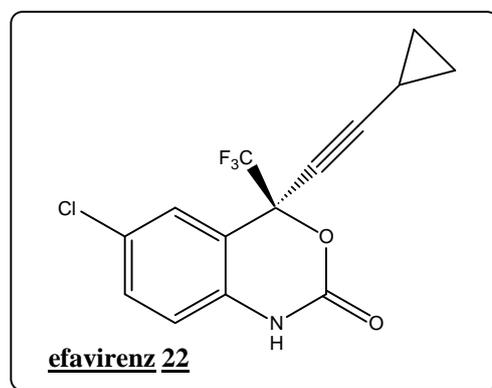
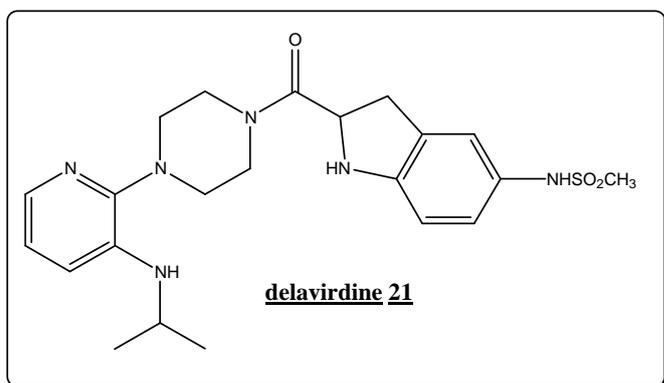


◆ **Inhibiteurs non nucléosidiques et non nucléotidiques de la RT (NNRTIs)**

Le terme « inhibiteurs non nucléosidiques de la RT » regroupe une large gamme de composés dont le premier représentant, le HEPT **17**, est identifié en 1989.⁴⁴ Cette découverte est rapidement suivie par celle des dérivés des benzodiazépines (TIBO **18**,⁴⁵ Néviparine **19**⁴⁶), des bis-hétéroaryl-pipérazines (BHAP **20**⁴⁷), des isoindolinones.^{48,49} A l'heure actuelle, plus d'une trentaine de familles chimiques sont reconnues pour leurs propriétés de NNRTIs.⁵⁰



Plusieurs molécules aux propriétés antivirales attractives ont fait l'objet d'études cliniques. En 1997, la névirapine,⁴⁶ commercialisée sous le nom de Viramune®, devient le premier NNRTI inclus dans les thérapies anti-VIH. Deux autres, la delavirdine **21**,⁵¹ commercialisée sous le nom de Rescriptor®, est le moins utilisé des médicaments de cette classe et l'efavirenz **22**,⁵² connu sous le nom de Sustiva®.



Le point commun de ces trois NNRTIs est qu'ils engendrent une hypersensibilité mais surtout des résistances liées à des mutations sur la transcriptase inverse. Afin de prévenir l'apparition de ces résistances, les NNRTIs doivent donc être utilisés dès le début de l'infection en concentrations suffisamment importantes et en combinaison avec des NRTIs et/ou des PIs.⁵⁰

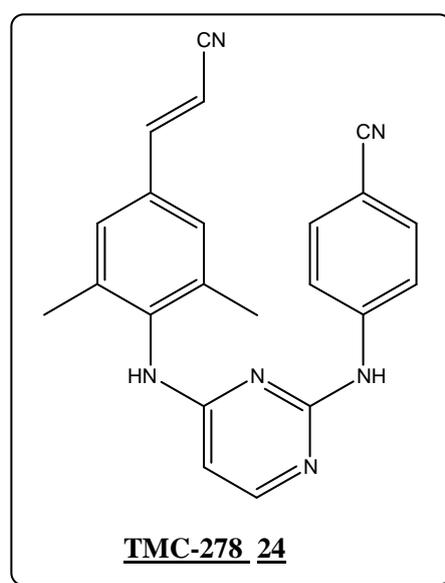
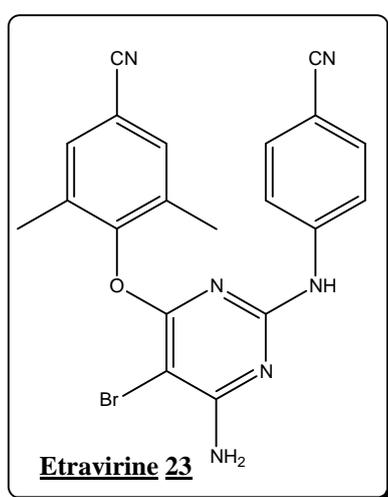
Alors que les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques agissent directement au niveau du site catalytique, les NNRTIs agissent au niveau d'un même site allostérique, localisé à environ 10 Å du site catalytique. Les NNRTIs partagent également le même mode d'action : leur liaison au site allostérique cause un changement de conformation de plusieurs résidus de la transcriptase inverse, parmi lesquels Tyr 181 et Tyr 188. La déformation qui en résulte se répercute sur le site actif, ce qui inhibe l'activité de l'ADN polymérase de l'enzyme.

Parce qu'ils exploitent un même site de liaison, les NNRTIs possèdent plusieurs caractéristiques biochimiques et pharmacologiques communes. L'une des plus importante est leur action sélective sur la transcriptase inverse du VIH-1. En effet, le site de liaison des NNRTIs est caractéristique de la transcriptase inverse du VIH-1 et n'existe ni sur la RT du VIH-2, ni sur les RT d'autres rétrovirus.

Une des conséquences principales de la grande spécificité des NNRTIs est que ces composés sont en général mieux tolérés que les NRTIs.⁵³ Cette faible toxicité constitue

d'ailleurs un de leurs principaux atouts sur le plan thérapeutique. Certains effets secondaires leur sont cependant associés, tels que des éruptions cutanées, de légers troubles gastro-intestinaux ou, dans le cas de l'Efavirenz, de faibles effets sur le système nerveux central (vertiges, insomnie, euphorie...) qui s'atténuent après quelques semaines.

Deux molécules sont en essais cliniques, Etravirine (TMC-125) **23**,^{54,55} et TMC-278 **24** en phase III et IIb respectivement. Elles font partie d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de la RT appelée NcRTi (pour nucleotide-competing RT inhibitors). Elles se lient au site actif de la fonction polymérase de la RT et ainsi entrent en compétition avec les nucléotides naturels.



◆ Inhibiteurs de Ribonucléase H :

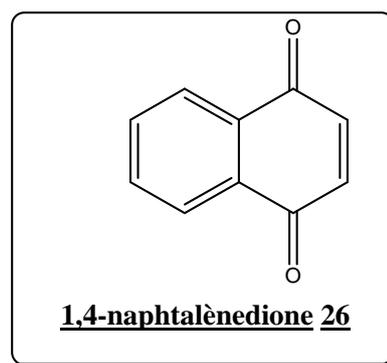
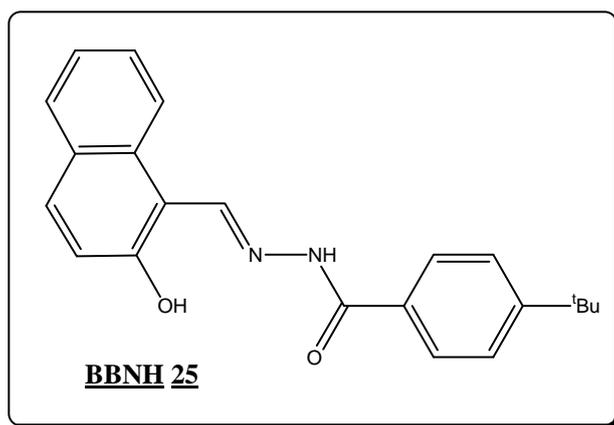
La transcriptase inverse est un dimère composé de deux polypeptides : p66 (66 kDa) et p51 (51 kDa). C'est une enzyme fondamentale des rétrovirus et son action permet la rétrotranscription du génome viral, constitué d'ARN simple brin, en un ADN double brin. Pour ce faire, elle est composée d'un domaine ADN polymérase et d'un domaine ribonucléase H (Rnase H). Le domaine ADN polymérase, sur lequel agissent les NRTIs, les NtRTIs et les NNRTIs, n'est pas le seul impliqué dans les mécanismes de création d'un ADN viral double brin. En effet, après la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN viral grâce au domaine ADN polymérase, le brin d'ARN doit être éliminé pour permettre la formation d'un ADN viral bicaténaire. Cette étape primordiale est effectuée par le domaine ribonucléase H de l'enzyme ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle.⁵⁶ Cette étape requiert la présence d'ions

métalliques divalents⁵⁷ dont le rôle dans le mécanisme de clivage de l'ARN n'a pas encore été déterminé mais dont les sites de liaisons avec l'enzyme constituent des cibles potentielles. Il semble d'ailleurs que l'inhibition de la Rnase H du VIH-1 peut se produire par des mécanismes directs (liaison au domaine Rnase H de la RT) ou indirects (modulation allostérique de l'activité).

Parallèlement aux nombreux inhibiteurs du domaine ADN polymérase de la RT qui ont été développés, quelques inhibiteurs du domaine Rnase H de l'enzyme ont également été identifiés, tels que l'illimaquinone,⁵⁸ l'ortho-phénantroline⁵⁹ ou l'AZT monophosphate.⁶⁰

Le site catalytique Rnase H est cependant situé dans une large cavité destinée à accueillir de longues chaînes d'acides nucléiques et n'offre que peu d'opportunités pour la liaison d'une molécule de faible poids moléculaire. Ceci explique pourquoi l'activité de la plupart des composés identifiés est trop faible pour être exploitée ($CI_{50} > 50 \mu M$).

Une famille de N-acyl hydrazones dotée de propriétés plus attractives a néanmoins été découverte en 1997.⁶¹ La BBNH **25**, la N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphtaldéhyde hydrazone, qui constitue le chef de file de cette série, inhibe la réplication du virus avec une EC_{50} de 1,5 μM . Cette molécule peut se lier indépendamment sur les deux sites et possède donc une activité similaire sur les deux domaines. C'est aussi le cas pour la 1,4-naphtalènedione **26**⁶² qui démontre même une activité supérieure sur Rnase H.



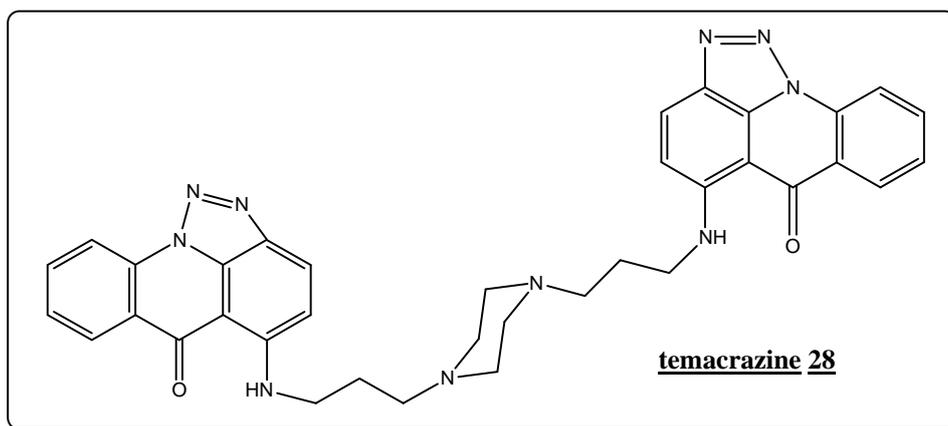
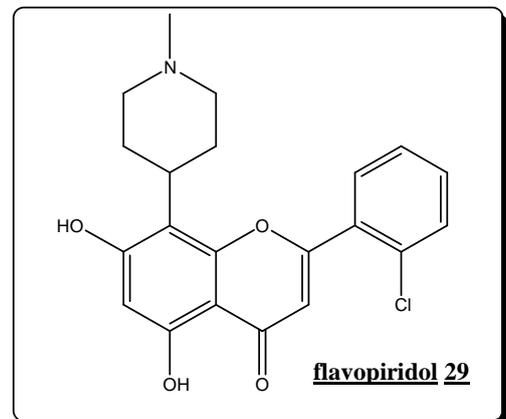
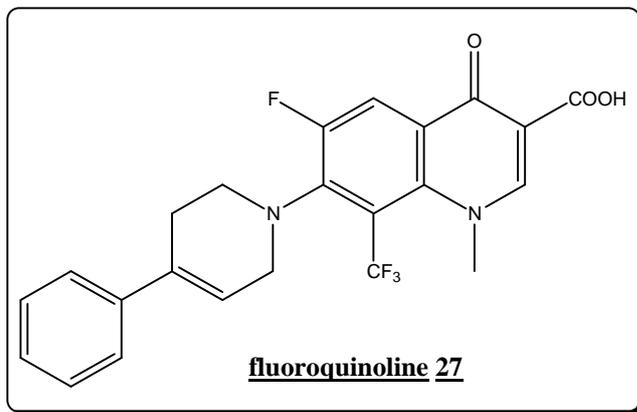
c. Les inhibiteurs de l'intégrase

Cette partie sera développée en détail dans le chapitre suivant.

d. Les inhibiteurs de la transcription

L'expression des gènes du VIH peut être inhibée par des composés interagissant avec des facteurs cellulaires qui se lient à la séquence LTR du génome viral et qui sont nécessaires à un niveau de transcription tels que NF- κ B,⁶³ un des facteurs cellulaires les plus importants. Une action plus spécifique peut cependant être espérée de la part des molécules bloquant la transactivation de la transcription par *tat*. Cette protéine remplissant une multitude de fonctions, elle représente une cible attractive pour une intervention thérapeutique.

Plusieurs composés inhibent la réplication du VIH en interférant avec la transcription des gènes. Ainsi, l'effet de la fluoroquinoline **27** est lié à l'inhibition de *tat*^{64,65} et d'autres transactivateurs.⁶⁶ La temacrazine **28**, une bis-triazoloacridone, bloque pour sa part la transcription des gènes viraux sans influencer celle des gènes cellulaires⁶⁷ mais engendre des résistances associées à des mutations au niveau de certaines positions des LTR. Le flavopiridol **29**, un inhibiteur de Cdk (*Cyclin dépendant kinase*) et de la protéine kinase P-TEFb, est étudié pour ses propriétés antiprolifératives dans le cadre de la lutte contre le cancer.⁶⁸ *Tat* formant un complexe avec P-TEFb, le flavopiridol inhibe la réplication du VIH. Enfin, plusieurs analogues peptidiques mimant certains domaines de *tat* sont également en mesure de bloquer la transactivation de la transcription.⁶⁹



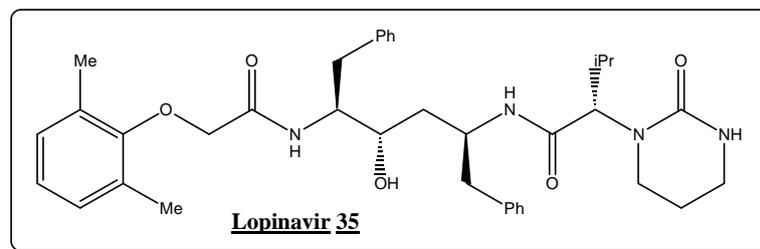
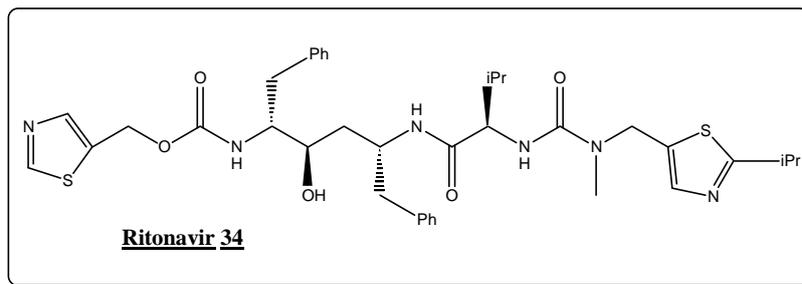
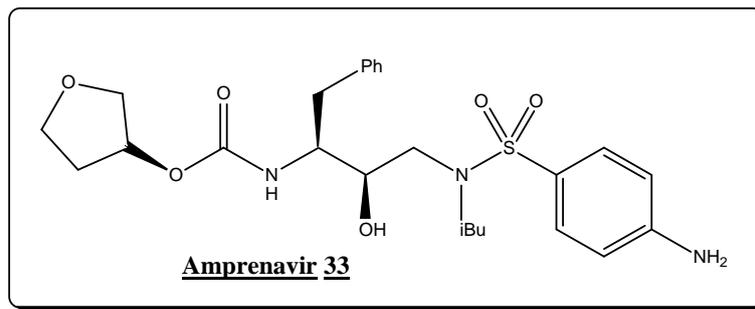
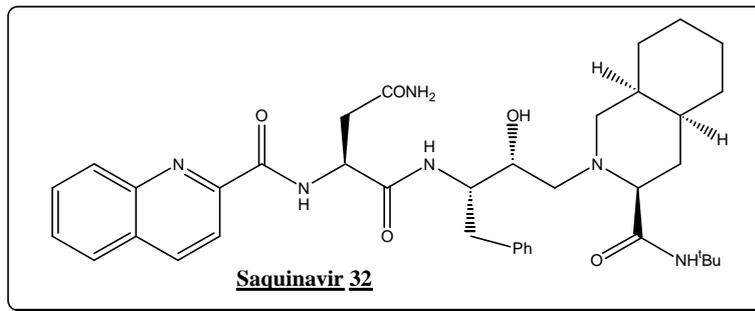
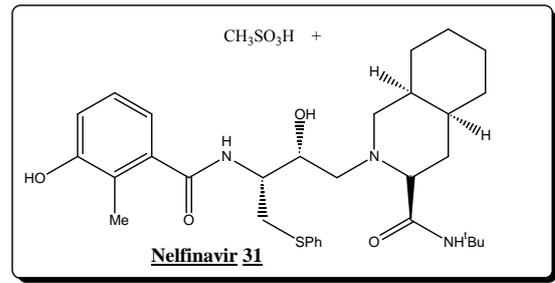
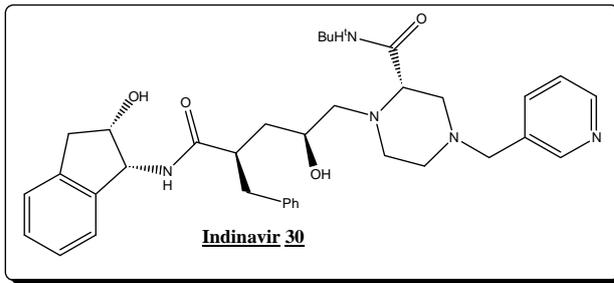
e. Les inhibiteurs de la protéase

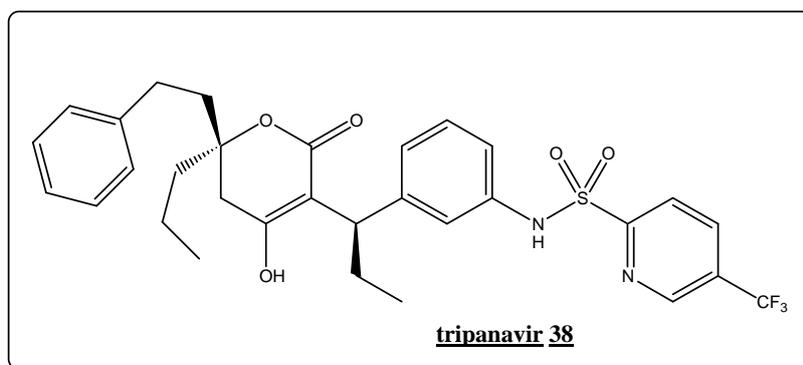
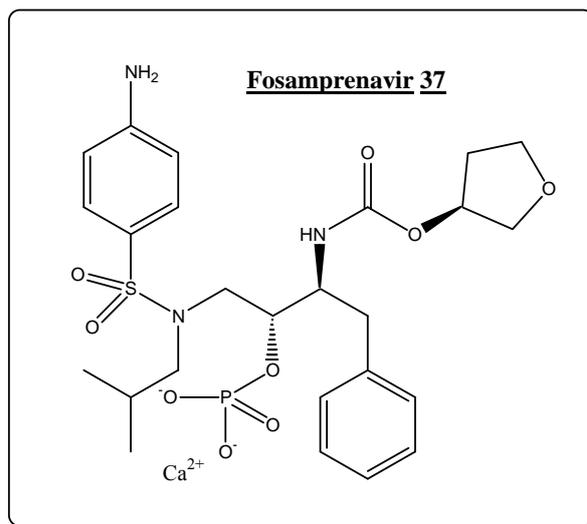
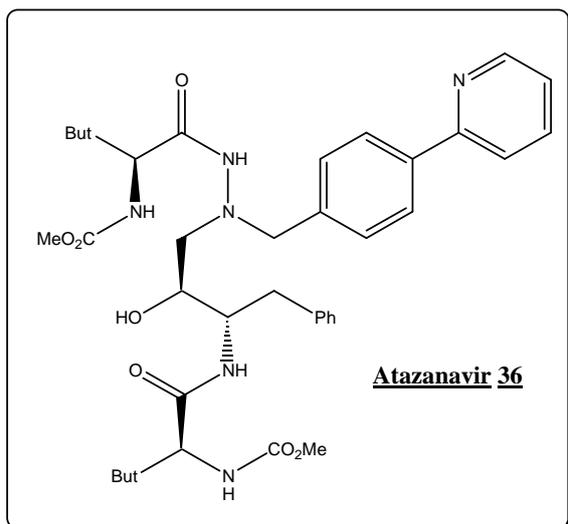
La protéase est la troisième enzyme spécifique du VIH à intervenir dans son cycle de réplication. Son rôle est de cliver spécifiquement les polyprotéines *gag* et *gag-pol* afin d'obtenir les protéines structurales et les protéines fonctionnelles du virus ce qui permet la création de nouveaux virions. Son implication dans la maturation et la production de nouveaux virions rend son action indispensable à l'infection de nouvelles cellules et elle constitue donc une cible thérapeutique très intéressante.⁷⁰

La protéase virale est une aspartyl protéase qui exerce son activité sous forme de dimère comportant un axe de symétrie C_2 .^{71,72,73,74,75} Ses deux monomères sont deux polypeptides de 99 acides aminés qui présentent des conformations identiques. Le site actif se situe entre ces deux sous-unités. Il est cerné par deux feuillets β flexibles et par la triade Asp-Thr-Gly (caractéristiques des protéases aspartiques) de chacun des deux monomères. Les résidus aspartiques de cette triade sont essentiels pour le bon fonctionnement de la protéase.

Les inhibiteurs de la protéase virale bloquent le clivage des précurseurs *gag* et *gag-pol* en protéines structurales et fonctionnelles. De ce fait, ils empêchent la maturation des particules virales, ce qui supprime leur caractère infectieux. Un grand nombre d'inhibiteurs de protéase, y compris les composés qui font actuellement l'objet d'applications cliniques, agissent en tant que molécules peptidomimétiques, dans lesquelles un lien hydroxyéthylène inerte remplace la liaison peptidique normalement clivée par la protéase.⁷⁶ L'ajout des inhibiteurs de protéase à la gamme des traitements antirétroviraux est à l'origine de progrès importants dans la prise en charge des patients infectés par le VIH. La grande majorité des traitements HAART incluent à présent ces molécules.

Les inhibiteurs de protéase approuvés par la FDA sont au nombre de dix. L'Indinavir **30** (Crixivan®),⁷⁷ le Nelfinavir **31** (Viracept®),^{78,79} le Saquinavir **32** (Invirase® et Fortovase®),^{80,81} l'Amprénavir **33** (Agenerase®),⁸² le Ritonavir **34** (Norvir®),⁸³ le Lopinavir **35** (utilisé en association avec le ritonavir sous l'appellation Kaletra®),⁸⁴ l'Atazanavir **36** (Reyataz®),^{85,86} le Fosamprenavir **37** (Telzir® et aux Etats-Unis d'Amérique du nord Lexiva®), le Darunavir (Prezista®) et le tripanavir **38** (Aptivus®).^{87,88}





Plusieurs problèmes sont cependant associés à ces composés. Les effets secondaires engendrés par les inhibiteurs de protéase vont des troubles gastro-intestinaux (fréquents) aux cas d'hyperlipidémie ou d'hyperglycémie (plus rares) ou de lipodystrophie (changement de la répartition des masses grasses dans le corps du patient).⁸⁹

Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de ces molécules sont également un problème complexe. D'une part, les composés peptidomimétiques sont souvent caractérisés par une faible biodisponibilité car ils sont rapidement métabolisés. Ainsi, la biodisponibilité du Saquinavir n'est que de 12% et son temps de demi-vie plasmique n'excède pas une à deux heures. D'autre part, la plupart des inhibiteurs de protéases interagissent avec les cytochromes p450 et tendent à inhiber certaines enzymes de cette famille. La prise régulière de ces composés tend donc à influencer le métabolisme des autres médicaments absorbés. Ceci permet l'utilisation d'une combinaison de médicaments judicieusement choisie de manière à augmenter les concentrations plasmiques d'un inhibiteur (effet booster du Ritonavir).

Enfin, comme pour la plupart des médicaments antirétroviraux destinés à combattre le VIH-1, l'efficacité à long terme des inhibiteurs de protéase peut être compromise par l'apparition de souches mutantes du virus.

B. L'INTEGRASE DU VIH-1

1. La structure de l'enzyme

L'intégrase du VIH-1, codée par le gène *pol* du VIH, est une enzyme de 32 kDa qui comporte 288 acides aminés et se compose de trois domaines distincts :

- un domaine N-terminal : composé des résidus 1 à 50, il possède un motif Histidine-Histidine-Cystéine-Cystéine (HHCC) liant un cation zinc,⁹⁰
- un domaine catalytique central : composé des résidus 50 à 212, il possède une triade d'acides aminés D64, D116 et E152 (DD35E) caractéristiques de toutes les protéines d'intégrase.⁹¹ Il est responsable de l'activité catalytique de l'enzyme⁹² ainsi que des contacts spécifiques avec l'ADN,
- un domaine C-terminal : composé des résidus 212 à 288, il est connu comme liant fortement mais non spécifiquement l'ADN.⁹³

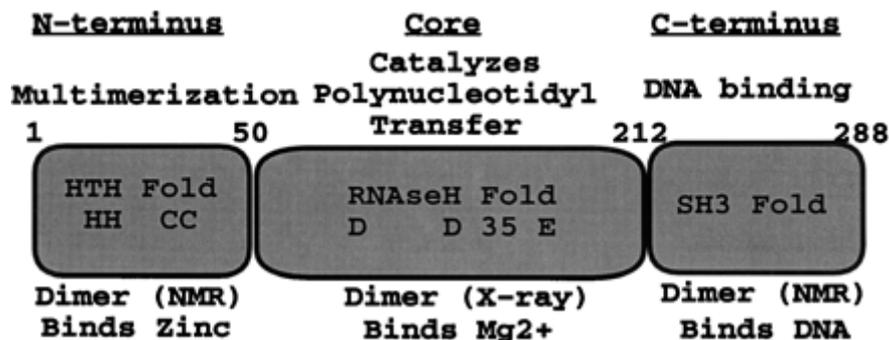


Figure 7- Représentation schématique des trois domaines de l'intégrase du VIH-1⁹⁴

Les structures de tous les domaines de l'intégrase du VIH-1 ont été établies par spectrométrie RMN et par cristallographie soit individuellement soit par paires^{95,96} mais la structure tridimensionnelle complète de l'intégrase comprenant les trois domaines n'a pas encore été établie.

Il a cependant été montré que des intégrases purifiées de certaines variétés de rétrovirus peuvent être présentes sous forme dimérique, tétramérique ou oligomérique et que

l'intégrase du VIH-1 est présente en équilibre entre la forme dimérique et tétramérique en solution.^{97,98,99}

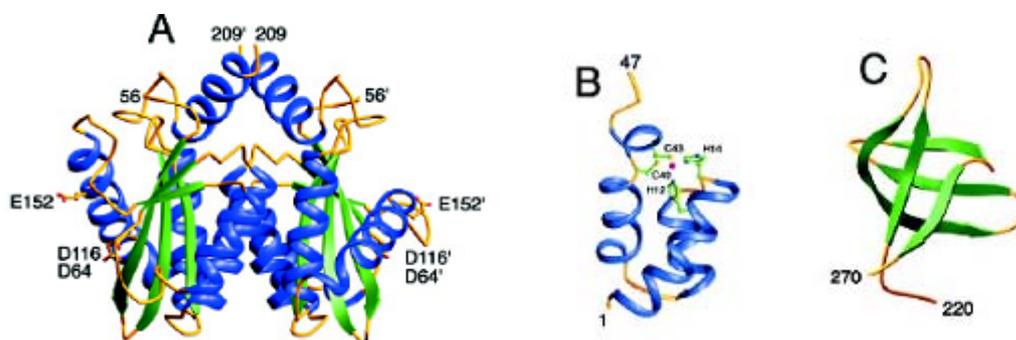


Figure 8- Structure des trois domaines de l'intégrase du VIH-1¹⁰⁰

a. Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal, constitué des résidus 1 à 50 de l'intégrase, est caractérisé par la présence de deux résidus Histidine et de deux résidus Cystéine qui constituent un motif HHCC, motif classique de la liaison du zinc.¹⁰¹ La structure de ce domaine a été résolue par RMN.¹⁰² En solution, celui-ci adopte une structure dimérique avec une interface entre les deux monomères composée majoritairement de résidus hydrophobes. Chaque unité est composée de quatre hélices α organisées autour d'un cation Zn^{2+} coordonné par le motif HHCC. Le domaine N-terminal isolé lie donc un équivalent de zinc, ce qui stabilise l'état de repliement du domaine et est nécessaire à une activité optimale de l'enzyme.^{101,103} De plus, cette liaison du zinc paraît jouer un rôle important au niveau de la multimérisation de l'intégrase du VIH-1 par formation d'interactions protéine-protéine.^{101,104}

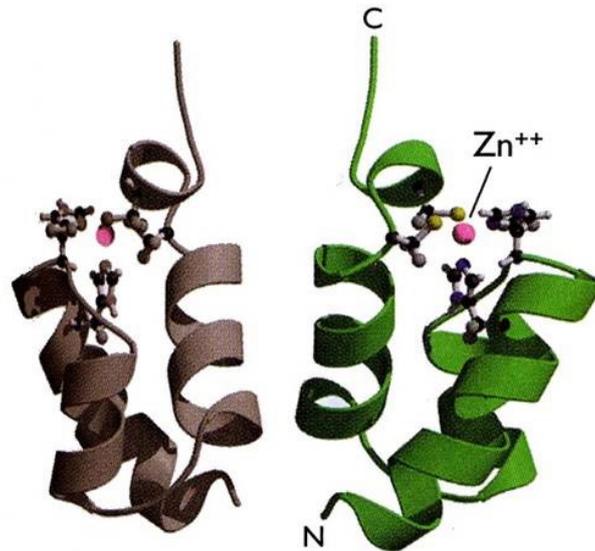


Figure 9- Structure du domaine N-terminal de l'intégrase du VIH-1¹⁰⁵

b. Le domaine catalytique central

Le domaine catalytique central, constitué des résidus 50 à 212, est caractérisé par la présence de résidus de type acide (deux résidus aspartiques, D64 et D116, et un résidu glutamique, E152). Ces résidus, très conservés parmi les intégrases rétrovirales, constituent une triade impliquée dans la coordination de cations divalents, l'ensemble étant indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme.⁹² L'analogie catalytique et structurale de l'intégrase avec d'autres protéines de la famille des polynucléotides transférase Mg^{2+} -dépendantes¹⁰⁶ suggère fortement que le cation impliqué dans l'activité naturelle de l'enzyme est Mg^{2+} .

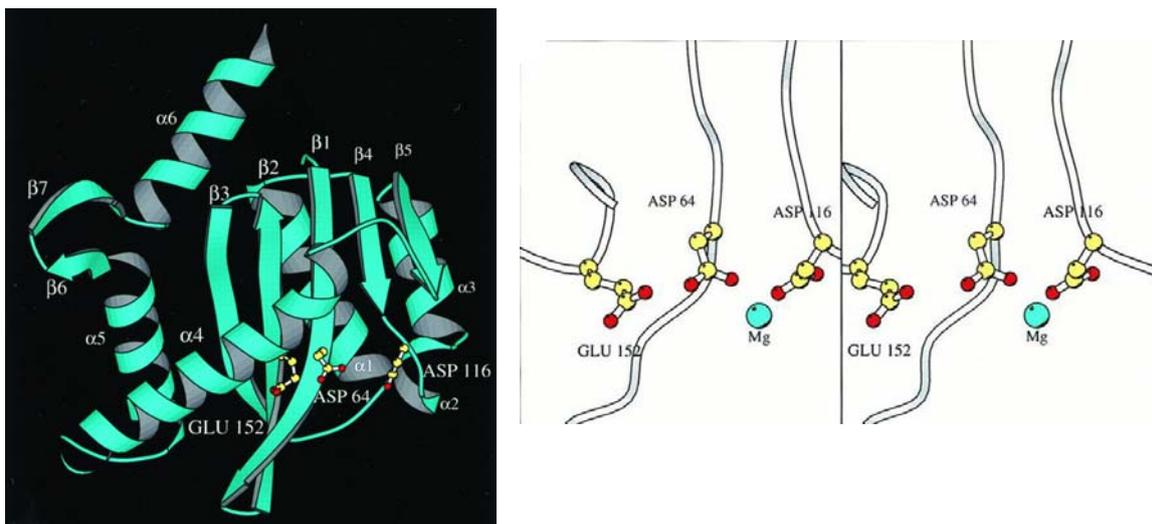


Figure 10- Structure tridimensionnelle du domaine catalytique central et de la triade DDE en présence de magnésium¹⁰⁷

Plusieurs équipes ont rapporté des structures cristallisées,^{108,109} résolues par rayon X, du domaine central seul ou en présence d'un cation métallique divalent. Celui-ci cristallise sous forme d'un dimère d'allure sphérique, chaque monomère constituant un hémisphère. Chaque monomère comprend un feuillet β central de cinq enchaînements antiparallèles (β 1- β 5), six hélices α (α 1- α 6) ainsi qu'un court feuillet β constitué de deux enchaînements antiparallèles (β 6- β 7) et situé entre les hélices α 5 et α 6.¹⁰⁷ Dans la structure résolue en présence de Mg^{2+} ,¹⁰⁷ le cation est coordiné par D64 et D116 tandis que le troisième résidu de la triade E152 ne participe pas à la liaison du métal. Deux molécules d'eau réalisent une coordination octaédrique du Mg^{2+} avec les atomes d'oxygène de D64 et D116. Face à ce site catalytique clé, on trouve une petite boucle flexible constituée des résidus 140 à 149 qui est sans doute impliquée dans des mouvements essentiels au cours du cycle catalytique.

c. Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal est constitué des résidus 212 à 288. La structure de cette partie isolée de l'enzyme a été résolue par RMN.^{110,111} Elle se présente en solution sous forme dimérique, chaque sous-unité étant composée d'un tonneau β de cinq enchaînements antiparallèles. La dimérisation crée un sillon en forme de selle, limité par la boucle entre les feuillets β 1 et β 2, qui contient plusieurs résidus chargés positivement (comme la Lys-264) et qui est de forme et de taille propres à accommoder l'ADN double brin. Il a été par ailleurs suggéré que la dimérisation de ce domaine était importante pour une multimérisation correcte de l'intégrase du VIH-1.⁹³

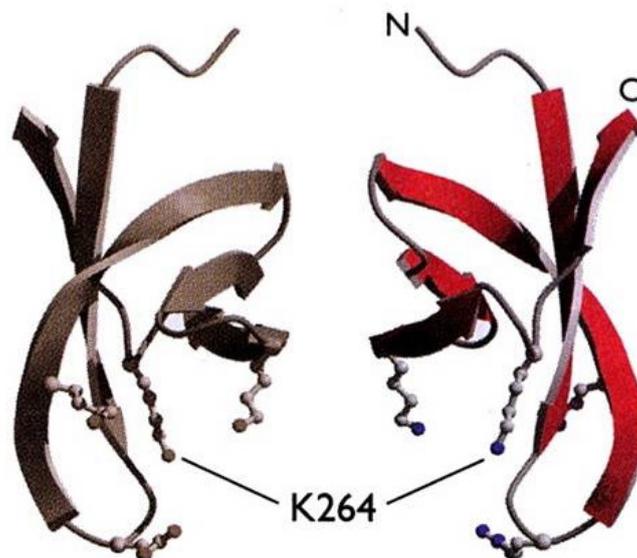


Figure 11- Structure du domaine C-terminal de l'intégrase du VIH-1¹⁰⁵

2. Le rôle de l'intégrase

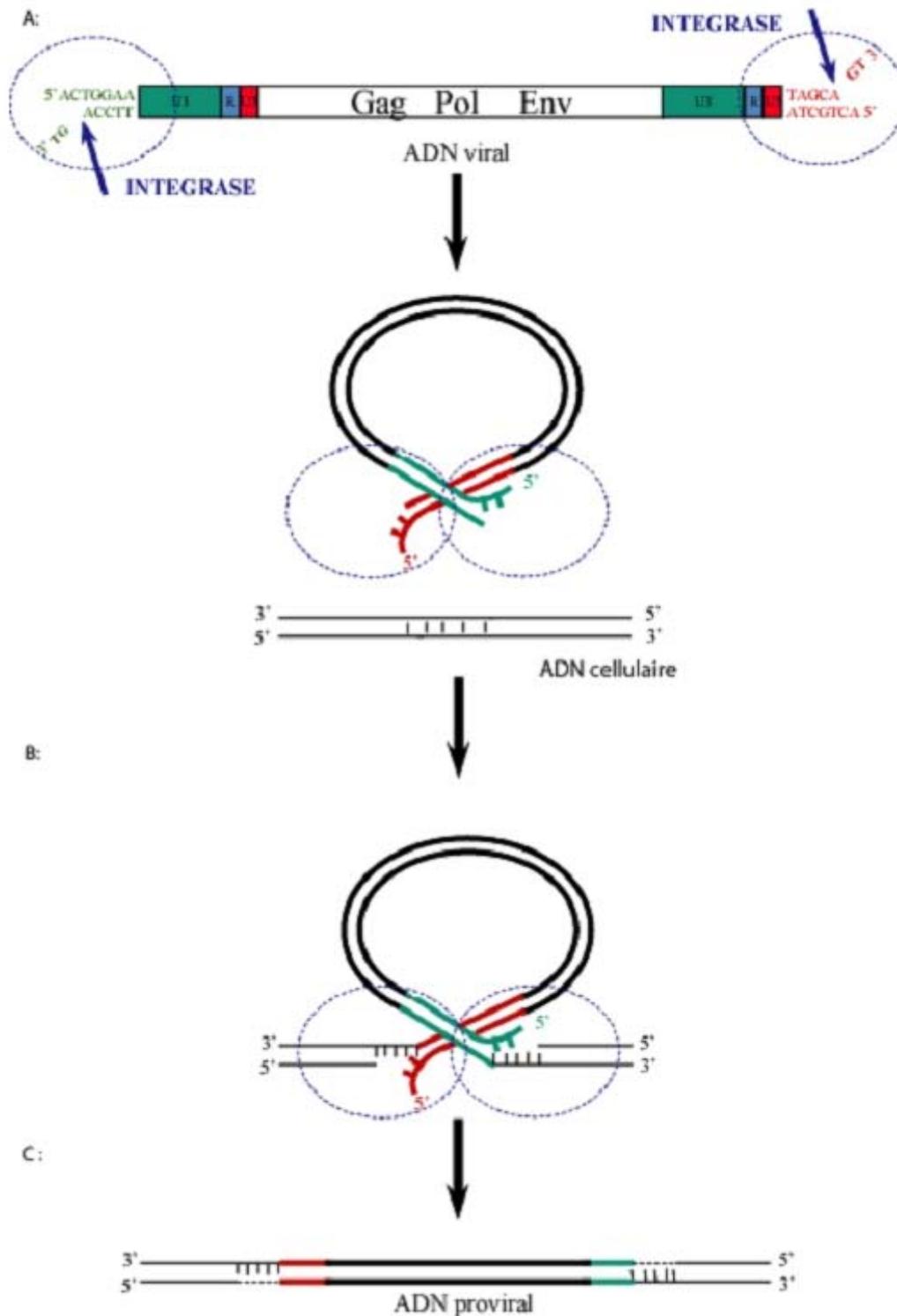


Figure 12- Processus d'intégration de l'ADN viral au sein de l'ADN hôte¹¹²

L'intégrase est responsable de l'insertion de l'ADN viral double brin au sein de l'ADN de la cellule hôte. Cette intégration se déroule en plusieurs étapes¹¹³ dont deux majeures, distinctes en spécificité, en temps et en lieu : la coupure de dinucléotides (3'-P) et le transfert de brins (ST).

Le moment exact où l'intégrase se lie à l'ADN viral n'est pas connu mais il semblerait qu'il y ait une interaction physique et fonctionnelle entre la transcriptase inverse et l'intégrase^{114,115} et donc que l'interaction ADN-IN débute au cours du processus de transcription inverse. Sur des cellules infectées par le VIH-1, le double brin d'ADN viral a d'ailleurs été isolé avec plusieurs dizaines de molécules d'intégrase au sein d'une importante structure nucléoprotéinique appelée complexe de préintégration (PIC).^{116,117} En plus d'ADN viral et d'intégrase, le PIC est constitué de protéine de la matrice virale, de transcriptase inverse, de protéine de la nucléocapside, de protéine virale R, de protéine cellulaire HMG I et vraisemblablement d'autres protéines cellulaires.

a. La coupure de dinucléotides

Cette étape a lieu dans le cytoplasme de la cellule infectée. Une fois la synthèse de l'ADN viral effectuée, les deux nucléotides situés à chaque extrémité 3' au niveau des LTRs¹¹³ sont coupés. Lors de cette étape, appelée coupure de dinucléotides (3'-processing, 3'-P), le dinucléotide GT de l'extrémité 3' est spécifiquement clivé conduisant à la création d'un nouveau groupement hydroxyle. Les dinucléotides situés aux extrémités de l'ADN viral sont alors représentés par le dinucléotide CA-3'-OH. Il est à noter que cette réaction est caractéristique de tous les mécanismes d'intégration des rétrovirus.

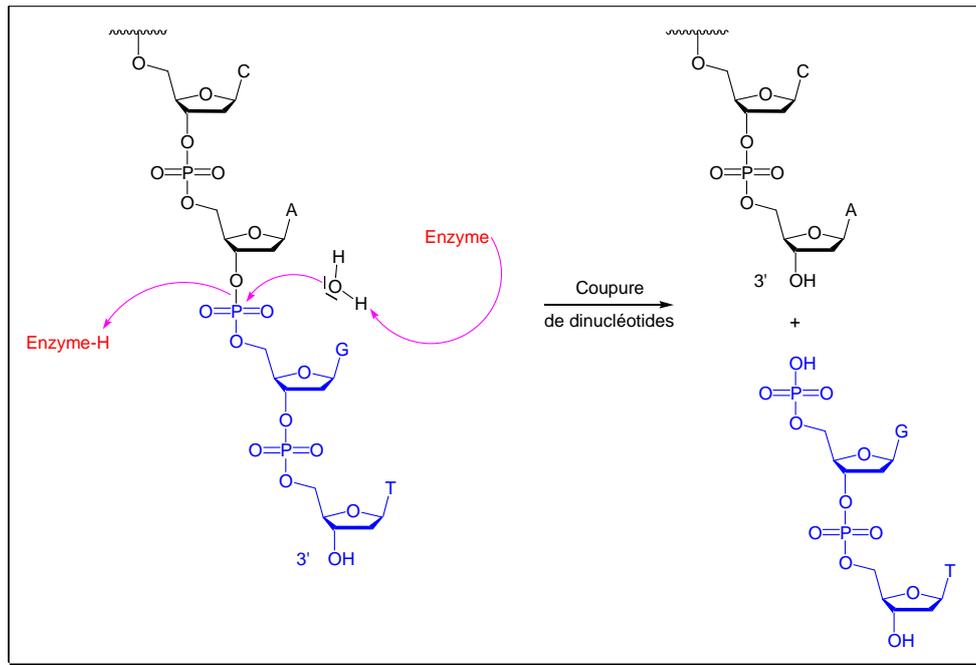


Figure 13- Mécanisme général de la coupure de dinucléotides effectuée par l'intégrase

b. Le transfert de brins

Si la réaction de coupure de dinucléotides a lieu dans le cytoplasme, l'ADN viral doit obligatoirement entrer au sein du noyau pour être intégré à l'ADN de la cellule infectée. Le mécanisme d'entrée dans le noyau reste pour l'instant assez obscur.¹¹⁸ Sa connaissance serait pourtant d'une grande utilité pour envisager de nouvelles stratégies pour bloquer l'intégration.

C'est à l'intérieur du noyau qu'a lieu la seconde étape catalysée par l'intégrase appelée transfert de brins (ST).

Les deux extrémités 3' de l'ADN viral s'insèrent dans l'ADN cible au niveau de deux liaisons phosphodiesteres distantes de cinq paires de bases. Cette insertion ne se fait pas sur un site spécifique du génome hôte mais toutes ses zones ne sont pas favorables à l'intégration.^{119,120}

Le transfert de brins met en jeu un mécanisme de transestérification, l'intégrase disposant l'extrémité 3' de l'ADN viral de manière à ce que le groupement hydroxyle puisse jouer le rôle de nucléophile. Cette attaque de la liaison phosphodiester de l'ADN hôte permet la jonction entre l'extrémité 3' de l'ADN viral et une extrémité 5' de l'ADN cible.

La liaison de l'ADN viral aux deux brins de l'ADN cellulaire s'effectue de manière concertée¹²¹ puis l'intégration est complétée par la perte des nucléotides non appariés à

chaque extrémité 5' de l'ADN viral. Il en résulte un ADN viral parfaitement intégré au sein de l'ADN hôte.

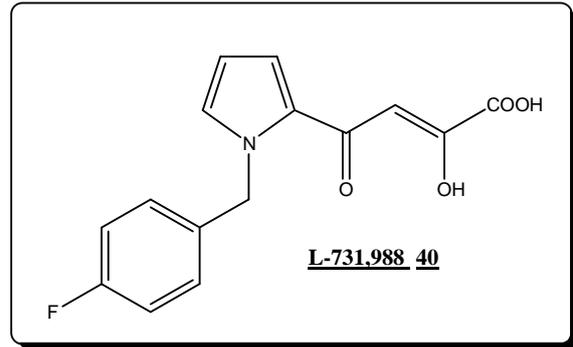
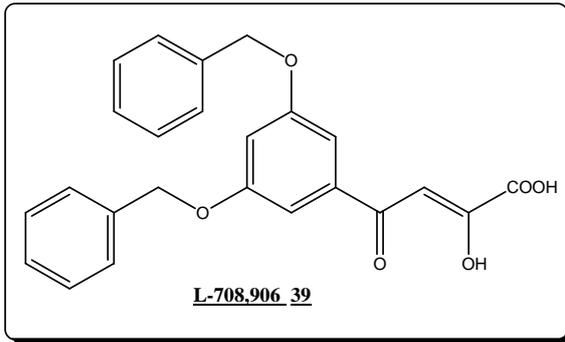
3. Les inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1

En principe, l'inhibition de l'intégrase peut avoir lieu à deux moments clés du processus : avant le 3'-P et donc avant la formation du complexe ADNviral-IN (oligonucléotides, peptides mimant l'intégrase, inhibiteur bloquant le site actif, avec vraisemblablement un seul ion divalent) ou après le 3'-P et donc par interaction avec le complexe ADNprocessé-IN (dinucléotides mimant le fragment GT, inhibiteur bloquant le site actif avec vraisemblablement deux ions divalents). On peut donc distinguer deux classes d'inhibiteurs des fonctions enzymatiques de l'intégrase. Malheureusement, l'ensemble des résultats est difficile à analyser selon ce critère et les inhibiteurs d'intégrase sont généralement classés selon leur structure.

De nombreuses revues ont été publiées sur le sujet^{22,122,123,124} mettant en évidence deux grandes familles : les dicétoacides et dérivés et les polyphénols. Les molécules entrant dans la première famille sont généralement sélectives du ST et c'est dans cette famille qu'ont été identifiées les molécules ayant les meilleures activités antivirales. Les polyphénols ont en général des activités anti-intégrase non spécifiques, inhibant souvent aussi efficacement le 3'-P et le ST.

a. Les α,γ -dicétoacides

Les inhibiteurs de type α,γ -dicétoacides ont été décrits pour la première fois par les chercheurs de la firme pharmaceutique Merck.^{125,126} A partir de ces travaux pionniers, de nombreux articles ont été publiés, présentant des modifications de la partie aromatique.^{127,128,129,130,131,132} En gardant le motif dicétoacide, des molécules « hybrides » associant des nucléobases^{133,134} (pyrimidine et purine), ou catéchols,^{135,136} ou renfermant deux fragments dicétoacides^{137,138} ont été synthétisées. Par rapport aux molécules de référence de Merck, L-708,906 **39** et L-731,988 **40**, aucune amélioration notable n'a été enregistrée.

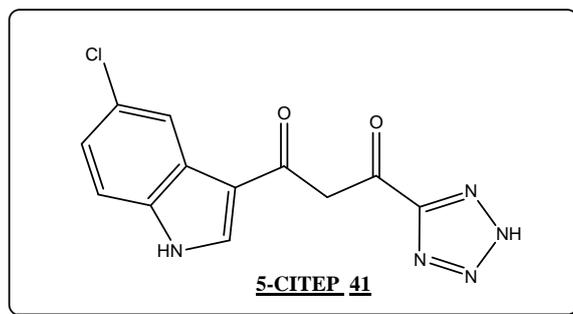


Les dicétoacides sont des inhibiteurs sélectifs de la seconde étape catalysée par l'intégrase, i.e. le transfert de brins. L'indice de sélectivité dépend des conditions dans lesquelles se font les tests (ordre d'addition des réactifs, nature du co-facteur...).¹³⁹ Ils sont capables d'entrer en compétition avec l'ADN cible en se fixant sur un complexe IN-ADNviral.¹⁴⁰ Ils sont capables de former des complexes 1:1 ou 2:2 comme cela a pu être démontré par des méthodes spectroscopiques.^{141,142} Le complexe 1:1 du L-731,988 avec le magnésium ne présente pas de différence d'inhibition notable avec le L-731,988¹⁴² (L-731,988 : CI₅₀ (3'-P) = 15 μM, CI₅₀ (ST) = 0,54 μM ; [L-731,988 : Mg] : CI₅₀ (3'-P) = 6 μM, CI₅₀ (ST) = 0,26 μM).

La fonction acide carboxylique n'est pas requise pour l'interaction avec le complexe IN-ADNviral mais est indispensable pour l'inhibition du ST. Il y a donc vraisemblablement interaction entre cette fonction acide et le magnésium lié coordonné par D64 et D116.^{143,144} Néanmoins, le motif dicétoacide n'est pas suffisant pour conférer une activité anti-intégrase et encore moins une activité antivirale. Barreca et al.¹⁴⁵ ont décrit récemment un pharmacophore modèle en 3D incluant la présence d'une unité aromatique en plus de la structure en trois points susceptible de lier le (ou les) atome(s) de magnésium.

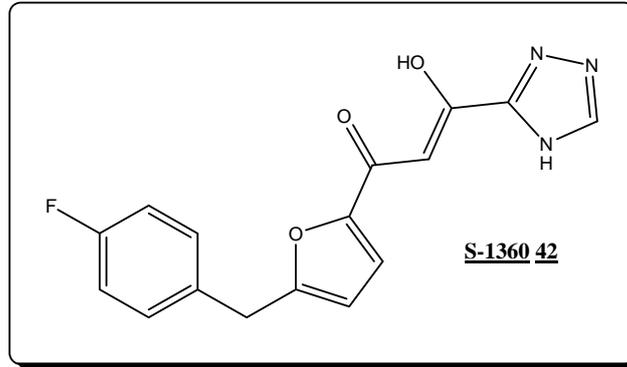
Presque simultanément aux travaux pionniers de Merck, le groupe Shionogi s'est intéressé¹⁴⁶ à des α,γ -dicétones comportant des groupements indoles diversement substitués qui inhibent l'intégrase purifiée avec des valeurs de CI_{50} inférieures à 10 μ M. Le remplacement de la fonction carboxylique par un bioisostère, le cycle tétrazole, a permis d'obtenir le 5-CITEP **41** dont la co-cristallisation avec le domaine catalytique central de l'intégrase a permis d'accéder à la première structure cristalline déterminée par rayons X d'un inhibiteur complexé dans cette région de l'enzyme.¹⁹⁵ Le 5-CITEP est stabilisé dans le site actif de l'intégrase par liaisons hydrogènes avec certains résidus catalytiques (E152) en plus des autres acides aminés (T66, N155, Q148) et des deux résidus lysine (K156 et K159) qui sont impliqués dans le substrat d'ADN. Dans la co-cristallisation 5-CITEP-IN, aucun contact direct entre la molécule et les deux autres résidus catalytiques (D64 et D116) et aucune interaction avec l'ion magnésium n'ont pu être détectés. Seules des interactions de Van der Walls entre le cycle indole et l'une des quatre molécules d'eau coordonnant l'ion magnésium semblent plausibles.

Malgré une faible activité contre l'intégrase, l'absence de propriétés antivirales, la structure 5-CITEP-IN a permis d'obtenir une première idée de l'environnement du site actif de l'intégrase en présence d'un inhibiteur s'y liant et a constitué un outil important pour mettre au point des nouvelles structures antivirales et réaliser des études de docking ou de dynamique moléculaire.



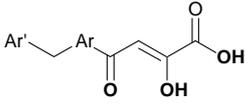
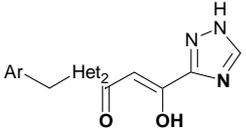
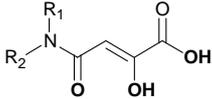
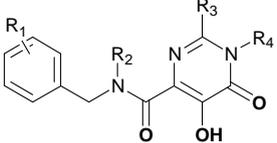
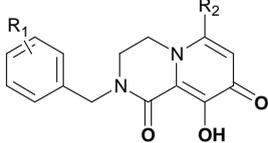
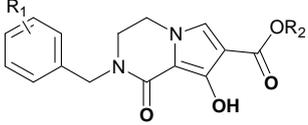
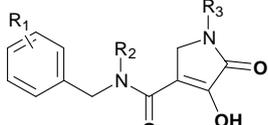
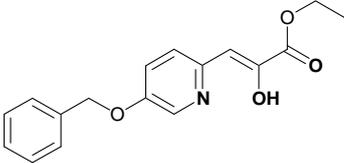
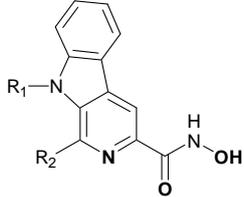
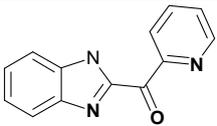
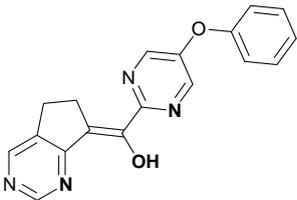
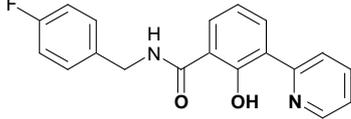
De nombreuses modifications structurales s'inspirant des composés de type α,γ -dicétoacides ont été effectuées permettant l'élaboration et le test sur intégrase d'un grand nombre de molécules. Parmi les nombreux composés synthétisés par la firme Shionogi, le S-1360 **42** fait preuve d'une activité remarquable ($CI_{50} = 0,02 \mu$ M sur l'activité catalytique de l'intégrase purifiée) qui lui a valu de devenir le premier inhibiteur de l'intégrase du VIH-1 à entrer en étude clinique.^{147,148} Il présente une CE_{50} et une CC_{50} respectivement de 0,2 et 12 μ M sur cellules MT-4 infectées et l'isolation d'enzymes mutantes résistantes au S-1360 a

permis de montrer que cette résistance est due à des substitutions d'acides aminés à proximité du site actif de l'intégrase.



De plus, les trois principaux mutants résistants (Q148K, I151L, N155S) n'induisent qu'une faible réplication virale et le S-1360 est actif contre les souches du VIH-1 résistantes aux NRTIs, NNRTIs et PIs, possédant même une action synergique avec certains d'entre eux (AZT, 3TC, néviparine et nelfinavir). L'ensemble de ces propriétés lui a permis d'atteindre la phase clinique II mais son développement a été arrêté en 2003 pour des problèmes de pharmacocinétique.¹⁴⁹

Tableau 5 : brevets des dérivés benzoylpyruviques

 <p>Merck WO 9962513 WO 9962520 WO 9962897 NIH WO 2003049695</p>	 <p>Shionogi WO 2000039086 WO 2001095905 WO 2001096329 Merck WO 2001000578</p>	 <p>BMS WO 2001096283 WO 2001098248 WO 2003049690 Jpn Tobacco WO 2003016266</p>
 <p>IRBM WO 2003035076 WO 2003035077 WO 2004058756 WO 2004058757 Shionogi JP 2004244320 BMS WO 2004062613 WO 2004096128</p>	 <p>Merck WO 2004024078 Jpn Tobacco WO 2005016927</p>	
 <p>Merck WO 2004047725</p>	 <p>BMS WO 2004004657</p>	
 <p>Shionogi WO 2001017968 WO 2003016275</p>	 <p>Pfizer WO 2004039803 WO 2004067531</p>	
 <p>Shionogi WO 2002070491 WO 2002070486</p>	 <p>Shionogi WO 2003047564 WO 2003016275</p>	
 <p>Virochem Pharma WO2005042524</p>		

b. Les hétérocycles de type 8-hydroxyquinoléines

Les dérivés de type 8-hydroxyquinoléines:

Des modifications apportées directement sur la partie α,γ -dicétoacide ont conduit au remplacement de ce motif par un groupement 8-hydroxy-[1,6]-quinoléine.¹⁵⁰ Cette dernière innovation a permis la mise au point de molécules (composé **43** par exemple) possédant d'intéressantes activités anti-intégrase et l'étude de ce type de composé a notamment permis la découverte du L-870,810 **44** dont la capacité à bloquer la réplication du VIH-1 en culture cellulaire ($CI_{50} = 10$ nM) a fait de lui le deuxième inhibiteur de l'intégrase à passer en étude clinique.¹⁵¹ Malgré une activité antivirale prometteuse ($CE_{95} = 19$ nM, $CC_{50} > 5$ μ M), la recherche sur le L-870,810 a été stoppée en raison de toxicité cellulaire intolérable dans le foie et les reins de chiens. Après l'abandon des essais cliniques sur le L-870,810, les travaux ont continué sur le dérivé L-870,812 **45** puis ont été abandonnés, vraisemblablement pour les mêmes raisons, au profit de MK-0518.

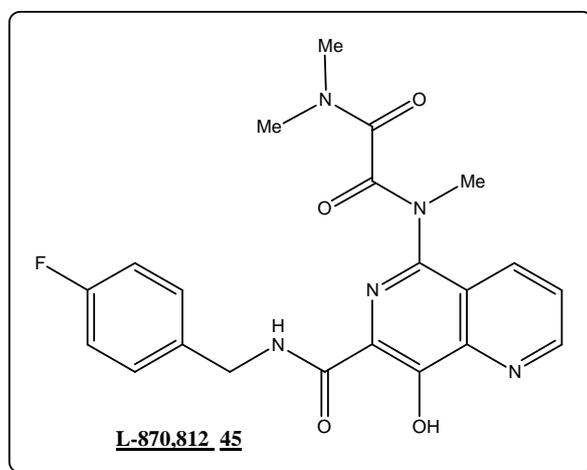
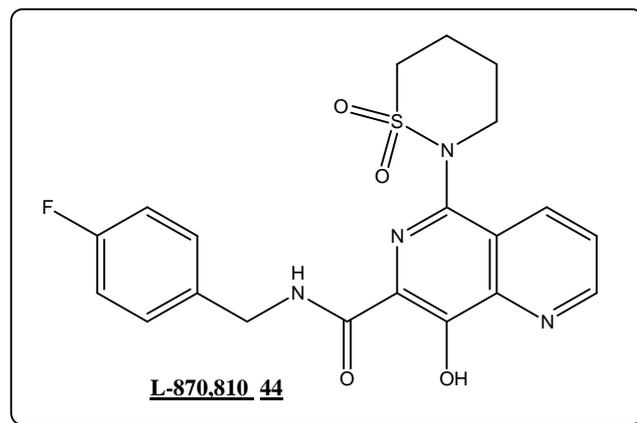
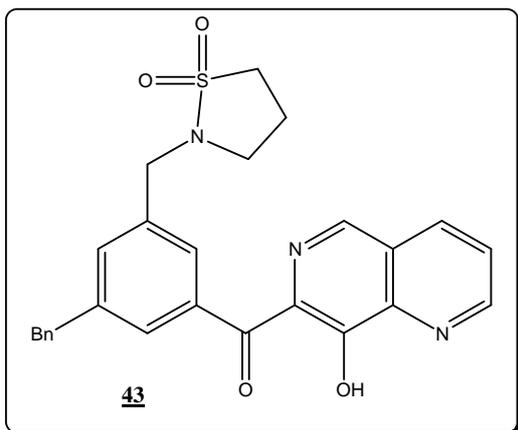
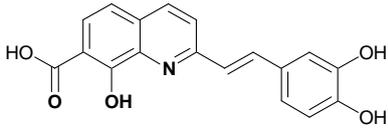
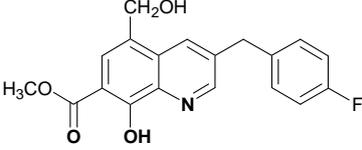
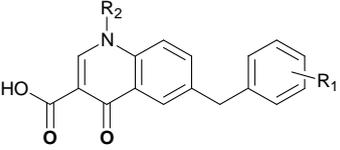
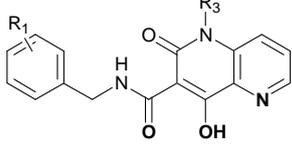
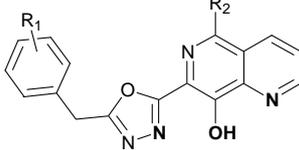
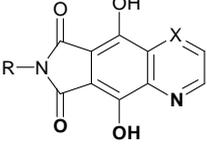
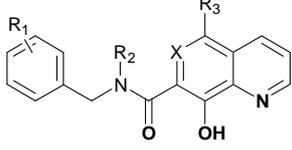


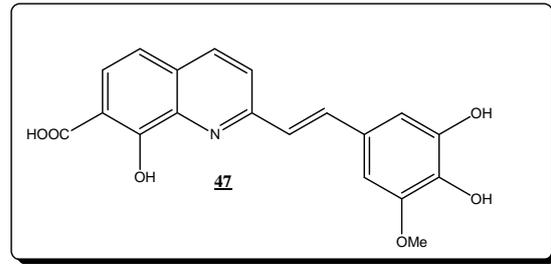
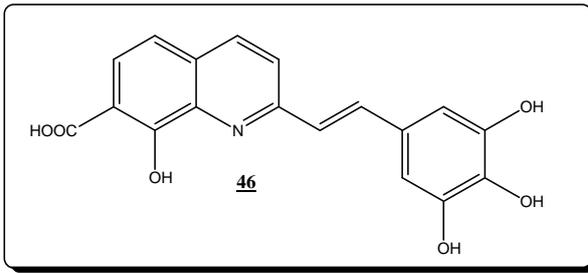
Tableau 6 : brevets des dérivés 8-hydroxyquinoléines

 <p>Bioalliance FR 20032839646 WO 2003031413 CNRS WO 9845269</p>	 <p>Shionogi WO 2004024693</p>	 <p>Jpn Tobacco WO 2004046115</p>
 <p>Merck WO2003062204</p>	 <p>GSK WO 2004101512</p>	 <p>Gilead WO 2004035576 WO 2004035577 Tibotec WO 2004096807</p>
	<p>Merck WO 2002036734 WO 2002030426 WO 2002030930 WO 2002030931 WO 2002055079 WO 2003016294 WO 2003016309 WO 2003016315</p>	<p>Merck WO 2003016309 WO 2003016315 WO 2003077850 WO 2003077857 WO 2003086319 WO 2004080402 Gilead WO 2005028478 Shionogi WO 2002070486</p>

Les styrylquinoléines :

Les styrylquinoléines occupent une place particulière parmi les 8-hydroxyquinoléines. Cette famille a été décrite pour la première fois en 1998^{152,153} par l'équipe de Jean d'Angelo, bien avant les travaux des équipes de chercheurs de Merck. Contrairement au L-870,810 ou au L-870,812, un cycle aromatique di- ou trioxycéné, relié par un bras éthényle est nécessaire pour conférer une bonne activité.

Le composé **46** est actuellement un des composés les plus actifs sur l'IN reportés pour cette famille de molécules ($CI_{50} = 0,3 \mu\text{M}$ pour le 3'-P et $0,4 \mu\text{M}$ pour le ST sur intégrase recombinante purifiée).¹⁵² Malheureusement, son excellente activité en milieu cellulaire ($CI_{50} = 1,2 \mu\text{M}$) est associée à une importante cytotoxicité ($CT_{50} = 10 \mu\text{M}$). La méthylation du groupement hydroxyle en position 3 sur le cycle phényle permet cependant de perdre cette cytotoxicité tout en ne diminuant que faiblement l'activité (composé **47**: $CI_{50} = 0,7 \mu\text{M}$ pour le 3'-P et $1,7 \mu\text{M}$ pour le ST, $CI_{50} = 12 \mu\text{M}$ et $CT_{50} > 100 \mu\text{M}$).¹⁵³



Tous les efforts visant à améliorer les propriétés antivirales ont par la suite été vains.^{154,155,156,157} In vitro, le composé **47** inhibe l'étape de 3'-P en empêchant la formation du complexe IN-ADNviral d'une manière compétitive.¹⁵⁸ In vivo, **47** est un vrai inhibiteur de l'intégrase induisant les mutations simple C280Y et double V165I/V249I et est actif sur des virus résistants (RTis ou DKAs) et notamment sur les mutants T66I, T66I/M154I et T66I/S153Y, résistants au L-731,988.¹⁵⁹

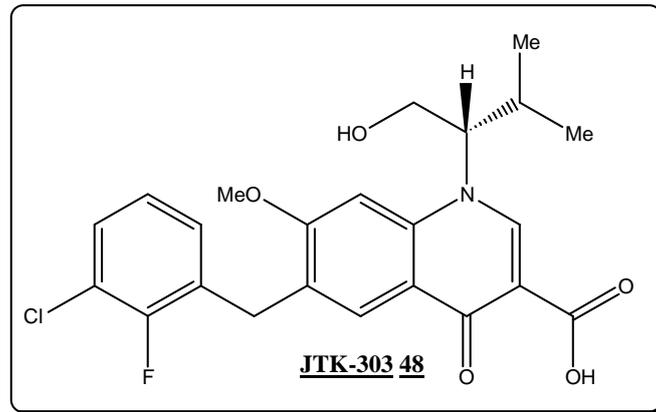
Les molécules en phase clinique :

Récemment, la firme Gilead a acquis le développement d'un dérivé de dihydroquinoléine, le JTK-303 (GS-9137) **48**, un inhibiteur d'intégrase breveté par la société Japan Tobacco. Cette molécule ressemble pharmacologiquement aux antibiotiques de la famille des quinolones.¹⁶⁰ On ne connaît que peu de choses sur cette molécule. Elle présente une CI_{50} de 1,7 nM contre l'intégrase et on pense que son activité est due à sa capacité à se lier au magnésium.

JTK-303 a déjà fait l'objet d'étude en phase clinique I au Japon et des essais de phase II ont tout récemment commencé. Cette molécule présente une forte activité antivirale in vitro sur de nombreuses souches de virus et un effet additif ou synergique en association avec d'autres antirétroviraux. Un ajout de 100 mg de Ritonavir augmente beaucoup la concentration du produit et prolonge sa présence dans le sang (la demi-vie plasmique passe de 3 heures à 9 heures), autorisant une prise unique journalière.

Les résultats d'un essai de phase I à différentes doses, où la molécule était testée en aveugle en monothérapie chez 40 patients naïfs et pré-traités, ont été présentés en 2006. Chaque dose (200 mg, 400 mg, 800 mg en deux prises par jour, 50 mg en une prise en association avec du Ritonavir) a été comparée à un placebo. Après dix jours de traitement, l'efficacité virologique a été maximale pour la dose de 50 mg en association avec le Ritonavir et celle de 800 mg prises deux fois par jour. Peu d'effets indésirables ont été observés

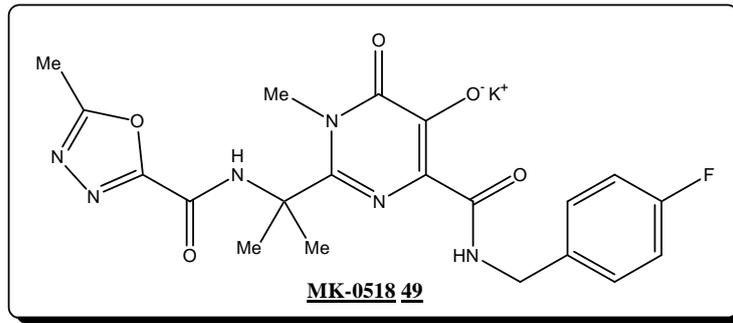
(diarrhées, nausées, céphalées) dans cet essai de courte durée. Là aussi, les résultats laissent présager une forte et rapide activité antivirale avec une bonne tolérance.



La firme Merck a commencé des essais cliniques avec une molécule issue des hydroxypyrimidinones carboxamides, le MK-0518 **49**. Cette molécule présente une bonne activité contre le ST ($CI_{50} = 2-7$ nM).

Le MK-0518 a déjà fait l'objet de plusieurs études cliniques. Dans un essai portant sur 160 personnes non infectées par le VIH, il a été montré qu'il provoquait l'apparition d'effets indésirables bénins (toux, diarrhées, nausées) qui disparaissaient spontanément, ce qui laisse supposer qu'il est bien toléré. Un essai de monothérapie d'une durée de dix jours portant sur 35 personnes vivant avec le VIH a conduit à une réduction de 98% de la charge virale à toutes les doses testées. Afin de mieux comprendre l'efficacité et la tolérance de MK-0518 sur l'infection VIH, la firme Merck a mis en place un essai clinique de phase III en début d'année 2006 sur un nombre plus important de personnes vivant avec le VIH-1.

Le MK-0518 a été testé aussi en combinaison avec un grand nombre d'autres antiviraux appartenant à toutes les classes (NRTI, NNRTI, PI) et il est apparu que cette molécule a une activité antivirale additive voire synergique avec ces différents composés. Le MK-0518 a donc le potentiel pour devenir le premier médicament inhibiteur de l'intégrase.



c. Les polyphénols

Un grand nombre d'inhibiteurs de l'IN du VIH-1 fait partie de cette classe de molécules. On peut les classer suivant leur structure (molécule contenant une partie catéchol ou (poly)phénol) ou leur origine (naturelle ou synthétique). Un grand nombre de composés aromatiques polyhydroxylés se sont révélés hautement cytotoxiques mais d'autres sont fréquemment consommés et dépourvus de cytotoxicité. En se basant sur des considérations structurales, on peut facilement déduire que les catéchols peuvent agir en tant que chélateurs de métaux, être engagés dans des réactions d'oxydoréduction ou s'intercaler dans l'ADN (quand le nombre de cycles aromatiques accolés est suffisant). C'est pourquoi il est difficile dans la recherche des mécanismes d'inhibition mis en jeu par ce type de composés de faire la distinction entre une chélation de Mg^{2+} au niveau du site actif, une réaction d'oxydoréduction ou une interaction avec l'ADN hôte ou viral.

◆ Les polyphénols naturels

Les polyphénols naturels sans motif « acide caféique » :

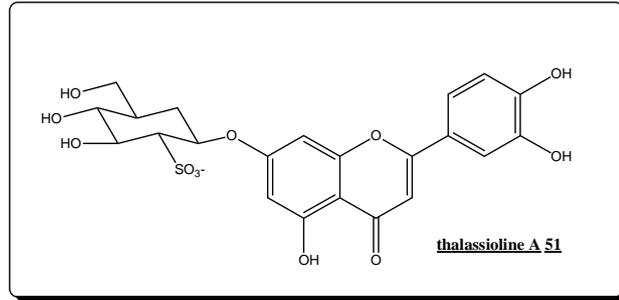
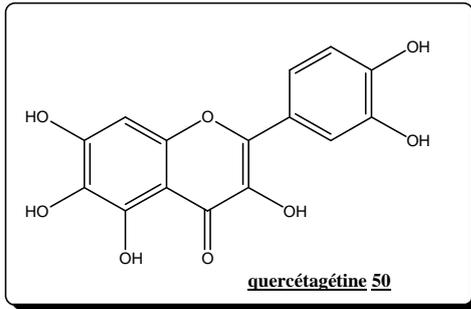
Une des premières familles de polyphénols naturels à avoir été étudiée dans la lutte contre l'intégrase est la famille des flavonoïdes,¹⁶¹ probablement à cause du large éventail d'effets biochimiques attribués à ces produits¹⁶² mais également parce qu'un grand nombre de ces composés est facilement accessible. La comparaison entre la structure et l'activité des flavonoïdes permet de constater que :

- l'activité requiert la présence d'au moins trois groupements hydroxyles adjacents,
- la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 n'est pas essentielle pour l'inhibition de l'intégrase,

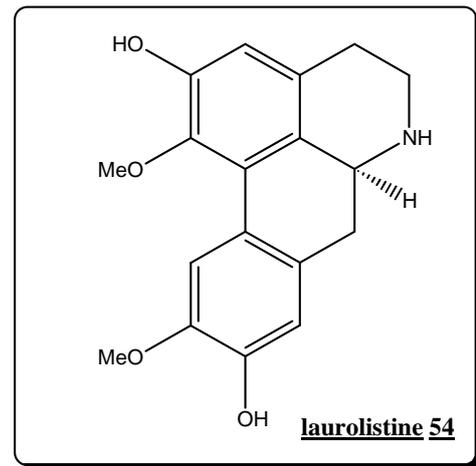
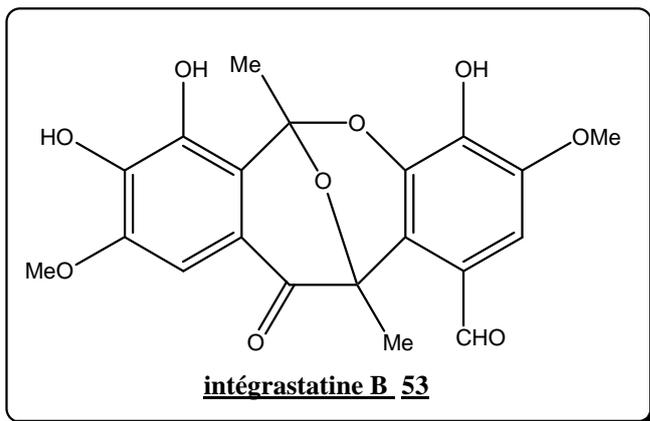
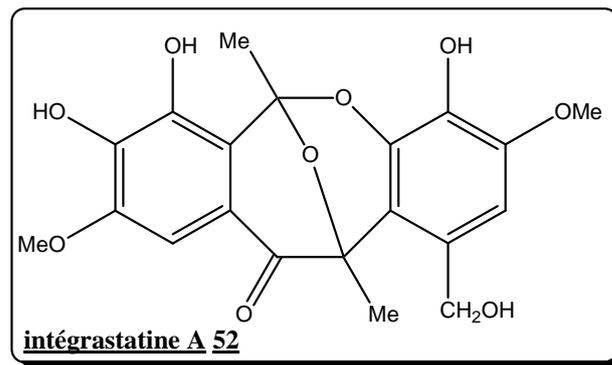
- l'absence de double liaison entre C2 et C3 conduit à des composés inactifs (taxifoline/quercétine),
- l'activité est réduite ou annihilée par la présence de groupements glycosyle ou méthoxyle.

La quercétagine **50** inhibe aussi bien les réactions de 3'-P ($CI_{50} = 0,8 \mu M$) et de ST ($CI_{50} = 0,1 \mu M$) que la réaction de désintégration ($CI_{50} = 0,8 \mu M$ en présence de Mg^{2+} , $CI_{50} = 0,4 \mu M$ en présence de Mn^{2+}).¹⁶¹ La quasi-planéité, l'aromaticité et la polarité des flavonoïdes peuvent permettre à ces composés des interactions de type empilement avec l'adénine ou la guanine. Cette interaction avec des bases de l'ADN au niveau du site actif peut être responsable de l'effet inhibiteur de ces composés. Cependant, les flavonoïdes sont surtout connus pour être impliqués dans des réactions d'oxydoréduction et de chélation de métaux. S'il y a participation d'une réaction d'oxydoréduction dans les mécanismes d'inhibition de ces composés, celle-ci est alors locale et protégée à l'intérieur du micro-environnement de l'intégrase. Par contre, l'intervention d'un phénomène de chélation dans le mécanisme d'inhibition est largement suggérée par la différence d'activité suivant que l'on utilise Mn^{2+} ou Mg^{2+} (flavonoïde plus efficace avec le premier de ces cations). La chélation d'un métal de transition par les flavonoïdes a largement été étudiée.¹⁶² Il y a trois sites possibles pour complexer un métal de transition au sein d'un flavonoïde contenant des groupements hydroxyle en C3, C5 et C3' et C5'. Le groupement OH-3 est normalement le premier site de complexation occupé suivi par OH-5 et la fonction catéchol. Cependant, aucune corrélation claire entre la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 et l'inhibition de l'intégrase n'a pu être établie.

Les thalassiolines sont des flavones solubles dans l'eau, isolés à partir d'algues, *thalassia testudinum*, provenant de la mer des caraïbes.¹⁶³ La thalassioline A **51** inhibe l'intégrase du HIV-1 recombinée *in vitro* ($CI_{50} = 2,1 \mu M$ pour le 3'-P et $CI_{50} = 0,4 \mu M$ pour le ST). En plus, elle présente une activité antivirale avec une CI_{50} de $27 \mu M$ ce qui donne un rôle à part à la thalassioline A parmi les autres flavones. On ne sait pas si la cible antivirale est l'intégrase tant que le traitement à long terme des cellules avec la thalassioline A n'a pas conduit à un virus résistant. La partie glycosulfonate semble avoir un rôle clé dans l'inhibition de l'intégrase mais aucun travail de fond (relation structure-activité) n'a suivi cette publication.¹⁶³

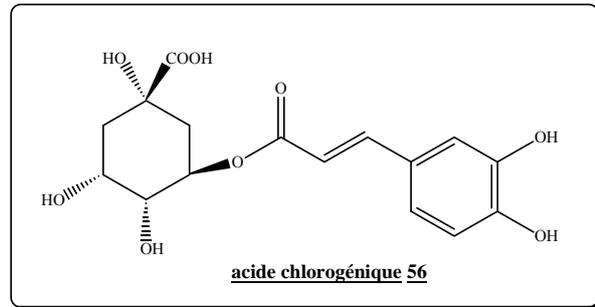
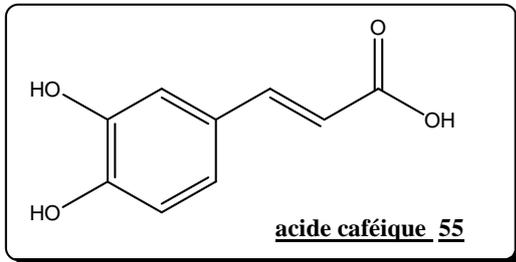


Les intégrastatines, hétérocycles aromatiques tétracycliques produits par des espèces fongiques non identifiées,¹⁶⁴ inhibent aussi l'intégrase du VIH-1. L'intégrastatine A **52** inhibe l'intégrase recombinée et le ST avec des CI_{50} de 0,6 μ M et 1,1 μ M respectivement. L'inhibition par l'intégrastatine B **53** est deux fois plus faible. Le composé le plus actif est la laurolistine **54**, isolée de racines *Lidera chunii* Merr..¹⁶⁵ Ce sesquiterpène inhibe le ST sur intégrase recombinée avec une valeur de CI_{50} de 7 μ M.

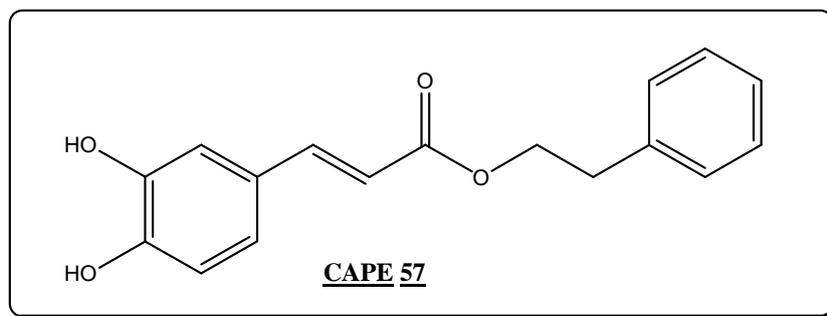


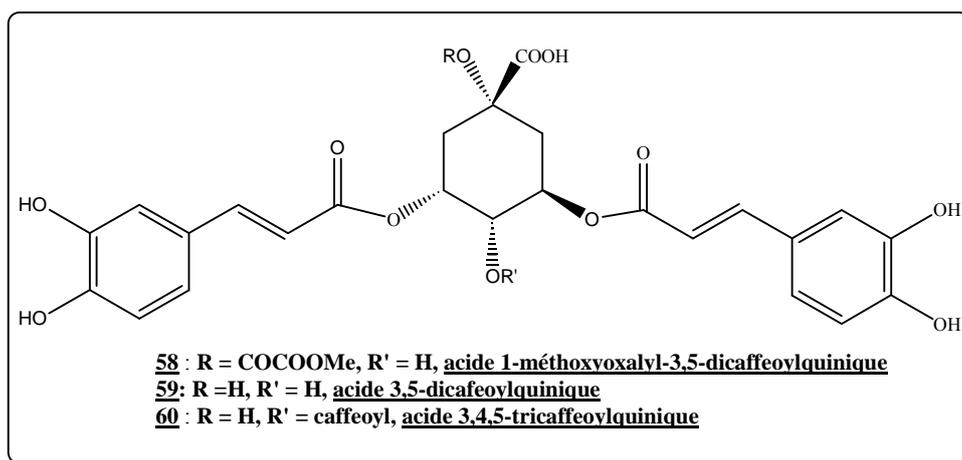
Les polyphénols naturels avec motif « acide caféique » :

L'acide caféique et ses dérivés sont très couramment trouvés dans les fruits, les légumes, le vin, l'huile d'olive, les thés, les grains de café et le propolis d'abeille.

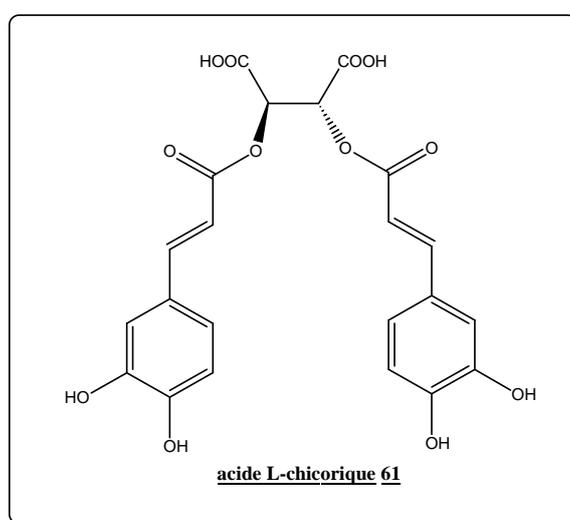


L'acide caféique **55** et l'acide chlorogénique (acide 5-caffeoyl quinique) **56** ne présentent pratiquement pas d'activité anti-HIV. Cependant une étude récente¹⁶⁶ a révélé une activité de l'acide caféique vis-à-vis de l'intégrase ($CI_{50} = 2,8 \mu M$ en présence de Mn^{2+}). L'ester phényléthylique, i.e CAPE (caffeic acid phenylethyl ester) **57**, un produit issu des abeilles est actif vis-à-vis de l'intégrase du VIH-1. Le CAPE est dix fois plus efficace dans l'inhibition du ST ($CI_{50} = 19 \mu M$) que dans celle du 3'-P ($CI_{50} = 220 \mu M$).¹⁶⁷ La préincubation du CAPE avec l'intégrase augmente grandement l'inhibition du 3'-P mais elle affecte peu celle du ST. L'importance de la nature du cation métallique utilisé est également mise en avant lors de tests sur l'étape de désintégration ($CI_{50} = 65 \mu M$ avec Mn^{2+} et $155 \mu M$ avec Mg^{2+}).¹⁶¹ D'autres composés possédant deux motifs caféiques, l'acide 1-méthoxyoxalyl-3,5-dicaffeoylquinique **58** et l'acide 3,5-dicaffeoylquinique **59** inhibent également les réactions de 3'-P, de ST et de désintégration.¹⁶⁸ Le composé, extrait des feuilles de laitue, présentant trois motifs caféiques, l'acide 3,4,5-tricaffeoylquinique **60**, inhibe les réactions de 3'-P, de ST et de désintégration et présente une activité sur cellules MT-2.¹⁶⁹





L'acide D-chicorique (D-CA),¹⁷⁰ l'un des constituants phénoliques majeurs isolés des endives,¹⁷¹ est une excellente molécule leader contre l'intégrase. Son énantiomère, l'acide L-chicorique (L-CA) **61**, constituant majeur isolé des racines et des parties aériennes d'*Echinacea purpurea*, inhibe aussi bien le 3'-P (CI₅₀ = 147 nM), le transfert de brins (CI₅₀ = 126 nM), la désintégration (CI₅₀ = 316 nM) que la croissance de cellules de type MT-2 (DE₅₀ = 4,2 μM (« Dose Efficace 50 ») et DL₅₀ = 700 μM (« Dose Létale 50 »)).¹⁶⁸

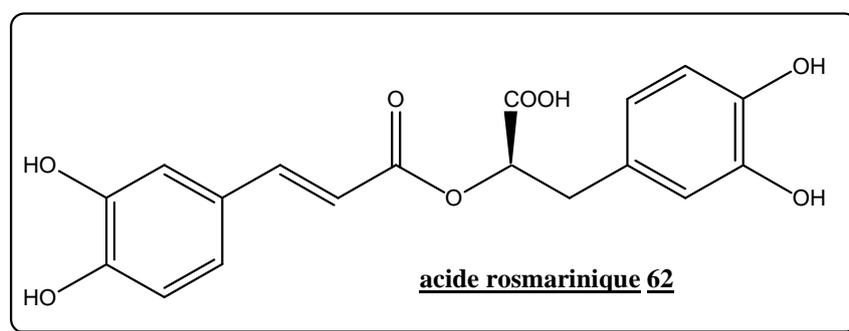


En le testant contre d'autres cibles virales potentielles, il a été démontré que le L-CA agissait moins efficacement sur celles-ci que sur l'intégrase et ce composé semblait donc être un inhibiteur sélectif de cette enzyme.¹⁷² Il a été également prouvé qu'il agit directement sur le domaine catalytique de l'enzyme.¹⁷³ D'après King et al.,¹⁷⁴ l'apparition d'une forme mutante d'intégrase résultant de la substitution de l'acide aminé de la position 140 (sérine à la place d'une glycine : G140S) à une souche de VIH-1 sensible au L-CA suffit à rendre le virus

résistant à ce composé. Cette simple constatation tend à confirmer la sélectivité du L-CA et la localisation de son action au niveau du domaine catalytique de l'enzyme.

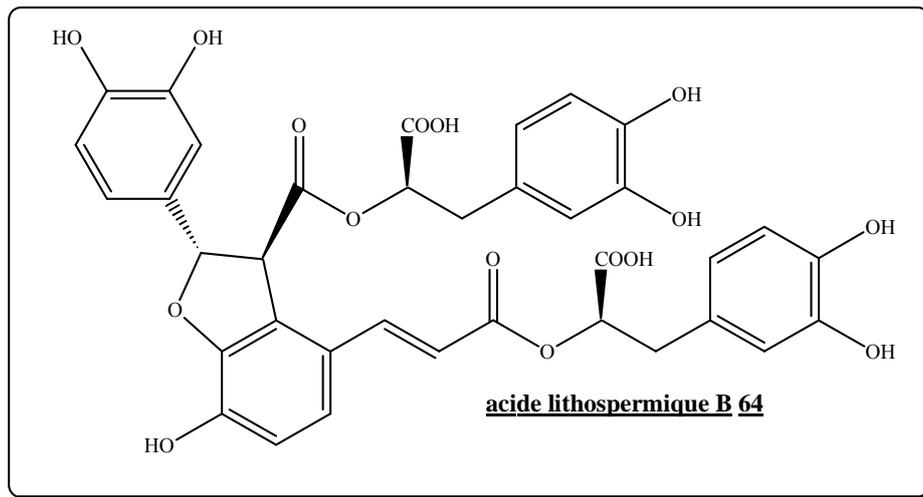
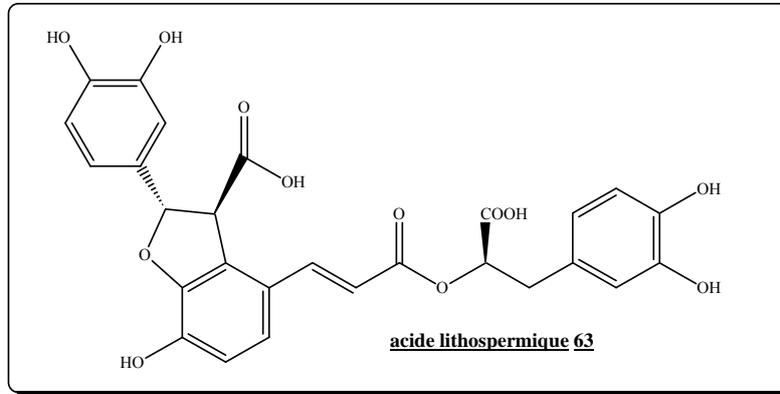
Par contre, Pluymers *et al.* ont démontré que le L-CA doit en réalité son activité anti-VIH en culture cellulaire à une interaction avec la protéine de surface gp120 de l'enveloppe virale.¹⁷⁵ Après plusieurs passages du virus en présence de L-CA, on constate en effet des mutations au niveau des boucles V2, V3 et V4 de gp120 alors qu'aucune mutation n'est détectée sur l'intégrase. De plus, en complète contradiction avec les affirmations de King *et al.*,¹⁷⁴ l'intégrase portant la mutation G140S apparaît comme étant aussi sensible à l'effet du L-CA que l'intégrase d'origine virale. Des expériences de temps d'addition corroborent l'existence d'une interaction du L-CA lors de l'étape d'adsorption du virus. Ces résultats remettent donc en cause la corrélation entre l'activité anti-VIH du L-CA et l'inhibition de l'intégrase.

L'acide rosmarinique **62**, ester de l'acide caféique et de l'acide 3,4-dihydrophényllactique, communément trouvé dans des plantes de la famille des *Boraginaceae*,¹⁷⁶ inhibe le 3'-P (CI₅₀ = 9 µM) et le ST (CI₅₀ = 4 µM) en présence de Mn²⁺.¹⁷⁷ A partir d'un screening, des extraits aqueux et éthanoliques de cinquante plantes Thai ont été testés comme inhibiteur d'intégrase.¹⁷⁸ L'acide rosmarinique, son ester méthylique et ses sels de calcium et de magnésium ont été isolés à partir d'extraits éthanoliques de *Coleus parvifolius* Benth.. Les rosmarinates de calcium et de magnésium se sont révélés cinq fois plus actifs que l'acide rosmarinique contre l'intégrase (CI₅₀ = 0,8-1 µM vs 5 µM). Les mêmes sels, isolés d'extraits aqueux de *Cordia spinescens* sont de bons inhibiteurs de transcriptase inverse avec des CI₅₀ de 5,8 et 3,1 µM respectivement¹⁷⁹ mais sont inactifs contre la protéase.

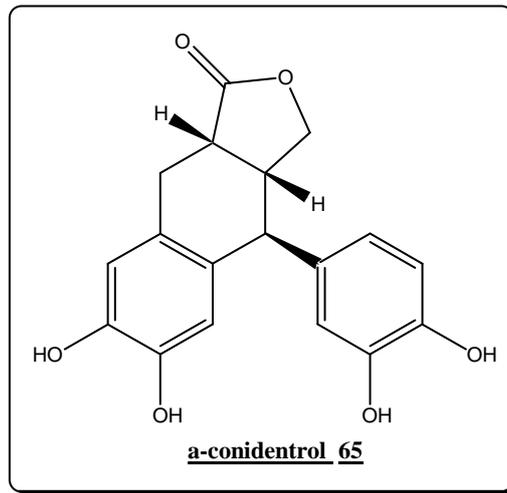


Les acides lithospermique **63** et lithospermique B **64** (dimère de l'acide rosmarinique), isolés de *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), sont actifs sur les réactions de 3'-P et de ST à des concentrations submicromolaires et sur l'infection de cellules H9 par le VIH-1 (CI₅₀ = 2,0-6,9 µM).¹⁸⁰ Le lithospermate de magnésium, isolé d'extraits éthanoliques de *Coleus parvifolius*

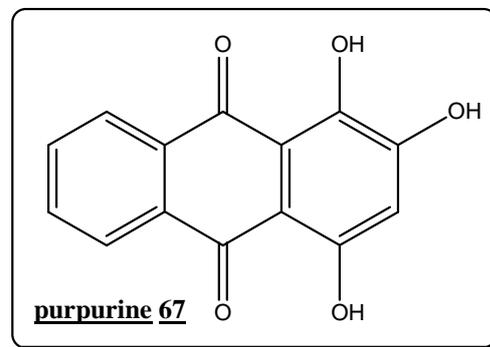
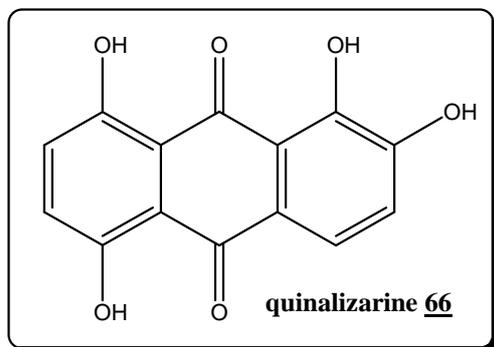
Benth. ou d'extraits aqueux de *Cordia spinescens*, est deux fois plus actif que l'acide lithospermique contre l'intégrase¹⁷⁸ et présente une activité submicromolaire contre la transcriptase inverse.¹⁷⁹ L'acide lithospermique est un inhibiteur prometteur du VIH-1 en raison de son grand potentiel multicible et son absence de cytotoxicité.

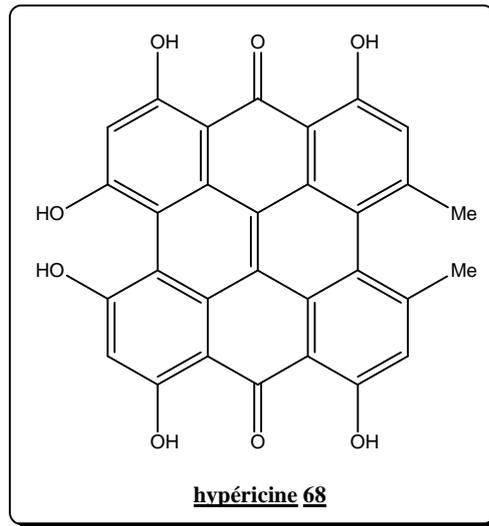


Dans la famille des lignanes, l' α -conidentrol **65** et le β -conidentrol inhibent les réactions catalysées par l'intégrase à des concentrations submicromolaires et ils possèdent un haut degré de sélectivité.¹⁸¹ Cependant, ils ne présentent pas d'activité antivirale, ni de cytotoxicité sur cellules MT-4, jusqu'à des concentrations de 100 μ M. Le β -conidentrol s'est également révélé inactif sur des complexes préassemblés.¹⁸²



De nombreuses molécules aromatiques polycycliques polyhydroxylées agissent comme des inhibiteurs d'intégrase purifiée. Parmi elles, plusieurs anthraquinones, tels que la quinalizarine **66**, la purpurine **67** ou encore d'autres dérivés aromatiques comme l'hypéricine **68**, sont actifs à la fois sur intégrase purifiée et sur complexes de préintégration (PICs).^{183,184} Les anthraquinones polyphénoliques peuvent se lier à l'intégrase en l'absence d'ADN, ce qui tend à prouver que cette liaison à l'intégrase fait au moins partie des mécanismes d'inhibition de ce type de composés. Cependant, le fait que la quinalizarine et ses analogues soient actifs sur PICs implique que le blocage de l'interaction IN-ADN n'est pas le seul mécanisme d'inhibition. D'autres expériences mettent en avant le rôle vraisemblable d'une liaison avec le métal du site actif. Cela appuie l'hypothèse selon laquelle la quinalizarine et ses dérivés pourraient former un complexe ternaire avec l'intégrase et un ion métallique. La quinalizarine démontre également une activité contre le VIH-1 *in vivo*, mais est cytotoxique à des concentrations proches des niveaux nécessaires à l'inhibition virale.¹⁸⁵





◆ Les polyphénols synthétiques

Les dérivés du CAPE :

Après avoir identifié le CAPE **57** comme étant un inhibiteur d'intégrase ($CI_{50} = 220 \mu\text{M}$ pour le 3'-P et $19 \mu\text{M}$ pour le ST),¹⁸⁶ une étude a cherché à établir les relations structure-activité sur ce type de molécule.¹⁸⁷ Une série d'esters de l'acide caféique a alors été synthétisée avec des molécules plus rigides (rotationnellement contraintes) ou des dérivés de type amide. En accord avec les précédentes études de relations structure-activité, deux groupements hydroxyles sont requis en position ortho sur un cycle aromatique pour obtenir une bonne inhibition de l'intégrase et un troisième groupement hydroxyle adjacent augmente l'activité. Chez les analogues de conformation contrainte, on a pu constater que les 7,8-dihydroxynaphtalène-2-carboxyliques sont plus actifs que les acides 6,7-dihydroxynaphtalène-2-carboxyliques. On a d'ailleurs remarquer le même comportement avec une série d'analogues de l'isoquinoline. Finalement, les dérivés du CAPE de type amide portant deux motifs catéchols se sont révélés aussi actifs que le CAPE, ce qui a conduit au développement d'une série de bis-arylamides.¹⁸⁸

Pour leur part, les ligands d'affinité irréversible ont prouvé leur efficacité dans l'étude d'un grand nombre de systèmes d'enzyme et de protéine. Lors d'une première approche dans la recherche de structures dirigées contre l'intégrase, une série d'esters arylisothiocyanates d'acide caféique a été synthétisée.¹⁸⁹ Le choix de la fonction isothiocyanate est lié à sa réactivité potentielle vis-à-vis des thiols et des amides, le but étant de sonder la présence de

ces fonctions nucléophiles à proximité de la zone où le CAPE se lie à l'enzyme. Ces esters arylthiocyanates d'acide caféique sont aussi actifs que le CAPE pour chacune des réactions catalysées par l'intégrase ($CI_{50} = 1-4 \mu\text{M}$ pour le 3'-P et le ST). Introduire un groupement isothiocyanate sur diverses positions du cycle aromatique dans la partie phényléthyle de la molécule n'affecte guère son activité, ce qui démontre une certaine insensibilité à cette fonction de la région à laquelle se lie l'inhibiteur.

Les dérivés renfermant deux motifs caféoyloyle :

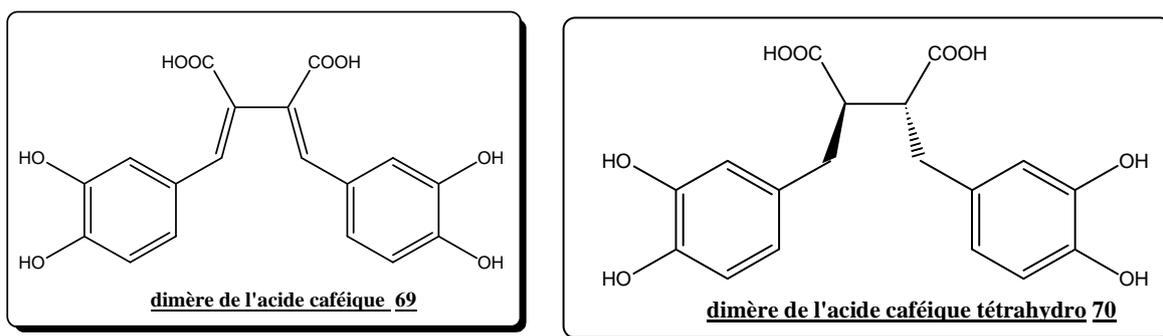
Suite à la découverte de l'activité des acides dicaféoylquiniques naturels contre l'intégrase,¹⁶⁸ par exemple l'acide 3,5-dicaféoylquinique **59** ($CI_{50} = 0,64 \mu\text{M}$ pour le 3'-P et $0,63 \mu\text{M}$ pour le ST), des nouveaux caféoyl glucosides,¹⁹⁰ dicaféoyl ou digalloyl pyrrolidines et dérivés du furane¹⁹¹ ont été synthétisés et testés comme inhibiteurs de l'intégrase sans amélioration significative de l'activité.

Etant donné les excellents résultats obtenus avec l'acide L-chicorique (L-CA) **61** lors d'essais sur l'inhibition de l'intégrase, des études complémentaires sur les relations structure-activité dans le cas d'analogues du L-CA ont été simultanément publiées.^{170,192} Dans l'une d'elles, la toxicité cellulaire et l'activité anti-VIH d'une première série de dérivés du L-CA ont été évaluées sur cultures cellulaires (cellules MT-2).¹⁹² Leur action sur l'intégrase a aussi été évaluée lors d'essais de désintégration. Dans l'autre étude, une autre série d'analogues a été évaluée.¹⁷⁰ L'inhibition des étapes de 3'-P et de ST, la toxicité cellulaire ainsi que l'activité anti-VIH sur des cellules CEM et des cellules MT-4 ont ainsi été mesurées. De ces deux études, les relations structure-activité suivantes peuvent être établies :

- les deux groupes carboxyliques libres sont nécessaires pour obtenir une activité maximale,
- La stéréochimie de l'acide chicorique n'a pas d'effet significatif sur l'activité,
- Alors que les groupes caféoyloyle sont nécessaires, le blocage de la fonction catéchol lors de la conversion en acétate, n'entraîne qu'une diminution de l'activité d'un facteur dix, probablement à cause d'un clivage partiel de ces fonctions acétate lors des essais sur l'enzyme,
- Les groupements caféoyloyle peuvent être liés au noyau diacide de la molécule par l'intermédiaire d'une fonction ester ou amide.

Cependant, la toxicité du L-CA est sujette à controverse, le L-CA et ses analogues se révélant toxiques sur cellules CEM-SS. Des études plus poussées ont montré que l'activité antivirale est extrêmement dépendante de la multiplicité de l'infection ainsi que de l'ordre d'addition du composé. Heureusement, le L-CA et quelques uns de ses dérivés se sont révélés actifs sur cellules MT-4 ($CI_{50} = 1,7-5,3 \mu M$) à des concentrations plus faibles que celles induisant une cytotoxicité ($40-60 \mu M$). Les indices de sélectivité obtenus, de l'ordre de dix, sont tout de même très différents de ceux reportés par Robinson *et al.*¹⁷⁰

Une seconde série d'études sur les relations structure-activité pour ce type de composés a conduit à l'identification de nouvelles molécules structurellement dérivées qui inhibent à la fois l'intégrase et la réplication virale.¹⁹³ Le dimère de l'acide caféique **69** est aussi actif que le L-CA et le stéréoisomère D,L de sa forme tétrahydro **70** est plus actif contre la réplication du VIH. Cependant, ces composés sont quatre à cinq fois plus toxiques que le L-CA, ce qui peut vraisemblablement être attribué à leur capacité à former des espèces biradicalaires.



Des prédictions de modélisation moléculaire¹⁹⁴ basée sur la structure cristalline d'un complexe IN-5-CITEP¹⁹⁵ suggèrent que le L-CA se loge dans une poche de liaison et remplit entièrement la partie superficielle du domaine catalytique de l'intégrase. Dans ce modèle, le L-CA interagit avec K156 et K159 ainsi qu'avec C65, T66 et H67. Mais les contacts les plus favorables sont avec les E152 et Q148. Les deux groupements carboxyliques interagissent avec les résidus K156, K159 et H67. Un de ces cycles catéchols montre d'importants contacts avec E152 et forme des liaisons hydrogènes avec Q148 alors que le second interagit faiblement avec E92. De manière à présenter le maximum d'interactions, le L-CA doit adopter une forme pliée dans laquelle les deux cycles aromatiques forment un angle d'environ 90°.

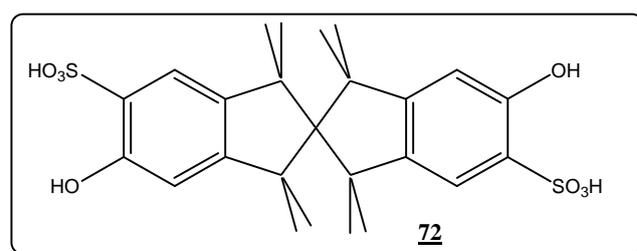
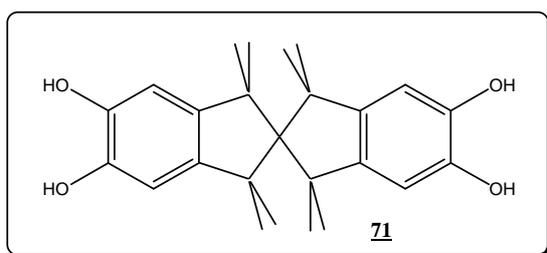
En 2006, une série d'analogues de l'acide chicorique ont été synthétisés et testés pour leurs propriétés anti-intégrase.¹⁹⁶ Les analogues possédant une chaîne aryle 3,4,5-trihydroxycinnamoyle sont ceux qui ont une l'activité la plus forte sur la réplication du VIH sur la réaction de 3'-P. Les dérivés substitués par un groupement galloyle révèlent une très forte activité *in vitro* et *in vivo*, souvent plus élevée que celle présentée par l'acide chicorique.

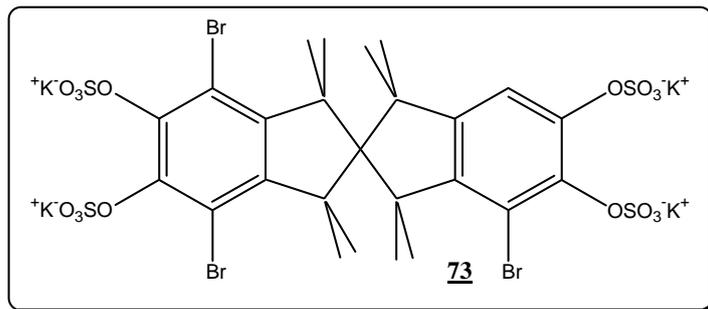
En contrepartie, les analogues avec un groupement cafeoyloyle présentent une modeste activité et les composés substitués par un groupement 3,4-dihydroxybenzoyle sont dénués d'activité.

Les bis-catéchols géométriquement contraints :

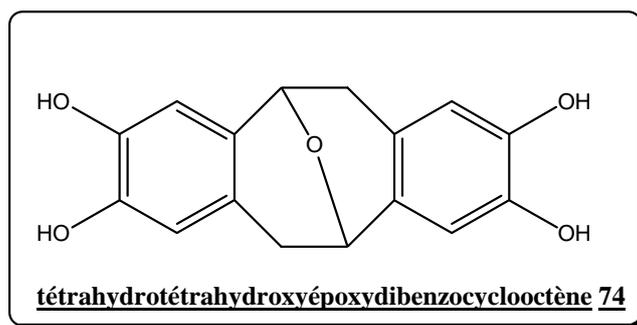
La famille des 3,3,3',3'-tétraméthyl-1,1'-spirobis(indan)-5,5',6,6'-tétrol est caractérisée par la présence de deux unités aryles, dont l'une contient le motif catéchol, séparées par un segment de liaison approprié.¹⁹⁷ Ces dérivés ont été synthétisés en modifiant le groupe attaché au cycle aromatique dans l'espoir d'avoir des composés plus puissants et moins toxiques.

Il a été prouvé que le motif catéchol n'est pas nécessaire pour l'inhibition de l'intégrase.¹⁹⁷ Le composé parent **71** présente une bonne activité sur intégrase mais uniquement en présence de manganèse ($CI_{50} = 17 \mu M$ pour le 3'-P et $5 \mu M$ pour le ST en présence de manganèse et >200 pour le ST en présence de magnésium), le dérivé **72** n'inhibe l'intégrase *in vitro* qu'en présence de magnésium ($CI_{50} >200 \mu M$ pour le 3'-P et $>200 \mu M$ pour le ST en présence de manganèse et $= 69 \mu M$ pour le ST en présence de magnésium) et le composé qui présente la meilleure activité est le composé **73** ($CI_{50} = 1,4 \mu M$ pour le 3'-P et $= 0,35 \mu M$ pour le ST en présence de manganèse et $= 4 \mu M$ pour le ST en présence de magnésium). Ces composés présentent des inhibitions différentes sur intégrase en présence de manganèse ou de magnésium mais les interactions spécifiques au métal sont inconnues.





Les époxydibenzocyclooctènes présentent eux aussi une structure pliée avec des cycles aromatiques quasi-perpendiculaires. Testé en tant qu'inhibiteurs de l'intégrase, le tétrahydratétrahydroxyépoxydibenzocyclooctène **74** s'est révélé actif sur intégrase *in vitro* ($CI_{50} = 1,3 \mu M$), a une activité modérée sur la réplication ($CI_{50} = 98 \mu M$) et ne présente pas de toxicité cellulaire.



1- Kaposi's sarcoma in homosexual men : a report of eight cases.

Hymes, K.B.; Greene, J.B.; Marcus, A. *Lancet*, **1981**, 2, 598-600.

2- Rare cancer seen in 41 homosexuals.

Altman, L.K. *New York Times*, **1981**.

3- Gay compromise syndrome.

Brennan, R.O. ; Durack, D.T. *Lancet*, **1981**, 2, 1338-1339.

4- New homosexual disorder worries officials.

Altman, L.K. *New York Times*, **1982**.

5- An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia : initial manifestation of cellular immune dysfunction.

Masur, H.; Michelis, M.A.; Greene, J.B.; Onorato, I.; Stouwe, R.A.; Holzman, R.S.; Wormser, G.; Brettman, L.; Lange, M.; Murray, H.W.; Cunningham-Rundles, S. *N. Engl. J. Med.* **1981**, 305, 1431-1438.

6- Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dautet, C.; Axler-Blin, C.; Brun-Vezinet, F.; Rozioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. *Science* **1983**, 220, 865-867.

7- Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-Cell lymphoma.

Poiesz, B.J.; Ruscetti, F.W.; Gazdar, A.F.; Bunn, P.A.; Minna, J.D.; Gallo, R.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 7415-7419.

8- Sida et infection par le VIH.

Cassuto, J.P.; Pesce, A.; Quaranta, J.F. *Masson* **1996** (3^{ème} édition).

9- <http://anne.decocter.free.fr>

(<http://anne.decocter.free.fr/d1viro/vretrov0.html>)

10- Relationship of AIDS to other retroviruses.

Wain-Hobson, S.; Alizon, M.; Montagnier, L. *Nature* **1985**, *313*, 743.

11- Retroviruses.

Varmus, H. *Science* **1988**, *240*, 1427-1435.

12- Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.

Clavel, F.D.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, F.; Santos-Ferreira, M.O.; Laurent, A.G.; Danguet, C.; Katlama, C.; Rosioux, C. *Science* **1986**, *233*, 343-346.

13- Figure modifiée, figure d'origine accessible sur <http://www.tthhivclinic.com>

14- Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV.

Wain-Hobson, S.; Sonigo, P.; Danos, O.; Cole, S.; Alizon, M. *Cell* **1985**, *40*, 9-17.

15- Regulation of HIV and HTLV gene expression.

Varmus, H. *Genes Dev.* **1988**, *2*, 1055-1062.

16- Figure d'origine accessible sur <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/SIDA/2struct.htm>

17- Figure d'origine accessible sur <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/SIDA/3cycle.htm>

18- T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.

Klatzmann, D.; Champagne, E.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Guetard, D.; Hercend, T.; Gluckman, J.C.; Montagnier, L. *Nature* **1984**, *312*, 767-768.

19- Figure modifiée, figure d'origine accessible sur http://www.medecine.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-base/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/VIRO/V2-Pathogenese_virale.pdf

20- Figure d'origine accessible sur <http://www.theses.ulaval.ca/2005/22933/ch02.html#N1040A>

21- HIV and AIDS: 20 years of science.

Fauci, A.S. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 839-843.

22- Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS

Pommier, Y.; Johnson, A.A.; Marchand, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 236-248.

23- <http://www.aidsinfo.nih.gov>

24- Peptides corresponding to a predictive α -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection.

Wild, C.T.; Shugars, D.C.; Greenwell, T.K.; McDanal, C.B.; Matthews, T.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9770-9774.

25- Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry.

Kilby, J.M.; Hopkins, S.; Venetta, T.M.; DiMassimo, B.; Cloud, G.A.; Lee, J.Y.; Alldredge, L.; Hunter, E.; Lambert, D.; Bolognesi, D.; Matthews, T.; Johnson, M.R.; Nowak, M.A.; Shaw, G.M.; Saag, M.S. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1302-1307.

26- Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides.

Rimski, L.T.; Shugars, D.C.; Matthews, T.J. *J. Virol.* **1998**, *72*, 986-993.

27- Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy.

Wei, X.; Decker, J.M.; Liu, H.; Zhang, Z.; Arani, R.B.; Kilby, J.M.; Saag, M.S.; Wu, X.; Shaw, G.M.; Kappes, J.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1896-1905.

28- Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. II. Discovery of 1-[(ϵ ,4-dimethyl-3-pyridinyl)carbonyl]-4-methyl-4-[3(S)-methyl-4-[1(S)-[4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl]-1-piperazinyl]-piperidine N1-oxide (SCH-350634), an orally bioavailable, potent CCR5 antagonist.

Tagat, J.R.; Steensma, R.W.; McCombie, S.W.; Nazareno, D.V.; Lin, S.I.; Neustadt, B.R.; Cox, K.; Xu, S.; Wojcik, L.; Murray, M.G.; Vantumo, N.; Baroudy, B.M.; Strizki, J.M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3343-3346.

29- Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase.

Furman, P.A.; Fyfy, J.A.; St Clair, M.H.; Weinhold, K.; Rideout, J.L.; Freeman, G.A.; Nusinoff Lehrman, S.; Bolognesi, D.P.; Broder, S.; Mitsuya, H.; Barry, D.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8333-8337.

30- <http://www.uvp5.univ-paris5.fr/microbes/Etud/msbm/cours5/sld004.htm>

31- 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. Mitsuya, H.; Weinhold, K.J.; Furman, P.A.; St Clair, M.H.; Nusinoff Lehrman, S.; Gallo, R.C.; Bolognesi, D.; Barry, D.W.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7096-7100.

32- Nucleosides. V. The monomesylates of 1-(2'-deoxy- β -D-lyxofuranosyl)thymine. Horwitz, J.P.; Chua, J.; Noel, M. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2076-2078.

33- Antiretroviral activity of stavudine (2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, D4T). Riddler, S.A.; Anderson, R.E.; Mellors, J.W. *Antivir. Res.* **1995**, *27*, 189-203.

34- Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and *in vitro* toxicity of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH-189), a novel heterocyclic nucleosid analog. Soudeyans, H.; Yao, X.J.; Gao, Q.; Belleau, B.; Kraus, J.L.; Nguyen-Ba, N.; Spira, B.; Wainberg, M.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 1386-1390.

35- The separated enantiomers of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH-189) both inhibit human immunodeficiency virus replication *in vitro*. Coates, J.A.V.; Cammack, N.; Jenkinson, H.J.; Mutton, I.M.; Pearson, B.A.; Storer, R.; Cameron, J.M.; Penn, C.R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 202-205.

36- Asymmetric synthesis and biological evaluation of β -L-(2R,5S)- and α -L-(2R,5R)-1,3-oxathiolane-pyrimidine and -purine nucleosides as potential anti-HIV agents. Jeong, L.S.; Schinazi, R.F.; Beach, J.W.; Kim, H.O.; Nampalli, S.; Shanmuganathan, K.; Alves, A.J.; McMillan, A.; Chu, C.K.; Mathis, R. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 181-195.

37- Affinity of the antiviral enantiomers of oxathiolane cytosine nucleosides for human 2'-deoxycytidine kinase. Shewach, D.S.; Liotta, D.C.; Schinazi, R.F. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 1540-1543.

38- Didanosine. An update on its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV disease. Perry, C.M.; Balfour, J.A. *Drugs* **1996**, *52*, 928-962.

39- 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity.

Daluge, S.M.; Good, S.S.; Faletto, M.B.; Miller, W.H.; St Clair, M.H.; Boone, L.R.; Tisdale, M.; Parry, N.R.; Reardon, J.E.; Dornsife, R.E.; Averett, D.R.; Krenitsky, T.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1082-1093.

40- HIV-1 resistance profile of the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor beta-D-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine (ReversetTM).

Geleziunas, R.; Gallagher, K.; Zhang, H.; Bacheler, L.; Garber, S.; Wu, J.T.; Shi, G.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F.; Erickson-Viitanen, S. *Antiviral Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 49-59.

41- KP-1212/1461 a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis.

Harris, K.S.; Brabant, W.; Styrchak, S.; Gall, A.; Daifuku, R. *Antivir. Res.* **2005**, *67*, 1-9.

42- Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), bis(isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA.

Robbins, B.L.; Srinivas, R.V.; Kim, C.; Bischofberger, N.; Fridland, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 612-617.

43- Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults.

Barditch-Crovo, P.; Deeks, S.G.; Collier, A.; Safrin, S.; Coakley, D.F.; Miller, M.; Kearney, B.P.; Coleman, R.L.; Lamy, P.D.; Kahn, J.O.; McGowan, I.; Lietman, P.S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2733-2739.

44- A new lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine.

Miyasaka, T.; Tanaka, H.; Baba, M.; Hayakawa, H.; Walker, R.T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2507-2509.

45- Potent and selective inhibition of HIV-1 replication *in vitro* by a novel series of TIBO derivatives.

Pauwels, R.; Andries, K.; Desmyter, J.; Schols, D.; Kukla, M.J.; Breslin, H.J.; Raeymaekers, A.; Van Gelder, J.; Woestenborghs, R.; Heykants, J.; Schellekens, K.; Janssen, M.A.; De Clercq, E.; Janssen, P.A.J. *Nature* **1990**, *343*, 470-474.

46- Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor.

Merluzzi, V.J.; Hargrave, K.D.; Labadia, M.; Grozinger, K.; Skoog, M.T.; Wu, J.C.; Shih, C.K.; Eckner, K.; Hattox, S.; Adams, J.; Rosenthal, A.S.; Faanes, R.; Eckner, R.J.; Koup, R.A.; Sullivan, J.L. *Science* **1990**, *250*, 1411-1413.

47- Nonnucleoside inhibitors that potently and specifically block human immunodeficiency virus type 1 replication.

Romero, D.L.; Busso, M.; Tan, C.K.; Reusser, F.; Palmer, J.R.; Poppe, S.M.; Aristoff, P.A.; Downey, K.M.; So, A.G.; Resnick, L.; Tarpley, W.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8806-8810.

48- Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase: Molecular modelling and X-Ray structure investigations.

Schäfer, W.; Friebe, W.G.; Leinert, H.; Mertens, A.; Poll, T.; Von der Saal, W.; Zilch, H.; Nuber, B.; Ziegler, M.L. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 726-732.

49- Crystallographic analysis of the binding modes of thiazoloisoindolinone non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase and comparison with modelling studies.

Ren, J.; Esnouf, R.M.; Hopkins, A.L.; Stuart, D.I.; Stammers, D.K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3845-3851.

50- The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection.

De Clercq, E. *Antiviral. Res.* **1998**, *38*, 153-179.

51- Bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships of novel substituted indole analogues and the identification of 1-[(5-methanesulfonamido-1H-indol-2-yl)-carbonyl]-4-[3-[(1-methylethyl)amino]-pyridinyl]piperazine monomethanesulfonate (U-90152S), a second generation clinical candidate.

Romero, D.L.; Morge, R.A.; Genin, M.J.; Biles, C.; Busso, M.; Resnick, L.; Althaus, I.W.; Reusser, F.; Thomas, R.C.; Tarpley, W.G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1505-1508.

52- L-743,726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase.

Young, S.D.; Brichter, S.F.; Tran, L.O.; Payne, L.S.; Lumma, W.C.; Lyle, T.A.; Huff, J.R.; Anderson, P.S.; Olsen, D.B.; Carroll, S.S.; Pettibone, D.J.; O'Brien, J.A.; Ball, R.G.; Balani, S.K.; Lin, J.H.; Chen, I.W.; Schleif, W.A.; Sardana, V.V.; Long, W.J.; Byrnes, V.W.; Emini, E.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2602-2605.

53- Toward improved anti-HIV chemotherapy: therapeutic strategies for intervention with HIV infections.

De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 8333-8337.

54- Expanded-spectrum nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors inhibit clinically relevant mutant variants of human immunodeficiency virus type 1.

Corbett, J.W.; Ko, S.S.; Rodgers, J.D.; Jeffrey, S.; Bacheler, L.T.; Klabe, R.M.; Diamond, S.; Lai, C.M.; Rabel, S.R.; Saye, J.A.; Adams, S.P.; Trainor, G.L.; Anderson, P.S.; Erickson-Viitanen, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2893-2897.

55- Evolution of anti-HIV drugs candidate. Part 3: diarylpyrimidine (DAPY) analogues.

Ludovici, D.W.; De Corte, B.L.; Kukla, M.J.; Ye, H.; Ho, C.Y.; Lichtenstein, M.A.; Kavash, R.W.; Andries, K.; de Bethune, M.P.; Azijn, H.; Pauwels, R.; Lewe, P.J.; Heeres, J.; Koymans, L.M.H.; de Jonge, M.R.; Van Aken, K.J.A.; Daeyaert, F.F.D.; Das, K.; Arnold, E.; Janssen, P.A.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2235-2239.

56- HIV-1 integrase and RNase H activities as therapeutic targets.

Andreola, M.L.; Richard De Soultrait, V.; Fournier, M.; Parissi, V.; Desjobert, C.; Litvak, S. *Expert Opin. Ther. Targets* **2002**, *6*, 433-446.

57- Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors.

Klumpp, K.; Qi Hang, J.; Rajendran, S.; Yang, Y.; Derosier, A.; Wong Kai In, P.; Overton, H.; Parkes, K.E.B.; Cammack, N.; Martin, J.A. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6852-6859.

58- Illimaquinone, a selective inhibitor of the RNase H activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase.

Loya, S.; Tal, R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2009-2012.

59- Catalytic properties of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and 2.

Hizi, A.; Shaharabany, M.; Loya, S. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6230-6239.

60- Inhibition of the RNase H activity of HIV reverse transcriptase by azidothymidilate.

Tan, C.K.; Civil, R.; Mian, A.M.; So, A.G.; Downey, K.M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4831-4835.

61- Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activity of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-t-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone.

Borkow, G.; Fletcher, R.S.; Barnard, J.; Arion, D.; Motakis, D.; Dimitrienko, G.I.; Parniak, M.A. *Biochemistry* **1997**, *36*, 3179-3185.

62- Inhibitory effects of quinines on RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase.

Min, B.S.; Miyashiro, H.; Hattori, M. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 857-862.

63- Human immunodeficiency virus gene regulation as a target for antiviral chemotherapy.

Daelemans, D.; Vandamme, A.M.; De Clercq, E. *Antivir. Chem. Chemother.* **1999**, *10*, 1-14.

64- Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by piperazinyloxoquinoline derivatives.

Baba, M.; Okamoto, M.; Makino, M.; Kimura, Y.; Ikeuchi, T.; Sakaguchi, T.; Okamoto, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1250-1255.

65- Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication and cytokine production by fluoroquinoline derivatives.

Baba, M.; Okamoto, M.; Kawamura, M.; Makino, M.; Higashida, T.; Takashi, T.; Kimura, Y.; Ikeuchi, T.; Tetsuka, T.; Okamoto, T. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 1097-1103.

66- Inhibition of the RNA-dependant transactivation and replication of human immunodeficiency virus type 1 by a fluoroquinoline derivative K-37.

Okamoto, H.; Cujec, T.P.; Okamoto, M.; Peterlin, B.M.; Baba, M.; Okamoto, T. *Virology* **2000**, *272*, 402-408.

67- Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription.

Turpin, J.A.; Buckheit, R.W., Jr.; Derse, D.; Hollingshead, M.; Williamson, K.; Palamone, C.; Osterling, M.C.; Hill, S.A.; Graham, L.; Schaeffer, C.A.; Bu, M.; Huang, M.; Cholody, W.M.; Michejda, C.J.; Rice, W.G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 487-494.

68- Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication.

Chao, S.H.; Fujinaga, K.; Marion, J.E.; Taube, R.; Sausville, E.A.; Senderowicz, A.M.; Peterlin, B.M.; Price, D.H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28345-28348.

69- New developments in anti-HIV chemotherapy.

De Clercq, E. *Biochimica and Biophysica Acta* **2002**, *1587*, 258-275.

70- The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS.

Debouck, C. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **1992**, *8*, 153-164.

71- Human immunodeficiency virus protease. Bacterial expression and characterization of the purified aspartic protease.

Darke, P.L.; Leu, C.T.; Davis, L.J.; Heimback, J.C.; Diehl, R.E.; Hill, W.S.; Dixon, R.A.F.; Sigal, I.S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 2307-2312.

72- Human immunodeficiency virus 1 protease expressed in *Escherichia coli* behaves as a dimeric aspartic protease.

Meek, T.D.; Dayton, B.D.; Metcalf, B.W.; Dreyer, G.B.; Strickler, J.E.; Gorniak, J.G.; Rosenberg, M.; Moore, M.L.; Magaard, V.W.; Debouck, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1841-1845.

73- Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1.

Navia, M.A.; Fitzgerald, P.M.; McKeever, B.M.; Leu, C.T.; Heimbach, J.C.; Herber, W.K.; Sigal, I.S.; Darke, P.L.; Springer, J.P. *Nature* **1989**, *337*, 615-620.

74- Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease.

Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B.K.; Baldwin, E.; Weber, I.T.; Selk, L.M.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S.B. *Science* **1989**, *245*, 616-621.

75- Design, activity, and 2.8 °Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease.

Erickson, J.; Neidhart, D.J.; VanDrie, J.; Kempf, D.J.; Wang, X.C.; Norbeck, D.W.; Plattner, J.J.; Rittenhouse, J.W.; Turon, M.; Wideburg, N. *Science* **1990**, *249*, 527-533.

76- Approaches to the design of effective HIV-1 protease inhibitors.

Lebon, F.; Ledecq, M. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 455-477.

77- L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor.

Vacc, J.P.; Dorsey, B.D.; Schleif, W.A.; Levin, R.B.; McDaniel, S.L.; Darke, P.L.; Zugay, J.; Quintero, J.C.; Blahy, O.M.; Roth, E.; Sardana, V.V.; Schlabach, A.J.; Graham, P.I.; Condra, J.H.; Gotlib, L.; Holloway, M.K.; Lin, J.; Chen, I.W.; Vastag, K.; Ostovic, D.; Anderson, P.S.; Emini, E.A.; Huff, J.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4096-4100.

78- Preclinical pharmacokinetics and distribution to tissue of AG1343, an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 protease.

Shetty, B.V.; Kosa, M.B.; Khalil, D.A.; Webber, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 110-114.

79- Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus protease.

Patick, A.K.; Mo, H.; Markowitz, M.; Appelt, K.; Wu, B.; Musick, L.; Kalish, V.; Kaldor, S.; Reich, S.; Ho, D.; Webber, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 292-297.

80- Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase.

Craig, J.C.; Duncan, I.B.; Hockley, D.; Grief, C.; Roberts, N.A.; Mills, J.S. *Antivir. Res.* **1991**, *16*, 295-305.

81- New drugs-Reports of new drugs recently approved by FDA. Saquinavir.

Ohta, Y.; Shinkai, I. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 465-466.

82- Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme.

Kim, E.E.; Baker, C.T.; Dwyer, M.D.; Murcko, M.A.; Rao, B.G.; Tung, R.D.; Navia, M.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1181-1182.

83- ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans.

Kempf, D.J.; Marsh, K.C.; Denissen, J.F.; McDonald, E.; Vasavanonda, S.; Flentge, C.A.; Green, B.E.; Fino, L.; Park, C.H.; Kong, X.P.; Wideburg, N.E.; Saldivar, A.; Ruiz, L.; Kati, W.M.; Sham, H.L.; Robins, T.; Stewart, K.D.; Hsu, A.; Plattner, J.J.; Leonard, J.M.; Norbeck, D.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2484-2488.

84- ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease.

Sham, H.L.; Kempf, D.J.; Molla, A.; Marsh, K.C.; Kumar, G.N.; Chen, C.M.; Kati, W.; Stewart, K.; Lal, R.; Hsu, A.; Betebenner, D.; Korneyeva, M.; Vasavanonda, S.; McDonald, E.; Saldivar, A.; Wideburg, N.; Chen, X.; Niu, P.; Park, C.; Jayanti, V.; Grabowski, B.; Granneman, G.R.; Sun, E.; Japour, A.J.; Leonard, J.M.; Plattner, J.J.; Norbeck, D.W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 3218-3224.

85- BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be used in combination with other available antiretroviral agents.

Robinson, B.S.; Riccardi, K.A.; Gong, Y.F.; Guo, Q.; Stock, D.A.; Blair, W.S.; Terry, B.J.; Deminie, C.A.; Djang, F.; Colonno, R.J.; Lin, P.F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2093-2099.

86- In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632.

Gong, Y.F.; Robinson, B.S.; Rose, R.E.; Deminie, C.; Spicer, T.P.; Stock, D.; Colonno, R.J.; Lin, P.F. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2000**, *44*, 2319-2326.

87- Antiviral activity of the dihydropyrene PNU-140690, a new nonpeptidic human immunodeficiency virus protease inhibitor.

Poppe, S.M.; Slade, D.E.; Chong, K.T.; Hinshaw, R.R.; Pagano, P.J.; Markowitz, M.; Ho, D.D.; Mo, H.; Gorman, R.R.; Dueweke, T.J.; Thaisrivongs, S.; Tarpley, W.G. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1997**, *41*, 1058-1063.

88- Susceptibility to PNU-140690 (Tipranavir) of human immunodeficiency virus type 1 isolates derived from patients with multidrug resistance to other protease inhibitors.

Rusconi, S.; La Seta Catamancio, S.; Citterio, P.; Kurtagic, S.; Violon, M.; Balotta, C.; Moroni, M.; Galli, M.; d'Arminio-Monforte, A. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2000**, *44*, 1328-1332.

89- Improved cyclic urea inhibitors of the HIV-1 protease: synthesis, potency, resistance profile, human pharmacokinetics and X-ray crystal structure of DMP-450.

Hodge, C.N.; Aldrich, P.E.; Bacheler, L.T.; Chang, C.H.; Eyermann, C.J.; Garber, S.; Grubb, M.; Jackson, D.A.; Jadhav, P.K.; Korant, B.; Lam, P.Y.S.; Maurin, M.B.; Meek, J.L.; Otto, M.J.; Rayner, M.M.; Reid, C.; Sharpe, T.R.; Shum, L.; Winslow, D.L.; Erickson-Viitanen, S. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 301-314.

90- Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding.

Bushman, F.D.; Engelman, A.; Palmer, I.; Wingfield, P.; Craigie, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3428-3432.

91- Current developments in HIV chemotherapy.

Meadows, D.C.; Gervay-Hague, J. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 16-29.

92- Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function *in vitro*.

Engelman, A.; Craigie, R. *J. Virol.* **1992**, *66*, 6361-6369.

93- Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding.

Puras Lutzke, R.A.; Plasterk, R.H.A. *J. Virol.* **1998**, *72*, 4841-4848.

94- Molecular dynamics studies on the HIV-1 integrase catalytic domain.

Lins, R.D.; Briggs, J.M.; Straatsma, T.P.; Carlson, H.A.; Greenwald, J.; Choe, S.; Mc Cammon, J.A. *Biophys.* **1999**, *76*, 2999-3011.

95- Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding.

Chen, J.C.H.; Krucinski, J.; Miercke, L.J.W.; Finer-Moore, J.S.; Tang, A.H.; Leavitt, A.D.; Stroud, R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8233-8238.

96- Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein.

Wang, J.Y.; Ling, H.; Yang, W.; Craigie, R. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7333-7343.

97- Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia Coli* possesses selective DNA cleaving activity.

Sherman, P.A.; Fyfe, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5119-5123.

98- Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically.

Jones, K.S.; Coleman, J.; Merkel, G.W.; Laue, T.M.; Skalka, A.M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16037-16040.

99- A soluble active mutant of HIV-1 integrase.

Jenkins, T.M.; Engelman, A.; Ghirlando, R.; Craigie, R. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7712-7718.

100- HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics.

Craigie, R. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23213-23216.

101- Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity.

Zheng, R.; Jenkins, T.M.; Craigie, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13659-13664.

102- Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase.

Cai, M.; Zheng, R.; Caffrey, M.; Craigie, R.; Clore, G.M.; Gronenborn, A.M. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 567-577.

103- Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein.

Vink, C.; Oude Groeneger, A.M.; Plasterk, R.H. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1419-1425.

104- Zn^{2+} promotes the self-association of human immunodeficiency virus type 1 integrase *in vitro*.

Lee, S.P.; Xiao, J.; Knutson, J.R.; Lewis, M.S.; Han, M.K. *Biochemistry* **1997**, *36*, 173-180.

105- http://www.ibcp.fr/rhaser/creze/viro/S1_2005_HIV_Integrase.html#d0e97

106- Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases.

Dyda, F.; Hickman, A.B.; Jenkins, T.M.; Engelman, A.; Craigie, R.; Davies, D.R. *Science* **1994**, *266*, 1981-1986.

107- Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium.

Goldgur, Y.; Dyda, F.; Hickman, A.B.; Jenkins, T.M.; Craigie, R.; Davies, D.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9150-9154.

108- The catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase: ordered active site in the F185H mutant.

Bujacz, G.; Alexandratos, J.; Zhou-Liu, Q.; Clément-Mella, C.; Wlodawer, A. *FEBS Lett.* **1996**, *398*, 175-178.

109- Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases.

Maignan, S.; Guilloteau, J.P.; Zhou-Liu, Q.; Clément-Mella, C.; Mikol, V. *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 359-368.

110- Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase.

Lodi, P.J.; Ernst, J.A.; Kuszewski, J.; Hickman, A.B.; Engelman, A.; Craigie, R.; Clore, G.M.; Gronenborn, A.M. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9826-9833.

111- The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold.

Eijkelenboom, A.P.; Lutzke, R.A.; Boelens, R.; Plasterk, R.H.; Kaptein, R.; Hard, K. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 807-810.

112- <http://www.biocis.u-psud.fr/themes/themeid.php?id=3>

113- Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein.

Brown, P.O.; Bowerman, B.; Varmus, H.E.; Bishop, J.M. *Proc. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2525-2529.

114- Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex.

Wu, X.; Liu, H.; Xiao, H.; Conway, J.A.; Hehl, E.; Kalpana, G.V.; Prasad, V.; Kappes, J.C. *J. Virol.* **1999**, *73*, 2126-2135.

115- HIV-1 reverse transcriptase and integrase enzymes physically interact and inhibit each other.

Tasara, T.; Maga, G.; Hottiger, M.O.; Hübscher, U. *FEBS Lett.* **2000**, *507*, 39-44.

116- Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex.

Farnet, C.M.; Haseltine, W.A. *J. Virol.* **1991**, *65*, 1910-1915.

117- Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition.

Miller, M.D.; Farnet, C.M.; Bushman, F.D. *J. Virol.* **1997**, *71*, 5382-5390.

118- Molecular mechanisms in retrovirus DANN integration.

Asante-Appiah, E.; Skalka, A.M. *Antivir. Res.* **1997**, *36*, 139-156.

119- Both substrate and target oligonucleotide sequences affect *in vitro* integration mediated by human immunodeficiency virus type 1 integrase protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*.

Leavitt, A.D.; Rose, R.B.; Varmus, H.E. *J. Virol.* **1992**, *66*, 2359-2368.

120- Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection.

Pryciak, P.M.; Varmus, H.E. *Cell* **1992**, *69*, 769-780.

121- Concerted integration of retrovirus-like DNA by human immunodeficiency virus type 1 integrase.

Goodarzi, G.; Im, G.J.; Brackmann, K.; Grandgenett, D.J. *Viol.* **1995**, *69*, 6090-6097.

122- Structure-activity relationships of HIV-1 integrase inhibitors-enzyme-ligand interactions.

Maurin, C.; Bailly, F.; Cotelle, P. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1859-1874.

123- Patented HIV-1 integrase inhibitors (1998-2005).

Cotelle, P. *Recent Patents an Anti-Infective Drug Discovery* **2006**, *1*, 1-16.

124- A historical sketch of the discovery and development of HIV-1 integrase inhibitors.

Savarino, A. *Expert Opin. Investig. Drug* **2006**, *12*, 1507-1522.

125- Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells.

Hazuda, D.J.; Felock, P.; Witmer, M.; Wolfe, A.; Stillmock, K.; Grobler, J.A.; Espeseth, A.; Gabryelski, L.; Schleif, W.; Blau, C.; Miller, M.D. *Science* **2000**, *287*, 646-650.

126- 4-aryl-2,4-dioxobutanoic acid inhibitors of HIV-1 integrase and viral replication in cells.

Wai, J.S.; Egbertson, M.S.; Payne, L.S.; Fischer, T.E.; Embrey, M.W.; Tran, L.O.; Melamed, J.Y.; Langford, H.M.; Guare, J.P.; Zhuang, L.; Grey, V.E.; Vacca, J.P.; Holloway, M.K.; Naylor-Olsen, A.M.; Hazuda, D.J.; Felock, P.J.; Wolfe, A.L.; Stillmock, K.A.; Schleif, W.A.; Gabryelski, L.J.; Young, S.D. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4923-4926.

127- Structure activity of 3-aryl-1,3-diketo-containing compounds as HIV-1 integrase inhibitors.

Pais, C.G.; Zhang, X.; Marchand, C.; Neamati, N.; Cowansage, K.; Svarovskaia, E.S.; Pathak, V.K.; Tang, Y.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T.R. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3184-3194.

128- Azido-containing aryl beta-diketo acid HIV-1 integrase inhibitors.

Zhang, X.; Pais, C.G.; Svarovskaia, E.S.; Marchand, C.; Johnson, A.A.; Karki, R.G.; Nicklaus, M.C.; Pathak, V.K.; Pommier, Y.; Burke, T.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1215-1219.

129- Design and synthesis of photoactivatable aryl diketo acid-containing HIV-1 integrase inhibitors as potential affinity probes.

Zhang, X.; Marchand, C.; Pommier, Y.; Burke, T.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1205-1207.

130- Design and synthesis of novel indole beta-diketo acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors.

Sechi, M.; Derudas, M.; Dallochio, R.; Dessi, A.; Bacchi, A.; Sannia, L.; Carta, F.; Palomba, M.; Ragab, O.; Chan, C.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Dayam, R.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5298-5310.

131- Pharmacophore-based design of HIV-1 integrase strand-transfer inhibitors.

Barreca, M.L.; Ferro, S.; Rao, A.; De Luca, L.; Zappala, M.; Monforte, A.M.; Debyser, Z.; Witvrouw, M.; Chimirri, A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7084-7088.

132- Synthesis and biological evaluation of novel 5(H)-phenanthridin-6-ones, 5(H)-phenanthridin-6-one diketo acid, and polycyclic aromatic diketo acid analogs as new HIV-1 integrase inhibitors.

Patil, S.; Kamath, S.; Sanchez, T.; Neamati, N.; Schinazi, R.F.; Buolamwini, J.K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1212-1228.

133- Beta-diketo acids with purine nucleobase scaffolds: novel, selective inhibitors of the strand transfer step of HIV integrase.

Nair, V.; Uchil, V.; Neamati, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *16*, 1920-1923.

134- HIV integrase inhibitors with nucleobase scaffolds: discovery of a highly potent anti-HIV agent.

Nair, V.; Chi, G.; Ptak, R.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 445-447.

135- Design, synthesis, and anti-integrase activity of catechol-DKA hybrids.

Maurin, C.; Bailly, F.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.F.; Cotellet, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2978-2984.

136- Design and synthesis of novel dihydroxyindole-2-carboxylic acids as HIV-1 integrase inhibitors.

Sechi, M.; Angotzi, G.; Dallochio, R.; Dessi, A.; Carta, F.; Sannia, L.; Mariani, A.; Fiori, S.; Sanchez, T.; Movsessian, L.; Plasencia, C.; Neamati, N. *Antivir. Chem. Chemother.* **2004**, *15*, 67-81.

137- Rational design and synthesis of novel dimeric diketoacid-containing inhibitors of HIV-1 integrase: implication for binding to two metal ions on the active site of integrase.

Long, Y.Q.; Jiang, X.H.; Dayam, R.; Sanchez, T.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2561-2573.

138- Novel bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors: design, synthesis, biological activities, and mechanism of action.

Di Santo, R.; Costi, R.; Roux, A.; Artico, M.; Lavecchia, A.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Palmisano, L.; Andreotti, M.; Amici, R.; Galluzzo, C.M.; Nencioni, L.; Palamara, A.T.; Pommier, Y.; Marchand, C. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1939-1945.

139- Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C280S).

Marchand, C.; Johnson, A.A.; Karki, R.G.; Pais, C.G.; Zhang, X.; Cowansage, K.; Patel, T.A.; Nicklaus, M.C.; Burke, T.R.; Pommier, Y. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 600-609.

140- HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase.

Espeseth, A.S.; Felock, P.; Wolfe, A.; Witmer, M.; Grobler, J.; Anthony, N.; Egbertson, M.; Melamed, J.Y.; Young, S.; Hamill, T.; Cole, J.L.; Hazuda, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11244-11249.

141- Spectroscopic studies of diketoacids-metal interactions. A probing tool for the pharmacophoric intermetallic distance in the HIV-1 integrase active site.

Maurin, C.; Bailly, F.; Buisine, E.; Vezin, H.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.F.; Cotelle, P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5583-5586.

142- From ligand to complexes: inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by beta-diketo acid metal complexes.

Sechi, M.; Bacchi, A.; Carcelli, M.; Compari, C.; Duce, E.; Fisicaro, E.; Rogolino, D.; Gates, P.; Derudas, M.; Al-Mawsawi, L.Q.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4248-4260.

143- Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes.

Grobler, J.A.; Stillmock, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A.S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J.S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6661-6666.

144- Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by beta-diketo acids.

Marchand, C.; Zhang, X.; Pais, C.G.; Cowansage, K.; Neamati, N.; Burke, T.R.; Pommier, Y. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12596-12603.

145- Efficient 3D database screening for novel HIV-1 IN inhibitors.

Bareca, M.L.; Rao, A.; De Luca, L.; Zappala, M.; Gurnari, C.; Monforte, P.; De Clercq, E.; Van Maele, B.; Debyser, Z.; Witvrouw, M.; Briggs, J.M.; Chimirri, A. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1450-1455.

146- Preparation of indole derivatives with antiviral activity.

Fujishita, T.; Yoshinaga, T. (Shionogi & Co., Ltd., Japan) *PCT Int. Appl.* **1999**, *WO 9950245*.

147- S1360: *in vitro* activity of a new HIV-1 integrase inhibitor in clinical development.

Yoshinaga, T.; Sato, A.; Fujishita, T.; Fujiwara, T. *Oral Abstract, 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* **2002**.

148- S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline.

Billich, A. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4*, 206-209.

149- Novel inhibitors of HIV-1 integration.

Witvrouw, M.; Van Maele, B.; Vercammen, J.; Hantson, A.; Engelborghs, Y.; De Clercq, E.; Pannecouque, C.; Debyser, Z. *Curr. Drug. Metab.* **2004**, *5*, 291-304.

150- Design and synthesis of 8-hydroxy-[1,6]-naphthyridines as novel inhibitors of HIV-1 integrase *in vitro* and infected cells.

Zhuang, L.; Wai, J.S.; Embrey, M.W.; Fisher, T.E.; Egbertson, M.S.; Payne, L.S.; Guare, J.P., Jr.; Vacca, J.P.; Hazuda, D.J.; Felock, P.J.; Wolfe, A.L.; Stillmock, K.A.; Witmer, M.V.; Moyer, G.; Schleif, W.A.; Gabryelski, L.J.; Leonard, Y.M.; Lynch, J.J.; Michelson, S.R.; Young, S.D. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 453-456.

151- The potential for cross resistance between S-1360, L-870810 and other structurally diverse inhibitors of HIV-1 integrase strand transfer.

Hazuda, D. *Oral Abstract, 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* **2003**.

152- Styrylquinoline derivatives: a new class of potent HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in CEM cells.

Mekouar, K.; Mouscadet, J.F.; Desmaële, D.; Subra, F.; Leh, H.; Savouré, D.; Auclair, C.; d'Angelo, J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2846-2857.

153- Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture.

Zouhiri, F.; Mouscadet, J.F.; Mekouar, K.; Desmaële, D.; Savouré, D.; Leh, H.; Subra, F.; Le Bret, M.; Auclair, C.; d'Angelo, J. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1533-1540.

154- Linker-modified quinoline derivatives targeting HIV-1 integrase: synthesis and biological activity.

Bénard, C.; Zouhiri, F.; Normand-Bayle, M.; Danet, M.; Desmaële, D.; Leh, H.; Mouscadet, J.F.; Mbemba, G.; Thomas, C.M.; Bonnenfant, S.; Le Bret, M.; d'Angelo, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2473-2476.

155- New HIV-1 replication inhibitors of the styrylquinoline class bearing aroyl/acyl groups at the C-7 position: synthesis and biological activity.

Normand-Bayle, M.; Bénard, C.; Zouhiri, F.; Mouscadet, J.F.; Leh, H.; Thomas, C.M.; Mbemba, G.; Desmaële, D.; d'Angelo, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4019-4022.

156- HIV-1 replication inhibitors of the styrylquinoline class: incorporation of a masked diketo acid pharmacophore.

Zouhiri, F.; Desmaële, D.; d'Angelo, J. Ourevitch, M.; Mouscadet, J.F.; Leh, H.; Le Bret, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8189-8192.

157- HIV-1 replication inhibitors of the styrylquinoline class: introduction of an additional carboxyl group at the C-5 position of the quinoline.

Zouhiri, F.; Danet, M.; Bénard, C.; Normand-Bayle, M.; Mouscadet, J.F.; Leh, H.; Thomas, C.M.; Mbemba, G.; d'Angelo, J.; Desmaële, D. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2201-2205.

158- Mechanism of HIV-1 integrase inhibition by styrylquinoline derivatives *in vitro*.

Deprez, E.; Barbe, S.; Kolaski, M.; Leh, H.; Zouhiri, F.; Auclair, C.; Brochon, J.C.; Le Bret, M.; Mouscadet, J.F. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 85-98.

159- Styrylquinolines, integrase inhibitors acting prior to integration: a new mechanism of action for anti-integrase agents.

Bonnenfant, S.; Thomas, C.M.; Vita, C.; Subra, F.; Deprez, E.; Zouhiri, F.; Desmaële, D.; d'Angelo, J.; Mouscadet, J.F.; Leh, H. *J. Virol.* **2004**, *78*, 5728-5736.

160- Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics.

Sato, M.; Motomura, T.; Aramaki, H.; Matsuda, T.; Yamashita, M.; Ito, Y.; Kawakami, H.; Matsuzaki, Y.; Watanabe, W.; Yamataka, K.; Ikeda, S.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Shinkai, H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1506-1508.

161- Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds.

Fesen, M.R.; Pommier, Y.; Leteurtre, F.; Hiroguchi, S.; Yung, J.; Kohn, K.W. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 595-608.

162- Flavonoids in health and disease.

Rice-Evans, C.E.; Packer, L. *Marcel Dekker Inc.*, New York, **1998**.

163- Thalassiolins A-C: new marine-derived inhibitors of HIV cDNA integrase.

Rowley, D.C.; Hansen, M.S.T.; Rhodes, D.; Sotriffer, C.A.; Ni, H.; McCammon, J.A.; Bushman, F.D.; Fenical, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3619-3625.

164- Integrastatins: structure and HIV-1 integrase inhibitory activities of two novel racemic tetracyclic aromatic heterocycles produced by two fungal species.

Singh, S.B.; Zink, D.L.; Quamina, D.S.; Pelaez, F.; Teran, A.; Felock, P.; Hazuda, D.J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2351-2354.

165- HIV-1 integrase inhibitory: a decade of research and two drugs in clinical trial.

Johnson, A.A.; Marchand, C.; Pommier, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 671-686.

166- Isolation, structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites.

Singh, S.B.; Jayasuriya, H.; Dewey, R.; Polishook, J.D.; Dombrowski, A.W.; Zink, D.L.; Guan, Z.; Collado, J.; Platas, G.; Pelaez, F.; Felock, P.J.; Hazuda, D.J. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 721-731.

167- Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase.

Fesen, M.R.; Kohn, K.W.; Leteurtre, F.; Pommier, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2399-2403.

168- Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit integrase.

Robinson, W.E., Jr.; Reinecke, M.G.; Abdel-Malek, S.; Jia, Q.; Chow, S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6326-6331.

169- Anti-human immunodeficiency virus activity of 3,4,5-tricafeoylquinic acid in cultured cells of lettuce leaves.

Tamura, H.; Akioka, T.; Ueno, K.; Chujyo, T.; Okazaki, K.I.; King, P.J.; Robinson Jr., W.E. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 396-400.

170- Chicoric acid analogues as HIV-1 integrase inhibitors.

Lin, Z.; Neamati, N.; Zhao, H.; Kiryu, Y.; Turpin, J.A.; Aberham, C.; Strebler, K.; Kohn, K.; Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; Debyser, Z.; De Clercq, E.; Rice, W.G.; Pommier, Y.; Burke, T.R., Jr. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1401-1414.

171- Identification and localization of hydroxycinnamoyl and flavonol derivatives from endive (*Cichorium endivia* L. cv Grande Maraichere) leaves.

Goupy, P.M.; Varoquaux, P.J.A.; Nicolas, J.J.; Macheix, J.J. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2116-2121.

172- Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase.

McDougall, B.; King, P.J.; Wu, B.W.; Hostomsky, Z.; Reinecke, M.G.; Robinson, W.E., Jr. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 140-146.

173- Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase.

Robinson, W.E.; Cordeiro, M.; Abdel-Malek, S.; Jia, Q.; Chow, S.A.; Reinecke, M.G.; Mitchell, W.M. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 846-855.

174- Resistance to the anti-human immunodeficiency virus type 1 compound L-chicoric acid results from a single mutation at amino acid 140 of integrase.

King, P.J.; Robinson, W.E., Jr. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8420-8424.

175- Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters.

Pluymers, W.; Neamati, N.; Pannecouque, C.; Fikkert, V.; Marchand, C.; Burke, T.R., Jr.; Pommier, Y.; Schols, D.; De Clercq, E.; Debyser, Z.; Witvrouw, M. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 641-648.

176- Rosmarinic acid.

Petersen, M.; Simmonds, M.S.J. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 121-125.

177- Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action.

Mazumder, A.; Neamati, N.; Sunder, S.; Schulz, J.; Pertz, H.; Eich, E.; Pommier, Y. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3057-3063.

178- HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*.

Tewtrakul, S.; Miyashiro, H.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T.; Yoshinaga, T.; Fujiwara, T.; Supavita, T.; Yuenyongsawad, S.; Rattanasuwon, P.; De-Adisai, S. *Phytotherapy Res.* **2003**, *17*, 232-239.

179- Inhibitory effects of *Cordia spinescens* extracts and their constituents on reverse transcriptase and protease from human immunodeficiency virus.

Aura Lim, Y.; Kojima, S.; Nakamura, N.; Miyashiro, H.; Fushimi, H.; Komatsu, K.; Hattori, M.; Shimotohno, K.; Gupta, M.P.; Correa, M. *Phytotherapy Res.* **1997**, *11*, 490-495.

180- Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza*.

Abd-Elazem, I.S.; Chen, H.S.; Bates, R.B.; Huang, R.C.C. *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 91-106.

181- Inhibition of human immunodeficiency virus integrase by bis-catechols.

LaFemina, R.L.; Graham, P.L.; LeGrow, K.; Hastings, J.C.; Wolfe, A.; Young, S.D.; Emini, E.A.; Hazuda, D.J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 320-324.

182- Differential divalent cation requirements uncouple the assembly and catalytic reactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase.

Hazuda, D.J.; Felock, P.J.; Hastings, J.C.; Pramanik, B.; Wolfe, A.L. *J. Virol.* **1997**, *71*, 7005-7011.

183- Differential inhibition of HIV-1 preintegration complexes and purified integrase protein by small molecules.

Farnet, C.M.; Wang, B.; Lipford, J.R.; Bushman, F.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9742-9747.

184- Human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: new aromatic hydroxylated inhibitors and studies of the inhibition mechanism.

Farnet, C.M.; Wang, B.; Hansen, M.; Lipford, J.R.; Zalkow, L.; Robinson, W.E., Jr.; Siegel, J.; Bushman, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2245-2253.

185- Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus.

Schinazi, R.F.; Chu, C.K.; Babu, J.R.; Oswald, B.J.; Saalman, V.; Cannon, D.L.; Eriksson, B.F.H.; Nasr, M. *Antivir. Res.* **1990**, *13*, 265-272.

186- Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet.

Bailly, F.; Cotelle, P. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1811-1818.

187- Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase.

Burke, T.R., Jr.; Fesen, M.R.; Mazumder, A.; Wang, J.; Carothers, A.M.; Grunberger, D.; Driscoll, J.; Kohn, K.; Pommier, Y. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4171-4178.

188- Arylamide inhibitors of HIV-1 integrase.

Zhao, H.; Neamati, N.; Mazumder, A.; Sunder, S.; Pommier, Y.; Burke, T.R., Jr. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1186-1194.

189- Arylthiocyanate-containing esters of caffeic acid designed as affinity ligands for HIV-1 integrase.

Zhang, X.; Neamati, N.; Lee, Y.K.; Orr, A.; Brown, R.D.; Whitaker, N.; Pommier, Y.; Burke, T.R., Jr. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1649-1657.

190- Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeoylglucosides.

Kim, S.N.; Lee, J.Y.; Kim, H.J.; Shin, C.G.; Park, H.; Lee, Y.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1879-1882.

191- Dicafeoyl- or digalloyl pyrrolidine and furan derivatives as HIV integrase inhibitors.

Hwang, D.J.; Kim, S.N.; Choi, J.H.; Lee, Y.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *9*, 1429-1437.

192- Structure-activity relationships: analogues of the dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication.

King, P.J.; Ma, G.; Miao, W.; Jia, Q.; McDougall, B.R.; Reinecke, M.G.; Cornell, C.; Kuan, J.; Kim, T.R.; Robinson, W.E., Jr. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 497-509.

193- Dicafeoyltartaric acid analogues inhibit human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase and HIV-1 replication at non-toxic concentrations.

Reinke, R.A.; King, P.J.; Victoria, J.G.; McDougall, B.R.; Ma, G.; Mao, Y.; Reinecke, M.G.; Robinson, W.E., Jr. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3669-3683.

194- Active site binding modes of HIV-1 integrase inhibitors.

Sotriffer, C.A.; Ni, H.; McCammon, J.A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4109-4117.

195- Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: a platform for antiviral drug design.

Goldgur, Y.; Craigie, R.; Cohen, G.H.; Fujiwara, T.; Yoshinaga, T.; Fujishita, T.; Sugimoto, H.; Endo, T.; Murai, H.; Davies, D.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13040-13043.

196- Design, synthesis, and biological evaluation of chicoric acid analogs as inhibitors of HIV-1 integrase.

Charvat, T.T.; Lee, D.; Robinson, W.E.; Chamberlin, A.R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4552-4567.

197- A next class of HIV-1 integrase inhibitors: the 3,3,3',3'-tetramethyl-1,1'-spirobis(indan)-5,5',6,6'-tetrol family.

Molteni, V.; Rhodes, D.; Rubins, K.; Hansen, M.; Bushman, F.D.; Siegel, J.S. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2031-2039.

Chapitre 2 : Synthèse de quelques polyphénols d'origine naturelle

INTRODUCTION

Déjà connue à l'époque des pharaons, la sauge (*Salvia officinalis*, Europe et *Salvia miltiorrhiza*, Asie) a traversé les siècles et les continents aussi bien comme aliment que comme médicament. Ses propriétés souveraines pour favoriser la digestion et traiter les infections des muqueuses étaient déjà connues des Grecs de l'Antiquité. Ce même usage médicinal fait aussi partie de la médecine ayurvédique (Inde) et de la médecine traditionnelle chinoise. Pline l'Ancien (antiquité grecque) rapportait qu'elle pouvait améliorer la mémoire. A l'époque des grandes épidémies de peste en Europe, elle était l'un des composants du célèbre « vinaigre des quatre voleurs » réputé protéger contre la peste. Elle est, encore de nos jours, souvent associée à d'autres plantes pour la préparation de décoctions ou d'infusions, de sirops ou de pommades.

Plusieurs acides phénoliques solubles dans l'eau ont été isolés à partir de la sauge et un grand nombre d'entre eux présentent le squelette de l'acide caféique, classés en dimères, trimères, tétramères et oligomères tels que les acides salvianoliques, lithospermiques et yunnanéiques.¹ La fonction carboxylique du squelette de l'acide caféique peut être reliée à une unité acide 3,4-dihydroxyphényllactique par l'atome d'oxygène alcoolique, l'exemple le plus simple étant l'acide rosmarinique (figure 18).



Figure 14: Salvia Officinalis



Figure 15: Salvia miltiorrhiza

Les propriétés biologiques de l'acide salvianolique A² ont été particulièrement étudiées; celui-ci présente des activités antitumorale et antiinflammatoire, une inhibition de l' H^+,K^+ -ATPase gastrique et des propriétés antioxydantes.³ D'après diverses études, la sauge a été définie comme l'espèce possédant le pouvoir naturel oxydant le plus fort.^{4,5} Ses effets antioxydants ont été attribués aux principaux composés phénoliques, l'acide rosmarinique (un dimère de l'acide caféique) et l'acide carnosique.^{6,7,8}

Il a été récemment rapporté que des dérivés d'acide caféique naturels présentent des activités anti-VIH.⁹ Les acides rosmariniques et lithospermiques peuvent servir de composés « pionniers » pour le développement de nouveaux agents anti-VIH de source naturelle.¹⁰ Depuis plusieurs années, notre laboratoire est impliqué dans la synthèse de polyphénols naturels (extraits d'éponges,¹¹ d'algues¹² ou de sauges^{13,14,15,16}) et le design de nouveaux inhibiteurs d'intégrase du VIH-1.^{13,17,18,19}

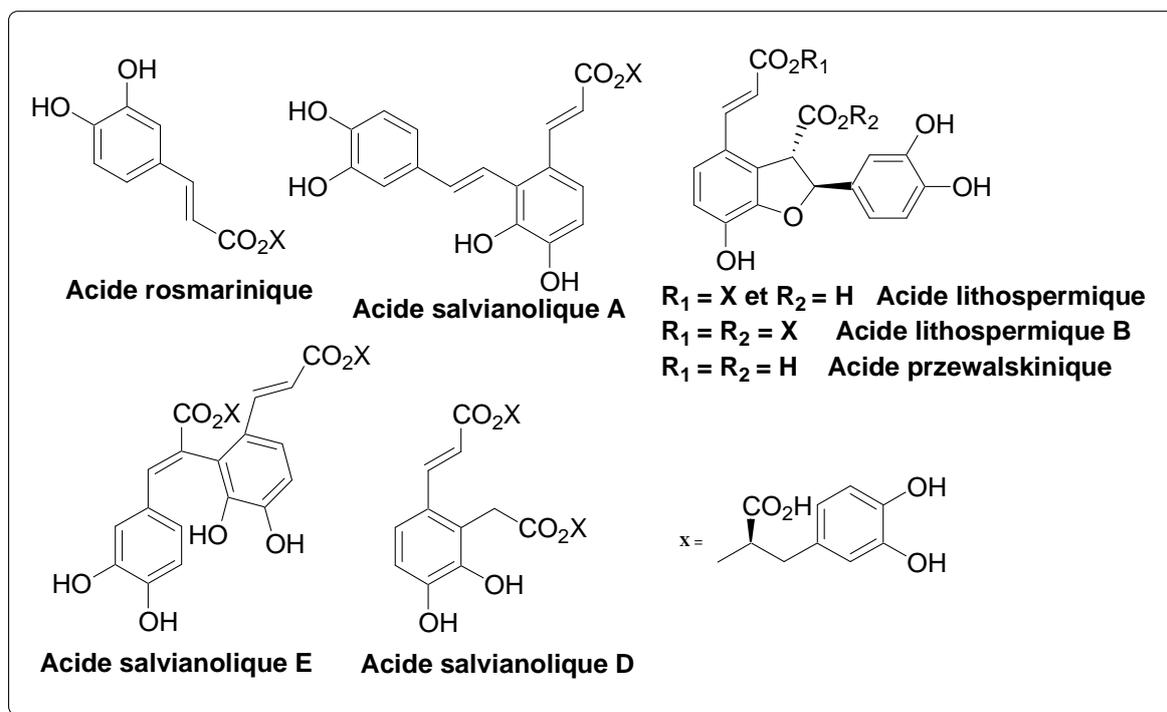


Figure 16 : exemples d'acides salvianoliques

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux synthèses totales de la partie acide des acides salvianoliques D et E²⁰ qui seront développées dans la première partie de ce chapitre.

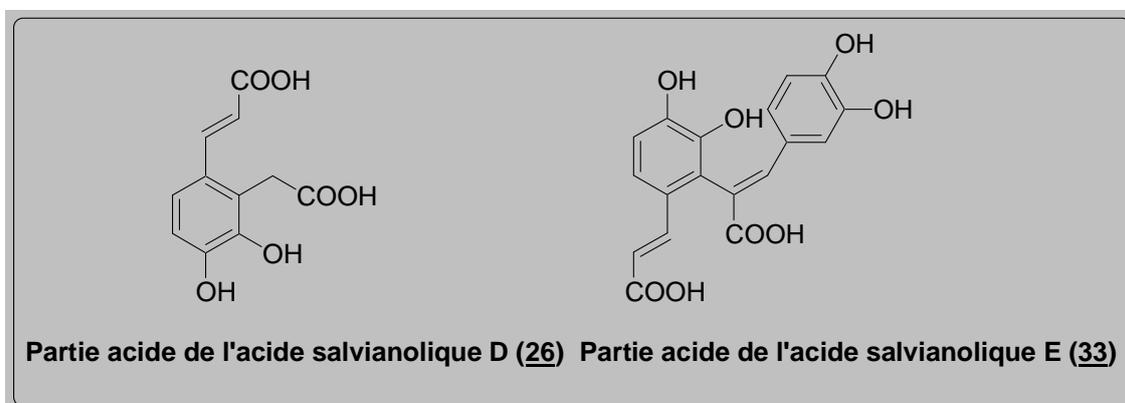


Figure 17 : Les molécules cibles du sous chapitre A

Ces composés sont extraits des racines de sauge chinoise, la *Salvia miltiorrhiza*, très connue en médecine traditionnelle chinoise pour le traitement de la bronchite, des brûlures, des maladies cardiovasculaires, rénales et hépatiques, du glaucome et des crises cardiaques.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de molécules provenant de la sauge *Salvia officinalis*.

En plus de l'acide salvianolique K (un trimère de l'acide caféique), de l'acide sagérinique (un tétramère) et l'acide rosmarinique, Lu *et al.* ont aussi caractérisé trois trimères de l'acide caféique, l'acide mélitrique A, le méltrate de méthyle A et la sagecoumarine.^{21,22} Ce dernier composé est particulièrement intéressant puisqu'il est le premier oligomère de l'acide caféique possédant une structure de coumarine. Les RMN ¹H et ¹³C de la sagecoumarine montrent que c'est une 3,6,7-trihydroxycoumarine qui est liée via une liaison éther sur sa position C-3 à un acide rosmarinique (figure 20). La sagecoumarine présente des activités antioxydantes élevées.²³

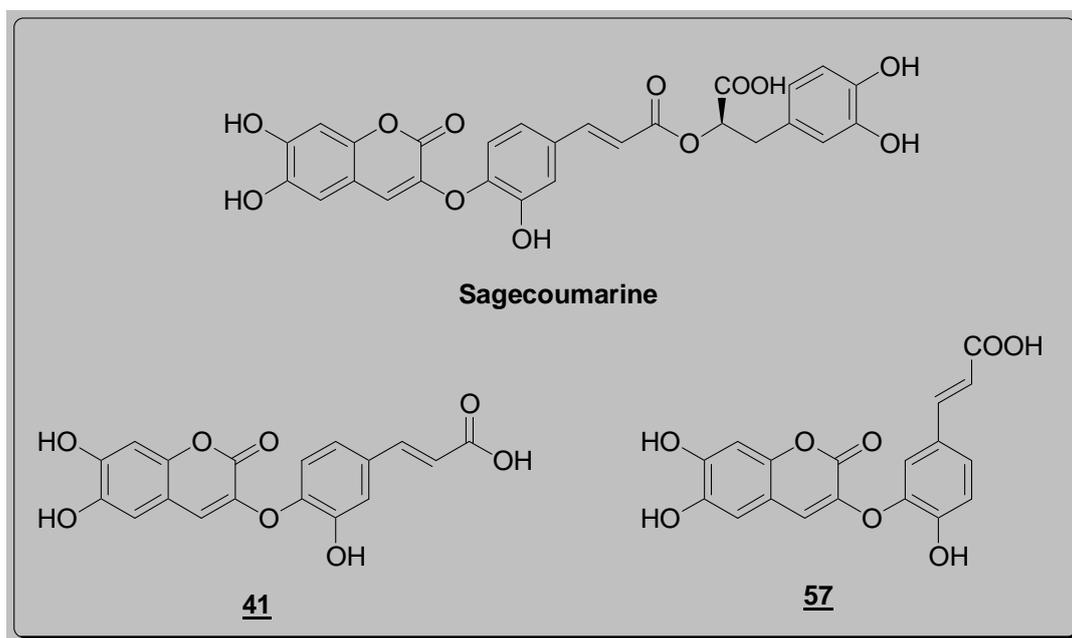


Figure 18 : Structures de la sagecoumarine et des conjugués caféoyl-coumarines.

Molécules cibles du sous-chapitre B

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse et à l'évaluation pharmacologique de molécules polyhydroxylées, dérivées de la sagedcoumarine sous la forme de deux conjugués caféoylcoumarines **41** et **57**, la synthèse étant développée dans la seconde partie.

Notre intérêt pour les polyphénols naturels,^{15,16} de la famille des décarboxynéolignanes tels que l'acide salvianolique F^{13,14} nous a conduit à nous intéresser aux acides tournefoliques A et B qui sont isolés de *Tournefortia sarmentosa* (Boraginaceae) tandis que les acides salvianoliques F et C sont isolés d'une variété de sauge (Lamiaceae).

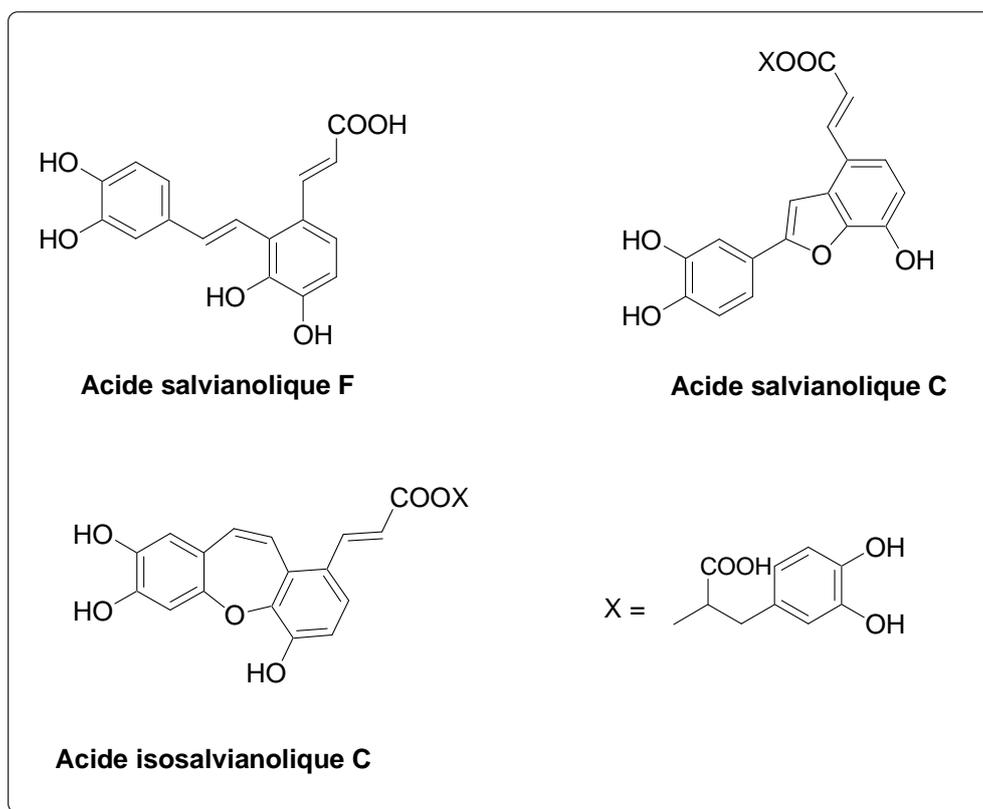


Figure 19 : exemple d'acides salvianoliques

Tournefortia sarmentosa est utilisé à Taiwan comme agent de désintoxication, comme agent anti-inflammatoire et pour l'amélioration de la circulation sanguine. Lin *et al.*²⁴ ont décrit en 1999 l'isolation de cinq nouveaux composés phénoliques provenant des extraits organiques de cette plante. Les extraits éthanoliques aqueux inhibent la peroxydation lipidique des lipoprotéines de basse densité (LDL) induite par les ions Cu²⁺. Poursuivant leurs travaux sur les composés phénoliques aux propriétés antioxydantes,²⁵ ils se sont intéressés aux fractions hydrosolubles de *Tournefortia sarmentosa*. Ils ont isolé et élucidé la structure de

trois nouveaux composés de la famille des oligomères de l'acide caféique tels que le tournefolal **72**, l'acide tournefolique A **74** et l'acide tournefolique B **79** ainsi que des polyphénols tels que l'acide salvianolique A, l'acide isosalvianolique C, l'acide lithospermique (constituant principal), l'acide salvianolique F et l'acide rosmarinique provenant des tiges de la plante.



235. *Tournefortia sarmentosa* Lam. 冷飯藤 © S. Y. Lu

Figure 20 : *Tournefortia sarmentosa*

La synthèse de dimères décarboxylés d'acide caféique tels que l'acide tournefolique A²⁵ (la partie caféique acide de l'acide salvianolique C) et l'acide tournefolique B (la partie caféique acide de l'acide isosalvianolique C) sera développée dans la troisième partie de ce chapitre.

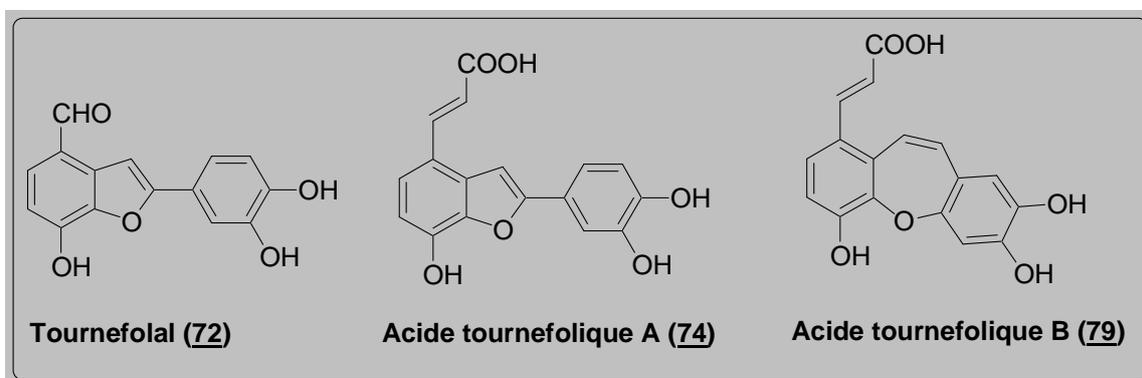


Figure 21 : Les molécules cibles du sous-chapitre C

En 1969, un nouveau polyphénol, l'acide fukinolique, a été isolé des *Petasites Japonicus* par Sakamura *et al.*²⁶ Son hydrolyse alcaline a donné l'acide caféique et un nouveau polyphénol, appelé acide fukiiique. Matsumoto *et al.*²⁷ ont proposé la structure de l'acide fukiiique et Yoshihara *et al.*^{28,29} ont déterminé la stéréochimie de cet acide qui est la même que celle de l'acide piscidique (figure 25). Il s'agit de l'acide (2S,3R)-2,3-dihydroxy-4-(3,4-dihydroxyphényl)-3-carboxybutyrique. D'autres esters d'acides hydroxycinnamiques, comme les acides cimicifugiques, les acides fukinoliques ont aussi été isolés des espèces *Cimicifuga*.³⁰

L'actée à grappes (en anglais black cohosh, *Cimicifuga racemosa*), provient de la famille des renonculacées. Cette plante est originaire des sous-bois ombragés du sud-est canadien et du nord est des Etats-Unis et peut atteindre jusqu'à 2,5 mètres de hauteur. Les parties utilisées sont la racine et les rhizomes.



Figure 22 : Actée à grappes

Les extraits sont utilisés depuis quelques années par de nombreuses femmes comme alternative naturelle à la thérapie hormonale de substitution (Hormone Replacement Therapy : HRT) lors de troubles de la ménopause. En présence d'un cancer du sein, l'HRT est contre-indiquée, car des études ont montré que la prolifération de cellules cancéreuses du sein isolées était augmentée par l'action hormonale des oestrogènes. Comme des études similaires avec les extraits de *Cimicifuga* manquaient encore, les autorités ont aussitôt considéré les préparations à base de *Cimicifuga* comme contre-indiquées chez les patientes atteintes de cancer du sein. De ce fait, une précaution d'emploi a été incluse dans l'information aux patients de ces préparations.

Un groupe de recherche international a examiné l'effet de *Cimicifuga racemosa* sur des cellules cancéreuses du sein. Leur étude, récemment publiée,³¹ démontre que des extraits de *Cimicifuga racemosa* possèdent un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB231 et favorisent également leur mort programmée (apoptose). Dans le même temps, un groupe américain³² a confirmé ces résultats. Parmi les différents composés des extraits figurent les glycosides triterpènes responsables de l'augmentation de l'activité inhibitrice et spécifiquement l'actéine. L'actéine a aussi révélé une activité anti-VIH.³³ Les autres constituants sont des esters phénoliques qui n'ont pas d'effet sur la prolifération des cellules MCF-7.³⁴

Les similarités structurales avec un inhibiteur connu de l'intégrase du VIH-1,³⁵ l'acide chicorique, nous ont conduit à synthétiser le mélange racémique de l'acide fukiique **85** et à évaluer ses propriétés antivirales. L'acide fukiique possède une partie acide tartrique substituée par un groupement 3,4-dihydroxybenzyle (comme l'acide L-chicorique). L'acide tartrique et le catéchol sont connus pour lier efficacement l'ion magnésium,³⁶ ce qui laisse suggérer que l'acide fukiique pourrait agir comme inhibiteur de l'intégrase du VIH-1 par une interaction avec l'ion magnésium (ou les ions magnésium) présent dans le site actif de l'enzyme.

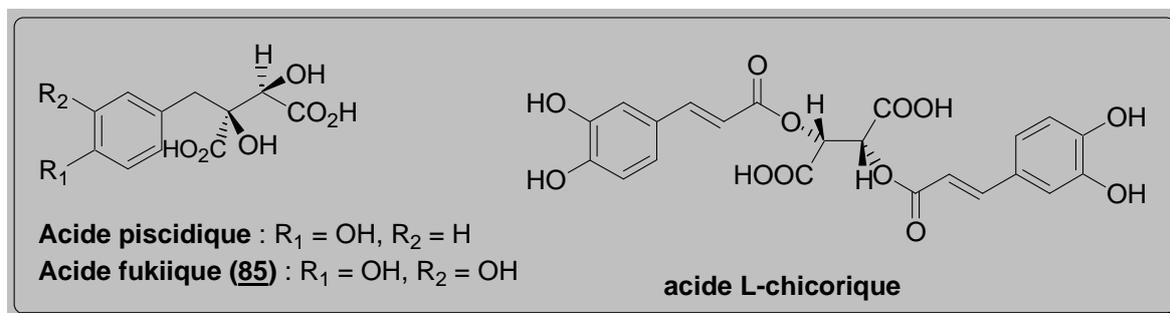


Figure 23 : Les acides piscidiques, L-chicorique et fukiique (acide fukiique :molécule cible du sous-chapitre D)

A. Les acides salvianoliques D et E

La synthèse des parties acides des acides salvianoliques D et E méthylées a déjà été décrite.^{37,38,39} Elle passe par la construction d'un précurseur **7** (figure 26) commun à la synthèse des deux parties acides des acides salvianoliques D et E.

1. Synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique D (**26**)

Nous avons essayé de reproduire cette synthèse en ayant pour but de déprotéger les fonctions hydroxyles par action de tribromure de bore en dernière étape.

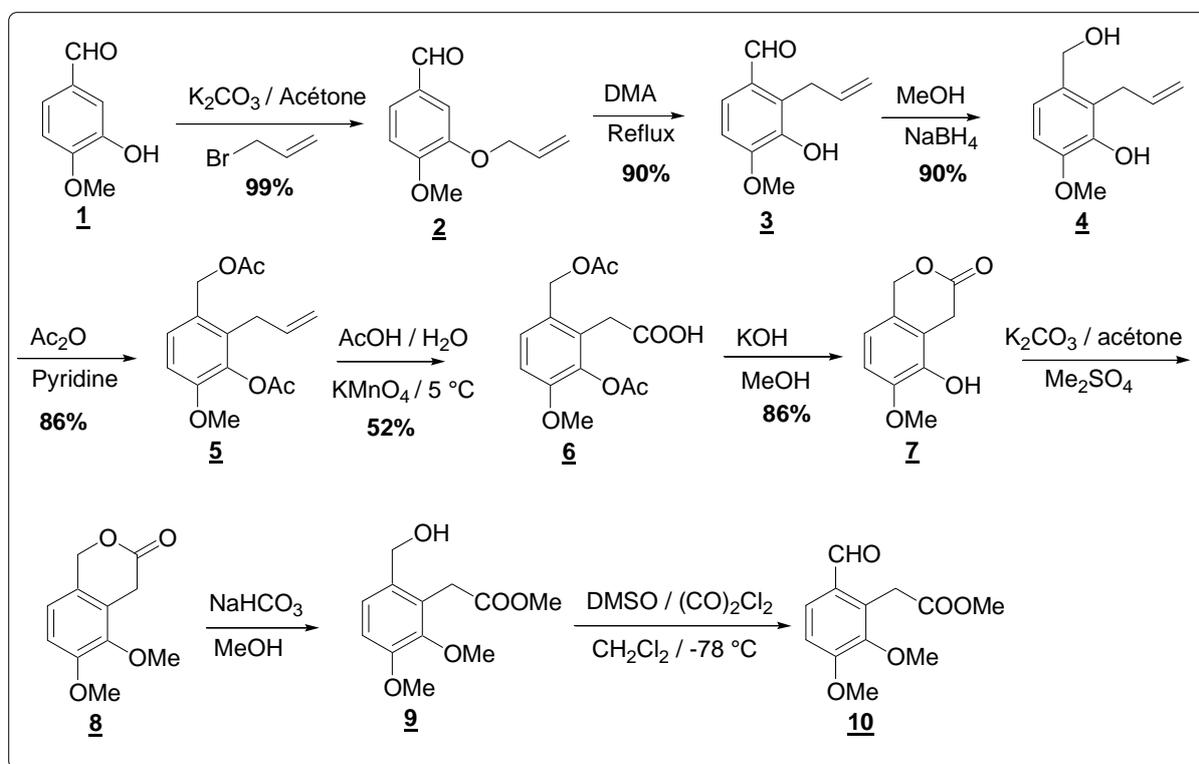


Schéma 1: Synthèse de la molécule **10**, décrite par Ai *et al.*^{37,38}

La 2-allylisovanilline **3** est facilement obtenue en deux étapes à partir de l'isovanilline **1** avec un rendement global de 89%.

La première étape consiste à allyler l'isovanilline en présence de carbonate de potassium. Après 2 h de reflux dans l'acétone anhydre, le 3-allyloxy-4-méthoxybenzaldéhyde **2** est obtenu de manière quantitative. Une réaction de Claisen (i.e. un réarrangement sigmatropique [3,3]) est ensuite nécessaire pour obtenir **3**. Elle s'effectue dans le

diméthylacétamide à 180 °C et permet d'obtenir avec un rendement de 90% la 2-allylisovanilline.

L'aldéhyde **3** est ensuite réduit en alcool benzylique **4** par action de borohydrure de sodium avec 90% de rendement. Les fonctions alcools sont ensuite protégées par acétylation (86%) et le groupement allyle de **5** est oxydé en acide carboxylique dans les conditions oxydantes de Lemieux-Rudolff pour conduire à **6**. Cette étape nous a posé beaucoup de difficultés. Finalement nous avons obtenu **6** avec 52% de rendement. Tous nos efforts pour atteindre le rendement décrit par Ai *et al.*^{37,38} ont été vains. Une hydrolyse à l'aide de potasse dans le méthanol nous fournit la lactone **7**, l'intermédiaire clé commun avec un rendement de 86%. Nous n'avons ensuite jamais réussi à protéger la fonction phénol sous forme de méthoxy (**7**→**8**, schéma 1) alors que Ai *et al.* annonçaient 20% de rendement. Nous avons alors essayé d'ouvrir directement la lactone mais nous n'avons obtenu que des produits de dégradation.

Pendant tous ces essais, un article est paru traitant notamment de la synthèse de **10**.⁴⁰

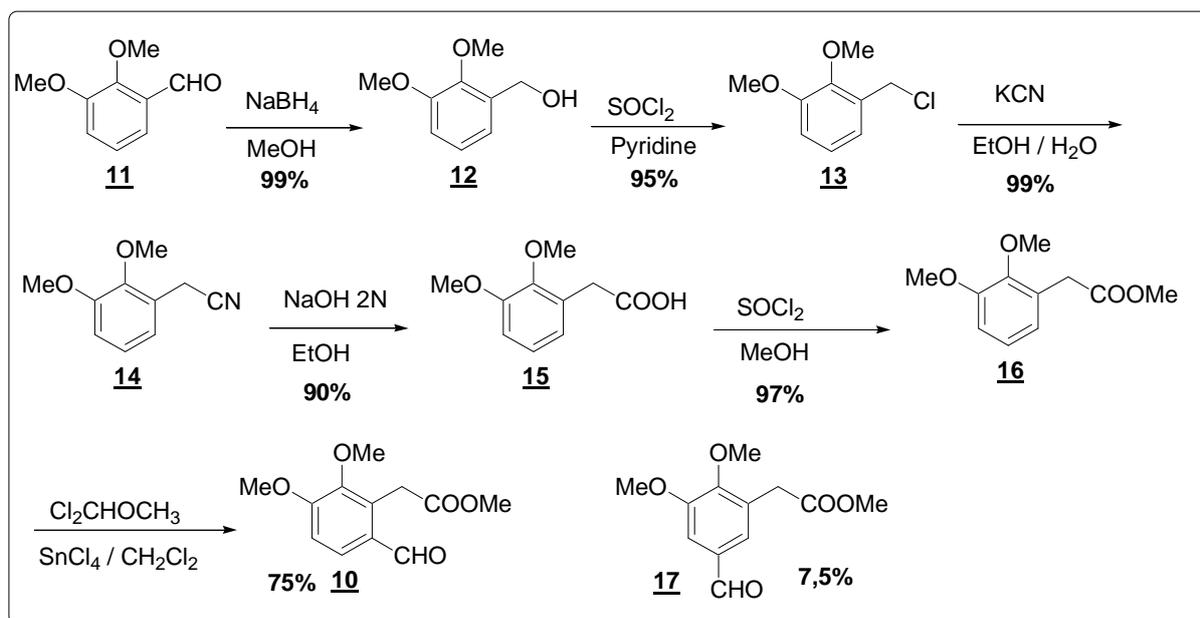


Schéma 2: Synthèse de l'intermédiaire **10** proposé par Detterbeck *et al.*⁴⁰

La synthèse décrite pour accéder à l'intermédiaire clé **10** à partir du 2,3-diméthoxybenzaldéhyde **11** est assez simple à mettre en œuvre. La fonction aldéhyde est réduite en alcool à l'aide de borohydrure de sodium. La fonction alcool est ensuite substituée par un chlore qui permet d'accéder facilement au nitrile. Celui-ci est hydrolysé en acide carboxylique puis converti en ester. Pour introduire la fonction aldéhyde en *ortho* de l'ester

méthylrique, l'utilisation de dichlorométhyl méthyl éther en présence de tétrachlorure d'étain est nécessaire. L'introduction de la fonction aldéhyde n'est pas faite sélectivement en *ortho* de l'ester méthylrique et un mélange de régioisomères est obtenu. Le rendement global de cette synthèse annoncé par les auteurs est de 61%. Néanmoins l'utilisation de dichlorométhyl méthyl éther lors de la dernière étape nous paraissait délicate à mettre en œuvre en raison de sa toxicité et induit la séparation d'isomères.

Nous avons donc modifié ce schéma de synthèse, le but étant d'introduire un brome en début de synthèse pour terminer par une formylation qui serait donc sélective et nous éviterait d'obtenir un mélange de régioisomères.

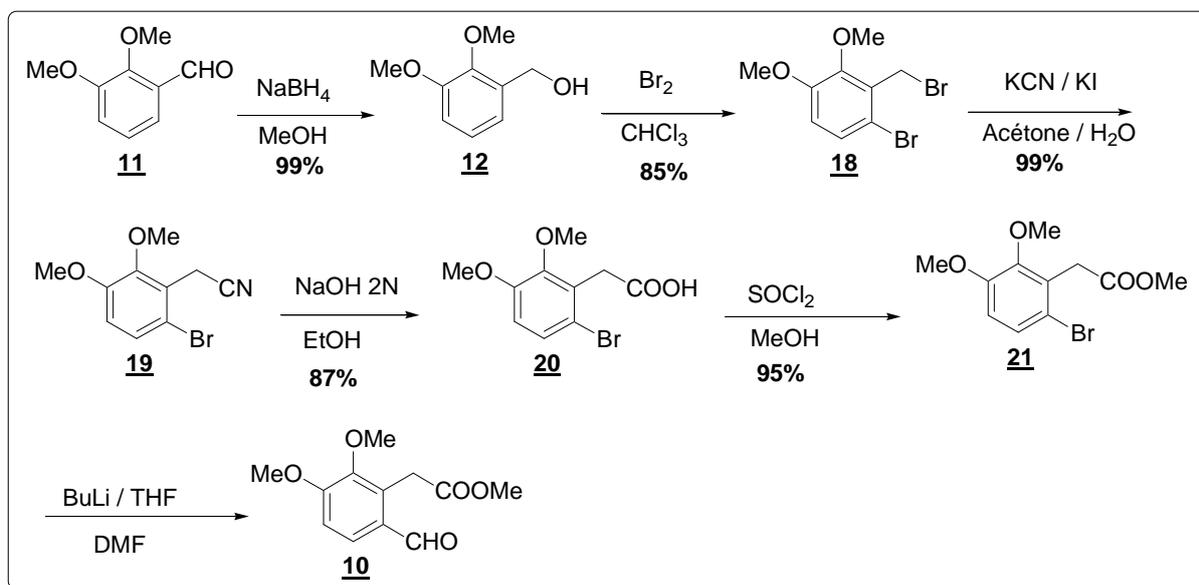


Schéma 3: Modification de la synthèse de l'intermédiaire 10, en s'inspirant des travaux de Detterbeck *et al.*.

La première étape est la même, c'est-à-dire la réduction de la fonction carbonyle en alcool benzylique. La deuxième étape est une double bromation en utilisant du brome dans le chloroforme. Lors de cette étape, on obtient aussi les isomères de position de 18. Ces composés sont séparables par colonne de chromatographie et on obtient le composé 18 avec 85% de rendement. Les trois étapes suivantes sont identiques au schéma décrit par Detterbeck *et al.* jusqu'à l'obtention de l'ester 21. Pour obtenir le précurseur intermédiaire 10, une interconversion halogène/métal est nécessaire suivie de l'ajout de diméthylformamide sec pour introduire le groupement carbonyle. Malheureusement, nous n'avons jamais réussi à obtenir le composé 10.

En nous inspirant toujours des travaux de Detterbeck *et al.*, nous avons envisagé une nouvelle voie de synthèse qui part à nouveau de l'isovanilline **1** et qui passe par un intermédiaire protégé sous forme d'acétal.

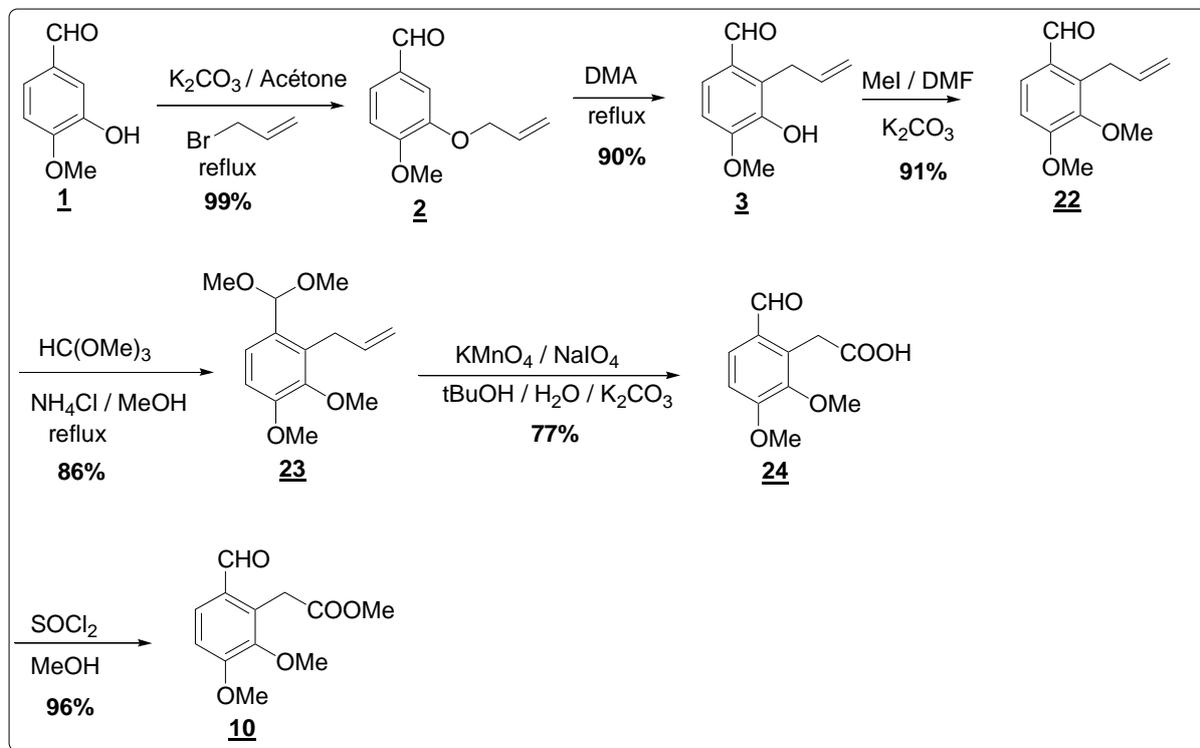


Schéma 4 : Synthèse de l'intermédiaire clé **10**

Les deux premières étapes sont identiques à la synthèse présentée sur le schéma 1.

La fonction phénol de la 2-allylisovanilline **3** est protégée à l'aide d'iodure de méthyle en présence de carbonate de potassium dans le diméthylacétamide avec un rendement de 91%. Puis la fonction aldéhyde est protégée sous forme d'acétal à l'aide d'orthoformiate de triméthyle en présence d'une quantité catalytique de chlorure d'ammonium dans le méthanol. Nous obtenons le 2-allyl-1-(diméthoxyméthyl)-3,4-diméthoxybenzène **23** avec un rendement de 86%.

L'oxydation de la fonction allyle en acide carboxylique est obtenue avec un rendement de 77%. Les conditions de réaction sont similaires à celles présentées dans la figure 26, i.e. l'utilisation d'un mélange de permanganate de potassium et de périodate de sodium, réactif en excès, en présence de carbonate de potassium dans un mélange eau / tertiobutanol. Cette réaction s'accompagne de la déprotection de la fonction aldéhyde pour conduire à **24**. Une

simple estérification par la suite nous permet d'obtenir notre intermédiaire clé **10** avec 96% de rendement, le rendement global étant de 52%.

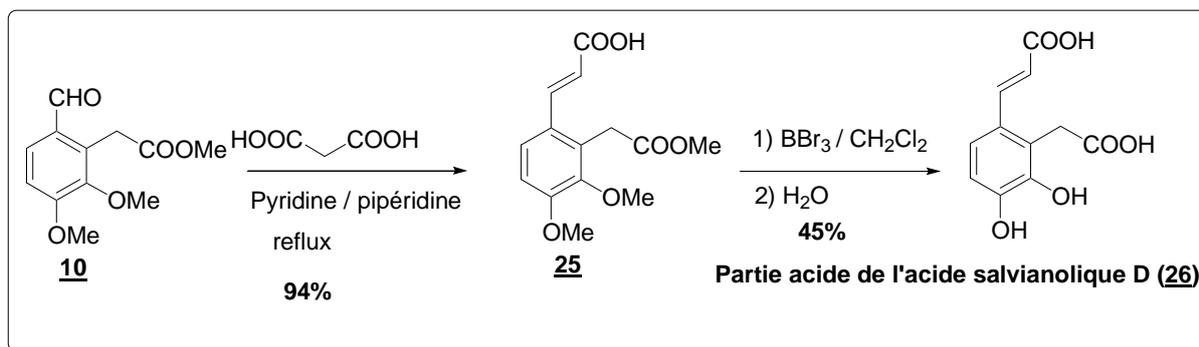


Schéma 5: synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique D

A partir de l'intermédiaire clé **10**, la partie acide de l'acide salvianolique D est obtenue assez facilement en deux étapes.

La première étape est une réaction de Knoevenagel. La réaction de Knoevenagel est une réaction très générale entre un composé à méthylène actif et un aldéhyde ou une cétone. Ici, nous condensons l'acide malonique sur l'aldéhyde **10** en présence de pyridine et de pipéridine à reflux. Nous obtenons le composé **25** avec un rendement de 94%. Sur le spectre proton, nous retrouvons deux doublets de constante 15,6 Hz caractéristiques de la formation la chaîne α,β -insaturée de configuration E.

La déprotection du composé **25** triméthoxylé est ensuite réalisée par une addition de tribromure de bore, suivie d'une hydrolyse. Quatre équivalents de BBr_3 doivent être utilisés : un pour chaque fonction à déprotéger et un supplémentaire pour assurer un excès qui sera détruit par l'addition d'eau. Cette déméthylation s'effectue avec un rendement correct (45%) et permet la déprotection simultanée des fonctions phénol et acide. Le produit final insoluble dans l'eau et le dichlorométhane est filtré du milieu réactionnel et lavé avec de l'eau.

Le rendement global pour la partie acide de l'acide salvianolique D est de 22%.

2. Synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique E (**33**)

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de l'acide salvianolique E en partant de l'intermédiaire **7**, en nous inspirant toujours des travaux de Ai *et al.* (schéma 6).^{37,38}

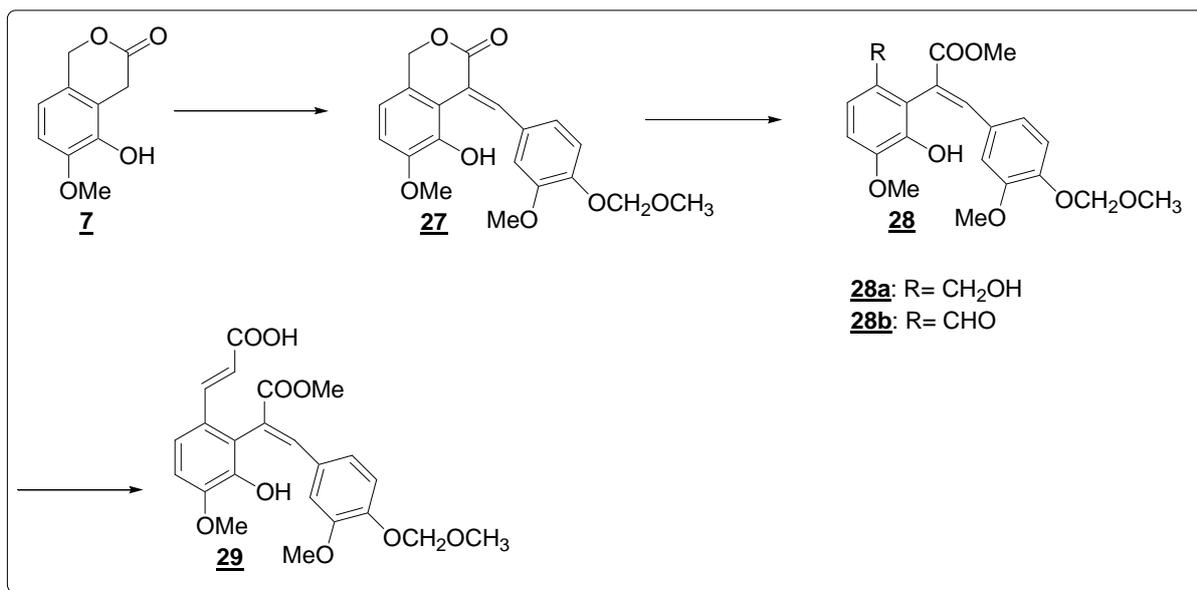


Schéma 6 : Synthèse du squelette de l'acide salvianolique E proposée par Ai *et al.*^{37,38}

Par soucis de simplicité et de cohérence, nous avons modifié le schéma de synthèse (schéma 7) en utilisant le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde ou vératraldéhyde au lieu du 3-méthoxy-4-méthoxyméthoxybenzaldéhyde décrit par Ai *et al.* (schéma 6).

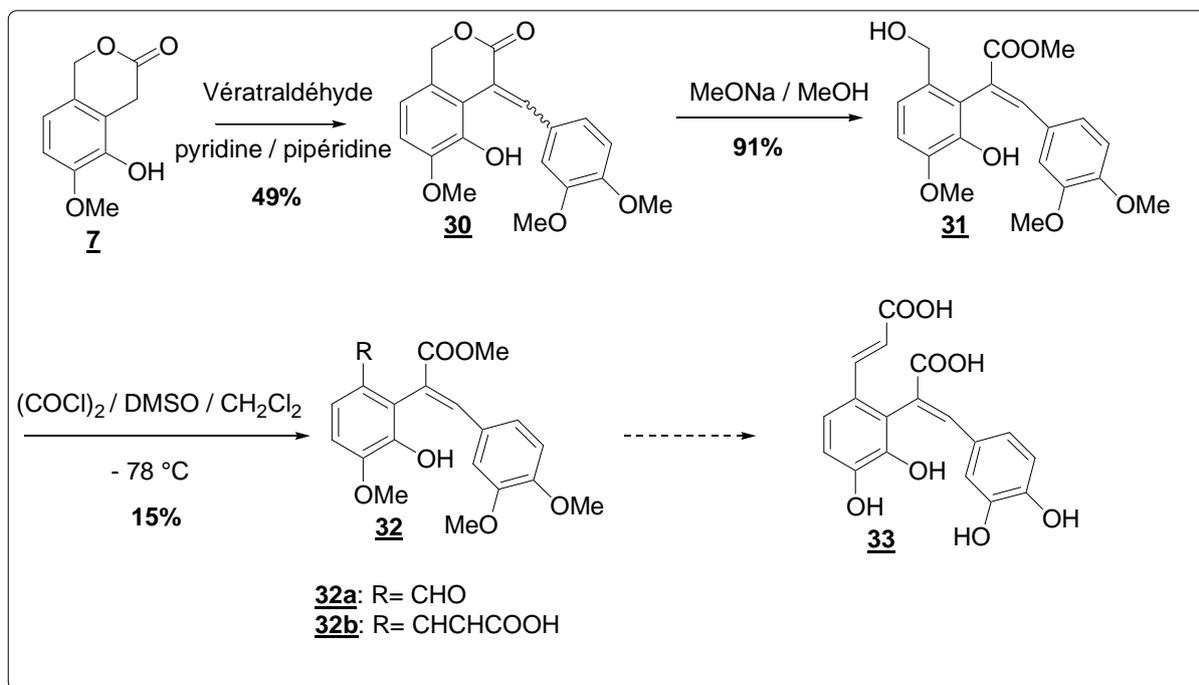


Schéma 7: Autre voie de synthèse pour la partie acide de l'acide salvianolique E.

A partir du précurseur intermédiaire commun **7**, nous avons condensé le vératraldéhyde à l'aide de pyridine et pipéridine en quantité catalytique et après une séparation sur colonne de silice, le rendement en produit **30** ne dépassait pas 49%. **30** est obtenu sous forme d'un mélange de stéréoisomères (**30E/30Z**, 80/20). Non satisfaits par ce rendement, nous avons donc mis en oeuvre d'autres réactions :

- Utilisation du 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undéc-7-ène (DBU)⁴¹ comme base (1,5 équivalents, reflux, 4 h).
- Utilisation du méthylate de sodium comme base (1,5 équivalents, reflux, 48 h).
- Utilisation de la pipéridine seule en quantité catalytique⁴² (quelques gouttes, reflux, 48 h).
- Utilisation du tétrachlorure de titane (TiCl₄) avec la triéthylamine⁴³ à 0°C.
- Utilisation du tétrachlorure de titane (TiCl₄) avec le tétrahydrofurane (THF) et de la pyridine.⁴⁴
- Réaction de « fusion »⁴⁵ sans utilisation de solvant à 130°C pendant 24h.

Aucune de ces réactions n'a permis d'isoler le composé **30**. Nous avons donc gardé le mode opératoire utilisant la pyridine et la pipéridine.

L'ouverture de la lactone se fait grâce au méthylate de sodium et on obtient le produit **31** avec un rendement de 91%. Le réactif de Jones nous a permis une oxydation douce de l'alcool benzylique en aldéhyde **32** mais avec des rendements très faibles (15%). D'autres réactions ont été testées en vue d'améliorer le rendement c'est-à-dire l'oxydation de Swern et l'utilisation d'oxyde de manganèse mais aucune de ces réactions n'a fonctionné.

Nous avons décidé de partir de l'intermédiaire **10**, obtenu d'après les travaux de Detterbeck *et al.*⁴⁰

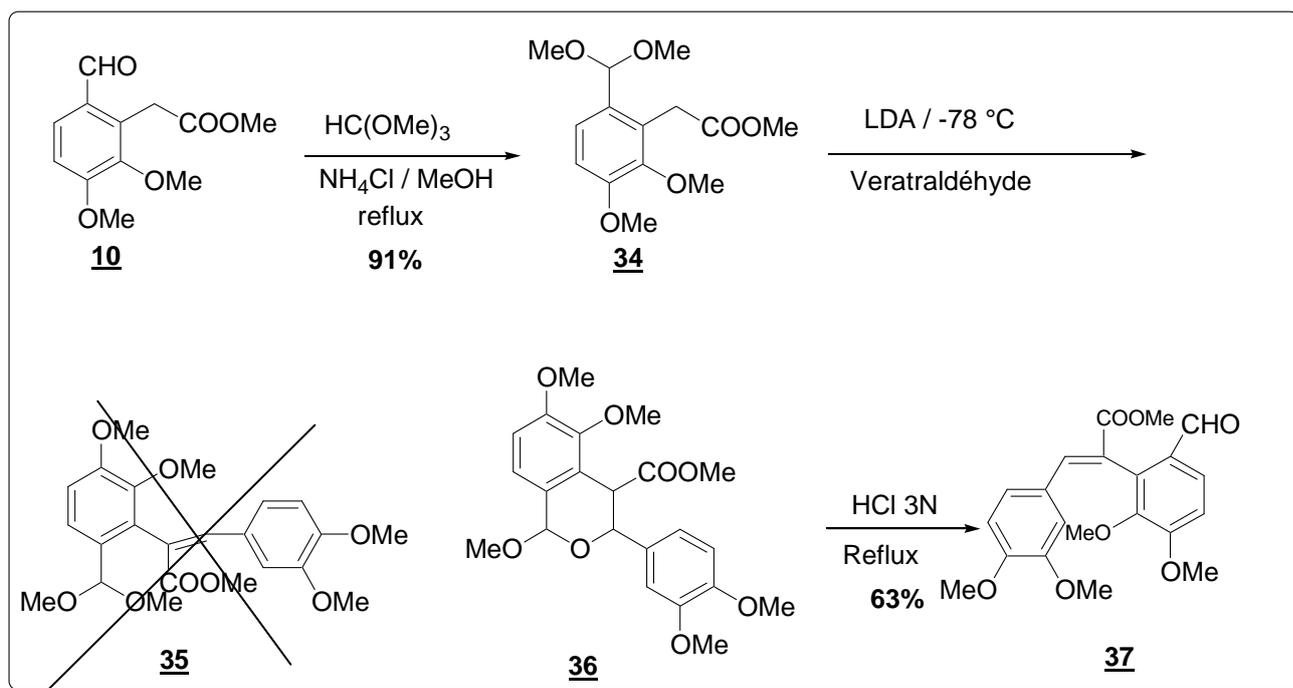


Schéma 8: Synthèse de l'intermédiaire **36**

La fonction aldéhyde de **10** est reprotégée sous forme d'acétal à l'aide d'orthoformiate de triméthyle en présence d'une quantité catalytique de chlorure d'ammonium dans le méthanol. Nous obtenons le (6-diméthoxyméthyl-2,3-diméthoxyphényl)acétate de méthyle **34** avec un rendement de 91%.

La réaction suivante est une adaptation de la réaction de Detterbeck, i.e. la condensation du véatraldéhyde sur l'acétal en présence de lithium diisopropylamidure de sodium à -78 °C . Elle consiste en l'obtention de l'acétal intermédiaire **35** suivie de la déprotection de la fonction aldéhyde. Dans ces conditions, nous n'avons pas obtenu l'acétal **35** mais nous avons isolé après chromatographie sur colonne le composé **36**, avec un rendement très faible (15%), un acétal cyclique dont la structure a été déterminée par spectrométrie RMN proton et carbone et confirmée par masse exacte. Une hydrolyse acide de 10 h sur ce composé nous a permis d'isoler l'aldéhyde souhaité **37**. Nous avons alors modifié la procédure en n'isolant pas l'intermédiaire réactionnel **36** et l'hydrolyse acide du brut réactionnel nous conduit après colonne à l'aldéhyde **37** avec un rendement de 63% (à partir de **34**).

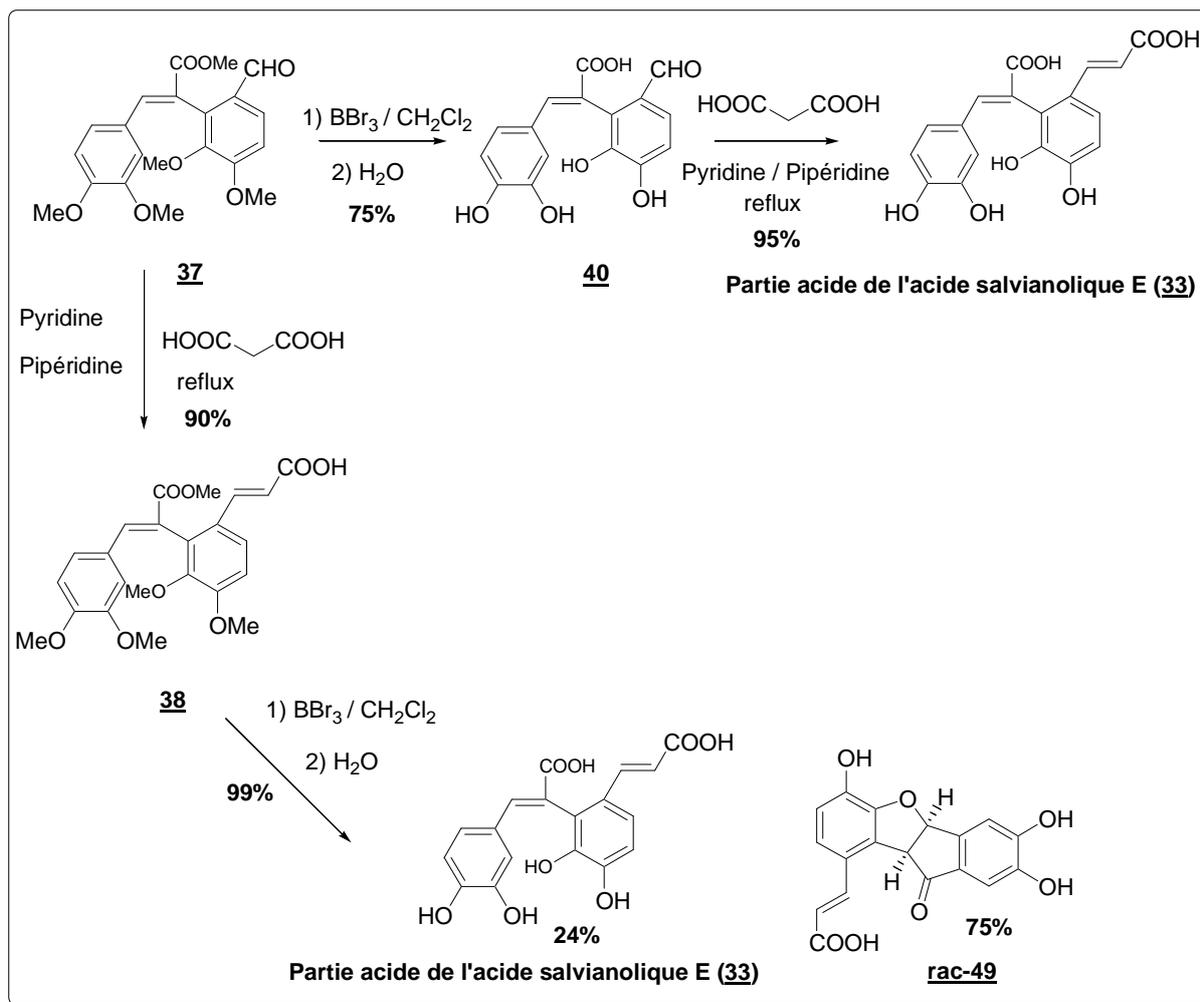


Schéma 9: Synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique E

A partir de l'aldéhyde **37**, nous avons tout d'abord condensé l'acide malonique sur la fonction aldéhyde et nous avons obtenu le composé **38** avec un rendement de 90%. Puis nous avons appliqué les mêmes conditions de déprotection qui nous avaient permis d'obtenir la partie acide de l'acide salvianolique D. Nous séparons facilement la partie acide de l'acide salvianolique E **33** et la molécule cyclisée **rac-49**. Nous obtenons majoritairement **rac-49** (75%) et tous nos efforts de modification des conditions de réaction ne nous ont pas permis d'améliorer le rendement en dérivé de l'acide salvianolique E. D'après les données de RMN proton et carbone 13, la structure de **rac-49** a été déterminée et confirmée par spectrométrie de masse. Sur le spectre proton, la série classique des pics due au cycle aromatique 1,2,4-trisubstitué a été remplacée par deux singulets caractéristiques des cycles aromatiques 1,2,4,5-tétrasubstitués. De plus, deux doublets à 4,72 ppm et 6,21 ppm indiquent la formation du cycle dihydrobenzofurane. La présence d'une fonction carbonyle est confirmée par le spectre

de carbone 13 avec un déplacement à 199,3 ppm. D'après la littérature,^{46,47} la valeur de la constante de couplage 3J (7,2 Hz) suggèrent que la jonction des pentacycles est cis.

Afin d'augmenter sensiblement le rendement, nous avons par ailleurs décidé de commencer par déprotéger le composé **37** dans les mêmes conditions que précédemment pour obtenir le composé **40** avec un rendement de 75%. La réaction de Knoevenagel en dernière étape nous permet d'obtenir la partie acide de l'acide salvianolique E avec un rendement global de 20% à partir de l'isovanilline.

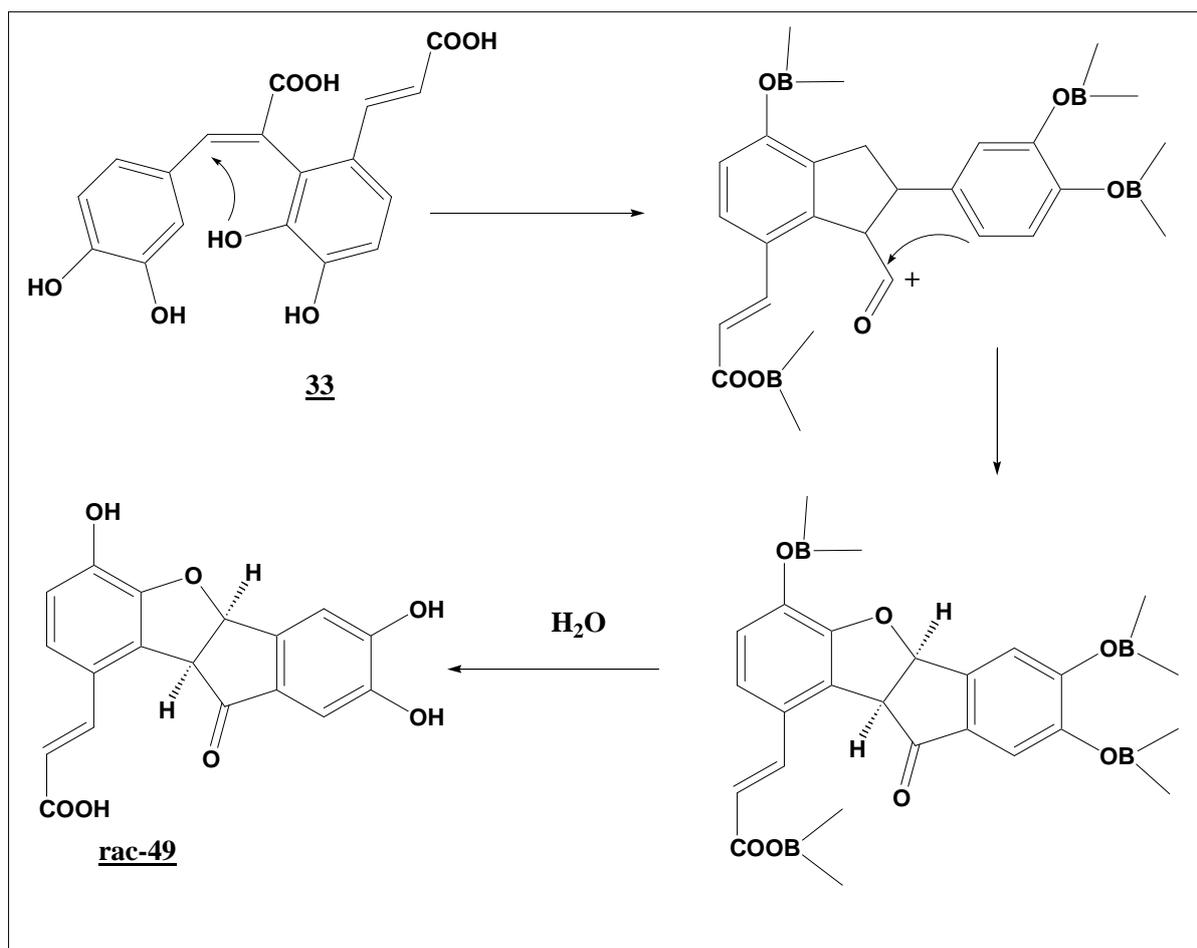


Schéma 10 : Proposition de mécanisme pour passer du composé **38** à **rac-49**

Nous avons essayé d'envisager un mécanisme pour passer du composé **38** à **rac-49**. Le passage de **38** à **rac-49** nécessite deux cyclisations. On peut supposer que la première cyclisation a lieu à partir de l'oxygène en position 3 du motif caféique suivie d'une deuxième cyclisation de type Friedel-Crafts sur le carbone activé. L'hydrolyse finale permet de régénérer les fonctions phénols et ester.

B. Les dérivés de la sagescoumarine

1. Synthèse de l'acide 3-hydroxy-4-(6,7-dihydroxycoumarin-3-oxy)cinnamique, 41

a. Cyclocondensation du sésamol formylé et d'un phénoxyacétamide

En s'inspirant de la synthèse des 3-phénoxycoumarines déjà décrite par condensation d'aldéhydes salicyliques et de N,N-diéthylphénoxyacétamides en présence d'oxychlorure de phosphore,^{48,49} la synthèse des 3-aryloxy-6,7-dihydroxycoumarines peut être envisagée selon le schéma rétrosynthétique suivant :

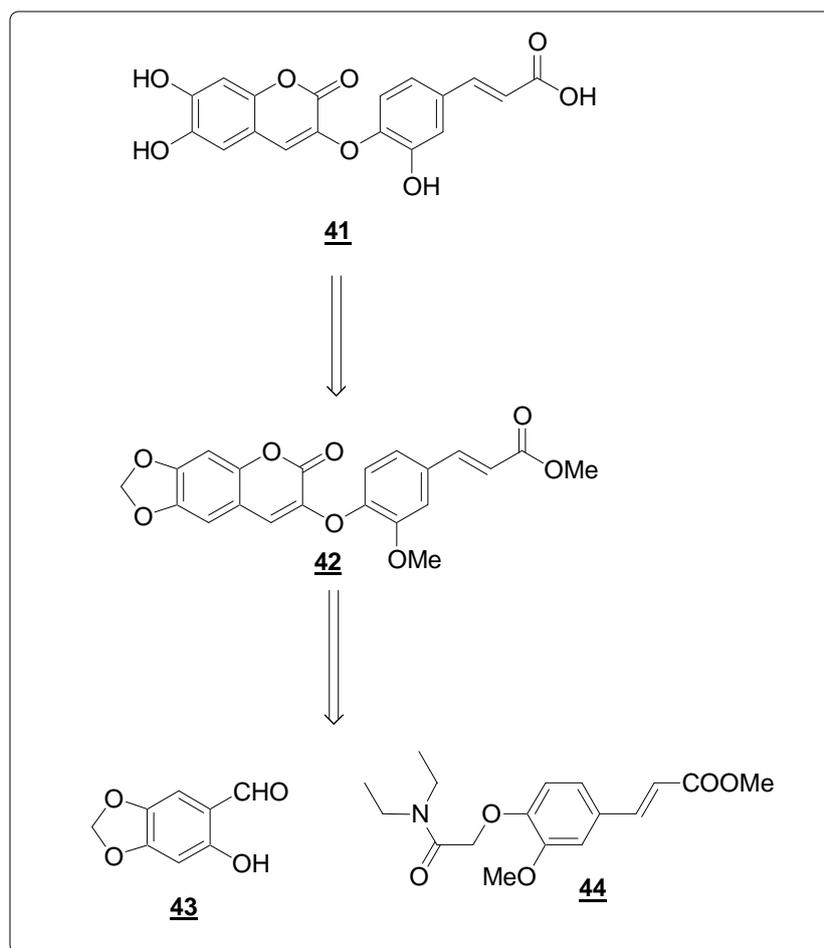


Schéma 11: Cyclocondensation du sésamol formylé et d'un phénoxyacétamide

◆ **Synthèse du 2-hydroxy-3,4-(méthylènedioxy)benzaldéhyde, 43**

Pour l'obtention de l'aldéhyde **43**, nous avons envisagé de partir du composé commercial de départ le sésamol (3,4-(méthylènedioxy)phénol) **45**.

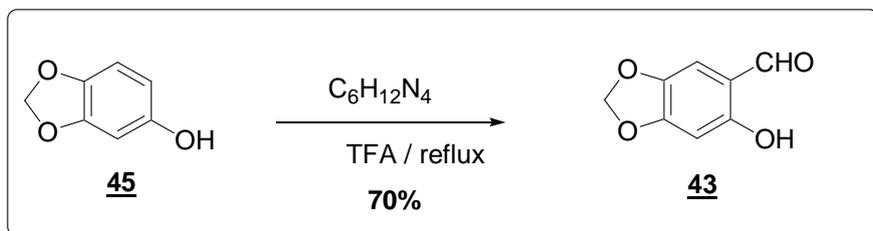


Schéma 12: Synthèse du composé **43**

Nous avons utilisé la formylation de Duff,^{50,51} qui a permis notamment la transformation d'un grand nombre de phénols en *ortho* hydroxybenzaldéhydes. Cette réaction nécessite la présence d'hexaméthylènetétraamine et d'un catalyseur acide, l'acide trifluoroacétique (TFA). Nous obtenons le composé **43** avec 70% de rendement.

◆ **Synthèse du N,N-diéthylphénoxyacétamide, 44**

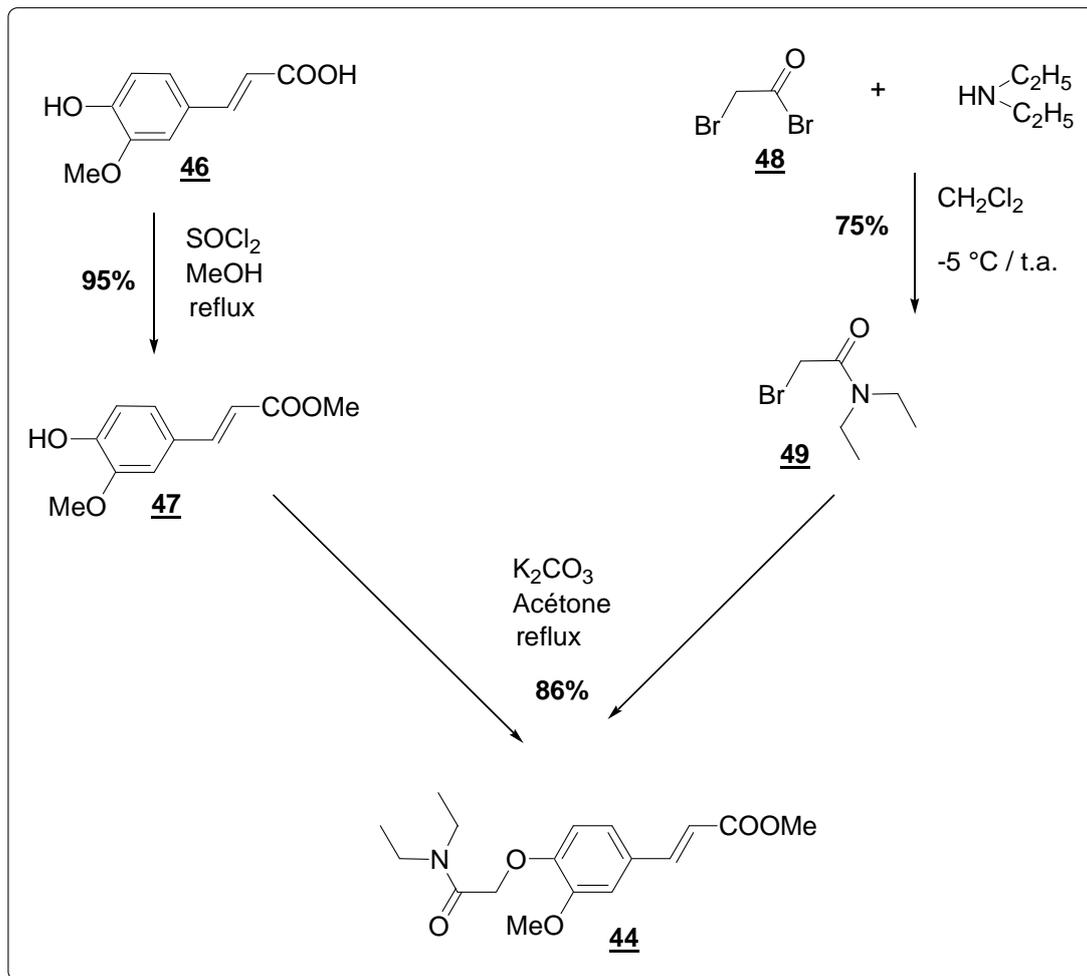


Schéma 13 : Synthèse du composé **44**

Le précurseur **44** été obtenu par condensation de l'estér méthylique de l'acide férulique **47** sur la N,N-diéthylbromoacétamide **49** en présence d'une base, le carbonate de potassium.

L'addition nucléophile de la diéthylamine sur le bromure de bromoacétyle **48** a donné lieu à la formation du N,N-diéthylbromoacétamide tandis que l'estérification de l'acide férulique a été effectuée par chauffage à reflux dans le méthanol en présence de chlorure de thionyle.

◆ Synthèse de la coumarine 41

Le chauffage à reflux d'une solution des précurseurs **43** et **44** en présence de POCl_3 n'a donné la coumarine dérivée qu'avec un rendement très faible. L'activation au préalable du complexe POCl_3 / phénoxyacétamide n'a eu que trop peu d'incidence sur le rendement.

Ceci nous a conduit à envisager d'autres stratégies de synthèses.

b. Cycloadditions du sésamol formylé avec le dérivé phénoxyacétique

D'autres méthodes basées sur la cyclocondensation du sésamol formylé avec un dérivé phénoxyacétique (et non plus phénoxyacétamide) sont par ailleurs décrites dans la littérature^{52,53} selon le schéma rétrosynthétique suivant :

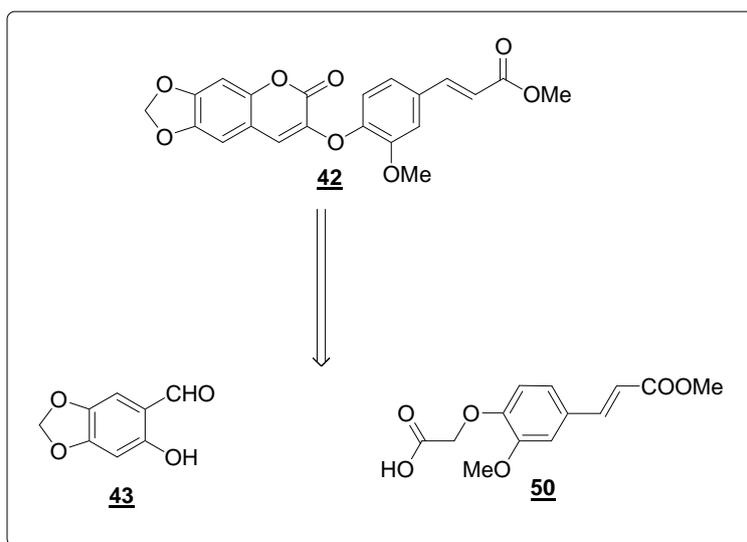


Schéma 14: Rétrosynthèse pour le composé **42**

➤ **Première méthode**

L'acide phénoxyacétique **50** a été obtenu par condensation du férulate de méthyle sur l'acide bromoacétique en présence d'hydrure de sodium NaH à reflux dans le THF avec 60% de rendement.⁵⁴ Il s'agit d'une simple substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}2$.

Nous avons utilisé comme agent activant le phényldichlorophosphate ($\text{PhOP}(=\text{O})\text{Cl}_2$).⁵⁵ Le chauffage à reflux d'un mélange des produits **43** et **50**, de $\text{PhOP}(=\text{O})\text{Cl}_2$

et de triéthylamine a donné après lavages et chromatographie sur colonne non pas la coumarine dérivée mais le produit **51** issu du couplage par estérification entre les précurseurs **43** et **50** avec un rendement de 25%.

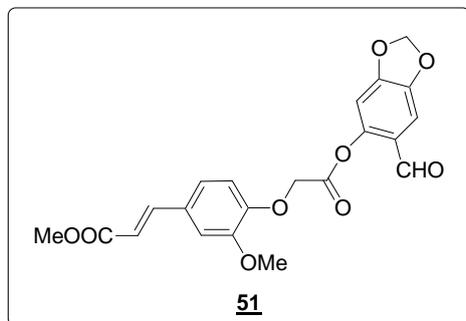


Figure 24 : composé **51** issu du couplage des composés **43** et **50** en présence de PhOP(=O)Cl_2

L'activation préalable à 0 °C ou à 40 °C par le PhOP(=O)Cl_2 du composé **50** a donné suivant le même mode opératoire l'ester **51** avec des rendements autour de 15%.

➤ Deuxième méthode

Cette méthode consiste à utiliser de l'anhydride acétique et de la triéthylamine à reflux dans le benzène.⁵² Un autre produit a été obtenu avec un rendement de 62% :

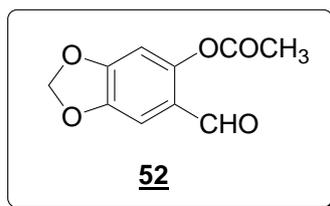


Figure 25 : composé **52** issu du couplage des composés **43** et **50** en présence d'anhydride acétique

Aucune de ces méthodes n'a donné lieu de façon satisfaisante à la formation par cyclisation de la coumarine. Nous avons seulement obtenu, avec des rendements faibles, mais de façon intéressante, l'ester **51** formé entre les précurseurs **43** et **50** avec le PhOP(=O)Cl_2 avec ou sans activation.

Ce nouveau produit est susceptible de fournir la coumarine dérivée par une réaction d'aldolisation intramoléculaire à l'aide d'une base. Ceci nous a dirigés vers une nouvelle voie de synthèse.

c. Aldolisation intramoléculaire de l'ester

Cette nouvelle stratégie est basée sur l'obtention préliminaire de l'ester **51** formé entre le sésamol formylé **43** et l'acide phénoxyacétique **50**.

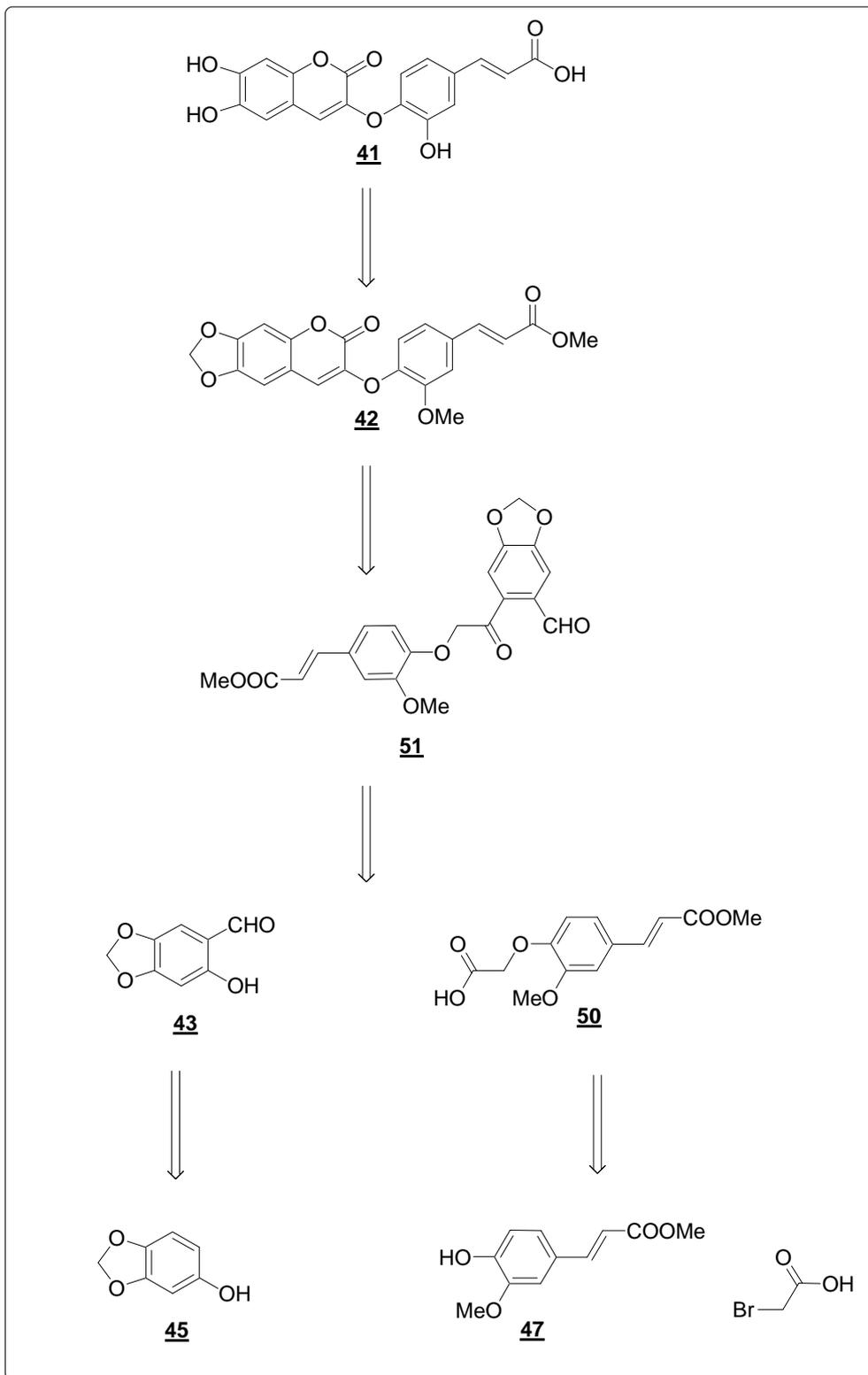


Schéma 15: Voie de synthèse adoptée pour le composé **41**

◆ **Synthèse de l'ester 51**

Pour permettre la condensation des précurseurs 43 et 50 avec un rendement correct, le sésamol formylé 43 a été activé sous forme de phénolate par réaction avec de la triéthylamine. L'acide phénoxyacétique 50 a été activé sous forme de chlorure d'acide à l'aide de chlorure de thionyle.

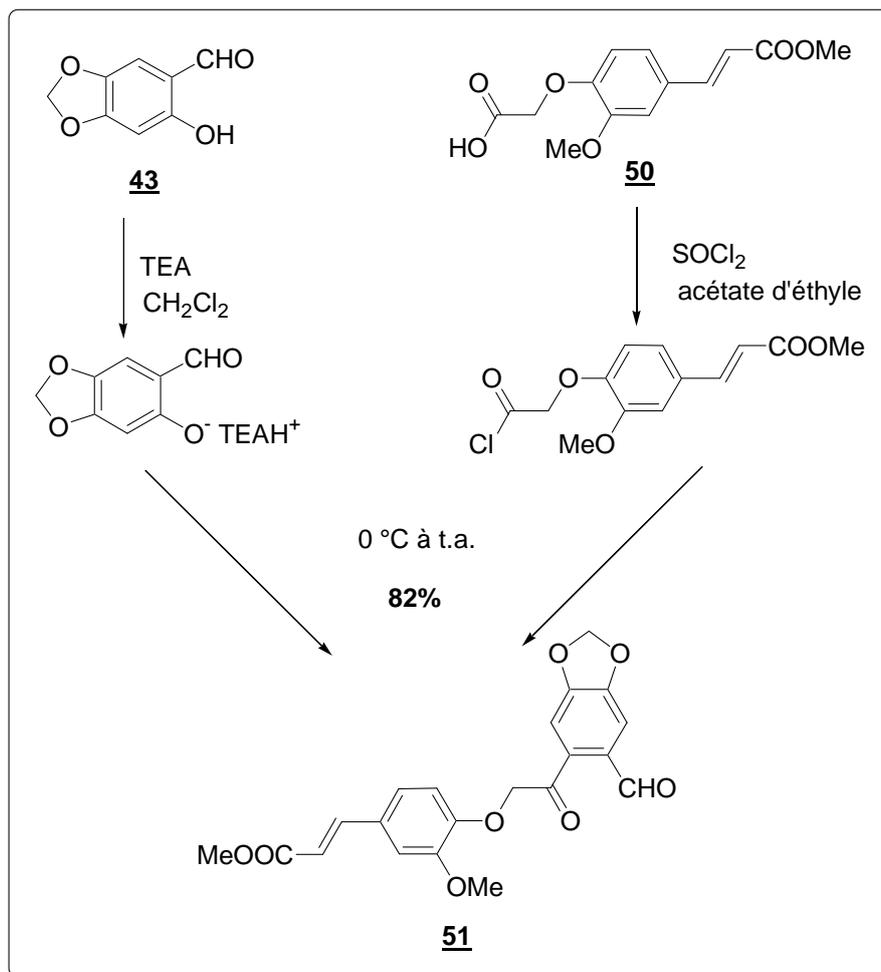


Schéma 16: Synthèse de l'ester 51

◆ **Cyclisation de l'ester 51**

La cyclisation de l'ester 51 en coumarine par aldolisation intramoléculaire a été réalisée à reflux dans le toluène avec une base forte, le DBU (Schéma 19).^{Error! Bookmark not}

defined. Le méthanolate de sodium ou l'hydrure de sodium⁵⁶ n'ont pas provoqué la cyclisation de l'ester.

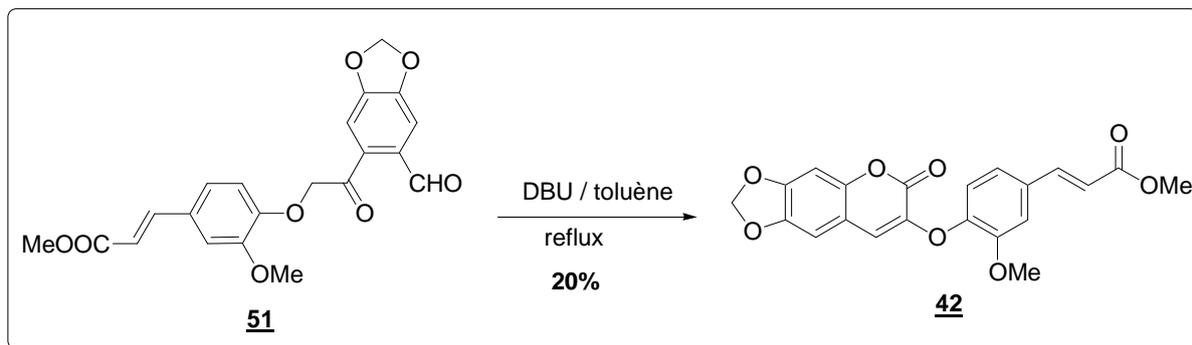


Schéma 17: Synthèse du composé 42

◆ Déprotection de la coumarine 42

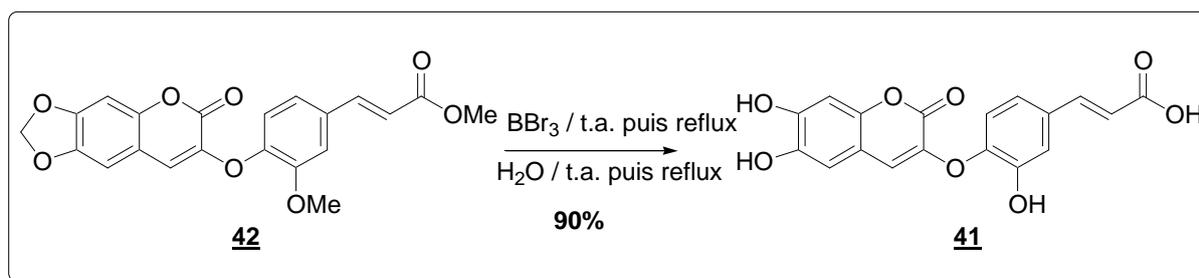


Schéma 18: Déprotection du composé 42

La déprotection totale de la coumarine 42 s'effectue à l'aide d'une solution de tribromure de bore dans le dichlorométhane. Les conditions classiques de déprotection n'ont pas déprotégé totalement la molécule. Il a fallu des conditions plus drastiques : après ajout du BBr₃, il a été nécessaire de porter à reflux le milieu réactionnel pendant 12 h. De même, lors de l'hydrolyse, un reflux prolongé a été nécessaire afin de s'assurer de la complète hydrolyse de la fonction ester.

La coumarine 41 est obtenue avec un rendement de 90%.

2. Synthèse de l'acide 3-(6,7-dihydroxycoumarin-4-oxy)-4-hydroxycinnamique, 57

a. Cyclocondensation avec le sésamol formylé

Nous avons tenté de la même manière de cyclocondenser en une seule étape le sésamol formylé avec les analogues acide phénoxyacétique et phénoxyacétamide représentés ci-dessous.

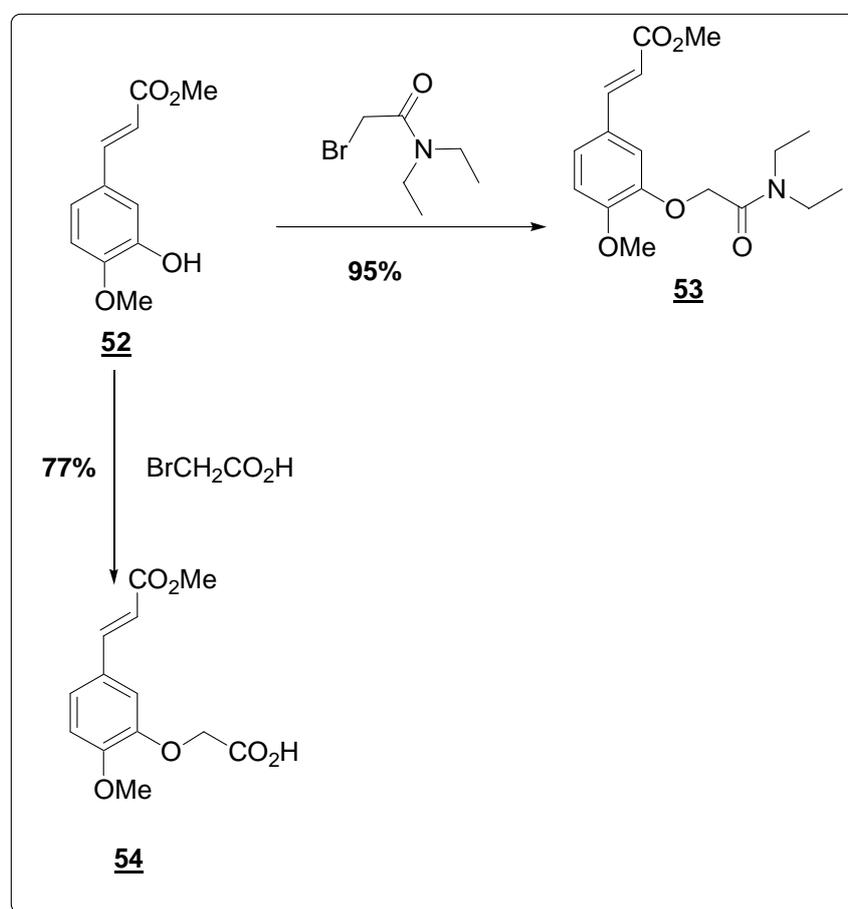


Schéma 19 : Cyclocondensation avec le sésamol formylé

Les composés **53** et **54** ont été élaborés comme précédemment par condensation de l'ester méthylique de l'acide isoférulique **52** sur le N,N-diéthylbromoacétamide et l'acide bromoacétique respectivement.

Comme précédemment, les méthodes de cyclocondensation (PhOP(=O)Cl₂, TEA ou DMF, TEA, Ac₂O ou DMF + POCl₃) n'ont pas fourni la coumarine **57** (ou avec un rendement de 4%) mais l'ester **55** issu du couplage des deux réactifs.

La méthode décrite précédemment en série « férulique », basée sur la cyclisation de l'ester intermédiaire a donc été réutilisée.

b. Aldolisation intramoléculaire de l'ester intermédiaire

Le schéma de synthèse suivant a été ainsi adopté :

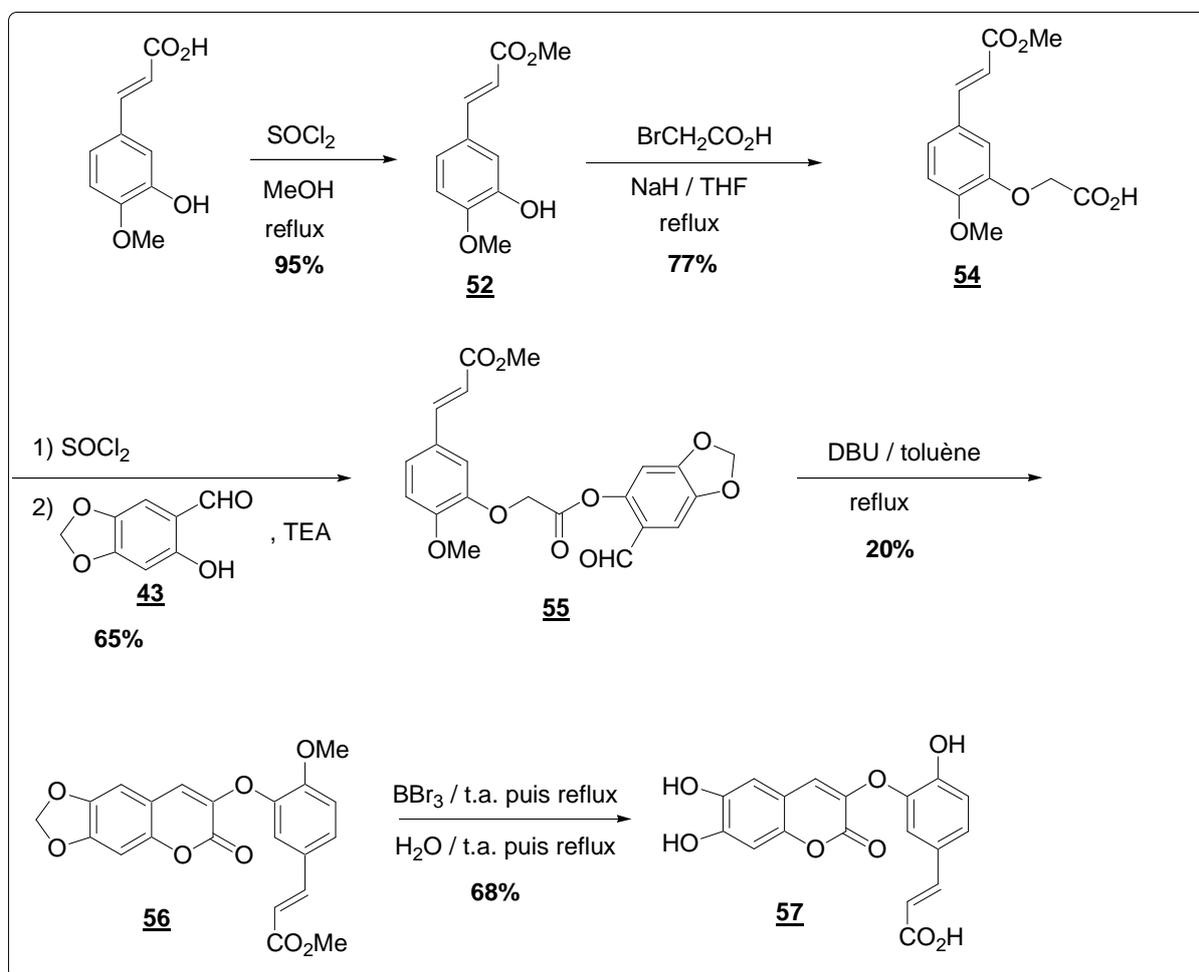


Schéma 20 : Schéma de synthèse pour le composé final **57**

La cyclisation intramoléculaire de l'ester **55** s'effectue à reflux dans le toluène en présence de DBU. La coumarine protégée **56** est obtenue avec un faible rendement de 20%.

Puis une déprotection à l'aide tribromure de bore nous permet d'obtenir la coumarine **57** sous forme de solide avec un rendement de 68%.

Finalement, la partie acide de la sagecoumarine **41** et son isomère « isoférulique » **57** sont obtenues avec des rendements globaux de 6% et 5% respectivement.

C. Le tournefolal et les acides tournefoliques A et B

La synthèse du tournefolal et de l'acide tournefolique A triméthylés a déjà été décrite en 2005 par des chercheurs visant à synthétiser des composés électroluminescents et ceci sans relation avec la possibilité d'accéder à des produits naturels.⁵⁷ Hwu *et al.* obtiennent le tournefolal triméthylé **61** en quatre étapes avec un rendement global de 37% et l'acide tournefolique A triméthylé **62** en cinq étapes avec un rendement global de 26%.

En partant de l'isovanilline **1**, ils forment la 2-iodoisovanilline **58** à l'aide de monochlorure d'iode (Schéma 21).⁵⁸

A partir du véatraldéhyde, ils obtiennent le 2,2-dibromo-1-(3,4-diméthoxyphényl)éthène **59** en utilisant du tétrabromure de carbone et de la triphénylphosphine. Ce composé **59** mis ensuite en présence de butyllithium à -78 °C est transformé en 3,4-diméthoxyphényléthyne **60**.⁵⁹ La 2-iodoisovanilline **58** et le 3,4-diméthoxyphényléthyne **60**, en présence de (PPh₃)₂PdCl₂, d'iodure de cuivre (I) et de triéthylamine dans le DMF à 110 °C conduisent au 4-formylbenzo[*b*]furane désiré **61**. Puis le composé **61** mis en présence d'acide malonique, de pyridine et pipéridine donne l'acide tournefolique A protégé **62**.

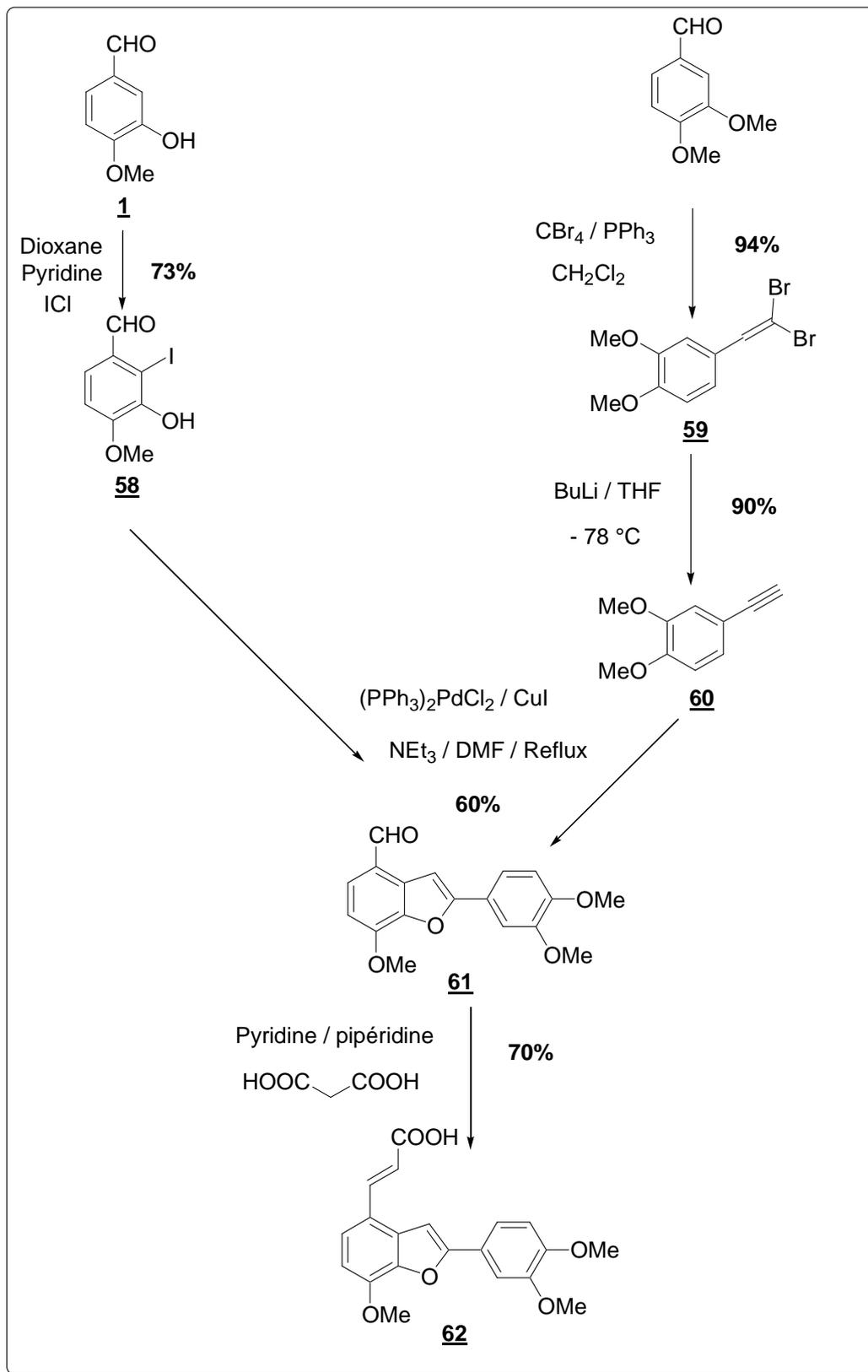


Schéma 21: Synthèse décrite par Hwu *et al.*⁵⁷

Nous avons envisagé une autre voie de synthèse pour former un composé **66** qui servirait d'intermédiaire à la fois pour la synthèse du tournefolal et de l'acide tournefolique A mais aussi pour celle de l'acide tournefolique B.

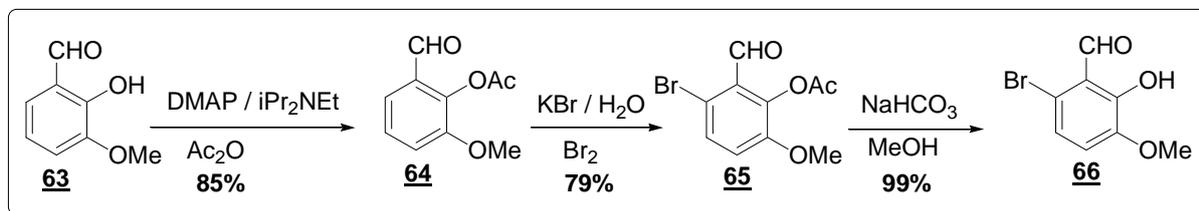


Schéma 22: Synthèse de l'intermédiaire **66**

L'intermédiaire **66** est synthétisé en 3 étapes avec un rendement de 66% à partir de l'*ortho*-vanilline. La bromation en *ortho* de la fonction aldéhyde a été effectuée par substitution électrophile aromatique de l'*ortho*-vanilline **63**, ce qui a nécessité une désactivation préalable de la fonction phénol par acétylation : on obtient ainsi l'*ortho*-bromobenzaldéhyde **65** qui est ensuite soumis à une hydrolyse basique pour donner l'*ortho*-hydroxybenzaldéhyde voulu **66**, avec un rendement quantitatif.

1. Synthèse du tournefolal (**72**) et de l'acide tournefolique A (**74**)

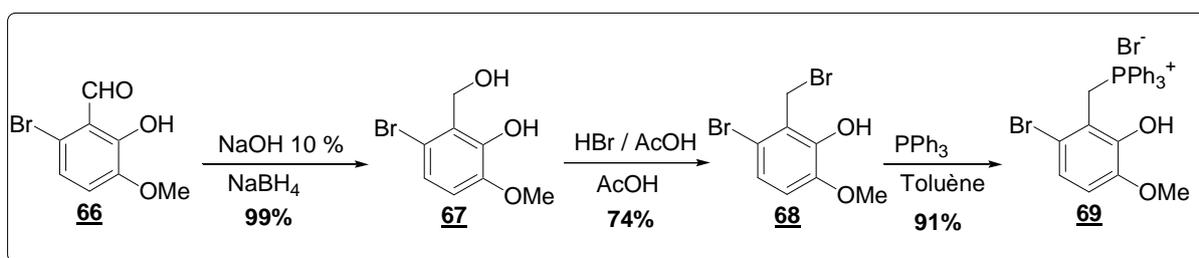


Schéma 23: Synthèse du sel de phosphonium **69**

Pour la synthèse du tournefolal et de l'acide tournefolique A, le composé **66** est réduit au moyen de borohydure de sodium NaBH₄ en alcool benzylique **67**, avec un rendement quantitatif. L'obtention du bromure de benzyle **68** s'effectue à l'aide d'une solution d'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique en présence d'acide acétique avec un rendement de 74%. Ce dernier mis en présence de triphénylphosphine dans le toluène conduit avec un rendement de 91% au sel de phosphonium **69**.

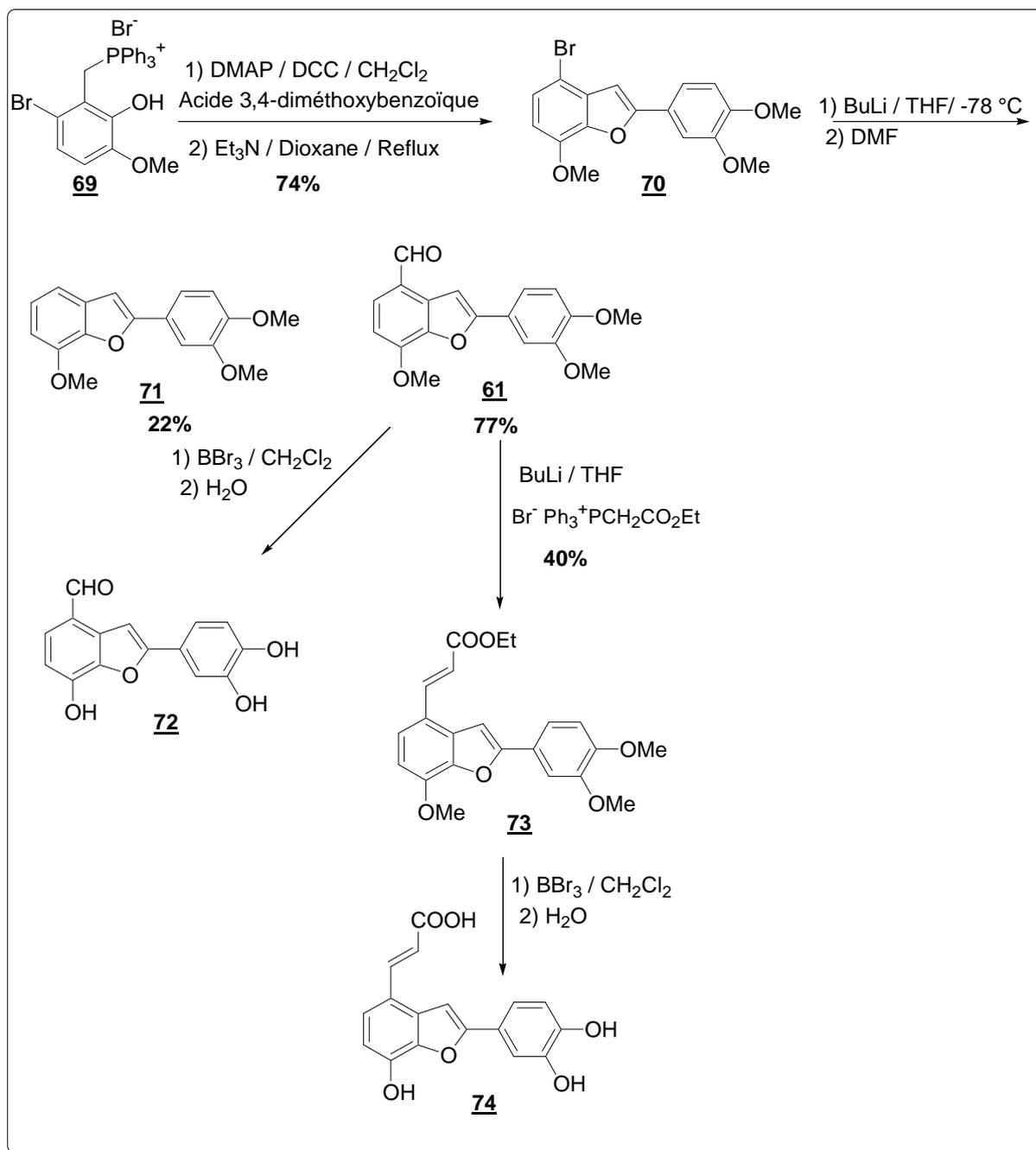


Schéma 24: Synthèse du tournefolal et de l'acide tournefolique A

Le couplage du sel de phosphonium **69** avec l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque, selon une adaptation de la procédure de McKittrick et Stevenson,⁶⁰ donne le benzofurane **70**.

La formation du cycle benzofurannique s'effectue en deux étapes.⁶¹ Tout d'abord, l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque est activé par la dicyclocarbodiimide et réagit avec le sel de phosphonium en présence de 4-diméthylaminopyridine dans le dichlorométhane. On obtient un ester intermédiaire (Schéma 25). L'arrachement de l'hydrogène sur le méthylène actif par

la triéthylamine conduit à un anion qui peut réagir sur la fonction carbonyle de l'ester pour former le cycle à 5 chaînons. Il y a ensuite passage par une bétaine qui conduit à un oxaphosphétane et de l'oxyde de la triphénylphosphine et le composé **70** sont obtenus. Le 2-(3,4-diméthoxyphényl)-4-bromo-7-méthoxybenzofurane **70** est obtenu après purification par chromatographie avec un rendement de 74%.

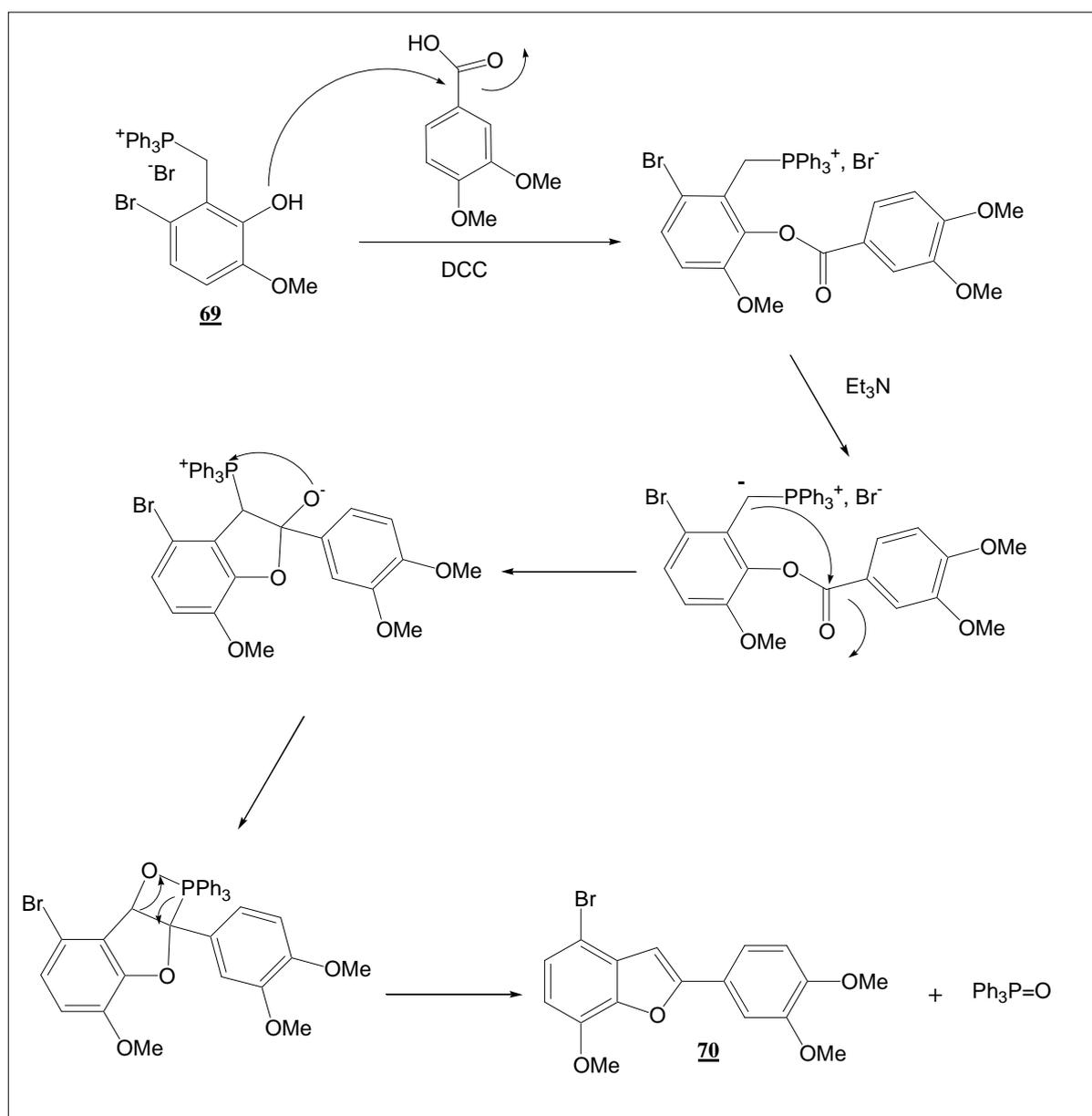


Schéma 25 : mécanisme de formation du cycle à 5 chaînons

Une interconversion halogène / métal est alors nécessaire à l'aide de butyllithium pour envisager une formylation ultérieure. Cette interconversion est obtenue de manière quantitative puisque l'ajout d'eau nous a permis d'isoler le produit **71**.

En revanche l'introduction de la fonction aldéhyde nous a posé de nombreux problèmes. Différentes méthodes ont été envisagées :

- l'ajout classique de diméthylformamide (DMF) à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, même en modifiant les conditions de réaction (temps d'agitation, température, nombre d'équivalents de DMF), n'a conduit qu'au composé **71**.
- l'utilisation d'orthoformiate de triméthyle, de N-formylpiperidine ou de pentacarbonyle de fer ($\text{Fe}(\text{CO})_5$)⁶² a conduit de même au composé **71**.
- Une synthèse magnésienne (magnésium, iode et 1,2-dibromoéthane en quantité catalytique) suivie de l'ajout de DMF a donné un mélange de produit de départ et du composé **71**.
- l'utilisation de butyllithium et de paraformaldéhyde s'est révélée infructueuse car un produit de dégradation a été formé au lieu de l'alcool benzylique.

Finalement, l'utilisation de DMF commercial à 99,99% a permis d'obtenir le composé **61** attendu en ajoutant à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 équivalents de DMF au dérivé lithien préalablement formé puis en laissant remonter la température pendant 2 h. Le composé **61** a ainsi été obtenu avec un rendement de 77% avec le composé **71** comme produit secondaire (22%).

Pour déprotéger le composé **61**, nous avons utilisé une solution molaire de tribromure de bore dans le dichlorométhane. Tous les essais de déprotection sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : essais de déméthylation

	Nombre d'équivalents de BBr ₃	Temps de réaction	Temps d'hydrolyse	Température de réaction
Essai 1	4,5	12 h	1 h	t.a.
Essai 2	15	15 h	1 h	t.a.
Essai 3	15	12 h	1 h	reflux
Essai 4	15	48 h	1 h	reflux
Essai 5	50	12 h	1 h	t.a.
Essai 6	50	12 h	4 h	reflux
Essai 7	50	48 h	4 h	reflux

Bien que présent en faible proportion dans le brut réactionnel, le tournefolal **72** n'a pu être isolé jusqu'à présent. Nous avons néanmoins réussi à l'identifier sans ambiguïté par RMN ¹H.

La construction de la chaîne α,β-insaturée a été ensuite envisagée par une réaction de Knoevenagel, i.e. la condensation de l'acide malonique en présence de pyridine et de pipéridine à reflux pendant une nuit. Des modifications de conditions de réaction (temps de reflux, travail sous atmosphère inerte...) ont été essayées mais dans tous les cas nous n'avons récupéré que le produit de départ. Les conditions de Hwu et al. se sont aussi révélées inefficaces.⁵⁷ Nous avons donc dû envisager d'autres méthodes comme des couplages de Stille et de Heck à partir du composé **70**.

Couplage de Heck :

Il permet de réaliser un couplage entre un composé halogéné et un alcène. C'est certainement le plus répandu des couplages palladocatalysés ; et c'est l'alcène le plus stable, i.e. celui de stéréochimie E, qui se forme (à quelques exceptions près).

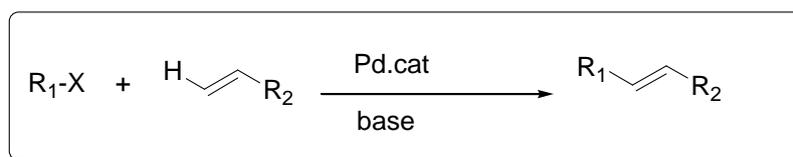


Schéma 26: Couplage de Heck

Nous avons donc mis en réaction de la triphénylphosphine, de l'acétate de palladium, du carbonate de potassium, de l'acrylate de méthyle et le composé **70** et nous n'avons récupéré que le produit de départ.

Couplage de Stille :⁶³

Le couplage de Stille est de nos jours un des couplages les plus utilisés en synthèse organique (avec le couplage de Suzuki). Celui-ci consiste en l'utilisation de dérivés de l'étain comme partenaire de couplage. La première étape est une hydrostannation d'alcyne avant le couplage avec le réactif.

Classiquement, le couplage de Stille nécessite l'utilisation de solvant de type diméthylformamide ou N-méthylpipéridine, avec des temps de chauffage variant de quelques heures à plusieurs jours. D'après la bibliographie,⁶⁴ l'utilisation des micro-ondes est possible et réduit fortement le temps de réaction (quelques minutes) tout en permettant l'utilisation de solvants tel que le tétrahydrofurane (THF).

Nous avons utilisé comme alcyne le propiolate de méthyle et suivi la procédure décrite par Maleczka *et al.*⁶⁴ Malheureusement, nous n'avons jamais isolé de produit organique pur.

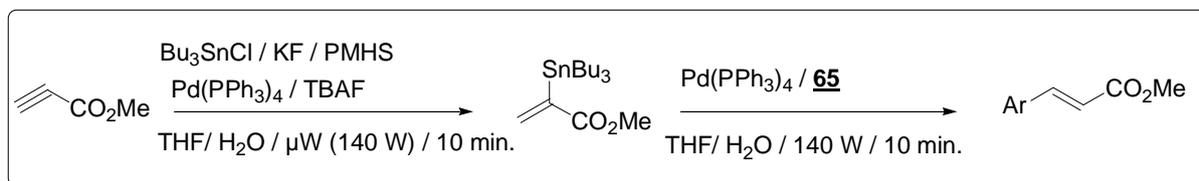


Schéma 27: Essai de couplage de Stille

Finalement, nous avons réussi à construire la chaîne α,β -insaturée à l'aide d'une réaction de Wittig. On génère in situ dans le tétrahydrofurane le phosphorane à l'aide de 1,1 équivalents de butyllithium qui réagit sur le bromure d'éthoxycarbonylméthyltriphenylphosphonium puis on ajoute le composé **61**. Après chromatographie sur colonne de silice, on sépare le composé souhaité **73** du composé de départ **61** avec un rendement de 40% (Schéma 24).

Pour déprotéger le composé **73**, nous avons à nouveau utilisé une solution molaire de tribromure de bore dans le dichlorométhane. Cinq équivalents de tribromure de bore sont

nécessaires pour la déméthylation. L'acide tournefolique A **74** est présent dans la phase acétate d'éthyle mais il n'a pu être purifié correctement jusqu'à présent.

2. Synthèse de l'acide tournefolique B (**79**)

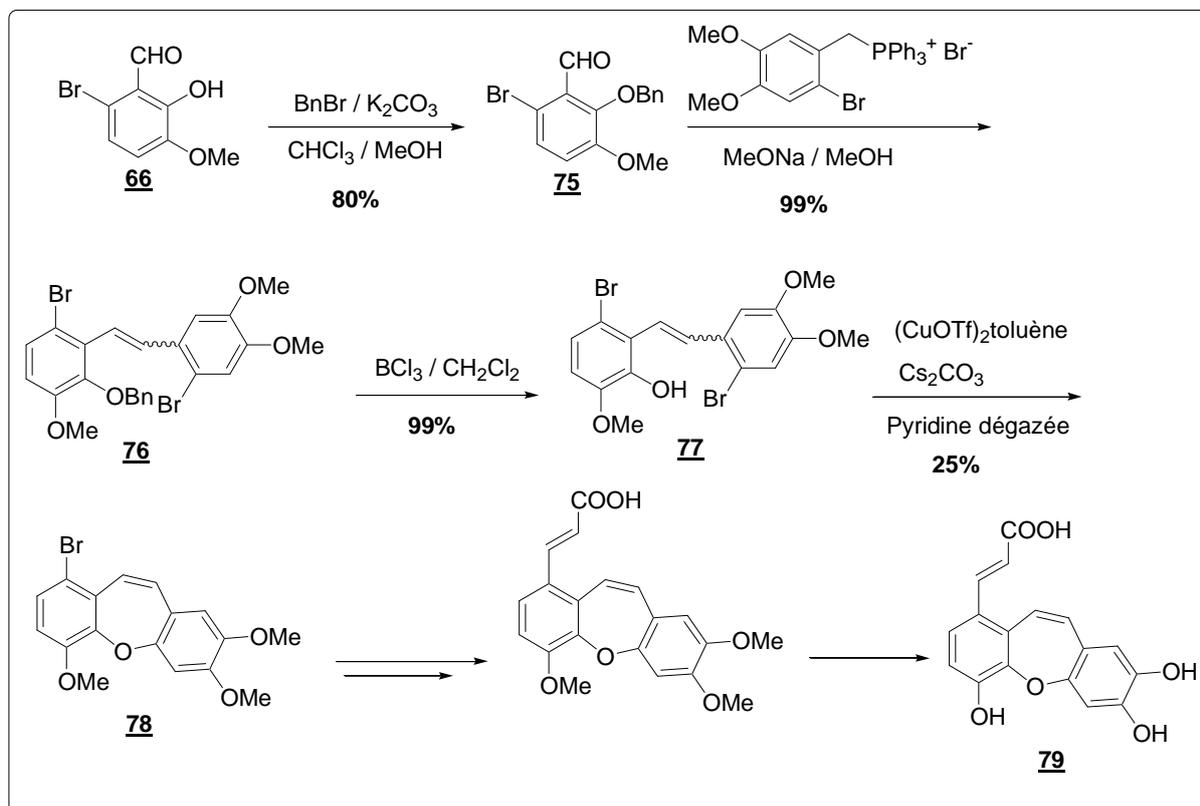


Schéma 28: Synthèse de l'acide tournefolique B

Le groupement phénol de l'intermédiaire **66** est protégé par une méthode classique de benzoylation à l'aide de bromure de benzyle. Puis une réaction de Wittig à l'aide de méthylate de sodium et de bromure de (2-bromo-4,5-diméthoxyphénylméthyl)triphenylphosphonium sur le composé **75** nous conduit à un mélange de deux isomères séparables par chromatographie et facilement identifiables en RMN ^1H . Les deux isomères peuvent être facilement différenciés par les signaux caractéristiques des protons vinyliques. L'isomère minoritaire **76Z** présente un doublet situé à 6,4 ppm et un deuxième doublet à 6,8 ppm de constante 11,8 Hz, caractéristique de la configuration Z. L'isomère majoritaire **76E** présente un doublet à 6,96 ppm et un deuxième à 7,72 ppm de constante 16,5 Hz, caractéristique de la configuration E.

Pour la formation du cycle à 7 chaînons, une réaction de type Ullmann a été envisagée. La condensation d'Ullmann permet d'accéder à des éthers biaromatiques à partir d'un

halogénoaryle ($X = I, Br$) et d'un phénol. Cette condensation met en œuvre un intermédiaire $ArOCu$ qui va réagir avec une espèce halogénoaryle $Ar'X$ pour conduire au couplage $ArOAr'$. Le mécanisme demeure encore obscur mais il semble emprunter le chemin d'une substitution nucléophile aromatique ou passer par un intermédiaire radicalaire, bien que certaines expériences contredisent ces deux hypothèses.

Le protocole « classique » de cette réaction requiert une haute température et une utilisation stoechiométrique de catalyseur. De plus, les halogénoaryles non activés réagissent difficilement et offrent de faibles rendements. Une solution consiste alors à introduire un groupement « activateur » en position *ortho* de l'atome d'halogène.

Ces réactions de couplage ont été particulièrement étudiées ces cinq dernières années avec notamment des efforts pour améliorer les conditions opératoires, les vitesses et les rendements de réaction. Plusieurs paramètres ont été pris en compte : le catalyseur au cuivre (plus ou moins sensible à l'air), la présence de ligands bidentates et neutres (N,N-chélateurs, O,O-chélateurs, N,O-chélateurs mais aussi les carbènes et les phosphines) qui vont « solubiliser » le complexe cuivrique, le solvant (à point d'ébullition élevé : 80 -120 °C, en général le toluène ou un solvant polaire) et la base (en général, le carbonate de potassium ou le carbonate de césium).⁶⁵

Buchwald et son équipe ont établi un nouveau protocole (Schéma 31) mettant en œuvre une quantité catalytique de complexe cuivrique (0,25 à 2,5% molaire).

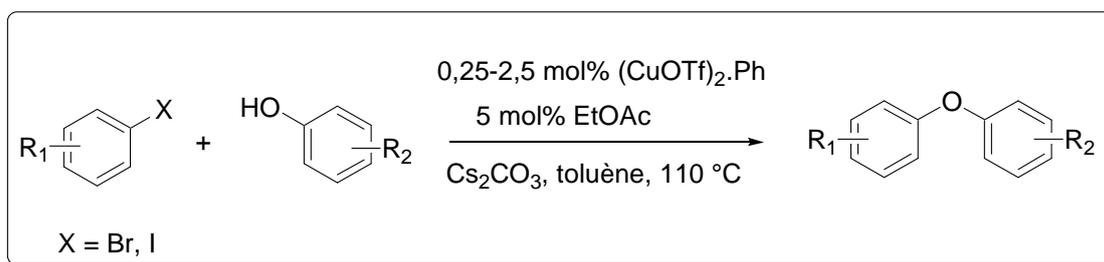


Schéma 29 : Réaction d'Ullmann par Buchwald *et al.*

Ce protocole réactionnel, mettant en œuvre seulement 0,25 à 2,5% molaire de catalyseur, utilisant l'acétate d'éthyle comme ligand et le carbonate de césium comme base,

est une des méthodes de synthèse les plus efficaces vers les éthers biaryliques. Il est applicable à une grande variété de bromo- et d'iodoaryles même désactivés.⁶⁶

Dans notre cas, seules les deux premières méthodologies sont applicables compte tenu de la structure de la molécule : une substitution nucléophile aromatique S_NAr intramoléculaire nécessiterait un bon groupement nucléofuge mais surtout un bon groupement électroattracteur en position *ortho* et/ou *para* de ce dernier. Notre choix s'est finalement porté sur une condensation de type Ullmann intramoléculaire, catalysée par un complexe cuivrique « soluble », $(CuOTf)_2 \cdot PhMe$.

La première étape consiste en la régénération de la fonction phénol à partir du groupement benzyloxy présent sur le composé **76** (Schéma 30). Le réactif utilisé est conditionné par la nature du groupement à déprotéger : c'est ainsi que la déprotection a été assurée par le trichlorure de bore qui permet une déprotection sélective. La réaction menée sur les composés **76E** et **76Z** conduit quantitativement aux composés **77E** et **77Z** respectivement. De même, le mélange **76E** et **76Z** en proportion 96/4 fournit quantitativement le mélange **77E/77Z** dans les mêmes proportions.

Les deux isomères **77E** et **77Z** ont ensuite été soumis à l'éthérisation intramoléculaire de type Ullmann permettant la formation du système oxépinique en utilisant un complexe cuivrique $(CuOTf)_2 \cdot PhMe$, du carbonate de césium comme base ainsi que de la pyridine dégazée et distillée. Partant de **77E** ou de **77Z**, on obtient l'oxépine **78** avec le même rendement modeste de 25%. De même, le mélange **77E/77Z** fournit **78** dans des conditions identiques. Ceci nous permet dorénavant de nous affranchir de la séparation des stéréoisomères **76E** et **76Z**.

D. L'acide fukiiique

La synthèse d'un précurseur de l'acide fukiiique racémique **84** a déjà été très succinctement décrite en 1972²⁷ et au laboratoire nous avons amélioré chaque étape jusqu'à la déprotection finale nous conduisant à la molécule cible qui n'a encore jamais été synthétisée.

L'hydrolyse en milieu acide relativement concentré (HCl 3M) de l'oxazolone **80** fournit alors l'acide 3,4-diméthoxyphénylpyruvique **81**. La seule forme identifiée par RMN est la forme énol de stéréochimie Z.

L'acide 3,4-diméthoxyphénylpyruvique **81** est accessible en deux étapes à partir du veratraldéhyde avec un rendement global de 49 %.

Pour obtenir le pyruvate de méthyle **82** correspondant avec un rendement de 81%, l'acide 3,4-diméthoxyphénylpyruvique **81** réagit avec l'iodométhane en présence de DBU dans le DMF selon le mode opératoire décrit par Namiki *et al.*⁶⁹

La réaction de Wittig sur le pyruvate de méthyle **82** a tout d'abord été envisagée en utilisant le sel de phosphonium $\text{Br}^- \text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{COOMe}$ en présence de méthylate de sodium dans le méthanol selon le mode opératoire décrit par Dalla *et al.*¹³

Cette réaction consiste à former le (carbométhoxyméthylène)triphénylphosphorane à partir du sel de phosphonium à l'aide de méthylate de sodium puis à le faire réagir sur le pyruvate de méthyle **82** en présence de méthanol à reflux.

Malheureusement, cette réaction s'est avérée peu efficace et conduisant à un mélange de **83Z** et **83E** avec un faible rendement (environ 20%) et à la formation de sous-produits tels que **86**.⁷⁰

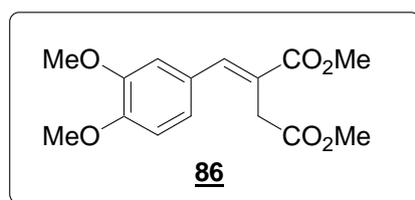


Figure 26 : Sous-produit **86** lors de la réaction de Wittig

Nous avons donc décidé de partir du (carbométhoxyméthylène)triphénylphosphorane commercial et de le faire réagir directement sur **82** dans le toluène à reflux. Le meilleur rendement en (3,4-diméthoxybenzyl)maléate de diméthyle **83Z** et en (3,4-diméthoxybenzyl)fumarate de diméthyle **83E** est obtenu pour un reflux de 2 h dans le toluène.⁷¹

Une chromatographie sur colonne de silice nous a permis de séparer l'isomère Z majoritaire (75%) et l'isomère E minoritaire (24%). Les deux isomères sont facilement différenciés en RMN du proton. Pour l'isomère Z, les protons du groupement méthylène

résonnent à 3,58 ppm sous forme de doublet et le proton oléfinique correspondant à 5,63 ppm sous forme de triplet. Pour l'isomère E, le méthylène résonne à 4,12 ppm sous forme de singulet et le proton oléfinique correspondant à 6,8 ppm sous forme de singulet. La constante de couplage cisoïde 4J vaut 1,9 Hz conformément aux données de la littérature. Pour la suite de la synthèse, on ne travaillera qu'avec le composé **83Z**, précurseur de l'acide fukiiique. De plus les deux isomères n'ont pas le même point de fusion : 55-56 °C pour **83Z** et 49-50 °C pour **83E**.

L'oxydation de la double liaison se fait à l'aide de permanganate de potassium. Elle consiste à placer le composé **83Z** dans l'éthanol à froid en présence de permanganate de potassium et de sulfate de magnésium pendant 12 h. Le composé oxydé **84**, précurseur de l'acide fukiiique racémique sous forme du diester méthylique et du diéther méthylique aromatique, est ainsi obtenu avec un rendement de 68%.

L'étape critique est la dernière étape, i.e. la déprotection finale puis l'isolation et la purification de **85**.

La déprotection de l'isomère **84** est réalisée par une addition de tribromure de bore, suivie d'une hydrolyse.

La déprotection de cet isomère est assez difficile à mettre en œuvre. Même en appliquant des conditions réactionnelles (réaction à reflux, augmentation du nombre d'équivalents de BBr_3 , augmentation du temps de réaction...), les bruts réactionnels (solide ou provenant de la phase acétate d'éthyle) sont généralement constitués de mélanges de molécules partiellement déméthylées. Cependant, en évaporant la phase aqueuse sous pression réduite et en effectuant des lavages à l'acétone et au méthanol, nous avons pu isoler l'acide fukiiique **85** avec un rendement de 35%.

E. Résultats biologiques

Le but du travail effectué en synthèse organique était d'élaborer de nouveaux produits afin d'évaluer leurs activités sur l'intégrase du VIH-1. L'ensemble des nouveaux inhibiteurs potentiels ainsi synthétisés a donc été testé sur l'enzyme in vitro en présence de magnésium par l'équipe du Docteur Jean-François Mouscadet à Cachan et par l'équipe du Professeur Zeger Debyser à Leuven, en Belgique. Certains composés n'ont été évalués que sur l'étape de

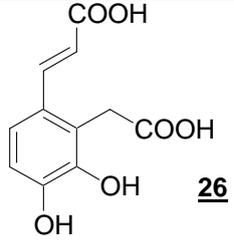
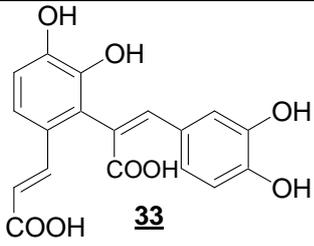
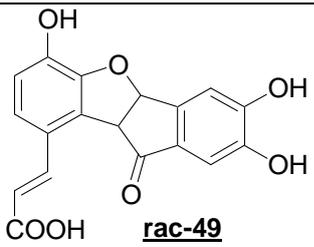
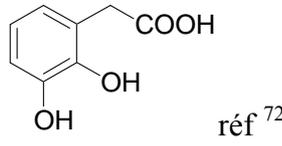
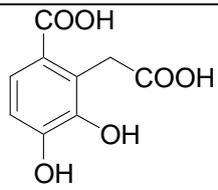
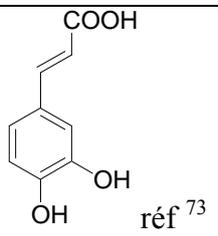
coupure de dinucléotides ou sur l'étape de transfert de brins ou sur l'ensemble des réactions catalysées par l'intégrase. Les composés les plus prometteurs sont ensuite testés sur cellules afin d'évaluer leur activité et leur cytotoxicité par l'équipe du Professeur Myriam Witvrouw à Leuven (cellules MT-4) et par l'équipe du Docteur Jean-François Mouscadet à Cachan (cellules HeLa).

1. Les acides salvianoliques D et E

Les molécules **26**, **33** et **rac-49** ont été testées sur l'ensemble des réactions catalysées par l'intégrase (overall inhibition), selon les protocoles décrits précédemment.

Après la synthèse et l'évaluation des activités biologiques de la partie acide de l'acide salvianolique D, une série de trois composés a été synthétisée où juste la chaîne α,β -insaturée a été remplacée soit par un brome, par un hydrogène ou bien par un acide carboxylique et les trois molécules ont été testées. Les résultats ont été comparés à ceux de la partie acide de l'acide salvianolique D, de la partie acide de l'acide salvianolique E et de la molécule tétracyclisée. Les résultats sont présentés dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Résultats biologiques

Composé	Inhibition de l'intégrase (µM)			Cellules MT-4 (µM)	
	Overall (labo ZD)	ST	Overall (labo JFM)	CE ₅₀	CC ₅₀
 <p>26</p>	1,34	1,09	0,32	55	177
 <p>33</p>	0,56	0,73	0,22	>4,5	>4,5
 <p>rac-49</p>	0,15	0,3	0,05	>27,4	>27,4
 <p>réf⁷²</p>	NT ^a	NT	>100	NT	NT
 <p>réf⁷³</p>	NT	NT	>100	NT	NT
 <p>réf⁷³</p>	2,8 ^b	24 ^b	NT	NT	NT

^a : NT : not tested; ^b : en présence de Mn²⁺

Les résultats pour les trois molécules cibles montrent une bonne corrélation entre les différentes valeurs de CI_{50} , plus basses pour les tests effectués dans le laboratoire parisien mais du même ordre de grandeur.

La partie acide de l'acide salvianolique D, la partie acide de l'acide salvianolique E et la molécule tétracyclisée sont actives contre l'intégrase « wild-type » en présence de l'ion magnésium Mg^{2+} .

L'acide caféique a été évalué auparavant comme inhibiteur d'intégrase en présence de l'ion manganèse Mn^{2+} et présente des CI_{50} de 2,8 et 24 μM sur l'ensemble des réactions catalysées par l'intégrase et sur la réaction de strand transfer respectivement.

La différence entre les deux essais indique que l'acide caféique est plus actif sur les étapes de 3'-processing ou d'attachement à l'ADN. Etant donné que les dosages de l'acide caféique ont été effectués en présence de Mn^{2+} , on pourrait s'attendre à ce que l'activité de l'acide caféique soit plus faible en présence de Mg^{2+} .

Les résultats montrent que la partie acide de l'acide salvianolique D **26**, comparé aux acides caféique, 2,3-dihydroxyphénylacétique et 6-carboxy-2,3-dihydrophénylacétique, a une activité anti-intégrase plus élevée. Les deux fonctions acide semblent indispensables ainsi que le bras espaceur éthényle. L'apport du groupement carboxyméthyle de (**26** comparé à l'acide caféique) est lui aussi significatif.

La partie acide de l'acide salvianolique E **33** et particulièrement la molécule tétracyclisée **rac-49** présentent les meilleures activités, comparables à celles des acides lithospermiques. L'ajout d'une seconde fonction catéchol démontre une augmentation significative de l'activité anti-intégrase mais les meilleurs résultats sont obtenus pour la structure rigide et repliée (**rac-49**). L'angle formé au niveau de la jonction des cycles à cinq chaînons est d'environ 110 °C.

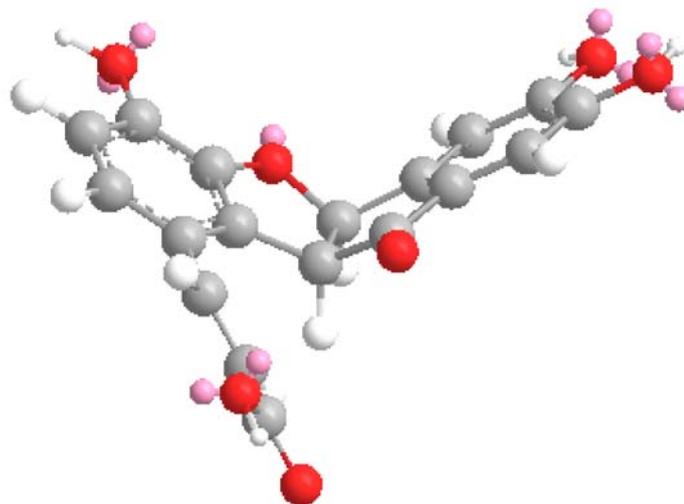


Figure 27 : Structure 3D rac-49 (dessinée sur Chemdraw 3D pro (MM2))

Les résultats pour le dosage de l'inhibition de la réaction de strand transfer indiquent que ces composés sont vraisemblablement actifs sur les étapes catalysées par l'intégrase.

Les molécules 26, 33 et rac-49 ont été testées pour leurs propriétés antivirales (cf tableau 8). Les trois molécules sont toxiques à une concentration inférieure à la concentration inhibant de 50% la réplication virale et il n'est donc pas possible de mesurer leurs activités antivirales.

En général, les dérivés naturels d'acide caféique ont une faible toxicité comme cela a été décrit dans la référence 74.⁷⁴ Il est connu que les fonctions ester (comme dans l'acide rosmarinique) sont sensibles à l'estérase. C'est pour cette raison que nous avons décidé de synthétiser et tester la partie acide substituée d'acide caféique des acides salvianoliques naturels D et E. Cependant, la cytotoxicité observée en culture cellulaire montre que ces composés doivent être modifiés en vue d'obtenir des molécules à activité antivirale potentielle. Néanmoins, au vue de ces résultats, on peut conclure que ces parties acides d'acides salvianoliques révèlent de très fortes activités contre l'intégrase, parmi les meilleures reportées dans cette classe de composés.

2. Les dérivés de sagecoumarine

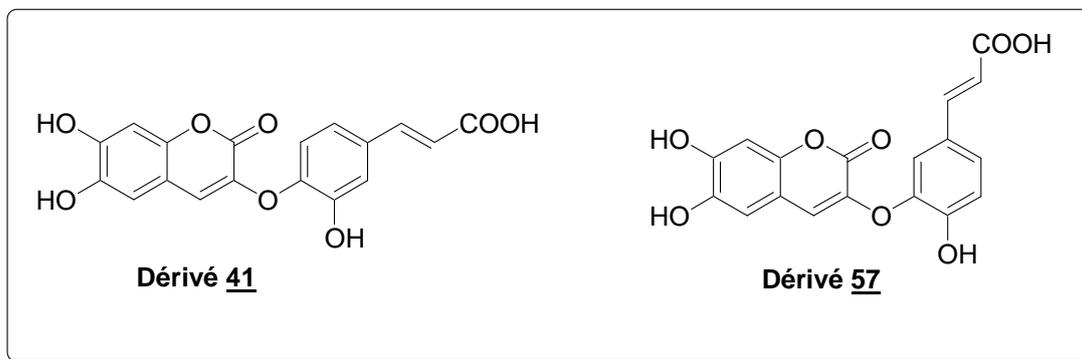


Figure 28 : Dérivés 41 et 57 de la sagecoumarine

L'activité inhibitrice contre l'intégrase du VIH-1 en présence de magnésium pour la réaction de 3'-processing a été évaluée pour chaque composé. La 3,6,7-trihydroxycoumarine⁷⁵ a aussi été testée pour comparer ensuite ses résultats aux deux composés.

Le tableau 9 présente les activités (CI_{50} en μM) pour les trois composés.

Tableau 9 : résultats de l'inhibition de l'intégrase du VIH-1 (CI_{50}) et de l'activité antivirale (CE_{50})

Composé	Inhibition de l'intégrase (μM)	Cellules HeLa- β -gal- CD_4^+ (μM)		Cellules MT-4 (μM)	
		CE_{50}	CC_{50}	CE_{50}	CC_{50}
3,6,7-trihydroxycoumarine	2,0	12,0	>50	>72	=72
Dérivé 1 (<u>41</u>)	2,0	37,0	>50	>105	=105
Dérivé 2 (<u>57</u>)	1,0	31,0	>50	>65	=65

Les composés 41 et 57 et le motif 3,6,7-trihydroxycoumarine présentent des activités anti-intégrase relativement modestes (de l'ordre du μM).

Sur cellules HeLa, aucune cytotoxicité n'est observée au-dessus de 50 μM , la plus haute concentration testée pour le dosage antiviral. Les deux dérivés caféoyles présentent des faibles activités antivirales avec des valeurs de CE_{50} autour de 30 μM et sont trois fois moins élevées que pour la 3,6,7-trihydroxycoumarine.

Testées sur cellules MT-4, nos molécules sont malheureusement dénuées d'activité antivirale. Néanmoins quelle que soit la lignée cellulaire utilisée, la toxicité des trois molécules testées reste faible.

3. L'acide fukiique

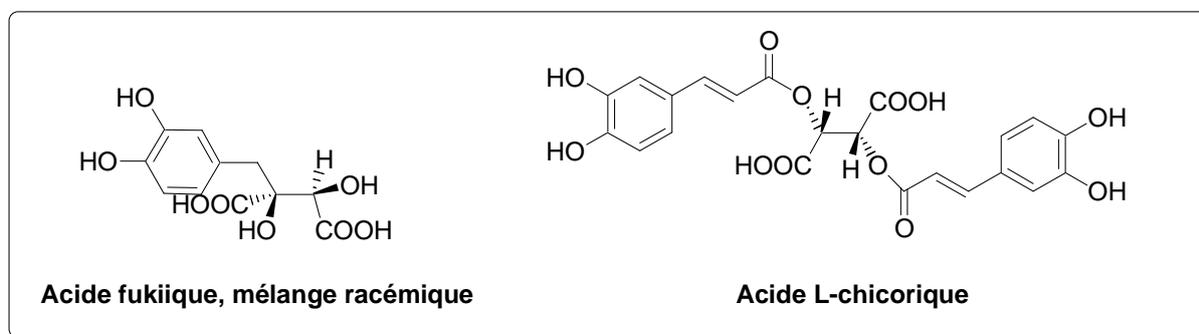


Figure 29 : Acide fukiique (rac-85) et l'acide chicorique

L'acide fukiique a été testé sous forme racémique, sur l'ensemble des réactions catalysées par l'intégrase et les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour l'acide L-chicorique (L-CA) et l'acide D-chicorique (D-CA). Son activité antivirale et sa cytotoxicité ont été évaluées sur cellules MT-4.

Les tests diffèrent selon les laboratoires avec la présence ou l'absence de sérum albumine bovine (bovine serum albumine (BSA)).

L'unité des CI_{50} est le micromolaire (μM).

Tableau 10 : Activités de l'acide fukiique

Composé	Inhibition de l'intégrase CI_{50}	Cellules MT-4	
		CE_{50}	CC_{50}
L-CA	0,2±0,2	12,7±8,5	115±21
D-CA	0,3±0,02	10,9±6,5	111±25
acide fukiique racémique	0,25±0,02 17.0±0,02 ^a	>22	22±0,02

a : BSA ajoutée en cours de réaction

En général, les molécules renfermant un (ou plusieurs) motifs catéchol présentent des CI_{50} en présence de BSA de 50 à 100 fois supérieure aux CI_{50} observées en absence de BSA. Ceci pourrait être attribué à la capacité de la BSA à piéger les polyphénols.⁷⁶

Les résultats reportés dans le tableau 10 indiquent que l'acide fukiique et l'acide chicorique présentent des activités similaires contre l'intégrase mais une toxicité différente. L'acide fukiique est 5 fois plus toxique que l'acide chicorique et sa forte toxicité n'a pas permis l'évaluation de son activité antivirale contre la réplication du virus.

1- HIV-1 integrase inhibitors : a decade of research and two drugs in clinical trial.

Johnson, A.A.; Marchand, C.; Pommier, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1059-1077.

2- Salvianolic acid A, a new depside from roots of *Salvia miltiorrhiza*.

Li, L.N.; Tan, R.; Chen, W.M. *Planta Med.* **1984**, *50*, 227-228.

3- Polyphenolics of *Salvia*.

Lu, Y.; Foo, L.Y. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 117-140.

4- The antioxidant properties of spices in foods.

Chipault, J.R.; Mizuno, G.R.; Lundberg, W.O. *Food Technol.* **1956**, *10*, 209-211.

5- The antioxidative action of spices.

Herrmann, K. *Dtsch. Lebensmitt. Rundsch.* **1981**, *77*, 134-139.

6- Carnosic acid as an antioxidant in rosemary and sage leaves.

Brieskorn, C.; Dömling, H.J.Z. *Lebensm. Unters. Forsch.* **1969**, *141*, 10-16.

7- Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*).

Cuvelier, M.E.; Berset, C.; Richard, H. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 665-669.

8- Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary.

Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 645-652.

9- Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet.

Bailly, F.; Cotelle, P. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1811-1818.

10- Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza*.

Abd-Elazem, I.S.; Chen, H.S.; Bates, R.B.; Huang, R.C.C. *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 91-106.

11- New bis-catechols 5-lipoxygenase inhibitors.

Dupont, R.; Goossens, J.F.; Cotelle, N.; Vrielynck, L.; Vezin, H.; Henichart, J.P.; Cotelle, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 229-235.

12- Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives.

Bailly, F.; Maurin, C.; Teissier, E.; Vezin, H.; Cotelle, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5611.

13- The total synthesis of Salvianolic acid F.

Dalla, V.; Cotelle, P. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6923-6930.

14- Towards the first synthesis of salvianolic acid F : an unexpected intramolecular Diels-Alder cyclization.

Dalla, V.; Cotelle, P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8285-8286.

15- Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis*.

Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.F.; Cotelle, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5053-5056.

16- Towards the synthesis of the skeleton of salvianolic acid D.

Queffelec, C.; Bailly, F.; Cotelle, P. *Synthesis* **2006**, 768-770.

17- Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of catechol and bis-catechol derivatives.

Dupont, R.; Jeanson, L.; Mouscadet, J.F.; Cotelle, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 3175-3178.

18- Spectroscopics studies of diketoacids-metal interactions. A probing tool for the pharmacophoric intermetallic distance in the HIV-1 integrase active site.

Maurin, C.; Bailly, F.; Buisine, E.; Vezin, H.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.F.; Cotelle, P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5583-5586.

19- Design, synthesis, and anti-integrase activity of catechol-DKA hybrids.

Maurin, C.; Bailly, F.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.F.; Cotelle, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2978-2984.

20- Salvianolic acids D and E : two new depsides from *Salvia Miltiorrhiza*.

Ai, C.; Li, L.N. *Planta. Med.* **1992**, *58*, 197-199.

21- Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*.

Lu, Y.; Foo, L.Y. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 91-94.

22- Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*.

Lu, Y.; Foo, L.Y.; Wong, H. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1149-1152.

23- Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*).

Lu, Y.; Foo, L.Y. *Food Chem.* **2001**, *75*, 197-202.

24- Phenolic compounds from *Tournefortia sarmentosa*.

Lin, Y.L.; Tsai, Y.L.; Kuo, Y.H.; Liu, Y.H.; Shiao, M.S. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1500-1503.

25- Anti-lipid-peroxidative principles from *Tournefortia sarmentosa*.

Lin, Y.L.; Chang, Y.Y.; Kuo, Y.H.; Shiao, M.S. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 745-747.

26- Fukiic acid isolated from the hydrolysate of a polyphenol in *Petasites japonicus*.

Sakamura, S.; Yoshihara, T.; Toyoda, K. *Agr. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 1795-1797.

27- The synthesis and configuration of fukiic acid derivatives.

Matsumoto, T.; Hidaka, K.; Nakayama, T.; Fukui, K. *Chem. Lett.* **1972**, 1-4.

28- The stereochemistry of fukiic acid and piscidic acid.

Yoshihara, T.; Ichihara, A.; Sakamura, S. *Tet. Lett.* **1971**, *41*, 3809-3812.

29- The stereochemistry of fukiic acid and its correlation with piscidic acid.

Yoshihara, T.; Ichihara, A.; Nuibe, H.; Sakamura, S.; Sugita, M.; Imamoto, S.; Senoh, S. *Agr. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 121-126.

30- Three new fukiic acid esters, cimicifugic acids A, B and C, from *Cimicifuga Simplex* WORMSK.

Takahira, M.; Kusano, A.; Shibano, M.; Kusano, G.; Sakunai, N.; Nagai, M.; Miyase, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 362-365.

31- Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells.

Einbond, L.S.; Shimizu, M.; Xiao, D.; Nuntanakorn, P.; Lim, J.T.; Suzui, M.; Seter, C.; Pertel, T.; Kennelly, E.J.; Kronenberg, F.; Weinstein, I.B. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *83*, 221-231.

32- Cimicifuga racemosa extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis.

Hostanska, K.; Nisslein, T.; Freudenstein, J.; Reichling, J.; Saller, R. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *84*, 151-160.

33- Anti-AID agents. Part 57: Actein, an anti-HIV principle from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* (black cohosh), and the anti-HIV activity of related saponins.

Sakurai, N.; Wu, J.H.; Sashida, Y.; Mimaki, Y.; Nikaido, T.; Koike, K.; Itokawa, H.; Lee, K.H. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, *14*, 1329-1332.

34- Phenolic esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa* do not cause proliferation effects in MCF-7.

Stromeier, S.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. *Planta. Med.* **2005**, *71*, 495-500.

35- Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters.

Pluymers, W.; Neamati, N.; Pannecouque, C.; Fikkert, V.; Marchand, C.; Burke, T.R.; Pommier, Y.; Shols, D.; De Clercq E.; Debyser, Z.; Witvrouw, M. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 641-648.

36- Studies on coordination compounds. X. Correlation of the solution stabilities of the chelate compounds of ligands coordinating through nitrogen and oxygen.

Van Uitert, L.G.; Fernelius, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 379-383.

37- Salvianolic acids D and E : two new depsides from *Salvia Miltiorrhiza*.

Ai, C.; Li, L.N. *Planta. Med.* **1992**, *58*, 197-199.

38- Synthesis of tetramethyl salvianolic acid F and trimethyl przewalskinic acid A.

Ai, C.; Li, L.N. *Chinese Chem. Lett.* **1996**, *7*, 427-430.

39- Total synthesis of heptamethyl lithospermate.

Jacobson, R.M.; Raths, R.A. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4013-4014.

40- An improved and versatile method for the rapid synthesis of aryldihydrobenzofuran systems by a boron tribromide-mediated cyclization reaction.

Detterbeck, R.; Hesse, M. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 343-360.

41- Some fatty acids having an *O*-heterocycle in their terminal positions. ω -(3-coumarin)alkanoic acids and ω -(2-chromonyl)alkanoic acids.

Yamaguchi, S.; Saitoh, M.; Kawase, Y. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, 28, 125-127.

42- Improved solvent-free synthesis and structure elucidation of (E) and (Z)-4-(arylmethylene)-3-isochromanones.

Lorand, T.; Forgo, P.; Földesi, A.; Osz, E.; Prokai, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2996-3003.

43- Transient titanium anolate aldol condensations.

Harrison, C.R. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4135-4138.

44- 6-methyl-3-benzylidene-5,6-dihydropyran-2,4-diones : synthesis and diastereoselectivity.

Sato, M.; Sunami, S.; Kaneko, C.; Satoh, S.I.; Furuya, T. *Tetrahedron Assymetry* **1994**, 5, 1665-1668.

45- Some reactions with 6,8-di-*tert*-butyl-4-phenyl-3,4-dihydrocoumarin.

Haikal, A.Z.; El-Farargy, A.F.; El-Mobuayed, M.; Hamad, M.M. *Arch. Pharm.* **1990**, 323, 185-187.

46- Palladium-catalyzed carbonylative cyclization of 1-iodo-2-alkenylbenzenes.

Negishi, E.; Coperet, C.; Ma, S.; Mita, T.; Sugihara, T.; Tour, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5904-5918.

47- Heterodiamantane und strukturell verwandte verbindungen. III. Pentacyclische diäther der C11-reihe. 5,13-dioxapentacyclo-[6.5.0.02,6.03,12.04,9]tridecan, 4,13-dioxapentacyclo-[6.4.1.02,7.03,10.05,9]tridecan und 3,10-dioxapentacyclo-[7.3.1.02,7.04,12.06,11]tridecan.

Ammann, W. ; Ganter, C. *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 996-1022.

48- General synthesis of 3-phenoxy coumarins.

Salunke, P.S.; Phalke, C.P.; Kelkar, S.L.; Wadia, M.S. *Synthesis* **1985**, 111-112.

49- A general synthesis of bis[coumarinyl]ethers: synthesis of daphnoretin methyl ether.

Phalke, C.P.; Kelkar, S.L.; Wadia, M.S. *Synthesis* **1986**, 413-414.

50- Formylation of aromatic compounds with hexamethylenetetraamine and trifluoroacetic acid.

Smith, W.E. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3972-3973.

51- Synthetic approaches toward ecteinascidins. Part 1. Preparation of an (E)-2-arylidene-3-benzoyazocin-4-one having a protected phenol in the E-ring.

Saito, N.; Tashiro, K.; Maru, Y.; Yamoguchi, K.; Kubo, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 53-69.

52- Synthesis of 3-(3-benzofuranyl)coumarins.

Deshpande, A.R.; Paradkar, M.V. *Synth. Comm.* **1990**, 20, 809-816.

53- A convenient synthesis of 3,7'-bis(coumarinyl)ethers; synthesis of edgeworin.

Deshpande, A.R.; Thombe, H.M.; Natu, A.D.; Paradkar, M.V. *Indian J. Chem.* **1992**, 31B, 759-761.

54- Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. Structure-activity relationships of benzyloxy and phenoxy acids.

Abraham, D.J.; Kennedy, P.E.; Mehanna, A.S.; Patwa, D.C.; Williams, F.L. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 967-978.

55- Simple one step route to substituted coumarins.

Gallastegui, J.; Logo, J.M.; Palomo, C. *J. Chem. Res.(S)* **1984**, 170-171.

56- A convenient Horner-Emmons approach to the synthesis of substituted ethyl 1,3-butadiene-2-carboxylates, and related compounds.

Janecki, T.; Bodalski, R. *Synthesis* **1989**, 506-510.

57- New benzo[*b*]furans as electroluminescent materials for emitting blue light.

Hwu, J.R.; Chuang, K.S.; Chuang, S.H.; Tsay, S.C. *Org. Lett.* **2005**, 7, 1545-1548.

58- Synthesis of halogenated trimetoquinol derivatives and evaluation of their β -agonist and thromboxane A₂ (TXA₂) antagonist activities.

Markovich, K.M.; Tantishaiyakul, V.; Hamada, A.; Miller, D.D.; Romstedt, K.J.; Shams, G.; Shin, Y.; Fraundorfer, P.F.; Doyle, K.; Feller, D.R. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 466-479.

59- Approaches to 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane lignans via asymmetric synthesis of dihydro- and tetrahydro-furan derivatives.

Pelter, A.; Ward, R.S.; Little, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 10, 2775-2790.

60- Synthesis of the yeast antioxidant benzofuran and analogues.

McKittrick, B.A.; Stevenson, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 709-712.

61- Total synthesis of moracin C.

McAllister, G.D.; Hartley, R.C.; Dawson, M.J.; Knaggs, A.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3453-3457.

62- Synthesis of porritoxin.

Cornella, I.; Kelly, T.R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2191-2193.

63- A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium.

Milstein, D.; Stille, J.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3636-3638.

64- Microwave-assisted one-pot hydrostannylation/Stille couplings.

Maleczka, Jr., R.E.; Lavis, J.M.; Clark, D.H.; Gallagher, W.P. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3655-3658.

65- Renaissance of Ullmann and Goldberg reactions. Progress in copper-catalyzed C-N-, C-O- and C-S-coupling.

Kunz, K.; Scholz, U.; Ganzer, D. *Synlett* **2003**, *15*, 2428-2440

66- A general copper-catalyzed synthesis of diaryl ethers.

Marcoux, J.F.; Doye, S.; Buchwald, S.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10539-10540.

67- A modified synthesis of (+/-)- β -aryllactic acids.

Wong, H.N.C.; Le Xu, Z.; Chang, H.M.; Lee, C.M. *Synthesis*, **1992**, 793-797.

68- Chemocontrolled reduction of aromatic α -ketoesters by NaBH₄: selective synthesis of α -hydroxy esters or 1,2-diols.

Dalla, V.; Cotelle, P.; Catteau, J.P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1577-1580.

69- Synthesis and aldose reductase-inhibitory activities of structural analogues of WF-3681, a novel aldose reductase inhibitor.

Namiki, T.; Baba, Y.; Szuki, Y.; Nishikawa, M.; Sawada, K.; Itoh, Y.; Oku, T.; Kitaura, Y.; Hashimoto, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1404-1414.

70- Synthetic studies on lignans and related compounds. Regiospecificity in the photocyclization of 2,3-dibenzylidenebutyrolactones.

Momose, T.; Kanai, K.; Nakamura, T.; Kuni, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 2755-2759.

71- Total syntheses of all four stereoisomers of piscidic acid via catalytic asymmetric dihydroxylation of (Z)- and (E)-trisubstituted olefins.

Toshima, H.; Saito, M.; Yoshihara, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1934-1941.

72- Capillary gas chromatography of dihydrobenzoic, phenylacetic and phenylpropionic acid.

Snook, M.E.; Mason, P.F.; Arrendale, R.F.; Chortyk, O.T. *J. of Chromatography A* **1985**, *324*, 141-151.

73- Anti-human immunodeficiency virus activity of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid in cultured cells of lettuce leaves.

Tamura, H.; Akioka, T.; Ueno, K.; Chujyo, T.; Okazaki, K.I.; King, P.J.; Robinson Jr., W.E. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 396-400.

74- Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet.

Bailly, F.; Cotellet, P. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1811-1818.

75- ESR of free radicals during the aerobic oxidation of 3-hydroxyesculetin and related derivatives in alkaline solution.

Cotellet, P.; Vezin, H. *Res. Chem. Intermed.* **2003**, *29*, 365-378.

76- Water-soluble complexes formed by natural polyphenols and bovine serum albumin : evidence from gel electrophoresis.

Kusuda, M.; Hatako, T.; Yoshida, T.T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 152-160.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La recherche de traitements contre le SIDA constitue actuellement une des priorités de la recherche médicale. En effet, même si les trithérapies permettent d'obtenir de bons résultats, les traitements sont lourds et le virus commence à développer des résistances à ces combinaisons d'inhibiteurs de la transcriptase inverse et de la protéase. La mise sur le marché du Fuzeon®, inhibiteur de fusion, en 2003 a constitué un immense espoir pour les malades en échec thérapeutique mais la recherche d'inhibiteurs ciblant d'autres étapes du cycle répliatif demeurait essentielle. Au cours de ce travail, deux inhibiteurs de l'intégrase sont entrés en essais cliniques de phase avancée, le raltegravir (MK-0518) et l'elvitegravir (GS-9137, JTK-303). Ces composés semblent très efficaces, faciles d'utilisation et dénués d'effets indésirables apparents.

Dans le cadre de cette étude, nous avons synthétisé des polyphénols d'origine naturelle : la partie acide de l'acide salvianolique D a été obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 22%, la partie acide de l'acide salvianolique E a été obtenu en 11 étapes avec un rendement global de 20%. Lors de cette synthèse, nous avons obtenu un composé tétracyclique en même temps que la partie acide de l'acide salvianolique E avec un rendement global de 21%. Deux dérivés de la sagescoumarine ont été synthétisés selon le même mode opératoire en 6 étapes avec un rendement global de 6% pour le premier composé et de 5% pour le second. L'acide fukiique a été synthétisé en 6 étapes avec un rendement global de 7%. Les synthèses du tournefolal, des acides tournefoliques A et B ne sont pas encore achevées.

Ces molécules ont été testées sur l'intégrase du VIH-1, cible pour laquelle il n'existe encore aucun médicament approuvé par la FDA. Les deux dérivés de la sagescoumarine présentent des activités anti-intégrase légèrement supérieure au micromolaire alors que celles des parties acide des acides salvianolique D et E, du composé tétracyclique et de l'acide fukiique sont sub-micromolaires.

Il n'y a pas d'activité antivirale pour toutes les molécules synthétisées mais la toxicité de ces molécules est relativement faible.

Les perspectives de ce travail sont de terminer les synthèses du tournefolal, de l'acide tournefolique A et B et de tester ces molécules sur intégrase du VIH-1.

Par la suite, il sera intéressant d'essayer de synthétiser des molécules aussi actives sur intégrase, aussi peu toxiques mais présentant une activité antivirale. Pour cela, on pourra envisager de modifier la lipophilie des molécules, notamment en introduisant une fonction amide, ester....

La synthèse de dérivés de la molécule tétracyclique **rac-49** pourra être aussi envisagée pour établir des relations de structure-activités.

On pourra enfin tester ces molécules sur d'autres cibles biologiques : comme par exemple sur l'inhibition de l'agrégat de protéines tels que l' α -synucléine qui intervient dans la maladie de Parkinson ou la β -amyloïde qui intervient dans la maladie d'Alzheimer ; ou sur d'autres enzymes telles que l'aldoréductase qui intervient dans le diabète.

CHAPITRE 3 : PARTIE EXPERIMENTALE

GENERALITES

Les solvants de réaction sont préalablement séchés et distillés, si nécessaire.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur gel de silice MERCK, KIESELGEL 60 GF₂₅₄, et révélées sous rayonnement UV à 254 nm.

Les chromatographies sur colonne pour la purification des produits ont été réalisées avec de la silice SI 60 (MERCK) de granulométrie 0,07-0,23 mm.

Les points de fusion ont été déterminés au moyen d'un appareil numérique de points de fusion ELECTROTHERMAL et n'ont pas été corrigés.

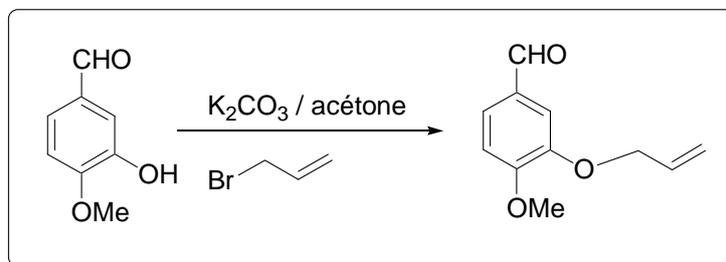
Les spectres RMN ont été réalisés à l'aide de spectromètres BRUKER AC 300 (300 MHz pour les spectres ¹H et 75 MHz pour les spectres ¹³C) ou AC 200 (200 MHz pour les spectres ¹H et 50 MHz pour les spectres ¹³C). les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au TMS pris comme étalon interne. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz et en valeur absolue. Les symboles adoptés pour l'interprétation des spectres sont : s pour singulet ; d pour doublet ; t pour triplet ; q pour quadruplet ; m pour multiplet.

Les analyses élémentaires des composés non décrits dans la littérature ont été effectuées au service central d'analyses du CNRS (Vernaison). Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre Apex Qe 9,4T Bruker Deltonics source monoelectrospray, mode position négatif.

Les spectres de masse en impact électronique ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre ThermoFinnigan PolarisQ fonctionnant à 70 eV. Les spectres à 60 eV ont été réalisés sur un spectromètre quadripolaire RIBERMAG R10-10. Les spectres de masse en « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight » (MALDI-TOF) ont été réalisés sur un spectromètre Voyager DE STR (Applied Biosystems). Le spectre de masse en « ElectroSpray Ionization » (ESI) a été enregistré sur un spectromètre Micromass Quattro II.

A. Synthèse des acides salvianoliques D et E

1. Synthèse du 3-allyloxy-4-méthoxybenzaldéhyde, 2

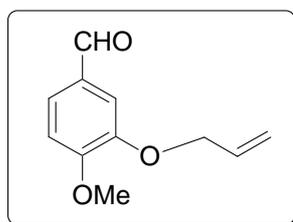


Dans un ballon de 100 mL, on place l'isovanilline (32,9 mmol, 5 g), le carbonate de potassium (36,2 mmol, 5 g) et le bromure d'allyle (41,3 mmol, 5 g) dans de l'acétone anhydre (20 mL).

Après 3 h de reflux, on filtre la solution.

Après évaporation du solvant sous vide, on obtient une huile jaune.

3-allyloxy-4-méthoxybenzaldéhyde (2)



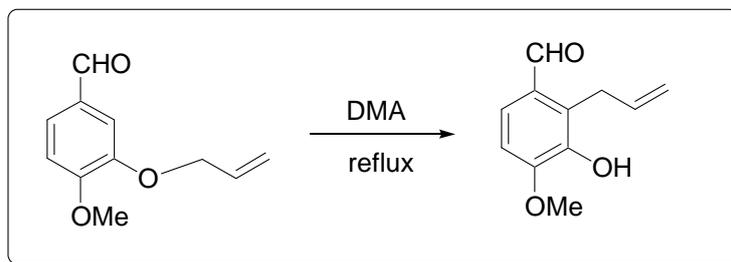
C₁₁H₁₂O₃ (M = 192,21 g/mol)

Rendement = 99%

Huile jaune¹

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,80 ppm (s, 3H, OMe); 4,55 ppm (dt, 2H, ⁴J = 1,4 Hz, ³J = 5,4 Hz, CH₂); 5,17 ppm (dq, 1H, ²J = ⁴J = 1,4 Hz, ³J_{cis} = 10,2 Hz); 5,29 ppm (dq, 1H, ²J = ⁴J = 1,4 Hz, ³J_{trans} = 17,9 Hz); 5,99 ppm (tdd, 1H, ³J = 5,4 Hz, ³J_{cis} = 10,2 Hz, ³J_{trans} = 17,9 Hz, =CH); 6,83 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz); 7,25 ppm (d, 1H, ⁴J = 1,9 Hz); 7,31 ppm (dd, 1H, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 1,9 Hz); 9,61 ppm (s, 1H, CHO).

2. Synthèse de la 2-allylisovanilline, **3**

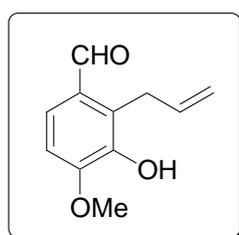


On place le 3-allyloxy-4-méthoxybenzaldéhyde (6,2 g, 32,25 mmol) dans un ballon de 100 mL, et on ajoute du diméthylacétamide (DMA, 9,1 mL) et on chauffe à 185 °C pendant 10 h.

Après refroidissement, on ajoute de l'éther (200 mL) et on extrait avec de la soude 2N (3 x 25 mL). On acidifie ensuite la phase aqueuse avec de l'acide chlorhydrique 36% et on extrait avec de l'acétate d'éthyle (5 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation sous vide des solvants organiques, on obtient une huile marron.

2-allylisovanilline (**3**)



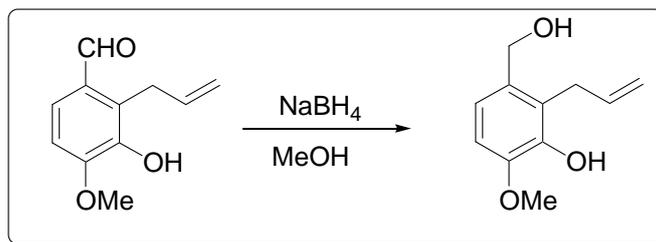
$C_{11}H_{12}O_3$ (M = 192,21 g/mol)

Rendement = 90%

Huile marron¹

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,80 ppm (d, 2H, ³J = 5,9 Hz, CH₂); 3,95 ppm (s, 3H, OMe); 5,00 ppm (m, 2H); 5,81 ppm (s él., 1H); 6,05 ppm (tdd, 1H, ³J = 6,0 Hz, ³J_{cis} = 10,5 Hz, ³J_{trans} = 16,5 Hz, =CH); 6,83 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz); 7,41 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz); 10,05 ppm (s, 1H, CHO).

3. Synthèse du 2-allyl-3-hydroxyméthyl-6-méthoxyphénol, 4

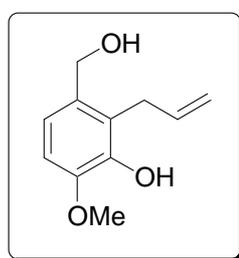


On introduit la 2-allylisovanilline (5,6 g, 29,1 mmol) dans un ballon de 100 mL et on la dissout dans du méthanol (150 mL). On refroidit le mélange à 0 °C et on ajoute du borohydrure de sodium (29,1 mmol, 1,1 g). On agite à 0 °C pendant 1 h puis à température ambiante pendant environ 3 h.

On ajoute une solution saturée de (10 mL) et on extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient un solide marron.

2-allyl-3-hydroxyméthyl-6-méthoxyphénol (4)



C₁₂H₁₄O₃ (M = 194,23 g/mol)

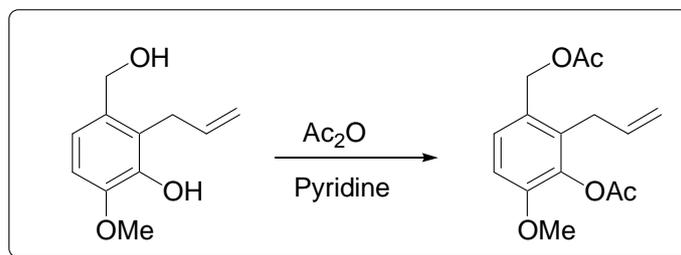
Rendement = 89%

Solide marron

T_f = 83-84 °C (lit.¹ 85-86 °C)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,53 ppm (dt, 2H, ⁴J = 1,6 Hz, ³J = 5,7 Hz, CH₂); 3,85 ppm (s, 3H, OMe); 4,61 ppm (s, 2H, CH₂); 4,99 ppm (m, 2H); 6,11 ppm (m, 1H); 6,71 ppm (d, 1H, ³J = 8,5 Hz); 6,89 ppm (d, 1H, ³J = 8,5 Hz).

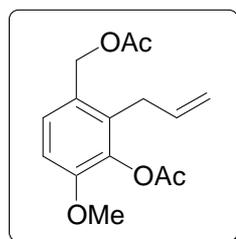
4. Synthèse du 3-acétoxy-1-acétoxyméthyl-2-allyl-4-méthoxybenzène,

5

Le 2-allyl-3-hydroxyméthyl-6-méthoxyphénol (5 g, 25,75 mmol) est dissout dans de la pyridine (4,8 équivalents, 10 mL) et on ajoute de l'anhydride acétique (2,5 équivalents, 6 mL). On agite à température ambiante pendant 2 h.

On ajoute de l'acétate d'éthyle (50 mL), on extrait avec de la soude 1 N (2 x 20 mL) puis avec de l'acide chlorhydrique 1 N (2 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient une huile marron.

3-acétoxy-1-acétoxyméthyl-2-allyl-4-méthoxybenzène (5)

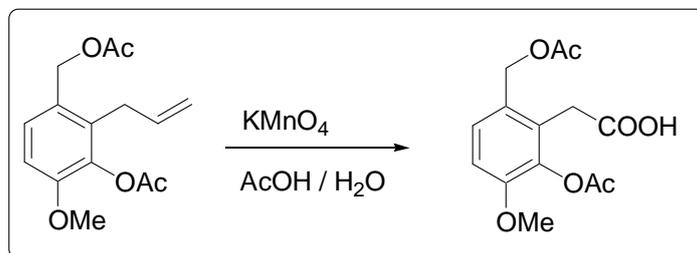
$C_{15}H_{18}O_5$ (M = 278,30 g/mol)

Rendement = 75%

Huile marron ^{1,2}

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 2,05 ppm (s, 3H, OAc); 2,32 ppm (s, 3H, OAc); 3,35 ppm (d, 2H, ³J = 5,7 Hz, CH₂); 3,81 ppm (s, 3H, OMe); 5,01 ppm (m, 2H, CH₂); 5,11 ppm (s, 2H); 5,82 ppm (m, 1H); 6,81 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz); 7,23 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz).

5. Synthèse de l'acide (2-acétoxy-6-acétoxyméthyl-3-méthoxy)phénylacétique, **6**

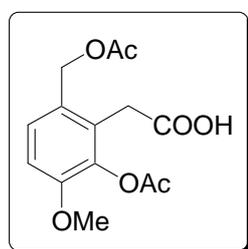


Le 3-acétoxy-1-acétoxyméthyl-2-allyl-4-méthoxybenzène (5,3 g, 19,05 mmol) est dissout dans 82 mL d'acide acétique et 27 mL d'eau. On refroidit entre 0 °C et 5 °C et on ajoute du permanganate de potassium (5 équivalents, 15 g) sans dépasser 5 °C. On laisse agiter à cette température pendant 2 h puis à température ambiante pendant environ 48 h.

On verse le mélange dans 350 mL d'eau et on ajoute du bisulfite de sodium solide pour réduire le permanganate en excès.

On filtre et on extrait la solution avec de l'acétate d'éthyle (4 x 25 mL), puis on extrait la phase organique avec de l'hydrogénocarbonate de sodium 0,5 N (2 x 20 mL). On récupère la phase aqueuse et on l'acidifie avec de l'acide chlorhydrique concentré. Après extraction avec de l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL), séchage sur sulfate de sodium et enfin après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide blanc.

acide 2-acétoxy-6-acétoxyméthyl-3-méthoxyphénylacétique (**6**)



C₁₂H₁₂O₅ (M = 212,20 g/mol)

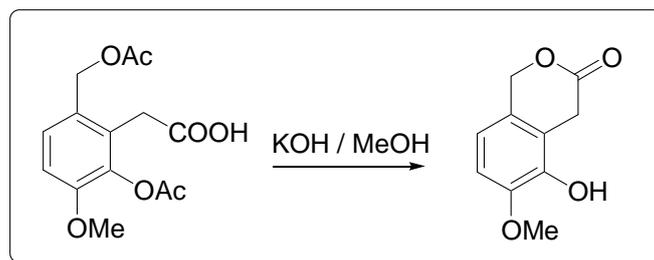
Rendement = 52%

Solide blanc

T_f = 100-101 °C (lit.² 99-101 °C)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 2,01 ppm (s, 3H, OAc); 2,31 ppm (s, 3H, OAc); 3,68 ppm (s, 2H); 3,85 ppm (s, 3H, OMe); 5,11 ppm (s, 2H); 6,89 ppm (d, 1H, ³J = 8,5 Hz); 7,25 ppm (d, 1H, ³J = 8,5 Hz).

6. Synthèse de la 5-hydroxy-6-méthoxyisochroman-3-one, 7

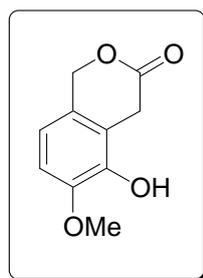


L'acide 2-acétoxy-6-acétoxyméthyl-3-méthoxyphénylacétique (2,1 g, 9,9 mmol) est dissout dans 50 mL d'une solution constituée de 10% de potasse dans du méthanol et on laisse agiter à température ambiante pendant 24 h.

On évapore le méthanol sous pression réduite et on dissout le résidu dans un peu d'eau (15 mL). On acidifie le mélange avec de l'acide chlorhydrique 3N et on extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide marron.

5-hydroxy-6-méthoxyisochroman-3-one (7)



$C_{10}H_{10}O_4$ (M = 194,18 g/mol)

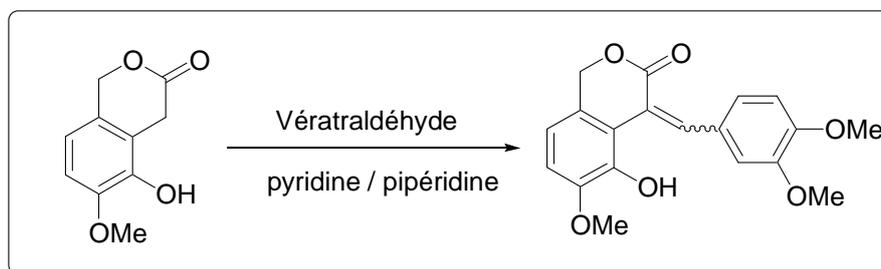
Rendement = 80%

Solide marron

$T_f = 100-101\text{ }^\circ\text{C}$ (lit.² 103-104 $^\circ\text{C}$)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,75 ppm (s, 2H, CH₂); 3,91 ppm (s, 3H, OMe); 5,27 ppm (s, 2H, CH₂); 6,73 ppm (d, 1H, ³J = 8,2 Hz); 6,79 ppm (d, 1H, ³J = 8,2 Hz).

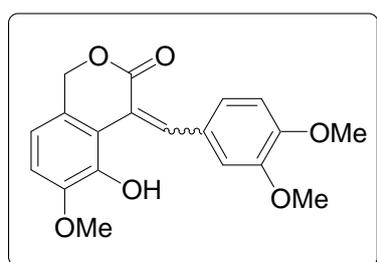
7. Synthèse de la 4-(3,4-diméthoxybenzylidène)-5-hydroxy-6-méthoxy-isochroman-3-one, **30**



Dans un ballon de 100 mL, on place la 5-hydroxy-6-méthoxyisochroman-3-one (1,5 g, 7,7 mmol) et du véatraldéhyde (7,7 mmol, 1,3 g) et on ajoute 9 mL de pyridine et 1,1 mL de pipéridine. On chauffe à 100 °C environ pendant 24 h. On ajoute du dichlorométhane (30 mL) et on effectue des lavages à l'acide chlorhydrique concentré (2 x 20 mL) puis on purifie le produit sur colonne (silice normale, éluant: 50% hexane / 50% acétate d'éthyle, % v/v).

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient des cristaux jaune.

4-(3,4-diméthoxybenzylidène)-5-hydroxy-6-méthoxy-isochroman-3-one (**30**)



$C_{19}H_{18}O_6$ (M = 342,34 g/mol)

Rendement = 25%

Solide jaune³

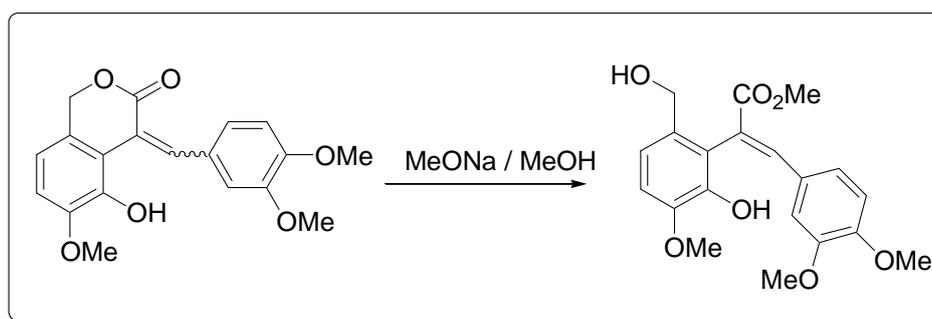
Le spectre 1H montre l'existence de 2 stéréoisomères (l'isomère E étant majoritaire à 80%). Nous ne reportons ici que les déplacements chimiques de l'isomère majoritaire.

En vue d'évaluer la faisabilité des étapes suivantes, nous n'avons pas séparé les stéréoisomères. Cette séparation sera envisagée si une purification ultérieure s'avère délicate (voire impossible).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,64 ppm (s, 3H, OMe); 3,893 ppm (s, 3H, OMe); 3,896 ppm (s, 3H, OMe); 5,18 ppm (s, 2H); 5,89 ppm (s él., 1H); 6,81 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 6,86 ppm (d, 2H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 6,95 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 7,05 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 7,75 ppm (s, 1H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 55,4 ppm (q); 55,8 ppm (q); 56,3 ppm (q); 69,2 ppm (t); 109,8 ppm (d); 110,4 ppm (d); 111,9 ppm (d); 116,4 ppm (d); 117,9 ppm (s); 119 ppm (s); 124,1 ppm (d); 126,4 ppm (s); 128,3 ppm (s); 138,8 ppm (d); 142,2 ppm (s); 146,9 ppm (s); 148,1 ppm (s); 150,4 ppm (s); 170,2 ppm (s).

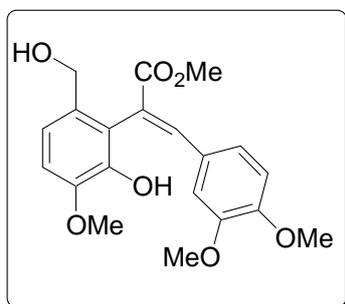
8. Synthèse du 2-(2-hydroxy-6-hydroxyméthyl-3-méthoxyphényl)-3-(3,4-diméthoxyphényl)propénoate de méthyle, 31



On dissout le 4-(3,4-diméthoxybenzylidène)-5-hydroxy-6-méthoxy-isochroman-3-one (0,7 g, 2,05 mmol) dans 10 mL de méthanol et on ajoute du méthylate de sodium (1,5 équivalents, 0,07 g). On chauffe à reflux pendant 24 h. On évapore le méthanol et on dissout le résidu dans 10 mL d'eau. On acidifie la solution avec une solution d'acide chlorhydrique 3N et on l'extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient des cristaux jaune pâle.

2-(2-hydroxy-6-hydroxyméthyl-3-méthoxyphényl)-3-(3,4-diméthoxyphényl)propénoate de méthyle (31)



$C_{20}H_{22}O_7$ (M = 374,38 g/mol)

Rendement = 91%

Solide jaune pâle^{1,3}

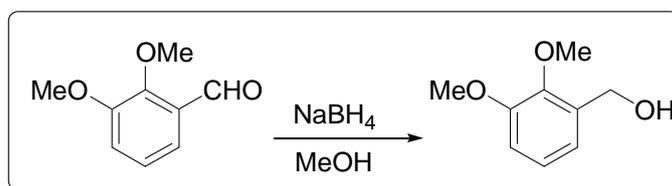
$T_f = 93\text{ }^\circ\text{C}$

Ce produit est obtenu sous la forme d'un seul stéréoisomère. Le déplacement chimique du proton éthylénique est conforme à une stéréochimie E.

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,44 ppm (s, 3H, OMe); 3,85 ppm (s, 3H, OMe); 3,91 ppm (s, 6H, OMe); 4,33 ppm (d, 1H, $^2\text{J} = 12,2$ Hz); 4,46 ppm (d, 1H, $^2\text{J} = 12,2$ Hz); 6,55 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 6,74 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 6,87 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 6,91 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 7,05 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 8,05 ppm (s, 1H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 54,6 ppm (q); 55,3 ppm (q); 55,35 ppm (q); 55,6 ppm (q); 62,7 ppm (t); 110,2 ppm (d); 110,8 ppm (d); 110,9 ppm (d); 120,0 ppm (d); 121,95 ppm (d); 122,55 ppm (s); 125,1 ppm (s); 126,85 ppm (s); 132 ppm (s); 142,9 ppm (d); 143,0 ppm (s); 146,1 ppm (s); 148,1 ppm (s); 150,2 ppm (s); 171,7 ppm (s).

9. Synthèse du (2,3-diméthoxyphényl)méthanol, 12

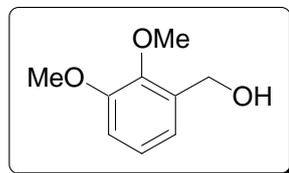


A une solution de 2,3-diméthoxybenzaldéhyde (5 g, 30,1 mmol) dans du méthanol (20 mL) est ajouté lentement du borohydrure de sodium (1,1 équivalents, 1,25 g).

Après 1 heure d'agitation, le solvant est évaporé sous pression réduite. On ajoute de l'eau (10 mL) et on extrait avec du dichlorométhane (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient une huile marron.

(2,3-diméthoxyphényl)méthanol (12)



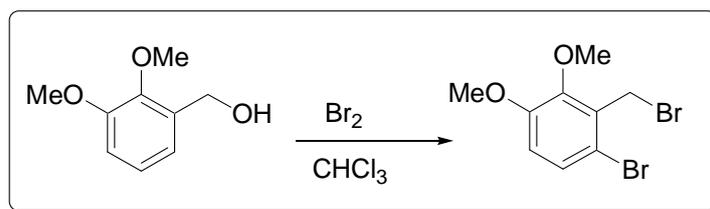
$C_9H_{12}O_3$ (M = 168,19 g/mol)

Rendement = 99%

Huile marron⁴

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,86 ppm (s, 3H, OMe); 3,87 ppm (s, 3H, OMe); 4,68 ppm (s, 2H, CH₂); 6,85-6,94 ppm (m, 2H); 7,01-7,06 ppm (m, 1H).

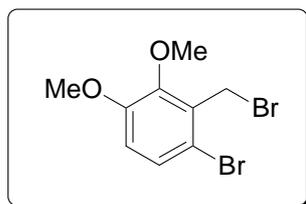
10. Synthèse du 1-bromo-2-bromométhyl-3,4-diméthoxybenzène, 18



A une solution du (2,3-diméthoxyphényl)méthanol (5 g, 29,7 mmol) dans le chloroforme (30 mL) refroidie à 0 °C est ajouté du brome goutte à goutte (2 équivalents, 3 mL).

Après 10 h d'agitation, on évapore le solvant sous pression réduite.

Une chromatographie sur colonne de silice du résidu (éluant : 70% hexane / 30% acétate d'éthyle, % v/v) donne le produit sous forme d'un solide blanc.

1-bromo-2-bromométhyl-3,4-diméthoxybenzène (18)

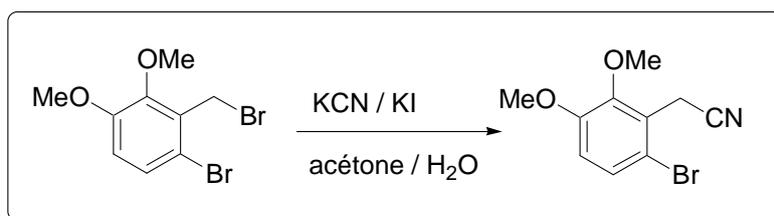
$C_9H_{10}O_2Br_2$ (M = 309,98 g/mol)

Rendement = 85%

Solide blanc

$T_f = 72-73\text{ }^\circ\text{C}$ (lit.⁵ $74\text{ }^\circ\text{C}$)

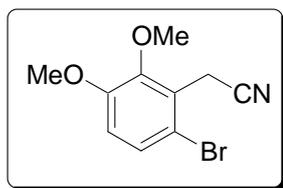
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) : 3,78 ppm (s, 3H, OMe); 3,90 ppm (s, 3H, OMe); 4,64 ppm (s, 2H, CH_2); 6,71 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,8\text{ Hz}$); 7,2 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,8\text{ Hz}$).

11. Synthèse du (6-bromo-2,3-diméthoxyphényl)acétonitrile, 19

A une solution du 1-bromo-2-bromométhyl-3,4-diméthoxybenzène (7,8 g, 25,2 mmol) dans de l'acétone (100 mL) et de l'eau (50 mL), est ajouté du cyanure de potassium (KCN) (1 équivalent, 1,9 g) et une quantité catalytique d'iodure de potassium (0,03 g).

Après 10 h de reflux, le mélange est concentré sous pression réduite puis extrait au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (2 x 10 mL) et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient un solide blanc.

(6-bromo-2,3-diméthoxyphényl)acétonitrile (19)

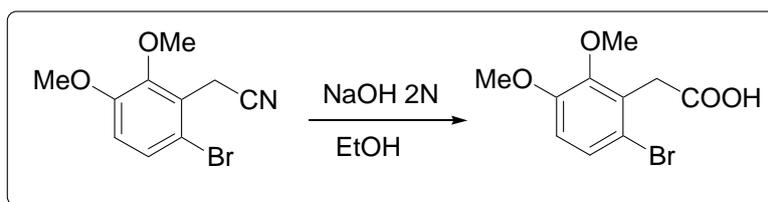
$C_{10}H_{10}O_2NBr$ ($M = 256,10$ g/mol)

Rendement = 99%

Solide blanc

$T_f = 69-70$ °C (lit.⁶ 70 °C)

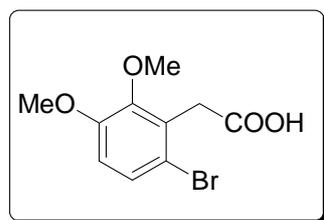
RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,85 ppm (s, 3H, OMe); 3,87 ppm (s, 3H, OMe); 3,94 ppm (s, 2H, CH_2); 6,81 ppm (d, 1H, $^3J = 8,7$ Hz); 7,28 ppm (d, 1H, $^3J = 8,7$ Hz).

12. Synthèse de l'acide 6-bromo-2,3-diméthoxyphénylacétique, 20

Un mélange du (6-bromo-2,3-diméthoxyphényl)acétonitrile (6,3 g, 24,6 mmol) dans une solution d'éthanol (20 mL) et de soude 2N (70 mL) est porté à reflux pendant 10 h.

Après évaporation sous pression réduite du solvant organique, le mélange est acidifié avec de l'acide chlorhydrique concentré puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et extraites avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium 1N (3 x 15 mL). Les phases aqueuses sont rassemblées, acidifiées avec une solution d'acide chlorhydrique 3N. On extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de l'eau (2 x 15 mL) puis séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient un solide blanc.

acide 6-bromo-2,3-diméthoxyphénylacétique (20)

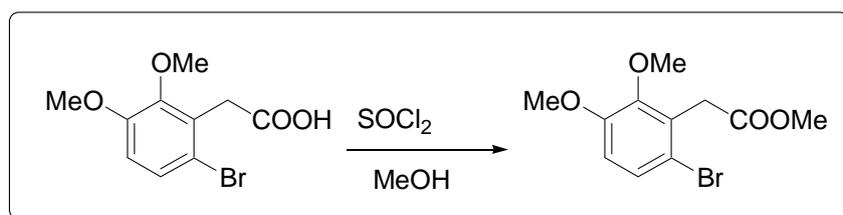
$C_{10}H_{11}O_4Br$ ($M = 275,10$ g/mol)

Rendement = 77%

Solide blanc

$T_f = 135-136$ °C (lit.⁶ 136 °C)

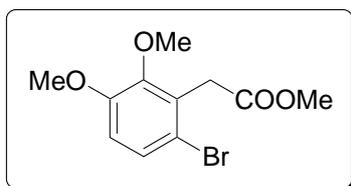
RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,83 ppm (s, 3H, OMe); 3,85 ppm (s, 3H, OMe); 3,92 ppm (s, 2H, CH_2); 6,77 ppm (d, 1H, $^3J = 8,7$ Hz); 7,27 ppm (d, 1H, $^3J = 8,7$ Hz).

13. Synthèse du (6-bromo-2,3-diméthoxyphényl)acétate de méthyle,**21**

A une solution refroidie d'acide 6-bromo-2,3-diméthoxyphénylacétique (5,2 g, 18,9 mmol) dans du méthanol (30 mL), on ajoute goutte à goutte du chlorure de thionyle (2 équivalents, 37,8 mmol, 2,8 mL).

Après 10 h de reflux, le méthanol est évaporé sous pression réduite. On dissout le résidu dans un peu d'eau (10 mL) et on extrait au dichlorométhane (3 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient un solide blanc.

(6-bromo-2,3-diméthoxyphényl)acétate de méthyle (21)

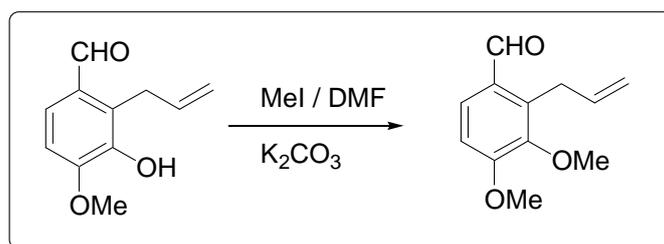
$C_{11}H_{13}O_4Br$ (M = 289,12 g/mol)

Rendement = 95%

Solide blanc

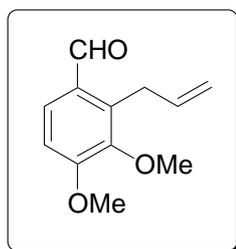
$T_f = 51-53\text{ }^\circ\text{C}$

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,71 ppm (s, 3H, OMe); 3,81 ppm (s, 3H, OMe); 3,84 ppm (s, 3H, OMe); 3,87 ppm (s, 2H, CH_2); 6,75 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9$ Hz); 7,25 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9$ Hz).

14. Synthèse du 2-allyl-3,4-diméthoxybenzaldéhyde, 22

A une solution de 2-allylisovanilline (5,6 g, 29,2 mmol) dans le diméthylformamide (34 mL) sont ajoutés du carbonate de potassium (8,65 g, 62,7 mmol) et de l'iodure de méthyle (6,6 g, 2,9 mL, 46,6 mmol). Le brut réactionnel est agité à température ambiante pendant 10 h, puis de l'eau (40 mL) est versée. Après extraction avec de l'éther (3 x 25 mL), on lave la phase organique avec une solution de soude 2N (2 x 10 mL).

Après séchage de la phase organique et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient une huile marron.

2-allyl-3,4-diméthoxybenzaldéhyde (22)

$C_{12}H_{14}O_3$ (M = 206,24 g/mol)

Rendement = 91%

Huile marron⁴

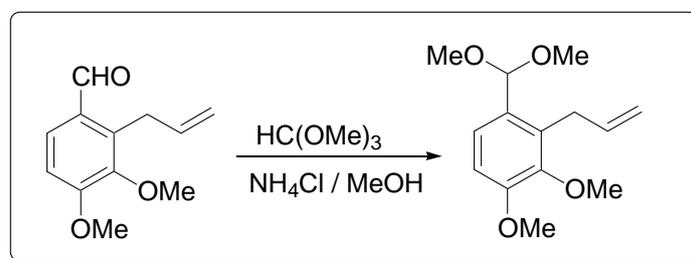
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,80 ppm (s, 3H, OMe); 3,82 ppm (td, 2H, ³J = 5,27 Hz, ⁴J = 1,9 Hz, CH₂); 3,95 ppm (s, 3H, OMe); 5,00 ppm (m, 2H); 6,05 ppm (m, 1H, CH=); 6,90 ppm (d, 1H, ³J = 8,6 Hz); 7,61 ppm (d, 1H, ³J = 8,6 Hz); 10,05 ppm (s, 1H, CHO).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) : 28,4 (t); 55,9 (q); 60,5 (q); 109,7 (d); 115,2 (d); 127,7 (s); 129 (d); 135,7 (s); 137 (d); 147 (s); 157,2 (s); 190,5 (d).

Microanalyses : Pour $C_{12}H_{14}O_3$: Calculé : C, 69,88; H, 6,84; O, 23,27

Trouvé : C, 69,44; H, 6,96; O, 23,39.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 206 ([M⁺], 50%); 191 (100%); 190 (15%); 175 (32%); 115 (16%); 91 (27%).

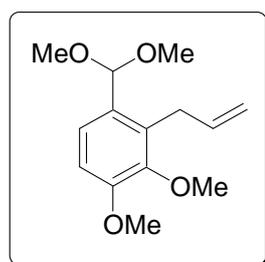
15. Synthèse du 2-allyl-3,4-diméthoxy-1-(diméthoxyméthyl)benzène,**23**

Un mélange de 2-allyl-3,4-diméthoxybenzaldéhyde (5,45 g, 26,4 mmol), d'orthoformiate de triméthyle (5,62 g, 5,8 mL, 52,8 mmol) et une quantité catalytique (ca. 0,1 g) de NH₄Cl dans le méthanol (54 mL) est porté à reflux pendant 2 h.

Après refroidissement à température ambiante, le mélange est versé dans une solution glacée de soude 2N (35 mL) puis extrait rapidement avec de l'éther (3 x 25 mL).

L'évaporation du solvant sous pression réduite nous donne une huile marron.

2-allyl-3,4-diméthoxy-1-(diméthoxyméthyl)benzène (23)



$C_{14}H_{20}O_4$ (M = 252,31 g/mol)

Rendement = 86%

Huile marron⁴

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,26 ppm (s, 6H, OMe); 3,50 ppm (td, 2H, ³J = 5,3 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, CH₂); 3,76 ppm (s, 3H, OMe); 3,83 ppm (s, 3H, OMe); 4,95 ppm (m, 2H); 5,35 ppm (s, 1H); 5,95 ppm (m, 1H, CH=); 6,77 ppm (d, 1H, ³J = 8,6 Hz); 7,25 ppm (d, 1H, ³J = 8,6 Hz).

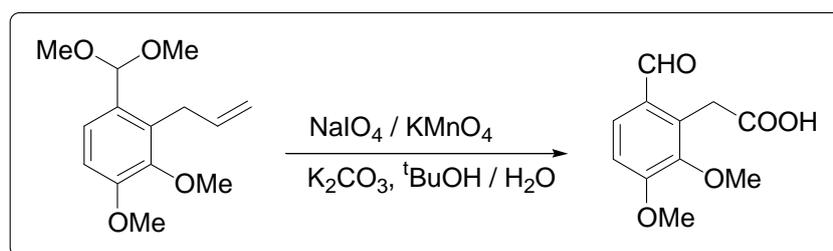
RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) : 23,4 (t); 47 (q, 2 x OCH₃); 49,3 (q); 54,4 (q); 95,2 (d); 103,4 (d); 108,6 (d); 116,1 (d); 122,8 (s); 125,7 (s); 131 (d); 141 (s); 146,5 (s).

Microanalyses : Pour $C_{14}H_{20}O_4$: Calculé : C, 66.65; H, 7.99; O, 25.37

Trouvé : C, 66.45; H, 7.57; O, 25.20.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 252 ([M⁺], 6%); 221 ([M-OCH₃]⁺, 33%); 206 (36%); 191 (82%); 189 (100%); 188 (32%); 175 (36%); 174 (77%); 149 (38%).

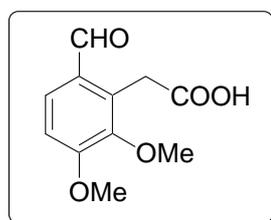
16. Synthèse de l'acide (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétique, 24



A une solution de 2-allyl-3,4-diméthoxy-1-(diméthoxyméthyl)benzène (5,7 g, 22,6 mmol) dans le tertiobutanol (40 mL) est ajoutée une solution de K_2CO_3 (9,4 g, 67,9 mmol) dans de l'eau (79 mL). A cette suspension sont ajoutés du périodate de sodium (20,1 g, 67,9 mmol) et du permanganate de potassium (2,9 g, 18,1 mmol). On agite pendant 4 h à température ambiante. On lave le mélange avec de l'acétate d'éthyle et la phase organique est mise de côté. On acidifie la phase aqueuse avec de l'HCl 3N et on l'extrait avec de l'acétate d'éthyle (5 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient une huile marron.

acide (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétique (24)



$C_{11}H_{12}O_5$ (M = 224,21 g/mol)

Rendement = 77%

Huile marron

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,75 ppm (s, 3H, OMe); 3,88 ppm (s, 3H, OMe); 4,12 ppm (s, 2H, CH_2); 6,85 ppm (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz); 7,50 ppm (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz); 9,8 ppm (s, 1H, CHO).

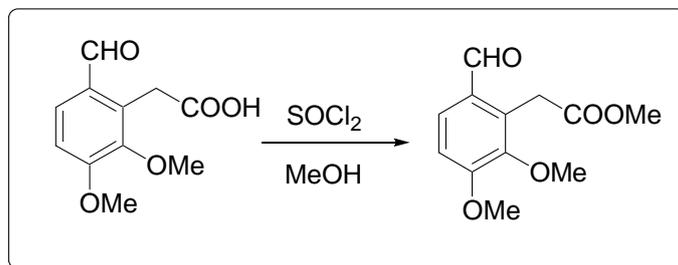
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 31,3 (t); 56,1 (q); 61,1 (q); 110,7 (d); 128,3 (s); 129,3 (s); 132,9 (d); 148,3 (s); 157,6 (s); 177 (s); 192,2 (d).

Microanalyses : Pour $C_{11}H_{12}O_5$: Calculé : C, 58.93; H, 5.39; O, 35.68

Trouvé : C, 58.67; H, 5.25; O, 35.90.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 194 ($[M-CH_2O]^+$, 38%); 180 (20%); 179 (100%); 91 (15%).

17. Synthèse du (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétate de méthyle,

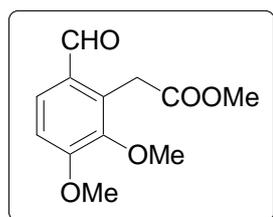
10

On dissout l'acide (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétique (3,9 g, 17,4 mmol) dans du méthanol (28 mL) et on ajoute goutte à goutte du chlorure de thionyle (1,5 équivalents, 26,1 mmol, 3,1 g, 1,9 mL).

Après 1,5 h d'agitation, on évapore le solvant sous pression réduite. On dissout le résidu dans du dichlorométhane et on effectue des lavages à l'eau (20 mL) puis à la saumure (15 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient une huile marron.

(2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétate de méthyle (10)



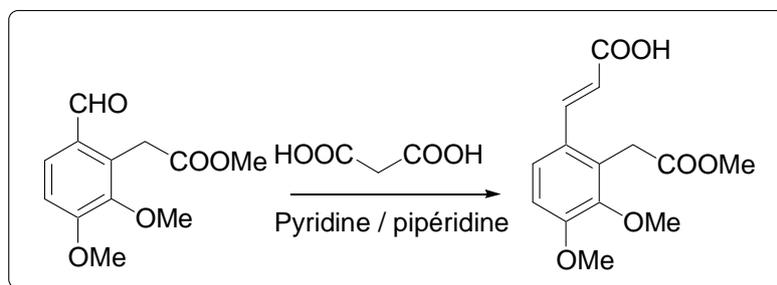
$C_{12}H_{14}O_5$ (M = 238,24 g/mol)

Rendement = 96%

Huile marron⁴

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,67 ppm (s, 3H, OMe); 3,80 ppm (s, 3H, OMe); 3,95 ppm (s, 3H, OMe); 4,18 (s, 2H, CH₂); 7,00 ppm (d, 1H, ³J = 8,6 Hz); 7,58 ppm (d, 1H, ³J = 8,6 Hz); 9,90 ppm (s, 1H, CHO).

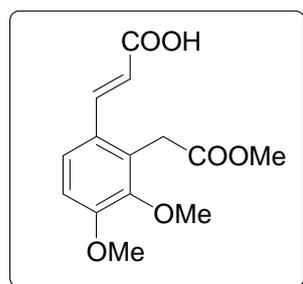
18. Synthèse de l'acide 3-[3,4-diméthoxy-2-(2-méthoxy-2-oxoéthyl)phényl]acrylique, 25



On dissout le (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétate de méthyle (3,9 g, 16,4 mmol) dans de la pyridine (150 mL) et on ajoute de l'acide malonique (3,55 g, 34,13 mmol) et quelques gouttes de pipéridine. On porte à reflux le mélange réactionnel pendant 10 h puis on le verse dans un excès d'HCl N (200 mL). On extrait le mélange avec de l'acétate d'éthyle (2 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

L'évaporation du solvant sous pression réduite nous donne un solide marron.

acide 3-[3,4-diméthoxy-2-(2-méthoxy-2-oxoéthyl)phényl]acrylique (25)



$C_{14}H_{16}O_6$ (M = 280,27 g/mol)

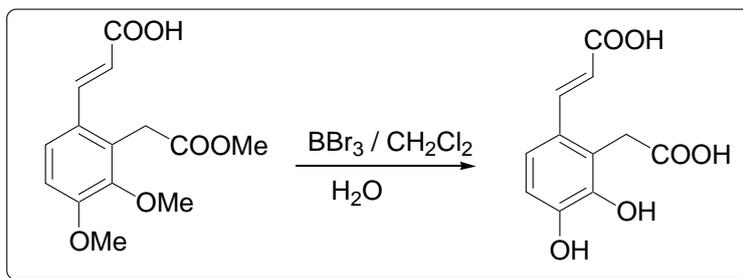
Rendement = 94%

Solide marron

$T_f = 158-160\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,70 ppm (s, 3H); 3,82 ppm (s, 3H); 3,88 ppm (s, 2H); 3,91 ppm (s, 3H); 6,29 ppm (d, 1H, $^3J = 15,6\text{ Hz}$); 6,9 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9\text{ Hz}$); 7,42 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9\text{ Hz}$); 7,92 ppm (d, 1H, $^3J = 15,6\text{ Hz}$).

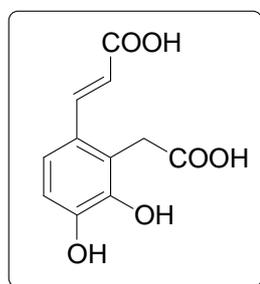
19. Synthèse de la partie acide de l'acide salvianolique D, 26



On dissout l'acide 3-[3,4-diméthoxy-2-(2-méthoxy-2-oxoéthyl)phényl]acrylique (4,4 g, 15,7 mmol) dans du dichlorométhane (20 mL) et on ajoute du tribromure de bore (solution 1,0 M dans du CH₂Cl₂, 4 équivalents, 63 mL) goutte à goutte à température ambiante. Après 24 h d'agitation, on ajoute goutte à goutte de l'eau (70 mL).

Un solide marron apparaît rapidement. La filtration de ce solide nous donne le produit final.

Partie acide de l'acide salvianolique D (26)



C₁₄H₁₆O₆ (M = 280,27 g/mol)

Rendement = 45%

Solide marron

T_f > 400 °C (décomposition)

RMN ¹H (CD₃COCD₃, 200 MHz) : 4,09 ppm (s, 2H); 6,29 ppm (d, 1H, ³J = 16,1 Hz); 6,96 ppm (d, 1H, ³J = 8,5 Hz); 7,38 ppm (d, 1H, ³J = 8,5 Hz); 7,58 ppm (d, 1H, ³J = 16,1 Hz).

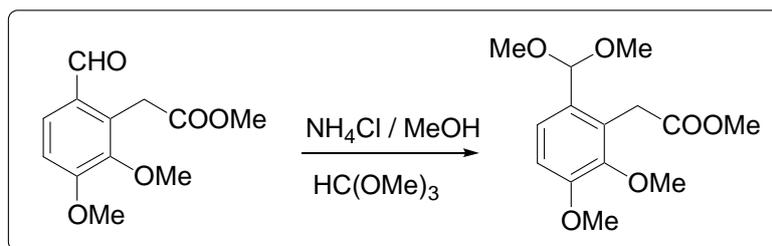
RMN ¹³C (CD₃COCD₃, 50 MHz) : 32,9 (t); 116,4 (d); 117,9 (d); 121,5 (s); 124,7 (d); 125,7 (s); 140,9 (d); 141,4 (s); 142,9 (s); 167,6 (s); 173,9 (s).

Microanalyses : Pour C₁₁H₁₀O₆: Calculé : C, 55.47; H, 4.23; O, 40.30

Trouvé : C, 55.87; H, 4.61; O, 40.57.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 220 ($[M-H_2O]^+$, 46%); 176 (100%, $[M-H_2O-CO_2]^+$); 148 (45%); 147 (50%); 146 (20%); 119 (31%); 91 (46%).

20. Synthèse du (2,3-diméthoxy-6-diméthoxyméthylphényl)acétate de méthyle, **34**

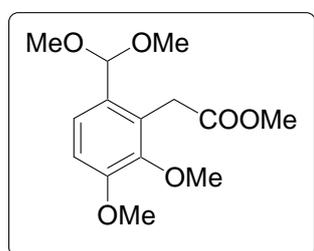


On dissout le (2,3-diméthoxy-6-formylphényl)acétate de méthyle (1,7 g, 7,1 mmol) dans du méthanol (14 mL), on ajoute une quantité catalytique de NH_4Cl puis de l'orthoformiate de triméthyle (14,3 mmol, 1,6 mL). On porte le mélange à reflux pendant 2 h.

Après refroidissement à température ambiante, on verse le mélange dans une solution glacée de soude 2N puis on extrait rapidement avec de l'éther (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient une huile jaune.

(2,3-diméthoxy-6-diméthoxyméthylphényl)acétate de méthyle (**34**)



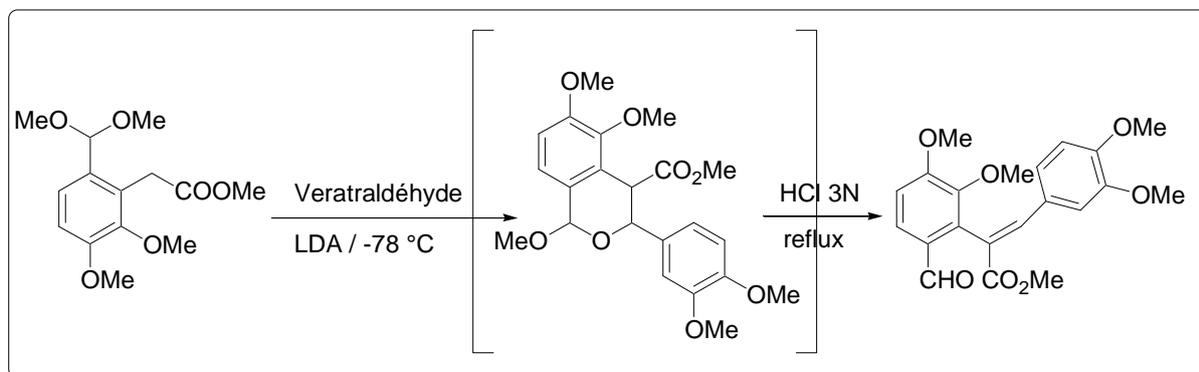
$C_{14}H_{20}O_6$ (M = 284,31 g/mol)

Rendement = 91%

Huile jaune⁴

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,23 ppm (s, 6H, OMe); 3,68 ppm (s, 3H, OMe); 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 3,85 ppm (s, 2H, CH_2); 3,88 ppm (s, 3H, OMe); 5,3 ppm (s, 1H); 6,82 ppm (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz); 7,21 ppm (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz).

21. Synthèse du 3-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(6-formyl-2,3-diméthoxyphényl) acrylate de (E)-méthyle, 37

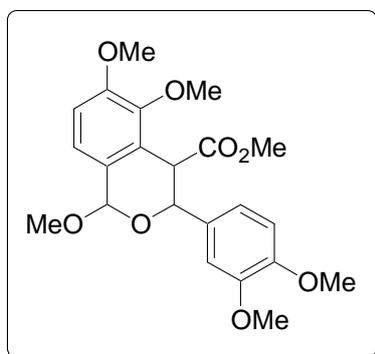


A de la diisopropylamine (1,2 mL), fraîchement distillée, dans du tétrahydrofurane (THF) (30 mL), on ajoute une solution de n-BuLi 1,6 M dans l'hexane (7,2 mL) à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. On agite 30 minutes en laissant remonter la température à température ambiante puis on refroidit à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ et on ajoute goutte à goutte le produit **34** (1,7 g, 6 mmol) dissout dans du THF (10 mL). Après agitation pendant 30 minutes à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, on ajoute goutte à goutte le vératraldéhyde (6 mmol, 1 g) dissout dans du THF et on agite encore 30 minutes.

On acidifie à froid avec de l'acide chlorhydrique 3N et on extrait rapidement avec de l'éther (4 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium. Après évaporation du solvant organique, on obtient une huile jaune.

On ajoute une solution d'acide chlorhydrique 3N (85 mL) et on porte à reflux pendant 12 h. On filtre le solide obtenu et on effectue une chromatographie sur colonne de silice (silice normale, éluant: 50% hexane / 50% acétate d'éthyle, %v/v). On obtient une huile jaune.

3-(3,4-diméthoxyphényl)-1,5,6-triméthoxyisochroman-4-carboxylate de méthyle (36)



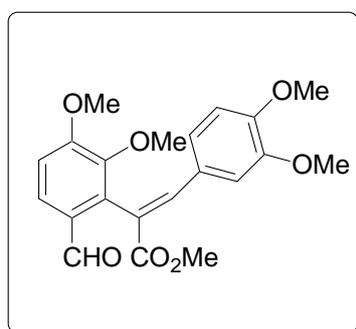
$C_{22}H_{26}O_8$ (M = 418,44 g/mol)

Huile jaune

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,31 ppm (s, 3H, OMe); 3,49 ppm (s, 3H, OMe); 3,73 ppm (s, 3H, OMe); 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 3,86 ppm (s, 3H, OMe); 3,88 ppm (s, 3H, OMe); 4,08 ppm (d, 1H, $^3J = 4,1$ Hz); 5,31 ppm (d, 1H, $^3J = 4,1$ Hz); 5,71 ppm (s, 1H); 6,92 ppm (m, 4H); 7,06 ppm (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 45,85 (d); 51,75 (q); 55,7 (q); 56,00 (q); 56,03 (q); 56,07 (q); 60,2 (q); 69,5 (d); 98,5 (d); 109,2 (d); 110,9 (d); 112,5 (d); 118,4 (d); 123,25 (d); 126,8 (s); 127,0 (s); 131,75 (d); 146 (s); 148,6 (s); 149 (s); 152,2 (s); 171,2 (s).

3-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(6-formyl-2,3-diméthoxyphényl)acrylate de (E)-méthyle (37)



$C_{21}H_{22}O_7$ (M = 386,40 g/mol)

Rendement = 63%

Huile jaune

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,41 ppm (s, 3H, OMe); 3,62 ppm (s, 3H, OMe); 3,78 ppm (s, 3H, OMe); 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 3,97 ppm (s, 3H, OMe); 6,41 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 6,71 ppm (m, 2H); 7,05 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz); 7,79 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz); 8,01 ppm (s, 1H); 9,81 ppm (s, 1H).

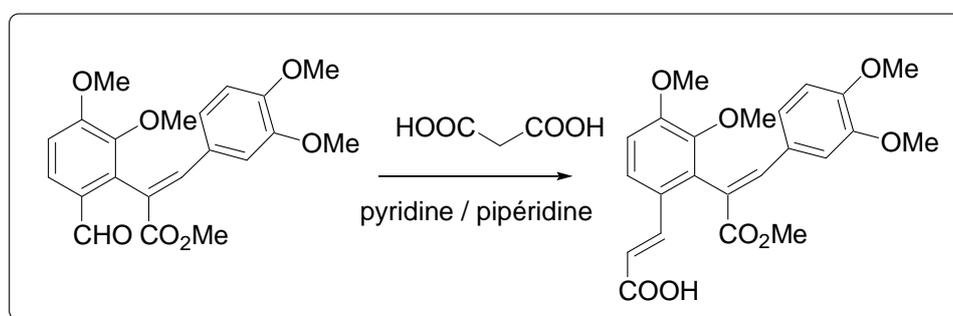
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 51,6 (q); 54,4 (q); 55,0 (q); 55,3 (q); 59,7 (q); 110,3 (d); 111,2 (d); 111,3 (d); 121,3 (s); 124,7 (d); 125,9 (d); 126,2 (s); 127,1 (s); 133,4 (s); 141,5 (d); 146,1 (s); 147,9 (s); 149,8 (s); 157,4 (s); 166,9 (s); 189,3 (d).

Microanalyses : Pour $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$: Calculé : C, 65,28; H, 5,74; O, 28,98

Trouvé : C, 65,67; H, 6,02; O, 29,01.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 425 (6%) $[\text{M} + \text{K}]$; 409 (15%) $[\text{M} + \text{Na}]$; 387 (100%) $[\text{M} + \text{H}^+]$; 355 (78%) $[\text{M} + \text{H}^+ - \text{CH}_3\text{OH}]$.

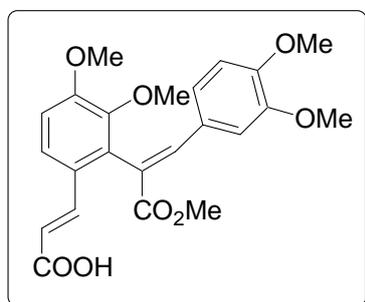
22. Synthèse de l'acide (E)-3-(2-((E)-1-(3,4-diméthoxyphényl)-3-méthoxy-3-oxoprop-1-èn-2-yl)-3,4-diméthoxyphényl)acrylique, 38



On dissout le 3-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(6-formyl-2,3-diméthoxyphényl)acrylate de (E)-méthyle (1,2 g, 3,3 mmol) dans 95 mL de pyridine et dans quelques gouttes de pipéridine et on ajoute l'acide malonique (0,7 g, 6,7 mmol). On porte à reflux pendant 10 h puis on verse le mélange réactionnel dans un excès de solution d'acide chlorhydrique 1N. On extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on recueille un solide marron.

**acide (E)-3-(2-((E)-1-(3,4-diméthoxyphényl)-3-méthoxy-3-oxoprop-1-
èn-2-yl)-3,4-diméthoxyphényl)acrylique (38)**



$C_{23}H_{24}O_8$ (M = 428,43 g/mol)

Rendement = 90%

Solide marron

$T_f = 138-140\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,41 ppm (s, 3H, OMe); 3,65 ppm (s, 3H, OMe); 3,79 ppm (s, 3H, OMe); 3,81 ppm (s, 3H, OMe); 3,94 ppm (s, 3H, OMe); 6,19 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 15,9\text{ Hz}$); 6,41 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9\text{ Hz}$); 6,71 ppm (m, 2H); 6,99 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,9\text{ Hz}$); 7,49 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,9\text{ Hz}$); 7,59 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 15,9\text{ Hz}$); 7,98 ppm (s, 1H).

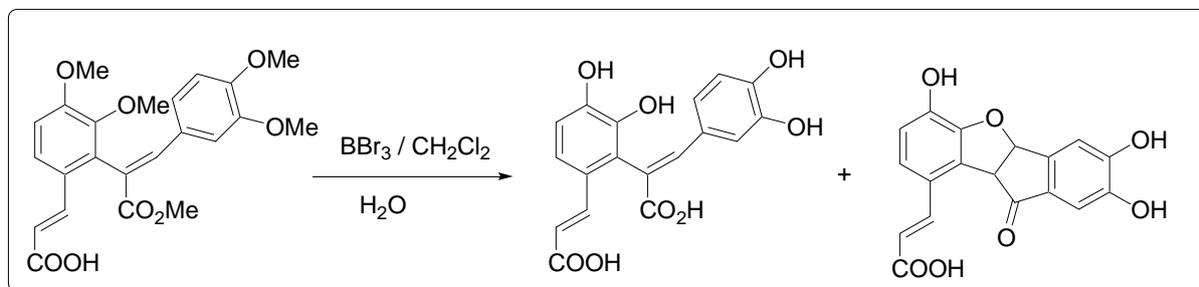
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 52,5 (q); 55,3 (q); 55,9 (q); 56 (q); 60,6 (q); 111,0 (d); 112,0 (d); 112,6 (d); 117,0 (d); 123,3 (s); 123,4 (d); 125,5 (d); 126,7 (s); 127,3 (s); 132,7 (s); 142,5 (s); 144,15 (d); 147,2 (s); 148,65 (s); 150,5 (s); 154,9 (s); 167,95 (s); 172,0 (s).

Microanalyses : Pour $C_{23}H_{24}O_8$: Calculé : C, 64,48; H, 5,65; O, 29,88

Trouvé : C, 64,25; H, 5,74; O, 29,49.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 467 (10%) [M + K]; 451 (13%) [M + Na]; 429 (74%) [M + H⁺]; 427 (100%) [M - H]; 397 (50%) [M + H⁺ - CH₃OH]; 353 (33%) [M + H⁺ - CH₃OH - CO₂].

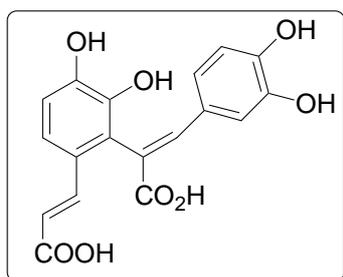
23. Synthèse de l'acide (E)-2-(6-((E)-2-carboxyvinyl)-2,3-dihydroxyphényl)-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylique (partie acide de l'acide salvianolique E)



A une solution d'acide (E)-3-(2-((E)-1-(3,4-diméthoxyphényl)-3-méthoxy-3-oxoprop-1-èn-2-yl)-3,4-diméthoxyphényl)acrylique (1 g, 2,3 mmol) dans du dichlorométhane (25 mL) est ajoutée à température ambiante goutte à goutte une solution de tribromure de bore (1,0 M dans le dichlorométhane, 7 équivalents, 16 mL).

Après 12 h d'agitation, on ajoute goutte à goutte de l'eau (20 mL). Un solide marron précipite rapidement, il s'agit d'un produit non souhaité, l'acide (E)-3-(2,3,6-trihydroxy-10-oxo-9b,10-dihydro-4bH-benzo[b]indéno[2,1-d]furan-9-yl)acrylique et la phase acétate d'éthyle nous donne la partie acide de l'acide salvianolique E.

Partie acide de l'acide salvianolique E (33)



$C_{18}H_{14}O_8$ (M = 358,3 g/mol)

Rendement = 25%

Solide marron

$T_f > 400$ °C (décomposition)

RMN 1H (CD_3COCD_3 , 200 MHz) : 6,24 ppm (d, 1H, $^3J = 15,8$ Hz); 6,65 ppm (s, 1H), 6,94 ppm (d, 2H, $^3J = 8,2$ Hz); 7,31 ppm (d, 2H, $^3J = 8,2$ Hz); 7,61 ppm (d, 1H, $^3J = 15,8$ Hz); 7,93 ppm (s, 1H).

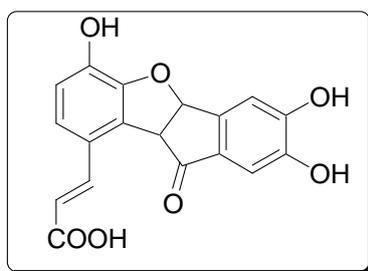
RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 50 MHz) : 115,7 (d); 115,3 (d); 116,7 (d); 117,4 (d); 118,2 (d); 122,9 (s); 123,4 (s); 124,2 (d); 126 (s); 126,1 (s); 141,1 (s); 142,4 (d); 143,7 (d); 144,9 (s); 147,26 (s); 147,29 (s); 167,9 (s); 168,4 (s).

Microanalyses : Pour $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_8$: Calculé : C, 60,34; H, 3,94; O, 35,72

Trouvé : C, 60,30; H, 3,87; O, 36,00.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 397 (59%) [M + K], 381 (100%) [M + Na].

acide (E)-3-(2,3,6-trihydroxy-10-oxo-9b,10-dihydro-4bH-benzo[b]indéno[2,1-d]furan-9-yl)acrylique (rac-39)



$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_7$ (M = 358,3 g/mol)

Rendement = 75%

Solide marron

$T_f > 400$ °C (décomposition)

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 200 MHz) : 4,72 ppm (d, 1H, $^3J = 7,2$ Hz); 6,21 ppm (d, 1H, $^3J = 7,2$ Hz); 6,39 ppm (d, 1H, $^3J = 15,8$ Hz); 6,79 ppm (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz); 6,99 ppm (s, 1H); 7,18 ppm (s, 1H); 7,21 ppm (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz); 8,18 ppm (d, 1H, $^3J = 15,8$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 50 MHz) : 55,9 (d); 84,0 (d); 108,95 (d); 112,9 (d); 117,0 (d); 117,8 (d); 120,1 (d); 125,0 (s); 126,9 (s); 129,3 (s); 144,15 (d); 144,5 (s); 146,4 (s); 148,8 (s); 154,2 (s); 168,4 (s); 199,3 (s).

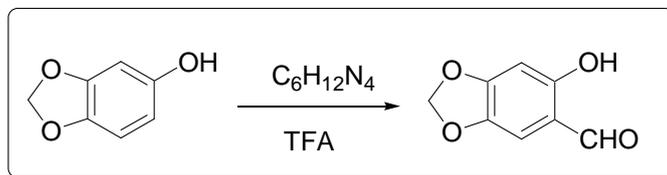
Microanalyses : Pour $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_7$: Calculé : C, 65,53; H, 3,55; O, 32,91

Trouvé : C, 65,47; H, 3,41; O, 32,49.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 379 (13%) [M + K], 378 (18%) [M + K - H], 377 (68%) [M + K - 2H], 363 (100%) [M + Na], 339 (75%) [M - H], 323 (83%) [M - OH].

B. Synthèse des dérivés de la sagecoumarine

1. Synthèse du 2-hydroxy-4,5-(méthylènedioxy)benzaldéhyde, 43

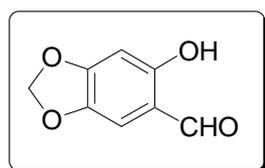


On dissout le 3,4-(méthylènedioxy)phénol (5,0 g, 36,2 mmol) dans 80 mL de dichlorométhane. On ajoute l'hexaméthylènetétraamine (50,0 g, 362,0 mmol) et l'acide trifluoroacétique (TFA) (100 mL). Lorsque l'on ajoute le TFA, la réaction est légèrement exothermique et on peut utiliser un bain de glace pour refroidir le milieu réactionnel. On laisse agiter à température ambiante pendant environ 30 minutes puis on porte le mélange réactionnel à reflux pendant 60 heures.

Après l'arrêt du reflux, on évapore sous pression réduite le TFA et le dichlorométhane. On ajoute de l'eau (25 mL) puis on extrait avec du dichlorométhane (2 x 15 mL). On rassemble les phases organiques et on les lave avec une solution d'acide chlorhydrique 1N (20 mL), avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium 0,5 N (20 mL) et enfin avec de l'eau (20 mL). On sèche la phase organique sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide que l'on purifie sur colonne de silice normale (éluant : 50% hexane / 50% acétate d'éthyle, %v/v). On obtient un solide jaune.

2-hydroxy-4,5-(méthylènedioxy)benzaldéhyde (43)



C₈H₆O₄ (M = 166,13 g/mol)

Rendement = 64%

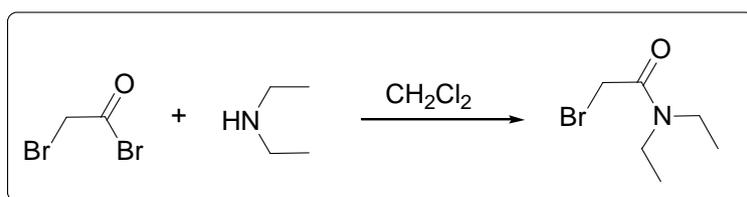
Solide jaune

T_f = 125-126 °C (lit.⁷ 125-126 °C)

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 5,99 ppm (s, 2H); 6,43 ppm (s, 1H); 6,82 ppm (s, 1H); 9,59 ppm (s, 1H); 11,74 ppm (s, 1H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 98,2 ppm (t); 102,1 ppm (d); 109,2 ppm (d); 113,5 ppm (s); 141,2 ppm (s); 155,0 ppm (s); 161,3 ppm (s); 193,5 ppm (d).

2. Synthèse du N,N-diéthylbromoacétamide, **49**

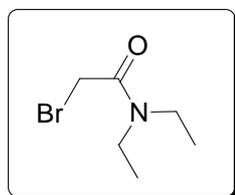


On dissout le bromure de bromoacétyle (25,0 mmol, 2,15 mL) dans 20 mL de dichlorométhane. On place le ballon dans un bain de glace / acétone à $-5\text{ }^\circ\text{C}$. On ajoute goutte à goutte la diéthylamine (500,0 mmol, 5,2 mL) à $-5\text{ }^\circ\text{C}$ puis on laisse sous agitation environ 45 minutes à température ambiante.

On lave ensuite le mélange réactionnel avec de l'eau (4 x 15 mL). On sèche la phase organique sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un liquide brun.

N,N-diéthylbromoacétamide (**49**)



$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{BrNO}$ ($M = 194,07\text{ g/mol}$)

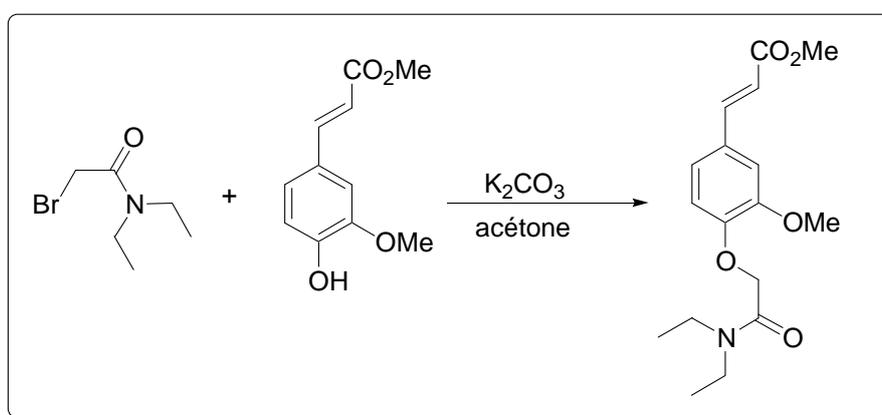
Rendement = 75%

Huile marron⁸

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 1,13 ppm (t, 3H, $^3\text{J} = 7,1$ Hz); 1,25 ppm (t, 3H, $^3\text{J} = 7,1$ Hz); 3,38 ppm (q, 2H, $^3\text{J} = 7,1$ Hz); 3,40 ppm (q, 2H, $^3\text{J} = 7,1$ Hz); 3,84 ppm (s, 2H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 12,5 ppm (q); 14,6 ppm (q); 40,0 ppm (t); 41,2 ppm (t); 42,3 ppm (t); 166,0 ppm (s).

3. Synthèse du (E)-3-(4-(2-(diéthylamino)-2-oxoéthoxy)-3-méthoxyphényl)acrylate de méthyle, 44

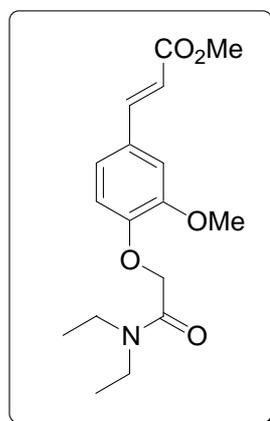


On dissout du férulate de méthyle (3,0 g, 14,0 mmol) dans 150 mL d'acétone anhydre. On ajoute du carbonate de potassium (2,2 g, 15,4 mmol). On agite à température ambiante pendant 30 minutes. L'apparition d'une couleur jaune est caractéristique de la formation du phénolate.

Ensuite, on ajoute goutte à goutte de la N,N-diéthylbromoacétamide (2,7 g, 14,0 mmol) dans 15 mL d'acétone anhydre. Après une nuit de reflux, on filtre le mélange réactionnel puis on évapore sous pression réduite l'acétone. On dissout le résidu dans l'eau et on acidifie avec une solution d'acide chlorhydrique 1N. On extrait ensuite à l'éther (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide jaune clair.

(E)-3-(4-(2-(diéthylamino)-2-oxoéthoxy)-3-méthoxyphényl)acrylate de méthyle (44)



$C_{18}H_{25}NO_4$ (M = 319,40 g/mol)

Rendement = 86%

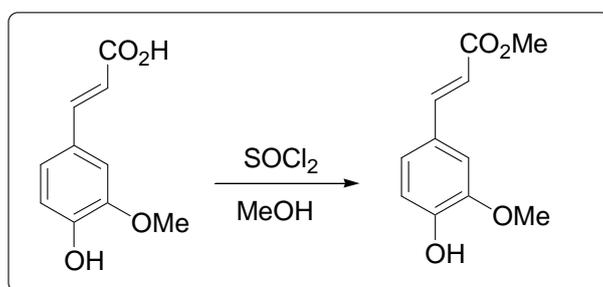
Solide jaune clair

$T_f = 46-49\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 1,10 ppm (t, 3H, $^3J = 7,0$ Hz); 1,18 ppm (t, 3H, $^3J = 7,0$ Hz); 3,38 ppm (q, 2H, $^3J = 7,0$ Hz); 3,39 ppm (q, 2H, $^3J = 7,1$ Hz); 3,74 ppm (s, 3H); 3,85 ppm (s, 3H); 4,73 ppm (s, 2H); 6,26 ppm (d, 1H, $^3J = 15,9$ Hz); 7,06 ppm (m, 2H); 7,10 ppm (d, 1H, $^3J = 1,9$ Hz); 7,57 ppm (d, 1H, $^3J = 15,9$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 12,60 ppm (q); 14,00 ppm (q); 40,20 ppm (t); 41,30 ppm (t); 51,40 ppm (q); 55,70 ppm (q); 67,9 ppm (t); 110,10 ppm (d); 113,20 ppm (d); 115,70 ppm (d); 122,10 ppm (d); 128,10 ppm (s); 144,50 ppm (d); 149,30 ppm (s); 149,50 ppm (s); 166,3 ppm (s); 167,4 ppm (s).

4. Synthèse du 4-hydroxy-3-méthoxycinnamate de méthyle, 47

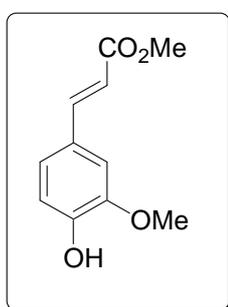


On dissout l'acide férulique (1 g, 5,1 mmol) dans 25 mL de méthanol. On refroidit le mélange à 0 °C et on ajoute goutte à goutte du chlorure de thionyle (1,1 équivalents, 0,4 mL).

Après 12 h de reflux, on évapore le méthanol puis on ajoute 10 mL d'eau. On extrait le mélange réactionnel avec de l'acétate d'éthyle (2 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient une huile jaune.

4-hydroxy-3-méthoxycinnamate de méthyle (47)



$C_{11}H_{12}O_4$ (M = 208,07 g/mol)

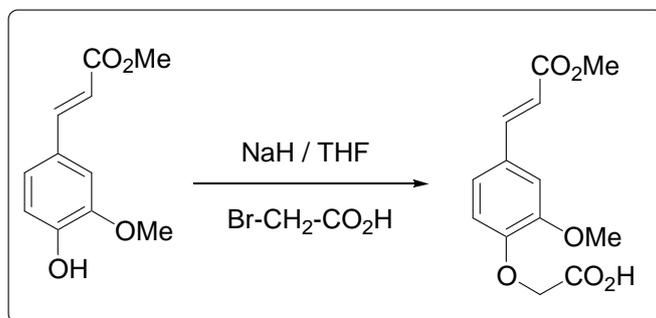
Rendement = 95%

Solide jaune

$T_f = 146-147$ °C (lit.⁹ 148 °C)

RMN 1H (CDCl₃, 200 MHz) : 3,78 ppm (s, 3H, OMe); 3,89 ppm (s, 3H, OMe); 6,28 ppm (d, 1H, $^3J = 15,9$ Hz); 6,89 ppm (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz); 7,01 ppm (d, 1H, $^4J = 1,9$ Hz); 7,05 ppm (dd, 1H, $^3J = 8,3$ Hz, $^4J = 1,9$ Hz); 7,61 ppm (d, 1H, $^3J = 15,9$ Hz).

5. Synthèse du (E)-3-(4-carbométhoxy-4-méthoxy-phényl)-acrylate de méthyle, 50



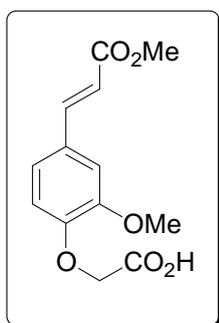
Dans un tricol, on place le 4-hydroxy-3-méthoxycinnamate de méthyle (1,1 g, 5,3 mmol), du NaH à 60% dans de l'huile (2,2 équivalents, 18,85 mmol, 0,5 g, préalablement

lavés à l'éther de pétrole) dans 15 mL de tétrahydrofurane (THF) sous argon. On ajoute goutte à goutte une solution d'acide bromoacétique (1,1 équivalents, 0,8 g) dissout dans 5 mL de THF.

L'ensemble est placé à reflux pendant 12 h. Après refroidissement, on ajoute 10 mL d'eau et on acidifie avec une solution d'acide chlorhydrique 3N. On extrait au dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on recueille un solide blanc.

(E)-3-(4-carbométhoxy-3-méthoxy-phényl)-acrylate de méthyle (50)



$C_{13}H_{14}O_6$ (M = 266,08 g/mol)

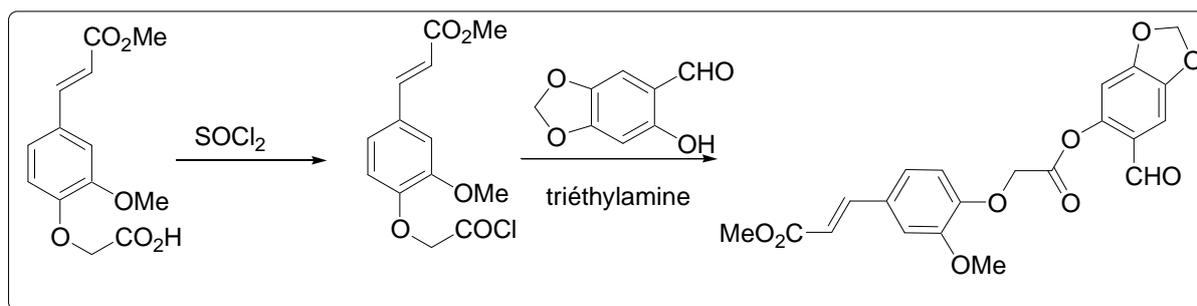
Rendement = 60%

Solide blanc

$T_f = 140-142\text{ }^\circ\text{C}$ (lit.¹⁰ $115\text{ }^\circ\text{C}$)

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) : 3,72 ppm (s, 3H, OMe); 3,81 ppm (s, 3H, OMe); 4,72 ppm (s, 2H); 6,57 ppm (d, 1H, $^3J = 15,2$ Hz); 6,87 ppm (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz); 7,21 ppm (dd, 1H, $^3J = 8,5$ Hz, $^4J = 1,8$ Hz); 7,37 ppm (d, 1H, $^4J = 1,8$ Hz); 7,58 ppm (d, 1H, $^3J = 15,2$ Hz).

6. Synthèse du (E)-3-(4-(2-(6-formylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-3-méthoxyphényl)acrylate de méthyle, 51



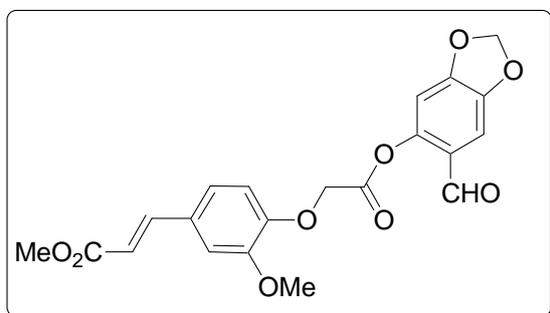
A une solution de 3-(3-méthoxy-4-méthoxycarbonylméthoxy-phényl)acrylate de méthyle (0,4 g, 1,5 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane est ajouté goutte à goutte à 0 °C du chlorure de thionyle (10,5 mmol, 0,8 mL).

Après un reflux de 2 h 30, on évapore sous pression réduite les résidus de chlorure de thionyle et le dichlorométhane. On redissout ensuite le résidu dans 15 mL de dichlorométhane et on ajoute à 0 °C le 2-hydroxy-4,5-(méthylènedioxy)benzaldéhyde (0,25 g, 1,5 mmol) et de la triéthylamine (1,5 mmol, 0,2 mL). On laisse agiter à 0 °C pendant 30 minutes puis 3 h à température ambiante.

On effectue ensuite des lavages avec une solution d'acide chlorhydrique 1N (2 x 15 mL), puis avec une solution de soude 1N (2 x 15 mL). On sèche la phase organique sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide beige qui est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle.

(E)-3-(4-(2-(6-formylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-3-méthoxyphényl)acrylate de méthyle (51)



$C_{21}H_{18}O_9$ (M = 414,36 g/mol)

Rendement = 82%

Solide beige

$T_f = 163-167$ °C

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,80 ppm (s, 3H); 3,93 ppm (s, 3H); 5,05 ppm (s, 2H); 6,09 ppm (s, 2H); 6,34 ppm (d, 1H, $^3J = 15,9$ Hz); 6,67 ppm (s, 1H); 7,02 ppm (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz); 7,05 ppm (m, 2H); 7,25 ppm (d, 1H, $^3J = 1,9$ Hz); 7,63 ppm (d, 1H, $^3J = 15,9$ Hz); 9,87 ppm (s, 1H).

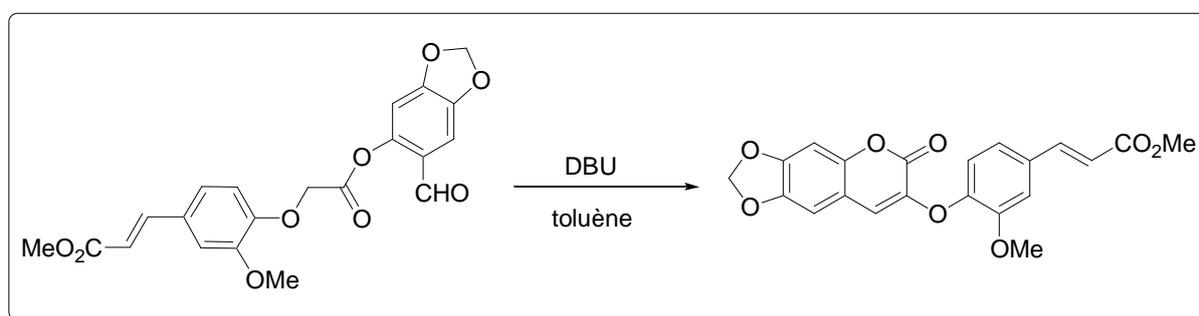
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 51,7 ppm (q); 56,0 ppm (q); 66,2 ppm (t); 102,9 ppm (t); 104,3 ppm (d); 108,3 ppm (d); 110,8 ppm (d); 114,4 ppm (d); 116,5 ppm (d); 122,0 ppm (s); 121,10 ppm (d); 129,40 ppm (s); 144,30 ppm (s); 146,40 ppm (d); 147,90 ppm (s); 148,90 ppm (s); 149,8 ppm (s); 153,2 ppm (s); 167,2 ppm (s); 167,5 ppm (s); 186,7 ppm (d).

Microanalyses : Pour C₂₁H₁₈O₉: Calculé : C, 60,87; H, 4,38; O, 34,75

Trouvé : C, 60,91; H, 4,44; O, 35,00.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 414 (M⁺, 12%); 207 (11%); 206 (26%); 180 (12%); 179 (100%); 175 (8%); 166 (11%); 165 (13%); 145 (7%).

7. Synthèse du (E)-3-(3-méthoxy-4-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5,g]chromèn-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle, 42

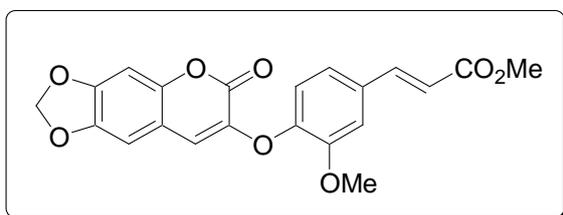


On dissout le (E)-3-(4-(2-(6-formylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-3-méthoxyphényl)acrylate de méthyle (0,4 g, 0,95 mmol) dans 25 mL de toluène et on ajoute le 1,8-diazabicyclo[4.5.0]-undec-7-ène (DBU) (1,6 équivalents, 0,25 mL).

Après une nuit de reflux, on évapore le toluène sous pression réduite et on dissout le résidu dans du dichlorométhane (20 mL). On effectue des lavages avec une solution d'acide chlorhydrique 1N (15 mL) puis avec une solution de soude 1N (15 mL) et on sèche la phase organique sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide blanc qui est recristallisé dans l'acétone.

(E)-3-(3-méthoxy-4-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5,g]chromèn-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle (42)



$C_{21}H_{16}O_8$ (M = 396,35 g/mol)

Rendement = 25%

Solide blanc

$T_f > 230\text{ }^\circ\text{C}^7$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,79 ppm (s, 3H); 3,87 ppm (s, 3H); 6,02 ppm (s, 2H); 6,38 ppm (d, 1H, $^3J = 16,0$ Hz); 6,68 ppm (s, 1H); 6,84 ppm (s, 1H); 6,86 ppm (s, 1H); 7,03 ppm (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz); 7,10-7,13 ppm (m, 2H); 7,65 ppm (d, 1H, $^3J = 16,0$ Hz).

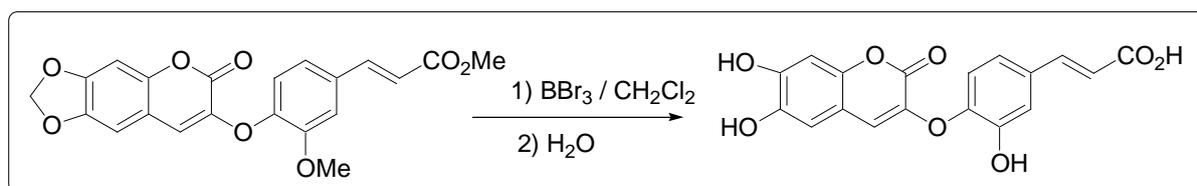
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 51,8 ppm (q); 56,1 ppm (q); 98,2 ppm (t); 102,2 ppm (d); 104,4 ppm (d); 111,9 ppm (d); 112,5 ppm (s); 117,7 ppm (d); 120,4 ppm (d); 121,7 ppm (d); 122,2 ppm (d); 132,2 ppm (s); 140,2 ppm (s); 144,0 ppm (s); 145,2 ppm (s); 145,4 ppm (s); 147,3 ppm (d); 149,6 ppm (s); 150,8 ppm (s); 157,2 ppm (s); 167,2 ppm (s).

Microanalyses : Pour $C_{21}H_{16}O_8$: Calculé : C, 63,64; H, 4,07; O, 32,29

Trouvé : C, 63,72; H, 3,98; O, 32,27.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 397 ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 11%); 396 ($\text{M}^{+\circ}$, 45%); 365 (7%); 309 (10%); 204 (27%); 203 (100%); 177 (25%); 175 (14%).

8. Synthèse de l'acide (E)-3-(4-(6,7-dihydroxy-2-oxo-2H-chromèn-3-yloxy)-3-hydroxyphényl)acrylique, 41

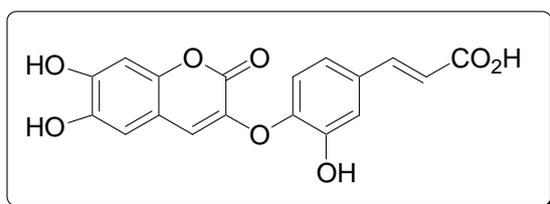


On dissout le (E)-3-(3-méthoxy-4-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5,g]chromén-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle (0,2 g, 0,50 mmol) dans 10 mL de dichlorométhane et on ajoute du tribromure de bore (solution 1,0 M dans CH₂Cl₂, 2 mL) goutte à goutte à température ambiante. Après 1 h 30 d'agitation à température ambiante, on porte le mélange réactionnel à reflux pendant une nuit.

Après arrêt du chauffage, on ajoute de l'eau goutte à goutte (10 mL), on agite pendant 30 minutes à température ambiante puis on porte à reflux pendant une nuit.

On filtre le précipité formé et on obtient un solide marron.

acide (E)-3-(4-(6,7-dihydroxy-2-oxo-2H-chromén-3-yloxy)-3-hydroxyphényl)acrylique (41)



C₁₈H₁₂O₈ (M = 356,28 g/mol)

Rendement = 90%

Solide marron

T_f = 248 °C

RMN ¹H (CD₃COCD₃, 200 MHz) : 6,42 ppm (d, 1H, ³J = 15,9 Hz); 6,84 ppm (s, 1H); 7,01 ppm (s, 1H); 7,09 ppm (d, 1H, ³J = 8,4 Hz); 7,16 ppm (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 1,8 Hz); 7,28 ppm (s, 1H); 7,30 ppm (d, 1H, ⁴J = 1,8 Hz); 7,59 ppm (d, 1H, ³J = 15,9 Hz).

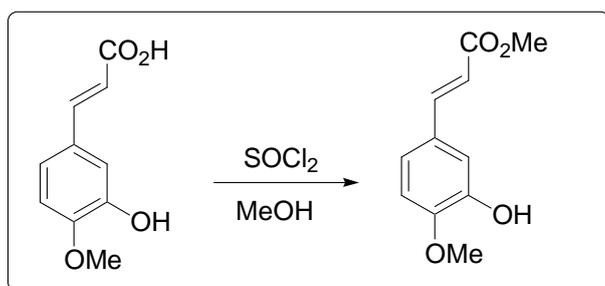
RMN ¹³C (CD₃COCD₃, 50 MHz) : 103,3 ppm (d); 112,1 ppm (d); 112,5 ppm (d); 117,1 ppm (s); 118,5 ppm (d); 120,6 ppm (d); 121,5 ppm (d); 124,8 ppm (d); 132,7 ppm (s); 140,0 ppm (s); 143,7 ppm (s); 144,9 ppm (d); 145,8 ppm (s); 146,8 ppm (s); 148,8 ppm (s); 149,2 ppm (s); 158,0 ppm (s); 167,8 ppm (s).

Microanalyses : Pour C₁₈H₁₂O₈: Calculé : C, 60,68; H, 3,39; O, 35,93

Trouvé : C, 60,89; H, 3,21; O, 36,02.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 357 ($[M^{+o} + H]$, 16%); 356 (M^{+o} , 80%); 339 (7%); 338 (20%); 253 (8%); 192 (8%); 191 (100%); 178 (46%); 177 (94%); 166 (13%); 165 (26%); 163 (7%); 162 (27%); 150 (46%); 137 (10%); 121 (11%); 67 (11%).

9. Synthèse du 3-hydroxy-4-méthoxycinnamate de méthyle, 52

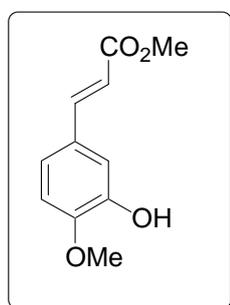


On dissout l'acide isoférulique (1 g, 5,1 mmol) dans 25 mL de méthanol. On refroidit le mélange à 0 °C et on ajoute goutte à goutte du chlorure de thionyle (1,1 équivalents, 0,4 mL).

Après 12h de reflux, on évapore le méthanol puis on ajoute 10 mL d'eau. On extrait le mélange réactionnel avec de l'acétate d'éthyle (2 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide blanc.

3-hydroxy-4-méthoxycinnamate de méthyle (52)



$C_{11}H_{12}O_4$ (M = 208,07 g/mol)

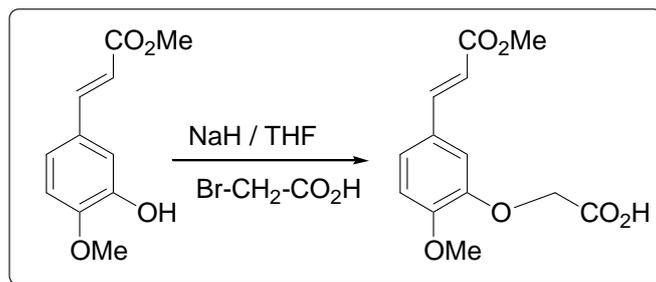
Rendement = 95%

Solide blanc

$T_f = 76-77$ °C

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) : 3,73 ppm (s, 3H, OMe); 3,88 ppm (s, 3H, OMe); 6,25 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 15,9$ Hz); 6,80 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 6,98 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 7,11 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 7,58 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 15,9$ Hz).

10. Synthèse du (E)-3-(3-carbométhoxy-4-méthoxy-phényl)acrylate de méthyle, 54

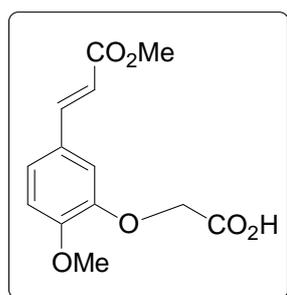


Dans un tricol, on place le 3-hydroxy-4-méthoxycinnamate de méthyle (1,1 g, 5,3 mmol), du NaH à 60% dans de l'huile (2,2 équivalents, 18,85 mmol, 0,5 g, préalablement lavés à l'éther de pétrole) dans 15 mL de tétrahydrofurane (THF) sous argon. On ajoute goutte à goutte une solution d'acide bromoacétique (1,1 équivalents, 0,8 g) dissout dans 5 mL de THF.

L'ensemble est placé à reflux pendant 12 heures. Après refroidissement, on ajoute 10 mL d'eau et on acidifie avec HCl 3N. On extrait au dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on recueille un solide blanc.

(E)-3-(3-carbométhoxy-4-méthoxy-phényl)acrylate de méthyle (54)



$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (M = 266,08 g/mol)

Rendement = 77%

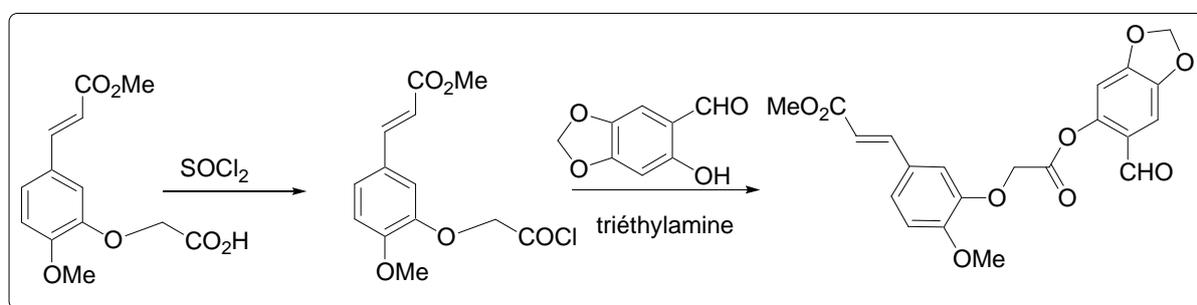
Solide blanc

$T_f = 143-145$ °C

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 300 MHz) : 3,69 ppm (s, 3H, OMe); 3,89 ppm (s, 3H, OMe); 4,79 ppm (s, 2H); 6,41 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 15,9$ Hz); 7,02 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,5$ Hz); 7,23 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,5$ Hz, $^4\text{J} = 1,8$ Hz); 7,32 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,8$ Hz); 7,56 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 15,9$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 75 MHz) : 50,7 ppm (q); 55,35 ppm (q); 65,25 ppm (t); 112,1 ppm (d); 112,6 ppm (d); 115,55 ppm (d); 123,6 ppm (d); 127,2 ppm (s); 144,35 ppm (d), 147,95 ppm (s); 151,85 ppm (s); 166,85 ppm (s); 169,2 ppm (s).

11. Synthèse du (E)-3-(3-(2-(6-formylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-4-méthoxyphényl)acrylate de méthyle, 55



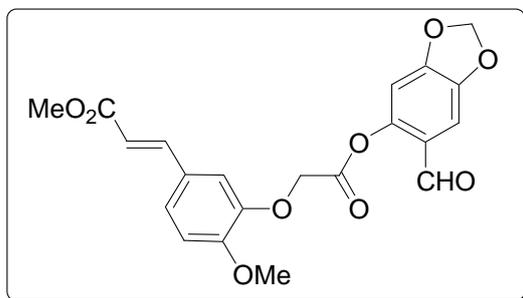
A une solution de (E)-3-(4-méthoxy-3-méthoxycarbonylméthoxy-phényl)acrylate de méthyle (0,4 g, 1,5 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane, on ajoute goutte à goutte à 0 °C du chlorure de thionyle (10,5 mmol, 0,8 mL).

Après un reflux de 2 h 30, on évapore sous pression réduite les résidus de chlorure de thionyle et le dichlorométhane. On redissout ensuite le résidu dans 15 mL de dichlorométhane et on ajoute à 0 °C le 2-hydroxy-4,5-(méthylènedioxy)benzaldéhyde (0,25 g, 1,5 mmol) et de la triéthylamine (1,5 mmol, 0,2 mL). On laisse agiter à 0 °C pendant 30 minutes puis 3 h à température ambiante.

On effectue ensuite des lavages avec une solution d'acide chlorhydrique 1N, puis avec une solution de soude 1N. On sèche la phase organique sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide beige qui est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle.

(E)-3-(3-(2-(6-formylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-4-méthoxyphényl)acrylate de méthyle (55)



$C_{21}H_{18}O_9$ (M = 414,36 g/mol)

Rendement = 65%

Solide beige

$T_f = 180-184\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) : 3,72 ppm (s, 3H); 3,83 ppm (s, 3H); 5,23 ppm (s, 2H); 6,22 ppm (s, 2H); 6,62 ppm (d, 1H, $^3J = 16,0$ Hz); 6,91 ppm (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz); 6,93 ppm (s, 1H); 7,34 ppm (m, 2H); 7,53 ppm (s, 1H); 7,60 ppm (d, 1H, $^3J = 16,0$ Hz); 9,95 ppm (s, 1H).

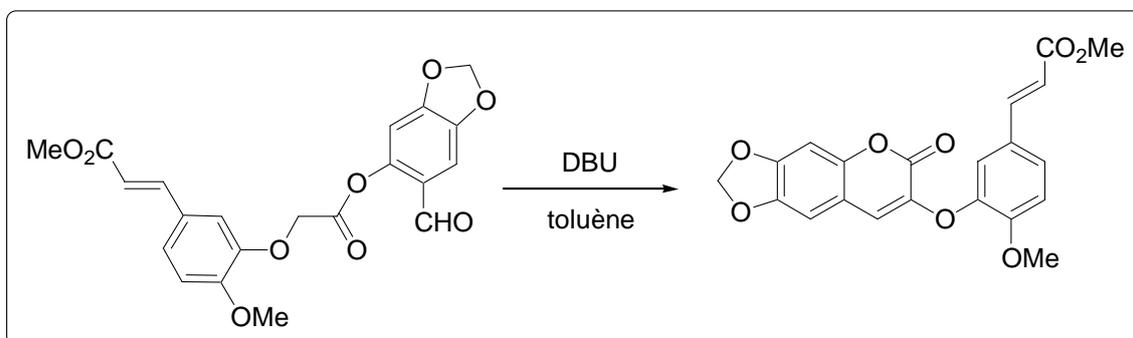
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 50 MHz) : 45,1 ppm (q); 49,5 ppm (q); 58,8 ppm (t); 97,0 ppm (t); 98,3 ppm (d); 100,4 ppm (d); 105,9 ppm (d); 106,0 ppm (d); 109,4 ppm (d); 115,7 ppm (s); 117,7 ppm (d); 120,6 ppm (s); 138,2 ppm (s); 139,9 ppm (d); 140,8 ppm (s); 141,9 ppm (s); 144,8 ppm (s); 146,8 ppm (s); 160,7 ppm (s); 161,4 ppm (s); 181,7 ppm (d).

Microanalyses : Pour $C_{21}H_{18}O_9$: Calculé : C, 60,87; H, 4,38; O, 34,75

Trouvé : C, 60,60; H, 4,21; O, 34,71.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 414 ($M^{+\circ}$, 12%); 221 (10%); 208 (10%); 207 (8%); 206 (40%); 189 (12%); 180 (11%); 179 (100%); 175 (9%); 166 (13%); 165 (14%); 161 (11%); 145 (7%).

12. Synthèse du (E)-3-(4-méthoxy-3-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromén-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle, 56

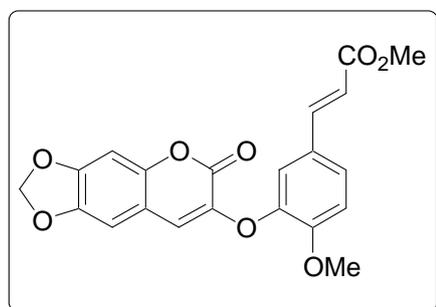


On dissout le (E)-3-(3-(2-(6-formylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yloxy)-2-oxoéthoxy)-4-méthoxyphényl)acrylate de méthyle (0,4 g, 0,95 mmol) dans 25 mL de toluène et on ajoute le 1,8-diazabicyclo[4.5.0]-undec-7-ène (DBU) (1,6 équivalents, 0,25 mL).

Après une nuit de reflux, on évapore le toluène sous pression réduite et on dissout le résidu dans du dichlorométhane (20 mL). On effectue des lavages avec une solution d'acide chlorhydrique 1N (15 mL) puis avec une solution de soude 1N (15 mL) et on sèche la phase organique sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide beige qui est recristallisé dans l'acétone.

(E)-3-(4-méthoxy-3-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromén-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle (56)



$C_{21}H_{16}O_8$ (M = 396,35 g/mol)

Rendement = 20%

Solide beige

$T_f = 199-203\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,75 ppm (s, 3H); 3,82 ppm (s, 3H); 6,02 ppm (s, 2H); 6,26 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 16,0$ Hz); 6,66 ppm (s, 1H); 6,76 ppm (s, 1H); 6,82 ppm (s, 1H); 6,99 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz); 7,22 ppm (s, 1H); 7,35 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz); 7,60 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 16,0$ Hz).

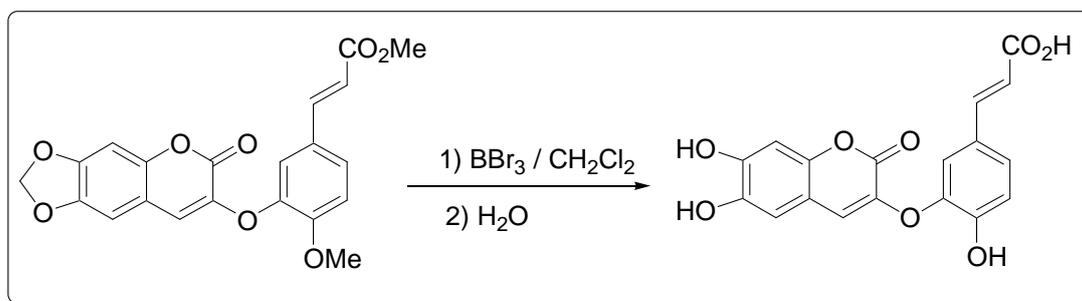
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 45,4 ppm (q); 50,0 ppm (q); 92,0 ppm (d); 96,0 ppm (t); 98,2 ppm (d); 106,4 ppm (s); 106,8 ppm (d); 110,4 ppm (d); 113,4 ppm (d); 115,1 ppm (d); 120,5 ppm (s); 121,7 ppm (d); 134,4 ppm (s); 137,3 ppm (s); 137,5 ppm (s); 139,0 ppm (s); 141,0 ppm (s); 143,3 ppm (d); 146,3 ppm (s); 151,0 ppm (s); 161,1 ppm (s).

Microanalyses : Pour $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_8$: Calculé : C, 63,64; H, 4,07; O, 32,29

Trouvé : C, 63,28; H, 4,15; O, 32,32.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 397 ($[\text{M}^+ + \text{H}]$, 11%); 396 (M^+ , 49%); 365 (10%); 204 (21%); 203 (100%); 177 (24%); 175 (16%).

13. Synthèse de l'acide (E)-3-(3-(6,7-dihydroxy-2-oxo-2H-chromèn-3-yloxy)-4-hydroxyphényl)acrylique, 57

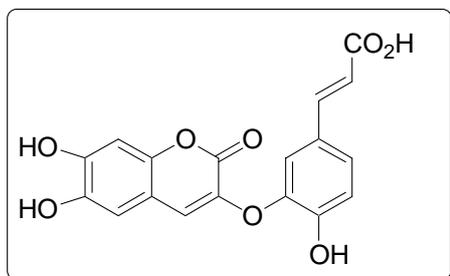


On dissout le (E)-3-(4-méthoxy-3-(6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromèn-7-yloxy)phényl)acrylate de méthyle (0,2 g, 0,50 mmol) dans 10 mL de dichlorométhane et on ajoute du tribromure de bore (solution 1,0 M dans CH_2Cl_2 , 2 mL) goutte à goutte à température ambiante. Après 1 h 30 d'agitation à température ambiante, on porte le mélange réactionnel à reflux pendant une nuit.

Après arrêt du chauffage, on ajoute de l'eau goutte à goutte (10 mL), on agite pendant 30 minutes à température ambiante puis on porte à reflux pendant une nuit.

On filtre le précipité formé et on obtient un solide noir.

acide (E)-3-(3-(6,7-dihydroxy-2-oxo-2H-chromén-3-yloxy)-4-hydroxyphényl)acrylique (57)



$C_{18}H_{12}O_8$ (M = 356,28 g/mol)

Rendement = 68%

Solide noir

$T_f = 280\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 200 MHz) : 6,35 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 16,0$ Hz); 6,81 ppm (s, 1H); 6,88 ppm (s, 1H); 7,03 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,4$ Hz); 7,28 ppm (s, 1H); 7,41 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,4$ Hz, $^4\text{J} = 2,0$ Hz); 7,49 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 2,0$ Hz); 7,57 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 16,0$ Hz); 8,38 ppm (br. s, 1H); 8,91 ppm (s él., 1H); 9,00 ppm (s él., 1H).

RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 50 MHz) : 97,2 ppm (d); 106,0 ppm (d); 106,3 ppm (d); 110,7 ppm (s); 112,2 ppm (d); 114,2 ppm (d); 118,1 ppm (d); 120,9 ppm (s); 121,8 ppm (d); 134,3 ppm (s); 137,5 ppm (s); 138,0 ppm (d); 138,6 ppm (s); 140,5 ppm (s); 142,6 ppm (s); 145,1 ppm (s); 152,0 ppm (s); 161,8 ppm (s).

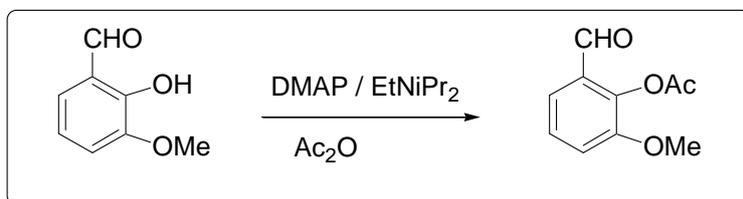
Microanalyses : Pour $C_{18}H_{12}O_8$: Calculé : C, 60,68; H, 3,39; O, 35,93

Trouvé : C, 60,41; H, 3,20; O, 36,12.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 357 ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 11%); 356 ($\text{M}^{+\circ}$, 54%); 339 (8%); 338 (33%); 328 (7%); 312 (8%); 191 (45%); 178 (63%); 177 (90%); 165 (23%); 162 (61%); 150 (71%); 137 (9%).

C. Synthèse du tournefolal et des acides tournefoliques A et B

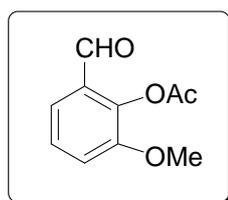
1. Synthèse du 2-acétoxy-3-méthoxybenzaldéhyde, 64



Dans un ballon de 100 mL, placer 10 g d'orthovanilline (65,8 mmol), 0,8 g de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans 23 mL de diisopropyléthylamine (iPr₂NEt). Refroidir à 0 °C et ajouter 7,9 mL d'anhydride acétique. Au bout de 12 h d'agitation à température ambiante, la solution est versée sur 100 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 3N, extraite au dichlorométhane (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide marron que l'on recristallise dans de l'éthanol absolu.

2-acétoxy-3-méthoxybenzaldéhyde (64)



C₁₀H₁₀O₄ (M = 194,18 g/mol)

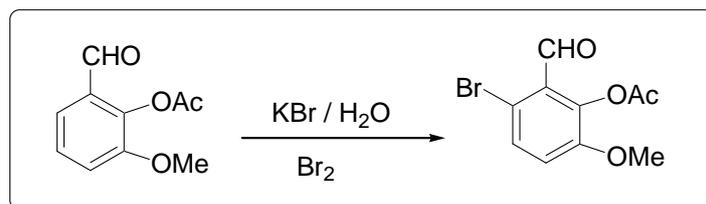
Rendement = 85%

Solide marron

T_f = 75-76 °C (lit.¹¹ 75,4-76,2 °C)

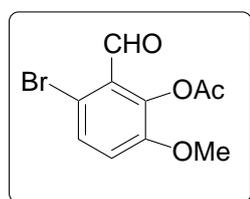
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 2,40 ppm (s, 3H, OAc); 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 7,22 ppm (dd, 1H, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 1,9 Hz); 7,32 ppm (t, 1H, ³J = 8,3 Hz); 7,48 ppm (dd, 1H, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 1,9 Hz); 10,11 ppm (s, 1H, CHO).

2. Synthèse du 2-acétoxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde, 65



A une solution de bromure de potassium KBr (10 g) dans l'eau (60 mL) est ajouté goutte à goutte du brome (1,7 mL, 1,4 éq., 30,9 mmol). Le 2-acétoxy-3-méthoxybenzaldéhyde (5 g, 21,5 mmol) est ensuite ajouté à cette solution et le mélange réactionnel est agité toute la nuit à température ambiante. La suspension est ensuite filtrée; le précipité obtenu est lavé à l'acétate d'éthyle puis recristallisé dans un mélange hexane-acétate d'éthyle : on recueille des cristaux blancs.

2-acétoxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde (65)



$C_{10}H_9O_4Br$ ($M = 273,08$ g/mol)

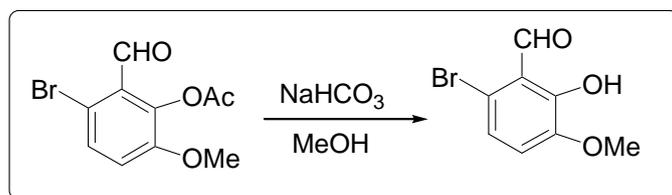
Rendement = 79%

Solide blanc

$T_f = 120-121$ °C (lit.¹¹ 121,6-123,4 °C)

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 2,38 ppm (s, 3H, OAc); 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 7,02 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9$ Hz); 7,49 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9$ Hz); 10,21 ppm (s, 1H, CHO).

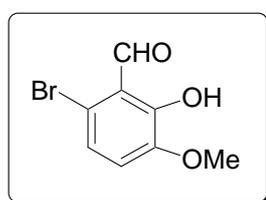
3. Synthèse du 6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde, 66



Une solution de 2-acétoxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde (7 g, 25,6 mmol) et de bicarbonate de sodium NaHCO_3 (2,4 g, 1,1 éq., 28,2 mmol) dans le méthanol (41 mL) est agitée pendant 2 heures à température ambiante. Cette solution est ensuite acidifiée par de l'acide chlorhydrique 3N puis extraite au dichlorométhane (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure puis séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, le solide jaune obtenu est recristallisé dans un mélange hexane-acétate d'éthyle : on recueille des cristaux jaunes.

6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde (66)



$\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3\text{Br}$ ($M = 231,04$ g/mol)

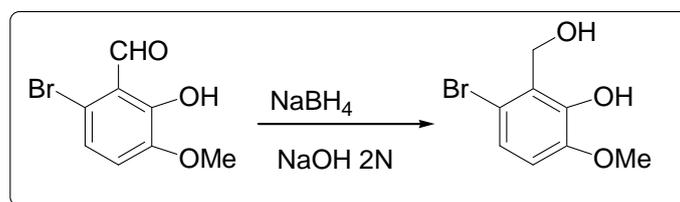
Rendement = 99%

Cristaux jaunes

$T_f = 105-106$ °C (lit.¹¹ 105,6-106,4 °C)

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,92 ppm (s, 3H, OMe); 6,88 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 7,12 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 10,26 ppm (s, 1H, CHO); 11,38 ppm (s él., 1H, OH).

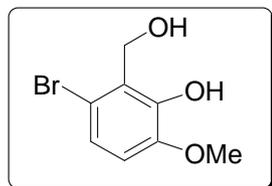
4. Synthèse du (6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphényl)méthanol, 67



A une solution de 6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde (5,9 g, 25,5 mmol) dans une solution de soude 2N (33 mL) est ajouté du borohydrure de sodium (0,95 g, 1 éq.) à température ambiante. Au bout de 4 heures d'agitation, on acidifie avec une solution d'acide chlorhydrique 3N. Le mélange est extrait avec du dichlorométhane (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on recueille un solide blanc.

(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphényl)méthanol (67)



$C_8H_9O_3Br$ ($M = 233,06$ g/mol)

Rendement = 99%

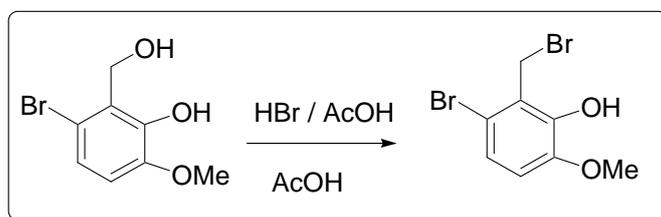
Solide blanc

$T_f = 104$ °C (lit. ¹² 104-105 °C)

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,65 ppm (s, 3H, OMe); 4,53 ppm (s, 2H); 6,62 ppm (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz); 6,73 ppm (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz).

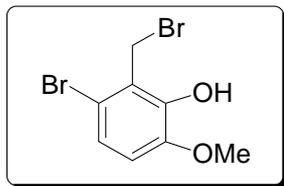
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 55,8 ppm (t); 60,4 ppm (q); 111,0 ppm (d); 114,6 ppm (s); 122,9 ppm (d); 124,9 ppm (s); 145,0 ppm (s); 145,8 ppm (s).

5. Synthèse du 1-bromo-2-bromométhyl-3-hydroxy-4-méthoxybenzène, 68



A une solution du (6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphényl)méthanol (5,4 g, 23,2 mmol) dans de l'acide acétique (24,3 mL) est ajoutée une solution de HBr à 33% dans l'acide acétique (49 mL) à température ambiante. Au bout de 2 heures d'agitation, on ajoute 100 mL d'eau. Le solide formé est filtré sous vide.

Après séchage du solide à l'étuve, on recueille un solide violet.

1-bromo-2-bromométhyl-3-hydroxy-4-méthoxybenzène (68)

$C_8H_9O_2Br_2$ (M = 295,96 g/mol)

Rendement = 74%

Solide violet

$T_f = 90-91\text{ }^\circ\text{C}$

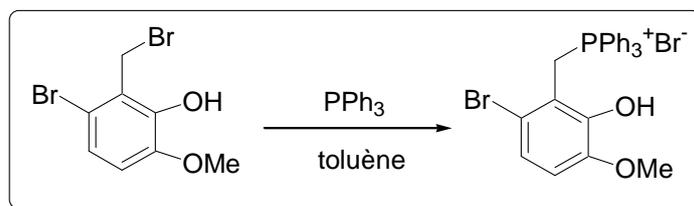
RMN ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,88 ppm (s, 3H, OMe); 4,77 ppm (s, 2H, CH_2); 6,71 ppm (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz); 7,09 ppm (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 27,9 ppm (t); 56,4 ppm (q); 111,8 ppm (d); 116,2 ppm (s); 123,3 ppm (s); 123,5 ppm (d); 145,3 ppm (s); 146,0 ppm (s).

Microanalyses : Pour $C_8H_9O_2Br_2$: Calculé : C, 32,47; H, 2,72; Br, 54,00; O, 10,81

Trouvé : C, 32,54; H, 2,81; Br, 54,40; O, 11,01.

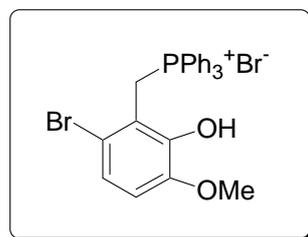
6. Synthèse du bromure de (6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphénylméthyl)triphénylphosphonium , 69



A une solution du 1-bromo-2-bromométhyl-3-hydroxy-4-méthoxybenzène (4,1 g, 13,8 mmol) dans le toluène (120 mL) est ajouté un équivalent de triphénylphosphine (3,7 g). On porte à reflux puis au bout de 12 heures d'agitation, on filtre sous vide le solide formé.

Après séchage du solide à l'étuve, on recueille un solide jaune.

bromure de (6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphénylméthyl)triphénylphosphonium (69)



$C_{26}H_{23}O_2Br_2P$ (M = 558,24 g/mol)

Rendement = 91%

Solide violet

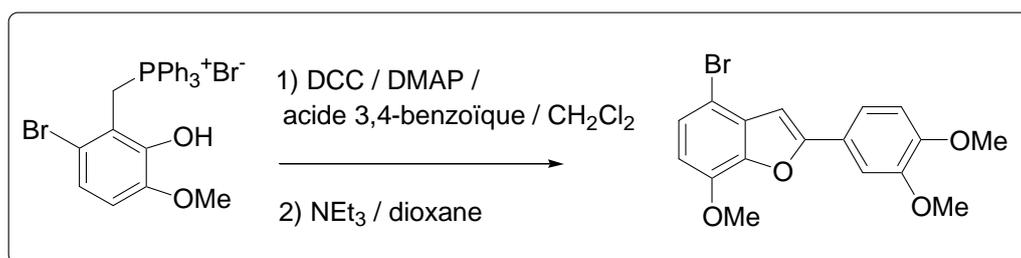
$T_f = 244-245\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,72 ppm (s, 3H, OMe); 4,89 ppm (d, 2H, $^2J = 13,0$ Hz, CH_2); 6,63 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9$ Hz); 6,91 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9$ Hz); 7,69 ppm (m, 15H, $\text{P}\phi_3$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 56,5 ppm (q); 56,6 ppm (t); 111,2 ppm (d); 114,65 ppm (s); 114,7 ppm (s); 115,3 ppm (d); 115,45 ppm (s); 116,98 ppm (s); 117,01 ppm (d); 118,7 ppm (d); 125,6 ppm (d); 125,7 ppm (d); 130,04 ppm (d); 130,07 ppm (d); 130,29 ppm (d); 130,32 ppm (d); 134,2 ppm (d); 134,4 ppm (d); 135,13 ppm (d); 135,19 ppm (d); 135,22 ppm (d); 135,28 ppm (d); 144,45 ppm (s); 144,6 ppm (d); 148,3 ppm (s); 148,4 ppm (s).

SM (impact électronique) : m/z (%) = 480 (^{81}Br) ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 30%); 479 (^{81}Br) ($[\text{M}^{+\circ}]$, 100%); 478 (^{79}Br) ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 25%); 477 (^{79}Br) ($[\text{M}^{+\circ}]$, 95%).

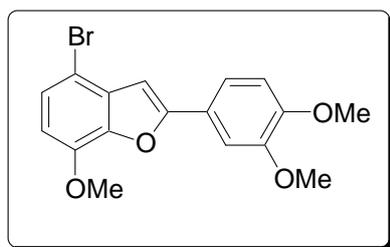
7. Synthèse du 4-bromo-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane, 70



A une solution de dicyclohexylcarbodiimide (10,1 mmol, 1,4 g) dans du dichlorométhane sec (112 mL) est ajoutée une solution de bromure de (6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxyphénylméthyl)triphénylphosphonium (6,05 g, 10,8 mmol), de DMAP (1,3 mmol, 0,15 g) et d'acide benzoïque (8,0 mmol, 1,45 g) dans 375 mL de dichlorométhane sec sous azote. Le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. La solution est ensuite concentrée sous vide et le résidu est dissout dans 375 mL de dioxane sec. On ajoute 6,3 mL de triéthylamine et le mélange réactionnel est porté à reflux pendant une nuit.

Après refroidissement, la solution est filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Une colonne de silice normale du résidu (éluant : 40% hexane / 60% acétate d'éthyle, %v/v) permet d'isoler le benzofurane.

4-bromo-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane (70)



$C_{17}H_{15}O_4Br$ (M = 363,2 g/mol)

Rendement = 74%

Solide jaune

$T_f = 139-140\text{ }^\circ\text{C}$

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,86 ppm (s, 3H, OMe); 3,92 ppm (s, 3H, OMe); 3,94 ppm (s, 3H, OMe); 6,59 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 6,82 ppm (s, 1H); 6,83 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 7,19 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 7,30 ppm (d, 1H, $^3J = 2,2$ Hz); 7,39 ppm (dd, 1H, $^3J = 8,6$ Hz, $^4J = 2,2$ Hz).

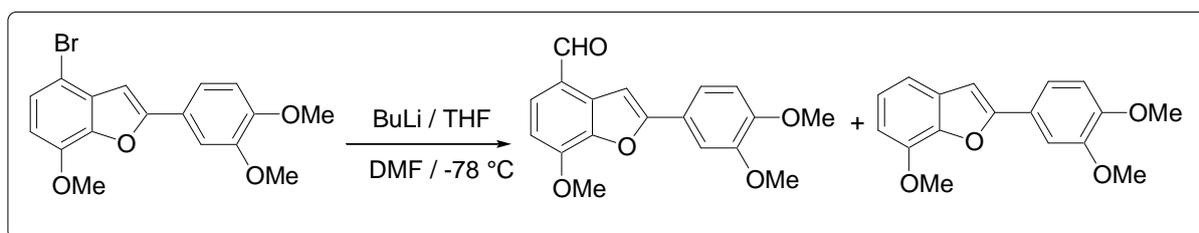
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 56,0 ppm (q); 56,1 ppm (q); 56,2 ppm (q); 100,4 ppm (d); 104,3 ppm (s); 107,5 ppm (d); 108,15 ppm (d); 111,3 ppm (d); 118,35 ppm (d); 122,75 ppm (s); 126,0 ppm (d); 132,0 ppm (s); 143,45 ppm (s); 144,7 ppm (s); 149,2 ppm (s); 149,95 ppm (s); 156,7 ppm (s).

SM (impact électronique) : m/z (%) = 365 (^{81}Br) ($[M^{+o} + H]$, 100%); 363 (^{79}Br) ($[M^{+o} + H]$, 95%).

Microanalyses : Pour $C_{17}H_{15}O_4Br$: Calculé : C, 56,22; H, 4,16; Br, 22,00; O, 17,62

Trouvé : C, 56,27; H, 4,35; Br, 22,20; O, 17,94.

8. Synthèse du 4-formyl-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane, 61

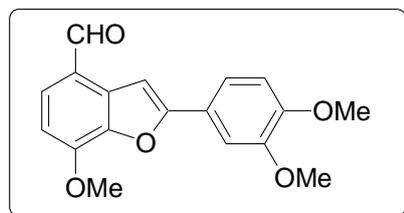


A une solution de 4-bromo-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane (6,6 mmol, 2,4 g) dans du tétrahydrofurane sec (15 mL) refroidie à -78 °C est ajoutée très lentement une solution de n-BuLi 1,6 M dans l'hexane (1,1 équivalents, 4,6 mL). On laisse la température remonter jusqu'à -50 °C puis on redescend à nouveau à -78 °C . On ajoute très rapidement du diméthylformamide (50 équivalents).

On maintient l'agitation pendant 1 h en laissant remonter la température. On ajoute ensuite de l'eau distillée (15 mL) et on extrait à l'éther éthylique (3 x 15 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique, on effectue une séparation sur une colonne de silice normale (éluant : 50% hexane / 50% acétate d'éthyle, % v/v) et on obtient le produit formylé et le produit débromé.

4-formyl-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane (61)



$C_{18}H_{16}O_5$ (M = 312,32 g/mol)

Rendement = 77%

Solide jaune

$T_f = 126-127\text{ °C}$ (lit. ¹³ °C)

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,78 ppm (s, 3H, OMe); 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 3,96 ppm (s, 3H, OMe); 6,66 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 6,79 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz); 7,21 ppm (s, 1H); 7,31 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,3$ Hz); 7,43 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz, $^4\text{J} = 1,3$ Hz); 7,45 ppm (s, 1H); 9,88 ppm (s, 1H, CHO).

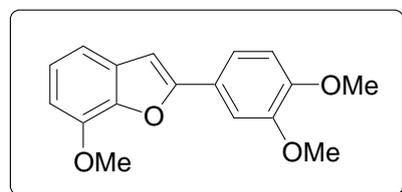
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 55,8 ppm (q); 55,9 ppm (q); 56,1 ppm (q); 100,45 ppm (d); 105,55 ppm (d); 108,0 ppm (d); 111,1 ppm (d); 118,4 ppm (d); 122,43 ppm (s); 122,47 ppm (s); 129,9 ppm (s); 131,8 ppm (d); 143,5 ppm (s); 149,0 ppm (s); 149,4 ppm (s); 150,0 ppm (s); 158,9 ppm (s); 190,6 ppm (d).

SM (impact électronique) : m/z (%) = 313 ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 100%); 314 ($[\text{M}^{+\circ} + 2\text{H}]$, 20%); 22 (26%).

Microanalyses : Pour $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$: Calculé : C, 69,22; H, 5,16; O, 25,61

Trouvé : C, 68,98; H, 5,37; O, 25,91.

7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane (71)



$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ ($M = 284,31$ g/mol)

Rendement = 22%

Solide jaune

$T_f = 115-118$ °C

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : 3,92 ppm (s, 3H, OMe); 3,98 ppm (s, 3H, OMe); 4,05 ppm (s, 3H, OMe); 6,78 ppm (m, 1H); 6,90 ppm (s, 1H); 6,92 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz); 7,14 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 7,16 ppm (s, 1H); 7,38 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9$ Hz); 7,47 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz, $^4\text{J} = 1,9$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 56,2 ppm (q); 56,3 ppm (2xq); 102,95 ppm (d); 106,55 ppm (d); 108,45 ppm (d); 111,5 ppm (d); 113,3 ppm (d); 118,4 ppm (d); 123,7 ppm (d); 128,5 ppm

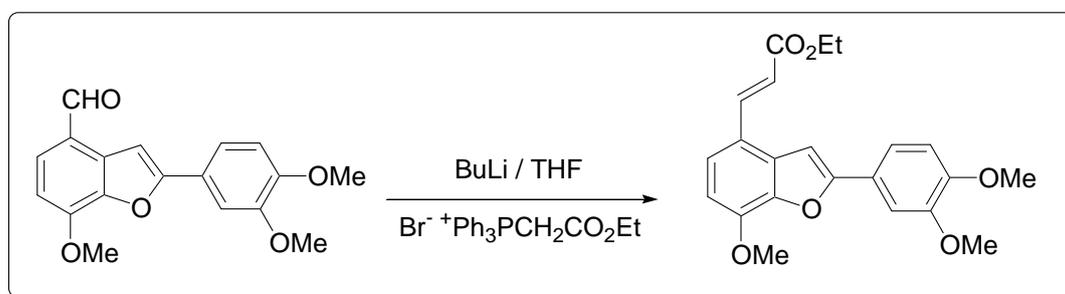
(s); 131,35 ppm (s); 141,9 ppm (s); 145,4 ppm (s); 149,4 ppm (s); 149,85 ppm (s); 156,4 ppm (s).

Microanalyses : Pour $C_{17}H_{16}O_4$: Calculé : C, 71,82; H, 5,67; O, 22,51

Trouvé : C, 72,00; H, 5,34; O, 22,63.

SM (impact électronique) : m/z (%) = 285 ($[M^{+o} + H]$, 70%); 257 ($[M^{+o} - CO + H]$, 5%).

9. Synthèse du 3-[7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofuran-4-yl]acrylate d'éthyle, 73



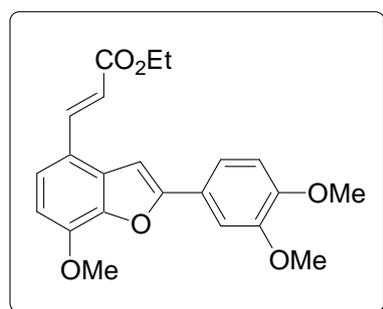
A une solution de bromure d'éthoxycarbonylméthyltriphenylphosphonium ($Br^- Ph_3^+PCH_2CO_2Et$) (1,1 équivalents, 5,3 mmol, 2,3 g) dans le tétrahydrofurane sec (10 mL) est ajoutée très lentement une solution de n-BuLi 1,6 M dans l'hexane (1,1 équivalents, 3,3 mL).

On maintient l'agitation pendant 3 h et on ajoute goutte à goutte une solution de 4-formyl-7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofurane (4,8 mmol, 1,5 g) dissout dans 15 mL de tétrahydrofurane sec.

Après 24 h d'agitation, on évapore le solvant organique sous pression réduite, on effectue une séparation sur une colonne de silice normale (éluant : 60% hexane / 40% acétate d'éthyle, % v/v) et on recueille un solide jaune.

3-[7-méthoxy-2-(3,4-diméthoxyphényl)benzofuran-4-yl]acrylate d'éthyle

(73)

C₂₂H₂₂O₆ (M = 382,41 g/mol)

Rendement = 40%

Solide jaune

T_f = 130-133 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : 1,35 ppm (t, 3H, ³J = 8,3 Hz, CH₃); 3,90 ppm (s, 3H, OMe); 3,97 ppm (s, 3H, OMe); 4,02 ppm (s, 3H, OMe); 4,28 ppm (q, 2H, ³J = 8,3 Hz, CH₂); 6,43 ppm (d, 1H, ³J = 15,9 Hz); 6,73 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz); 6,90 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz); 7,13 ppm (s, 1H); 7,34 ppm (d, 1H, ³J = 8,3 Hz); 7,35 ppm (s, 1H); 7,48 ppm (dd, 1H, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 1,9 Hz); 7,88 ppm (d, 1H, ³J = 15,9 Hz).

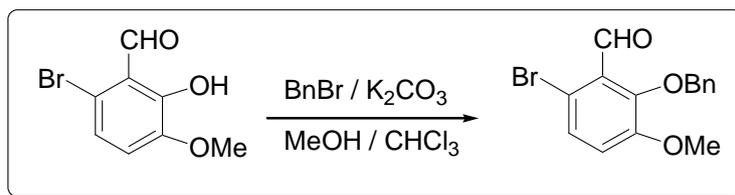
RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) : 14,6 ppm (q); 56,2 ppm (q); 56,25 ppm (q); 56,35 ppm (q); 60,6 ppm (t); 99,45 ppm (d); 106,8 ppm (d); 111,5 ppm (d); 113,3 ppm (d); 116,6 ppm (d); 118,35 ppm (d); 123,0 ppm (d); 123,7 ppm (s); 125,15 ppm (s); 130,75 ppm (s); 142,7 ppm (s); 143,95 ppm (d); 146,85 ppm (s); 149,4 ppm (s); 150,25 ppm (s); 157,6 ppm (s); 167,7 ppm (s).

SM (impact électronique) : m/z (%) = 383 ([M⁺ + H], 70%); 337 ([M⁺ - EtOH], 100%).

Microanalyses : Pour C₂₂H₂₂O₆: Calculé : C, 69,10; H, 5,80; O, 25,10

Trouvé : C, 69,00; H, 5,89; O, 24,94.

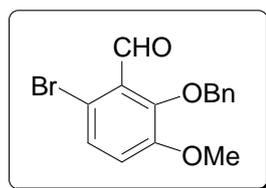
10. Synthèse du 2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde, 75



Dans un ballon de 100 mL, on place le 6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde (5 g, 21,6 mmol), du carbonate de potassium (1 équivalent, 21,6 mmol, 3,0 g) et du bromure de benzyloxy (1 équivalent, 2,6 mL) dans 28 mL de chloroforme et 14 mL de méthanol et on porte le mélange à reflux. Au bout de 4 h, on concentre le mélange réactionnel et on dissout le résidu dans du chloroforme (15 mL) et on effectue des lavages de la phase organique avec une solution chlorhydrique 1N puis avec une solution de soude 10% et enfin avec de la saumure. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide jaune.

2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde (75)



$C_{15}H_{13}O_3Br$ ($M = 321,17$ g/mol)

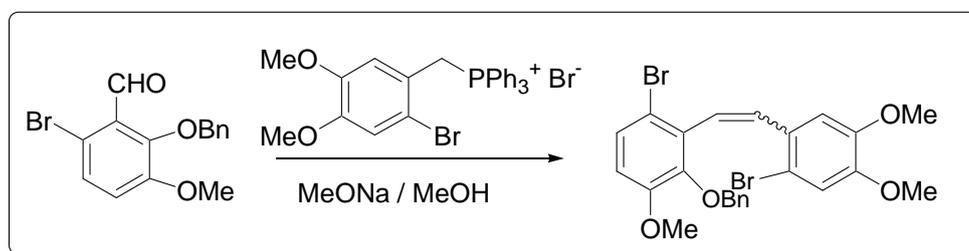
Rendement = 80%

Solide jaune

$T_f = 47-48$ °C (lit.¹⁴ 49 °C)

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 5,11 ppm (s, 2H, CH_2); 6,93 ppm (d, 1H, $^3J = 8,9$ Hz); 7,3-7,5 ppm (m, 6H).

11. Synthèse du (E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy)éthylène, 76E et du (Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy) éthylène, 76Z.



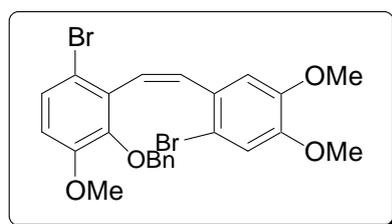
A du sodium (1,1 équivalents, 0,5 g) dissout dans du méthanol (10 mL), on ajoute le bromure de (2-bromo-4,5-diméthoxyphénylméthyl)triphénylphosphonium (1 équivalent, 17,3 mmol, 9,9 g) dissout dans 20 mL de méthanol et on agite vigoureusement pendant 30 min.

Dans un ballon de 100 mL, on dissout le 2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxybenzaldéhyde (17,3 mmol, 5,6 g) dans 50 mL de méthanol, on ajoute goutte à goutte la solution ainsi préparée ci-dessus et on porte à reflux le mélange. Au bout de 24 h, on concentre le mélange réactionnel. On dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle (20 mL) et on effectue des lavages à l'eau (2 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient une huile que l'on purifie par chromatographie sur colonne de silice normale (éluant: 80% hexane / 20% acétate d'éthyle, %v/v). On récupère les 2 isomères séparément.

Rendement global = 99%

(Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy) éthylène (76Z)



$C_{24}H_{22}O_4Br_2$ (M = 534,24 g/mol)

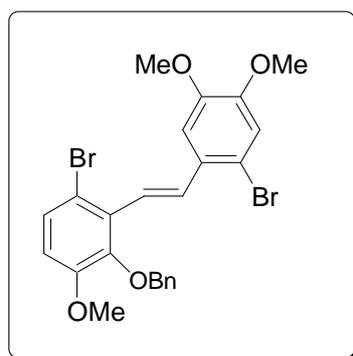
Rendement = 3%

Huile jaune

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): 3,32 ppm (s, 3H, OMe); 3,79 ppm (s, 3H, OMe); 3,81 ppm (s, 3H, OMe); 4,82 ppm (s, 2H, CH_2); 6,40 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 11,8$ Hz); 6,50 ppm (s, 1H); 6,74 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,9$ Hz); 6,87 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 11,8$ Hz); 6,93 ppm (s, 1H); 7,31 ppm (m, 6H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 55,4 (q); 56,1 (q); 56,1 (q); 74,8 (t); 112 (d); 112,7 (d); 114,65 (s); 114,8 (s); 115,2 (d); 125,3 (d); 127,96 (d); 128,05 (d); 128,4 (d); 128,5 (d); 128,99 (d); 129,08 (s); 131,1 (d); 131,9 (d); 133,5 (s); 137,35 (s); 146,4 (s); 147,7 (s); 148,9 (s); 152,8 (s).

(E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy)éthylène (76E)



$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{Br}_2$ ($M = 534,24$ g/mol)

Rendement = 96%

Solide jaune

$T_f = 101-103$ °C

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): 3,86 ppm (s, 3H, OMe); 3,92 ppm (s, 6H, OMe); 4,98 ppm (s, 2H, CH_2); 6,72 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,9$ Hz); 6,96 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 16,2$ Hz); 6,99 ppm (s, 1H); 7,11 ppm (s, 1H); 7,35 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,9$ Hz et m, 5H); 7,72 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 16,2$ Hz) .

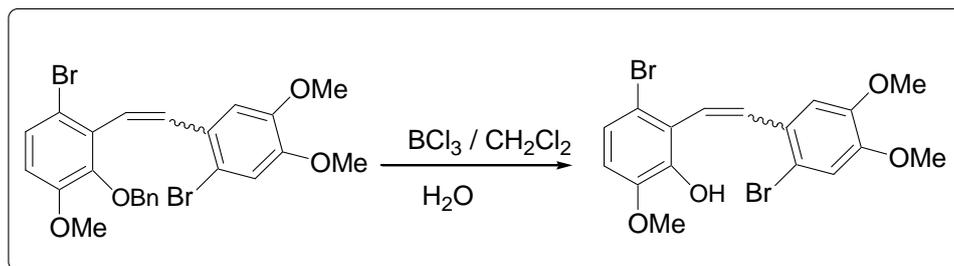
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 56,17 (q); 56,21 (q); 56,3 (q); 74,9 (t); 109 (d); 112,4 (d); 115,0 (s); 115,35 (s); 115,7 (d); 124,7 (d); 128,1 (d); 128,4 (d); 128,64 (d); 128,66 (d); 129,0 (d); 129,8 (s); 131,1 (d); 131,9 (s); 134,4 (d); 137,4 (s); 147,2 (s); 148,8 (s); 149,7 (s); 152,95 (s).

SM (impact électronique) : m/z (%) = 537 ($^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}$) ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 20%); 535 ($^{81}\text{Br}^{79}\text{Br}$) ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 30%); 533 ($^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}$) ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 20%); 456 (^{81}Br) ($[\text{M}^{+\circ} - ^{81}\text{Br} + \text{H}]$, 12%); 454 (^{79}Br) ($[\text{M}^{+\circ} - ^{79}\text{Br} + \text{H}]$, 12%).

Microanalyses : Pour $C_{24}H_{22}O_4Br_2$: Calculé : C, 53,96; H, 4,15; Br, 29,91; O, 11,98

Trouvé : C, 54,21; H, 4,00; Br, 30,11; O, 12,21.

12. Synthèse du (E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène, 77E et du (Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène, 77Z.



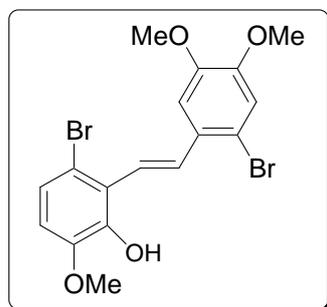
On dissout le (E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy)éthylène (2 g, 3,7 mmol) dans 25 mL de dichlorométhane. On place le mélange sous atmosphère inerte d'argon, on refroidit à 0 °C et on ajoute goutte à goutte du trichlorure de bore (solution 1,0 M dans CH_2Cl_2 , 5 équivalents, 18,7 mL).

Après 2 h d'agitation à 0 °C et 1 h 30 d'agitation à température ambiante, on verse le mélange réactionnel dans 25 mL d'eau glacée. On extrait au dichlorométhane (3 x 20 mL) et on sèche la phase organique sur sulfate de magnésium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient une huile marron.

On procède de la même façon pour le (Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(2-benzyloxy-6-bromo-3-méthoxy)éthylène. On obtient une huile marron.

(E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène (77E)



$C_{17}H_{16}O_4Br_2$ (M = 444,11 g/mol)

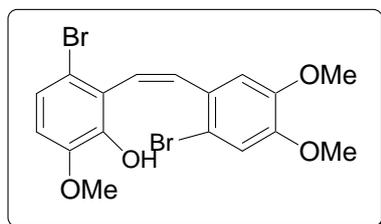
Rendement = 99%

Huile marron

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz): 3,88 ppm (s, 3H, OMe); 3,89 ppm (s, 3H, OMe); 3,95 ppm (s, 3H, OMe); 6,38 ppm (s él., 1H) ; 6,61 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 7,04 ppm (s, 1H); 7,10 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 7,12 ppm (d, 1H, $^3J = 16,2$ Hz); 7,22 ppm (s, 1H); 7,88 ppm (d, 1H, $^3J = 16,2$ Hz) .

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 55,9 (q); 56,0 (q); 56,0 (q); 112,35 (s); 114,3 (d); 115,0 (d); 115,25 (d); 115,3 (s); 127,3 (d); 131,1 (s); 133,95 (d); 134,9 (d); 135,4 (s); 144,6 (s); 148,0 (s); 148,8 (s); 148,95 (s).

(Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène (77Z)



$C_{17}H_{16}O_4Br_2$ (M = 444,11 g/mol)

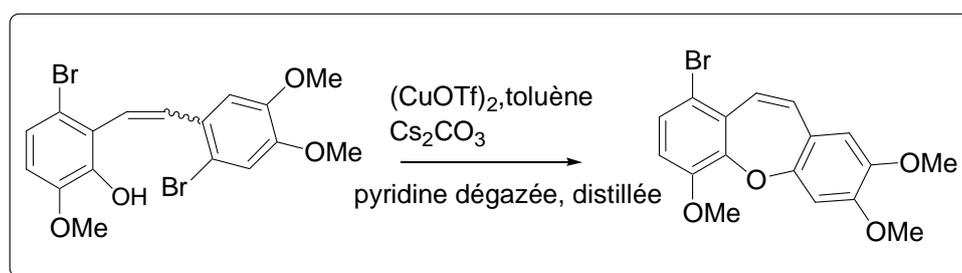
Rendement = 99%

Huile marron

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz): 3,56 ppm (s, 3H, OMe); 3,85 ppm (s, 3H, OMe); 3,86 ppm (s, 3H, OMe); 6,59 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz); 6,72 ppm (d, 1H, $^3J = 11,7$ Hz); 6,83 ppm (s, 1H); 6,97 ppm (d, 1H, $^3J = 11,7$ Hz); 6,94 ppm (s, 1H); 7,26 ppm (d, 1H, $^3J = 8,6$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 55,9 (q); 56,0 (q); 56,05 (q); 112,35 (s); 114,3 (d); 115,0 (d); 115,25 (d); 115,3 (s); 127,3 (d); 131,6 (s); 132,5 (d); 134,7 (d); 135,4 (s); 144,6 (s); 148,0 (s); 148,8 (s); 148,95 (s).

13. Synthèse du (Z)-1-bromo-4,7,8-triméthoxydibenzo[b,f]oxépine, 78



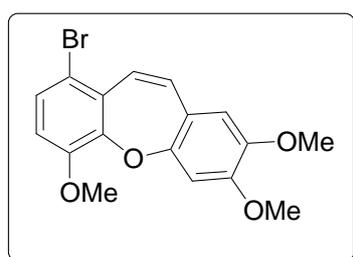
Une solution contenant du (E)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène (1 g, 2,25 mmol), du carbonate de césium (2 équivalents, 4,5 mmol, 1,46 g) et du « triflate de cuivre » (0,1125 mmol, 58,2 mg, 5% molaire) dans 50 mL de pyridine distillée et dégazée est portée à reflux pendant 24 h.

Après refroidissement, le mélange réactionnel est versé sur une solution d'acide chlorhydrique 10% (100 mL) puis extrait au chloroforme (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de soude 10% (40 mL), à la saumure puis enfin séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (silice normale, éluant: hexane 50% / acétate d'éthyle 50%, % v/v). On obtient un solide marron.

On procède de la même manière pour le (Z)-2-(6-bromo-3,4-diméthoxyphényl)-1-(6-bromo-2-hydroxy-3-méthoxy)éthylène.

(Z)-1-bromo-4,7,8-triméthoxydibenzo[b,f]oxépine (78)



$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{Br}$ ($M = 362,20$ g/mol)

Rendement = 25%

Huile marron

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): 3,84 ppm (s, 3H, OMe); 3,89 ppm (s, 3H, OMe); 3,91 ppm (s, 3H, OMe); 6,66 ppm (s, 1H); 6,78 ppm (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz); 6,81 ppm (d, 1H, $^3J = 11,4$ Hz); 6,88 ppm (s, 1H); 6,94 ppm (d, 1H, $^3J = 11,4$ Hz); 7,29 ppm (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : 56,25 (q); 56,3 (q); 56,4 (q); 105,6 (d); 110,75 (s); 112,9 (d); 113,35 (d); 112,1 (s); 127,95 (d); 128,7 (d); 128,75 (d); 131,0 (s); 131,25 (s); 146,4 (s); 150,65 (s); 151,3 (s); 152,2 (s).

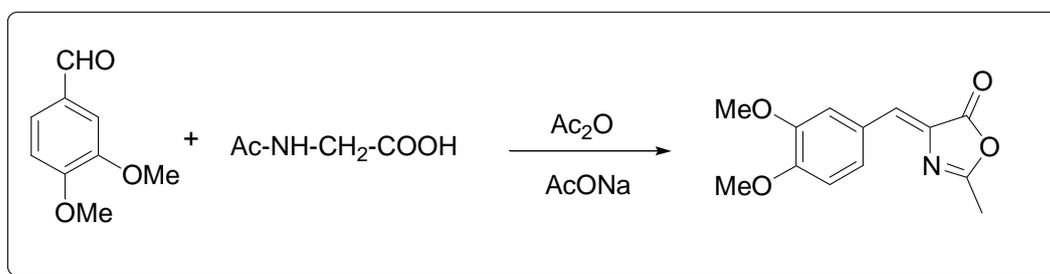
SM (impact électronique) : m/z (%) = 365 (^{81}Br) ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 100%); 363 (^{79}Br) ($[\text{M}^{+\circ} + \text{H}]$, 85%); 351 (25%); 349 (25%).

Microanalyses : Pour $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{Br}$: Calculé : C, 56,22; H, 4,16; Br, 22,00; O, 17,62

Trouvé : C, 56,41; H, 4,27; Br, 22,33; O, 17,94.

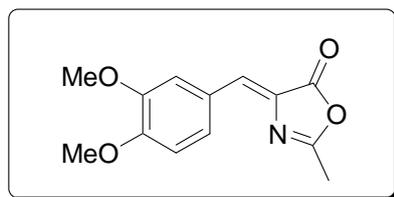
D. Synthèse de l'acide fukiique

1. Synthèse de la 4-[1-(3,4-diméthoxyphényl)méthylidène]-2-méthyl-4H-oxazol-5-one, **80**



Dans un ballon de 100 mL, on place du véatraldéhyde (5 g, 30,1 mmol), de la N-acétylglycine (4,23 g, 36,1 mmol), de l'acétate de sodium (3,21 g, 39,1 mmol) dans de l'anhydride acétique (150,5 mmol, 14 mL) et on porte à reflux pendant 8 h.

On refroidit la solution à température ambiante, on ajoute 50 mL d'eau puis on laisse agiter pendant une nuit. Le précipité jaune obtenu est filtré, lavé avec de l'éthanol aqueux à 50% (4 x 20 mL) puis séché sous vide. On obtient un solide orange.

4-[1-(3,4-diméthoxyphényl)méthylidène]-2-méthyl-4H-oxazol-5-one (80)

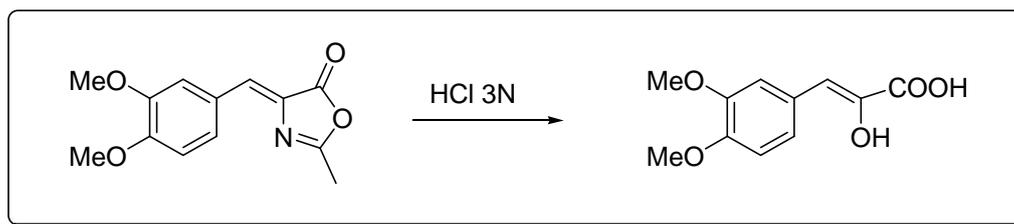
$C_{13}H_{13}NO_4$ (M = 247,25 g/mol)

Rendement = 65%

Solide orange

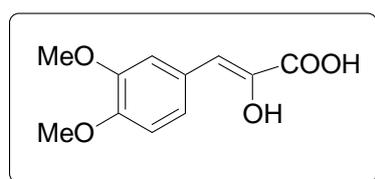
$T_f = 166\text{ °C}$ (lit.¹⁵ 166-167 °C)

RMN 1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) : 2,39 (s, 3H, Me); 3,78 ppm (s, 3H, OMe); 3,82 ppm (s, 3H, OMe); 7,07 ppm (d, 1H, $^3J = 8,2$ Hz); 7,12 ppm (s, 1H); 7,73 ppm (d, 1H, $^3J = 8,2$ Hz); 7,92 ppm (s, 1H).

2. Synthèse de l'acide 3,4-diméthoxyphénylpyruvique, 81

Dans un ballon de 100 mL, on place la 4-[1-(3,4-diméthoxyphényl)méthylidène]-2-méthyl-4H-oxazol-5-one (3 g, 12,15 mmol) dans 77,2 mL d'HCl 3N et on porte à reflux pendant 4 h.

Après réaction, on filtre à chaud le mélange réactionnel, on lave le précipité formé à l'eau (2 x 10 mL) et on sèche sous vide. On obtient un solide violet.

acide 3,4-diméthoxyphénylpyruvique (81)

$C_{11}H_{12}O_5$ (M = 224,21 g/mol)

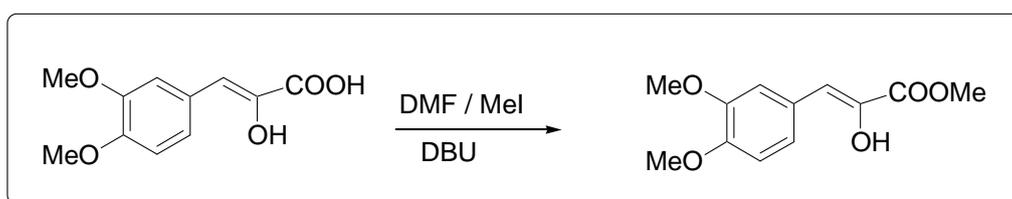
Rendement = 75%

Solide violet

$T_f = 201\text{ °C}$ (lit.¹¹ 201-202 °C)

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) : 3,75 ppm (s, 3H, OMe); 3,76 ppm (s, 3H, OMe); 6,39 ppm (s, 1H); 6,92 ppm (d, 2H, $^3\text{J} = 8,5$ Hz); 7,31 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,5$ Hz, $^4\text{J} = 1,8$ Hz); 7,44 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,8$ Hz); 8,95 ppm (s. él., 1H).

3. Synthèse du 3,4-diméthoxyphénylpyruvate de méthyle, **82**

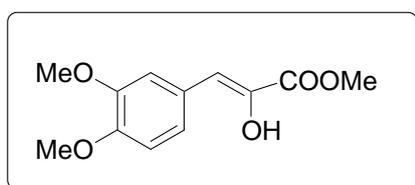


On dissout l'acide 3,4-diméthoxyphénylpyruvique (2 g, 8,9 mmol) dans 21 mL de diméthylformamide sec et on refroidit à 0 °C. On ajoute du 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undéc-7-ène (DBU, 8,9 mmol, 0,6 mL) et de l'iodure de méthyle (5 équivalents, 44,8 mmol, 2,8 mL).

Après 12 h d'agitation, on verse le mélange dans un mélange éther et HCl N (50 / 50 % v/v). On sépare la phase organique, on la lave avec de l'eau (2 x 20 mL) puis avec une solution saturée de NaCl (2 x 20 mL) puis on la sèche sur sulfate de magnésium.

Après évaporation du solvant organique sous pression réduite, on obtient un solide rouge.

3,4-diméthoxyphénylpyruvate de méthyle (**82**)



$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (M = 238,24 g/mol)

Rendement = 81%

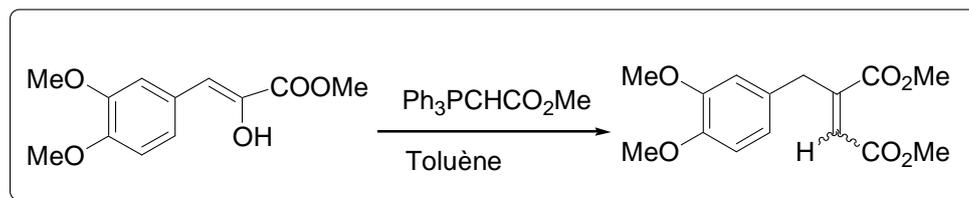
Solide rouge

$T_f = 99-100$ °C (lit. ¹⁶ 99-102 °C)

RMN ^1H (CD $_3$ COCD $_3$, 200 MHz) : 3,92 ppm (s, 9H, 2-OMe et CO $_2$ Me); 6,49 ppm (s, 1H); 6,85 ppm (d, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz); 7,24 ppm (dd, 1H, $^3\text{J} = 8,6$ Hz, $^4\text{J} = 1,91$ Hz); 7,49 ppm (d, 1H, $^4\text{J} = 1,9$ Hz)

RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 50 MHz) : 53,1 ppm (q); 55,75 ppm (q); 55,8 ppm (q); 110,9 ppm (d); 111,45 ppm (d); 112,7 ppm (d); 123,4 ppm (d); 127,1 ppm (s); 137,65 ppm (s); 148,7 ppm (s); 149,1 ppm (s); 166,8 ppm (s).

4. Synthèse du (3,4-diméthoxybenzyl)maléate de diméthyle et du (3,4-diméthoxybenzyl)fumarate de diméthyle, **83Z** et **83E**.

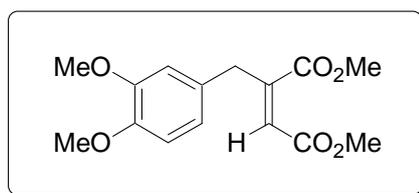


On dissout le 3,4-diméthoxyphénylpyruvate de méthyle (1,72 g, 7,2 mmol) dans 80 mL de toluène, on ajoute le (carbométhoxyméthylène)triphénylphosphorane (7,2 mmol, 2,4 g).

Après 2 h de reflux, on évapore le toluène. On obtient une huile que l'on purifie sur colonne (silice normale, éluant: hexane 70% / acétate d'éthyle 30%, % v/v). On récupère les 2 isomères séparément.

Rendement global = 99%

(3,4-diméthoxybenzyl)maléate de diméthyle (**83Z**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_6$ (M = 294,30 g/mol)

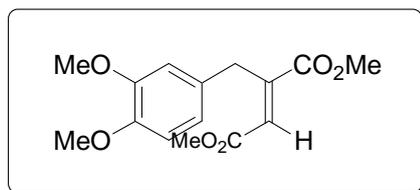
Rendement = 75%

Solide jaune

$T_f = 55-56\text{ }^\circ\text{C}$ (lit.¹⁶ 56,5-57 $^\circ\text{C}$)

Produit majoritaire

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): 3,58 ppm (d, 2H, $^4J = 1,9$ Hz, CH_2); 3,69 ppm (s, 3H, OMe); 3,73 ppm (s, 3H, OMe); 3,82 ppm (s, 6H, OMe); 5,63 ppm (t, 1H, $^4J = 1,9$ Hz); 6,62-6,87 (m, 3H, protons aromatiques).

(3,4-diméthoxybenzyl)fumarate de diméthyle (83E)C₁₅H₁₈O₆ (M = 294,30 g/mol)

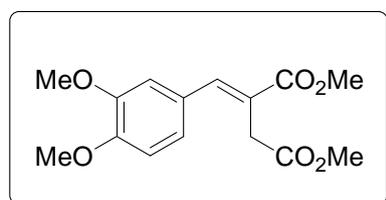
Rendement = 24%

Solide blanc

T_f = 49-50 °C (lit.¹⁶ 49-50 °C)

Produit minoritaire

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): 3,72 ppm (s, 3H, OMe); 3,78 ppm (s, 3H, OMe); 3,81 ppm (s, 3H, OMe); 3,85 ppm (s, 3H, OMe); 4,12 ppm (s, 2H, CH₂); 6,72-6,98 ppm (m, 3H, protons aromatiques); 7,83 ppm (s, 1H).

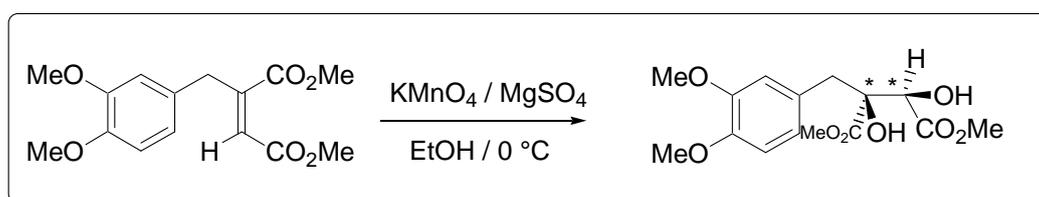
2-(3,4-diméthoxybenzylidène)succinate de (E)-diméthyle (86)C₁₅H₁₈O₆ (M = 294,30 g/mol)

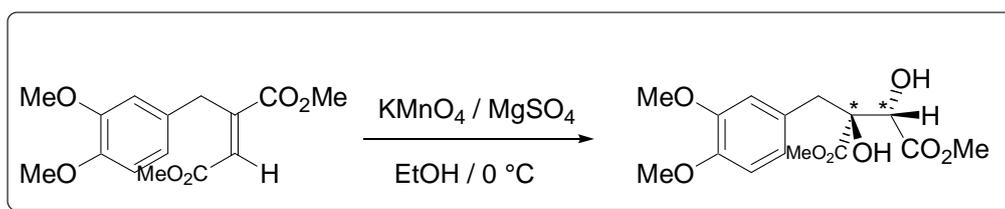
Solide blanc

T_f = 69,5-70 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): 3,58 ppm (s, 2H, CH₂); 3,72 ppm (s, 3H); 3,81 ppm (s, 3H, OMe); 3,86 ppm (s, 3H, OMe); 3,89 (s, 3H, OMe); 6,72-6,91 ppm (m, 3H); 7,84 ppm (s, 1H).

5. Synthèse du (2S,3R) et du (2R,3S)-3-(3,4-diméthoxybenzyl)tartrate de diméthyle et du (2S,3S) et du (2R,3R)-3-(3,4-diméthoxybenzyl)tartrate de diméthyle, 84Z et 84E.





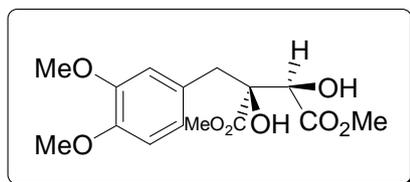
On dissout le (3,4-diméthoxybenzyl)maléate de diméthyle (1 g, 3,4 mmol) dans 22,7 mL d'éthanol absolu et on refroidit à 0 °C. On ajoute une solution de permanganate de potassium (0,74 g) et de sulfate de magnésium (0,53 g) dans 10 mL d'eau et on agite à 0 °C pendant 3 h.

On ajoute une solution à 25% d'hydrogénosulfite de sodium (30 mL) puis on acidifie avec de l'acide chlorhydrique à 36%. On extrait ensuite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant organique sous vide, on obtient un solide blanc.

On procède de la même manière pour le (3,4-diméthoxybenzyl)fumarate de diméthyle. On obtient un solide marron.

rac-3-(3,4-diméthoxybenzyl)tartrate de diméthyle (84Z)



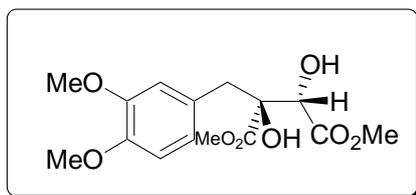
$C_{17}H_{15}O_4Br$ (M = 363,2 g/mol)

Rendement = 68%

Solide blanc

$T_f = 139-140$ °C (lit.¹⁶ 141-142 °C)

RMN 1H (CDCl₃, 200 MHz): 3,07 ppm (s, 2H, CH₂); 3,71 ppm (s, 3H); 3,82 ppm (s, 6H); 3,88 ppm (s, 3H); 4,43 ppm (s, 1H); 6,68-6,73 ppm (m, 3H, protons aromatiques).

rac-3-(3,4-diméthoxybenzyl)tartrate de diméthyle (84E)C₁₇H₁₅O₄Br (M = 363,2 g/mol)

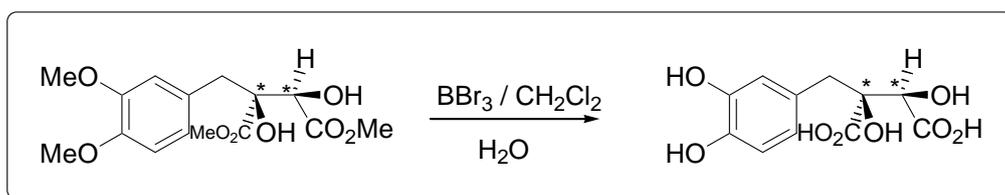
Rendement = 75%

Solide marron

T_f = 91-92 °C (lit.¹⁶ 93-94 °C)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): 3,01 ppm (d, 1H, J = 13,7 Hz, CH₂); 3,21 ppm (d, 1H, J = 13,7 Hz, CH₂); 3,69 ppm (s, 6H, CO₂Me); 3,82 ppm (s, 6H, OMe); 4,55 (s, 1H); 6,68-6,73 ppm (m, 3H, protons aromatiques).

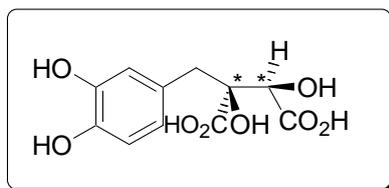
6. Synthèse de l'acide fukiique ou acide rac-2,3-dihydroxy-3-(3,4-dihydroxybenzyl)tartrique, 85.



On dissout le rac-3-(3,4-diméthoxybenzyl)tartrate de diméthyle (500 mg, 1,35 mmol) dans 10 mL de dichlorométhane et on ajoute du BBr₃ (1M dans du CH₂Cl₂, 6,9 mL) goutte à goutte à température ambiante. Après 1 h d'agitation, on ajoute de l'eau (10 mL) et on agite pendant 1 h.

On sépare la phase dichlorométhane de la phase aqueuse et on évapore la phase aqueuse sous pression réduite. On lave le solide formé avec 5 mL d'acétone anhydre et on évapore l'acétone. Puis on lave le résidu avec 5 mL de méthanol.

On évapore le solvant organique sous pression réduite et on obtient un solide marron.

acide fukiiique (85)C₁₁H₁₂O₈ (M = 272,21 g/mol)

Rendement = 35%

Huile marron

RMN ¹H (CD₃COCD₃, 200 MHz): 2,91 ppm (d, 1H, ²J = 13,8 Hz, CH₂); 3,12 ppm (d, 1H, ²J = 13,8 Hz, CH₂); 4,53 (s, 1H); 6,52-6,78 ppm (m, 3H, protons aromatiques).

RMN ¹³C (CD₃COCD₃, 50 MHz) : 41,5 (t); 75,7 (d); 80,6 (s); 115,5 (d); 118,35 (d); 122,6 (d); 128,1 (s); 144,6 (s); 145,15 (s); 172,9 (s); 174,2 (s).

E. Résultats biologiques**1. Mode opératoire pour les tests in vitro****a. Mode opératoire du Professeur Zeger Debyser (labo ZD)**

Les dosages réalisés sur l'ensemble des réactions catalysées par l'intégrase (overall integrase) se font par test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Pour déterminer la susceptibilité de l'enzyme vis-à-vis des composés, nous avons utilisé des tests ELISA optimisés. Ces dosages utilisent un substrat oligonucléotidique dont l'un (5'-ACTGCTAGAGATTTCCACACTGACTAAAAGGGTC-3') est lié avec de la biotine sur la position 3' finale et l'autre est lié avec de la digoxigénine sur la position 5' finale.

Pour les dosages d'«overall integration», le second oligonucléotide marqué à la digoxigénine en 5' finale est le (5'-GACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3').

Pour les dosages sur l'inhibition de la réaction de ST, le second oligonucléotide ne possède pas la partie GT en position 3' finale.

L'intégrase est diluée dans une solution contenant 750 mM de NaCl, 10 mM de Tris, 10 % de glycérol et 1 mM de β -mercaptoéthanol, à pH 7,6.¹⁷

Pour exécuter la réaction, 4 μ L d'intégrase diluée (ce qui correspond à une concentration de 1,6 μ M) et 4 μ L d'oligonucléotides détremés (7 nM) ont été ajoutés au volume final de la réaction contenant 10 mM de chlorure de magnésium ($MgCl_2$), 5 mM de DTT, 20 mM de HEPES, 5% de PEG et 15% de DMSO (diméthylsulfoxyde), à pH 7,5. La réaction est portée à 37 °C pendant une heure. Les produits de réaction sont dénaturés avec 30 mM de soude et quantifiés par mesure spectrophotométrique.

b. Mode opératoire du Docteur Jean-François Mouscadet (labo JFM)

Un premier criblage mesurant l'activité totale de l'intégrase est mené sur plaques 96 puits. Le dosage est mené en présence de 1,25 nM du complexe ADN/ADN U5A/U5B et de 6,25 nM du complexe ADN/ADN U5A/U5B-2, dans un tampon contenant 20 mM d'HEPES (pH=7,2), 1 mM de dithiothréitol (DTT), 10 mM de $MgCl_2$. Les mélanges sont incubés à 37 °C pendant 1 heure en présence ou non des composés à tester. Les réactions sont stoppées par extraction par un mélange phénol/chloroforme. Les fragments d'ADN sont précipités par de l'éthanol, remis en suspension dans l'eau et séparés sur gel de polyacrylamide dénaturé à 18% et quantifiés par mesure spectrophotométrique. L'inhibition en présence de la drogue est exprimée par la concentration inhibitrice permettant de diminuer l'activité enzymatique de 50%.¹⁸

2. Mode opératoire pour les tests sur cellules

a. Sur cellules MT-4

La détermination de l'activité antivirale des drogues est basée sur une réduction de la cytopathogénicité induite de souche IIIB du VIH-1. L'activité métabolique de la cellule est estimée par la capacité de la déshydrogénase mitochondriale à réduire le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT), jaune, en formazan qui est bleu. Les cellules MT-4 infectées sont cultivées en présence de différentes concentrations de drogues pendant 5 jours avant la détermination de la production de virus. La concentration d'inhibition 50% (CE_{50}) est tirée de la courbe dose/effets. Parallèlement, la cytotoxicité des

composés MB a été mesurée par le test au MTT sur des cellules infectées après 5 jours d'incubation. La concentration cytotoxique 50% est la concentration pour laquelle la densité optique à 540 nm est divisée par 2.¹⁹

b. Sur cellules HeLa- β -gal-CD₄⁺

Les cellules lymphocytaires CEM4fx sont maintenues dans un milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% de sérum foetal de veau. Les cellules HeLa- β -gal-CD₄⁺ sont cultivées dans du DMEM avec 10% de sérum foetal de veau et 0,5 mg/mL de généticine. Le surnageant viral est obtenu par transfection des cellules P4 avec le clone génomique du HIV-1 PLN4-3. Les cellules CEM4fx sont mises en plaques 96 puits (100 μ L) et infectées avec le virus. Le surnageant viral est retiré après 2 h d'infection et les molécules en solution dans du DMSO sont ajoutées. Les cellules infectées sont cultivées en présence des molécules pendant 3 jours. Les surnageants sont ensuite collectés à t = 72 h et sont utilisés pour infecter les cellules P4. Les cellules P4 sont incubées pendant 24 h et ensuite lysées dans un tampon phosphate contenant 50 mM de 2-mercaptoéthanol, 10 mM de MgSO₄, 25 mM d'EDTA, 0,125% de NP40. 20 μ L de lysat sont incubés avec 100 μ L de tampon contenant du CPRG. L'intensité de la coloration rouge est mesurée sur un spectrophotomètre à 570 nm. La viabilité des cellules CEM4fx est estimée par dosage MTT (Sigma) après 3 jours de traitement avec les molécules (20 μ L). Une solution (7,5 mg/mL) de tampon phosphate est ajoutée. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C dans un incubateur de CO₂ pendant 4 h. La solubilisation des cristaux de formazan est achevée en ajoutant 100 μ L de 10% de SDS, 10 mM de HCl. L'absorbance est lue grâce à un spectrophotomètre à 570 nm. Les expériences sont effectuées en triplicate et moyennées.

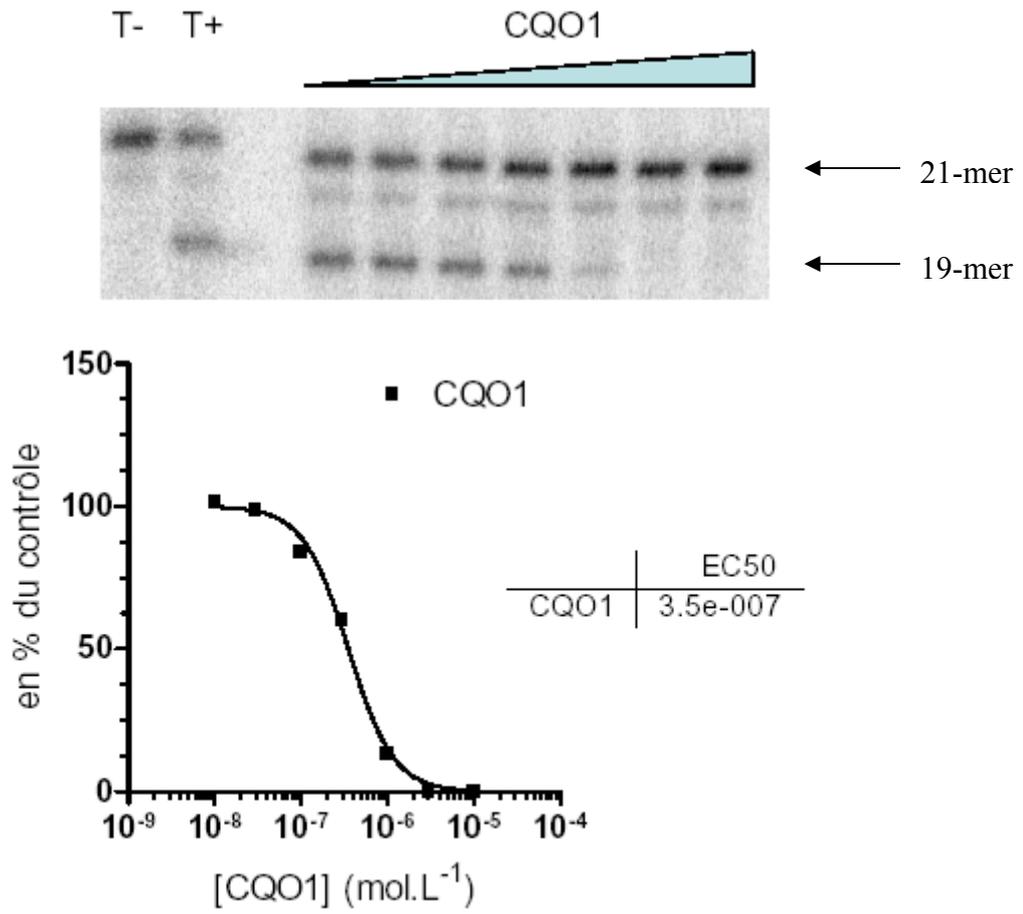


Figure 30 : Exemple de test d'inhibition de l'intégrase pour la partie acide de l'acide salvianolique D

1- Total synthesis of heptamethyl lithospermate.

Jacobson, R.M.; Raths, R.A. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 401-402.

2- Salvianolic acids D and E : two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*.

Ai, C.B.; Li, L.N. *Planta. Med.* **1992**, *58*, 197-199.

3- Synthesis of tetramethyl salvianolic acid F and trimethyl przewalskinic acid A.

Ai, C.B.; Li, L.N. *Chinese Chem. Lett.* **1996**, *7*, 427-430.

4- An improved and versatile method for the rapid synthesis of aryldihydrobenzofuran systems by a boron tribromide-mediated cyclization reaction.

Detterbeck, R.; Hesse, M. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 343-360.

5- Synthesis of linear oligo(catechol) ligands for the metal directed self-assembling of helicates.

Albrecht, M. *Synthesis* **1996**, *2*, 230-236.

6- Synthesis of dl-4-hydroxycrebanine.

Kunitumo, J.I.; Miyata, Y.; Oshikata, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 5245-5249.

7- Structure and synthesis of some complex pyranoisoflavonoids from the bark of *Dalbergia nitidula* welw. Ex Bak..

Van Heerden, F.R.; Brandt, E.V.; Roux, D.G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1978**, 137-145.

de Peredo, A.G.; Leonce, S.; Monneret, C.; Dauzonne, D. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 79-83.

8- Palladium-catalyzed intermolecular α -arylation of zinc amide enolates under mild conditions.

Hama, T.; Culkin, D.A.; Hatwig, J.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4976-4985.

9- Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization.

Pieters, L.; Dyck, S.V.; Gao, M.; Bai, R.; Hamel, E.; Vlietinck, A.; Lemiere, G. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5475-5481.

10- Novel regioselective ester hydrolysis by pig-liver esterase.

Basak, A.; Bhattacharya, G.; Palit, S.K. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1997**, *70*, 2509-2514.

11- Antineoplastic agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug.

Pettit, G.R.; Grealish, M.P.; Herald, D.L.; Boyd, M.R.; Hamel, E.; Pettit, R.K. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2731-2737.

12- “Long range”-kopplungen in einigen kernsubstituierten *o*-hydroxyanisolen und verwandten verbindungen.

Brink, M. *Tetrahedron* **1972**, *28*, 763-770

13- New benzo[*b*]furans as electroluminescent materials for emitting blue light.

Hwu, J.R.; Chuang, K.S.; Chuang, S.H.; Tsay, S.C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1545-1548.

14- Synthesis of NK109, an anticancer benzo[*c*]phenanthridine alkaloid.

Nakanishi, T.; Suzuki, M.; Mashiba, A.; Ishikawa, K.; Yokotsuka, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4235-4239.

15- A modified synthesis of (±)-β-aryllactic acids.

Wong, H.N.C.; Le XU, Z.; Chang, H.M.; Lee, C.M. *Synthesis* **1992**, 793-797.

16- The synthesis and configuration of fukiic acid derivatives.

Matsumoto, T.; Hidaka, K.; Nakayama, T.; Fukui, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1972**, *45*, 1501-1503.

17- Assays for the evaluation of HIV-1 integrase inhibitors.

Debysers, Z.; Cherepanov, P.; Pluymers, W.; De Clercq, E. *Methods Mol. Biol.* **2001**, *160*, 139-155.

18- Determinants of Mg²⁺-dependent activities of recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase.

Leh, H.; Brodin, P.; Bischerour, J.; Deprez, E.; Tauc, P.; Brochon, J.C.; Le Cam, E.; Coulaud, D.; Auclair, C.; Mouscadet, J.F. *Biochemistry* **2000**, *39*, 9285-9294.

19- Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds.

Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309-321.

Synthèse de dérivés naturels de l'acide caféique, inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1

Les traitements actuels contre le SIDA sont composés essentiellement d'inhibiteurs de deux des trois enzymes du Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH), la transcriptase inverse et la protéase. L'apparition de résistances impose cependant la recherche de composés actifs sur d'autres cibles dans le cycle répliatif du virus. Ce travail a donc été consacré à la synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels de la troisième enzyme du VIH-1 : l'intégrase. Parmi les composés polyphénoliques qui ont été obtenus, quatre présentent une activité importante lors de tests *in vitro* ($IC_{50} < 500$ nM) et deux présentent une activité de l'ordre du micromolaire. Ces composés n'ont pas d'activité antivirale mais ne sont pas toxiques.

Synthesis of natural caffeic acid derivatives, potential HIV-1 integrase inhibitors

Current treatment against AIDS are mainly composed of inhibitors of two of the three HIV-1-enzymes, the reverse transcriptase and the protease. However, apparition of resistances leads to search new drugs targeting other steps in the replicative cycle. The aim of this work was to synthesise new potential inhibitors of the third HIV-1-enzyme: the integrase. Amongst the different synthesized polyphenols, four of them have a great *in vitro* activity ($IC_{50} < 500$ nM) and two have an activity closed to the micromolar. These compounds have not an antiviral activity but they are no toxics.

Auteur: Clémence Queffélec

Discipline: Chimie Organique et Macromoléculaire

Mots clés : SIDA / Intégrase du VIH-1 / Polyphénols / Synthèse totale

Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire

UMR CNRS 8009

Université des Sciences et Technologies de Lille

Cité Scientifique

59655 Villeneuve d'Ascq