Réactivité des polyéthers ionophores et des coumarines : vers des systèmes moléculaires efficaces pour la santé animale

Émilie Vialle

▶ **To cite this version:**

Émilie Vialle. Réactivité des polyéthers ionophores et des coumarines : vers des systèmes moléculaires efficaces pour la santé animale. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10161 . tel-00867741

HAL Id: tel-00867741

https://theses.hal.science/tel-00867741

Submitted on 30 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 161-2011 Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : chimie

(arrêté du 7 août 2006)

REACTIVITE DES POLYETHERS IONOPHORES ET DES COUMARINES : VERS DES SYSTEMES MOLECULAIRES EFFICACES POUR LA SANTE ANIMALE

soutenue le 22 septembre 2011 par

Emilie VIALLE

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
Laboratoire de Catalyse, Synthèse et Environnement

Directeur de thèse : Dr. Stéphane PELLET-ROSTAING

JURY :

Dr. Philippe BELMONT	Institut Curie (Paris)	Rapporteur
Dr. Marc TAILLEFER	Université de Montpellier	Rapporteur
Dr. Patrick MAVINGUI	Université de Lyon	Président
Jean DELAVEAU	Mérial	
Pr. Marc LEMAIRE	Université de Lyon	
Pr. Bruno ANDRIOLETTI	Université de Lyon	
Dr. Stéphane PELLET-ROSTAING	Université de Montpellier	

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. A. Bonmartin**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. Fleury
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

Remerciements

Comme une thèse ne s'écrit jamais seule…

Je remercie tout d'abord le Professeur Marc LEMAIRE pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans de très bonnes conditions. Merci beaucoup pour votre disponibilité, vos discussions scientifiques, vos conseils et pour vos encouragements tout au long de ces années, notamment lors du changement de sujet.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Jean DELAVEAU pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de travailler en collaboration avec la société Mérial. Je vous remercie énormément d'avoir permis l'ouverture scientifique des deux sujets vers de nombreuses disciplines chimiques et biologiques, ceci a rendu ma thèse d'autant plus intéressante, enrichissante et passionnante.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Docteur Stéphane PELLET-ROSTAING qui, malgré l'éloignement, a su me donner un encadrement de qualité, ainsi que des conseils avisés, le tout avec une bonne humeur quotidienne. Merci pour nos discussions scientifiques et pour ton feeling qui m'ont permis de développer les deux sujets par la synthèse de molécules originales. Bonne continuation à Marcoule.

Je remercie également le Professeur Bruno ANDRIOLETTI pour son encadrement, ses conseils scientifiques et pour nos nombreuses discussions. Merci de m'avoir permis d'améliorer mon anglais tout au long de ces trois années en me corrigeant et en me faisant répéter à l'oral mes présentations mensuelles. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ton laboratoire.

Ces remerciements s'adressent également à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré au cours de ces trois années. Je pense principalement au Docteur Mimoun MAACHE, parasitologue, pour les tests in vitro concernant les anticoccidiens, au Docteur Nathalie GENESTE de l'université de Bordeaux, pour la modélisation des molécules répulsives ainsi qu'à Pierre-Nicolas STEBE, stagiaire M2, au Professeur Frédéric MARION-POLL de l'INRA de Versailles et au Docteur Rolland ALLEMAND de l'université de Lyon, pour leur aide précieuse dans la mise en place du test avec les drosophiles et pour leurs connaissances de ces petits insectes. Je remercie également Audrey MINOST dont le sujet de thèse concerne l'élaboration de nouvelles formulations de répulsifs, pour nos échanges scientifiques.

Je remercie également un grand nombre de personnes de la société Mérial pour avoir participé aux réunions d'avancement dont, le Docteur Charlie MENG, le Docteur Lance HAMMERLAND, le Docteur Ted CHESTER, de même que Lucienne FATHI, mais aussi le Docteur Kerry POWELL et le Docteur Ann SLUDER de la société Scynexis.

Ces remerciements s'adressent également aux membres du jury, au Docteur Patrick MAVINGUI, chargé de recherche au sein du laboratoire d'Ecologie microbienne de Lyon, au

Docteur Philippe BELMONT, responsable de l'équipe Chimie Organométallique, Hétérocycles et Cibles Biologiques (COHCB) de l'institut Curie à Paris, ainsi qu'au Docteur Marc TAILLEFER, directeur de recherche au sein du laboratoire Architectures Moléculaires et Matériaux Nanostructurés (AM2N) de l'institut Gerhardt à Montpellier, pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.

Merci également à Monsieur Bernard FENET, Mademoiselle Caroline TOPPAN et Monsieur Christophe GILBERT du centre RMN de l'université de Lyon pour leurs nombreux spectres RMN. Merci au Docteur Denis BOUCHU, Madame Natali HENRIQUES et Monsieur Christian DUCHAMP du centre de masse pour leur rapidité à donner les résultats des analyses de masse. Merci à tous pour leurs conseils et pour les connaissances de leur domaine qu'ils m'ont apportés au cours de ces trois ans et qui ont été nécessaires pour déterminer certaines structures.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire Catalyse, Synthèse et Environnement (CASYEN), les anciens et les actuels.

Tout d'abord, je tiens à remercier très chaleureusement le Docteur Wissam DAYOUB pour sa disponibilité, pour son aide et pour son soutien. Merci pour tes conseils techniques, surtout pour les purifications sur colonne, qui m'ont permis bien souvent de gagner un temps précieux et merci pour ta bonne humeur et pour ton optimisme. Bon courage pour la suite, tu mérites de réussir.

Je voudrais également remercier mon binôme de paillasse, Stéphane LAVAL, avec qui j'ai partagé pendant presque trois ans le laboratoire. J'ai passé de très agréables moments en ta compagnie avec ton organisation désordonnée... Bon courage pour ta soutenance de thèse et bien évidemment pour la suite. J'espère que tu trouveras un super post-doc aux Etats-Unis.

Merci aux permanents et aux post-docs du laboratoire : Florence, Nicolas, Estelle, Eric et Julien (le nouvel arrivant) pour leur disponibilité et leurs discussions scientifiques. Un grand merci à l'heureuse future retraitée Annick et à Marie-Christine pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs aides administrative et technique.

Merci aux nombreux collègues passés et présents qui se sont succédés au laboratoire durant ces trois années et qui m'ont permis de passer des moments très agréables et inoubliables au sein du laboratoire. Je pense à toi Stéphanie G (Vive Montpellier), Christelle, Bénédicte (La Roannaise), Lei, Clément (bon courage pour ta soutenance et pour la suite…pour ton post-doc au Etats-Unis), Yan, Leyla, Yin Jé, Marc (Junior), Marco, Adrien, Aurélie, Stéphanie M, Simon, Romain, Etienne B, Cédric, Delphine, François, Santiago, Sophie et Yutta.

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille, en particulier mes parents et mes sœurs, ainsi que mon copain (ou plutôt fiancé) Vincent. Merci beaucoup pour votre soutien permanent, vos encourageants et votre amour vrai. Ils ont été plus que nécessaires tout au long de mes études supérieures, et oui, depuis huit ans déjà vous suivez de prêt mon travail et mon évolution dans la chimie. Mille et un mercis d'être là.

Résumé

L'objectif de cette thèse, réalisée en collaboration avec la société Mérial, concerne la santé animale et s'oriente vers la synthèse de molécules actives à visée préventive ou thérapeutique. Deux sujets distincts sont abordés.

Dans un premier temps, le but recherché est la synthèse d'une série de molécules présentant une activité anti-coccidienne pour le traitement préventif des poulets. Quarante-trois composés originaux, issus d'une synthèse courte à deux ou trois étapes, ont été préparés par hémi-synthèse de la monensine. Quinze molécules ont été testées *in vitro* et trois d'entre elles montrent une activité importante vis-à-vis du parasite *Eimeria tenella.*

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux répulsifs pour un large panel d'arthropodes. Après avoir fait une étude bibliographique approfondie, nos recherches se sont concentrées sur la réactivité de la coumarine. Environ soixante-dix molécules ont été synthétisées par modifications fonctionnelles des 4-, 6- et 7-hydroxycoumarines et de la coumarine. La grande majorité a été testée en présence de drosophiles. Six molécules présentant une activité répulsive équivalente à celle du DEET, produit de référence, ont été identifiées.

Abstract

This thesis was completed in collaboration with the Animal Health Company Merial. The objective of the thesis is the synthesis of preventive and therapeutic bioactive molecules. Two separate subjects were treated.

First, the aim was the synthesis of a series of molecules having an anticoccidial activity for the preventive treatment of chickens. Forty-three original compounds, issued from a short synthesis with two or three steps, were prepared from monensin by hemi-synthesis. Among them, fifteen were tested *in vitro* and three of them showed a significant activity against *Eimeria tenella*.

Thereafter, we have worked on the synthesis of new repellents for a wide range of arthropods. After a comprehensive bibliographic study, our research was focused on the coumarin reactivity. More than seventy molecules were synthesized by structural modifications of 4-, 6- and 7-hydroxycoumarins and of coumarin. Almost all the compounds were tested in the presence of drosophila. Six molecules showing a repellent activity equivalent to DEET, used as a reference product, were identified.

Liste d'abréviations

AcOH : Acide acétique
APTS : Acide paratoluène sulfonique
CCM : Chromatographie sur couche mince
DAST : Trifluorure de diéthylaminosulfure
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCC : Dicyclohexylcarbodiimide
DCM : Dichlorométhane
DEAD : Diéthylazodicarboxylate
DEET : *N,N*-diéthyl-*m*-toluamide
DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIEA : Diisopropyléthylamine
DIC : N,N'-diisopropylcarbodiimide
DL_{50} : Dose létale 50
DMAP : Diméthylaminopyridine
DMF : Diméthylformamide
DMP : Diméthylphtalate
DMSO : Diméthylsulfoxide
DPPF : 1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocène
Equiv. : Equivalent
FDPP : Phosphinate de pentafluorophényle diphényle
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
HOBt : Hydroxybenzotriazole
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
LAGEP: Laboratoire d'Automatique et de Génie des procédés
MS : Spectrométrie de masse
MS4A : Tamis moléculaire de 4 Angström
MsCl : Chlorure de mésyle
N° : Numéro
NBS : *N*-Bromosuccinimide
NCS : *N*-Chlorosuccinimide
NFSI : N-fluorobenzènesulfonimide
NMP : *N*-méthyl-2-pyrrolidone
PMD : *p*-menthane-3,8-diol
PPy : 4-pyrrolidinopyridine
Pyr : Pyridine
Rdt : Rendement
Rf : Rapport frontal
REACH : Règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RX : Rayon X
t : Temps

T.A. : Température ambiante
TBAF : Fluorure de tétrabutylammonium
TBAI : Iodure de tétrabutylammonium
TEA : Triéthylamine
THF : Tétrahydrofurane
t_R : Temps de rétention
TsCl : Chlorure de tosyle
TsOH : Acide toluène sulfonique
Uma : Unité de masse atomique
Vol. : Volume

Sommaire général

Introduction générale.....11

Premier chapitre :.....17

Optimisation de l'activité anticoccidienne d'ionophores naturels : modification de la monensine et tests biologiques

I - Etude bibliographique.....22
I-1 La coccidiose.....22
I-2 Les polyéthers ionophores.....25
I-3 La monensine.....27
II - Synthèse de dérivés de la monensine.....32
II-1 Etude et caractérisation.....32
II-2 Modification de la monensine.....37
II-3 Synthèse de dérivés de la monensine oxodioxane.....69
II-4 Synthèse de dérivés de la monensine oxolactone.....75
II-5 Conclusion.....76
III- Résultats des tests biologiques.....79
II-1Principe du test.....79
II-2 Molécules testées et résultats.....82
Conclusions.....88
IV- Partie expérimentale.....89

Deuxième chapitre :.....111

Coumarine modifiée : vers de nouveaux répulsifs d'arthropodes ?

I - Etude bibliographique.....116
I-1 Objectifs fixés par Mérial.....116
I-2 Les répulsifs.....117
I-3 Présentation du sujet.....126
II - Synthèse de dérivés de la coumarine.....129
II-1 Modifications des hydroxycoumarines.....129
II-2 Hydrogénation.....147
III - Résultats des tests biologiques.....151
III-1 Principe et mise en place du test.....151
III-2 Etude de deux répulsifs connus : DEET et Picaridine.....156
III-3 Résultats des tests réalisés avec les nouvelles molécules.....158
Conclusions.....173
IV- Partie expérimentale.....174

Conclusion générale.....197

Introduction générale

Introduction générale

Tout comme l'homme, l'animal a besoin d'être soigné. La recherche de nouveaux principes actifs pour nos amis à plumes, à poils ou à écailles est un secteur d'actualité et novateur. La santé animale reste un sujet très important pour les éleveurs, les vétérinaires, les personnes possédant un animal de compagnie mais aussi pour nos sociétés. La menace que constituent les maladies infectieuses ou contagieuses, se fait sentir dans le monde entier, en témoigne le fait que l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Office international des épizooties (OIE) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) publient conjointement chaque année un relevé de l'incidence de la maladie dans leurs pays membres. Cet *Animal Health Yearbook* donne la liste de 140 maladies contagieuses (telle la peste, la fièvre aphteuse, la rage ou la tuberculose bovine) présentant divers degrés de gravité sur le plan socio-économique, pour la santé publique et la santé animale.

Le domaine de la santé animale englobe l'ensemble des animaux qu'ils soient de compagnie, d'élevage ou sauvage. La France compte, parmi ses habitants, près de 60 millions d'animaux de compagnie et plus de 317 millions d'animaux d'élevage ou d'exploitation agricole (volailles, bovins, caprins, ovins…). De la même manière que les humains, les animaux sont touchés par divers types de maladies, dont les maladies parasitaires dues à l'ingestion de micro-organismes (arthropodes et helminthes), mais aussi les maladies métaboliques et celles provoquées par les toxines. Cette thèse s'intéresse plus particulièrement aux maladies parasitaires.

La conception actuelle de la santé repose sur l'idée d'un équilibre entre les agents pathogènes (microbes et parasites), les conditions d'élevage et l'animal lui-même. Ainsi, si les microbes ou parasites sont potentiellement capables de provoquer une gène, leur présence n'est pas toujours suffisante pour développer la maladie. Les conditions d'élevage, c'est-à-dire l'environnement dans lequel évoluent les animaux, et l'alimentation qu'ils reçoivent, influencent à la fois la résistance des animaux et le développement des agents pathogènes. L'élevage représente une part importante de la valeur des productions agricoles. Les maladies des animaux, par pertes directes (animaux malades, mortalité) ou indirectes (augmentation du coût des productions, entraves aux échanges commerciaux) qu'elles engendrent, entament la valeur des productions et peuvent avoir de graves conséquences socio-économiques. La santé animale représente aussi un important facteur de compétitivité de l'élevage et donc un enjeu pour les pays producteurs tournés vers l'exportation et développant des productions à haute valeur ajoutée.

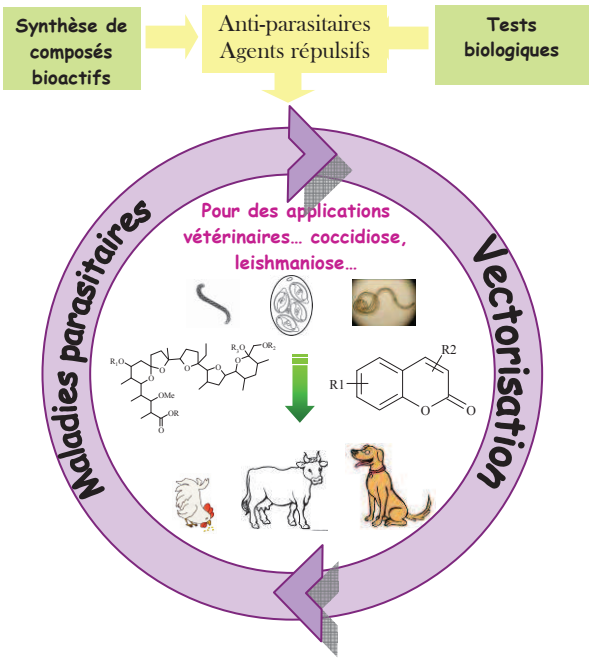
Les maladies infectieuses sont provoquées par des micro-organismes. La plupart de celles qui intéressent les vétérinaires sont dues à des virus, à des bactéries ou à des helminthes. Moins nombreuses, mais tout aussi graves, sont les maladies causées par des bactéries de type mycoplasmes et rickettsies, par des protozoaires et par d'autres agents parasitaires.

Plusieurs facteurs contribuent aux effets d'une maladie infectieuse. Les affections qui déciment les adultes ou les jeunes dans une population animale sont évidemment très graves. Certaines concernent directement la fonction reproduction, provoquant la stérilité ou l'avortement. D'autres peuvent nuire sérieusement à la productivité, notamment à la qualité et à la quantité des produits ou du travail fourni par l'animal. Les zoonoses menacent la santé de l'être humain lorsqu'il y a risque de contamination par l'animal. Le degré de gravité assigné à une maladie est fonction de la combinaison de ces divers facteurs.

Les voies de contagion sont diverses. Certains micro-organismes pullulent dans les sécrétions et les excréments des animaux infectés, à l'origine par exemple de la coccidiose, et peuvent se diffuser du fait de la promiscuité ou des rapports sexuels. Certains germes peuvent être emportés au loin par les vents ou les eaux courantes avant d'infester un animal récepteur. D'autres se transmettent de la mère au fœtus, et d'autres encore par des piqûres d'insectes. Certains peuvent être transmis à des hôtes de la faune sauvage où ils demeurent latents avant de passer à nouveau à des animaux domestiques. Selon les voies de contagion et les porteurs, certaines maladies sont très difficiles à contrôler et à éliminer.

C'est donc dans l'optique d'améliorer certains traitements pour limiter et contrôler la diffusion de maladies que la société Mérial a souhaité s'engager dans un programme de recherche sur trois ans portant d'une part sur la chimie des anti-coccidiens et d'autre part sur celle des agents répulsifs.

Le sujet de recherche de cette thèse se divise ainsi en deux parties distinctes traitant pour l'une de la recherche de nouvelles molécules anti-coccidiennes pour le traitement des élevages aviaires intensifs et pour l'autre de la synthèse de nouveaux agents répulsifs efficaces vis-à-vis des mouches, des moustiques et des tiques. Dans un schéma global, ces deux sujets sont indissociables, le premier étant orienté vers le traitement d'un parasite et le second étant ciblé sur l'inhibition de la vectorisation d'un agent pathogène.



Le premier chapitre concerne la recherche d'une alternative aux additifs alimentaires disponibles contre la coccidiose. Cette dernière est une maladie causée par un protozoaire du

genre *Eimeria* et de l'espèce *tenella*, la coccidie. Le principe du traitement repose sur l'efficacité d'une molécule qui bloquerait le développement du parasite *in situ*. C'est ce que nous appelons communément la chimiothérapie. Après une introduction présentant la coccidiose et les molécules actuellement disponibles sur le marché, nous aborderons, dans un premier temps, la synthèse de monensines modifiées par réactions d'amidation, d'estérification, d'éthérification, d'oxydation et de fluoration. Le deuxième volet de cette première partie décrira les résultats des tests biologiques effectués *in vitro* avec certaines des molécules nouvellement synthétisées.

Le second chapitre de la thèse est dédié à la réactivité des coumarines comme architecture moléculaire ayant un effet répulsif sur plusieurs arthropodes susceptibles de transmettre, à un animal, une maladie infectieuse. Après une étude bibliographique comportant un bref historique des répulsifs et une présentation du sujet, nous détaillerons, tout d'abord, les modifications chimiques (éthérification, estérification, amidation, hydrogénation…) réalisées sur les 4, 6 et 7-hydroxycoumarines et sur la coumarine. Dans une seconde partie, nous présenterons les résultats des tests biologiques *in vivo* effectués en présence de drosophiles. A partir des résultats obtenus, nous tenterons d'établir une relation structure-efficacité par comparaison des effets répulsifs du DEET et de la picaridine, répulsifs commercialement disponibles.

Premier chapitre :

Optimisation de l'activité anticoccidienne d'ionophores naturels : modification de la monensine et tests biologiques

Premier chapitre :

Optimisation de l'activité anticoccidienne d'ionophores naturels : modification de la monensine et tests biologiques

---

I – Etude bibliographique 22
I-1 La coccidiose 22
I-1-1 Définition 22
I-1-2 Cycle de vie du protozoaire 22
I-1-3 Traitement et phénomène de résistance 23
I-2 Les polyéthers ionophores 25
I-2-1 Généralités 25
I-2-2 Mode d'action des polyéthers ionophores 26
I-3 La monensine 27
I-3-1 Description de la monensine 27
I-3-2 Modifications de la monensine 28
II – Synthèse de dérivés de la monensine 32
II-1 Etude et caractérisation de la monensine 32
II-1-1 Caractérisation structurale 32
II-1-2 Etude de la solubilité 35
II-1-3 Développement d'une méthode HPLC analytique 35
II-2 Modifications de la monensine 37
II-2-1 Augmentation de la taille de la pseudo-cavité 37
II-2-2 Lactonisation 43
II-2-3 Réactions d'éthérification 46
II-2-4 Réactions de fluoration 54
II-2-5 Oxydation 60
II-2-6 Estérification de la monensine 65
II-2-7 Réaction de Mitsunobu 67
II-3 Synthèse de dérivés de la monensine oxodioxane **6g** 69
II-3-1 Réactions d'estérification 69
II-3-2 Réactions d'éthérification 71
II-3-3 Oxydation 72
II-3-4 Saponification 73
II-3-5 Réaction de fluoration 74
II-4 Synthèse de dérivés de la monensine oxolactone **16** 75
II-4-1 Saponification 75
II-4-2 Perspectives 75
II-5 Conclusion 76
III – Résultats des tests biologiques 79
III-1 Principe du test 79
III-2 Molécules testées et résultats 82
Conclusions 88
IV - Partie expérimentale 89

IV-1 Preparation of monensin acid **1a** 89
IV-2 General procedure for the amidification of monensin acid 89
IV-3 General procedure for the saponification 94
IV-4 General procedure for monensin lactonization 95
IV-5 General procedure for the synthesis of C25-alcoxymonensin 95
IV-6 General procedure for the lactonization of 25-methoxymonensin 99
IV-7 General procedure for the etherification with $BF_3.Et_2O$ 100
IV-8 General procedure for the fluoration of the lactone 102
IV-9 General procedure for oxidation 102
IV-9-1 Oxidation of the lactone 102
IV-9-2 Oxidation of the monensin 103
IV-10 General procedure for esterification 103
IV-10-1 From alkyl iodide 103
IV-10-2 From alcohols 104
IV-11 Procedure for the amination of methanoate monensin 105
IV-12 Procedures to obtain monensin oxodioxane derivatives 105
IV-12-1 Esterification of monensin oxodioxane 105
IV-12-2 Etherification of monensin oxodioxane on C7 107
IV-12-3 Oxidation of monensin oxodioxane 107
IV-12-4 Saponification of monensin oxodioxane 108
IV-12-5 Fluorination of monensin oxodioxane 108
IV-13 Procedure for saponification of monensin oxolactone 110

Premier chapitre :

Optimisation de l'activité anticoccidienne d'ionophores naturels : modification de la monensine et tests biologiques

La monensine est un antibiotique de la famille des polyéthers ionophores de type spirocétal, obtenue par fermentation des S*treptomyces cinnamonensis*. Comme la plupart des récepteurs polyéthers de la même famille, formant des complexes pseudomacrocycliques avec les cations mono- et divalents, ce composé agit comme transporteur d'ions créant un déséquilibre ionique entre la cellule et son milieu environnant, déséquilibre à l'origine de l'apoptose. Ces propriétés pharmacologiques remarquables en font un antiparasitaire vétérinaire de choix, particulièrement actif vis à vis des coccidies, des bactéries gram positives et des *Apicomplexa* (*Plasmodium*, *Eimeria*, …). Connu comme « coccidiostatique », cet ionophore est un additif utilisé dans l'alimentation animale, pour la prévention des coccidioses.

Bien que peu étudiée vis-à-vis de ces anticoccidiens, l'émergence de phénomènes de résistance est devenue un problème majeur pour l'élevage. Jusqu'à présent, peu ou pas d'orientation concernant la modification structurale des ionophores considérés n'a été envisagée pour restaurer leur activité. A ce jour, seuls quelques analogues modifiés de la monensine ont été synthétisés pour des études de relation structure-activité. La société Mérial s'intéresse à ce sujet et souhaite développer de nouveaux anticoccidiens synthétisés par hémi-synthèse en deux ou trois étapes à partir de la monensine.

I – Etude bibliographique

I–1 La coccidiose

I-1-1 Définition

Après la seconde guerre mondiale, pour répondre au besoin impérieux de nourrir les populations, le poulet « a quitté » la basse-cour pour un élevage rationalisé dit élevage industriel. Avec l'augmentation des concentrations animales, les risques sanitaires sont alors apparus et les coccidioses se sont développées.

La coccidiose est l'infection parasitaire la plus répandue chez les poulets. Elle est causée par des organismes unicellulaires de la classe des protistes (eucaryotes unicellulaires) coccidie qui se logent dans l'intestin. Elle se transmet par voie oro-fécale et se manifeste par des diarrhées chroniques parfois sanguinolentes. Seuls les élevages de bonne qualité et la chimiothérapie prophylactique, utilisant une large gamme de médicaments, permettent de la contrôler. Mais, ce contrôle reste limité car les coccidies développent rapidement une résistance vis-à-vis de ces molécules.[1] Par ailleurs, la coccidiose constitue l'une des maladies les plus onéreuses chez les poulets. Chaque année, elle coûte environ 1,5 milliard US$ aux producteurs.[2]

I-1-2 Cycle de vie du protozoaire

La coccidiose est causée par des parasites protozoaires (coccidies), *Apicomplexa*, du genre *Eimeria*. Leurs oocystes, œufs encapsulés, peuvent être présents dans l'environnement dès lors qu'il y a un élevage aviaire, par exemple un élevage de poulets. Le cycle de vie des coccidies est monoxène, c'est-à-dire qu'il se déroule dans un seul hôte. Il est composé de trois phases distinctes : sporogonie, mérogonie ou schizogonie et gamogonie, conduisant à la libération d'une nouvelle génération d'oocystes au bout d'une semaine (Figure 1).[3] Le cycle commence par une ingestion d'oocystes sporulés. Chaque oocystes sporulés contient quatre sporocystes avec chacun deux sporozoïtes. A température corporelle, les sporozoïtes quittent leur sporocyste et deviennent actifs. Les sporozoïtes de différentes espèces *Eimeria* pénètrent en quelques secondes dans les cellules intestinales du poulet. Le cycle de vie d'un *Eimeria* comprend trois à quatre générations de multiplication asexuée appelées schizogonie. Le stade suivant, la gamétogonie, est une multiplication sexuée. Toutes les étapes du parasite se situent dans les cellules épithéliales de l'intestin du poulet. De celles-ci apparaissent les oocystes, qui sont excrétés avec les excréments dans l'environnement. Dans des conditions favorables, ces oocystes se développent jusqu'à des oocystes sporulés (sporogonie), que la poule ingère à nouveau et le cycle est complet. En fonction des influences de l'environnement et de l'espèce *Eimeria*, la longueur du cycle varie entre cinq et sept jours. Le pouvoir de multiplication des coccidies est très important. En effet, en ingérant seulement quelques oocystes, des millions de nouveaux oocystes se forment en huit jours.

[1] Cox F. E. G., *Int. J. Parasitol.*, **1998**, 28, 165-179.
[2] Yadav A., Gupta S. K., *Vet. Parasitol.*, **2001**, 102, 69-75.
[3] Chapman H. D., Jeffers T. K., Williams R. B., *Poult. Sci.*, **2010**, 89, 1788-1801.

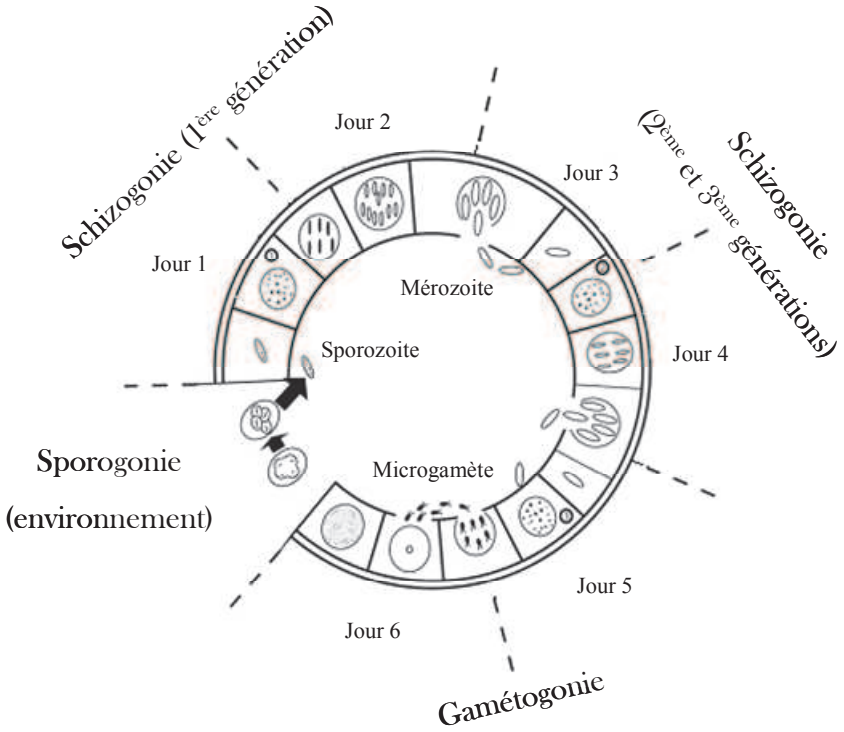


Figure 1 : Cycle de vie de l'*Eimeria* d'après la revue de Chapman et al.

I-1-3 Traitement et phénomène de résistance

De nos jours, la coccidiose clinique a pratiquement disparu. Par contre, les coccidioses subcliniques persistent et peuvent entraîner, compte tenu des coûts de production, des pertes économiques importantes pour l'éleveur (diminution de la croissance, déclassements à l'abattage,…). C'est pour ces raisons, que les éleveurs utilisent des substances anticoccidiennes incorporées en mélange dans l'alimentation des poulets. En effet, les anticoccidiens ne sont pas des médicaments, mais des additifs alimentaires.

Un additif en alimentation animale est une substance, dotée ou non d'une valeur nutritionnelle, qui est ajoutée intentionnellement aux aliments des animaux dans un but précis d'ordre nutritionnel, sensoriel, technologique ou zootechnique (tels les antibiotiques ou les anticoccidiens).

Actuellement, onze coccidiostatiques sont autorisés en tant qu'additifs alimentaires dans l'union européenne.[4] Ces derniers peuvent être classés en deux groupes (Figure 2):

- *les coccidiostatiques d'origine synthétique :* décoquinate, diclazuril, halofuginone, robenidine et nicarbazine.
- *les coccidiostatiques d'origine naturelle :* lasalocide, maduramicine, monensine, nasarine, salynomycine et semduramicine.

[4] Afssa – Saisine n°2007-SA-0176.

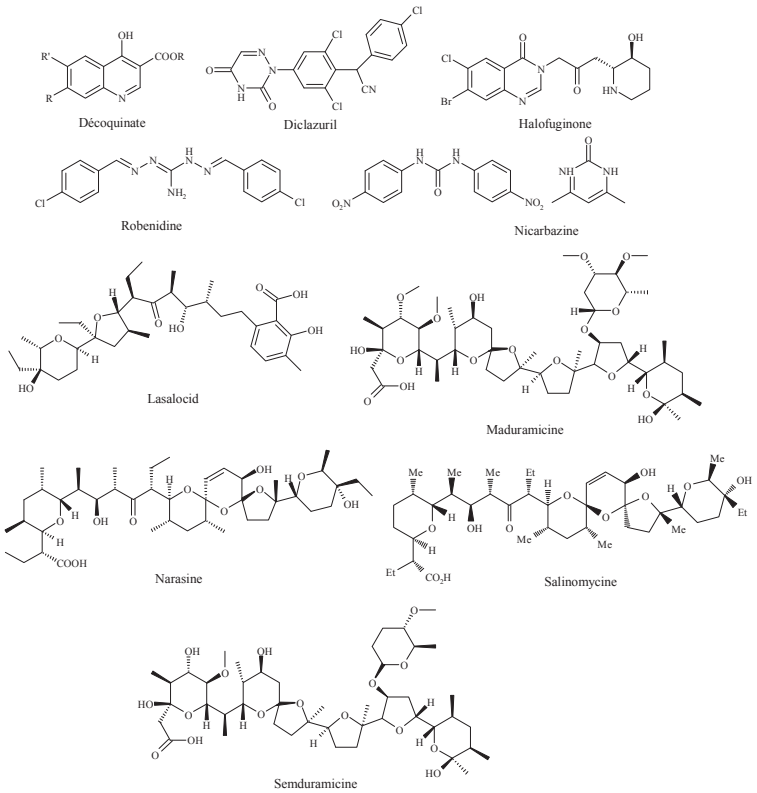


Figure 2 : Coccidiostatiques synthétiques et naturels autorisés par l'union européenne

La chimioprévention reste la méthode de lutte la plus efficace et la plus économique à ce jour, contre la coccidiose. Cependant, des phénomènes de résistance du parasite à certains coccidiostatiques, tels que la monensine, sont apparus dans les élevages. Quelques études ont été réalisées à ce sujet. Une publication décrit notamment la situation de cette résistance chez des producteurs de poulets néerlandais[5] avec quatre souches datant de 1996, quatre autres datant de 1999 et sept isolées en 2001. Le profil de sensibilité a été établi sur la base de la réduction des lésions dans les groupes traités comparés à un groupe contrôle non traité. Neuf anticcocidiens ont été testés. L'étude démontre le développement d'un phénomène de résistance des souches à tous les produits testés en 1999 et 2001. Par ailleurs, il a été montré qu'une résistance élevée peut être évitée en alternant les anticoccidiens à chaque démarrage d'élevage.

Le premier chapitre de cette thèse s'appuie sur ces constatations. Afin de contrer les phénomènes de résistance, nous avons synthétisé de nouvelles molécules par modifications chimiques d'un polyéther ionophore, la monensine. Cette dernière est un des anticoccidiens les plus utilisés mais son utilisation risque d'être prochainement limitée dans l'union européenne. Ces nouvelles molécules synthétisées doivent posséder une activité anticoccidienne au moins égale, voire supérieure à celle de la monensine, et ne pas présenter de résistance vis-à-vis des coccidies.

[5] Peek H. W., Landman W. J. M., *Avian Pathol.*, **2003**, 32 (4), 391-401.

I-2 Les polyéthers ionophores

I-2-1 Généralités

La plupart des antibiotiques ionophores est produit par des bactéries saprophytes de genre *Streptomyces*, mais aussi *Streptoverticillim*, *Nocardiopsis*, *Nocardia* et *Actinomadura*. En plus des produits naturels, plusieurs ionophores chimiquement modifiés existent. Ils appartiennent tous au vaste groupe des ionophores signifiant « transporteurs d'ions » dont seule une partie est utilisée comme facteurs de croissance ou dans la prévention d'infections chez les animaux.

Les polyéthers ionophores constituent un groupe de composés qui possèdent une architecture moléculaire parfaitement adaptée à la reconnaissance et au transport des ions de petite taille au travers des barrières lipidiques. Leur capacité à modifier la perméabilité des systèmes membranaires, naturels ou artificiels, leur permet de changer les gradients de concentration de part et d'autre des membranes biologiques et ainsi d'interférer dans les processus métaboliques liés à la paroi membranaire. Ces composés (de 200 à 2000 Da) forment des complexes liposolubles avec les cations polaires, parmi lesquels K^+, Na^+, Ca^{2+} qui jouent un rôle biologique déterminant. Leur cinétique de complexation/décomplexation et leur vitesse de diffusion en font des transporteurs membranaires plus efficaces que la plupart des enzymes macromoléculaires. Ils peuvent effectuer jusqu'à 1000 cycles de transport par seconde. La conformation particulière de leur squelette est à l'origine du transport. En effet, la surface interne de la cavité d'accueil dans laquelle les polyéthers ionophores maintiennent un cation piégé par des interactions électrostatiques ion-dipôle, contient des atomes d'oxygène.

La forte affinité de ces molécules vis-à-vis des cations a fait des ionophores des molécules de choix largement étudiés en biologie cellulaire, en biochimie et dans l'industrie agroalimentaire. Selon le mode de transport, les ionophores sont divisés en trois catégories :[6]

- *Les ionophores neutres :* qui ne présentent pas de forte activité antimicrobienne et ne sont donc pas utilisés comme antibactériens.

- *Les « quasi-ionophores » :* qui sont des molécules polypeptidiques capables de former des pores conducteurs d'ions. Ils sont en cela différents des deux autres catégories.

- *Les ionophores carboxyliques :* qui sont des molécules à chaîne ouverte, appelés aussi antibiotiques polyéthers. Ils sont subdivisés en polyéthers monovalents et polyéthers divalents, suivant le transport préférentiel de cations mono- ou divalents. Les complexes formés avec les cations sont électriquement neutres et migrent indépendamment du potentiel de membrane.

[6] Butaye P., Devriese L. A., Haesebrouck F., *Clin. Microbiol. Rev.*, **2003**, 16 (2), 175-188.

I-2-2 Mode d'action des polyéthers ionophores

Les ionophores incorporés dans les additifs alimentaires à destination des animaux de rente sont des ionophores carboxyliques. Le mode de transport induit par ces derniers est différent de celui des ionophores neutres. En effet, au pH physiologique de 7,4, le groupement carboxylique ionisé se situe à la surface de la membrane. Lorsque l'ionophore anionique est en contact avec un cation, la complexation s'effectue par formation d'un zwitterion. Les charges étant alors compensées, le complexe peut s'extraire de la surface polaire. Le squelette lipophilique de l'ionophore permet la diffusion passive du complexe de même que sa migration vers le côté opposé. Ce mouvement facilite la resolvatation du cation à l'arrivée du complexe sur l'autre face. La diminution de la polarité du ionophore par complexation avec un autre cation (pouvant être remplacé par un proton) rend possible le retour du ionophore sur la face initiale de la membrane par le même mécanisme (Figure 3). Les polyéthers ionophores sont donc des échangeurs de cations passifs.[7]

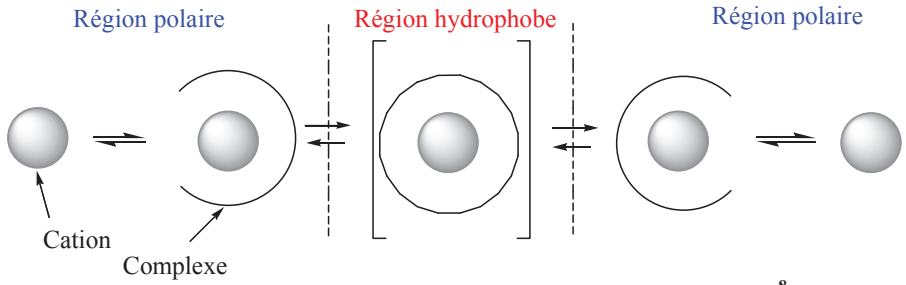


Figure 3 : Mécanisme du transport membranaire des ions[8]

Ainsi, par le biais de ces échanges, les polyéthers ionophores modifient les gradients de concentration en un cation donné, notamment le potassium et le sodium, de part et d'autre de la membrane, ce qui conduit à la mort de la cellule.[9]

[7] Thèse de l'université de Poitiers, Jérôme Henri, **2006**.
[8] Matsumori N., Morooka A., Murata M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 14989-14995.
[9] Huczynski A., Przybylski P., Brzezinski B., Bartl F., *Biopolymers*, **2006**, 82, 491-503.

I-3 La monensine

I-3-1 Description de la monensine

La monensine, acide 4-[2-[5-éthyl-5-[5-[6-hydroxy-6-(hydroxyméthyl)-3,5-diméthyl-oxan-2-yl]-3-méthyl-oxolan-2-yl]oxolan-2-yl]-9-hydroxy-2,8-diméthyl-1,6-dioxaspiro[4.5] dec-7-yl]-3-méthoxy-2-méthylpentanoïque, a été isolée, en 1967, pour la première fois par Agtarap et al.[10] à partir d'une souche de *Streptomyces cinnamonensis* et a été commercialisée en 1971. C'est un polyéther ionophore antibiotique possédant une activité anticoccidienne contre les *Eimeria* du poulet.

La monensine possède les caractéristiques structurales typiques des polyéthers ionophores. En effet, elle est constituée d'un squelette à cinq cycles oxygénés substitués par des fonctions alcools et un acide carboxylique, un spirocétal, trois cycles tétrahydrofuranes et deux cycles tétrahydropyranes. De plus, sa stéréochimie est riche, dix-sept centres stéréogèniques (*) sur les vingt-six carbones composant son squelette dont six contigus. Elle est également composée de deux hydroxyles terminaux (primaire et tertiaire) et d'un secondaire (Figure 4). Les hydroxyles terminaux permettent la formation d'une pseudo cavité, site de reconnaissance du cation, par liaisons hydrogène impliquant l'acide carboxylique terminal.

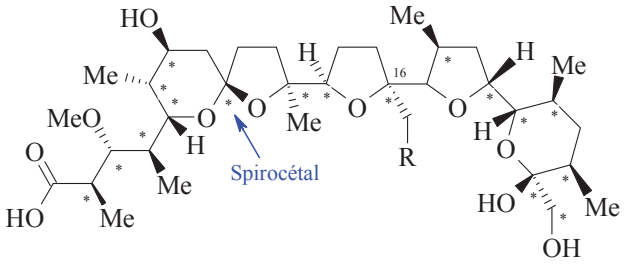


Figure 4 : Monensine

La monensine existe sous deux formes différenciées au niveau du carbone 16. En effet, la monensine A, forme largement majoritaire, possède un groupement éthyle, tandis que la monensine B, minoritaire, a un méthyle. Le ratio entre ces deux structures dépend des conditions de culture employées.[11]

La monensine forme des complexes majoritairement avec le potassium, le sodium et le calcium. Sakakibara et ses collaborateurs ont obtenu la structure RX du complexe monensine-sodium[12] (Figure 5).

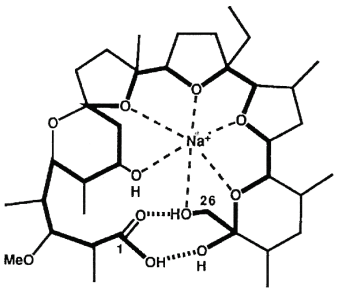


Figure 5 : Structure de la monensine

[10] Agtarap A., Chamberlin J. W., Pinkerton M., Steinrauf L., *J. Chem. Am. Soc.*, **1967**, 89 (22), 5737-5739.
[11] Liu H., Reynolds K. A., *J. Bacter.*, **1999**, 181 (21), 6806-6813.
[12] Sakakibara J., Nakamura A., Nagai S-I., Ueda T., Ishida T., *Chem. Pharm. Bull.,* **1988**, 36 (12), 4776-4784.

La structure du complexe se caractérise clairement par la forme pseudo-cyclique qu'adopte la monensine en présence d'ion sodium. Grâce à cette étude, les atomes et les groupes fonctionnels accessibles sont déterminés. Ces derniers peuvent donc être modifiés chimiquement sans altérer la géométrie de la conformation.

I-3-2 Modifications de la monensine

I-3-2-1 Travaux de synthèse déjà publiés

Certains chimistes se sont intéressés à la synthèse totale de la monensine à partir de 1979. Le groupe de Kishi fut le premier à décrire sa synthèse en quarante-huit étapes.[13] Peu de temps après, l'équipe de Still a également publié une autre synthèse totale convergente.[14]

Par ailleurs, la monensine a été modifiée chimiquement afin d'améliorer ou de diversifier son activité biologique. A la fin des années 1980, plusieurs équipes se sont intéressées à la modification fonctionnelle de la monensine. En 1986, Sanofi publia un brevet sur la monensine oxydée en position 25 pour lutter contre la coccidiose (Figure 6).[15]

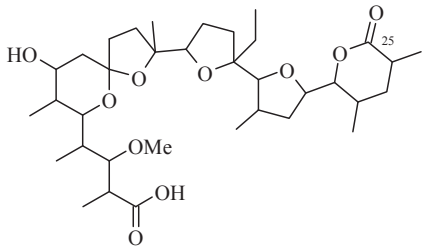


Figure 6 : Monensine oxydée en position 25

Par la suite, cette équipe a synthétisé de nouveaux dérivés de la monensine provenant de la modification en C25 et C26 par estérification, lactonisation, carbonatation, sulfonation et oxydation.[16,17]

Le groupe de Sakakibara a également travaillé sur la modification de la monensine afin d'étudier l'activité de transport d'ions de ces nouveaux complexes. En effet, il existe une relation entre la structure modifiée et le transport d'ions sodium. Ces travaux de recherche ont débuté par la préparation des acides monensylaminés par condensation de l'acide carboxylique terminal de la monensine en présence d'un acide aminé.[12] Cependant, il fut démontré que la partie acide aminé ne permettait pas l'établissement d'une conformation pseudocyclique.[18] C'est donc pour avoir des composés avec une plus grande hydrophobicité que ces mêmes chercheurs se sont intéressés à la formation d'acide-1,29-lactones monensylaminés à partir des acides monensylaminés (Schéma 1) en utilisant la méthode de lactonisation de macrocycles décrite par Corey.[19,20] Mais, leurs études ont montré que la

[13] Schmid T., Fukuyama T., Akasaka K., Kishi Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101 (1), 259-263.
[14] Collum D. B., McDonald J. H., Still W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102 (2), 2117-2121.
[15] Jeminet G., FR 2 605 221, **20 octobre 1986**.
[16] Gaboyard C., Dauphin G., Vaufrey F., Jeminet G., *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, 54 (5), 1149-1155.
[17] Rochdi M., Delort A.-M., Guyot J., Sancelme M., Gibot S., Gourcy J.-G., Dauphin G., Gumila C., Vial H., Jeminet G., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 588-595.
[18] Nakamura A., Nagai S., Ueda T., Sakakibara J., Hotta Y., Takeya K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37 (9), 2330-2333.
[19] Nakamura A., Nagai S., Ueda T., Murakami N., Sakakibara J., Shibuya H., Kitagawa I., *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39 (7), 1726-1730.

présence de l'acide carboxylique en bout de chaîne était indispensable à la création de la cavité pseudomacrocylclique. Ainsi, une modification de l'acide carboxylique ne contribue pas à l'amélioration de l'activité du transport d'ions.

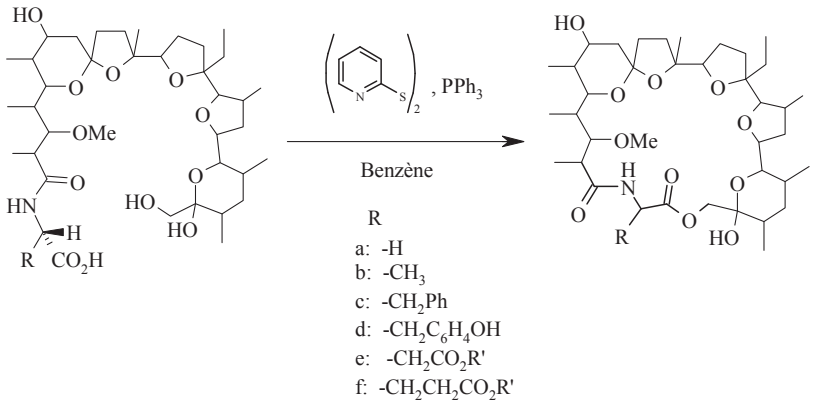


Schéma 1 : Formation d'acides 1,29-lactones monensylaminés

Sakakibara s'est ensuite intéressé à l'alcool secondaire en position 7 car l'analyse de la structure RX de la monensine a montré que ce groupement, bien qu'engagé dans la chélation des ions, se situe à la surface de la molécule. Ainsi, une modification sur ce site augmente la lipophilie sans pour autant changer la conformation pseudocyclique. Les chercheurs ont commencé par introduire des groupements acyles et alkyles sur cette position (Figure 7). Ces transformations s'effectuent en cinq étapes. Les modifications de l'alcool secondaire nécessitent au préalable des étapes de protection de l'acide carboxylique par un ester et des alcools primaire et tertiaire par un groupement acétal, suivies de leur déprotection.[21,22]

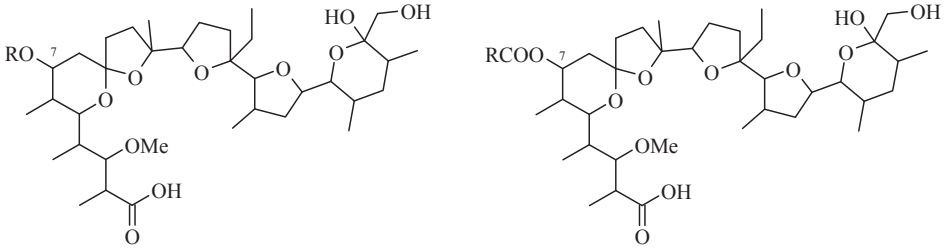
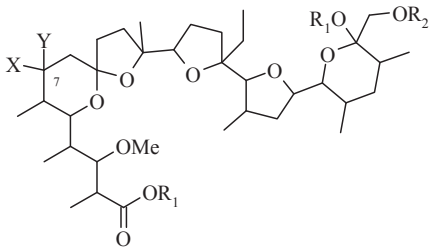


Figure 7 : Dérivés alkylés et acylés en position 7 de la monensine

Des réactions d'oxydation de l'alcool secondaire ont été réalisées, suivies par diverses réactions caractéristiques des cétones telles que des réactions de type Wittig et des formations d'oximes suivies d'une réduction (Figure 8).[23]

[20] Corey E. J., Nicolaou K. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96 (17), 5614-5616.
[21] Nakamura A., Nagai S., Takahashi T., Malhan R., Murakami N., Ueda T., Sakakibara J., Asano A., *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40 (9), 2331-2337.
[22] Nagatsu A., Takahashi T., Isomura M., Nagai S., Ueda T., Murakami N., Sakakibara J., Hatano K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, 42 (11), 2269-2275.
[23] Nagatsu A., Tabunoki Y., Nagai S., Ueda T., Sakakibara J., Hidaka H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1997**, 45 (6), 966-970.



Monensine : X=OH, Y=R1=R2=H
7-oxomonensine protégée : X=Y=O, R1=Me, R2=Ac
7-carboxyméthylmonensine : X=CH_2CO_2H, Y=R1=R2=H
7-aminomonensine : X=NH_2, Y=R1=R2=H
7-oxomonensine : X=Y=O, R1=R2=H

Figure 8 : Dérivés de la monensine issus de l'oxydation de l'alcool secondaire

Ils ont également synthétisé la 25-carboxylmonensine[24], puis introduit des groupements alkyles sur la position 7.[25] En position 26, la même équipe a substitué l'alcool primaire par des groupements benzyles, benzoyles, phenylcarbamoyles et phénylaminés.[26]

Plus récemment, Huczynski et ses collaborateurs se sont aussi concentrés sur la synthèse des dérivés de la monensine et ont étudié leur structure, leur complexation avec certains ions mono- et divalents et leurs activités antibactérienne et antifongique. Ils ont surtout travaillé autour de deux familles issues de la modification de l'acide carboxylique : les esters[9,27,28,29,30] et les amides.[31,32,33] Un des amides synthétisés récemment comporte un éther couronne capable lui aussi de complexer avec le sodium.[34] Ils ont de même élaboré des uréthanes en faisant réagir l'alcool primaire de la monensine avec un isocyanate.[35] Ils ont montré que certains esters présentaient une activité antibactérienne qui est, pour le composé issu de l'estérification de la monensine avec la 4-(2-hydroxyéthyl)morpholine, très élevée. Certains amides sont, quant à eux, actifs contre les souches de bactéries gram positives.

En 2009, Mazier et ses collaborateurs publièrent un brevet concernant la prévention et le traitement des infections au plasmodium, notamment de la malaria, par la monensine ou par un de ses dérivés. Ils ont testé la 25-méthoxymonensine et une série de plusieurs carbamates en position 26, provenant de la substitution de l'alcool primaire de la monensine. Ces molécules ont donné des résultats encourageants sur l'inhibition du développement des oocystes.[36]

---

[24] Nagatsu A., Tanaka R., Hashimoto M., Mizukami H., Ogihara Y., Sakakibara J., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41 , 2629-2632.
[25] Tanaka R., Nagatsu A., Mizukami H., Ogihara Y., Sakakibara J., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 57 , 3005-3012.
[26] Tanaka R., Nagatsu A., Mizukami H., Ogihara Y., Sakakibara J., *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, 46 (6) , 711-715.
[27] Huczynski A., Przybylski P., Brzezinski B., Bartl F., *Biopolymers*, **2006**, 81, 282-294.
[28] Huczynski A., Stefanska J., Przybylski P., Brzezinski B., Bartl F., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 2585-2589.
[29] Huczynski A., Przybylski P., Brzezinski B., *Tetrahedron*, **2007**, 63, 8831-8839.
[30] Huczynski A., Lowicki D., Brzezinski B., Bartl F., *J. Mol. Struct.*, **2008**, 874, 89-100.
[31] Lowicki D., Huczynski A., Ratajczak-Sitarz M., Katrusiak A., Stefanska J., Brzezinski B., Bartl F., *J. Mol. Struct*., **2009**, 923, 53-59.
[32] Lowicki D., Huczynski A., Stefanska J., Brzezinski B., *Tetrahedron*, **2009**, 65, 7730-7740.
[33] Lowicki D., Huczynski A., Brzezinski B., Bartl F., *J. Mol. Struct.*, **2011**, 990, 121-131.
[34] Lowicki D., Huczynski A., Stefanska J., Brzezinski B., *Tetrahedron*, **2011**, 67, 1468-1478.
[35] Huczynski A., Ratajczak-Sitarz M., Stefanska J., Katrusiak A., Brzezinski B., Bartl F., *J. Antibiot.*, **2011**, 64, 249-256.
[36] Mazier D., Mahmoudi N., Farhati K., Garcia-Domenech R., Galvez J., Derouin F., Danis M., WO 2009/074649 A1, **18 juin 2009.**

I-3-2-2 Modifications envisagées

L'objectif de cette première partie de thèse était de synthétiser et d'évaluer de nouvelles familles de monensines modifiées devant être au moins aussi actives que celles existantes vis-à-vis d'*Eimeria tenella* et ne présentant pas de résistance chez les poulets. La synthèse de ces molécules se fait par hémisynthèse, c'est-à-dire par modifications de polyéthers ionophores déjà connus pour leur activité contre la coccidiose.

Les travaux envisagés à l'ICBMS ont été dédiés à la préparation et à l'évaluation biologique de nouveaux analogues semi synthétiques de la monensine. Ce projet s'est orienté au départ vers trois objectifs :

- les modifications chimiques de l'ionophore,
- l'étude des propriétés de reconnaissance et de transport ionique des nouveaux récepteurs,
- l'évaluation de leurs propriétés anticoccidiennes.

Les travaux effectués se sont majoritairement concentrés sur la modification de la monensine (Figure 9) et sur les tests *in vitro* de certains composés. Une quarantaine de dérivés a été obtenue par le biais de réactions d'amidification, de lactonisation, de *O*-alkylation ou de fluoration, ainsi que de réactions d'oxydation.

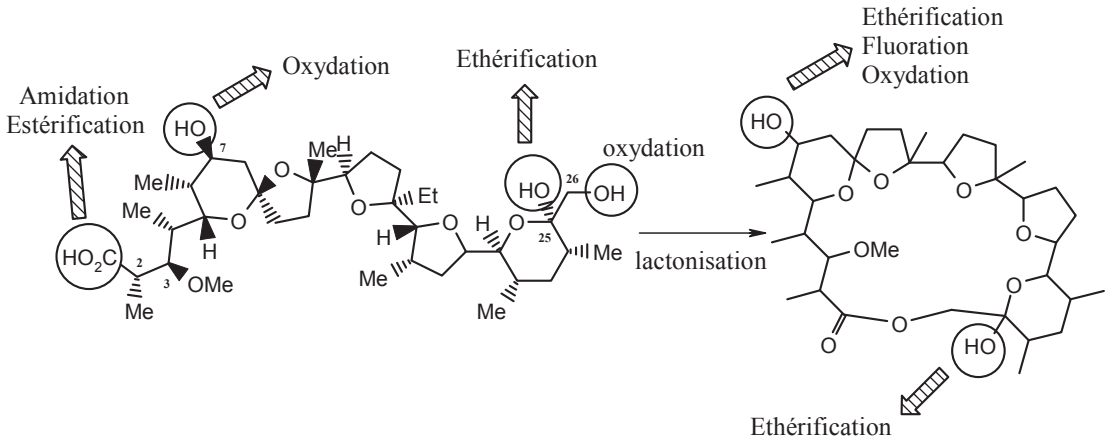


Figure 9 : Modifications envisagées de la monensine

L'efficacité antiparasitaire ainsi que les tests de cytotoxicité ont été évalués par la société MERIAL qui dispose d'un test approprié, récemment mis au point par le Dr Mimoun Maache. Ce test consiste en une culture *in vitro* des premières étapes du parasite jusqu'à la Schizogonie. L'activité des molécules est déterminée par le comptage du nombre de mérozoïtes libérés. Certains composés obtenus ont déjà montré des activités similaires à celle de la monensine.

II – Synthèse de dérivés de la monensine

II-1 Etude et caractérisation de la monensine

II-1-1 Caractérisation structurale

De manière à caractériser les produits synthétisés, nous avons étudié, dans un premier temps, la monensine par RMN (^{1}H et ^{13}C) à une dimension (1D) et à deux dimensions (2D), par spectrométrie de masse et par spectroscopie infra-rouge.

II-1-1-1 Par RMN

Différents types d'analyse par RMN 1D et 2D ont été effectués, tels que :

- RMN ^{1}H,
- RMN ^{13}C,
- COSY (*Correlation Spectroscopy*) : couplage scalaire homonucléaire ^{1}H-^{1}H,
- NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) : couplage spatial homonucléaire ^{1}H-^{1}H ,
- HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) : corrélation longue distance ^{1}H-^{13}C,
- HSQC-TOCSY (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation-Total Correlation Spectroscopy*) : couplage fort ^{1}H-^{13}C avec le proton directement lié au carbone.

Grâce à la combinaison de l'ensemble de ces analyses, chaque signal de résonance des protons et des carbones du composé a pu être attribué. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux déjà publiés par Cane[37] et Turner[38] qui n'étaient pas d'accord quant à l'attribution des carbones C11 et C19. Nos résultats valident la solution de Turner, à savoir que le signal de résonance des protons du C11 est identifié comme un système AB aux champs plus faibles que ceux du C19 également identifié comme un système AB. En effet, les protons H19 sont liés aux protons du carbone 18 qui est lui-même lié à un méthyle (C29). Alors que les protons H11 sont liés au carbone 12 portant le groupement méthyle (C32). Grâce aux spectres RMN HSQC et COSY, nous avons fait l'attribution des signaux à chaque carbone et à chaque proton en commençant par les carbones et les protons en positions 2 et 20 car leurs signaux sont très distincts des autres sur le spectre. En réalisant cette étude, nous nous sommes aperçus que le signal du carbone 19 présente un déplacement chimique inférieur à celui du carbone 11, ce qui est conforme aux résultats publiés par Turner. L'attribution des protons du sel de sodium de la monensine est la suivante (Figure 10).

[37] Cane D., Liang T. C., Hasler H., *J. Am. Chem. Soc*., **1982**, 104, 7274-7281.
[38] Ajaz A. A., Robinson J. A., Turner D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1987**, 27-36.

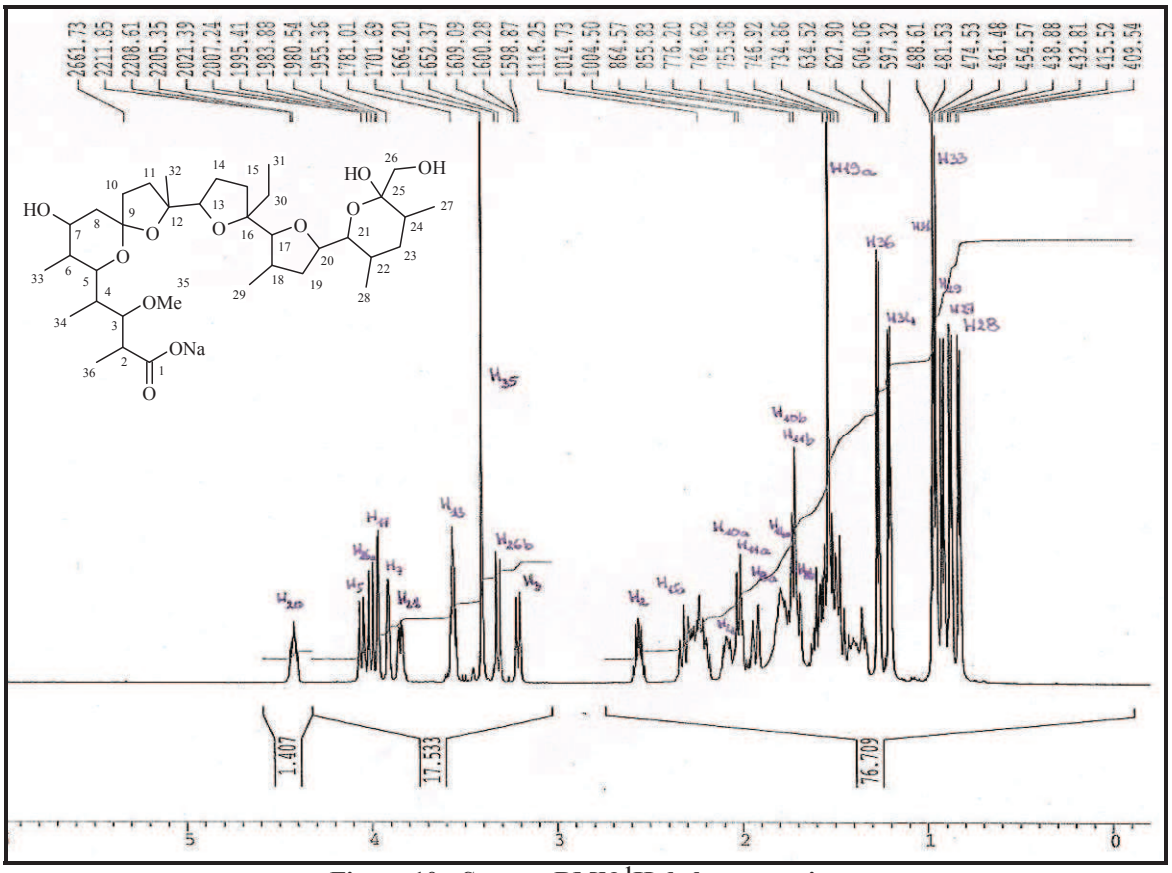


Figure 10 : Spectre RMN ^{1}H de la monensine

L'attribution des atomes de carbone correspondants est résumée dans les tableaux suivants :

Déplacement chimique (ppm)	***Carbone***
8,56	C(31)
10,84	C(33)
11,39	C(34)
14,91	C(29)
16,40	C(27)
17,04	C(36)
17,15	C(28)
27,60	C(14)
27,78	C(32)
30,16	C(15)
30,99	C(30)
32,18	C(22)
33,53	C(11)
33,59	C(19)
33,87	C(8)
34,66	C(18)
35,18	C(6)
35,97	C(23)

Déplacement chimique (ppm)	***Carbone***
36,86	C(24)
37,80	C(4)
39,57	C(10)
45,35	C(2)
58,26	C(35)
65,20	C(26)
68,68	C(5)
70,78	C(7)
74,81	C(21)
76,75	C(20)
82,86	C(13)
83,33	C(3)
85,32	C(17)
85,54	C(12)
86,16	C(16)
98,62	C(25)
107,30	C(9)
181,58	C(1)

Le spectre proton de la monensine sous forme acide est légèrement différent et présente un singulet large vers 6,05 ppm correspondant au proton de l'acide carboxylique. Dans les cas du sel de sodium de la monensine et de la monensine acide, en RMN du proton, les signaux H20, H35 et H2 sont très distincts et constituent des éléments clés pour suivre l'évolution des réactions. En RMN du carbone, le déplacement du signal du carbonyle nous renseignera sur l'avancement de la réaction, notamment lors des réactions d'amidation ou d'estérification.

II-1-1-2 Par spectrométrie de masse

Le spectre de masse de la monensine (Figure 11) montre la présence majoritaire d'adduits de sodium et l'absence d'ions moléculaires protonés.[39] Les spectres de masse du sel de sodium de la monensine et de la monensine sous forme acide sont similaires. Le sel de sodium de la monensine a une masse de 693,4 uma correspondant à l'espèce $[M+Na]^+$. Ainsi, la monensine sous forme acide piège un sodium dans la chambre d'ionisation, l'adduit de sodium est donc visible.

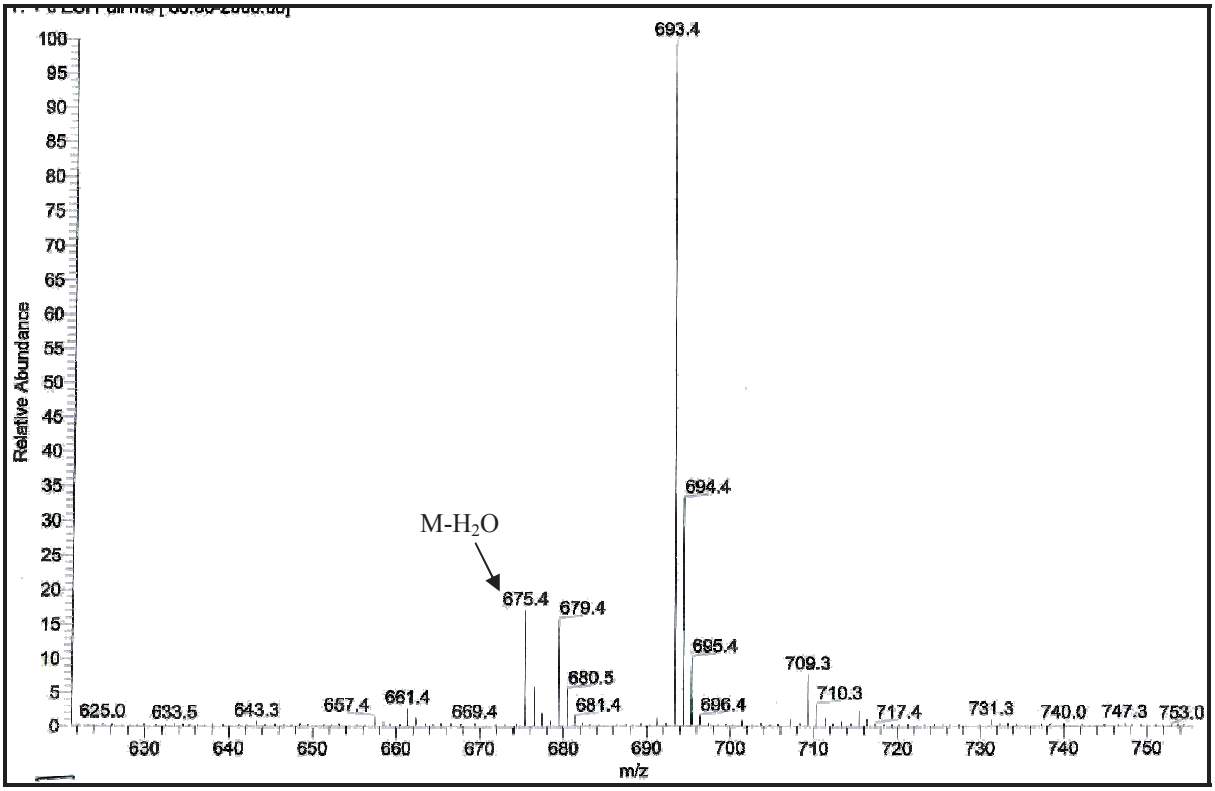


Figure 11 : Spectre de masse de la monensine

Pour chacun des dérivés de la monensine synthétisés, le spectre de masse nous indiquera majoritairement les adduits de sodium.

II-1-1-3 Par Infra-rouge

Lorsque le spectre infra-rouge du sel de sodium de la monensine est réalisé, la bande du carbonyle est identifiée à 1562,28 cm^{-1}, alors que celle du carbonyle de l'acide est à 1710,60 cm^{-1}.

[39] Song W., Huang M., Rumbeiha W., Li H., *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **2007**, 21, 1944 – 1950.

La connaissance des bandes d'absorption du carbonyle de la monensine nous permettra de confirmer ou non la formation d'amide ou d'ester, en observant le déplacement de la bande du carbonyle.

II-1-2 Etude de la solubilité

Les données sur la solubilité de la monensine dans différents solvants n'étant pas décrites, des tests de solubilité de la monensine ont été réalisés au laboratoire. Les résultats nous ont également permis de définir des solvants de réaction.

Afin de réaliser ces essais, à 20°C, 200 mg de sel de sodium de la monensine ont été mélangés à 10 mL de solvant. La solution a été agitée pendant 2h, puis filtrée sur verre fritté. Ensuite, le précipité a été séché et pesé. La différence entre la masse de produit introduit initialement et celui restant sur le fritté après filtration, nous indique la solubilité du produit, à température ambiante, dans un volume de 10 mL. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 1).

Solvant	***Solubilité (mg/mL)***	***Solubilité***
H_2O	3,3	- -
Acétone	15,1	+
Acétonitrile	7,0	-
Méthanol	20	+ + +
Acétate d'éthyle	11,9	+
Chloroforme	20	+ + +
Toluène	20	+ + +
DMSO	1,1	- - -
THF	20	+ + +
DMF	18,7	+ +

Tableau 1 : Solubilité de la monensine

Nous constatons que le sel de sodium de la monensine est soluble dans les alcools, le THF et les solvants chlorés. Les réactions pourront être réalisées dans ce type de solvants.

II-1-3 Développement d'une méthode HPLC analytique

Pour suivre l'avancement des réactions chimiques, nous avons également mis au point une technique d'analyse par chromatographie liquide haute pression couplée à un réfractomètre. En nous appuyant sur les travaux réalisés par les équipes de Gamba[40] et de Croteau[41], nous avons déterminé un solvant d'élution : méthanol/eau/acide acétique (900/100/1). Les analyses s'effectuent sous une pression de 100 bar avec un débit d'élution de 1 mL/min. La colonne utilisée est une « Alltech, Adsorbosphere C18 5u » en phase inverse, de longueur 250 mm et de diamètre interne 4,6 mm. Dans ces conditions, le sel de sodium de la monensine sort avec un temps de rétention de 10 minutes environ.

L'avantage de la détection par indice de réfraction est qu'elle ne nécessite aucune dérivatisation de la molécule avant ou après l'analyse. De plus, ce mode de détection est

[40] Dusi G., Gamba V., *J. Chromatogr. A,* **1999**, 835, 243-246.
[41] Akhtar M. H., Croteau L. G., *Analyst,* June **1996**, 121, 803-806.

caractérisé par des coefficients de réponse peu différents contrairement à la détection UV. Par contre, il est sensible à la température, au débit et à la pression. De plus, il ne peut pas être utilisé avec un gradient d'élution.

Lors de l'analyse de la monensine, nous constatons la présence de deux signaux sur le chromatogramme (Figure 12). Le signal à 9,75 min est le produit présent à 85 %, tandis que le signal à 7,75 min représente 15 % du mélange. Ce signal minoritaire est une impureté plus polaire du sel de sodium de la monensine commerciale.

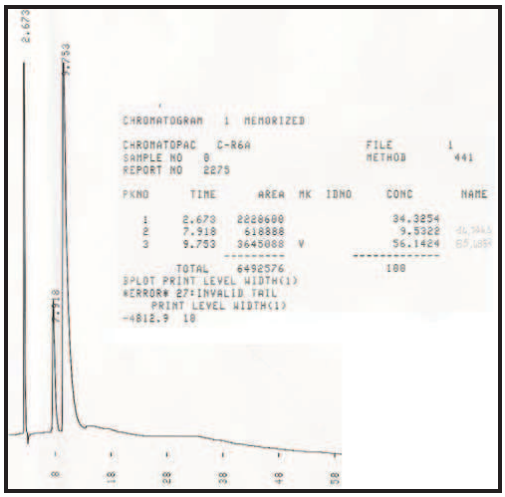


Figure 12 : Chromatogramme de la monensine

Des études plus approfondies par HPLC couplée à un spectre de masse, réalisées par le Dr Laure GUY à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, nous ont permis de déterminer la structure probable de cette impureté. Le spectre de masse montre deux pics : le premier à 679 uma et le second à 693 uma. La masse 693 correspond à la monensine couplée au sodium et celle de 679 à la monensine ayant perdu un CH_2. La structure (**1b**) peut correspondre au composé issu d'une élimination de Michaël du groupement méthoxy suivie d'une hydratation du résidu acrylique intermédiaire (Schéma 2). En effet, le signal du composé en HPLC, situé avant celui de la monensine, est dû à un produit plus polaire. La présence d'un quatrième alcool augmente la polarité de la molécule.

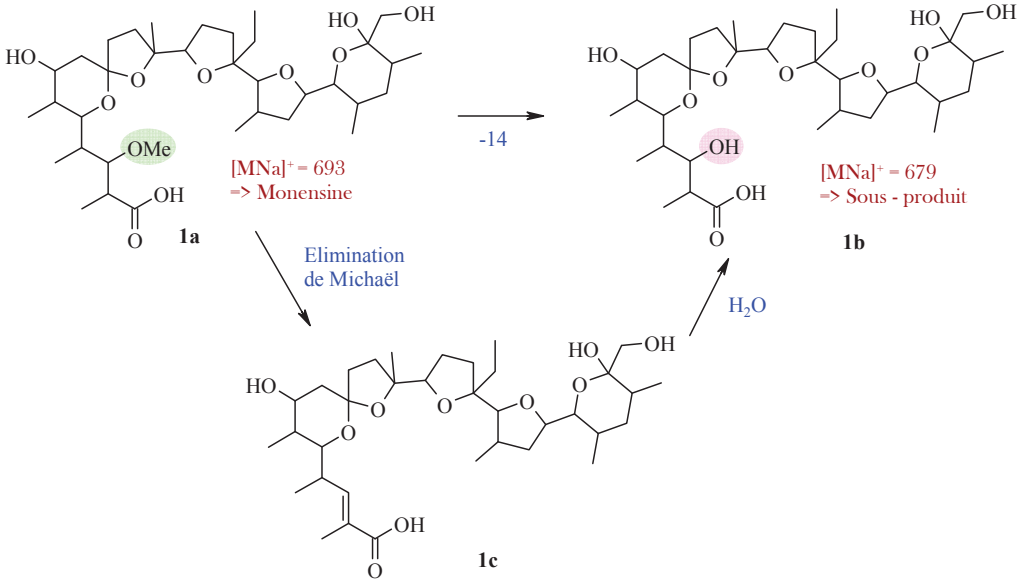


Schéma 2 : Impureté de la monensine

II-2 Modifications de la monensine

II-2-1 Augmentation de la taille de la pseudo-cavité

Les polyéthers ionophores, de part leur lipophilie et leur structure pseudo-cyclique, ont la propriété de complexer et de transporter les cations à travers la membrane cellulaire. En effet, ils sont capables de capturer un atome de sodium, ou de potassium, grâce à l'établissement d'interactions électrostatiques entre le cation et les six atomes d'oxygène et grâce à la formation de liaisons hydrogène entre l'acide carboxylique et les deux alcools terminaux.[42, 43] L'adéquation entre la taille du sodium et celle de la cavité du récepteur peut s'expliquer par la fermeture du cycle due à la formation de ces liaisons hydrogène. Une absence de liaisons hydrogène entraîne une perte d'activité du polyéther.

C'est donc pour conserver et/ou pour renforcer ces liaisons hydrogène que nous nous sommes intéressés aux réactions d'amidation de l'acide carboxylique avec des amines possédant un acide carboxylique, protégé ou non sous forme ester (Figure 13). D'autre part, ces réactions nous ont permis d'augmenter la lipophilie de la molécule. Rappelons que le logP[44] de la monensine sodium est de 4,43 (calculé avec le logiciel NewLogP calculator). La monensine respecte la règle des cinq de Lipinski (pas plus de cinq liaisons hydrogène donneur, pas plus de 10 liaisons hydrogène accepteur, une masse molaire inférieure à 500 Da et un logP < 5). Sakakibara et ses collaborateurs ont montré qu'une augmentation de la lipophilie entraîne généralement une augmentation de l'activité. Il existe donc une corrélation entre la perméabilité des ions sodium au travers de la membrane et la lipophilie, de même qu'entre la lipophilie et l'activité biologique.[21]

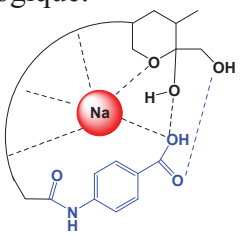


Figure 13 : Formation d'un pseudo-macrocycle

Nous avons testé, dans un premier temps, des amines aromatiques substituées par un groupe ester. Puis, dans un second temps, nous avons utilisé des acides aminés et une amine fluorée.

II-2-1-1 Réactions d'amidation

II-2-1-1-a Bibliographie

Les réactions d'amidation sont des réactions de couplage entre un acide carboxylique et une amine.[45] Pour être réactif, l'acide carboxylique nécessite d'être activé. Il existe différentes méthodes d'activation utilisant des bases, des carbodiimides, des phosphoniums, des uroniums, des immoniums, des imidazoliums ou des organophosphorés.

---

[42] Duax W. L., Smith G. D., Strong P. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 6725-6729.
[43] Huczynski A., Ratajczak-Sitarz M., Katrusiak A., Brzezinski B., *J. Mol. Struct.*, **2007**, 832, 84-89.
[44] LogP : mesure de solubilité différentielle de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau (logP = $\log(C_{oct}/C_{eau})$
[45] Han S.-Y., Kim Y.-A., *Tetrahedron*, **2004**, 60, 2447-2467.

Sakakibara et ses collaborateurs[12] avaient déjà travaillé sur la condensation de la monensine avec des acides aminés *O*-benzylés, suivie d'une débenzylation pour obtenir l'acide monensylaminé correspondant. Différents acides aminés benzylés ont été testés tels que la glycine, l'alanine, la sérine, la phénylalanine, la tyrosine, l'acide aspartique benzylé et l'acide glutamique benzylé (Schéma 3). Ces réactions d'amidation ont été effectuées en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt) en tant qu'agent de couplage dans le THF à 5°C.

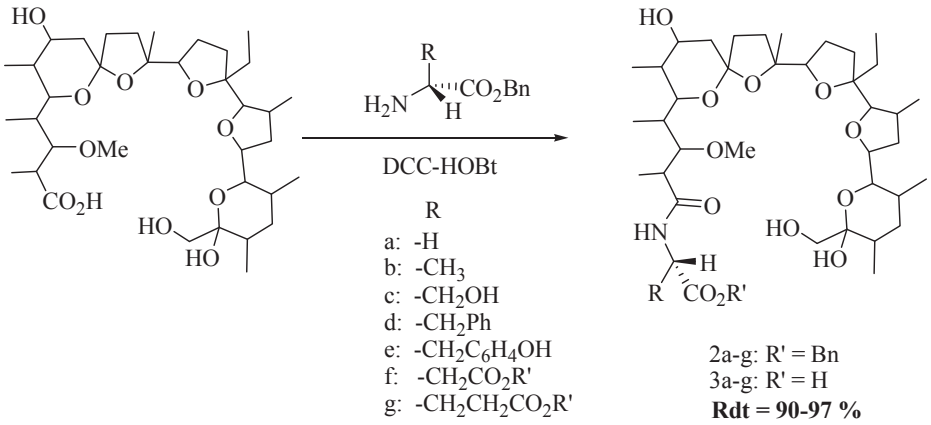


Schéma 3 : Réactions d'amidation réalisées par Sakakibara et al.

Ces acides monensylaminés ne conduisent pas à de nouvelles structures à propriétés anticoccidiennes. Cela peut s'expliquer par le fait que la structure acide aminé ne favorise pas l'établissement de liaisons hydrogène et donc la formation d'une cavité permettant le transport d'ions. En effet, le déplacement de la fonction COOH due à la présence de l'acide aminé à une extrémité de la molécule entraîne un changement de conformation du complexe. La nouvelle liaison hydrogène se fait entre l'oxygène de l'alcool primaire et celui du groupement méthoxy et non plus avec l'acide carboxylique terminal.

II-2-1-1-b Synthèse d'amides

Dans notre démarche, les réactions d'amidation ont été réalisées à partir de la monensine sous forme acide **1a**. Cette dernière a été préparée par précipitation du sel de sodium de la monensine **1** dans le chloroforme par ajout d'acide perchlorique, suivant le protocole décrit par Colombatti et ses collaborateurs[46] (Schéma 4).

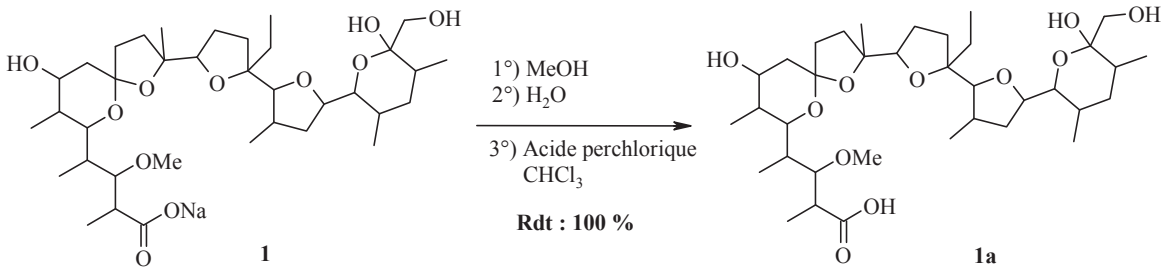


Schéma 4 : Préparation de la monensine acide

[46] Dosio F., Francesi A., Ceruti M., Brusa P., Cattel L., Colombatti M., *Biochem. Pharmacol.*, **1996**, 52, 157-166.

La monensine acide **1a** a été obtenue de façon quantitative. Le spectre infra-rouge de la monensine acide présente une bande C=O vers 1710 cm^{-1} alors que le sel de sodium de la monensine a une bande à 1562 cm^{-1}. Sur le spectre RMN ^1H, un large signal à 6 ppm apparaît avec la forme acide.

Diverses amines telles que des dérivés de l'aniline, des dérivés de la benzylamine, des acides aminés et une amine fluorée ont été testées (Schéma 5).

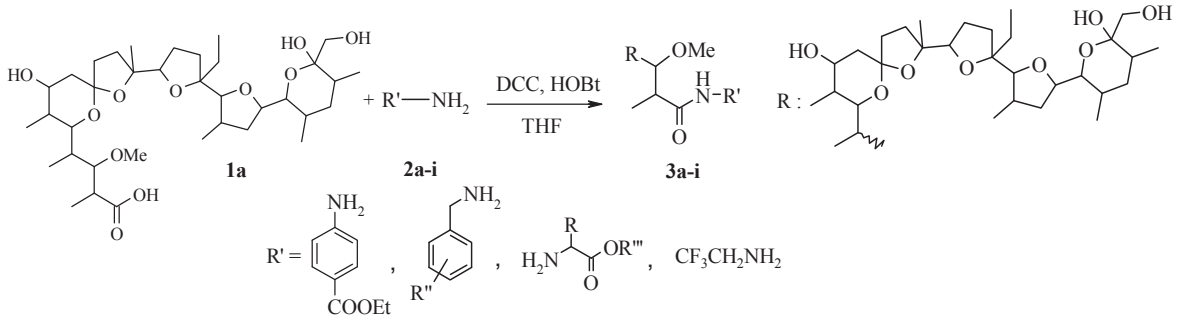
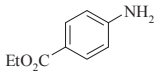
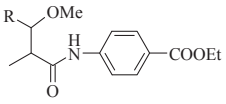
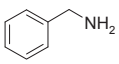
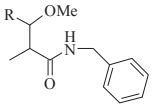
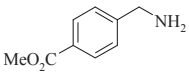
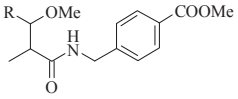
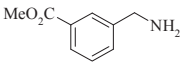
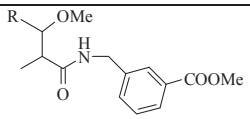
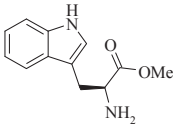
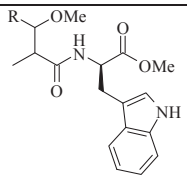
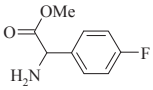
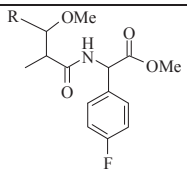
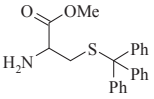
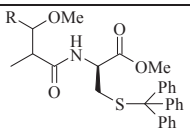
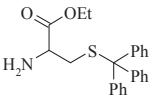
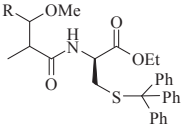
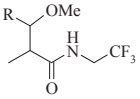


Schéma 5 : Réactions d'amidation

Les résultats obtenus avec les différentes amines sont rassemblés dans le tableau 2 suivant.

Entrée	*Amine*		*Produit*		*Rendement isolé*	*LogP**
1		**2a**		**3a**	3%	5,19
2		**2b**		**3b**	73%	5,96
3		**2c**		**3c**	94%	5,96
4		**2d**		**3d**	90%	6,39
5		**2e**		**3e**	93%	6,18
6		**2f**		**3f**	84%	5,79
7		**2g**		**3g**	93%	9,71
8		**2h**		**3h**	67%	10,06
9	$CF_3CH_2NH_2$	**2i**		**3i**	18%	5,62

* Log P calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 2 : Résultats des réactions d'amidation

Afin de réaliser la réaction d'amidation en présence de 4-aminobenzoate d'éthyle **2a** (entrée 1), différents agents de couplage (Figure 14) ont été testés (FDPP/DIEA, DCC/HOBt, EDCI, réactif de Ghosez). De plus, des études de solvant et de stœchiométrie ont été faites.

L'association FDPP (pentafluorophényl diphényl phosphinate)/DIEA (diisopropyléthylamine) et le réactif de Ghosez ne conduisent pas à la formation de l'amide attendu quelque soit le solvant ou la quantité d'amine introduite.

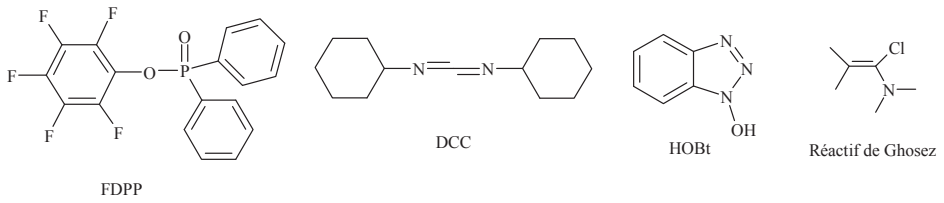


Figure 14 : Agents de couplage testés

Des résultats pas plus satisfaisants ont été obtenus avec l'association DCC (1,2 eq) / HOBt (1,2 eq). En effet, l'amide **2a** (entrée 1) a été isolé avec un rendement de 3%, le taux de conversion ne dépassant pas 20%. Lors de la réaction, une lactonisation de la monensine se produit, le composé résultant étant obtenu avec 6 % de rendement.

Plus que l'inefficacité des systèmes d'activation, la difficulté de la réaction peut s'expliquer par la faible nucléophilie de l'aniline. Pour cette raison, des amines plus nucléophiles ont été testées telles que des benzylamines et des acides aminés.

La benzylamine **2b** (entrée 2) a été testée dans les conditions décrites par Sakakibara.[12] La réaction donne un taux de conversion de 100%. Le produit **3b** est isolé par simple extraction avec un rendement de 28%. Par la suite, nous avons réalisé la réaction avec deux benzylamines substituées respectivement par un groupement ester en position *para* **2c** et en position *méta* **2d**. Une conversion complète a été observée dans les deux cas avec des rendements très satisfaisants de 94 et 90% (entrées 3 et 4) après une purification par extraction. Pour ces trois composés, le spectre RMN ^{13}C comporte un signal à 176 ppm, caractéristique du carbonyle d'un amide.

Pour diversifier les amides à tester, nous avons réalisé des réactions d'amidation avec des acides aminés variés **2e-2h** (entrées 5 à 8), différents de ceux déjà étudiés par Sakakibara. Trois acides aminés ont été sélectionnés parmi lesquels la fluorophenylalanine est intéressante car elle possède un atome de fluor. Le tryptophane et la cystéine permettent l'introduction d'un hétéroatome : l'azote et le soufre. Pour chaque acide aminé, une protection de la fonction acide carboxylique est nécessaire, effectuée dans un mélange $SOCl_2$/MeOH (ou EtOH).[47,48] En présence du tryptophane **2e**, de la fluorophénylalanine **2f** et de la cystéine **2g**, de très bons rendements ont été obtenus de 84 à 93%. Avec la cystéine éthylée **2h**, un rendement plus faible de 67% est observé.

La trifluoroéthanamine **2i** a été utilisée. La conversion de la monensine est totale au bout de trois jours, mais deux produits majoritaires sont formés, nécessitant une purification sur colonne pour isoler l'amide recherché **3i** (entrée 9). Ceci explique le rendement obtenu de 18% plus faible que ceux des autres amides. De plus, le second produit formé n'a pas pu être isolé, il semble s'être dégradé sur la silice lors de la séparation.

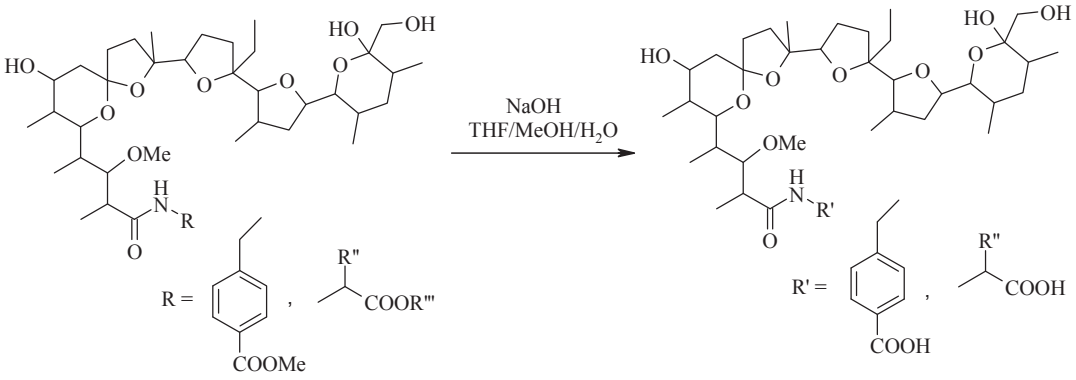
L'ensemble de ces réactions nous a permis de synthétiser neuf amides différents dont certains ont été testés *in vitro* sur des cellules bovines chez Mérial. Les résultats des tests seront développés dans la partie III du premier chapitre.

[47] Kawakubo H., Takagi S., Yamaura Y., Katoh S., Ishimoto Y.,Nagatani T., Mochizuki D., Kamata T., Sasaki Y., *J. Med. Chem*., **1993**, 36, 3526–3532.
[48] Pascal R., Sola R., Labéguère F., Jouin P., *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 3755–3761.

II-2-1-2 Réactions de saponification

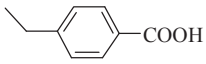
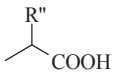
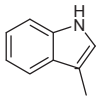
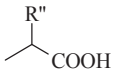
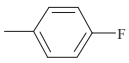
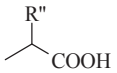
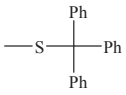
Les nouveaux amides synthétisés, possédant un groupement ester en position terminale (**3c**, **3e**, **3f**, **3g** et **3h**), ont été saponifiés afin de vérifier le rôle des interactions hydrogènes potentielles sur l'activité des nouvelles molécules.

Les saponifications (Schéma 6) ont été réalisées dans un mélange THF/Méthanol/eau distillée (2/2/1), puis par addition lente de NaOH (1N). La réaction se fait à température ambiante pendant six heures. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 3.



3c, 3e-3h **4a-d**

Schéma 6 : Saponification des amides estérifiés

Entrée	*Amide*	*R'*	*R''*	*Rendement isolé*	*LogP**
1	**4a**		-	57%	5,62
2	**4b**			92%	6,03
3	**4c**			14%	5.79
4	**4d**			0% Obtention de [M-CH_2]	9.56

* Log P calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 3 : Résultats des réactions de saponification

Les réactions de saponification sur les amides présentent quelques difficultés. En effet, la conversion n'est pas toujours totale, notamment avec les dérivés de la phénylalanine fluorée **4c** et de la cystéine tritylée **4d**. L'amide **4c** a été obtenu avec un faible rendement après séparation sur colonne chromatographique. Par contre, l'amide **4d** issu de la saponification de la cystéine tritylée n'a pas été obtenu. Le produit formé semble être l'acide carboxylique déméthylé. Une perte de CH_2 s'est probablement produite lors de la réaction, suivant le même schéma réactionnel que celui décrit dans la partie II-1-3 (élimination de Michaël puis hydratation).

II-2-2 Lactonisation

II-2-2-1 Bibliographie

Corey et ses collaborateurs ont réalisé en 1975 la lactonisation de la monensine acide dans des conditions neutres et aprotiques.[49] Ils ont utilisé le disulfure de 2,2'-dipyridinyle (2,5 équivalents) et la triphénylphosphine (2,5 équivalents) dans le benzène à reflux pendant 17 heures (Schéma 7).

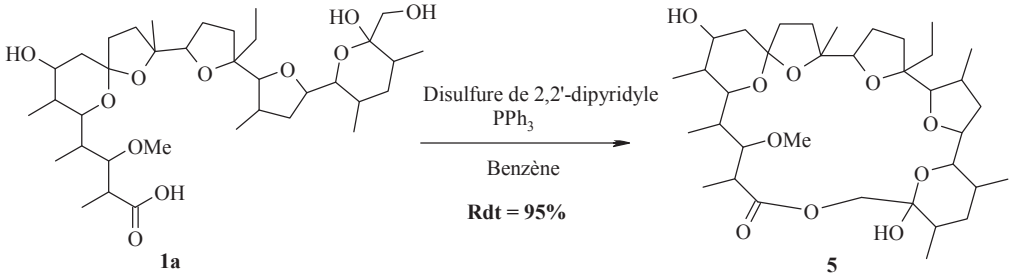


Schéma 7 : Lactonisation de la monensine par Corey

Ils obtiennent une huile incolore soluble dans tous les solvants organiques classiques.

II-2-2-2 Réactions testées

II-2-2-2-a Lactonisation de la monensine

Nous avons reproduit les conditions de lactonisation décrites par Corey. Après 60 heures sous agitation à 80°C dans le toluène, la conversion est totale. La purification nécessite une extraction liquide-liquide suivie de deux colonnes flash sur silice. En effet, la réaction de lactonisation en présence de 2,2'-dipyridinyl disulfide et de triphénylphosphine génère deux sous-produits difficiles à éliminer : l'oxyde de triphénylphosphine et la pyridinethione (Schéma 8).

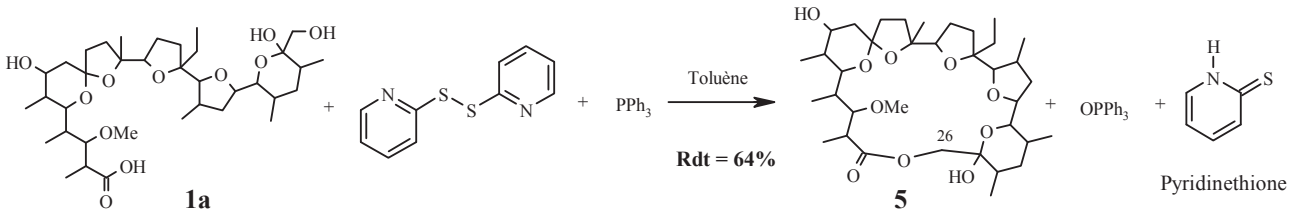


Schéma 8 : Lactonisation de la monensine

Après purification, une mousse blanche est obtenue avec un rendement de 64%. La présence de la lactone est révélée en RMN ^{1}H par deux doublets (δ = 3,67 ppm et δ =4,42 ppm) ayant une constante de couplage de 11,3 Hz. Ces derniers correspondent aux protons H_{26} du groupement méthylène situés entre la fonction ester et l'alcool tertiaire.

Afin de simplifier la purification et de pouvoir synthétiser la lactone en quantité plus importante, nous avons testé une autre méthode de lactonisation des macrocycles. Boden et Keck[50] utilisent le dicyclohexylcarbodiimide en présence de la diméthylaminopyridine et du

[49] Corey E. J., Nicolaou K. C., Melvin L. S. Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97 (3), 653-654.
[50] Boden E. P., Keck G. E., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2394-2395.

chlorhydrate de diméthylaminopyridine pour former des macrocycles à seize chaînons (Schéma 9).

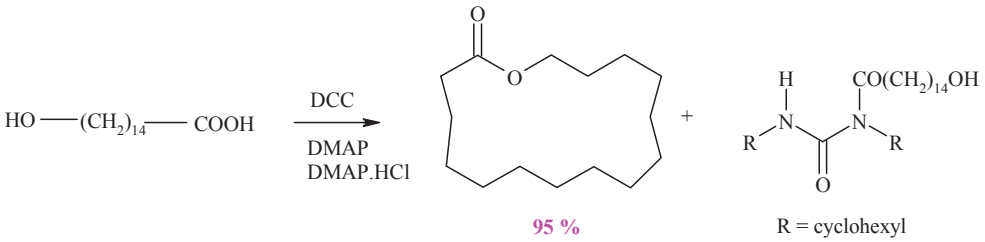


Schéma 9 : Lactonisation de Boden et Keck

Cette méthode de lactonisation a été testée sur la monensine acide **1a**. Après 15 heures sous agitation au reflux du chloroforme suivie d'une extraction liquide-liquide, une mousse blanche est obtenue avec 80% de rendement. Le spectre RMN ^{1}H est identique à celui obtenu par la lactonisation de Corey. La spectrométrie de masse nous indique la présence de dimères en faible quantité. En revanche, le chromatogramme en HPLC montre un seul pic à environ 15 minutes d'élution et correspondant à la lactone **5**. Bien que nous ne l'ayons pas confirmé, le dimère, observé en masse, est probablement un adduit généré lors de l'analyse.

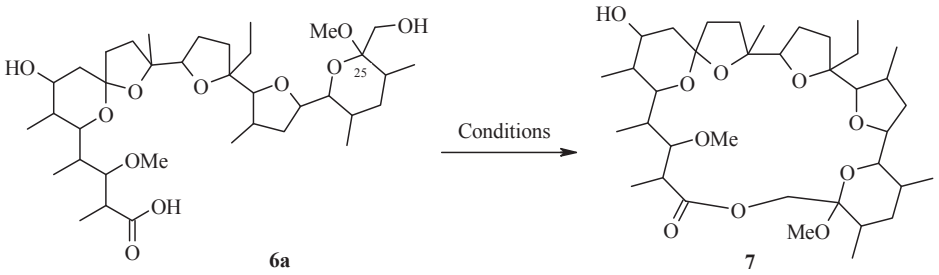
Le tableau 4 rassemble les résultats obtenus avec les deux méthodes de lactonisation. Il montre que la méthode de lactonisation de Boden et Keck est la plus efficace de part le rendement élevé obtenu et de part la simplicité de purification demandée.

Entrée	***Conditions***	***Temps de Reaction***	***Rendement isolé***	***Purification***
1	2,2'-dipyridinyl disulfure, PPh_3	67h	64%	2 colonnes
2	DCC, DMAP, DMAP.HCl	15h	80%	Extraction

Tableau 4 : Comparaison des deux méthodes de lactonisation

II-2-2-2-b Lactonisation de la monensine méthylée en C25

La monensine a été méthylée en position 25 pour former le composé **6a**. La réaction de méthylation sera détaillée dans la partie suivante (II-2-3). Les conditions de lactonisation ont été testées sur cette molécule afin d'obtenir une lactone mono-éthérifiée en position 25.



6a **7**

Entrée	***Conditions***	***Temps de réaction***	***Rendement***	***Analyses***	***LogP****
1	2,2'-dipyridinyl disulfure, PPh_3	5 jours	-	Produit de départ	-
2	DCC, DMAP, DMAP.HCl	18h	90%	MS : 689,6 ($[MNa]^+$)	6,12

* Log P calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Schéma 10 : Lactonisation de la monensine méthylée

Les deux méthodes précédentes de lactonisation ont été testées sur la monensine méthylée **6a** (Schéma 10). Seules les conditions dérivées de celles de Boden et Keck[50] (entrée 2) permettent d'obtenir le produit attendu, à savoir la lactone méthylée **7** avec un rendement satisfaisant de 90%.

II-2-3 Réactions d'éthérification

II-2-3-1 Ethérification de la monensine

II-2-3-1-a Avec NaH

Dans un premier temps, nous avons cherché à benzyler la monensine par réaction de Williamson. Sakakibara et ses collaborateurs avaient d'ores et déjà benzylé la monensine avec du NaH et du bromure de benzyle, mais, la molécule avait été préalablement protégée au niveau de l'acide carboxylique et des alcools primaire et tertiaire.[22]

La benzylation a été effectuée sur le sel de sodium de la monensine en présence de bromure de benzyle, d'hydrure de sodium et d'iodure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane à température ambiante (Schéma 11). Après 98h d'agitation, la conversion est totale.

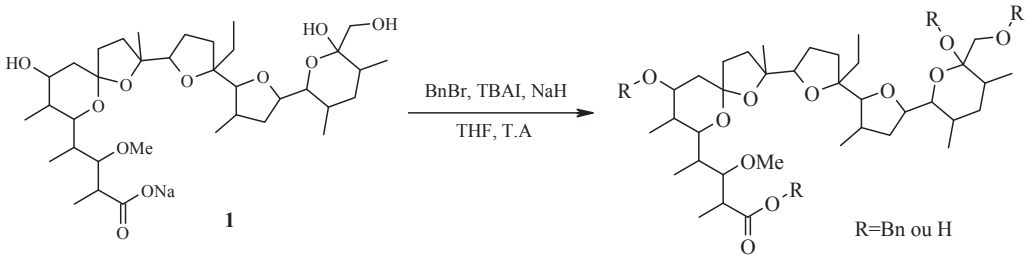


Schéma 11 : Benzylation de la monensine sel de sodium

L'analyse par spectrométrie de masse indique la présence d'un mélange de monensine di-, tri-, tétra- et pentabenzylée. Les conditions utilisées ne sont donc pas du tout sélectives. Seul le produit dibenzylé a pu être isolé, les autres présentent des rapports frontaux trop proches pour permettre leur séparation.

II-2-3-1-b Avec LiBr, nBu_4NBr

Sakakibara et ses collaborateurs utilisent également le système LiBr / nBu$_4$NBr dans le méthanol afin de protéger sélectivement l'alcool tertiaire de la monensine avec 75% de rendement[23] (Schéma 12). Le mécanisme de cette réaction passe par l'intermédiaire d'un carbocation et par la libération de lithine. Le bromure de tétrabutylammonium sert d'agent de transfert de phase pour les bromures.

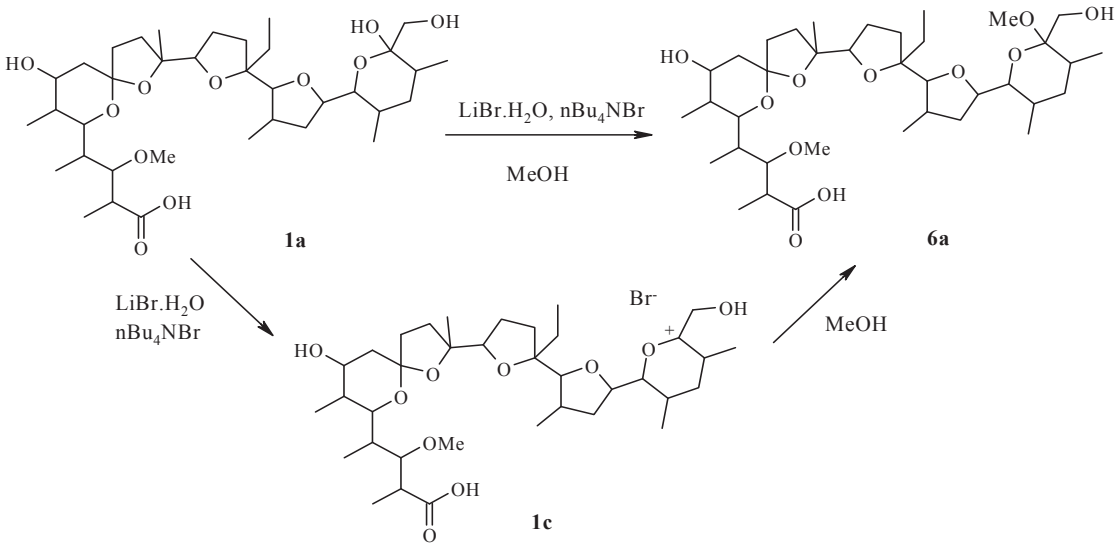


Schéma 12 : Méthylation de la monensine en C25

Nous avons reproduit ces conditions et obtenu le produit désiré avec 75% de rendement. La nouvelle molécule possède un logP calculé de 5,47, supérieur à celui de la monensine de 4,82.

Ensuite, nous avons réalisé la même réaction en faisant varier les alcools. Le glycérol et l'acide glycolique ont été testés, de même que divers alcools : éthanol, propanol, glycidol, méthoxyéthanol, trifluoroéthanol et le glycolate de méthyle. Cette méthodologie a également été testée avec un anhydride.

a) Alcools simples

Les premiers alcools utilisés ne présentent pas d'autres groupes fonctionnels réactifs. Certaines réactions ont nécessité un chauffage à 40°C pour améliorer la conversion. Cependant, dans chacun des cas, une conversion partielle de la monensine est observée. La purification des produits (**6a-f**) s'effectue sur colonne chromatographique de silice. Les synthèses réalisées sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 5).

Entrée	*Ether*	*Alcools*	*Rendement isolé*	*LogP**
1	**6a**	MeOH	75%	5,47
2	**6b**	EtOH	40%	5,82
3	**6c**	PrOH	17%	6,34
4	**6d**	$CH_3OCH_2CH_2OH$	52%	5,41
5	**6e**	CF_3CH_2OH	11%	6,41
6	**6f**	Glycidol	18%	5,30

* LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 5 : Monensine éthérifiée en C25 par des alcools

D'une façon générale, les rendements isolés obtenus avec les alcools autres que le méthanol, sont plus faibles. Ce résultat est probablement dû à leur encombrement stérique.

En présence d'éthanol et de propanol, les composés désirés, **6b** et **6c**, sont synthétisés avec des rendements respectifs de 40 et 17% (entrées 2 et 3). Nous constatons donc que plus

la longueur de la chaîne de carbone augmente, plus la réaction est lente et difficile. Lorsque la réaction est réalisée en présence de méthoxyéthanol et de trifluoroéthanol (entrées 4 et 5), les produits, **6d** et **6e**, sont isolés avec 52% et 11% de rendement. Avec le glycidol (entrée 6), ce dernier reste faible de 18%.

L'ensemble des éthers de « première génération » a été analysé par RMN ^{1}H, ^{13}C et DEPT, de même qu'en spectrométrie de masse haute résolution.

b) Glycolate de méthyle

Lors de la réaction en présence du méthyle glycolate, le produit obtenu n'est pas celui attendu. En effet, nous obtenons le produit de cyclisation, la monensine oxodioxane (**6g**).

Selon toute vraisemblance, au cours de la synthèse (Schéma 13), une première étape d'éthérification se produit *via* la formation d'un intermédiaire carbocation, puis une seconde étape de transestérification conduit à une lactone à six membres.

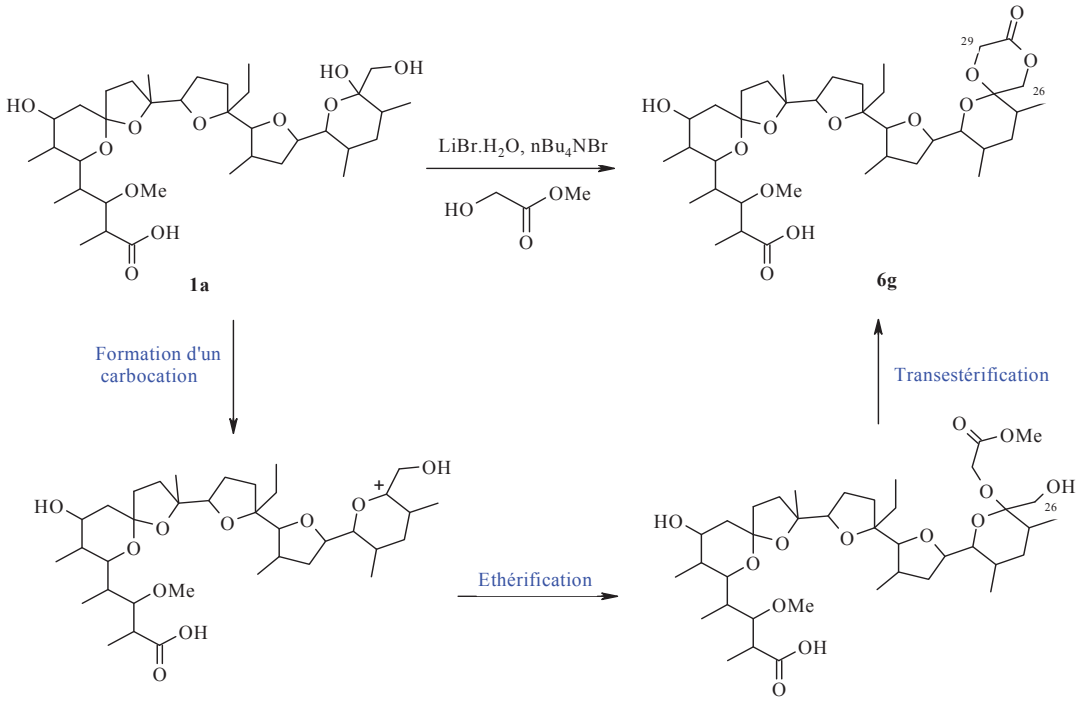


Schéma 13 : Formation de la monensine oxodioxane

Ce nouveau produit a été analysé par RMN ^{1}H, ^{13}C et DEPT, de même qu'en spectrométrie de masse haute résolution. Le spectre de la RMN ^{1}H présente quatre doublets caractéristiques. A 4,47 ppm et à 4,09 ppm sont présents deux doublets ayant une constante de couplage de 11,3 Hz. Cette constante est caractéristique de deux gem-protons (C26) se situant entre un ester et un carbone spiranique. De plus, nous observons à 4,38 ppm et à 4,26 ppm la présence de deux doublets ayant des constantes de couplage respectives de 16,9 Hz et de 17,1 Hz. Ces fortes constantes de couplage correspondent aux gem-protons (C29) situés entre le carbonyle et l'oxygène du carbone spiranique.

Le produit **6g** a été obtenu avec un rendement de 40% et présente un logP calculé de 5,60. Cette nouvelle structure est intéressante car elle permet de protéger simultanément les alcools primaire et tertiaire de la monensine. Sa réactivité sera abordée dans une partie suivante (II-3).

c) Anhydride acétique

Nous avons testé l'acétylation de la monensine en présence de LiBr et de nBu$_4$NBr dans l'anhydride acétique (Schéma 14).

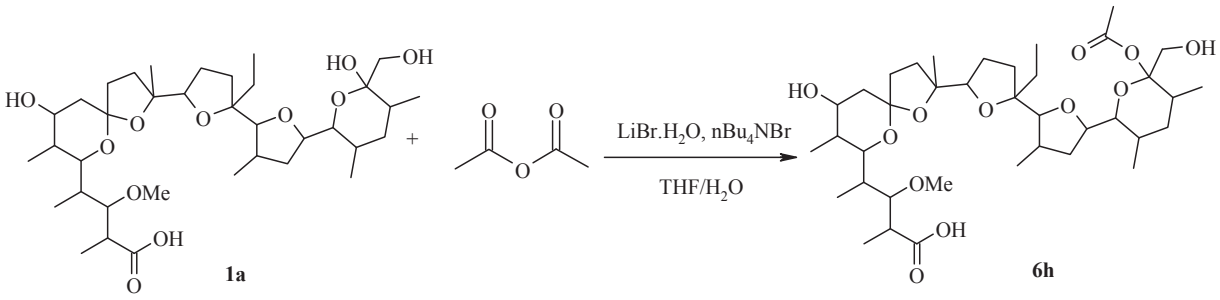


Schéma 14 : Acétylation de la monensine

Le produit **6h** a été obtenu après trois jours d'agitation, puis isolé sur colonne chromatographique. La séparation a été difficile car un des produits secondaires est difficilement séparable du produit **6h**. Ce dernier a été obtenu avec un rendement isolé de 17% et présente un logP calculé de 5,26.

II-2-3-2 Ethérification de la lactone

II-2-3-2-a Tosylation et mésylation

Dans le but d'avoir une lactone possédant des bons groupements partants en position 7, des réactions de tosylation et de mésylation ont été effectuées, malheureusement sans succès (Schéma 15).

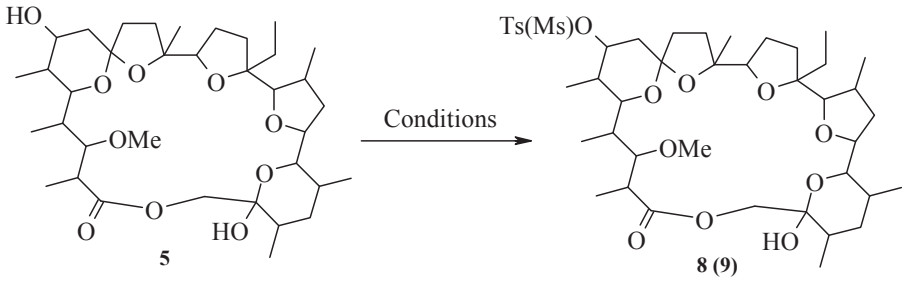


Schéma 15 : Tosylation / Mésylation de la lactone

Plusieurs conditions de tosylation ont été essayées (Tableau 6), sans succès.

Entrée	***Conditions***	***Solvant***
1	TsCl, t.a.	Toluène anhydre (0,05 g/mL)
2	TsCl/pyridine, t.a.	Toluène anhydre (0,05 g/mL)
3	TsCl/ Et_3N, DMAP, t.a.	DCM anhydre (0,05 g/mL)
4	TsCl/ Et_3N, DMAP, t.a.	DCM anhydre (0,17 g/mL)
5	TsCl, t.a.	Pyridine
6	TsCl/pyridne, t.a.	Toluène anhydre (0.2 g/mL)
7	TsCl/NaOH, H_2O, t.a.	THF (0,05 g/mL)
8	TsCl/$BF_3.Et_2O$, t.a.	DCM anhydre (0,2 g/mL)

Tableau 6 : Conditions de tosylation

Pour chacun de ces essais, aucune conversion n'a été observée. De façon surprenante, l'alcool secondaire de la lactone ne semble pas réagir avec le chlorure de tosyle, contrairement à l'alcool primaire de la monensine. L'équipe de Delort[17] a réalisé la tosylation de l'alcool primaire de la monensine sans qu'elle ne soit protégée préalablement.

Toutes les réactions de mésylation (Tableau 7) ont échoué. Celles réalisées en présence de DMAP dans la pyridine (entrées 3 et 4) montrent que la lactone a été entièrement consommée. Mais, l'analyse en masse indique que les produits formés sont différents de celui attendu. Ils ont une masse de 689,5 et de 704,5 et leur structure n'a pas été déterminée. Les produits n'ont pas été isolés et les synthèses arrêtées.

Entrée	***Conditions***	***Solvant***
1	MsCl (1,2 eq), Pyr (3vol), t.a	Toluène (1 g/mL)
2	MsCl (10 eq), NaH (10eq), t.a	Toluène (0,33 g/mL)
3	MsCl (97eq), DMAP (0,15), t.a	Pyridine (0,03 g/mL)
4	MsCl (97eq), DMAP (0,15), -10°C-> t.a	Pyridine (0,03 g/mL)
5	MsCl/NaOH, H_2O, t.a	THF (0,05 g/mL)
6	MsCl (20eq), -10°C-> t.a	Pyridine (0,03 g/mL)

Tableau 7 : Conditions de mésylation

II-2-3-2-b Méthylation

Pour augmenter la lipophilie de la lactone, des réactions de *O*-méthylation de la lactone ont été réalisées (Tableau 8).

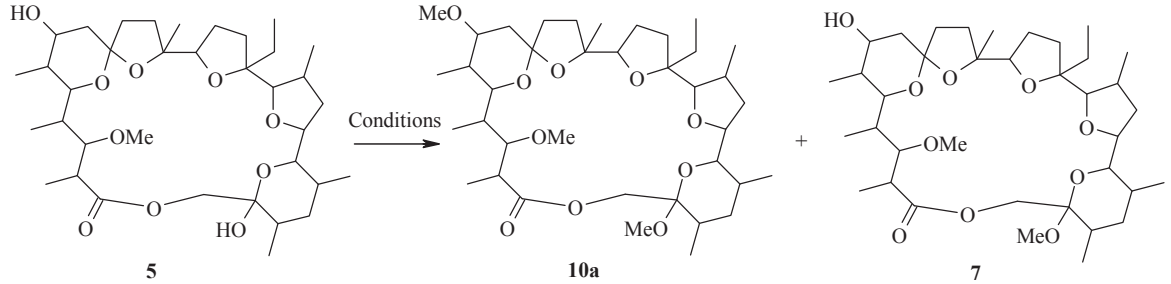
Dans un premier temps, nous avons testé les mêmes conditions que celles utilisées par Sakakibara[23] lors de la méthylation de la monensine **1a**. Mais, la lactone **5** n'est pas réactive vis-à-vis de LiBr et nBu$_4$NBr (entrée 1). Ensuite, nous avons décidé d'utiliser des conditions plus classiques de méthylation telles que HCl/méthanol (entrée 2) et MeI/tBuOK (entrée 3). Aucune de ces expériences n'a donné de résultats satisfaisants.

Nous avons poursuivi nos expériences en testant d'autres conditions telles qu'APTS/méthanol (entrée 4), Me_2SO_4/K_2CO_3 (entrées 5 et 6) et $BF_3.Et_2O$/MeOH (entrées 7 à 9). Dans les deux dernières conditions citées, le produit attendu (la lactone monométhylée) est détecté par spectrométrie de masse, mais de nombreux sous-produits sont également présents. Avec APTS/méthanol, le produit attendu n'est pas identifié.

Entrée	*Conditions*	*Solvant*	*Produits*
1	LiBr, nBu_4NBr, t.a	MeOH (0,05 g/mL)	Lactone initiale
2	HCl (1N), t.a	MeOH (0,05 g/mL)	Lactone initiale
3	MeI, tBuOK, t.a	THF anhydre (0,05 g/mL)	Lactone initiale
4	APTS	MeOH (0,02 g/mL)	Sous-produits
5	Me_2SO_4(2.2 eq), K_2CO_3(2.2 eq), t.a	Acetone (0,20 g/mL)	Produit en mélange
6	Me_2SO_4 (1eq), K_2CO_3 (1eq), t.a	Acetone anhydre (0,20 g/mL)	Produit en mélange
7	$BF_3.Et_2O$ (-10°C -> t.a.)	MeOH (0,01 g/mL)	Produit en mélange
8	$BF_3.Et_2O$ (-78°C)	MeOH (0,01 g/mL)	Lactone initiale
9	$BF_3.Et_2O$ (-78°C -> t.a)	MeOH (0,01 g/mL)	Produit en mélange, mais isolé à 40%

Tableau 8 : Conditions de méthylation

Dans les conditions $BF_3.Et_2O$/MeOH, une étude de l'influence de la température a été réalisée (entrées 7 à 9). Nous constatons que lorsque le $BF_3.Et_2O$ est introduit à -10°C et que le milieu est ensuite agité à température ambiante, la réaction n'est pas sélective. Un grand nombre de produits est détecté. Par contre, lorsque la réaction est effectuée à -78°C, aucune transformation n'est observée. La lactone initiale est obtenue. Lorsque le $BF_3.Et_2O$ est additionné à -78°C et qu'ensuite la réaction est laissée à température ambiante, un produit est formé de façon majoritaire. Ce produit **10a** a été isolé avec un rendement de 40% et correspond à la lactone diméthylée (Schéma 16).

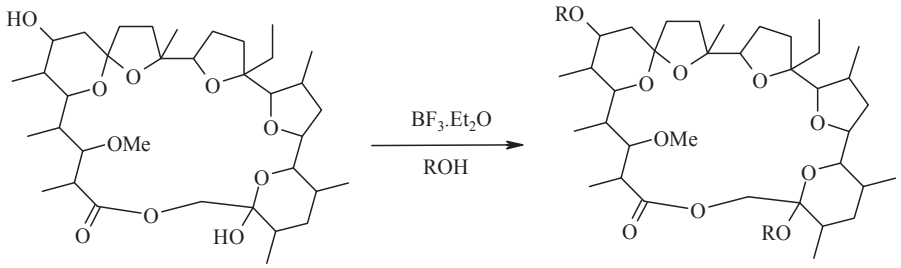


5 **10a** **7**

Schéma 16: Méthylation de la lactone

II-2-3-2-c Ethérification avec $BF_3.Et_2O$

Suite aux résultats obtenus précédemment avec $BF_3.Et_2O$ en présence de méthanol, nous avons voulu élargir la famille de lactone diéthérifiée en faisant varier les alcools et, ainsi, augmenter la lipophilie de cette dernière (Schéma 17).



5 **10 a-e**

Schéma 17 : Diéthérification de la lactone avec $BF_3.Et_2O$

Les différents alcools testés sont réunis dans le tableau suivant (Tableau 9).

Entrée	*Lactone*	*ROH*	*Rendement isolé*	*LogP**
1	**10a**	MeOH	40%	6.77
2	**10b**	EtOH	18 %	7.48
3	**10c**	PrOH	39%	8.53
4	**10d**	BuOH	13%	9.41
5	**10e**	BnOH	5%	10.22

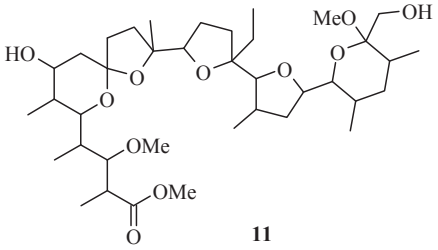
* LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 9 : Diéthérification de la lactone

En présence de méthanol, le composé **10a** est obtenu avec un rendement isolé de 40%. Puis, nous avons augmenté la longueur de la chaîne carbonée en faisant réagir l'éthanol (**10b**, 18%), le propanol (**10c**, 39%), le butanol (**10d** ; 13%) et l'alcool benzylique (**10e**, 5%). Nous remarquons que la difficulté de la réaction augmente avec la taille de l'alcool.

Il est important de noter qu'aucune de ces lactones diéthérifiées n'a pas pu être caractérisée par RMN car les spectres sont très mal définis. En effet, il semblerait que quatre diastéréoisomères se soient formés. Ceci est dû au mécanisme de la réaction qui fait intervenir la formation d'un carbocation avant la réaction de l'alcool. Deux fonctions hydroxyles réagissant, cela entraîne la formation de deux carbocations et donc la création de quatre diastéréoisomères. Par contre, chacune des lactones a été identifiée par spectrométrie de masse à haute résolution.

Nous avons testé cette méthodologie sur la monensine acide **1a** (Figure 15). Nous avons d'une part méthylé l'alcool tertiaire et d'autre part estérifié l'acide carboxylique pour obtenir la molécule **11** avec un rendement de 22%.



11

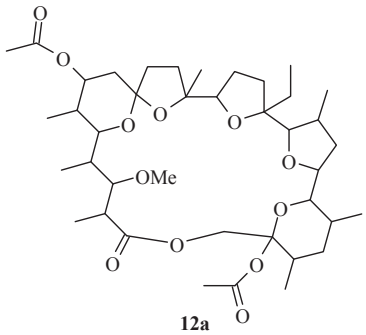
Figure 15 : Méthylation de la monensine avec $BF_3.Et_2O$

II-2-3-2-d Acétylation

Nous avons réalisé des réactions d'acétylation en présence de $BF_3.Et_2O$ dans le but d'augmenter la lipophilie de la lactone.

Tout d'abord, nous avons utilisé $BF_3.Et_2O$ dans l'anhydride acétique. L'analyse par spectrométrie de masse nous montre la présence de la lactone diacétylée **12a** (Figure 16).

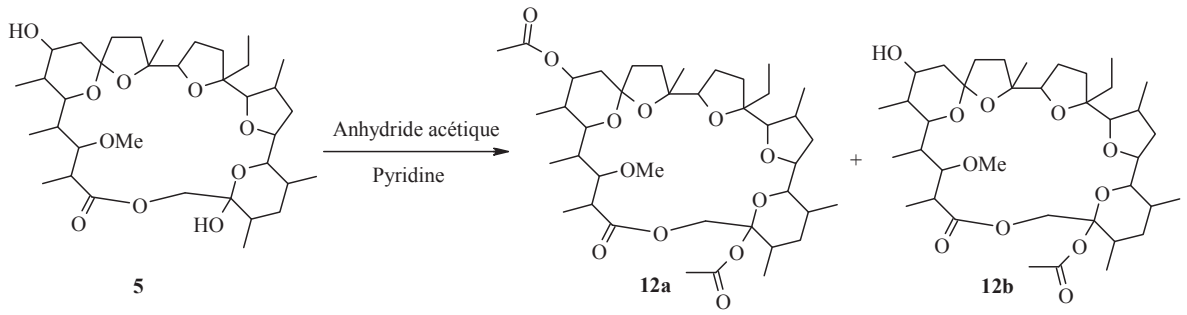
La purification de la lactone diacétylée est difficile car le produit semble se dégrader sur la silice. Les chromatographies sur couche mince montrent également de longues traînées, laissant présumer de la dégradation du produit sur silice.



12a

Figure 16 : Acétylation de la lactone avec $BF_3.Et_2O$

Dans la littérature, nous avons pu constater que Suzuki[51] et ses collaborateurs avaient étudié la synthèse de cette lactone diacétylée en utilisant de l'anhydride acétique en présence de pyridine à 50°C pendant quatre jours. Cependant, la réaction conduit à un mélange de produits : lactones mono- et diacétylées, **12b** et **12a** (Schéma 18).



5 **12a** **12b**

Schéma 18 : Acétylation de la lactone

Après plusieurs purifications sur colonne chromatographique de silice et sur colonne en phase inverse, l'équipe de Suzuki a réussi à isoler la lactone diacétylée. Cependant, ils n'ont pas communiqué leur rendement.

Constatant la difficulté de purification de cette lactone, nous avons abandonné cette piste.

[51] Tohda K., Suzuki K., Kosuge N., Watanabe K., Nagashima H., Inoue H., Shirai T., *Anal. Chem*., **1990**, 62 (9), 936-942.

II-2-4 Réactions de fluoration

II-2-4-1 Bibliographie

II-2-4-1-a Les produits fluorés dans le domaine médicinal

Il a fallu attendre les années 1970 pour que la chimie organique du fluor connaisse une véritable expansion. Les énormes progrès réalisés en méthodologie de synthèse ont rendu accessible des molécules de plus en plus complexes, et ont ainsi permis l'essor de la chimie médicinale du fluor[52]. En 2006, les médicaments fluorés représentaient 25% des parts de marché. L'évolution des produits fluorés dans le domaine médicinal est représentée sur l'histogramme suivant (Figure 17).

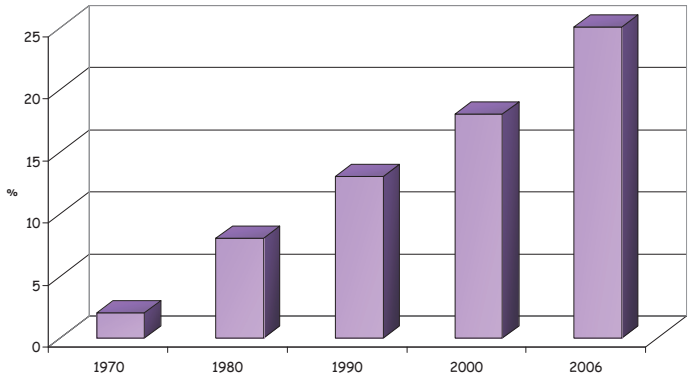


Figure 17 : Part de marché des produits fluorés

De plus, les produits fluorés montrent souvent une activité biologique supérieure à leurs homologues non fluorés. Par exemple, l'anticancéreux difluoré *Vinflunine*[53,54], des laboratoires pharmaceutiques Pierre-Fabre, présente une activité supérieure à son homologue non fluoré la *Vinorelbine* (Schéma 19).

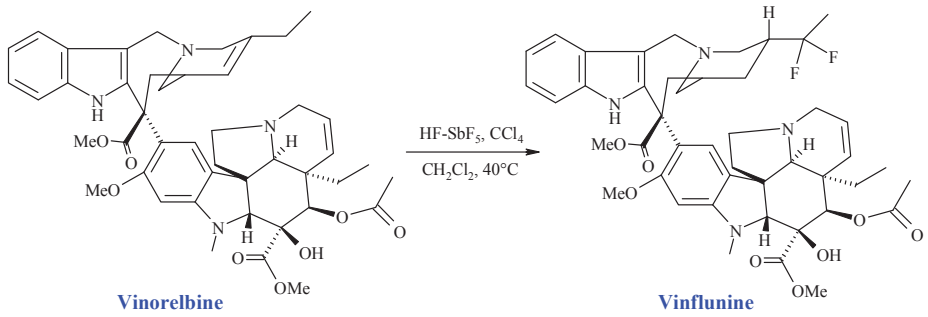


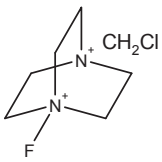
Schéma 19 : Fluoration de la Vinorelbine

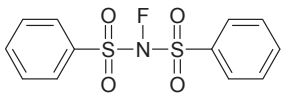
II-2-4-1-b Les agents de couplage

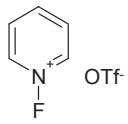
Il existe deux types d'agents de fluoration. Les agents électrophiles « F^+ », tels le Selectfluor, *N*-fluorobenzènesulfonimide (NFSI) et le triflate de *N*-fluoropyridinium, qui

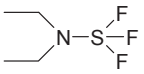
[52] Bégué J. P., Bonnet-Delpon D., *L'actualité chimique*, **octobre-novembre 2006**.
[53] Fahy J., Duflos A., Ribert J.P., Jacquesy J.C., Berrier C., Jouannetaud M.P., Zunino F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119 (36), 8576-8577.
[54] Kruczynski A., Barret J.M., Etievant C., Colpaert F., Fahy J., Hill B.T., *Biochemical Pharmacology*, **1998**, 55, 635-648.

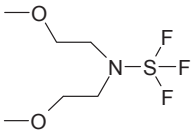
réagissent sur des substrats nucléophiles. Les agents nucléophiles « F^-», tels le trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST) et Deoxo-fluor, qui réagissent sur des substrats électrophiles[55].


F-TEDA ou Selectfluor


NFSI


N-Fluoropyridinium triflate


DAST


Deoxo-Fluor

II-2-4-2 Réactions avec le DAST

Dans un premier temps, nous souhaitions fluorer les deux alcools présents sur la lactone **5**, celui en position C7 est un alcool secondaire et celui en C25 est un tertiaire, pour obtenir la lactone difluorée **13** (Figure 18). Ainsi, nous avons choisi un agent de fluoration nucléophile, le DAST. Différentes conditions de réaction ont été testées pour étudier les effets de la température, de la stœchiométrie en DAST, de la concentration du milieu et du temps de réaction.

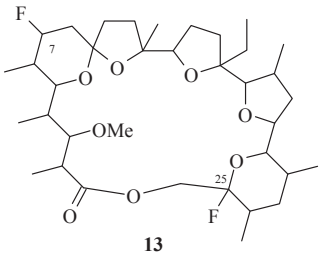

13

Figure 18 : Difluoration de la lactone

II-2-4-2-a L'effet de la température

La réaction a été réalisée à température ambiante, à -40°C et à -78°C (Tableau 10). Nous constatons que lorsque la réaction est effectuée à -78°C, il ne se passe rien (entrée 2). Par contre, à température ambiante (entrée 1), la réaction est exothermique et de nombreux produits sont formés. Lorsque la réaction s'effectue à une température intermédiaire, de -40°C (entrée 4), la réaction est incomplète.

Nous avons également décidé d'introduire le DAST dans le milieu (lactone et dichlorométhane) à -78°C, et de laisser revenir le milieu réactionnel à température ambiante (entrée 3). Au bout de 50 minutes, la conversion est complète et nous obtenons après purification sur colonne le produit A (**14a**) caractérisé par spectrométrie de masse et par RMN.

Entrée	***DAST (eq)***	***Température***	***Analyses***
1	1	t.a.	De nombreux produits
2	1	-78°C	Lactone initiale
3	1	-78°C -> t.a.	Lactone fluorée A (**14a**)
4	1	-40°C	Réaction incomplète : mélange

Tableau 10 : Conditions de fluoration testées avec le DAST

[55] Kirk K. L., *Organic Process Research & Development*, **2008**, 12, 305-321.

D'après l'ensemble des analyses spectroscopiques effectuées, la structure suivante du produit **14a** peut être proposée (Figure 19).

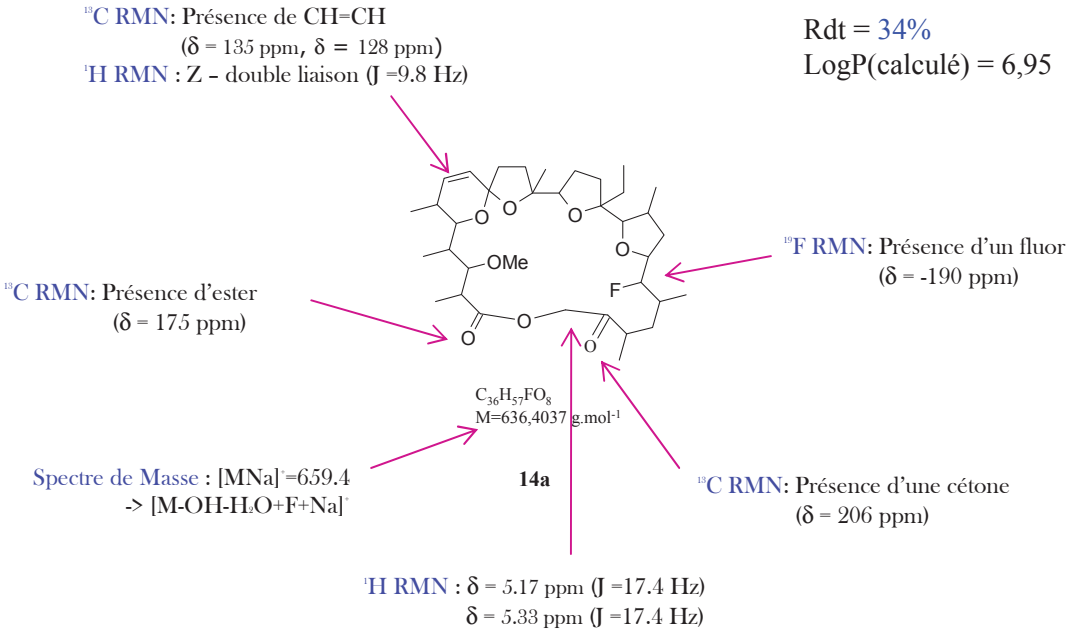


Figure 19 : Analyse structurale du composé 14a

II-2-4-2-b L'effet de la stœchiométrie du DAST

Pour réaliser cette étude (Figure 20), les réactions ont toutes été faites sur 50 mg de lactone dissoute dans 0,5 mL de dichlorométhane anhydre. Le DAST a été introduit à -78°C, puis la réaction a été agitée à température ambiante pendant 50 minutes. Chaque synthèse aboutit à la formation du composé A (**14a**) et d'un autre composé B (**14b**), qu'il n'a pas été possible d'isoler.

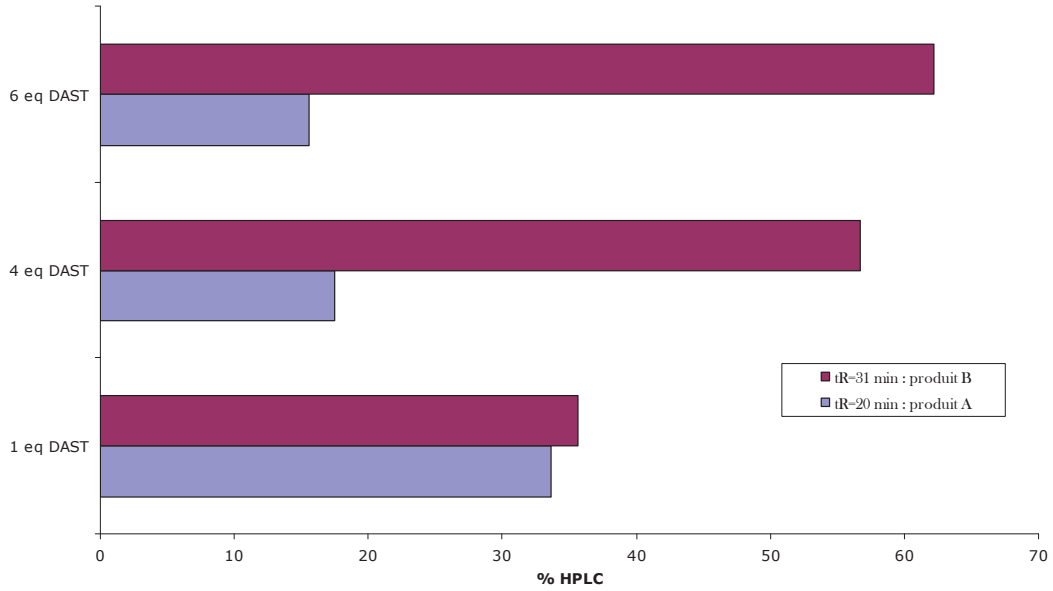


Figure 20 : Etude de la stœchiométrie du DAST

Cet histogramme montre que plus l'excès de DAST introduit est important, plus la formation du produit B est favorisée au bout de 50 minutes.

II-2-4-2-c L'effet de la concentration du milieu

Deux types de milieux ont été étudiés à différentes concentrations en lactone (0,015, 0,154 et 0,300 mol/L). Dans le premier, la réaction a été réalisée avec un équivalent de DAST (Figure 21) et dans le second, avec quatre équivalents (Figure 22).

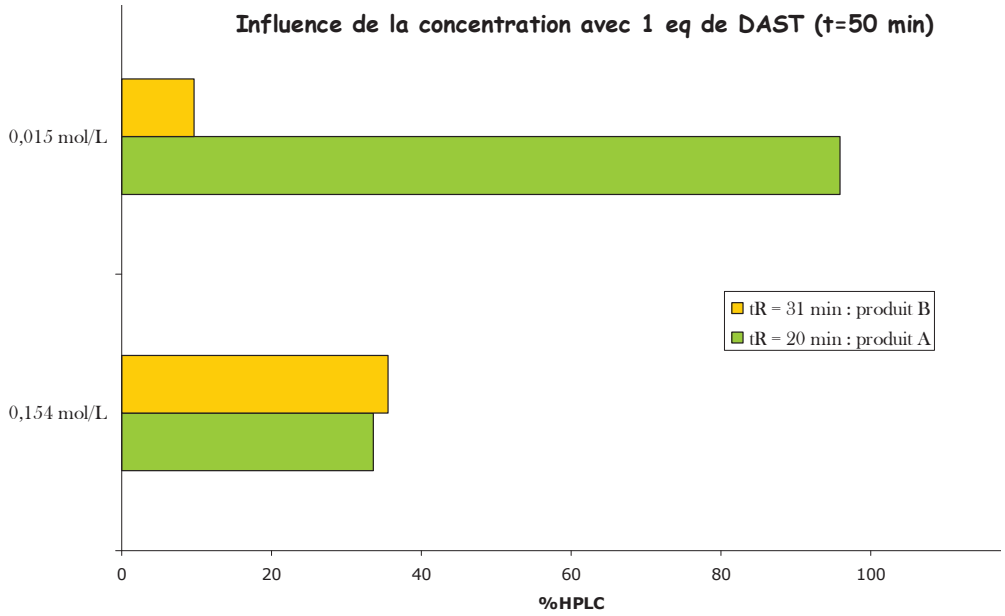


Figure 21 : Influence de la concentration avec 1 eq de DAST

D'après cet histogramme, avec un équivalent de DAST, un milieu dilué (0,015 mmol/L de lactone) favorise la formation du produit fluoré A (**14a**).

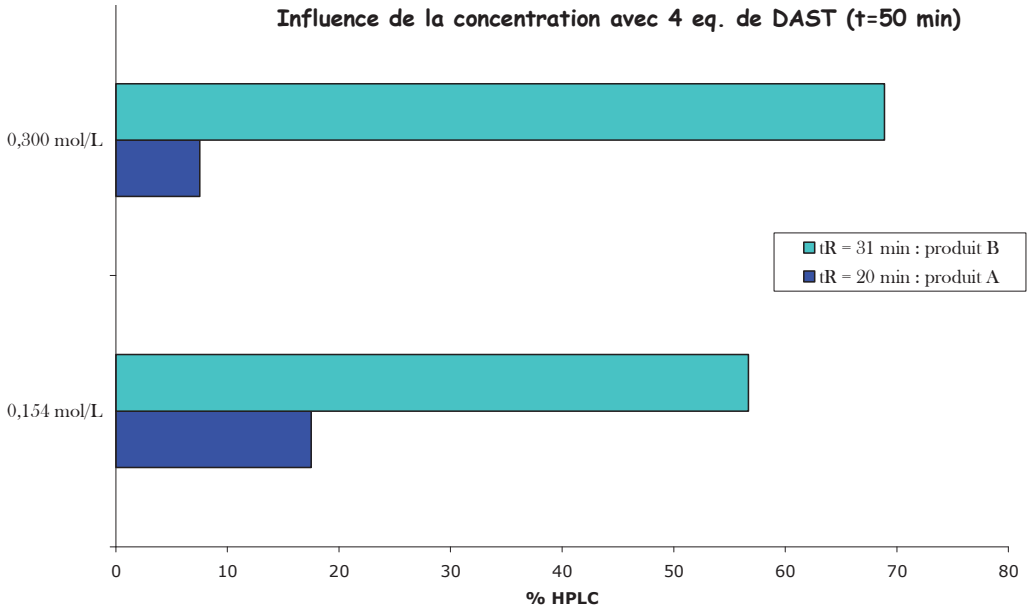


Figure 22 : Influence de la concentration avec 4 eq de DAST

A l'inverse, avec quatre équivalents de DAST, un milieu très concentré (0,300 mol/L) favorise la formation de l'intermédiaire B (**14b**).

II-2-4-2-d L'effet du temps de réaction

Un suivi cinétique par HPLC (Figure 23) a été réalisé lors de la réaction mettant en jeu six équivalents de DAST introduits à -78°C dans 10 volumes de dichlorométhane. Puis, la réaction a été agitée à température ambiante.

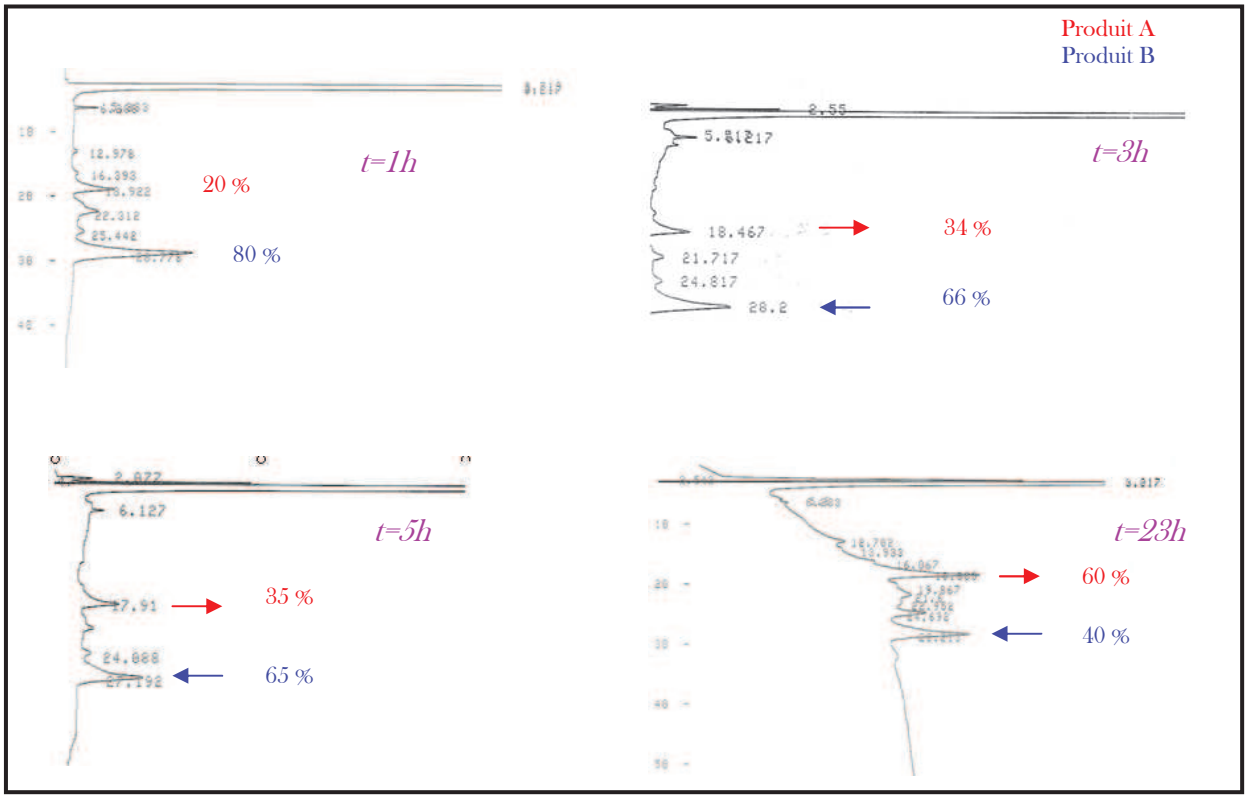


Figure 23 : Suivi cinétique de la réaction de fluoration de la lactone

Dans ces conditions (large excès de DAST), le produit B (**14b**) est majoritaire au bout de 1h (80% de formation). Puis, au cours de la réaction, on constate, d'après les chromatogrammes HPLC, que les proportions de produits A (**14a**) et B (**14b**) évoluent. Au bout de 23h, le produit A (**14a**) devient majoritaire avec 60% de formation.

Des études en HPLC ont été réalisées, par le docteur Laure GUY (ENS-Lyon), sur le brut de cette réaction arrêtée au bout de 1h. L'objectif était d'isoler le produit B (**14b**) par HPLC préparative. Malheureusement, les résultats montrent que le produit **14b** se dégrade sur la silice, il n'est pas stable et il ne peut donc pas être isolé.

II-2-4-2-e Proposition de mécanisme

Le mécanisme réactionnel (Figure 24) formant la lactone fluorée **14a** n'est pas évident. Nous proposons un mécanisme en quatre étapes basé sur une première addition du DAST sur l'alcool secondaire de la lactone suivie d'une élimination de HF et de fluorure de diéthylaminosulfonyle aboutissant à une double liaison cis en position 7. L'acidité du HF libéré protone alors l'alcool tertiaire de la monensine qui permet la formation d'un carbocation par déshydratation. Le fluorure attaque ensuite le carbone en position 21 conduisant à la lactone fluorée **14a**.

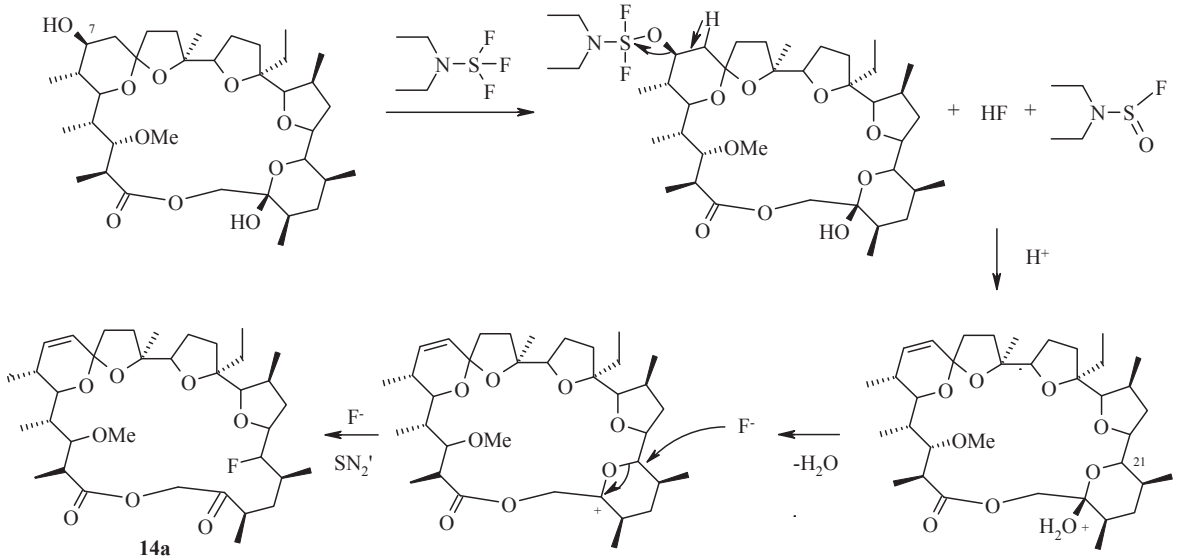


Figure 24 : Proposition de mécanisme pour la fluoration de la lactone

Si cette proposition de mécanisme s'avère exacte, alors elle offre de nouvelles perspectives de modifications de la monensine et de ses dérivés, notamment par l'utilisation de HF dans la pyridine ou de $HF.SbF_5$, réactif utilisé dans la synthèse de la vinflunine (II-2-4-1).

II-2-4-3 Réactions avec le Déoxofluor

Etant donné qu'avec le DAST, le produit attendu **13** n'est pas obtenu, nous avons décidé de tester un autre agent de fluoration nucléophile qui soit plus doux, comme le Déoxofluor (Tableau 11).

Entrée	***Déoxofluor (eq)***	***Température***	***HPLC***	
1	1	-78°C -> t.a	- Reste de la lactone - 2 produits formés (t = 20 min et 31 min).	
2	4	-78°C -> t.a	t = 50 min 20 min (27%) 31 min (44%)	t = 3h 20 min (43%) 31 min (38%)

Tableau 11 : Fluoration avec le Déoxofluor

Le Déoxofluor semble être moins réactif vis-à-vis de la lactone que le DAST. Avec un équivalent, la réaction n'est pas totale (entrée 1). Lorsqu'un excès de Déoxofluor est introduit (entrée 2), la conversion est complète, mais peu sélective.

II-2-5 Oxydation

La monensine et la lactone comportent des fonctions alcools qui peuvent être oxydées. Sur la monensine, nous pouvons envisager une oxydation totale ou partielle en faisant varier les réactifs d'oxydation (réactifs de Swern, Dess-Martin, Corey-Kim, NaOCl…).

II-2-5-1 Bibliographie

Sakakibara et ses collaborateurs ont déjà réalisé une réaction d'oxydation sur l'alcool secondaire de la monensine protégée au niveau des autres fonctions alcools[23] (Schéma 20). Pour cela, ils ont utilisé le sulfure de diméthyle en présence de *N*-Chlorosuccinimide dans du dichlorométhane, réaction de Corey-Kim. La monensine oxydée a été obtenue avec un rendement de 78%.

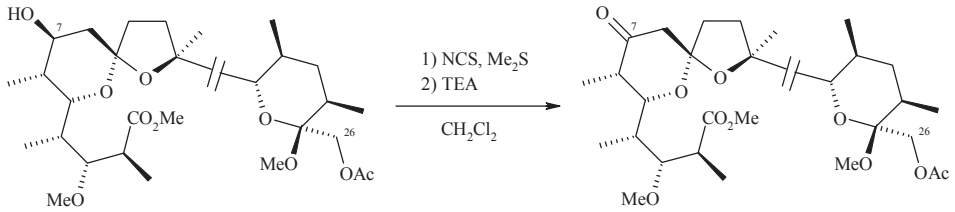


Schéma 20 : Oxydation en C7 de la monensine protégée en C1, C25 et C26[23]

Par ailleurs, Nagatsu et ses collaborateurs[24] ont aussi réalisé des réactions d'oxydation sur l'alcool primaire de la monensine protégée. Ils ont oxydé, dans un premier temps, avec un rendement de 91 %, l'alcool primaire en aldéhyde en présence de dichromate pyridinium (PDC) par une réaction de Corey, puis ils ont transformé, de façon quantitative, par la réaction de Pinnick, l'aldéhyde en acide carboxylique avec $NaClO_2$ et NaH_2PO_4 (Schéma 21)

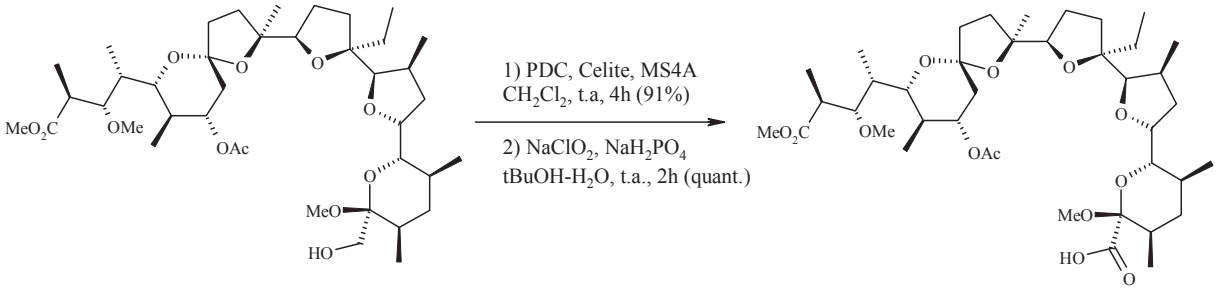


Schéma 21 : Oxydation en C26 de la monensine protégée en C1, C7 et C25[24]

II-2-5-2 Oxydation de la lactone

Nous avons débuté cette étude sur la lactone **5**, qui n'a qu'un seul alcool oxydable, l'alcool secondaire.

Le réactif de Dess-Martin (Figure 25), le Dess-Martin périodinane, a été le premier oxydant considéré. Ce dernier permet de réaliser des oxydations douces. Nous souhaitions oxyder la lactone au niveau de l'alcool secondaire.

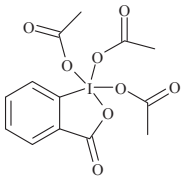


Figure 25 : Réactif de Dess-Martin

Une étude par analyses RMN ^{1}H, ^{13}C et de spectrométrie de masse nous permet de constater que le produit formé n'est pas la lactone monooxydée attendue, mais le produit **15,** décrit ci-dessous (Figure 26), issu de l'oxydation de l'hémiacétal et de l'alcool secondaire. Le rendement de cette synthèse est de 72% et le produit **15** présente un logP calculé de 6,17.

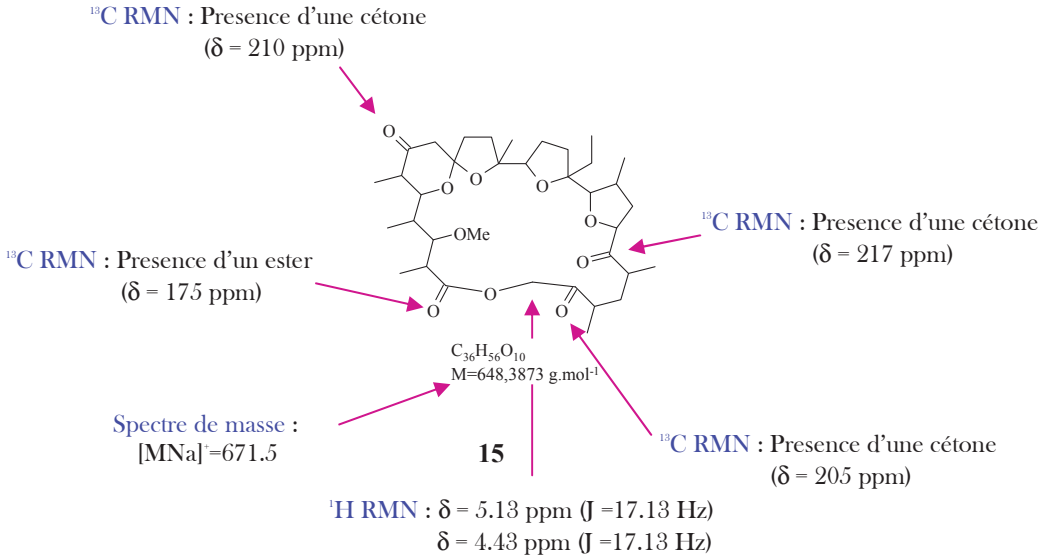


Figure 26 : Analyse structurale du composé 15

Par ailleurs, cette structure conforte notre proposition pour la structure de la molécule **14a** issue de la fluoration de la lactone. En effet, nous retrouvons dans les deux cas deux protons déblindés, vers 5 ppm, ayant des constantes de couplage élevées (17 Hz), qui correspondent aux gem-protons situés entre la cétone et l'ester.

Afin, d'obtenir la lactone oxydée sélectivement sur l'alcool secondaire, nous avons testé d'autres conditions d'oxydation.

Dans un premier temps, nous avons reproduit la réaction de Dess-Martin en présence de pyridine. L'ajout d'une base pourrait, en effet, empêcher l'ouverture de l'hémiacétal. Mais, nous observons la formation du produit **15** uniquement, avec un rendement de 77 %, donc équivalent à celui obtenu dans les conditions classiques de Dess-Martin.

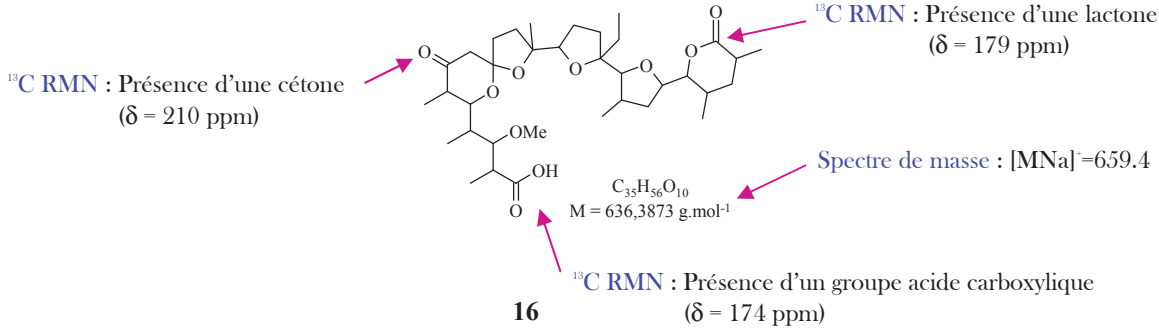
Puis, nous avons essayé les conditions de Corey-Kim, en présence de sulfure de diméthyle et de *N*-chlorosuccinimide, et les conditions de Swern avec du chlorure d'oxalyle, du diméthylsulfoxyde et de la triéthylamine. Mais, dans ces deux cas, nous avons observé une faible conversion de la lactone. Suite à ces résultats non satisfaisants, nous avons abandonné les recherches de nouveaux agents d'oxydation pour oxyder sélectivement l'alcool secondaire de la lactone.

II-2-5-3 Oxydation de la monensine

II-2-5-3-a Oxydation par le réactif de Dess-Martin

Nous avons débuté nos réactions d'oxydation de la monensine dans les conditions de Dess-Martin, identiques à celles utilisées sur la lactone, afin d'obtenir l'oxydation de ces alcools primaire et secondaire.

Trois équivalents de Dess-Martin périodinane ont été introduits. La conversion de la monensine est complète après une nuit sous agitation. Après séparation sur colonne, nous analysons le produit obtenu par spectrométrie de masse, RMN ^{1}H et ^{13}C et nous constatons que le produit obtenu n'est pas celui attendu, mais le produit **16**, décrit ci-dessous (Figure 27), avec un rendement de 24 % et un logP calculé de 6,07.



16

Figure 27 : Analyse structurale du composé 16

II-2-5-3-b Autres conditions d'oxydation testées

Dans un premier temps, nous avons essayé des conditions douces permettant d'oxyder sélectivement l'alcool primaire de la monensine en aldéhyde. Les conditions de Swern (Chlorure d'oxalyle en présence de DMSO et de triéthylamine)[56] (entrée 1), celles de Tomioka[57] en présence de $RuCl_2(PPh_3)_3$ (entrées 2 à 4) et celles de Einhorn[58] en présence de *N*-chlorosuccinimide (entrée 5) ont été testées (Tableau 12).

Entrée	***Conditions***	***Analyses***
1	Chlorure d'oxalyle, DMSO, Et_3N, CH_2Cl_2	Plusieurs produits
2	$RuCl_2(PPh_3)_3$ (0,6eq), toluène	HPLC : Plusieurs produits dont la monensine
3	$RuCl_2(PPh_3)_3$ (1,2eq), toluène	MS : Plusieurs produits dont la monensine
4	$RuCl_2(PPh_3)_3$ (0,6eq), benzène	MS : Plusieurs produits dont la monensine
5	TEMPO, K_2CO_3, $NaHCO_3$, nBu$_4$NCl, NCS, CH_2Cl_2	Monensine seule

Tableau 12 : Conditions d'oxydation de l'alcool primaire de la monensine

[56] Mancuso A.J., Huang S.L., Swern D., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43 (12), 2480-2482.
[57] Tomioka H., Takai K., Oshima K., Nozaki H., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22 (17), 1605-1608.
[58] Einhorn J., Einhorn C., Ratajczak F., Pierre J.L., *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 7452-7454.

Ces essais n'ont pas été concluants car aucune des réactions n'a conduit à la formation majoritaire d'un produit. En effet, dans chacun des cas, nous avons observé la conversion nulle ou partielle de la monensine.

Dans un second temps, nous avons testé des conditions permettant, théoriquement, cette fois, d'oxyder sélectivement l'alcool secondaire de la monensine. Nous avons testé l'eau de javel dans l'acide acétique glacial[59] (entrée 1), le *N*-bromosuccinimide[60] (entrée 2), le diméthylsulfoxide (DMSO) en présence de dicyclohexyle carbodiimide (DCC) et d'acide orthophosphorique[61] (entrée 3), de même que le DMSO en présence d'anhydre acétique[62] (entrée 4) (Tableau 13).

Entrée	***Conditions***	***Analyses***
1	NaOCl, AcOH	MS : Plusieurs produits dont la monensine
2	NBS, solution aqueuse de diméthoxypropane 10%	Très faible conversion de la monensine
3	DCC, DMSO, H_3PO_4, Ether	MS : Plusieurs produits dont la monensine
4	DMSO, Ac_2O	MS : Plusieurs produits dont la monensine

Tableau 13 : Conditions d'oxydation de l'alcool secondaire de la monensine

Pour toutes ces conditions, nous observons uniquement une faible conversion de la monensine.

Finalement, nous avons testé des conditions d'oxydation plus fortes décrites pour oxyder de façon non sélective les alcools primaire et secondaire. Différentes conditions utilisant l'eau de javel et le permanganate de potassium ont été essayées (Tableau 14).

Entrée	***Conditions***	***Analyses***
1	TEMPO, $NaHCO_3$, KBr, nBu$_4$NBr, NaOCl, CH_2Cl_2[63]	Très faible conversion
2	$NiCl_2.(H_2O)_6$, CH_2Cl_2[64]	Monensine seule
3	$KMnO_4$, NaOH	Monensine seule
4	$KMnO_4$, H_2SO_4[65]	Monensine seule
5	$KMnO_4$/tamis moléculaire, toluène[66]	Monensine seule

Tableau 14 : Conditions d'oxydation forte

[59] Stevens R. V., Chapman K. T., Stubbs C. A., Tam W. W., AlbizatiK. F., *Tetrahedron Lett*., **1982**, 23 (45), 4647-4650.
[60] Sugimura T., Paquette L. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 3017-3024.
[61] Albright J. D., Goldman L., *J. Org. Chem*., **1965**, 30 (4), 1107-1110.
[62] Natrajan A., Ferrara J. D., Youngs W. J., Sukenik C. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 7477-7483.
[63] Anelli P. L., Biffi C., Montanari F., Quici S., *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 2559-2562.
[64] Grill J. M., Ogle J. W., Miller S. A., *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 9291-9296.
[65] Crombie L., Harper S. H., *J. Chem. Soc.*, **1950**, 2685-2689.
[66] Regen S. L., Koteel C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, May 25, 3837-3838.

La monensine ne réagit pas du tout avec le permanganate de potassium (entrées 3 à 5) et reste inerte. En présence d'eau de javel (entrée 1), une faible conversion de cette dernière est observée.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il est difficile d'oxyder sélectivement la monensine sans la protéger auparavant. Dans de nombreux cas, la monensine reste inerte et la plupart des réactifs d'oxydation conduise à des produits de dégradation. Seules les conditions de Dess-Martin permettent d'oxyder la monensine et de former majoritairement un nouveau produit (**16**).

II-2-6 Estérification de la monensine

La formation d'un ester peut être un moyen d'augmenter la lipophilie de la monensine. Cet ester agirait au sein de l'organisme du poulet en tant que « prodrug ». Une fois ingéré, l'ester serait hydrolysé afin de libérer l'acide carboxylique, indispensable à la formation de la pseudo-cavité.

II-2-6-1 Bibliographie

Des recherches pour transformer l'acide carboxylique de la monensine en ester ont déjà été réalisées par Tohda et ses collaborateurs en 1990[51]. L'ester méthylique a été obtenu par réaction du iodure de méthyle en présence de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU) dans le benzène anhydre pendant quatre jours à température ambiante, avec un rendement de 75%.

Plus récemment, depuis 2006, l'équipe de Huczinski et de Brzezinski a synthétisé de nombreux esters de la monensine. En fonction de la nature de l'ester recherché, différentes méthodologies de synthèse ont été mises au point : [28]

- EtOH, DCC, CH_2Cl_2, 0°C à t.a,
- ROH, DCC, PPy (4-pyrrolidinopyridine), CH_2Cl_2, 0°C à t.a,
- ROH, DCC, PPy, APTS, CH_2Cl_2, 0°C à t.a,
- RX (bromures ou chlorures), DBU, toluène, 90-100°C, 5h.

Treize esters ont ainsi été préparés (Figure 28), depuis 2006.

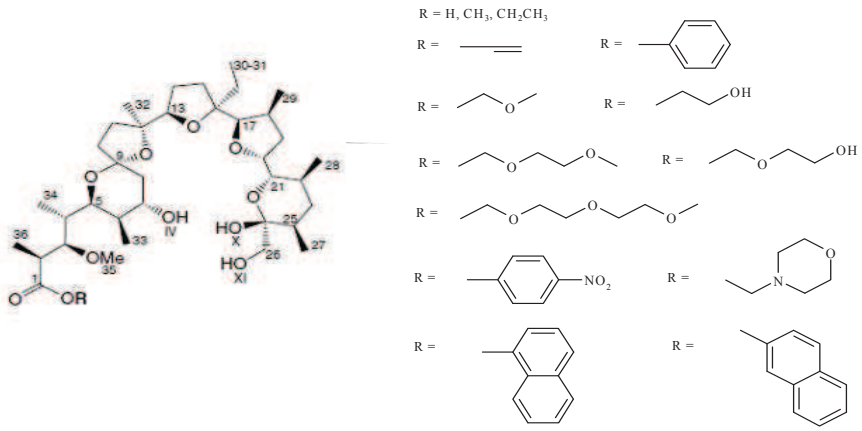
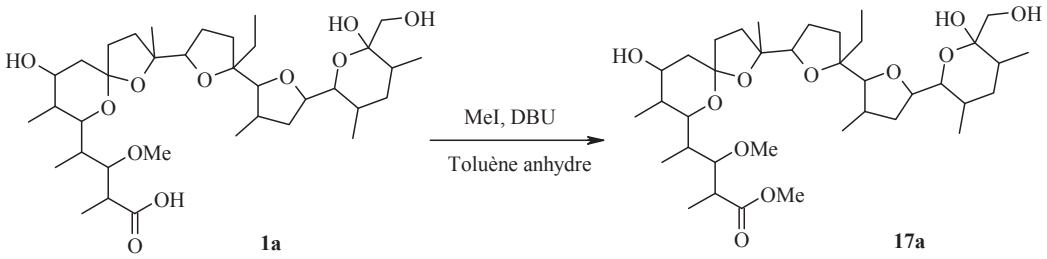


Figure 28 : Esters synthétisés par l'équipe d'Huczinski et de Brzezinski

L'activité antibactérienne et antifongique de ces esters a été testée *in vitro* en présence de levures de type micro-organismes, de bactéries gram-positives et gram-négatives avec pour certains de bons résultats.

II-2-6-2 Réactions testées

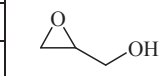
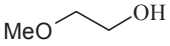
Nous avons, dans un premier temps, reproduit les conditions de Tohda pour méthyler l'acide carboxylique (Schéma 22). Nous obtenons le produit attendu **17a**, sous forme d'une mousse, avec un rendement de 52% après purification sur colonne. Le logP de l'ester est évalué à 4,96.



1a **17a**

Schéma 22 : Estérification de la monensine

Nous avons étendu la famille des esters en testant d'autres réactifs tels que le glycidol et le méthoxyéthanol. Ces réactifs n'étant pas disponibles sous forme d'iodures mais sous forme d'alcools, nous avons dû mettre au point une autre méthodologie. Pour le glycidol, plusieurs essais ont été réalisés testant différentes conditions (entrées 1 à 3) (Tableau 15), l'ester **17b** a été obtenu en effectuant la réaction en présence de DMAP, DCC et DMAP.HCl. Le produit **17c** issu du méthoxyéthanol a été synthétisé en présence de DMAP et de DCC avec un rendement de 21% (entrée 4).

Entrée	***Alcool***	***Ester***	***Conditions***	***Rendement isolé***	***Analyses***	***LogP****
1		**17b**	K_2CO_3, DMF	-	Monensine	-
2			DMAP/DCC, THF	-	Autre produit	-
3			DMAP/DCC/DMAP.HCl CH_2Cl_2	27%	Ester	4,80
4		**17c**	DMAP/DCC, THF	21%	Ester	4,92

* LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 15 : Estérification de la monensine

Trois esters dérivés de la monensine, **17a**, **17b** et **17c**, ont donc été synthétisés. Nous n'avons pas poursuivi les réactions d'estérification, les premières évaluations biologiques n'ayant pas été concluantes (voir partie III).

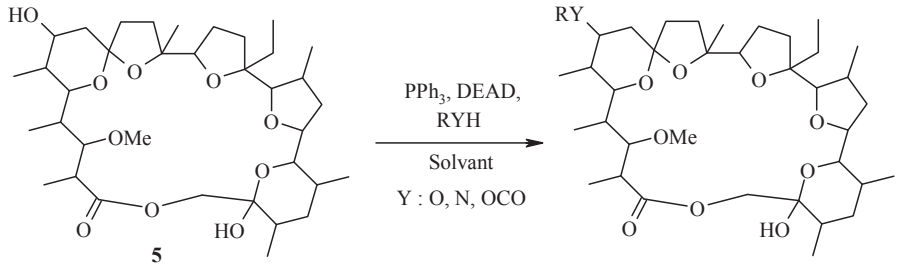
II-2-7 Réaction de Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu permet la substitution d'alcools primaires et secondaires. Ce type de synthèse a été réalisé sur la lactone (**5**), sur la monensine (**1a**) et sur la monensine estérifiée (**17a**) afin de former une famille de molécules ayant une lipophilie supérieure à celle de la monensine.

II-2-7-1 Réaction de Mitsunobu sur la lactone

La lactone possède deux groupements hydroxyles libres, un alcool secondaire et un alcool tertiaire. Ce dernier n'étant pas réactif vis-à-vis des réactions de Mitsunobu, seul l'alcool secondaire reste disponible pour réaliser la réaction. La lactone semble être un réactif de choix et ne nécessite donc aucune protection.

La réaction a été effectuée dans un solvant anhydre, souvent le THF, mais le toluène a été également testé, en présence de diéthylazodicarboxylate et de triphénylphosphine à température ambiante (Schéma 23).



5

Schéma 23 : Réaction de Mitsunobu sur la lactone

Divers nucléophiles ayant différents pKa ont été testés (Tableau 16). En effet, la notion de pKa du nucléophile est importante dans le cas d'une réaction de Mitsunobu. Pour amorcer la réaction, il est nécessaire que le nucléophile ait un pKa inférieur à 13, voire même inférieur à 11[67].

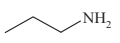
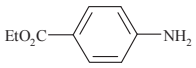
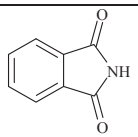
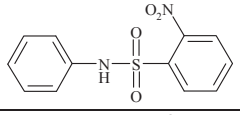
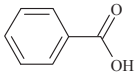
Entrée	***RYH***	***Analyses***
1		Lactone initiale
2		Lactone initiale
3		Lactone initiale
4		Lactone initiale
5		Lactone initiale

Tableau 16 : Réaction de Mitsunobu

[67] *TCI Product Literature*, **2007**, R-5044E

Quelque soit le nucléophile utilisé, la réaction ne s'amorce pas, la lactone n'est pas du tout consommée. Suite à ces résultats, nous avons essayé de réaliser la réaction en présence d'aniline nosylée dans du toluène en chauffant à 75°C. Nous n'avons observé aucune conversion de la lactone également. Nous avons arrêté ce type de réaction sur la lactone.

De même que pour les réactions de tosylation et de mésylation sur l'alcool secondaire, la position 7 de la lactone ne semble pas réactive vis-à-vis de la réaction de Mitsunobu. Cet alcool est probablement trop encombré.

II-2-7-2 Réaction de Mitsunobu sur la monensine

La réaction de Mitsunobu a été également effectuée sur la monensine sous forme acide **1a** (Schéma 24).

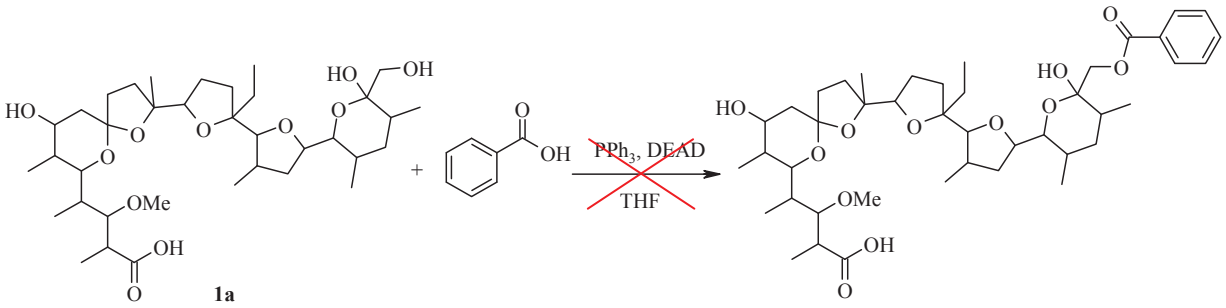


Schéma 24 : Réaction de Mitsunobu sur la monensine

Seul l'acide benzylique a été testé. Aucune conversion de la monensine n'a été observée. L'acide carboxylique terminal de la monensine aurait pu réagir également, mais rien ne s'est produit.

II-2-7-3 Réaction de Mitsunobu sur la monensine estérifiée

Nous avons aussi réalisé la réaction de Mitsunobu sur la monensine estérifiée en C1, **17a**, afin de fonctionnaliser l'alcool primaire (Schéma 25).

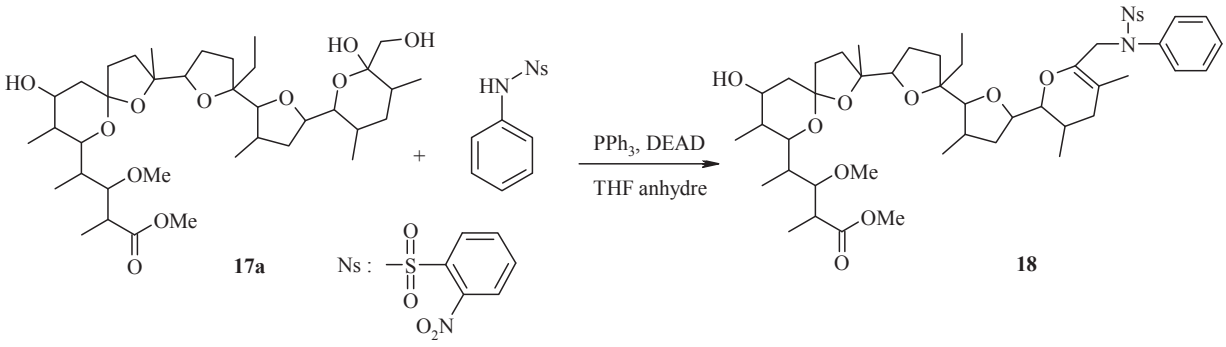


Schéma 25 : Réaction de Mitsunobu sur la monensine méthanoate 17a

Suite aux analyses RMN et de spectroscopie de masse, nous avons constaté qu'au cours de la réaction, il s'est produit une substitution nucléophile au niveau de l'alcool primaire suivie d'une déshydratation de l'alcool tertiaire. Le produit **18** a été obtenu avec un rendement de 61% et a un logP calculé de 7,96.

II-3 Synthèse de dérivés de la monensine oxodioxane **6g**

La monensine oxodioxane (**6g**) (Figure 29) issue de la réaction d'éthérification de la monensine avec le glycolate de méthyle en présence de LiBr hydraté et de nBu$_4$Br, est un nouvel intermédiaire de choix pour la préparation d'anticoccidiens originaux.

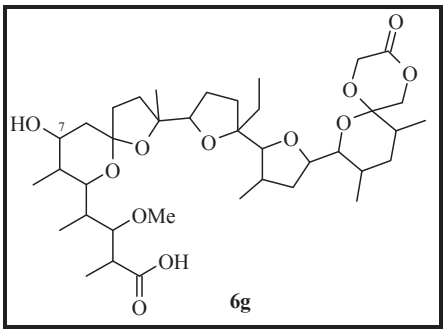


Figure 29 : Monensine oxodioxane

Ce composé **6g**, possédant les alcools primaire et tertiaire protégés sous forme d'un oxo dioxane, nous permet d'envisager diverses réactions sur l'alcool secondaire en C7 et sur l'acide carboxylique, de même que des réactions sur la lactone (ouverture, transestérification…).

II-3-1 Réactions d'estérification

II-3-1-1 Sur le carbone C7

II-3-1-1-a Bibliographie

Sakakibara et ses collaborateurs ont travaillé sur l'estérification de l'alcool secondaire en C7 de la monensine protégée en C25 et en C26 par un acétal[21]. Ils ont réalisé la réaction avec un anhydride en présence de DMAP et de pyridine (Schéma 26). Les rendements obtenus sont très satisfaisants, compris entre 86% et 92%.

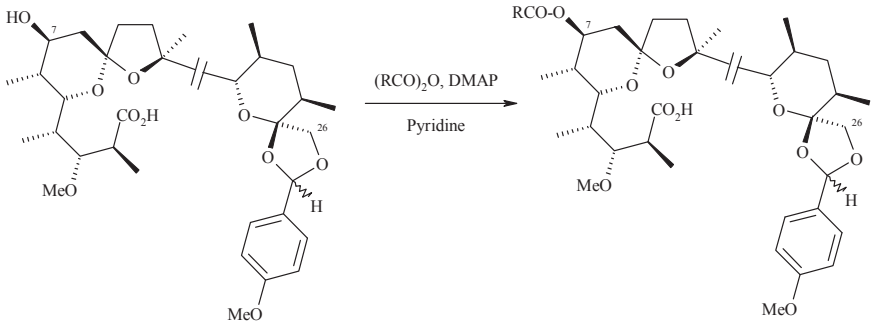
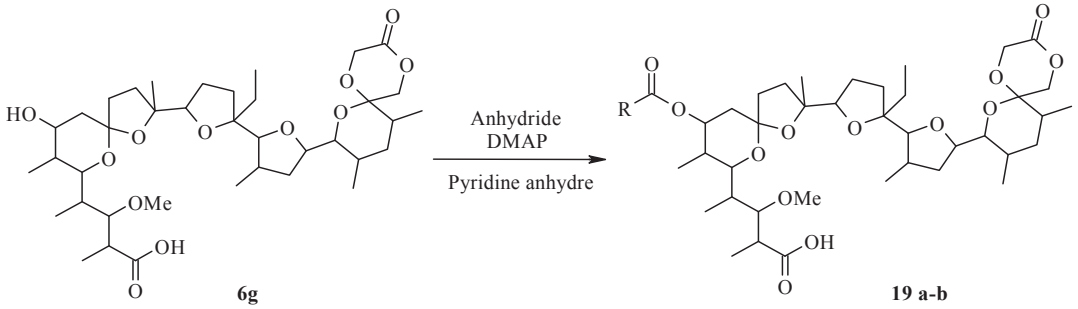


Schéma 26 : Estérification en C7 de la monensine

II-3-1-1-b Réactions testées

Nous avons souhaité reproduire les conditions décrites par Sakakibara sur la monensine oxodioxane (**6g**) elle-même protégée en C25 et en C26 (Schéma 27). Dans un premier temps, deux anhydrides ont été testés : l'anhydride acétique et l'anhydride trifluoroacétique.



6g **19 a-b**

Schéma 27 : Estérification en C7 de la monensine oxodioxane

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant (Tableau 17).

Entrée	*Ester*	*R*	*Rendement isolé*	*LogP**
1	**19a**	CH_3	21%	6,04
2	**19b**	CF_3	-	7,18

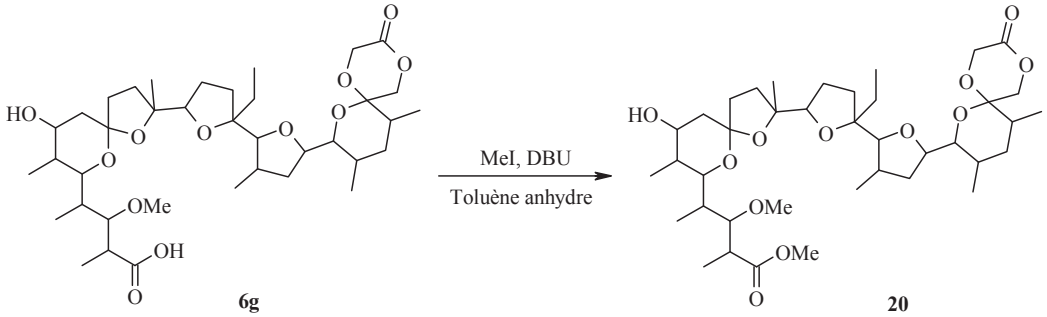
* LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 17 : Estérification en C7 de la monensine oxodioxane

L'ester **19a** (entrée 1) a été isolé par purification sur colonne chromatographique sans trop de difficulté. Le spectre RMN du carbone indique la présence de trois carbonyles à 166, 170 et 179 ppm. Par contre, l'ester **19b** (entrée 2) reste impur. En effet, son spectre de masse montre la présence de plusieurs produits ayant des masses $[MNa]^+$ de 733,4 uma (produit de départ) et de 701,4 uma correspondant au produit de départ ayant perdu une masse de 32.

II-3-1-2 Sur le carbone C1

Dans le but d'obtenir d'une part un nouveau produit et d'autre part un intermédiaire de synthèse (protection de l'acide carboxylique), nous avons réalisé l'estérification de l'acide carboxylique de la monensine oxodioxane **6g**. L'estérification a été effectuée avec du iodure de méthyle et du DBU (Schéma 28).



6g **20**

Schéma 28 : Estérification en C1 de la monensine oxodioxane

Après une purification sur colonne, le produit **20** est obtenu avec un rendement de 71%. La présence de deux singulets à 52 et 58 ppm confirme la structure du composé **20** dont le logP est estimé à 5,60.

II-3-2 Réactions d'éthérification

II-3-2-1 Bibliographie

Sakakibara et ses collaborateurs ont travaillé sur l'éthérification de l'alcool secondaire en C7 de la monensine protégée en C25 et en C26 par un acétal.[21] La réaction a été faite avec un iodoalcane en présence de d'hydrure de sodium dans du THF. Cette synthèse conduit à la formation d'un sous-produit provenant de la perte du méthoxy en C3 par élimination de Michaël (Schéma 29). Les rendements obtenus, mélange des deux produits, sont compris entre 80% et 91%.

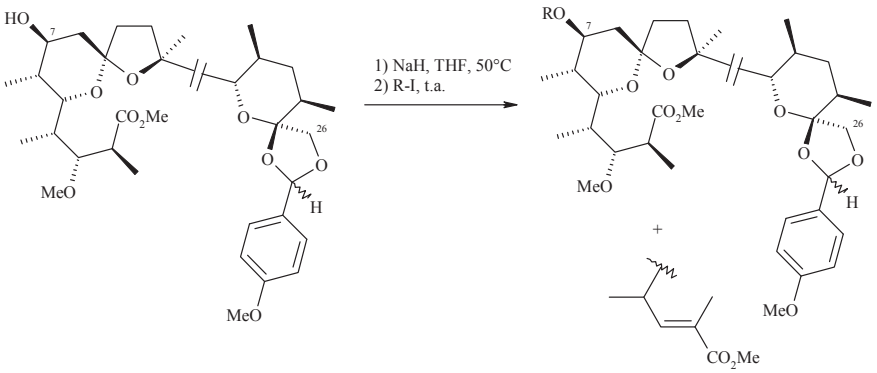
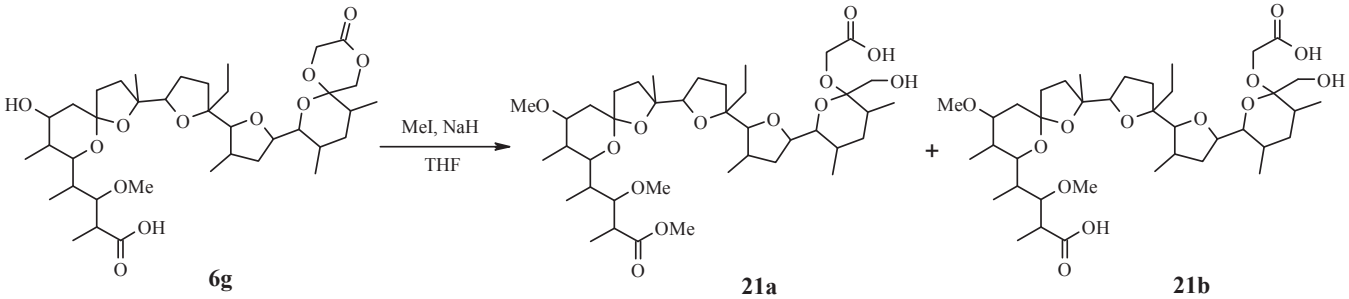


Schéma 29 : Ethérification en C7 de la monensine par Sakakibara

II-3-2-2 Réactions testées

Nous avons testé les conditions d'éthérification décrites par Sakakibara sur la monensine oxodioxane **6g** (Schéma 30).



6g **21a** **21b**

Schéma 30 : Ethérification de la monensine oxodioxane

Différents essais ont été réalisés utilisant les mêmes conditions avec du iodure de méthyle (Tableau 18).

Entrée	***Rendement***	***Analyses***	***LogP****
1	25% (brut)	MS : $[MNa]^+$ = 779,5 et 765,2 (Produits **21a** et **21b**)	5.73 (**21a**)
2	43% (isolé)	MS : $[MNa]^+$ = 765,2 (Produit **21b** isolé)	5.58 (**21b**)

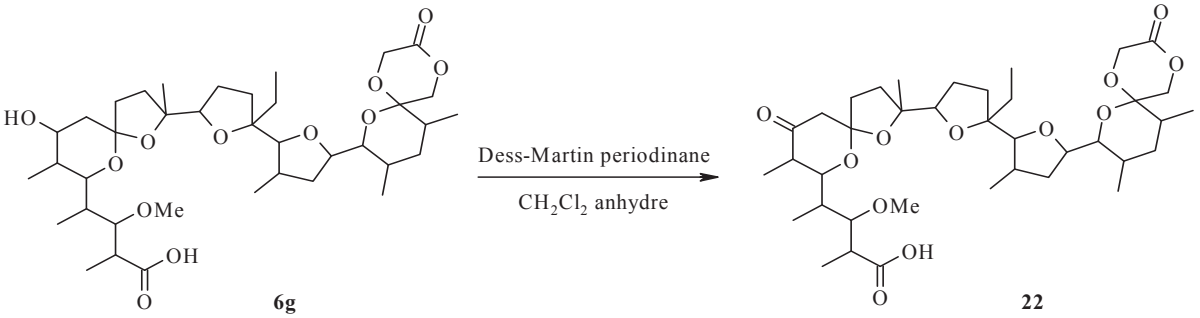
* LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 18 : Ethérification de la monensine oxodioxane

Deux produits (**21a** et **21b**) semblent se former au cours de la réaction (entrée 1). Seul le produit **21b** a été isolé avec un rendement de 43% et caractérisé par RMN et par spectrométrie de masse (entrée 2). La RMN du carbone montre la présence de deux carbonyles à 176 et 179 ppm, correspondant aux déplacements chimiques des carbones des acides carboxyliques, et de deux groupements *O*-méthoxy à 59 et 60 ppm.

II-3-3 Oxydation

Les conditions d'oxydation de Dess-Martin sur la monensine oxodioxane (**6g**) ont été utilisées afin d'oxyder sélectivement l'alcool secondaire en C7 (Schéma 31).



6g **22**

Schéma 31 : Oxydation de la monensine oxodioxane

Après avoir additionné lentement 1,5 équiv. de Dess-Martin périodinane sur une solution de monensine oxodioxane dissoute dans du dichlorométhane anhydre à température ambiante, le milieu réactionnel est agité, à température ambiante, pendant une nuit. La conversion de la monensine oxodioxane est complète et trois produits se sont formés, dont un de façon largement majoritaire. Après purification sur colonne, le produit **22** est obtenu avec un rendement isolé de 26%. La molécule **22** est caractérisée par spectrométrie de masse et par RMN. La présence d'un signal de résonance à 211 ppm confirme l'existence d'un groupement cétone, par RMN du carbone. De même, les signaux de résonance localisés à 179 et 167 ppm sont respectivement attribués aux carbones de la fonction acide et de la lactone. La molécule **22** présente un logP calculé de 6,12.

II-3-4 Saponification

La lactone à six chaînons de la monensine oxodioxane (**6g**) a été saponifiée afin d'obtenir un dérivé de la monensine comportant deux acides carboxyliques aux deux extrémités. La présence de deux acides carboxyliques entraîne la formation de liaisons hydrogène fortes, de l'ordre de 24 kJ/mol, entre les carbonyles et les hydroxyles, qui devrait permettre de former le pseudo-macrocycle (Figure 30).

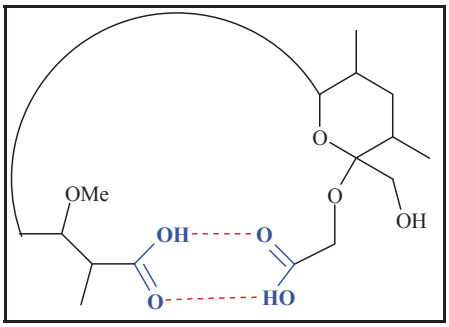
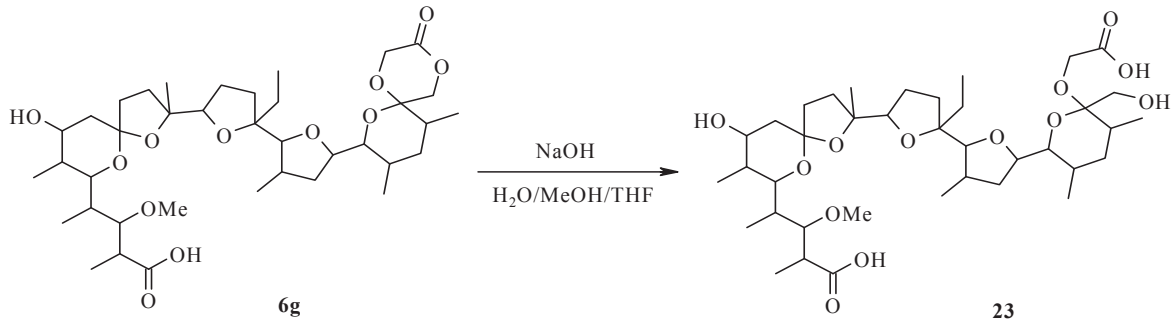


Figure 30 : Liaisons hydrogène intermoléculaires

Les conditions de saponification testées sont classiques. La monensine oxodioxane est dissoute dans un mélange THF/Méthanol/eau distillée (2/2/1), puis NaOH (1N) est additionné lentement. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit (Schéma 32). La conversion de la réaction est totale.



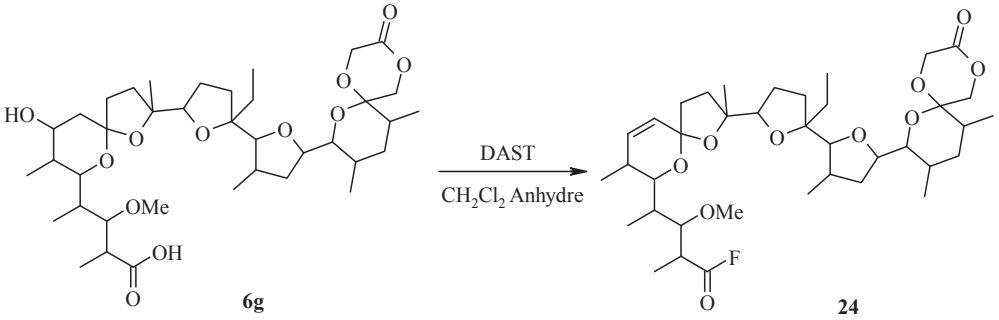
6g **23**

Schéma 32 : Saponification de la monensine oxodioxane

Le produit **23** a été obtenu avec un rendement isolé de 77% et a un logP calculé de 4,94. Son spectre RMN du carbone souligne la présence de ceux acides à 179 et 184 ppm.

II-3-5 Réaction de fluoration

Dans un premier temps, nous avons cherché à fluorer l'alcool secondaire de la monensine oxodioxane avec le DAST. Mais, après réaction, nous constatons que le produit formé n'était pas celui attendu, mais le produit de déshydratation **24** (Schéma 33).

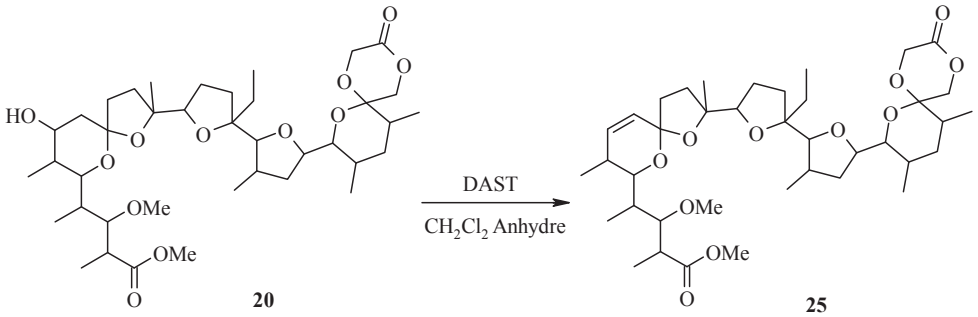


6g **24**

Schéma 33 : Fluoration de la monensine oxodiaoxane

En effet, au cours de la réaction, l'acide carboxylique est fluoré conduisant à la formation de fluorure d'acyle (δ_{19F}=36 ppm, δ_{13C}=166ppm (d, J=363 Hz)) et l'alcool secondaire a été déshydraté conduisant à la formation d'une double liaison cis, δ=5,95 ppm (q, J=9,5 Hz), δ=5,55 (d, J=9,7 Hz), le DAST étant connu pour faire des réactions secondaires de déshydratation.[68] Dans notre cas, cette réaction serait la réaction majoritaire. Ces différents essais et structures déterminées nous permettent de valider la structure définie pour la lactone fluorée **14a** (voir partie II-2-4). La nouvelle molécule **24** présente un logP calculé de 6,85 et a été obtenue avec un rendement de 35%.

Par la suite, ces conditions de fluoration ont été testées sur la monensine oxodioxane méthylée en C1 (**20**) dans l'objectif de fluorer l'alcool secondaire. De la même manière que précédemment, le produit attendu n'a pas été obtenu, mais le produit **25** a été isolé avec un rendement de 66% (Schéma 34). La molécule **25** a un logP calculé de 6,75.



20 **25**

Schéma 34 : Fluoration de la monensine oxodioxane méthylée en C1

Le produit **25** est issu de la déshydratation de l'alcool secondaire du produit **20**, le spectre RMN ^{1}H confirme la présence de deux protons éthyléniques, δ=5,93 ppm (q, J=9,6 Hz), δ=5,51 (d, J=9,6 Hz) et le spectre ^{19}F montre l'absence de fluor.

Ce dernier essai de fluoration nous permet de conclure que le DAST n'est pas un bon agent de fluoration de l'alcool secondaire de la monensine et de ses dérivés.

[68] Middleton W.J., *J. Org. Chem.*, **1975**, 40 (5), 574-578.

II-4 Synthèse de dérivés de la monensine oxolactone **16**

II-4-1 Saponification

La monensine oxolactone (**16**) a été saponifiée afin d'obtenir aux extrémités de la molécule deux fonctions acides carboxyliques, comme expliqué dans la partie II-3-4. Les conditions de saponification utilisées sont identiques à celles décrites précédemment (Schéma 35).

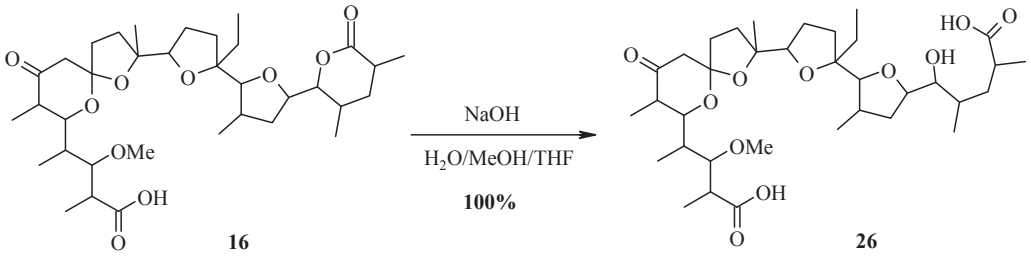


Schéma 35 : Saponification de la monensine oxolactone

Le produit **26** a été obtenu de façon quantitative et a un logP calculé de 5,40. Le spectre ^{13}C présente une cétone (211 ppm) et deux acides carboxyliques (179 et 174 ppm).

II-4-2 Perspectives

La monensine oxolactone **16** est un bon intermédiaire de synthèse, obtenu avec un rendement de 24%. Elle peut permettre de réaliser diverses réactions de façon sélective notamment sur la fonction cétone. Jusqu'à présent, nous n'avons pas modifié de fonction cétone. Il pourrait être intéressant d'un point de vue biologique d'introduire de nouvelles fonctions dans la monensine.

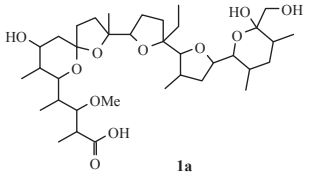
II-5 Conclusion

Quarante trois molécules dérivées de la monensine ont été synthétisées (Figure 31). La monensine est principalement réactive au niveau de l'acide carboxylique et au niveau des trois alcools.

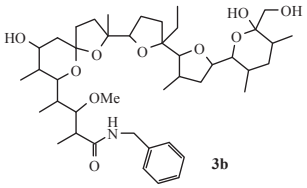
Le groupement carboxylique a été modifié par des réactions d'amidation et d'estérification, plus particulièrement de lactonisation. Les réactions d'amidation en présence de DCC et de HOBt, et celles de lactonisation, avec DCC, DMAP et DMAP.HCl, ont été réalisées sans difficulté particulière avec de bons rendements. Les réactions d'estérification ont souvent nécessité une adaptation des conditions suivant la nature de l'alcool à introduire.

Les fonctions hydroxyles ont été engagées dans des réactions d'éthérification, d'oxydation, de fluoration et d'amination. L'éthérification de l'alcool tertiaire a été réalisée en présence de LiBr et de nBu$_4$NBr. Les rendements sont satisfaisants avec des alcools à chaîne courte mais diminuent ensuite lorsque la longueur de la chaîne augmente. Par contre, l'éthérification sélective de l'alcool secondaire ou primaire nécessiterait des protections, au préalable, de l'acide carboxylique et des autres alcools. La lactone avait été synthétisée dans le but d'obtenir un intermédiaire de synthèse protégeant l'alcool primaire et l'acide carboxylique. Mais, peu de réactions ont pu être faites à partir de cette molécule. La lactone a été diéthérifée en présence de $BF_3.Et_2O$. Concernant les réactions d'oxydation, un grand nombre de réactifs a été testé sans grand succès. Seul le réactif de Dess-Martin a réussi à oxyder la monensine, la lactone et la monensine oxodioxane avec des rendements convenables. Le DAST a, quant à lui, fluoré la lactone. Il est important de souligner que les réactions d'oxydation et de fluoration n'ont pas permis de réaliser des réactions sélectives au niveau de l'alcool secondaire, ce qui était recherché, mais ces réactifs ont entraîné une cascade de transformations conduisant aux composés dont la structure a été déterminée par analyses spectrométriques. Le mécanisme de ces dernières réactions n'est pas évident à déterminer.

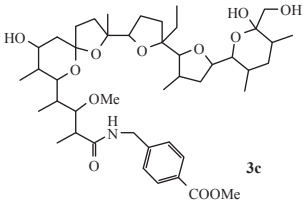
Par ailleurs, deux intermédiaires de synthèse ont été découverts, la monensine oxodioxane **6g** et la monensine oxolactone **16**. A cause de l'arrêt du sujet, peu de travaux ont été réalisés sur la réactivité du composé **16**, mais ce dernier reste intéressant. Par contre, certaines modifications de la monensine oxodioxane **6g** ont été réalisées : éthérification, estérification, oxydation et saponification. Cette étude préliminaire nous a permis de constater que le produit **6g** était un bon intermédiaire de synthèse. La petite lactone sur la partie terminale de la molécule protège les alcools primaire et tertiaire et laisse ainsi libres d'accès l'alcool secondaire et l'acide carboxylique.



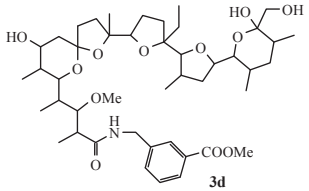
1a



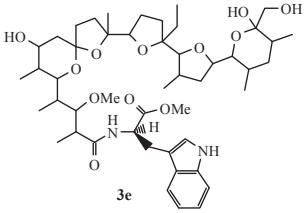
3b



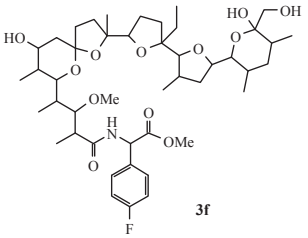
3c



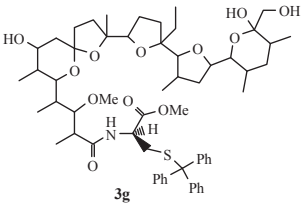
3d



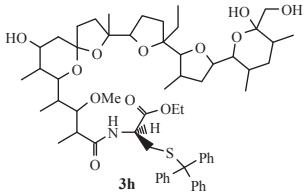
3e



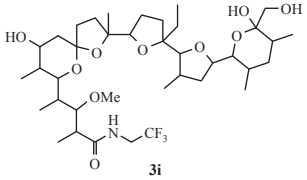
3f



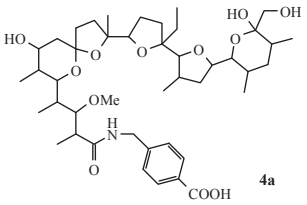
3g



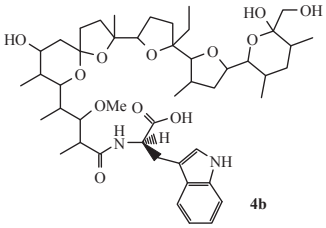
3h



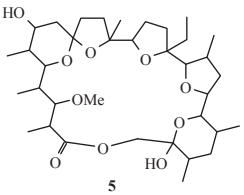
3i



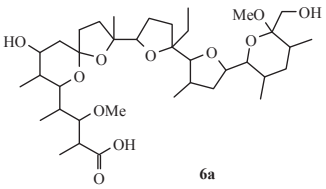
4a



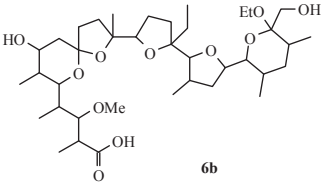
4b



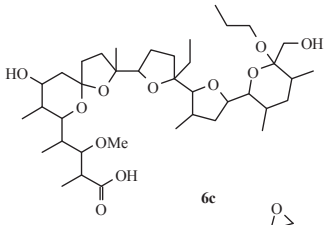
5



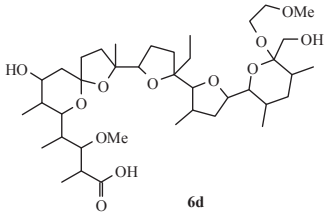
6a



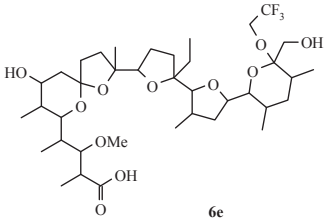
6b



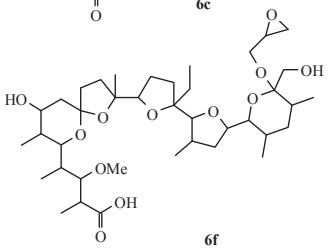
6c



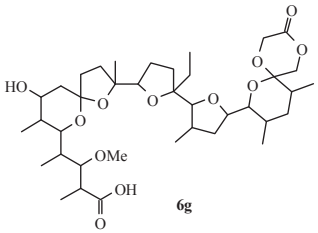
6d



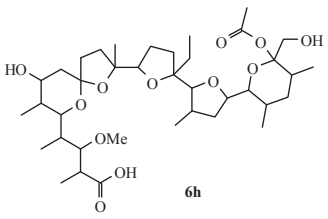
6e



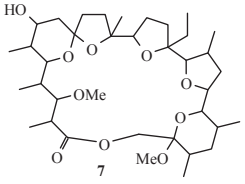
6f



6g



6h



7

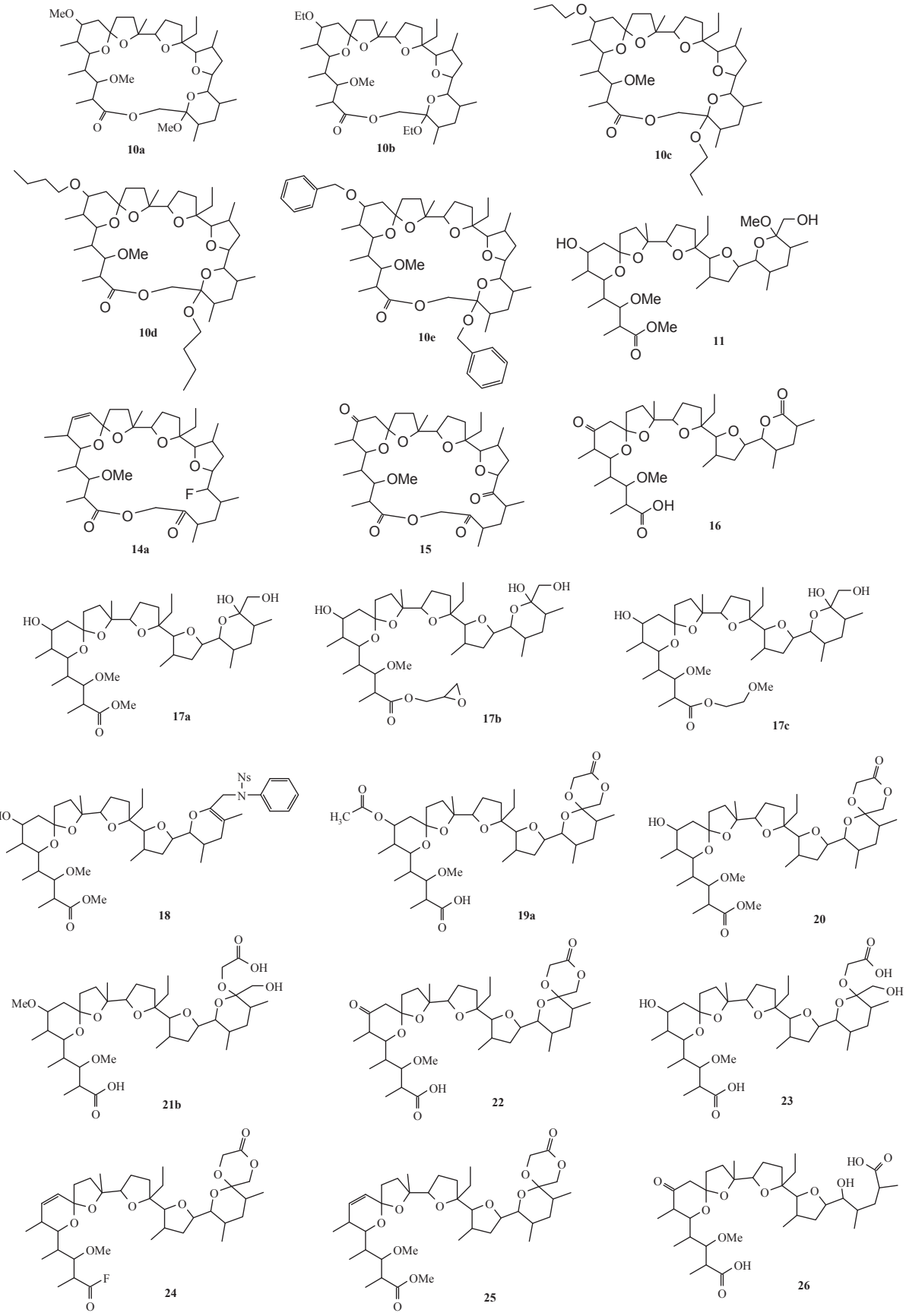


Figure 31 : Ensemble de molécules synthétisées

III – Résultats des tests biologiques

Disposant de quarante trois molécules originales, certaines ont été testées *in vitro* selon un test anticoccidien nouveau mis au point dans les laboratoires de Mérial. Les tests ont été effectués par Mimoun Maache, docteur en parasitologie.

Compte tenu de l'arrêt du sujet, seules quinze molécules synthétisées ont été testées *in vitro*. Le choix de ces composés a été, dans un premier temps, de façon systématique, puis nous les avons sélectionnés en tenant compte des résultats précédemment obtenus tout en essayant de tester une molécule par famille.

III-1 Principe du test

Le test *in vitro* permet d'évaluer l'efficacité des nouveaux polyéthers ionophores synthétisés vis-à-vis de la coccidie. Ce test permet d'effectuer une première sélection de molécules actives en prévision de tests *in vivo* sur le poulet. L'avantage d'un test *in vitro* est la possibilité de contrôler l'environnement de l'étude et d'observer l'impact d'un changement environnemental et du milieu sur le développement du parasite. De plus, son coût est nettement inférieur à celui d'un test sur l'animal ce qui rend plus abordable l'analyse d'un grand nombre de produits.

Dans le cas d'une culture cellulaire et d'un screening *in vitro*, le choix de la lignée cellulaire est l'un des facteurs clés pour obtenir une infection et un traitement propres. De plus, les conditions de culture sont également importantes pour pouvoir visualiser les différentes étapes du cycle de vie d'*Eimeria tenella*. En effet, si les différentes étapes du développement de l'*Eimeria* (gamogonie et schizogonie) peuvent être correctement observées, alors il est possible de tester les composés et de déterminer exactement leur mode d'action et à quelle étape de développement du parasite ils agissent.

Dans un premier temps, la cytotoxicité des composés est testée en déterminant la concentration d'inhibition IC_{50}. Elle correspond à la concentration en polyéther ionophore permettant la viabilité de 50% des cellules. Toutes les concentrations supérieures à l'IC_{50} seront exclues du test. Certaines concentrations plus faibles seront testées afin de déterminer la concentration qui permet l'élimination partielle ou totale du parasite ou l'inhibition de son développement.

Pour la prévention et le traitement, un composé est considéré comme efficace lorsqu'il n'est pas toxique ou que sa toxicité est faible pour les cellules hôtes et élevée pour la cible, dans notre cas le parasite. Son indice thérapeutique (dose létale pour 50% des animaux testés/dose d'efficacité maximale pour 50% des animaux testés) doit être élevé.

Le test de cytotoxicité est effectué dans des plaques à 96 puits. Des cellules bovines sont mises en culture et incubées pendant 24h à 40°C dans les puits. Puis, une concentration fixée allant de 50 µg/mL à 0,4 µg/mL en polyéther ionophore est ajoutée dans chacun des puits. Les cellules sont incubées à 40°C pendant 24h.

20 µL de « Cell Titer » sont additionnés à chacun des puits. Cette solution contenant un sel de tétrazole MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) permet une analyse colorimétrique du nombre de cellules vivantes. La figure 32 représente

une plaque 96 puits après addition de « Cell Titer ». L'intensité des couleurs dépend de la toxicité du polyéther ionophore testé. Plus la couleur est intense et plus la quantité de cellules vivantes est importante. En effet, le principe de « Cell Titer » est basé sur des réactions d'oxydoréduction qui se passent au niveau des mitochondries dans les cellules vivantes, le tétrazolium contenu dans le « Cell Titer » est réduit en formazan qui est violet (Schéma 36).

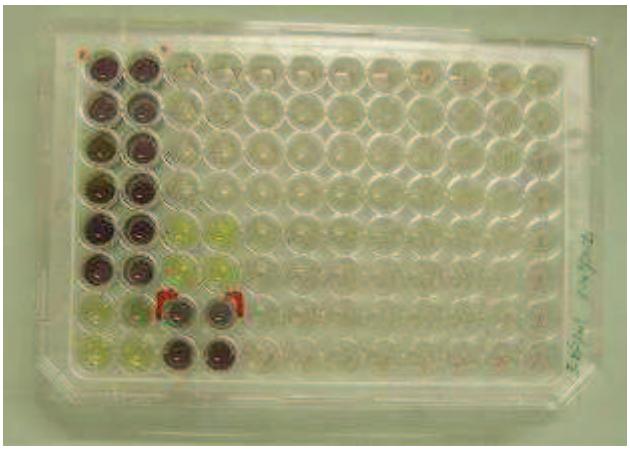


Figure 32 : Plaque 96 puits après l'addition de « Cell Titer »

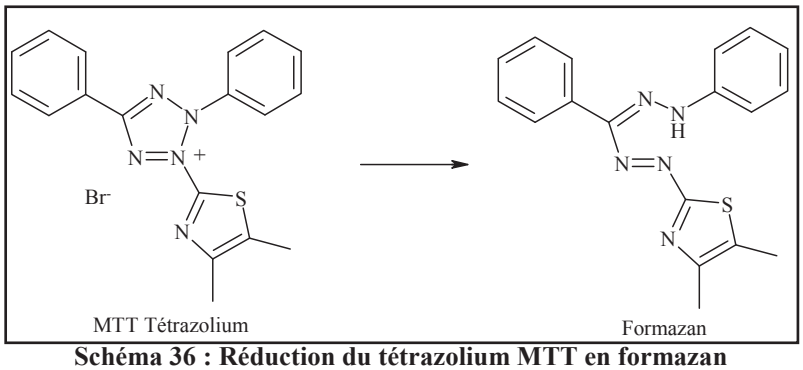


Schéma 36 : Réduction du tétrazolium MTT en formazan

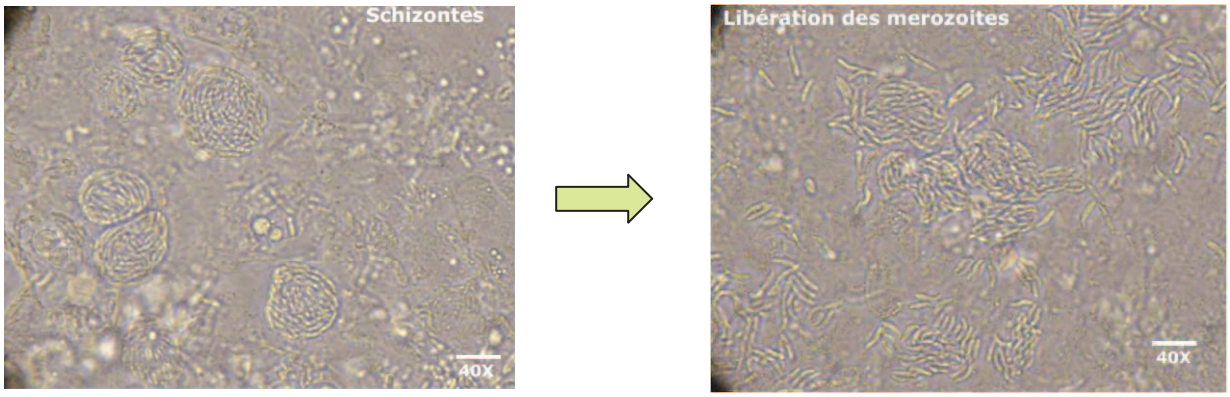
Les cellules sont à nouveau incubées pendant 30 min à 1h à 40°C, avant que la plaque ne soit lue dans un lecteur de plaques à une longueur d'onde de 490 nm (maximum d'absorption du formazan). Cette lecture permet de déterminer la densité optique (DO) de chacun des puits et elle permet d'accéder au pourcentage d'inhibition.

$$\%IC_{50} = (DO_{traité}/DO_{contrôle}) \times 100$$
$$\%viabilité = [1 - (DO_{traité}/DO_{contrôle})] \times 100$$

Une fois la concentration IC_{50} déterminée, le test est effectué sur des cellules infectées. La concentration de travail choisie est toujours inférieure à l'IC_{50}.

Après avoir mis des cellules en culture à 40°C dans chacun des puits d'une plaque à 96 puits, ces dernières sont traitées avec une concentration déterminée (< IC_{50}) de polyéther ionophore. Puis, les sporozoïtes d'*Eimeria tenella* sont excystés et les cellules infectées par les sporozoïtes purifiées. Après une incubation de 24h à 40°C, le milieu est changé. L'efficacité des molécules est évaluée microscopiquement après 40h et 48h. La libération des

mérozoïtes est observée (Figure 33). Ainsi, dans les cas explicites, les mérozoïtes libérés sont comptés, par contre dans les cas ambigus, la PCR (Poly Chain Reaction) quantitative pourra être utilisée (par manque de temps, cette méthode n'a pas été employée). Pour chacun des tests, un contrôle positif de traitement (avec la monensine **1a**) et un contrôle positif d'infection sont réalisés.



Schizonte (maturation)

Schizonte mature = libération des Mérozoïtes

Figure 33 : Libération des mérozoïtes

III-2 Molécules testées et résultats

Quinze molécules synthétisées ont été testées *in vitro*. Tout d'abord, la toxicité des dix premières vis-à-vis des cellules a été évaluée. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 19.

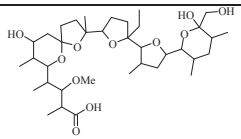
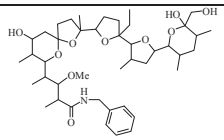
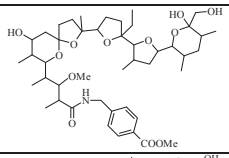
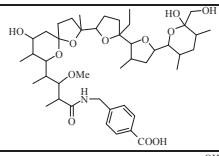
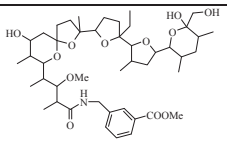
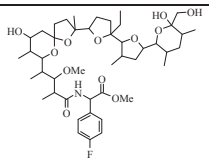
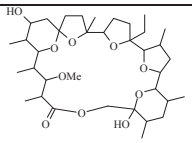
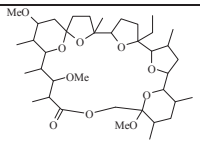
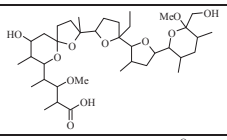
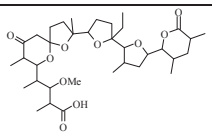
Entrée	***Nom***	***Molécules***	***IC_{50}***
1	Monensine acide **1a**		25,0 µg/ml
2	Amide **3b**		11,9µg/ml
3	Amide **3c**		18,5µg/ml
4	Amide **4a**		38,9µg/ml
5	Amide **3d**		> 50µg/ml
6	Amide **3f**		> 50µg/ml
7	Lactone **5**		9,0 µg/ml
8	Lactone **10a**		> 50µg/ml
9	Monensine éthérifiée **6a**		> 50µg/ml
10	Monensine oxolactone **16**		> 50µg/ml

Tableau 19 : Molécules testées des première et deuxième séries

La cytotoxicité a été déterminée en effectuant les mêmes tests que ceux décrits dans le paragraphe III-1. Le graphe ci-dessous (Figure 34) montre la détermination graphique de l'IC_{50} de l'amide **3b**, après lecture de la densité optique de chacun des puits de la plaque.

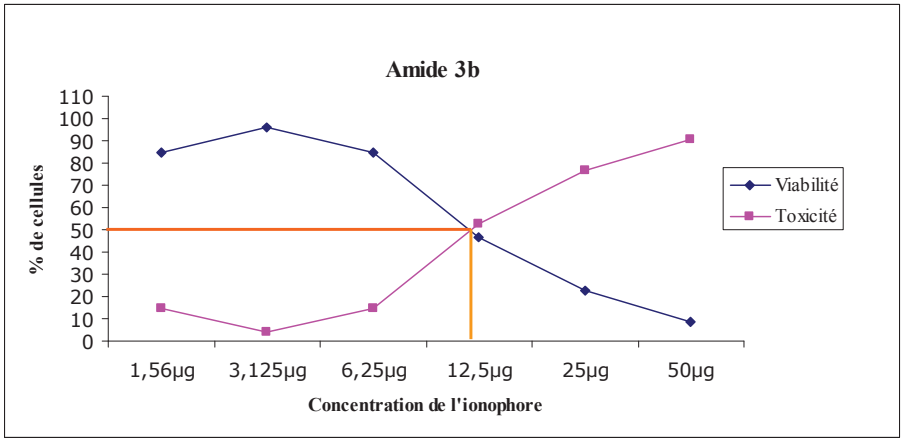
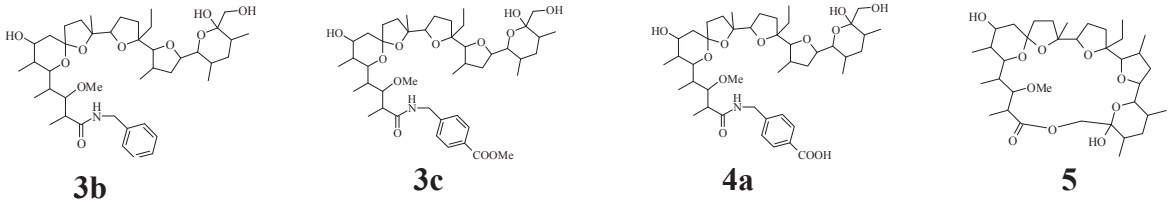
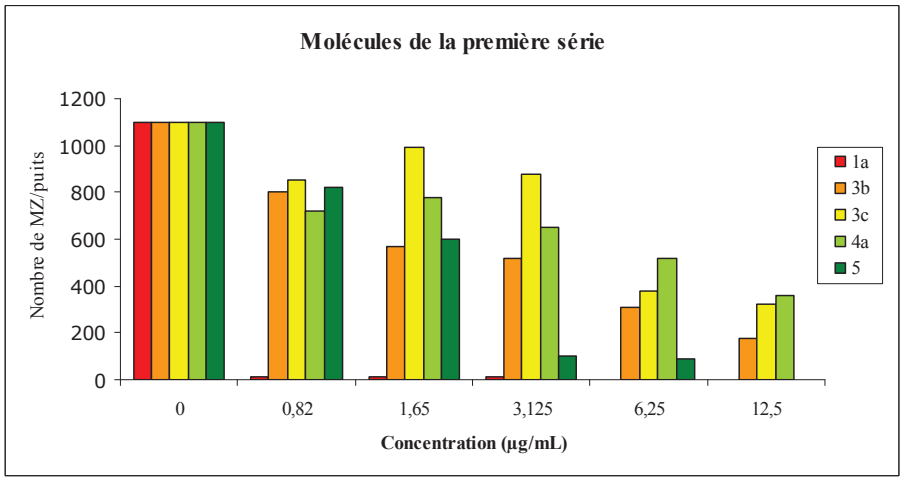


Figure 34 : Détermination graphique de l'IC_{50}

Dans un second temps, l'efficacité des quinze molécules synthétisées a été testée vis-à-vis d'*Eimeria tenella*. Trois séries de molécules ont été composées pour faire les tests biologiques.

Les molécules de la première série d'analyse, monensine acide **1a**, amide **3b**, amide **3c**, amide **4a** et lactone **5**, ont été testées à cinq concentrations différentes en présence du parasite. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 35.





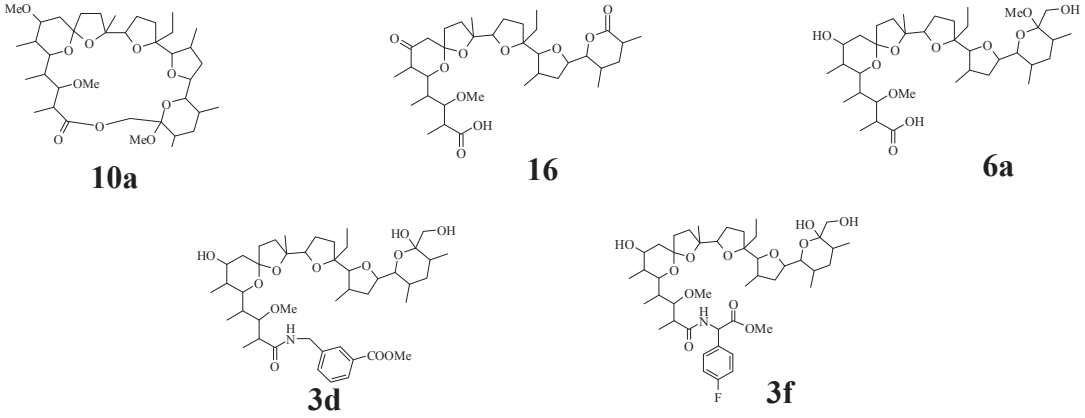
MZ = Mérozoïtes

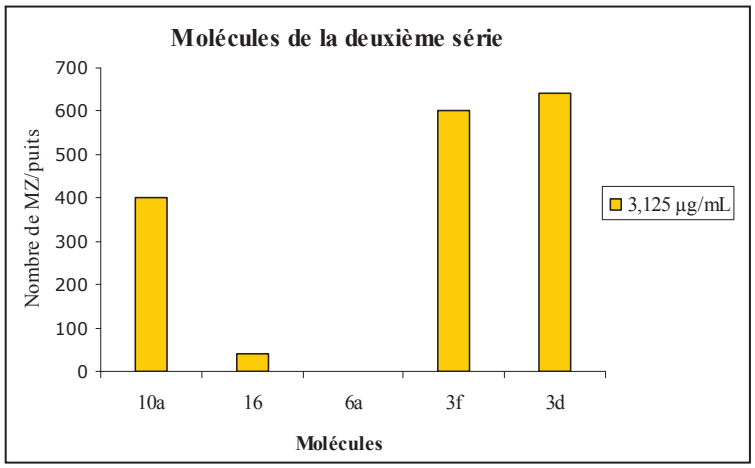
Figure 35 : Effet anticoccidien des molécules de la première série à cinq concentrations

L'étude du diagramme obtenu permet de conclure que les polyéthers ionophores **3b**, **3c** et **4a** n'inhibent pas l'évolution du parasite *Eimeria tenella in vitro*, mais la ralentissent.

Pour des concentrations élevées, supérieures ou égales à 12,5 µg/mL, la lactone **5** inhibe totalement la formation des mérozoïtes. La lactone a une activité non négligeable à 6,25 et à 3,125 µg/mL. La monensine acide, **1a**, montre, quant à elle, une activité très importante même aux concentrations les plus faibles. A des concentrations très faibles, elle inhibe fortement la formation des mérozoïtes.

Les molécules de la seconde série, amide **3d**, amide **3f**, monensine méthylée **6a**, lactone diéthérée **10a** et monensine oxydée **16**, ne présentent aucune toxicité pour les cellules bovines même à une concentration élevée (> 50 µg/mL). Elles n'ont été testées qu'à une seule concentration de 3,125 µg/mL, concentration de référence. Le nombre de mérozoïtes a été évalué dans chacun des cas (Figure 36).





MZ = Mérozoïtes

Figure 36 : Effet anticoccidien des molécules de la deuxième série à 3,125 µg/mL

Malheureusement, à cette concentration, les molécules **3d**, **3f** et **10a** ne montrent pas d'activité pour inhiber le développement du parasite *Eimeria tenella in vitro*. En effet, nous observons toujours la formation de mérozoïtes. Sur la photo ci-dessous (Figure 37) du test avec **10a**, nous observons une libération importante de mérozoïtes.

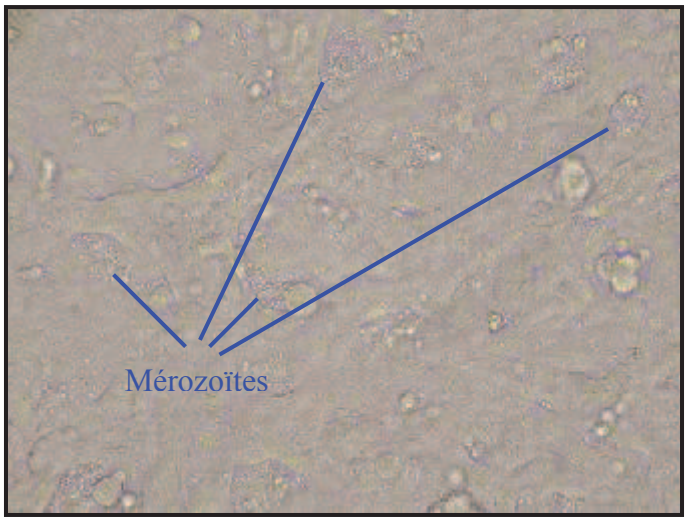


Figure 37 : Libération de mérozoïtes

La molécule **6a** montre une très forte toxicité vis-à-vis du parasite. Elle est capable de bloquer le développement du parasite *Eimeria tenella in vitro*. En effet, une absence de schizontes et de mérozoïtes est constatée (Figure 38).

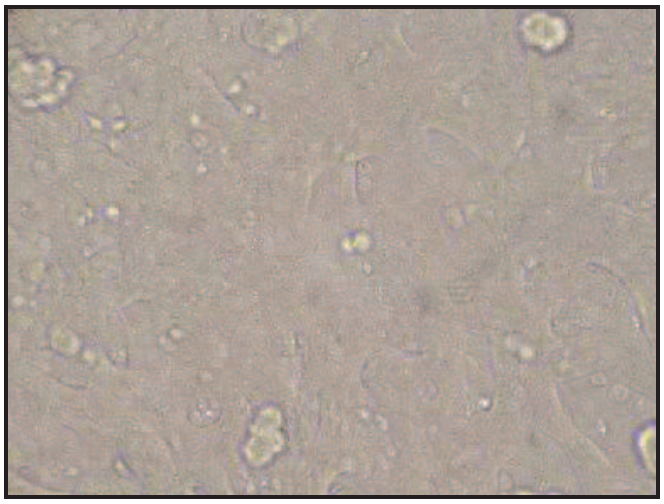


Figure 38 : Absence de mérozoïtes pour la molécule 6a

Même si elle n'inhibe pas totalement le développement du parasite, la molécule **16** montre une toxicité (efficacité) importante vis-à-vis du parasite. Cette toxicité se traduit par une formation très limitée de schizontes et de mérozoïtes. Ceci peut être aussi intéressant dans le cadre de la recherche d'une immunité naturelle du poulet lors d'une seconde contamination car le système immunitaire aura été, au préalable, stimulé.

Les molécules de la troisième série, **6g**, **15**, **22**, **23** et **26** (Tableau 20) ont été testées sur *Eimeria tenella* à différentes concentrations variant de 3,125 à 0,78 µg/mL.

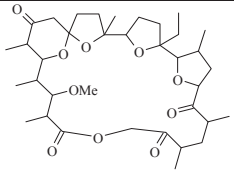
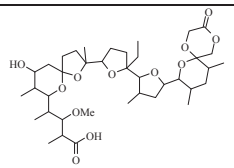
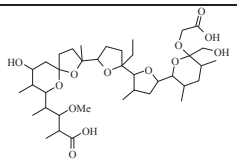
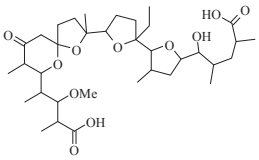
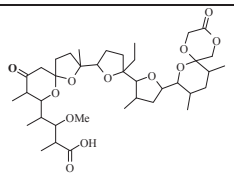
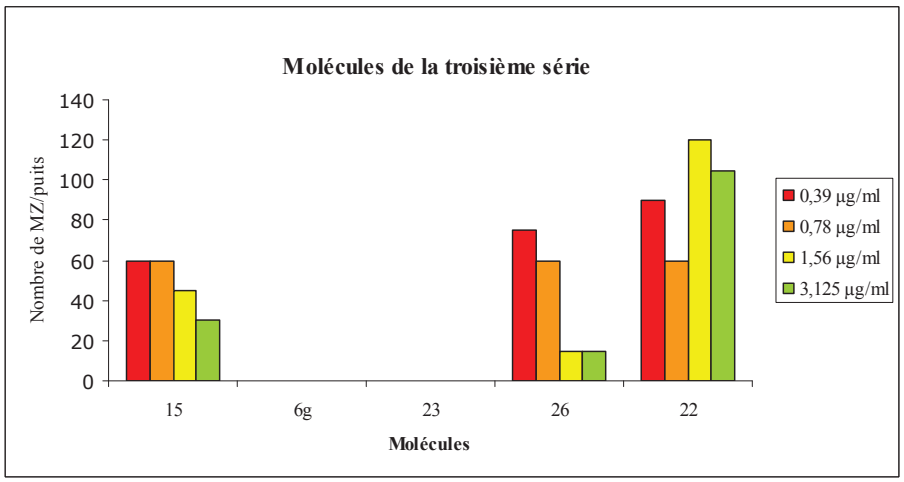
Entrée	*Nom*	*Molécules*
1	Lactone oxydée **15**	
2	Monensine oxodioxane **6g**	
3	Monensine oxodioxane saponifiée **23**	
4	Monensine oxolactone saponifiée **26**	
5	Monensine oxodioxane oxydée **22**	

Tableau 20 : Molécules testées de la troisième série

Le nombre de mérozoïtes et le nombre de schizontes ont été déterminés pour chaque molécule aux quatre concentrations : 0,39µg/mL, 0,78 µg/mL, 1,56 µg/mL et 3,125 µg/mL (Figure 39).



MZ = Mérozoïtes

Figure 39 : Effet anticoccidien des molécules de la troisième série à quatre concentrations

A des concentrations très faibles (< 0,39 µg/mL), les molécules **6g** et **23** montrent une activité très importante et efficace vis-à-vis d'*Eimeria tenella*. En effet, ces deux molécules inhibent totalement son développement *in vitro*. Les résultats obtenus pour les molécules **15**, **26** et **22** montrent qu'elles n'inhibent pas le parasite aux faibles concentrations. Par contre, à

des concentrations supérieures à 1,56 µg/mL, la monensine oxolactone saponifiée **26** a une activité non négligeable sur le parasite.

La figure (Figure 40) ci-dessous récapitule l'activité anticoccidienne de chaque composé à 3,125 µg/mL.

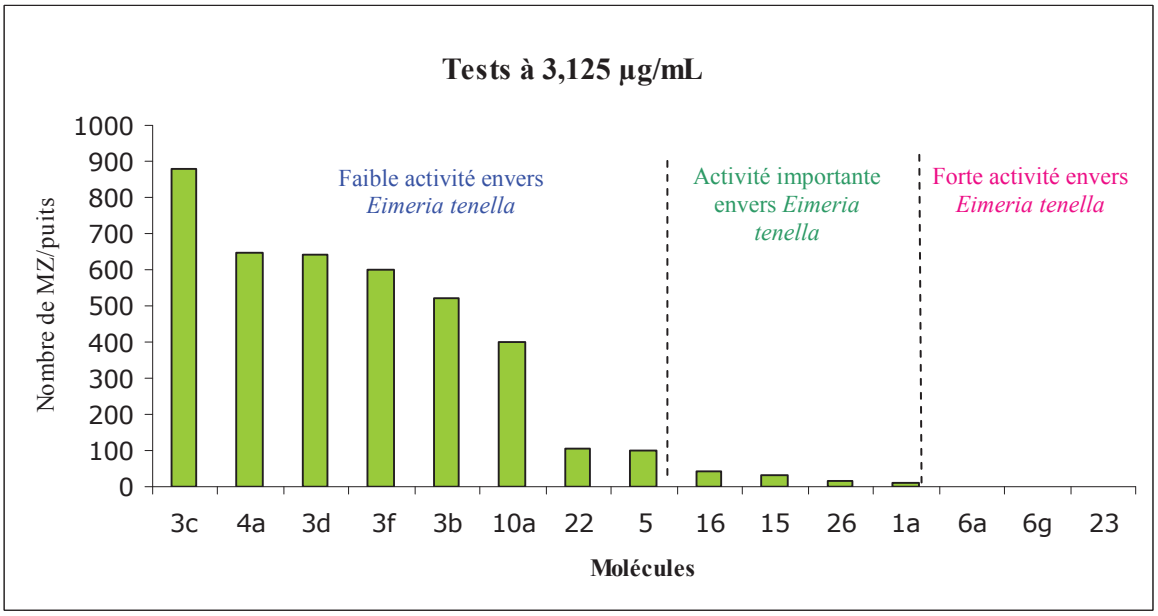


Figure 40 : Effet anticoccidien des molécules à 3,125 µg/mL

Cet histogramme permet de conclure que l'activité anticoccidienne dépend de la structure de la molécule et des fonctions présentes. Ainsi, nous pouvons observer que les composés possédant une fonction amide (**3c**, **4a**, **3d**, **3f** et **3b**) ont un faible effet anticoccidien. La forme lactonisée semble moins intéressante que la forme ouverte, en effet, la lactone (**5**) est moins active que la monensine acide (**1a**). La diéthérification de la lactone (**10a**) contribue également à une diminution de son efficacité.

Par contre, nous remarquons que la présence de carbonyles augmente l'activité. La saponification de la monensine oxodioxane **6g**, de même que celle de la monensine oxolactone **16**, conduisant respectivement aux composés **23** et **26**, contribue à augmenter l'activité des composés non saponifiés. Cette accroissement de l'efficacité est probablement due à la présence de deux fonctions acides sur la molécule, qui engendrent la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires fortes, favorisant ainsi le transport des ions au travers la membrane. Il est possible que les lactones terminales des monensines oxodioxane et oxolactone soient une fonction acide carboxylique masquée qui s'hydrolysent dans le milieu physiologique.

L'oxydation de la monensine oxodioxane, formant le produit **22**, entraîne une diminution de son activité anticoccidienne. Tandis que celle de la lactone, donnant le composé **15**, l'augmente de façon significative.

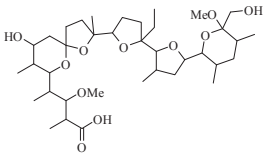
Les composés **6a** (monensine méthylée en position 25), **6g** (monensine oxodioxane) et **23** (monensine oxodioxane saponifiée) présentent une activité anticoccidienne supérieure à celle de la monensine acide. Les molécules **26** (monensine oxolactone saponifiée), **15** (lactone oxydée) et **16** (monensine oxolactone) ont, quand à elle, une efficacité envers *Eimeria tenella* du même ordre de grandeur que celle de la monensine. Aucune corrélation entre l'activité et le logP ne peut être établie au vue des résultats obtenus.

Conclusions

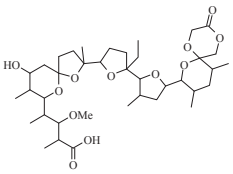
Jusqu'en 2008, date du début de la thèse, très peu d'études avaient été réalisées sur la modification synthétique de la monensine. En 18 mois de thèse, nous avons étudié un très grand nombre de réactifs et appliqué plusieurs réactions utilisables sur ce type de molécules complexes. Certaines molécules synthétisées peuvent être considérées comme des plates-formes permettant de créer de nouvelles familles dont certaines ont conduit à des résultats biologiques intéressants.

Nous avons synthétisé quarante trois molécules issues de réactions diverses d'amidation, de lactonisation, d'éthérification, d'estérification, d'amination, de fluoration et d'oxydation. Ces composés ont été isolés par colonne chromatographique et caractérisés, pour la majorité, par RMN ^{1}H, ^{13}C et DEPT et par spectrométrie de masse.

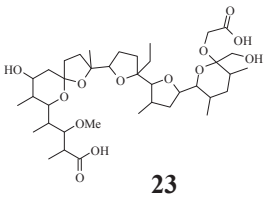
Quinze nouveaux polyéthers ionophores ont été transmis à Merial, plus particulièrement au Dr Mimoun Maache pour qu'ils soient testés grâce aux tests *in vitro* mis en place. Parmi ces composés, trois d'entre eux (**6a**, **6g** et **23**) ont montré une activité très importante vis-à-vis du parasite *Eimeria tenella*. La molécule **6a** avait déjà été synthétisée par Sakakibara et al mais pas testée, par contre les composés **6g** et **23** sont entièrement nouveaux. Un autre polyéther a montré des résultats satisfaisants et encourageants. Il s'agit de la monensine oxolactone **16**. Ces quatre molécules offrent des cytotoxicités très faibles pour une grande activité. Cette caractéristique peut être importante dans le cas d'une activité anti-parasitaire, quelque soit le parasite ciblé.



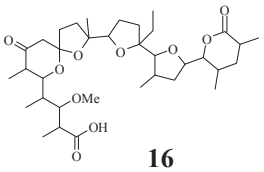
6a



6g



23



16

Au cours de ces 18 mois, nous avons trouvé trois familles de molécules qui sont actives vis-à-vis du parasite *Eimeria tenella*. Ces dernières, obtenues après une ou deux étapes de synthèse, offrent de nouvelles pistes de recherche. Nous avons, par ailleurs, commencé à travailler sur la famille de la monensine oxodioxane **6g**.

Suite aux tests biologiques, nous pouvons donner quelques conclusions. Ces analyses nous ont montré que la fonction amide n'est pas intéressante contrairement à la fonction ester, surtout sous la forme lactone. La présence de fonctions oxygénées est un facteur qui semble très important et non négligeable. La partie terminale de la monensine composée initialement de fonctions donneuses de liaisons hydrogène peut être protégée sous diverses formes (lactone, éther, …) sans que cela nuise à l'activité, au contraire celle-ci en est parfois améliorée. Par opposition à l'hypothèse initiale, la partie terminale de la monensine ne semble pas être primordiale pour la formation d'une cavité autour de l'ion sodium. Ces travaux de recherche ont donné lieu à un brevet, déposé en avril 2011.

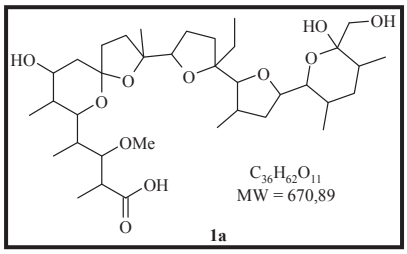
La recherche de nouveaux anti-coccidiens par la modification de la monensine est un sujet qui reste attractif et d'actualité, dont les possibilités sont importantes.

IV - Partie expérimentale

All newly synthesized molecules were analysed by NMR ^{1}H, ^{13}C, DEPT and by mass spectrometry high resolution (with the device Thermofinnigan MAT 95 XL). To determine the integration of signals in NMR, 2D NMR HSQC was performed for some molecules. Moreover, for the fluorinated molecules, a ^{19}F NMR was carried out. NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 300 and 400. Chemical shifts are given in ppm and coupling constants are reported in Hz.

IV-1 Preparation of monensin acid **1a**

The monensin sodium salt **1** (20.0 g, 29 mmol) was dissolved in methanol (200 mL). Monensin was, then, precipitated by adding slowly water (120 mL) to the methanol solution. The reaction mixture was stirred for 15 minutes. The white salt obtained was filtered off and dried under vacuum. It was, then, dissolved in chloroform (100 mL) and stirred vigourously for 1h at room temperature with a layer of aqueous perchloric acid (1M). The chloroform layer was washed with distilled water until the washings were neutral, and then evaporated to dryness. The obtained powder (20 g, 100%) was dried under vacuum stored at -20°C.



Yield : 100%

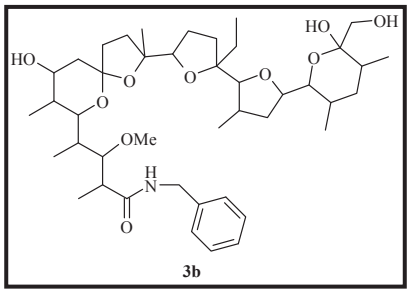
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 6.05 (5H, s), 4.32 (1H, m), 4.06 (1H, d, J=11.7 Hz), 3.96 (2H, m), 3.85 (1H, s), 3.72 (1H, d, J=10.9 Hz), 3.48 (1H, d, J=10.9 Hz), 3.40 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.22 (1H, dd, J=10.2 Hz), 2.62 (1H, m), 2.19 (5H, m), 1.94 (3H, m), 1.47 (20H, m), 1.17 (1H, s), 1.09 (3H, d, J=8.4 Hz), 0.89 (15H, m).

IV-2 General procedure for the amidification of monensin acid

A mixture of monensin acid **1a** (1 equiv.) and HOBt (1.2 equiv.) in THF was stirred at 5°C for 30 min and then DCC (1.2 equiv.) was added. After being stirred for 1h, the reaction mixture was treated with benzylamine (1.3 equiv.), and stirring was maintained at room temperature during 4 days. The mixture was evaporated to dryness to afford a powder, which was suspended in AcOEt (6 mL) and filtered off. The organic phase was washed with 10% citric acid solution (3 mL), saturated $NaHCO_3$ (3 mL) and distilled water (3 mL), successively, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness to afford the desired amide.

- **1-benzylamidomonensin 3b**

Procedure: monensin acid **1a** (500 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), HOBt (127 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.), DCC (186.7 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.) and benzylamine (110 µL, 0.98 mmol, 1.3 equiv.), THF (5 mL).



3b

Yield : 73%
m = 417.5 mg

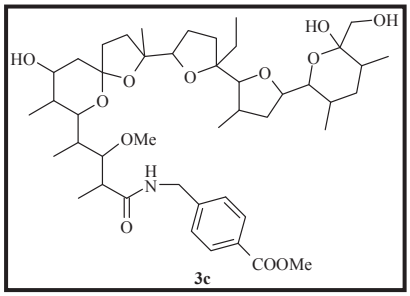
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.24 (5H, m), 4.91 (1H, s), 4.58 (1H, s), 4.46-4.34 (2H, m), 4.27 (1H, m), 4.12 (1H, dd, J_1=7.8 Hz, J_2=2 Hz), 3.91 (1H, d, J=4.3 Hz), 3.86 (1H, dd, J_1=9.6 Hz, J_2=2.8 Hz), 3.70 (1H, s), 3.50 (1H, m), 3.39-3.35 (5H, m), 2.51 (1H, m), 2.24-2.01 (3H, m), 2.00-1.85 (3H, m), 1.82-1.60 (8H, m), 1.53-1.34 (11H, m), 1.22 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.99 (3H, d, J= 6.8 Hz), 0.91-0.76 (15H, m).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.20, 139.26, 128.57, 128.54, 127.69, 127.06, 107.90, 97.64, 86.57, 86.08, 85.51, 83.24, 82.46, 76.69, 74.97, 71.25, 67.67, 67.43, 58.93, 49.24, 43.25, 42.45, 39.00, 37.47, 36.93, 36.69, 35.08, 34.75, 34.51, 33.37, 33.12, 32.76, 31.13, 30.30, 27.68, 26.65, 17.35, 16.35, 15.52, 14.05, 12.93, 11.00, 8.36.

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{43}H_{69}O_{10}NNa^+$ = 782.4819, found = 782.4820.

- **1-(4-methylbenzoate)methyleneamidomonensin 3c**

Procedure: monensin acid **1a** (500 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), HOBt (127 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.), DCC (187.5 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.), methyl 4-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (198.6 mg, 0.98 mmol, 1.3 equiv.) and *N*-methylmorpholine (110 µL, 0.98 mmol, 1.3 equiv.), THF (5 mL).



3c

Yield : 93%
m = 585.9 mg

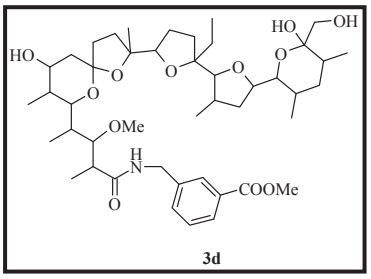
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.95 (2H, d, J=8.3 Hz), 7.52 (1H, t, J=5.8 Hz), 7.35 (2H, d, J=8.3 Hz), 4.67 (1H, m), 4.47 (2H, qd, J_1=6.3 Hz, J_2=15.6 Hz), 4.30 (1H, m), 4.13 (1H, m), 3.96 (1H, d, J=4.3 Hz), 3.90 (5H, m), 3.72 (1H, s), 3.50 (1H, q), 3.39 (6H, m), 2.99 (1H, s), 2.53 (1H, m), 2.25-2.16 (2H, m), 2.13-2.05 (1H, m), 2.04-1.87 (3H, m), 1.86-1.83 (1H, d, J=10.3 Hz), 1.74-1.24 (20H, m), 1.01 (3H, d, J=7.1 Hz), 0.92 (6H, m), 0.83 – 0.72 (9H, m).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.66, 167.18, 144.87, 129.88, 128.83, 127.42, 107.94, 97.85, 86.35, 86.06, 85.39, 83.16, 82.16, 74.53, 71.14, 67.65, 67.37, 59.01, 52.13, 42.90, 42.31, 38.96, 37.57, 36.98, 36.63, 35.08, 34.59, 34.48, 34.07, 33.33, 33.29, 32.73, 31.18, 30.50, 27.63, 26.95, 17.32, 16.41, 15.47, 14.35, 12.92, 10.93, 8.43.

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{45}H_{71}O_{12}NNa^+$ = 840.4874, found = 840.4873.

- **<u>1-(3-methylbenzoate)methyleneamidomonensin 3d</u>**

<u>Procedure</u> : monensin acid **1a** (507.9 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), HOBt (124.3 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.), DCC (190.4 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.), methyl 3-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (199.4 mg, 0.98 mmol, 1.3 equiv.) and *N*-methylmorpholine (110 µL, 0.98 mmol, 1.3 equiv.), THF (5 mL).



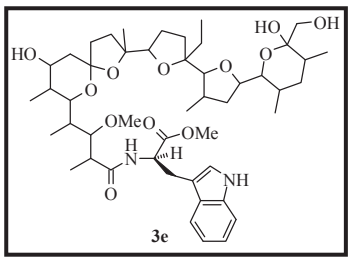
3d

Yield : 90%
m=549.2 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.94 (1H, s), 7.89 (1H, d, J=7.8 Hz), 7.49 (1H, d, J=7.8 Hz), 7.38-7.33 (2H, m), 5.08 (1H, s), 4.63 (1H, d, J=7.5 Hz), 4.51-4.40 (2H, m), 4.30 (1H, m), 4.15 (1H, dd, J_1=2.0 Hz, J_2=7.8 Hz), 3.92-3.88 (6H, m), 3.71 (1H, s), 3.52 (1H, dd, J_1=5.6 Hz, J_2=10.1 Hz), 3.40-3.35 (6H, m), 2.56-2.53 (1H, m), 2.24-2.21 (2H, m), 2.03-1.97 (1H, m), 1.96-1.87 (3H, m), 1.84-1.64 (6H, m), 1.61-1.55 (1H, m), 1.54-1.35 (11H, m), 1.25 (3H, d, J=7.04 Hz), 1.01 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.92-0.89 (6H, m), 0.83-0.75 (9H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.50, 167.15, 139.83, 132.27, 130.39, 128.66, 128.37, 107.91, 97.64, 86.52, 85.97, 85.60, 83.22, 82.40, 76.62, 74.94, 71.25, 67.63, 67.50, 58.96, 52.17, 42.86, 42.38, 38.96, 37.50, 36.98, 36.60, 35.12, 34.70, 34.45, 33.36, 33.17, 32.70, 31.10, 30.44, 27.69, 26.77, 17.33, 16.31, 15.47, 14.11, 12.92, 10.95, 8.38.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{45}H_{71}O_{12}NNa^+$ = 840.4868, found = 840.4867.

- **<u>(R)-methyl 2'-(monensinamido)-3'-(1'H-indol-3'-yl)propanoate 3e</u>**

<u>Procedure</u> : monensin acid **1a** (200 mg, 0.30 mmol, 1 equiv.), HOBt (49.2 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv.), DCC (74.2 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv.), methyl-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanaote hydrochloride (99.8 mg, 0.39 mmol, 1.3 equiv.) and *N*-methylmorpholine (45 µL, 0.39 mmol, 1.3 equiv.), THF (2 mL).



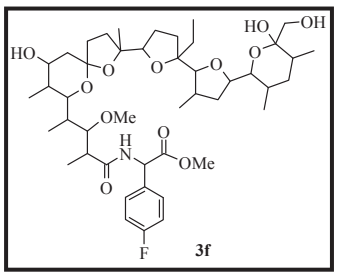
3e

Yield : 95%
m=247.3 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 9.11 (1H, s), 7.49 (1H, d, J=7.9 Hz), 7.39 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.14 (1H, td, J_1=1.0 Hz, J_2=7.1 Hz), 7.07 (2H, m), 6.80 (1H, d, J=7.4 Hz), 4.83 (1H, m), 4.55 (1H, d, J=9.4 Hz), 4.3 (1H, m), 4.05 (1H, dd, J_1=2.4 Hz, J_2=6.8 Hz), 3.95 (1H, d, J=4.6 Hz), 3.89 (1H, d, J_1=3.0 Hz, J_2=10.1 Hz), 3.65 (3H, m), 3.55 (3H, m), 3.35 (2H, dd, J_1=5.2 Hz, J_2=14.7 Hz), 3.28 (1H, d, J=5.4 Hz), 3.23 (3H, m), 2.69 (1H, m), 2.53 (1H, m), 2.29 (1H, m), 2.16 (2H, m), 1.90 (3H, m), 1.79-1.58 (7H, m), 1.57-1.28 (11H, m), 1.15 (3H, m), 0.98-0.85 (16H, m), 0.56 (3H, d, J=7.0 Hz).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.00, 172.69, 136.51, 127.61, 123.59, 122.01, 119.35, 118.67, 111.50, 109.57, 107.83, 97.65, 86.55, 86.39, 85.61, 84.50, 83.56, 83.39, 75.51, 71.35, 67.42, 67.24, 57.78, 52.38, 49.28, 41.75, 38.97, 37.36, 37.11, 36.94, 34.94, 34.38, 34.09, 33.39, 32.93, 31.30, 30.10, 27.86, 27.58, 26.73, 25.75, 25.08, 17.51, 15.80, 13.41, 12.44, 10.90, 8.34.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{48}H_{74}O_{12}N_2Na^+$ = 893.5139, found = 893.5140.

- **Methyl 2'-(monensinamido)-2'-(4'-fluorophenyl)acetate 3f**

Procedure : monensin acid **1a** (370 mg, 0.55 mmol, 1 equiv.), HOBt (89.9 mg, 0.66 mmol, 1.2 equiv.), DCC (136.8 mg, 0.66 mmol, 1.2 equiv.) and 4-fluoro-DL-alpha-phenylglycine methanoate (133.1 mg, 0.72 mmol, 1.3 equiv.), THF (4 mL).



3f

Yield : 94%
m=433.9 mg

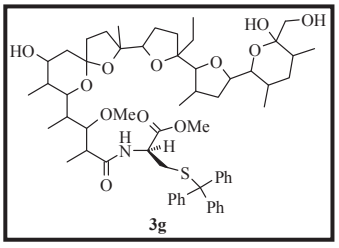
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 8.62-8.58 (1H, m), 7.40-7.31 (2H, m), 7.08-7.00 (2H, td, J_1=2.2 Hz, J_2=8.8 Hz), 5.55 (1H, dd, J_1=7.6 Hz, J_2=43.8 Hz), 4.31-4.26 (1H, m), 4.18-4.10 (1H, m), 3.92 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.89-3.75 (2H, m), 3.70 (3H, s), 3.69-3.49 (2H, m), 3.45-3.37 (4H, m), 3.29 (1H, m), 2.60-2.57 (1H, m), 2.27-2.20 (1H, m), 2.18-1.62 (12H, m), 1.55-1.30 (8H, m), 1.28-1.18 (3H, m), 1.03-0.73 (21H, m).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.05, 171.18, 163.66, 161.25, 129.66 (t, J=8 Hz), 116.15 (dd, J_1=4 Hz, J_2=22 Hz), 107.58, 97.39, 86.83, 86.32, 85.81, 83.62, 82.59, 76.86, 75.88, 71.69, 68.23, 67.56, 59.20, 58.80, 56.03 (d, J=65.2 Hz), 42.91, 39.40, 37.35, 37.23, 37.00, 35.23, 34.92, 33.75, 33.13, 33.09, 31.33, 30.27, 28.08, 26.30, 17.72, 16.72, 15.96, 14.28, 13.08, 11.46, 11.23, 8.60.

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{45}H_{70}O_{12}NFNa^+$ = 858.4780, found = 858.4781.

- **(S)-methyl 2'-monensinamido-3'-(tritylthio)propanoate 3g**

Procedure : monensin acid **1a** (1.01 g, 1.49 mmol, 1 equiv.), HOBt (242.3 mg, 1.79 mmol, 1.2 equiv.), DCC (376.8 mg, 1.79 mmol, 1.2 equiv.), trytilated cysteine methanoate hydrochloride (807.3 mg, 1.95 mmol, 1.3 equiv.) and *N*-methylmorpholine (215 µL, 1.95 mmol, 1.3 equiv.), THF (10 mL).



3g

Yield : 93%
m=1.44 g

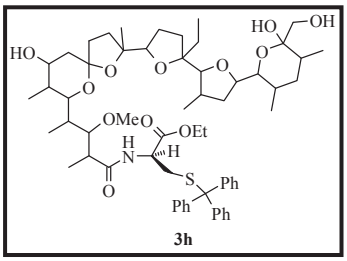
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.45-7.20 (15H, m), 6.86 (1H, d, J=7.6 Hz), 4.53 (1H, q, J=6.4 Hz), 4.27 (1H, m), 4.07 (1H, dd, J_1=2.0 Hz, J_2=8.6 Hz), 3.91 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.84-3.80 (1H, m), 3.75-3.65 (5H, m), 3.60-3.56 (1H, m), 3.50-3.44 (4H, m), 3.36 (3H, s), 2.70 (1H, dd, J_1=4.8 Hz, J_2=12.1 Hz), 2.56-2.48 (2H, m), 2.27 (1H, m), 2.14 (2H, m), 2.00-1.63 (10H, m), 1.60-1.30 (10H, m), 1.27-1.19 (2H, m), 1.01-0.83 (21H, m).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.47, 171.10, 144.52, 129.61, 128.07, 126.90, 107.72, 97.34, 87.20, 86.48, 85.54, 83.39, 81.93, 76.80, 75.84, 71.30, 68.06, 67.33, 66.66, 58.35, 52.55, 51.33, 42.34, 39.19, 36.93, 36.55, 35.06, 34.97, 34.64, 34.06, 33.83, 33.57, 32.97, 32.58, 31.15, 27.91, 25.83, 25.08, 23.75, 17.47, 16.38, 15.77, 13.38, 12.81, 11.15, 8.23.

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{59}H_{83}O_{12}NSNa^+$ = 1052.5534, found =1052.5535.

▪ **(S)-ethyl 2'-(monensinamido)-3'-(tritylthio)propanoate 3h**

Procedure : monensin acid **1a** (200 mg, 0.30 mmol, 1 equiv.), HOBt (49.0 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv.), DCC (75.9 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv.), trytilated cysteine ethanoate hydrochloride (116.4 mg, 0.27 mmol, 0.91 equiv.) and *N*-methylmorpholine (45 µL, 0.39 mmol, 1.3 equiv.), THF (2 mL).



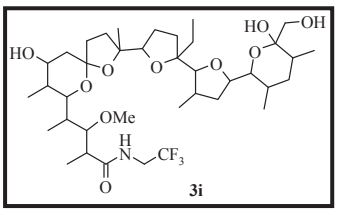
3h

Yield : 67%
m=204.8 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.43-7.35 (6H, m), 7.37-7.18 (9H, m), 4.55-4.50 (1H, m), 4.29-4.24 (1H, m), 4.17-4.11 (2H, m), 4.10-4.05 (1H, m), 3.86 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.83-3.75 (1H, m), 3.73-3.65 (1H, m),3.64-3.57 (1H, m), 3.50-3.47 (3H, m), 3.39-3.36 (3H, m), 2.69 (1H, dd, J_1=5.0 Hz, J_2=12.1 Hz), 2.58-2.50 (2H, m), 2.35-2.21 (1H, m), 2.19-2.03 (4H, m), 1.99-1.89 (4H, m), 1.87-1.63 (6H, m), 1.62-1.32 (9H, m), 1.28-1.19 (6H, m), 1.04-0.81 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 174.36, 170.23, 147.00, 144.49, 129.88, 128.35, 127.17, 107.70, 97.55, 89.58, 86.95, 86.05, 83.78, 82.01, 77.63, 76.94, 71.61, 68.51, 67.76, 61.96, 58.50, 51.67, 42.65, 39.52, 37.22, 37.09, 36.66, 35.45, 34.92, 34.22, 33.97, 33.23, 32.65, 31.38, 30.02, 28.27, 25.90, 21.48, 17.75, 16.60, 16.05, 14.51, 13.53, 13.04, 11.44, 8.45.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{60}H_{85}O_{12}NSNa^+$ =1066.5690, found =1066.5691.

▪ **1-trifluoroethanamidomonensin 3i**

Procedure : monensin acid **1a** (502.2 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), HOBt (123.1 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.), DCC (189.5 mg, 0.90 mmol, 1.2 equiv.), trifluoroethanamine hydrochloride (136.0 mg, 0.98 mmol, 1.3 equiv.) and *N*-methylmorpholine (110 µL, 0.98 mmol, 1.3 equiv.), THF (5 mL).



3i

Yield : 18%
m=100 mg

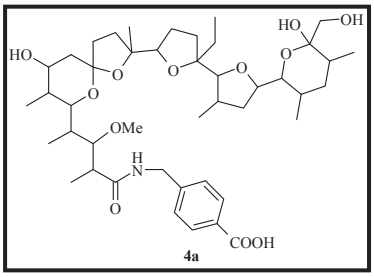
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.46 (1H, s), 4.32 (1H, m), 4.14 (1H, d, J=6.8 Hz), 3.97-3.85 (4H, m), 3.78 (1H, d, J=2.2 Hz), 3.50 (3H, s), 3.41 (4H, m), 2.56-2.53 (1H, m), 2.27-2.18 (2H, m), 2.17-2.05 (1H, m), 2.04-1.96 (4H, m), 1.84 (1H, d, J=10.6 Hz), 1.76-1.36 (16H, m), 1.23 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.02 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.94-0.85 (15H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 177.06, 124 (q, J=277.0 Hz), 107.98, 97.84, 86.45, 86.08, 85.51, 83.20, 81.91, 77.36, 74.68, 71.19, 67.80, 67.38, 58.87, 42.10, 40.59 (q, J=33.54 Hz), 38.98, 37.44, 36.94, 36.62, 35.18, 34.63, 34.48, 33.37, 32.76, 31.16, 30.55, 27.67, 26.98, 25.06, 17.35, 16.35, 15.47, 14.03, 12.89, 10.87, 8.44.
NMR ^{19}F (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : -72.71 (t, J=9.7 Hz).
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{64}O_{10}NF_3Na^+$ = 774.4375, found =774.4388.

IV-3 General procedure for the saponification

The ester part of amidomonensin (1 equiv.) in 1N NaOH (5 mL) containing THF-MeOH-H_2O (2 : 2 : 1) was stirred at room temperature for 6 h. Then the mixture was evaporated to dryness to give a powder, which was suspended in AcOEt (6 mL) and filtered off. The solid was washed several times with dichloromethane and the filtrate was evaporated to dryness to afford the desired acid.

- **1-(benzoic acid)methyleneamidomonensin 4a**

Procedure : 1-(4-methylbenzoate)methyleneamidomonensin **3c** (585.9 mg, 0.72 mmol, 1 equiv.).



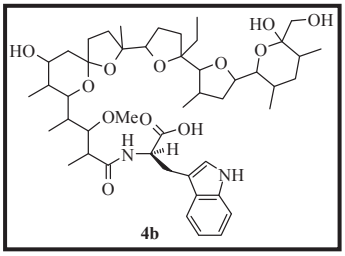
4a

Yield : 57%
m=332.6 mg

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.47 (2H, d, J=7.3 Hz), 6.79 (2H, d, J=7.3 Hz), 4.90 (1H, m), 4.69 (1H, m), 4.45-4.20 (2H, m), 4.01 (3H, m), 3.89-3.78 (2H, m), 3.61-3.55 (4H, m), 3.51-3.40 (1H, m), 3.30 (2H, d, J=10.6 Hz), 2.26-2.08 (5H, m), 2.03-1.83 (4H, m), 1.72-1.61 (6H, m), 1.58-1.49 (2H, m), 1.48-1.31 (4H, m), 1.24 (3H, m), 1.17-1.08 (3H, m), 1.04-0.69 (15H, m), 0.54 (3H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.21, 171.67, 136.93, 129.61, 125.73, 121.20, 108.32, 97.92, 89.94, 86.06, 83.56, 81.35, 75.22, 73.74, 69.08, 67.82, 63.98, 62.70, 43.81, 43.50, 40.41, 39.68, 37.44, 35.62, 35.10, 34.54, 34.46, 33.05, 32.97, 31.52, 29.48, 29.09, 27.86, 26.13, 18.73, 16.35, 16.28, 16.18, 15.54, 14.44, 10.58, 7.99.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{44}H_{69}O_{12}NNa^+$ = 826.4717, found = 826.4719.

- **(R)-2'-(monensinamido)-3'-(1'H-indol-3'-yl)propanoic acid 4b**

Procedure : (R)-methyl 2'-(monensinamido)-3'-(1'H-indol-3'-yl)propanoate **3e** (95.3 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.).



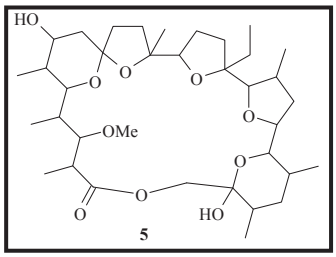
4b

Yield : 92%
m=86.6 mg

NMR ^1H (400 MHz, D_2O/MeOD) δppm : 7.74 (1H, d, J=7.8 Hz), 7.52 (1H, d, J=8.3 Hz), 7.27 (2H, m), 7.19 (1H, t, J=7.6 Hz), 4.58 (1H, m), 4.45-4.25 (2H, m), 4.08 (2H, m), 3.89 (2H, m), 3.71-3.50 (4H, m), 3.23 (2H, m), 3.02 (3H, m), 2.43 (3H, m), 2.26 (2H, m), 2.15-1.95 (8H, m), 1.90-1.50 (10H, m), 1.37 (4H, d, J=9.3 Hz), 1.16-0.97 (18H, m), 0.85 (2H, d, J=6.8 Hz).
NMR ^{13}C (400 MHz, D_2O/MeOD) δppm : 216.32, 188.07, 187.17, 179.18, 178.31, 171.67, 137.10, 128.58, 124.77, 122.58, 120.03, 119.56, 112.53, 111.19, 108.39, 88.83, 88.70, 86.07, 83.00, 81.31, 78.57, 71.23, 69.87, 62.54, 57.92, 56.40, 49.28, 42.58, 41.60, 36.72, 36.44, 36.03, 34.88, 30.86, 30.66, 30.41, 30.22, 28.17, 25.42, 19.88, 17.91, 16.50, 15.79, 13.45, 12.53, 10.78, 8.25.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{47}H_{72}O_{12}N_2Na^+$ = 879.4983, found = 879.4982.

IV-4 General procedure for monensin lactonization

In a tree-necked bottom flask, equipped with reflux condenser, DCC (6.3 g, 30 mmol, 2 equiv.), DMAP (5.5 g, 45 mmol, 3 equiv.), DMAP.HCl (4.7 g, 30 mmol, 2 equiv.) and chloroform (850 mL) were introduced. The resulting solution was brought to reflux, and a solution of monensin acid **1a** (10g, 15 mmol, 1 equiv.) in THF (150 mL) was slowly added over 2h. After addition was completed, the reaction mixture was stirred at reflux during 12h. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and quenched with methanol (20 mL) and acetic acid (3.6 mL). The stirring was maintained for 30 min at room temperature. The solvent was removed under vacuum and then, the mixture was diluted with diethylether and filtered. The organic phase was washed with aqueous HCl solution (1N) and with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated over vacuum to afford the expected product as a white powder.



Yield : 78%
m=7.6 g

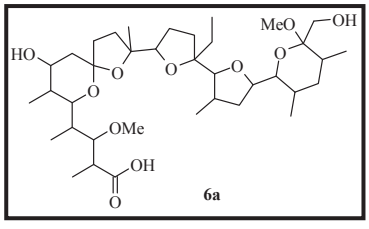
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.39 (1H, d, J=11.3 Hz), 4.27 (1H, m), 4.20 (1H, d, J=10.9 Hz), 4.02 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.93 (1H, dd, 10.2 Hz), 3.83 (1H, d, J=2.9 Hz), 3.65 (1H, d, J=11.3 Hz), 3.60 (1H, m), 3.40 (1H, s), 3.35 (3H, s), 2.86 (1H, m), 2.18 (5H, m), 1.88 (3H, m), 1.71 (4H, m), 1.43 (15H, m), 1.18 (3H, d, 7.5 Hz), 0.93 (15H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 178.19, 108.50, 97.03, 86.75, 85.86, 85.73, 85.69, 83.15, 79.37, 76.99, 74.05, 71.62, 68.68, 68.00, 58.56, 38.84, 38.30, 37.06, 36.01, 35.48, 35.17, 34.32, 33.89, 33.09, 32.90, 31.25, 30.89, 27.69, 25.27, 17.66, 17.00, 15.69, 12.58, 11.11, 10.29, 8.61.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{36}H_{60}O_{10}Na^+$ = 675.4084, found = 675.4084.

IV-5 General procedure for the synthesis of C25-alcoxymonensin

A mixture of monensin acid **1a** (1 equiv.), $LiBr.H_2O$ (0.1 equiv.) and *n*-Bu_4NBr (0.05 equiv.) in the alcohol was stirred at room temperature. After 3 days, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (AcOEt/Cyclohexane) to give the expected product.

- **<u>25-Methoxymonensin 6a</u>**

<u>Procedure</u> : monensin acid **1a** (3.07g, 4.48 mmol, 1 equiv.), $LiBr.H_2O$ (49.8 mg, 0.45 mmol, 0.1 equiv.) and *n*-Bu_4NBr (75.8 mg, 0.22 mmol, 0.05 equiv.). column : AcOEt/Cyclohexane : 60/40.

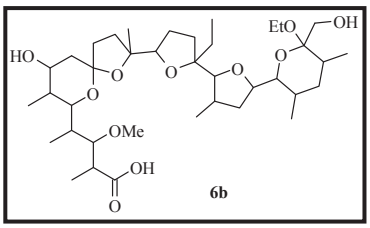


Yield : 68%
m=1.95 g

NMR ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.32 (1H, m), 4.06-4.03 (1H, m), 3.97-3.91 (1H,m), 3.88-3.85 (1H, m), 3.77-3.74 (1H, m), 3.71-3.61 (1H, m), 3.50-3.46 (1H, m), 3.42-3.36 (4H, m), 3.27-3.22 (4H,m), 2.65-2.60 (1H, m), 2.30-2.00 (5H, m), 1.99-1.80 (3H, m), 1.75-1.40 (8H, m), 1.39-1.21 (11H, m), 1.08 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.04-0.83 (15H, m).
NMR ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 177.17, 107.91, 86.45, 86.08, 85.62, 83.40, 83.62, 81.90, 77.31, 71.90, 71.52, 68.67, 67.52, 58.51, 48.95, 41.13, 38.69, 37.29, 36.72, 36.22, 35.06, 34.90, 34.07, 33.96, 33.15, 32.90, 31.57, 31.56, 28.28, 17.68, 16.05, 15.92, 12.67, 12.38, 11.19, 10.94, 8.92.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{37}H_{64}O_{11}Na^+$ = 707.4346, found = 707.4346.

- **25-Ethoxymonensin 6b**

Procedure : monensin acid **1a** (1.04 g, 1.50 mmol, 1 equiv.), $LiBr.H_2O$ (16.6 mg, 0.15 mmol, 0.1 equiv.) and *n*-Bu_4NBr (26.0 mg, 0.08 mmol, 0.05 equiv.). Column : AcOEt/Cyclohexane : 50/50.



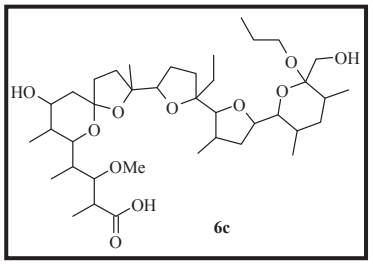
6b

Yield : 40%
m=420 mg

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.33 (1H, m), 4.06 (1H, dd, J_1= 2.1 Hz, J_2= 11.3 Hz), 3.96 (1H, dd, J_1= 3.0 Hz, J_2= 10.3 Hz), 3.86 (1H, m), 3.74 (1H, d, J=15.4 Hz), 3.65-3.53 (2H, m), 3.48 (1H, d, J=10.9 Hz), 3.41 (2H, q, J=4.8 Hz), 3.36 (3H, s), 3.22 (1H, dd, J_1= 1.9 Hz, J_2= 10.2 Hz), 2.62 (2H, m), 2.25-2.04 (5H, m), 1.98-1.86 (4H, m), 1.70-1.46 (11H, m), 1.45-1.20 (7H, d, J=4.9 Hz), 1.14 (1H, t, J=6.8 Hz), 1.00 (2H, d, J=7.1 Hz), 0.97-0.83 (17H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 177.36, 107.93, 86.45, 85.28, 85.08, 83.59, 81.72, 73.95, 71.69, 70.85, 68.02, 67.26, 67.17, 58.53, 58.15, 42.10, 38.51, 36.84, 35.75, 34.69, 34.21, 33.88, 32.96, 32.71, 31.62, 31.28, 27.98, 27.83, 27.05, 18.51, 17.68, 16.49, 15.89, 15.75, 10.89, 10.48, 8.71, 8.26.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{66}O_{11}Na^+$ = 721.4503, found = 721.4503.

- **25-propoxymonensin 6c**

Procedure : monensin acid **1a** (505.5 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), $LiBr.H_2O$ (10.0 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.) and *n*-Bu_4NBr (15.0 mg, 0.04 mmol, 0.05 equiv.). Column : Cyclohexane/AcOEt: 60/40.



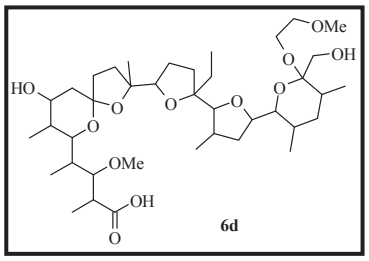
6c

Yield : 16%
m=85 mg

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.40-4.31 (1H, m), 4.20-4.00 (2H, m), 3.98-3.3.91 (1H, m), 3.89-3.83 (1H, m), 3.70-3.59 (3H, m), 3.54-3.44 (1H, m), 3.42-3.36 (4H, m), 3.24 (1H, dd, J_1=2.0 Hz, J_2=9.8 Hz), 2.66-2.62 (1H, m), 2.29-2.03 (5H, m), 1.99-1.87 (3H, m), 1.72-1.46 (13H, m), 1.45-1.31 (4H, m), 1.28-1.21 (4H, m), 1.10-1.0.98 (3H, m), 0.97-0.88 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 177.32, 107.94, 97.19, 86.45, 85.66, 85.29, 83.79, 81.96, 77.32, 74.34, 71.21, 68.42, 67.44, 65.07, 58.42, 42.27, 38.75, 37.15, 36.94, 36.18, 34.94, 34.89, 34.36, 34.09, 33.14, 33.02, 31.81, 31.56, 28.26, 28.03, 26.27, 17.88, 16.63, 16.10, 16.04, 11.15, 10.80, 10.54, 8.97.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{68}O_{11}Na^+$ = 735.4659, found = 735.4658.

- **25-*O*-methoxyéthanol monensin 6d**

Procedure : monensin acid **1a** (509.0 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), LiBr.H_2O (10.5 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.) and *n*-Bu_4NBr (12.2 mg, 0.04 mmol, 0.05 equiv.). Column : AcOEt.

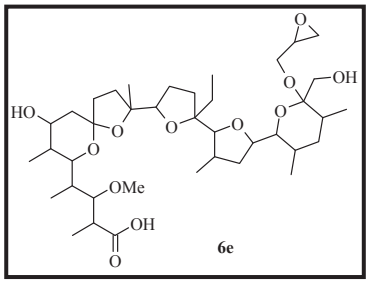


Yield : 52%
m=286.4 mg

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.27-4.21 (1H, m), 4.04 (1H, dd, J_1=1.8 Hz, J_2=9.3 Hz), 3.89 (1H, d, J=4.3 Hz), 3.76 (1H, d, J=2.8 Hz), 3.72-3.63 (2H, m), 3.61-3.53 (4H, m), 3.50-3.41 (3H, m), 3.39 (3H, s), 3.36 (3H, s), 2.64-2.61 (1H, m), 2.27-2.13 (3H, m), 2.12-1.86 (7H, m), 1.84-1.76 (1H, m), 1.73-1.60 (3H, m), 1.59-1.46 (4H, m), 1.41-1.25 (6H, m), 1.21 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.00 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.96 (15H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.44, 107.50, 99.31, 88.13, 86.76, 83.53, 81.88, 76.62, 74.91, 74.07, 71.65, 68.84, 67.54, 62.11, 60.52, 59.28, 58.44, 41.85, 39.52, 38.67, 37.33, 36.74, 36.62, 34.90, 33.98, 33.88, 32.84, 31.55, 31.47, 28.28, 27.68, 24.46, 17.61, 16.16, 16.01, 15.86, 11.21, 11.02, 8.89.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{68}O_{12}Na^+$ = 751.4608, found = 751.4607.

- **25-*O*-Glycidol monensin 6e**

Procedure : monensin acid **1a** (506.6 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), LiBr.H_2O (10.5 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.), *n*-Bu_4NBr (17.2 mg, 0.04 mmol, 0.05 equiv.) and glycidol (500 µL, 7.5 mmol, 10 equiv.) in dichloromethane. Column : Cyclohexane/AcOEt: 60/40.

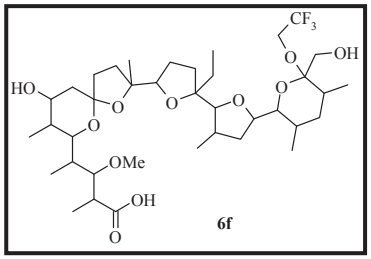


Yield : 14%
m=100 mg

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.47-4.42 (1H, m), 4.42 (1H, m), 3.99-3.96 (3H, m), 3.87-3.76 (3H, m), 3.59 (2H, m), 3.47 (2H, s), 3.34 (3H, s), 3.23 (1H, m), 2.83 (1H, s), 2.71-2.65 (2H, m), 2.27 (1H, m), 2.14-1.61 (13H, m), 1.53-1.38 (9H, m), 1.22 (3H, d, J=6.0 Hz), 1.00-0.85 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.37, 107.70, 97.12, 87.27, 86.40, 85.71, 83.53, 81.56, 76.62, 76.17, 71.36, 68.07, 67.48, 65.13, 58.39, 49.49, 44.79, 41.06, 39.16, 37.14, 36.87, 36.20, 35.19, 34.88, 34.50, 33.56, 32.87, 32.54, 31.14, 29.77, 27.99, 25.92, 17.45, 16.26, 15.79, 12.35, 12.03, 11.22, 8.19.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{66}O_{12}Na^+$ = 749.4452, found = 749.4450.

- **25-*O*-trifluoroethanol monensin 6f**

Procedure : monensin acid **1a** (501.0 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), LiBr.H_2O (8.8 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.) and *n*-Bu_4NBr (13.1 mg, 0.04 mmol, 0.05 equiv.). Column : AcOEt/Cyclohexane : 50/50.

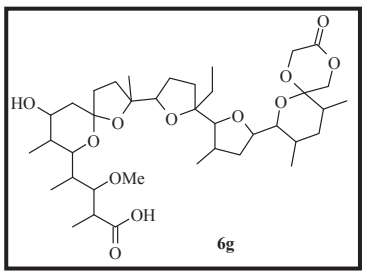


Yield : 11%
m=61.5 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.30 (1H, m), 4.05-3.95 (3H, m), 3.86 (1H, d, J=4.6 Hz), 3.76 (1H, s), 3.68 (2H, dd, J=11.8 Hz), 3.58 (2H, m), 3.50 (1H, m), 3.36 (3H, s), 2.63 (1H, m), 2.33 (1H, m), 2.17 (1H, m), 2.09-1.83 (9H, m), 1.75-1.56 (6H, m), 1.51-1.42 (1H, m), 1.50-1.20 (9H, m), 0.99 (6H, d, J=5.0 Hz), 0.92-0.82 (12H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 179.31, 124.45 (q, J=275.61 Hz), 107.68, 99.65, 88.00, 86.38, 86.09, 83.33, 81.45, 78.06, 77.36, 71.71, 68.20, 65.32, 59.75 (q, J=34.27 Hz), 58.27, 40.91, 39.12, 36.95, 36.44, 36.07, 35.82, 35.21, 34.80, 33.48, 32.46, 32.14, 28.71, 27.37, 27.05, 24.45, 21.19, 17.54, 16.34, 15.48, 12.09, 11.14, 8.00.
NMR ^{19}F (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : -74.46 (t, J=10.24 Hz)
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{63}O_{11}F_3Na^+$ = 775.4215, found = 775.4196.

- **Monensin oxo-dioxane 6g**

Procedure : monensin acid **1a** (500 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), LiBr.H_2O (9.1 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.), *n*-Bu_4NBr (13.2 mg, 0.04 mmol, 0.05 equiv.), methyl glycolate (571 µL, 7.5 mmol, 10 equiv.) in dichloromethane. Column : Cyclohexane/AcOEt: 60/40.

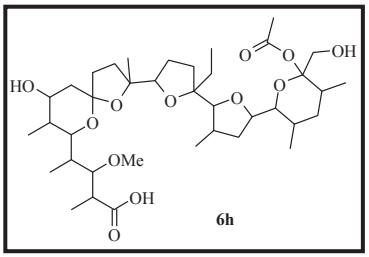


Yield : 40%
m=212.1 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.47 (1H, d, J=11.3 Hz), 4.38 (1H, d, J=16.9 Hz), 4.26 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.09 (1H, d, J=11.3 Hz), 4.01 (1H, d, J=8.8 Hz), 3.87 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.77 (1H, m), 3.62 (1H, dd, J_1=8.6 Hz, J_2=9.0 Hz), 3.55 (1H, t, J=4.8 Hz), 3.39 (1H, m), 3.36 (3H, s), 2.66-2.60 (1H, m), 2.28 (1H, m), 2.16-1.85 (9H, m), 1.80-1.73 (2H, m), 1.69-1.48 (10H, m), 1.35-1.20 (6H, m), 1.03-0.86 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 178.69, 167.53, 107.43, 94.34, 88.09, 86.34, 85.29, 82.83, 81.27, 78.84, 77.36, 72.57, 71.64, 67.94, 59.64, 58.16, 40.86, 39.26, 36.96, 35.74, 35.53, 34.91, 34.58, 34.43, 33.18, 32.18, 32.01, 30.29, 28.84, 27.65, 24.33, 17.57, 16.45, 16.08, 12.92, 11.95, 11.03, 8.05.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{62}O_{12}Na^+$ = 733.4133, found = 733.4102.

- **Monensin acetylene 6h**

Procedure : monensin acid **1a** (1.07 g, 1.50 mmol, 1 equiv.), LiBr.H_2O (18.0 mg, 0.15 mmol, 0.1 equiv.) and *n*-Bu_4NBr (24.6 mg, 0.08 mmol, 0.05 equiv.) in anhydride acetic. Column : Cyclohexane/AcOEt: 60/40.



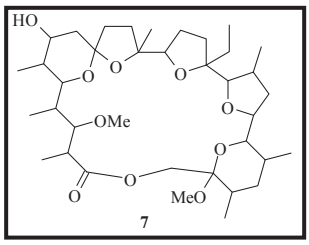
Yield : 17%
m=182.7 mg

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.30-4.24 (2H, m), 4.11 (2H, t, J=12.08 Hz), 4.01-3.98 (2H, m), 3.75 (1H, m), 3.47 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J_1=2.0 Hz, J_2=9.3 Hz), 2.66-2.62 (1H, m), 2.22-2.12 (6H, m), 2.05-1.86 (5H, m), 1.77-1.59 (6H, m), 1.56-1.30 (7H, m), 1.24 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.09 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.96-0.85 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.58, 171.10, 108.00, 97.00, 86.43, 85.80, 84.72, 83.33, 81.97, 77.36, 77.04, 74.94, 71.03, 67.41, 67.20, 58.18, 40.83, 38.71, 36.92, 36.34, 35.24, 34.86, 34.71, 34.59, 33.75, 32.77, 31.27, 30.58, 27.61, 27.43, 21.31, 17.71, 16.39, 16.01, 15.32, 10.90, 10.76, 8.54.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{64}O_{12}Na^+$ = 735.4295, found = 735.4293.

IV-6 General procedure for the lactonization of 25-methoxymonensin

In a tree-necked bottom flask, equipped with reflux condenser, DCC (120 mg, 0.58 mmol, 2 equiv.), DMAP (108.1 mg, 0.87 mmol, 3 equiv.), DMAP.HCl (98.7 mg, 0.58 mmol, 2 equiv.) and chloroform (20 mL) were introduced. The resulting solution was brought to reflux, and a solution of 25-methoxymonensin **6a** (201 mg, 0.29 mmol, 1 equiv.) in THF (4 mL) was slowly added over 2h. After addition was completed, the reaction mixture was stirred at reflux during 16h. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and quenched with methanol (0.5 mL) and acetic acid (85 µL). The stirring was continued for 30 min at room temperature. The solvent was removed under vacuum and then, the mixture was diluted with diethylether and filtered. The organic phase was washed with aqueous HCl solution (1N) and with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated over vacuum to afford the expected product as a white powder.

- **25-methyllactone 7**



Yield : 90%
m=173.1 mg

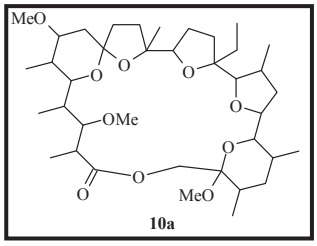
NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.30-4.18 (1H, m), 4.14-4.08 (1H, m), 4.04-3.95 (2H, m), 3.90 (1H, d, J=4.2 Hz), 3.78-3.55 (1H, m), 3.51-3.39 (3H, m), 3.34-3.29 (3H, m), 3.26 (3H, s), 2.63 (1H, m), 2.27-2.15 (3H, m), 2.11-1.70 (7H, m), 1.69-1.40 (4H, m), 1.37-1.25 (9H, m), 1.23-1.11 (4H, m), 1.00-0.79 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.01, 107.64, 98.49, 88.21, 86.70, 85.76, 85.33, 78.01, 77.62, 71.76, 68.60, 68.00, 66.26, 59.18, 48.81, 41.64, 39.75, 37.53, 37.46, 37.33, 36.11, 35.85, 35.44, 35.22, 34.38, 34.00, 30.72, 25.87, 25.18, 24.27, 18.02, 16.22, 12.89, 11.75, 11.48, 8.62, 8.42.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{37}H_{62}O_{10}Na^+$ = 689.4241, found = 689.4241.

IV-7 General procedure for the etherification with $BF_3.Et_2O$

Lactone monensin **5** or monensin acid **1a** (1 equiv.) was dissolved in MeOH (10 vol). The reaction mixture was cooled until -78°C and $BF_3.Et_2O$ (1.05 equiv.) was added very slowly under argon. After 5 min stirring at -78°C, the reaction mixture was stirred at room temperature. After 5h stirring, the reaction medium was diluted with diethyl ether and dichloromethane. The solution was neutralized by the addition of NH_4OH, extracted with dichloromethane and distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. A purification on silica gel column chromatography allows to afford the expected compound.

- **7, 25-dimethoxylactone 10a**

Procedure : lactone monensin **5** (500 mg, 0.77 mmol, 1 equiv.) and $BF_3.Et_2O$ (100 µL, 0.81 mmol, 1.05 equiv.). Column : Cyclohexane/AcOEt: 85/15.



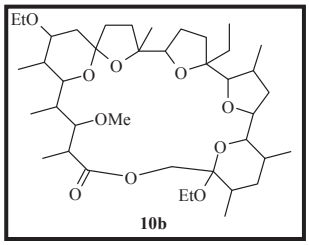
10a

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{64}O_{10}Na^+$ = 703.4397, found = 703.4396.

Yield : 40%
m=207.9 mg

- **7, 25-diethoxylactone 10b**

Procedure : lactone monensin **5** (250 mg, 0.38 mmol, 1 equiv.) and $BF_3.Et_2O$ (50 µL, 0.40 mmol, 1.05 equiv.). Column : Cyclohexane/AcOEt: 90/10.



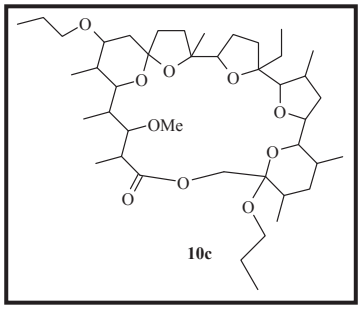
10b

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{40}H_{68}O_{10}Na^+$ = 731,4709, found = 731.4709.

Yield : 23%
m=63.8 mg

- **7, 25-dipropoxylactone 10c**

Procedure: lactone monensin **5** (250 mg, 0.38 mmol, 1 equiv.) and $BF_3.Et_2O$ (50 µL, 0.40 mmol, 1.05 equiv.). Column : Cyclohexane/AcOEt: 90/10.



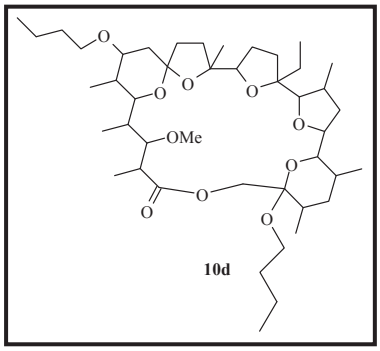
10c

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{42}H_{72}O_{10}Na^+$ = 759.5023, found = 759.5020.

Yield : 39%
m=57.3 mg

- **7, 25-dibutylactone 10d**

Procedure: lactone monensin **5** (300 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) and $BF_3.Et_2O$ (60 µL, 0.48 mmol, 1.05 equiv.). Column : Cyclohexane/AcOEt: 95/5.

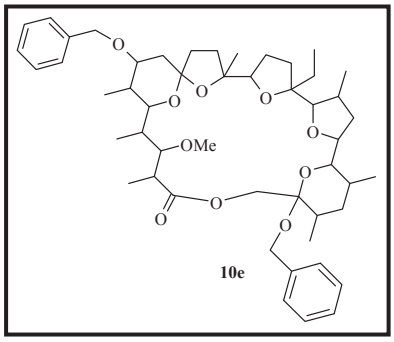


Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{44}H_{76}O_{10}Na^+$ = 787.5336, found = 787.5339.

Yield : 13%
m=44.5 mg

- **7, 25-diphenoxylactone 10e**

Procedure : lactone monensin **5** (300 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) and $BF_3.Et_2O$ (60 µL, 0.48 mmol, 1.05 equiv.). Column : Dichloromethane/MeOH: 90/10.

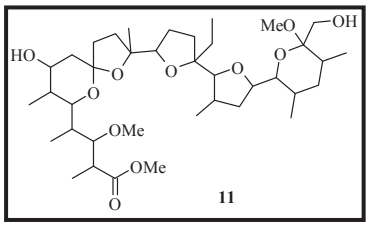


Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{50}H_{72}O_{10}Na^+$ = 855.5023, found = 855.5021

Yield : 5%
m= 14.3 mg

- **Methanoate de 25-methyl monensin 11**

Procedure : monensin acid **1a** (1.02 g, 1.50 mmol, 1 equiv.) and $BF_3.Et_2O$ (195 µL, 1.58 mmol, 1.05 equiv.). Column : Cyclohexane/AcOEt (70/30).



Yield : 22%
m=133.0 mg

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.29-4.27 (1H, m), 4.00 (1H, dd, J_1= 9.32 Hz, J_2= 2.04 Hz), 3.94 (1H, dd, J_1= 9.04 Hz, J_2= 2.24 Hz), 3.90 (1H, d, J=4.28 Hz), 3.83 (1H, d, J=4.80 Hz), 3.77 (1H, m), 3.73 (1H, m), 3.70 (3H, s), 3.52 (1H, m), 3.33 (4H, m), 3.26 (3H, s), 2.65-2.63 (1H, m), 2.32-2.22 (1H, m), 2.15-1.48 (16H, m), 1.38-1.21 (4H, m), 1.21-1.19 (3H, m), 1.10-0.85 (21H, m).

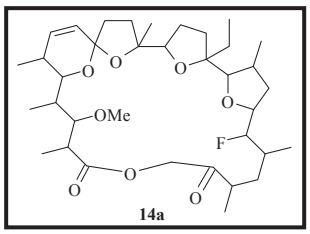
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.00, 107.70, 107.42, 99.49, 97.55, 89.59, 86.44, 85.38, 81.70, 75.76, 71.56, 68.05, 63.89, 61.43, 58.33, 52.03, 43.32, 41.14, 39.15, 37.28, 37.20, 37.13, 36.16, 34.91, 32.79, 32.57, 31.16, 29.76, 28.71, 28.41, 17.62, 17.44, 15.78, 12.56, 12.23, 11.20, 8.18, 7.60.

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{66}O_{11}Na^+$ = 721.4503, found = 721.4502.

IV-8 General procedure for the fluoration of the lactone

In a dry three-necks round-bottomed flask, lactone monensin **5** (200 mg, 0.31 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (20 mL) under argon. The mixture was cooled at -78°C and DAST (80 µL, 0.62 mmol, 2 equiv.) was added very slowly. At the end of the addition, the reaction was stirred at room temperature during 50 min. The reaction mixture was washed several times with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness to afford the desired lactone.

- **7,8-ene-21-fluoro-25-one monensine lactone 14a**



Yield : 33%
m=65.5 mg

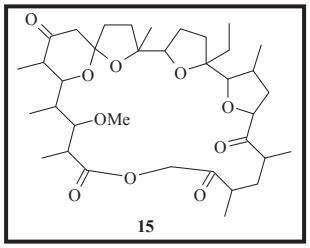
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 5.87 (1H, m), 5.47 (1H, d, J=9.6 Hz), 5.19 (1H, d, J=17.4 Hz), 4.63 (1H, m, J=50.6 Hz), 4.34 (1H, d, J=17.6 Hz), 4.18 (1H, s), 3.97 (1H,m), 3.58 (3H, s), 3.54 (3H, d, J=11.0 Hz), 3.27 (1H, d, J=8.8 Hz), 2.73 (2H, m), 2.17-1.68 (14H, m), 1.50-0.90 (27H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 206.16, 175.60, 135.28, 128.25, 105.10, 86.70, 85.67, 85.10 (d, J=174.3 Hz), 82.90, 82.89 (d, J=47.4 Hz), 82.45, 77.36, 70.11, 67.88, 60.08, 39.28, 39.11 (d, J=17.5 Hz), 38.88, 38. 32, 37.20, 35.31, 34.34, 33.86, 30.90 (d, J=10.2 Hz), 30.83, 30.76, 29.87, 27.86, 22.34, 18.07, 16.39, 14.42, 13.83, 11.33, 8.60, 8.11.
NMR ^{19}F (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : -190.22.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{36}H_{57}O_8FNa^+$ = 659.3935, found = 659.3937.

IV-9 General procedure for oxidation

IV-9-1 Oxidation of the lactone

A solution of lactone monensin **5** (103.0 mg, 0.15 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (2 mL) was added to a stirred solution of Dess-Martin periodinane in dichloromethane 15%wt (360 µL, 0.17 mmol, 1.14 equiv.) over 5 min at room temperature under argon. After 4 h Dess-Martin periodinane (150 µL, 0.5 equiv.) was added to the reaction mixture. After 12 h, Dess-Martin periodinane (500 µL, 1.5 equiv.) was added to the reaction mixture. After 1 day, the reaction mixture was extracted with diethyl ether and NaOH (1N), washed with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness to afford the trioxydated lactone.

- **Tri ketone lactone 15**



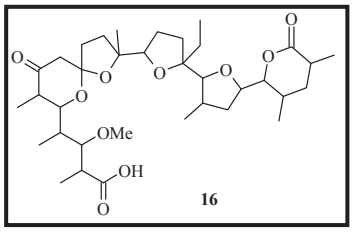
Yield : 72%
m=70.0 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 5.13 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.52 (1H, dd, J_1=10.1 Hz, J_2=9.8 Hz), 4.42 (1H, d, J=16.8 Hz), 4.30 (1H, t, J=3.5 Hz), 3.94 (1H, d, J=4.3 Hz), 3.90 (1H, dd, J_1=8.6 Hz, J_2=2.3 Hz), 3.59 (1H, m), 3.51 (3H, m), 3.24 (1H, m), 2.75 (3H, m), 2.41 (1H, dd, J_1=7.3 Hz, J_2=3.3 Hz), 2.34 (1H, d, J=15.6 Hz), 2.30-2.21 (1H, m), 2.20-2.01 (6H, m), 1.97-1.82 (5H, m), 1.76-1.70 (1H, m), 1.55-1.48 (2H, m), 1.45-1.39 (1H, m), 1.36 (3H, m), 1.18-1.11 (9H, m), 0.99-0.90 (12H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 217.29, 210.69, 205.36, 175.47, 107.27, 87.35, 87.24, 87.12, 83.09, 81.56, 81.16, 77.35, 70.25, 66.84, 59.14, 49.81, 47.23, 39.73, 39.22, 39.02, 38.71, 38.48, 37.94, 35.62, 35.07, 33.89, 30.58, 30.10, 28.26, 22.29, 18.08, 15.68, 15.40, 11.71, 8.99, 8.25.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{36}H_{56}O_{10}Na^+$ = 671.3766, found = 671.3794.

IV-9-2 Oxidation of the monensin

A solution of monensin acid **1a** (1.0 g, 1.49 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (20 mL) was added to a stirred solution of Dess-Martin periodinane in dichloromethane 15%wt (9.5 mL, 4.48 mmol, 3 equiv.) over 5 min at room temperature under argon. After 1 day, the reaction mixture was extracted with diethyl ether and NaOH (1N), washed with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. A purification on silica gel column chromatography (Cyclohexane/AcOEt : 50/50) allows to afford the oxidated monensin.

- **Monensine oxo-lactone 16**



Yield : 24%
m=230.0 mg

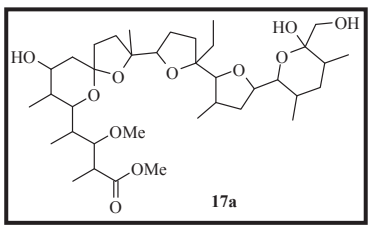
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.24 (1H, m), 4.14 (2H, m), 3.98 (1H, m), 3.64 (1H, m), 3.55 (1H, m), 3.37 (3H, s), 2.74 (2H, m), 2.63 (1H, m), 2.50-241 (2H, m), 2.29-2.01 (7H, m), 1.95-1.85 (1H, m), 1.75 (2H, m), 1.69-1.40 (7H, m), 1.33-1.17 (9H, m), 1.15-1.06 (6H, m), 0.97-0.89 (9H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 211.14, 197.35, 174.56, 107.82, 88.34, 88.23, 86.44, 86.37, 83.69, 82.30, 77.36, 71.42, 59.04, 47.34, 46.73, 40.87, 39.73, 37.49, 37.02, 36.15, 35.11, 35.07, 31.92, 31.68, 31.08, 29.97, 29.14, 25.22, 18.37, 17.27, 15.86, 11.98, 11.22, 10.91, 8.24.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{35}H_{56}O_{10}Na^+$ = 659.3771, found = 659.3772.

IV-10 General procedure for esterification

IV-10-1 From alkyl iodide

Monensin acid **1a** (1.0 g, 1.50 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous toluene (6 vol) under argon. 1, 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (250 µL, 1.65 mmol, 1.1 equiv.) and alkyl iodide (122 µL, 1.95 mmol, 1.3 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 5 days. The reaction mixture was extracted with AcOEt and HCl (1N), washed with saturated $NaHCO_3$ and distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. A purification on silica gel column chromatography allows to afford the desired ester.

- **Methanoate monensin 17a**



Yield : 52%
m=538.1 mg

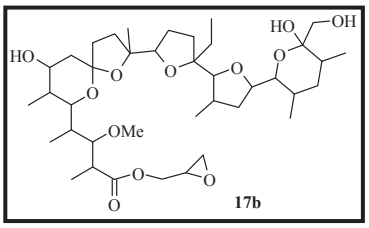
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.29-4.25 (1H, m), 3.98 (1H, dd, J_1=2.2 Hz, J_2=9.3 Hz), 3.86 (1H, d, J=4.6 Hz), 3.81 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=9.8 Hz), 3.76 (1H, d, J=3.0 Hz), 3.70 (3H, s), 3.60-3.53 (2H, m), 3.47 (2H, s), 3.32 (3H, s), 2.66 (1H, m), 2.27 (1H, m), 2.16-2.08 (2H, m), 2.07-1.94 (3H, m), 1.90-1.78 (4H, m), 1.68-1.60 (4H, m), 1.57-1.20 (10H, m), 1.19 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.99 (7H, dd, J_1=7.0 Hz, J_2=16.6 Hz), 0.91-0.81 (11H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.11, 107.71, 97.19, 87.10, 86.43, 85.70, 83.55, 81.76, 77.36, 77.08, 71.36, 68.11, 67.43, 58.36, 52.03, 41.02, 39.13, 37.17, 36.88, 36.10, 35.18, 34.89, 34.49, 33.51, 32.87, 32.67, 31.17, 29.77, 27.93, 25.92, 17.44, 16.29, 15.77, 12.32, 12.25, 11.20, 8.20.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{37}H_{64}O_{11}Na^+$ = 707.4346, found = 707.4347.

IV-10-2 From alcohols

In a tree-necked bottom flask, monensin acid **1a** (1 equiv.), DCC (2 equiv.), DMAP (3 equiv.), DMAP.HCl (2 equiv.) and dichloromethane were introduced. The resulting solution was stirred at room temperature and alcohol (5 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 17h. The solvent was removed under vacuum and then, the mixture was suspended in AcOEt and filtered off. The organic phase was washed with aqueous HCl solution (1N) and with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated over vacuum. A purification on silica gel column allows to afford the expected product.

- **Glycidolate monensin 17b**

Procedure : monensin acid **1a** (506.6 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), DCC (318 mg, 1.50 mmol, 2 equiv.), DMAP (277.8 mg, 2.25 mmol, 3 equiv.), DMAP.HCl (239.9 mg, 1.50 mmol, 2 equiv.), glycidol (251 µL, 3.75 mmol, 5 equiv.) and dichloromethane (5 mL). Column : Cyclohexane/AcOEt (40/60).

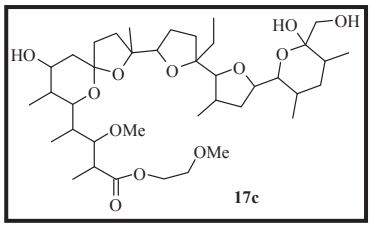


Yield : 27%
m=148.2 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.47-4.40 (2H, m), 4.34-4.25 (1H, m), 4.04-3.94 (3H, m), 3.83 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.81-3.75 (2H, m), 3.62-3.57 (2H, m), 3.46 (2H, d, J=6.8 Hz), 3.34 (3H, s), 3.27-3.20 (1H, m), 2.83 (1H, t, J=4.8 Hz), 2.74-2.65 (2H, m), 2.28-2.22 (1H, m), 2.18-2.04 (2H, m), 1.99-1.80 (6H, m), 1.75-1.31 (13H, m), 1.27-1.20 (3H, m), 1.02-0.84 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.37, 107.73, 97.01, 87.45, 86.33, 85.92, 83.60, 81.59, 77.36, 76.53, 71.45, 68.12, 67.64, 65.37, 65.13, 58.38, 49.50, 44.80, 41.07, 39.21, 37.13, 36.90, 36.17, 35.26, 34.94, 34.55, 32.90, 32.41, 31.14, 29.80, 28.07, 25.82, 17.47, 16.23, 15.79, 12.35, 12.03, 11.24, 8.19.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{66}O_{12}Na^+$ = 749.4452, found = 749.4452.

- **Methoxyethanoate monensin 17c**

*Procedure : m*onensin acid **1a** (499.0 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.), DCC (313 mg, 1.50 mmol, 2 equiv.), DMAP (276.9 mg, 2.25 mmol, 3 equiv.), methoxyethanol (100 µL, 1.26 mmol, 1.7 equiv.) and dichloromethane (5 mL). Column : Cyclohexane/AcOEt (50/50).



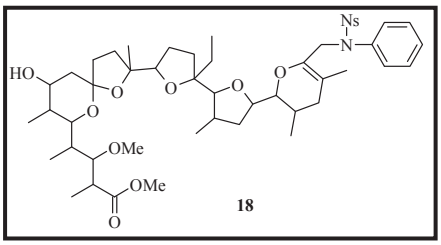
Yield : 21%
m=114.3 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.26 (3H, d, J=4.8 Hz), 4.15-3.95 (1H, m), 3.85-3.74 (3H, m), 3.67-3.59 (4H, m), 3.51-3.43 (2H, m), 3.37 (3H, s), 3.33 (3H, s), 2.76-2.60 (1H, m), 2.39-2.21 (1H, m), 2.14-2.11 (2H, m), 2.01-1.85 (6H, m), 1.81-1.60 (5H, m), 1.55-1.48 (3H, m), 1.38-1.21 (8H, m), 1.15-1.05 (2H, m), 1.00-0.86 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.69, 107.72, 97.06, 87.40, 86.40, 86.08, 83.88, 82.03, 76.86, 76.67, 71.72, 70.86, 68.43, 67.79, 63.95, 59.28, 58.71, 49.59, 41.28, 39.48, 37.61, 37.18, 36.51, 35.52, 35.16, 34.83, 34.34, 31.42, 29.98, 26.00, 25.34, 24.04, 17.73, 16.51, 16.06, 12.75, 12.11, 11.51, 8.43.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{68}O_{12}Na^+$ = 751.4603, found = 751.4589.

IV-11 Procedure for the amination of methanoate monensin

A solution of the methanoate monensin **17a** (50.7 mg, 0.08 mmol, 1 equiv.), triphenylphosphine (41.2 mg, 0.15 mmol, 2 equiv.) and nosylated aniline (42.1 mg, 0.15 mmol, 2equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (1 mL) was stirred at room temperature under anhydrous conditions. Diethylazodicarboxylate DEAD (26 µL, 0.17 mmol, 2.2 equiv.) was added slowly at room temperature. After 3 days, the solution was concentrated under reduced pressure, then diluted with a small quantity of ether and filtered. After evaporation, the concentrated filtrate was chromatographed on silica gel (Cyclohexane/AcOEt : 70/30).

- **26-*C*-nosylaniline monensin-25-ene 18**



18

Yield : 61%
m=45.3 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.60 (2H, d, J=3.5 Hz), 7.49 (1H, d, J=7.8 Hz), 7.43 (1H,m), 7.26 (3H, m), 7.15 (2H, m), 4.51 (1H, d, J=14.4 Hz), 4.30 (1H, d, J=14.4 Hz), 4.08 (1H, m), 3.93 (1H, dd, J_1=9.6 Hz, J_2=2.0 Hz), 3.81 (1H, d, J=4.3 Hz), 3.75 (1H, d, J=3.0 Hz), 3.70 (3H, s), 3.66 (1H, m), 3.52 (1H, t, J=5.0 Hz), 3.33 (4H, m), 2.66-2.63 (1H, m), 2.24-2.11 (2H, m), 2.10-1.98 (4H, m), 1.88-1.84 (4H, m), 1.74-1.45 (10H, m), 1.43-1.37 (3H, m), 1.28-1.19 (6H, m), 1.00 (3H, d, J=7.1 Hz), 0.95-0.85 (12H, m).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.01, 148.16, 141.13, 137.98, 133.35, 132.86, 132.22, 131.09, 130.26, 129.07, 128.42, 123.95, 107.66, 107.43, 88.82, 86.65, 85.83, 83.58, 82.05, 81.67, 76.39, 71.67, 68.04, 60.54, 58.29, 53.57, 52.03, 51.75, 41.16, 39.86, 37.10, 36.19, 35.83, 35.04, 34.70, 31.73, 31.08, 30.12, 29.34, 29.30, 27.06, 24.80, 17.70, 17.14, 15.99, 12.72, 12.19, 11.19, 8.26.

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{49}H_{70}O_{13}N_2SNa^+$ = 949.4491, found = 949.4464.

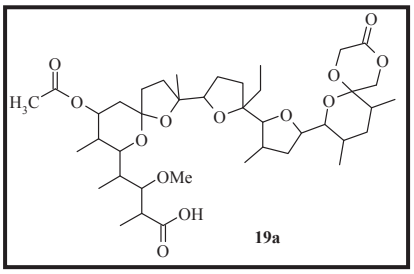
IV-12 Procedures to obtain monensin oxodioxane derivatives

IV-12-1 Esterification of monensin oxodioxane

IV-12-1-1 Esterification on C7

To a solution of monensin oxodioxane **6g** (397 mg, 0.56 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (4 mL) were added acetic anhydride (1 mL, 10.08 mmol, 18 equiv.) and DMAP (10 mg, 0.07 mmol, 0.13 equiv.). The mixture was stirred at room temperature. After one day, the reaction was quenched with 10% Na_2CO_3 solution, then extrated with AcOEt. The extract was washed with 1N HCl, saturated $NaHCO_3$ and NaCl solution, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The residue was chromatographed on silica gel (Cyclohexane/AcOEt : 70/30) to give the expected product as a powder (87.0 mg, 21%).

- **C-7-Acetate monensin oxodioxane 19a**



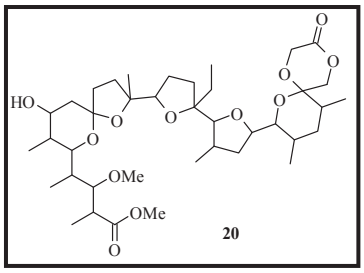
Yield : 21%
m=87.0 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, C_6D_6) δppm : 4.85 (1H, s), 4.38-3.35 (2H, m), 4.17 (1H, m), 4.08 (1H, d, J=5.0 Hz), 4.01 (1H, d, J=17.0 Hz), 3.88 (1H, d, J=11.4 Hz), 3.71-3.69 (2H, m), 3.61 (1H, d, J=11.0 Hz), 3.31 (1H, m), 3.22 (3H, s), 2.73 (1H, m), 2.23-1.98 (12H, m), 1.95-1.76 (4H, m), 1.64-1.41 (7H, m), 1.29 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.17 (3H, d, J=7.1 Hz), 1.09 (4H, m), 1.01 (3H, t, J=7.3 Hz), 0.95 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.86 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.73 (3H, d, J=5.8 Hz), 0.60 (3H, d, J=5.5 Hz).
NMR ^{13}C (400 MHz, C_6D_6) δppm : 179.86, 170.23, 166.23, 106.08, 94.34, 87.21, 86.66, 85.46, 83.16, 82.33, 79.17, 77.46, 73.60, 72.00, 68.34, 59.92, 58.33, 41.15, 40.00, 37.67, 37.12, 35.81, 35.07, 34.82, 34.13, 33.51, 33.32, 32.98, 32.47, 28.93, 27.86, 23.95, 21.53, 17.52, 16.58, 15.96, 12.52, 12.03, 10.63, 8.13.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{40}H_{64}O_{13}Na^{+}$ = 775.4239, found = 775.4219.

IV-12-1-2 Esterification on C1

Monensin oxodioxane **6g** (132 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous toluene (1.3 mL) under argon. 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (30 µL, 0.20 mmol, 1.1 equiv.) and methyl iodide (15 µL, 0.24 mmol, 1.3 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 2 days. The reaction mixture was evaporated to dryness. A purification on silica gel column chromatography allows to afford 90.0 mg (69%) of the desired ester.

- **Methanoate monensin oxodioxane 20**



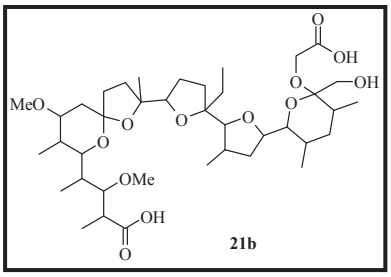
Yield : 69%
m=90.0 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.47 (1H, d, J=11.4 Hz), 4.38 (1H, d, J=16.8 Hz), 4.22 (2H, d, J=17.1 Hz), 4.09 (1H, d, J=11.3 Hz), 3.92 (1H, dd, J_1=1.8 Hz, J_2=9.6 Hz), 3.86 (1H, d, J=4.6 Hz), 3.70 (4H, s), 3.62 (1H, m), 3.51 (1H, t, J=4.8 Hz), 3.37 (1H, dd, J_1=3.8 Hz, J_2=10.0 Hz), 3.33 (3H, s), 2.64 (1H, m), 2.29 (1H, m), 2.17-2.09 (1H, m), 2.08-1.90 (6H, m), 1.87-1.74 (4H, m), 1.69-1.52 (7H, m), 1.50-1.39 (1H, m), 1.36-1.25 (4H, m), 1.20 (3H, d, J=6.80 Hz), 1.10-0.85 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 175.98, 167.16, 107.50, 94.37, 88.02, 86.36, 85.42, 82.93, 81.72, 78.92, 77.36, 77.25, 72.54, 71.55, 67.99, 59.68, 58.33, 52.00, 41.13, 39.29, 37.12, 37.01, 36.16, 35.59, 34.92, 34.80, 34.51, 33.23, 32.22, 28.80, 27.63, 24.22, 17.59, 16.47, 16.09, 12.69, 12.22, 11.19, 8.05.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{64}O_{12}Na^{+}$ = 747.4303, found = 747.4275.

IV-12-2 Etherification of monensin oxodioxane on C7

A solution of monensin oxodioxane **6g** (50.7 mg, 0.07 mmol, 1 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (1.5 mL) was stirred in the presence of NaH (60% in oil) (15 mg, 0.35 mmol, 5 equiv.) at 50°C for 30 min. The mixture was cooled to room temperature and methyl iodide (22 µL, 0.35 mmol, 5 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18h, quenched by the addition of a saturated NH_4Cl solution and diluted with AcOEt. The organic layer was washed with a saturated NaCl solution, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated to dryness. The residue was chromatographed on the silica gel (AcOEt/MeOH : 90/10) to give the expected product as a powder (22.1 mg, 43%).

- ***O*-7-methyl, *O*-25-glycolic acid monensin 21b**



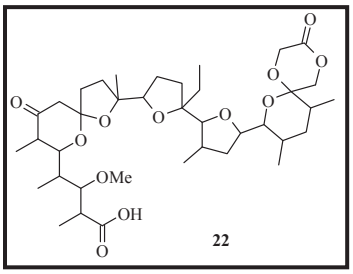
Yield : 43%
m=22.1 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) δppm : 4.30-4.24 (1H, m), 4.13-4.04 (4H, m), 3.77 (1H, d, J=2.8 Hz), 3.73-3.68 (1H, m), 3.60-3.56 (2H, m), 3.48 (1H, dd, J_1=3.3 Hz, J_2=9.8 Hz), 3.40-3.35 (7H, m), 2.60-2.57 (1H, m), 2.39-2.37 (1H, m), 2.33-2.22 (1H, m), 2.16-1.79 (10H, m), 1.72-1.55 (5H, m), 1.50-1.25 (7H, m), 1.18 (3H, d, J=7.04 Hz), 1.03-1.00 (6H, m), 0.98-0.90 (12H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, MeOD) δppm : 179.70, 176.29, 108.66, 101.56, 88.75, 87.86, 86.22, 84.15, 83.46, 79.19, 79.08, 75.73, 72.48, 69.00, 60.87, 59.96, 58.83, 42.50, 40.43, 38.48, 37.59, 37.56, 36.46, 36.39, 35.55, 35.39, 34.42, 32.91, 32.62, 30.48, 28.99, 25.97, 18.06, 16.55, 16.30, 12.87, 12.74, 11.34, 8.52.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{66}O_{13}Na^+$ = 765.4427, found = 765.4396.

IV-12-3 Oxidation of monensin oxodioxane

A solution of monensin oxodioxane **6g** (172.4 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (4 mL) was added to a stirred solution of Dess-Martin periodinane in dichloromethane 15%wt (872 µL, 0.42 mmol, 1.5 equiv.) over 5 min at room temperature under argon. After 1 day, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and then stirred 5 min with a saturated $Na_2S_2O_3$ solution, extracted and washed with distilled saturated $NaHCO_3$, NaCl solution, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. A purification on silica gel column chromatography (Hexane/Acétone : 70/30) allows to afford 51.6 mg (26%) of the oxidated product.

- **7-oxo-monensine oxodioxane 22**



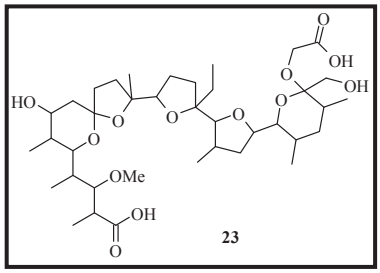
Yield : 26%
m=51.6 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 4.48 (1H, d, J=11.3 Hz), 4.38 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.26 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.22 (1H, m), 4.18-4.12 (2H, m), 3.84 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.64-3.56 (2H, m), 3.40-3.37 (4H, m), 2.79-2.72 (2H, m), 2.65-2.62 (1H, m), 2.40 (1H, d, J=15.4 Hz), 2.31-2.26 (1H, m), 2.16-1.93 (6H, m), 1.86-1.66 (3H, m), 1.62-1.42 (7H, m), 1.34-1.25 (4H, m), 1.18 (3H, d, J=6.76 Hz), 1.12 (3H, d, J=7.1 Hz), 0.97-0.84 (15H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 210.92, 179.68, 167.62, 107.61, 94.34, 87.84, 86.24, 85.53, 83.28, 82.35, 78.79, 77.26, 72.57, 71.56, 59.69, 59.13, 47.40, 46.76, 40.78, 39.33, 37.11, 36.99, 35.55, 34.90, 34.39, 33.24, 32.87, 32.25, 28.79, 27.80, 24.72, 17.61, 16.48, 16.11, 12.02, 11.01, 10.90, 8.12.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{60}O_{12}Na^+$ = 731.3977, found = 731.3950.

IV-12-4 Saponification of monensin oxodioxane

Monensin oxodioxane **6g** (50.3 mg, 0.07 mmol, 1 equiv.) was stirred in a mixture of THF-MeOH-H_2O (2: 2: 1) at room temperature. NaOH 1N (250 µL) was added slowly. The mixture was stirring during 17 h. Then the mixture was evaporated to dryness to give a powder, which was suspended in dichloromethane (6 mL) and filtered off. The solid was washed several times with dichloromethane and the filtrate was evaporated to dryness to afford 39.0 mg (77%) of the desired acid.

- ***O*-25-glycolic acid monensin 23**



Yield : 77%
m=39.0 mg

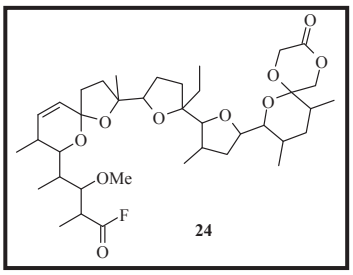
NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) δppm : 4.27-4.21 (1H, m), 4.12-4.04 (3H, m), 3.95 (1H, d, J=15.6 Hz), 3.76 (1H, d, J=2.5 Hz), 3.64-3.55 (2H, m), 3.51-3.48 (1H, m), 3.47-3.43 (2H, m), 3.32 (3H, s), 2.40-2.31 (2H, m), 2.20-2.13 (2H, m), 1.98-1.88 (5H, m), 1.84-1.73 (4H, m), 1.68-1.50 (6H, m), 1.46-1.32 (6H, m), 1.08-1.03 (6H, m), 0.99-0.94 (6H, m), 0.91-0.79 (9H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, MeOD) δppm : 184.16, 179.37, 108.65, 101.50, 87.55, 87.52, 86.12, 85.48, 83.99, 79.81, 78.40, 71.89, 69.07, 65.35, 62.94, 58.98, 45.50, 40.42, 39.08, 39.02, 38.43, 37.42, 36.24, 36.04, 34.93, 34.65, 33.23, 32.56, 30.47, 28.67, 27.37, 17.94, 16.96, 16.06, 14.49, 13.29, 11.44, 8.44.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{64}O_{13}Na^{+}$ = 751.4239, found = 751.4215.

IV-12-5 Fluorination of monensin oxodioxane

In a dry three-neck round-bottomed flask, monensin oxodioxane derivative (1 equiv.) was dissolved in anhydrous dichloromethane under argon. The mixture was cooled at -78°C and DAST (2 equiv.) was added very slowly. At the end of the addition, the reaction was stirred at room temperature during 1 day. The reaction mixture was washed several times with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The residue was chromatographed on silica gel to afford the desired product.

- **Acide fluorique monensin-7-ene oxodioxane 24**

*Procedure :*monensin oxodioxane **6g** (300 mg, 0.42 mmol, 1 equiv.), DAST (110 µL, 0.84 mmol, 2 equiv.) and dichloromethane (3 mL). Column : Cyclohexane/AcOEt (80/20).

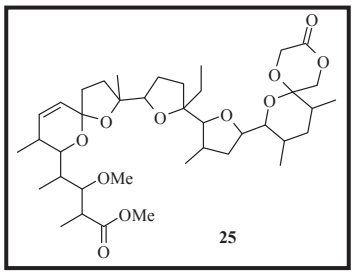


Yield : 32%
m=91.1 mg

NMR ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 5.95 (1H, dd, J_1=9.5 Hz, J_2=9.9 Hz), 5.55 (1H, d, J=9.7 Hz), 4.48 (1H, d, J=11.3 Hz), 4.38 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.26 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.21-4.15 (1H, m), 4.08 (1H, d, J=11.3 Hz), 3.88 (2H, m), 3.70-3.66 (2H, m), 3.39 (3H, s), 3.36-3.28 (1H, m), 2.84-2.79 (1H, m), 2.30-2.17 (2H, m), 2.14-1.80 (7H, m), 1.75-1.40 (9H, m), 1.39-1.19 (7H, m), 1.00-0.88 (18H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 167.26, 165.93 (d, J=363.1 Hz), 134.91, 128.11, 104.58, 94.43, 86.81, 86.27, 85.57, 83.10, 81.29, 78.92, 77.65, 72.56, 71.14, 59.81, 59.04, 39.93 (d, J=44.48 Hz), 39.30, 37.43, 37.01, 35.40, 35.11, 35.06, 33.76, 33.11, 32.14, 32.03, 29.09, 28.29, 24.84, 17.68, 16.33, 16.07, 13.38, 12.11, 9.73, 8.21.
NMR ^{19}F (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 36.89 ppm.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{38}H_{59}O_{10}FNa^+$ = 717.3984, found = 717.3984.

- **Methanoate monensin-7-ene oxodioxane 25**

*Procedure :*methanoate monensin oxodioxane **20** (200 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.), DAST (69 µL, 0.56 mmol, 2 equiv.) and dichloromethane (2 mL). Column : Cyclohexane/AcOEt (80/20).



Yield : 66%
m=128.0 mg

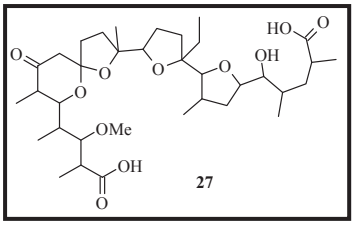
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 5.95-5.90 (1H, dd, J_1=9.6 Hz, J_2=9.6 Hz), 5.51 (1H, d, J=9.6 Hz), 4.48 (1H, d, J=11.3 Hz), 4.36 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.24 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.20-4.18 (1H, m), 4.07 (1H, d, J=11.3 Hz), 3.87 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.75 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.0 Hz), 3.67 (4H, m), 3.59 (1H, m), 3.32 (4H, m), 2.63-2.60 (1H, m), 2.29-2.26 (1H, m), 2.19-2.16 (1H, m), 2.09-1.98 (5H, m), 1.93-1.75 (3H, m), 1.73-1.40 (8H, m), 1.35-1.27 (4H, m), 1.17 (3H, d, J=7.04 Hz), 1.01-0.86 (18H, m).
RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 176.40, 167.22, 135.10, 128.02, 104.50, 94.40, 86.52, 86.21, 85.59, 83.19, 82.29, 78.92, 77.62, 72.54, 71.46, 59.81, 58.70, 51.87, 40.66, 39.26, 37.41, 37.01, 35.42, 35.09, 35.03, 33.73, 33.18, 32.23, 31.32, 29.03, 28.20, 24.63, 17.67, 16.34, 16.07, 13.15, 12.17, 11.37, 8.18.
RMN ^{19}F (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : nothing.
Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{39}H_{62}O_{11}Na^+$ = 729.4184, found = 729.4160

.

IV-13 Procedure for saponification of monensin oxolactone

Monensine oxolactone **16** (48.9 mg, 0.08 mmol, 1 equiv.) was stirred in a mixture of THF-MeOH-H_2O (2: 2: 1) at room temperature. NaOH 1N (250 µL) was added slowly. The mixture was stirred during 5 h. Then the mixture was evaporated to dryness to give a powder, which was suspended in dichloromethane (6 mL) and filtered off. The solid was washed several times with dichloromethane and the filtrate was evaporated to dryness to afford 50.0 mg (96%) of the desired acid.

- **7-oxo, 21-hydroxy, 25-acide monensin 27**



27

Yield : 96%
m=50.0 mg

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) δppm : 4.36 (1H, d, J=13.3 Hz), 4.25-4.20 (1H, m), 4.15-4.05 (1H, m), 3.95-3.90 (1H, m), 3.74-3.56 (1H, m), 3.51-3.39 (4H, m), 2.50-2.38 (3H, m), 2.37-2.27 (2H, m), 2.25-2.06 (3H, m), 2.01 (4H, m), 1.88 (5H, m), 1.77-1.72 (1H, m), 1.70-1.38 (4H, m), 1.30-1.20 (5H, m), 1.19-1.04 (3H, m), 1.03-0.90 (16H, m).

NMR ^{13}C (400 MHz, MeOD) δppm : 198.59, 180.40, 170.38, 103.35, 88.72, 88.10, 86.91, 84.73, 84.54, 84.39, 79.64, 78.56, 60.73, 44.87, 42.28, 42.24, 39.46, 38.87, 36.36, 36.29, 36.20, 35.76, 34.08, 33.36, 30.78, 28.16, 27.76, 24.23, 23.70, 20.29, 17.00, 16.93, 10.77, 9.67, 8.28.

Exact mass: HR ESIMS: Calculated for $C_{35}H_{58}O_{11}Na^{+}$ = 677.3871, found = 677.3854.

Deuxième chapitre :

Coumarine modifiée : vers de nouveaux répulsifs d'arthropodes ?

Deuxième chapitre :

Coumarine modifiée : vers de nouveaux répulsifs d'arthropodes ?

I – Etude bibliographique 116
I-1 Objectifs fixés par Mérial 116
I-2 Les répulsifs 117
I-2-1 Généralités et historique des répulsifs 117
I-2-2 Caractéristiques d'un répulsif 119
I-2-3 Description de quelques répulsifs connus 120
I-2-4 Conclusion de la bibliographie concernant les répulsifs 124
I-3 Présentation du sujet 126
I-3-1 Sujet proposé : modification de la coumarine 126
I-3-2 Bibliographie concernant la coumarine 126
II – Synthèse de dérivés de la coumarine 129
II-1 Modifications des hydroxycoumarines 129
II-1-1 Réactions d'éthérification 129
II-1-2 Formation de coumarines acide carboxylique en position 7 136
II-1-3 Réactions d'estérification 139
II-1-4 Réactions d'amidation 143
II-2- Hydrogénation 147
II-2-1 Hydrogénation de la coumarine 147
II-2-2 Hydrogénation des coumarines éthérées 149
III – Résultats des tests biologiques 151
III-1 Principe et mise en place du test 151
III-1-1 La drosophile : un modèle pour l'évaluation des répulsifs 151
III-1-2 Description du test 152
III-1-3 Exploitation des résultats 154
III-2 Etude de deux répulsifs connus : DEET et Picaridine 156
III-2-1 Etude du DEET 156
III-2-2 Etude de la Picaridine 157
III-3 Résultats des tests réalisés avec les nouvelles molécules 158
III-3-1 Tests biologiques avec les esters 158
III-3-2 Tests biologiques avec les amides 160
III-3-3 Tests biologiques avec les éthers 162
III-3-4 Etude paramétrique pour optimiser la structure 169
III-3-5 Etude de certaines molécules à 1,032 mmol/mL 171
III-3-6 Conclusion des tests biologiques 172
Conclusions 173
IV – Partie expérimentale 174

IV-1 General procedure for etherification of hydroxycoumarins (**1**, **2** and **3**) 174
IV-1-1 From 7-hydroxycoumarin with bromide (**4a** – **4c**) 174
IV-1-2 From alcohol on 7-hydroxycoumarin (**4d** – **4y**) 175
IV-1-3 From alcohol on 4-hydroxycoumarin (**5a-5f**) 180
IV-1-4 From alcohol on 6-hydroxycoumarin (**6a-6c**) 182
IV-2 General procedure for the synthesis of the two coumarin acids 183
IV-2-1 Synthesis of the coumarin acid **7** 183
IV-2-2 Synthesis of the coumarin acid **8** 184
IV-3 General procedure for esterification 185
IV-3-1 General procedure for esterification of 7-hydroxycoumarin (**11a-11m**) 185
IV-3-2 General procedure for esterification of coumarin acid **7** (**12a-12b**) 188
IV-3-3 General procedure for esterification of coumarin acid **8** (**13a-13c**) 189
IV-4 General procedure for amidification 190
IV-4-1 General procedure for amidification of coumarin acid **7** (**14a-14g**) 190
IV-4-2 General procedure for amidification of coumarin acid **8** (**15a-15g**) 192
IV-4-3 General procedure for amidification on the position 4 194

Deuxième chapitre :

Coumarine modifiée : vers de nouveaux répulsifs d'arthropodes ?

La recherche d'agents répulsifs toujours plus efficaces, moins toxiques et ayant une activité prolongée est actuellement un sujet sensible. En effet, de nombreux insectes peuvent être vecteurs de maladies graves telles que la dengue ou le paludisme véhiculés par exemple par les moustiques. C'est pour cela qu'il est important de mettre au point de nouveaux répulsifs ayant une efficacité et une durée d'action supérieures à celles déjà existantes. De nos jours, le DEET est le plus efficace mais il présente certains inconvénients.

Il existe trois grandes familles de répulsifs, ceux dérivant du DEET (les amides), ceux d'origine naturelle et ceux possédant une fonction ester. Nous avons choisi de nous diriger vers la modification d'une lactone bicyclique, la coumarine. Cette dernière présente des propriétés répulsives déjà avérées. Nous souhaitons les augmenter en la modifiant chimiquement par addition d'un groupement fonctionnel ou par réduction.

I – Etude bibliographique

I-1 Objectifs fixés par Mérial

Le domaine des répulsifs est un des axes phares de la recherche de Mérial. En effet, Mérial souhaite développer un nouveau répulsif « universel » contre différentes cibles et étant applicable à la protection de plusieurs animaux de compagnie ou d'élevage. L'entreprise souhaite, à long terme, que ce nouveau répulsif protège les chiens des tiques et des puces, les chevaux des taons, les ruminants et les moutons des mouches et le milieu aviaire des acariens.

Mérial a fixé un cahier des charges précis et souhaite que le nouveau répulsif dans une formulation soit efficace pendant 30 jours. Parallèlement, une thèse est en cours au laboratoire du LAGEP (université de Lyon) pour mettre au point une nouvelle formulation basée sur la nano-encapsulation, devant permettre d'augmenter la durée d'action du produit. De plus, l'entreprise veut développer une nouvelle molécule répulsive ayant une efficacité au moins aussi importante que le DEET ou la Picaridine, deux répulsifs actuellement commercialisés. C'est le sujet développé dans la seconde partie de cette thèse.

Pour évaluer l'efficacité des molécules nouvellement synthétisées, nous avons mis en place et réalisé des tests *in vivo* en présence de drosophiles au laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE, UMR 5558) de l'Université Claude Bernard Lyon 1 avec l'aide du Dr Rolland Allemand. En parallèle, une étude de modélisation moléculaire est réalisée en collaboration avec l'équipe Modélisation Moléculaire de l'institut des Sciences Moléculaires (ISM-LPTC, UMR 5255) de l'Université Bordeaux 1 sous la direction du Dr Nathalie Geneste. Cette analyse devrait permettre d'établir une corrélation précise entre les différents paramètres physico-chimiques qui caractérisent les répulsifs avec l'activité de ces derniers et ainsi de synthétiser des structures optimisées.

I-2 Les répulsifs

Dans de nombreuses régions du monde, les insectes par leurs piqûres sont les vecteurs majeurs de maladies, telles que le paludisme ou la fièvre jaune. Depuis les temps romains, de nombreuses plantes ont été utilisées en tant que répulsifs, grâce aux propriétés répulsives des terpènes. Mais elles ont été, de nos jours, largement remplacées par les produits de synthèse. Le plus connu et le plus utilisé est le *N,N*-diéthyl-m-toluamide (DEET).

I-2-1 Généralités et historique des répulsifs

Les répulsifs sont des substances chimiques qui visent à repousser les insectes ou à les empêcher d'attaquer l'homme ou les animaux. Plusieurs modes d'action leur sont attribués : soit ils interfèrent avec les molécules attractives ou soit ils agissent sur des sites spécifiques en créant des réactions d'éloignement. Ils provoquent chez l'insecte une altération de la conduite de repérage de la proie, conduisant à une déviation du vol, l'éloignant de sa cible potentielle. Cette définition oppose fondamentalement les répulsifs aux insecticides. Ces derniers tuent l'insecte, avec souvent des sélectivités, et ils ont un impact sur l'environnement.[1]

L'utilisation de répulsifs remonte à la haute antiquité. A cette époque, les recettes étaient variées mais peu efficaces, souvent malodorantes et d'utilisation délicate (huile d'olive, jus de tomate, urine de chameau…). Plus récemment, la recherche de nouveaux répulsifs, surtout aux Etats-Unis où elle a été stimulée par la guerre du Vietnam, permit de découvrir plus de 20000 molécules. Mais, en raison de leur toxicité et de leur faible efficacité, seules quelques-unes ont été retenues.[1]

Il existe deux grandes familles de répulsifs : les naturels et les synthétiques.

Parmi les répulsifs naturels, le plus connu est l'huile de citronnelle obtenue de plusieurs espèces de *Cymbopogon*, en particulier de *Cymbopogon nardus*. Cette huile contient majoritairement deux terpènes qui présentent une activité répulsive : citronellal et géraniol (Figure 1). Leur action, découverte en 1901, dure moins d'une heure.

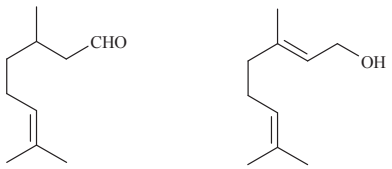


Figure 1 : Citronellal et géraniol

D'autres huiles essentielles présentent une activité répulsive, par exemple l'ail, le cèdre, le curcuma, l'eucalyptus, la lavande ou encore le clou de girofle.

Mais, l'utilisation de ces huiles essentielles en tant que répulsifs présente de nombreux inconvénients. En effet, leur composition et leur qualité sont variables et dépendent de l'âge des feuilles, de la saison et de la méthode d'extraction. De plus, certaines de ces substances sont potentiellement photo-toxiques ou allergènes.

[1] Combemale P., *Med. Trop.*, **2001**, 61, 99-103.

C'est pour ces raisons que les répulsifs d'origine synthétique sont plus largement utilisés de nos jours.

Le diméthylphtalate (DMP) (Figure 2) a été le premier répulsif breveté en 1929. D'abord utilisé pour chasser les mouches, son activité s'est ensuite répandue, après modification du méthyl ester en butyl ester, envers divers insectes. Cependant, en 1990, les scientifiques découvrent que le DMP présente des propriétés tératogènes. Par ailleurs, il fait aujourd'hui partie des molécules préoccupantes dans le cadre du programme REACH (Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of CHemical substances).

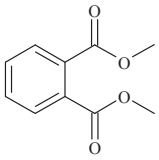


Figure 2 : Diméthylphtalate

Juste avant la seconde guerre mondiale, en 1937 et en 1939, deux nouveaux répulsifs ont été découverts : l'indalone[2] et l'éthyl hexanediol[3], appelé aussi Rutgers 612 (Figure 3). Mais, comme le diméthylphtalate, ces molécules montrent certaines limitations qui empêchent d'étendre leur utilisation.

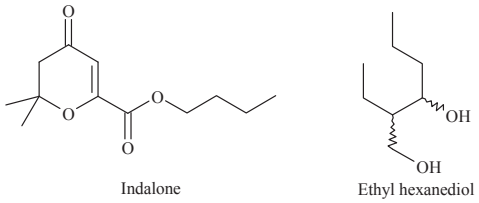


Figure 3 : Indalone et Ethyl hexanediol

En 1953, les chimistes synthétisent le DEET (*N*,*N*-diéthyl-m-toluamide)[4] en une étape à partir de l'acide m-toluique avec un rendement de 70%. Ce composé (Figure 4) est actuellement le répulsif le plus utilisé dans le monde et l'élément de référence pour tous les autres. L'agence « US Environmental Protection Agency » estime que 200 millions de personnes dans le monde entier emploient du DEET chaque année. Mais, le DEET présente quelques inconvénients. Il est un solvant pour les plastiques (montres, stylos et appareils photo), il a une odeur désagréable, il peut être irritant pour la peau et les muqueuses. De plus, il a été associé à des cas de neurotoxicité, en particulier chez les enfants.

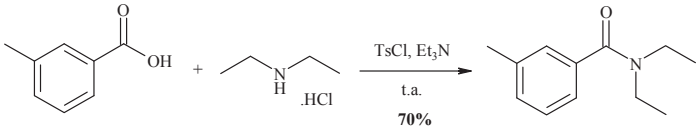


Figure 4 : Synthèse du DEET[5]

Puis, en 1970, Merck introduit sur le marché un nouveau répulsif, Merck 3535[6] (IR 3535) (Figure 5). Ce dernier a des propriétés cosmétiques et toxicologiques plus favorables que le DEET.

[2] Knipling E. F., Dove W. E., *J. Econ. Entomol.*, **1944**, 37, 477-480.
[3] Travis B. V., Smith C. N., *J. Forestry*, **1950**, 48, 329-330.
[4] McCabe E. T., Barthel W. F., Gertler S. I., *J. Org. Chem.*, **1954**, 19, 493-498.
[5] Khalafi-Nezhad A., Parhami A., Soltani Rad M. N., Zarea A., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 6879-6882.
[6] Klier M., Kuhlow F., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1976**, 27, 141-153.

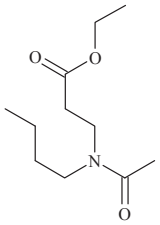


Figure 5 : Merck 3535

Plus récemment, Bayer a développé un autre amide, la Picaridine[7] (Bayrepel, KBR 3023) (Figure 6) qui est en train de remplacer progressivement le DEET. Ce nouveau répulsif n'a pas d'odeur et présente de meilleures propriétés cosmétiques que le DEET.

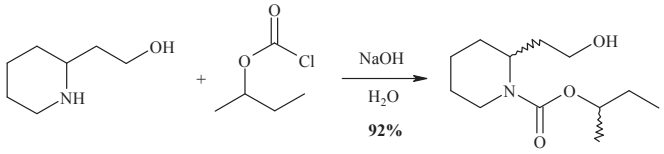


Figure 6 : Synthèse de la Picaridine[8]

Par ailleurs, le *p*-menthane-3,8-diol (PMD)[9] (Figure 7) est également un successeur potentiel du DEET. Le PMD est au départ obtenu à partir de feuilles de l'arbre Lemon Eucalyptus, *Eucalyptus citriodora* et sa synthèse est également connue.[10] Il est apparu, pour la première fois en tant que répulsif, dans les années 1970, en Chine où il remplaçait le diméthylphtalate synthétique.

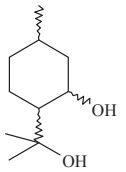


Figure 7 : *p*-menthane-3,8-diol (PMD)

I-2-2 Caractéristiques d'un répulsif

Un répulsif idéal devrait présenter les caractéristiques suivantes[11] :

- Avoir une efficacité de longue durée envers une large variété d'arthropodes,
- Ne pas être irritant après une application topique ou sur les vêtements,
- Etre sans odeur ou avoir une odeur agréable,
- Ne pas avoir d'effets sur les vêtements (coloration, décoloration ou fragilisation des fibres),
- Ne pas avoir une apparence huileuse lors d'une application topique,
- Etre inerte vis-à-vis des plastiques utilisés communément,
- Etre chimiquement stable et être disponible à un prix abordable pour une utilisation à grande échelle.

[7] Bayer, EP 0 289 842 A1, **1988**.
[8] Bayer, DE 4133516 A1, **1993**.
[9] Nishimura H., *Fragr. J.*, **1985**, 13 (6), 160-162.
[10] Baron C., Maume B., *Parfumerie, Cosmetique, Savons*, **1963**, 6 (9), 361-368.
[11] Brown M., Hebert A. A., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1997**, 36 (2), Part 1, 243-249.

De nombreuses études ont montré que des composés comportant des groupements spécifiques ont une activité répulsive supérieure en termes de durée de protection.[12] En 1953, après avoir étudié les résultats des tests de Morton et de ses collaborateurs[13] sur 4000 composés, Roadhouse[14] a conclu que les oximes sont les composés les plus efficaces et que les hydrocarbones forment les répulsifs les moins efficaces. De plus, les données indiquent que les fonctions oxygénées (éthers, esters…) sont très importantes pour l'activité répulsive et que la présence d'un groupement phényle l'augmente probablement.

En 1968, après l'évaluation de 4308 composés issus de la même banque de données, Garson et Winnike[15] ont trouvé que les amides et les imides présentent une meilleure activité répulsive que les phénols et les alcools.

La volatilité des composés est un paramètre très important pour leur activité. En effet, Christophers[16] a démontré que les molécules dont le point de fusion est supérieur à 37°C, sont généralement de mauvais répulsifs. Par contre, la coumarine qui a une température de fusion de 68-70°C est une exception. Piper et ses collaborateurs[17] ont trouvé qu'il était préférable que les composés répulsifs aient une température d'ébullition comprise entre 230 et 260°C.

Il existe une gamme optimale de masse moléculaire comprise entre 146 et 257 pour une activité répulsive potentielle.[18] Les molécules qui sont encombrées et qui portent des substituants sur leur chaîne principale sont susceptibles d'être de bons répulsifs.[19, 20]

La lipophilie des composés est également un paramètre important qui peut influencer l'activité répulsive. En effet, le composé ne doit pas être trop hydrophobe pour ne pas pénétrer dans la peau. Il est préférable qu'il reste en surface pour repousser les insectes. Son coefficient de partage (logP) doit être compris entre 1,5 et 2,5[21].

I-2-3 Description de quelques répulsifs connus

Une étude bibliographique approfondie nous a permis de classer les répulsifs en trois grandes familles :

- Les répulsifs naturels : terpènes, pyréthroïdes
- Les amides : apparentés au DEET
- Les esters : esters linéaires ou lactones bicycliques

[12] Ma D., Bhattacharjee A. K., Gupta R. K., Karle J. M., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1999**, 60 (1), 1-6.
[13] Morton F. A., Travis B. V., Linduska J. P., *US Dept. Agr. Bur. Entomol. Plant Quaran*, **April, 1942 to April, 1947**, E-733.
[14] Roadhouse L. A. O., *Can. J. Zool.*, **1953**, 31, 535-546.
[15] Garson L. R., Winnike M. E., *J. Med. Entomol.*, **1968**, 5, 339-352.
[16] Christophers S. R., *J. Hyg.*, **1947**, 45, 176-231.
[17] Piper D. E., Hall R. H., Wright G. F., *Chem. Can*., **1951**, 3, 97-98.
[18] Rayner H. B., Wright R. H., *Can. J. Entomol.*, **1966**, 98, 76-80.
[19] Sugawara R., Tominaga Y., Suzuki T., *Insect. Biochem*., **1977**, 7, 483-485.
[20] Alexander B. H., Beroza M., *J. Econ. Entomol.*, **1963**, 56, 58-60.
[21] Suryanarayana M. V. S., Pandey K. S., Prakash S., Raghuveeran C. D., Dangi R. S., Swamy R. V., Rao K. M., *J. Pharm. Sci.*, **1991**, 80 (11), 1055-1057.

I-2-3-1 Les répulsifs naturels

De nombreuses plantes ou produits dérivés, en particulier les huiles essentielles, sont décrites comme des sources potentielles de répulsifs contre les insectes. Les huiles essentielles contiennent de nombreux terpènes à l'origine de cette activité. Au sens strict, les terpènes sont des hydrocarbures mais de nombreux dérivés (alcools, aldéhydes, cétones, acides), de structure apparentée, sont considérés comme des composés terpéniques.

Par exemple, le PMD est un terpène d'origine naturelle dont la synthèse est actuellement connue et industrialisée. Le PMD comporte quatre centres chiraux. Il possède donc seize stéréoisomères. L'étude de quatre de ces derniers a été réalisée et a montré qu'ils avaient une activité répulsive équivalente.[22]

I-2-3-2 Les amides

Les amides sont une grande classe de répulsifs qui a été largement étudiée depuis les années 1950. Les trois amides les plus connus et utilisés sont le DEET, la Picaridine (carbamate) et le Merck 3535.

Le DEET est le premier répulsif découvert de cette famille. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées autour de cette molécule afin de trouver un répulsif qui soit encore plus efficace et qui présente moins de désagréments. Les chimistes ont modifié la partie lipophile du DEET en incorporant divers substituants sur le cycle aromatique ou en remplaçant ce dernier par un cycle saturé. Ils ont également modifié la fonction amide en changeant les substituants par des cycles ou par des chaînes hydrocarbonées plus ou moins longues (Figure 8).[23, 24, 25]

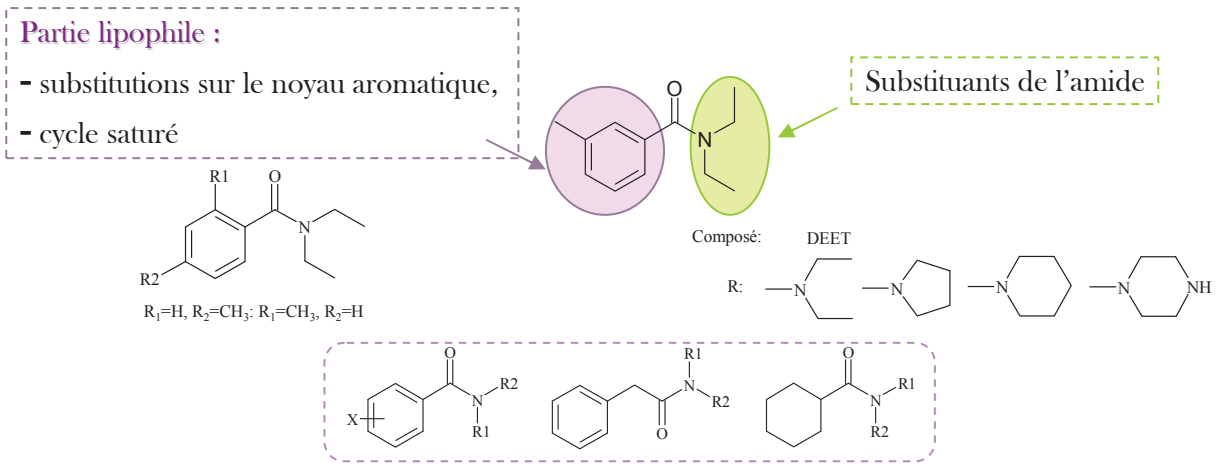


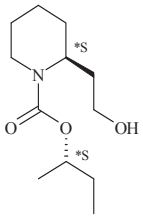
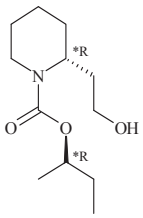
Figure 8 : Modifications du DEET

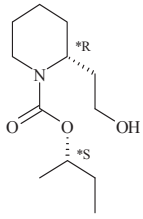
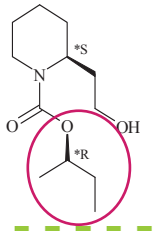
[22] Barasa S. S., Ndiege I. O., Lwande W., Hassanali A., *J. Med. Entomol.*, **2002**, 39 (5), 736-741.
[23] Johnson H. L., Skinner W. A., Skidmore D., Maibach H. I., *J. Med. Chem.*, **1968**, 11, 1265-1268.
[24] Suryanarayana M. V. S., Pandey K. S., Prakash S., Raghuveeran C. D., Dangi R. S., Swamy R. V., Rao K. M., *J. Pharm. Sci.*, **1991**, 80, 1055-1057.
[25] Jahn A., Kim S. Y., Choi J. H., Kim D. D., Ahn Y. J., Yong C. S., Kim J. S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2010**, 62, 91-97.

Une recherche par mot clé sur « Scifinder Scholar®» en avril 2011, avec le mot clé « DEET », nous indique que 1506 articles et 780 brevets ont été publiés. Si la recherche est réalisée avec les termes « DEET, synthesis », nous obtenons 407 articles et 329 brevets. Ces résultats montrent que le DEET est un sujet d'importance aussi bien d'un point de vue académique qu'industriel.

Des études de modélisation ont été réalisées à partir du DEET. La société Bayer a beaucoup œuvré dans ce domaine. Dans les années 1980, la recherche d'un nouveau répulsif basée sur une analyse structurale assistée par ordinateur a ainsi été initiée à partir du DEET. Parmi les 800 composés proposés, la structure de la Picaridine a été sélectionnée et a donné de très bons résultats. En 1988, Bayer dépose un brevet sur les dérivés α, ω-aminoalcools incluant la Picaridine,[7] brevet ne protègeant que les formes racémiques des produits.

La Picaridine possède deux centres chiraux et a donc quatre stéréoisomères qui ont potentiellement des activités répulsives différentes. L'efficacité de ces derniers a été étudiée[26] et brevetée[27] récemment. Les tests sur cochons d'Inde en présence du moustique *Aedes Aegypti* ont montré que les quatre stéréoisomères n'avaient pas une activité répulsive équivalente (Tableau 1).

Molécule	***Temps de protection (h)***
	3,9
	4,4

Molécule	***Temps de protection (h)***
	3,4
	4,9

L'isomère le plus efficace

Tableau 1 : Tests répulsifs sur des cochons d'Inde (*Aedes Aegypti*)

D'après ces résultats, l'isomère (S, R) est le plus efficace. De plus, la partie butan-2-ol semble être importante et significative pour l'activité répulsive de la Picaridine car les deux meilleurs isomères sont constitués du (R)-butan-2-ol.

[26] Natarajan R., Basak S. C., Balaban A. T., Klun J. A., Schmidt W. F., *Pest. Manag. Sci.*, **2005**, 61, 1193-1201.
[27] Saltigo GMBH, WO 2008/046889, **2008**.

I-2-3-3 Les esters et les lactones bicycliques

De nombreuses publications font référence à des esters linéaires et à des lactones bicycliques ayant des propriétés répulsives importantes. Cette famille a été beaucoup moins étudiée que celle des amides.

En 1987, la société Angus Chemical Company a publié un brevet[28] concernant des lactones bicycliques (Figure 9) ayant une activité répulsive envers les insectes.

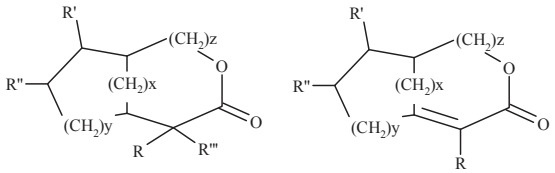


Figure 9 : Structures brevetées par Angus Chemical Company

Dans ce brevet, plusieurs structures sont proposées dont cinq molécules, appelées CIC (Coulston International Company), qui présentent une activité importante sur quinze testées (Figure 10). Ces lactones sont constituées de cycles à cinq ou à six chaînons et d'une fonction carboxyle située en position béta de la jonction des cycles.

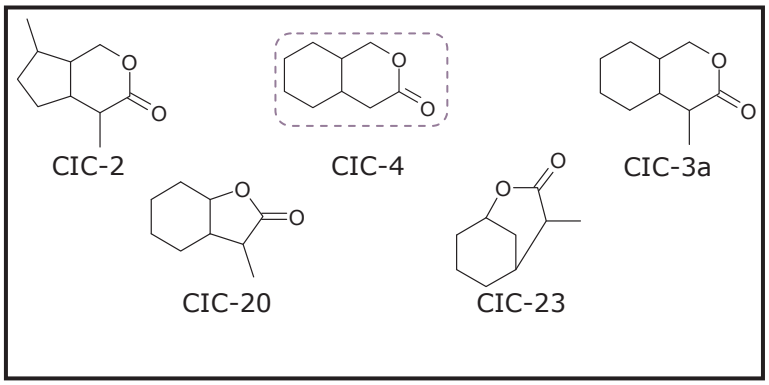


Figure 10 : CIC ayant une bonne activité répulsive

En 1991, la société Johnson (S. C.) & Son a publié un brevet[29] concernant également l'activité répulsive de lactones bicycliques. Ces dernières sont constituées d'un cyclopentyle fusionné avec un cycle à six chaînons et possèdent une fonction carbonyle localisée sur le cycle à cinq en position alpha de la jonction de cycle. Leur activité répulsive est comparée à celle de la népatalactone, lactone bicyclique ayant aussi une fonction carboxyle en alpha de la jonction de cycle et étant connue pour son action répulsive. Trois lactones ont été testées sur des femelles *Aedes Aegypti* (Figure 11). Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 2).

[28] Angus Chemical Company, US 4663346, **1987**.
[29] Johnson (S. C.) & Son, 2022491 A1, **1991**.

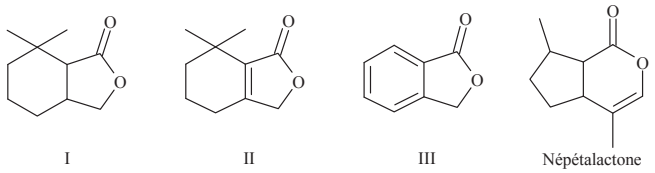


Figure 11 : Lactones testées

Matériel	*Dose**	*Contrôle***	*Traitement***
Formule I	2,04	26,0 (1,7)	10,1 (3,7)
Formule II	2,07	25,7 (2,8)	12,7 (3,8)
Formule III	2,56	24,6 (1,0)	11,1 (1,8)
DEET	2,73	26,4 (1,1)	21,6 (2,6)

* Nanomoles de produit par litre d'air cible

** Nombre de moustiques sur la surface cible (Erreur standard)

Tableau 2 : Tests répulsifs avec les lactones bicycliques

En 2007, la société du Pont de Nemours[30] a breveté les stéréoisomères de la népétalactone et de son dérivé, la dihydronépétalactone (Figure 12). Ils présentent tous une activité répulsive envers divers arthropodes, notamment contre les tiques.

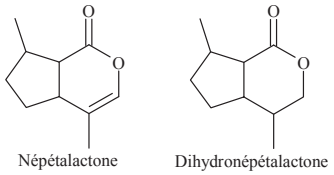


Figure 12 : Népétalactone et Dihydronépétalactone

I-2-4 Conclusion de la bibliographie concernant les répulsifs

De notre étude bibliographique ressort trois grandes familles de répulsifs qui ont été plus ou moins étudiées. La première classe comprend l'ensemble des dérivés amides inspirés du DEET. Cette catégorie dans laquelle se trouvent la picaridine et le merck 3535, a été largement étudiée depuis les années 1950. Le second groupe rassemble les molécules répulsives naturelles telles que les terpènes et les pyréthroïdes. Et le troisième ensemble, beaucoup moins étudié, contient les composés comportant une fonction ester et/ou lactone (Figure 13). Les lactones semblent être plus intéressantes que les esters linéaires.

Cette analyse nous a permis de sélectionner la famille des esters/lactones. En effet, cette dernière, moins étudiée, est plus libre d'un point de vue propriétés industrielles et est plus originale que celle des amides.

[30] E. I. du Pont de Nemours Compagny, US 7232844 B2, **2007**.

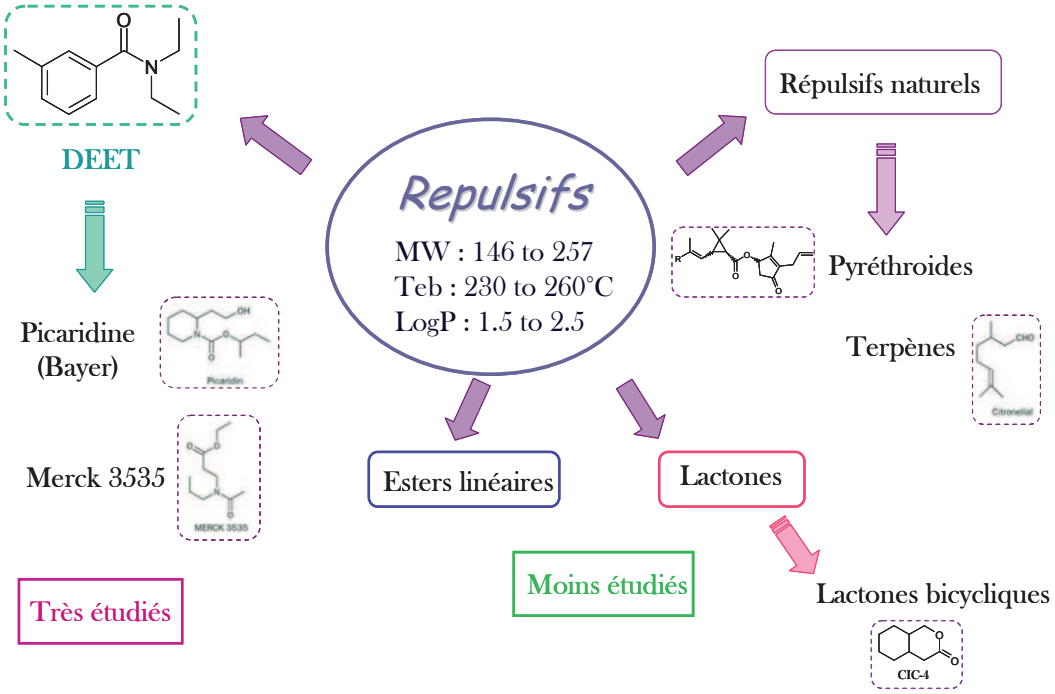


Figure 13 : Résumé de l'étude bibliographique

Nous avons fait également le choix de synthétiser des molécules ayant des masses moléculaires de l'ordre de 150 à 300 $g.mol^{-1}$ et des logP de 1,5 à 3,5. Ces composés ne comporteront pas ou peu de groupements donneurs de liaisons hydrogènes (HBD). Ces dernières entraîneraient une baisse de la tension de vapeur ce qui rendrait la molécule moins volatile. Or, pour être répulsif, un composé doit être un peu volatile pour être présent dans une couche au-dessus de la surface à protéger.

I-3 Présentation du sujet

I-3-1 Sujet proposé : modification de la coumarine

C'est à travers une littérature extrêmement riche, que nous avons choisi de concentrer nos recherches sur la famille des lactones bicycliques, composés les moins étudiés dans le domaine. Nous avons constaté que les amides ont été très largement abordés, notamment par des grandes entreprises chimiques telles que Bayer. Par ailleurs, Mérial ne souhaite pas travailler à partir de produits naturels. En effet, l'approvisionnement de tels substrats est variable en quantité et peut dépendre des conditions climatiques et environnementales du pays qui l'extrait.

Ainsi, nous avons proposé de concentrer nos travaux autour de la coumarine. En effet, cette molécule présente certaines analogies structurales avec la lactone CIC-4 qui a une bonne activité répulsive. Ces deux composés sont des lactones bicycliques comportant une fonction carbonyle en position béta de la jonction de cycle et sont constitués de neuf carbones et de deux oxygènes. Par réduction totale de la coumarine, un composé non aromatique possédant de très grandes similitudes structurales avec la CIC-4, peut être obtenu (Figure 14).

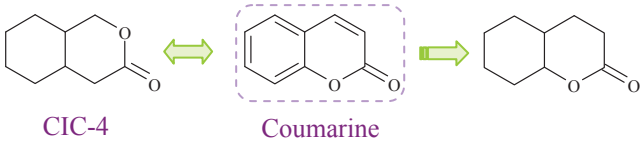


Figure 14 : Analogies structurales

De plus, un brevet[31] datant de 1952 décrit la coumarine et certains de ses dérivés comme ayant des propriétés répulsives intéressantes contre les acridiens. D'autres études plus récentes, réalisées à partir de dérivés coumariniques extraits de plantes, soulignent une activité répulsive contre divers insectes tels que les moustiques et les tiques.[32,33] Ainsi, la coumarine présente déjà une action répulsive avérée. En la modifiant par des transformations chimiques de substitution, de réduction ou d'hydrolyse, nous devrions pouvoir augmenter cette action.

La coumarine peut être modifiée au niveau de sa double liaison, de son cycle aromatique et peut être réduite. La coumarine est disponible commercialement à un prix raisonnable (sur le site d'Alfa Aesar en avril 2011, 1kg de coumarine coûte 101 euro).

I-3-2 Bibliographie concernant la coumarine

I-3-2-1 Synthèse de la coumarine

La coumarine est une 2*H*-chromen-2-one de masse molaire de 146,04 g.mol^{-1}, ayant une température d'ébullition de 301,7°C et un logP de 1,78. Son nom vient de « cumaru » qui est le nom, dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine. Elle est présente en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le

[31] Chauvin R. A. J., Mentzer C., N° 1.003.646, **1952**.
[32] Ngadjui B. T., Ayafor J. F., Sondengam B. L., *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52 (2), 243-247.
[33] Tunon H., Thorsell W., Mikiver A., Malander I., *Fitoterapia*, **2006**, 77, 257-261.

mélilot, la sauge sclarée et la lavande. Nous la trouvons également dans le miel, le thé vert et la cannelle. La coumarine est stockée dans la plante sous la forme de glucoside de l'acide coumarinique qui se transforme en coumarine sous l'action d'enzymes ou du soleil.

Ce composé a été isolé par A. Vogel en 1820, à partir des fèves de Tonka. Puis, il a été synthétisé en 1868 par W. H. Perkin,[34] (réaction de Perkin), à haute température, à partir du salicylate de sodium et de l'anhydride acétique $(CH_3CO)_2O$ en présence d'une base faible (CH_3COONa) (Schéma 1).

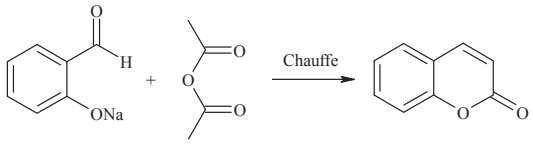


Schéma 1 : Réaction de Perkin

Certains dérivés de la coumarine peuvent être obtenus par la condensation de Pechmann[35] entre un phénol et un β-céto ester en présence d'un acide fort (Schéma 2).

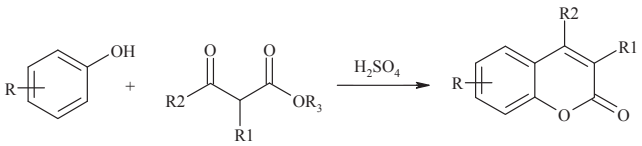


Schéma 2 : Condensation de Pechmann

Des dérivés de la coumarine substitués en position 3 sur la double liaison sont synthétisés par la réaction de Knoevenagel,[36] cyclocondensation de salicylaldéhydes avec des composés méthylènes réactifs tels que les esters maloniques, les esters cyanoacétiques et les malononitriles en présence de pyridine et d'autres bases (Schéma 3).

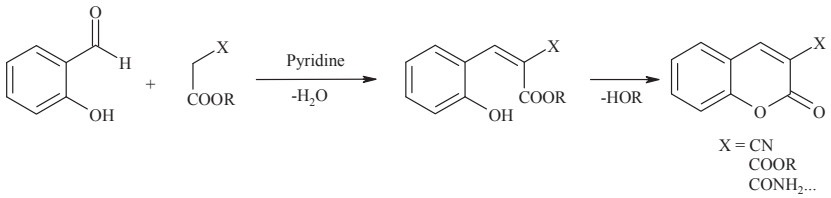


Schéma 3 : Synthèse de Knoevenagel

I-3-2-2 Propriétés biologiques de la coumarine et son utilisation

La coumarine et ses dérivés présentent de nombreuses applications tant dans le domaine médical que dans le domaine cosmétique et de la parfumerie. Ils présentent par exemple des activités anti-tumorale, anti-fongicide et anticoagulante reconnues. La coumarine est largement utilisée dans les parfums et entre dans environ 90% des compositions et, à une concentration supérieure à 1%, dans 60% des compositions.

[34] Perkin W. H., *J. Chem. Soc.*, **1868**, 21, 181-186.
[35] Pechmann H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1884**, 17, 929-936.
[36] Knoevenagel E., *Ber.*, **1896**, 29, 172-174.

En marge de ces applications, nous pouvons signaler la neutralisation de certaines odeurs : insecticides, peintures, encres ou plastiques et le masquage des odeurs d'iodoforme ou de phénols. Hors du domaine de l'olfaction, on l'utilise en électrochimie car elle améliore le dépôt de cristaux dans le zingage par exemple.

I-3-2-3 Propriétés toxicologiques de la coumarine

La coumarine n'est pas toxique aux doses habituelles dans la nourriture (0,25%). Cependant, les scientifiques ont trouvé une toxicité hépatique et des tumeurs chez le rat traité à 100 mg/kg/jour (DL_{50} (rat, oral) = 0,293 $g.kg^{-1}$) et une toxicité pulmonaire et des tumeurs chez la souris à 200 mg/kg/jour. Ceci a entraîné son interdiction dans les aliments. A des doses inférieures, aucun effet n'est observé.

Les études sont compliquées car le métabolisme de la coumarine est différent en fonction de l'espèce étudiée. Chez l'homme, la coumarine est convertie en 7-hydroxycoumarine qui n'est pas toxique, tandis que chez les rongeurs, elle est transformée en 3,4-époxycoumarine qui est très toxique.[37] C'est pour ces raisons que des dérivés de la coumarine, plus précisément de la 4-hydroxycoumarine, sont utilisés en tant que rondenticides, comme par exemple le wafarin (Figure 15). Par contre, sa non-toxicité chez l'homme permet son utilisation large dans les parfums ou comme anticoagulant.

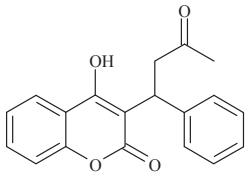


Figure 15 : Wafarin

I-4-2-4 Réactivité de la coumarine

Bien que la coumarine soit constituée d'un cycle aromatique, elle possède le caractère d'énol lactone plutôt que celui d'un hétéroarène comme le montre son spectre RMN.[38] Pour ces raisons, les réactions caractéristiques sont l'addition C3-C4 sur la double liaison et l'ouverture nucléophile de la fonction lactone. Il est très difficile de réaliser, directement sur le noyau aromatique, des substitutions électrophiles aromatiques ou toutes autres modifications spécifiques à la chimie des aromatiques. Lorsque la modification du cycle aromatique sera abordée, il faudra partir d'une coumarine déjà substituée sur le cycle par un groupement réactif, tel un hydroxyle ou une amine.

Pour débuter nos recherches, la 7-hydroxycoumarine commerciale a été sélectionnée comme précurseur de synthèse, puis nous avons fait varier la position de l'hydroxyle en positions 4 et 6 (Figure 16).

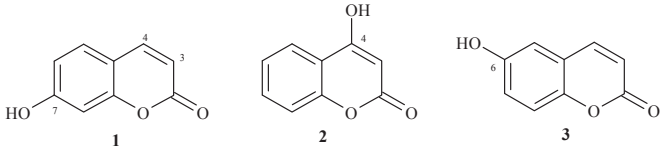
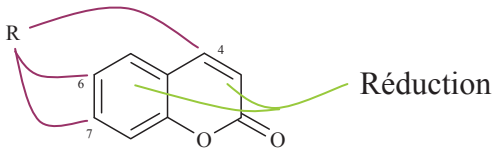


Figure 16 : Hydroxycoumarines

[37] Cohen A. J., *Fd Cosmet. Toxicol.*, **1979**, 17, 277-289.
[38] Eicher T., Hauptmann S., *The Chemistry of heterocycles 2nd*, **2003**, Wiley-VCH, ISBN : 3-527-30720-6.

II – Synthèse de dérivés de la coumarine

Les 4-, 6- et 7-hydroxycoumarines ont été utilisées comme précurseurs dans un certain nombre de réactions (estérification, éthérification, amidation…) grâce à sa fonction hydroxyle accessible située en position 4, 6 ou 7. Des réductions du cycle aromatique et de la double liaison ont également été réalisées.



Une étude de l'influence sur l'activité répulsive de la nature de R de même que de sa position sur le cycle coumarine a été faite. Les synthèses réalisées sont courtes, avec au maximum quatre étapes, et permettent d'obtenir un grand nombre de composés variés.

Pour une meilleure compréhension, les molécules synthétisées seront d'abord présentées, puis les résultats des tests seront détaillés. Cependant, au cours de la thèse, le choix des molécules a été déterminé au fur et à mesure, en fonction des résultats biologiques obtenus en parallèle. Le choix de ce type de présentation a été fait par souci de simplicité.

II-1 Modifications des hydroxycoumarines

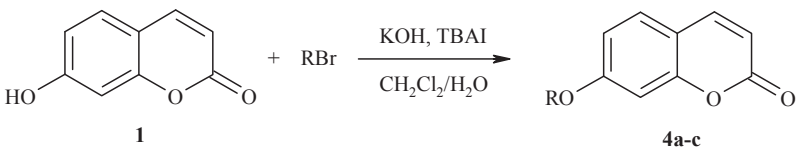
II-1-1 Réactions d'éthérification

II-1-1-1 Ethérification de la 7-hydroxycoumarine

II-1-1-1-a A partir du bromure

Les réactions d'éthérification ont été réalisées, tout d'abord, à partir de bromures d'alkyle. Ainsi, une substitution nucléophile est réalisée à partir de l'alcool de la 7-hydroxycoumarine sur le bromure d'alkyle. Plusieurs conditions ont été testées.

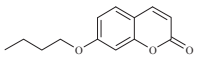
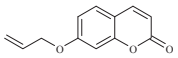
Dans un premier temps, la réaction a été faite en présence d'hydroxyde de potassium (KOH) et d'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) dans une solution dichlorométhane/eau (Schéma 4).



1 **4a-c**

Schéma 4 : Ethérification de la 7-hydroxycoumarine

Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 3).

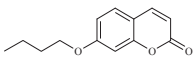
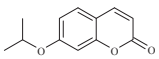
Entrée	*Ether*	*N° éther*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**4a**	17%	218.09	2.95
2		**4b**	35%	202.06	2.36

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 3 : Ethérification avec KOH/TBAI

Les rendements obtenus par cette méthodologie sont relativement faibles. En effet, la forte alcalinité du milieu réactionnel favorise l'ouverture de la lactone et les réactions secondaires.

Pour éviter les réactions secondaires, nous avons utilisé une base beaucoup plus faible, le carbonate de potassium K_2CO_3, en présence du bromure et de la 7-hydroxycoumarine, à reflux dans un solvant. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 4).

Entrée	*Solvant*	*Température*	*Ether*	*N° éther*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1	AcOEt	80°C		**4a**	82%	218.09	2.95
2	Acétone	55°C		**4c**	83%	204.07	2.40

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 4 : Ethérification avec K_2CO_3

Des rendements plus satisfaisants sont obtenus dans ces conditions. Pour l'éther **4a**, une amélioration de 65% est observée par rapport à la première méthodologie. Mais, cette méthode est difficile à mettre en œuvre car ces dérivés bromés à courte chaîne carbonée sont assez volatiles, il est nécessaire de travailler dans des tubes scellés. Il convient aussi de choisir le solvant en fonction de la volatilité du bromure.

II-1-1-1-b A partir de l'alcool

Pour faciliter la mise en œuvre des réactions, nous avons décidé de tester les conditions de Mitsunobu en faisant réagir non plus des dérivés bromés mais des alcools sur la 7-hydroxycoumarine. Cette méthodologie, triphénylphosphine (PPh_3) en présence de diéthylazodicarboxylate (DEAD) dans du THF anhydre à température ambiante (Schéma 5), nous permettra de faire rapidement des éthérifications avec un grand nombre d'alcools commerciaux sans passer par l'intermédiaire bromé. Elle nécessite une purification sur colonne, mais cette dernière est justifiée car nous avons besoin de produits purs pour tester l'efficacité des composés. Mais, il est vrai que pour une production industrielle, la voie par la synthèse de Williamson sera préférée et nous en avons montré sa faisabilité.

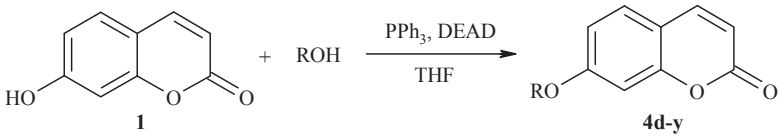
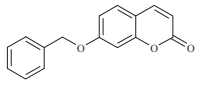
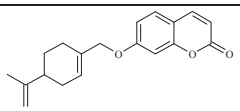
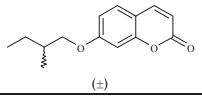
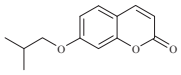
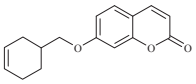
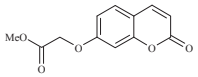
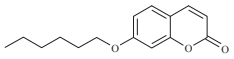
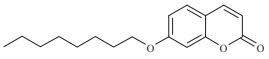
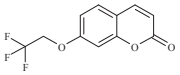
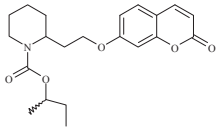


Schéma 5 : Ethérification selon la réaction de Mitsunobu

Une large gamme d'alcools a été utilisée afin de tester l'influence de divers paramètres structuraux (longueur de chaîne, ramifications, carbone asymétrique) sur l'activité répulsive vis-à-vis des drosophiles. Nous avons réalisé cette réaction d'une part en présence d'alcools primaires et d'autre part en présence d'alcools secondaires.

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus avec des alcools primaires (Tableau 5).

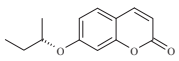
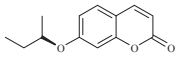
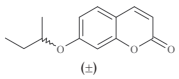
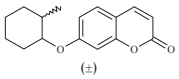
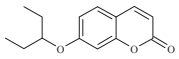
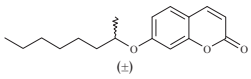
Entrée	*Ether*	*N° éther*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**4d**	35%	252,08	3,35
2		**4e**	73%	296,14	4,08
3		**4f**	85%	232,11	3,31
4		**4g**	70%	218,09	2,87
5		**4h**	80%	256,11	3,38
6		**4i**	53%	234,05	1,25
7		**4j**	95%	246.13	3.84
8		**4k**	100%	274.35	4.73
9		**4l**	-	244.17	2.58
10		**4m**	-	373,19	3,76

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 5 : Réaction de Mitsunobu en présence d'alcools primaires

Dans l'ensemble, les rendements obtenus à partir des alcools primaires sont satisfaisants, allant de 35% à 100%. Le faible rendement (35%) de l'éther **4d** (entrée 1) s'explique par une purification difficile. En effet, plusieurs lavages ont été nécessaires pour éliminer l'alcool benzylique et à chaque lavage, une perte de produit est observée. Lors de la réaction avec le trifluoroéthanol (entrée 9), aucune conversion n'a été observée à cause de l'acidité de cet alcool qui entre en compétition avec l'hydroxycoumarine. De plus, le produit **4m** (entrée 10) issu du couplage de la 7-hydroxycoumarine avec la picaridine n'a pas pu être purifié correctement, la picaridine résiduelle étant difficile à éliminer même par chromatographie. Mise à part les produits **4l** et **4m**, l'ensemble des autres produits a été isolé par colonne avec une grande pureté. Ils ont tous été analysés par RMN ^{1}H, ^{13}C et DEPT et une masse exacte a été réalisée.

Les produits synthétisés à partir d'alcools secondaires sont réunis dans le tableau suivant (Tableau 6).

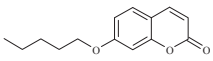
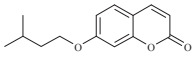
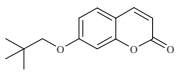
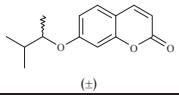
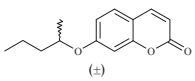
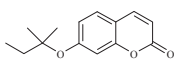
Entrée	*Ether*	*N° éther*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**4n**	91%	218,09	2,92
2		**4o**	94%	218,09	2,92
3		**4p**	100%	218.09	2.92
4		**4q**	35%	258,12	3,79
5		**4r**	99%	232,11	3,44
6		**4s**	93%	274.35	4 .70

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 6 : Réaction de Mitsunobu en présence d'alcools secondaires

Les rendements obtenus sont très satisfaisants excepté celui pour l'éther **4q** (entrée 4). Il semblerait que l'encombrement dû au méthyle situé en alpha de l'alcool ait gêné la réaction, ainsi un mélange des deux diastéréoisomères est obtenu. L'ensemble des nouvelles molécules synthétisées a été caractérisé par RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT et par spectrométrie de masse.

Après avoir testé ces deux premières séries d'éthers sur drosophiles, nous avons remarqué que les molécules **4f** et **4r**, parmi d'autres, présentaient une bonne activité répulsive. Ces deux composés ont la même masse moléculaire de 232,11 g.mol^{-1} et leur partie éther comporte cinq carbones. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur la famille des alcools comportant cinq carbones, les « alcools amyliques», et de synthétiser tous les éthers coumariniques correspondants (Tableau 7).

Entrée	*Ether*	*N° éther*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**4t**	100%	232,11	3,39
2		**4u**	65%	232,11	3,24
3		**4v**	49%	232,11	3,25
4		**4w**	93%	232,11	3,29
5		**4x**	91%	232,11	3,37
6		**4y**	-	232,11	3,20

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 7 : Ethérification en présence d'alcools amyliques

Nous obtenons les produits avec de bons rendements. Il faut noter que tous les composés ont été synthétisés dans les conditions de Mitsunobu excepté les produits **4v** et **4y** (entrées 3 et 6) du fait de l'encombrement du groupement tert-butyle pour **4v**. Nous avons donc fait, pour ce dernier, la réaction en deux étapes, avec dans un premier temps la triflatation de l'alcool primaire avec de l'anhydride triflique suivie directement par une réaction de Williamson en présence d'une base faible K_2CO_3 et d'un chauffage à reflux. L'éther **4y** (entrée 6) n'a pas pu être synthétisé car son alcool correspondant est tertiaire et la réaction de Mitsunobu ne fonctionne pas avec ce type d'alcools. Il faudrait envisager, pour la synthèse de ce composé, une voie d'accès par addition nucléophile à partir de l'alcène.

La réaction de Mitsunobu est plus facile à mettre en œuvre que les simples réactions de Williamson. Cependant, en cas de forte activité répulsive, il faudrait envisager une alternative à cette voie de synthèse pour une application à l'échelle industrielle (nombreux sous-produits, notamment l'oxyde de triphénylphosphine).

II-1-1-2 Ethérification de la 4-hydroxycoumarine

Nous avons réalisé des réactions d'éthérification sur la 4-hydroxycoumarine afin de comparer l'activité répulsive suivant la position sur le cycle coumarinique. Ces éthers ont été synthétisés en utilisant les conditions de Mitsunobu (Schéma 6).

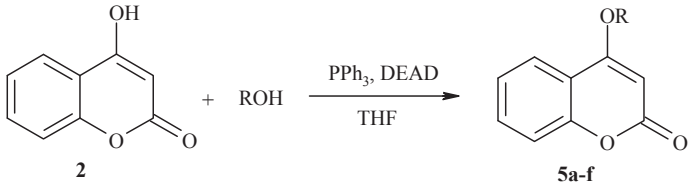
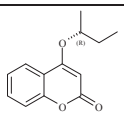
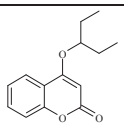
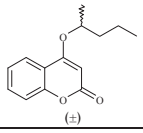
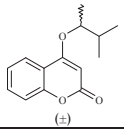
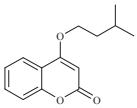
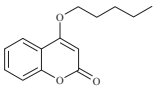


Schéma 6 : Ethérification de la 4-hydroxycoumarine

Seuls des alcools amyliques et le butan-2-ol ont été utilisés pour faire ces réactions d'éthérification, car suite à une première série de tests *in vivo*, ce sont les éthers en position 7 issus de ces alcools qui ont montré les meilleurs résultats (Tableau 8). Les résultats des tests biologiques obtenus avec ces éthers pourront être comparés à ceux obtenus avec les éthers en position 7.

Entrée	*Ether*	*N° éther*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**5a**	100%	232,11	2,44
2		**5b**	87%	232,11	2,96
3		**5c**	91%	232,11	2,88
4		**5d**	84%	232,11	2,80
5		**5e**	91%	232,11	2,75
6		**5f**	100%	232,11	2,91

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 8 : Ethérification de la 4-hydroxycoumarine

L'ensemble de ces nouveaux éthers a été synthétisé avec de très bons rendements, comme leurs analogues substitués en position 7. Ces nouveaux composés ont été caractérisés par RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT et par spectrométrie de masse.

II-1-1-3 Ethérification de la 6-hydroxycoumarine

Nous avons également synthétisé des éthers en position 6 afin de pouvoir comparer l'influence de la position du groupement éther vis-à-vis de l'activité répulsive. Ces éthers ont été obtenus par la réaction de Mitsunobu (Schéma 7).

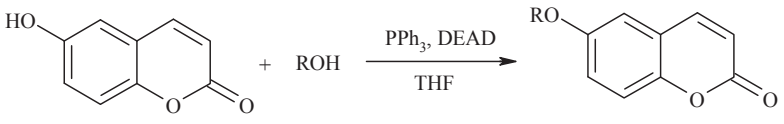
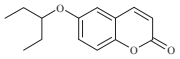
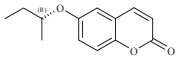
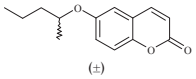


Schéma 7 : Ethérification de la 6-hydroxycoumarine

Trois alcools ont été sélectionnés pour faire cette réaction : le pentan-3-ol, le butan-2-ol et le pentan-2-ol. D'un coût plus élevée que les 4- et 7-hydroxycoumarines (27,20 euro / gramme), la 6-hydroxycoumarine n'a été modifiée qu'avec trois alcools (Tableau 9).

Entrée	*Ether*	*N° éther*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**6a**	79%	232,11	3,44
2		**6b**	79%	218,09	2,92
3		**6c**	91%	232,11	3,37

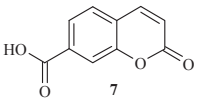
*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 9 : Ethérification de la 6-hydroxycoumarine

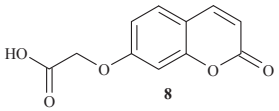
Comme pour les éthers en positions 4 et 7, les rendements obtenus sont tout à fait satisfaisants. Ces molécules ont été analysées par RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT et par spectrométrie de masse.

II-1-2 Formation de coumarines acide carboxylique en position 7

Des coumarines comportant un groupement acide carboxylique ont été synthétisées. En effet, grâce à cette fonction, nous pouvons accéder à des amides et à des esters. Deux acides ont été formés :

- l'acide directement lié au cycle coumarinique : 

7

- l'acide séparé du cycle coumarinique par une fonction éther : 

8

Nous allons détailler les voies d'accès de chacun de ces acides.

II-1-2-1 Formation de la coumarine acide 7

Pour synthétiser l'acide **7**, nous avons envisagé le schéma réactionnel décrit ci-dessous, à partir de la 7-hydroxycoumarine, en trois étapes : triflation, cyanation et hydrolyse (Schéma 8).

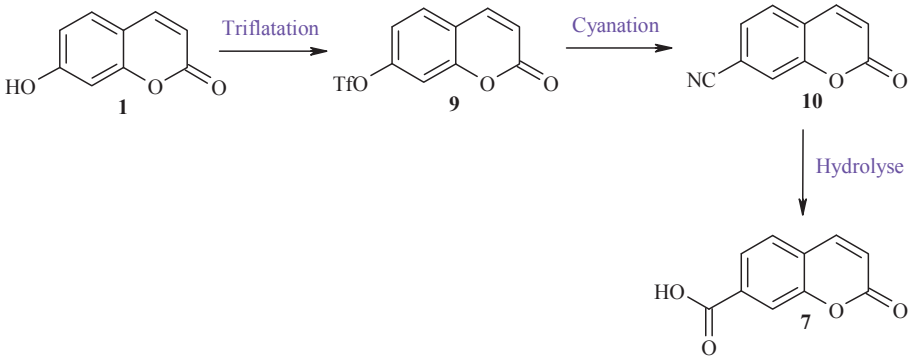


Schéma 8 : Voie de synthèse envisagée

Les différentes étapes sont détaillées dans les parties suivantes.

II-1-2-1-a Triflation

La réaction de triflation a été réalisée, dans des conditions anhydres, à partir de la 7-hydroxycoumarine en présence d'anhydride trifluorométhane sulphonique et de pyridine dans du dichlorométhane à température ambiante (Schéma 9).

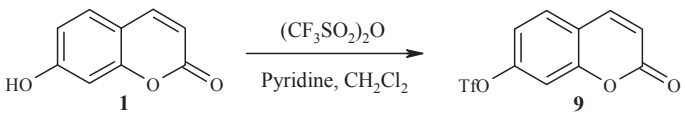


Schéma 9 : Triflation de la 7-hydroxycoumarine

Le produit triflaté **9** est obtenu après purification avec un rendement de 92%.

II-1-2-1-b Cyanation

Différentes conditions de cyanation ont été testées à partir de la coumarine triflatée afin de former l'analogue nitrile (Schéma 10).

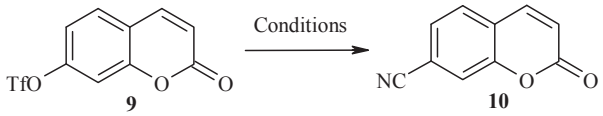


Schéma 10 : Cyanation de la 7-coumarine triflate

Les résultats des expérimentations testées sont réunis dans le tableau ci-dessous (Tableau 10).

Entrée	***Conditions***	***Conversion***	***Rendement***
1	CuCN, NMP, 180°C	-	-
2	CuBr, NMP, 110°C then CuCN, 180°C	-	-
3	KCN, $Pd_2(dba)_3$, DPPF, NMP, 60°C[39]	faible	-
4	$Zn(CN)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, DMF, 150°C[40]	Complète	94%

Tableau 10 : Réaction de cyanation

C'est en fait par une cyanation pallado-catalysée et en présence de dicyanure de zinc (entrée 4) que le composé recherché a été obtenu avec un rendement de 94%, les autres conditions n'étaient pas efficaces.

II-1-2-1-c Hydrolyse

La réaction d'hydrolyse a été faite en présence d'acide sulfurique à 70%, à reflux pendant une nuit (Schéma 11).[41]

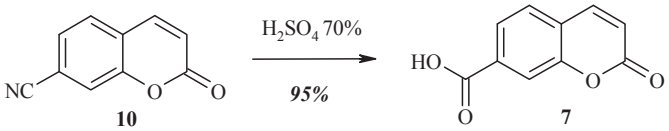


Schéma 11 : Hydrolyse de la 7-cyanocoumarine

L'acide coumarinique **7** est obtenu avec un rendement de 95%.

Ainsi, l'acide coumarinique **7** a été synthétisé en trois étapes avec un rendement global de 82%.

[39] Takagi K., Sasaki K., Sakakibara Y., *Bull. Chem. Jpn.*, **1991**, 64, 1118-1121.
[40] Janssen Pharmaceutica N.V., US 2006/001927, **2006**.
[41] Charitos C., Tzougraki C., Kokotos G., *J. Peptide Res.*, **2000**, 56, 373-381.

*II-1-2-2 Formation de la coumarine acide **8***

L'acide coumarinique **8** est obtenu en deux étapes de synthèse (Schéma 12). Dans un premier temps, la 7-hydroxycoumarine est éthérifiée en présence de glycolate de méthyle dans les conditions de Mitsunobu, décrite précédemment, pour former l'éther **4i**. Dans un second temps, la partie ester du glycolate de méthyle est saponifiée pour donner quantitativement l'acide attendu **8**.

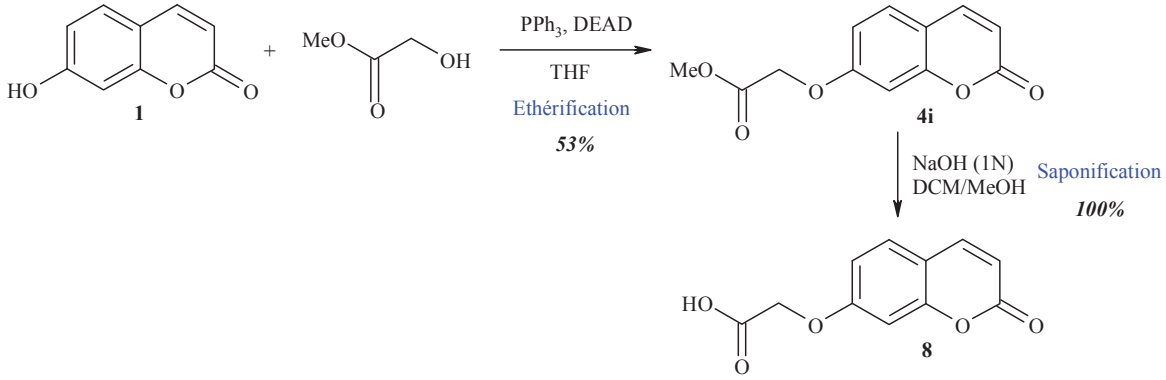


Schéma 12 : Voie d'accès de l'acide coumarinique 8

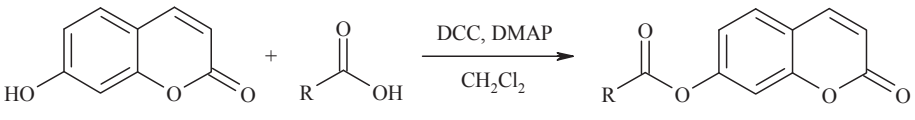
L'acide **8** est obtenu avec un rendement global de 53%.

II-1-3 Réactions d'estérification

II-1-3-1 Réactions d'estérification de la 7-hydroxycoumarine

Nous avons choisi de réaliser des réactions d'estérification sur la 7-hydroxycoumarine avec des acides présentant des analogies structurales avec certains répulsifs connus tels le benzyl benzoate, Merck 3535 ou l'indalone.

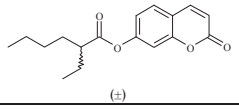
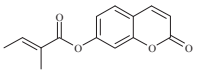
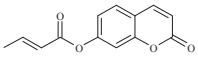
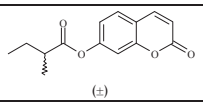
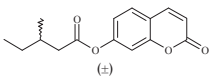
Ces réactions ont été effectuées en présence de DCC (dicyclohéxyl carbodiimide) et de DMAP (diméthylaminopyridine) dans du dichlorométhane à température ambiante (Schéma 13).



1 **11a - m**

Schéma 13 : Estérification de la 7-hydroxycoumarine

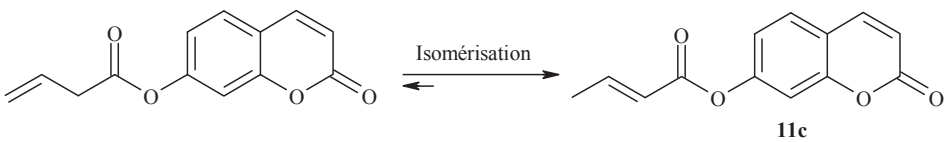
Dans un premier temps, la réaction a été réalisée en présence d'un acide carboxylique possédant une chaîne carbonée aliphatique plus ou moins longue et ramifiée (Tableau 11) afin de s'approcher de la structure de la picaridine ou de celle de Merck 3535.

Entrée	*Ester*	*N° ester*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**11a**	86%	288,14	4,41
2		**11b**	83%	244,07	3,16
3		**11c**	54%	230,06	2,23
4		**11d**	82%	246,09	3,08
5		**11e**	85%	260,10	3,27

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 11 : Esters avec une chaîne aliphatique

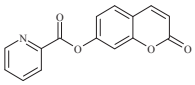
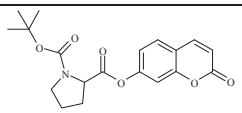
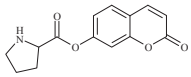
Les esters ont été obtenus avec de bons rendements (82% à 86%) sauf pour la molécule **11c** (54%, entrée 3). Ce composé est issu de l'estérification entre la 7-hydroxycoumarine et l'acide vinylacétique et non l'acide crotonique. Lors de la réaction, il s'est produit une isomérisation de la double liaison, nous obtenons donc un mélange des deux esters avec en majorité (93%) le produit **11c** (Schéma 14).



11c

Schéma 14 : Isomérisation de l'ester vinylacétique

Puis, des acides ayant des hétérocycles fonctionnalisés ont été utilisés (Tableau 12).

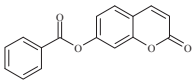
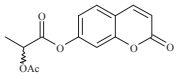
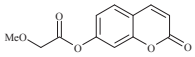
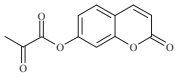
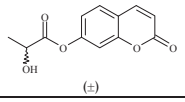
Entrée	*Ester*	*N° ester*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**11f**	80%	267,05	2,41
2		**11g**	91%	359,14	2,80
3		**11h**	100%	259,08	1,52

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 12 : Esters avec un hétérocycle

L'ester **11h** (entrée 3) comportant le noyau proline a été obtenu par déprotection du groupement Boc de l'ester **11g** (entrée 2).

D'autres esters comportant divers groupements ont été synthétisés (Tableau 13).

Entrée	*Ester*	*N° ester*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**11i**	81%	266,06	3,44
2		**11j**	53%	276,06	1,58
3		**11k**	-	234,05	1,22
4		**11l**	-	232,03	1,91
5		**11m**	-	234,05	1,14

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 13 : Esters fonctionnalisés

Les esters **11k**, **11l** et **11m** n'ont pas été isolés. En effet, pour ces esters, divers essais avec différentes quantités de DCC et DMAP ont été réalisés sans succès. En ce qui concerne l'ester issu de l'acide pyruvique (**11l**, entrée 4), il semblerait que la liaison dicarbonylée soit trop fragile pour cette réaction, responsable de la dégradation du produit lors de la réaction. Pour les produits **11k** (entrée 3) et **11m** (entrée 5), les faibles conversions obtenues ne permettent pas une purification sur colonne. Par contre, les ester **11i** (entrée 1) et **11j** (entrée 2) ont été synthétisés, isolés et caractérisés.

Lorsque l'hydroxyle de l'acide lactique est protégé par un groupement acétate, la réaction d'estérification s'effectue avec une conversion totale. Par contre, il n'est pas envisageable de déprotéger cet ester, la fonction ester sur le cycle aromatique étant plus fragile que celle de l'acétate.

II-1-3-2 Réactions d'estérification sur des coumarines acide carboxylique

Afin d'avoir d'autres types d'esters à tester, nous avons estérifié deux coumarines portant une fonction acide carboxylique en position 7. Par ailleurs, en regardant des répulsifs connus comportant une fonction ester comme IR 3535, il nous semble que si le carbonyle est proche du cycle, la molécule sera plus active.

II-1-3-2-a Réactions d'estérification sur la coumarine acide **7**

Nous avons réalisé les réactions d'estérification entre la coumarine acide **7** et un alcool dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, DCC en présence de DMAP (Schéma 15).

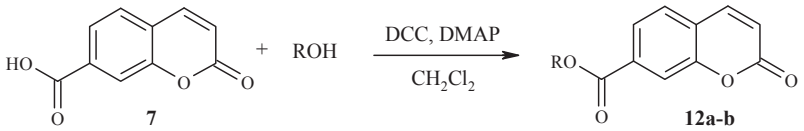
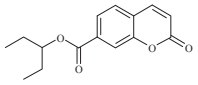
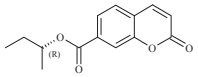


Schéma 15 : Estérification de la 7-coumarine acide

Nous avons synthétisé par cette méthode deux nouveaux esters (Tableau 14).

Entrée	***Ester***	***N° ester***	***Rendement isolé***	***Masse molaire***	***LogP****
1		**12a**	60%	260,28	3,44
2		**12b**	66%	246,09	3,08

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 14 : Estérification de la 7-coumarine acide

Les alcools sélectionnés pour faire ces esters ont été fortement inspirés des répulsifs connus. En effet, l'ester **12a** (entrée 1) a été synthétisé avec du pentan-3-ol qui présente des analogies de structure avec la partie amide du DEET. Concernant l'ester **12b** (entrée 2), l'alcool utilisé est le (R)-butan-2-ol qui correspond à la partie ester de la Picaridine.

II-1-3-2-b Réactions d'estérification sur la coumarine acide **8**

De la même manière que pour la coumarine acide **7**, nous avons réalisé des réactions d'estérification, avec des alcools ayant donnés des résultats satisfaisants lors des tests en présence de drosophiles, pour étendre la famille des esters (Schéma 16).

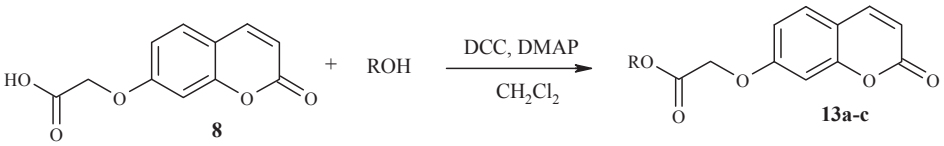
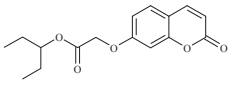
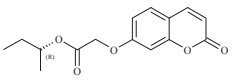
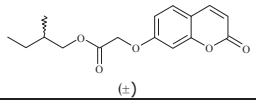


Schéma 16 : Estérification avec la coumarine acide 8

Trois nouveaux esters ont été synthétisés (Tableau 15).

Entrée	*Ester*	*N° ester*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**13a**	60%	290,11	3,07
2		**13b**	68%	276,10	2,55
3		**13c**	53%	290,11	2,94

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 15 : Estérification de la coumarine acide 8

Nous avons pris les mêmes alcools (entrées 1 et 2) que ceux utilisés pour l'estérification de la coumarine acide **7** afin de pouvoir comparer les activités répulsives de ces deux familles. L'ester **13c** (entrée 3) a été synthétisé pour voir l'influence d'un CH_2 supplémentaire sur l'activité répulsive, car il ne diffère que de cela avec la molécule **13b**.

II-1-4 Réactions d'amidation

Lors de nos recherches bibliographiques, nous avons remarqué qu'il existait une grande famille de répulsifs comportant une fonction amide. C'est pour cette raison que nous avons concentré nos efforts sur la synthèse de divers types de famille d'amides. Pour chacun des groupes, les mêmes amines ont été utilisées afin de pouvoir comparer entre eux le pouvoir répulsif des molécules.

II-1-4-1 Réactions d'amidation sur la coumarine acide 7

La première famille d'amides que nous avons synthétisée, dérive de la coumarine acide **7**. Les conditions d'amidation utilisées sont classiques. Nous avons fait réagir la coumarine acide **7** avec un amide primaire ou secondaire en présence de DCC et de HOBt (Schéma 17).

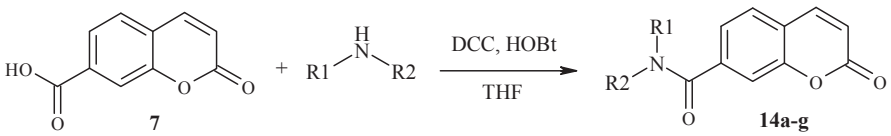
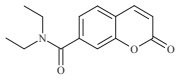
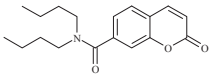
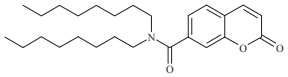
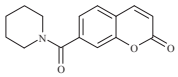
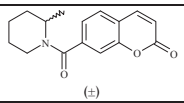
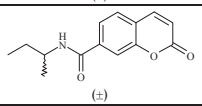
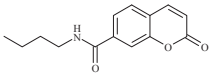


Schéma 17 : Amidation de la coumarine acide 7

Sept amides ont été synthétisés dont cinq amides tertiaires et deux secondaires (Tableau 16).

Entrée	*Amide*	*N° amide*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**14a**	100%	245,27	1,79
2		**14b**	81%	301,38	3,73
3		**14c**	58%	413,30	7,29
4		**14d**	45%	257,10	1,93
5		**14e**	76%	271,31	2,35
6		**14f**	58%	245,27	2,15
7		**14g**	37%	245,27	2,18

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 16 : Réaction d'amidation de la coumarine acide 7

Parmi les cinq amides tertiaires synthétisés, trois proviennent de dialkyles amines linéaires (entrées 1, 2 et 3) et deux d'amines cycliques (entrées 4 et 5). Nous avons souhaité tester l'influence de la longueur de chaîne d'une part et d'autre part la différence entre une chaîne linéaire (**14a**, **14b** et **14c**) et une cyclique plus ou moins encombrée (**14d** et **14e**). Les

amides **14f** et **14g** sont secondaires, ainsi nous voulions voir si la présence d'un –NH est importante pour l'activité répulsive. L'ensemble de ces amides a été entièrement caractérisé par RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT et par spectrométrie de masse.

*II-1-4-2 Réactions d'amidation sur la coumarine acide **8***

La même réaction d'amidation que celle mise en jeu pour la coumarine acide **7** a été réalisée sur l'acide **8** (Schéma 18).

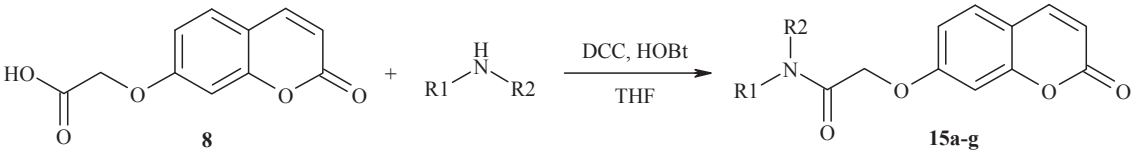
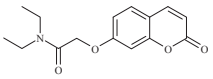
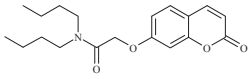
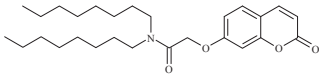
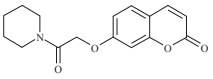
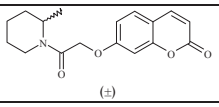
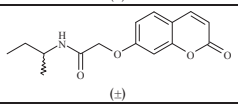
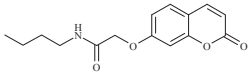


Schéma 18 : Amidation de la coumarine acide 8

Sept amides ont été synthétisés (Tableau 17).

Entrée	*Amide*	*N° amide*	*Rendement isolé*	*Masse molaire*	*LogP**
1		**15a**	69%	275,11	1,46
2		**15b**	96%	331,18	3,39
3		**15c**	94%	443,30	6,95
4		**15d**	45%	287,31	1,59
5	 (±)	**15e**	79%	301,34	2,01
6	 (±)	**15f**	68%	275,11	1,82
7		**15g**	42%	275,11	1,84

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

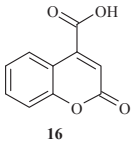
Tableau 17 : Réaction d'amidation de la coumarine acide 8

Cinq amides tertiaires ont été synthétisés dont trois sont formés de chaînes linéaires (**15a**, **15b** et **15c**, entrées 1, 2 et 3) et deux d'une chaîne cyclique (**15d** et **15e**, entrées 4 et 5), et deux amides secondaires possédant une chaîne alkyle à quatre carbones (**15f** et **15g**, entrées 6 et 7). Tous ces produits ont été caractérisés par RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT et par spectrométrie de masse.

II-1-4-3 Réactions d'amidation en position 4

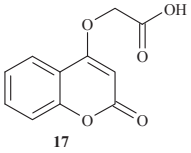
Nous avons souhaité élargir la famille des amides en synthétisant des amides en position 4. Nous avons souhaité faire les deux mêmes types d'amides que ceux élaborés en position 7. Pour cela, nous avons dû synthétiser les acides correspondants :

- l'acide directement lié au cycle coumarinique :



16

- l'acide séparé du cycle coumarinique par une fonction éther :



17

II-1-4-3-a Synthèse de l'acide coumarinique **16**

Nous envisageons de synthétiser l'acide **16** en trois étapes.

Dans un premier temps, nous avons tenté de « triflater » la 4-hydroxycoumarine (**2**) en utilisant de l'anhydride triflique en présence de pyridine anhydre et de dichlorométhane anhydre. Nous obtenons une conversion totale, mais la 4-coumarine triflatée (**18**) n'étant pas très stable, nous ne sommes pas parvenus à l'isoler. Pour cette raison, nous avons songé à une autre voie de synthèse (Schéma 19).

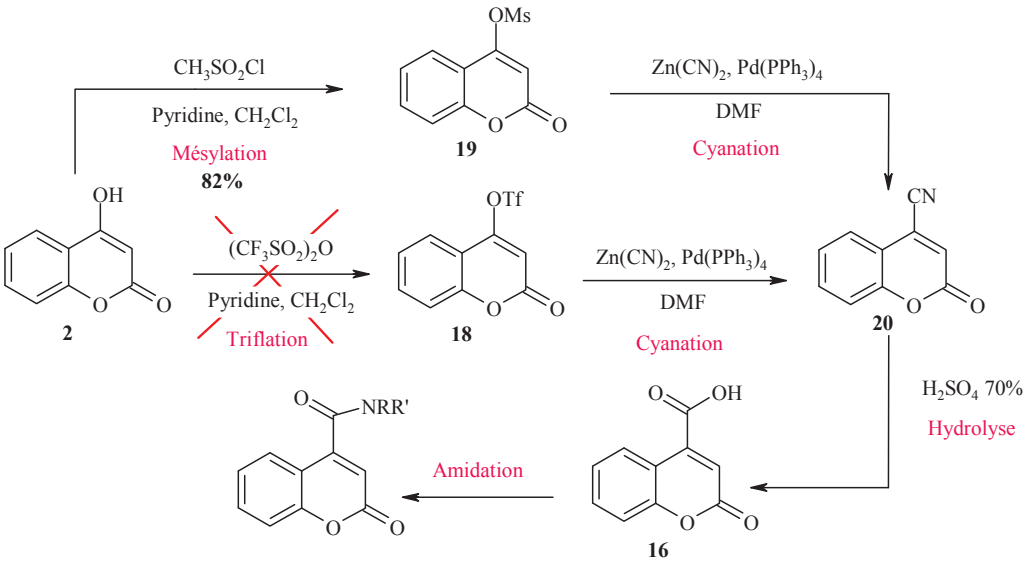


Schéma 19 : Voie de synthèse pour former l'acide coumarine en position 4

L'intermédiaire trilflaté (**18**) a été remplacé par la 4-mésyle coumarine (**19**). Cet intermédiaire est plus stable et donc beaucoup plus facile à isoler. Il a été obtenu par réaction du chlorure de mésyle en présence de pyridine dans du dichlorométhane avec un rendement de 82%. Par manque de temps, la séquence de synthèse n'a pas été portée à terme.

Nous envisageons de poursuivre la synthèse en effectuant une cyanation du groupement mésyle pour obtenir le composé **20** suivi d'une hydrolyse qui nous permettra de former l'acide **16**. Une fois que nous aurons formé l'acide coumarinique **16**, nous pourrons

facilement accéder à une nouvelle famille d'amides en employant des réactions de couplage mises au point lors de la synthèse des amides en position 7.

II-1-4-3-b Synthèse de l'acide coumarinique **17**

L'acide coumarinique **17** est issu de l'éthérification de la 4-hydroxycoumarine **2** suivie d'une saponification de l'ester terminal du glycolate de méthyle (Schéma 20).

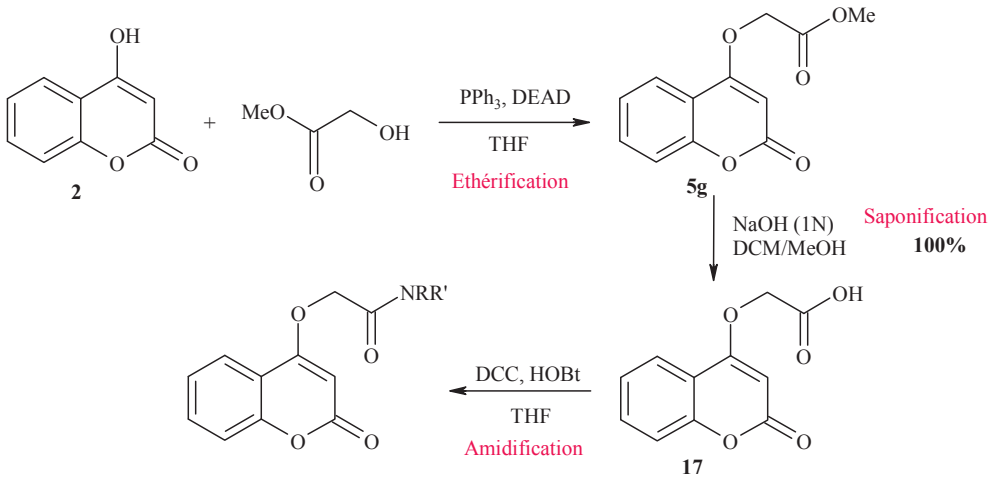


Schéma 20 : Voie de synthèse pour former l'acide coumarinique 17 en position 4

L'éther **5g** a été synthétisé dans les conditions de Mitsunobu. La conversion de la 4-hydroxycoumarine a été totale. Par contre, la purification de cet éther **5g** n'est pas facile car le composé est insoluble dans de nombreux solvants. Ce dernier n'a pas été isolé totalement pur, du DEAD réduit (sous forme d'hydrazine) était présent. Cependant, le produit a été engagé dans une réaction de saponification en présence de NaOH. Après réaction et traitement, nous avons obtenu l'acide **17** très pur. Ce dernier a été caractérisé par RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT et par spectrométrie de masse.

A présent, nous pouvons donc envisager de faire des réactions d'amidation sur cet acide.

II-2- Hydrogénation

II-2-1 Hydrogénation de la coumarine

Nous avons également souhaité réduire complètement la coumarine afin d'obtenir des analogues proches de la CIC-4 (Figure 17) dont les propriétés répulsives sont connues.

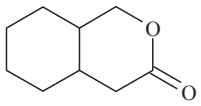


Figure 17 : CIC-4

Les hydrogénations ont été réalisées sous pression d'hydrogène en présence d'un catalyseur, Ru/C (5wt%) (Schéma 21). Une étude méthodologique visant à optimiser les conditions de réaction par modification de différents paramètres tels que la pression, la température, la stœchiométrie et le solvant, a été faite dans le but de l'appliquer à des coumarines éthérées.

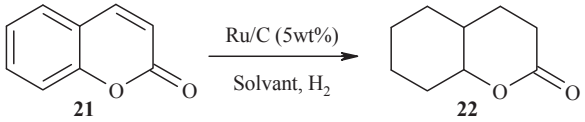


Schéma 21 : Hydrogénation de la coumarine

Deux solvants de réaction ont été étudiés : le méthanol et l'acétate d'éthyle.

II-2-1-1 Dans le méthanol

Les réactions ont été réalisées, dans un premier temps, dans le méthanol comme décrit dans le brevet relatif à la réduction des coumarines[42] (Tableau 18).

Entrée	***T***	***Pression H_2***	***Ru/C [Coumarine]***	***Analyses (GC-MS)***
1	130°C	15 bar	0,18% 1,37 mol/L	83% 17%
2	130°C	20 bar	0,18% 2,74 mol/L	63% 30% Produits ouverts 7%
3	130°C	20 bar	1,00% 2,74 mol/L	71% Produits ouverts 29%
4	130°C	10 bar	1,00% 2,74 mol/L	66% 17% Produits ouverts 18%
5	50°C	20 bar	1,00% 2,74 mol/L	83% Produits ouverts 17%
6	t.a.	20 bar	1,00% 2,74 mol/L	26% 49% Produits ouverts 25%
7	50°C	20 bar	0,50% 2,74 mol/L	93% Produits ouverts 7%
8	50°C	20 bar	0,30% 2,74 mol/L	78% 6% Produits ouverts 16%

Tableau 18 : Hydrogénation dans le méthanol

[42] Iwamoto K., Tanaka S., US 5639893, **1997**.

Nous constatons que la température, la pression et la quantité de catalyseur introduit influencent la sélectivité d'une part et le rendement de la réaction d'autre part.

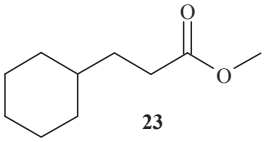
Il est évident que plus nous introduisons de catalyseur et plus la réduction est importante (entrées 2 et 3) à température et à pression équivalente.

Lorsque nous maintenons, à stœchiométrie équivalente, la température à 130°C et que nous diminuons la pression de 20 bar (entrée 3) à 10 bar (entrée 4), nous remarquons que la conversion de la coumarine n'est pas totale. En effet, à plus basse pression, il reste 17% d'hydrocoumarine.

A conditions équivalentes (20 bar, 1,0% de Ru/C), une baisse de la température de 130°C (entrée 3) à 50°C (entrée 5) favorise la formation d'octahydrocoumarine **22** au détriment de la formation de produits secondaires. Mais, à température ambiante (entrée 6), seuls 26% d'octahydrocoumarine **22** sont synthétisés, l'hydrogénation partielle est majoritaire (49%).

En se fixant à 50°C sous 20 bar, nous constatons que l'introduction de 0,5% de catalyseur (entrée 7) augmente considérablement le taux d'octahydrocoumarine (**22**) à 93% par rapport à 83% obtenu avec 1,0% de Ru/C (entrée 5). Par contre, avec 0,3% de catalyseur (entrée 8), nous obtenons de moins bons résultats, 78% de produit attendu seulement.

En conclusion, le méthanol représente un bon solvant pour la réduction complète de la coumarine. Les conditions optimisées sont donc 50°C, 20 bar et 0,5% de Ru/C. La structure des produits d'ouverture n'est pas connue, mais parmi ces composés se trouvent la coumarine réduite ouverte estérifiée **23** (Figure 18).



23

Figure 18 : Structure du produit d'ouverture majoritaire

II-2-1-2 Dans l'acétate d'éthyle

Nous avons testé, dans un second temps, l'acétate d'éthyle pour voir si ce solvant permettait d'éviter la formation des produits secondaires d'ouverture.

Plusieurs conditions ont été testées (Tableau 19).

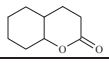
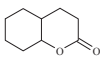
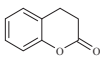
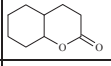
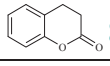
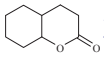
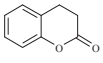
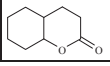
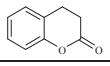
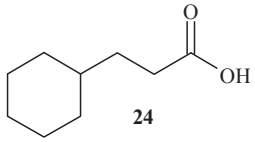
Entrée	***T***	***Pression H_2***	***Ru/C [Coumarine]***	***Analyses (GC-MS)***
1	130°C	20 bar	1.00% 2.74 mol/L	 27% Produits ouverts 73%
2	130°C	15 bar	1.00% 2.74 mol/L	 32%  64% Produits ouverts 4%
3	130°C	5 bar	1.00% 2.74 mol/L	 4.5%  87.5% Produits ouverts 8%
4	80°C	20 bar	1.00% 2.74 mol/L	 37%  5% Produits ouverts 58%
5	50°C	20 bar	1.00% 2.74 mol/L	 36%  31% Produits ouverts 33%

Tableau 19 : Hydrogénation dans l'acétate d'éthyle

A 130°C, sous 20 bar d'hydrogène avec 1,0% de Ru/C (entrée 1), les produits secondaires d'ouverture sont largement majoritaires par rapport à l'octahydrocoumarine **22**. En diminuant la pression à 15 bar (entrée 2) puis à 5 bar (entrée 3), nous augmentons la proportion d'hydrocoumarine qui devient le produit majoritaire à 87,5% quand la pression est de 5 bar.

Par contre, en diminuant la température à 80°C (entrée 4), il reste 5% de produit de réduction partielle et la quantité d'octahydrocoumarine a légèrement augmenté. A 50°C (entrée 5), la proportion d'hydrocoumarine a augmenté au détriment des produits d'ouverture.

Il semble que l'acétate d'éthyle soit un bon solvant pour l'hydrogénation partielle et la formation de l'hydrocoumarine. Les conditions optimisées, dans ce cas, sont 130°C, 5 bar et 1,0% de Ru/C. Avec ce solvant, le produit d'ouverture majoritaire **24** est dû à l'hydrogénolyse de la coumarine réduite (Figure 19).



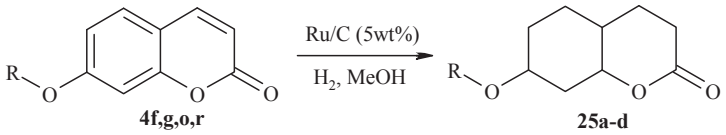
24

Figure 19 : Structure du produit d'ouverture majoritaire

L'octahydrocoumarine et l'hydrocoumarine n'ont pas été testées en présence de drosophiles car la purification n'a pas permis d'obtenir les produits de façon pure. Une démarche de purification plus approfondie devra être menée.

II-2-2 Hydrogénation des coumarines éthérées

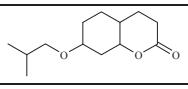
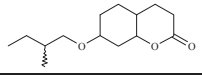
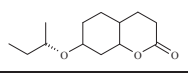
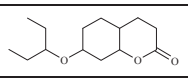
Les conditions optimisées d'hydrogénation complète, décrites dans le partie précédente, 50°C, 20 bar d'hydrogène et 0,5% de Ru/C (5wt%) ont été utilisées pour hydrogéner des coumarines éthérées dans le but d'obtenir des analogues variés de CIC-4 (Schéma 22).



4f,g,o,r **25a-d**

Schéma 22 : Hydrogénation des coumarines éthérées

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 20).

Entrée	***Ether attendu***	***N° ether***	***Rendement GC***	***LogP****
1		**25a**	- Produit attendu : 74%	2,31
2		**25b**	- Absence de l'éther attendu - Ether partiellement réduit (70%)	2,75
3		**25c**	- Absence de l'éther attendu - Ether partiellement réduit (93%)	2,36
4		**25d**	- Absence de l'éther attendu - Ether partiellement réduit (45%)	2,88

*LogP calculés avec le logiciel « New LogP Calculator »

Tableau 20 : Ethers hydrogénés

La réaction impliquant l'éther **25a** (entrée 1) présente une conversion totale avec un rendement GC estimé en produit attendu de 74%. Le produit n'a pas été isolé par colonne chromatographique car la masse du produit brut était trop faible pour cette purification. Pour les autres éthers (**25b**, **25c** et **25d**, entrées 2 à 4), le composé attendu n'est pas visible par spectrométrie de masse. Dans chacun de ces cas, seul l'éther partiellement réduit au niveau de la double liaison est visible et majoritaire. De nombreux sous-produits se forment lors de la réaction, notamment des produits issus de l'ouverture de la lactone suivie de son hydrogénolyse.

Une autre condition impliquant la formation de colloïdes de ruthénium[43] en présence de trioctylamine (0,08 equiv.) et de $RuCl_3$ (0,02 équiv.) dans un mélange eau-méthanol à température ambiante sous 30 bar d'hydrogène, a été testée sur l'éther **4r**. Ce nouveau procédé conduit au même résultat qu'avec le Ru/C, seul le produit partiellement réduit est visible et a un rendement GC de 45%. Des sous-produits se forment également.

Pour évaluer la reproductibilité de la réaction de l'éther réduit **25a**, la synthèse a été faite à nouveau dans les mêmes conditions. Contre toute attente, le produit obtenu n'est pas celui attendu, en effet, le composé partiellement réduit se forme de façon majoritaire (68% en GC) et celui complètement hydrogéné n'est pas visible. Il sera nécessaire de faire une méthodologie plus approfondie sur cette réaction en testant différents catalyseurs, solvants et conditions de température et de pression. Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pas pu aller plus loin dans cette étude.

[43] Fache F., Lehuede S., Lemaire M., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36 (6), 885-888.

III – Résultats des tests biologiques

L'activité de la plupart des molécules synthétisées a été évaluée *in vivo* en présence de drosophiles, modèles pour l'évaluation des répulsifs. Cet insecte est plus facile à élever que les moustiques. Pour ces derniers, des autorisations d'élevage sont obligatoires.

III-1 Principe et mise en place du test

III-1-1 La drosophile : un modèle pour l'évaluation des répulsifs

III-1-1-1 Description de la drosophile

La drosophile est un insecte diptère également appelé mouche du vinaigre, bien qu'appartenant au genre désigné par le terme plus général de *mouches des fruits*. La drosophile se reconnaît à son corps brun, de deux à trois millimètres, et à ses antennes paraissant pectinées, aux soies fourchues. Pour réaliser nos expériences, nous avons utilisé l'espèce *Drosophila melanogaster* (Figure 20), tout simplement appelée dans la littérature biologique *drosophila*. Cette espèce de drosophiles est l'un des organismes modèles les plus étudiés en recherche biologique, en particulier en génétique et en biologie du développement. En effet, elles sont petites et relativement faciles à élever en laboratoire, leur cycle de génération est court (environ deux semaines) et elle a une grande productivité, les femelles peuvent pondre jusqu'à 500 œufs en dix jours.

Figure 20 : Vue latérale d'une *drosophila melanogaster*

La drosophile est phototrophe, c'est-à-dire qu'elle est toujours attiré par la lumière, et elle se dirige toujours vers le haut.

III-1-1-2 Mode d'action des répulsifs sur la drosophile

De nombreux biologistes s'intéressent aux mécanismes moléculaires de la perception olfactive de la drosophile. C'est un domaine extrêmement complexe et actuellement très étudié. Le mécanisme de l'olfaction n'est pas encore connu précisément, mais plusieurs hypothèses ont été formulées. Dans ce manuscrit, nous exposerons de façon très simplifiée le mode d'action des répulsifs sur la drosophile.

La drosophile possède des récepteurs liés à la gustation et d'autres liés à l'olfaction. Ceux du goût sont situés sur les pattes, les ailes et le dard.[44] La reconnaissance olfactive s'effectue grâce aux poils sensoriels, répartis sur la surface du troisième segment antennaire et du palpe maxillaire, contenant les récepteurs olfactifs.[45] (Figure 21).

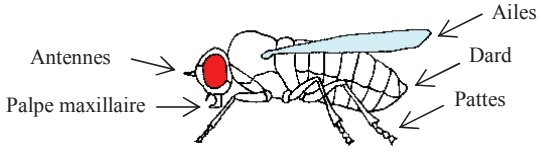


Figure 21 : Localisation des récepteurs gustatifs et olfactifs chez la drosophile

[44] Montell C., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2009**, 19 (4), 345-353.
[45] Jefferis G.S., *Curr. Biol.*, **2005**, 15 (17), R668-670.

Les molécules odorantes se lient aux récepteurs des neurones olfactifs. Les neurones olfactifs, fonctionnant en dimère, à l'intérieur des poils sensoriels envoient des projections vers l'un des quarante trois glomérules à l'intérieur du lobe antennaire du cerveau. Les glomérules sont innervés par les dendrites des neurones de projection. Ces derniers se projettent à leur tour vers le corps pédonculé et la corne latérale du protocérébrum. Des substances odorantes différentes sélectionnent des motifs de l'activité glomérulaire, suggérant que chez les insectes comme chez les vertébrés, une carte topographique de la qualité de l'odeur est représentée dans le lobe antennaire. Toutefois, en l'absence de gènes codant pour les molécules des récepteurs, il n'a pas été possible de définir une base physique pour cette carte spatiale.

III-1-2 Description du test

Le test mis en place permet de déterminer l'effet répulsif ou attractif d'une molécule donnée sur les drosophiles. Ce dernier a été décrit par Vosshall pour étudier le mécanisme d'action du DEET sur l'insecte.[46]

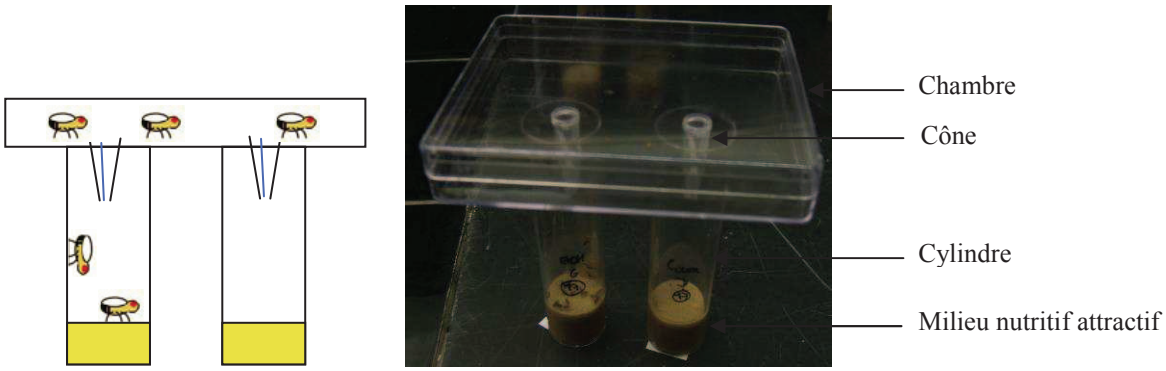


Photo 1 : Montage du test utilisé

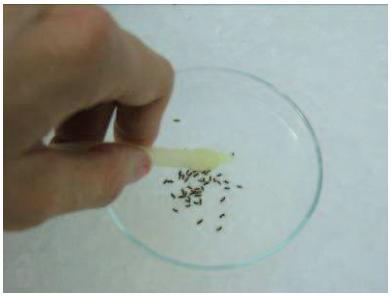
Le système utilisé se compose d'une chambre horizontale dans laquelle les drosophiles sont introduites, et de deux cylindres verticaux contenant un milieu nutritif attractif pour les mouches (Photo 1). Le milieu nutritif est composé majoritairement de levure de bière sèche et de farine de maïs mélangées à de l'agar-agar (gélifiant), il contient également un peu d'antifongique (hydroxybenzoate de méthyle). La chambre est percée de deux trous dans lesquels deux cônes plastiques sont mis. Dans chacun de ces cônes, un papier filtre, de taille 0,5mm x 1,5mm, est mis en place.

Chaque appareil permet d'évaluer l'efficacité d'une molécule et pour chaque molécule, cinq appareils sont utilisés simultanément, ce qui nous fait une reproductibilité sur cinq essais. Quarante drosophiles sont introduites dans chacune des chambres. Nous étudions donc l'activité d'une molécule sur deux cents mouches.

L'élevage des mouches a été réalisé par le docteur Roland Allemand du laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive à Lyon (UMR 5558). Les mouches utilisées sont toutes âgées de 12 ou 14 jours. L'âge de l'insecte est très important car sa maturité sexuelle est différente suivant le stade de sa vie. Cette différence pourrait entraîner des changements de comportement de la drosophile et donc biaiser les résultats.

[46] Ditzen M., Pellegrino M., Vosshall L. B., *Science*, **28 march 2008**, 319, 1838-1842.

Dans un premier temps, les mouches sont réparties dans des tubes par groupe de quarante et elles sont mises à jeûner pendant 24h. Pour être comptées, les drosophiles sont endormies sur de la glace et aspirées une à une à l'aide d'un aspirateur à mouches (Photo 2).



Aspiration des drosophiles

Photo 2 : Aspirateur et aspiration des drosophiles

Suite au jeûne, l'ensemble des appareils est installé. Nous avons travaillé avec dix-huit appareils simultanément. Dans chaque montage, sur un des papiers filtre sont déposés 10 µL d'une solution éthanolique (ou d'acétate d'éthyle si le produit n'est pas soluble dans l'éthanol) contenant la molécule étudiée à une concentration donnée et sur l'autre 10 µL d'éthanol (ou d'acétate d'éthyle). Pour être introduites dans la chambre, les drosophiles sont à nouveau endormies sur de la glace. Une fois les systèmes mis en place, les drosophiles sont laissées libres de faire leur choix entre les deux tubes pendant 22h (Photo 3). Leur cycle de luminosité, réglé grâce à un programmateur, est de 12h de jour et 12h de nuit. La pièce d'expérimentation est entièrement peinte en noir et thermostatée à 25°C.

Le lendemain, l'ensemble des mouches descendues dans les cylindres est compté en les endormant au dioxyde de carbone de manière à évaluer l'effet répulsif des molécules testées.

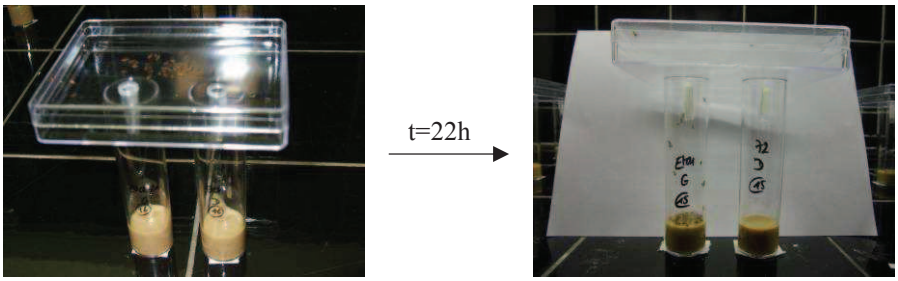


Photo 3 : Choix des drosophiles en 22h

III-1-3 Exploitation des résultats

III-1-3-1 Paramètres étudiés

Nous appellerons N1 le nombre de drosophiles descendues dans le tube contenant le papier filtre contenant le solvant pur et N2 le nombre de drosophiles dans le tube contenant le papier filtre imprégné de la solution éthanolique d'une molécule synthétisée.

Deux paramètres cruciaux sont pris en compte. Dans un premier temps, le pourcentage de mouches descendu dans chacun des tubes est évalué. Dans un second temps, l'indice de répulsion, I_R, est calculé de la façon suivante :

$$I_R = (N1-N2)/(N1+N2)$$

L'indice de répulsion doit permettre de comparer l'efficacité des molécules les unes par rapport aux autres et d'établir une ébauche de relation structure-activité.

III-1-3-2 Validation de la méthode employée

Afin d'étudier la fiabilité et la robustesse du test avec les drosophiles, une analyse statistique a été réalisée sur un échantillon de 86 « tests témoins ». Nous appelons « test témoin » un système comportant, dans chacun des tubes, un papier filtre imprégné d'éthanol, solvant de nos échantillons. Pour chaque essai, le nombre de drosophiles dans chaque tube est compté et le pourcentage associé déterminé.

L'analyse statistique effectuée consiste à définir un intervalle autour du pourcentage théorique du nombre de mouches se trouvant dans un des tubes, lors des tests témoins. L'hypothèse initiale formulée est : est-ce que la distribution dans chacun des deux tubes est équivalente en l'absence de molécules répulsives ? Nous appuierons notre raisonnement sur le pourcentage de mouches étant descendues dans le tube de gauche. Nous appellerons p, le pourcentage théorique de drosophiles dans le tube gauche et q, celui de drosophiles dans le tube droit, q = 1 – p, p et q valent donc tous les deux 0,50. A la suite de nos essais témoin, le pourcentage de drosophiles observées dans le tube gauche, p_{obs} , est de 0,58, par déduction, q_{obs} est de 0,42.

L'intervalle théorique recherché correspond à $p \pm 2\sigma$ avec un risque d'erreur de 5% (risque d'erreur communément employé en biologie), où σ est l'écart type. La formule générale de l'écart est la suivante :

$$\sigma = \sqrt{\frac{pq}{n}} \text{ soit } \sigma = \sqrt{\frac{0,5\times 0,5}{86}} = 0,054$$

avec p et q pourcentages de drosophiles dans les tubes gauche et droite et n le nombre d'essais

Soit $2\sigma = 0,11$, ainsi l'intervalle recherché est, avec un risque d'erreur de 5% :

$$0,39 \leq p \leq 0,61$$

Or, le pourcentage de mouches observées dans le tube gauche est de 0,58. Donc, ce dernier appartient à l'intervalle théorique déterminé. Notre test est validé car la différence

observée entre la théorie et le test témoin n'est pas significative. Ces résultats nous permettent d'affirmer que l'ensemble des données obtenues grâce au test en présence de drosophiles est fiable dans la zone comprise entre 61% et 100%. Lorsque nous observons un pourcentage de répulsion compris entre 39% et 61%, la molécule n'a aucun effet, à un risque d'erreur de 5%, car la valeur du pourcentage peut résulter des seules fluctuations des paramètres du test. Par contre, au-delà de 61%, le composé commencera à avoir une activité répulsive significative, en dessous de 39%, la molécule sera plutôt attractive.

Une étude statistique sur les essais réalisés en présence de molécules synthétisées ne peut être faite car le nombre de répétitions, qui est de cinq, est insuffisant. Mais, pour les meilleurs produits, cette étude sera réalisée prochainement.

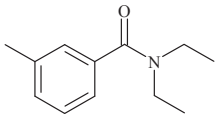
A ce jour, les tests accomplis nous ont permis de tester les composés synthétisés et de les classer selon leur activité répulsive, par l'intermédiaire de l'indice de répulsion, même s'il n'est pas encore possible de déterminer une incertitude sur cet indice.

III-2 Etude de deux répulsifs connus : DEET et Picaridine

Nous avons choisi de prendre le DEET et la picaridine comme références de nos tests biologiques car ce sont les meilleurs répulsifs du marché.

III-2-1 Etude du DEET

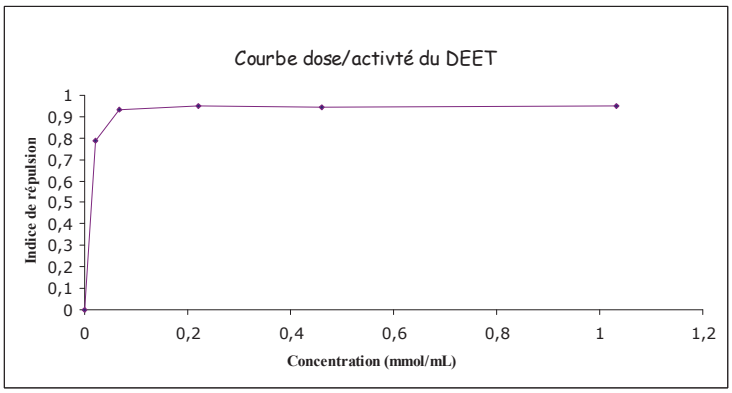
Le DEET (*N*,*N*-diéthyl-*m*-toluamide) est un amide ayant un logP calculé de 2,50. Le logiciel « EPI-Suite » nous a permis de calculer sa pression de vapeur saturante à 0,442 Pa (soit 0,00331 mmHg), sa température d'ébullition (308°C) et sa température de fusion (86°C). Avec le serveur « Chemspider », nous avons évalué, de façon empirique également, sa tension de surface (36±3 dyne/cm) et son enthalpie de vaporisation (54±3 kJ/mol) (Figure 22).



Constantes physiques	***Valeurs***
Pression de vapeur	0,442 Pa (3,31E-3 mmHg)
Température d'ébullition	308°C
Température fusion	86°C
Tension de surface	36±3 kJ/cm
Enthalpie de vaporisation	54±3 kJ/mol

Figure 22 : Constantes physiques du DEET

L'activité répulsive du DEET a été évaluée, à différentes concentrations, avec le dispositif décrit précédemment. L'étude a été faite à 20%, 10%, 5%, 1% et 0,5% massique dans l'éthanol (Figure 23). Pour chaque concentration, cinq appareils ont été utilisés simultanément.



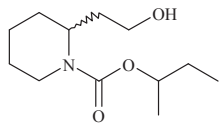
Concentration massique	***Concentration molaire (mmol/mL)***	***% de drosophiles dans le tube côté EtOH***	***% de drosophiles dans le tube côté répulsif***	***Indice de répulsion***
20%	1,032	97,61	2,39	0,952
10%	0,460	97,09	2,91	0,942
5%	0,220	97,52	2,48	0,950
1%	0,067	96,55	3,45	0,931
0,5%	0,021	89,27	10,73	0,785

Figure 23 : Etude dose-activité du DEET

D'après les résultats de cette étude, nous observons que l'activité du DEET est maximale et constante jusqu'à 1% massique et qu'elle commence à diminuer entre 1 et 0,5%. Ces résultats confirment bien le fait que le DEET est un bon répulsif des drosophiles.

III-2-2 Etude de la Picaridine

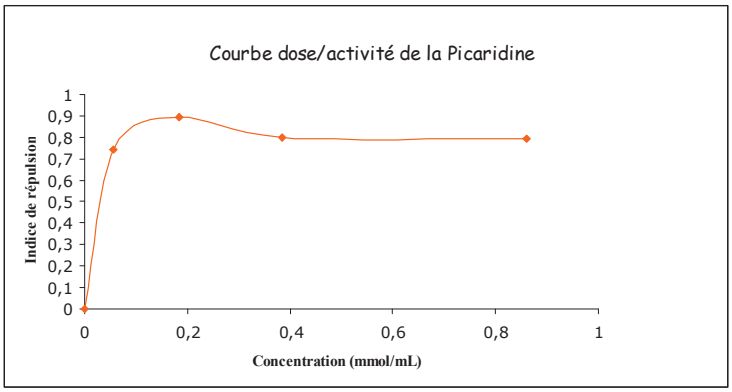
La Picaridine est un carbamate ayant un logP calculé de 1,61. De la même manière que pour le DEET, certains logiciels nous ont permis de calculer un certain nombre de constantes physiques (Figure 24).



Constantes physiques	*Valeurs*
Pression de vapeur	0,0011 Pa (8,26E-6 mmHg)
Température d'ébullition	321°C
Température fusion	89°C
Tension de surface	38±3 kJ/cm
Enthalpie de vaporisation	66±6 kJ/mol

Figure 24 : Constantes physiques de la Picaridine

Comme pour le DEET, l'activité répulsive de la Picaridine a été évaluée, à différentes concentrations, avec le dispositif décrit précédemment. L'étude a été faite à 20%, 10%, 5% et 1% massique dans l'éthanol (Figure 25).



Concentration massique	*Concentration molaire (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté répulsif*	*Indice de répulsion*
20%	0,861	89,71	10,29	0,790
10%	0,384	90,05	9,95	0,801
5%	0,183	94,81	5,19	0,896
1%	0,056	87,25	12,75	0,745

Figure 25 : Etude dose-activité de la Picaridine

Nous constatons que l'activité répulsive de la Picaridine vis-à-vis des drosophiles est moins bonne que celle du DEET. Par ailleurs, l'effet de répulsion diminue entre 5 et 1%. La picaridine remplace peu à peu le DEET car elle présente de meilleures propriétés comme sa capacité à ne pas dissoudre les plastiques et son odeur neutre.

L'objet de notre étude était de déterminer la structure chimique optimale de la coumarine ayant un effet répulsif au moins équivalent à celui du DEET.

III-3 Résultats des tests réalisés avec les nouvelles molécules

Les résultats des tests biologiques sont présentés par famille de molécules synthétisées. Ainsi, les composés d'un même groupe seront évalués entre eux puis les meilleurs de chacun des groupes seront comparés (Figure 26). Tous les résultats obtenus seront comparés à ceux du DEET et de la Picaridine.

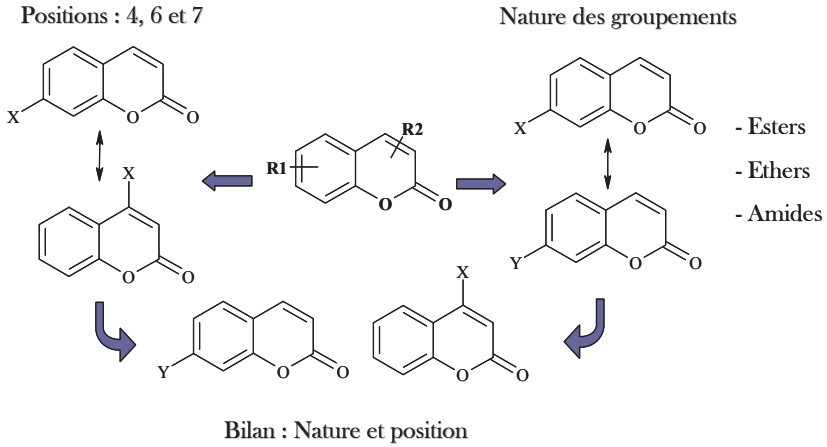


Figure 26 : Schéma général de l'étude

La coumarine a été testée à 20% en solution dans l'éthanol en présence de drosophiles et a montré une activité répulsive moyenne avec un indice de répulsion de 0,625 (soit 81,25% de mouches dans le tube côté éthanol), sur cinq répétitions.

III-3-1 Tests biologiques avec les esters

Les deux familles d'esters ont été testées (Figure 27). Les résultats calculés par indice de répulsion sont présentés sous forme d'un histogramme. Tous les composés ont été étudiés dans un premier temps en solution à 20% massique dans l'éthanol (soit 197 g/L). La concentration molaire testée est donc différente pour chacun des produits.

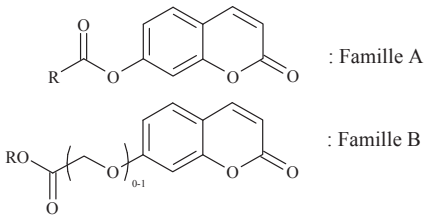
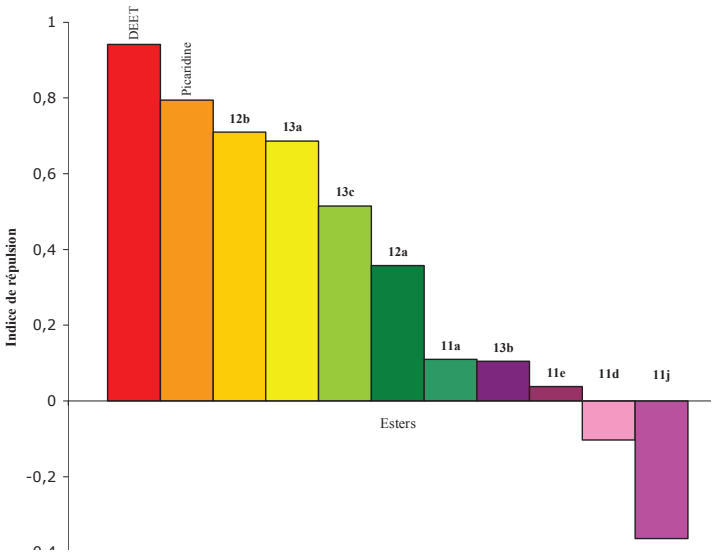


Figure 27 : Les deux familles d'esters testées

Dès les premiers tests, nous nous sommes heurtés à des problèmes de solubilité de certains composés dans l'éthanol. Un grand nombre d'esters restait insoluble même dans l'acétate d'éthyle. Ces derniers n'ont pas pu être testés. L'histogramme (Figure 28) montre que de façon générale, les esters ont une activité répulsive nettement inférieure à celle du DEET et légèrement plus faible que la Picaridine dans certains cas. La première famille d'esters, famille A, est beaucoup moins active que la famille B. En effet, le meilleur de cette famille A est le produit **11a** qui a un faible indice de répulsion de 0,110. Certains de ces composés (**11d** et **11j**) présentent même une activité attractive. L'ester **11j** comporte une partie proche de l'acide lactique, ce dernier appartenant aux molécules attractives reconnues. Les composés **12b** et **13a**, appartenant à la famille B, présentent un indice de répulsion de l'ordre de 0,7. Ce sont les meilleurs répulsifs de cette série.



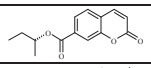
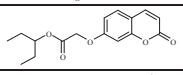
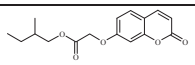
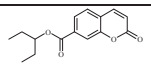
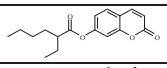
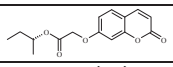
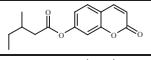
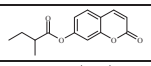
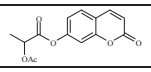
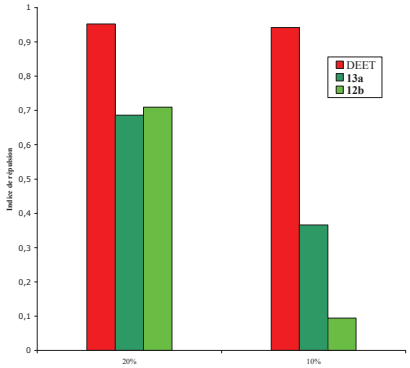
N° ester	*Molécule*	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
12b		0,802	85,50	14,50	0,710
13a		0,680	84,31	15,69	0,686
13c		0,680	75,74	24,26	0,515
12a		0,758	67,86	32,14	0,357
11a		0,685	55,50	44,50	0,110
13b		0,715	53,73	46,27	0,105
11e		0,759	51,90	48,10	0,038
11d		0,802	44,80	55,20	-0,103
11j		0,715	31,82	68,18	-0,364

Figure 28 : Activité répulsive des esters

D'une façon générale, la famille des esters n'est pas à retenir car leur activité est nettement inférieure à celle du DEET. Cependant, les deux meilleurs composés **12b** et **13a** ont été testés à une concentration inférieure, à 10% massique (Figure 29) pour évaluer l'effet répulsif en présence d'une plus faible quantité de produit.



N° ester	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
12b	0,360	54,77	45,23	0,095
13a	0,341	68,29	31,71	0,366

Figure 29 : Etude de l'activité de deux esters à 10% et à 20% massique

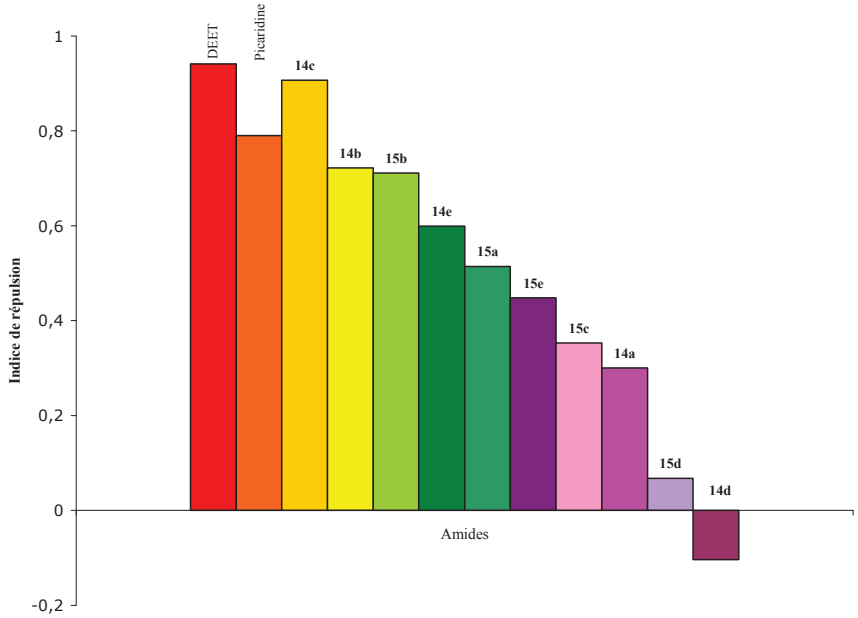
Cette étude montre une diminution très nette de l'activité entre 20% et 10%. Cette observation est notable pour le composé **12b** pour lequel l'effet répulsif est sept fois moins important à 10%. Ces résultats confortent notre décision d'écarter les esters comme répulsifs.

III-3-2 Tests biologiques avec les amides

Les amides ont également été testés à une concentration massique de 20% dans l'éthanol (soit 197,3 g/L). Les amides tertiaires et secondaires ont été étudiés séparément.

III-3-2-1 Etude des amides tertiaires

Les résultats des tests réalisés avec les amides tertiaires sont décrits dans le schéma suivant et détaillés dans le tableau associé (Figure 30).



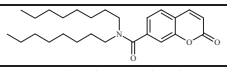
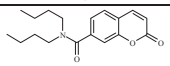
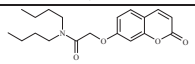
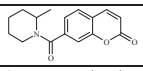
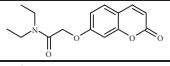
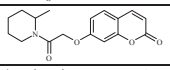
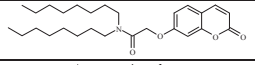
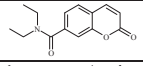
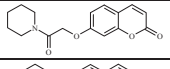
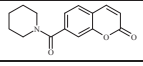
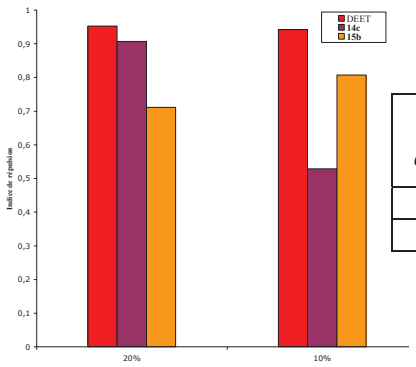
N° amide	*Molécule*	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
14c		0,477	95,33	4,67	0,907
14b		0,655	86,27	13,73	0,722
15b		0,596	85,58	14,42	0,711
14e		0,727	80,10	19,90	0,599
15a		0,717	75,71	24,29	0,514
15e		0,654	72,41	27,59	0,448
15c		0,445	67,66	32,34	0,353
14a		0,805	65,03	34,97	0,301
15d		0,687	53,40	46,60	0,068
14d		0,768	44,83	55,17	-0,103

Figure 30 : Activité répulsive des amides tertiaires

Ces résultats montrent que l'activité dépend de la nature de l'amide. Globalement, aucune conclusion générale sur l'activité répulsive des amides ne peut être donnée. En effet, certains composés montrent de très bons effets répulsifs alors que d'autres n'ont aucun effet (**15d** et **14d**). D'une façon générale, quelque soit le type d'amides, les chaînes linéaires sont plus favorables que les chaînes cycliques et l'encombrement est important. Les chaînes octyles et butyles (**14c**, **14b** et **15b**) donnent de meilleurs résultats que les chaînes éthyles (**14a** et **15a**). De plus, lorsque l'amide est directement attaché au cycle coumarinique, obtenu à partir de l'acide **7**, la répulsion est favorisée. L'amide **14c** montre une activité répulsive très importante, équivalente à celle du DEET à 20% et les molécules **14b** et **15b** des activités similaires à la Picaridine.

Les amides **14c** et **15b** ont également été testés en solution dans l'éthanol à 10% en masse (Figure 31).



N° amide	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
14c	0,213	76,43	23,57	0,529
15b	0,268	90,36	9,64	0,807

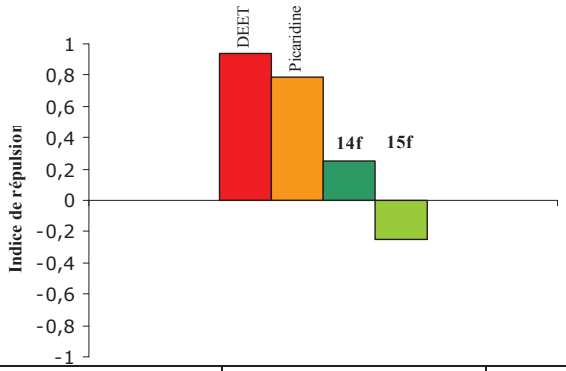
Figure 31 : Etude de l'activité de deux amides à 10%

Les résultats de cette analyse à 10% sont différents pour les deux amides testés. L'activité du composé **14c** décroit de façon significative lorsque la quantité de produit déposé diminue. En revanche, l'activité **15b** reste stable. Ces résultats sont difficiles à interpréter. Néanmoins, les amides sont de bons accepteurs de liaisons hydrogène, ils sont plus polaires que les esters et que les éthers. Leur tension de vapeur est donc plus faible et le relargage dans l'air est plus lent. Tout se passerait comme si la cellulose (donneur de liaisons hydrogène) servait de réservoir. Ce phénomène sera expliqué dans une partie suivante (III-3-3-3).

III-3-2-2 Etude des amides secondaires

Seuls deux des amides secondaires (**14f** et **15f**) ont pu être testés en présence de drosophiles à 20% en masse. En effet, les composés **14g** et **15g** issus du couplage des acides avec la *n*-butylamine ne sont pas solubles dans l'éthanol et n'ont pas pu être testés.

Les résultats obtenus (Figure 32) montrent que les amides secondaires n'ont pas d'activité répulsive significative. Cette dernière est surtout très faible par rapport aux deux répulsifs de référence. Le composé **15f** possède même un effet plutôt attractif.



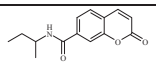
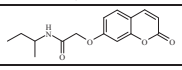
N° amide	*Molécule*	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
14f		0,850	62,58	37,42	0,251
15f		0,717	37,44	62,56	-0,251

Figure 32 : Activité répulsive des amides secondaires

Au vue des résultats obtenus, nous pouvons confirmer que les amides secondaires ne sont pas de bons candidats pour la répulsion des insectes. Il est préférable de nous orienter plutôt vers les amides tertiaires parmi lesquels le composé **14c** semble très intéressant de part sa forte activité répulsive à 20% massique. Cet amide ayant une forte masse moléculaire, sa tension de vapeur est très faible, ainsi il s'évapore lentement.

III-3-3 Tests biologiques avec les éthers

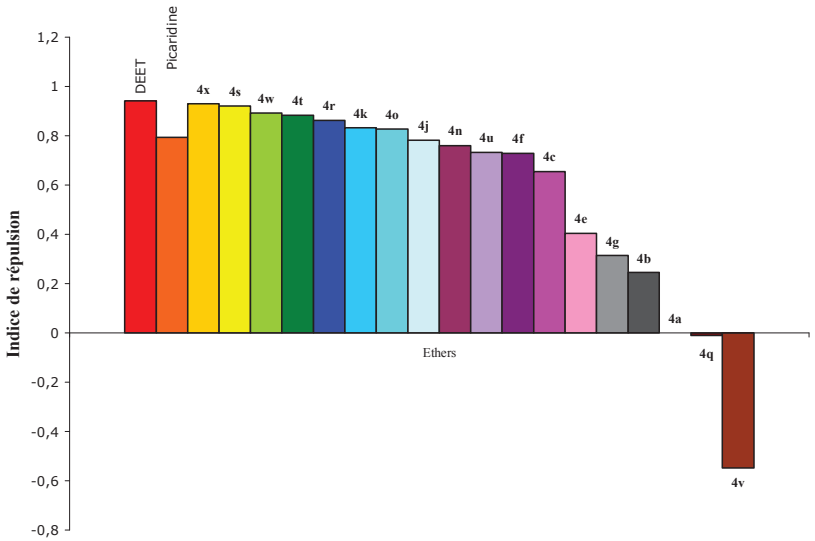
III-3-3-1 Etude des éthers à 20% en masse

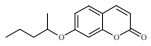
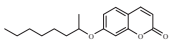
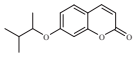
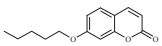
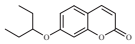
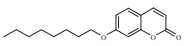
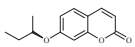
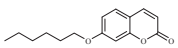
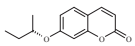
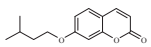
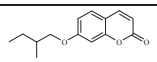
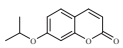
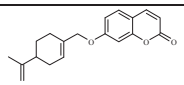
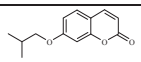
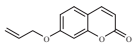
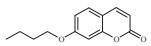
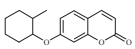
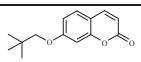
L'ensemble des éthers synthétisés a été testé en présence de drosophiles. Certains composés, notamment ceux possédant un cycle aromatique supplémentaire **4d** ou une double liaison intracyclique **4h**, ne sont pas solubles dans l'éthanol ou dans l'acétate d'éthyle, et n'ont pas pu être testés.

Les résultats seront présentés par groupes définis selon la position de l'éther (en 7, 6 ou 4).

- ***Ethers en position 7***

Différents types d'éthers en position 7 ont été testés (Figure 33), éthers contenant des chaînes alkyles linéaires ou ramifiées, cycliques ainsi que des éthers chiraux.



N° éther	*Molécule*	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
4x		0,850	96,12	3,82	0,922
4s		0,719	96,00	4,00	0,920
4w		0,850	94,21	5,79	0,884
4t		0,850	94,12	5,88	0,882
4r		0,850	93,09	6,91	0,862
4k		0,719	91,63	8,37	0,833
4o		0,905	91,34	8,66	0,827
4j		0,802	89,06	10,94	0,781
4n		0,905	88,02	11,98	0,760
4u		0,850	86,63	13,37	0,733
4f		0,850	86,47	13,53	0,729
4c		0,967	82,74	17,26	0,655
4e*		0,666	70,20	29,80	0,404
4g**		0,905	65,70	34,30	0,314
4b**		0,977	62,25	37,75	0,245
4a		0,905	47,06	52,94	-0,059
4q		0,765	49,48	50,52	-0,010
4v***		0,425	22,64	77,36	-0,547

* Tests réalisés dans le CH_2Cl_2, ** Tests réalisés dans l'AcOEt, *** Tests à 10% dans l'AcOEt

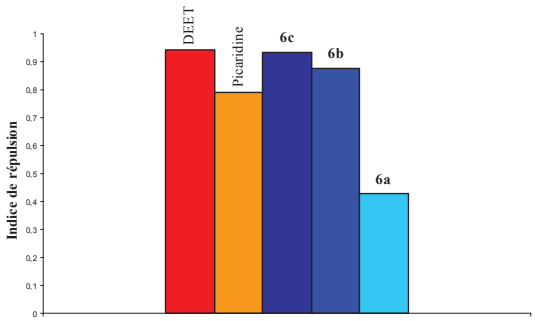
Figure 33 : Activité répulsive des éthers en position 7

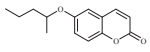
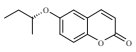
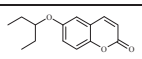
Tout d'abord, nous remarquons que la famille des éthers est majoritairement plus efficace que celles des amides et des esters. Par ailleurs, nous constatons que huit composés présentent une activité répulsive supérieure ou équivalente à la Picaridine (**4x**, **4s**, **4w**, **4t**, **4r**, **4k**, **4o** et **4j**), dont deux proches de celle du DEET (**4x** et **4s**). Certains produits sont plutôt attractifs, c'est le cas pour l'éther **4v** qui attire les drosophiles à 77%. De plus, ces données confirment que la structure de la molécule (nombre de carbone, ramification et stéréochimie) est primordiale pour l'activité. Par exemple, l'ajout d'un carbone sur la chaîne alkyle de l'éther **4a** pour former **4t** augmente considérablement l'activité du produit **4t**.

Dans cette famille, il est remarquable de constater que les éthers contenant au moins cinq carbones de même que ceux ramifiés par un méthyle en alpha de l'oxygène sont les meilleurs. Les molécules composées de plus de cinq carbones linéaires, celles ayant moins de cinq carbones et/ou ramifiées en position bêta et gamma, et celles incorporant des cycles ou des liaisons multiples semblent moins efficaces. Néanmoins, nous ne pouvons pas confirmer actuellement cette hypothèse car il est nécessaire de prendre en compte les marges d'erreur liées aux expériences.

Ethers en position 6

Trois analogues d'éthers en position 7 ont été synthétisés en position 6, puis testés *in vivo* (Figure 34).



N° éther	*Molécule*	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
6c		0,850	96,57	3,43	0,931
6b		0,905	93,85	6,15	0,877
6a*		0,850	81,07	18,93	0,621

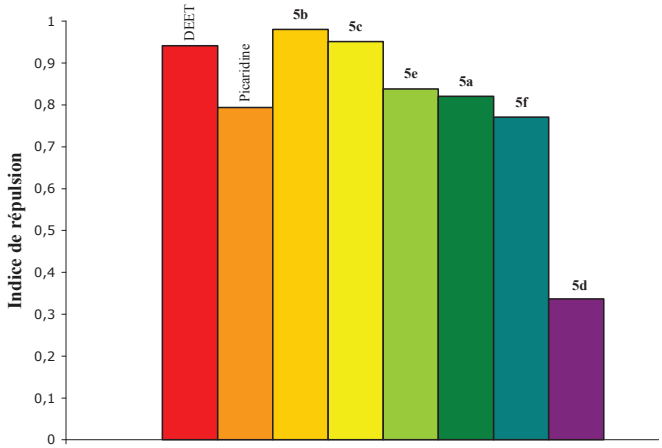
* Tests réalisés dans l'AcOEt

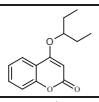
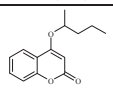
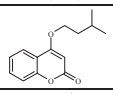
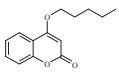
Figure 34 : Activité répulsive des éthers en position 6

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus avec les analogues en position 7. Les composés **6c** et **6b** présentent une activité similaire à leurs analogues respectifs **4x** et **4o**. Par contre, la molécule **6a** est beaucoup moins bonne que son analogue **4r**, une diminution de 0,241 de l'indice de répulsion étant observée. La position de l'éther peut donc avoir une influence sur l'activité dans certains cas. Comme dans le cas précédent, ces résultats confirment en outre que les éthers à cinq carbones ramifiés en alpha sont efficaces.

Ethers en position 4

La famille d'éthers en position 4 a également été testée en présence de drosophiles et a montré globalement des résultats satisfaisants (Figure 35).



N° éther	*Molécule*	*Concentration (mmol/mL)*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*	*Indice de répulsion*
5b		0,850	98,26	1,74	0,965
5c		0,850	97,57	2,43	0,951
5e		0,850	91,92	8,08	0,838
5a		0,905	91,04	8,96	0,821
5f*		0,850	88,56	11,44	0,771
5d		0,850	66,83	33,17	0,337

*Tests réalisés dans l'AcOEt

Figure 35 : Activité répulsive des éthers en position 4

Les éthers en position 4 semblent être de bons candidats pour la répulsion des drosophiles avec des répulsions supérieures à 90% pour quatre d'entre eux. Cinq d'entre eux (**5b**, **5c**, **5e**, **5a** et **5f**) ont une activité supérieure ou équivalente à la Picaridine, dont deux (**5b** et **5c**) équivalente au DEET. D'après ces résultats, une ramification en alpha de l'oxygène de l'éther paraît être un facteur clé pour l'augmentation de l'activité d'une molécule. Si la ramification se trouve sur le carbone en gamma, la répulsion est diminuée (**5e**). Lorsqu'un groupement éthyle se situe sur le carbone en alpha de l'éther (**5b**) l'effet répulsif est meilleur qu'avec un groupe méthyle (**5c**). De plus, nous constatons que la présence d'une substitution en alpha et en béta sur un même composé diminue l'effet répulsif (**5d**).

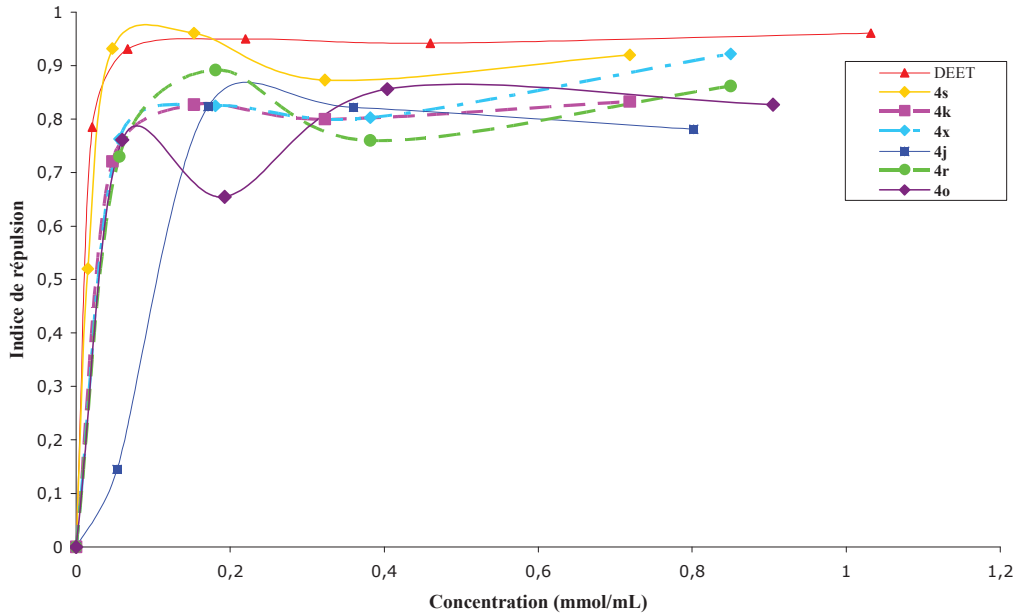
Quelque soit la position du groupement éther sur le cycle coumarine (4, 6 ou 7), cette étude montre que les coumarines substituées par des chaînes alkyles à cinq carbones et ramifiées uniquement en alpha donnent les meilleures activités répulsives. La ramification en alpha est un paramètre important puisque les composés comportant des éthers à moins ou plus de cinq carbones et ramifiés en alpha sont eux aussi efficaces, dans une moindre mesure.

III-3-3-2 Etude de la relation dose-activité

Une étude relation dose-activité a été menée sur les meilleurs éthers en position 7, 6 et 4. Les composés ont été testés à 20%, 10%, 5% et 1% massique. Les molécules **4s** et **5b** ont été analysées en plus à 0,5%. L'ensemble des résultats sera comparé à la courbe dose-réponse du DEET.

Courbes dose-activité de quelques éthers en position 7

L'étude a été réalisée sur six éthers de cette famille, les molécules **4s**, **4k**, **4x**, **4j**, **4r** et **4o** (Figure 36). Seul le composé **4s** a été testé à 0,5% en masse car il présentait une activité répulsive encore élevée à 1% et proche du DEET.



Agrandissement de la partie entre 0 et 0,2 mmol/mL :

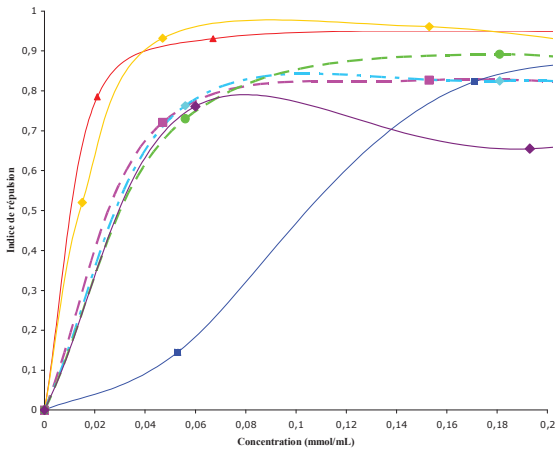


Figure 36 : Effet dose-activité de quelques éthers en position 7

D'une façon générale, l'activité des éthers testés se maintient constante jusqu'à 5% puis commence à décroître plus ou moins rapidement. Tout d'abord, l'éther **4j** diminue très rapidement entre 5% et 1%. Puis, l'ensemble des composés **4k**, **4x**, **4r** et **4o** voit leur efficacité baisser à partir de 1%. Ces molécules présentent des comportements similaires et nous pouvons dire qu'elles ont la même activité répulsive envers les drosophiles. Tandis que le produit **4s** se distingue vraiment des autres avec un effet plus important. Son action s'affaiblit après 1%.

Courbes dose-activité de quelques éthers en position 6

Deux éthers en position 6 ont été testés à quatre concentrations massiques : 20%, 10%, 5% et 1% (Figure 37).

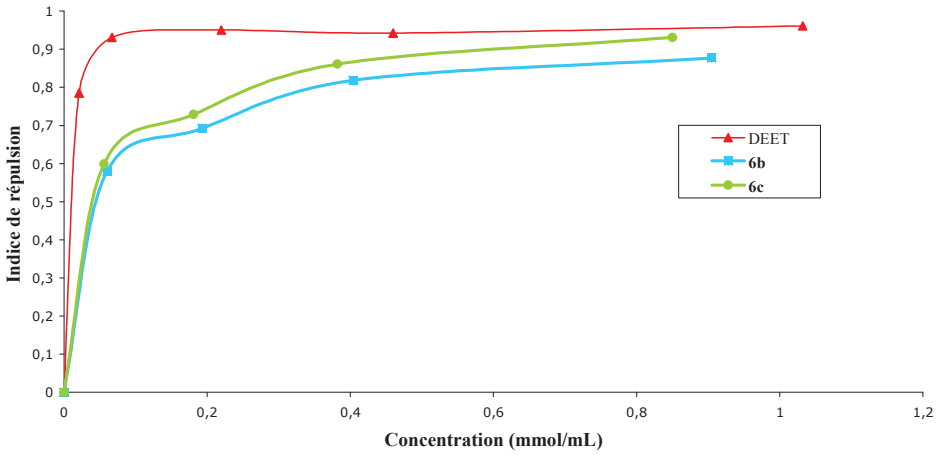


Figure 37 : Effet dose-activité de deux éthers en position 6

Les molécules **6b** et **6c** testées présentent des courbes similaires. Elles ont toutes les deux des activités bonnes jusqu'à 10%, puis elles diminuent progressivement. Leur effet reste tout de même bien inférieur à celui du DEET.

Courbes dose-activité de quelques éthers en position 4

Parmi la famille des éthers en position 4, les quatre meilleures molécules ont été sélectionnées pour étudier l'activité en fonction de la quantité de produit déposée (Figure 38).

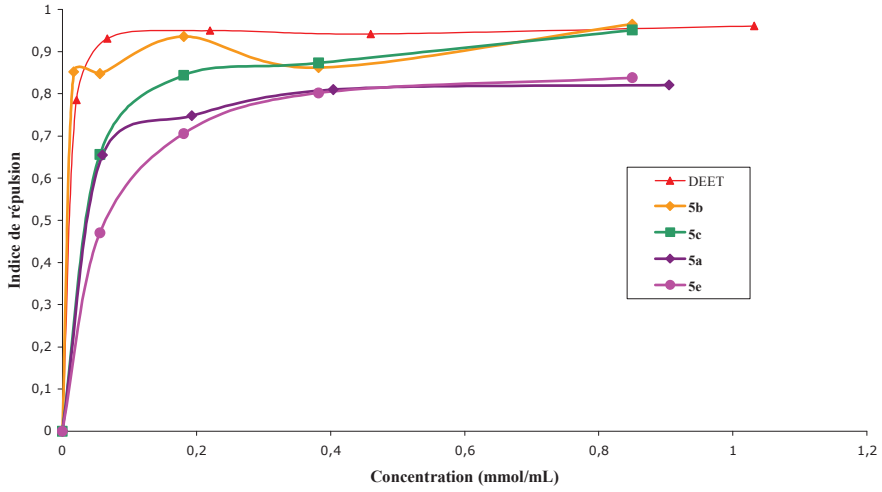
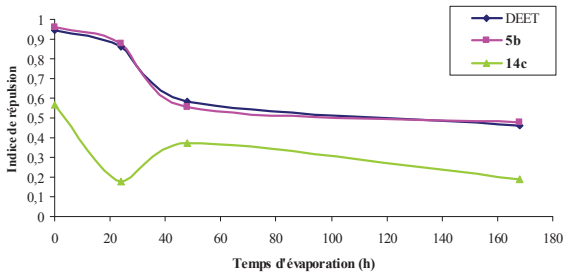


Figure 38 : Effet dose-activité d'éthers en position 4

D'après les courbes, trois groupes se distinguent. Le premier est constitué du composé **5e** dont l'activité décroît brusquement, entre 10% et 5%. Le deuxième lot comprend les composés **5c** et **5a** dont l'effet reste stable et correct jusqu'à la concentration massique de 5%, avant de diminuer, et le troisième groupe, la molécule **5b**, dont l'efficacité est maximale jusqu'à au moins 0,5% massique. Il est à noter que son action à la concentration massique de 0,5% est supérieure à celle du DEET.

III-3-3-3 Etude de la rémanence

Nous avons étudié la rémanence de trois molécules, le DEET, **5b** et **14c**, sur sept jours. Pour chaque produit, une solution à 10% en masse a été préparée et déposée sur l'ensemble des papiers filtres le même jour. Ces derniers ont été laissés à l'air libre dans une pièce ventilée à 25°C. Les tests en présence de drosophiles ont été lancés à 0h, 24h, 48h et 168h (Figure 39).



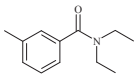
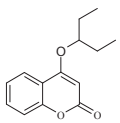
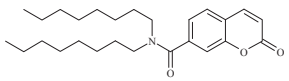
Nom	*Molécule*	*Temps (h)*	*Indice de répulsion*	*% de drosophiles dans le tube côté EtOH*	*% de drosophiles dans le tube côté produit*
DEET		0	0,942	92,78	7,22
		24	0,861	93,03	6,97
		48	0,584	79,19	20,81
		168	0,463	73,13	26,87
5b		0	0,964	98,19	1,81
		24	0,880	93,98	6,02
		48	0,553	77,67	22,33
		168	0,480	74,02	25,98
14c		0	0,568	78,40	21,60
		24	0,178	58,89	41,11
		48	0,375	68,75	31,25
		168	0,191	59,57	40,43

Figure 39 : Etude de la rémanence du DEET, de 5b et de 14c

Le DEET et la molécule **5b** ont des rémanences similaires. En effet, entre 0 et 24h, l'action répulsive des deux produits reste stable, puis diminue brusquement entre 24 et 48h pour rester constante jusqu'à 168h. Même au bout de 7 jours, ces deux composés présentent une activité répulsive non négligeable. Dès le début, nous savions que le produit **14c** avait une efficacité bien inférieure à celle des deux autres à cette concentration. Mais, nous avons souhaité étudier la perte de son activité en fonction du temps. Cette molécule, très lourde, a une pression de vapeur très faible (VP : 9,8E-10 Pa) par rapport aux deux autres (VP (**5b**) : 1,9E-3 Pa), ainsi, elle s'évapore moins vite. Son action devrait donc durer plus longtemps. Or, nous observons tout de même une diminution entre 0 et 24h, puis une stabilisation de l'effet répulsif, sans pouvoir l'expliquer.

Ces résultats nous emmènent à penser qu'entre 0h et 24h, ce sont les molécules situées à la surface du papier filtre qui agissent. Puis, le produit imprégné dans la cellulose commence à s'évaporer de façon continue, ce qui peut expliquer le plateau après 48h.

III-3-4 Etude paramétrique pour optimiser la structure

L'action de plusieurs paramètres sur l'activité répulsive a été étudiée avec la famille des éthers. L'influence de la longueur de la chaîne carbonée ainsi que de ses ramifications, celle de la position du groupement éther et celle des carbones asymétriques a été analysée grâce aux tests biologiques en présence de drosophiles.

III-3-4-1 Influence de la longueur de chaîne

Nous avons synthétisé des éthers en position 7 comportant des chaînes carbonées de taille différente à quatre, cinq, six et huit carbones (Figure 40). Ces molécules ont été testées en solution dans l'éthanol à 20% massique.

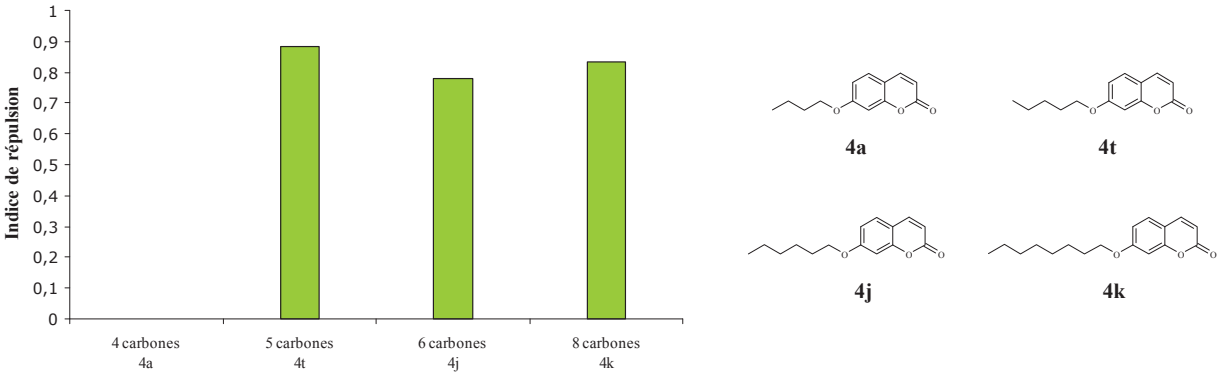


Figure 40 : Influence de la longueur de chaîne

Les résultats obtenus montrent que la longueur de chaîne, avec une fonction éther, a une influence sur l'activité des molécules. En effet, lorsque la coumarine est substituée par une chaîne butyle, la molécule **4a** n'a aucune activité, ce qui a été vérifié deux fois. Mais, l'efficacité de la coumarine augmente fortement en ajoutant un carbone à la chaîne (**4t**). En accroissant à nouveau la chaîne de un ou trois carbones (**4j** et **4k**), la répulsion des drosophiles reste encore importante.

III-3-4-2 Influence de la position des ramifications

L'influence de la position et du type de ramifications a été étudiée sur des éthers à cinq carbones en positions 7 et 4 (Figure 41). L'étude a été faite avec des solutions de ces produits à 20% en masse dans l'éthanol.

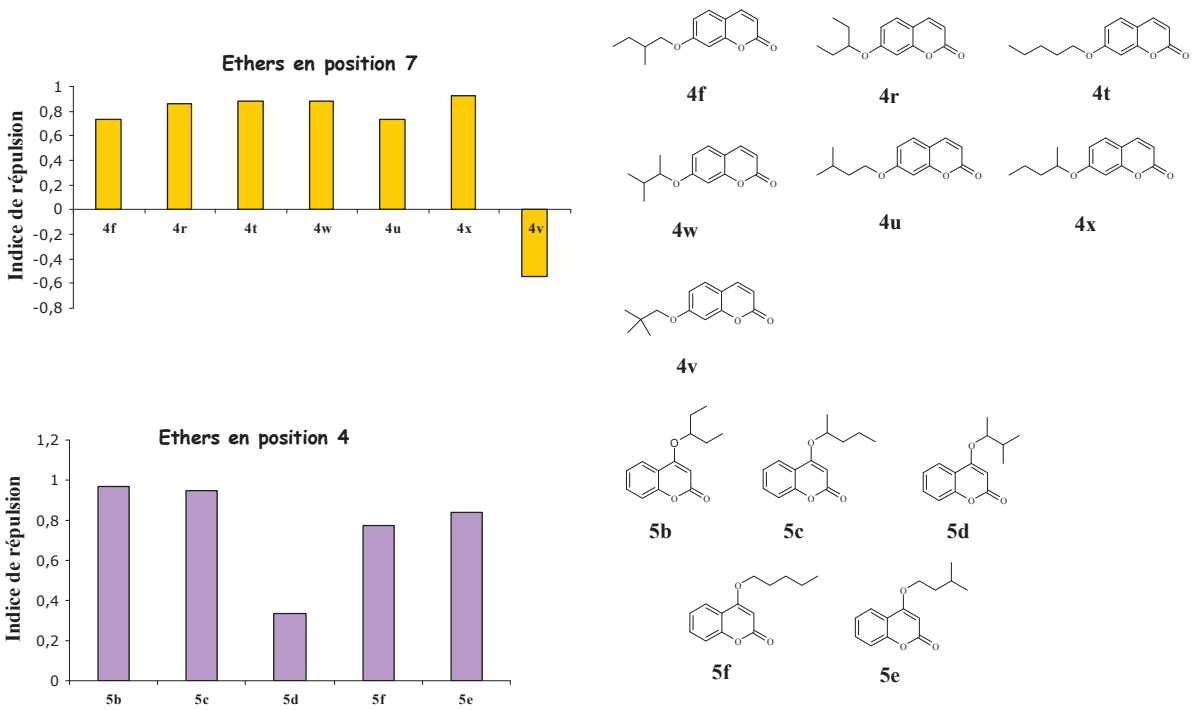


Figure 41 : Influence de la ramification sur l'activité répulsive

Globalement, nous pouvons observer qu'en présence d'un groupement trop encombrant tel un tertbutyle, l'effet est notablement réduit comme c'est le cas pour le composé **4v**. Par ailleurs, et comme supposé précédemment, une ramification en alpha de l'oxygène de l'éther augmente l'efficacité des molécules, les meilleurs résultats sont obtenus avec des produits ramifiés en alpha : **4r**, **4x**, **5b** et **5c**. Les composés possédant une chaîne alkyle linéaire (**4t** et **5f**) semblent moins répulsifs.

III-3-4-3 Influence de la position de l'éther sur le cycle coumarinique

Comme décrit précédemment, trois familles d'éthers ont été synthétisées en positions 7, 6 et 4. Nous avons comparé entre eux les résultats des tests biologiques, effectués à 20% massique dans l'éthanol, pour un même groupement aux trois positions différentes (Figure 42).

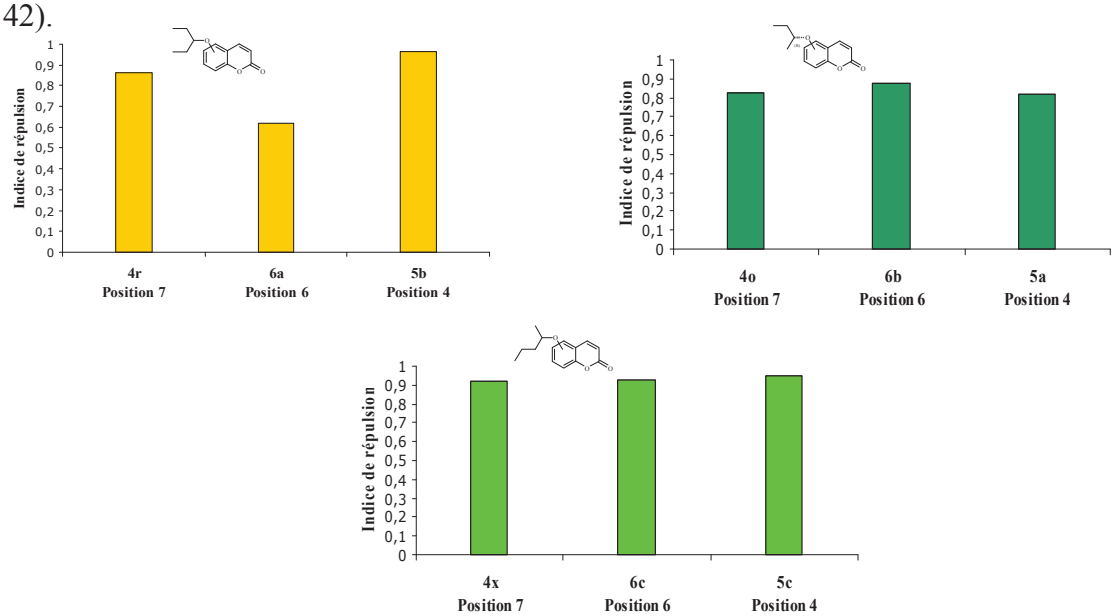


Figure 42 : Influence de la position de la substitution sur l'activité répulsive

Lorsque le noyau coumarine est substitué par le pentan-3-ol, l'activité répulsive de la molécule varie fortement d'une position à une autre. En effet, la position 4 se détache des deux autres, elle est beaucoup plus réactive que la 6 et légèrement plus que la 7. Par contre, avec le 2-butanol et le 2-pentanol, la différence d'efficacité entre les divers sites de substitution n'est pas importante.

III-3-4-4 Influence de la stéréochimie absolue

Une étude sur l'influence de la chiralité d'un composé a été réalisée (Figure 43). Les deux isomères de la molécule issue de l'éthérification de la 7-hydroxycoumarine en présence de 2-butanol ont été synthétisés de façon stéréosélective par Mitsunobu.

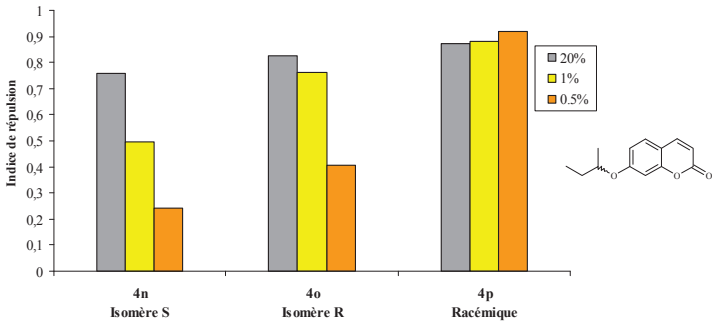


Figure 43 : Influence de la chiralité sur l'activité répulsive

Les expérimentations ont été réalisées à 20%, à 1% et à 0,5% massique avec les deux stéréoisomères et le racémique du butan-2-ol. Nous constatons d'une part que quelque soit la concentration, le produit racémique est le plus efficace et d'autre part que l'isomère (S) est beaucoup moins actif que le (R). De plus, l'efficacité du produit (S) décroît très rapidement à 1% par rapport aux deux autres. A 0,5%, seul le produit racémique présente une activité importante. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés dans l'étude des isomères de la Picaridine dans le brevet de Saltigo.[27] Le butan-2-ol est une partie que nous retrouvons dans le carbamate de la Picaridine. L'entreprise Saltigo a démontré que les isomères de la Picaridine possédant le (R)-butan-2-ol sont plus répulsifs que les autres. L'activité du racémique supérieure à chacun des deux isomères est probablement due à un effet synergique important entre les deux composés chiraux.

III-3-5 Etude de certaines molécules à 1,032 mmol/mL

En regardant les concentrations molaires auxquelles les composés ont été testées, nous nous apercevons que le DEET a été analysé à une concentration de 1,032 mmol/mL, bien plus élevée que celles des autres produits. C'est pour ces raisons que nous avons évalué certaines molécules à cette concentration.

Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné la Picaridine, deux éthers (**5b** et **4w**), deux amides (**14c** et **15b**) et un ester (**13a**). Nous souhaitions voir s'il n'existe pas aussi un effet concentration sur l'activité.

Testés à la même concentration que le DEET, la Picaridine, les deux éthers et les deux amides présentent la même activité répulsive (de l'ordre de 97% de répulsion, soit un indice de répulsion voisin de 0,950). Par contre, l'ester voit son activité diminuer à cette concentration (64% de répulsion, soit un indice de répulsion de 0,281).

III-3-6 Conclusion des tests biologiques

Nous avons synthétisé et testé un grand nombre de molécules classées par famille de fonctions. A l'intérieur d'un même ensemble, nous avons cherché à comparer les molécules entre elles en jouant soit sur la position des substitutions, soit sur l'emplacement des ramifications, soit sur la longueur de chaîne ou soit sur la chiralité. Parmi l'ensemble des composés synthétisés, dix-sept possèdent une activité au moins comparable à la Picaridine à la concentration massique de 20% dont pour six équivalente au DEET (Figure 44). Parmi ces six produits se trouvent cinq éthers (**5b**, **5c**, **6c**, **4x** et **4s**) et un amide (**14c**). Aucun ester ne présente une activité comparable à la Picaridine, ils sont tous moins efficaces.

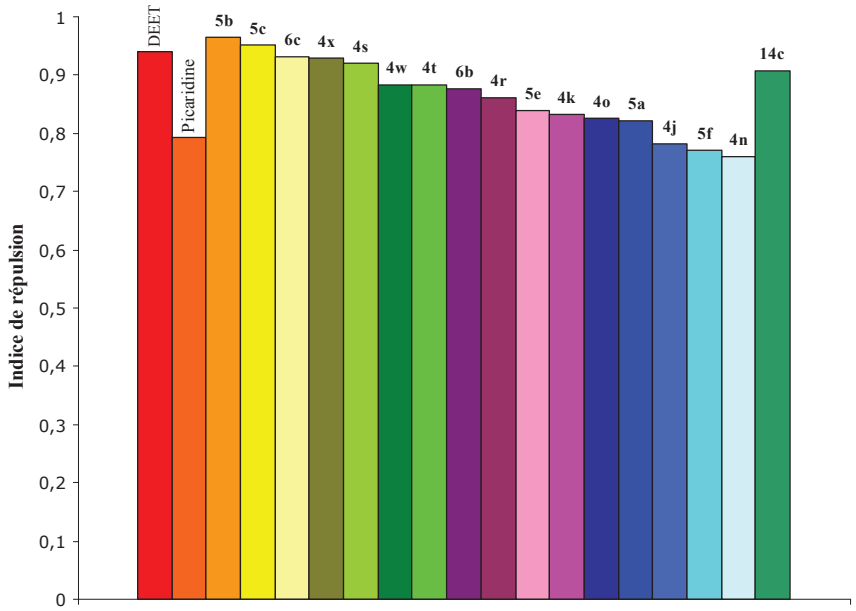


Figure 44 : Comparaison des meilleurs résultats

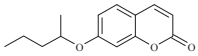
Nous avons montré que l'activité de répulsion n'est pas liée qu'à un seul paramètre mais à la synergie d'un ensemble de données. Il est donc difficile de décrire un squelette type d'une molécule répulsive. Cependant, dans le cas des éthers, nous pouvons penser que la présence d'une chaîne alkyle en alpha de l'oxygène est importante pour améliorer l'activité d'une molécule. Globalement, les éthers à cinq carbones montrent une très bonne activité. Les éthers comportant plus de cinq carbones mais ramifiés en alpha par un méthyle sont également efficaces. De plus, parmi les amides, les secondaires ne sont pas de bons candidats contrairement à certains amides tertiaires. L'amide **14c** comprenant deux longues chaînes octyles est très intéressant car il présente une très bonne efficacité à 20%. De plus, de part sa faible tension de vapeur, nous pouvons espérer une évaporation lente et donc plus longue de ce dernier.

Nous avons donc découvert deux types de molécules répulsives. La première famille est composée d'éthers en position 7, 6 ou 4. Ces derniers présentent des tensions de vapeur inférieures à celle du DEET et du même ordre de grandeur que celle de la Picaridine. Ce groupe aura une action quasi immédiate et s'évaporera un peu moins rapidement que le DEET. La seconde famille est celle des amides. Ces derniers ont une pression de vapeur nettement plus faible que le DEET, ils auront donc une action plus longue car leur évaporation se fera plus lentement.

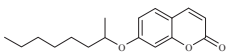
Conclusions

Au cours des dix-huit derniers mois de thèse, nous avons initié un sujet de recherche concernant la synthèse de nouveaux répulsifs. Les répulsifs sont un domaine largement étudié depuis les années 1950. Après une étude bibliographique sur le domaine, nos recherches se sont orientées vers une famille de molécules moins abordées, à savoir les lactones bicycliques, plus particulièrement la coumarine et ses dérivés.

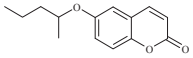
Notre travail de synthèse s'est concentré sur la modification de la coumarine. Quinze esters, quatorze amides, trente quatre éthers, trois acides, une coumarine triflatée et un dérivé nitrile ont été synthétisés. Ces composés ont été entièrement caractérisés par RMN ^{1}H et ^{13}C et par spectrométrie de masse haute résolution. L'activité répulsive de l'ensemble de ces molécules a été évaluée *in vivo* en présence de drosophiles. Cette étude a mis en évidence une efficacité comparable à celle du DEET de six molécules, cinq éthers (**5b**, **5c**, **6c**, **4x** et **4s**) et un amide (**14c**). Ces résultats encourageants offrent de bonnes perspectives pour la poursuite du sujet dans cette voie.



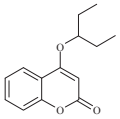
4x



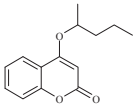
4s



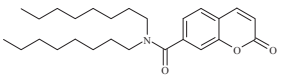
6c



5b



5c



14c

Cependant, les résultats obtenus avec le test de répulsion ne sont pas quantitatifs, mais qualitatifs. Ils seraient intéressants d'affiner ce test afin qu'il devienne quantitatif. Par ailleurs, des études sont en cours pour étudier l'action répulsive des molécules synthétisées sur d'autres insectes, tels que les tiques, les moustiques et les mouches piqueuses. Le substrat coumarinique semble être une plate-forme de choix pour la détermination d'une molécule répulsive originale.

IV – Partie expérimentale

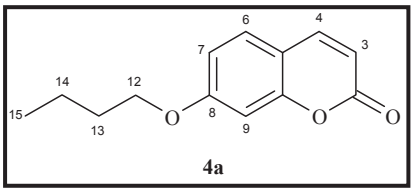
IV-1 General procedure for etherification of hydroxycoumarins (**1**, **2** and **3**)

IV-1-1 From 7-hydroxycoumarin with bromide (**4a** – **4c**)

*Procedure with KOH, TBAI (**4a** and **4b**)*: 7-hydroxycoumarin **1** (1 equiv.) was dissolved in dichloromethane, then the bromoalkyle (4 equiv.), KOH (3 equiv.) and TBAI (0.05 equiv.) were added. Water was added in order to dissolve the mixture. The reaction medium was stirred at room temperature during 18h. After extraction with distilled water, the mixture was dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. A purification on silica gel chromatography affords the expected compound.

*Procedure with K_2CO_3 (**4a** and **4c**)*: 7-hydroxycoumarin **1** (1 equiv.), bromoalkyle (6 equiv.) and K_2CO_3 (5 equiv.) were dissolved in the appropriate solvent. The reaction mixture was refluxed for one day. The solution was concentrated under reduced pressure, then diluted with chloroform, extracted with HCl (1N), washed with distilled water and dried over $MgSO_4$. After evaporation, the mixture was purified on silica gel chromatography to give the expected compound.

- **7-Butoxy-chromen-2-one 4a**

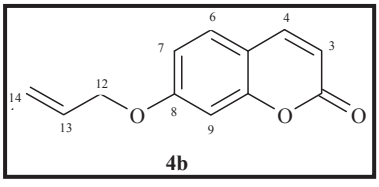


4a

Yield : 82%
Mp = 48°C

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.83 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 6.23 (1H, d, J=9.3 Hz, H_3), 4.02 (2H, t, J=6.6 Hz, H_{12}), 1.84-1.76 (2H, m, H_{13}), 1.56-1.45 (2H, m, H_{14}), 0.98 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.58, 161.43, 156.07, 143.59, 128.82, 113.14, 113.06, 112.50, 101.46, 68.49, 31.13, 19.31, 13.93.
HR ESIMS: Calculated for $C_{13}H_{14}O_3^{+\cdot}$=218.0943, found=218.0941.

- **7-Allyloxy-chromen-2-one 4b**

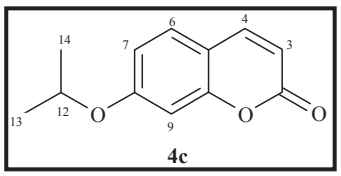


4b

Yield : 35%
Mp = 93°C

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.36 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.86 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.82 (1H, d, J=2.2 Hz, H_9), 6.25 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 6.10-5.99 (1H, m, H_{13}), 5.44 (1H, dq, J=17.4 Hz, H_{14}), 5.34 (1H, dq, J=10.6 Hz, H_{14}), 4.60 (2H, d, J=5.3 Hz, H_{12}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.91, 161.33, 155.97, 143.52, 132.27, 128.89, 118.71, 113.34, 113.27, 112.79, 101.88, 69.42.
HR ESIMS: Calculated for $C_{12}H_{10}O_3^{+\cdot}$=202.0630, found=202.0627.

- **7-Isopropoxy-chromen-2-one 4c**



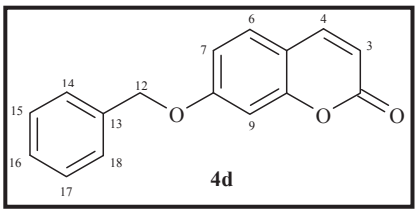
Yield : 83%
Mp = 66°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=9.0 Hz, H_6), 6.82-6.79 (2H, m, H_7 and H_9), 6.23 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.66-4.56 (1H, m, H_{12}), 1.37 (6H, d, J=6.0 Hz, H_{13} and H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.46, 161.42, 156.10, 143.58, 128.90, 113.93, 112.97, 112.38, 102.39, 70.85, 21.93.
HR ESIM: Calculated for $C_{12}H_{12}O_3Na^+$=227.0679, found=227.0685.

IV-1-2 From alcohol on 7-hydroxycoumarin (**4d – 4y**)

A solution of 7-hydroxycoumarin **1** (250 mg, 1.54 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (807.8 mg, 3.08 mmol, 2 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (5 mL) was stirred at room temperature under anhydrous conditions. The corresponding alcohol (2 equiv.) was added. Then, diethylazodicarboxylate (DEAD, 540 µL, 3.39 mmol, 2.2 equiv.) was introduced dropwise at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for one day. The solution was concentrated under reduced pressure, then diluted with Et_2O and filtered off. After evaporation, the concentrated filtrate was chromatographied on silica gel (cyclohexane/AcOEt : 90/10).

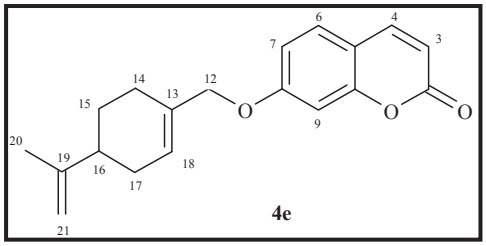
- **7-Benzyloxy-chromen-2-one 4d**



Yield : 35%
Mp = 157°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.45-7.35 (6H, m, H_{ar} and H_6), 6.94-6.90 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.3 Hz, H_7), 6.89 (1H, d, J=2.5 Hz, H_9), 6.25 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 5.13 (2H, s, H_{12}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 162.01, 161.31, 155.96, 143.50, 135.89, 128.93, 128.91, 128.53, 127.66, 113.39, 112.87, 102.06, 70.66.
HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{12}O_3^{+\cdot}$=252.0786, found=252.0788.

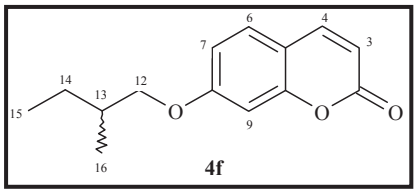
- **7-(4-Isopropenyl-cyclohex-1-enylmethoxy)-chromen-2-one 4e**



Yield : 73%
Mp = 120°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.3 Hz, H_6), 6.87-6.82 (2H, m, H_7 and H_9), 6.24 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 5.87 (1H, s, H_{18}), 4.74-4.72 (2H, m, H_{21}), 4.46 (2H, s, H_{12}), 2.25-2.10 (4H, m), 2.08-1.98 (1H, m), 1.97-1.85 (1H, m), 1.75 (3H, s, H_{20}), 1.58-1.49 (1H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.35, 161.43, 155.99, 149.60, 143.58, 132.68, 128.80, 126.27, 113.41, 113.16, 112.63, 109.03, 101.83, 72.97, 40.98, 30.58, 27.40, 26.32, 20.91.
HR ESIMS: Calculated for $C_{19}H_{20}O_3Na^+$=319.1305, found=319.1301.

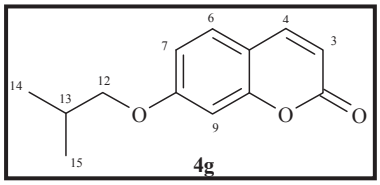
- **7-(2-Methyl-butoxy)-chromen-2-one 4f**



Yield : 85%
Mp = 59°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.83 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.6 Hz, H_9), 6.23 (1H, d, J=9.3 Hz, H_3), 3.90-3.85 (1H, m, H_{12}), 3.82-3.77 (1H, m, H_{12}), 1.94-1.85 (1H, m, H_{13}), 1.63-1.52 (1H, m, H_{14}), 1.35-1.27 (1H, m, H_{14}), 1.03 (3H, d, J=6.6 Hz, H_{16}), 0.96 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.74, 161.45, 156.08, 143.58, 128.80, 113.16, 113.04, 112.48, 101.50, 73.56, 34.67, 26.19, 16.59, 11.42.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found=255.0983.

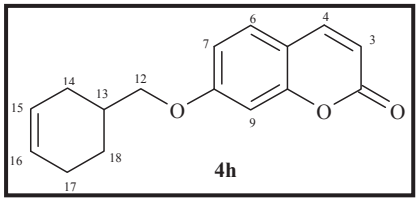
- **7-Isobutoxy-chromen-2-one 4g**



Yield : 70%
Mp = 84°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.84 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.2 Hz, H_9), 6.23 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 3.77 (2H, d, J=6.6 Hz, H_{12}), 2.17-2.06 (1H, m, H_{13}), 1.04 (6H, d, J=6.5 Hz, H_{14} and H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.68, 161.45, 156.07, 143.58, 128.80, 113.14, 113.06, 112.49, 101.51, 75.05, 28.27, 19.30.
HR ESIMS: Calculated for $C_{13}H_{14}O_3Na^+$=241.0835, found=241.0832.

- **7-(Cyclohex-3-enylmethoxy)-chromen-2-one 4h**

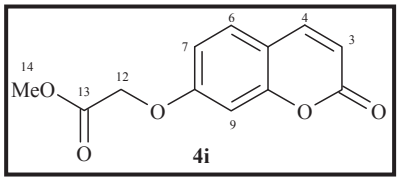


Yield : 80%
Mp = 118°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.36 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.85 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.81 (1H, d, J=2.2 Hz, H_9), 6.24 (1H, d, J=9.3 Hz, H_3), 5.71 (2H, m, H_{15} and H_{16}), 3.90 (2H, d, J=6.6 Hz, H_{12}), 2.26-2.10 (4H, m), 1.93-1.85 (2H, m), 1.58-1.25 (1H, m).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm :162.65, 161.43, 156.08, 143.57, 128.84, 127.30, 125.64, 113.11, 112.56, 101.55, 73.16, 33.52, 28.32, 25.49, 24.52.
HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{16}O_3Na^+$=279.0992, found=279.0988.

- **(2-Oxo-2H-chromen-7-yloxy)-acetic acid methyl ester 4i**

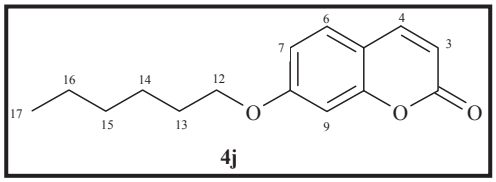
Treatment : THF was evaporated, then THF was added again to the crude product and the corresponding ether was filtered.



Yield : 53%
Mp=150°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.64 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.40 (1H, d, J=8.8 Hz, H_6,), 6.89 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.78 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 6.28 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.70 (2H, s, H_{12}), 3.83 (3H, s, H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 168.52, 161.02, 160.87, 155.81, 143.33, 129.15, 113.99, 113.53, 112.96, 101.86, 65.40, 52.65.
HR ESIMS: Calculated for $C_{12}H_{10}O_5Na^+$=257.0420, found=257.0413.

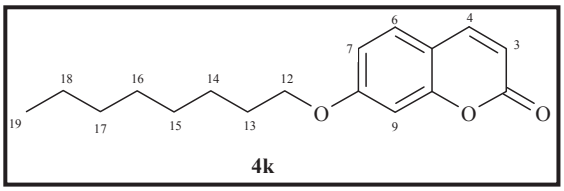
- **7-Hexyloxy-chromen-2-one 4j**



Yield :95%
Mp =liquid at r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.83 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.2 Hz, H_9), 6.23 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.01 (2H, t, J=6.6 Hz, H_{12}), 1.85-1.77 (2H, m, H_{13}), 1.49-1.43 (2H, m, H_{14}), 1.40-1.34 (4H, m, H_{15} and H_{16}), 0.91 (3H, t, J=7.0 Hz, H_{17}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.58, 161.44, 156.08, 143.58, 128.82, 113.14, 113.06, 112.49, 101.46, 68.81, 31.66, 29.07, 25.76, 22.71, 14.15.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{18}O_3H^+$=247.1329, found=247.1340.

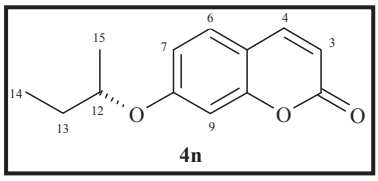
- **7-Octyloxy-chromen-2-one 4k**



Yield : 100%
Mp =50°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.83 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 6.23 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.01 (2H, t, J=6.6 Hz, H_{12}), 1.85-1.77 (2H, m, H_{13}), 1.50-1.43 (2H, m, H_{14}), 1.40-1.28 (8H, m, H_{15}, H_{16}, H_{17} and H_{18}), 0.89 (3H, t, J=6.3 Hz, H_{19}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.59, 161.44, 156.08, 143.58, 128.81, 113.14, 113.06, 112.49, 101.47, 68.82, 31.92, 29.43, 29.34, 29.11, 26.09, 22.78, 14.23.
HR ESIMS: Calculated for $C_{17}H_{22}O_3H^+$=275.1642, found=275.1644.

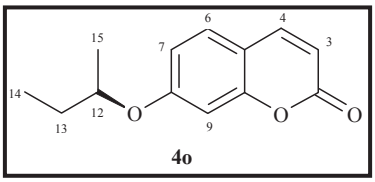
- **(S)-7-*sec*-Butoxy-chromen-2-one 4n**



Yield : 91%
Mp = liquid at r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.34 (1H, d, J=8.3 Hz, H_6), 6.83-6.78 (2H, m, H_7 and H_9), 6.23 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.41-4.32 (1H, m, H_{12}), 1.83-1.72 (1H, m, H_{13}), 1.71-1.60 (1H, m, H_{13}), 1.33 (3H, d, J=6.3 Hz, H_{15}), 0.99 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.77, 161.48, 156.11, 143.58, 128.90, 113.95, 112.93, 112.36, 102.39, 75.95, 29.11, 19.16, 9.82.
HR ESIMS: Calculated for $C_{13}H_{14}O_3Na^+$=241.0835, found=241.0844.

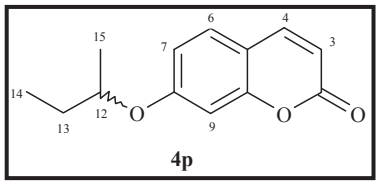
- **(R)-7-*sec*-Butoxy-chromen-2-one 4o**



Yield : 94%
Mp = liquid at r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.34 (1H, d, J=8.3 Hz, H_6), 6.83-6.79 (2H, m, H_7 and H_9), 6.24 (1H, d, J=9.3 Hz, H_3), 4.41-4.32 (1H, m, H_{12}), 1.83-1.72 (1H, m, H_{13}), 1.71-1.60 (1H, m, H_{13}), 1.33 (3H, d, J=6.04 Hz, H_{15}), 0.99 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.77, 161.48, 156.11, 143.58, 128.90, 113.95, 112.93, 112.36, 102.39, 75.95, 29.11, 19.16, 9.82.

- **7-*sec*-Butoxy-chromen-2-one 4p**

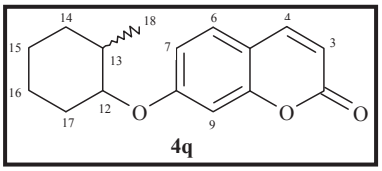


4p

Yield : 100%
Mp = liquid at r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.3 Hz, H_6), 6.83-6.78 (2H, m, H_7 and H_9), 6.22 (1H, d, J=9.3 Hz, H_3), 4.40-4.33 (1H, m, H_{12}), 1.81-1.72 (1H, m, H_{13}), 1.71-1.62 (1H, m, H_{13}), 1.33 (3H, d, J=6.0 Hz, H_{15}), 0.98 (3H, t, J=7.5 Hz, H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.77, 161.47, 156.11, 143.58, 128.90, 113.94, 112.93, 112.36, 102.39, 75.95, 29.11, 19.16, 9.81.

- **7-(2-Methyl-cyclohexyloxy)-chromen-2-one 4q**



4q

Yield : 35%
Mp = 61°C

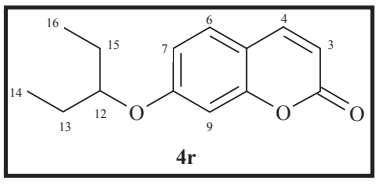
Mixture of 2 diastereoisomers (70/30)

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm :
- *Diastereoisomer A* (70%) : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.34 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.86-6.80 (2H, m, H_7 and H_9), 6.22 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.41-4.39 (1H, m, H_{12}), 2.02-1.99 (1H, m, H_{17}), 1.88-1.77 (1H, m, H_{13}), 1.71-1.67 (1H, m), 1.61-1.52 (4H, m), 1.40-1.25 (2H, m), 0.98 (3H, d, J=6.8 Hz, H_{18}).
- *Diastereoisomer B* (30%) : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.34 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.86-6.80 (2H, m, H_7 and H_9), 6.22 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 3.87-3.79 (1H, m, H_{12}), 2.16-2.12 (1H, m, H_{17}), 1.88-1.77 (1H, m), 1.71-1.67 (3H, m), 1.40-1.25 (3H, m), 0.98 (3H, d, J=6.8 Hz, H_{18}).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm :
- *Diastereoisomer A* : 162.06, 161.52, 156.15, 143.60, 128.90, 114.13, 112.84, 112.32, 102.61, 77.89, 35.16, 29.35, 28.41, 24.42, 21.05, 18.77.
- *Diastereoisomer B* : 162.06, 161.52, 156.15, 143.60, 128.85, 113.91, 112.88, 112.35, 102.43, 83.01, 38.09, 33.67, 30.98, 25.38, 24.71, 17.20.

HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{18}O_3Na^+$= 281.1148, found = 281.1152.

- **7-(1-Ethyl-propoxy)-chromen-2-one 4r**

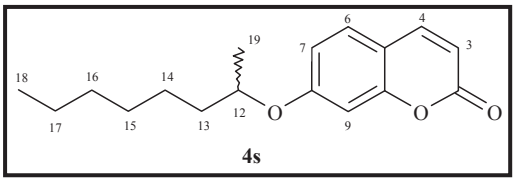


4r

Yield : 99%
Mp = liquid à r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.34 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.82 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.79 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 6.22 (1H, d, J=9.3 Hz, H_3), 4.21-4.14 (1H, m, H_{12}), 1.75-1.67 (4H, m, H_{13} and H_{15}), 0.96 (6H, t, J=7.3 Hz, H_{14} and H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.32, 161.50, 156.12, 143.59, 128.91, 114.01, 112.89, 112.35, 102.44, 81.13, 26.13, 9.69.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found=255.1000.

- **7-(1-Methyl-heptyloxy)-chromen-2-one 4s**

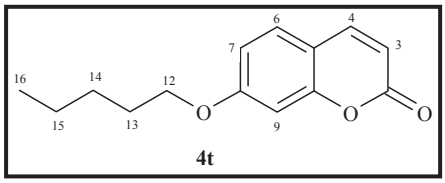


4s

Yield : 93%
Mp = liquid at r.t.

NMR ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.4 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.8 Hz, H_6), 6.83-6.78 (2H, m, H_7 and H_9), 6.23 (1H, d, J=9.4 Hz, H_3), 4.45-4.38 (1H, m, H_{12}), 1.81-1.70 (1H, m, H_{13}), 1.64-1.54 (2H, m, H_{13} and H_{14}), 1.45-1.19 (10H, m, H_{14},H_{15}, H_{16}, H_{17} and H_{19}), 0.88 (3H, t, J=6.6 Hz, H_{18}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.79, 161.49, 156.13, 143.59, 128.91, 113.96, 112.92, 112.36, 102.35, 74.86, 36.34, 31.90, 29.34, 25.55, 22.72, 19.66, 14.20.
HR ESIMS: Calculated for $C_{17}H_{22}O_3H^+$=275.1642, found=275.1652.

- **7-Pentyloxy-chromen-2-one 4t**

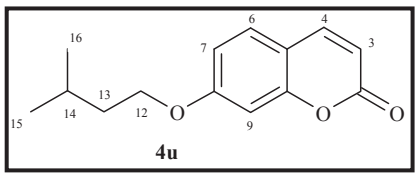


4t

Yield : 100%
Mp < 45°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.32 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.56 Hz, H_6), 6.83 (1H, dd, J_1=2.28 Hz, J_2=8.56 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.52 Hz, H_9), 6.23 (1H, d, J=9.56 Hz, H_3), 4.01 (2H, t, J=6.52 Hz, H_{12}), 1.84-1.78 (2H, m, H_{13}), 1.48-1.38 (4H, m, H_{14} and H_{15}), 0.94 (3H, t, J=7.04 Hz, H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.58, 161.44, 156.08, 143.59, 128.82, 113.14, 113.06, 112.50, 101.46, 68.80, 28.80, 28.24, 22.55, 14.13.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found=255.0990.

- **7-(3-Methyl-butoxy)-chromen-2-one 4u**

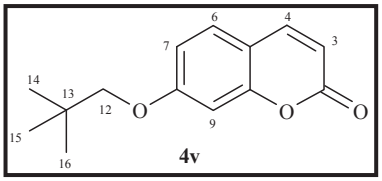


4u

Yield : 65%
Mp < 45°C

NMR ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.42 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.28 Hz, H_6), 6.85-6.80 (2H, m, H_7 and H_9), 6.24 (1H, d, J=9.42 Hz, H_3), 4.04 (2H, t, J=6.57 Hz, H_{12}), 1.89-1.77 (1H, m, H_{14}), 1.74-1.67 (2H, m, H_{13}), 0.97 (6H, d, J=6.60 Hz, H_{15} and H_{16}).
NMR ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.55, 161.44, 156.08, 143.59, 128.83, 113.15, 113.07, 112.51, 101.46, 67.20, 37.76, 25.15, 22.67.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found= 255.0981.

- **7-(2,2-Dimethyl-propoxy)-chromen-2-one 4v**

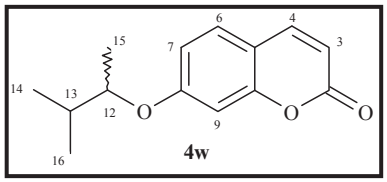


4v

Yield : 49%
Mp = 149°C

NMR ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.5 Hz, H_4), 7.35 (1H, d, J=8.8 Hz, H_6), 6.85 (1H, dd, J_1=2.2 Hz, J_2=8.5 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.5 Hz, H_9), 6.23 (1H, d, J=9.5 Hz, H_3), 3.64 (2H, s, H_{12}), 1.05 (9H, s, H_{14}, H_{15} and H_{16}).
NMR ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) δppm : 162.96, 161.49, 156.09, 143.61, 128.77, 113.17, 113.03, 112.47, 101.49, 78.50, 32.04, 26.67.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found =255.0995.

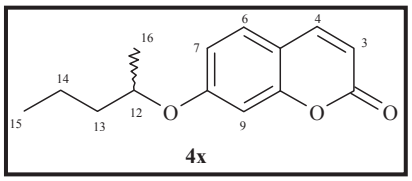
- **7-(1,2-Dimethyl-propoxy)-chromen-2-one 4w**



Yield : 93%
Mp < 45°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.34 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.83-6.78 (2H, m, H_7 and H_9), 6.22 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.24-4.17 (1H, m, H_{12}), 1.99-1.91 (1H, m, H_{13}), 1.27 (3H, d, J=6.3 Hz, H_{15}), 0.99 (6H, m, H_{14} and H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.94, 161.48, 156.13, 143.57, 128.90, 113.96, 112.90, 112.33, 102.42, 79.31, 33.03, 18.44, 17.82, 15.95.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found=255.0990.

- **7-(1-Methyl-butoxy)-chromen-2-one 4x**



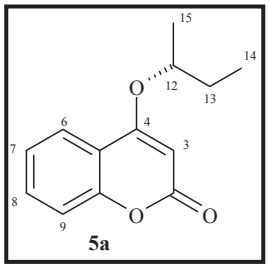
Yield : 91%
Mp < 45°C

NMR ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.62 (1H, d, J=9.4 Hz, H_4), 7.34 (1H, d, J=8.8 Hz, H_6), 6.82-6.78 (2H, m, H_7 and H_9), 6.22 (1H, d, J=9.4 Hz, H_3), 4.48-4.37 (1H, m, H_{12}), 1.79-1.71 (1H, m, H_{13}), 1.70-1.53 (1H, m, H_{13}), 1.47-1.41 (2H, m, H_{14}), 1.32 (3H, d, J=6.2 Hz, H_{16}), 0.93 (3H, t, J=7.2 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.77, 161.48, 156.10, 143.59, 128.91, 113.91, 112.89, 112.33, 102.31, 74.54, 38.43, 19.62, 18.79, 14.09.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3H^+$=233.1172, found=233.1182.

IV-1-3 From alcohol on 4-hydroxycoumarin (**5a-5f**)

A solution of 4-hydroxycoumarin **2** (250 mg, 1.54 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (807.8 mg, 3.08 mmol, 2 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (5 mL) was stirred at room temperature under anhydrous conditions. The corresponding alcohol (2 equiv.) was added. Then, diethylazodicarboxylate (DEAD, 540 µL, 3.39 mmol, 2.2 equiv.) was introduced dropwise at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for one day. The solution was concentrated under reduced pressure, then diluted with Et_2O and filtered off. After evaporation, the concentrated filtrate was chromatographied on silica gel (cyclohexane/AcOEt : 90/10).

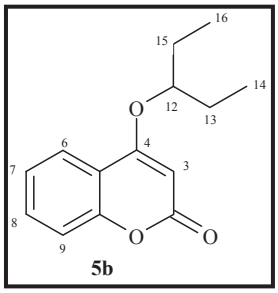
- **4-*sec*-Butoxy-chromen-2-one 5a**



Yield : 100%
Mp < 45°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.83 (1H, dd, J_1=1.2 Hz, J_2=7.8 Hz, H_9), 7.54 (1H, td, J_1=1.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_8), 7.33-7.24 (2H, m, H_6 and H_7), 5.65 (1H, s, H_3), 4.54-4.45 (1H, m, H_{12}), 1.93-1.82 (1H, m, H_{13}), 1.81-1.70 (1H, m, H_{13}), 1.42 (3H, d, J=6.0 Hz, H_{15}), 1.02 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 164.91, 163.42, 153.64, 132.40, 123.90, 123.30, 116.90, 116.40, 90.74, 77.28, 28.87, 18.78, 9.69.
HR ESIMS: Calculated for $C_{13}H_{14}O_3Na^+$=241.0835, found =241.0839.

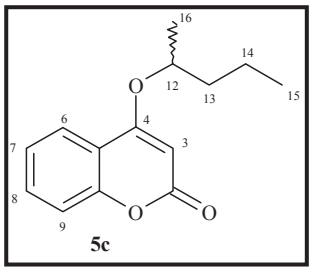
- **4-(1-Ethyl-propoxy)-chromen-2-one 5b**



Yield : 87%
Mp < 45°C

NMR ^{1}H (300 MHz, CDCl$_3$) δppm : 7.84 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=7.9 Hz, H_9), 7.54 (1H, td, J_1=1.7 Hz, J_2=7.4 Hz, H_8), 7.31 (1H, dd, J_1=1.3 Hz, J_2=8.5 Hz, H_6), 7.26 (1H, td, J_1=1.1 Hz, J_2=7.2 Hz, H_7), 5.65 (1H, s, H_3), 4.36-4.28 (1H, m, H_{12}), 1.86-1.75 (4H, m, H_{13} and H_{15}), 0.99 (6H, t, J=7.4 Hz, H_{14} and H_{16}).
NMR ^{13}C (300 MHz, CDCl$_3$) δppm : 165.30, 163.51, 153.65, 151.16, 132.42, 123.94, 123.25, 116.94, 90.77, 82.24, 25.81, 9.58.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3H^+$=233.1172, found=233.1177.

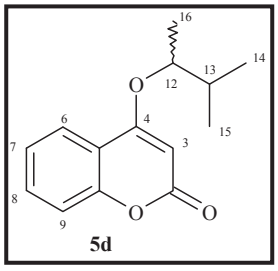
- **4-(1-Methyl-butoxy)-chromen-2-one 5c**



Yield : 91%
Mp = liquid at r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 7.81 (1H, d, J=7.8 Hz, H_9), 7.54 (1H, td, J_1=1.5 Hz, J_2=8.3 Hz, H_8), 7.33-7.24 (2H, m, H_6 and H_7), 5.65 (1H, s, H_3), 4.60-4.52 (1H, m, H_{12}), 1.91-1.81 (1H, m, H_{13}), 1.73-1.65 (1H, m, H_{13}), 1.60-1.43 (1H, m, H_{14}), 1.42 (3H, d, J=6.0 Hz, H_{16}), 1.32-1.25 (1H, m, H_{14}), 0.96 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 164.91, 163.44, 153.64, 132.39, 123.90, 123.31, 116.90, 116.40, 90.68, 75.94, 38.07, 19.24, 18.70, 14.04.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3H^+$=233.1172, found=233.1179.

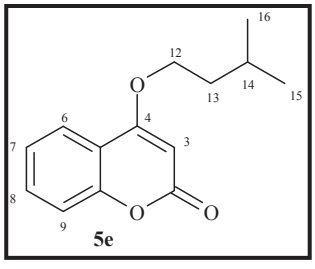
- **4-(1,2-Dimethyl-propoxy)-chromen-2-one 5d**



Yield : 84%
Mp = 48°C

NMR ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 7.82 (1H, dd, J_1=1.0 Hz, J_2=7.8 Hz, H_9), 7.53 (1H, td, J_1=1.2 Hz, J_2=7.3 Hz, H_8), 7.32-7.24 (2H, m, H_6 and H_7), 5.64 (1H, s, H_3), 4.38-4.31 (1H, m, H_{12}), 2.10-2.01 (1H, m, H_{13}), 1.35 (3H, d, J=6.0 Hz, H_{16}), 1.06-1.01 (6H, m, H_{14} and H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 164.91, 163.41, 153.63, 132.38, 123.91, 123.23, 116.91, 116.45, 90.68, 80.42, 33.00, 18.10, 18.00, 15.63.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3H^+$=233.1172, found =233.1178.

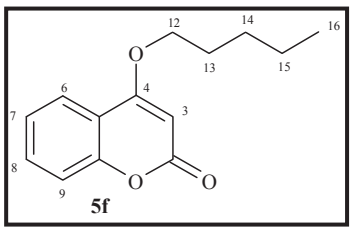
- **4-(3-Methyl-butoxy)-chromen-2-one 5e**



Yield : 91%
Mp = 62°C

NMR ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 7.82 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=7.8 Hz, H_9), 7.54 (1H, td, J_1=1.8 Hz, J_2=8.6 Hz, H_8), 7.33-7.24 (2H, m, H_6 and H_7), 5.67 (1H, s, H_3), 4.02-3.90 (2H, m, H_{12}), 2.05-1.96 (1H, m, H_{13}), 1.66-1.56 (1H, m, H_{13}), 1.43-1.33 (1H, m, H_{14}), 1.09 (3H, d, J=6.8 Hz, H_{16}), 0.99 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 166.18, 163.43, 153.77, 132.72, 124.24, 123.37, 117.21, 116.32, 90.79, 74.29, 34.68, 26.47, 16.90, 11.69.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3H^+$=233.1172, found =233.1173.

- **4-Pentyloxy-chromen-2-one 5f**



5f

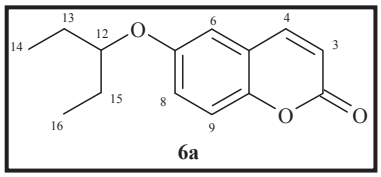
Yield : 100%
Mp = 96°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.82 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=8.0 Hz, H_9), 7.54 (1H, td, J_1=1.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_8), 7.33-7.24 (2H, m, H_6 and H_7), 5.66 (1H, s, H_3), 4.12 (2H, t, J=6.5 Hz, H_{12}), 1.95-1.87 (2H, m, H_{13}), 1.52-1.40 (4H, m, H_{14} and H_{15}), 0.96 (3H, t, J=7.0 Hz, H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.89, 163.20, 153.51, 132.44, 123.96, 123.17, 116.92, 116.00, 90.51, 69.57, 28.33, 28.24, 22.48, 14.10.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3H^+$=233.1172, found =233.1176.

IV-1-4 From alcohol on 6-hydroxycoumarin (**6a-6c**)

A solution of 6-hydroxycoumarin **3** (250 mg, 1.54 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (807.8 mg, 3.08 mmol, 2 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (5 mL) was stirred at room temperature under anhydrous conditions. The corresponding alcohol (2 equiv.) was added. Then, diethylazodicarboxylate (DEAD, 540 µL, 3.39 mmol, 2.2 equiv.) was introduced dropwise at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for one day. The solution was concentrated under reduced pressure, then diluted with Et_2O and filtered off. After evaporation, the concentrated filtrate was chromatographied on silica gel (cyclohexane/AcOEt : 90/10).

- **6-(1-Ethyl-propoxy)-chromen-2-one 6a**

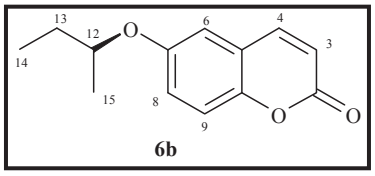


6a

Yield : 79%
Mp = 80°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.25 (1H, d, J=10.1 Hz, H_9), 7.10 (1H, dd, J_1=3.0 Hz, J_2=9.1 Hz, H_8), 6.91 (1H, d, J=2.8 Hz, H_6), 6.41 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.14-4.07 (1H, m, H_{12}), 1.73-1.65 (4H, m, H_{13} and H_{15}), 0.96 (6H, t, J=7.3 Hz, H_{14} and H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.21, 155.35, 148.38, 143.40, 121.27, 119.39, 117.98, 117.08, 112.91, 81.51, 26.08, 9.68.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found= 255.0983.

- **6-*sec*-Butoxy-chromen-2-one 6b**

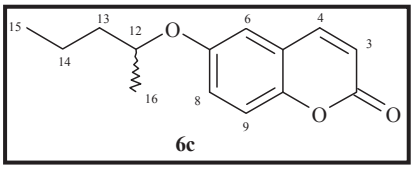


6b

Yield : 79%
Mp < 45°C

NMR ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.5 Hz, H_4), 7.25 (1H, d, J=9.1 Hz, H_9), 7.09 (1H, dd, J_1=2.8 Hz, J_2=9.1 Hz, H_8), 6.91 (1H, d, J=2.9 Hz, H_6), 6.41 (1H, d, J=9.5 Hz, H_3), 4.31-4.26 (1H, m, H_{12}), 1.80-1.71 (1H, m, H_{13}), 1.69-1.60 (1H, m, H_{13}), 1.30 (3H, d, J=6.0 Hz, H_{15}), 0.99 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{14}).
NMR ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) δppm : 161.21, 154.81, 148.42, 143.40, 121.28, 119.38, 117.99, 117.09, 112.83, 76.30, 29.21, 19.26, 9.88.
HR ESIMS: Calculated for $C_{13}H_{14}O_3H^+$=219.1016, found=219.1018.

- **6-(1-Methyl-butoxy)-chromen-2-one 6c**



6c

Yield : 91%
Mp = 65°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) ppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.25 (1H, d, J=9.8 Hz, H_9), 7.08 (1H, dd, J_1=3.0 Hz, J_2=9.1 Hz, H_8), 6.91 (1H, d, J=2.8 Hz, H_6), 6.41 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.40-4.31 (1H, m, H_{12}), 1.78-1.69 (1H, m, H_{13}), 1.61-1.39 (3H, m, H_{13} and H_{14}), 1.30 (3H, d, J=6.0 Hz, H_{16}), 0.94 (3H, t, J=7.5 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) ppm : 161.20, 154.83, 148.42, 143.39, 121.24, 119.40, 118.00, 117.10, 112.79, 74.91, 38.65, 19.74, 18.87, 14.17.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{16}O_3Na^+$=255.0992, found=255.0985.

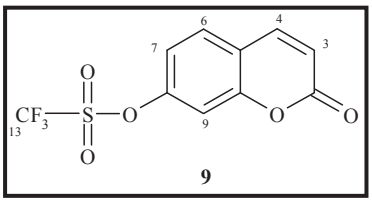
IV-2 General procedure for the synthesis of the two coumarin acids

IV-2-1 Synthesis of the coumarin acid **7**

IV-2-1-1 Procedure for the triflation

7-hydroxycoumarin **1** (1.5 g, 9.25 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (30 mL) under argon. Then the mixture was cooled at 0°C and anhydrous pyridine (1.50 mL, 18.5 mmol, 2 equiv.) was added. Then, trifluoromethanesulfonic anhydride (3.10 mL, 18.50 mmol, 2 eq.) was added dropwise over 20 min to the stirred, ice cold solution. After the addition, the reaction was stirred at room temperature during 18h. The reaction mixture was diluted with diethylether and then quenched with HCl 10%, washed several times with saturated $NaHCO_3$ and NaCl solution, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The residue was chromatographed on silica gel (cyclohexane/AcOEt : 70/30) to afford 2.50 g of the desired product **9**.

- **Trifluoro-methanesulfonic acid 2-oxo-*2H*-chromen-7-yl ester 9**



9

Yield : 92%
Mp = 94°C

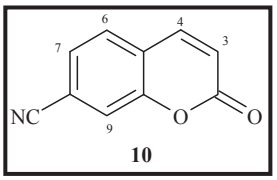
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.72 (1H, d, J=9.8 Hz, H_4), 7.58 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 7.28 (1H, d, J=2.5 Hz, H_9), 7.22 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.3 Hz, H_7), 6.49 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 159.38, 154.75, 151.00, 142.21, 129.57, 118.93, 118.81 (q, J=319.36 Hz), 117.96, 117.90, 110.71.
HR ESIMS: Calculated for $C_{10}H_5O_5F_3SH^+$=294.9883, found=294.9892.

IV-2-1-2 Procedure for the cyanation

Trifluoro-methanesulfonic acid 2-oxo-*2H*-chromen-7-yl ester **9** (1 g, 3.40 mmol, 1 equiv.), $Zn(CN)_2$ (598.8 mg, 5.10 mmol, 1.5 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (393.0 mg, 0.34 mmol, 0.10 equiv.) were dissolved in DMF (20 mL) at room temperature in a sealed tube. After 20 min, the reaction mixture was heated to 150°C for one night. The reaction mixture was cooled to room temperature and ethyl acetate (35 mL) was added. The reaction mixture was then washed with water and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated. The

solid was washed with a solution of cyclohexane/AcOEt (90/10) and the remaining solid was filtrated off to give the expected compound **10** (545.1 mg).

- **2-Oxo-*2H*-chromene-7-carbonitrile 10**



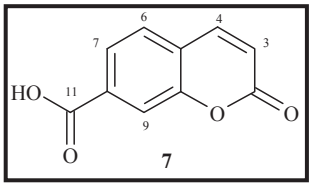
Yield : 94%
Mp = 234°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.73 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.60 (2H, m, H_6 and H_9), 7.55 (1H, dd, J_1=1.3 Hz, J_2=8.1 Hz, H_7), 6.57 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 159.08, 153.70, 142.01, 128.91, 127.71, 122.43, 120.85, 119.89, 117.47, 115.05.
HR ESIMS: Calculated for $C_{10}H_5O_2NNa^+$=194.0212, found=194.0219.

IV-2-1-3 Procedure for the hydrolysis

2-Oxo-*2H*-chromene-7-carbonitrile **10** (770 mg, 4.50 mmol, 1 equiv.) was added to a solution of 70% H_2SO_4 (14 mL) and the mixture was refluxed under stirring overnight. Distilled water was added to the mixture, the solid formed was filtered and treated with 3N NaOH solution. The remaining solids were filtered off and the filtrate was acidified with 8M H_2SO_4 solution. The precipitated solid was filtered and washed with water to give the expected compound **7** (815 mg).

- **2-Oxo-*2H*-chromene-7-carboxylic acid 7**



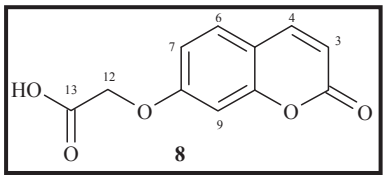
Yield : 95%
Mp = 266°C

NMR ^{1}H (400 MHz, DMSO) δppm : 13.44 (1H, s, OH), 8.13 (1H, d, J=9.8 Hz, H_4), 7.89-7.81 (3H, m, H_6, H_7 and H_9), 6.62 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3).
NMR ^{13}C (400 MHz, DMSO) δppm : 166.17, 159.61, 153.18, 143.42, 133.56, 128.84, 124.87, 122.15, 118.32, 116.85.
HR ESIMS: Calculated for $C_{10}H_6O_4Na^+$=213.0158, found=213.0160.

IV-2-2 Synthesis of the coumarin acid **8**

(2-Oxo-2H-chromen-7-yloxy)-acetic acid methyl ester **4i** (1.30 g, 5.47 mmol, 1 equiv.) in 3N NaOH (7.5 mL) containing CH_2Cl_2-MeOH (2 :1) was stirred at room temperature for two days. Then the mixture was quenched with HCl (1N) and a precipitate was formed. The solid was filtrated and dryed to afford the desired acid **8** (1.20 g).

- **(2-Oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)-acetic acid 8**



Yield : 100%
Mp = 218°C

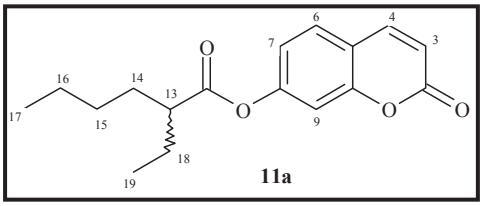
NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) δppm : 7.89 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.56 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6,), 6.98 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.91 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 6.27 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.80 (2H, s, H_{12}).
NMR ^{13}C (400 MHz, MeOD) δppm : 171.78, 163.21, 162.82, 156.93, 145.64, 130.53, 114.62, 114.05, 113.88, 102.74, 66.08.
HR ESIMS: Calculated for $C_{11}H_8O_5Na^+$=243.0264, found=243.0266.

IV-3 General procedure for esterification

IV-3-1 General procedure for esterification of 7-hydroxycoumarin (**11a-11m**)

Under a nitrogen atmosphere, the corresponding acid (1.85 mmol, 1.2 equiv.) was charged and dissolved in dichloromethane (5 mL). To this solution were added dicyclohexyl carbodiimide (DCC, 412.7 mg, 2.0 mmol, 1.3 equiv.) and 4-*N,N'*-dimethylaminopyridine (DMAP, 244.2 mg, 2.0 mmol, 1.3 equiv.). Then, 7-hydroxycoumarine (250 mg, 1.54 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for a day at room temperature. The precipitated dicyclohexyl urea was filtered off and the solvent was removed under reduced vacuum. The residue was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (70/30).

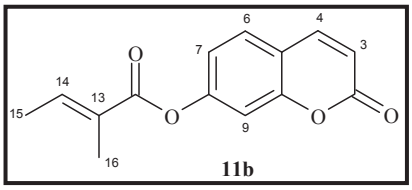
- **2-Ethyl-hexanoic acid 2-oxo-2H-chromen-7-yl ester 11a**



Yield : 86%
Mp = liquid at r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.68 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.48 (1H, d, J=8.5 Hz, $H_{6,}$), 7.09 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 7.03 (1H, dd, J_1=2.1 Hz, J_2=8.3 Hz, H_7), 6.39 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 2.60-2.49 (1H, m, H_{13}), 1.84-1.57 (4H, m), 1.42-1.35 (4H, m), 1.02 (3H, t, J=7.5 Hz, H_{19}), 0.93 (3H, m, H_{17}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 174.38, 160.48, 154.87, 153.57, 143.00, 128.64, 118.65, 116.71, 116.15, 110.61, 47.49, 31.78, 29.76, 25.57, 22.74, 14.10, 11.98.
HR ESIMS: Calculated for $C_{17}H_{20}O_4Na^+$=311.1254, found= 311.1268.

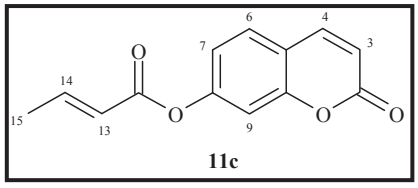
- **2-Methyl-but-2-enoic acid 2-oxo-2H-chromen-7-yl ester 11b**



Yield : 83%
Mp = 106°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.69 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.48 (1H, d, J=8.6 Hz, $H_{6,}$), 7.18-7.12 (2H, m, H_9 and H_{14}), 7.06 (1H, dd, J_1=2.0 Hz, J_2=8.3 Hz, H_7), 6.38 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 1.95 (3H, s, H_{16}), 1.90 (3H, d, J=7.0 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.89, 160.59, 154.86, 153.98, 143.06, 140.85, 128.59, 127.80, 118.77, 116.58, 116.01, 110.70, 14.89, 12.27.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{12}O_4^{+\cdot}$=244.0736, found=244.0733.

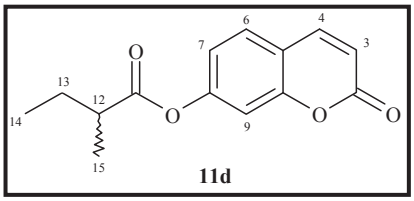
- **But-2-enoic acid 2-oxo-*2H*-7-yl ester 11c**



Yield : 54%
Mp = 112°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.69 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.48 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 7.28-7.12 (2H, m, H_9 and H_{14}), 7.07 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.38 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 6.05 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=15.6 Hz, H_{13}), 1.99 (3H, dd, J_1=1.0 Hz, J_2=6.3 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 164.16, 160.54, 154.83, 153.49, 148.49, 143.03, 128.62, 121.54, 118.63, 116.67, 116.09, 110.61, 18.47.
HR ESIMS: Calculated for $C_{13}H_{10}O_4^{+\cdot}$=230.0577, found=230.0577.

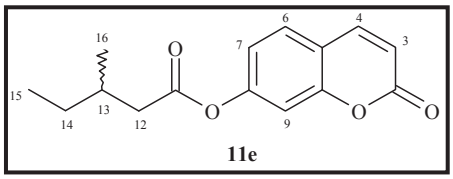
- **2-Methyl-butyric acid 2-oxo-*2H*-chromen-7-yl ester 11d**



Yield : 82%
Mp = 76°C

NMR ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 7.68 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.48 (1H, d, J=8.3 Hz, H_6), 7.09 (1H, d, J=2.0 Hz, H_9), 7.03 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.3 Hz, H_7), 6.39 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 2.71-2.61 (1H, m, H_{12}), 1.90-1.78 (1H, m, H_{13}), 1.71-1.57 (1H, m, H_{13}), 1.30 (3H, d, J=7.0 Hz, H_{15}), 1.03 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 174.65, 160.49, 154.87, 153.59, 143.00, 128.64, 118.57, 116.69, 116.15, 110.55, 41.26, 26.84, 16.56, 11.71.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{14}O_4^{+\cdot}$=246.0892, found=246.0892.

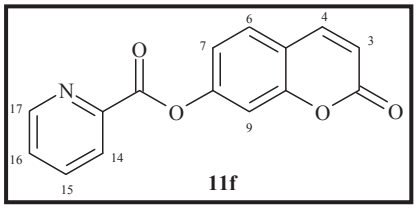
- **3-Methyl-pentanoic acid 2-oxo-*2H*-chromen-7-yl ester 11e**



Yield : 85%
Mp = 48°C

NMR ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 7.68 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.48 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 7.10 (1H, d, J=2.0 Hz, H_9), 7.04 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.39 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 2.59 (1H, dd, J_1=6.0 Hz, J_2=15.1 Hz, H_{12}), 2.38 (1H, dd, J_1=8.0 Hz, J_2=15.2 Hz, H_{12}), 2.08-1.98 (1H, m, H_{13}), 1.51-1.41 (1H, m, H_{14}), 1.40-1.28 (1H, m, H_{14}),1.05 (3H, d, J=6.8 Hz, H_{16}), 0.95 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 171.25, 160.48, 154.86, 153.43, 142.99, 128.65, 118.60, 116.73, 116.18, 110.61, 41.47, 32.19, 29.48, 19.45, 11.44.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{16}O_4^{+\cdot}$=260.1049, found=260.1050.

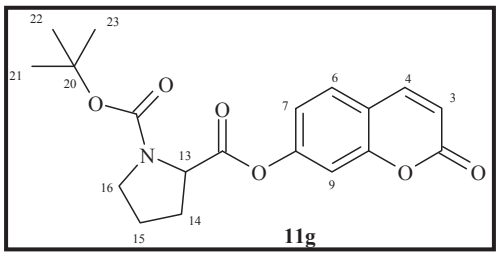
- **Pyridine-2-carboxylic acid 2-oxo-2*H*-chromen-7-yl ester 11f**



Yield : 80%
Mp = 170°C

NMR ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$) δppm : 8.87 (1H, d, J=4.0 Hz, H_{17}), 8.29 (1H, d, J=7.8 Hz, H_{14}), 7.96 (1H, td, J_1=1.8 Hz, J_2=7.8 Hz, H_{15}), 7.72 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.62-7.58 (1H, m, H_{16}), 7.56 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 7.30 (1H, d, J=2.1 Hz, H_9), 7.23 (1H, dd, J_1=2.2 Hz, J_2=8.3 Hz, H_7), 6.43 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3).
NMR ^{13}C (400 MHz, CDCl$_3$) δppm :163.45, 160.45, 154.89, 153.53, 150.41, 146.93, 142.99, 137.52, 128.85, 127.98, 126.30, 118.71, 117.17, 116.48, 110.90.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_9NO_4Na^{+}$=290.0424, found=290.0419.

- **Pyrrolidine-1, 2-dicarboxylic acid 1-*tert*-butyl ester 2-(2-oxo-2*H*-chromen-7-yl) ester 11g**

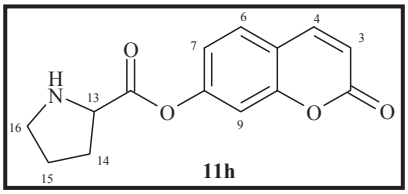


11g

Yield : 91%
Mp = 155°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.71-7.66 (1H, m, H_4), 7.51-7.46 (1H, m, H_6), 7.14-7.03 (2H, m, H_9 and H_7), 6.40 (1H, t, J=9.3 Hz, H_3), 4.54-4.45 (1H, dm, J=21.2 Hz, H_{13}), 3.63-3.45 (2H, m, H_{16}), 2.44-2.33 (1H, m, H_{14}), 2.21-2.16 (1H, m, H_{14}), 2.05-1.94 (2H, m, H_{15}), 1.47 (9H, d, J=8.6 Hz, H_{21}, H_{22}, H_{23}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 171.29, 160.53, 154.86, 154.64, 153.53, 153.19, 143.01, 128.82, 118.55, 116.93, 116.38, 110.46, 80.61, 59.29, 46.79, 34.16, 28.57, 25.75, 23.90.
HR ESIMS: Calculated for $C_{19}H_{21}NO_6Na^+$=382.1261, found =382.1257.

- **Pyrrolidine-2-carboxylic acid 2-oxo-2*H*-chromen-7-yl ester 11h**

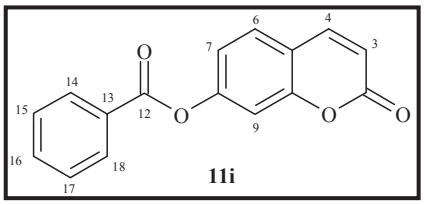


11h

Yield : 100%
Mp = 112°C

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) δppm : 7.98 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.73 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 7.33 (1H, d, J=2.0 Hz, H_9), 7.24 (1H, dd, J_1=2.2 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.46 (1H, d, J=9.8 Hz, H_3), 4.77 (1H, m, H_{13}), 3.51-3.43 (2H, m, H_{16}), 2.66-2.57 (1H, m, H_{14}), 2.47-2.37 (1H, m, H_{14}), 2.20-2.15 (2H, m, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, MeOD) δppm : 168.59, 162.01, 155.86, 153.70, 144.84, 130.57, 119.17, 119.00, 117.15, 111.05, 60.84, 47.45, 29.39, 24.68.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{13}NO_4H^+$=260.0917, found=260.0920.

- **Benzoic acid 2-oxo-*2H*-chromen-7-yl ester 11i**

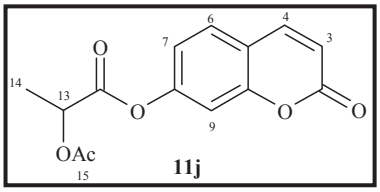


11i

Yield : 81%
Mp = 168°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 8.21 (2H, dm, J=7.0 Hz, H_{ar}), 7.73 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.70-7.65 (1H, m, H_{ar}), 7.56-7.51 (3H, m, H_6 and H_{ar}), 7.26 (1H, m, H_9), 7.19 (1H, dd, J_1=2.2 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.42 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 164.66, 160.51, 154.93, 153.66, 143.02, 134.24, 130.47, 128.91, 128.88, 128.76, 118.73, 116.90, 116.29, 110.79.
HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{10}O_4Na^+$=289.0471, found=289.0464.

- **2-Acetoxy-propionic acid 2-oxo-2*H*-chromen-7-yl ester 11j**



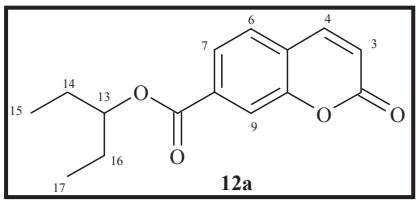
Yield : 53%
Mp = 86°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.69 (1H, d, J=9.7 Hz, H_4), 7.49 (1H, d, J=8.5 Hz, H_6), 7.13 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 7.07 (1H, dd, J_1=2.1 Hz, J_2=8.5 Hz, H_7), 6.41 (1H, d, J=9.7 Hz, H_3), 5.25 (1H, q, J=7.2 Hz, H_{13}), 2.18 (3H, s, H_{15}), 1.66 (3H, d, J=7.2 Hz, H_{14}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 170.63, 169.10, 160.31, 154.81, 152.81, 142.88, 128.80, 118.24, 117.09, 116.47, 110.34, 68.74, 20.71, 16.90.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{12}O_6Na^+$=299.0526, found=299.0526.

IV-3-2 General procedure for esterification of coumarin acid **7** (**12a-12b**)

The coumarin acid **7** (250 mg, 1.32 mmol, 1 equiv.) was charged and dissolved in dichloromethane (5 mL). To this solution were added dicyclohexyl carbodiimide (DCC, 354.9 mg, 1.72 mmol, 1.3 equiv.) and 4-*N,N'*-dimethylaminopyridine (DMAP, 210 mg, 1.72 mmol, 1.3 equiv.). Then, the corresponding alcohol (1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for two days at room temperature. The precipitated dicyclohexyl urea was filtered off and the solvent was removed under reduced vacuum. The residue was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (70/30).

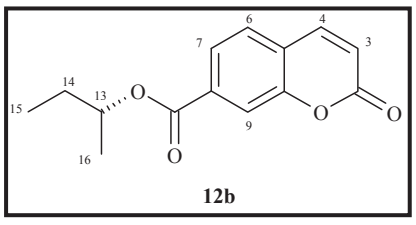
- **2-Oxo-2*H*-chromene-7-carboxylic acid 1-ethyl-propyl ester 12a**



Yield : 60%
Mp = 69°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.99 (1H, s, H_9), 7.95 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=8.1 Hz, H_7), 7.74 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.55 (1H, d, J=7.8 Hz, H_6), 6.52 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 5.07-5.00 (1H, m, H_{13}), 1.77-1.69 (4H, m, H_{14} and H_{15}), 0.96 (6H, t, J=7.3 Hz, H_{16} and H_{17}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.08, 160.25, 153.84, 142.63, 134.00, 127.97, 125.32, 122.12, 118.86, 118.20, 78.55, 26.61, 9.75.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{16}O_4Na^+$=283.0941, found=283.0932.

- **2-Oxo-2*H*-chromene-7-carboxylic acid *sec*-butyl ester 12b**



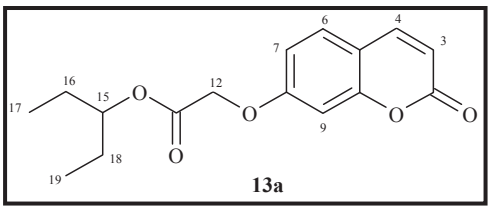
Yield : 66%
Mp = 74°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.97 (1H, s, H_9), 7.93 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=7.8 Hz, H_7), 7.73 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.54 (1H, d, J=8.0 Hz, H_6), 6.51 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 5.16-5.07 (1H, m, H_{13}), 1.81-1.65 (2H, m, H_{14}), 1.35 (3H, d, J=6.3 Hz, H_{16}), 0.98 (3H, t, J=7.5 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 164.87, 160.24, 153.81, 142.62, 134.06, 127.94, 125.27, 122.10, 118.85, 118.18, 74.05, 29.00, 19.62, 9.82.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{14}O_4Na^+$=269.0784, found=269.0773.

IV-3-3 General procedure for esterification of coumarin acid **8** (**13a-13c**)

The coumarin acid **8** (300 mg, 1.36 mmol, 1 equiv.) was charged and dissolved in dichloromethane (6 mL). To this solution were added dicyclohexyl carbodiimide (DCC, 364.8 mg, 1.77 mmol, 1.3 equiv.) and 4-*N,N'*-dimethylaminopyridine (DMAP, 216.1 mg, 1.77 mmol, 1.3 equiv.). Then, the corresponding alcohol (1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for two days at room temperature. The precipitated dicyclohexyl urea was filtered off and the solvent was removed under reduced vacuum. The residue was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (70/30).

- **(2-Oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)-acetic acid 1-ethyl-propyl ester 13a**

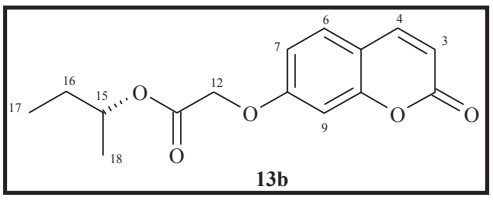


13a

Yield : 60%
Mp = 64°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.39 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.89 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.8 Hz, H_7), 6.78 (1H, d, J=2.5 Hz, H_9), 6.27 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.93-4.86 (1H, m, H_{15}), 4.69 (2H, s, H_{12}), 1.64-1.55 (4H, m, H_{16} and H_{18}), 0.88 (6H, d, J=7.3 Hz, H_{17} and H_{19}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 168.01, 161.11, 161.06, 155.84, 143.36, 129.09, 113.91, 113.44, 112.95, 101.89, 78.87, 65.54, 26.49, 9.69.
HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{18}O_5H^+$=291.1227, found=291.1230

- **(2-Oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)-acetic acid sec-butyl ester 13b**

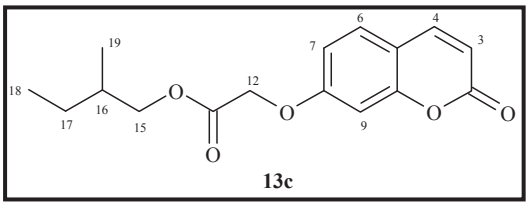


13b

Yield : 68%
Mp = 74°C

NMR ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.64 (1H, d, J=9.8 Hz, H_4), 7.39 (1H, d, J=8.9 Hz, H_6), 6.89 (1H, dd, J_1=2.6 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.77 (1H, d, J=2.7 Hz, H_9), 6.27 (1H, d, J=9.5 Hz, H_3), 5.30-4.95 (1H, m, H_{15}), 4.66 (2H, s, H_{12}), 1.66-1.53 (2H, m, H_{16}), 1.26 (3H, d, J=6.3 Hz, H_{18}), 0.89 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{17}).
NMR ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) δppm : 167.77, 161.11, 161.03, 155.81, 143.37, 129.08, 113.88, 113.42, 112.99, 101.84, 74.35, 65.62, 28.81, 19.52, 9.73.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{16}O_5Na^+$=299.0887, found=299.0880.

- **(2-Oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)-acetic acid 2-methyl-butyl ester 13c**



13c

Yield : 53%
Mp = 51°C

NMR ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.64 (1H, d, J=9.0 Hz, H_4), 7.40 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.89 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.7 Hz, H_7), 6.78 (1H, d, J=2.5 Hz, H_9), 6.28 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.70 (2H, s, H_{12}), 4.11-3.99 (2H, m, H_{15}), 1.79-1.68 (1H, m, H_{16}), 1.44-1.32 (1H, m, H_{17}), 1.23-1.10 (1H, m, H_{17}), 0.89 (6H, m, H_{18} and H_{19}).
NMR ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δppm : 168.22, 161.08, 160.96, 155.80, 143.36, 129.10, 113.92, 113.44, 112.96, 101.85, 70.35, 65.43, 34.19, 26.02, 16.41, 11.29.
HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{18}O_5H^+$=291.1227, found=291.1236.

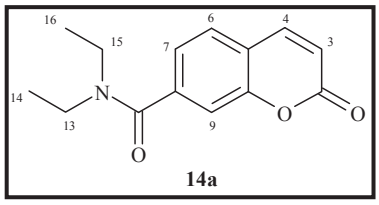
IV-4 General procedure for amidification

IV-4-1 General procedure for amidification of coumarin acid **7** (**14a-14g**)

A mixture of coumarin acid **7** (300 mg, 1.58 mmol, 1 equiv.) and HOBt (256.2 mg, 1.90 mmol, 1.2 equiv.) in THF (3 mL) was stirred at 5°C for 30 min and then DCC (391.2 mg, 1.90 mmol, 1.2 equiv.) was added. After being stirred for 1h, the reaction mixture was treated with the corresponding amine (2.05 mmol, 1.3 equiv.), and stirring was maintained at room temperature during 2 days. The mixture was evaporated to dryness to give a powder, which was suspended in AcOEt and filtered off. The organic phase was washed with 10% citric acid solution, saturated $NaHCO_3$ and distilled water, successively, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The residue was chromatographed on silica gel (cyclohexane/AcOEt) to afford the desired amide.

- **2-Oxo-2*H*-chromene-7-carboxylic acid diethylamide 14a**

Column: AcOEt/Cyclohexane (50/50)



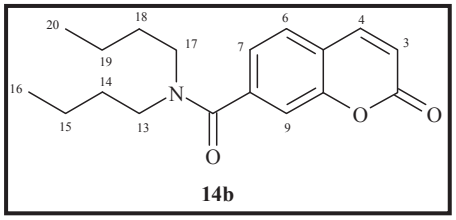
14a

Yield : 100%
Mp < 45°C

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.70 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.51 (1H, d, J=7.8 Hz, H_6), 7.31-7.26 (2H, m, H_7 and H_9), 6.46 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 3.56 (2H, m, H_{13}), 3.25 (2H, m, H_{15}), 1.26 (3H, m, H_{14}), 1.12 (3H, m, H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 169.37, 160.43, 153.89, 142.91, 140.65, 128.38, 122.69, 119.36, 117.64, 114.82, 43.44, 39.64, 14.36, 12.98.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{15}NO_3H^+$=246.1125, found=246.1121.

- **-Oxo-2*H*-chromene-7-carboxylic acid dibutylamide 14b**

Column: AcOEt/Cyclohexane (65/35)



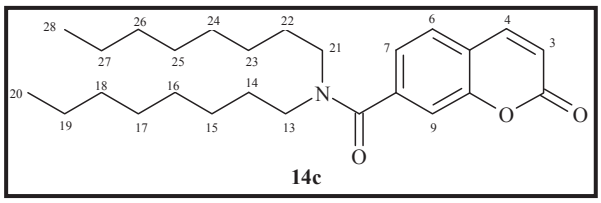
14b

Yield : 81%
Mp = 64°C

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.71 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.51 (1H, d, J=8.0 Hz, H_6), 7.30 (1H, s, H_9), 7.26 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=7.0 Hz, H_7), 6.46 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 3.49 (2H, t, J=6.8 Hz, H_{13}), 3.17 (2H, t, J=6.3 Hz, H_{17}), 1.66-1.40 (6H, m, H_{14}, H_{18} and H_{19}), 1.17-1.11 (2H, m, H_{15}), 0.98 (3H, t, J=6.8 Hz, H_{16}), 0.80 (3H, t, J=6.8 Hz, H_{20}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 169.64, 160.46, 153.92, 142.92, 140.97, 128.30, 122.90, 119.28, 117.63, 115.09, 48.94, 44.78, 30.96, 29.73, 20.43, 19.94, 14.05, 13.77.
HR ESIMS: Calculated for $C_{18}H_{23}NO_3H^+$=302.1751, found=302.1744.

- **2-Oxo-*2H*-chromene-7-carboxylic acid dioctylamide 14c**

Column: AcOEt/Cyclohexane (30/70)



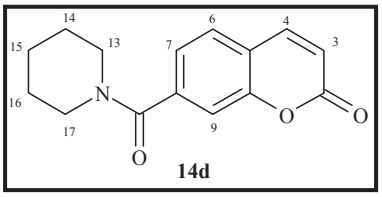
14c

Yield : 58%
Mp = 50°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.71 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.51 (1H, d, J=7.8 Hz, H_6), 7.29 (1H, s, H_9), 7.26 (1H, m, H_7), 6.46 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 3.48 (2H, t, J=7.3 Hz, H_{13}), 3.16 (2H, t, J=6.5 Hz, H_{21}), 1.72-1.58 (2H, m, H_{14}), 1.57-1.42 (2H, m, H_{22}), 1.40-1.15 (20H, m, H_{15}, H_{16}, H_{17}, H_{18}, H_{19}, H_{23}, H_{24}, H_{25}, H_{26} and H_{27}), 0.90-0.82 (6H, m, H_{20} and H_{28}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 169.61, 160.45, 153.92, 142.91, 140.98, 128.29, 122.89, 119.27, 117.62, 115.09, 49.15, 45.04, 31.96, 31.85, 29.53, 29.41, 29.19, 28.80, 27.62, 27.21, 26.68, 22.78, 22.71, 14.23.
HR ESIMS : Calculated for $C_{26}H_{39}NO_3H^+$=414.3003, found=414.3004.

- **7-(Piperidine-1-carbonyl)-chromen-2-one 14d**

Column: AcOEt/Cyclohexane (60/40)



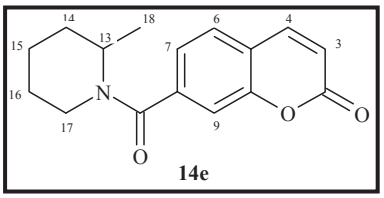
14d

Yield : 45%
Mp = 142°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.71 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.52 (1H, d, J=7.6 Hz, H_6), 7.32 (1H, d, J=1.2 Hz, H_9), 7.30 (1H, dd, J_1=1.3 Hz, J_2=7.8 Hz, H_7), 6.46 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 3.72 (2H, s, H_{13}), 3.32 (2H, s, H_{17}), 1.69-1.50 (6H, m, H_{14}, H_{15} and H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 168.29, 160.42, 153.89, 142.90, 140.06, 128.36, 123.14, 119.53, 117.70, 115.36, 48.84, 43.37, 26.66, 25.66, 24.60.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{15}NO_3H^+$=258.1125, found=258.1121.

- **7-(2-Methyl-piperidine-1-carbonyl)-chromen-2-one 14e**

Column: AcOEt/Cyclohexane (65/35)



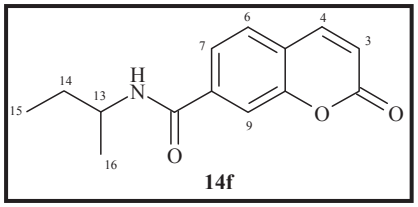
14e

Yield : 76%
Mp = 110°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.71 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.52 (1H, d, J=7.8 Hz, H_6), 7.31-7.26 (2H, m,H_7 and H_9), 6.46 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 3.01 (1H, s, H_{13}),1.69-1.41 (8H, m, H_{14}, H_{15}, H_{16} and H_{17}), 1.25 (3H, d, J=6.0 Hz, H_{18}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 168.45, 160.44, 153.96, 142.92, 140.60, 128.42, 122.78, 119.39, 117.60, 114.94, 49.35, 33.98, 25.71, 25.03, 18.93, 16.29.
HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{17}NO_3H^+$=272.1281, found=272.1284.

- **2-Oxo-*2H*-chromene-7-carboxylic acid *sec*-butylamide 14f**

Column: AcOEt/Cyclohexane (35/65)

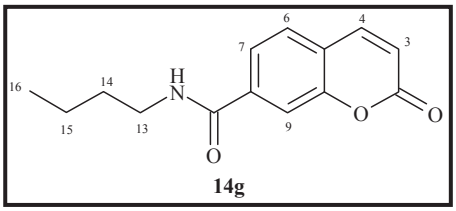


Yield : 58%
Mp = 164°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.72 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.70-7.68 (2H, m, H_7 and H_9), 7.54 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.48 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3),6.08 (1H, d, J=6.0 Hz, H_{12}), 4.18-4.10 (1H, m, H_{13}), 1.64-1.57 (2H, m, H_{14}), 1.26 (3H, d, J=6.5 Hz, H_{16}), 0.98 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{15}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.31, 160.36, 153.98, 142.75, 138.40, 128.29, 123.21, 120.94, 118.25, 115.41, 47.71, 29.83, 20.54, 10.58.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{15}NO_3H^+$=246.1125, found=246.1128.

- **2-Oxo-*2H*-chromene-7-carboxylic acid butylamide 14g**

Column: AcOEt/Cyclohexane (50/50)



Yield : 37%
Mp = 179°C

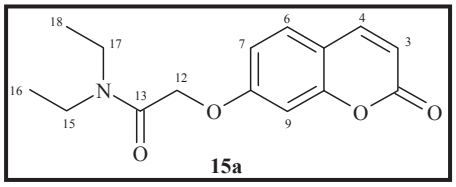
NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.74-7.69 (3H, m, H_4, H_7 and H_9), 7.54 (1H, d, J=7.8 Hz, H_6), 6.49 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 6.32 (1H, s, H_{12}), 3.51-3.45 (2H, m, H_{13}), 1.67-1.59 (2H, m, H_{14}), 1.48-1.38 (2H, m, H_{15}), 0.97 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{16}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.90, 160.37, 153.98, 142.75, 138.18, 128.32, 123.23, 120.99, 118.28, 115.40, 40.24, 31.75, 20.30, 13.91.
HR ESIMS: Calculated for $C_{14}H_{15}NO_3H^+$=246.1125, found=246.1124.

IV-4-2 General procedure for amidification of coumarin acid **8** (**15a-15g**)

A mixture of coumarin acid **8** (300 mg, 1.36 mmol, 1 equiv.) and HOBt (219.8 mg, 1.63 mmol, 1.2 equiv.) in THF (6 mL) was stirred at 5°C for 30 min and then DCC (336.3 mg, 1.63 mmol, 1.2 equiv.) was added. After being stirred for 1h, the reaction mixture was treated with the corresponding amine (1.77 mmol, 1.3 equiv.), and stirring was maintained at room temperature during 2 days. The mixture was evaporated to dryness to give a powder, which was suspended in AcOEt and filtered off. The organic phase was washed with 10% citric acid solution, saturated $NaHCO_3$ and distilled water, successively, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The residue was chromatographed on silica gel (cyclohexane/AcOEt) to afford the desired amide.

- ***N,N*-Diethyl-2-(2-oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)-acetamide 15a**

Column: AcOEt/Cyclohexane (60/40)

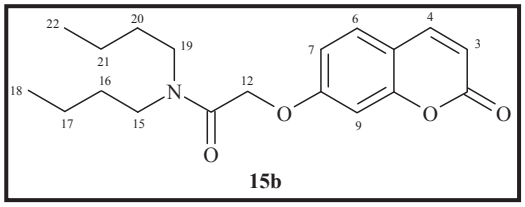


Yield : 69%
Mp = 90°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.38 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.93 (1H, dd, J_1=2.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.80 (1H, d, J=2.5 Hz, H_9), 6.26 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.76 (2H, s, H_{12}), 3.45-3.34 (4H, m, H_{15} et H_{17}), 1.25 (3H, t, J=7.1 Hz, H_{16}), 1.15 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{18}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.89, 161.43, 161.19, 155.83, 143.44, 129.07, 113.70, 113.30, 113.04, 102.00, 67.18, 41.57, 40.63, 14.52, 12.97.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{17}NO_4H^+$=276.1230, found=276.1235.

- **N,N-Dibutyl-2-(2-oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)-acetamide 15b**

Column: AcOEt/Cyclohexane (70/30)



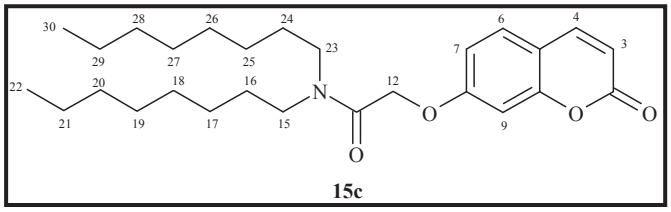
15b

Yield : 96%
Mp = 62°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.38 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.93 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.78 (1H, d, J=2.2 Hz, H_9), 6.26 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.76 (2H, s, H_{12}), 3.34 (2H, t, J=7.6 Hz, H_{15}), 3.26 (2H, t, J=7.8 Hz, H_{19}), 1.64-1.48 (4H, m, H_{16} and H_{20}), 1.42-1.25 (4H, m, H_{17} and H_{21}), 0.97 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{18}), 0.91 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{22}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 166.18, 161.47, 161.22, 155.82, 143.45, 129.05, 113.64, 113.26, 113.06, 101.94, 66.98, 47.15, 46.00, 31.26, 29.71, 20.32, 20.29, 13.95.
HR ESIMS: Calculated for $C_{19}H_{25}NO_4H^+$=332.1856, found=332.1850.

- **N,N-Dioctyl-2-(2-oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)-acetamide 15c**

Column: AcOEt/Cyclohexane (30/70)



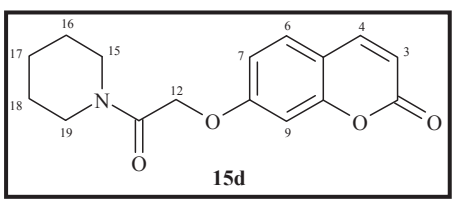
15c

Yield : 94%
Mp = 56°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.38 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.93 (1H, dd, J_1=2.2 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.78 (1H, d, J=2.2 Hz, H_9), 6.26 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.76 (2H, s, H_{12}), 3.33 (2H, t, J=7.6 Hz, H_{15}), 3.26 (2H, t, J=7.8 Hz, H_{23}), 1.60-1.48 (4H, m, H_{16} and H_{24}), 1.35-1.20 (20H, m, H_{17}, H_{18}, H_{19}, H_{20}, H_{21}, H_{25}, H_{26}, H_{27}, H_{28} and H_{29}), 0.90-0.82 (6H, m, H_{22} and H_{30}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 166.18, 161.47, 161.18, 155.82, 143.41, 129.03, 113.66, 113.27, 113.02, 102.00, 67.06, 47.40, 46.25, 31.92, 31.87, 29.45, 29.42, 29.35, 29.19, 27.62, 27.12, 27.08, 22.76, 22.74, 14.21.
HR ESIMS : Calculated for $C_{27}H_{41}NO_4H^+$=444.3108, found=444.3106.

- **7-(2-Oxo-2-piperidin-1-yl-ethoxy)-chromen-2-one 15d**

Column: AcOEt/Cyclohexane (60/40)



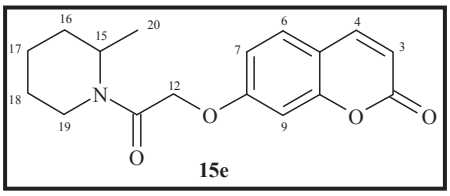
15d

Yield : 45%
Mp = 136°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.63 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.38 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.93 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.81 (1H, d, J=2.2 Hz, H_9), 6.25 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.76 (2H, s, H_{12}), 3.56 (2H, t, J=5.3 Hz, H_{15}), 3.46 (2H, t, J=5.3 Hz, H_{19}), 1.65-1.55 (6H, m, H_{16}, H_{17} and H_{18}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.03, 161.34, 161.14, 155.80, 143.40, 129.08, 113.70, 113.32, 112.82, 102.13, 67.41, 46.35, 43.39, 26.63, 25.61, 24.50.
HR ESIMS: Calculated for $C_{16}H_{17}NO_4H^+$=288.1230, found=288.1228.

- **7-[2-(2-Methyl-piperidin-1-yl)-2-oxo-ethoxy]-chromen-2-one 15e**

Column: AcOEt/Cyclohexane (70/30)

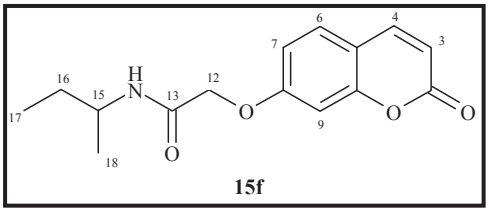


Yield : 79%
Mp = liquida t r.t.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.56 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.31 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.86 (1H, dd, J_1=2.3 Hz, J_2=8.6 Hz, H_7), 6.75 (1H, d, J=2.3 Hz, H_9), 6.19 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.70 (2H, m, H_{12}), 4.78-2.61 (3H, m, H_{15} and H_{19}), 1.70-1.41 (6H, m, H_{16}, H_{17} and H_{18}), 1,23 (3H, m, H_{20}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 165.14, 161.39, 161.16, 155.80, 143.42, 129.07, 113.67, 113.28, 112.86, 102.10, 67.56, 44.61, 40.53, 36.94, 29.85, 18.79, 15.68.
HR ESIMS: Calculated for $C_{17}H_{19}NO_4H^+$=302.1387, found=302.1383.

- **N-*sec*-Butyl-2-(2-oxo-*2H*-chromen-7-yloxy)-acetamide 15f**

Column: AcOEt/Cyclohexane (35/65)

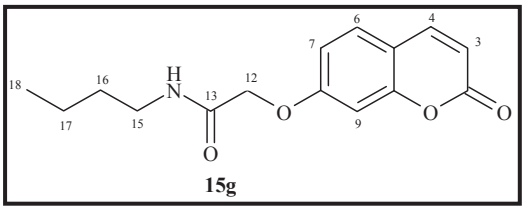


Yield : 68%
Mp = 94°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.65 (1H, d, J=9.6 Hz, H_4), 7.43 (1H, d, J=8.6 Hz, H_6), 6.90-6.86 (2H, m, H_7 and H_9), 6.30 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 6.21 (1H, m, H_{14}) 4.53 (2H, s, H_{12}), 4.06-3.98 (1H, m, H_{15}), 1.56-1.48 (2H, m, H_{16}), 1.18 (3H, d, J=6.8 Hz, H_{18}), 0.91 (3H, t, J=7.3 Hz, H_{17}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 166.35, 160.85, 160.17, 155.83, 143.17, 129.32, 114.36, 113.85, 112.14, 102.80, 67.75, 46.69, 29.73, 20.51, 10.47.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{17}NO_4H^+$=276.1230, found=276.1231.

- ***N*-Butyl-2-(2-oxo-*2H*-chromen-7-yloxy)-acetamide 15g**

Column: AcOEt/Cyclohexane (60/40)



Yield : 42%
Mp = 133°C

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.65 (1H, d, J=9.3 Hz, H_4), 7.43 (1H, d, J=8.3 Hz, H_6), 6.90-6.86 (2H, m, H_7 and H_9), 6.48 (1H, s, H_{14}) 6.30 (1H, d, J=9.6 Hz, H_3), 4.54 (2H, s, H_{12}), 3.40-3.34 (2H, m, H_{15}), 1.59-1.50 (2H, m, H_{16}), 1.40-1.31 (2H, m, H_{17}), 0.93 (3H, t, J=7.6 Hz, H_{18}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm :166.95, 160.83, 160.14, 155.83, 143.16, 129.34, 114.37, 113.86, 112.09, 102.77, 67.71, 39.06, 31.73, 20.17, 13.84.
HR ESIMS: Calculated for $C_{15}H_{17}NO_4H^+$=276.1230, found=276.1232.

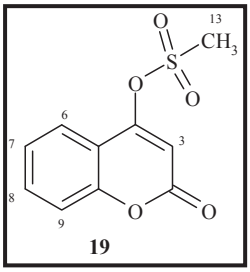
IV-4-3 General procedure for amidification on the position 4

Procedure for mesylation :

4-hydroxycoumarin **2** (500 g, 3.08 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (3.5 mL) under argon. Then the mixture was cooled at 0°C and anhydrous

pyridine (1.50 mL, 18.5 mmol, 6 equiv.) was added. Then, methanesulfonic chloride (290 µL, 3.70 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise over 5 min to the stirred, ice cold solution. After the addition, the reaction was stirred at room temperature during one night. The reaction mixture was diluted with dichloromethane and then washed several times with distilled water, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The residue was washed with diethylether and the desired product **19** was precipitated and filtered (608 mg).

- **Methanesulfonic acid 2-oxo-*2H*-chromen-4-yl ester 19**



NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 7.74 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=8.0 Hz, H_9), 7.64 (1H, td, J_1=1.5 Hz, J_2=8.6 Hz, H_8), 7.40-7.33 (2H, m, H_6 and H_7), 6.54 (1H, s, H_3), 3.39 (3H, s, H_{13}).
NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δppm : 160.66, 157.37, 153.75, 133.69, 124.87, 123.09, 117.34, 114.84, 103.71, 39.34.
HR ESIMS: Calculated for $C_{10}H_8O_5SNa^+$=262.9985, found=262.9983.

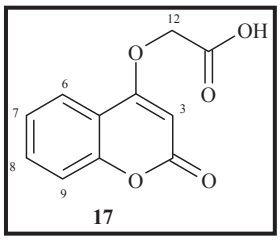
Yield : 82%
Mp = 114°C

*Procedure for the synthesis of the coumarin acid **17** :*

A solution of 4-hydroxycoumarin **2** (750 mg, 4.63 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (2.43 g, 9.25 mmol, 2 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (15 mL) was stirred at room temperature under anhydrous conditions. Methyl glycolate (704 µL, 9.25 mmol, 2 equiv.) was added. Then, diethylazodicarboxylate (DEAD, 1.6 mL, 10.19 mmol, 2.2 equiv.) was introduced slowly at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for one day. The solution was concentrated under reduced pressure, then chromatographied on silica gel (cyclohexane/AcOEt : 50/50). The expect compound **5g** was not very pure. But, the synthesis was pursued.

The ether **5g** (1 equiv.) in 3N NaOH containing CH_2Cl_2-MeOH (2 :1) was stirred at room temperature for two days. Then the mixture was quenched with HCl (1N) and stirred during one night. A precipitate was formed and filtrated to afford quantitatively the desired pure acid **17**.

- **(2-Oxo-*2H*-chromen-4-yloxy)-acetic acid 17**



NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) δppm : 7.98 (1H, dd, J_1=1.5 Hz, J_2=7.8 Hz, H_9), 7.66 (1H, td, J_1=1.8 Hz, J_2=8.6 Hz, H_8), 7.40-7.35 (2H, m, H_6 and H_7), 5.77 (1H, s, H_3), 4.96 (2H, s, H_{12}).
NMR ^{13}C (400 MHz, MeOD) δppm : 170.12, 166.94, 164.91, 154.60, 134.07, 125.53, 124.46, 117.58, 116.69, 91.83, 66.46.
HR ESIMS: Calculated for $C_{11}H_8O_5Na^+$=243.0264, found=243.0269.

Yield : 100%
Mp = 221°C

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ce doctorat, réalisé en collaboration avec la société Mérial, était de synthétiser des molécules actives à visées préventives et thérapeutiques pour des animaux. Deux sujets distincts ont été abordés.

Dans le premier chapitre, le but recherché était la restauration de l'activité anti-coccidienne de la monensine par modification chimique de cet ionophore naturel. Quarante-trois composés originaux, issus d'une méthodologie de synthèse à deux ou trois étapes, ont été préparés par hémi-synthèse à partir de la monensine mettant en jeu des réactions simples d'amidation, d'estérification, d'éthérification, d'oxydation et de fluoration. La modification chimique de la monensine engendre souvent de nombreux sous-produits et nécessite plusieurs purifications sur colonne. Quinze molécules ont été testées *in vitro* et trois d'entre elles ont montré une activité très importante vis-à-vis du parasite *Eimeria tenella*. D'après l'analyse des résultats, la présence de nombreuses fonctions oxygénées (hydroxyles, carbonyles, éthers) est un facteur primordial et non négligeable pour l'efficacité d'un composé. Cette dernière repose sur la capacité du récepteur à piéger le sodium ou le potassium, cation indispensable au développement des oocystes. Ce sujet ayant été arrêté en cours de thèse, nous n'avons malheureusement pas pu exploiter au maximum les derniers résultats biologiques qui paraissaient pourtant très encourageants. Les trois molécules montrant une activité anticoccidienne meilleure que la monensine devraient être testées à nouveau en utilisant un mode de comptage plus précis, la PCR (Polymerase Chain Reaction). Des perspectives nouvelles peuvent d'ores et déjà être envisagées, notamment en développant la chimie de la monensine oxodioxane **6g** par éthérification et estérification. La monensine oxolactone **16** semble être également une bonne piste de recherche. De nombreuses réactions chimiques peuvent être envisagées sur ce substrat. Par ailleurs, nous avons centré notre recherche autour de la monensine, le polyéther ionophore le plus utilisé dans l'alimentation animale. Il est toutefois envisageable d'étendre l'étude à d'autres ionophores présentant eux-aussi une activité anticoccidienne telle que la salynomycine (Schéma 1). Par la présence de fonctions identiques à celle de la monensine (carboxylate, hydroxyle) mais aussi par la présence d'une double liaison, de nouveaux types de réactions peuvent être envisagés tels que des additions nucléophiles ou électrophiles, des époxydations suivies de l'ouverture de l'époxyde… Tout ceci pourrait faire l'objet d'un nouveau sujet de thèse.

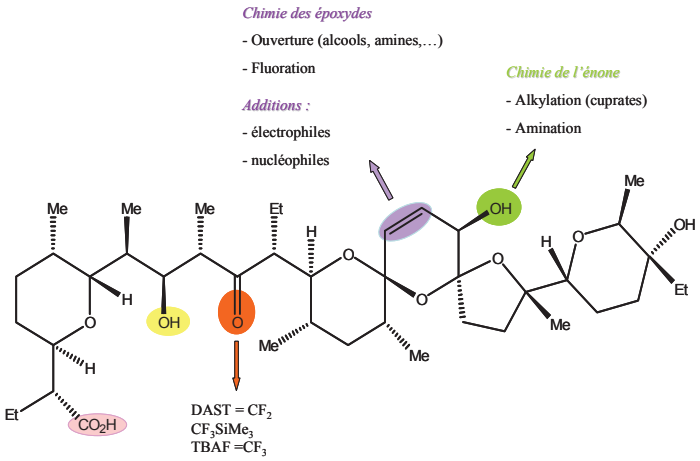
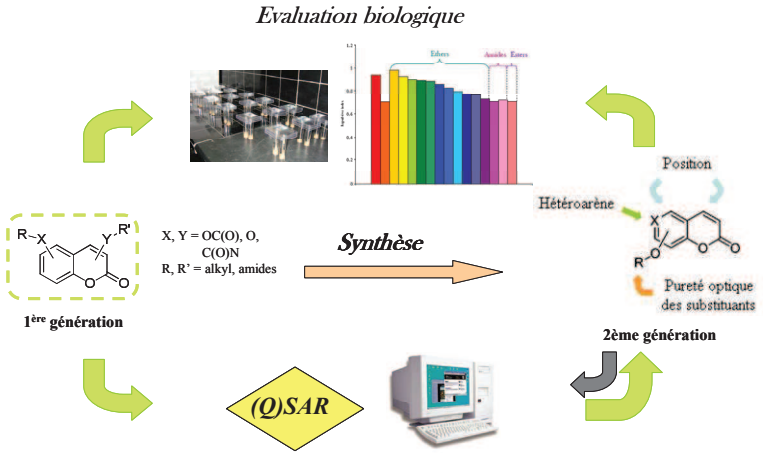


Schéma 1 : Modifications envisageables sur la salynomycine

Dans le second chapitre, nous nous sommes concentrés sur la synthèse de nouveaux répulsifs présentant un large spectre d'activité. Après avoir fait une étude bibliographique approfondie, nos recherches se sont orientées vers la coumarine. Environ soixante-dix molécules ont été synthétisées par modifications fonctionnelles des 4-, 6- et 7-hydroxycoumarines et de la coumarine. La grande majorité a été testée en présence de drosophiles grâce à un test que nous avons développé au laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE) de Lyon. De ces analyses se dégagent six composés présentant une activité répulsive équivalente à celle du DEET, répulsif de référence, le plus utilisé dans le monde. Ce dernier présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients : il dissout certains plastiques et peut causer, à forte concentration, des allergies ou des irritations. De façon remarquable, les éthers de coumarine représentent une famille très prometteuse, notamment ceux à cinq carbones comportant une ramification en alpha. Les amides tertiaires à longues chaînes ne sont également pas à exclure. La poursuite du travail consisterait à diversifier cette famille de composés éthérés en faisant varier la longueur de chaîne à dix ou douze carbones et ainsi que la nature des ramifications permettant ou non de mettre en relation l'activité des molécules avec leur tension de vapeur, leur lipophilie ou l'effet de la gêne stérique.

Une collaboration avec le docteur Nathalie Geneste (Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'environnement) concernant l'étude de la relation structure-activité des molécules nouvellement synthétisées est en cours et doit contribuer à déterminer des structures potentiellement les plus répulsives. Cette analyse s'appuie sur la corrélation de descripteurs structuraux des composés (hydrophobie, propriétés électroniques, effets stériques) avec l'activité répulsive observée (indice de répulsion). Ces études préliminaires (Q)SAR 2D et3D ont pour objectif de nous aider à ajuster les modifications chimiques sur le noyau aromatique. Ainsi, de nouvelles voies de synthèse seront utilisées pour préparer les molécules de seconde génération. Après les résultats des tests biologiques avec ces nouveaux composés, nous nous attacherons à synthétiser de nouveaux analogues basés sur l'introduction d'une diversité moléculaire sur les positions cruciales identifiées par (Q)SAR.



REACTIVITE DES POLYETHERS IONOPHORES ET DES COUMARINES : VERS DES SYSTEMES MOLECULAIRES EFFICACES POUR LA SANTE ANIMALE

L'objectif de cette thèse, réalisée en collaboration avec la société Mérial, concerne la santé animale et s'oriente vers la synthèse de molécules actives à visée préventive ou thérapeutique. Deux sujets distincts sont abordés.

Dans un premier temps, le but recherché est la synthèse d'une série de molécules présentant une activité anti-coccidienne pour le traitement préventif des poulets. Quarante-trois composés originaux, issus d'une synthèse courte à deux ou trois étapes, ont été préparés par hémi-synthèse de la monensine. Quinze molécules ont été testées *in vitro* et trois d'entre elles montrent une activité importante vis-à-vis du parasite *Eimeria tenella.*

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux répulsifs pour un large panel d'insectes. Après avoir fait une étude bibliographique approfondie, nos recherches se sont concentrées sur la réactivité de la coumarine. Environ soixante-dix molécules ont été synthétisées par modifications fonctionnelles des 4-, 6- et 7-hydroxycoumarines et de la coumarine. La grande majorité a été testée en présence de drosophiles. Six molécules présentant une activité répulsive équivalente à celle du DEET, produit de référence, ont été identifiées.

CHEMICAL REACTIVITY OF POLYETHER IONOPHORES AND COUMARINS: TOWARDS EFFECTIVE MOLECULAR SYSTEMS FOR ANIMAL HEALTH

This thesis was completed in collaboration with the Animal Health Company Merial. The objective of the thesis is the synthesis of preventive and therapeutic bioactive molecules. Two separate subjects were treated.

First, the aim was the synthesis of a series of molecules having an anticoccidial activity for the preventive treatment of chickens. Forty-three original compounds, issued from a short synthesis with two or three steps, were prepared from monensin by hemi-synthesis. Among them, fifteen were tested *in vitro* and three of them showed a significant activity against *Eimeria tenella*.

Thereafter, we have worked on the synthesis of new repellents for a wide range of insects. After a comprehensive bibliographic study, our research was focused on the coumarin reactivity. More than seventy molecules were synthesized by structural modifications of 4-, 6- and 7-hydroxycoumarins and of coumarin. Almost all the compounds were tested in the presence of drosophila. Six molecules showing a repellent activity equivalent to DEET, used as a reference product, were identified.

DISCIPLINE : Chimie

MOTS-CLES : Polyéthers ionophores, monensine, anticoccidiens, coumarine, répulsifs, relation structure-activité

KEY-WORDS : Polyether ionophores, monensin, anticoccidials, coumarin, repellents, structure-activity relationship

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS)
Laboratoire de Catalyse, Synthèse et Environnement
Bât. CPE, Campus de la Doua, 43 boulevard du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex, France