

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

**UMR 7509 - Laboratoire de Chimie Moléculaire
Equipe Biomolécules, Synthèse et Méthodologie**

THÈSE présentée par :

Sarah SAINT-AURET

soutenue le : 14 Septembre 2017

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

**Synthèse totale de mycolactone A/B et
d'analogues ciblés pour l'étude
mécanistique de l'ulcère de Buruli**

THÈSE dirigée par :

**Dr. BLANCHARD Nicolas
Dr. BISSERET Philippe**

Université de Strasbourg (Directeur de thèse)
Université de Strasbourg (Co-directeur de thèse)

RAPPORTEURS :

**Dr. GUEYRARD David
Dr. MARCIA DE FIGUEIREDO Renata**

Université Claude Bernard Lyon 1
Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

**Dr. CHABAUD Laurent
Prof. COMPAIN Philippe
Dr. GULEA Mihaela**

Institut de Chimie des Substances Naturelles
Université de Strasbourg
Université de Strasbourg

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de recherche « Biomolécules, Synthèse et Méthodologie » du Laboratoire de Chimie Moléculaire (UMR 7509), sous la direction du Dr. Nicolas Blanchard et co-direction du Dr. Philippe Bisseret, financé par une bourse de la Fondation pour le développement de la chimie des substances naturelles et ses applications (fondation placée sous l'égide de l'Académie des sciences), et soutenu par la Fondation Follereau.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres du jury pour avoir pris le temps d'évaluer ce travail. J'exprime ma gratitude envers le Dr. David Gueyrard (université Claude Bernard Lyon 1) et le Dr. Renata Marcia de Figueiredo (université de Montpellier) pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Merci également au Dr. Laurent Chabaud (Institut de Chimie des Substances Naturelles), au Prof. Philippe Compain (université de Strasbourg) et au Dr. Mihaela Gulea (université de Strasbourg) pour leur participation à mon jury de thèse en qualité d'examineurs.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement le Dr. Nicolas Blanchard pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant. Je suis consciente de ne pas avoir été l'étudiante la plus facile tous les jours avec un moral parfois au plus bas, mais je ne te remercierai jamais assez pour ta confiance, tes encouragements et ton encadrement tout au long de ces trois années de doctorat.

Mes sincères remerciements sont également dirigés envers le Dr. Philippe Bisseret pour sa grande gentillesse, sa sérénité et son soutien dès les premiers jours de mon arrivée à Mulhouse. Je remercie également le Dr. Guillaume Duret pour le bol d'air parisien, son humour particulier et son aide précieuse dans le laboratoire. Je pense aussi à remercier chaleureusement Robert Quinlan pour sa bonne humeur et son extrême sympathie. Je leur souhaite tout le meilleur pour la suite.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué au bon déroulement de ce projet de thèse. Depuis 2006 plusieurs personnes ont permis de faire avancer le projet des mycolactones au sein du laboratoire. Je pense tout particulièrement au Dr. Anne-Caroline Chany, au Dr. Virginie Casarotto, au Dr. Cédric Tresse, au Dr. Lise Bréthous-Parmentier, et au Dr. Hajer Abdelkafi, sans qui ce travail de thèse n'aurait pas la même conclusion. J'adresse également mes remerciements à mes premiers stagiaires, Boyang Yin et André Fuchs, qui m'ont aidé au cours de mon entrée dans ce projet. J'adresse également mes remerciements au Prof. Aggarwal et le Dr. Christopher Brown de l'université de Bristol pour leur coopération à ce projet. De plus, je suis très reconnaissante à l'égard du Prof. Baudoin pour m'avoir permis de réaliser des expérimentations dans son laboratoire à l'université de Bâle. Je remercie tous les membres de son équipe, et plus particulièrement David Dailler, pour leur très grande gentillesse et pour m'avoir si bien accueilli. En plus d'avoir eu la chance de travailler dans une équipe dynamique et solidaire, ce passage à l'université de Bâle m'a offert l'opportunité de rencontrer des personnes ayant beaucoup apporté à ce projet. Ainsi, je remercie chaleureusement le Dr. Markus Neuburger pour son temps passé à essayer de faire diffracter aux rayons X certaines de mes molécules, merci également au Dr. Heinz Nadig et au Prof. Daniel Häussinger pour leur aide précieuse dans les analyses par spectrométrie de

masse et par spectrométrie RMN de plusieurs de mes composés. Mes remerciements vont également au Dr. Caroline Demangel (institut Pasteur) ainsi qu'à toute son équipe pour leur collaboration au cours de ce projet.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire de Chimie Organique et Bio-organique de l'institut Jean-Baptiste Donnet (Université de Haute-Alsace). Notamment, je tiens à remercier le Prof. Jean-Philippe Goddard, rencontré quelques années auparavant au cours de ma licence professionnelle à l'UPMC, pour m'avoir dirigé vers l'équipe du Dr. Nicolas Blanchard lorsque j'étais à la recherche d'une thèse en synthèse totale de produits naturels. Je tiens à adresser des remerciements particuliers au Dr. Didier Le Nouën pour sa disponibilité, son aide considérable en RMN, et pour avoir toujours réussi à trouver le temps de passer rapidement mes échantillons. Je tiens de plus à remercier le Dr. Marjorie Schmitt pour sa bienveillance, son soutien et ses conseils. Je remercie également les nouveaux arrivants de la fin de l'année 2016, le chargé de recherche Dr. Vincent Bizet et les doctorants Oualid Boubertakh, Vincent Le Foulher, Yvette Lock Toy Ki et Chunyang Zhang, qui ont apporté un peu de fraîcheur et de bonne humeur dans les locaux.

Je souhaite également remercier le club de boxe de Rixheim qui m'a accueilli au cours de cette dernière année de thèse et sans qui le dénouement de ces trois années aurait pu être différent. Merci à toutes les personnes rencontrées au cours de ces séances d'entraînements qui m'ont permises de relâcher la pression.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux sans qui ce travail n'aurait pas été possible. J'ai une pensée à tous mes amis hors du laboratoire, notamment Emilie, Mélanie, Christian, Mickael, Mathieu, Bernhard, Anne-Sophie, Diane. Merci à ma famille, mes parents, mon frère et ma sœur de me supporter dans mes choix, pour leurs encouragements, et pour avoir été présents et à mon écoute au cours de ces trois années. Pour finir, je ne saurais comment remercier la personne essentielle à l'avancement de ce projet, David. Je ne peux que t'adresser ma plus grande gratitude pour ton soutien continu malgré mes sautes d'humeurs répétées, merci pour ta confiance, ta fidélité, ta compagnie, ton aide, ton humour, ton amour, ta protection, ta joie de vivre,..., merci pour tout.

Table des matières

Liste des abréviations	8
Chapitre 1 : Introduction	14
1.1 <i>Mycobacterium ulcerans</i> et l'ulcère de Buruli.....	14
1.1.1 Repères historiques.....	14
1.1.2 Manifestation clinique et mode de transmission.....	15
1.1.3 Diagnostic et traitement.....	17
1.2 Les mycolactones	19
1.2.1 Caractérisation des mycolactones.....	19
1.2.2 Biosynthèse des mycolactones.....	21
1.3 Synthèses totales de la mycolactone A/B	26
1.3.1 Présentation des stratégies synthétiques précédemment développées pour la synthèse totale de la mycolactone A/B	26
1.3.2 Première génération de synthèse totale de la mycolactone A/B par Kishi (2001-2002) ..	28
1.3.3 Deuxième génération de synthèse totale de la mycolactone A/B par Kishi (2007)	32
1.3.4 Troisième génération de synthèse totale de la mycolactone A/B par Kishi (2010)	34
1.3.5 Synthèse totale de la mycolactone A/B par Negishi (2011)	36
1.3.6 Synthèse totale de la mycolactone A/B par Altmann (2011)	40
1.3.7 Synthèse partielle de la mycolactone A/B par Aggarwal (2015)	43
1.3.8 Comportement photochimique de la mycolactone A/B	45
1.4 Conclusion	48
1.5 Références.....	49
Chapitre 2 : Aspects biologiques.....	55
2.1 Effets biologiques des mycolactones	55
2.1.1 Effet cytopathique	56
2.1.2 Effet immunosuppresseur	57
2.1.3 Localisation cellulaire de la mycolactone A/B.....	61
2.1.4 Avancées sur les mécanismes biologiques de l'ulcère de Buruli.....	61
2.2 Analogues de mycolactones.....	68
2.2.1 Synthèse des analogues de la mycolactone A/B	68
2.2.2 Synthèse des analogues C8-desméthylés de mycolactones par Blanchard (2011-2014) .	71

2.2.3 Synthèse d'analogues fluorescents de mycolactones.....	78
2.3 Evaluation biologique et SAR	79
2.3.1 Analyse de la première génération d'analogues (2003-2011) et des récents analogues de Kishi (2017).....	80
2.3.2 Analyse des analogues de mycolactones C8-desméthylés sur WASP (2014)	82
2.3.3 Analyse des analogues de mycolactones C8-desméthylés pour leur activité immunosuppressives.....	84
2.4 Conclusion	85
2.5 Références.....	87
Chapitre 3 : Résultats et discussion	92
3.1 Présentation du projet	92
3.1.1 Contexte	92
3.1.2 Projet de recherche.....	94
3.2 Synthèse totale de la mycolactone A/B	95
3.2.1 Première approche de la synthèse de la mycolactone A/B.....	96
3.2.2 Deuxième approche de la synthèse de la mycolactone A/B.....	101
3.2.3 Troisième approche de la synthèse de la mycolactone A/B	110
3.3 Vers la synthèse de nouveaux analogues de mycolactones	122
3.3.1 Analogues de mycolactones diversifiés en C8.....	122
3.3.2 Analogues C12 de mycolactones.....	135
3.4 Synthèse de la mycolactone A/B par une voie synthétique décrite dans la littérature.....	137
3.4.1 Synthèse de la mycolactone A/B à partir de l'intermédiaire 173	137
3.4.2 Synthèse de la mycolactone A/B à partir de l'intermédiaire fourni par Aggarwal	140
3.5 Evaluation biologique.....	141
3.5.1 Analyse de l'effet immunosuppresseur des composés synthétisés.....	141
3.5.2 Analyse de l'effet immunosuppresseur de deux composés saturés pour un contrôle négatif	144
3.6 Conclusion	145
3.7 Références.....	148
Chapitre 4 : Conclusion générale et perspectives	155
4.1 Références.....	162

Chapitre 5 : Partie expérimentale	165
5.1 Material and methods.....	165
5.2 Synthesis of the southern chain's precursors	165
5.3 Synthesis of the northern chain's precursors.....	168
5.4 Synthesis of the natural toxin.....	171
5.5 Synthesis of the C8-Br toxin's homologue	185
5.6 Synthesis of intermediates and analogues.....	193
5.6.1 Synthesis of the intermediates of interest	193
5.6.2 Synthesis of the isopropyle analogue.....	195
5.6.3 Synthesis of the C8-desmethyl fluorescent analogue	199
5.6.4 Synthesis of various mycolactones analogues	203
5.7 References.....	206
Index des molécules	207

Liste des abréviations

A

[α] : pouvoir rotatoire spécifique
Ac : acétyl
ACP : protéine porteuse d'acyl
ADN : acide désoxyribonucléique
Alk : alkyl
APTS : acide paratoluènesulfonique
Ar : aryl
ARNm : acide ribonucléique messenger
AT : acyltransférase
AT1 : acyltransférase 1(malonate)
AT2 : acyltransférase 2 (malonate)
AT₂R : récepteur de type 2 de l'angiotensine II
AT3 : acyltransférase 3 (méthylmalonate)
atm : atmosphère

B

9-BBN : 9-borabicyclo[3.3.1]nonane
BAAR : bacilles acido-alcool-résistants
Bn : benzyl
Boc : *tert*-butoxycarbonyl
BODIPY : dipyrrométhène boron difluoride
BOP : (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
br : broad
brsm : basé sur le produit de départ récupéré (based on recovered starting material)
Bu : butyl
Bz : benzoyl
B3LYP : fonctionnelle hybride d'échange-corrélation à trois paramètres Becke/Lee–Yang–Parr

C

°C : degré Celsius
Cb : N,N-diisopropylcarbamoyle
CCM : chromatographie sur couche mince
CDI : carbonyldiimidazole
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CoA : coenzyme A
Cp : cyclopentadiényl
CPA : cellules présentatrices d'antigènes
m-CPBA : acide *mé*ta-chloropéroxybenzoïque
Cy : cyclohexyl

D

δ : déplacement chimique en RMN
DAMP : diméthyl (diazométhyl)phosphonate
DCE : 1,2-dichloroéthane
DCM : dichlorométhane
DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DH : déhydratase
DIBALH : hydrure de diisobutylaluminium
DMAP : 4-(N,N-diméthylamino)pyridine
DME : diméthoxyéthane
DMEDA : diméthyléthylènediamine
DMF : diméthylformamide
DMSO : diméthyl sulfoxide
DPEPhos : diphénylphosphinophényl)éther
dppf : bis(diphénylphosphine)ferrocène
d.r. : ratio diastéréomérique

E

e.e. : excès énantiomérique
EDCI : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
éq. : équation
equiv. : équivalent
ER : énoyl-reductase
Et : éthyl

G

g : gramme

H

h : heure
HG-IIG : catalyseur d'Hoveyda-Grubbs de seconde génération
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
HRMS : spectrométrie de masse de haute résolution
HWE : réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons
Hz : Hertz

I

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane
IFN : interférons
IL : interleukine
im. : imidazole
Ipc : isopinocamphéyl
IS : séquence d'insertion

J

J : constante de couplage en RMN

K

Kb : kilobase
KR : céto-réductase
KRA : céto-réductase A
KRB : céto-réductase B
KS : céto-synthase

L

L : litre
LCMS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LD₅₀ : dose létale médiane
LDA : diisopropylamide de lithium

M

μ : micro
M : molaire (moles par litre)
Me : méthyl
Ms : méthylsulfonyl (mésyl)
MTPA : acide α-méthoxy-α-trifluorométhylphénylacétique
M. ulcerans : *Mycobacterium ulcerans*
MW : micro-ondes

N

NCS : N-chlorosuccinimide
NMP : 1-méthyl-2-pyrrolidinone
nOe : effet Overhauser nucléaire
N-WASP : protéine neuronale du syndrome de Wiskott-Aldrich

O

OMS : organisation mondiale de la santé

P

PCR : réaction en chaîne par polymérase
PEPPSI : Pyridine-Enhanced Precatalyst Preparation Stabilization and Initiation, ou [1,3-Bis(2,6-di-3-pentylphenyl)imidazol-2-ylidène](3-chloropyridyl)
Ph : phényl
pin : pinacolato
PKS : polycétides synthases
PMB : p-méthoxybenzyl
i-Pr : isopropyl

R

RCM : réaction de métathèse cyclisante
ROS : dérivé réactif de l'oxygène
[Ru]-2 : catalyseur de Grubbs de seconde génération

S

SAR : relation de structure-activité

T

TASF : tris(diméthylamino)sulfonium difluorotriméthylsilicate

TBAF : fluorure de tétra-n-butylammonium

TBS : *tert*-butyldiméthylsilyl

TE : thioestérase

TEMPO : 2,2,6,6-tetraméthylpipéridin-1-oxyl

TES : triéthylsilyl

TFA : acide trifluoroacétique

TFP : tri-2-furylphosphine

THF : tétrahydrofurane

TLC : chromatographie sur couche mince

TNF : facteur de nécrose tumorale

Ts : para-toluènesulfonyl (tosyl)

W

WASP : protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich

Chapitre 1 : Introduction

1. Introduction

La dénomination de « maladie tropicale négligée », qui a émergé en 2006 à l'initiative de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), représente un groupe diversifié de maladies transmissibles prédominant dans les milieux tropicaux et subtropicaux dans 149 pays et touchant plus d'un milliard de personnes. Ces infections sont une conséquence des conditions environnementales et socio-économiques. En effet, elles affectent principalement les populations vivant dans la pauvreté, sans assainissement adéquat et en contact étroit avec les vecteurs infectieux et les animaux. Actuellement, une quinzaine de maladies sont considérées comme des maladies tropicales négligées.¹ Elles font l'objet de plans mondiaux de lutte coordonnés par l'OMS, dans le but de les prévenir, maîtriser, éliminer ou de les éradiquer. Il s'agit de maladies répandues, comme la lèpre, la rage, ou encore la dengue, mais aussi d'autres beaucoup moins médiatisées telles que l'ulcère de Buruli. Cette dernière a été classée parmi les priorités de l'OMS en raison des connaissances limitées à son sujet ainsi que du fardeau social et économique qu'elle représente pour les régions en développement touchées. Une initiative mondiale visant à mobiliser et à coordonner la recherche internationale a été lancée en 1998.

Dans le domaine scientifique, les biologistes ont vu un tournant dans leur compréhension de l'ulcère de Buruli grâce à l'isolement et la caractérisation d'une toxine polycétidique, précédemment inconnue, à partir de cultures de *Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*) par l'équipe de Pamela Small en 1999.² Cette nouvelle classe de molécules, appelée mycolactones, a également suscité l'intérêt synthétique de plusieurs chimistes. En effet, la synthèse totale de produits naturels et de leurs dérivés (analogues ou sondes) est un domaine d'étude permettant d'élucider la structure de substances complexes, d'explorer la biologie, mais aussi conduisant à des avancées majeures dans les méthodes de synthèse. Dans ce contexte, ce projet de recherche s'intéresse à la chimie des mycolactones et à leur mécanisme d'action, dans la cadre d'une collaboration avec le Dr. Demangel de l'institut Pasteur à Paris.

Avant d'examiner les mycolactones dans leur ensemble, une introduction sur l'ulcère de Buruli et son pathogène humain sera développée. La deuxième partie de cette introduction traitera de la façon dont les structures des mycolactones ont été élucidées et comment *M. ulcerans* produit ces composés. Enfin, la troisième partie exposera les stratégies précédemment développées pour synthétiser la toxine.

1. 1. *Mycobacterium ulcerans* et l'ulcère de Buruli

1.1.1. *Repères historiques*

La première description clinique d'une nouvelle maladie de peau nécrosante est apparue en 1948 avec les travaux de Peter Mac Callum.³ En effet, ce dernier décrit pour la première fois l'agent causal en découvrant des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) dans une biopsie prélevée à partir d'un ulcère de la jambe chez un enfant de Bairnsdale (Australie) en 1940.⁴ Il publiera également huit ans plus tard son rapport détaillé sur six patients atteints d'ulcères sur leurs bras ou leurs jambes dus à cette nouvelle infection mycobactérienne. Cependant, la bactérie responsable de cette maladie

nécrosante de la peau n'est pas nommée dans la publication d'origine ; le nom *Mycobacterium ulcerans* ne sera proposé qu'en 1950 par Frank Johannes Fenner.⁵

Toutefois, cette maladie était déjà connue en Afrique avant 1948 : des cas soupçonnés d'infections par *Mycobacterium ulcerans* ont été rapportés dès le milieu du 19^{ème} siècle. La description détaillée de l'infection évoquée par l'explorateur James Augustus Grant dans son livre « A walk across Africa » en 1864 est actuellement considérée comme le premier cas rapporté d'ulcère de Buruli.⁶ Sir Robert Cook avait également décrit dès 1897 des ulcères étendus chez des patients en Ouganda provoqués presque certainement par *M. ulcerans*.⁷ De plus, entre 1923 et 1935, un médecin missionnaire dans le nord-est du Congo (ex-Zaïre), nommé Kleinschmidt, a lui aussi observé des lésions cutanées à bords creusés contenant de nombreux bacilles acido-alcoolo-résistants.⁸ En 1960, de nombreux cas se sont produits dans le Comté de Buruli en Ouganda (aujourd'hui le district de Nakasongola), d'où le nom le plus couramment utilisé pour cette maladie d'ulcère de Buruli.⁹

Actuellement, l'ulcère de Buruli est dénombré dans au moins 33 pays de régions tropicales, subtropicales et tempérées d'Afrique, d'Amérique du Sud et du Pacifique occidental. Très récemment, un premier cas d'infection à *Mycobacterium ulcerans* a également été reporté en Jordanie.¹⁰ Il est à noter que ce sont les pays d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale, tels que le Bénin, le Cameroun, la Côte d'Ivoire, le Ghana et la République Démocratique du Congo, qui comptent la plupart des cas rapportés (Figure 1). D'autre part, les cas signalés en Australie et au Japon, pays ayant des climats modérés non-tropicaux, ont soulevé l'intérêt des scientifiques dans la biologie de la bactérie responsable de la maladie : différentes souches de *M. ulcerans* dans différents continents ont ainsi pu être identifiées.^{11,12} Chaque année, plus de 7000 personnes sont infectées par l'ulcère de Buruli, ce qui en fait la troisième infection mycobactérienne¹³ la plus fréquente chez l'homme après la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) et la lèpre (*Mycobacterium leprae*).

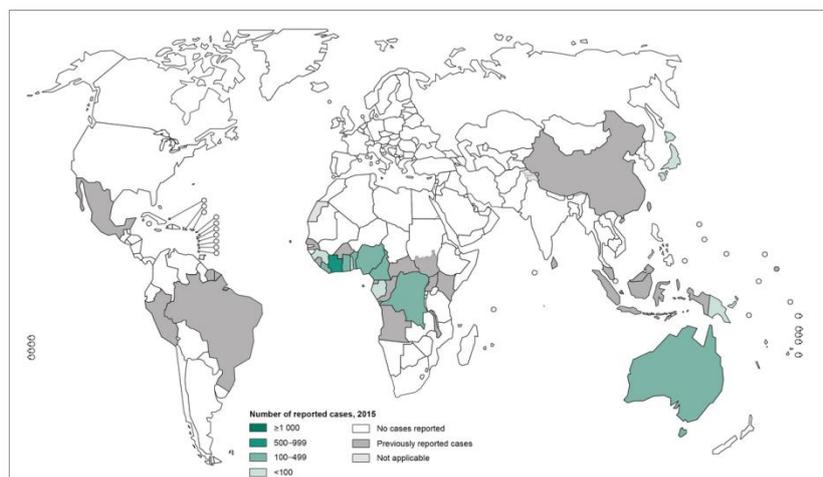


Figure 1 : Distribution mondiale de l'ulcère de Buruli en 2015.¹ Figure reproduite de la réf. 1 avec permission. Copyright 2016 – WHO

1.1.2. **Manifestation clinique et mode de transmission**

L'infection par *Mycobacterium ulcerans*, dont les premiers signes apparaissent après une incubation de plusieurs semaines suite à l'inoculation, peut être caractérisée par deux stades bien distincts de la maladie : les lésions pré-ulcérales et les lésions ulcérales. A un stade précoce, la maladie commence avec des papules, ressemblant à des piqures d'insectes, ou avec des nodules

sous-cutanés (Figure 2a).¹⁴ Ces lésions de la peau, provoquant quelques démangeaisons, se transforment progressivement en plaies à bords irréguliers et de plus de 3 centimètres de diamètre appelées plaques (Figure 2b). Des tuméfactions diffuses pouvant s'étendre à un membre entier ont également été observées chez quelques patients (Figure 2c). Ces différentes lésions pré-ulcéranes étant toutes indolores, elles conduisent généralement les personnes infectées à négliger ces symptômes. La maladie évolue alors vers une ulcération cutanée massive, l'aspect caractéristique de l'ulcère de Buruli (Figure 2d). Une décoloration de la peau peut être observée autour de ces lésions ulcéranes, mais là encore ces dernières restent indolores. Néanmoins, ces lésions ouvertes peuvent devenir douloureuses lorsque surgit une surinfection bactérienne ou un œdème sévère. Quelques décès imputables à des septicémies, au tétanos ou à des hémorragies ont été signalés. Un nombre croissant d'infections osseuses, appelées ostéomyélites, qui compliquent la prise en charge des cas a également été notifié.¹⁵ Par ailleurs, il est à noter que plusieurs guérisons spontanées ont été observées sur des patients après une longue phase ulcéranne, entraînant des infirmités majeures dues à des rétractions et à la destruction osseuse.¹⁶

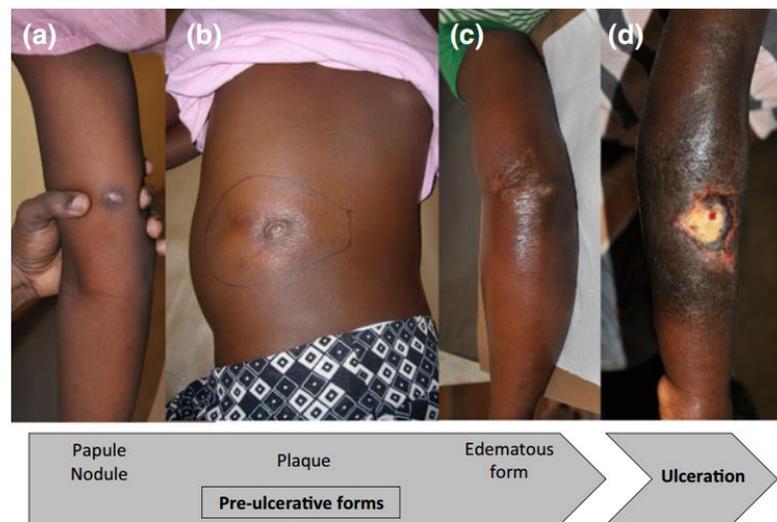


Figure 2 : Manifestations cliniques de l'ulcère de Buruli. Figure reproduite de la réf. 12 avec permission. Copyright 2017 – WILEY

De manière générale, tous les sujets, hommes et femmes à part égales et quel que soit leur âge, peuvent être infectés par la bactérie. Néanmoins, il est à souligner qu'en Afrique ce sont les enfants âgés de moins de quinze ans les plus touchés par l'infection. Les lésions se situent principalement sur les membres inférieurs (55%), souvent sur les membres supérieurs (35%) et parfois sur d'autres parties du corps (10%) comme le tronc, le visage ou les organes génitaux.¹⁷ Il a été proposé que la limitation de l'infection à la peau puisse être due à la température de croissance restreinte de *M. ulcerans*. En effet, la croissance des souches de la bactérie en conditions de laboratoire se caractérise par une plage de température remarquablement étroite comprise de 28 à 34 °C avec une croissance optimale de la plupart des souches se situant entre 30 et 33 °C, jouant ainsi un rôle important dans la pathogénèse de l'ulcère de Buruli.¹⁸ Par ailleurs, contrairement à la lèpre et à la tuberculose qui se caractérisent par une transmission de personne à personne, la transmission directe humaine à humaine de *M. ulcerans* est extrêmement rare. Mais, comme pour d'autres mycobactéries environnementales, il est très probable qu'il soit nécessaire à *M. ulcerans* d'être inoculé dans le derme pour qu'il puisse s'y multiplier.¹⁹ Etant donné la prédominance du nombre de cas d'ulcères de Buruli déclaré à proximité de fleuves, lacs naturels ou artificiels, ou de zones

marécageuses, l'existence d'un réservoir aquatique a été avancée.^{20a-b} Par ailleurs, il faut souligner que dans de nombreuses régions les infections à *M. ulcerans* ne sont apparues qu'après des perturbations écologiques importantes, telles que la déforestation, la construction de barrages et l'agriculture.²¹ Des fragments d'ADN de *Mycobacterium ulcerans* ont été identifiés dans différents insectes aquatiques, poissons, animaux ou encore directement dans les sources d'eau environnementale.²² Néanmoins, le mode exact de transmission à l'humain est méconnu à ce jour. Cependant, des essais expérimentaux montrent que la bactérie peut être transmise à des souris par une piqûre d'insecte aquatique contaminé.²³

1.1.3. Diagnostic et traitement

L'identification sans ambiguïté des infections par *M. ulcerans* est très difficile aux centres de soins en raison du nombre d'autres infections mycobactériennes non tuberculeuses et du niveau général d'équipement technique dans les régions endémiques. Plusieurs méthodes de détection existent mais ne sont pas adaptées à toutes les régions où la maladie se déclare. En effet, la mise au point de méthodes de détection précoces, faciles à mettre en œuvre et le moins invasives possible, tels que des tests dermiques ou sérologiques, reste une priorité compte tenu notamment du jeune âge des patients ou encore de la ruralité et l'isolement de certaines zones endémiques.

Toutefois, quatre tests différents ont été établis pour diagnostiquer la maladie : examen direct du prélèvement effectué (pus, échantillons de peau, biopsies), culture de *M. ulcerans*, amplification génétique par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) et histopathologie. La PCR est l'examen dont la sensibilité, c'est-à-dire l'efficacité de détection, est la plus élevée puisque elle se situe vers 98%. L'examen direct ne possède qu'une sensibilité d'environ 40%, la culture entre 20 et 60%, et l'histologie se situe vers 90%. Néanmoins, il est à noter que tous ces tests nécessitent un échantillon de l'ulcère ou une biopsie de tissu, et requièrent pour certains un temps d'analyse assez long (de 6 à 8 semaines pour la culture de la bactérie). Il faut savoir que le temps de réplication de la bactérie est également très long, son dédoublement a été évalué à plus de 48 heures.²⁴ Néanmoins, pour respecter les normes de l'OMS, au moins deux de ces tests doivent être positifs pour un diagnostic concluant.²⁵

Récemment, des méthodes de diagnostic basées sur la détection de l'agent causal de *Mycobacterium ulcerans* par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été développées.²⁶ La CCM est relativement simple à mettre en œuvre mais peut être compliquée à interpréter avec la présence d'autres lipides dans l'échantillon.²⁷ Par ailleurs, ces méthodes nécessitent d'être approfondies et testées sur plus grande échelle avant de pouvoir se prononcer sur leur éventuelle utilisation dans le cadre du dépistage de l'ulcère de Buruli.

Les difficultés de diagnostic précoce de l'ulcère de Buruli ont pour conséquence de rendre le traitement de la maladie difficile et insatisfaisant. En effet, l'élimination chirurgicale complète des tissus infectés a été pour longtemps la seule façon de traiter efficacement l'infection, laissant le patient avec des cicatrices importantes ou même une perte complète de membres. Depuis 2004, l'Organisation Mondiale de la Santé préconise une thérapie journalière d'une durée de 8 semaines avec une combinaison de rifampicine administrée par voie orale et d'injections intramusculaires de streptomycine pour le traitement de l'infection (Figure 3). D'un point de vue mécanistique, il est actuellement considéré que ces bactéricides inhibent, d'une part, la production de l'agent causal

produit par *Mycobacterium ulcerans*, et, d'autre part, *Mycobacterium ulcerans* lui-même.²⁸ Cependant, malgré sa relative efficacité, certaines préventions subsistent quant à l'utilisation de la streptomycine en raison de son caractère invasif, de son adhésion thérapeutique et de sa disponibilité. De plus, ses effets secondaires, tels que la déficience auditive et la néphrotoxicité, sont d'autres préoccupations à prendre en compte, en particulier chez les enfants. Par conséquent, les efforts actuels se concentrent sur le développement d'un régime d'antibiotiques administré par voie orale seule, comme par exemple l'association de la rifampicine avec la clarithromycine, traitement qui est actuellement recommandé en Australie (Figure 3).²⁹

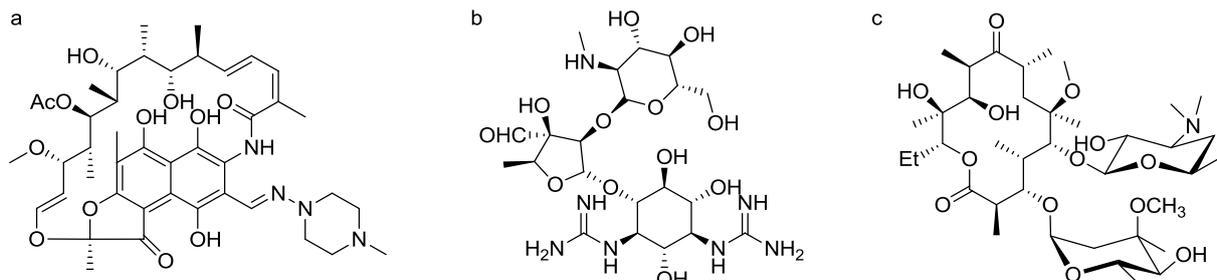


Figure 3 : Antibiotiques utilisés dans le traitement de l'ulcère de Buruli (a : rifampicine ; b : streptomycine ; c : clarithromycine)

Afin de faciliter le traitement et de surveiller les progrès dans les mesures de santé publique, l'OMS a introduit un système de classification des lésions de la maladie basé sur la taille et la position de la lésion. Il existe ainsi trois différentes catégories : la catégorie I correspondant aux lésions uniques de moins de 5 cm de diamètre, la catégorie II correspondant aux lésions uniques entre 5 et 15 cm de diamètre, et la catégorie III regroupant les lésions uniques de plus de 15 cm de diamètre ou lésions multiples et lésion(s) sur un site critique (œil, sein ou organes génitaux) ou une complication de type ostéomyélite. Toutes les lésions de catégorie I et certaines de catégorie II guérissent avec un traitement antibiotique seul. Pour les cas avancés, un consensus entre les praticiens admet que l'intervention chirurgicale doit être réalisée uniquement après un traitement antibiotique d'au moins 4 semaines, minimum nécessaire pour inhiber la croissance de *M. ulcerans*.³⁰

D'autres types de traitements ont également été testés mais sans résultats validés par la communauté scientifique, tels que les traitements hyperbares³¹ ou encore à base d'oxyde d'azote sous forme de crème.³² Une grande attention a également été portée sur le développement de traitement des lésions fondée sur la thermothérapie et l'application locale de chaleur.³³ Idéalement, le développement d'un vaccin pour prévenir l'infection offrirait la meilleure solution et semble réalisable. En effet, sachant que la forme active de l'ulcère de Buruli ne se développe que chez certaines personnes exposées à *M. ulcerans*³⁴ et que le risque pour les jeunes adultes de développer la maladie est beaucoup moins important que pour les enfants, ces observations suggèrent que le développement d'une immunité protectrice contre l'ulcère de Buruli est possible. Néanmoins, les tentatives dans ce domaine ont connu un succès limité jusqu'à présent.³⁵

La mise au point d'un traitement efficace et spécifique de cette infection fortement répandue dans les pays tropicaux est essentiel. L'ulcère de Buruli suscite l'intérêt de nombreux groupes de recherche depuis plusieurs années, notamment pour la compréhension du mécanisme d'action de cette mycobactérie, et pour à terme mettre au point un moyen de lutte contre la maladie. Dans ce cadre, dès les années 60, l'observation clinique de lésions nécrosantes se développant à distance du site d'infection³⁶ conduisent Connor et Lunn à proposer l'hypothèse de l'existence d'une toxine produite par *M. ulcerans* se diffusant dans l'organisme.³⁷

1. 2. Les mycolactones

La pathologie caractéristique de l'ulcère de Buruli, c'est-à-dire l'apparition d'ulcère étendu sans douleur associée, est liée à la formation d'une exotoxine, de type macrolide polycétidique, appelée mycolactone. En raison de l'important coût métabolique de la production de mycolactone, il est probable que la toxine joue un rôle important dans la survie et la croissance de *M. ulcerans* dans son environnement.

1.2.1. *Caractérisation des mycolactones*

Les efforts menés par la communauté scientifique en faveur de l'ulcère de Buruli a conduit à une première percée majeure en 1998 lorsque le groupe de Small a purifié partiellement, à partir de culture de *M. ulcerans* d'une souche africaine, une molécule lipidique, et a ainsi mis en évidence l'existence de cette toxine.³⁸ Cette dernière a été isolée et caractérisée en 1999 par le même groupe grâce à des purifications par chromatographie sur couche mince puis par HPLC des extraits lipidiques issus de cultures du micro-organisme.³⁹ Des analyses par spectrométrie de masse haute résolution combinées avec les spectroscopies infra-rouge et RMN multidimensionnelles ont permis d'établir la structure brute, sans information stéréochimique, et ont également révélé la nature polycétidique complexe de ces toxines. Ces dernières seront nommées mycolactones en référence à leur origine mycobactérienne et leur structure macrolidique (Figure 4). Ces mycolactones sont les premiers macrolides isolés d'un pathogène humain. Cet aspect pathogénique a été démontré par l'injection intradermique de mycolactones purifiées et de *M. ulcerans* à des cochons d'Inde provoquant ainsi dans les deux cas l'apparition de nécroses caractéristiques de l'ulcère de Buruli.³⁸

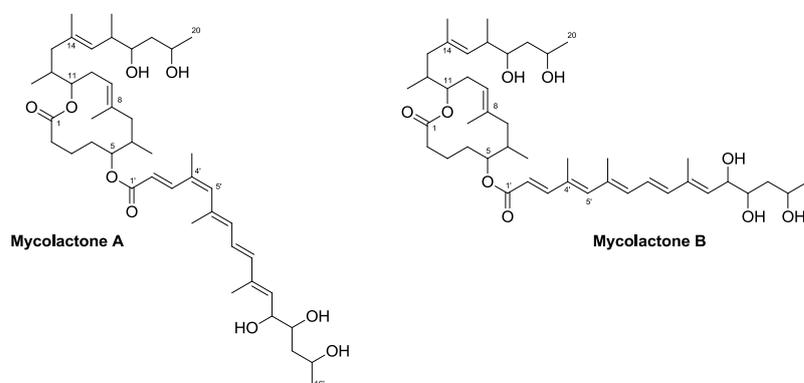


Figure 4 : Structure brute des mycolactones A ($Z-\Delta^{4'-5'}$) et B ($E-\Delta^{4'-5'}$)

La structure des mycolactones est définie par un cycle macrolactonique à 12 atomes substitué en C11 par une chaîne carbonée C12-C20 et en C5 par une chaîne pentaénique C1'-C16'. A l'état naturel, les mycolactones se présentent sous la forme d'un mélange d'isomères géométriques, notamment au niveau de l'insaturation C4'-C5' ($Z-\Delta^{4'-5'}/E-\Delta^{4'-5'} = 3:2$) ; l'isomère Z (mycolactone A) est prédominant dû aux contraintes allyliques A^{1,3} présentes dans l'isomère E (mycolactone B). Une purification de ce mélange peut être effectuée par HPLC, mais une nouvelle analyse de ces fractions conduit de nouveau aux deux composés. Ainsi, les produits purifiés s'isomérisent spontanément pour atteindre l'état d'équilibre thermodynamique 60:40. La même observation a également été faite par analyses RMN. Small a alors montré qu'un état d'équilibre dynamique existe entre ces deux mycolactones.³⁹

La détermination des configurations relatives et absolues a été réalisée par le groupe de Kishi peu de temps après la découverte de la structure brute de la toxine. Dès 2001, grâce à la synthèse de composés modèles ainsi qu'à l'utilisation de base de données RMN⁴⁰ et de solvants chiraux, Kishi et son équipe ont pu élucider la configuration relative et absolue de la structure macrocyclique⁴¹ puis de la chaîne inférieure C1'-C16'.⁴² La preuve structurale finale a été posée lorsque ce même groupe a accompli la première synthèse totale de la mycolactone A/B (Figure 5).⁴³

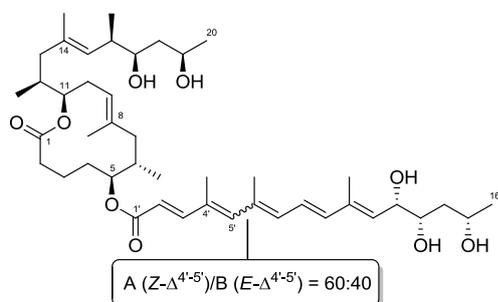
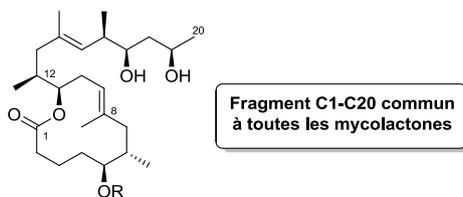


Figure 5 : Structure exacte des mycolactones A (Z- $\Delta^{4'-5'}$) et B (E- $\Delta^{4'-5'}$)

Par ailleurs, les travaux de Small admettent que les mycolactones A et B sont les principaux métabolites issus des souches de *M. ulcerans* d'Afrique de l'Est. Cependant, plusieurs mycolactones ont été identifiées depuis lors. En effet, des variantes de la mycolactone A/B ont été isolées de différentes souches humaines provenant de Malaisie, d'Afrique de l'Ouest, d'Australie, de Chine, du Japon ainsi que d'espèces de mycobactéries voisines telles que *M. marinum* (pathogène de poisson), *M. pseudoshottsii* (pathogène de poisson), *M. liflandii* (pathogène de grenouille), *M. shinshuense* (pathogène humain). Ces variantes, appelées mycolactone C, D, E, F, dia-F, S1 et S2, se distinguent les unes des autres par leur virulence ; la mycolactone A/B étant la plus toxique. Cette observation s'explique notamment par leur structure qui diffère uniquement par la nature de la chaîne inférieure C1'-C16' mais avec complète conservation du noyau lactonique (Figure 6).⁴⁴ Une mycolactone artificielle, mycolactone G, produite par ingénierie biosynthétique par l'équipe de Leadlay a également été isolée.⁴⁵ Tout comme la mycolactone A/B, ces mycolactones se présentent elles aussi sous la forme d'un mélange d'au moins deux isomères géométriques au niveau de la chaîne pentaénique. Ce phénomène a été souligné par deux lettres dans la mycolactone A/B, cependant une seule lettre est utilisée pour la nomenclature de ces dérivés (C, D, E, F, S, G).



Nom usuel	Elucidation complète de la structure	isolée de	Structure de la chaîne inférieure (R) C1'-Cn'
Mycolactone A/B	2001	pathogène humain (<i>M. ulcerans</i>)	
Mycolactone C	2003	pathogène humain (<i>M. ulcerans</i>)	
Mycolactone D	2003	pathogène humain (<i>M. ulcerans</i>)	
Mycolactone S1	2012	pathogène humain (<i>M. ulcerans</i> subsp. <i>shinshuense</i>)	
Mycolactone S2	2012	pathogène humain (<i>M. ulcerans</i> subsp. <i>shinshuense</i>)	
Mycolactone E	2008	pathogène de grenouille (<i>M. ulcerans</i> ecovar <i>Liflandii</i>)	
Mycolactone E (métabolite mineur)	2010	pathogène de grenouille (<i>M. ulcerans</i> ecovar <i>Liflandii</i>)	
Mycolactone F	2008	pathogène de poisson eau salée (<i>M. marinum</i> M)	
Mycolactone <i>dia</i> -F	2009	pathogène de poisson eau douce (<i>M. marinum</i> M)	
Mycolactone G	2007	<i>M. marinum</i> DL045 clonée avec MUP_053	

Figure 6 : Structure des différentes mycolactones (1999-2012).³ Figure adaptée de la réf. 3 avec permission. Copyright 2013 – *Natural Product Reports*

La découverte de ces différences structurales chez les mycolactones ainsi que la mise en évidence du nouveau rôle des polycétides en tant que pathogènes pour l'homme ont attiré une attention particulière. Une avancée majeure dans le domaine a concerné la description complète du génome de *M. ulcerans* en 2004 par Cole et ses collaborateurs.⁴⁶ En effet, cette découverte a permis d'élucider la biosynthèse de la toxine, permettant alors une meilleure compréhension de l'origine et de la diversité structurale des mycolactones.

1.2.2. Biosynthèse des mycolactones

Les mycolactones font partie de la grande famille de produits naturels appelés polycétides. La biosynthèse de ce type de molécules, généralement issus de métabolismes secondaires, est

catalysée par une classe d'enzymes multifonctionnelles appelées polycétides synthases (PKS) et classées comme type I, II ou III.⁴⁷ Ces dernières, alors présentes dans le génome de la bactérie, permettent d'assembler des unités acétyl-CoA ou malonyl-CoA et ainsi de fonctionnaliser les chaînes polycétidiques synthétisées.⁴⁸ En effet, la formation de ce type de produits naturels est généralement catalysée par des PKS de type I contenant des sites enzymatiques actifs appelés domaines, qui sont eux-mêmes organisés en modules. Et, chaque module est constitué d'au moins trois domaines : un domaine β -cétioacyl-ACP synthase (KS), une acyltransférase (AT) et une protéine porteuse d'acyle (ACP). La biosynthèse est généralement amorcée par un fragment acyle relié à un domaine KS (module de chargement) qui est condensé avec un malonyle activé ou un méthylmalonyle attaché à un domaine ACP (module d'extension) qui lui-même subit une décarboxylation (Figure 7-A). Après cette condensation décarboxylante, le nouveau fragment β -carbonylé introduit peut subir d'autres modifications impliquant une enzyme β -cétoreductase (KR), une déshydratase (DH) ou encore une énoyl-réductase (ER) (Figure 7-B). Une fois que toutes les enzymes présentes sur le module ont réagi, la chaîne allongée de manière linéaire est transférée au domaine KS du module suivant. Ce cycle d'allongement est répété plusieurs fois en fonction du nombre de modules dans la PKS.

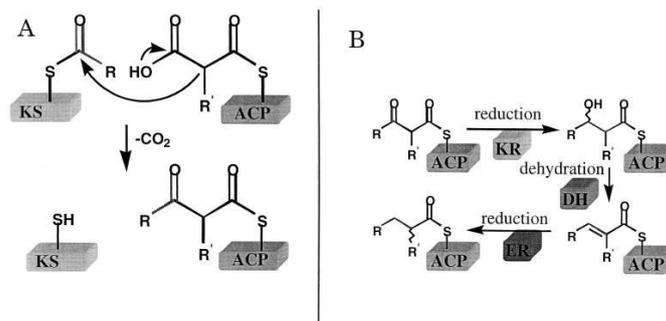


Figure 7 : Réactions et catalyseurs clés dans la biosynthèse des polycétides.⁴⁹ Figure reproduite de la réf. 49 avec permission. Copyright 2017 – American Society for Microbiology

L'analyse génomique de *M. ulcerans* a permis de mettre en évidence l'existence d'un plasmide de virulence sur lequel est situé un ensemble de gènes codant les polycétides synthases de type I, et donc permettant la formation des mycolactones.⁵⁰ Ces études, menées par l'équipe de Stinear, suggèrent que *M. ulcerans* s'est adapté à un nouvel environnement et a évolué à partir d'un ancêtre de *M. marinum* grâce à l'acquisition d'une grande molécule d'ADN circulaire et à l'accumulation des séquences d'insertion (IS) IS2404 et IS2606. Chez *M. ulcerans*, ce plasmide, nommé pMUM001, possède une taille de 174 kb et code pour mlsA1, mlsA2 et mlsB, trois différentes PKS de type I (Figure 8).

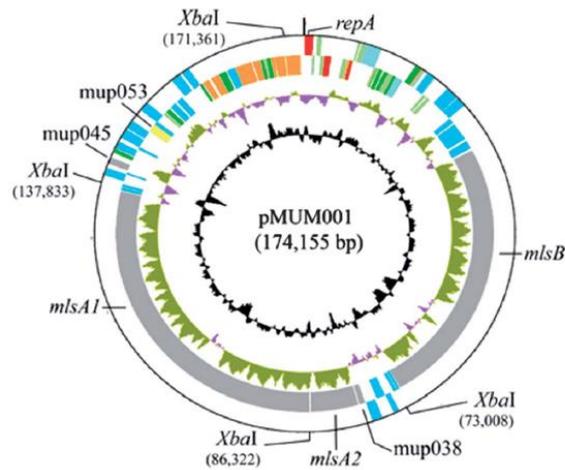


Figure 8 : Représentation du plasmide de virulence pMUM001 de *M. ulcerans*.⁴⁶ Figure reproduite de la réf. 46 avec permission. Copyright 2004 – National Academy of Sciences

Les deux polycétides synthases modulaires, *mlsA1* (1,8 MDa) et *mlsA2* (0,26 MDa), sont composées d'un module de chargement et de neuf modules d'extension permettant ainsi la synthèse de la macrolactone liée avec la chaîne supérieure, soit le fragment C1-C20. *MlsB* (1,2 MDa) contient quant à elle un module de chargement et sept modules d'extension qui permettent la synthèse linéaire de la chaîne latérale en suivant l'assemblage classique de la formation des polycétides. En plus des KS, AT et ACP requis, d'autres domaines enzymatiques sont impliqués, à savoir DH, KR et TE. Les modules KR existent sous deux formes, KRA et KRB ; A et B correspondant à la sélectivité de la réduction des fonctions cétones en alcool, elle-même corrélée aux acides aminés spécifiques dans le site actif de l'enzyme.⁵¹ Trois autres gènes sont également présents sur le plasmide : MUP_038 qui encode pour une thioestérase, MUP_045 codant pour une enzyme de type cétoynthase et permettant la réaction d'estérification entre la chaîne inférieure et le fragment macrolidique, et MUP_053 qui code pour un cytochrome P450 hydroxylase Cyp140A7. Ce dernier gène est impliqué dans l'hydroxylation de la position C12' de la chaîne latérale inférieure (Figure 9).⁵²

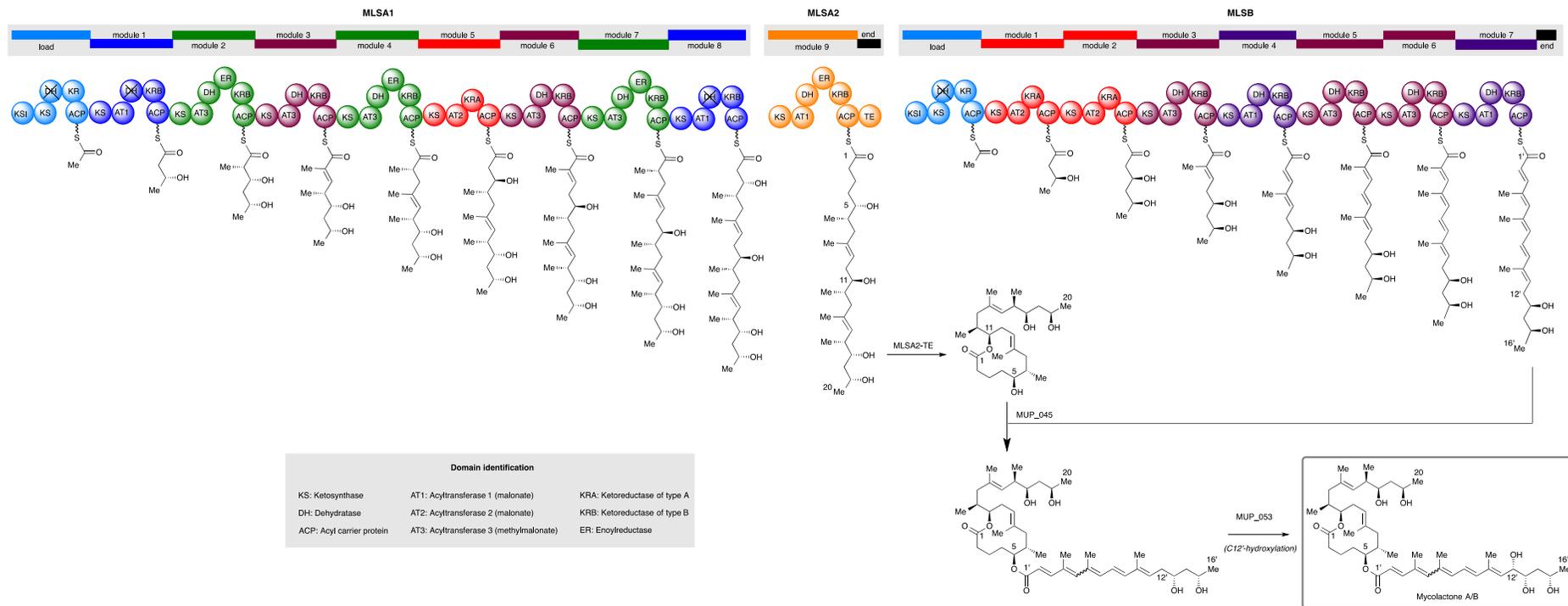


Figure 9 : Représentation de la biosynthèse de la mycolactone A/B avec modélisation des différents modules des polycétides synthases *mIsA1*, *mIsA2* et *mIsB*.³ Figure reproduite de la réf. 3 avec permission.
 Copyright 2013 – *Natural Product Reports*

Ainsi, la variété structurelle de la chaîne inférieure des mycolactones est causée par des changements dans l'enzyme *misB* : des plasmides différents de celui de *M. ulcerans* ont été découverts dans le génome d'autres bactéries produisant des mycolactones (*M. liflandii* et *M. marinum*).⁵³ Ces plasmides, nommés pMUM002 et pMUM003, présentent des différences dans le gène codant la chaîne inférieure ce qui amène alors à une grande opportunité de recombinaison sur ces gènes. Par exemple, dans le cas de mycolactone D, le domaine AT du module 7 de *misB* a été modifié : un groupement propionate est intégré à la chaîne au lieu d'une unité d'acétate, expliquant le groupement méthyle supplémentaire à la mycolactone D en position C2'.⁵⁴ En ce qui concerne les mycolactones E et F, des modifications au niveau du module de chargement AT et la suppression d'un module d'extension expliquent leur formation (Figure 10).

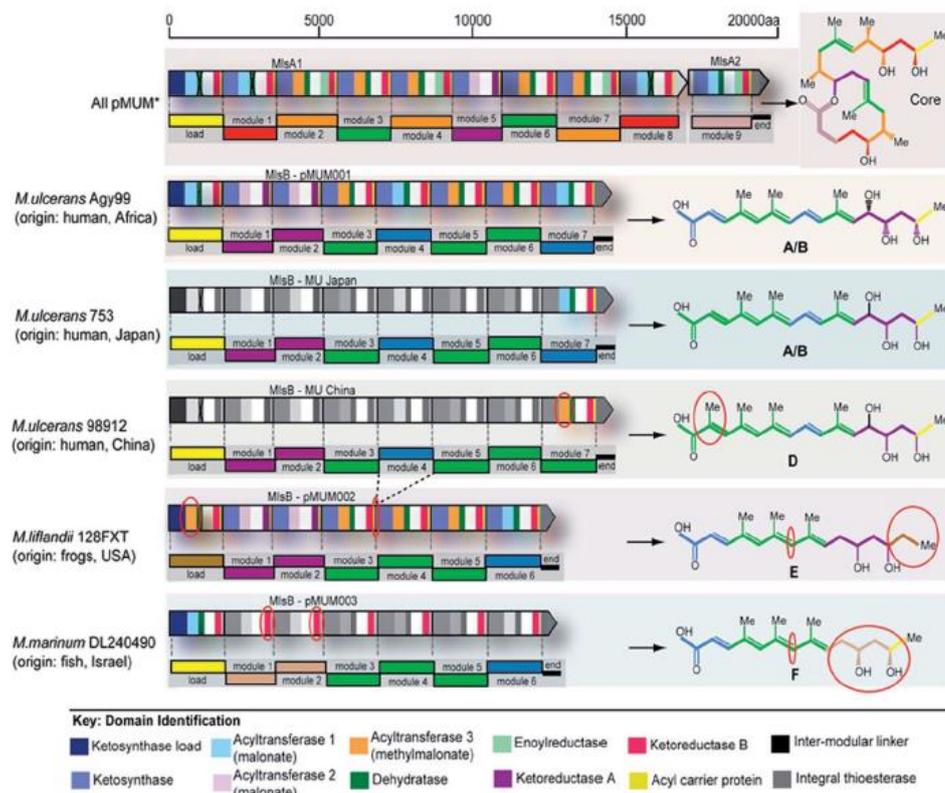


Figure 10 : Représentation schématique de la biosynthèse des différentes mycolactones par les plasmides pMUM001, pMUM002 et pMUM003.⁵³ Figure reproduite de la réf. 53 avec permission. Copyright 2008 – BMC Genomics

L'analyse comparative de l'ensemble des séquences génomiques de *M. ulcerans* et d'autres mycobactéries productrices de mycolactones (*M. marinum*, *M. pseudoshottsii*, *M. shinshuense* et *M. liflandii*) révèle alors quelques différences sur les séquences d'insertions acquises au cours de leur évolution.⁵⁵ En effet, les multiples copies de séquences d'insertions sont connues pour promouvoir des réarrangements dans le génome et donc la formation de gènes inactifs.⁵⁶ Deux lignées distinctes ont cependant pu être caractérisées : l'une des lignées est dite « classique » tandis que l'autre est appelée « ancestrale ». Les mycobactéries isolées d'Australie et d'Afrique sont incluses dans le lignage classique tandis que les isolats du Japon, de la Chine, du Mexique, du Surinam et de la Guinée française sont inclus dans la lignée ancestrale.⁵⁷ Ces données sont cohérentes avec les différences intercontinentales des souches isolées.^{11,12,58} En effet, les lignées ancestrales sont génétiquement plus proches de l'ancêtre commun, *M. marinum*, et sont moins virulentes que la lignée classique indiquant alors le possible impact du nombre de cette IS sur la virulence et donc sur l'adaptation des

souches à un nouvel environnement. Néanmoins, même si toutes les mycobactéries produisant des mycolactones n'expriment pas un phénotype totalement similaire, il a été décidé de toutes les appeler *M. ulcerans*, considérant que le génome de ces espèces est fortement comparable et évitant ainsi toute confusion sur les différentes nomenclatures.⁵⁹

La découverte de la structure chimique de la mycolactone A/B en 1999 par Small ainsi que l'élucidation de son processus de formation par la mycobactérie ont éveillé l'intérêt d'un autre domaine de recherche, la chimie. En effet, la structure atypique de la mycolactone A/B a fortement intrigué la communauté des chimistes. Plusieurs groupes de recherche en ont rapporté sa synthèse totale et/ou partielle dans le but notamment de confirmer et/ou d'élucider cette structure complexe, mais également pour illustrer des méthodologies synthétiques.

1. 3. Synthèses totales de la mycolactone A/B

La mycolactone A/B est un macrolide complexe caractérisé notamment par dix centres stéréogènes, une chaîne pentaénique et un fragment macrolactonique à 12 chaînons. Ce défi synthétique a attiré l'attention de divers groupes de recherche spécialisés dans la synthèse des produits naturels. Dans ce sous-chapitre focalisé sur la chimie de la mycolactone A/B, les efforts de synthèse des groupes de Kishi, Negishi, et Altmann seront discutés. Les découvertes et développements synthétiques récents rapportés par Kishi et Aggarwal seront également abordés. En raison des travaux étendus déjà publiés dans ce domaine, tous les aspects de la synthèse ne seront pas discutés ici : seules des considérations générales seront prises en considération, les importantes différences conceptuelles seront décrites et les points forts synthétiques seront présentés.

Par ailleurs, il est également important de noter que d'autres groupes ont présenté des synthèses partielles des mycolactones. Des efforts sur la chaîne inférieure C1'-C16' ont été rapportés par Gurjar et Cherian en 2001⁶⁰ ainsi que par Minnaard et Feringa en 2005.⁶¹ Une synthèse partielle du fragment macrolactonique C1-C20 a été développée par Burkart en 2006 et 2010.⁶² De plus, entre 2004 et 2012, Kishi a publié de façon consécutive la synthèse des mycolactones C (2004),^{44a} E,^{44b} F,^{44c} et *dia*-F (2008),^{44c} du métabolite mineur de E (2010)^{44d} et des mycolactones S1 et S2 (2012).^{44e} Les synthèses partielles de la mycolactone A/B et la synthèse totale des autres mycolactones (C, D, E et son métabolite mineur, F, *dia*-F, S1 et S2) ne seront pas présentées.

1.3.1 *Présentation des stratégies synthétiques précédemment développées pour la synthèse totale de la mycolactone A/B*

Dès 2001, Kishi rapporte la synthèse du fragment C1-C20 des mycolactones ainsi que la synthèse de composés modèles des chaînes supérieure et inférieure de la mycolactone A/B qu'il utilise pour déterminer la stéréochimie de la toxine naturelle.^{41,42,40} Cette première étude de la chimie de la mycolactone A/B a été suivie par des synthèses totales : trois générations par Kishi en 2002,⁴³ 2007⁶³ et 2010,⁶⁴ puis celles développées en 2011 par Negishi,⁶⁵ et par Altmann cette même année.⁶⁶ Bien que les synthèses développées par ces trois groupes pour l'obtention de la mycolactone A/B mettent en jeu une chimie différente, l'étape logique d'estérification finale entre le fragment macrolidique C1-C20 **1** et la chaîne inférieure C1'-C16' **2** reste commune (Schéma 1).

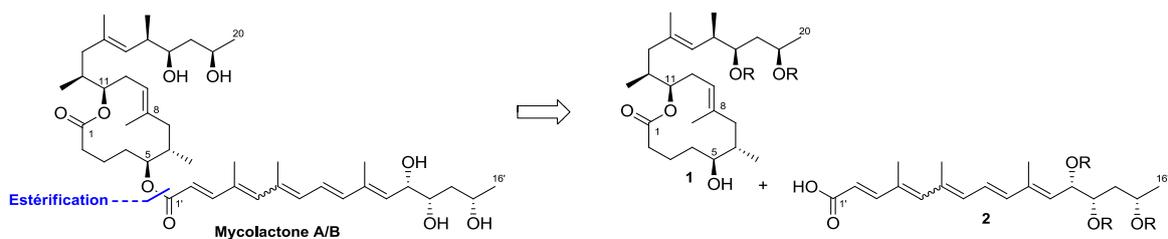


Schéma 1 : Analyse rétrosynthétique de la formation de la mycolactone A/B commune aux synthèses totales de Kishi, Negishi et Altmann

L'obtention du fragment macrolactonique **3** a, quant à lui, fait l'objet de différentes stratégies de synthèse, dont les principales déconnexions sont récapitulées sur le schéma 2. Deux de ces stratégies font intervenir une déconnexion en C13-C14 du fragment macrolidique à partir d'une réaction de couplage pallado-catalysée, alors que la dernière, développée par le groupe de Negishi, repose sur une réaction de macrolactonisation d'un intermédiaire avancé. Dans le groupe de Kishi, l'obtention de **3** est réalisée par la création de la liaison σ C13-C14 via un couplage croisé pallado-catalysé entre l'iodure vinylique C14-C20 correspondant et l'iodure d'alkyle obtenu après estérification du séco-acide **4**. Ce dernier est obtenu par formation de la liaison σ C7-C8 via un second couplage croisé entre les précurseurs **5** et **6** (Schéma 2, éq. 1). Pour le groupe d'Altmann, le fragment C1-C20 **3** est lui aussi obtenu par création de la liaison σ C13-C14 à l'aide d'un couplage croisé pallado-catalysé mais cette fois-ci entre l'iodure vinylique de la chaîne supérieure correspondant et le dérivé C13-iodé de la macrolactone **10** (Schéma 2, éq. 2). De plus, Altmann choisit de réaliser la formation de cette macrolactone **10** en utilisant, après estérification, une réaction de métathèse cyclisante du diène **11** créant ainsi la liaison π C8-C9. Contrairement aux deux autres groupes, Negishi envisage l'obtention du fragment C1-C20 **3** par estérification du séco-acide **7** portant déjà la chaîne supérieure. Ce dernier provient alors de la construction de la liaison σ C9-C10 via l'ouverture de l'époxyde **8** par le vinyl alane **9** (Schéma 2, éq. 3).

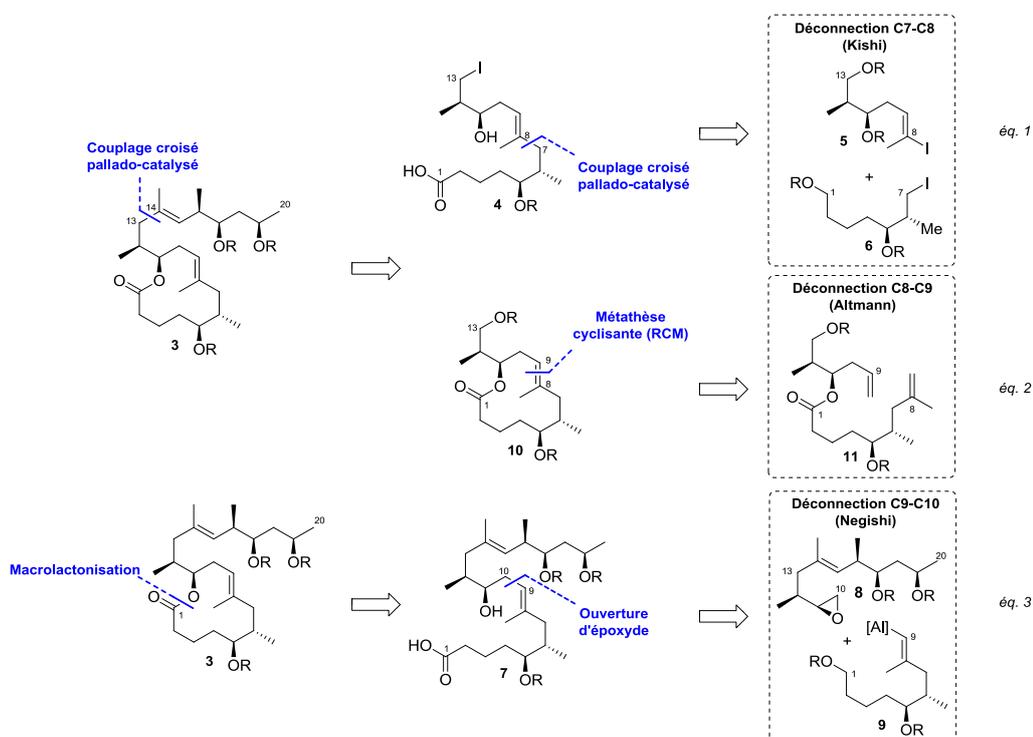


Schéma 2 : Analyses rétrosynthétiques pour l'obtention du fragment C1-C20 par Kishi, Altmann et Negishi

La préparation de la chaîne pentaénique C1'-C16' a été réalisée suivant deux approches distinctes : construction de la liaison π C8'-C9' via une réaction de type Horner-Wadsworth-Emmons entre le phosphonate **12** et l'aldéhyde **13** (Schéma 3, éq. 1) ou création de la liaison σ C7'-C8' par un couplage croisé de type Negishi entre les iodures vinyliques **14** et **15** (Schéma 3, éq. 2).

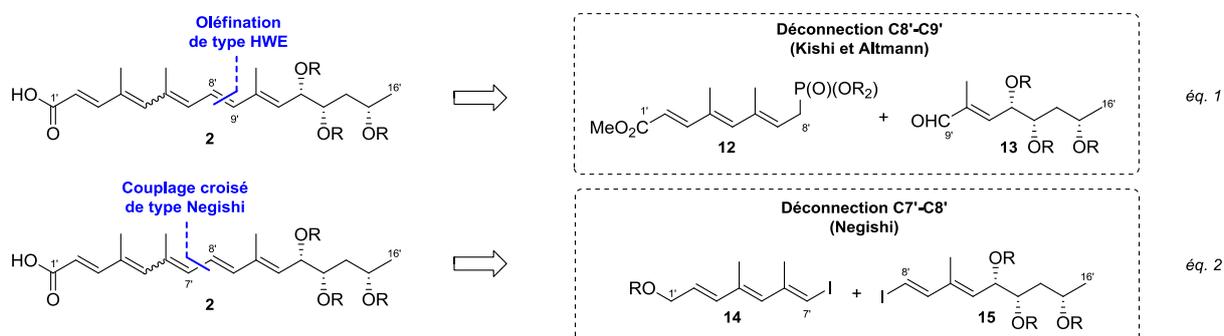


Schéma 3 : Analyses rétrosynthétiques pour l'obtention du fragment C1'-C16' par Kishi, Altmann et Negishi

La synthèse totale de la mycolactone A/B est présentée dans les paragraphes suivants d'un point de vue chronologique : les différentes approches développées par Kishi seront dans un premier temps abordées, suivies par les contributions de Negishi, et enfin d'Altmann.

1.3.2 Première génération de synthèse totale de la mycolactone A/B par Kishi (2001-2002)

Les déconnexions envisagées pour la première synthèse totale par le groupe de Kishi sont représentées sur la Figure 11.^{41,42,43} Cette approche pionnière repose sur une estérification entre la structure macrocyclique et la chaîne pentaénique C1'-C16', tel que présenté sur le Schéma 1. Il faut souligner que la préparation de l'ester pentaénique C1'-C16' a suivi la stratégie établie par Gurjar et Cherian lors de leur synthèse de la chaîne inférieure en 2001.⁶⁰ Cette synthèse convergente fait également intervenir comme étapes clés des réactions de couplages pallado-catalysés et une réaction de macrolactonisation.

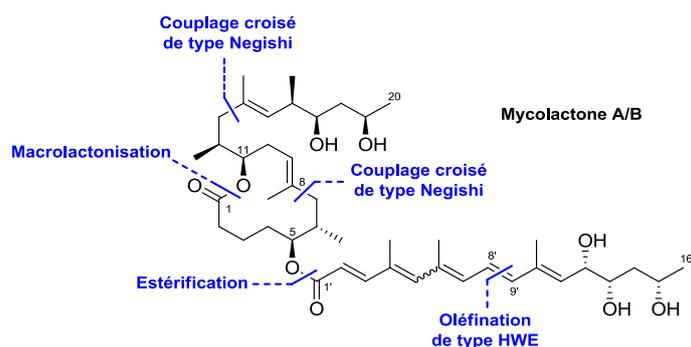


Figure 11 : Déconnexions envisagées pour la première génération de synthèse totale de la mycolactone A/B par Kishi (2001-2002)

1.3.2.1 Préparation des intermédiaires avancés

La formation du fragment macrocyclique C1-C20 a été accomplie par l'équipe de Kishi à partir des trois intermédiaires avancés **18**, **21** et **24**, dont leur synthèse est décrite par les équations 1, 2 et 3 du Schéma 4. Pour arriver à ces composés d'une certaine complexité, la stratégie adoptée a été de

partir de produits de départ permettant de fixer au moins un centre asymétrique mais surtout d'utiliser des réactions asymétriques permettant de créer de nouveau centres stéréogènes. Pour exemples, la crotylboration asymétrique de Brown⁶⁷ a été utilisée pour le passage de **16** à **17**, ou encore la réaction d'hydrozirconation de Schwartz⁶⁸ fixant, après iodolyse, la stéréochimie des iodures vinyliques **21** et **24**.

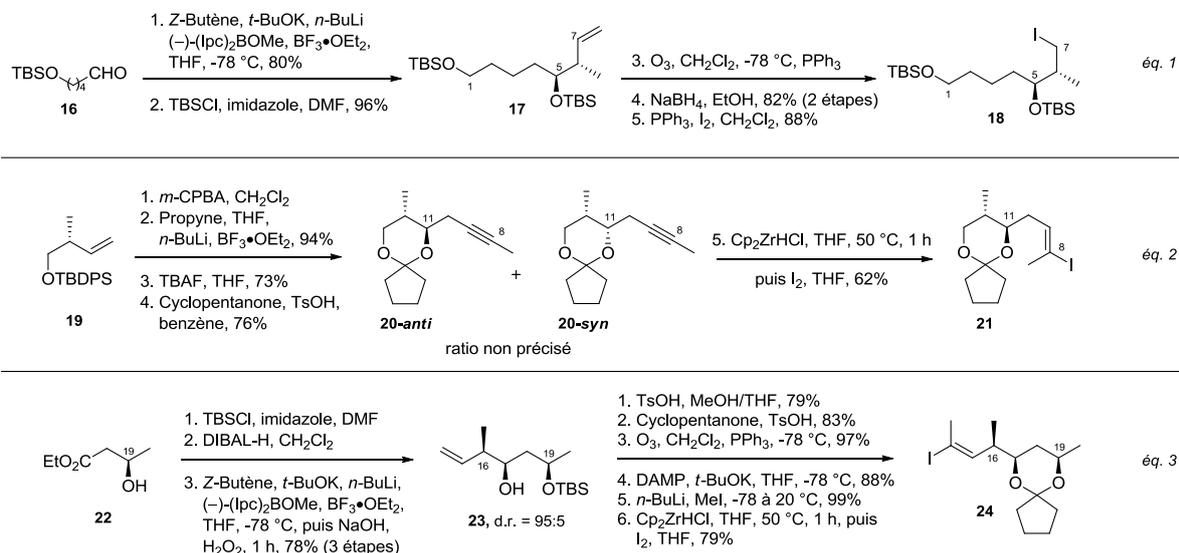


Schéma 4 : Synthèses des intermédiaires avancés **18**, **21** et **24** en vue de la formation du fragment macrocyclique par Kishi (2001-2002)

1.3.2.2 Préparation du fragment C1-C20

L'iodure de vinyle **21** est ensuite couplé à l'iodure d'alkyle **18** grâce à une réaction de couplage croisé pallado-catalysé de type Negishi^{69,70} afin de construire l'alcène **25** avec un rendement modéré (Schéma 5). Ce dernier est transformé en **26** après cinq étapes successives, impliquant l'hydrolyse en conditions acides de l'acétal cyclique, la protection de l'alcool primaire avec le chlorure de pivaloyle, la protection par un groupement TES de l'alcool secondaire, la déprotection de l'alcool primaire suivie finalement de sa conversion en iodure d'alkyle correspondant. Une deuxième réaction de couplage croisé de type Negishi entre **26** et l'intermédiaire précédemment synthétisé **24** a été choisie pour l'accès au précurseur linéaire C1-C20. Une déprotection mettant en jeu HF-pyridine a ensuite été appliquée pour la déprotection des fonctions alcools positionnées en C1 et C11. L'alcool primaire en C1 subit ensuite une première oxydation avant d'engager l'aldéhyde correspondant dans une deuxième oxydation, dite oxydation de Lindgren-Pinnick,⁷¹ permettant ainsi la formation du séco-acide **27**. Enfin, la structure macrocyclique **28** a été obtenue par macrolactonisation dans les conditions de Yamaguchi⁷² suivie par les déprotections successives des alcools avant la re-protection du 1,3-diol. Cette dernière étape s'explique par le fait que, dans sa première génération de synthèse, Kishi s'appuie sur la structure macrolactone C1-C20 précédemment synthétisée pour la détermination de la stéréochimie de la molécule.⁴¹ Le 1,3-diol C17/C19 est alors sélectivement protégé par un acétal cyclique afin de pouvoir effectuer ensuite la réaction d'estérification de la fonction hydroxyle en C5 avec la chaîne inférieure C1'-C16'.

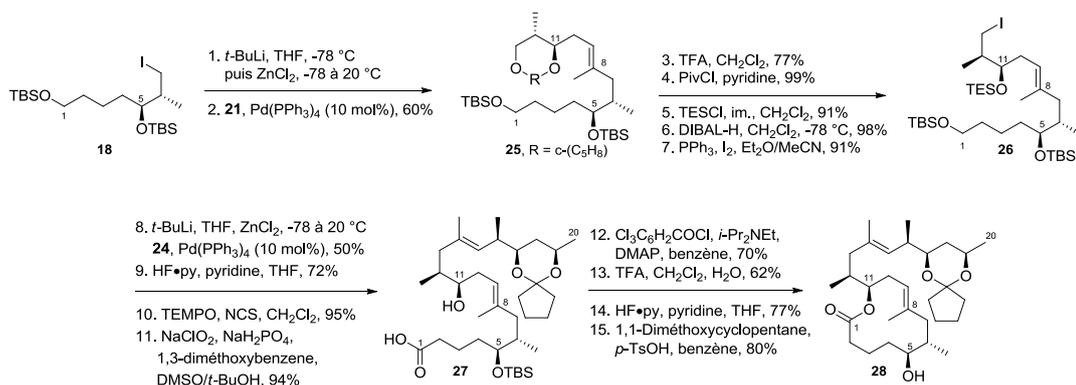


Schéma 5 : Synthèse du fragment C1-C20 par Kishi (2001-2002)

1.3.2.3 Préparation du fragment C1'-C16'

Pour la synthèse de la chaîne latérale C1'-C16', la stratégie de Kishi, présentée dans le Schéma 6 consiste à coupler le phosphonate triénique C1'-C8' **30** avec le fragment trihydroxylé C9'-C16' **31** grâce à une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons.

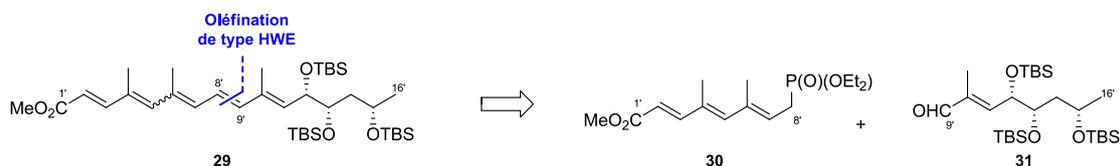


Schéma 6 : Analyse rétrosynthétique du fragment C1'-C16' par Kishi (2001-2002)

Quelques modifications à la synthèse décrite Gurjar et Cherian ont été appliquées.⁶⁰ En effet, à la place du 4,6-didéoxy-D-glucose comme « pool chiral », la synthèse commence ici avec l'aldéhyde énantiomériquement pur connu **32**.⁷³ Ce dernier est soumis à une oléfination de Horner-Wadsworth-Emmons, suivie d'une réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless⁷⁴ permettant d'obtenir le diol **33** avec une diastéréosélectivité modeste. Une séquence de six étapes successives fournit l'aldéhyde α,β -insaturé **31**, premier partenaire pour la formation de la chaîne pentaénique (Schéma 7). Il est à noter que le choix des groupements protecteurs pour les fonctions alcools s'est porté sur des éthers silylés, au lieu d'éthers de benzyle comme dans la synthèse initiale de Gurjar et Cherian,⁶⁰ pour des raisons de conditions de déprotections plus douces lors des étapes finales.

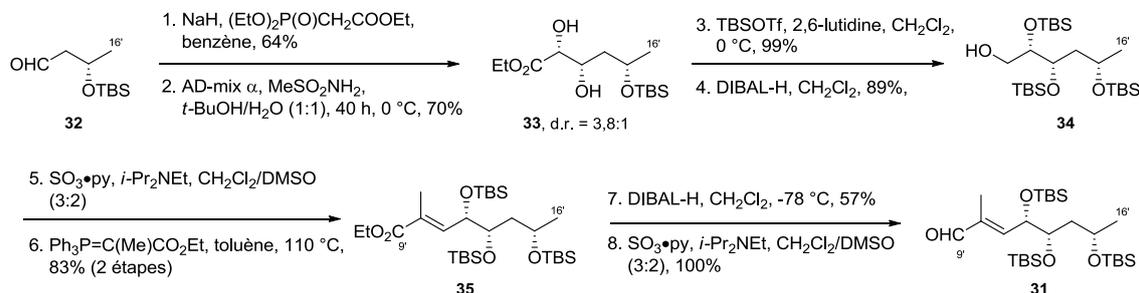


Schéma 7 : Synthèse de l'aldéhyde C9'-C16' par Kishi (2001-2002)

Le second partenaire est préparé à partir de l'alcool allylique **36** en douze étapes par une stratégie itérative de réactions d'oxydation/oléfination/réduction (Schéma 8). L'alcool primaire du

triène **39** est ensuite converti en bromure allylique, et une réaction d'Arbuzov⁷⁵ permet d'installer le phosphonate désiré, conduisant au composé **30**.

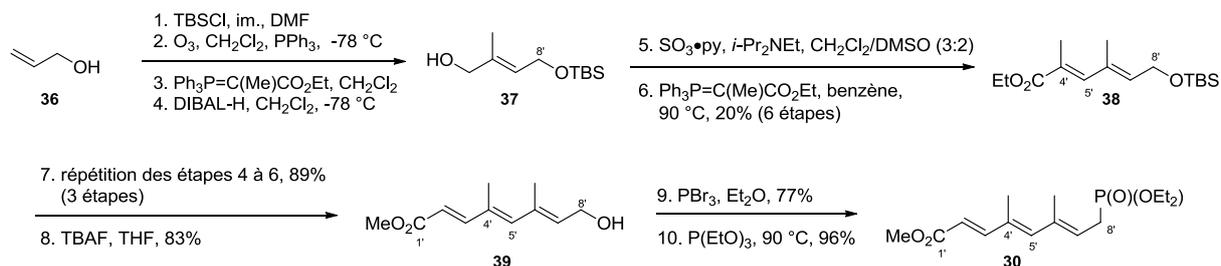


Schéma 8 : Synthèse du phosphonate C1'-C8' par Kishi (2001-2002)

Le couplage des deux fragments **30** et **31** par une réaction de type Horner-Wadsworth-Emmons conduit à l'ester pentaénique **29** avec un rendement de 94% (Schéma 9). L'ester obtenu est un mélange d'isomères géométriques (E - $\Delta^{4'-5'}$ / Z - $\Delta^{4'-5'}$ /2 autres isomères = 73:17:7:3), confirmé par des expériences en RMN du proton. Ce mélange inséparable d'isomères a été soumis à une photoisomérisation conduisant à un nouveau mélange (E - $\Delta^{4'-5'}$ / Z - $\Delta^{4'-5'}$ /2 autres isomères = 36:52:4:5) avec 3% de deux autres isomères minoritaires : il est intéressant de noter que le ratio a changé en faveur de l'isomère Z . Une simplification sur la notation du mélange d'isomères amène donc au ratio proche de l'état d'équilibre de la toxine naturelle, à savoir un mélange Z - $\Delta^{4'-5'}$ / E - $\Delta^{4'-5'}$ = 60:40. La saponification de l'ester permet finalement d'obtenir l'acide **40**, dont les deux isomères majoritaires sont séparables à ce stade.

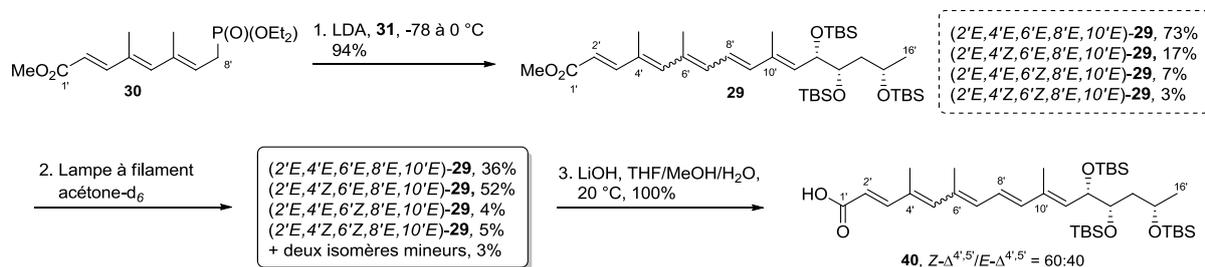


Schéma 9 : Synthèse de la chaîne inférieure C1'-C16' par Kishi (2001-2002)

1.3.2.4 Assemblage final

Bien qu'en apparence facile à mettre en œuvre, les dernières étapes permettant la formation de la mycolactone A/B se sont révélées complexes pour le groupe de Kishi. En effet, après un criblage de conditions classiques d'estérification (EDCI/DMAP et BOP/DMAP) n'ayant pas conduit au produit désiré, Kishi utilise alors les conditions de Yamaguchi pour estérifier l'acide carboxylique **40** avec le fragment macrolactonique **28**.⁷² L'étape de déprotection finale est, dans un premier temps, effectuée avec du HF•pyridine dans l'acétonitrile mais conduit à la formation de nombreux produits secondaires avec seulement 5 à 10% de mycolactone A/B. La raison invoquée serait l'instabilité présumée du système polyénique et les possibles additions d'oxy-Michael sur la chaîne inférieure dans des conditions acides. Une séquence en deux étapes est alors mise au point, consistant en une déprotection des éthers silylés par TBAF suivie de l'utilisation d'une solution acide aqueuse pour libérer le 1,3-diol de la chaîne supérieure. Toutefois, la déprotection de l'acétonide conduisant également à des produits de dégradation, cette dernière étape n'est menée qu'à 60% de conversion.

Le triol est séparé puis réengagé en réaction de déprotection afin d'obtenir, au final, la mycolactone A/B avec 67% de rendement (Schéma 10).

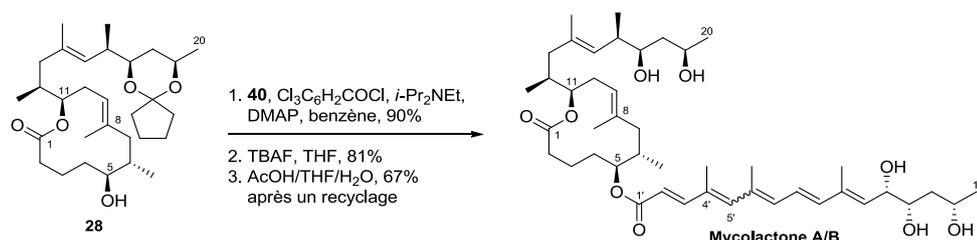


Schéma 10 : Etapes finales de la formation de la mycolactone A/B par Kishi (2001-2002)

Les analyses RMN proton et carbone de cette mycolactone A/B synthétique permettent de confirmer que la toxine obtenue par voie chimique est bien identique à la toxine naturelle. Toutefois, une version améliorée de cette première approche de la mycolactone A/B a été publiée en 2007 par Kishi.

1.3.3 Deuxième génération de synthèse totale de la mycolactone A/B par Kishi (2007)

Dans le but d'améliorer l'efficacité de sa synthèse, Kishi a mis au point une nouvelle stratégie en prenant notamment en compte les problèmes de groupements protecteurs rencontrés lors de la première génération.⁶³ En effet, après les difficultés révélées lors de la déprotection finale du groupement acétal dans la synthèse précédente, Kishi choisit de remplacer la protection du 1,3-diol par des groupements protecteurs de type éther silylé. Par ailleurs, la préparation du fragment C1-C20 met également en jeu une séquence différente d'intermédiaires laissant place à une optimisation en termes de nombre d'étapes, de sélectivité et d'efficacité (Schéma 11).

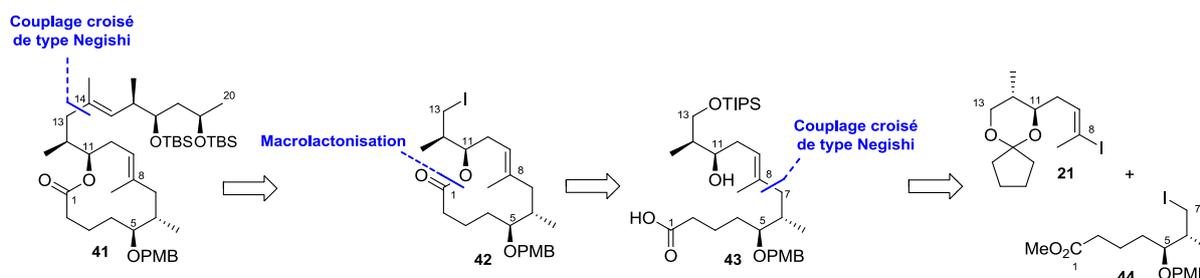


Schéma 11 : Analyse rétrosynthétique du fragment C1-C20 de la deuxième génération de synthèse par Kishi (2007)

1.3.3.1 Préparation des intermédiaires avancés

Les synthèses des fragments C14-C20 **50** et C1-C7 **44** ont subi quelques modifications mais restent toutefois très similaires à celles de la première approche (Schéma 12, éq. 1 et éq. 3). L'éther silylé en position C5 a été remplacé par un groupement benzylique (PMB), afin de pouvoir déprotéger sélectivement cette position. De plus, le carbone C1 est oxydé sous forme d'ester limitant ainsi le nombre d'étapes d'oxydation après le couplage croisé. Au contraire, la synthèse du fragment C8-C13 a été totalement revue afin d'éviter la réaction d'époxydation non sélective utilisée dans la synthèse précédente. En effet, cette nouvelle voie synthétique permet, cette fois-ci, l'obtention de l'alcyne **48** énantiomériquement pur. Ce dernier est ensuite soumis à des réactions de changement

de groupement protecteur avant d'effectuer une réaction d'hydrozirconation de Schwartz conduisant à **21** avec un rendement de 62% (Schéma 12, éq. 2).

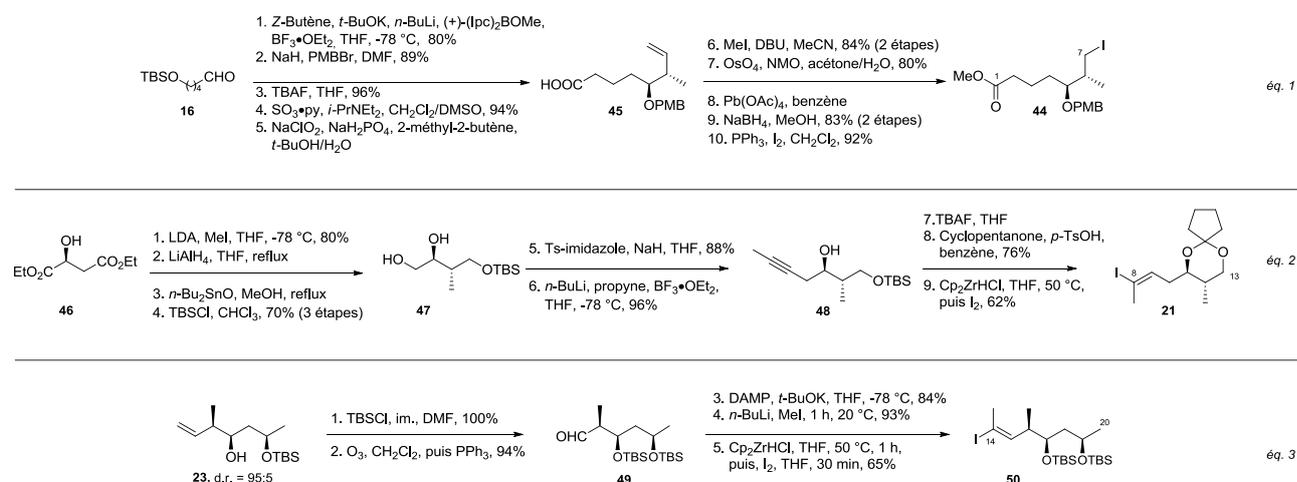


Schéma 12 : Synthèses des intermédiaires avancés **18**, **21** et **24** en vue de la formation du fragment macrocyclique par Kishi (2007)

1.3.3.2 Préparation du fragment C1-C20 et assemblage final

Les trois intermédiaires avancés ainsi synthétisés sont ensuite couplés pour former la mycolactone A/B synthétique (Schéma 13). Les conditions utilisées pour le couplage des fragments C1-C7 **44** et C8-C13 **21** ont été adaptées pour être compatibles avec la fonction ester de l'iode d'alkyle du premier partenaire. L'utilisation du couple Zn-Cu permet l'insertion du zinc dans la liaison sigma C7-I dans des conditions relativement douces, évitant ainsi l'emploi de *n*-BuLi. De plus, l'application du système catalytique légèrement modifié de Corey, à savoir l'utilisation de palladium(0) et LiCl dans un solvant aprotique polaire, délivre le produit de couplage désiré avec un excellent rendement.⁷⁶ L'intermédiaire couplé ainsi obtenu est transformé en séco-acide **43** à la suite de trois étapes successives avant d'être ensuite soumis aux conditions de Yamaguchi dans l'étape de macrolactonisation. L'alcool primaire en C13 du macrocycle est déprotégé puis converti en iode d'alkyle par une réaction d'Appel.⁷⁷ La macrolactone **42** résultante est alors couplée avec le fragment C14-C20 **50** dans les mêmes conditions que précédemment. L'alcool en position C5 du fragment C1-C20 est ensuite déprotégé en condition oxydante, conduisant à **51**, puis estérifié avec la chaîne C1'-C16' **40** dont la synthèse n'a pas été modifiée. La déprotection globale par le TBAF conduit à la mycolactone A/B avec de très bons rendements, démontrant la supériorité des éthers silylés par rapport aux cétales en tant que groupements protecteurs dans le cadre de la synthèse de mycolactones.

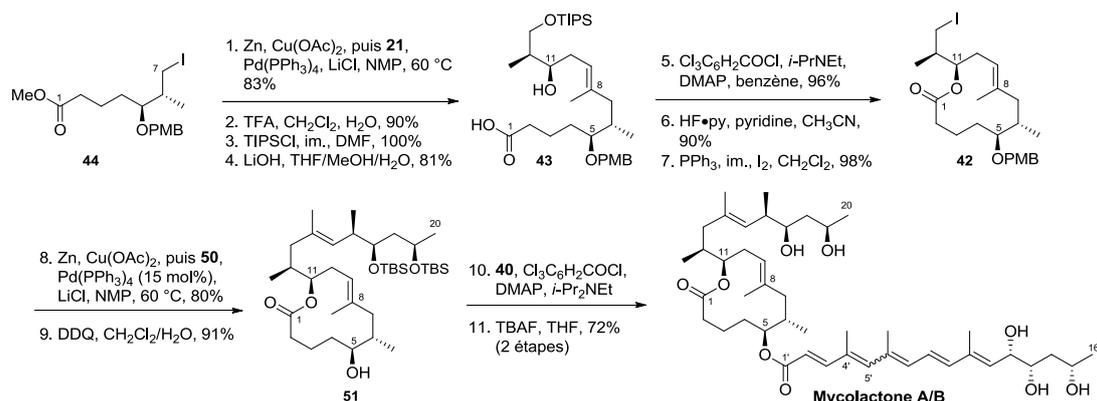


Schéma 13 : Etapes finales de la formation de la mycolactone A/B par Kishi (2007)

Malgré les améliorations conséquentes qu'apporte cette deuxième génération de synthèse, Kishi développe trois ans plus tard une troisième approche en mettant l'accent sur la diminution du nombre d'étapes pour une application à plus grande échelle.

1.3.4 Troisième génération de synthèse totale de la mycolactone A/B par Kishi (2010)

Une troisième génération de synthèse des mycolactones est publiée par Kishi en 2010 utilisant exactement les mêmes déconnexions que la seconde génération.⁶⁴ Néanmoins, cette dernière se trouve être plus efficace et permet notamment de produire le fragment macrolactonique sur l'échelle du multigramme. Des voies synthétiques nouvelles ont été conçues afin d'obtenir les fragments clés **44**, **21** et **50** avec un rendement élevé ; ces dernières sont décrites dans les paragraphes ci-dessous.

1.3.4.1 Préparation des intermédiaires avancés

Le fragment C1-C7 **44** est préparé de façon similaire à la première génération de synthèse. Toutefois, il est à souligner que l'aldéhyde **52** de départ possède déjà le carbone C1 à l'état d'oxydation d'un acide carboxylique, permettant une économie d'étape. Ce dernier subit une réaction de crotylboration asymétrique de Brown conduisant à l'hydroxy-ester **53** avec un excès énantiomérique de 86%. Après la protection catalysée par le triflate de scandium de l'alcool nouvellement formé en éther de *p*-méthoxybenzyle, l'oléfine terminale est convertie en iodure d'alkyle **44** en quatre étapes avec 65% de rendement (Schéma 14).

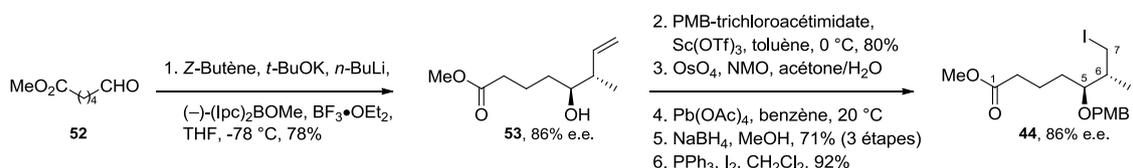


Schéma 14 : Synthèse de l'intermédiaire avancé C1-C7 par Kishi (2010)

Pour des raisons de sélectivité modérées lors des approches précédentes, la synthèse du fragment C8-C13 **21** a été totalement revue. Après hydroalumination régio- et stéréosélective du diyne-1,4 **54**, l'alcool allylique **55** obtenu est engagé dans une réaction d'époxydation asymétrique de Sharpless conduisant à l'époxyde α -hydroxylé **56** avec un excès énantiomérique de 80%. Ce dernier

est ouvert de manière stéréosélective par un cuprate d'ordre supérieur⁷⁸ afin de fixer la stéréochimie du carbone C12. Le diol libéré est protégé sous forme d'acétal, délivrant l'alcyne interne **20-anti** qui est converti en iodure vinylique par une réaction d'hydrozirconation de Schwartz suivie d'une iodolyse. Après quelques optimisations sur le mode d'obtention du réactif de Schwartz, **21** est obtenu avec 68% de rendement sous forme d'un mélange 22:1 de régioisomères **21/57** (Schéma 15).

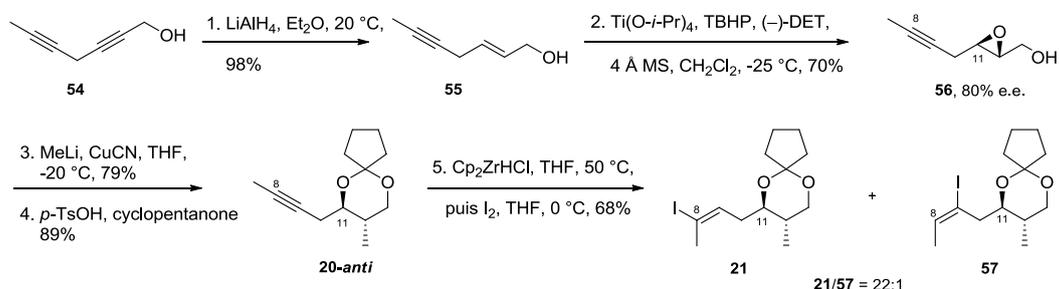


Schéma 15 : Synthèse de l'intermédiaire avancé C8-C13 par Kishi (2010)

Le fragment C14-C20 **50** est obtenu via une nouvelle stratégie s'appuyant sur des réactions de catalyse asymétrique pour fixer les centres stéréogènes en C16 et C17 (Schéma 16). En effet, l'époxyde énantiopur **58** est converti en cinq étapes en ényne **60** avant de subir une réaction d'époxydation asymétrique catalysée au titane en présence du ligand de Katsuki **62**,⁷⁹ conduisant à l'époxyde propargylique **61** avec un bon rendement et une diastéréosélectivité de 50:1. Après ouverture régio- et stéréosélective de **61** et protection de l'alcool libéré, l'alcyne obtenu subit une hydrozirconation/iodolyse permettant d'accéder à l'iodure vinylique **50**.

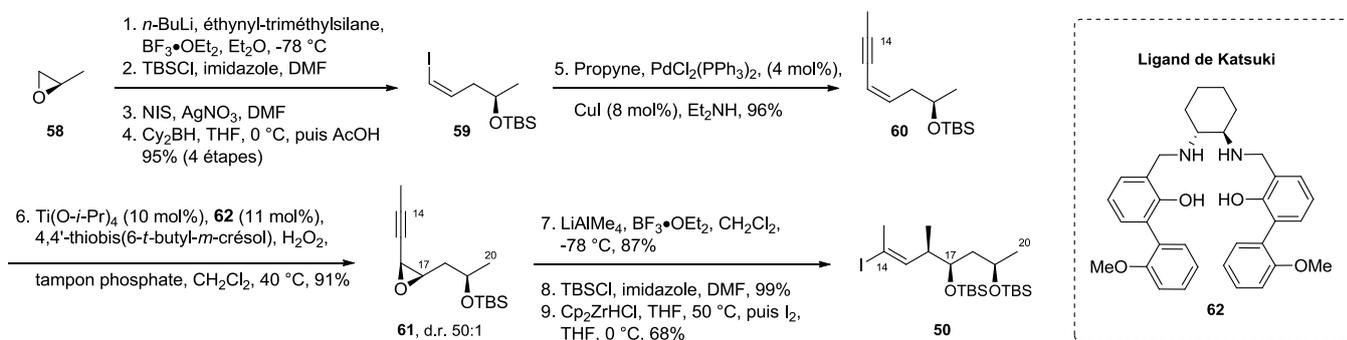


Schéma 16 : Synthèse de l'intermédiaire avancé C14-C20 par Kishi (2010)

1.3.4.1 Préparation du fragment C1-C20 et assemblage final

Les fragments C1-C7 **44** et C8-C13 **21** sont ensuite couplés dans les conditions développées lors de la seconde génération de synthèse. Il faut souligner que la formation de la liaison σ C7-C8 est obtenue avec un très bon rendement malgré la formation de diastéréoisomères minoritaires. Des étapes successives de protection/déprotection amènent au séco-acide **43**. Ce dernier est estérifié dans les conditions de Yamaguchi permettant alors d'obtenir le macrocycle **63** énantiomériquement pur. En effet, l'un des diastéréoisomères minoritaires, obtenu suite au couplage des fragments C1-C7 **44** et C8-C13 **21**, est éliminé par chromatographie après déprotection de l'acétal, et le second est séparé à ce stade de la synthèse. **63** est ensuite converti en iodure d'alkyle avant le couplage avec le fragment C14-C20 **50** dans les conditions optimisées de la deuxième génération de synthèse. Une étape supplémentaire de déprotection au DDQ conduit alors au fragment C1-C20 **51**, prêt à être estérifié avec la chaîne inférieure **40** (Schéma 17).

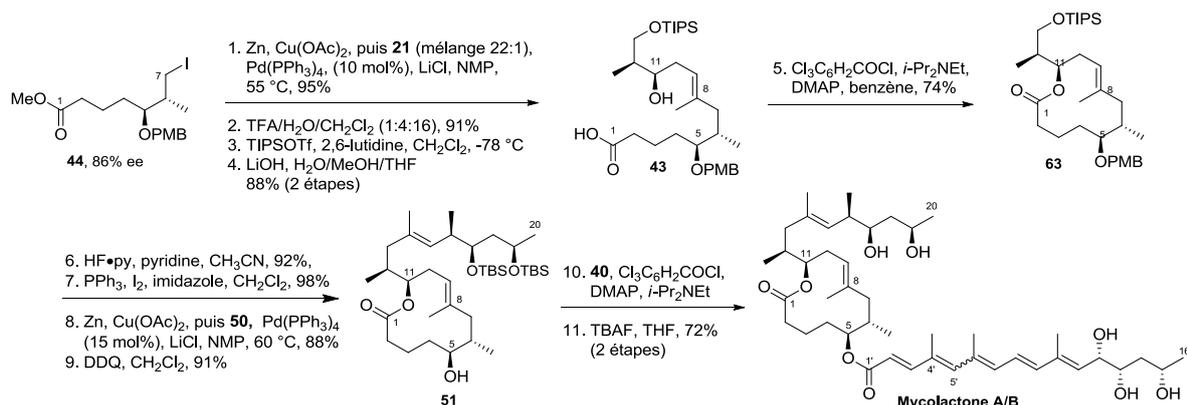


Schéma 17 : Étapes finales de la formation de la mycolactone A/B par Kishi (2010)

Grâce à un choix judicieux des groupements protecteurs, Kishi améliore encore une fois la synthèse totale de la mycolactone A/B. Il est à noter que cette approche a notamment permis la préparation de 6 grammes du composé **51**-C5-OPMB en 14 étapes linéaires avec un rendement global de 19%. Suite aux trois générations de synthèse rapportées par Kishi, Negishi et Altmann publient également une synthèse totale de la mycolactone A/B en 2011. Ces efforts sont présentés dans les sous-chapitres suivants.

1.3.5 Synthèse totale de la mycolactone A/B par Negishi (2011)

Les déconnexions de la mycolactone A/B pour la synthèse totale décrite par le groupe de Negishi en 2011 sont représentées sur la Figure 12.^{65a} Après avoir publié en 2006 une synthèse de la chaîne latérale C1'-C16' des mycolactones A/B,^{65b} Negishi publie une synthèse totale efficace dont les efforts ont été tournés vers le développement d'une voie synthétique hautement stéréosélective (supérieure à 98%). Cette dernière s'appuie notamment sur l'utilisation de réactions stéréosélectives pallado-catalysées et alumino-dirigées, et permettant également la formation sélective de la mycolactone A et de la mycolactone B. Par ailleurs, la synthèse repose là encore sur une étape finale d'estérification entre l'alcool en position C5 du fragment C1-C20 et la chaîne inférieure C1'-C16' sous forme d'acide carboxylique. Cependant, les déconnexions envisagées pour l'obtention de ces deux intermédiaires avancés diffèrent de celles décrites par Kishi.

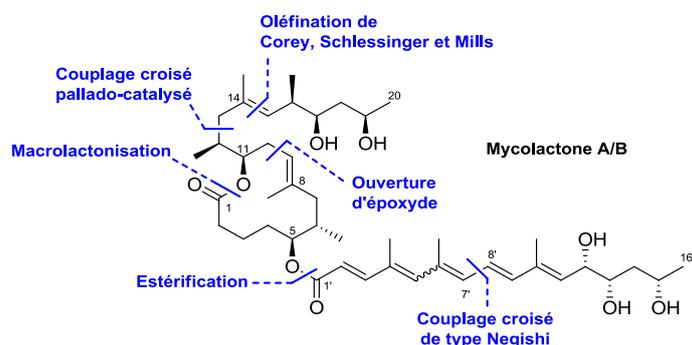


Figure 12 : Déconnexions envisagées pour la synthèse totale de la mycolactone A/B par Negishi (2011)

1.3.5.1 Préparation des intermédiaires avancés

Negishi décide de débiter la synthèse du fragment C1-C9 de manière similaire à celle de Kishi en obtenant l'intermédiaire **17** avec une pureté isomérique supérieure à 98%. Après hydroboration de l'oléfine terminale, l'alcool primaire résultant est transformé en aldéhyde puis en dibromo-oléfine via une réaction de Ramirez,⁸⁰ avant sa conversion en alcyne terminal **65** selon la procédure de Corey-Fuchs (Schéma 18).⁸¹

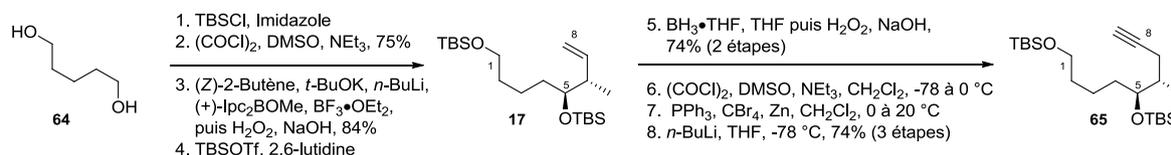


Schéma 18 : Synthèse de l'intermédiaire avancé C1-C9 par Negishi (2011)

Pour la synthèse du deuxième intermédiaire avancé, Negishi a pour produit de départ l'alcène **23**, formé en 4 étapes en suivant la méthode décrite par Kishi pour la synthèse de la chaîne supérieure. Après protection de la fonction alcool, dihydroxylation de l'oléfine terminale et coupure oxydante du diol résultant, l'aldéhyde formé est engagé dans une réaction d'oléfination de Corey, Schlessinger et Mills (oléfination de Peterson modifiée).^{82,83} Cette dernière fait intervenir le dérivé α -lithiosilylimine **70** et conduit ainsi, après traitement acide, à l'aldéhyde α,β -insaturé **66** avec une très bonne sélectivité. La fonction aldéhyde est ensuite convertie en bromure d'alkyle primaire avant d'être engagée dans un couplage croisé pallado-catalysé avec le vinyl-zincique **71**.⁸⁴ Après déprotection du groupement THP, l'alcool allylique **68** obtenu est alors soumis à une réaction d'époxydation asymétrique de Sharpless permettant l'obtention d'un époxy-alcool sous la forme d'un unique diastéreo- et énantiomère. Quelques transformations classiques supplémentaires permettent d'accéder au fragment C10-C20 **69** (Schéma 19).

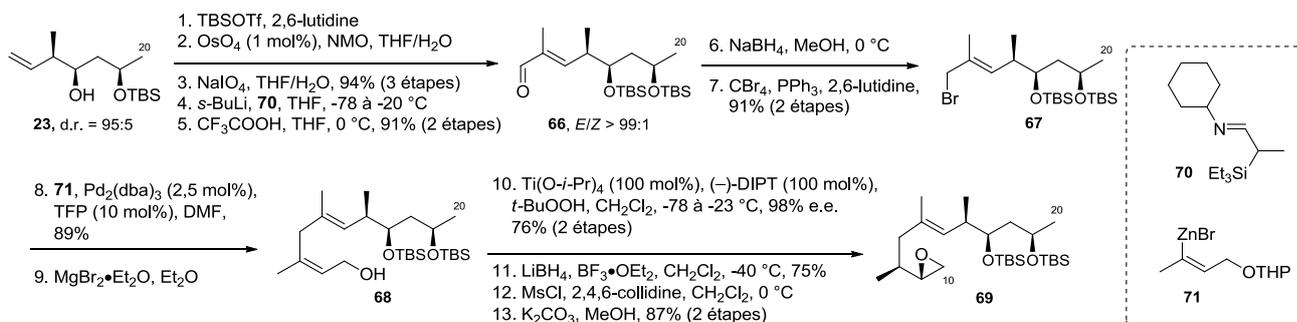


Schéma 19 : Synthèse de l'intermédiaire avancé C10-C20 par Negishi (2011)

1.3.5.2 Préparation du fragment C1-C20

L'assemblage des fragments C1-C7 et C8-C20 a été réalisé par une réaction d'ouverture d'époxyde. Pour cela, l'alcyne terminal **65** est soumis à une réaction de méthyl alumination d'alcyne catalysée au zirconium, et le traitement avec du *n*-BuLi conduit à un intermédiaire de type vinyl-alanate. Ce dernier est capable d'effectuer la réaction d'ouverture de l'époxyde **69** dans des conditions douces, conduisant ainsi au fragment linéaire C1-C20 avec 83% de rendement et une pureté isomérique supérieure à 98%.⁸⁵ Deux étapes supplémentaires conduisent à l'aldéhyde **72** qui est ensuite transformé en acide carboxylique. La macrolactonisation dans les conditions de Yamaguchi⁷² amène au fragment macrolactonique C1-C20 entièrement protégé. Après déprotection

totale de ce dernier, le 1,3-diol C17-C19 est re-protégé sous forme d'acétal afin d'obtenir le fragment C1-C20 **28** prêt à être estérifié avec la chaîne inférieure (Schéma 20).

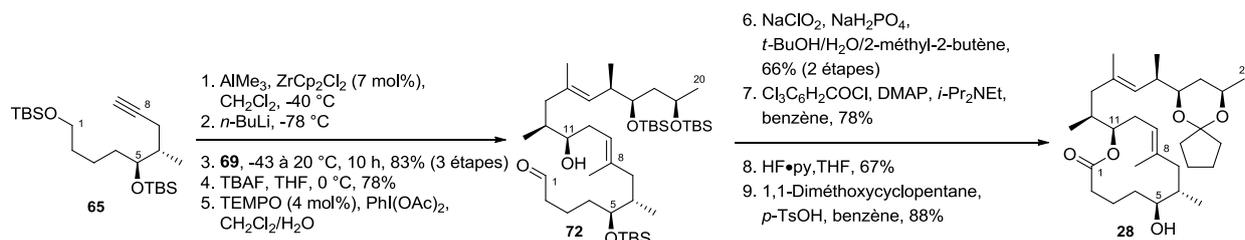


Schéma 20 : Synthèse du fragment C1-C20 par Negishi (2011)

1.3.5.1 Préparation du fragment C1'-C16'

La stratégie de synthèse de la chaîne latérale C1'-C16' est basée sur l'obtention stéréosélective des chaînes inférieures $Z-\Delta^{4'-5'}$ et/ou $E-\Delta^{4'-5'}$ des mycolactones A et B respectivement. En s'appuyant sur ses travaux de 2006,^{65b} le groupe de Negishi prévoit la préparation des chaînes C1'-C16' $Z-\Delta^{4'-5'}$ et $E-\Delta^{4'-5'}$ par un couplage croisé de type Negishi entre l'iodure vinylique ($4'Z$)-**74** ou ($4'E$)-**74** avec le fragment C8'-C16' **75** (Schéma 21).

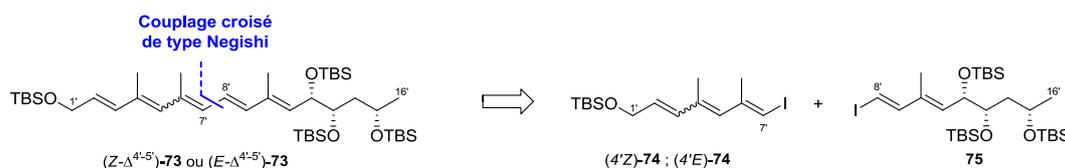


Schéma 21 : Analyse rétrosynthétique du fragment C1'-C16' pour l'obtention sélective de la mycolactone A ($Z-\Delta^{4'-5'}$) ou de la mycolactone B ($E-\Delta^{4'-5'}$) par Negishi (2011)

Un accès indépendant aux fragments C1'-C7' ($4'Z$)-**74** et ($4'E$)-**74** est développé par le groupe de Negishi (Schéma 22). La dernière version rapportée pour la formation du fragment de la mycolactone A est présentée dans l'équation 1.⁸⁶ Le propyne **76** subit une bromoboration suivie d'un couplage croisé avec le vinyl-zincique **79**. L'iodolyse du vinyl-borane résultant conduit alors à l'iodure vinylique **77** qui, après couplage avec le diéthynylzinc **80**, délivre le diène **78**. Ce dernier subit ensuite une méthylalumination suivie d'une iodolyse pour donner le triène ($4'Z$)-**74**, après protection de la fonction alcool. Le fragment C1'-C7' ($4'E$)-**74**, précurseur de la mycolactone B, est obtenu à partir de l'alcool propargylique **81** (éq. 2). Une première séquence d'hydroalumination/iodolyse, réalisée par du réactif de Schwartz préparé *in situ* par traitement de $[Cp_2ZrCl_2]$ avec du DIBAL-H, conduit à un iodure vinylique. Celui-ci est ensuite engagé dans un couplage croisé pallado-catalysé avec le diéthynylzinc **80** amenant à l'alcyne **82**. Une nouvelle itération méthylalumination/iodolyse de la triple liaison est réalisée, suivie du couplage croisé de l'iodure vinylique E formé avec le diéthynylzinc **80**. L'alcyne ainsi obtenu subit une dernière séquence méthylalumination/iodolyse pour conduire, après protection de l'alcool allylique, au triène ($4'E$)-**74**.⁸⁷

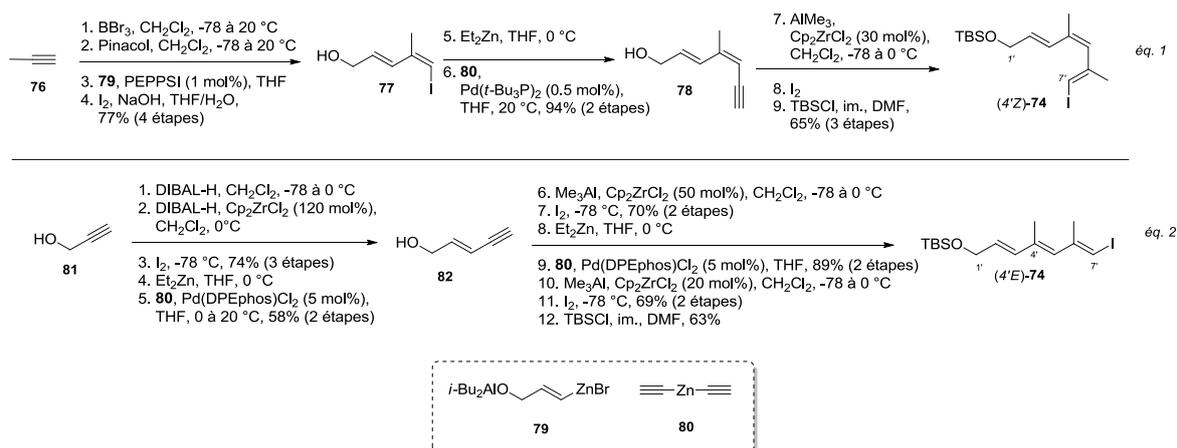


Schéma 22 : Synthèse du fragment C1'-C7' de la mycolactone A (éq. 1) et de la mycolactone B (éq. 2) par Negishi (2011)

La synthèse du fragment commun C8'-C16' **75** est obtenu à partir du (S)-hydroxybutyrate d'éthyle **ent-22** (Schéma 23). Après protection de l'alcool et réduction de l'ester éthylique, l'aldéhyde intermédiaire est engagé dans une réaction de crotylboration asymétrique *syn*-sélective avec l'allylborane **86**. La fonction alcool créée est ensuite protégée sous forme d'éther silylé, conduisant au composé **83** sous la forme d'un unique isomère. Ce dernier est par la suite transformé en dibromo-oléfine **84** avant d'être engagé dans un couplage croisé *trans*-sélectif avec le zincique **87**. S'en suit une méthylation en présence de diméthylzinc délivrant l'alcyne vrai **85** stéréochimiquement pur avec un rendement de 61% après déprotection. Les groupements protecteurs sont ensuite permutés et une séquence finale d'hydrozirconation/iodolyse de l'alcyne terminal permet d'accéder à l'iodure vinylique entièrement silylé **75**.

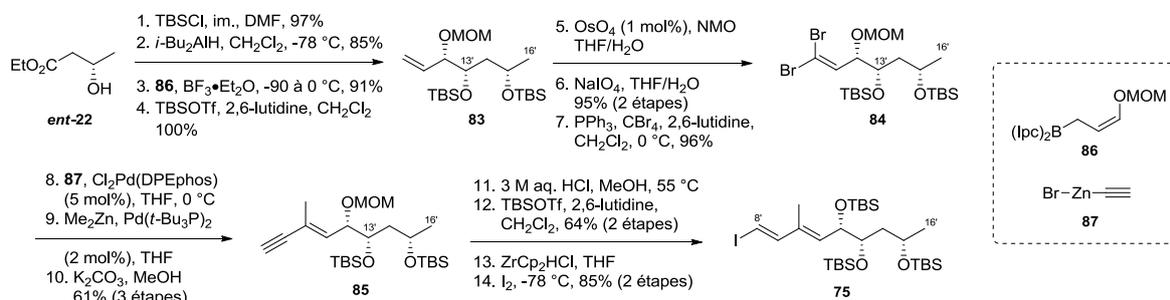


Schéma 23 : Synthèse du fragment commun C8'-C16' de la mycolactone A et la mycolactone B par Negishi (2011)

Les deux fragments C1'-C7' (*4'Z*)-**74** et (*4'E*)-**74** sont assemblés à l'iodure vinylique C8'-C16' **75** par un couplage pallado-catalysé de type Negishi, délivrant alors les deux chaînes pentaéniques $Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ et $E\text{-}\Delta^{4'-5'}$ sous la forme d'un isomère unique (Schéma 24). La déprotection de l'alcool en position allylique, suivie par une oxydation en acide carboxylique via un processus en deux étapes conduit aux fragments C1'-C16' $Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ -**40** et $E\text{-}\Delta^{4'-5'}$ -**40** avec des rendements respectifs de 49% et 44%.

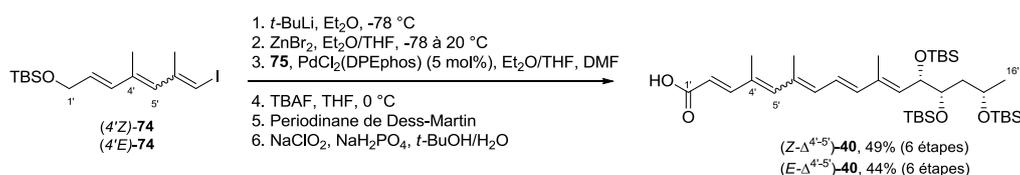


Schéma 24 : Synthèse du fragment C1'-C16' par Negishi (2011)

1.3.5.1 Assemblage final

L'estérification des fragments C1'-C16' Z- $\Delta^{4'-5'}$ -**40** et E- $\Delta^{4'-5'}$ -**40** avec le fragment C1-C20 **28** précédemment synthétisé conduit aux mycolactones A (à partir de Z- $\Delta^{4'-5'}$ -**40**) et B (à partir de E- $\Delta^{4'-5'}$ -**40**) entièrement protégées sous forme d'un seul isomère (Schéma 25). Cependant, le clivage des groupements protecteurs silylés par l'action de TBAF induit une isomérisation de la liaison C4'-C5' dans les deux cas. Après déprotection finale en conditions acides du 1,3-diol, les mycolactones A/B sont obtenues sous la forme d'un mélange légèrement enrichi d'isomères Z- $\Delta^{4'-5'}$ /E- $\Delta^{4'-5'}$ = 1:0,75 et 1:0,82 pour les deux voies de synthèse.

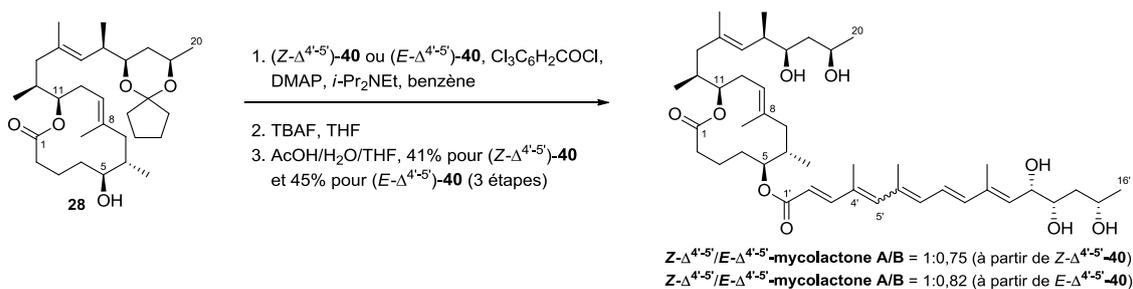


Schéma 25 : Etapes finales de la formation de la mycolactone A/B par Negishi (2011)

Negishi a ainsi développé une synthèse totale des mycolactones A/B en s'appuyant sur certains fragments ainsi que sur la stratégie de groupements protecteurs de Kishi. En parallèle, Altmann publie lui aussi en 2011 une nouvelle synthèse totale de la mycolactone A/B.^{66a}

1.3.6 Synthèse totale de la mycolactone A/B par Altmann (2011)

La voie synthétique développée par Altmann est influencée par la volonté d'établir une synthèse flexible des mycolactones, dans le but de faciliter l'incorporation de modifications structurales. Pour cela, le potentiel de la réaction de fermeture de cycle par métathèse (RCM) a été étudié pour la formation de l'oléfine (E)-trisubstituée en position C8-C9.^{66b} Cette stratégie, employée également par le groupe de Burkart pour leur synthèse formelle de la mycolactone A/B,⁶² est peu courante dans la littérature et s'appuie généralement sur la pré-organisation du précurseur de métathèse via des cycles aromatiques 1,2-disubstitués.⁸⁸ Conformément à tous les concepts rétrosynthétiques antérieurs, la synthèse totale repose sur une réaction d'estérification finale entre le fragment macrolactonique C1-C20 et la chaîne inférieure C1'-C16' (Figure 13).

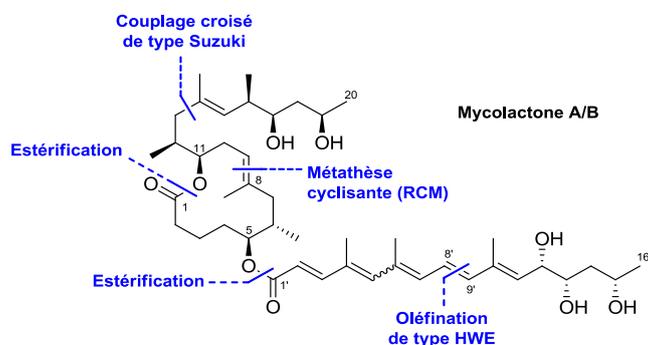


Figure 13 : Déconnexions envisagées pour la synthèse totale de la mycolactone A/B par Altmann (2011)

1.3.6.1 Préparation du fragment C1-C20

La formation du fragment C1-C20 a été réalisée en plusieurs temps par le groupe d'Altmann. Premièrement, le fragment C1-C8 **91** est synthétisé en suivant les étapes décrites dans l'équation 1 du Schéma 26. Après mono-protection du 1,5-pentanediol **64** sous forme d'éther de *p*-méthoxybenzyle, la fonction alcool restante est oxydée en aldéhyde. Ce dernier est ensuite engagé dans une réaction d'aldolisation d'Oppozoler avec le sultame **92**⁸⁹ conduisant, après coupure de la copule chirale, au diol **88** avec une très bonne diastéréosélectivité (supérieure à 95%). L'alcool primaire est ensuite activé sous forme de tosylate, permettant la formation de **89** après substitution nucléophile intramoléculaire. Inspiré par les travaux de Carreira et Du Bois, l'oxétane formé est ensuite ouvert à l'aide d'un excès d'isopropényllithium.⁹⁰ L'alcool secondaire ainsi libéré est protégé avec un groupement silylé, délivrant l'oléfine **90**. Après déprotection du groupement PMB, l'alcool libéré est converti en acide carboxylique, permettant l'obtention du premier partenaire de métathèse **91**. Le deuxième précurseur est quant à lui obtenu à partir du (*S*)-ester de Roche **93** (Schéma 26, éq. 2). Après protection de l'alcool primaire, la fonction ester est réduite en aldéhyde. Ce dernier est engagé dans une réaction d'allylation diastéréosélective en présence de l'allyltributylstannane,⁹¹ permettant d'accéder à l'alcool homoallylique **94**. Le clivage oxydatif de l'éther PMB par le DDQ entraînant un mélange de diol désiré et d'ester de *p*-méthoxybenzoate correspondant, un traitement avec LiAlH₄ a été nécessaire pour obtenir **95-anti** après tosylation de l'alcool primaire.

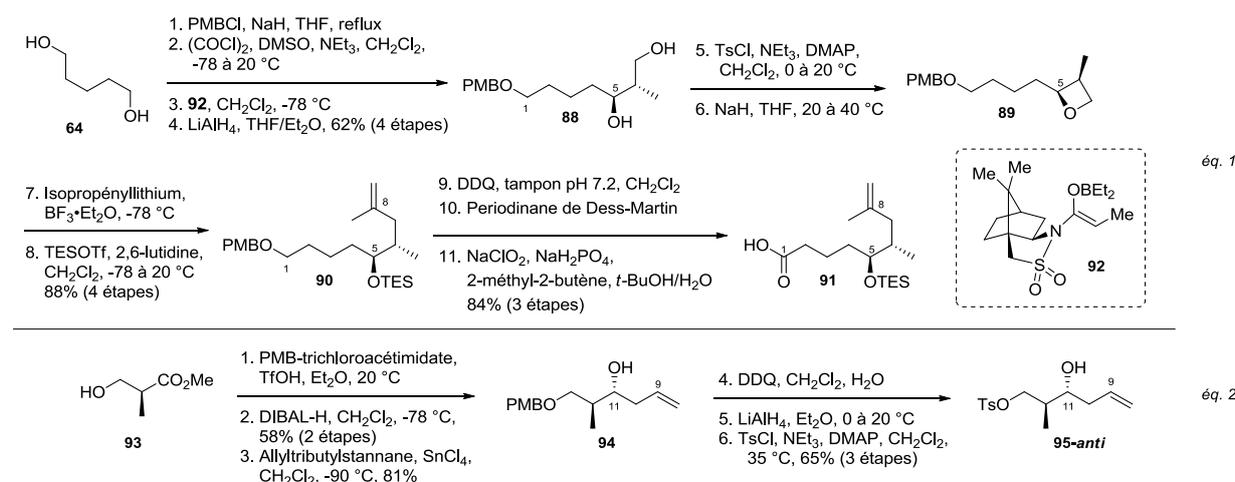


Schéma 26 : Synthèses des intermédiaires avancés pour la réaction de métathèse cyclisante par Altmann (2011)

Les fragments C1-C8 **91** et C9-C13 **95-anti** sont ensuite estérifiés dans les conditions de Höfle-Steglich,⁹² conduisant au diène **96** (Schéma 27). Après plusieurs optimisations, il s'est avéré que l'utilisation de 12 mol% de la seconde génération de catalyseur à base de ruthénium de type Grubbs à reflux du dichlorométhane permettait la formation du macrocycle désiré à 12 chaînons (*E*)-trisubstitué avec 80% dans le meilleur des cas. Le groupe tosylé est ensuite transformé en iode d'alkyle via la réaction de Finkelstein.⁹³ La macrolactone-iodée **97** résultante est ensuite engagée dans une réaction de Suzuki modifiée, c'est-à-dire par l'intermédiaire du ate-complexe constitué par le dérivé organo-lithié de **97** en réaction avec le 9-MeO-BBN,⁹⁴ avec le fragment C14-C20 **99** (synthétisé par la procédure de Kishi), conduisant ainsi au produit de couplage avec un très bon rendement. Il est à noter que les premiers essais de couplage ont été réalisés avec l'iodure vinylique C14-C20 **50** préparé par Kishi mais qu'aucun produit de couplage n'a pu être observé ; la raison

invquée serait une possible gène stérique crée par les groupements TBS et empchant ainsi le couplage sp^2-sp^3 .⁹⁵ Finalement, la dprotection slective de la fonction alcool en position 5, en vue de l'estrification avec la cha4ne infrieure, dlvre le fragment macrolactonique **98**.

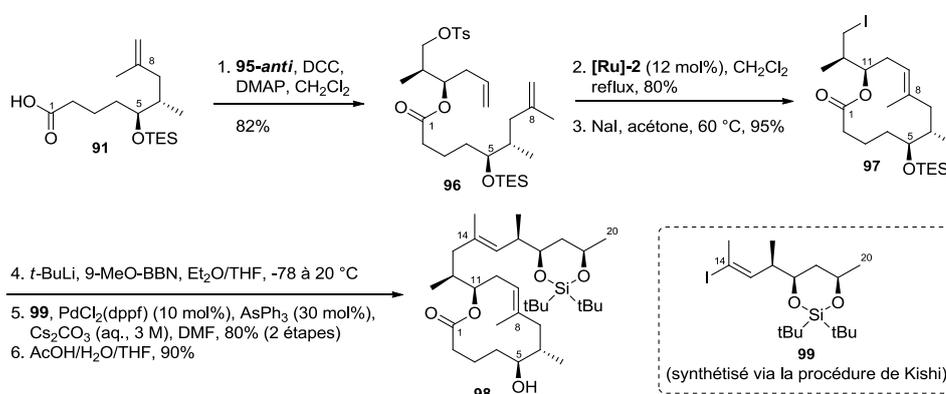


Schéma 27 : Synthèse du fragment C11-C20 par Altmann (2011)

1.3.6.1 Préparation du fragment C1'-C16'

La synthèse du fragment C1'-C16' repose sur une réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons, soit la déconnexion décrite par Kishi pour sa première approche de la synthèse totale de la mycolactone A/B (voir Schéma 6). Néanmoins, alors que la synthèse du phosphonate **30** suit la même procédure rapportée par Kishi (voir Schéma 8), la synthèse de l'aldéhyde **31** est différente et s'appuie sur les travaux publiés par Minnaard et Feringa en 2005 (Schéma 28, eq. 1).⁶¹ En effet, le monosaccharide **100**, utilisé comme inducteur asymétrique, est soumis à la méthode de Jennings et Jones.⁹⁶ Cette dernière permet la chloration des fonctions hydroxyles en position 4 et 6 grâce à l'action du chlorure de sulfuryle et de l'iodure de sodium. Toutefois, la déchloration est, cette fois-ci, effectuée par la combinaison de H_2 et de nickel de Raney. L'ouverture de l'acétal en conditions acides en présence du 1,3-propanethiol est suivie par la formation *in situ* de l'acétonide amenant à l'alcool **101**. L'inversion du stéréocentre C5 est réalisée par une réaction de Mitsunobu,⁹⁷ suivie d'une méthanolyse conduisant au composé **102**. Après hydrolyse de l'acétonide et protection de la stérotriade par des TBS, la fonction aldéhyde est libérée, délivrant ainsi **103**. La synthèse rejoint ensuite celle de Kishi pour la formation de l'aldéhyde **31**. Les fragments C1'-C8' **30** et C9'-C16' **31** sont finalement assemblés de façon analogue à Kishi (Schéma 28, eq. 2).

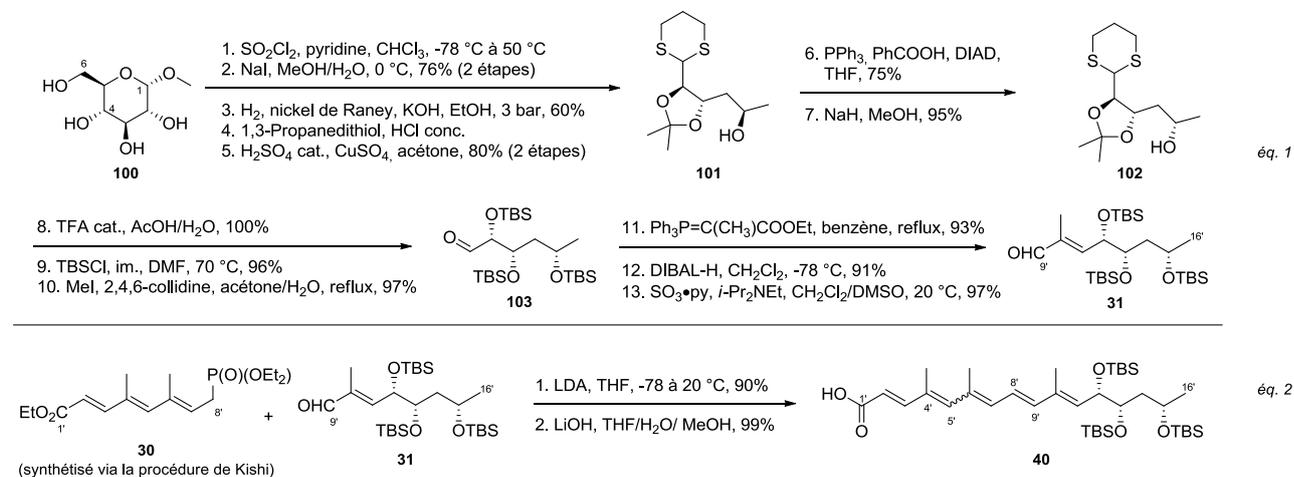


Schéma 28 : Synthèse du fragment C1'-C16' par Altmann (2011)

1.3.6.2 Assemblage final

L'estérification du fragment C1-C20 **98** avec la chaîne inférieure C1'-C16' **40** amène à la mycolactone A/B totalement protégée avec un rendement de 89% (Schéma 29). Finalement, la déprotection totale de la molécule, réalisée en deux étapes, permet l'obtention de la mycolactone A/B synthétique sous la forme d'un mélange $Z-\Delta^{4'-5'}/E-\Delta^{4'-5'} = 1:1$.

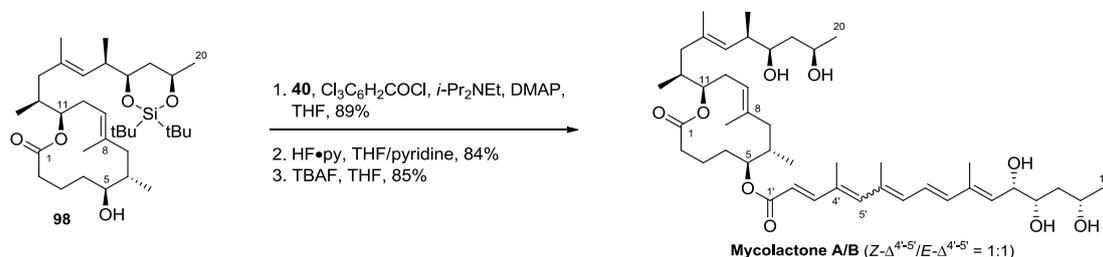


Schéma 29 : Etapes finales de la formation de la mycolactone A/B par Altmann (2011)

Kishi, Negishi et Altmann ont été les premiers à proposer une synthèse totale pour l'accès à la mycolactone A/B. Ces efforts ont conduit à des solutions viables sur la façon de former la toxine naturelle et à l'application de méthodologies de synthèse adaptée à la chimie complexe de cette dernière. Très récemment, un autre groupe s'est intéressé à la structure de la mycolactone A/B en rapportant un accès original au fragment macrolactonique. Bien que partielle, cette synthèse, développée par Aggarwal en 2015,⁹⁸ est présentée dans le sous-chapitre suivant.

1.3.7 Synthèse partielle de la mycolactone A/B par Aggarwal (2015)

Pour leur synthèse partielle de la mycolactone A/B, les efforts du groupe d'Aggarwal se sont concentrés sur le développement d'une voie synthétique convergente et hautement stéréosélective, permettant un accès rapide au fragment C1-C20. Pour cela, la méthodologie basée sur des homologations itératives de lithiation-borylation entre un ester boronique et un carbamate a été utilisée (Schéma 30).⁹⁹ Cette méthodologie, propre au groupe d'Aggarwal, a déjà prouvé son efficacité pour la synthèse de produits naturels¹⁰⁰ mais a dû être adaptée pour la synthèse de la mycolactone A/B.

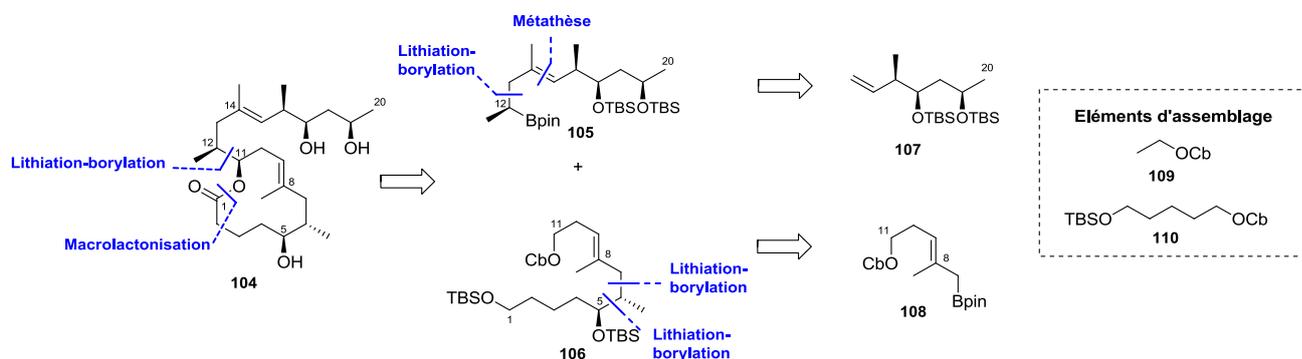


Schéma 30 : Analyse rétrosynthétique de la synthèse partielle de la mycolactone A/B par Aggarwal (2015)

1.3.7.1 Préparation des éléments d'assemblage et des intermédiaires avancés

Les deux éléments d'assemblage **109** et **110**, nécessaires aux réactions d'itérations, sont dans un premier temps synthétisés. Ces carbamates, décrit notamment par Hoppe pour des réactions énantiosélectives après leur α -déprotonation,¹⁰¹ sont synthétisés suivant les conditions classiques décrites par l'équation 1 du Schéma 31. Pour la synthèse de l'ester boronique **108**, Aggarwal rapporte une voie synthétique comprenant trois étapes à haut rendement (Schéma 31, éq. 2). En effet, le 3-pentynol **113** est soumis à une réaction de cupro-boration avec le B_2pin_2 ,¹⁰² permettant la formation du vinyl boronate désiré sous la forme d'un unique régio- et stéréoisomère. Après protection de l'alcool avec le chlorure de carbamoyle CbCl, une homologation de Matteson¹⁰³ avec le chlorométhyllithium (préparé *in situ*) amène à l'intermédiaire avancé **108**. Par la suite, le fragment C13-C20 a été synthétisé via l'alcène **23** dont la procédure suit celle décrite initialement par Kishi.⁴³ Après protection de la fonction alcool en éther silylé, le précurseur est engagé dans une réaction de métathèse, catalysée par la seconde génération du catalyseur d'Hoveyda-Grubbs (HG-IIIG), avec l'ester pinacolique de l'acide isopropenylboronique commercial afin de former le vinyl borane correspondant avec une stéréochimie observée de 99 :1 en faveur de l'isomère Z souhaité.¹⁰⁴ Ce dernier subit ensuite une homologation de Matteson à un carbone dans les mêmes conditions que précédemment afin d'arriver à l'intermédiaire **107** (Schéma 31, éq. 3).

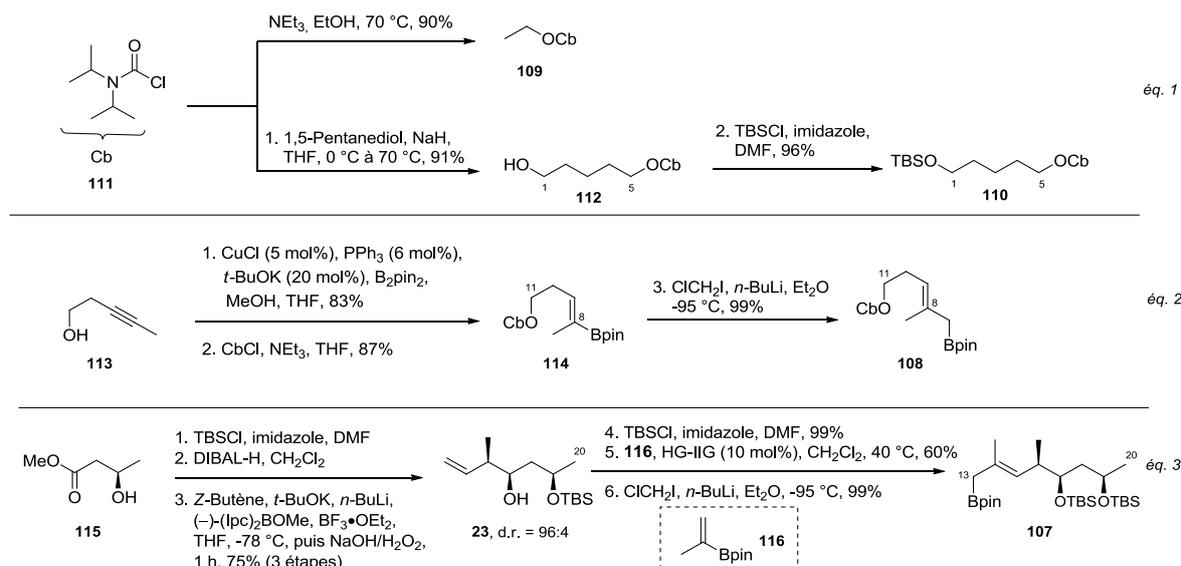


Schéma 31 : Synthèses des éléments d'assemblage (éq. 1) et intermédiaires avancées (éqs. 2 et 3) par Aggarwal (2015)

1.3.7.2 Préparation du fragment C1-C20

Les différents partenaires sont ensuite associés par des réactions itératives de lithiation asymétrique-borylation permettant ainsi la formation du fragment linéaire C1-C20 (Schéma 32). Il est à noter que toutes les réactions de réarrangement 1,2-métalate produisent les molécules désirées avec une très bonne stéréosélectivité. Par ailleurs, Aggarwal a également démontré que cette voie de synthèse peut être réalisée sans purification entre chaque étape, permettant alors la formation en « one-pot » de plus de 3 g de l'intermédiaire **106**, ou encore de 950 mg du fragment **116**.

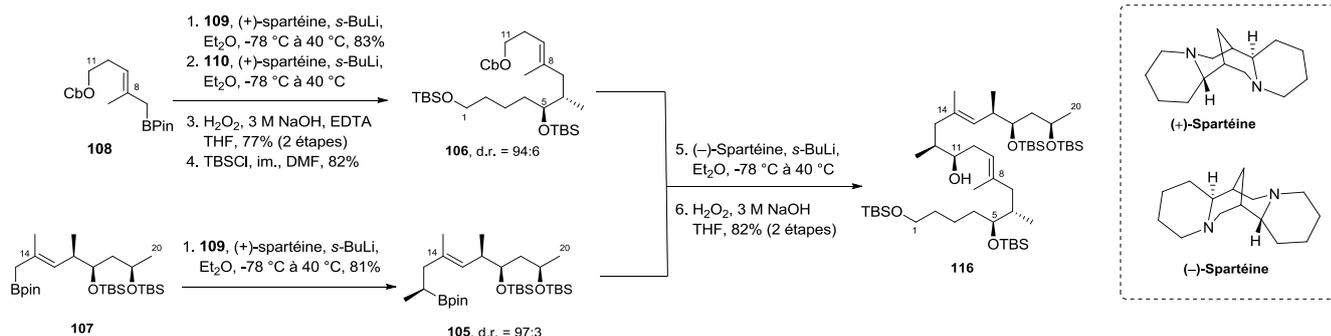


Schéma 32 : Synthèse du fragment linéaire C1-C20 par Aggarwal (2015)

1.3.7.3 Etapes finales

Pour les étapes finales amenant à la formation du fragment macrocycle C1-C20 **104**, la séquence de macrolactonisation dans les conditions de Yamaguchi suivie d'une totale déprotection par l'action de HF•pyridine a été appliquée (Schéma 33).

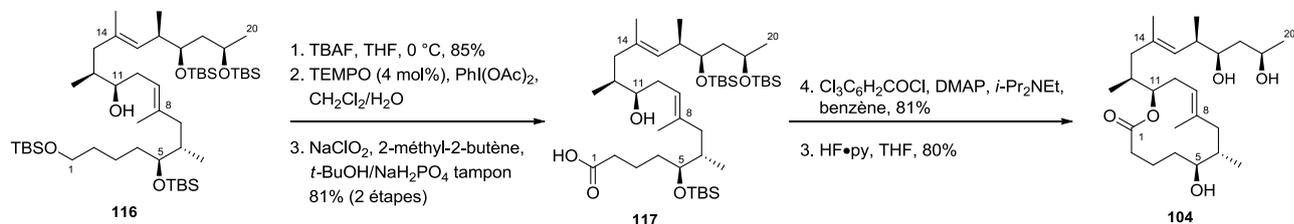


Schéma 33 : Etapes finales pour la synthèse partielle de la mycolactone A/B par Aggarwal (2015)

La récente voie d'accès au cœur de la mycolactone A/B ainsi développée par Aggarwal a permis de réduire notablement le nombre d'étapes jusqu'alors nécessaire, passant ainsi en nombre totale d'étapes de 28⁶⁴ à 11 (en considérant les séquences d'homologations itératives comme étape unique).

1.3.8 Comportement photochimique de la mycolactone A/B

Pour compléter l'étude de la mycolactone A/B, il est important de mentionner les travaux réalisés par Kishi en 2012 sur la stabilité photochimique de cette structure complexe.¹⁰⁵ Cette analyse fait suite à l'observation du Prof. Britton à l'hôpital Karolinska (Stockholm, 2011) de mycolactones A/B ayant totalement perdu leur pouvoir néocroissant après une exposition d'une demi-heure à la lumière. Le groupe de Marion et Marsollier a également démontré en 2012 que la mycolactone A/B se dégradait lorsqu'elle est soumise à différentes longueurs d'onde (254, 312 et 365 nm, la lumière visible et les lampes incandescentes et fluorescentes).¹⁰⁶ Par ailleurs, une application médicale potentielle à l'irradiation lumineuse (photothérapie) pour lutter contre la mycobactérie produisant la toxine a aussi été mentionnée quelques années auparavant,³³ rendant ainsi la compréhension du comportement photochimique de la toxine une priorité.

Afin de comprendre l'effet d'une irradiation lumineuse sur la mycolactone A/B, Kishi réalise des expérimentations en exposant la mycolactone A/B synthétique et des composés modèles à une radiation par une lampe UV (filtre 365 nm) ou par la lumière visible naturelle. L'irradiation de mycolactones synthétiques à 365 nm dans l'acétone à 30 °C, conduit à un mélange de quatre photoproduits dont les doubles liaisons C2'-C3' et C10'-C11' restent inchangées (Schéma 34, éq. 1). Il

émet alors l'hypothèse que cette rapide isomérisation *Z/E* des alcènes est suivie d'une cycloaddition [4+2] du triène C4'-C9' induite par l'effet de l'irradiation lumineuse, amenant alors à la formation du motif bicyclo[3,1,0]hexène identifié chez ces produits nommés « photomycolactones ». Cependant, la séparation des différents constituants du mélange s'avérant complexe, Kishi choisit de continuer son étude avec les modèles simplifiés **118a-d** (Schéma 34, éq. 2). L'irradiation du tétraène **118a** à 365 nm, dans l'acétone à 30 °C pendant 2,5 heures, conduit à un mélange de quatre isomères géométriques dans les proportions suivantes : **118a/118b/118c/118d** = 2:7:1:1, et dont la structure a été déterminée par des expériences RMN. Kishi note également que le mélange évolue lentement via une cycloaddition [4+2] menant, après deux jours d'exposition, à un mélange de quatre photoproduits. Après purification classique par colonne chromatographique, traitement au TBAF et purification par HPLC chirale, les composés bicycliques **119a-d** sont classés en deux sous-groupes appelés A et B, faisant référence aux produits majeurs (A) et mineurs (B) obtenus. La stéréochimie relative et absolue de **119a-d** est déterminée à l'aide de la structure aux rayons X du tri-*p*-bromobenzoate de **119a** obtenue ainsi que par des expériences RMN, confirmant ainsi l'hypothèse de la cycloaddition [4+2].

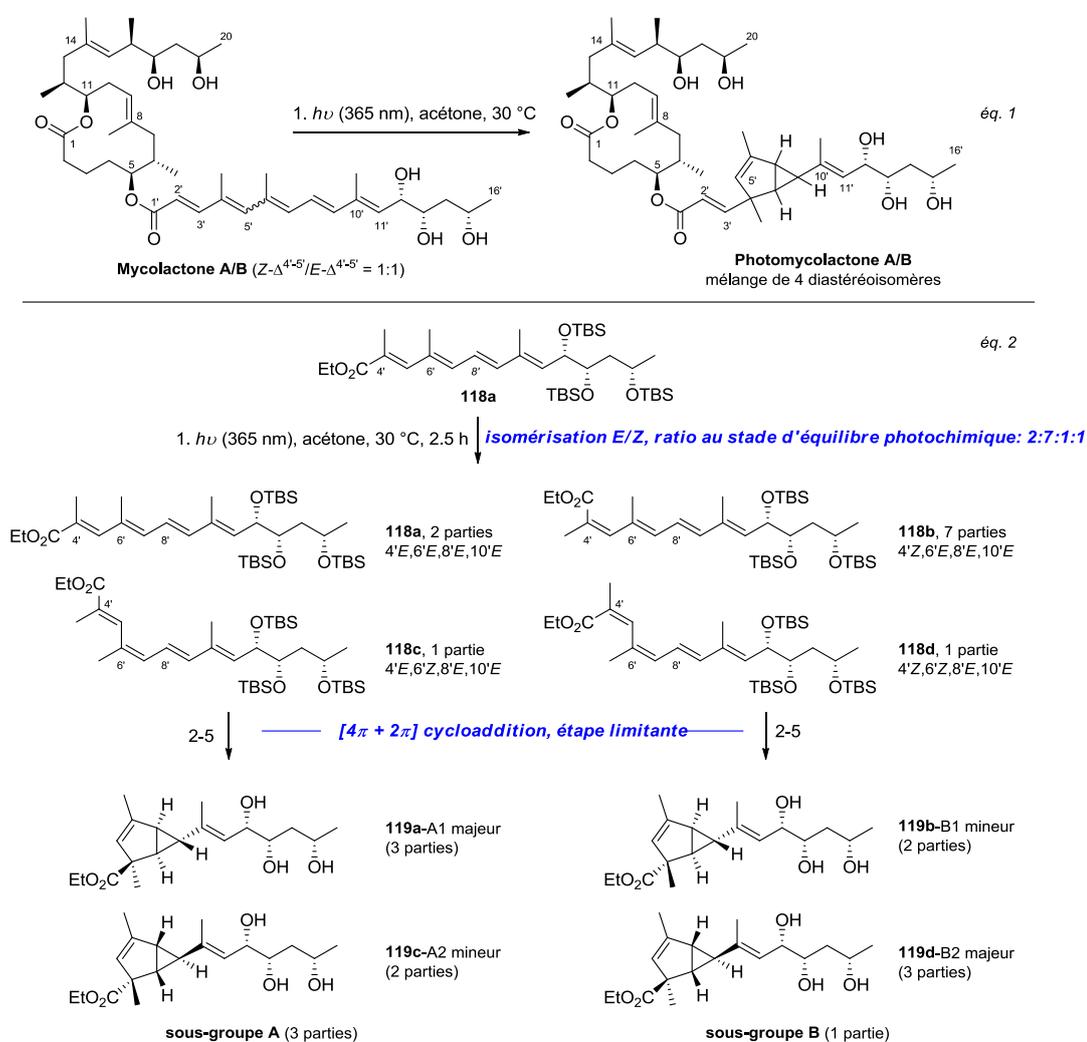


Schéma 34 : Transformation photochimique de la mycolactone A/B (éq. 1) et de tétraénoates modèles (éq. 2).
Réactifs et conditions : (2) *hu* (365 nm), acétone 30 °C, 2 jours; (3) chromatographie sur gel de silice; (4) TBAF, THF, 20 °C; (5) séparation par HPLC chirale.³ Schéma adapté de la réf. 3 avec permission. Copyright 2013 – Natural Product Reports

Dans le but de corrélér les photoproduits obtenus via les composés modèles à ceux observés initialement avec la mycolactone synthétique, les transformations décrites sur le Schéma 35 ont été réalisées. Le composé **119a** est transformé en fragment C1'-C16' **120a** à l'aide de cinq transformations successives, puis estérifié avec le fragment C1-C20 **51** des mycolactones,⁶³ conduisant au composé **121a**. Les photoproduits **119b-d** ont été transformés de la même manière délivrant les composés **120b-d**. Finalement, les analyses RMN ¹H ainsi que les temps de rétention HPLC de chacun des composés **120a-d** permettent d'identifier les « photomycolactones » obtenus à partir de la mycolactone A/B synthétique.

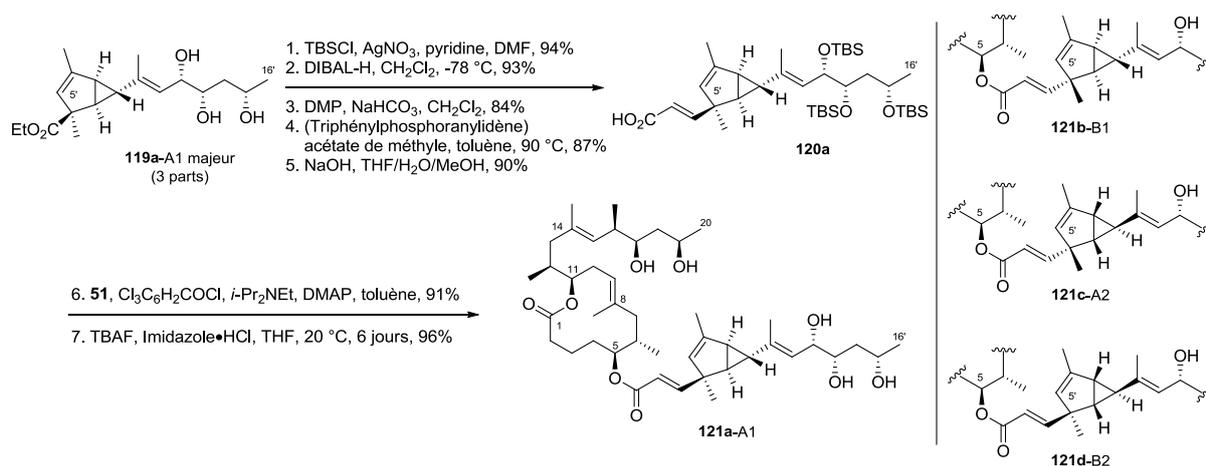


Schéma 35 : Transformation des photoproduits modèles en photomycolactones.³ Schéma adapté de la réf. 3 avec permission. Copyright 2013 – *Natural Product Reports*

Afin de confirmer sans ambiguïté les structures de chacune des photomycolactones, Kishi a approfondi son analyse en mettant au point en 2015 une synthèse totale stéréosélective permettant l'accès aux quatre « photomycolactones ». ¹⁰⁷ Les analyses biologiques de ces dernières, confirmant une diminution de toxicité, a mis en évidence la possibilité de former des mycolactones « détoxifiées » par irradiation lumineuse. A l'opposé, cette étude suggère également la possibilité de former un analogue de mycolactone stabilisé, et ayant potentiellement la toxicité naturelle de la mycolactone, grâce à la réduction de la double liaison C6'-C7'. En effet, selon le mécanisme proposé, cet alcène est requis pour que la cyclisation photochimique ait lieu. Là encore, Kishi a concentré ses efforts en 2017 sur la préparation de deux dihydro-mycolactones **122a** et **122b** afin d'étudier leur comportement chimique et biologique (Figure 14).¹⁰⁸ En plus d'être inertes aux irradiations lumineuses, ces molécules sont stables en conditions acides, basiques et thermiques. Les évaluations biologiques de ces analogues ont montré une toxicité similaire à la mycolactone A/B, bien que plus importante pour **122b** que **122a**, et mis ainsi à jour l'importance d'une structure stéréospécifique de la chaîne inférieure.

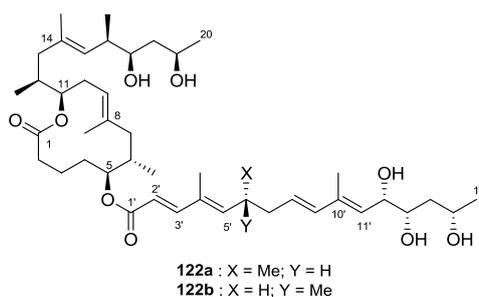


Figure 14 : Structures des dihydro-mycolactones par Kishi (2017)

1. 4. Conclusion

Les deux grandes découvertes effectuées au cours du XXe siècle constituent de véritables tournants dans l'histoire de l'ulcère de Buruli. La première a été la révélation de *M. ulcerans*, mycobactérie responsable de la maladie de l'ulcère de Buruli, en 1948 par Peter MacCallum. Celle-ci a été suivie, quelques années après, par le dévoilement du principal agent pathogène sécrété par la mycobactérie, alors nommée mycolactone par Small.

Nous venons de voir que *M. ulcerans*, dont le mode de transmission exacte à l'homme est encore inconnu, a développé une stratégie de colonisation originale. Cette dernière se caractérise par la multiplication en silence de la mycobactérie dans l'hôte infecté, synonyme alors de vastes ulcérations cutanées dont le caractère indolore est à l'origine du retard de la prise en charge des patients. La mycolactone A/B, responsable des effets pathogènes de la maladie, est alors reconnue comme premier polycétide bioactif toxique pour l'homme. De par leur structure atypique les mycolactones ont rapidement suscité un grand intérêt des communautés scientifiques. D'un point de vue chimique, le développement des nombreuses synthèses totales et partielles de la mycolactone A/B, ainsi que les synthèses totales des autres mycolactones (C, E, F, *dia*-F, S1 et S2), rapportées entre 2001 et 2015 constituent une ressource importante et nécessaire pour la préparation de ces toxines. En effet, la quantité de mycolactone A/B isolée de *M. ulcerans* est de l'ordre de la centaine de µg dans les conditions classiques de fermentation en laboratoire.⁴⁵ Or, la préparation chimique de la toxine parfaitement caractérisée et avec un haut degré de pureté représente un enjeu majeur pour l'ensemble de la communauté biologique souhaitant disposer de la mycolactone A/B en vue d'études sur les effets biologiques de cette dernière.

L'exploration de la biologie des mycolactones fait l'objet du chapitre suivant. Nous verrons que ce domaine a également suscité un intérêt grandissant et que les efforts des scientifiques ont été menés sur plusieurs axes afin d'essayer de comprendre les mécanismes biologiques de la maladie.

1. 5. Références

- ¹ Voir le site de l'Organisation Mondiale de la Santé : <http://www.who.int/buruli/en/>
- ² K. M. George, D. Chatterjee, G. Gunawardana, D. Welty, J. Hayman, R. Lee, P. L. Small, *Science* **1999**, *283*, 854-857.
- ³ A.-C. Chany, C. Tresse, V. Casarotto, N. Blanchard, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1527-1567.
- ⁴ P. MacCallum, J. C. Tolhurst, G. Buckle, H. A. Sissons, *J. Pathol. Bacteriol.* **1948**, *60*, 93-122.
- ⁵ F. Fenner, *Med. J. Aust.* **1950**, *2*, 813-818.
- ⁶ J. A. Grant, *A walk across Africa or domestic scenes from my Nile journal*; William Blackwood and sons, Edinburgh and London, 1864.
- ⁷ Cook A. Mengo hospital notes, 1897, Makerere Medical School Library. *BMJ* **1970**, *2*, 378-379.
- ⁸ W. M. Meyers, D. H. Connor, B. McCullough, J. Bourland, R. Moris, L. Proos, *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **1974**, *54*, 147-157.
- ⁹ J. Clancey, O. Dodge, H. Lunn, M. Oduori, *Lancet* **1961**, *278*, 951-954.
- ¹⁰ J. W. Al Ramahi, H. Annab, M. Al Karmi, B. Kirresh, M. Wreikat, R. Batarseh, M. Yacoub, M. Kaderi, *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *58*, 77-81.
- ¹¹ R. R. Yotsu, K. Nakanaga, Y. Hoshino, K. Suzuki, N. Ishii, *J. Dermatol.* **2012**, *39*, 587-593.
- ¹² R. H. Ortiz, D. A. Leon, H. O. Estevez, A. Martin, J. L. Herrera, L. F. Romo, F. Portaels, R. H. Pando, *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *157*, 271-281.
- ¹³ Les mycobactéries, responsables d'un grand nombre de maladies à localisation pulmonaire, ganglionnaire, cutanée ou généralisée, sont des bacilles acido-alcoolo-résistants. Cette propriété est due à la structure de la membrane composée de peptidoglycanes et d'acide mycolique qui renforcent la paroi. « Microbiologie, Prescott, Harley, Klein, De Boeck, 6^{ème} édition ».
- ¹⁴ R. R. Yotsu, C. Murase, M. Sugawara, K. Suzuki, K. Nakanaga, N. Ishii, K. Asiedu, *J. Dermatol.* **2015**, *42*, 1033-1041.
- ¹⁵ Ostéomyélite: Infection osseuse par voie hématogène.
- ¹⁶ a) T. S. van der Werf, W. T. van der Graaf, J. W. Tappero, K. Asiedu, *Lancet* **1999**, *354*, 1013-1018. b) C. L. Gordon, J. A. Buntine, J. A. Hayman, C. J. Lavender, J. A. Fyfe, P. Hosking, P. D. R. Johnson, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1290.
- ¹⁷ M. Goto, K. Nakanaga, T. Aung, T. Hamada, N. Yamada, M. Nomoto, S. Kitajima, N. Ishii, S. Yonezawa, H. Saito, *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 805-811.
- ¹⁸ W. M. Meyers, W. M. Shelly, D. H. Connor, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1974**, *23*, 924-929.
- ¹⁹ H. R. Williamson, L. Mosi, R. Donnell, M. Aqqad, R. W. Merritt, P. L. Small, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2770.
- ²⁰ a) F. Portaels, W. M. Meyers, A. Ablordey, A. G. Castro, K. Chemlal, P. de Rijk, P. Elsen, K. Fissette, A. G. Fraga, R. Lee, E. Mahrous, P. L. Small, P. Stragier, E. Torrado, A. Van Aerde, M. T. Silva, J. Pedrosa, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e178. b) T. Stinear, J. K. Davies, G. A. Jenkin, J. A. Hayman, F. Oppedisano, P. D. Johnson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3206-3213.
- ²¹ A. L. Morris, J.-F. Guégan, D. Andreou, L. Marsollier, K. Carolan, M. Le Croller, D. Sanhueza, R. E. Gozlan, *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600387.
- ²² R. W. Merritt, E. D. Walker, P. L. Small, J. R. Wallace, P. D. R. Johnson, M. E. Benbow, D. A. Boakye, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e911.
- ²³ L. Marsollier, J. Aubry, J. P. Saint Andre, R. Robert, P. Legras, A.L. Manceau, S. Bourdon, C. Audrain, B. Carbonnelle, *Pathol. Biol.* **2003**, *51*, 490-495.
- ²⁴ L. Marsollier, T. Stinear, J. Aubry, J. P. Saint André, R. Robert, P. Legras, A.-L. Manceau, C. Audrain, S. Bourdon, H. Kouakou, B. Carbonnelle, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1097-1103.
- ²⁵ WHO, *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2008**, *83*, 145-154.
- ²⁶ a) T. Spangenberg, Y. Kishi, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 1410-1412. b) P. J. Converse, Y. Xing, K. H. Kim, S. Tyagi, S.-Y. Li, D. V. Almeida, E. L. Nueremberger, J. H. Grosset, Y. Kishi, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2618. c) A. Wadagni, M. Frimpong, D. M. Phanzu, A. Ablordey, E. Kacou, M. Gbedevi, E. Marion, Y. Xing, V. S. Babu, R. O. Phillips, M. Wansbrough-Jones, Y. Kishi, K. Asiedu, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004247.
- ²⁷ F. S. Sarfo, R. O. Phillips, B. Rangers, E. A. Mahrous, R. R. Lee, E. Tarelli, K. B. Asiedu, P. L. Small, M. H. Wansdrough-Jones, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e577.
- ²⁸ F. S. Sarfo, P. J. Converse, D. V. Almeida, J. Zhang, C. Robinson, M. Wansbrough-Jones, J. H. Grosset, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2101.

- ²⁹ D. P. O'Brien, G. Jenkin, J. Buntine, C. M. Steffen, A. McDonald, S. Horne, N. D. Friedman, E. Athan, A. Hughes, P. P. Callan, P. D. Johnson, *Med. J. Aust.* **2014**, *200*, 267-270.
- ³⁰ A. Chauty, M.-F. Ardant, A. Adeye, H. Euverte, A. Guedenon, C. Johnson, J. Aubry, E. Nuermberger, J. Grosset, *Antimicrob. Agents Chem.* **2007**, *51*, 4029-4035.
- ³¹ R. E. Klieg, J. H. Wolcou, A. Confer, *Aviat. Space Environ. Med.* **1975**, *46*, 1241-1245.
- ³² R. Phillips, S. Kuijper, N. Benjamin, M. Wansbrough-Jones, M. Wilks, A. H. J. Kolk, *Antimicrob. Agents Chem.* **2004**, *48*, 3130-3132.
- ³³ a) T. W. Huber, R. A. Reddick, P. G. Kubica, *Appl. Microbiol.* **1970**, *19*, 383-384. b) W. M. Meyers, W. M. Shelly, D. H. Connor, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1974**, *23*, 924-929. c) R. B. Cope, J. A. Hartmann, C. K. Morrow, W. M. Haschek, P. L. Small, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2002**, *18*, 271-279. d) M. Vogel, P. F. Bayi, M. T. Ruf, M. W. Bratschi, M. Bolz, A. Um Book, M. Zwahlen, G. Pluschke, T. Junghanss, *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 342-350.
- ³⁴ a) D. Diaz, H. Döbeli, D. Yeboah-Manu, E. Mensah-Quainoo, A. Friedlein, N. Soder, S. Rondini, T. Bodmer, G. Pluschke, *Clin. Vaccine Immunol.* **2006**, *13*, 1314-1321. b) K. Röltgen, M. W. Bratschi, A. Ross, S. Y. Aboagye, K. A. Ampah, M. Bolz, A. Andreoli, J. Pritchard, J. C. Minyem, D. Noumen, E. Koka, A. Um Boock, D. Yeboah-Manu, G. Pluschke, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2904.
- ³⁵ a) F. Portaels, J. Aguiar, M. Debacker, A. Guedenon, C. Steunou, C. Zinsou, W. M. Meyers, *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 62-65. b) M. Bolz, A. Bénard, A. M. Dreyer, S. Kerber, A. Vettiger, W. Oehlmann, M. Singh, M. Duthie, G. Pluschke, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004431.
- ³⁶ B. R. Forbes, J. S. Wannan, W. B. Kirkland, *Med. J. Aus.* **1954**, *41*, 475-479.
- ³⁷ D. H. Connor, H. F. Lunn, *Arch. Pathol.* **1966**, *81*, 183-199.
- ³⁸ K. M. George, L. P. Barker, D. M. Welty, P. L. Small, *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 587-593.
- ³⁹ G. Gunawardana, D. Chatterjee, K. M. George, P. Brennan, D. Whitten, P. L. Small, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6092-6093.
- ⁴⁰ Y. Kobayashi, J. Lee, K. Tezuka, Y. Kishi, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2177-2180.
- ⁴¹ A. B. Benowitz, S. Fidanze, P. L. Small, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5128-5129.
- ⁴² S. Fidanze, F. Song, M. Szlosek-Pinaud, P. L. Small, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10117-10118.
- ⁴³ F. Song, S. Fidanze, A. B. Benowitz, Y. Kishi, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 647-650.
- ⁴⁴ a) T. C. Judd, A. Bischoff, Y. Kishi, S. Adusumilli, P. L. Small, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4901-4904. b) S. Aubry, R. E. Lee, E. A. Mahrous, P. L. Small, D. Beachboard, Y. Kishi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5385-5388. c) H. J. Kim, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1842-1844. d) T. Spangenberg, S. Aubry, Y. Kishi, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1782-1785. e) S. M. Hande, Y. Kazumi, W. G. Lai, K. L. Jackson, S. Maeda, Y. Kishi, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4618-4621.
- ⁴⁵ H. Hong, T. Stinear, J. Porter, C. Demangel, P. F. Leadlay, *ChemBioChem.* **2007**, *8*, 2043-2047.
- ⁴⁶ T. P. Stinear, A. Mve-Obiang, P. L. Small, W. Frigui, M. J. Pryor, R. Brosch, G. A. Jenkin, P. D. Johnson, J. K. Davies, R. E. Lee, S. Adusumilli, T. Garnier, S. F. Haydock, P. F. Leadlay, S. T. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1345-1349.
- ⁴⁷ J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416.
- ⁴⁸ L. Katz, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2557-2576.
- ⁴⁹ B.A. Pfeifer, C. Khosla, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 106-118.
- ⁵⁰ T. Stinear, M. J. Yip, J. L. Porter, J. A. M. Fyfe, C. J. Lavender, F. Portaels, M. Rhodes, H. Kator, A. Colorni, G. A. Jenkin, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2021-2029.
- ⁵¹ P. Caffrey, *ChemBioChem.* **2003**, *4*, 654-657.
- ⁵² H. Hong, P. J. Gates, J. Staunton, T. Stinear, S. T. Cole, P. F. Leadlay, J. B. Spencer, *Chem. Commun.* **2003**, 2822-2823.
- ⁵³ S. Pidot, H. Hong, T. Seemann, J. Porter, M. Yip, A. Men, M. Johnson, P. Wilson, J. Davies, P. Leadlay, T. Stinear, *BMC Genomics* **2008**, *9*, 462.
- ⁵⁴ H. Hong, J. B. Spencer, J. L. Porter, P. F. Leadlay, T. Stinear, *ChemBioChem.* **2005**, *6*, 643-648.
- ⁵⁵ M. J. Yip, J. L. Porter, J. A. M. Fyfe, C. J. Lavender, F. Portaels, M. Rhodes, H. Kator, A. Colorni, G. A. Jenkin, T. Stinear, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2021-2029.
- ⁵⁶ J. Mahillon, M. Chandler, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 725-774.
- ⁵⁷ K. Doig, K. Holt, J. Fyfe, C. Lavender, M. Eddyani, F. Portaels, D. Yeboah-Manu, G. Pluschke, T. Seemann, T. Stinear, *BMC Genomics* **2012**, *13*, 258.
- ⁵⁸ P. Stragier, A. Ablordey, L. M. Bayonne, Y. L. Lugor, I. S. Sindani, P. Suykerbuyk, H. Wabinga, W. M. Myers, F. Portaels, *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 844-847.
- ⁵⁹ K. Röltgen, T. P. Stinear, G. Pluschke, *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 522-529.
- ⁶⁰ M. K. Gurjar, J. Cherian, *Heterocycles* **2001**, *55*, 1095-1103.

- ⁶¹ R. Summeren, B. L. Feringa, A. Minnaard, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2524-2533.
- ⁶² a) M. D. Alexander, S. D. Fontaine, J. J. La Clair, A. G. Dipasquale, A. L. Rheingold, M. D. Burkart, *Chem. Commun.* **2006**, 4602-4604. b) K. Ko, M. D. Alexander, S. D. Fontaine, J. E. Biggs-Houck, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5159-5165.
- ⁶³ F. Song, S. Fidanze, A. B. Benowitz, Y. Kishi, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5739-5753.
- ⁶⁴ K. L. Jackson, W. J. Li, C. L. Chen, Y. Kishi, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2263-2272.
- ⁶⁵ a) G. W. Wang, N. Yin, E. Negishi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4118-4130. b) Pour les études préliminaires de 2006, voir : N. Yin, G. Wang, M. X. Qian, E. Negishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2916-2920.
- ⁶⁶ a) P. Gersbach, A. Jantsch, F. Feyen, N. Scherr, J.-P. Dangy, G. Pluschke, K.-H. Altmann, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13017-13031. b) Pour les études préliminaires de 2007, voir : F. Feyen, A. Jantsch, K. H. Altmann, *Synlett* **2007**, 415-418.
- ⁶⁷ H. C. Brown, K. S. Bhat, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5919-5923.
- ⁶⁸ a) D. W. Hart, J. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8115-8116. b) J. Schwartz, J. A. Labinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1976**, *15*, 333-340.
- ⁶⁹ a) A. O. King, N. Okukado, E.-i. Negishi, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1977**, 683-684. b) E. Negishi, N. Okukado, A. O. King, D. E. Van Horn, B. I. Spiegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2254-2256.
- ⁷⁰ A. B. Smith, Y. Qiu, D. R. Jones, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12011-12012.
- ⁷¹ a) B. O. Lindgren, T. Nilsson, *Acta Chem. Scand.* **1973**, *27*, 888-890. b) G. A. Kraus, B. Roth, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4825-4830. c) B. S. Bal, W. E. Childers, H. W. Pinnick, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091-2096.
- ⁷² J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989-1993.
- ⁷³ I. Paterson, I. Boddy, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5301-5304.
- ⁷⁴ a) E. N. Jacobsen, I. Marko, W. S. Mungall, G. Schroeder, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1968-1970. b) K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771.
- ⁷⁵ a) A. Michaelis, R. Kaehne, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *31*, 1048-1055. b) A. E. Arbuzov, *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* **1906**, *38*, 687.
- ⁷⁶ X. Han, B. M. Stoltz, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7600-7605.
- ⁷⁷ R. Appel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801-811.
- ⁷⁸ a) M. R. Johnson, T. Nakata, Y. Kishi, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4343-4346. b) B. H. Lipshutz, J. Kozlowski, R. S. Wilhelm, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2305-2307.
- ⁷⁹ K. Matsumoto, Y. Sawada, T. Katsuki, *Synlett* **2006**, 3545-3547.
- ⁸⁰ F. Ramirez, N. B. Desai, N. McKelvie, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1745-1747.
- ⁸¹ E. J. Corey, P. L. Fuchs, *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 3769-3772.
- ⁸² a) E. J. Corey, D. Enders, M. G. Bock, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, *17*, 7-10. b) R. H. Schlessinger, M. A. Poss, S. Richardson, P. Lin, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2391-2394. c) R. Desmond, S. G. Mills, R. P. Volante, I. Shinkai, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3895-3898.
- ⁸³ D. J. Peterson, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 780-784.
- ⁸⁴ H. Matsushita, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2882-2884.
- ⁸⁵ a) E. Negishi, S. Baba, A. O. King, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 17-18. b) D. E. Van Horn, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2252-2254. c) E. Negishi, D. E. Van Horn, T. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6639-6647.
- ⁸⁶ C. Wang, T. Tobrman, Z. Xu, E. Negishi, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4092-4095.
- ⁸⁷ N. Yin, G. Wang, M. Qian, E. Negishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2916-2920.
- ⁸⁸ a) A. Fürstner, K. Langemann, *Synthesis* **1997**, 792-803. b) X. Wang, J. Porco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3067-3071. c) A. Fürstner, T. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7814-7821. d) S. Sasmal, A. Geyer, M. E. Geyer, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6260-6263. e) M. D. Ronsheim, C. K. Zercher, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1878-1885. f) M. Prakesch, U. Sharma, M. Sharma, S. Khadem, D. M. Leek, P. Arya, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 715-734. g) W. Wang, J. Zhang, J. He, S. Tang, X. Wang, X. She, X. Pan, *Chin. J. Chem.* **2008**, *26*, 1109-1113. h) R. M. Kanada, D. Itoh, M. Nagai, J. Nijima, N. Asai, Y. Mizui, S. Abe, Y. Kotake, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4350-4355.
- ⁸⁹ W. Oppozoler, J. Blagg, I. Rodriguez, E. Walther, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2767-2772.
- ⁹⁰ (a) M. J. Eis, J. E. Wrobel, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3693-3694. b) E. M. Carreira, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8106-8125.
- ⁹¹ a) G. E. Keck, M. B. Andrus, S. Castellino, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8136-8141. b) G. E. Keck, D. E. Abbott, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1883-1886. c) G. E. Keck, M. Park, D. Krishnamurthy, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3787-3788. d) S. E. Denmark, T. Wilson, T. M. Willson, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 984-986.
- ⁹² B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522-524.

-
- ⁹³ H. Finkelstein, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43*, 1528-1532.
- ⁹⁴ a) N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483. b) S. Kotha, K. Lahiri, D. Kashinath, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633-9695. c) G. Seidel, A. Fürstner, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2055-2070.
- ⁹⁵ A. Arefolov, J. S. Panek, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5596-5603.
- ⁹⁶ a) H. J. Jennings, J. K. N. Jones, *Can. J. Chem.* **1962**, *40*, 1408-1414. b) H. J. Jennings, J. K. N. Jones, *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 1151-1159.
- ⁹⁷ a) O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380-2382. b) O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28.
- ⁹⁸ C. A. Brown, V. K. Aggarwal, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 1-5.
- ⁹⁹ a) J. L. Stymiest, G. Dutheuil, A. Mahmood, V. K. Aggarwal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7491-7494. b) D. Leonori, V. K. Aggarwal, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3174-3183.
- ¹⁰⁰ a) A. P. Pulis, P. Fackler, V. K. Aggarwal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4382-4385. b) C. J. Fletcher, K. M. P. Wheelhouse, V. K. Aggarwal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2503-2506. c) A. P. Pulis, V. K. Aggarwal, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7570-7574.
- ¹⁰¹ a) D. Hoppe, T. Krämer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 160-162. b) D. Hoppe, T. Hense, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2282-2316.
- ¹⁰² a) H. R. Kim, J. Yun, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2943-2945. b) M. J. Hesse, C. P. Butts, C. L. Willis, V. K. Aggarwal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12444-12448.
- ¹⁰³ K. M. Sadhu, D. S. Matteson, *Organometallics* **1985**, *4*, 1687-1689.
- ¹⁰⁴ C. Morrill, T. W. Funk, R. H. Grubbs, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7733-7736.
- ¹⁰⁵ Y. Xing, S. M. Hande, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19234-19239.
- ¹⁰⁶ E. Marion, S. Prado, C. Cano, J. Babonneau, S. Ghamrawi, L. Marsollier, *PLoS One* **2012**, *7*, e33600.
- ¹⁰⁷ X. Li, V. S. Babu, Y. Kishi, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 3220-3224.
- ¹⁰⁸ V. S. Babu, Y. Zhou, Y. Kishi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1274-1277.

Chapitre 2 :
Aspects biologiques

2. Aspects biologiques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'ulcère de Buruli est une maladie nécrotique de la peau causée par l'infection à *M. ulcerans*, et dont les lésions cutanées sont dues à la sécrétion de l'exotoxine appelée mycolactone A/B par la bactérie elle-même. En effet, les changements de la concentration en mycolactone au cours du temps sont directement liés à la pathogénèse de l'ulcère de Buruli. Si la maladie n'est pas diagnostiquée ou traitée de manière appropriée, elle entraîne une déformation irréversible des membres du corps, un handicap fonctionnel et des infections secondaires potentiellement mortelles. Bien que des efforts aient été menés pour rendre le traitement et le diagnostic de la maladie relativement efficaces, les programmes de contrôle restent coûteux et peu adaptés aux conditions de terrain. Or, dans le but d'améliorer la détection et la gestion de l'ulcère de Buruli, il est essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui déclenchent la pathogénèse de la maladie.

Dans ce contexte, la communauté biologique a été largement active ces dernières décennies. En effet, de nombreuses études en biologie cellulaire, immunologie ou encore microbiologie ont été publiées et ont amené à des avancées majeures concernant la compréhension mécanistique de l'ulcère de Buruli. Grâce à un travail interdisciplinaire, la préparation de pharmacophores de mycolactones synthétiques a également permis de réaliser des études de relation structure-activité (SAR) de la toxine, permettant, entre autres, la détermination des fonctions chimiques responsables d'un effet biologique cible dans l'organisme.

Les différents aspects biologiques de la maladie seront étudiés dans les paragraphes suivants ; les études sur les propriétés biologiques étant très vastes, seules les plus significatives seront discutées en détail. Par la suite, la synthèse des analogues de mycolactones et leur contribution à la compréhension du déroulement de la maladie d'un point de vue moléculaire seront analysées.

2. 1. Effets biologiques des mycolactones

Après la découverte de la toxine impliquée dans l'infection à *M. ulcerans* en 1999, de nombreux groupes de recherche ont essayé d'élucider le mécanisme d'action des mycolactones et de trouver l'une de leur cible cellulaire. Bien que le mode d'action exact des mycolactones sur les cellules soit encore dans une phase exploratoire, deux effets biologiques principaux de ces toxines ont néanmoins été identifiés dès les années 1970 : un effet cytopathique et un effet immunosuppresseur.^{1,2} Ces effets ont été prouvés sur une large gamme de cellules et tissus, et, en particulier, la cytotoxicité cellulaire de la toxine due à son activité apoptotique, a été largement rapportée.³ Cette capacité à provoquer une apoptose massive, considérée alors comme la cause de la destruction des tissus observée lors de l'infection,⁴ a été démontrée *in vivo* par des études sur des fibroblastes murins L929, des cellules adipeuses, des kératinocytes et des cellules du système inflammatoire, mais également *in vivo* sur de petits animaux tels que les cochons d'inde.^{5,6}

2.1.1 Effet cytopathique⁷

Dès 1974, l'effet cytopathique de *Mycobacterium ulcerans* a été démontré sur des cellules du tissu conjonctif nommées fibroblastes murins L929. Ainsi, le traitement de ces fibroblastes murins, présentant une forme initiale fusiforme, avec des cultures stériles de *M. ulcerans*, mais également avec différentes concentrations en mycolactone A/B, engendre une réorganisation du cytosquelette de la cellule.^{1,8} Comme démontré sur la Figure 1, l'incubation de fibroblastes murins L929 en présence de mycolactone A/B conduit à un ralentissement de la croissance cellulaire suivi d'un arrondissement des cellules (90 à 100%) après 24 heures. Ces dernières se détachent ensuite du support et le phénomène d'apoptose (20 à 35%) se produit 48 heures après le début de l'incubation. Ces analyses ont également permis de montrer que *M. ulcerans* et la mycolactone A/B purifiée bloquent la croissance des fibroblastes murins L929 en phase G0/G1 du cycle cellulaire, mais que cet effet cytostatique est réversible lorsque la cellule n'est plus en contact de la toxine.^{9,10} L'activité cytopathique des mycolactones sur ces mêmes cellules a pu être quantifiée à 20 nM (valeur de référence) par le groupe de Small.^{10b} Par la suite, des études par cytométrie en flux ont permis d'estimer la concentration de mycolactones pour laquelle la moitié des cellules cibles sont tuées (LC₅₀) ainsi que celle nécessaire pour inhiber à 50% l'activité métabolique des cellules (IC₅₀). Pour la mycolactone A/B, la LC₅₀ a été mesurée à 12 nM et l'IC₅₀ à 5 nM.¹¹

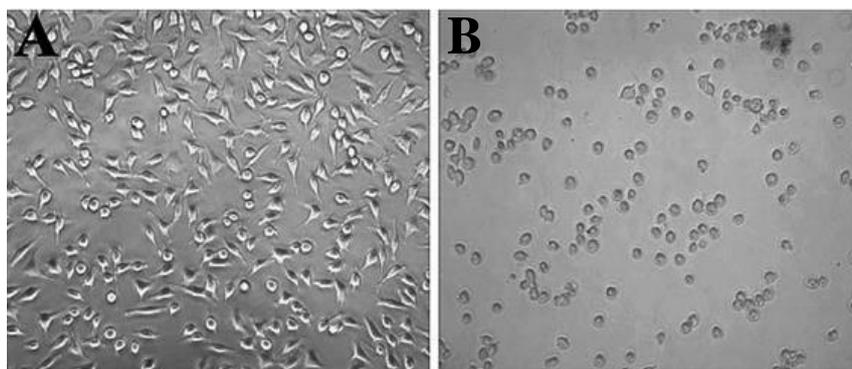


Figure 1 : Photos de fibroblastes L929 murins (A) et arrondissement des cellules après 24 heures d'incubation avec 100 ng de mycolactone A/B (B).¹² Figure adaptée de la réf.12 avec permission. Copyright 2017 – American Society for Microbiology

La toxicité de la mycolactone A/B a également été démontrée à travers une étude basée sur un mutant de *M. ulcerans* (*tox⁻* mutant 1615 A) incapable de produire les toxines. Ce dernier a été testé sur les mêmes cellules L929 que précédemment sans qu'aucun effet cytopathique ne soit observé, même après 48 heures d'incubation. De plus, l'injection intradermique du mutant à des cochons d'inde ne provoque pas non plus l'ulcération cutanée observée lors de l'inoculation de la mycolactone A/B, démontrant ainsi l'implication de la toxine.⁹

Il est à souligner que l'effet cytopathique des mycolactones chez les patients semble être dépendant de la concentration de la toxine. En effet, une étude réalisée par l'équipe de Small en 2005 démontre que de faibles concentrations de mycolactones (de 15 ng/mL à 1 µg/mL) ne provoquent pas de libération significative de lactase déshydrogénase, synonyme de nécrose cellulaire, mais que celle-ci est observée à partir d'une concentration en mycolactones égale à 15 µg/mL après 4 heures d'incubation.¹³ Par ailleurs, des changements rapides de la perméabilité cellulaire sont également notés lors de ces études. En effet, au centre de la lésion, une nécrose avec destruction des tissus adipeux est observée de façon prédominante. Au contraire, une concentration

plus faible de la toxine conduit majoritairement au phénomène d'apoptose à la périphérie de la lésion. Bien que les mycobactéries ne soient pas mobiles, des lésions à distance du site d'infection sont observées sans amplification de la réponse immunitaire initiale.^{14,15} Ainsi, la réplification localisée de bacilles amène l'hypothèse de la formation de micro-colonies qui pourraient entraîner des concentrations locales de mycolactones extrêmement élevées.¹⁶ La mort des adipocytes au contact de la toxine conduit alors à la libération d'acides gras créant un environnement hydrophobe qui facilite la diffusion de la mycolactone. La toxine diffuse alors des tissus infectés vers les organes lymphoïdes par le sang périphérique et peut s'accumuler dans les organes internes, favorisant l'apparition de lésions hors du site d'infection.

En 2010, une étude sur les kératinocytes de type HaCaT, cellules de la peau ayant un rôle central dans la cicatrisation et la réparation des plaies, a été réalisée. Elle a permis de démontrer l'effet cytotoxique de la toxine sur l'épiderme.¹⁷ En effet, une forte concentration en mycolactone, dès 1000 ng/mL (équivalent à 1,35 μ M), induirait environ 30% d'apoptose, valeur relativement faible due au rôle joué par les antioxydants (ROS) dans ce mécanisme.^{6c} Le développement des lésions d'ulcère de Buruli ne serait ainsi pas seulement dû à des phénomènes apoptotiques et nécrotiques dans les tissus sous-cutanés, mais aussi à l'action directe de la mycolactone sur la couche superficielle de la peau.¹⁸

Les mycolactones jouent également un rôle sur le caractère indolore des lésions caractéristiques de l'ulcère de Buruli. Cette perte de sensation de douleur, observée quant à elle à des doses non cytotoxiques en toxines,¹⁵ peut être expliquée par l'interaction des mycolactones avec des cellules nerveuses^{19,20} et aussi par leur effet immunosuppresseur.

2.1.2 Effet immunosuppresseur

Depuis la découverte de cellules mononuclées à la périphérie de l'infection et non à côté de la bactérie, suggérant alors un défaut de signal du système immunitaire,^{14a,21} plusieurs études ont été menées pour découvrir le rôle exact de la mycolactone A/B dans ce phénomène. Bien que le mécanisme de l'immunosuppression, mis en évidence pour la première fois en 1988,^{2b} ne soit pas clairement établi, diverses avancées ont permis d'établir des hypothèses acceptées par la communauté scientifique.

Pour rappel, un organisme vivant peut mettre en place deux types de réponses immunitaires pour faire face à un pathogène : la réponse immunitaire humorale et la réponse immunitaire cellulaire. Cette dernière se divise elle-même en deux catégories de réponse : l'immunité innée qui fournit une réponse non spécifique mais immédiate à une infection donnée, et l'immunité adaptative qui assure une réponse spécifique par reconnaissance d'un antigène suivie de l'amplification de la réponse immunitaire, mais qui est beaucoup plus lente à se mettre en place. Certaines cellules du système immunitaire sont responsables de l'immunité innée, telles que les macrophages et les cellules dendritiques, tandis que les lymphocytes sont responsables de l'immunité adaptative. Au cours d'une réponse immunitaire, l'organisme fait prédominer la réponse la mieux adaptée en fonction du type d'antigène à éliminer.

Sur un type de cellule donné, les concentrations en mycolactones pouvant générer l'effet immunosuppresseur sont généralement inférieures aux doses cytotoxiques, mais l'action observée est beaucoup plus rapide. A titre d'exemple, les monocytes humains primaires commencent à

produire du TNF (facteur de nécrose tumorale) 40 minutes après l'exposition à un agent pathogène, or un dixième de la dose cytopathique de mycolactones inhibe complètement la production de cette cytokine importante dans la réponse anti-microbienne.²²

L'immunité innée est la première des défenses de l'organisme à être touchée par l'infection à *M. ulcerans*. En effet, la première étape de l'infection semble être la phagocytose de *M. ulcerans* par les macrophages (Figure 2). Cette première étape est suivie d'une inhibition progressive de l'activité phagocytaire qui correspond à la production de la toxine, mettant en évidence l'existence d'une phase de croissance de la mycobactérie au sein des macrophages.^{21b} Les seconds acteurs de l'immunité innée touchés par l'infection sont les cellules dendritiques. Ces dernières sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et sont activées lorsqu'un pathogène est phagocyté et que des antigènes sont synthétisés. Par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les cellules dendritiques sont capables de présenter les antigènes, synthétisés après phagocytose, aux lymphocytes, et sont donc des éléments clés de la réponse immunitaire à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative. En présence de mycolactones, les cellules dendritiques ne sont plus capables de produire les signaux chimiotactiques de la réponse immunitaire, notamment la production de chimiokines²³ essentielles pour la réponse immunitaire. De plus, la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques semble être également bloquée en présence de la toxine et le recrutement de cellules inflammatoires vers le site d'infection est également limité. Ceci explique alors le manque de réponse inflammatoire, qui se traduit par une diminution de l'activation des lymphocytes T lors de l'infection par *M. ulcerans*. Par ailleurs, il est à noter que la production de cellules immunitaires au cours de la maladie peut avoir lieu selon deux voies : soit au site d'infection où la concentration est cytotoxique, soit au niveau systémique en diminuant les réponses des cellules dendritiques et des cellules T. Néanmoins, les hypothèses actuellement en cours ne permettent pas d'affirmer si l'immunosuppression est essentiellement locale ou plutôt systémique.^{3a,13,14a,21a,24,25}

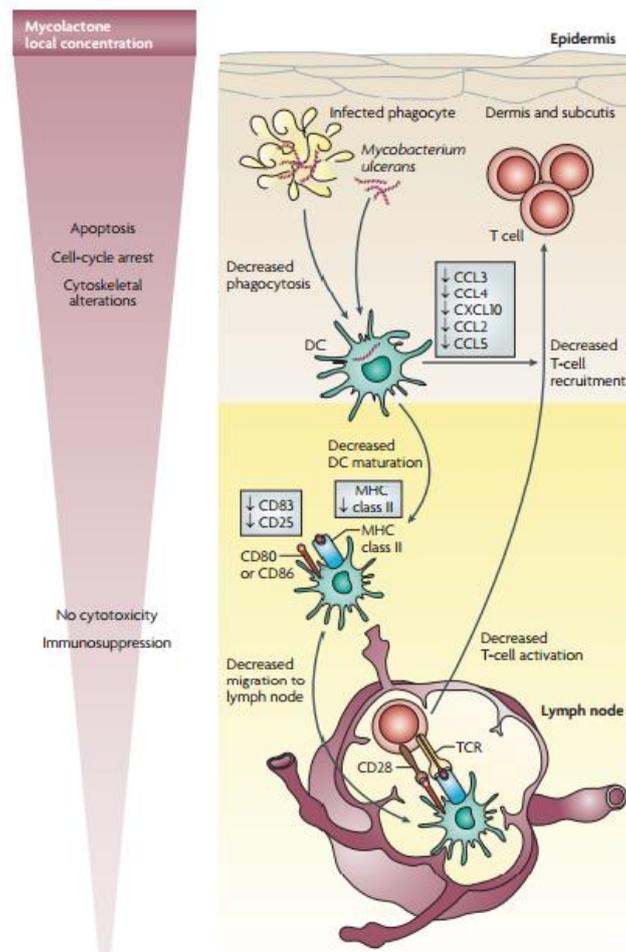


Figure 2: Représentation schématique des mécanismes biologiques entraînant les effets cytopathique et immunosuppresseur des mycolactones.²⁶ Figure reproduite de la réf. 26 avec permission. Copyright 2009 – Nature

L'infection par *Mycobacterium ulcerans* entraîne un changement de la réponse immunitaire primaire au cours du temps. La première activation de l'immunité adaptative au stade de la formation des lésions a été démontrée par la modification des niveaux d'ARNm dans de nombreuses cytokines (TNF, IL-2, IL-10, IFN- γ ...).²⁷ Les cytokines représentent un groupe diversifié de protéines qui agissent en tant que médiateurs entre cellules et sont synthétisées par les cellules du système immunitaire, notamment par les lymphocytes T. Elles agissent à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Les lymphocytes T, dont leur maturation se produit dans le thymus, acquièrent un récepteur (T-cell receptor, TCR) capable de reconnaître l'antigène présenté par les CPA : l'activation après rencontre avec l'antigène permet leur prolifération dans l'organisme ainsi que leur différenciation. En effet, il existe deux types principaux de lymphocytes T : les lymphocytes T CD4⁺, appelés T-helper (Th), et les lymphocytes CD8⁺, appelés T-cytotoxiques (Tc). Les lymphocytes Th, dérivant d'un précurseur commun qui sécrète de l'interleukine IL-2, peuvent également être divisés en deux sous-catégories selon leur profil de sécrétion cytokinique : les Th1 sécrétant les INF- γ , et les Th2 sécrétant les IL-4, IL-5, IL-13 et IL-10. Ces intermédiaires de la réponse immunitaire peuvent moduler les mécanismes de défense d'un organisme, on parle alors de balance Th1/Th2. Quand les lymphocytes Th1 prédominent, la réponse immunitaire est orientée vers une immunité adaptative avec production importante de cellules Tc, alors que lorsque les Th2 sont majoritaires la réponse immunitaire est dirigée vers une immunité humorale avec différenciation des lymphocytes B et production d'anticorps en grande quantité. De manière générale, une immunité adaptative de

type Th1 avec une production élevée d'interférons (IFN- γ) permettant l'activation des macrophages est nécessaire pour combattre une infection mycobactérienne.²⁸

Or, dans le cas particulier de l'infection par *M. ulcerans*, une modification de la balance Th1/Th2 est observée. Quand la maladie est au stade de nodules, la réponse Th1 semble prédominer avec une production importante d'IFN- γ et d'IL-2 ainsi qu'une faible concentration d'IL-10.^{27c} Au stade de lésions ulcérales, la production des cytokines TGF- β et IL-10 est élevée et une inversion vers la réponse de type Th2 est observée avec diminution du niveau d'IFN- γ .²⁹ Il est important de noter que le niveau d'IFN- γ redevient normal après excision des lésions par chirurgie, indiquant que l'effet immunosuppresseur n'est pas la conséquence d'un défaut génétique dans les cellules T mais est dû à la présence de *M. ulcerans*.³⁰ De plus, les cytokines produites par la réponse Th1 inhibent les lymphocytes Th2 et inversement, mettant en évidence l'importance de la balance Th1/Th2 pour l'élimination de *M. ulcerans*.

Dès 1999, une première expérience utilisant une préparation partiellement purifiée d'extraits de *M. ulcerans* suggère que les propriétés immunosuppressives de la mycolactone s'étendent aux monocytes et lymphocytes car elles inhibent la production d'IL-2 par des lignées de cellules T activées.³¹ Cette étude a été confirmée plus tard en démontrant que la mycolactone A/B pure inhibe directement la production d'IL-2 et d'IFN- γ dans les lymphocytes T.^{16,32} Sachant que l'interleukine 2 permet aux lymphocytes T ayant reconnu un même antigène de se diviser et de proliférer, la diminution de sa production par les cellules T activées entraîne un défaut de réponse immunitaire.

De plus, la mycolactone A/B est également capable de bloquer le processus de « homing » des cellules T, à savoir la migration de ces dernières vers les ganglions lymphatiques périphériques (PLNs). En effet, l'administration *in vivo* d'une large dose de toxine (de 50 à 100 μ g) a été associée à une réduction de l'expression du récepteur L-selectine (CD62-L), ce dernier étant une molécule d'adhésion cellulaire présente chez les lymphocytes afin de permettre leur migration.³³

Par ailleurs, la mycolactone A/B a la capacité de stimuler l'activité d'une kinase lymphocytaire de la famille des Src appelée Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase).³⁴ Cette kinase, présente dans les lymphocytes T, est capable de phosphoryler les résidus tyrosine de certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire de ces lymphocytes. Il a été montré que la mycolactone A/B a pour effet d'hyperactiver la Lck en la relocalisant vers des micro-domaines de la membrane plasmique appelés les « lipides rafts ». Cette activation engendre une cascade de signalisations dans les lymphocytes T dont l'effet est la diminution de l'expression des récepteurs des cellules T (TCR) et l'activation de la phosphoinositide, une phospholipase C (PLC- γ 1) présente autour de la kinase. Le résultat se traduit par un changement du niveau de calcium intracellulaire.³⁵ Ces deux mécanismes biologiques induits par la mycolactone A/B contribuent à l'inactivation fonctionnelle des lymphocytes T et par conséquent à l'apoptose des cellules.

Ainsi, les mycolactones induisent une diversité d'effets biologiques, et ce sur une large gamme de cellules. Dans l'ensemble, l'arrêt de la production de protéines (cytokines, chimiokines et autres) par les principaux acteurs de la réponse immunitaire et la perte d'adhésion cellulaire apparaît comme la cause de l'immunosuppression et de la nécrose des tissus.³⁶ Récemment, l'analyse métabolomique de patients atteints par la maladie a mis en évidence des altérations dans leur sérum, indiquant probablement l'inhibition de la production de protéines sécrétées par la mycolactone au niveau cellulaire.³⁷ Par ailleurs, il est important de souligner que ces effets sont

dépendants de la lignée cellulaire avec laquelle la toxine est en interaction, du temps d'exposition, mais également de la concentration en mycolactone.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels la mycolactone A/B induit ces effets ont représenté un grand nombre d'études ces dernières années, ce qui a conduit à la découverte de plusieurs cibles cellulaires. Par ailleurs, l'analyse de la localisation de la mycolactone A/B au sein de la cellule a joué un rôle essentiel dans ces avancées.

2.1.3 Localisation cellulaire de la mycolactone A/B

Dès 2003, la localisation cellulaire de la toxine a été étudiée par Snyder et Small via l'utilisation du composé fluorescent de mycolactones **123** obtenu en quelques étapes à partir de la toxine extraite de cultures de *M. ulcerans*.³⁸ Plus récemment, l'équipe de Demangel, avec laquelle notre laboratoire entretient une collaboration, a également étudié la distribution cellulaire de la toxine en utilisant cette fois-ci l'analogue fluorescent de mycolactones **124** (Figure 3), obtenu par synthèse totale.³⁹ Bien que l'effet cytopathique de ces deux dérivés sur les fibroblastes murin L929 soit inférieur à celui de la mycolactone A/B, ces études ont permis de prouver que la toxine rentrait par diffusion passive au travers la membrane plasmique et restait localisée uniquement dans le cytoplasme des cellules sans entrer dans le noyau. Des résultats similaires ont été obtenus par incubation de cellules épithéliales ou de lymphocytes humains avec une mycolactone A/B enrichie en ¹⁴C, appuyant ainsi l'hypothèse d'une cible biologique cytoplasmique.²⁵

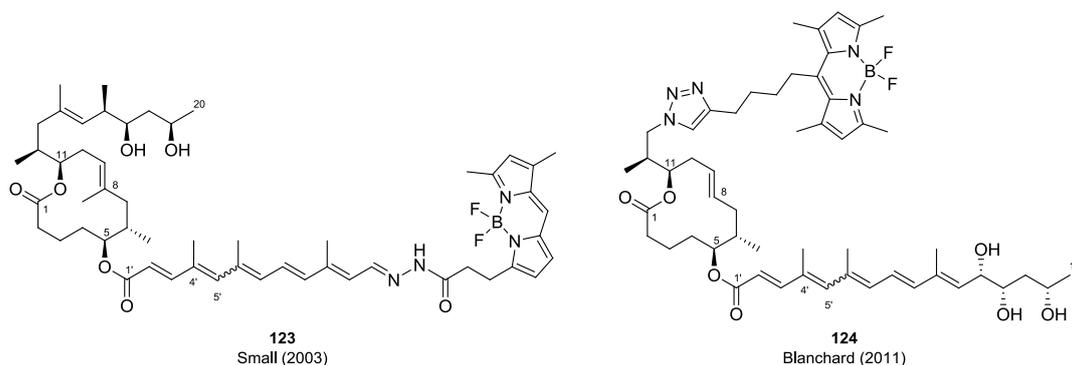


Figure 3 : Structure des dérivés fluorescents Bodipy-Mycolactone par Small (2003) et Blanchard (2011)

Des études par coloration de l'actine, qui joue un rôle important pour l'architecture et le mouvement cellulaire, ont également été réalisées afin de mettre en évidence un lien éventuel entre le réarrangement du cytosquelette observé, lors de l'incubation de la toxine, et cette protéine. Cependant, l'absence de co-localisation entre l'actine colorée des cellules L929 et les analogues fluorescents de mycolactones ont démontré que ces derniers n'avaient pas d'action directe sur l'actine. Néanmoins, ce résultat obtenu par Small doit être mis en perspective avec la découverte en 2013 d'un effet de la mycolactone A/B sur une famille de protéine régulatrice de la polymérisation de l'actine.⁴⁰ Cette première cible protéique a permis une progression dans la compréhension mécanistique de l'ulcère de Buruli.

2.1.4 Avancées sur les mécanismes biologiques de l'ulcère de Buruli

L'observation du réarrangement du cytosquelette de certaines cellules suivi de leur détachement de la surface de culture après incubation avec la mycolactone A/B, qui se loge alors

dans leur cytoplasme, a permis de mettre en évidence un lien entre la toxine et une potentielle cible biologique au sein de la cellule. Les premières recherches se sont alors tournées vers un récepteur impliqué dans la régulation de la dynamique du cytosquelette, amenant l'équipe de Demangel à rapporter la première cible biologique des mycolactones en 2013. Cette dernière se trouve être une famille de protéines impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine : WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein) et N-WASP (neural-Wiskott-Aldrich Syndrome protein).^{40,41} Plusieurs découvertes ont fait suite à cette première avancée. En 2014, les groupes de Brodin et Marsollier ont identifié une nouvelle cible biologique des mycolactones, à savoir un récepteur de l'angiotensine II.²⁰ Cette même année, le groupe de Simmonds met en évidence un point clé du mécanisme d'action des mycolactones : l'inhibition de la translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique.^{36,42} Cette étude sera poursuivie par le même groupe quelques années plus tard et débouchera sur la découverte du mécanisme moléculaire de cette inhibition : la mycolactone affecterait le translocateur Sec61.⁴³ Le groupe de Demangel appuie également cette hypothèse par l'analyse en 2016 de la cible Sec61 pour expliquer l'effet immunosuppresseur de la mycolactone A/B.⁴⁴ Très récemment, une nouvelle cible biologique est décrite par le groupe de Pluschke : la mycolactone serait un inhibiteur de l'enzyme mTOR (cible mécanistique de la rapamycine),⁴⁵ régulatrice de différents processus cellulaires importants.

Ces points clés de la compréhension mécanistique de l'ulcère de Buruli sont développés dans les sous-paragraphes suivants.

2.1.4.1. Les cibles WASP et N-WASP par Demangel (2013)

La protéine WASP (502 acides aminés) est le premier membre identifié de la famille des régulateurs d'actine, dont cinq sont exprimés chez les mammifères.⁴⁶ N-WASP, composée de 505 acides aminés, a, quant à elle, été découverte deux ans après, soit en 1996.⁴⁷ Alors que WASP est uniquement exprimée dans les lignées de cellules sanguines, la protéine N-WASP est exprimée dans un plus grand nombre de tissus.⁴⁸

A l'état inactif, les protéines WASP et N-WASP sont repliées sur elles-mêmes (Figure 4, A). Cet état de repliement est dû à une interaction intramoléculaire entre le domaine C-terminal verprolin-cofilin-acidic (VCA) et le complexe de la région GTPase Binding Domain (GDB). Après activation du domaine N-terminal par un stimulus approprié, WASP et N-WASP se déplient permettant alors au domaine VCA d'activer le complexe Arp2/3, un nucléateur essentiel de l'actine. Cette nouvelle interaction induit alors la polymérisation de l'actine. Les travaux menés par l'équipe de Demangel ont démontré que la mycolactone A/B est un activateur de WASP et N-WASP cent fois plus puissant que le ligand CDC42, principal régulateur *in vivo* de ces protéines.¹⁵ En présence de la toxine, les protéines WASP et N-WASP sont activées de manière continue et conduisent à une polymérisation non contrôlée des filaments d'actine, provoquant un réarrangement très rapide du cytosquelette (Figure 4, B). Il est important de noter que la mycolactone A/B est également la première molécule non protéique capable d'interagir avec WASP et N-WASP.

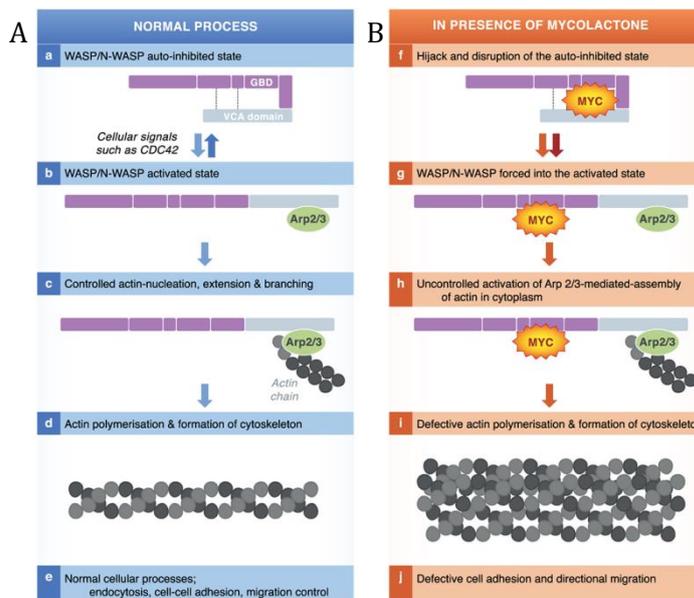


Figure 4 : Modèle du mécanisme d'activation de WASP et N-WASP en l'absence de mycolactones (A) et en présence de mycolactones (B).⁴⁹ Figure reproduite de la réf. 49 avec permission. Copyright 2017 – WILEY

L'étude de la mycolactone sur la viabilité de cellules épithéliales de type HeLa a permis de démontrer que la liaison de la toxine à N-WASP affecte l'adhésion, mais aussi la vitesse de migration et le sens de direction de ces cellules. Ces résultats ont permis de mettre au point le premier mécanisme moléculaire impliqué dans l'infection par *M. ulcerans* : il débute avec un amincissement de l'épiderme puis conduit à l'apoptose, entraînant alors la rupture de l'épiderme. Une première explication à l'apparition d'ulcères cutanés lors de l'infection par *M. ulcerans* est alors proposée. Par ailleurs, une augmentation de la concentration en complexe Arp2/3 sur N-WASP dans la zone périnucléaire de cellules épithéliales exposées à la mycolactone A/B a été notée, prouvant ainsi la capacité de cette toxine à activer Arp2/3 via N-WASP. De même, il a été observé que l'injection *in vivo* de mycolactones dans les oreilles de souris modifiait l'organisation jonctionnelle et la cohésion des kératinocytes, entraînant un amincissement cutané puis une rupture du derme. Or, ce processus de dégradation a été supprimé par co-administration de wiskostatine, l'inhibiteur de N-WASP, démontrant encore une fois l'activité de la mycolactone sur sa cible.

Afin de renforcer son analyse, le groupe de Demangel a utilisé l'analogue fluorescent de mycolactones **124**,³⁹ présenté précédemment, pour des études de microscopie par immunofluorescence (Figure 5).⁴⁰ Des cellules de types Jurkat ont été incubées avec cet analogue fluorescent dont l'activité biologique est relativement similaire à la toxine naturelle (en vert, cadre (1)). De façon analogue, ces cellules ont été incubées avec du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), une molécule fluorescente permettant de colorer le noyau des cellules (en bleu clair, cadre (2)). Il est important de noter que la comparaison de ces deux clichés a permis de confirmer que la toxine restait localisée dans le cytoplasme de la cellule sans entrer dans le noyau. Par la suite, les cellules Jurkat ont été incubées avec WASP marquée sous sa forme ouverte (active) grâce à l'action d'anticorps spécifique (en mauve, cadre (3)) et avec le complexe Arp2/3 lui aussi marqué (en rouge, cadre (5)). Le cliché obtenu avec **124** a ensuite été comparé avec le cliché de la forme active de WASP (cadre (4)) et avec le cliché d'Arp2/3 (cadre (6)). Une co-localisation limitée mais significative entre l'analogue fluorescent de mycolactones et la forme active de WASP marquée après 1 heure a été

observée, démontrant ainsi que la mycolactone A/B favorise l'activation et l'incorporation de Arp2/3 par WASP.

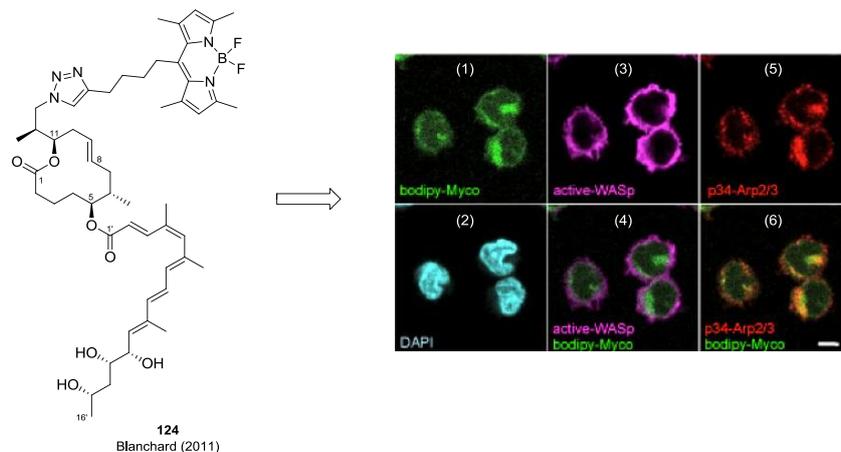


Figure 5 : Identification de WASP et N-WASP comme cibles protéiques des mycolactones.⁴⁰ Figure adaptée de la réf. 40 avec permission. Copyright 2013 – *The Journal of Clinical Investigations*.

2.1.4.2. Le récepteur de l'angiotensine II par Brodin et Marsollier (2014)

L'absence de douleur, appelée hypoesthésie et observée dans la pathologie de l'ulcère de Buruli, a été initialement attribuée à la destruction des cellules du système nerveux par la mycolactone A/B.¹⁹ Or, les formes précoces de la maladie, indolores, ne présentent pas de destruction ou de lésions des cellules nerveuses. Cette contradiction a poussé les groupes de Marsollier et Brodin à étudier ce phénomène en émettant l'hypothèse selon laquelle la mycolactone A/B modulerait la transmission de l'influx nerveux par un mécanisme indépendant de la destruction des cellules nerveuses.²⁰

A travers des études réalisées sur des cellules de types PC12, présentant des propriétés proches de celles des neurones, et d'un criblage à haut débit pour identifier le récepteur impliqué, Marsollier et Brodin ont démontré que cette analgésie était due à l'activation, dose-dépendante en mycolactone A/B, d'un récepteur de l'angiotensine II (Figure 6). En se liant au récepteur de l'angiotensine II (AT₂R), la mycolactone A/B induit une cascade de signalisation menant à l'activation des cyclo-oxygénases de type 1 via une phospholipase A2 (PLA₂). Cette dernière, une enzyme faisant partie de la classe des hydrolases, induit ensuite la synthèse de l'acide gras présent dans les phospholipides constituant les membranes cellulaires, nommé acide arachidonique (AA). L'acide arachidonique est ensuite métabolisé en prostaglandine de type 2 (PGE₂), un autre acide gras jouant un rôle dans l'inflammation. Les PGE₂ vont directement interagir avec les canaux potassiques de la famille TRAAK (TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺), déclenchant ainsi leur ouverture. L'ouverture de ces canaux favorise alors une fuite de potassium provoquant l'hyperpolarisation cellulaire qui serait à l'origine de l'effet analgésique.

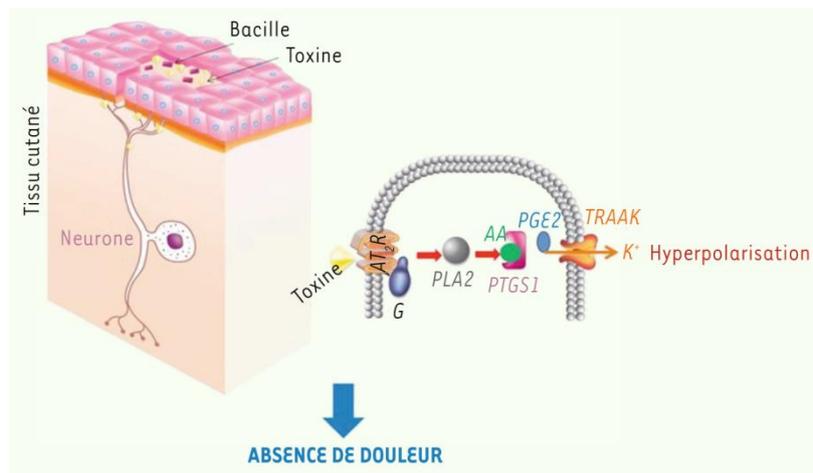


Figure 6 : Modèle de la cascade signalétique induite par la mycolactone A/B.⁵⁰ Figure reproduite de la réf. 50 avec permission. Copyright 2017 – EDP Sciences

Bien que Marsollier et Brodin aient démontré leur hypothèse par des études *in vitro* mais également *in vivo*, cette proposition de mécanisme a soulevé plusieurs interrogations au sein de la communauté scientifique, notamment sur la transduction du signal invoqué, le choix des modèles ou encore les concentrations en mycolactones utilisées.⁵¹ Par ailleurs, il faut souligner que l'expression de l'AT₂R en dehors du cerveau chez les adultes en bonne santé est controversée,⁵² or aucune étude ne démontre pour le moment la capacité de la toxine à traverser la barrière hémato-encéphalique. L'évaluation de ce mécanisme chez les patients atteints par l'ulcère de Buruli reste également à être vérifié.

2.1.4.3. Inhibition de la translocation des protéines via Sec61 par Simmonds (2014-2017) et Demangel (2016)

Le groupe de Simmonds a été le premier à s'intéresser à l'inhibition de la production de certaines protéines par les mycolactones lors de l'infection à *M. ulcerans* afin de déterminer les mécanismes mis en jeu par la toxine pour contourner le système immunitaire de l'hôte infecté. Une analyse détaillée sur les monocytes humains primaires a permis de proposer une première hypothèse impliquant un mécanisme post-transcriptionnel pour l'action des mycolactones, probablement au niveau de la traduction.²² Par ailleurs, cette même étude révèle également que la mycolactone n'est pas un inhibiteur général de la production de protéines car elle ne supprime pas la synthèse de toutes les protéines, mais qu'au contraire elle semble cibler sélectivement un sous-ensemble de gènes pour le contrôle de la production des cytokines, chimiokines et autres molécules effectrices intracellulaires.³⁶

Ces efforts ont mené à la découverte en 2014 du phénomène biologique généralisé pouvant expliquer l'effet immunosuppresseur : la translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique.⁴² Ce phénomène représente un mode de transport des protéines leur permettant de traverser les membranes sans modifier le contenu cellulaire, et donc sans risques de perturber les fonctions essentielles de la cellule. La translocation est essentielle pour que les protéines y ayant recours puissent assurer leur fonction. Ainsi, le groupe de Simmonds a démontré que les mycolactones n'empêchaient pas la traduction des protéines dérivant des ARNm mais inhibaient leur translocation, notamment de plusieurs cytokines telles que TNF, IL-6 et Cox-2, qui transitent à travers le réticulum endoplasmique. Les protéines ainsi immobilisées dans cet organe, sans en

endommager la structure, subissent par la suite une dégradation par le protéasome signifiant ainsi l'arrêt de production des protéines circulant via le réticulum endoplasmique (Figure 7). Bien qu'il existe un certain nombre de mécanismes par lesquels les protéines peuvent pénétrer dans le réticulum endoplasmique afin d'être par la suite sécrétés, retenus ou insérés dans la membrane, cette étude propose également l'implication du translocon Sec61, essentiel au phénomène de translocation des protéines. En effet, ce complexe hétérotrimérique, composé des sous-unités Sec61 α , Sec61 β et Sec61 γ , est connu pour être responsable du transport de protéines, à la fois direct et rétrograde à travers la membrane du réticulum endoplasmique.⁵³

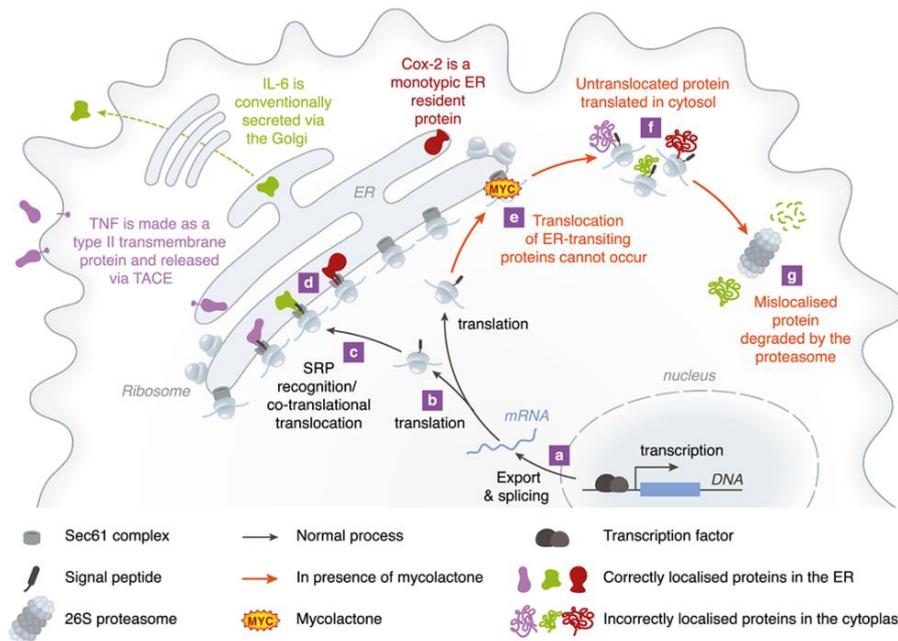


Figure 7 : Modèle du mécanisme d'inhibition de Sec61 par la mycolactone A/B.⁴⁹ Figure reproduite de la réf. 49 avec permission. Copyright 2017 – WILEY

Cette hypothèse a été confirmée et étayée deux ans plus tard par l'équipe de Simmonds^{43a} et celle de Demangel.⁴⁴ En utilisant des méthodes biochimiques et génétiques variées pour des analyses *in vitro* et *in vivo*, les deux groupes ont prouvé que la mycolactone ciblait principalement le translocon Sec61 pour l'inhibition de la translocation des protéines. De plus, cette inhibition concernerait seulement les protéines co-traductionnelles et non les post-traductionnelles. Ces différences observées sur la translocation des protéines seraient ainsi provoquées par un changement conformationnel des pores de la sous-unité Sec61 α ⁴⁴ induit par la mycolactone, ce qui stabiliserait une conformation fermée du complexe Sec61,^{43a} empêchant par conséquent la circulation des protéines.

Ces résultats mettent l'accent sur la complexité de la translocation dans le réticulum endoplasmique. Très récemment, l'utilité de la mycolactone en tant qu'outil de compréhension dans ce processus biologique a été démontrée.^{43b} Dans l'ensemble, ces avancées majeures ont mis en évidence un nouveau mode d'action des mycolactones, expliquant ainsi plusieurs des activités pathologiques de l'ulcère de Buruli, notamment le déficit en cytokines innées, la perte de récepteurs membranaires et de cellules T qui sont l'origine de cette infection.

2.1.4.4. La cible mTOR par Pluschke (2017)

La cible mécanistique de la rapamycin (mTOR) est une enzyme appartenant à la famille des sérine/thréonine kinases composée de deux complexes moléculaires distincts, l'assemblage mTORC1 et mTORC2, et d'un récepteur intracellulaire nommée FKBP12. Il est connu que la fonction principale de cette enzyme dans un organisme est la régulation de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales comme la synthèse de protéines et de lipides, mais aussi l'activité mitochondriale et l'organisation du cytosquelette. Or, en plus de posséder des similarités structurales à la rapamycine (une lactone immunomodulatrice naturelle),²⁶ le groupe de Pluschke a démontré que la mycolactone agissait de manière analogue en inhibant la voie de signalisation de mTOR. Ainsi, un mécanisme moléculaire de l'apoptose cellulaire observée dans la pathologie de l'ulcère de Buruli a été mis à jour.⁴⁵

Par des études impliquant des fibroblastes murins L929 et des modèles expérimentaux, il a été démontré qu'une possible interaction directe entre la mycolactone A/B et le récepteur FKBP12 engendre l'inhibition de mTORC2 (mais pas de mTORC1 comme avec la rapamycine), empêchant ainsi la phosphorylation de la protéine kinase Akt (Figure 8). La désactivation de cette dernière entrave la phosphorylation de plusieurs cibles d'Akt, y compris le facteur de transcription FoxO3 qui se trouve alors être quant à lui activé. Cette activation lui permet alors de rentrer dans le noyau de la cellule. Ceci conduit au déclenchement de la surexpression du régulateur pro-apoptotique *Bim*, et donc à l'apoptose des cellules en contact avec la mycolactone.

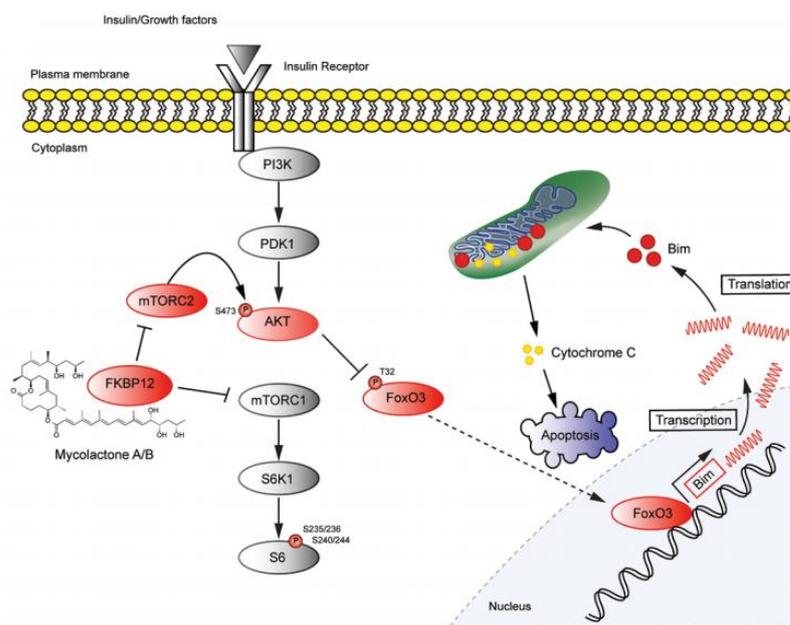


Figure 8 : Modèle du mécanisme d'inhibition de mTOR par la mycolactone A/B.⁴⁵ Figure reproduite de la réf. 45 avec permission. Copyright 2017 – American Chemical Society

Par ailleurs, il est souligné dans cette étude que la séquence d'évènements conduisant à l'apoptose de la cellule a duré 24 heures. Cette observation remet en cause les précédentes études effectuées sur une plus courte durée empêchant, ainsi, la reconnaissance de l'implication de l'inhibition du mTOR dans l'apoptose induite par la mycolactone.²²

Ces nouvelles avancées ont permis un début de compréhension du mode d'action de la maladie. Il est à souligner que l'ubiquité des cibles biologiques connues jusqu'à présent de la mycolactone est en relation avec le phénotype cellulaire observé dans les études cytopathiques et immunosuppressives. Cependant, la compréhension du mécanisme d'action de la toxine au niveau moléculaire, et notamment des interactions ayant lieu entre les mycolactones et leurs cibles protéiques, n'est que partielle à l'heure actuelle, et reste essentielle pour la mise au point de nouvelles méthodes de diagnostic et de traitements spécifiques de la maladie. Afin de fournir de nouveaux outils moléculaires pour explorer les interactions entre la toxine et ses cibles biologiques, plusieurs groupes se sont intéressés à la synthèse d'analogues de mycolactones et la mise au point d'une étude relation structure-activité (SAR) de ces toxines. Ces efforts de recherche sont détaillés dans les sous-chapitres suivants.

2. 2. Analogues de mycolactones

Afin de fournir des informations supplémentaires sur la biologie complexe de la mycolactone A/B, plusieurs groupes se sont penchés sur le développement de stratégies chimiques. A travers le concept de « synthèse totale diversifiée » (Diverted Total Synthesis, DTS), les groupes de Kishi,⁵⁴ d'Altmann^{11,55} et de Blanchard³⁹ ont développé des stratégies d'exploration fonctionnelle de la mycolactone A/B par la préparation d'analogues synthétiques, avec pour objectif l'étude de leurs activités biologiques. En effet, l'utilisation de mycolactones obtenues par cultures du bacille pour des études comparatives peut être compromise par l'hétérogénéité des préparations. Par conséquent, les études biologiques avec des mycolactones synthétiques hautement définies représentent une alternative attrayante. Par ailleurs, les premières études SAR de la toxine ont également servi de guide pour la conception de sonde de mycolactones fluorescente. L'analogue fluorescent **124** préparé par l'équipe de Blanchard a été essentiel dans la confirmation de la cible protéique de mycolactones rapportée par Demangel en 2013, soulignant ainsi l'importance des analogues de produits naturels dans l'étude de la biologie.

Les différents analogues de mycolactones (synthétiques ou non) rapportés dans la littérature, ainsi que leur synthèse, sont présentés dans les paragraphes qui suivent. Il est à noter que la reproduction de divers analogues décrits par notre laboratoire a fait l'objet d'une partie de cette thèse : grâce à l'optimisation de certaines étapes, il a été possible de fournir aux biologistes les quantités sollicitées pour des tests. Les résultats de l'évaluation biologique des analogues de mycolactones feront l'objet du dernier sous-chapitre.

2.2.1. *Synthèse des analogues de la mycolactone A/B*

Au cours de la détermination de la structure de la mycolactone A/B en 1999, le groupe de Small rapporte plusieurs modifications chimiques de la mycolactone A/B obtenue par fermentation, telles que des peracétylations des groupes hydroxyles ou des hydrogénations des doubles liaisons.⁹ Ces modifications structurales, qui se traduisent par une perte totale de l'activité cytotoxique, sont les premiers analogues de mycolactones rapportés. Par ailleurs, il faut rappeler que lors de la détermination de la stéréochimie de la mycolactone A/B en 2001, Kishi rapporte lui aussi la synthèse de composés modèles de mycolactones.⁵⁶

Toutefois, c'est le groupe d'Altmann en 2011 qui rapporte la synthèse des deux premiers analogues de mycolactones préparés dans le but spécifique de leur évaluation biologique.⁵⁵ Sur ces analogues simplifiés de mycolactones, la chaîne supérieure a été remplacée par un groupement isopropyle : la macrolactone **126** qui ne possède pas de chaîne inférieure et le composé **127** dont la chaîne inférieure est dérivée de l'acide sorbique (Schéma 1, éq. 1). **126** est obtenu à partir de la macrolactone tosylée **125**, un intermédiaire avancé de sa synthèse totale de la mycolactone A/B,⁵⁵ par réduction du tosyloxy par NaBH₄ à 100 °C, suivie de la déprotection du groupement silylé en position C5 par traitement acide. **127** est ensuite obtenu après estérification de **126** avec l'acide sorbique. En 2013, le même groupe rapporte six nouveaux analogues complets obtenus, là encore, à partir d'intermédiaires avancés de sa synthèse totale.¹¹ Ces composés présentent des modifications de la chaîne supérieure **128-130** ou de la chaîne inférieure **131-133** (Schéma 1, éqs. 2 et 3). En 2011, Kishi publie également deux analogues de mycolactones pouvant avoir une utilisation dans la formation de mycolactones conjuguées.⁵⁴ Ces derniers sont obtenus à l'aide d'intermédiaires avancés de synthèse⁵⁷ et possèdent une chaîne inférieure modifiée **134** et **135** (Schéma 1, éq. 3).

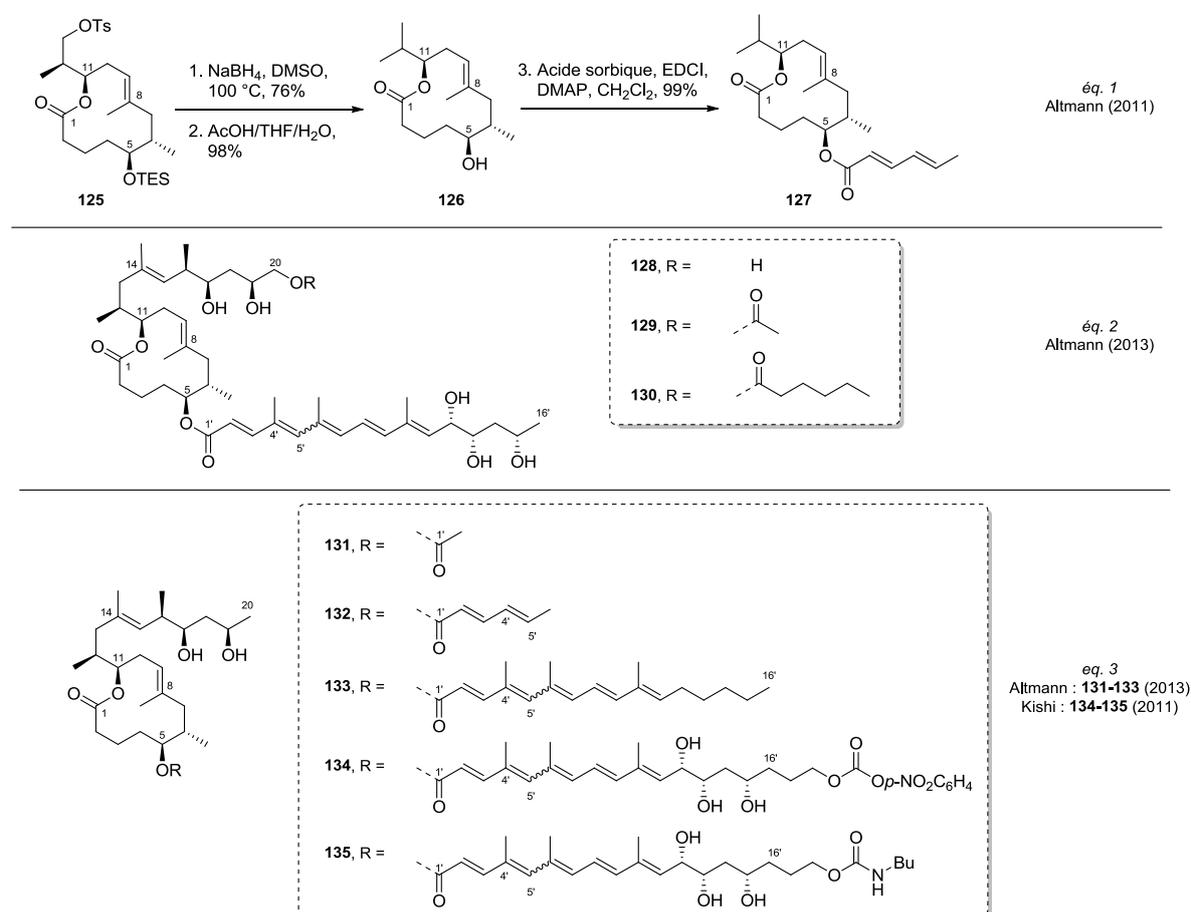


Schéma 1 : Analogues de mycolactones par Altmann (2011, éq. 1; 2013 éqs. 2 et 3) et par Kishi (2011, éq. 3)

Nous retenons également qu'en 2017, Kishi propose la synthèse de deux analogues de mycolactones stabilisés par réduction de la double liaison C6'-C7' afin d'étudier leurs propriétés chimique et biologique (voir partie 1.3.8).⁵⁸ En effet, au cours de son étude Kishi rapporte le caractère inerte des dihydro-mycolactones **122a** et **122b** (voir Figure 11) face à une cyclisation induite photochimiquement, mais tout en gardant une certaine cytotoxicité.

De manière similaire, les analogues de mycolactones dits « immobilisés » semblent être des outils très efficaces pour l'identification directe de la cible moléculaire de la mycolactone A/B, via notamment par une chromatographie d'affinité. Le groupement fonctionnel généralement utilisé se trouve être la biotine, de par sa grande affinité envers le couple avidine/streptavidine faisant office de matrice.⁵⁹ En effet, la collaboration d'Altmann avec le groupe de Pluschke a démontré très récemment l'utilité de dérivés biotinylés de mycolactones dans la confirmation de la cible mTOR de la mycolactone A/B pour expliquer le phénomène d'apoptose.⁴⁵ La stratégie a été de lier la mycolactone à la (+)-biotine par un lien de type PEG bi-fonctionnalisé permettant la conjugaison par de simples réactions d'amination. En utilisant des intermédiaires avancés de sa synthèse,⁵⁵ le groupe d'Altmann a préparé, selon la procédure décrite sur le Schéma 2, deux dérivés : l'analogue biotinylé **136** conjugué en C5 (éq. 1) et l'analogue **138** dont la biotine est fixée sur la chaîne supérieure en C20 (éq. 2).

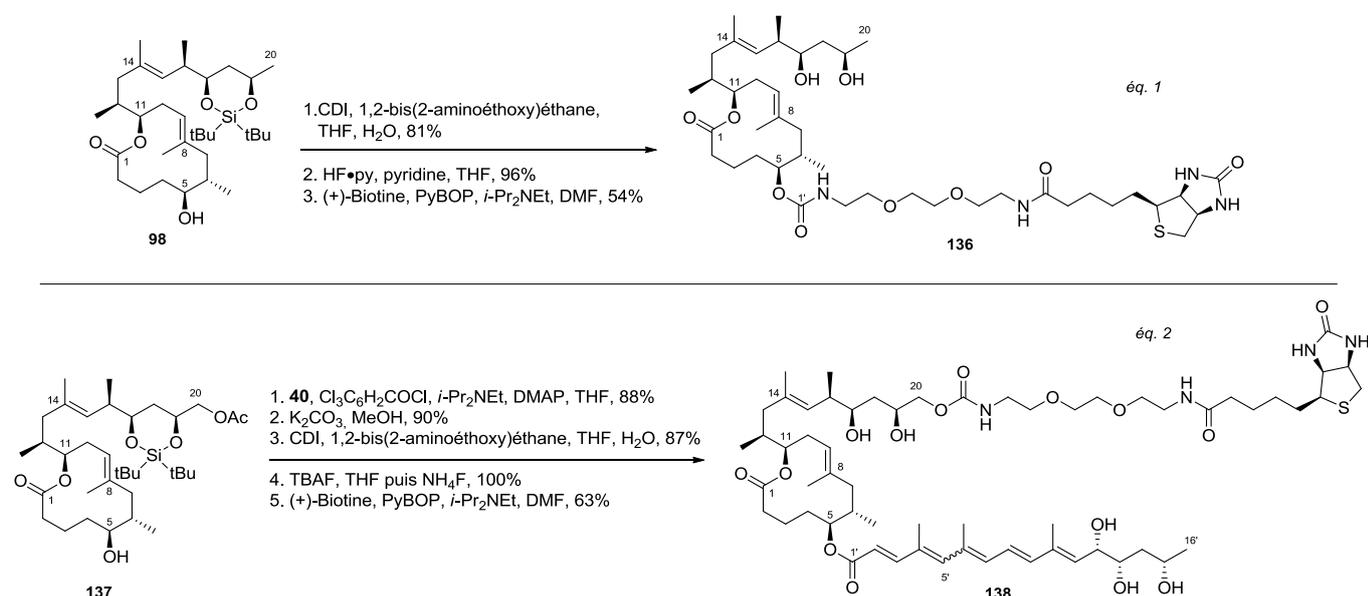


Schéma 2 : Synthèse des dérivés biotinylés de mycolactones par Altmann (2017)

Cette approche a également été utilisée au sein de notre laboratoire afin de fournir à nos collaborateurs de l'institut Pasteur deux dérivés biotinylés nécessaires pour la découverte de la cible biologique WASP.⁴⁰ La stratégie adoptée est quant à elle différente de celle d'Altmann : la conjugaison avec la (+)-biotine est réalisée sans lien PEG mais à l'aide d'une biotinyl-acylhydrazine commerciale. Cette dernière est insérée à la structure de la molécule via l'aldéhyde intermédiaire, formé après la coupure oxydante du 1,2-diol en C12'-C13' (Schéma 3). Malgré une procédure bien connue en littérature,⁶⁰ nous notons, pour notre cas, la présence de biotine oxydée sous forme de sulfoxyde à hauteur de 10 à 20% environ, en mélange avec les analogues désirés. Il est toutefois considéré que la biotine et sa forme sulfoxyde possèdent des activités similaires.⁶¹ Néanmoins, il faut souligner qu'aucune détection de biotine sulfone, dont les propriétés biologiques diffèrent complètement de la forme réduite,⁶² n'a été observée. A partir de la mycolactone A/B fournie par l'équipe de Kishi, notre équipe a synthétisé le dérivé biotinylé **139** avec un rendement de 89% après 2 étapes. Le dérivé **141** est obtenu dans les mêmes conditions à partir d'un composé important au laboratoire : l'analogue C8-desméthylé de mycolactones **140**.

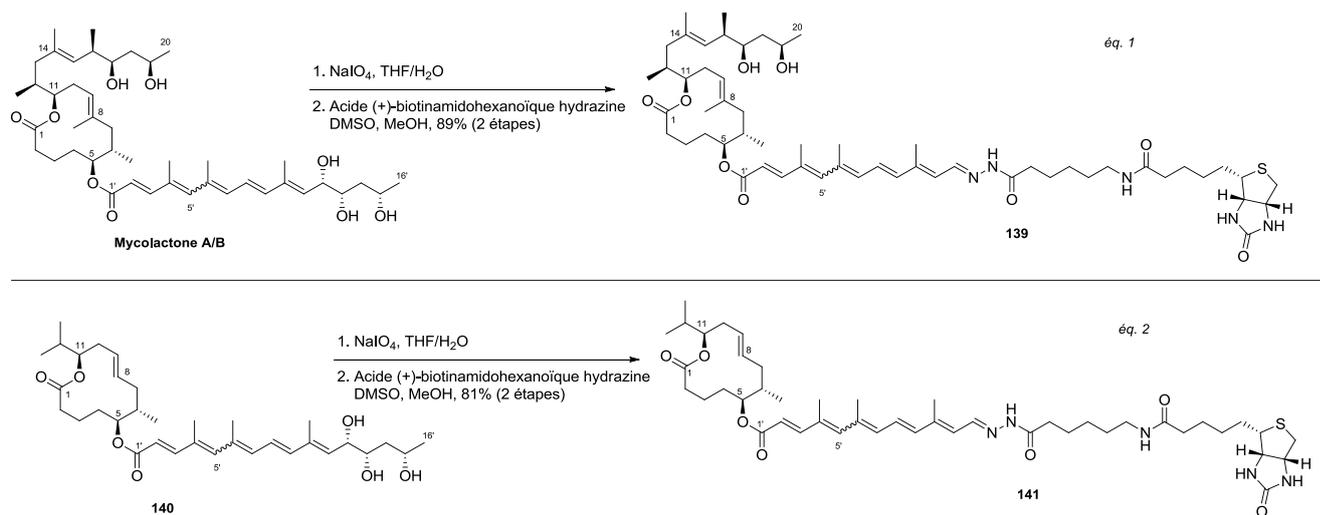


Schéma 3 : Synthèse des dérivés biotinylés de mycolactones par Blanchard (2013)

2.2.2. Synthèse des analogues C8-desméthylés de mycolactones par Blanchard (2011-2014)

Depuis 2006, notre laboratoire concentre ses efforts de synthèse sur la compréhension des interactions fonctionnelles, au niveau moléculaire, de la mycolactone A/B dans les systèmes biologiques. Dans cette optique, une voie de synthèse modulaire permettant un accès rapide à une large gamme d'analogues de mycolactones a été mise au point.³⁹ La stratégie est fondée sur la synthèse accessible d'une mycolactone C8-desméthylée permettant ainsi d'établir une première étude SAR de la toxine après attachement des chaînes latérales modifiées ou non.

2.2.2.1. Présentation de la voie de synthèse modulaire (2011)

Le concept rétrosynthétique est inspiré des synthèses totales précédemment développées,^{55,56,63} à savoir : une estérification finale et une réaction de couplage croisé pallado-catalysé servant à relier les deux chaînes latérales à la structure macrocyclique (Figure 9). La chaîne inférieure est préparée à l'aide d'un couplage croisé catalysé au cuivre, ce qui représente une nouveauté par rapport aux synthèses connues, et son motif triol est obtenu par des réactions de dihydroxylations asymétriques de Sharpless⁶⁴ presque consécutives. Il faut rappeler que chacune des mycolactones naturelles (de A/B à S2) possède une activité biologique très différente des autres, et que chacune ne diffère que par la nature de la chaîne inférieure C1'-C16', soulignant ainsi son importance pour l'activité biologique.^{25,38} En se basant sur ces données, la stratégie d'estérification en fin de synthèse, permettant d'insérer différentes chaînes inférieures sur le même précurseur C1-C20, est adéquate à la préparation d'analogues.

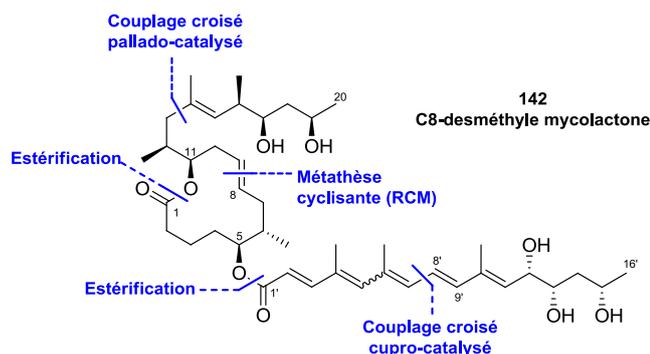


Figure 9 : Déconnexions envisagées pour la synthèse totale de la mycolactone C8-desméthylée par Blanchard (2011)

La préparation du fragment C1-C20 est basée sur la reconnaissance d'une stéréochimie identique des centres en position C6 et C12 pouvant alors être fixée à partir d'un unique précurseur chiral, à savoir le (*S*)-ester de Roche **93**. En s'appuyant sur les travaux de Fürstner pour sa synthèse des amphidinolides,⁶⁵ **93** est dans un premier temps protégé sous forme de tosylate avant d'être converti en aldéhyde **143**. Ce dernier est engagé dans l'étape d'allylboration de Brown,⁶⁶ permettant de fixer la configuration *syn* ou *anti* des centres C5/C6 et C11/C12 via les (-)- et (+)-Ipc₂allylboranes (Schéma 4, éq. 1). Cette courte séquence permet un accès rapide aux alcools homo-allyliques **95-syn** et **95-anti**, qui sont tous deux obtenus avec une très bonne diastéréosélectivité. **95-syn** est ensuite protégé sous forme d'éther silylé, avant de subir une réaction de métathèse croisée catalysée par la seconde génération du catalyseur de Grubbs avec l'acide acrylique (Schéma 4, éq. 2). L'oléfine interne résultante est réduite puis le groupement tosylé est transformé, via une réaction de Finkelstein, en iodure d'alkyle primaire. Ce dernier est engagé dans une réaction d'alcénylation ferro-catalysée en utilisant les conditions développées par Cossy⁶⁷ pour donner l'oléfine terminale **145**. Il est important de noter que cette étape tolère l'acide carboxylique libre en C1, permettant alors d'économiser une séquence protection/déprotection/oxydation supplémentaire. L'estérification de **145** avec **95-anti**, précédemment synthétisé, délivre le diène correspondant qui subit ensuite une réaction de métathèse cyclisante sous micro-ondes, rappelant ainsi l'approche initialement développée par Burkart⁶⁸ et repris par Altmann⁵⁵ dans leurs synthèses totales. Le macrocycle, obtenu sous la forme d'un seul isomère *E*, est converti en iodure d'alkyle par déplacement du tosylate afin d'obtenir la macrolactone iodée **146**. Cette dernière est mise en présence du zinc de Rieke, permettant sa conversion en alkyl zincique, puis couplée avec le fragment C14-C20 **50** dans les conditions de Negishi. La déprotection sélective de l'alcool en position C5 délivre finalement le fragment C1-C20 **147**.

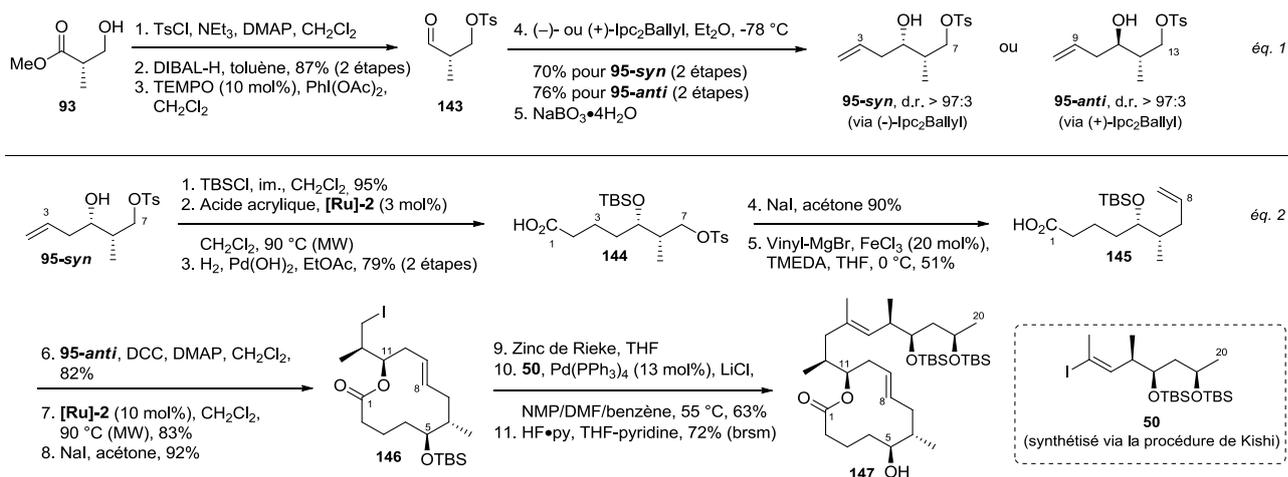


Schéma 4 : Synthèse du fragment C1-C20 des analogues C8-desméthylés de mycolactones par Blanchard (2011)

Une stratégie très flexible a été appliquée pour la synthèse de la chaîne inférieure, et dont la préparation s'effectue en deux temps. La synthèse du premier précurseur de couplage **150** débute par la déprotonation du méthylmalonate de diéthyle **148** par l'action de NaH (Schéma 5, éq. 1). L'énolate de sodium généré est ensuite alkylé avec de l'iodoforme avant de subir une saponification. Le di-acide résultant se décarboxyle spontanément pour conduire à l'acide **149**. Après une séquence réduction/oxydation de la fonction acide, l'aldéhyde obtenu est soumis à une réaction de Wittig. Une seconde itération réduction/oxydation/Wittig délivre le triène C1'-C7' **150**. La synthèse du fragment C1'-C16' est ensuite complétée à partir du *trans*-hexadiénal commercial **151** qui est transformé en triénoate par une réaction de Wittig (Schéma 5, éq. 2). Ce dernier est engagé dans une réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless conduisant au diol-*syn* correspondant avec une très bonne régio- et énantiosélectivité. Le diol ainsi obtenu est transformé en carbonate allylique avant de subir une réduction pallado-catalysée menant, après protection de l'alcool par un groupement silylé, au diénoate **153**. Cette séquence en deux étapes, s'inspirant des travaux de O'Doherty,⁶⁹ permet de moduler facilement la configuration absolue du stéréocentre C15' en jouant sur l'AD-mix (α ou β) utilisé lors de l'étape de dihydroxylation précédente. Par la suite, une seconde réaction de dihydroxylation asymétrique est réalisée conduisant au diol-*syn* correspondant. Ce dernier est protégé une fois de plus sous la forme d'éther silylé afin de donner le composé tri-silylé **35**. Là encore, la configuration des centres C12' et C13' peut être modulée en fonction de l'AD-mix utilisé. Ensuite, **35** est converti en aldéhyde, et une homologation à un carbone, dans les conditions rapportées par Hodgson,⁷⁰ délivre le diénylstannane-(*E,E*) **154**. Une réaction de couplage de type Stille catalysée au cuivre(I) dans un solvant très polaire, pour favoriser l'échange Sn-Cu,⁷¹ a été choisie pour coupler les deux partenaires ; le diphenylphosphinate de tétrabutylammonium est utilisé comme séquestrant des sels d'étain.⁷² L'ester C1'-C16' est alors obtenu sous la forme d'un mélange $Z-\Delta^{4'-5'}/E-\Delta^{4'-5'} = 20:80$. Après saponification de la fonction ester, l'acide C1'-C16' **40** est photoisomérisé en conditions douces pour atteindre l'équilibre naturel $Z-\Delta^{4'-5'}/E-\Delta^{4'-5'} = 60:40$.

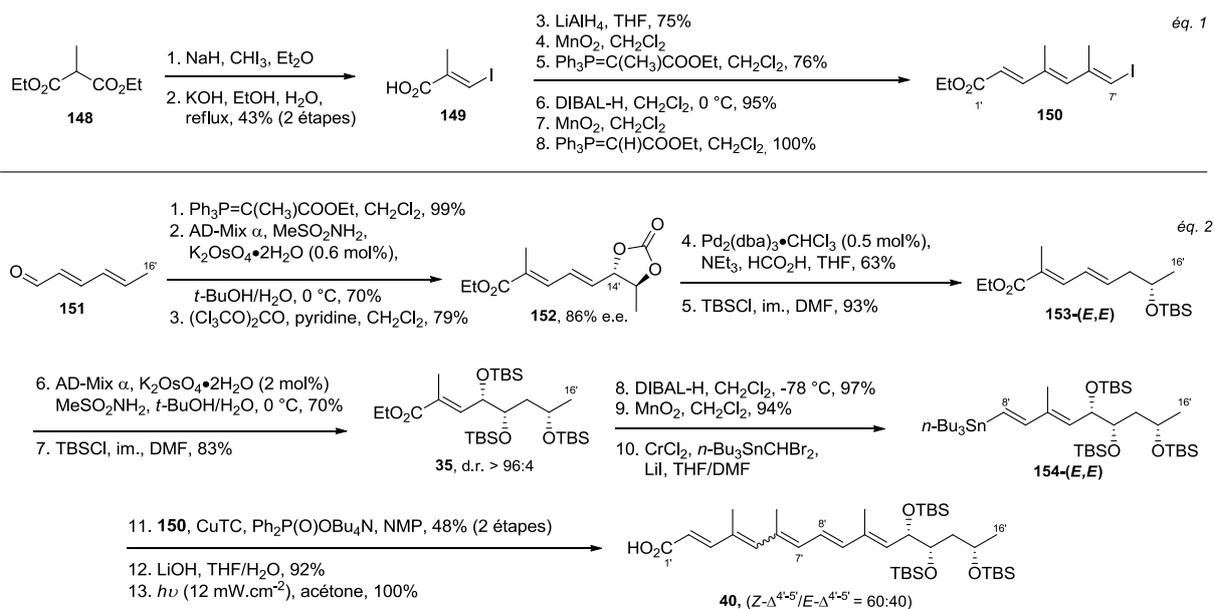


Schéma 5 : Synthèse du fragment C1'-C16' par Blanchard (2011)

Les fragments C1-C20 **147** et C1'-C16' **40** synthétisés sont ensuite estérifiés dans les conditions de Yamaguchi⁷³ pour conduire, après déprotection globale de la molécule au TBAF, à la mycolactone C8-desméthylée **142** (Schéma 6).

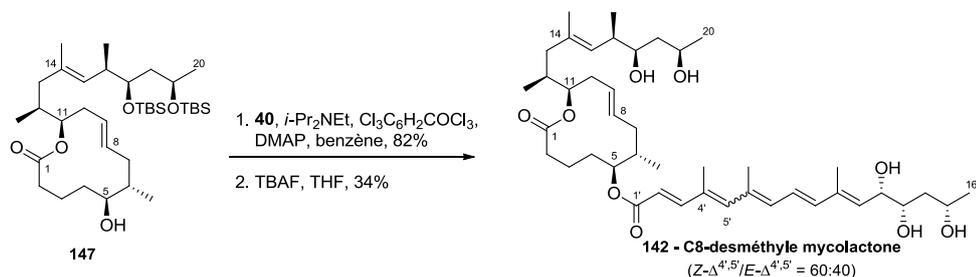


Schéma 6 : Etapes finales de la formation de la C8-desméthyle mycolactone par Blanchard (2011)

2.2.2.2. Première génération d'analogues produits via la voie de synthèse modulaire (2011)

En appliquant la voie de synthèse ainsi développée, huit analogues de mycolactones C8-desméthylés ont pu être préparés.³⁹ Ces derniers peuvent être classés dans trois catégories, en fonction de leurs différences de structure et de l'assemblage moléculaire du cœur macrocyclique avec les chaînes supérieure et inférieure.

La première catégorie inclut les analogues C8-desméthylés possédant la chaîne supérieure naturelle et dont l'alcool en position C5 peut être soit libre **147** soit estérifié avec la chaîne inférieure de la mycolactone A/B **142** ou des variantes **142b-d** (Figure 10). Les analogues **142b-d** ont été obtenus en modulant l'AD-mix utilisé lors des étapes de dihydroxylation asymétrique (**142b** et **142c**) ou en ajoutant une séquence de O'Doherty supplémentaire (**142d**).

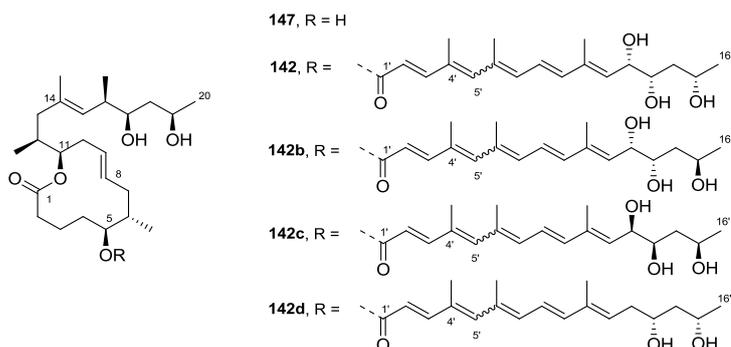


Figure 10 : Structure des analogues C8-desméthylés possédant la chaîne supérieure naturelle par Blanchard (2011)

La deuxième catégorie contient les analogues C8-desméthylés avec un groupe isopropyle en remplacement de la chaîne supérieure et dont l'alcool en position C5 est soit libre **155** soit estérifié avec la chaîne inférieure naturelle **140** (Figure 11, éq. 1). Ces deux dérivés ont été obtenus en réduisant l'iodure d'alkyle **146** par un traitement avec le zinc de Rieke préparé *in situ* suivi d'une hydrolyse. Enfin, la dernière catégorie consiste en l'analogue de la chaîne inférieure **156** (Figure 11, éq. 2).

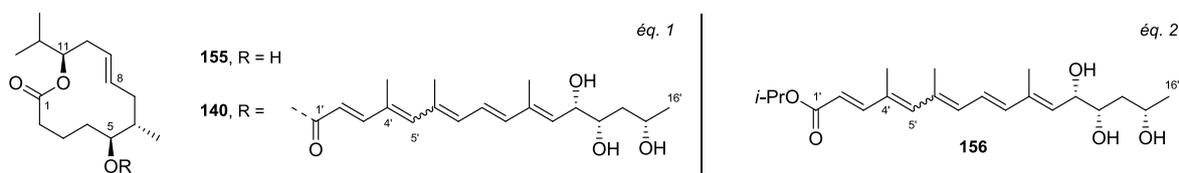


Figure 11 : Structures des analogues tronqués C8-desméthylés (éq. 1) et de l'analogue de la chaîne inférieure (éq. 2) par Blanchard (2011)

Tout comme ceux rapportés par Altmann et Kishi, les propriétés biologiques de ces analogues ont été évaluées afin de mettre au point une première étude SAR. Cette dernière, présentée dans le sous-chapitre 2.3, a notamment permis de mettre en évidence l'importance de la stéréotriade-C12',C13',C15' ainsi que l'avantage du groupement isopropyle en remplacement de la chaîne supérieure. Ces observations ont amené l'équipe de Blanchard à synthétiser une deuxième génération d'analogues.⁷⁴

2.2.2.3. Deuxième génération d'analogues produits via la voie de synthèse modulaire (2014)

La deuxième génération d'analogues produits par l'équipe de Blanchard repose sur la voie synthétique développée précédemment, qui permet notamment d'obtenir une diversité de molécules via une estérification en fin de synthèse. De ce fait, les nouvelles modifications structurales sont principalement axées sur l'inversion de la configuration d'un ou plusieurs de ces centres ainsi que la suppression d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles de la chaîne inférieure. Par ailleurs, l'importance du motif pentaénique du fragment C1'-C11' a également été étudiée notamment via l'insertion de cycles aromatiques et la réduction du nombre d'insaturations. En effet, l'insertion de groupement aromatique permet de rigidifier le système pentaénique : l'isomérisation naturelle de la double-liaison en position C4'-C5' pourrait alors être détournée.

Une adaptation de la méthodologie développée pour la synthèse du fragment C1'-C16' a donc permis la synthèse de vingt nouveaux analogues, pouvant également être classés en différentes catégories.

La première catégorie comprend un nouvel analogue C8-desméthylé **157** possédant la chaîne supérieure naturelle et dont l'alcool en position C5 a été estérifié avec la chaîne inférieure dépourvue de groupement hydroxyle en position C15' (Figure 12).

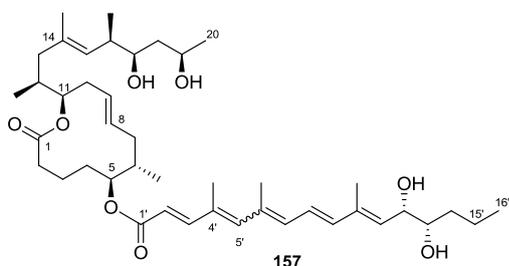


Figure 12 : Structure de l'analogue C8-desméthylé C15'-déoxy **157** par Blanchard (2014)

La deuxième catégorie inclut les analogues ayant recueilli le plus d'attention, à savoir ceux de la série C8-desméthylée possédant un groupement C11-isopropyle en remplacement de la chaîne supérieure (Figure 13). L'estérification finale sur le cœur macrocycle tronqué a été effectuée avec des chaînes inférieures présentant une grande variété structurale au niveau de la stéréotriade, amenant aux composés **140a-n** (éq. 1 et éq. 2). L'insertion d'un groupement aromatique a été réalisée par des réactions de couplage croisé pallado-catalysé de type Stille à partir du stannane **154** et d'un dérivé aromatique bromé. Cette stratégie a permis d'obtenir des analogues rigidifiés et possédant des chaînes plus au moins courtes **140o-q** (éq. 3).

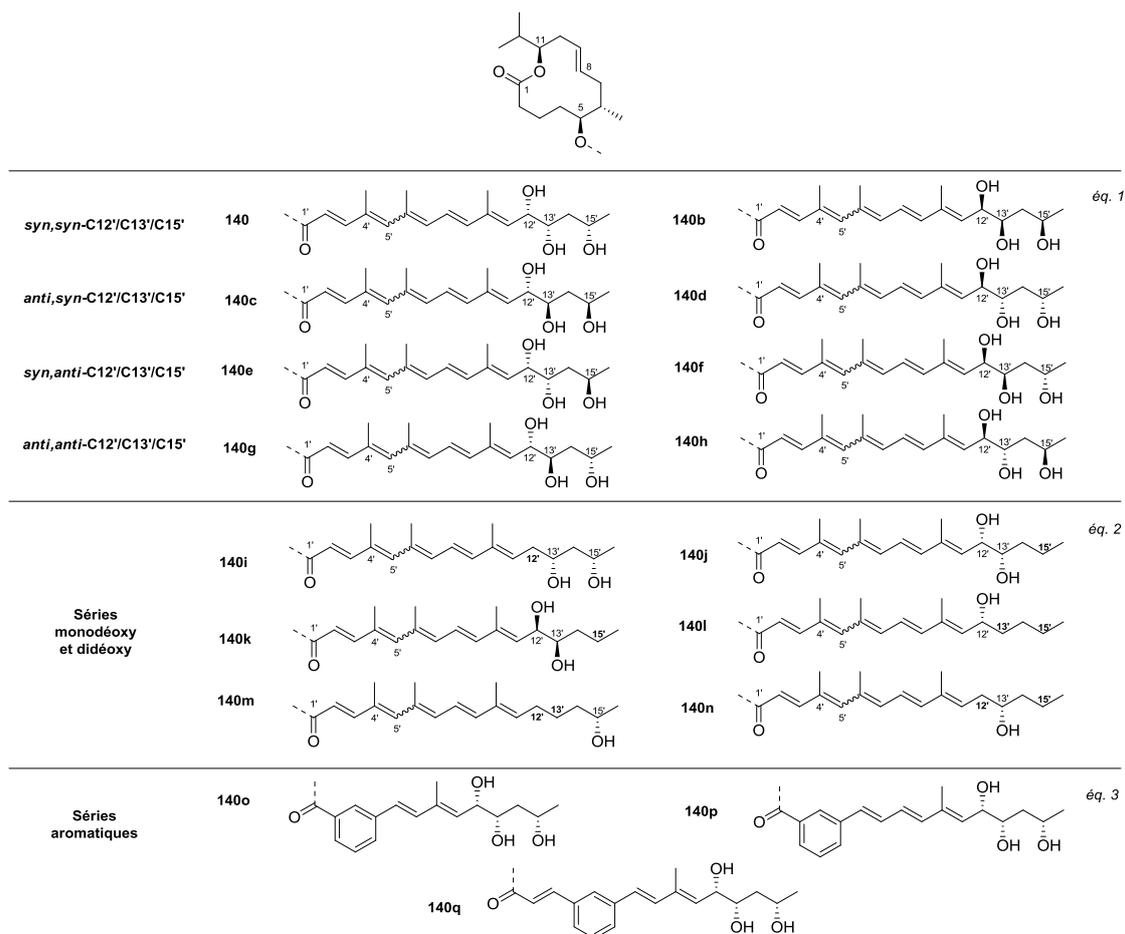


Figure 13 : Structures des analogues tronqués C8-desméthylés par Blanchard (2014)

Afin d'étudier l'importance de l'insaturation interne du fragment macrocycle, un analogue C8,C9-dihydromycolactone C8-desméthylé **158** a été obtenu par une réaction d'hydrogénation avec un intermédiaire avancée de la voie de synthèse modulaire (Figure 14).

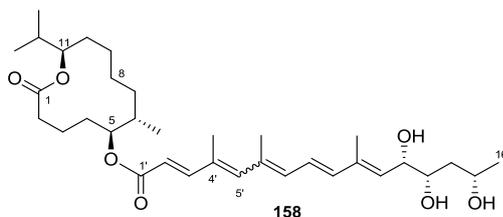


Figure 14 : Structure de l'analogue tronqué C8,C9-dihydromycolactone C8-desméthylé par Blanchard (2014)

Enfin, la dernière catégorie comprend un nouvel analogue de la chaîne inférieure **159**, possédant un groupement cyclohexyle en remplacement de la macrolactone à 12 chaînons (Figure 15).

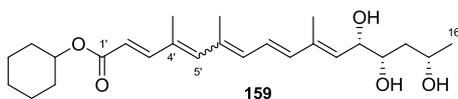


Figure 15 : Structure de l'analogue de la chaîne inférieure par Blanchard (2014)

Avant la discussion sur l'évaluation biologique de ces différents analogues, la préparation des analogues fluorescents, ayant comme démontré précédemment une grande importance dans le processus d'appréhension des mécanismes d'action de la toxine, est présentée dans le paragraphe suivant.

2.2.3. Synthèse d'analogues fluorescents de mycolactones

Pour leur étude sur l'activité cellulaire de la mycolactone A/B, Snyder et Small rapportent en 2003 la synthèse d'un analogue fluorescent à partir d'une toxine obtenue par extraction de cultures de *M. ulcerans*.³⁸ La toxine naturelle est soumise à une réaction de coupure oxydante du 1,2-diol de la chaîne inférieure grâce à l'action d' HIO_4 . L'aldéhyde résultant **160** est ensuite conjugué avec un hydrazide fluorescent commercial, à savoir le Bodipy® FL D-2371, délivrant la Bodipy-mycolactone **123** (Schéma 7). Bien que cet analogue ait permis de mettre en évidence la diffusion passive de la toxine dans le cytoplasme de la cellule, il a été démontré que la modification de la stéréotriade sur la chaîne inférieure présente une conséquence directe sur les effets biologiques. On peut citer par exemple le cas de la mycolactone C, possédant une chaîne inférieure C12'-déoxy, qui est connue pour être moins active et toxique que la mycolactone A/B (LC_{50} (mycolactone A/B) = 12 nM ; LC_{50} (mycolactone C) = 186 nM).¹¹

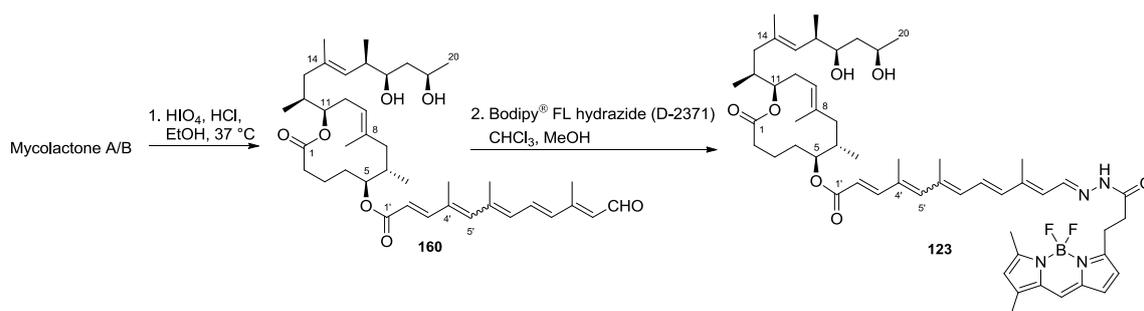


Schéma 7 : Synthèse de l'analogue fluorescent de mycolactones par Small (2003)

De ce fait, notre laboratoire a rapporté en 2011 la synthèse d'une nouvelle Bodipy-mycolactone dont les centres C12', C13' et C15' sont conservés.³⁹ En se basant sur l'intermédiaire avancé **161**, l'insertion d'un groupement azoture en C13 par substitution nucléophile du tosylate permet un point d'accroche pratique de la sonde. La fonction C5-hydroxy du macrocycle est alors libérée puis estérifiée avec la chaîne inférieure naturelle de la mycolactone A/B pour conduire, après déprotection globale au triol **163**. Ce dernier est ensuite engagé dans une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre(I) avec l'alcyne-Bodipy **164** (synthétisé selon la procédure décrite par Overkleeft)⁷⁵ pour conduire à la Bodipy-mycolactone **124**. Il est à préciser que ce dérivé fluorescent a fait l'objet d'une resynthèse au cours de mon projet de thèse afin de fournir à nos collaborateurs la quantité requise. Or, une optimisation des conditions opératoires de la dernière étape, initialement réalisée sous micro-onde à 60°C avec 15 mol% de CuSO_4 monohydraté dans un mélange $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ en présence de 15 mol% d'ascorbate de sodium comme réducteur, ont permis d'augmenter le rendement de 30% à 71% (Schéma 8, éq. 1).⁷⁶ En 2014, une deuxième génération d'analogues fluorescents a été synthétisée : **165** sans chaîne inférieure et **165d** dont le noyau pyrrolique est substitué par un groupement éthyle (Schéma 8, éq. 2).⁷⁴ Cette substitution permet de moduler les propriétés d'absorption et d'émission du Bodipy, ainsi **165d** émet dans le rouge (maximum d'absorption à $\lambda = 551\text{ nm}$) alors que **123** aura une émission plutôt dans le vert (maximum

d'absorption à $\lambda = 505$ nm). Par ailleurs, deux dérivés substitués en C13 par un groupement triazole ont également été préparés dans l'objectif de déterminer les effets de ce groupement sur l'activité biologique.

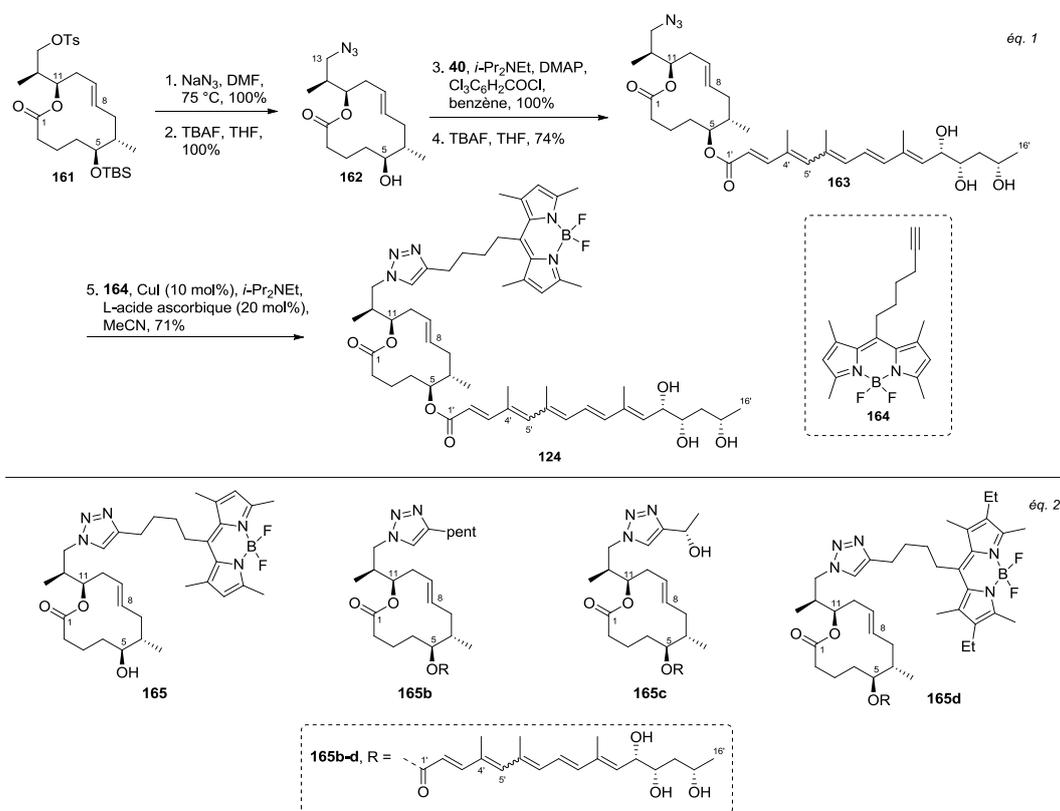


Schéma 8 : Synthèse de l'analogue fluorescent de mycolactones par Blanchard (2011, éq. 1) et structures de la deuxième génération d'analogues par Blanchard (2014, éq. 2)

Grâce à ses caractéristiques biologiques bien particulières, la mycolactone A/B a suscité l'intérêt de nombreux groupes de recherche. Les multiples études menées sur les mycolactones présentes naturellement dans la nature ont permis de mettre en évidence l'importance de la chaîne inférieure dans l'activité biologique. Afin d'enrichir les données connues sur ces différentes mycolactones, plusieurs analogues synthétiques ont été préparés, constituant ainsi une vaste collection de composés dont l'activité biologique peut être quantifiée. Dans l'objectif de faire le bilan sur ces travaux, le sous-chapitre suivant se propose de regrouper les résultats biologiques connus sur les analogues de mycolactones.

2. 3. Evaluation biologique et SAR

Bien qu'un intérêt certain à découvrir et comprendre les mécanismes biologique et moléculaire de la mycolactone A/B ait amené à une grande variété d'analogues, les résultats des études individuelles sont difficilement comparables. En effet, différents systèmes de lecture, telles que l'arrondissement cellulaire,⁸ la production de cytokines⁷⁷ ou encore les analyses par cytométrie en flux,^{55a} et ce sur des lignées cellulaires très variées, ont été utilisés. De plus, le temps d'incubation lors de la détermination de l'activité cytopathique diffère également d'une étude à l'autre, pouvant passer de 24 heures à 48 heures. Il faut également rappeler que les préparations de mycolactone A/B obtenues par cultures de *M. ulcerans* sont généralement contaminées par la présence de

métabolites secondaires, comme par exemple d'autres variantes de mycolactones. Néanmoins, l'analyse des différents résultats obtenus pour la première génération d'analogues (entre 2003 et 2011) a permis de dégager les tendances générales de la relation entre structure et activité cytopathique. Pour précision, les tests de cytotoxicité des analogues préparés par notre équipe en 2011 ont été réalisés par le Dr. Schmitt, en collaboration avec le Prof. Tarnus du laboratoire de Chimie Organique et Bio-organique (COB, université de Haute-Alsace).

Par la suite, la découverte de la première cible biologique WASP en 2013 a donné une nouvelle orientation aux évaluations biologiques. En effet, les interactions entre la première génération (2011) et la seconde génération (2014) d'analogues produits par notre laboratoire et la cible protéique ont été évaluées. Pour cela, une collaboration avec l'équipe du Dr. Demangel de l'institut Pasteur a été mise en place, produisant ainsi une seconde SAR et des découvertes majeures. Toutes ces données sont résumées dans les paragraphes suivants.

2.3.1. Analyse de la première génération d'analogues (2003-2011) et des récents analogues de Kishi (2017)

Dès 2003, les premières indications de l'importance de la chaîne inférieure de la mycolactone A/B pour l'activité biologique sont rapportées.⁸ En effet, le précurseur naturel macrocyclique de mycolactone A/B durant la biosynthèse, obtenu par hydrolyse d'une mycolactone A/B issue de culture de *M. ulcerans*, est évalué comme étant dix-mille fois moins actif que la toxine complète. Cette observation initiale semble être confirmée à la vue des résultats biologiques obtenus par de nombreux groupes de recherche après l'évaluation biologique des analogues évoqués dans les sous-chapitres précédents ; la Figure 16 résume ces activités biologiques. Pour rappel, la mycolactone A/B possède une activité cytopathique quantifiée à 20 nM^{10b} et une IC₅₀ de 5 nM¹¹ sur les fibroblastes murins L929. L'inhibition de 50% de l'activité métabolique des cellules par la toxine naturelle (LC₅₀) a été mesurée à 12 nM.¹¹

A travers cette première étude des relations entre la structure et l'activité biologique, plusieurs informations peuvent être discutées. Il est important de noter que le fragment C14-C20 est essentiel pour l'activité cytopathique mais peut toutefois être étendu par des fonctions polaires, comme le démontre les analogues **128**, **129** et **130** rapportés par Altmann, qui conservent une nette cytotoxicité (Figure 16, éq. 3). Le substituant méthyle en position C8 est également important pour l'activité cytopathique puisque la mycolactone C8-desméthylée **142** est 125 fois moins active que la toxine naturelle (Figure 16, éq. 4). De plus, la suppression du fragment C14-C20 ou du fragment C1'-C16' sur ces mêmes analogues résulte en une baisse importante de l'activité cytopathique avec moins de 27 et 53% d'arrondissement de cellules après 48 heures d'incubations pour les dérivés **147** et **140** respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Altmann à partir des dérivés de la mycolactone naturelle, présumant la tolérance de modifications sur le fragment C14-C20 et le caractère essentiel de la chaîne inférieure. En effet, toutes les études démontrent que la chaîne inférieure C1'-C16' est capitale pour l'activité cytopathique, et notamment la stéréotriade C12', C13', C15'. Alors que la configuration absolue du centre C15' peut être inversée sans modification significative de l'activité cytopathique, une perte complète de cet effet est observée si la stéréotriade entière est inversée. De plus, la présence des groupes hydroxyles en positions C12', C13' et C15' semble être requise pour l'activité cytopathique et plus particulièrement celui en position C12'. La conjugaison du système pentaénique semble également importante dans l'activité

cytopathique sur les fibroblastes L929 à la vue de l'IC₅₀ des dérivés **122a** et **122b** dont la valeur est environ onze fois supérieure à celle de la toxine naturelle. Par ailleurs, la cytotoxicité du dérivé **135** de Kishi, quantifiée à 30 nM, se compare très favorablement à celle de la mycolactone A/B naturelle (dans la gamme 10 nM), démontrant ainsi que l'extension de la chaîne inférieure est possible sans incidence sur l'activité biologique.

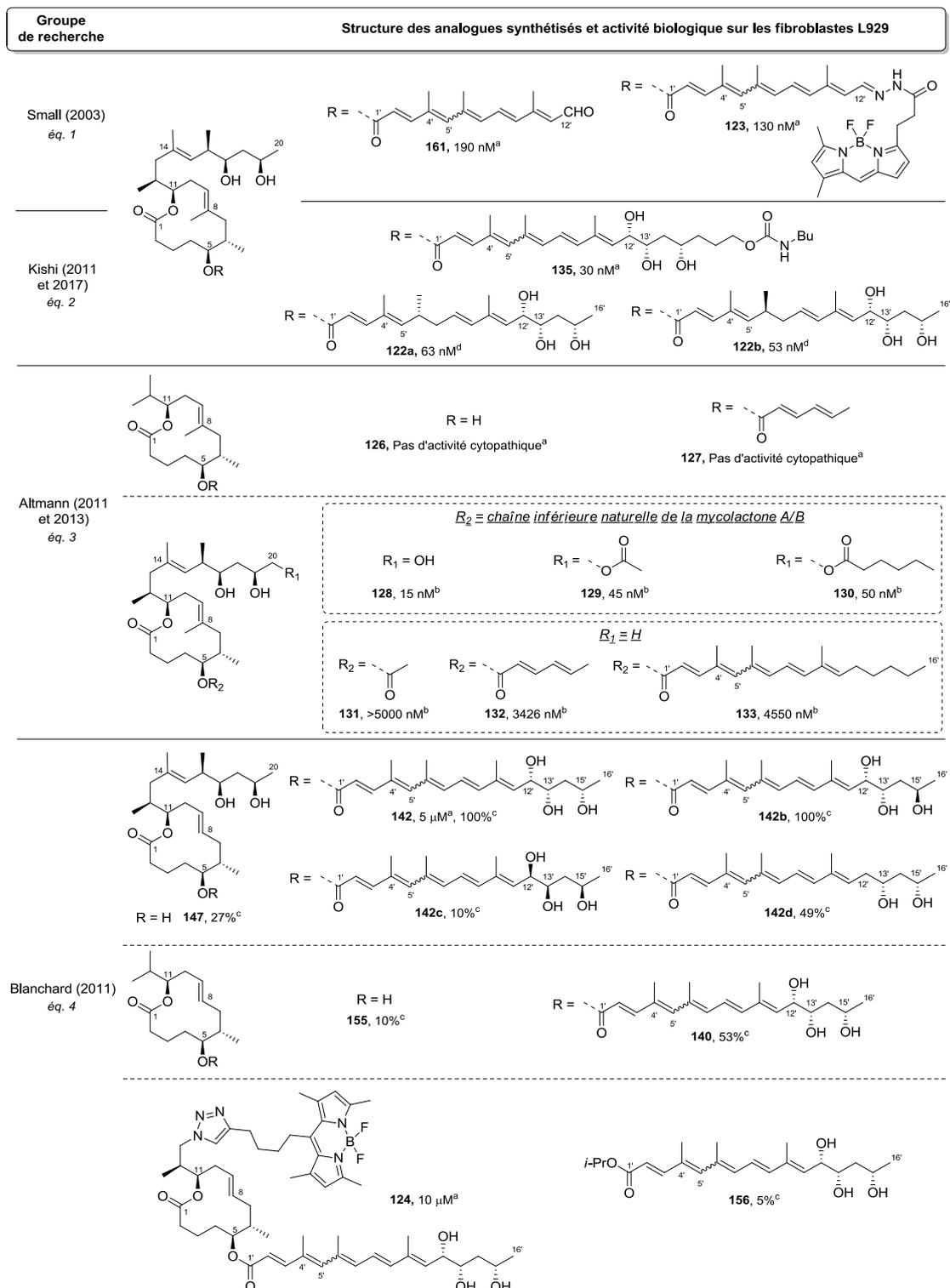


Figure 16 : Vue d'ensemble des activités biologiques connues sur les fibroblastes L929 des différents analogues de mycolactones rapportés dans la littérature. ^a Activité cytopathique définie comme la concentration minimum pour laquelle 90% des cellules sont arrondies, ^b LC₅₀ après 48 heures d'incubation, ^c Pourcentage de cellules arrondies à 10 μM après 48 heures d'incubation, ^d IC₅₀ après 16 heures d'incubation.

Cette première étude a permis de mieux comprendre les relations structure-activité des mycolactones. Dans l'optique d'évaluer avec précision le rôle et l'implication de chacune des modifications structurales, et ainsi permettre une meilleure compréhension du mécanisme d'action de la toxine, une étude plus fine sur la cible protéique WASP a été réalisée.

2.3.2. Analyse des analogues de mycolactones C8-desméthylés sur WASP (2014)

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe de Demangel, l'ensemble des analogues de mycolactones C8-desméthylés synthétisés par notre laboratoire entre 2011 et 2014 ont été envoyés à l'institut Pasteur afin d'évaluer l'efficacité avec laquelle ces derniers se lient à WASP et N-WASP.⁷⁴ Pour cela, des tests ELISA ont été réalisés avec la mycolactone A/B purifiée de *M. ulcerans* (servant de référence) et les analogues par la mesure du déplacement du dérivé biotinylé de mycolactones **139** du domaine de liaison des mycolactones de WASP et N-WASP identifié par Demangel.⁴⁰ Les résultats obtenus expriment la concentration minimale d'analogue nécessaire pour déplacer la moitié du dérivé biotinylé de mycolactones, qui présente une IC_{50} de $32,3 \pm 22,1 \mu M$ (Figure 19). Les mesures d' IC_{50} sur WASP et N-WASP donnant des résultats similaires, seuls ceux obtenus avec WASP sont rapportées. Trois catégories se démarquent.

La première catégorie comprend sept analogues dont l' IC_{50} a été évaluée comme étant supérieure à $100 \mu M$; les structures de ces derniers sont représentées sur la Figure 17.

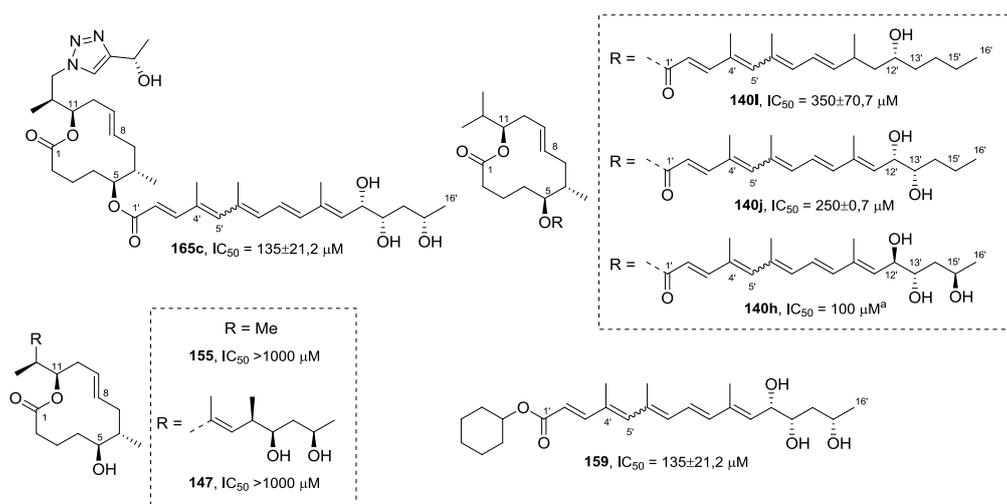


Figure 17 : Structures des analogues de mycolactones se liant à WASP avec une IC_{50} supérieure à $100 \mu M$. Marges d'erreur calculées sur plusieurs évaluations ($n \geq 2$). ^a Evaluation unique.

La deuxième catégorie contient six analogues dont l' IC_{50} est comprise entre 50 et $100 \mu M$; les structures de ces derniers sont représentées sur la Figure 18.

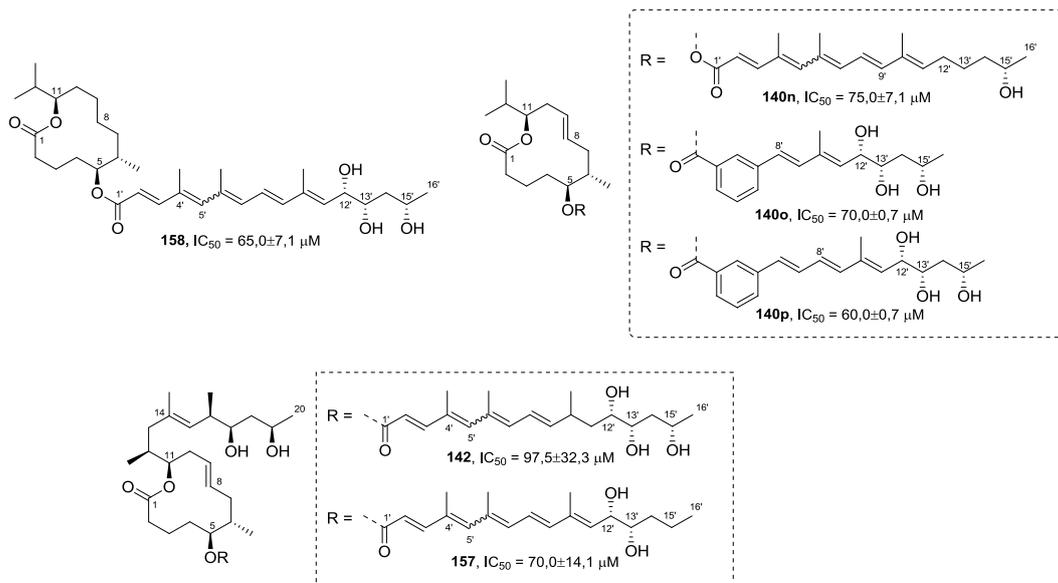


Figure 18 : Structures des analogues de mycolactones se liant à WASP avec une IC_{50} comprise en 50 et 100 μM . Marges d'erreur calculées sur plusieurs évaluations ($n \geq 2$).

Et enfin, la dernière catégorie regroupe quatorze analogues présentant une IC_{50} inférieure à 50 μM ; les structures de ces derniers sont représentées sur la Figure 19.

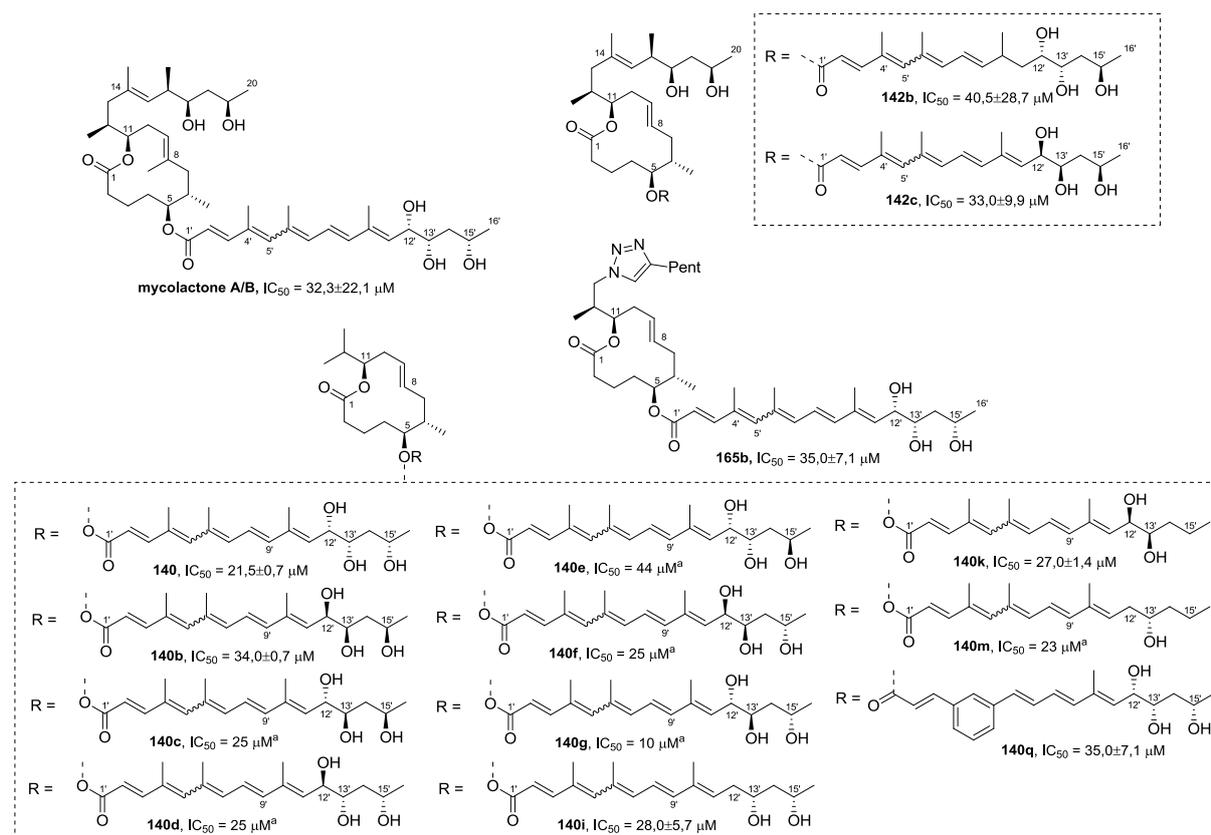


Figure 19 : Structures des analogues de mycolactones se liant à WASP avec une IC_{50} inférieure à 50 μM . Marges d'erreur calculées sur plusieurs évaluations ($n \geq 2$). ^a Evaluation unique.

Grâce à ces résultats, les différentes fonctions chimiques impliquées dans la liaison avec WASP et N-WASP peuvent être mises en évidence. En effet, aucune affinité à WASP n'a pu être

détectée pour les analogues **147** et **155** ne possédant pas de chaînes inférieures, démontrant encore une fois l'importance de cette dernière dans l'activité biologique de la toxine. Au contraire, l'analogue **140**, dont le fragment C14-C20 est supprimé, affiche une affinité de liaison très similaire à la toxine naturelle, en faisant alors un analogue de référence. La rigidification du système oléfinique est également tolérée lorsque ce dernier est connecté à la position C3', comme le cas de l'analogue **140q**. De plus, les configurations relatives et absolues des centres C12', C13' et C15' peuvent être modifiées sans impact significatif sur l'affinité pour WASP. La suppression d'un ou deux groupes hydroxyles en positions C12', C13' ou C15' semble possible, comme le démontrent les dérivés **140k** et **140m**. L'introduction d'un motif triazole est également acceptée quand ce dernier est substitué par une chaîne alkyle, comme le cas de **165b**. D'autre part, l'insaturation C8-C9 et le méthyle en C8 ne semblent pas nécessaires dans les interactions avec WASP. Or, il a été démontré précédemment que le groupement méthyle en position C8 est fortement impliqué dans l'activité cytotoxique.

De manière générale, cette étude prouve qu'une affinité de liaison pour WASP peut être obtenue même avec des analogues simplifiés ne présentant ni le méthyle en position C8, ni la chaîne supérieure naturelle, l'analogue **140** en étant le meilleur exemple. Par ailleurs, des différences notables entre l'effet cytopathique et l'affinité de liaison à WASP ont été soulignées. Ces observations ont conduit l'équipe de Demangel à tester ces analogues de mycolactones C8-desméthylés sur des cellules Jurkart afin de déterminer cette fois-ci leur activité immunosuppressive.⁷⁸

2.3.3. Analyse des analogues de mycolactones C8-desméthylés pour leur activité immunosuppressive

Afin de déterminer les caractéristiques structurales de l'activité immunosuppressive de la mycolactone A/B, l'équipe de Demangel étudie dès 2015 l'aptitude des analogues de mycolactones C8-desméthylés à inhiber la production de cytokines par les lymphocytes T activés. Afin de déterminer la contribution de chaque fragment composant la mycolactone, tous les analogues précédemment testés sur WASP ont été comparés à la mycolactone naturelle pour leur capacité à bloquer la production d'interleukine 2 par les cellules Jurkart, en utilisant l'IC₅₀ comme critère de comparaison. De plus, une nouvelle étude de l'activité cytopathique a été réalisée, mais cette fois-ci sur des cellules épithéliales de type HeLa, afin d'évaluer les analogues pour leur capacité à induire un détachement cellulaire après 48 heures d'incubation. Toutes ces données sont résumées Figure 20.

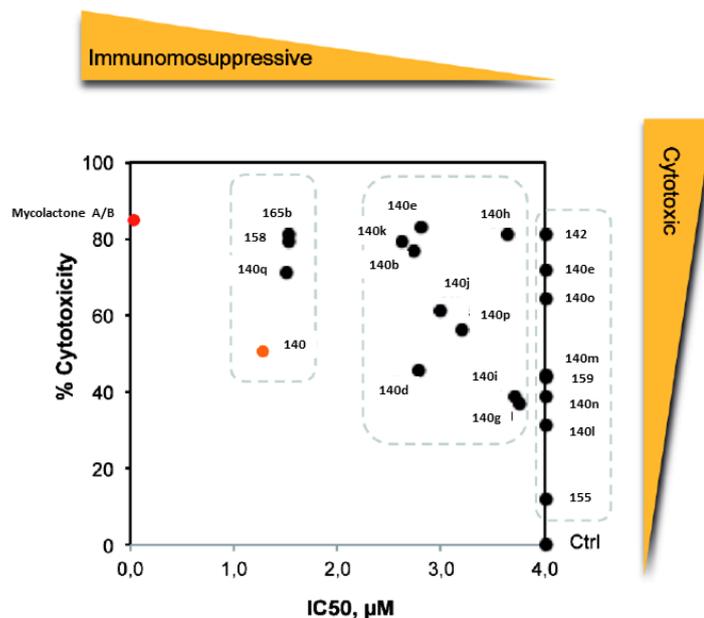


Figure 20 : Moyenne des activités cytopathique et immunosuppressive de la mycolactone A/B et des analogues de mycolactones C8-desméthylés.⁷⁸ Figure adaptée de la réf. 78 avec permission. Copyright 2017 – The American Association for the Advancement of Science

De manière cohérente, tous les analogues ont une activité biologique moindre par rapport à la mycolactone A/B, démontrant encore une fois l'importance de chaque module de la toxine naturelle dans les effets biologiques observés. Les analogues possédant un caractère immunosuppressif comparable à la toxine naturelle, à savoir **165b**, **158**, **140q** et **140**, sont ceux dont le fragment C14-C20 est supprimé ou remplacé par le groupement triazole, mais conservant la chaîne inférieure de la mycolactone naturelle. Par ailleurs, une information essentielle peut être dégagée de cette analyse : les propriétés immunosuppressives et l'activité cytopathique peuvent être partiellement dissociées. En effet, l'analogue **140** présente un ratio optimal entre l'immunosuppression et la cytotoxicité.

Par la suite, **140** a fait l'objet d'une série d'analyses *in vitro* et *in vivo*. Ces dernières ont révélé que cet analogue tronqué de mycolactones C8-desméthylées pouvait représenter une alternative à la toxine naturelle pour l'inhibition de la production de cytokines par les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes, tout en étant bien moins toxique. Par ailleurs, les études compétitives de l'affinité de liaison de la toxine naturelle et de l'analogue **140** au récepteur de l'angiotensine II, cible de choix pour le développement de nouvelles molécules antidouleur,⁷⁹ ont montré des résultats comparables.

En plus de son importance pour la compréhension du développement de la maladie, cette mycolactone hautement simplifiée, qui présente des propriétés immunosuppressives comparables sans effets secondaires cytotoxiques, pourrait potentiellement servir de tête de série dans le développement d'une nouvelle classe d'agents immunosuppressifs avec un nouveau mécanisme d'action.

2. 4. Conclusion

La présence de mycolactones dans l'organisme entraîne de nombreuses conséquences, se manifestant entre autres par la formation d'ulcères. Au niveau cellulaire, les effets biologiques

constatés sont variés, les deux plus importants étant une activité cytopathique et un effet immunosuppresseur. Au cours de ces dernières années, la découverte de différentes cibles protéiques de la toxine a permis une première approche dans la compréhension des effets biologiques observés lors de l'infection.

Il faut souligner que plusieurs de ces avancées ont été rendues possibles grâce à un travail interdisciplinaire entre chimistes et biologistes. En effet, la mycolactone A/B synthétique est préférable par rapport à celle purifiée à partir de cultures de *M. ulcerans* en raison des difficultés qui subsistent dans le processus de purification et dans l'obtention rapide de la toxine. Par ailleurs, la préparation d'analogues synthétiques de mycolactones a permis de mettre au point les premières analyses SAR de ces toxines. Ces études ont ainsi délivré des informations cruciales permettant une meilleure compréhension du mécanisme d'action de la mycolactone A/B au niveau moléculaire et l'identification des principales fonctions chimiques de la molécule impliquée dans l'activité biologique de la toxine naturelle. En plus d'être un outil indispensable pour l'élucidation de mécanismes moléculaires dans la pathologie de l'ulcère de Buruli mais également dans la compréhension de la biologie cellulaire en général, les analogues de mycolactones ouvrent également de nouvelles perspectives pour le développement de nouveaux candidats antidouleur, comme évoqué précédemment avec l'analogue **140**.

Néanmoins, les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces processus, dont notamment les voies de déclenchements, sont encore largement méconnus. Il reste toujours beaucoup à apprendre sur les propriétés biophysiques des mycolactones, leur distribution et leur stabilité dans les systèmes biologiques, avant de pouvoir mettre au point des méthodes de diagnostic et des traitements spécifiques à la maladie. Or, afin de répondre aux différentes interrogations qui subsistent, la synthèse de la mycolactone A/B et de ses variantes structurales représentent des outils précieux.

C'est dans ce contexte, à la fois compétitif et dynamique, que nous nous proposons de développer une voie de synthèse modulable permettant un accès rapide à la toxine naturelle et à ces analogues. Les objectifs et résultats obtenus au cours de nos travaux font l'objet du chapitre suivant.

2. 5. Références

- ¹ R. E. Krieg, W. T. Hockmeyer, D. H. Connor, *Arch. Dermatol.* **1974**, *110*, 783-788.
- ² a) J. K. Read, C. M. Heggie, W. M. Meyers, D. H. Connor, *Infect. Immun.* **1974**, *9*, 1114-1122. b) M. Pimsler, T. A. Sponsler, W. M. Meyers, *J. Infect. Dis.* **1988**, *157*, 577-580.
- ³ a) E. Coutanceau, L. Marsollier, R. Brosch, E. Perret, P. Goossens, M. Tanguy, S. T. Cole, P. L. Small, C. Demangel, *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 1187-1196. b) S. F. Sarfo, R. O. Phillips, B. Rangers, E. A. Mahrous, R. E. Lee, E. Tarelli, K. B. Asiedu, P. L. Small, M. H. Wansbrough-Jones, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e577. c) J. Ogbechi, M. T. Hall, B. S. Bodman, K. Smith, M. Vogel, H. L. Wu, A. Stainer, C. T. Esmon, J. Ahnström, G. Pluschke, R. E. Simmonds, *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005011.
- ⁴ M. T. Silva, F. Portaels, J. Pedrosa, *Lancet Infect. Dis.* **2009**, *9*, 699-710.
- ⁵ K. M. Dobos, P. L. Small, M. Deslauriers, F. D. Quinn, H. King, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 7182-7186.
- ⁶ a) H. M. Lee, D. M. Shin, D. K. Choi, Z. W. Lee, K. H. Kim, J. M. Yuk, C. D. Kim, J. H. Lee, E. K. Jo, *Cell. Microbiol.* **2009**, *11*, 678-692. b) C. Bozzo, R. Tiberio, F. Graziola, G. Pertusi, G. Valente, E. Colombo, P. L. Small, G. Leigheb, *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 1258-1263. c) A. Grönberg, L. Zettergren, K. Bergh, M. Stahle, J. Heilborn, K. Angeby, P. L. Small, H. Akuffo, S. Britton, *PLoS One* **2010**, *5*, e13839.
- ⁷ L'effet cytopathique est défini par Small par l'observation d'un arrondissement de 90% des cellules à 24 heures suivi par le décollement des cellules à 48 heures.
- ⁸ A. Mve-Obiang, R. E. Lee, F. Portaels, P. L. Small, *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 774-783.
- ⁹ K. M. George, D. Chatterjee, G. Gunawardana, D. Welty, J. Hayman, R. Lee, P. L. Small, *Science* **1999**, *283*, 854-857.
- ¹⁰ a) K. M. George, L. P. Barker, D. M. Welty, P. L. Small, *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 587-593. b) K. M. George, L. Pascopella, D. M. Welty, P. L. Small, *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 877-883.
- ¹¹ N. Scherr, P. Gersbach, J.-P. Dangy, C. Bomio, J. Li, K.-H. Altmann, G. Pluschke, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2143.
- ¹² B. S. Ranger, E. A. Mahrous, L. Mosi, S. Adusumilli, R. E. Lee, A. Colorni, M. Rhodes, P. L. Small, *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 6037-6045.
- ¹³ S. Adusumilli, A. Mve-Obiang, T. Sparer, W. Meyers, J. Hayman, P. L. Small, *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 1295-1304.
- ¹⁴ a) H. Hong, E. Contanceau, M. Leclerc, L. Caleechurn, P. F. Leadlay, C. Demangel, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e325. b) F. S. Sarfo, F. Le Chevalier, N. Aka, R. O. Phillips, Y. Amoako, I. G. Boneca, P. Lenormand, M. Dosso, M. Wansbrough-Jones, R. Veyron-Churlet, L. Guenin-Macé, C. Demangel, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1237.
- ¹⁵ R. Phillips, F. S. Sarfo, L. Guenin-Macé, J. Decalf, M. Wansbrough-Jones, M. L. Albert, C. Demangel, *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 1675-1684.
- ¹⁶ S. Rondini, E. Mensah-Quainoo, H. Troll, T. Bodmer, G. Pluschke, *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4231-4237.
- ¹⁷ C. Bozzo, R. Tiberio, F. Graziola, G. Pertusi, G. Valente, E. Colombo, P. L. Small, G. Leigheb, *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 1258-1263.
- ¹⁸ F. Graziola, E. Colombo, R. Tiberio, G. Leigheb, C. Bozzo, *Arch. Dermatol. Res.* **2017**, *309*, 179-189.
- ¹⁹ a) M. Goto, K. Nakanaga, T. Aung, T. Hamada, N. Yamada, M. Nomoto, S. Kitajima, N. Ishii, S. Yonezawa, H. Saito, *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 805-811. b) J. En, M. Goto, K. Nakanaga, M. Higashi, N. Ishii, H. Saito, S. Yonezawa, H. Hamada, P. L. Small, *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2002-2007.
- ²⁰ E. Marion, O. R. Song, T. Christophe, J. Babonneau, D. Fenistein, J. Eyer, F. Letournel, D. Henrion, N. Clere, V. Paille, N. C. Guérineau, J.-P. Saint André, P. Gersbach, K.-H. Altmann, T. Stinear, Y. Comoglio, G. Sandoz, L. Preisser, Y. Delneste, E. Yeramian, L. Marsollier, P. Brodin, *Cell* **2014**, *157*, 1565-1576.
- ²¹ a) M. S. Oliveira, A. G. Fraga, E. Torrado, A. G. Castro, J. P. Pereira, A. L. Filho, F. Milanezi, F. C. Schmitt, W. M. Meyers, F. Portaels, M. T. Silva, J. Pedrosa, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 6299-6310. b) E. Torrado, A. G. Fraga, A. G. Castro, P. Stragier, W. M. Meyers, F. Portaels, M. T. Silva, J. Pedrosa, *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 977-987.
- ²² R. E. Simmonds, F. V. Lali, T. Smallie, P. L. Small, B. M. Foxwell, *J. Immunol.* **2009**, *182*, 2194-2202.
- ²³ Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques qui contrôlent les motifs de migration et le positionnement des cellules immunitaires.
- ²⁴ A. G. Fraga, A. Cruz, T. G. Martins, E. Torrado, M. Saraiva, D. R. Pereira, W. M. Meyers, F. Portaels, M. T. Silva, A. G. Castro, J. Pedrosa, *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 421-430.
- ²⁵ H. Hong, C. Demangel, S. J. Pidot, P. F. Leadlay, T. Stinear, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 447-454.
- ²⁶ C. Demangel, T. P. Stinear and S. T. Cole, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 50-60.

- ²⁷ a) E. Peduzzi, C. Groeper, D. Schutte, P. Zajac, S. Rondini, E. Mensah-Quainoo, G. C. Spagnoli, G. Pluschke, C. A. Daubenberg, *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 638-645. b) R. Phillips, C. Horsfield, J. Mangan, K. Laing, S. Etuaful, P. Awuah, K. Nyarko, F. Osei-Sarpong, P. Butcher, S. Lucas, M. Wansbrough-Jones, *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 2917-2924. c) G. Prevot, E. Bourreau, H. Pascalis, R. Pradinaud, A. Tanghe, K. Huygen, P. Launois, *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 958-965. d) E. Torrado, S. Adusumilli, A. G. Fraga, P. L. Small, A. G. Castro, J. Pedrosa, *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 3979-3988.
- ²⁸ Y. Stienstra, W. T. van der Graaf, G. J. Te Meerman, T. H. The, L. F. De Leij, T. S. Van Der Werf, *Trop. Med. Int. Health* **2001**, *6*, 554-562.
- ²⁹ a) T. M. Gooding, P. D. Johnson, D. E. Campbell, J. A. Hayman, E. L. Hartland, A. S. Kemp, R. M. Robins-Browne, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1704-1707. b) T. M. Gooding, P. D. Johnson, M. Smith, A. S. Kemp, R. M. Robins-Browne, *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5562-5567. c) T. M. Gooding, A. S. Kemp, R. M. Robins-Browne, M. Smith, P. D. Johnson, *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 1076-1077.
- ³⁰ a) B. D. Westenbrink, Y. Stienstra, M. G. Huitema, W. A. Thompson, E. O. Klutse, E. O. Ampadu, H. M. Boezen, P. C. Limburg, T. S. van der Werf, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2005**, *12*, 125-129. b) D. Yeboah-Manu, E. Peduzzi, E. Mensah-Quainoo, A. Asante-Poku, D. OforiAdjei, G. Pluschke, C. A. Daubenberg, *J. Leukocyte Biol.* **2006**, *79*, 1150-1156.
- ³¹ A. A. Pahlevan, D. J. M. Wright, C. Andrews, K. M. George, P. L. Small, B. M. Foxwell, *J. Immunol.* **1999**, *163*, 3928-3935.
- ³² J. Rohr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2847-2849.
- ³³ L. Guenin-Macé, F. Carrette, F. Asperti-Boursin, A. Le Bon, L. Caleechurn, V. Di Bartolo, A. Fontanet, G. Bismuth, C. Demangel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 12833-12838.
- ³⁴ S. Boulkroun, L. Guenin-Mace, M. I. Thoulouze, M. Monot, A. Merckx, G. Langsley, G. Bismuth, V. Di Bartolo, C. Demangel, *J. Immunol.* **2010**, *184*, 1436-1444.
- ³⁵ A. Gomez, A. Mve-Obiang, B. Vray, J. Remacle, K. Chemlal, W. M. Meyers, F. Portaels, P. A. Fonteyne, *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 2995-2997.
- ³⁶ B. Hall, R. E. Simmonds, *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 177-183.
- ³⁷ F. Niang, F. S. Sarfo, M. Frimpong, L. Guénin-Macé, M. Wansbrough-Jones, T. Stinear, R. O. Phillips, C. Demangel, *Sci. Rep.* **2014**, *5*, 17693.
- ³⁸ D. S. Snyder, P. L. Small, *Microb. Pathog.* **2003**, *34*, 91-101.
- ³⁹ A.-C. Chany, V. Casarotto, M. Schmitt, C. Tarnus, L. Guenin-Macé, C. Demangel, O. Mirguet, J. Eustache, N. Blanchard, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14413-14419.
- ⁴⁰ L. Guenin-Mace, R. Veyron-Churlet, M. I. Thoulouze, G. Romet-Lemonne, H. Hong, P. F. Leadlay, A. Danckaert, M. T. Ruf, S. Mostowy, C. Zurzolo, P. Bousso, F. Chretien, M. F. Carlier, C. Demangel, *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 1501-15012.
- ⁴¹ *M. marinum* est également capable d'interagir avec WASP et N-WASP pour stimuler la polymérisation de l'actine, voir : L. M. Stamm, M. A. Pak, J. H. Morisaki, S. B. Snapper, K. Rottner, S. Lommel, E. J. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 14837-14842.
- ⁴² B. S. Hall, K. Hill, M. McKenna, J. Ogbechi, S. High, A. E. Willis, R. E. Simmonds, *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004061.
- ⁴³ a) M. Mc Kenna, R. E. Simmonds, S. High, *J. Cell. Sci.* **2016**, *129*, 1404-1415. b) M. McKenna, R. E. Simmonds, S. High, *J. Cell. Sci.* **2017**, *130*, 1307-1320.
- ⁴⁴ L. Baron, A. O. Paatero, J.-D. Morel, F. Impens, L. Guenin-Macé, S. Saint-Auret, N. Blanchard, R. Dillmann, F. Niang, S. Pellegrini, J. Taunton, V. O. Paavilainen, C. Demangel, *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 2885-2896.
- ⁴⁵ R. Bieri, N. Scherr, M.-T. Ruf, J.-P. Dangy, P. Gersbach, M. Gehringer, K.-H. Altmann, G. Pluschke, *ACS Chem. Bio.* **2017**, *12*, 1297-1307.
- ⁴⁶ a) J. M. Derry, H. D. Ochs, U. Francke, *Cell* **1994**, *78*, 635-644. b) M. Symons, J. M. Derry, B. Karlak, S. Jiang, V. Lemahieu, F. McCormick, U. Francke, A. Abo, *Cell* **1996**, *84*, 723-734.
- ⁴⁷ a) H. Miki, K. Miura, T. Takenawa, *EMBO J.* **1996**, *15*, 5326-5335. b) H. Miki, T. Takenawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 73-78.
- ⁴⁸ A. J. Thrasher, S. O. Burns, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 182-192.
- ⁴⁹ F. S. Sarfo, R. Phillips, M. Wansbrough-Jones, R. E. Simmonds, *Cell Microbiol.* **2016**, *18*, 17-29.
- ⁵⁰ O.-R. Song, E. Marion, Y. Comoglio, J. Babonneau, N. Guerineau, G. Sandoz, E. Yeramian, P. Brodin, L. Marsollier, *Med. Sci. (Paris)* **2016**, *32*, 156-158.
- ⁵¹ A. H. J. Danser, P. Anand, *Cell* **2014**, *157*, 1504-1506.
- ⁵² T. Ichiki, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 3013-3021.
- ⁵³ K. Römish, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 4185-4191.

- ⁵⁴ Y. Kishi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 6703-6708.
- ⁵⁵ a) P. Gersbach, A. Jantsch, F. Feyen, N. Scherr, J.-P. Dangy, G. Pluschke, K.-H. Altmann, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13017-13031. b) Pour les études préliminaires de 2007, voir : F. Feyen, A. Jantsch, K. H. Altmann, *Synlett* **2007**, 415-418.
- ⁵⁶ S. Fidanze, F. Song, M. Szlosek-Pinaud, P. L. Small, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10117-10118.
- ⁵⁷ K. L. Jackson, W. Li, C.-L. Chen, Y. Kishi, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2263-2272.
- ⁵⁸ V. S. Babu, Y. Zhou, Y. Kishi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1274-1277.
- ⁵⁹ a) N. M. Greene, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85-133. b) E. A. Bayer, M. Wilchek, *Methods Biochem. Anal.* **1980**, *26*, 1-45.
- ⁶⁰ a) M. B. Rosenberg, E. Hawrot, X. O. Breakefield, *J. Neurochem.* **1986**, *46*, 641-648. b) A. U. Hain, D. Bartee, N. G. Sanders, A. S. Miller, D. J. Sullivan, J. Levitskaya, C. F. Meyers, J. Bosch, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4521-4531.
- ⁶¹ D. B. Melville, D. S. Gendhof, J. M. Lee, *J. Biol. Chem.* **1954**, *208*, 503-512.
- ⁶² K. Dittmer, V. Du Vigneaud, *Science* **1944**, *100*, 129-131.
- ⁶³ a) G. W. Wang, N. Yin, E. Negishi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4118-4130. b) Pour les études préliminaires de 2006, voir : N. Yin, G. Wang, M. X. Qian, E. Negishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2916-2920.
- ⁶⁴ K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771.
- ⁶⁵ C. Aïssa, R. Riveiros, J. Ragot, A. Fürstner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15512-15520.
- ⁶⁶ a) U. S. Racherla, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 401-404. b) H. C. Brown, K. S. Bhat, R. S. Randad, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 319-320. c) H. C. Brown, P. K. Jadhav, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2092-2093.
- ⁶⁷ A. Guerinot, S. Reymond, J. Cossy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 6521-6524.
- ⁶⁸ M. D. Alexander, S. D. Fontaine, J. J. La Clair, A. G. Dipasquale, A. L. Rheingold, M. D. Burkart, *Chem. Commun.* **2006**, *44*, 4602-4604.
- ⁶⁹ G. A. O'Doherty, T. J. Hunter, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1049-1052.
- ⁷⁰ D. M. Hodgson, L. T. Boulton, G. N. Maw, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3713-3724.
- ⁷¹ a) E. Piers, T. Wong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3609-3610. b) G. D. Allred, L. S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2748-2749. c) J. Srogl, G. D. Allred, L. S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12376-12377.
- ⁷² a) M. Donnard, N. Blanchard, *Copper-Mediated Cross-Coupling Reactions*, ed. G. Evano et N. Blanchard, John Wiley & Sons, Hoboken, **2013**, ch. 18. b) G. Evano, N. Blanchard, M. Toumi, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3054-3131.
- ⁷³ J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989-1993.
- ⁷⁴ A.-C. Chany, R. Veyron-Churlet, C. Tresse, V. Mayau, V. Casarotto, F. Le Chevalier, L. Guénin-Macé, C. Demangel, N. Blanchard, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7382-7395.
- ⁷⁵ M. Verdoes, U. Hillaert, B. I. Florea, M. Sae-Heng, M. D. P. Risseeuw, D. V. Filippov, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6169-6171.
- ⁷⁶ a) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015. b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, B. K. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- ⁷⁷ H. Hong, T. Stinear, J. Porter, C. Demangel, P. F. Leadlay, *ChemBioChem.* **2007**, *8*, 2043-2047.
- ⁷⁸ L. Guénin-Macé, L. Baron, A.-C. Chany, C. Tresse, S. Saint-Auret, F. Jönsson, F. Le Chevalier, P. Bruhns, G. Bismuth, S. Hidalgo-Lucas, J.-F. Bisson, N. Blanchard, C. Demangel, *Sci. Trans. Med.* **2015**, *7*, 289ra85.
- ⁷⁹ A. S. Rice, R. H. Dworkin, T. D. McCarthy, P. Anand, C. Bountra, P.I. McCloud, J. Hill, G. Cutter, G. Kitson, N. Desem, M. Raff, *Lancet* **2014**, *383*, 1637-1647.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

L'infection à *M. ulcerans* suscite l'intérêt de la communauté scientifique depuis des décennies. En effet, dès la découverte en 1999 de l'exotoxine responsable des effets biologiques observés chez les patients touchés par l'ulcère de Buruli, de nombreuses études ont été menées afin d'apporter les premiers éléments de réponse concernant les mécanismes biologiques de cette maladie nécrotique. Par ailleurs, le développement de synthèses totales permettant l'accès à une toxine de haute pureté et l'élaboration de voies synthétiques modulaires pour l'obtention d'analogues ont joué un rôle majeur dans ces progrès. La voie de synthèse développée précédemment par notre équipe de recherche représente un outil robuste pour la synthèse d'analogues de mycolactones C8-desméthylés. A l'aide de cette dernière, une trentaine d'analogues ont été synthétisés, dont un fluorescent ayant contribué à la découverte de la première cible biologique des mycolactones. Ces analogues comprennent quasiment toutes les configurations possibles de la stéréotriade C12', C13', C15' présente sur la chaîne inférieure, avec également plusieurs exemples de produits mono- et di-désoxygénés. L'évaluation biologique de ces différents analogues a permis d'identifier plus précisément les fonctions chimiques de la toxine impliquées dans la réponse biologique observée lors de l'infection par *M. ulcerans*. De plus, cette étude SAR a révélé un analogue simplifié pouvant servir de tête de série de nouvelle classe d'agent thérapeutique.

Néanmoins, bien que la maladie soit connue depuis plus de 150 ans, ces avancées restent relativement récentes et ne permettent qu'une première approche dans le processus d'élucidation des mécanismes biologiques. C'est en tenant compte du contexte évolutif des dernières découvertes et des inconvénients des synthèses précédemment développées qu'une nouvelle orientation a été donnée au projet. En effet, ce dernier est désormais dirigé vers le développement d'une voie synthétique unique permettant l'obtention de la toxine naturelle et d'analogues présentant des modifications structurales sur le fragment macrocyclique, soit une famille d'analogues encore jamais étudiée.

3. 1. Présentation du projet

3.1.1. *Contexte*

La mise en évidence des principales fonctions chimiques impliquées dans l'activité biologique à travers la synthèse d'analogues de mycolactones, suivie de l'identification de différentes cibles biologiques, permet une approche différente pour la compréhension du déclenchement de la maladie. En effet, ces découvertes ouvrent la voie aux études d'interactions ligand-protéine des mycolactones, jusqu'alors impossible en l'absence d'une cible biologique reconnue. L'élucidation de la conformation adoptée par la mycolactone A/B au sein du complexe protéique cible, ainsi que l'identification des différents acides aminés de la protéine impliqués dans les interactions avec la toxine naturelle, constituent désormais une priorité pour le développement de méthodes de diagnostic significatives et de traitements efficaces. Or, ces informations pourraient notamment être accessibles à travers l'étude du complexe protéine-ligand via des sondes spécifiques de mycolactones.

La préparation de sondes de mycolactones pour l'étude d'interactions avec sa cible biologique implique la modulation d'une position caractéristique de la structure de la mycolactone A/B. D'un point de vue SAR, aucune information n'a mis en évidence le caractère essentiel des méthyles en positions C4', C6' et C10' de la chaîne inférieure pour l'activité cytotoxique (Figure 1). La modification de ces dernières apparaît alors comme secondaire. De même, aucune information n'a souligné l'impact du méthyle en position C14, ou des hydroxyles en positions C17 et C19, vis-à-vis de l'activité biologique.¹ De plus, les excellentes affinités de liaison pour la cible protéique WASP, obtenues avec les analogues tronqués de leur chaîne supérieure, rendent également la modification des positions C14, C17 et C19 non prioritaire.² Au contraire, les études SAR développées en 2011 et 2014 ont illustré l'importance de la stéréotriade C12', C13', C15' pour l'activité biologique.³ D'autre part, les études SAR de 2011 ont également montré que la déméthylation de la position vinylique C8 entraîne une nette diminution de l'activité cytotoxique. En effet, comme précisé dans le chapitre précédent, la valeur de référence de l'activité cytopathique de la mycolactone A/B est définie à 20 nM,⁴ or l'analyse de la mycolactone A/B C8-desméthylée montre une activité de seulement 5 µM. Mais contrairement à la stéréotriade, les études SAR de 2014 ont prouvé qu'une affinité de liaison pouvait être conservée en absence de substituants en position C8. Pour rappel, il a été mesuré que la toxine naturelle se liait à la cible WASP avec une affinité de 32±22,1 µM et que son analogue C8-desméthylé possédait une IC₅₀ de 97,5±28,7 µM sur cette même cible. De ce fait, la modulation de cette position apparaît très intéressante. Par ailleurs, il n'existe à l'heure actuelle aucune voie de synthèse permettant d'apporter une diversité structurale, autre qu'un groupement méthyle ou un proton, en position C8 des mycolactones. La préparation de cette nouvelle famille d'analogues permettrait donc de mettre en place une voie de synthèse originale de la macrolactone offrant ainsi l'accès à la macrolactone C8-méthylée de la mycolactone A/B naturelle et d'analogues en cette même position.

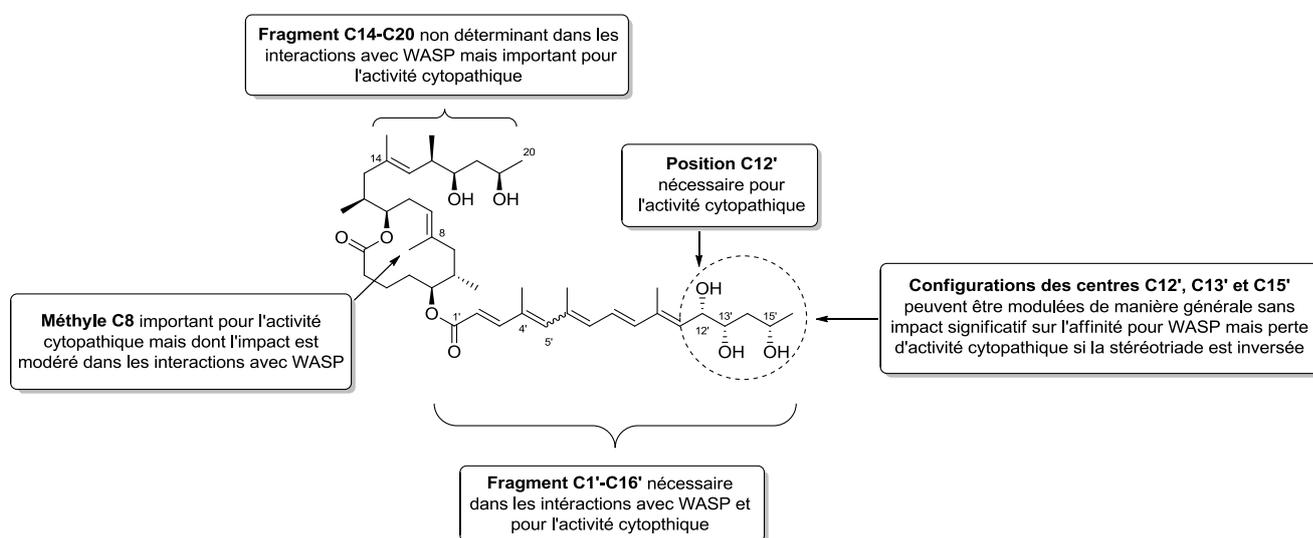


Figure 1 : Rappel de l'étude SAR mise au point concernant les fonctions de la toxine impliquées dans les interactions avec WASP et N-WASP (2014) et des informations concernant l'activité cytotoxique (1999-2013)

Dans cette optique, une voie de synthèse unique a été développée pour l'obtention de la mycolactone A/B et ses analogues en C8.

3.1.2. *Projet de recherche*

Ce projet s'inscrit dans la continuité des efforts menés par notre laboratoire, qui se sont jusqu'à présent concentrés sur la mise au point d'une voie de synthèse modulaire de la chaîne inférieure. En se basant sur une mycolactone C8-desméthylée, qui a permis un accès rapide aux analogues, une première approche dans la compréhension du mécanisme d'action de la toxine a été exposée. La nouvelle stratégie d'exploration fonctionnelle des mycolactones, développée au cours de cette thèse, repose sur une voie synthétique flexible et originale de la partie macrolactonique. L'objectif visé est la synthèse totale de la toxine naturelle, essentielle pour les tests biologiques, et dont les intermédiaires rencontrés au cours de cette unique voie synthétique pourraient également être transformés en analogues d'intérêts. L'analyse biologique de ces derniers, en comparaison avec celle de la mycolactone A/B, permettrait ainsi d'établir de nouvelles relations structure-activité.

La préparation de sondes de mycolactones est reconnue comme étant une méthode de choix pour la découverte et la confirmation de cible biologique. A titre d'exemple, la première cible protéique de la mycolactone A/B a été découverte grâce à la synthèse d'une sonde fluorescente (voir chapitre 2.1).⁵ Par ailleurs, une compréhension au niveau moléculaire du mécanisme d'action des produits naturels à l'aide de sondes spécifiques est également rapportée par différents groupes de recherche.⁶ Ainsi, une modulation en position C8, position qui n'affecte pas l'affinité de liaison avec le récepteur supposé, autoriserait d'exploiter la mycolactone A/B pour la découverte de nouvelles cibles biologiques et la compréhension des processus moléculaires et biologiques résultant à l'infection. Bien que les avancées dans ce domaine soient en perpétuelle évolution, comme le montrent les découvertes récentes réalisées par les groupes de Pluschke,⁷ Demangel,^{5,8} Simmonds,⁹ ou encore Marsollier et Brodin,¹⁰ plusieurs points restent encore à être éclaircis, dont notamment le mécanisme moléculaire et les types d'interactions entre la toxine et sa cible. Sur le plan conceptuel, plusieurs types de sondes peuvent être préparés en fonction de l'étude réalisée. Toutefois, la généralisation propose une division de la structure en trois parties, à savoir la molécule de référence reliée par un lien covalent à un groupement fonctionnel. Ce dernier a pour avantage la conjugaison facilitée avec un second partenaire. Dans l'optique d'une bio-conjugaison, nous envisageons de relier la mycolactone A/B, par sa position C8, à un groupement fonctionnel de type azoture au moyen d'une chaîne alkyle.

Dans cette optique, une stratégie de synthèse originale et modulaire a été étudiée. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés au développement d'une nouvelle voie de synthèse du motif macrocyclique de la mycolactone A/B permettant une flexibilité quant au groupement porté en position C8. D'un point de vue rétrosynthétique, le fragment macrolactonique, dont la chaîne supérieure pourrait être couplée par un couplage pallado-catalysé de type Suzuki, serait relié, après déprotection de l'alcool en position C5, au fragment C1'-C16' par une estérification de Yamaguchi. Pour apporter une diversité structurale en position C8, il est envisagé de réaliser des réactions de couplages métallo-catalysés (Figure 2).

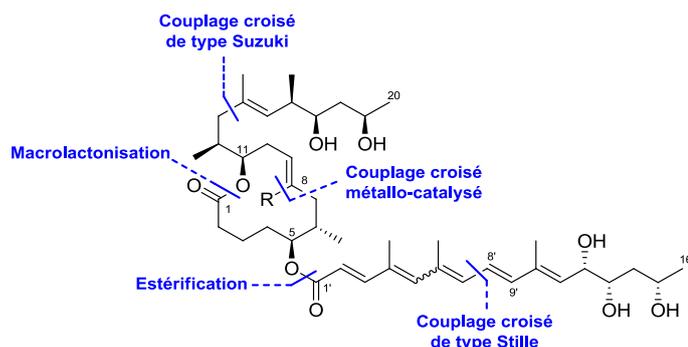


Figure 2 : Déconnexions envisagées pour la synthèse totale de la mycolactone A/B et de ses analogues en C8

Plusieurs personnes ont été impliquées dans ce projet depuis 2006, notamment le Dr. Anne-Caroline Chany, le Dr. Virginie Casarotto, le Dr. Cédric Tresse, le Dr. Lise Bréthous-Parmentier et le Dr. Hajer Abdelkafi. Leurs efforts m'ont permis de disposer de certains intermédiaires de synthèse des chaînes inférieures et supérieures, facilitant ainsi l'avancement de ce nouveau projet. Il est à préciser également que les stagiaires Boyang Yin (M1 à la Faculté des Sciences de l'UHA) et André Fuchs (2^{ème} année à l'ENSCMu) ont contribué en 2015 au développement de la nouvelle voie de synthèse du fragment macrocyclique.

Considérant la nécessité pour les biologistes de disposer rapidement d'une toxine naturelle de haute pureté, l'objectif premier a été d'examiner la nouvelle voie de synthèse pour l'accès à la mycolactone A/B, possédant alors un méthyle en position C8. Par la suite, les travaux se sont concentrés sur l'optimisation de cette même voie de synthèse, mais dont la molécule finale posséderait une modification structurale en position C8. Ainsi, les structures accessibles seraient des analogues de mycolactones diversifiés en C8 ou encore des sondes spécifiques. L'intermédiaire de synthèse représentatif de la mycolactone A/B doit imiter suffisamment la structure de la toxine naturelle tout en offrant un groupement fonctionnalisable par lequel une diversification ou l'attache d'un lien peut être réalisé. Ainsi, l'objectif synthétique de cette thèse repose sur le développement d'une synthèse totale de la mycolactone A/B qui serait hautement flexible et reproductible, permettrait un accès à la stéréochimie désirée et des montées en échelle, faciliterait l'introduction de modifications structurales pour les études SAR, et enfin permettrait la préparation d'analogues modifiés en vue d'une bio-conjugaison. Par ailleurs, les analyses biologiques de la mycolactone A/B synthétique et de ses analogues représenteraient une ressource supplémentaire quant à la compréhension du déclenchement de l'ulcère de Buruli et des conséquences qui en résultent. Les travaux réalisés au cours de ce projet sont présentés dans les sous-chapitres suivants.

3. 2. Synthèse totale de la mycolactone A/B

C'est en tenant compte des conditions préalablement définies qu'un premier concept rétrosynthétique a été élaboré pour la préparation du fragment macrolactonique de la mycolactone A/B. Les chaînes latérales ayant fait l'objet de nombreuses synthèses, leur préparation a été réalisée en suivant les protocoles déjà décrits dans la littérature. Néanmoins, il est à noter que des améliorations majeures concernant leur préparation, qui seront discutées par la suite, ont été réalisées au cours de cette thèse.

3.2.1. Première approche de la synthèse de la mycolactone A/B

D'un point de vue rétrosynthétique, divers intermédiaires de synthèse, déjà rencontrés dans les synthèses totales de la mycolactone A/B décrites dans la littérature, sont interceptés à l'aide d'une toute nouvelle stratégie de synthèse (Schéma 1). Le fragment macrolactonique C1-C20 **98** pourrait être obtenu par une réaction de couplage pallado-catalysé de type Suzuki avec la chaîne supérieure **99** utilisée par Altmann¹¹ dans sa synthèse totale et préparée selon la méthode de Kishi.¹² Le contrôle du centre en C12 de l'intermédiaire du couplage de Suzuki pourrait être réalisé par une hydroboration diastéréosélective sur l'alcène le moins encombré de **167**. Pour l'obtention de la stéréochimie désirée en C11, une réduction asymétrique de l'isopropénylcétone **168** est considérée. L'insertion d'un groupement en position C8 pourrait être réalisée via un couplage croisé métallo-catalysé sur l'alcène bromé **169**. Ce dernier serait formé par une réaction de bromoallylation (Z)-sélective de l'alcyne **65**, intermédiaire également présent dans la synthèse totale décrite par Negishi.¹³ Enfin, comme produit de départ de cette voie synthétique, on retrouve l'ester de Roche **93** qui apporte le premier centre stéréogène de la molécule en position C6. Le fragment macrolactonique C1-C20 **98**, intermédiaire de la synthèse totale décrite par Altmann,¹¹ sera ensuite relié à la chaîne inférieure par une estérification dans les conditions de Yamaguchi, menant après les déprotections finales à la mycolactone A/B.

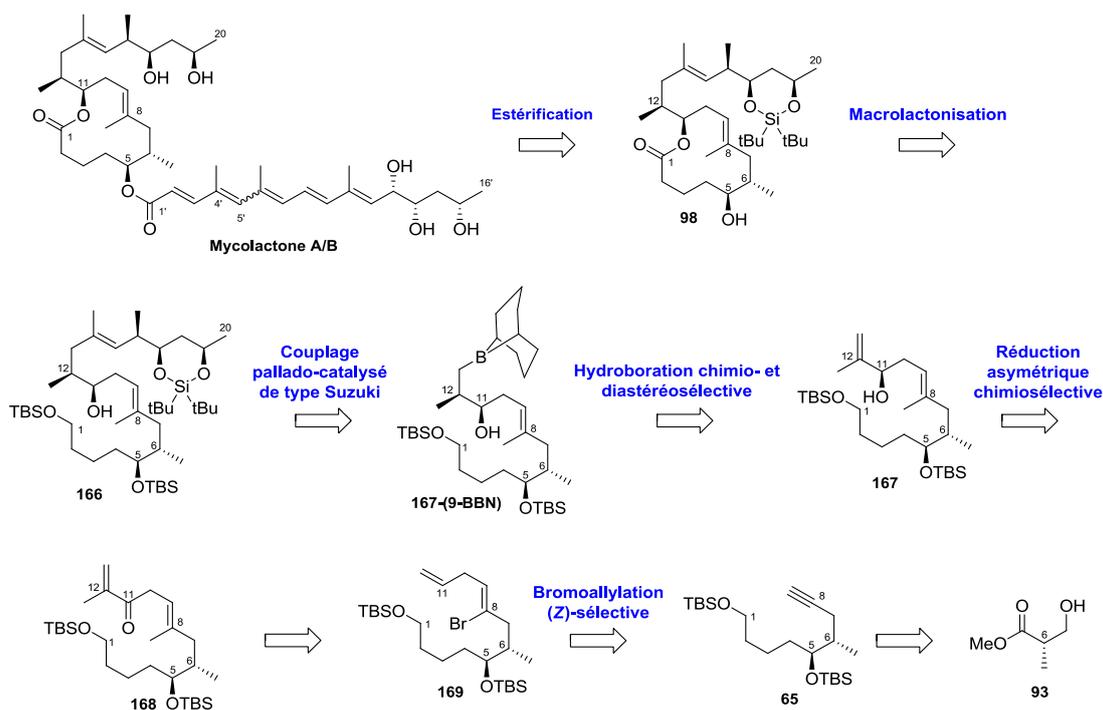


Schéma 1 : Analyse rétrosynthétique de la première approche pour la préparation de la mycolactone A/B

3.2.1.1. Préparation du fragment linéaire C1-C13

La préparation du fragment C1-C13 reprend les premières étapes de la synthèse modulaire développée par notre laboratoire en 2011 pour la préparation de la mycolactone C8-desméthylée (voir sous-chapitre 2.2.2). A partir de l'ester de Roche **93**, commercialement disponible, l'aldéhyde **143** est obtenu après une réaction de tosylation de l'alcool, suivie d'une séquence de réduction/oxydation. L'intermédiaire ainsi formé est ensuite engagé dans une réaction d'allylboration de Brown¹⁴ utilisant une solution commerciale de (-)-Ipc₂Ballyl à 1 M dans le pentane.

L'alcool homoallylique correspondant, obtenu avec une diastéréosélectivité supérieure à 93:7, est ensuite protégé sous la forme d'un éther silylé **170** (Schéma 2).

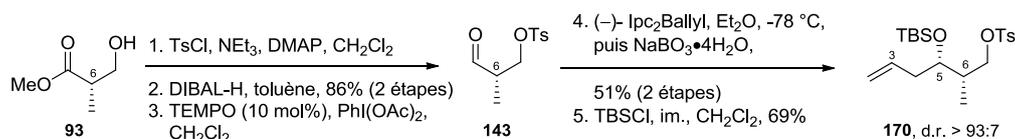


Schéma 2 : Synthèse de l'intermédiaire **170** par réaction d'allylboration asymétrique

Par la suite, l'éther homoallylique **170** est soumis à une réaction de métathèse croisée avec l'acrylate de méthyle. L'utilisation de la seconde génération de catalyseur à base de ruthénium de type Grubbs dans le dichloroéthane à 60 °C entraîne une métathèse croisée efficace, conduisant à **171** avec 94% de rendement. Il faut toutefois souligner que le rendement isolé semble être dépendant du temps de réaction requis pour la conversion complète du produit de départ. En effet, un temps de réaction supérieur à 6 heures conduit à la formation de produits secondaires non-identifiés et difficilement séparables du produit désiré. Alors, nous nous sommes aperçus que le temps de réaction optimal était de 4 heures de réaction. Par ailleurs, pour faire face à l'éventuelle dégradation du catalyseur, nous avons observé qu'un ajout de ce dernier à hauteur de 1 mol% (soit 6+1 mol% dans l'ensemble de la réaction), dissous dans 1 mL de solvant quelle que soit l'échelle de la réaction, après trois heures d'agitation, permettait de tirer la conversion à son maximum et ainsi d'obtenir de très bon rendement. Le dérivé carbonyle α,β -insaturé **171** est ensuite engagé dans une succession de réductions faisant intervenir dans un premier temps le catalyseur d'Adams pour l'hydrogénation de l'alcène,¹⁵ puis l'hydruire de diisobutylaluminium pour la réduction de l'ester. L'alcool primaire ainsi obtenu est protégé par un groupement silylé afin d'obtenir quantitativement l'intermédiaire **173** (Schéma 3).

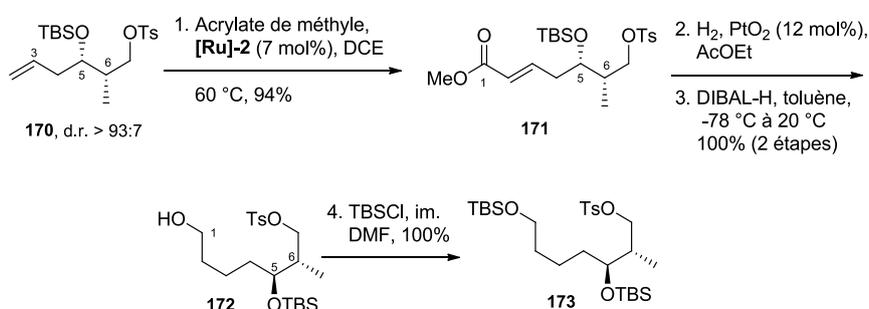


Schéma 3 : Synthèse de l'intermédiaire **173** par réactions de métathèse croisée et de réductions

Le groupement tosyloxy de **173** est ensuite changé par une fonction alcyne à l'aide d'un complexe commercial d'acétylure de lithium•éthylènediamine (Schéma 4). Il est à noter que la polarité du milieu réactionnel pour cette réaction joue un rôle essentiel. En effet, il a été observé qu'en présence de diméthylsulfoxyde seul, l'élimination de type E2 du tosylate était en compétition avec la réaction de substitution désirée. Cependant, à l'aide d'un mélange de solvants THF/DMSO (1:1) et d'une température régulée à 0 °C, cette réaction conduit sélectivement, avec un rendement correct, à l'alcyne terminal **65** nécessaire pour la réaction de bromoallylation (Z)-sélective.¹⁶ En s'appuyant sur les travaux développés par Kaneda et Teranishi,^{16a} et repris entre autres par Rawal,^{16b} l'intermédiaire **65** est engagé dans la réaction de bromoallylation avec un large excès de bromure d'allyle et en présence d'une quantité catalytique de palladium(II), conduisant ainsi à l'intermédiaire

169. Il est à préciser pour cette réaction que l'ajout de l'alcyne dans le milieu réactionnel est réalisé sur une période de 8 heures afin d'éviter toutes réactions parasites. Par ailleurs, la stéréochimie du bromure vinylique **169** a été confirmée par des expériences RMN de type nOe (Figure 3).

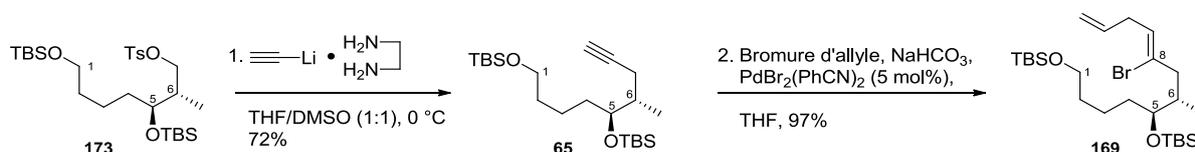


Schéma 4 : Synthèse de l'intermédiaire **169** par réaction de bromoallylation

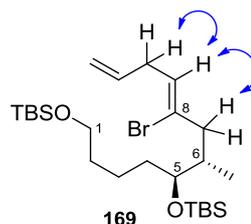


Figure 3 : nOe observés sur l'intermédiaire **169**

Il est à noter que seul l'isomère *Z* est obtenu au cours de la réaction de bromoallylation, dont le mécanisme réactionnel postulé est illustré sur le Schéma 5. Ce dernier commence par une *syn* addition du complexe de palladium sur l'alcyne vrai. Grâce à un échange de ligand, l'alcène se complexe ensuite au palladium avant de subir l'étape d'insertion migratoire. Par la suite, une β -bromo élimination, thermodynamiquement et cinétiquement favorable,¹⁷ permet de régénérer le catalyseur et de libérer le 1-bromo-1,4-diène désiré, l'intermédiaire clé de la stratégie de synthèse.

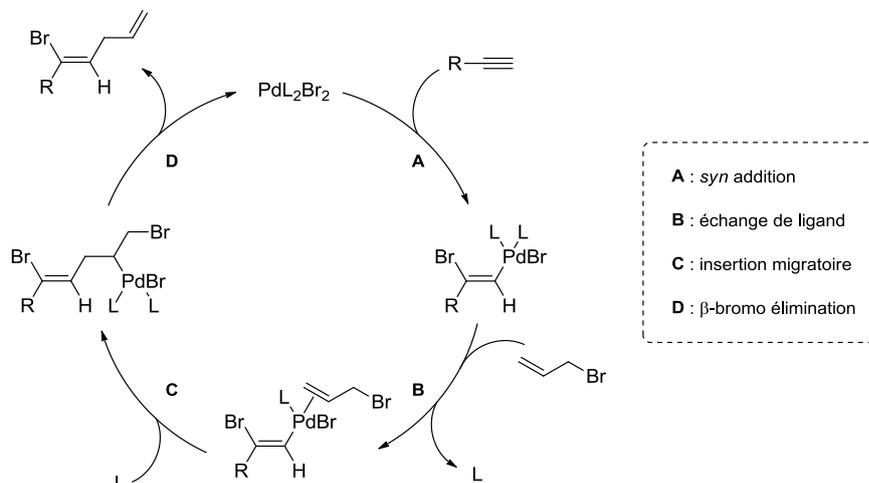


Schéma 5 : Cycle catalytique de la réaction de bromoallylation

Le bromure vinylique **169** est une plate-forme versatile de par la liaison C8-Br, qui peut être fonctionnalisée par divers réactions de couplages métallo-catalysés. Pour la synthèse de la toxine naturelle, l'insertion du méthyle a été réalisée par un couplage croisé pallado-catalysé de type Negishi¹⁸ à l'aide d'une solution commerciale de diméthylzinc. Le catalyseur PdCl₂(DPEPhos), décrit par Negishi en 2003 pour le couplage de 2-bromo-1,3-diènes,¹⁹ n'ayant donné aucune conversion dans notre cas, le tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) a été exploité. Ces conditions réactionnelles, rapportées notamment par Jamison sur un substrat similaire à l'intermédiaire **169**,²⁰

ont permis d'obtenir le diène méthylé en C8 **174** avec 92% de rendement. Il est à préciser que des bons rendements sur cette réaction ont été obtenus pour des échelles allant de 30 mg à plus de 2 g de produit.

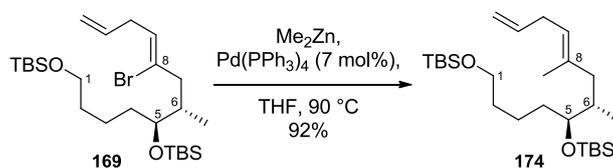


Schéma 6 : Synthèse de l'intermédiaire **174** par une réaction de couplage croisé de type Negishi

Une fois l'intermédiaire de la toxine naturelle en main, il a été envisagé d'allonger la structure en C13 par l'addition d'un Grignard sur l'aldéhyde préalablement formé, puis de contrôler le centre en C11 par une réaction de réduction asymétrique de la cétone correspondante (Schéma 7). Les premiers essais se sont portés sur une réaction d'ozonolyse, en se basant sur les travaux de Wender pour sa synthèse de la bryostatine ^{9,21} afin de former l'aldéhyde nécessaire pour la réaction d'addition de l'organomagnésien. Plusieurs tentatives d'ozonolyse ont ainsi été réalisées à l'aide d'une solution d'ozone dans le dichlorométhane préparée à une concentration d'environ 25 mM. Cependant, à cause d'un manque cruel de sélectivité au cours des différents essais de variations d'ozone dans le milieu réactionnel, il a été décidé de fractionner la formation de l'aldéhyde.

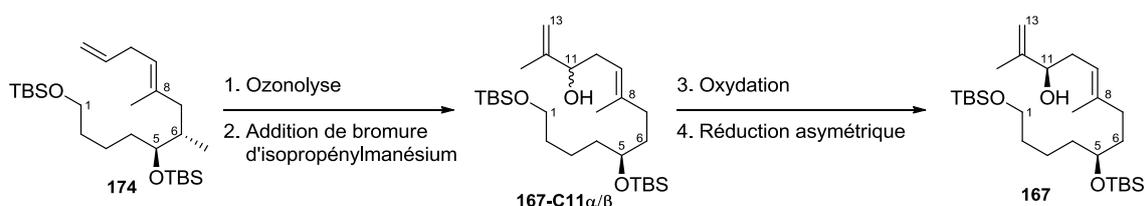


Schéma 7 : Etapes envisagées pour la synthèse de l'intermédiaire **167**

Ainsi, il a été décidé de former la fonction aldéhyde en deux étapes, à savoir par une dihydroxylation de l'alcène terminal **174** suivie de la coupure oxydante du diol correspondant. Cette dernière étape serait alors succédée par l'addition du réactif commercial de bromure d'isopropénylmagnésium, conduisant à l'intermédiaire **167** sous la forme d'un mélange d'épimères en C11 (Schéma 8). Toutefois, les essais de dihydroxylation dans les conditions décrites par VanRheenen²² (réaction d'Upjohn) ont montré la présence de mono- et de double-dihydroxylation en fin de réaction. Un mélange complexe a été observé malgré des essais d'optimisations sur les temps de réaction (de 15 heures à 1 heures), la température (de 25 °C à 0 °C) et les quantités de catalyseurs (de 20 à 5 mol%).

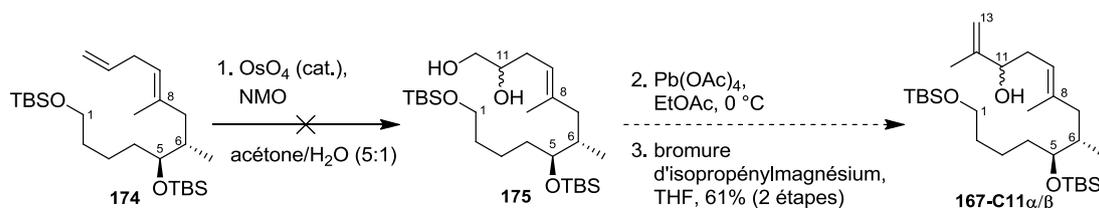


Schéma 8 : Essais de réaction d'Upjohn sur l'intermédiaire **174**

Par conséquent, nous avons dû nous orienter vers l'emploi de la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless.²³ L'utilisation de l'AD-mix alpha ou bêta nous a finalement permis

d'obtenir le 1,2-diol souhaité en quantités suffisantes malgré, là encore, des problèmes de sélectivité et des difficultés de montée en échelle (Schéma 9). Pour cette réaction, l'utilisation de méthanesulfonamide en tant qu'additif accorde une accélération de l'étape d'hydrolyse, du complexe formé par le catalyseur et le substrat, dans le milieu réactionnel hétérogène. Ainsi, grâce à une cinétique de réaction accélérée, il est possible de réaliser les réactions de dihydroxylation à basse température et d'améliorer la sélectivité.^{23,24} Le diol **172**, dont le meilleur rendement obtenu est de 74%, est ensuite engagé dans une réaction de coupure oxydante dans les conditions de Criegee²⁵ avant l'addition de l'organomagnésien commercial, conduisant à la formation de **167** sous la forme de deux épimères en C11 avec un ratio α/β égal à 88:12. Ce dernier est ensuite transformé en cétone par l'action de l'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX), permettant des oxydations en conditions relativement douces comme le periodinane de Dess-Martin.²⁶

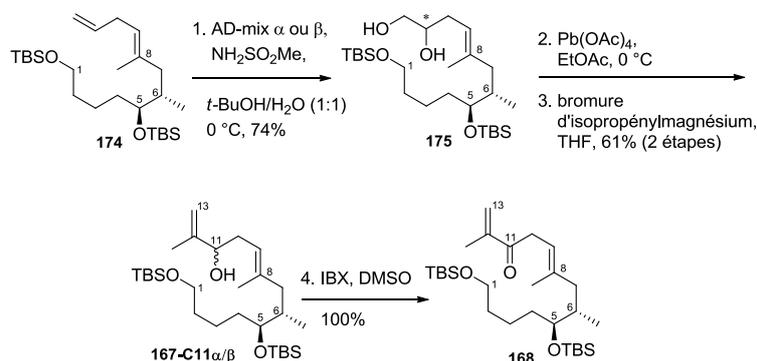


Schéma 9 : Synthèse de l'intermédiaire **168** par réaction d'addition d'organomagnésien

La cétone **168** en main, le contrôle stéréosélectif du centre C11 a ensuite été examiné. En s'appuyant sur les travaux de Clark dans la synthèse de dérivés de claidielline,²⁷ l'utilisation de la copule de Corey-Bakshi-Shibata (CBS) a été expérimentée pour la réduction diastéréosélective de la fonction cétone en position C11.²⁸ Plus précisément, des essais avec le catalyseur dont l'oxazaborolidine est substitué par un méthyle, substitution connue pour d'augmenter la stéréosélectivité,²⁹ ont été réalisés. En effet, la copule CBS de configuration (*S*) permettrait, suivant l'état de transition représenté sur le Schéma 10, de réduire sélectivement la cétone et d'obtenir **167** avec la stéréochimie souhaitée. Le mécanisme admis pour cette réaction commence par l'activation du catalyseur par le borane, produisant ainsi le complexe **A**. Ce dernier coordonne ensuite la cétone pour former l'intermédiaire à 6 centres **B**. Le transfert de l'hydrure du borane à la cétone est réalisé de manière stéréosélective, en fonction de la différence de taille entre les groupements de part et d'autre de cette dernière. Enfin, deux voies différentes sont envisagées pour terminer ce mécanisme. La première régénère directement le catalyseur après décomplexation de l'alcoolate et de l'atome de bore. La deuxième voie fait intervenir une autre molécule de borane pour régénérer le complexe actif. Après hydrolyse, toutes deux conduisent à l'alcool secondaire de manière stéréosélective.

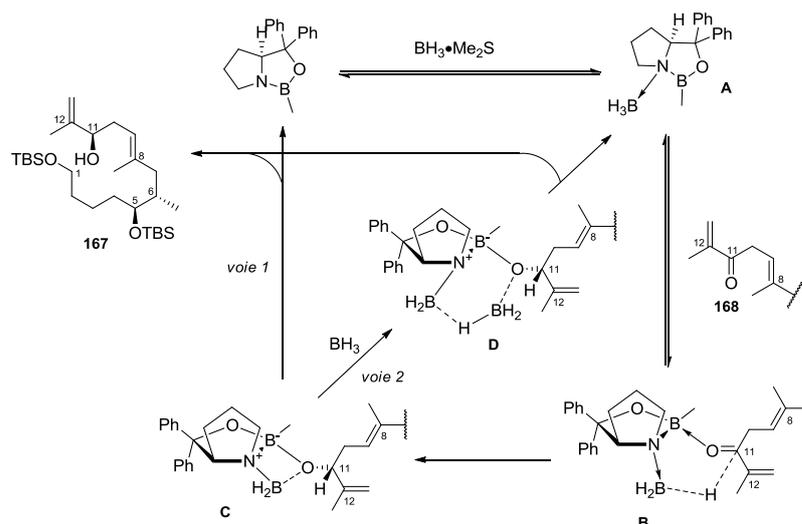


Schéma 10 : Mécanisme et état de transition lors de la réaction de réduction asymétrique via la copule de Corey-Bakshi-Shibata

Cependant, bien que cette réaction soit très rapportée dans la littérature,³⁰ des essais préliminaires utilisant du borane complexé par le sulfure de diméthyle comme source réductrice ont été réalisés et n'ont conduit qu'à une conversion très lente après 8 heures de réaction et à l'apparition de produits de dégradation (Schéma 11).

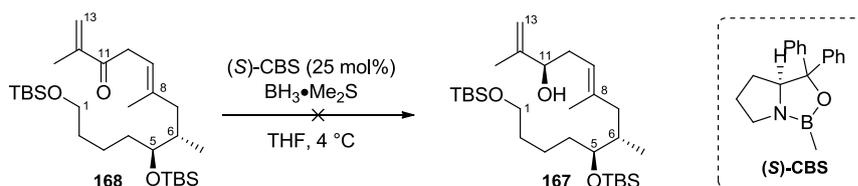


Schéma 11 : Essais de réduction diastéréosélective de l'intermédiaire 168 à l'aide de la copule de Corey-Bakshi-Shibata

Devant ces résultats décevants, une nouvelle stratégie de synthèse pour l'extension en C13 et le contrôle du centre en C11, en repartant de notre intermédiaire clé **169**, a été étudiée. Les objectifs de cette nouvelle approche sont notamment la réduction du nombre d'étapes, un meilleur contrôle stéréo- et chimiosélectif, et une synthèse sans destruction d'un centre stéréogène préalablement formé.

3.2.2. Deuxième approche de la synthèse de la mycolactone A/B

Comme précisé sur l'analyse rétrosynthétique présentée Schéma 12, cette nouvelle approche reprend les étapes clés précédemment évoquées pour la synthèse du fragment macrocyclique C1-C20. Cette stratégie conserve ainsi l'étape finale de couplage de la chaîne inférieure par estérification de l'alcool libre en position C5, conduisant à la mycolactone A/B (voir Schéma 1). Toutefois, un changement est à noter pour le passage de **169** à **177** et de **176** à **167**. En effet, la réaction de métathèse croisée a été considérée pour l'extension de la structure jusqu'en C13. Par ailleurs, deux options ont été étudiées quant à la formation diastéréosélective de la fonction alcool en position C11 de l'intermédiaire **167**, à savoir des réactions d'époxydation et de dihydroxylation asymétriques.

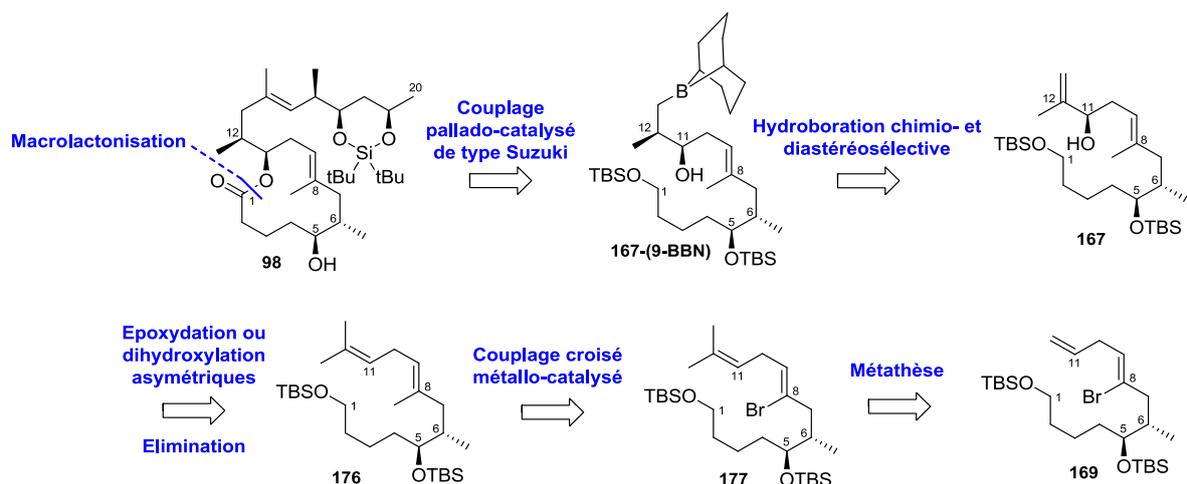


Schéma 12 : Analyse rétrosynthétique de la deuxième approche pour la préparation du fragment macrocyclique C1-C20

3.2.3.1. Préparation du fragment linéaire C1-C13

Dans l'optique de réduire le nombre d'étapes, une réaction de métathèse croisée avec le 2-méthyl-2-butène a été effectuée.³¹ En insérant le substituant gem-diméthyle, la structure du fragment linéaire a ainsi été allongée jusqu'au carbone en position 13. Par la suite, la réaction de couplage croisé de type Negishi, permettant d'insérer le méthyle en C8, a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Il est à noter que ces conditions réactionnelles nous conduisent, encore une fois, à l'obtention de l'intermédiaire désiré **176** avec un très bon rendement (Schéma 13).

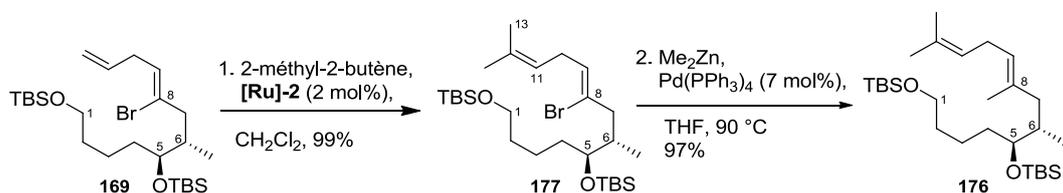


Schéma 13 : Synthèse de l'intermédiaire 176 par réactions de métathèse croisée et couplage de type Negishi

Par la suite, la formation stéréosélective de la fonction alcool en position C11 a été étudiée. Cette dernière peut être effectuée selon les deux voies d'oxydation asymétrique présentées Schéma 14. Une évaluation des deux routes, permettant la formation de l'intermédiaire **167**, est décrite dans les paragraphes suivants.

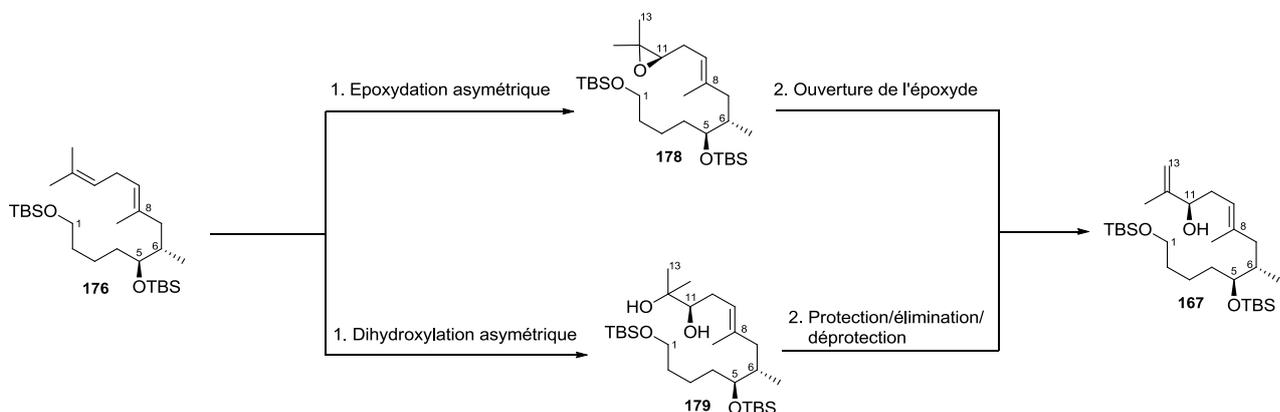


Schéma 14 : Réactions d'oxydations asymétriques envisagées pour la synthèse de l'intermédiaire 167

En principe, une réaction d'époxydation asymétrique régiosélective permettrait de fixer, en un nombre d'étapes minimum, le centre en C11 souhaité puis de former l'alcène terminal en C12-C13 par simple ouverture de l'époxyde formé. En effet, il est décrit que l'ouverture de l'époxyde trisubstitué en conditions douces par le titanocène(III), dont les travaux pionniers ont été initiés par RajanBabu et Nugent entre 1988 et 1994,³² donnerait un accès direct à l'alcool allylique **167** désiré (Schéma 15).³³ Dans une première étape, il est donc nécessaire d'époxyder le substrat **176** de manière chimio- et stéréosélective. Parmi les stratégies d'époxydation asymétrique à la disposition du chimiste, nous avons retenu la réaction de Shi³⁴ qui est la seule permettant de distinguer deux oléfines trisubstituées, telles que C8-C9 et C11-C12, très proches structurellement.³⁵ Ce type d'époxydation fait intervenir une cétone chirale dérivée du fructose en présence d'Oxone® afin de générer *in situ* un dioxirane chiral. Ainsi, plusieurs essais d'époxydation utilisant la copule **180** ont été réalisés. Cependant, les différentes tentatives utilisant des quantités catalytiques et stœchiométriques en pré-catalyseur n'ont donné aucune conversion sur notre substrat. Le produit de départ a pu être récupéré sans indications de dégradation.

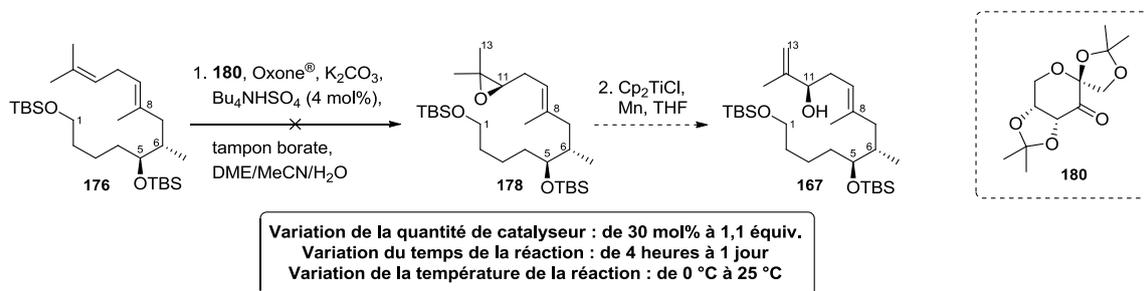


Schéma 15 : Essais d'époxydation sur l'intermédiaire **176**

Nous nous sommes alors tournés vers la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless²³ pour fixer la configuration du centre en C11 (Schéma 16). Après plusieurs essais et optimisations, l'utilisation de l'AD-mix β , dans les strictes conditions décrites par Sharpless,³⁶ a effectivement permis la formation sélective du 1,2-diol **179** avec un rendement reproductible et satisfaisant, ainsi qu'un très bon rapport diastéréomérique. La mesure de l'excès diastéréomérique du centre en C11 a été déterminée par la synthèse d'une paire de diastéréoisomères d'esters de Mosher avec le (*R*)- et le (*S*)-MTPA (acide (*R*)- ou (*S*)-(+)- α -méthoxy- α -trifluorométhylphénylacétique) suivie d'une analyse en RMN du proton et du fluor (Tableau 1 et Figure 4).³⁷

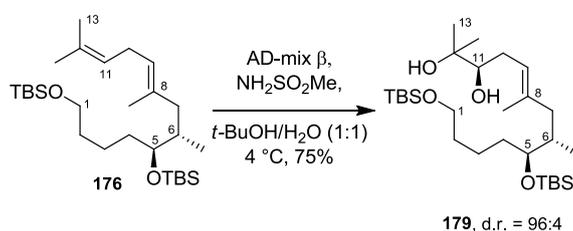
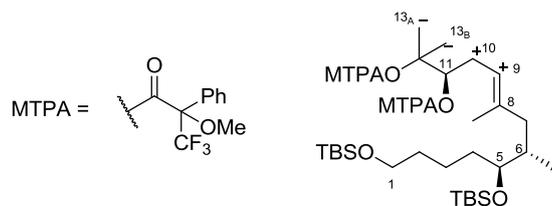


Schéma 16 : Synthèse de l'intermédiaire **179** par réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless



	<i>S</i> (ppm)	<i>R</i> (ppm)	$\Delta\delta = \Delta S - \Delta R$ (ppm)
H9	5,1592	5,0675	+0,0917
H10	2,4332	2,3579	+0,0753
H10'	2,1979	2,1163	+0,0816
H11	5,1021	5,0569	+0,0452
H13_A	1,1942	1,2426	-0,0484
H13_B	1,1685	1,2244	-0,0559

Tableau 1 : Résultats des différences des déplacements chimiques pour l'attribution de la configuration de l'intermédiaire 179

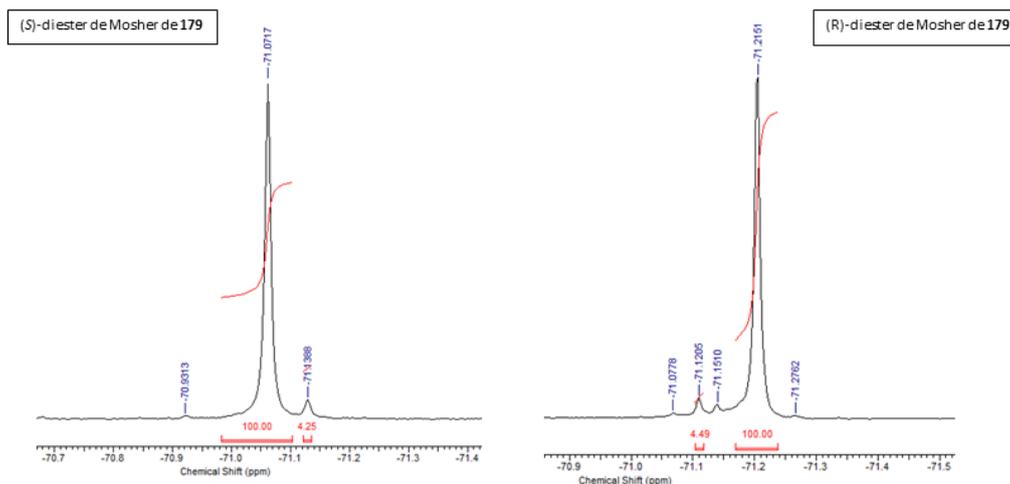


Figure 4 : Analyse des spectres ^{19}F du diester de Mosher (*S*) à gauche et (*R*) à droite pour la détermination de l'excès diastéréomérique de l'intermédiaire 179

Les étapes suivantes font intervenir des réactions de protection, déshydratation et déprotections sélectives de l'alcool secondaire puis de l'alcool primaire (Schéma 17). Bien qu'en apparence triviales, chacune de ces étapes a nécessité un effort d'optimisation, afin d'atteindre des réactions possédant des rendements corrects et reproductibles sur diverses échelles.

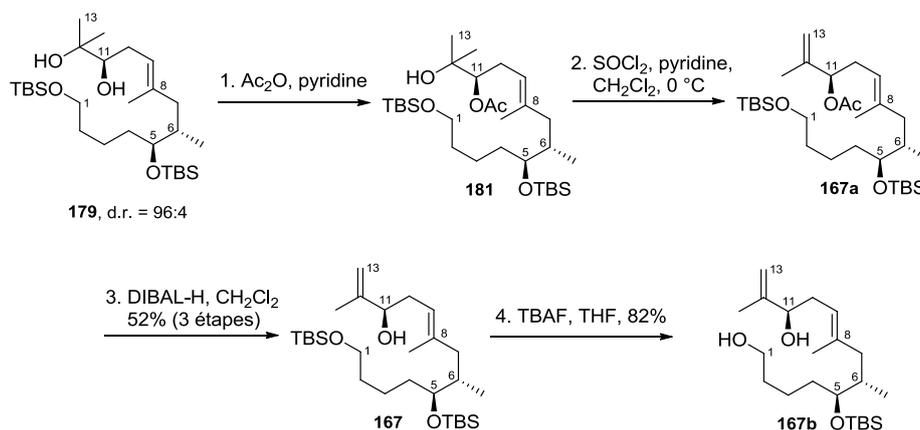


Schéma 17 : Synthèse de l'intermédiaire 167b par réactions successives de protection/élimination/déprotections

En effet, il est à souligner que des essais de protections de l'alcool secondaire en C11 par un groupement silylé de type triéthylsilyle (TES), dans l'optique d'une déprotection unique avec l'alcool primaire protégé sous la forme d'un éther de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBS), n'ont pas abouti au produit désiré **181a** (Schéma 18). En effet, la déprotection du groupement TES s'est avérée très délicate et sans possibilité d'une complète mono-silylation sélective. Par ailleurs, l'étape de déshydratation a également nécessité quelques optimisations avant de parvenir à une réaction reproductible. Initialement, cette étape faisait intervenir la méthode décrite par Yadav en 1989³⁸ avec l'utilisation de chlorure de mésyle en présence de DMAP et de triéthylamine dans le dichlorométhane. Néanmoins, bien que cette méthode ait été très utilisée pour la déshydratation d'alcool tertiaire dans la synthèse de produits naturels,³⁹ elle n'a conduit qu'à la formation de produits de dégradation et à une très mauvaise reproductibilité. De ce fait, une méthode plus classique utilisant le chlorure de thionyle et un large excès de pyridine⁴⁰ a été choisie. Cette dernière permet d'obtenir le produit désiré en un temps de réaction très court (15 minutes) et avec une bonne reproductibilité. De plus, la déprotection sélective de l'alcool secondaire s'est avérée plus adaptée avec l'utilisation de DIBAL-H en comparaison au carbonate de potassium dissous dans un mélange MeOH/THF/H₂O. Ces dernières conditions réactionnelles conduisaient à la formation ponctuelle de produits secondaires ainsi qu'à des temps de réaction très longs pouvant durer au-delà de 20 heures d'agitation suivant les quantités de produit engagés.

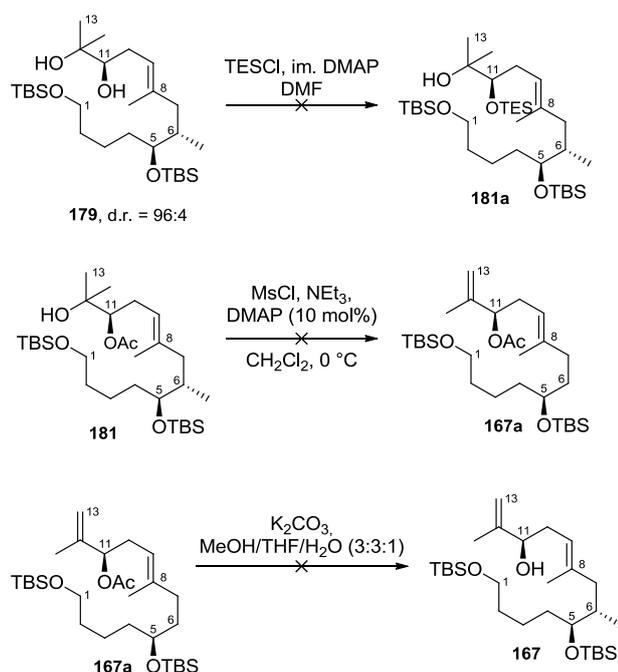


Schéma 18 : Essais non-productifs dans les réactions successives de protection/élimination/déprotections

Par la suite, le contrôle de la configuration du centre en C12 a été étudié en utilisant une réaction d'hydroboration sélective. L'objectif étant d'engager, en « *one-pot* », l'intermédiaire organoboré dans un couplage croisé de type Suzuki afin d'insérer la chaîne supérieure au fragment linéaire C1-C13. Cette dernière étape sera suivie de la fermeture du macrocycle afin d'obtenir le fragment C1-C20, comme envisagé pour la stratégie de cette deuxième approche (Schéma 19).

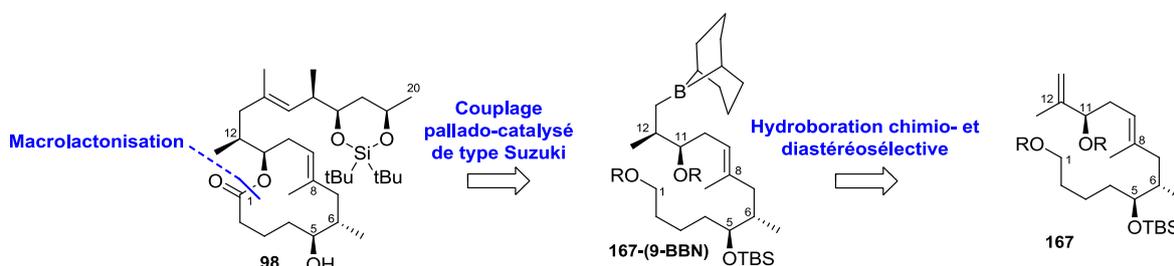


Schéma 19 : Rappel des étapes clés envisagées pour la synthèse du fragment macrocyclique 98

En effet, la réaction d'hydroboration, découverte en 1956 par Brown,⁴¹ permet à la fois de contrôler un centre asymétrique mais également de créer de nouvelles liaisons carbone-carbone. Cette réaction consiste en l'addition d'une liaison B-H sur une double ou une triple liaison C-C. Depuis cette découverte, de nombreuses améliorations ont été apportées à cette réaction : de nouvelles sources de boranes sont désormais accessibles, l'utilisation de métaux de transition permet de diminuer les températures de réaction ainsi que d'inverser la régiosélectivité, et de nouveaux ligands permettent de contrôler la stéréosélectivité.⁴² Actuellement de nombreux agents hydroborants sont disponibles (Figure 5) ; le choix de ces derniers dépend du type d'application souhaitée.⁴³ En termes d'exemples, les mono- et dialkyl- boranes (thexylborane, diisopinocampérylborane, ou encore catécholborane) sont généralement utilisés pour leur régiosélectivité et/ou stéréosélectivité, selon la taille et la chiralité de leurs substituants.

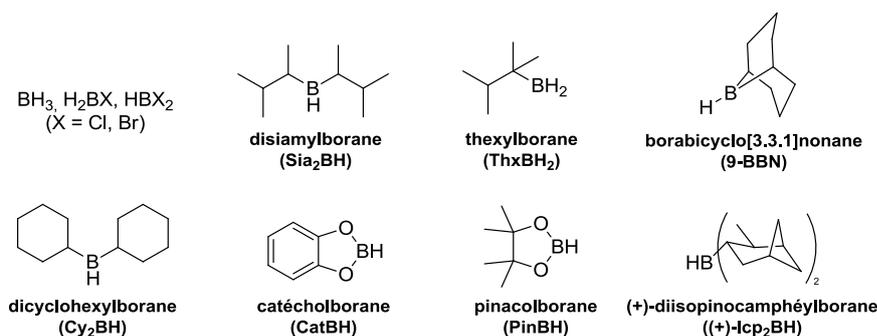


Figure 5 : Structures des différents agents d'hydroboration

Dans notre cas, l'hydroboration non métallo-catalysée apparaît plus qu'adéquate au regard des études théoriques, dont les précisions sont données ci-après. Pour cette réaction, le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane⁴⁴ (9-BBN), agent d'hydroboration couramment utilisé dans la littérature,⁴⁵ a été préféré. De tous les dialkylboranes, le 9-BBN constitue un cas un peu particulier. D'une part, il possède une structure plus elliptique que ses homologues pouvant expliquer une sensibilité moins prononcée quant à l'encombrement stérique des substituants du dérivé insaturé. Néanmoins, il est décrit que la vitesse de réaction avec cet agent d'hydroboration est beaucoup plus rapide vis-à-vis d'un alcène terminal qu'une oléfine interne, avec par exemple un facteur 100 entre l'hydroboration du 1-hexène et du *cis*-2-pentène.⁴⁶ D'autre part, la conformation tendue et rigide du bicyclic accentue le caractère électrophile de l'atome de bore du réactif 9-BBN, rendant ce dernier sensible aux influences électroniques.⁴⁷ Des études démontrent que la réaction d'hydroboration est facilitée lorsque l'alcène possède un groupement méthyle en position vinylique, comme le cas du substrat **167**. En effet, l'effet inductif donneur du méthyle augmente la densité électronique sur l'oléfine et par conséquent accentue sa nucléophilie.⁴⁸

La régiosélectivité de l'hydroboration résulte d'une combinaison de facteurs électroniques⁴⁹ et stériques des deux partenaires de réaction. Généralement, et sans ajout de catalyseur, l'atome de bore s'additionne sur le carbone le moins encombré, conduisant au produit anti-Markovnikov. En s'appuyant sur le mécanisme de la réaction, le procédé d'hydroboration est, de plus, stéréospécifique. Effectivement, les premières études sur cette réaction, menées par Brown,⁵⁰ proposent un schéma réactionnel dissociatif. Ce dernier fait intervenir un état de transition à quatre centres d'un borane trivalent, et dont la polarisation de la double liaison oriente l'addition de l'hydrure porté par l'atome de bore. Les groupes de Seyferth⁵¹ et Streitwieser⁵² s'appuient, quant à eux, sur des bases stéréochimiques et suggèrent plutôt un mécanisme associatif via un complexe π intermédiaire évoluant vers un état de transition à trois centres. Cette hypothèse sera confirmée par Pasto⁵³ à l'aide d'une étude cinétique des effets isotopiques hydrogène-deutérium et ¹⁰Bore-¹¹Bore, lors d'une réaction d'hydroboration d'oléfines par du diborane complexé. Par la suite, le développement des calculs orbitaux a permis à l'équipe de Nagase⁵⁴ d'étudier le mécanisme de l'addition du diborane sur l'éthylène par la méthode quantique *ab initio*. L'interprétation de leurs résultats a amené le groupe de recherche à approuver un processus d'hydroboration en deux étapes : une étape préliminaire sans barrière énergétique conduit à la formation d'un complexe π à trois centres qui évolue ensuite en produit d'hydroboration, par passage concerté vers un état de transition à quatre centres (Figure 6). De ce fait, le mécanisme d'addition, concerté et péricyclique, impose systématiquement une stéréosélectivité *syn*.

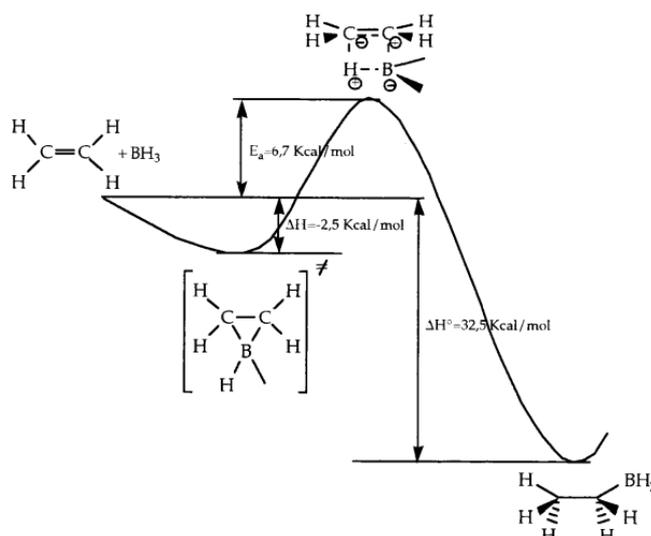


Figure 6 : Profil d'énergies de la réaction de l'éthylène avec BH_3 en champ auto-cohérent (SCF) de la base 6-31G**. ⁵⁴ Figure adaptée de la réf. 54 avec permission. Copyright 2017 – American Chemical Society

En considérant les études théoriques et les rotamères de la molécule **167**, représentés Schéma 20, la formation du composé *1,2-anti* désiré devrait être favorisée. En effet, le rotamère possédant les interactions 1,3-allyliques minimales devrait être engagé dans la réaction avec le borane qui arriverait alors sur la face la plus dégagée de l'alcène. ⁵⁵

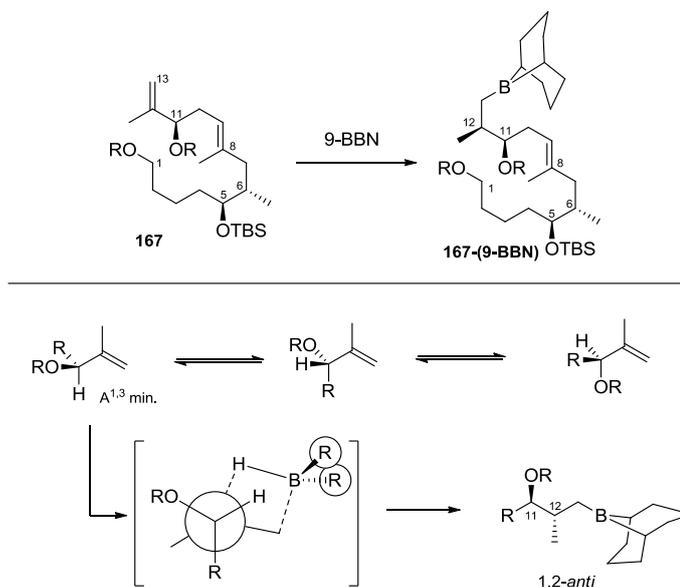


Schéma 20 : Etat de transition lors de la réaction d'hydroboration diastéréosélective contrôlée par les interactions 1,3-allyliques

De plus, l'application du modèle de Houk sur l'alcène acyclique 1,1-disubstitué **167** pour cette réaction d'hydroboration avec le 9-BBN, amènerait également à la formation préférentielle du composé *1,2-anti* (Schéma 21). ⁵⁶ Bien qu'en mettant cette fois-ci en jeu les interactions 1,2-allyliques, le même résultat que précédemment devrait être obtenu. En effet, afin de minimiser la gêne stérique entre les ligands de l'atome de bore et les substituants de l'alcène, la réaction d'hydroboration devrait conduire au produit désiré malgré la présence d'interactions 1,2-allyliques.

Dans la littérature, cette stéréoinduction a fait l'objet de différentes études,^{55a, 57} et a été appliquée dans plusieurs synthèses totales de produits naturels.⁵⁸

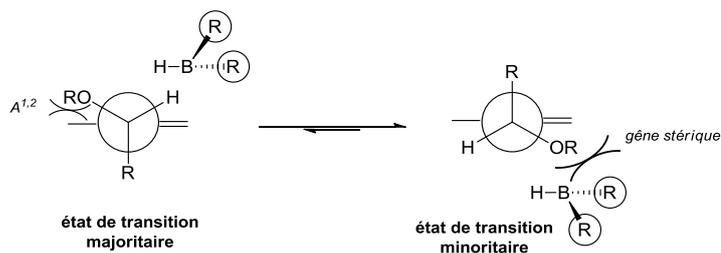
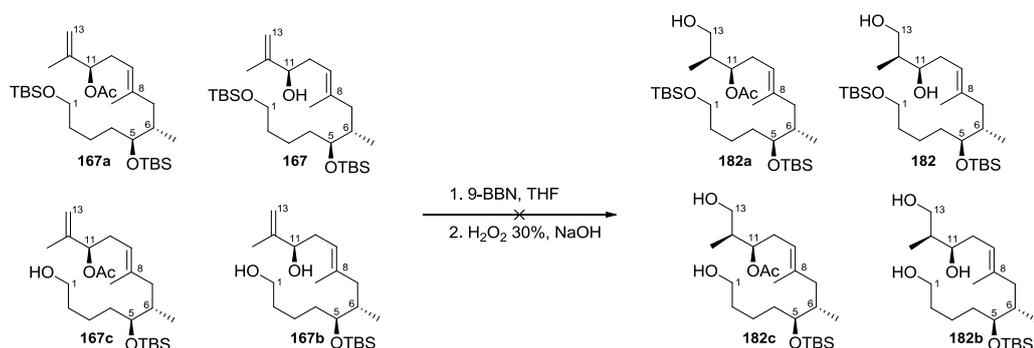


Schéma 21 : États de transition lors de la réaction d'hydroboration diastéréosélective contrôlée par les interactions 1,2-allyliques

Pourtant, l'hydroboration de **167** reste un défi en raison des nombreuses études rapportant la difficulté de différenciation des deux faces énantiotopiques sur un alcène prochiral 1,1-disubstitué.⁵⁹ Cependant, dans notre cas, le centre stéréogène en position allylique devrait être suffisant pour induire une stéréosélectivité satisfaisante.^{55a,60} Toutefois, avant d'effectuer la réaction cruciale de couplage croisé avec la chaîne supérieure, l'étape d'hydroboration a été étudiée en premier lieu. En effet, cette dernière fixant la configuration du centre stéréogène en C12, il était important de déterminer la diastéréosélectivité de la réaction, mais également de définir l'ensemble des groupes protecteurs de **167** permettant cette transformation. La présence d'alcools libres ou protégés est tolérée lors de la réaction d'hydroboration. Elle a par ailleurs été rapportée comme permettant de diriger la réaction d'hydroboration pour rationaliser des transformations régio- et stéréosélectives.⁶¹ En effet, si l'on se réfère à la définition d'une réaction dirigée décrite par Hoveyda, Evans et Fu,⁶² à savoir comme étant « la pré-association des partenaires réactifs, soit par liaison hydrogène, covalente, soit par interaction acide/base de Lewis, suivie du maintien de cette interaction pendant la transformation chimique qui en résulte », il est irrévocable que l'incorporation d'atomes d'oxygène dans un substrat affecte la réactivité ou la sélectivité d'une transformation par une certaine forme de direction de l'atome d'oxygène. Ce changement pouvant être dû à l'environnement stérique de l'atome d'oxygène ou à un effet de polarisation inductif ou de résonance que l'oxygène pourrait imposer au substrat. Néanmoins, les différentes études basées sur une réaction d'hydroboration dirigée ne permettent pas de déterminer avec un mécanisme réactionnel comment l'atome d'oxygène peut affecter la régio- et/ou le contrôle stéréospécifique de la transformation, sachant que le borane seul est impliqué dans ces effets, au regard des états de transition et des mécanismes décrits.

Par conséquent, les différents composés **167** (totalement et partiellement protégés, voir Schéma 17) ont été engagés dans la réaction d'hydroboration avec une solution commerciale de 9-BBN à 0,5 M dans le THF afin de déterminer leur réactivité. Le composé **167c** a également été synthétisé par simple déprotection sélective de l'alcool primaire de **167** en vue d'étudier sa réactivité. Il est à noter que les trialkylboranes formés par l'hydroboration de Brown ne peuvent être isolés car ils sont très sensibles à l'hydrolyse. L'organoborane obtenu lors de la réaction d'hydroboration étant instable, l'excès diastéréomérique est déterminé sur l'alcool formé par une réaction d'oxydation à l'aide d'eau oxygénée et de soude. Plusieurs essais impliquant différents nombres d'équivalents de réactif sur des temps de réaction plus ou moins longs et avec un chauffage thermique s'élevant jusqu'à 50 °C ont été réalisés (Schéma 22). Cependant, aucune de ces conditions réactionnelles n'a permis d'obtenir l'alcool désiré **182a-c**. Au contraire, la présence du produit de

départ en mélange avec des sous-produits de dégradation a été observée, indiquant une absence de réactivité significative de ces intermédiaires.



Variation de la quantité de 9-BBN : de 1 équiv. à 3 équiv.
Variation du temps de la réaction : de 1 heure à 1 jour
Variation de la température de la réaction : de 25 °C à 50 °C

Schéma 22 : Essais d'hydroboration/oxydation sur différents intermédiaires de synthèse

Au vu de ces résultats décevants, une nouvelle approche a dû être développée avec pour objectif d'augmenter la réactivité de l'alcène 1,1-disubstitué. Il a été considéré que l'undocénolide possédant le motif isopropényle représenterait un substrat plus réactif pour cette réaction d'hydroboration diastéréosélective. En effet, cette forme macrocyclique permettrait de réduire le nombre possible de conformères de plus basse énergie, et donc d'avoir une sélectivité plus grande que sur le système acyclique.⁶³ Cette troisième approche est décrite dans le sous-chapitre suivant.

3.2.3. Troisième approche de la synthèse de la mycolactone A/B

L'analyse rétrosynthétique de cette nouvelle approche implique alors la fermeture du cycle à 12 chaînons par une réaction de macrolactonisation du composé **184**, avant la réalisation des étapes d'hydroboration diastéréosélective et de couplage croisé de type Suzuki (Schéma 23). Les étapes précédant ces réactions clés restent inchangées, tout comme la perspective d'une estérification finale entre la chaîne inférieure et le fragment macrolactonique C1-C20 **98**.

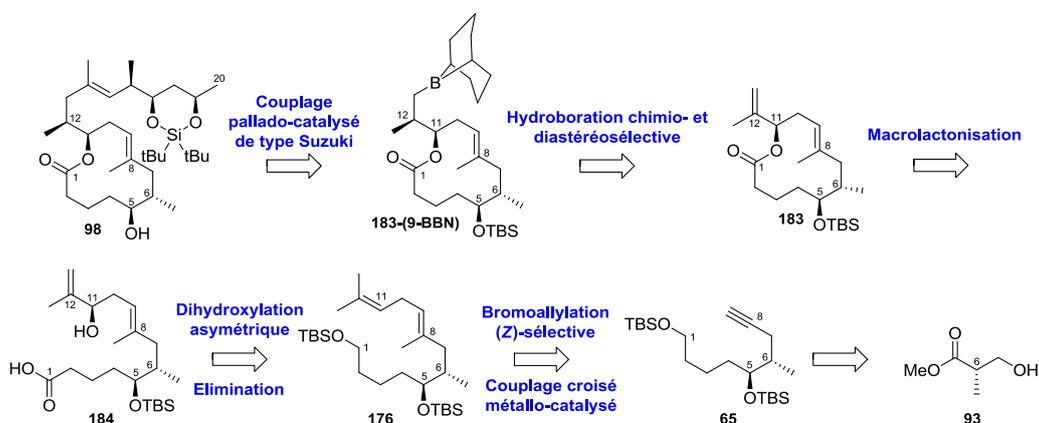


Schéma 23 : Analyse rétrosynthétique de la troisième approche pour la préparation du fragment macrocyclique C1-C20

3.2.3.1. Préparation du fragment linéaire C1-C13

La formation de la macrolactone **183** a été réalisée suivant les étapes décrites sur le Schéma 24. L'intermédiaire **167b**, précédemment synthétisé, est engagé dans une séquence de deux oxydations afin de transformer sélectivement la fonction alcool primaire en aldéhyde⁶⁴ puis en acide carboxylique correspondant,⁶⁵ conduisant ainsi au séco-acide **184** avec un rendement de 77%. En se basant sur les synthèses de la mycolactone A/B développées antérieurement,⁶⁶ la fermeture du cycle a été accomplie avec un bon rendement par l'utilisation des conditions réactionnelles de Yamaguchi.⁶⁷

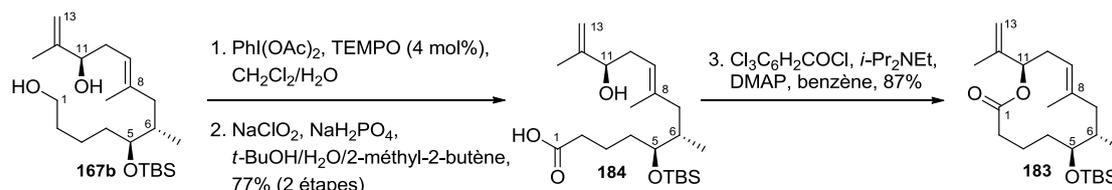
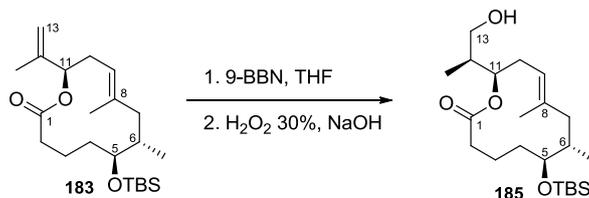


Schéma 24 : Synthèse de l'intermédiaire **183** par réactions d'oxydations et de macrolactonisation

Considérant les résultats peu concluants obtenus précédemment avec la forme ouverte de l'intermédiaire de synthèse **167a-c** (voir Schéma 22), la macrolactone **183** a ensuite été soumise, sur petite échelle (13 μmol , soit 5 mg), à différents essais d'hydroboration/oxydation en utilisant plusieurs conditions réactionnelles. Ces dernières impliquent des variations de températures et de temps de réaction, comme précisées dans le Tableau 2. Plusieurs informations se détachent de ces tentatives. La première demeure être la relative réactivité de l'undocénolide **183** au regard de la réaction d'hydroboration. En effet, la présence de produit désiré a été détectée dans différents essais (entrées 2, 3, 4, 5 du Tableau 2). Toutefois, la formation de **185** semble s'accompagner de sous-produits dans la plupart des cas. De plus, la réaction d'hydroboration apparaît peu reproductible au vu des entrées 4 et 5 : le recours aux strictes conditions réactionnelles dans un cas et dans l'autre conduit à deux résultats très différents. Par ailleurs, la concentration du milieu réactionnel semble également jouer un rôle dans cette réaction. L'entrée 6 du tableau suggère la nécessité d'un ajout de solvant pour le bon déroulement de la réaction. En effet, l'utilisation de la solution commerciale de 9-BBN, à 0,5 M dans le THF, en tant que réactif et solvant amène à un mélange complexe de produits de dégradation non-identifiés.



Entrée	9-BBN 0,5 M (équiv.)	THF (mL)	Température	Temps de réaction	Observations après traitement oxydant (RMN)
1	1,5	1	35 °C	3 heures	aucune conversion
2	3	1	25 °C	5,5 heures	≈10% de 185
3	3	1	25 °C	15 heures	≈50% de 185 et sous-produits
4	3	1	50 °C	15 heures	conversion totale et sous-produits
5	3	1	50 °C	15 heures	≈40% de 185 et sous-produits
6	3	0	50 °C	15 heures	dégradation

Tableau 2 : Essais d'hydroboration/oxydation sur l'intermédiaire **183**

Devant ces résultats non-concluants, plusieurs optimisations ont été envisagées. Premièrement, l'apparition de divers sous-produits en fin de réaction a été attribuée à la trop forte basicité du peroxyde alcalin lors de l'étape d'oxydation de l'organoborane. Par conséquent, la méthode développée par Kabalka en 1989, utilisant le perborate de sodium comme oxydant doux,⁶⁸ semble plus appropriée pour oxyder l'organoborane en son alcool correspondant, évitant par la même occasion toute ouverture potentielle de la macrolactone. Cette méthode est également utilisée au cours des étapes précédentes, plus précisément dans la réaction d'allylboration asymétrique de Brown pour la transformation de l'aldéhyde **143** en l'alcool homoallylique correspondant (voir Schéma 2).

Par ailleurs, les problèmes de reproductibilité observés lors des différents essais (entrées 4 et 5, Tableau 2) ont été associés à la rapidité de dégradation de la solution commerciale de 9-BBN après son ouverture. De ce fait, la forme solide, plus stable et également commerciale, du dimère de 9-borabicyclo[3.3.1]nonane sera préférée pour la suite des études.⁶⁹ En effet, pour la première fois isolé et caractérisé dans les années 60 par Köster,⁷⁰ ce réactif, dont la dissociation s'effectue après sa solubilisation dans le solvant de réaction, est aujourd'hui très répandu dans la littérature.⁷¹

Dans l'optique d'augmenter la vitesse de réaction, l'utilisation d'ultrasons, reconnue par Brown dès 1985 comme jouant un rôle majeur dans l'accélération de la réaction d'hydroboration,⁷² sera également exploitée. Les effets des ultrasons sont directement liés au phénomène de cavitation qui correspond à la formation, à la croissance et à l'implosion de microbulles de gaz dans les liquides. Plus précisément, il est décrit qu'à une certaine fréquence, la propagation des ultrasons dans un liquide est accompagnée de la formation de bulles de cavitation.⁷³ La brusque implosion de ces bulles de gaz de quelques micromètres de diamètre est accompagnée d'effets locaux très intenses, mécaniques et chimiques, à la base de l'ensemble des applications des ultrasons en chimie. L'effondrement des microbulles libère d'importantes quantités d'énergie sous forme d'une intense

chaleur locale, de très haute pression, ou encore d'ondes de choc. Il est à préciser que la reproductibilité des expériences conduites sous ultrasons et décrites dans la littérature est relativement difficile du fait de la différence de matériel et des divers paramètres pouvant modifier l'effet des ultrasons. A titre d'exemples, les groupes de Baldwin et de Shibasaki, qui rapportent tous deux l'utilisation d'ultrasons pour la réaction d'hydroboration d'un intermédiaire de la synthèse des épothilones A et B, ne précisent pas le type d'appareillage employé.⁷⁴ Pour nos essais, le simple bac à ultrasons présent au laboratoire, dont les fréquences générées sont comprises entre 20 et 60 kHz, a été utilisé.

Toutes ces optimisations ont été appliquées pour la séquence d'hydroboration/oxydation sur le substrat **183** (Schéma 25). A notre satisfaction, la combinaison des améliorations apportées sur les conditions réactionnelles a permis l'obtention de la macrolactone hydroxylée **185** avec un rendement de 60% sur les deux étapes. Il est à préciser que la quantité de dimère de 9-borabicyclo[3.3.1]nonane a été fixée à deux équivalents, amenant ainsi à une conversion complète du produit de départ. Notons enfin que deux heures de réaction dans un bain à ultrasons reviennent à faire évoluer la température de 25 à 45 °C au sein du milieu réactionnel.⁷⁵

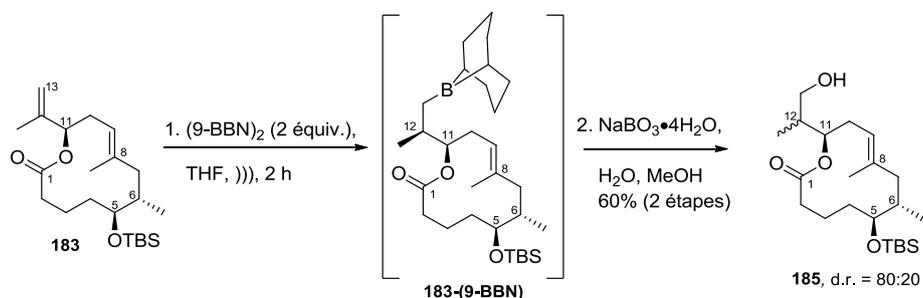


Schéma 25 : Synthèse de l'intermédiaire **185** par réactions d'hydroboration/oxydation

Bien que ces conditions aient été optimisées, permettant notamment la formation du produit désiré sans présence notable de dégradation ou même de réaction de double-hydroboration, la diastéréosélectivité obtenue ne s'élève qu'à un rapport de 80:20 en faveur du diastéréoisomère désiré.⁷⁶ La diastéréosélectivité de la réaction a été déterminée par analyse RMN ¹H et expérience nOe du mélange de diastéréoisomères non-séparés, puis confirmée par une analyse conformationnelle via une modélisation moléculaire de **185**. Ces études ont été réalisées par le Dr. Didier Le Nouën de l'université de Haute-Alsace (laboratoire de Chimie Organique et Bio-organique COB). L'analyse de la structure électronique de **185** par la méthode de densité fonctionnelle (DFT) a permis de modéliser la conformation du macrocycle hydroxylé. Par ailleurs, cette analyse a également permis de déterminer l'angle de torsion présent dans la conformation de plus basse énergie de **185**, et ainsi de calculer théoriquement la constante de couplage (*J*) entre les deux protons en H11 et H12 (Schéma 26). Par analogie avec les constantes de couplages expérimentales de la RMN ¹H de ces mêmes protons, dont les déplacements chimiques pour le massif H11 diffèrent pour chaque isomère, il a été prouvé que le produit 1,2-*anti* était majoritairement formé (Figure 7 et Figure 8). En effet, ce dernier possède une constante de couplage bien plus grande que le stéréoisomère minoritaire 1,2-*syn*.

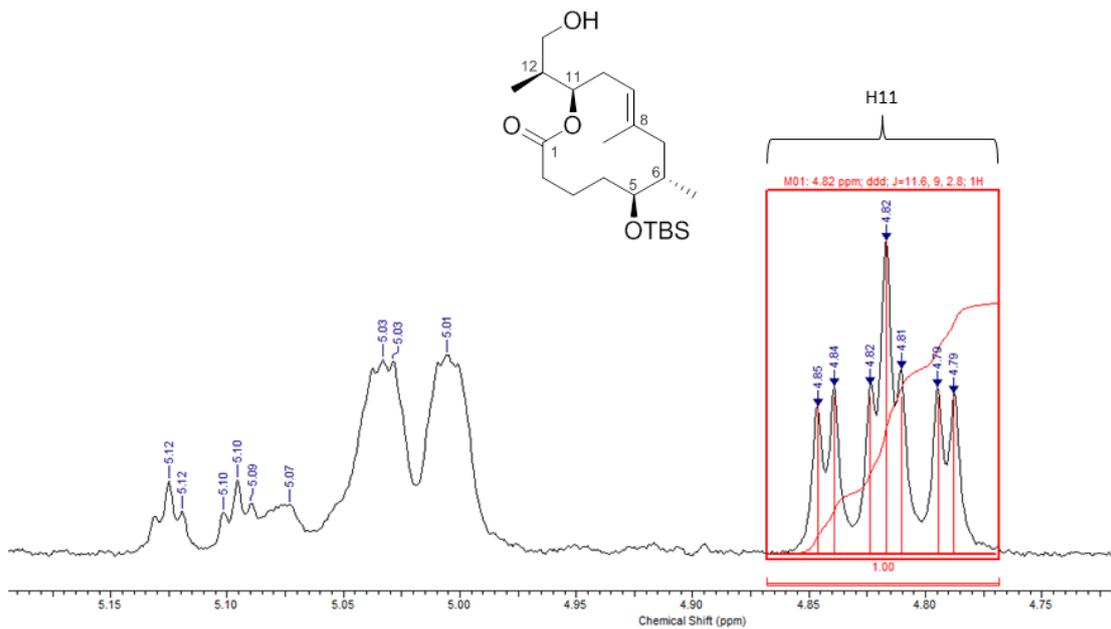


Figure 7 : Détermination expérimentale de la constante de couplage entre H11 et H12 de 185-*anti*

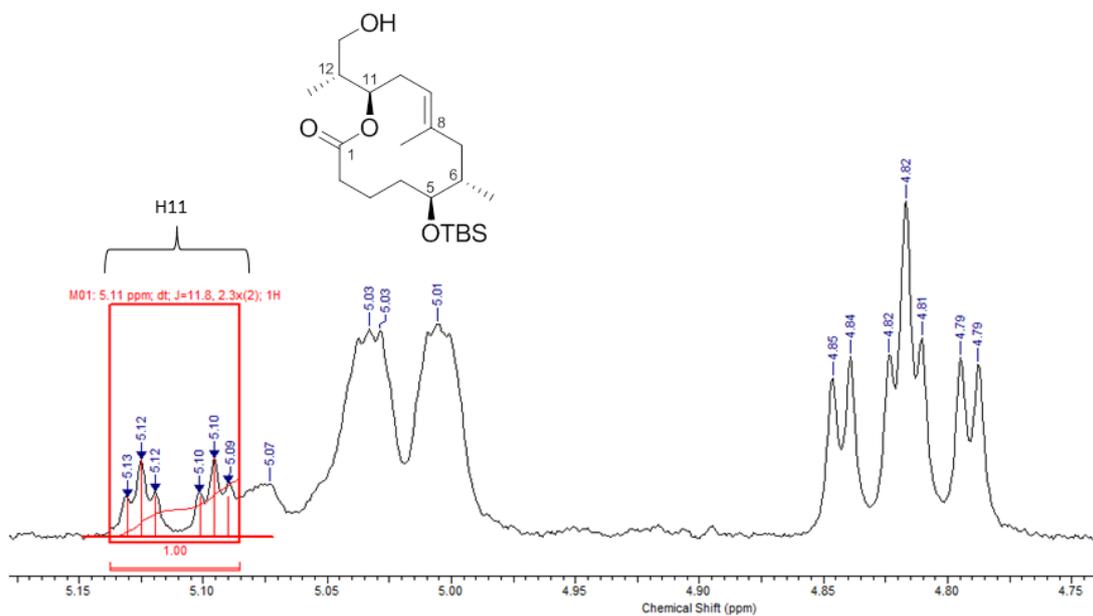


Figure 8 : Détermination expérimentale de la constante de couplage entre H11 et H12 de 185-*syn*

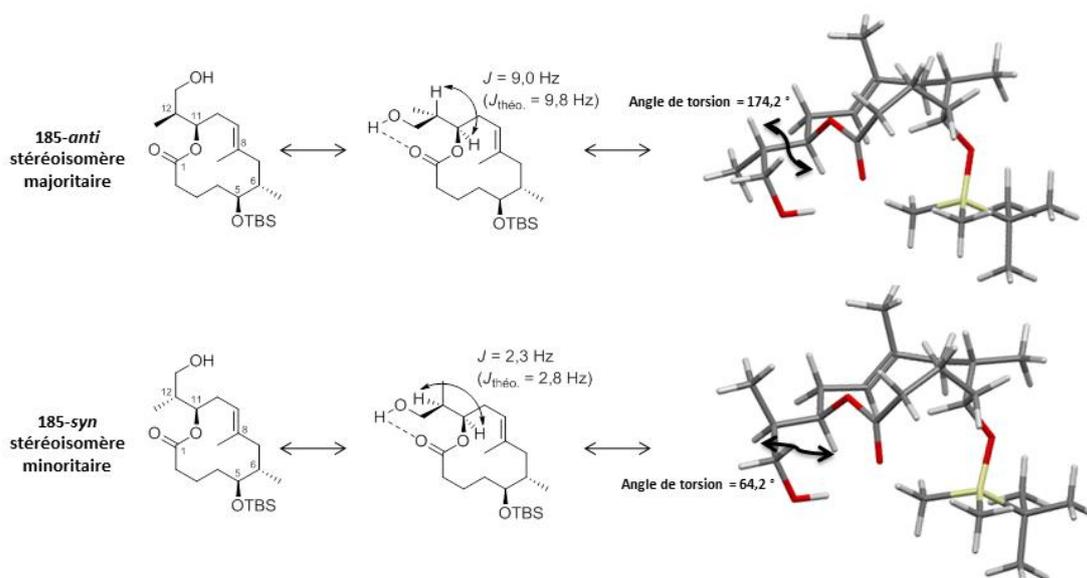


Schéma 26 : Analyse conformationnelle de l'intermédiaire **185** par théorie de la densité fonctionnelle (DFT) avec la fonctionnelle d'échange *RSH-GGA/ ω B97X-D* et la base 6-31G*.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer la diastéréosélectivité modeste obtenue. Dans l'optique d'apporter un complément d'information quant à la diastéréosélectivité de cette réaction d'hydroboration, plusieurs tentatives de cristallisation de l'intermédiaire **183** ont été réalisées. Pour cela, des estérifications entre l'alcool en C5 avec l'acide carboxylique de ferrocène ou encore avec l'acide *para*-nitrobenzoïque ont été effectuées (Figure 9). Cependant aucune des structures **186** et **187** n'ont abouti à une forme cristalline permettant leur diffraction aux rayons X. Or, la conformation exacte du macrocycle **183** serait un atout majeur dans la compréhension de la diastéréosélectivité obtenue pour la réaction d'hydroboration.

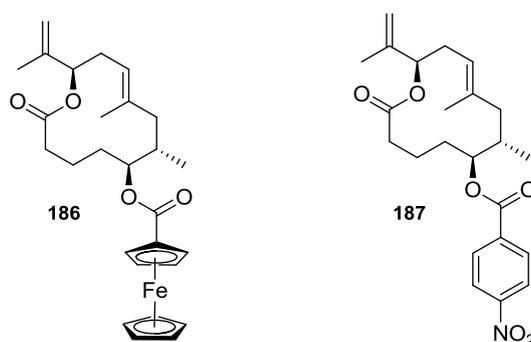


Figure 9 : Structures des composés synthétisés pour les essais de diffraction aux rayons X

Bien que ces tentatives de cristallisation se soient révélées infructueuses, il est concevable de se baser sur la conformation obtenue pour l'intermédiaire **185** (voir Schéma 26) afin d'avancer des hypothèses quant à la stéréosélectivité de la réaction d'hydroboration. En effet, la conformation de plus basse énergie obtenue lors des minimisations moléculaires de **185** suggère une dissemblance entre les deux faces de la molécule : la face supérieure semble être la plus dégagée (Figure 10). Ainsi, la formation du composé 1,2-*anti*, obtenu par l'arrivée du borane sur la face supérieure, est bien favorisée.

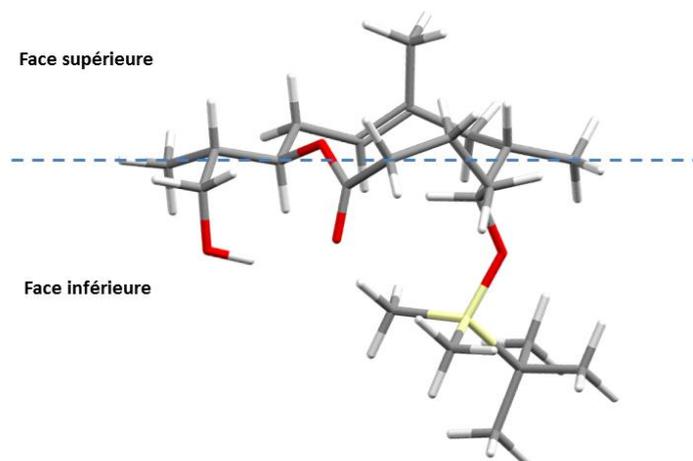


Figure 10 : Conformation du stéréoisomère majoritaire 185-*anti* et différenciation des deux faces de la molécule

Par ailleurs, les études théoriques rapportées dans la littérature nous permettent également d'apporter des explications quant à la modeste diastéréosélectivité obtenue. Premièrement, d'après les travaux de Rauk,⁷⁷ le borane ne peut pas former de complexe avec la fonction ester de la macrolactone, et n'est donc pas dirigé par cette fonction. En effet, il a été démontré qu'un groupement acétoxy formerait un complexe avec le bore beaucoup plus faible qu'avec un éther cyclique, or le solvant de la réaction se trouve être le tétrahydrofurane.

La diastéréosélectivité pourrait alors s'expliquer par des effets électroniques ou conformationnels de la structure macrocyclique. En effet, il est connu que la présence d'un atome d'oxygène, voisin d'une double-liaison carbone-carbone dans un système rigide, peut stabiliser un état de transition soit électrostatiquement soit par interaction d'une orbitale de la paire d'électrons célibataires de l'atome d'oxygène avec l'orbitale π de l'alcène. Ces types de stabilisations permettent, entre autres, d'accélérer la réaction.⁷⁸ Dans les systèmes homoallyliques, cette stabilisation s'effectue par une conformation *anti* du groupement possédant l'alcool avec la liaison B-C partiellement formée (Figure 11). Au contraire, dans les systèmes allyliques, la position *anti* du groupement oxygéné défavorise l'état de transition par abaissement de la densité électronique sur la double-liaison à cause du recouvrement orbitalaire de l'orbitale σ^*C-O avec la π de l'alcène.⁵⁶

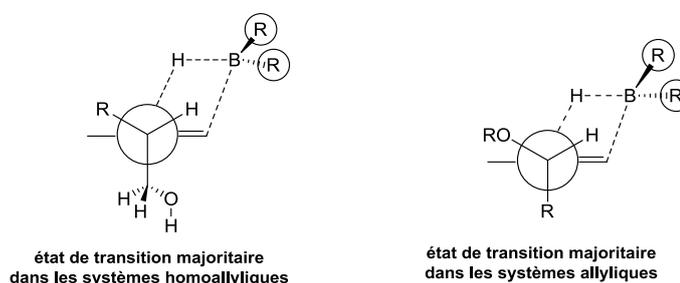


Figure 11 : Etats de transition majoritaires pour des systèmes homoallyliques (à gauche) et allyliques (à droite) dans la réaction d'hydroboration

La diastéréosélectivité observée dans notre cas, avec un groupement oxygéné en position allylique à la double liaison et dont la configuration est figée en position coplanaire par la fermeture de cycle (voir Schéma 20 et Schéma 21), devrait être supérieure au rapport 8:2 obtenu d'un point de vue théorique car l'état de transition se trouve être stabilisé. Néanmoins, très peu d'études

rapportent les effets électroniques d'un ester cyclique voisin à l'oléfine, par lequel la modeste stéréoinduction pourrait être expliquée. Par ailleurs, l'hydroboration d'un alcène en dehors d'un cycle à plusieurs chaînons est également peu documentée. L'étude réalisée par Evans et ses collaborateurs en 1988,⁷⁹ indique toutefois un niveau très bas de contrôle stéréochimique sur un cycloalcène exocyclique présentant un groupement oxygéné en position allylique avec un rapport d'isomères de 61:39. Ainsi la diastéréosélectivité modeste pourrait s'expliquer par l'association d'effets, tel que l'état de transition favorisé sur l'intermédiaire **183** mais dont la structure cycloalcényle diminue la stéréoinduction importante attendue. D'autre part, l'étude de la réaction d'hydroboration sur diverses oléfines rapportée par Still en 1983 révèle la difficulté d'une diastéréosélection notable sur notre système.^{55a} En effet, en étudiant l'effet du groupement protecteur porté par un alcool en position allylique, Still démontre que seule la protection de l'alcool par un groupement -COCF₃ permettrait d'atteindre un ratio diastéromérique élevé pouvant atteindre 14:1. Au contraire, la protection avec un acétate ou encore un groupement silylé de type *tert*-butyldiméthylsilyle conduit à un ratio de 7,5:1 et 9:1 respectivement. Par conséquent, on peut noter que la diastéréosélectivité obtenue dans notre cas reste raisonnable et est en cohérence avec ce qui est décrit dans la littérature.

Malgré une diastéréosélectivité modeste sur l'étape d'hydroboration, ces conditions ont été retenues pour l'étape déterminante de couplage croisé avec la chaîne supérieure. La synthèse de cette dernière est décrite dans le sous-paragraphe suivant.

3.2.3.2. Préparation du fragment C14-C20

La procédure utilisée au laboratoire pour la synthèse de la chaîne supérieure suit celle décrite par Kishi pour sa deuxième approche de la synthèse totale de la mycolactone A/B (Schéma 27).¹² Néanmoins, il a été décidé d'utiliser la chaîne supérieure protégée par un silane cyclique, comme dans la synthèse décrite par Altmann.¹¹ En effet, le groupe d'Altmann rapporte que leurs tentatives de couplage croisé avec la chaîne supérieure protégée par des TBS, dans les conditions de Suzuki modifiées, se sont avérées infructueuses pour la formation de **98a** (Schéma 28). La raison invoquée étant des considérations stériques : les groupements *tert*-butyldiméthylsilyles gêneraient l'accès à l'iodure vinylique. De plus, le choix du silane cyclique en tant que groupement protecteur du 1,3-diol permet d'avoir une certaine orthogonalité de déprotection. Cette synthèse ayant déjà été décrite dans les chapitres précédents, une brève description des étapes réalisées au cours de cette thèse est présentée ci-après.

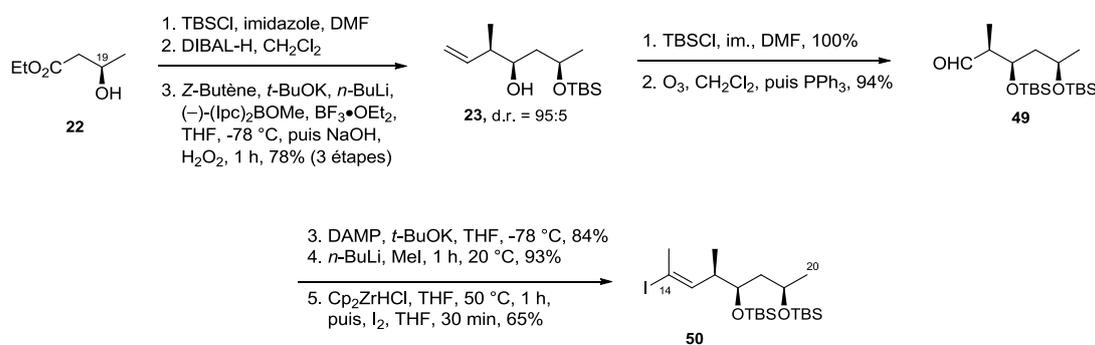


Schéma 27 : Rappel des étapes pour synthèse de la chaîne supérieure 50 par Kishi (2007)

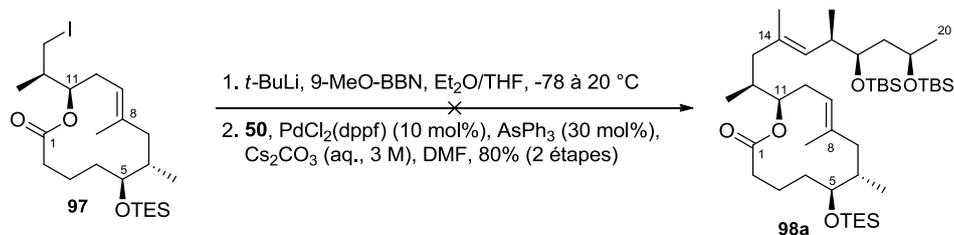


Schéma 28 : Essai non-productif de couplage croisé entre le fragment macrocyclique 97 et la chaîne supérieure 50 par Altmann (2011)

La préparation du fragment C14-C20 débute avec l'intermédiaire **49**, préparé en quantité suffisante par le Dr. Hajer Abdelkafi (chercheur post-doctoral au sein de l'équipe entre fin 2015 et mi-2017) pour des expériences antérieures (Schéma 29). L'aldéhyde est soumis à une réaction de type Corey-Fuchs⁸⁰ permettant ainsi sa transformation en dibromo-oléfine avant conversion en l'alcyne terminal correspondant suivi de sa méthylation. Une séquence d'hydrozirconation/iodolyse⁸¹ amène à l'intermédiaire **50** de Kishi. Le rendement relativement faible obtenu lors de cette étape s'explique par l'utilisation d'un réactif commercial de Schwartz dont la qualité a pu être altérée.⁸² Pour finir, un échange de groupement protecteur permet la formation de manière quantitative de la chaîne supérieure **99**.

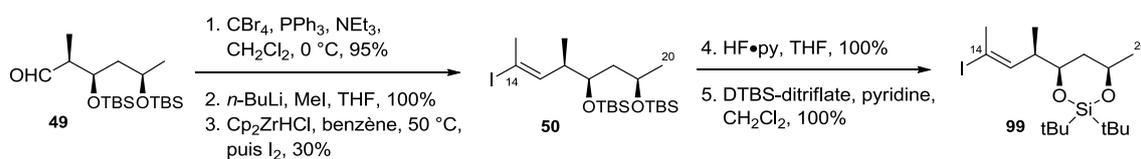


Schéma 29 : Synthèse du fragment C14-C20

3.2.3.3. Préparation du fragment C1-C20

Ayant en possession les deux intermédiaires destinés à la formation du fragment C1-C20, la réaction de couplage croisé de type Suzuki a été examinée. Ce couplage a été largement exploité depuis la fin des années 1970 pour la synthèse de produits naturels.⁸³ Dans les nombreux systèmes réactionnels décrits, les complexes à base de palladium sont les plus fréquemment employés et l'entité basique, nécessaire pour générer l'espèce nucléophile, est généralement un hydroxyde ou un alcoolate respectivement en solution aqueuse ou alcoolique.⁸⁴ Conscient du rôle essentiel de la base dans cette réaction,⁸⁵ plusieurs d'entre-elles ont été testées au cours de la phase d'exploration, à savoir le carbonate de césium, l'hydroxyde de sodium ou encore l'éthanolate de thallium,⁸⁶ et le méthanolate de sodium.⁸⁷ Toutefois, les conditions classiques mettant en jeu le carbonate de césium dans un mélange DMF/H₂O (5:1) avec pour catalyseur et ligand le Pd(dppf)Cl₂ et la triphénylarsine, utilisées notamment par Paterson pour la synthèse totale de l'ester de méthyle de la spirastrellolide A⁸⁸ ou Danishefsky au cours de sa synthèse de la désoxyépothilone F,⁸⁹ ont permis l'obtention du fragment C1-C20 **188** avec un rendement raisonnable pour une étape clé (Schéma 30). La détermination de l'excès diastéréomérique a été réalisée par l'analyse RMN ¹H du mélange : le rapport de l'intégration correspondant aux massifs H11 de chaque isomère amène sensiblement au rapport déterminé au cours des essais de réaction d'hydroboration suivi de l'oxydation, soit un mélange de 80:20 (Figure 12).

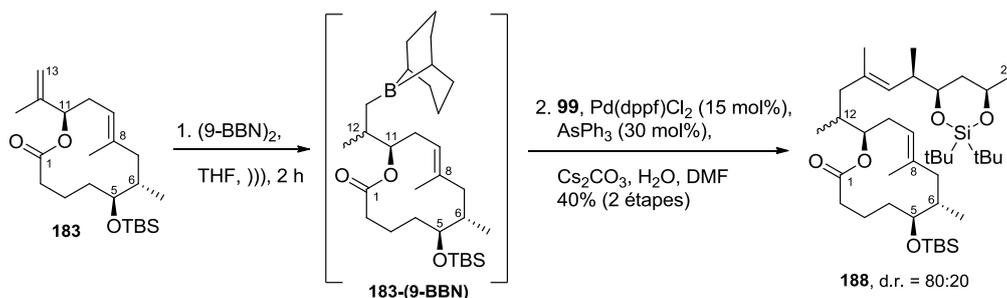


Schéma 30 : Synthèse de l'intermédiaire 188 par réactions en « one-pot » d'hydroboration et de couplage croisé de type Suzuki

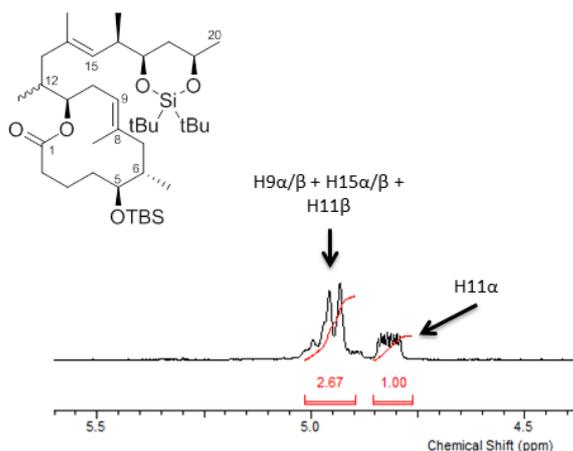


Figure 12 : Analyse RMN ^1H pour la détermination du rapport diastéréomérique de l'intermédiaire 188

Afin d'estérifier le fragment macrolactonique avec la chaîne inférieure, la déprotection sélective de l'alcool en C5 a été examinée. Il est à noter que cette déprotection a nécessité un effort d'optimisation avant de découvrir les conditions réactionnelles nécessaires pour ce clivage. Pour exemple, le groupe de Negishi, dont le macrocycle C1-C20 possède également un groupement -OTBS en C5, décrit un clivage global des trois éthers silylés du fragment avant la re-protection du 1,3-diol de la chaîne supérieure (Schéma 31, éq. 1).¹³ Par ailleurs, Burkart rapporte aussi des difficultés de déprotection du OTBS en C5 au cours de sa synthèse formelle de la mycolactone A/B (Schéma 31, éq. 2),⁹⁰ le conduisant à changer de stratégie et à remplacer le substituant TBS en C5 par un groupement de type PMB.⁹¹

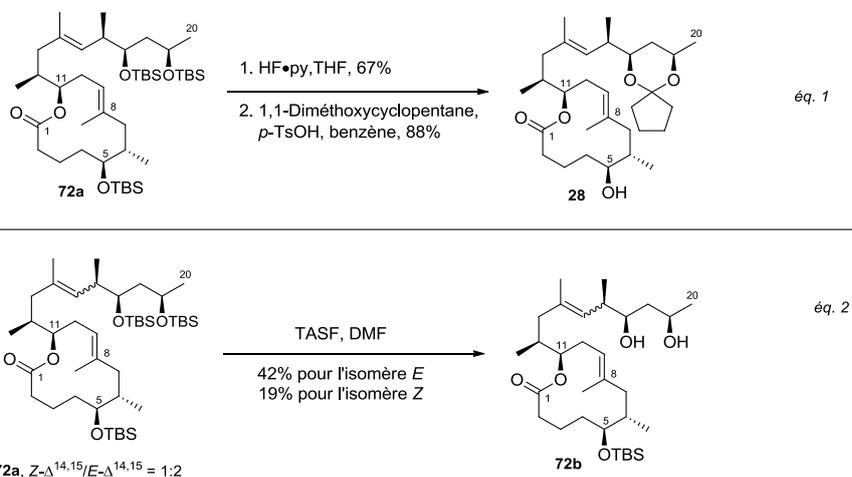


Schéma 31 : Déprotections du fragment macrolactonique C1-C20 72a par Negishi (2011, éq. 1) et Burkart (2006, éq. 2)

Toutefois, il a été découvert, au cours des différents essais de déprotection, que la combinaison de l'acide acétique avec une résine sulfonique commerciale de type Dowex® 50WX8-400 (forme hydrogène) au reflux du THF autorisait le clivage sélectif de l'éther en C5 (Schéma 32). Ainsi, ces conditions réactionnelles nous ont permis d'intercepter l'intermédiaire de synthèse **98** décrit par l'équipe d'Altmann.¹¹

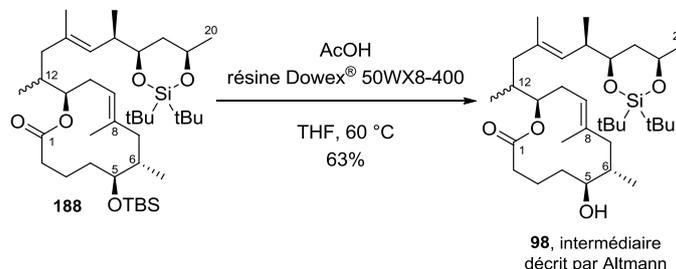


Schéma 32 : Synthèse de l'intermédiaire **98** par déprotection sélective de l'alcool C5

Il est à préciser que plusieurs tentatives de séparation des diastéréoisomères sur l'intermédiaire **98** ont été réalisées. Néanmoins, ne possédant pas au sein du laboratoire l'appareillage adéquat permettant une séparation efficace des isomères, il a été décidé de continuer la synthèse avec le mélange 4:1 sur la position C12.

Avant de présenter l'assemblage final pour l'obtention de la mycolactone A/B, la synthèse de la chaîne inférieure, préparée au cours de cette thèse, est décrite dans le sous-paragraphe suivant.

3.2.3.4. Préparation du fragment C1'-C16'

La synthèse du fragment C1'-C16' a également été réalisée à l'aide d'intermédiaires présents en quantité suffisante au sein du laboratoire. L'intermédiaire **35**, synthétisé au cours de sa thèse par le Dr. Cédric Tresse alors doctorant (2011-2014), est dans un premier temps réduit par l'action de DIBAL-H avant d'être converti en aldéhyde (Schéma 33). Il est à préciser que les étapes suivantes ont fait l'objet d'une optimisation par rapport à la synthèse précédemment développée dans le laboratoire (voir sous-chapitre 2.2.2.1.) permettant une augmentation significative du rendement de l'étape clé de couplage croisé de type Stille. En se basant sur les travaux de Fürstner,⁹² l'homologation à un carbone de l'aldéhyde avec le chlorure de chrome(II) et l'iodoforme amène à la formation d'un iodure vinylique. Ce dernier est ensuite transformé en diénylstannane-(*E,E*) **154** par l'action du *n*-butyllithium suivi du piégeage par le chlorure de tributylétain. Le couplage croisé de **154** avec l'intermédiaire **150**, préparé par Edwidge Picazo alors stagiaire travaillant avec le Dr. Cédric Tresse, a été effectué par l'association du tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) en quantité catalytique avec le CuTC et le diphénylphosphinate de tétrabutylammonium, permettant ainsi d'augmenter le rendement de couplage de 48 à 89%. En effet, cette co-catalyse, notamment décrite par Farina et Liebeskind en 1994 et reprise par Fürstner,^{93,92} a pour conséquence d'augmenter la vitesse de réaction de l'étape cinétiquement déterminante, à savoir la transméallation. La saponification, suivie de l'isomérisation du système pentaénique, conduit finalement à l'acide carboxylique **40**.

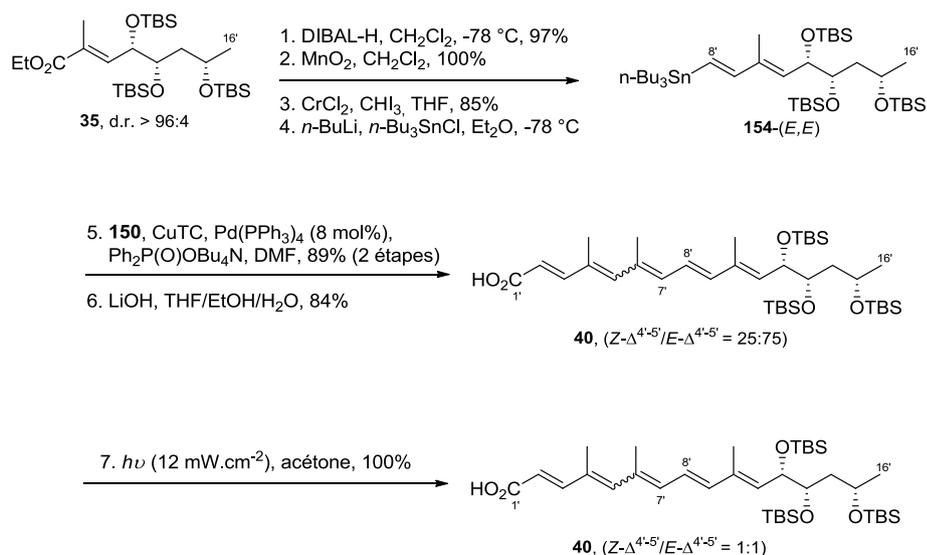


Schéma 33 : Synthèse du fragment C1'-C16'

3.2.3.5. Assemblage final

Les étapes finales pour la formation de la mycolactone A/B suivent celles décrites dans la littérature (Schéma 34).¹¹ L'estérification avec la chaîne inférieure, réalisée dans les conditions de Yamaguchi, est apparue moins efficace que dans l'étude du groupe d'Altmann. Néanmoins, elle a permis l'obtention de la mycolactone A/B entièrement protégée **189** en mélange d'isomères *Z*- $\Delta^{4'-5'}$ /*E*- $\Delta^{4'-5'}$ à environ 1:1, et sous la forme de deux épimères en C12 (80:20). Finalement, la déprotection des alcools silylés, requérant deux étapes successives, a conduit à la mycolactone A/B en mélange *Z*- $\Delta^{4'-5'}$ /*E*- $\Delta^{4'-5'}$ voisin de 1:1 et en C12 de 80:20, avec un rendement de 71% sur la dernière étape (Schéma 34). Ainsi la toxine naturelle a été synthétisée en 27 étapes pour la plus longue séquence linéaire avec un rendement global de 0,2%. A titre de comparaison, la première génération de synthèse totale de la mycolactone A/B décrite par Kishi entre 2001 et 2002 (voir Chap. 1.3.2) comptait 22 étapes linéaires permettant la formation de la toxine naturelle avec un rendement global proche de 1%.^{66a} Ainsi, bien que le rendement global apparaisse comme relativement faible, il est à rappeler que l'objectif de ce projet de recherche reste la formation d'une voie synthétique modulable. Par ailleurs, toutes les données spectroscopiques pour la mycolactone A/B ainsi synthétisée, dont l'isomère en C12 est bien majoritaire dans le mélange, sont en accord avec les données présentes dans la littérature.

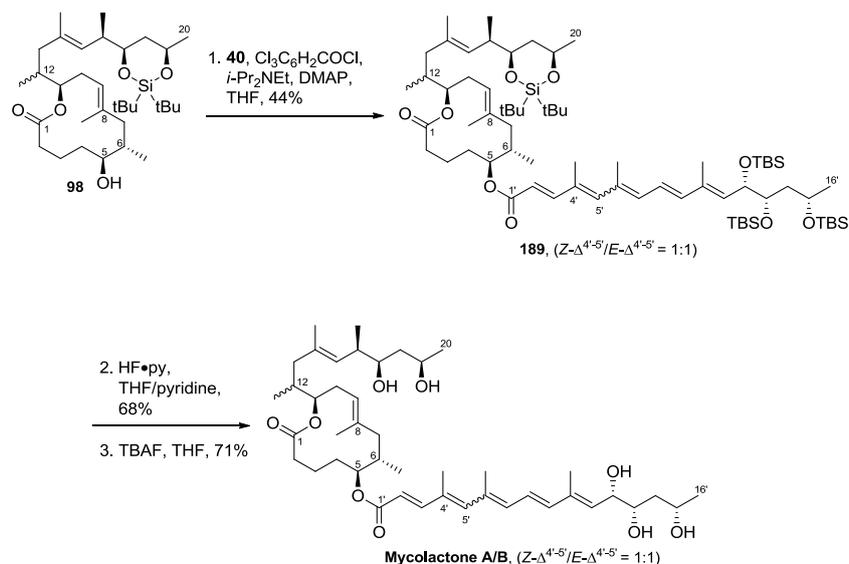


Schéma 34 : Etapes finales de la formation de la mycolactone A/B

Avec une stratégie robuste et flexible pour la synthèse totale de mycolactone A/B en main, nos efforts se sont ensuite tournés vers la synthèse de nouveaux analogues de mycolactones. Dans l'optique d'apporter des informations supplémentaires concernant les mécanismes moléculaires et biologiques déclencheurs de l'ulcère de Buruli, le développement d'analogues de mycolactones originaux est essentiel. Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont présentés dans le sous-chapitre suivant.

3. 3. Vers la synthèse de nouveaux analogues de mycolactones

3.3.1. *Analogues de mycolactones diversifiés en C8*

La stratégie adoptée s'appuie sur la robustesse et la flexibilité de la voie synthétique précédemment développée. En effet, il est envisagé de réaliser la synthèse de nouveaux analogues de mycolactones diversifiés en C8 par la simple transposition de toutes les étapes préalablement mises au point, qu'elles soient des étapes clés ou de transition de type protection/déprotection. De ce fait, l'analyse rétrosynthétique représentée Schéma 35 reprend toutes les étapes clés prédéfinies et repose sur l'intermédiaire **169**, fil conducteur de la voie de synthèse. En effet, la possibilité d'insérer un groupement méthyle via un couplage croisé pallado-catalysé sur cet alcène bromé a été démontré au cours de la synthèse de la mycolactone A/B. Dans l'optique de tester l'efficacité de la voie de synthèse développée préalablement, il a été envisagé de conduire cet intermédiaire clé à un stade avancé de la synthèse. L'intermédiaire bromé **190** pourrait alors amener à une diversité d'analogues C8 de mycolactones par des réactions de couplages croisés métallo-catalysés. En effet, il a été considéré d'insérer en cette position différents groupements de type alkyle, cycloalkyle, ou encore halogénure d'alkyle. De plus, ces derniers pourraient présenter une fonction réactive, telle qu'un alcyne ou un azoture, afin d'envisager des réactions de bio-conjugaison. Ainsi, cette méthode permettrait une modulation de la position C8 à une phase tardive, représentant alors un outil puissant pour la synthèse rapide de nouveaux analogues structuraux de mycolactones.

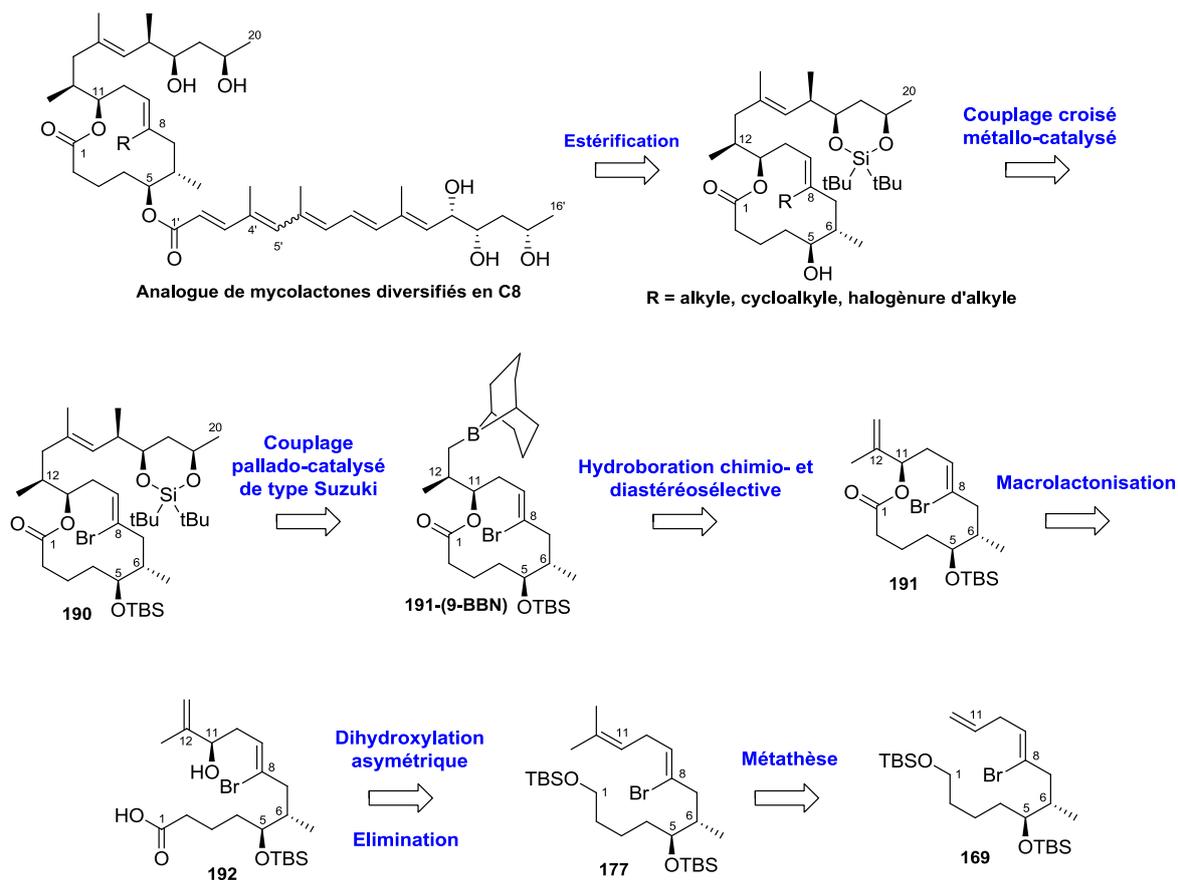


Schéma 35 : Analyse rétrosynthétique pour la préparation d'analogues de mycolactones diversifiés en C8

3.3.1.1. Préparation du fragment C1-C13 et essais de modulation en C8

En suivant la même voie de synthèse que précédemment, l'allongement de l'intermédiaire **169** jusqu'en C13 est effectué par l'insertion du groupement gem-diméthyle à l'aide d'une réaction de métathèse croisée avec le 2-méthyl-2-butène. L'action de la seconde génération de catalyseur à base de ruthénium de type Grubbs dans cette réaction conduit à la formation quantitative de **177**. Puis, ce dernier est exposé aux conditions de dihydroxylation asymétrique de Sharpless, permettant ainsi la formation du diol **193** avec un rendement très satisfaisant et reproductible (Schéma 36). La très bonne diastéréosélectivité a été déterminée, comme pour l'intermédiaire méthylé **179**, par analyses RMN des diesters de Mosher correspondants (Tableau 3 et Figure 13).

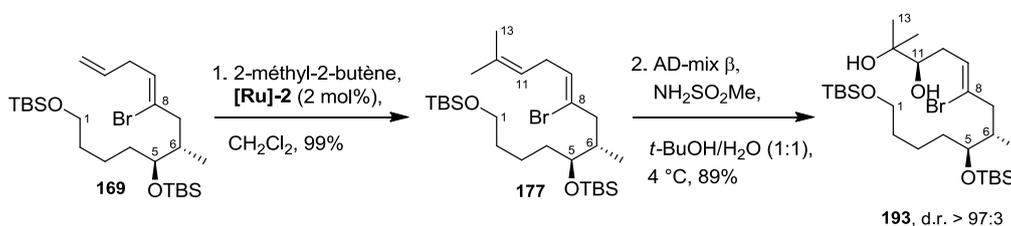
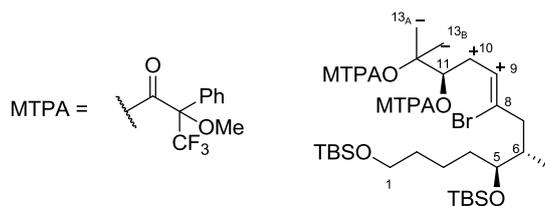


Schéma 36 : Synthèse de l'intermédiaire **193** par réactions de métathèse croisée et de dihydroxylation asymétrique



	<i>S</i> (ppm)	<i>R</i> (ppm)	$\Delta\delta = \Delta S - \Delta R$ (ppm)
H9	5,6739	5,5621	+0,1118
H10	2,6328	2,5977	+0,0351
H10'	2,5312	2,5054	+0,0258
H11	5,1416	5,0989	+0,0427
H13_A	1,2018	1,2689	-0,0671
H13_B	1,1823	1,2212	-0,0389

Tableau 3 : Résultats des différences des déplacements chimiques pour l'attribution de la configuration de l'intermédiaire 193

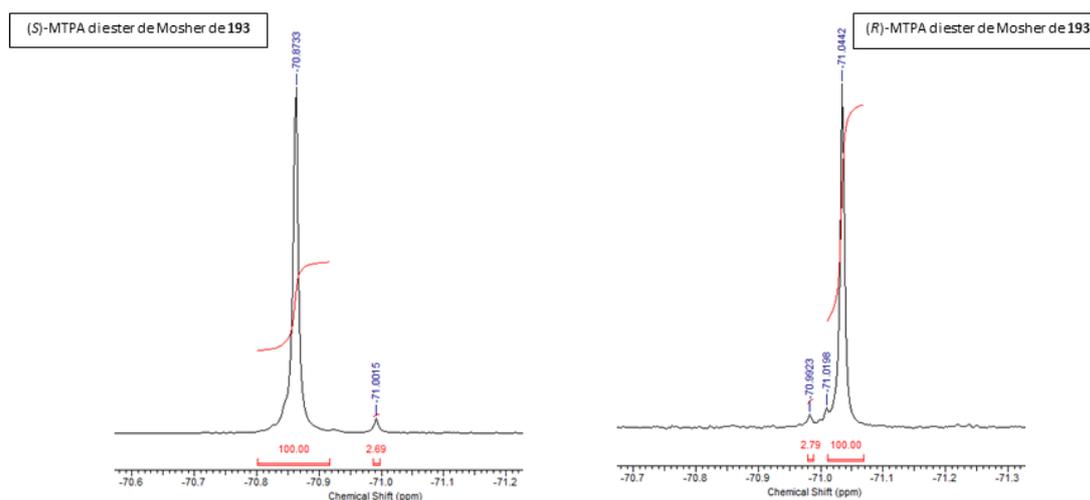


Figure 13 : Analyse des spectres ¹⁹F du diester de Mosher (*S*) à gauche et (*R*) à droite pour la détermination de l'excès diastéréomérique de l'intermédiaire 193

Toutefois, il est à préciser que la réaction de dihydroxylation asymétrique sur l'intermédiaire bromé **177** s'est avérée plus compliquée que pour son homologue méthylié **176**. Bien que l'intermédiaire bromé accorde une meilleure sélectivité pour l'addition électrophile, les premières tentatives utilisant l'AD-mix comme mélange de réactifs pour la formation du diol ont résulté en la formation non-négligeable d'un sous-produit. Ce dernier a été identifié comme étant l'élimination de l'alcool secondaire conduisant à la formation du diène conjugué **193a** (Schéma 37, éq. 1). Cette observation a été attribuée, dans un premier temps, à la trop forte basicité du milieu réactionnel. En effet, le mélange AD-mix est composé à environ 30% de carbonate de potassium.⁹⁴ Afin de minimiser la formation de ce produit secondaire, différents essais en milieu tamponné⁹⁵ ou encore avec des quantités très faibles en catalyseur ont été réalisés (Schéma 37, éqs. 2 et 3).

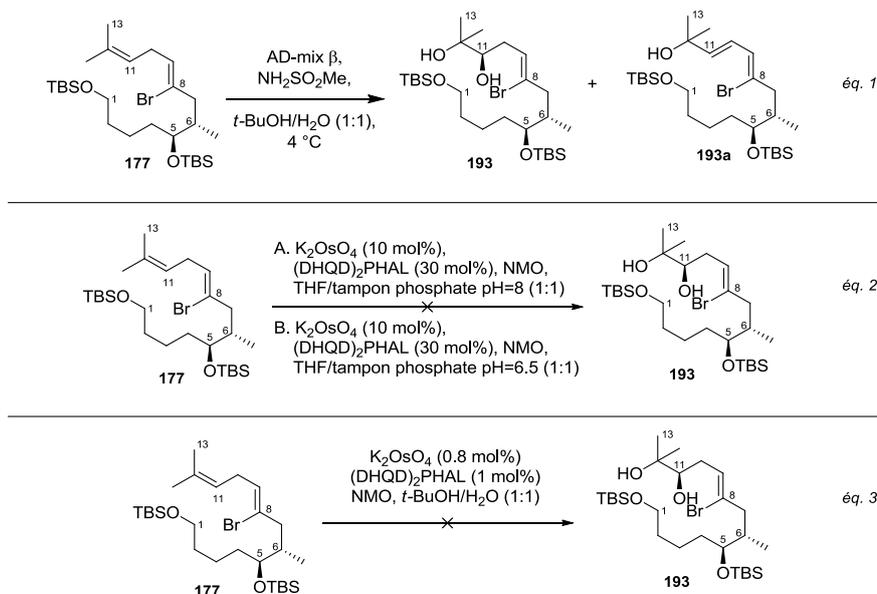


Schéma 37 : Essais non-productifs de réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless sur l'intermédiaire 177

Toutefois, ces tentatives n'ont pas répondu aux attentes et ont mené majoritairement à la non-réactivité du produit de départ, ainsi qu'à la formation ponctuelle de produits de dégradation non-identifiés. C'est alors en travaillant sur les conditions décrites dans la littérature, et plus précisément sur celles recommandées par Sharpless,³⁶ que les prérequis réactionnels optimaux ont été déterminés. Il est à savoir que cette réaction hétérogène nécessite une agitation constante et vigoureuse. De plus, l'ordre d'ajout des réactifs est également important, tout comme la concentration et la température de réaction. Par ailleurs, la couleur du milieu réactionnel est un indice déterminant pour la conversion de l'alcène de départ en son produit correspondant. En effet, il a été observé que la conversion totale des intermédiaires de synthèse, bromé ou méthylé, n'était obtenue qu'au virement jaune vif du milieu réactionnel premièrement orange. Initialement étudiés par Sharpless pour expliquer l'effet du ferricyanure de potassium en tant que réoxydant,⁹⁶ ces changements de couleurs au cours de la réaction sont suggérés par la séquence de réactions se produisant entre la phase aqueuse et la phase organique, comme présentée Figure 14.

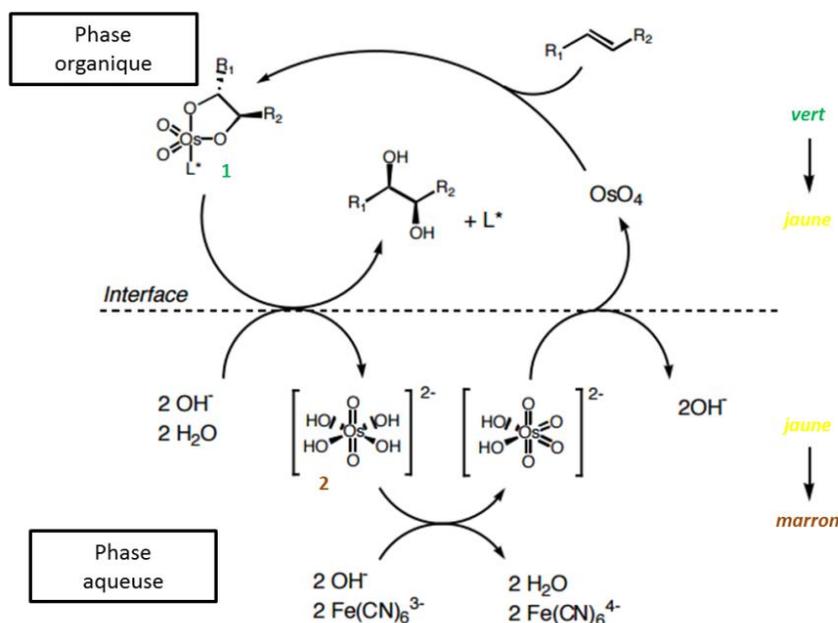


Figure 14 : Mécanisme réactionnel de la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless

Maîtrisant la synthèse de **193**, ce dernier a alors été engagé dans la succession de réactions de protection/élimination/déprotections (Schéma 38). L'alcool primaire de **194** est ensuite sélectivement oxydé jusqu'à l'obtention de l'acide carboxylique, permettant alors d'effectuer la réaction de macrolactonisation dans les conditions de Yamaguchi. Pour des raisons d'instabilité de divers intermédiaires de synthèse, certaines étapes ont dû être poursuivies sans qu'une purification ne soit possible. Toutefois, il est à noter que cet enchaînement de réactions sur des produits bruts n'empêche pas la formation efficace des produits désirés.

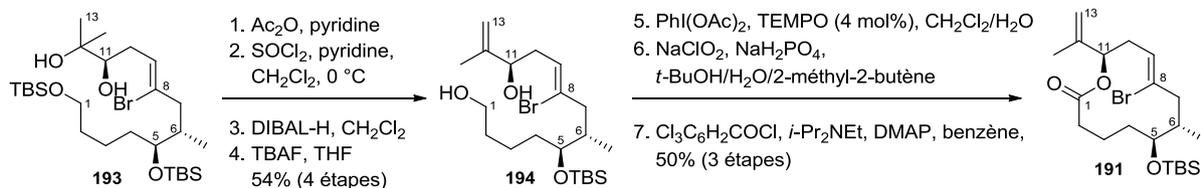


Schéma 38 : Synthèse de l'intermédiaire **191** par réactions de protection/élimination/déprotections et de macrolactonisation

Possédant une première C8-bromo macrolactone, la capacité de cette dernière à effectuer des réactions de couplage croisé pallado-catalysé, en vue d'une diversification en C8, a été expérimentée sur **191**. Afin de démontrer la flexibilité de la stratégie développée, les premières études de couplage se sont portées sur l'insertion d'un groupement méthyle dans le but d'atteindre l'intermédiaire **183** de la toxine naturelle. Il est à préciser que l'intermédiaire **191** possède deux sites de réaction possible avec le palladium, à savoir l'addition oxydante du métal dans la liaison C-Br ou l'ionisation allylique du système macrolactonique isopropényle (Figure 15),⁹⁷ dont la réactivité de chacun était incertaine.

formation du complexe π -allyle de palladium

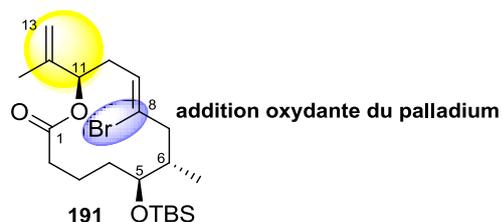


Figure 15 : Sites de réactions probables du palladium sur l'intermédiaire **191**

Dans une situation compétitive, comme le cas de **191**, l'ionisation allylique devrait, en général, être favorisée pour des raisons de stabilité du complexe π -allyle résultant par rapport au complexe- σ correspondant à l'addition oxydante sur le bromure de vinyle.⁹⁸ Toutefois, les études menées par Nwokogu⁹⁹ et Heathcock¹⁰⁰ démontrent que la sélectivité du palladium est fortement corrélée aux effets conformationnels émanant de la molécule étudiée. En effet, si le groupement allylique n'adopte pas la conformation antipériplanaire requise, le palladium ne peut activer cette fonction et effectuera préférentiellement l'addition oxydante.¹⁰¹ Par ailleurs, plusieurs groupes rapportent la prédominance d'une addition oxydante sur la formation compétitive d'un π -allyle lors de synthèses totales de produits naturels (Schéma 39),¹⁰² renforçant ainsi notre souhait de réaliser des essais de modulation sur l'intermédiaire **191**.

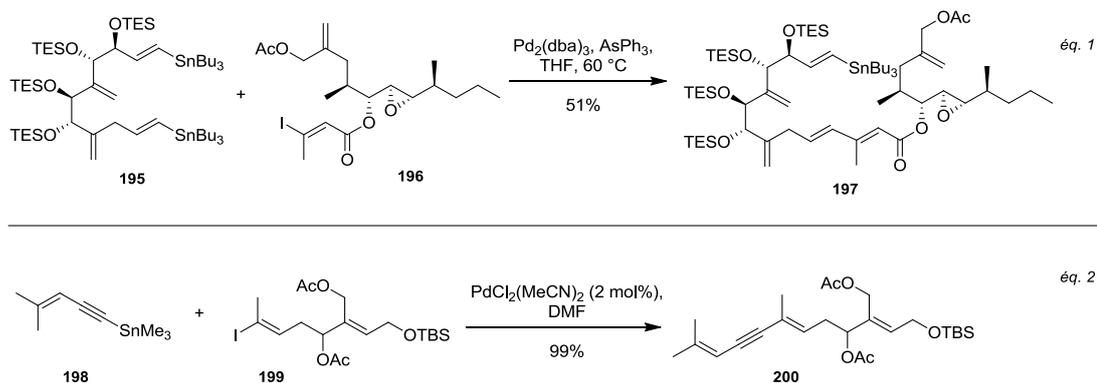


Schéma 39 : Exemples tirés de la littérature pour des réactions compétitives d'addition oxydante sur l'ionisation allylique¹⁰²

De ce fait, deux essais de couplages croisés ont été tentés pour l'incorporation du groupement méthyle en position 8. La première tentative reprend les conditions réactionnelles utilisées précédemment, à savoir un couplage de type Negishi. Pour le deuxième essai, des conditions relativement plus douces de couplage de type Suzuki¹⁰³ ont également été testées (Schéma 40). Cependant, ces deux tentatives ont résulté en la formation quantitative de l'acide carboxylique triénique **201**, correspondant au produit d'ouverture de la macrolactone par un complexe π -allyle de palladium suivi de son élimination. L'analyse RMN proton de ce dernier nous indique cependant que cette ouverture semble être suivie du couplage croisé permettant d'insérer le groupement méthyle en position C8. Aucune trace de produit cyclique méthylé en C8 n'a été détectée, démontrant ainsi la préférence cinétique et thermodynamique du palladium pour l'ionisation allylique dans le cas de **191**.

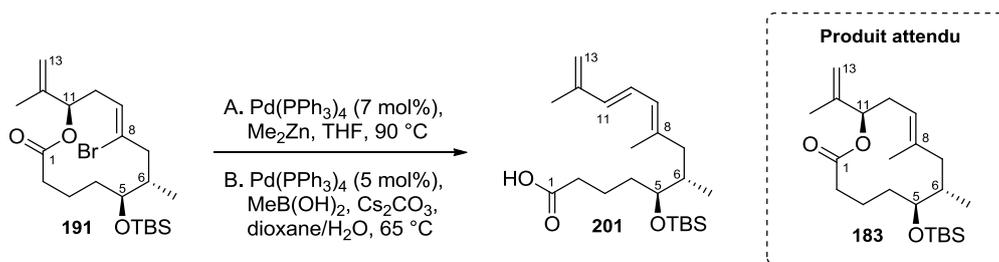


Schéma 40 : Essai de modulation de la position C8 sur l'intermédiaire **191** par réactions de couplage croisé pallado-catalysé

Au vu de ces résultats, la poursuite de la voie synthétique avec l'intermédiaire **191** suivie de la réalisation des différents essais de couplage croisé métallo-catalysé sur un intermédiaire de synthèse plus avancé s'avèrent indispensables. La formation du fragment C1-C20 ainsi que les essais de diversification en position C8 sont présentés dans le sous-chapitre suivant.

3.3.1.2. Préparation du fragment C1-C20 et essais de modulation en C8

Ainsi, comme pour son homologue **183**, l'isopropényle macrolactone **191** est soumise à la réaction de couplage de Suzuki en « *one-pot* », à savoir la réaction d'hydroboration sous ultrasons suivie du couplage croisé avec la chaîne supérieure (Schéma 41). Bien que la diastéréosélectivité de la réaction d'hydroboration apparaisse comme similaire à **183**, le rendement sur les deux étapes de réactions est, quant à lui, nettement amélioré. Cet effet pourrait être dû à la meilleure régiosélectivité de la réaction d'hydroboration sur le substrat **191** par rapport à **183**. En effet, il a été démontré que la présence d'un atome d'halogène sur une double-liaison diminue dramatiquement la vitesse d'hydroboration à cause des effets électroniques de ce groupement attracteur.¹⁰⁴ Ainsi, l'addition électrophile du 9-BBN se produit sélectivement sur la double-liaison non-halogénée, d'où un rendement de couplage croisé plus élevé.¹⁰⁵ Le rapport diastéromérique a été déterminé comme pour l'homologue C8-méthylé par RMN ¹H mais, cette fois-ci, sur le massif isolé du proton H9 des deux épimères (Figure 16).

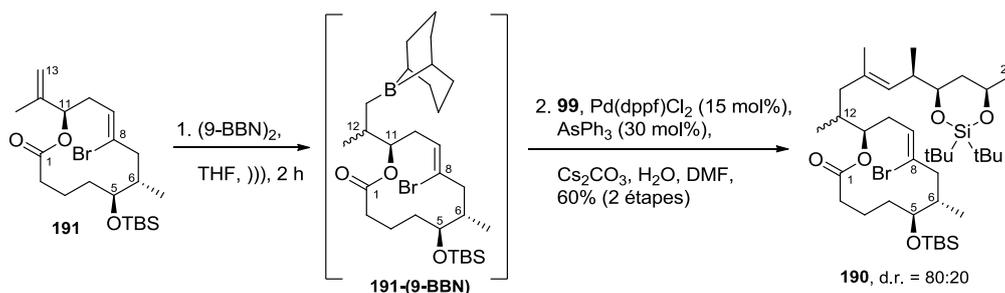


Schéma 41 : Synthèse de l'intermédiaire **190** par réactions en « *one-pot* » d'hydroboration et de couplage croisé de type Suzuki

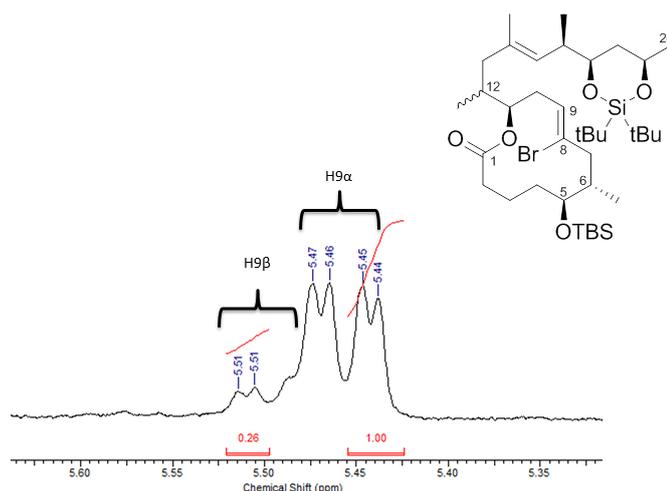


Figure 16 : Analyse RMN ^1H pour la détermination du rapport diastéréomérique de l'intermédiaire **190**

Le fragment C1-C20 en main, nos efforts se sont ensuite tournés vers la modulation de la position C8 à l'aide de divers couplages métallo-catalysés. Toujours dans le but de démontrer la flexibilité de la stratégie développée, les premières études de couplage se sont portées sur l'insertion d'un groupement méthyle afin d'atteindre, cette fois-ci, l'intermédiaire **188** de la toxine naturelle. Pour ce faire, les conditions standards du couplage de type Negishi utilisées précédemment ont été appliquées sur **190** (Schéma 42). Bien que la réaction apparaisse plus lente que sur le fragment acyclique, avec une conversion d'environ 55% après 15 heures de réaction, ces conditions réactionnelles ont permis la formation de l'intermédiaire de la toxine naturelle sans présence de produits de dégradation. **188** a ainsi été obtenu avec un rendement de 75%, calcul basé sur le produit de départ récupéré.

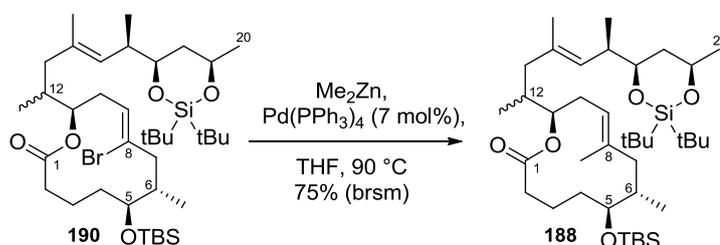


Schéma 42 : Synthèse de l'intermédiaire **188** par réaction de couplage croisé de Negishi

Dans l'optique d'augmenter la réactivité de l'intermédiaire **190** vis-à-vis des réactions de couplages croisés, une réaction d'échange brome-iode en conditions relativement douces a été étudiée. Les conditions réactionnelles, initialement développées par Buchwald pour une réaction de type Finkelstein sur des dérivés aromatiques¹⁰⁶ puis repris par la même équipe sur des dérivés vinylés,¹⁰⁷ ont été appliquées (Schéma 43). Cependant, aucune trace du produit iodé **202** n'a pu être détectée. Au contraire, malgré l'absence d'une base forte dans le milieu, la formation du produit d'élimination **203** a été majoritairement décelée et ce dernier a pu être caractérisé. Il est effectivement rapporté dans la littérature plusieurs méthodes de synthèse de macrolactones à douze chaînons contenant un alcyne, indiquant alors la facilité de formation de ces intermédiaires.¹⁰⁸ Ainsi, cet essai révèle une stabilité très modérée de l'intermédiaire **190** dans un milieu relativement basique. Cette réaction d'échange brome-iode est encore à l'étude au laboratoire.

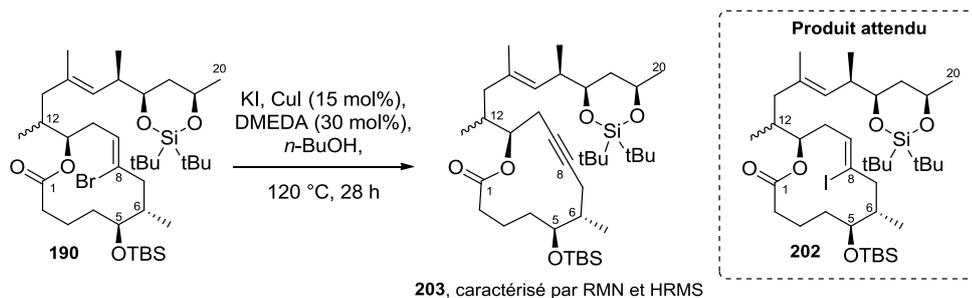


Schéma 43 : Essai d'échange brome-iodure en position C8 par réaction cupro-catalysée sur l'intermédiaire **190**

Toutefois, il est à préciser qu'un essai d'échange brome-iodure, utilisant ces mêmes conditions réactionnelles, a été effectué sur l'intermédiaire **191**. Contrairement au fragment macrocyclique C1-C20 **190**, ce dernier n'a montré aucune réactivité vis-à-vis de ces conditions, même sur un temps prolongé, seul le produit de départ **191** est récupéré à la fin de la réaction (Schéma 44).

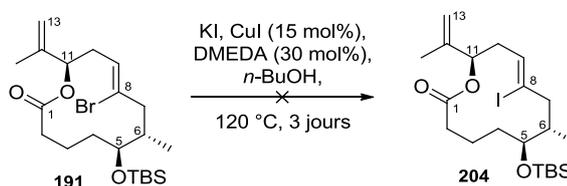


Schéma 44 : Essai non-productif d'échange brome-iodure en position C8 par réaction cupro-catalysée sur l'intermédiaire **191**

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la préparation de nouvelles sondes de mycolactones. La stratégie choisie a été d'insérer une chaîne alkyle possédant une fonction réactive en position terminale, cette dernière pouvant permettre une conjugaison ultérieure avec différentes sondes fluorescentes (Schéma 45). En effet, les groupements alkyles linéaires sont, de manière générale, électroniquement et stériquement équivalents aux groupements méthyles. Ainsi, cette approche entraînerait une perturbation minimale de la conformation de la mycolactone et permettrait de conserver les propriétés biologiques initiales. Or, bien qu'essentiel pour l'activité cytopathique, il a été démontré que l'absence du méthyle en position C8 sur la mycolactone A/B avait peu d'effet sur l'affinité de liaison avec la cible WASP (voir Chap. 2.3.2), suggérant ainsi une position potentiellement inerte vis-à-vis de légères modifications.

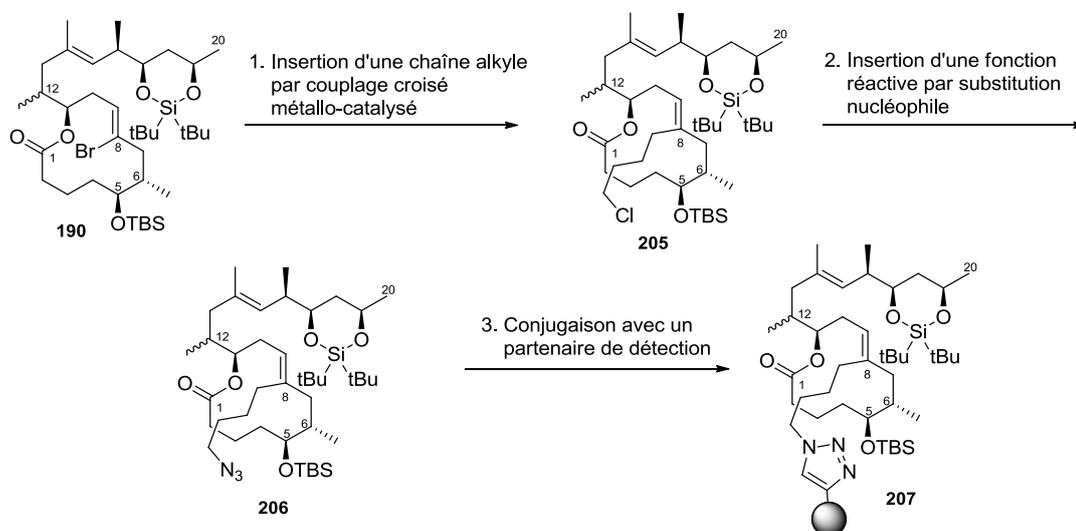


Schéma 45 : Stratégie synthétique pour la préparation de sondes C8 de mycolactones

Différents groupes rapportent l'utilisation de cette stratégie pour la formation d'analogues de produits naturels (Figure 17). Le premier exemple de la littérature est l'étude de la modification du méthyle en position C16 de la discodermolide, réalisée par le groupe de Schreiber.¹⁰⁹ Toutefois, l'allongement du méthyle par deux chaînes alkyles, reliées entre-elles avec une fonction carbamate, s'est révélée infructueuse en raison du manque d'activité de l'analogue formé. Un deuxième exemple se trouve être la modification du méthyle en position C6 des épothilones B et D par un groupement allyle. Cette étude a été réalisée par une équipe de recherche de chez Schering AG pour des études de radio-marquage au tritium.¹¹⁰ Pour cet exemple, l'extension à deux carbones de la structure de référence et les produits radio-marqués correspondants ont conservé l'activité biologique. Plus récemment, le groupe de Leighton a également mis en place cette stratégie pour leur synthèse d'analogues de la dictyostatine.¹¹¹ Cette dernière s'appuie sur le remplacement d'un groupement méthyle par un bras alkyle à plusieurs carbones et possédant un substituant de conjugaison en fin de chaîne, tel qu'un azoture. Pour ce faire, une toute nouvelle voie de synthèse a été développée afin d'installer le bras alkyle dès les premières étapes de la synthèse totale de leur molécule d'intérêt. Là encore, cette étude a démontré que ce type de modulation n'avait que très peu de conséquences sur l'activité biologique de leur molécule d'intérêt. Ainsi, l'utilisation de cette stratégie semble être viable pour l'exploration de potentielles applications ciblées.

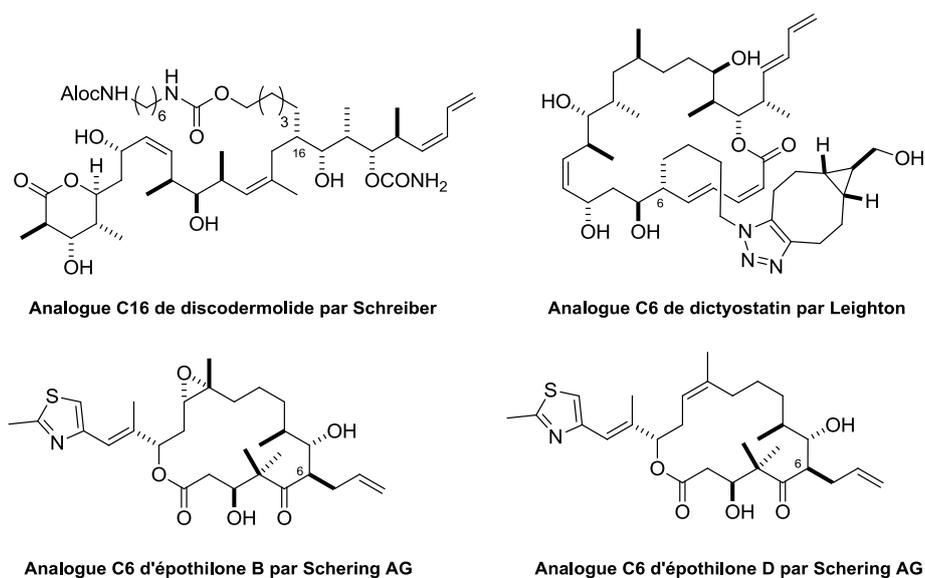
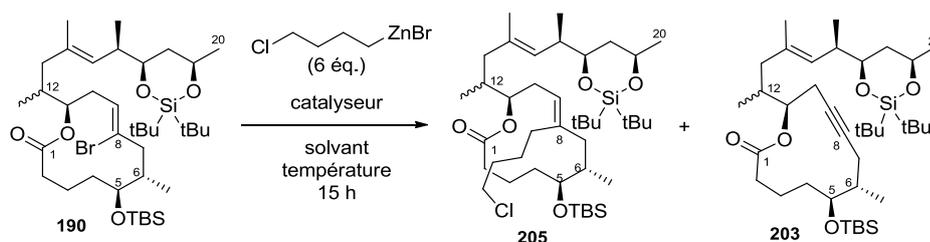


Figure 17 : Structures des analogues de produits naturels formés par la stratégie d'extension du méthyle

Dans cette optique, il a été envisagé de tirer profit des résultats satisfaisants du couplage croisé de type Negishi lors de l'interception de l'intermédiaire **188** (Schéma 42). Ainsi, les premiers essais pour l'installation d'un bras alkyle sur **190** font appel à cette réaction. Cette stratégie permet ainsi l'insertion d'un lien covalent à une étape tardive, sans changement global de la voie synthétique. Le choix du bras de liaison s'est arrêté sur une chaîne alkyle à quatre carbones avec un chlorure terminal, utilisé dans la littérature pour des couplages croisés,¹¹² et dont la solution de bromure de zinc correspondante à une concentration de 0,5 M dans le THF est commercialement disponible. Par la suite, la transformation du chlorure en azoture serait réalisée afin d'évaluer les possibles réactions de chimie-click pour l'attache covalente entre la mycolactone modifiée et un autre partenaire (voir Schéma 45).¹¹³ Les différents essais réalisés sur 10 mg de l'intermédiaire **190** sont présentés dans le Tableau 4.

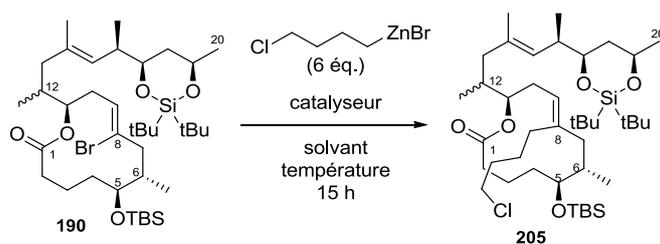


Entrée	Catalyseur	Solvant	Température	Observations après traitement aqueux (RMN)
1	Pd(PPh ₃) ₄ (7 mol%)	THF (200 µL)	25 °C	aucune conversion
2	Pd(PPh ₃) ₄ (7 mol%)	THF (200 µL)	90 °C	aucune conversion
3	Pd(PPh ₃) ₄ (7 mol%)	Toluène (200 µL)	90 °C	apparition de sous-produits majoritaires
4	Pd(<i>t</i> -Bu ₃ P) ₂ (10 mol%)	THF (200 µL)	25 °C	aucune conversion
5	Pd(<i>t</i> -Bu ₃ P) ₂ (60 mol%)	THF (200 µL)	90 °C	190 en mélange avec 203

Tableau 4 : Essais d'insertion d'un bras alkyle par couplage croisé de type Negishi sur l'intermédiaire **190**

Les résultats obtenus au cours de ces différents essais indiquent une très faible réactivité de l'intermédiaire **190** dans la réaction de couplage croisé de type Negishi. En effet, le produit de départ est majoritairement récupéré, sans trace de dégradation ni de formation de sous-produit, excepté pour l'entrée 3 du Tableau 4 avec l'utilisation d'un solvant très apolaire. Néanmoins, il est à souligner qu'une quantité trop importante de catalyseur (entrée 5, Tableau 4), et donc de phosphine basique, amène à la formation non-négligeable du produit d'élimination **203** précédemment identifié. Par ailleurs, connaissant l'instabilité importante des catalyseurs de palladium, et plus particulièrement du bis(tri-*tert*-butylphosphine)palladium(0), il a été suggéré que l'absence de conversion du produit de départ pourrait être due à une dégradation partielle du catalyseur lors de sa manipulation en conditions normales de laboratoire.

Dans ce contexte, une collaboration avec l'équipe du Prof. Baudoin de l'université de Bâle (Suisse) a été amorcée afin de réaliser des expériences en conditions totalement inertes au moyen d'une boîte à gants.¹¹⁴ Pour ces nouvelles tentatives, présentées dans le Tableau 5, différents catalyseurs ont été testés. Afin de confirmer une possible dégradation du catalyseur Pd(*t*-Bu₃P)₂ lors des manipulations en conditions normales de laboratoire, ce dernier a fait l'objet des premiers essais de couplage croisé entre **190** et le dérivé zincique (entrées 1 et 2). Par la suite, l'application du pré-catalyseur de palladium PEPPSI-*i*-Pr, utilisé par le groupe de Negishi en 2009 pour démontrer la facilité de couplage croisé de type Negishi sur des bromoalcènes trisubstitués de configuration *Z*,¹¹⁵ a été expérimentée (entrée 3). Bien que stables et inertes, les pré-catalyseurs de type PEPPSI (« Pyridine-Enhanced Precatalyst Preparation Stabilization and Initiation »), développés par le groupe d'Organ dans les années 2000, sont des dérivés de type carbènes N-hétérocycliques (NHC) de palladium connus pour accélérer les réactions de couplage croisé.¹¹⁶ L'effet des ultrasons associé au catalyseur très actif bis(tricyclohexylphosphine)palladium(0) a également été étudié (entrée 4), tout comme l'addition d'une base aminée dans le milieu réactionnel reconnue comme étant un additif de prévention contre la perte de configuration et la formation de sous-produits au cours des réactions de couplage de type Negishi (entrée 5).¹¹⁷ Enfin, un essai de couplage de type Negishi médié par un catalyseur au nickel a aussi été considéré (entrée 6).¹¹⁸



Entrée	Catalyseur	Solvant	Température	Observations après traitement aqueux (RMN)
1	Pd(<i>t</i> -Bu ₃ P) ₂ (14 mol%)	THF (200 μL)	25 °C	aucune conversion
2	Pd(<i>t</i> -Bu ₃ P) ₂ (14 mol%)	THF (200 μL)	90 °C	aucune conversion
3	PEPPSI- <i>i</i> -Pr (11 mol%)	THF (200 μL)	90 °C	aucune conversion
4	Pd(Cy ₃ P) ₂ (13 mol%)	THF (200 μL)))) (2 h)	aucune conversion
5	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (11 mol%), TMEDA	THF (200 μL)	90 °C	aucune conversion
6	Ni(acac) ₂ (10 mol%), DPEPhos (20 mol%)	THF/NMP (10:1) (200 μL)	90 °C	aucune conversion et présence de sous-produits

Tableau 5 : Essais d'insertion d'un bras alkyle par couplage croisé de type Negishi en conditions inertes sur l'intermédiaire 190 (réalisés avec l'aide de David Dailler, doctorant dans l'équipe du Prof. Baudoin à l'université de Bâle)

Toutefois, aucune de ces tentatives ne s'est montrée concluante. Il est évident que la forme macrocyclique diminue fortement la réactivité de la position C8. Une possible gêne stérique pourrait empêcher la réaction de couplage croisé de se produire efficacement. Néanmoins, en s'appuyant sur le résultat de couplage croisé qui nous a permis d'intercepter l'intermédiaire de synthèse de la toxine naturelle, il semblerait que la transmétallation ne s'effectue pas lors de ces essais. En effet, l'essai productif de couplage croisé de type Negishi utilise les conditions réactionnelles suivantes : la combinaison d'un catalyseur de palladium(0) avec le diméthylzinc dans le THF. Or, toutes les tentatives de couplage croisé présentées en Tableau 4 et Tableau 5 sont basées sur l'utilisation d'une solution de bromure d'alkyle de zinc, alors qu'un réactif de type dialkyle zincique serait bien plus réactif.

Dans ce contexte, il a été considéré de préparer au laboratoire le dialkylzinc d'intérêt, non disponible commercialement, comme précisé sur le Schéma 46. La synthèse de réactifs de type dialkylzinc fonctionnalisés a été principalement décrite par Knochel dans les années 90¹¹⁹ et reprise par différents groupes de recherche.¹²⁰ Néanmoins, la préparation du dialkylzinc souhaité a été infructueuse dans notre cas. Il est à préciser que la procédure implique l'utilisation de diéthylzinc pur, produit hautement pyrophorique et dont la commercialisation est limitée. Toutefois, nous avons tenté de distiller l'hexane contenu dans une solution de diéthylzinc à 1 M afin d'avoir en possession le réactif sans solvant, mais les essais de couplage avec le dérivé iodé **208** n'ont pas abouti à la formation du produit désiré **210**. La stratégie d'extension du méthyle en position C8 est toujours en cours d'étude au laboratoire.

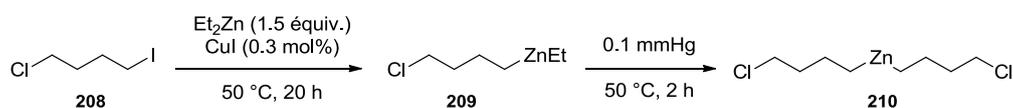


Schéma 46 : Synthèse du bis(4-chlorobutyl)zinc 210 selon la procédure de Knochel

Malgré une modulation de la position C8 encore à un stade exploratoire, l'étude biologique de l'analogue de mycolactones bromée en position C8 pourrait se révéler intéressante. L'analyse de ce dernier apporterait des informations supplémentaires en termes d'interactions moléculaires avec les différentes cibles biologiques de la mycolactone A/B. En effet, cet analogue direct pourrait contribuer à l'efficacité de liaison avec la protéine cible par différents types d'interactions. Par ailleurs, les volumes caractéristiques d'un méthyle ou d'un brome en position vinylique étant semblables ($V_{Me} = 73,17 \text{ \AA}^3$ et $V_{Br} = 74,50 \text{ \AA}^3$),¹²¹ la C8-bromo mycolactone devrait adopter la même conformation, en plus de posséder des propriétés chimiques et pharmacologiques similaires à la toxine naturelle. La synthèse de cette dernière est décrite dans le sous-paragraphe suivant.

3.3.1.3. Préparation de l'analogue C8-Br de mycolactones

Afin de réaliser la réaction d'estérification avec la chaîne inférieure, l'intermédiaire **190** a été soumis aux conditions de déprotection déterminées précédemment, permettant ainsi le clivage sélectif de l'éther silylé en position C5 (Schéma 47). Le composé **211** est obtenu avec un rendement de 47% après une purification nécessaire par chromatographie liquide haute performance préparatoire (Prép-HPLC) afin d'éliminer une impureté dont la séparation avec le produit désiré était complexe en chromatographie sur colonne de silice. Cette dernière a été identifiée par analyse RMN ¹H comme étant l'ouverture du THF par l'action de l'acide acétique, conduisant alors au composé **212**.

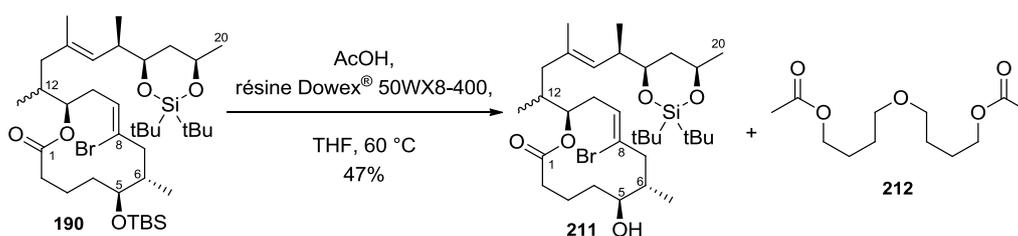


Schéma 47 : Synthèse de l'intermédiaire **211** par déprotection sélective de l'alcool C5

Possédant l'intermédiaire **211** en quantités suffisantes, bien que faibles, ce dernier a été engagé dans la réaction d'estérification avec **40** dans les conditions de Yamaguchi (Schéma 48). Le rendement obtenu sur cette réaction s'est encore une fois révélé relativement bas malgré l'application des précautions réactionnelles requises. Par la suite, l'intermédiaire totalement protégé a subi une première déprotection sélective du silane cyclique, par l'action d' $\text{HF} \cdot \text{pyridine}$, conduisant à **213**. De manière inattendue, la réaction de ce dernier avec une solution commerciale de TBAF à 1 M n'a pas permis d'obtenir le produit **214** souhaité. A l'aide d'analyses RMN et spectrométrie de masse, il a été déterminé que la déprotection des TBS a bien eu lieu, mais que cette dernière s'est accompagnée de l'élimination de l'atome de brome en position C8. En effet, nous avons pu reconnaître la présence d'un analogue C8-C9-alcyne de mycolactones en mélange avec d'autres produits non-identifiés. Toutefois, les quantités récupérées après une première purification étant trop faibles, un nouvel essai de séparation n'a pas été tenté. Il est à noter que ce type d'élimination, résultant de la relative basicité du réactif TBAF, est connu dans la littérature, mais plus spécifiquement sur des systèmes conjugués, comme pour la synthèse du cœur de la kédarcidine rapportée par Myers.¹²² Ainsi, l'ajout d'un additif de type dérivé phénolique¹²² ou encore acide acétique¹²³ afin de tamponner la solution serait à considérer lors des prochaines tentatives de déprotection finale.

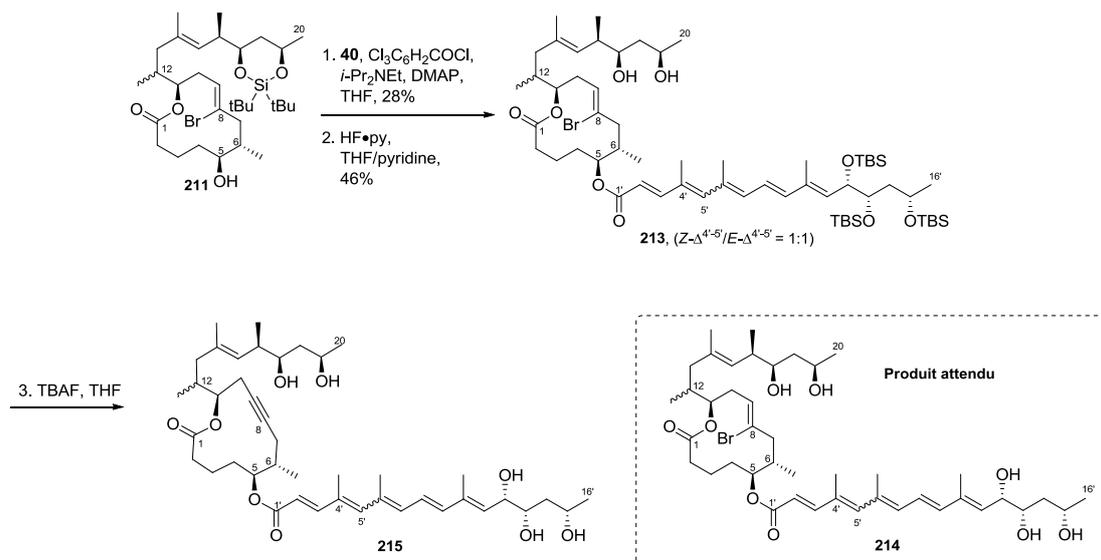


Schéma 48 : Etapes finales de la formation de l'analoge C8-Br de mycolactones

Des nouveaux essais pour la préparation d'analogues de mycolactones diversifiés en C8 sont actuellement en cours au laboratoire. Toutefois, il est à mentionner la robustesse de la voie synthétique ainsi conçue. En effet, les rendements obtenus pour la mycolactone A/B et son analogue C8-bromé sont très similaires sur les différentes étapes de la synthèse. Nos efforts se sont également concentrés sur la démonstration de la flexibilité de la voie de synthèse nouvellement développée. En effet, en plus de pouvoir disposer de nouveaux analogues de mycolactones en position C8, la position C12 peut également se trouver modifiée sans changements des étapes clés optimisées. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le sous-paragraphe suivant.

3.3.2. Analogues C12 de mycolactones

Il a été démontré que l'insertion de la chaîne supérieure était possible à l'aide des réactions d'hydroboration et de couplage croisé de type Suzuki (Schéma 49). Il est alors facilement envisageable d'introduire, par la même stratégie, différents substituants compatibles avec la réaction de Suzuki. Toutefois, il est à rappeler que les études de SAR indiquent un caractère secondaire quant à la présence de la chaîne supérieure pour les activités biologiques.^{2,3} Dans ce contexte, nous nous sommes principalement intéressés à la synthèse d'un analogue plus attrayant, à savoir l'analogue tronqué en C13-C20 de mycolactones **216** possédant le méthyle caractéristique en C8, dont aucune étude biologique n'a encore été réalisée à ce jour (Figure 18). En effet, l'analogue de référence **140** a présenté des caractéristiques biologiques particulièrement intéressantes (voir chapitre 2.3), l'étude de son homologue méthylé en C8 semble alors primordiale.

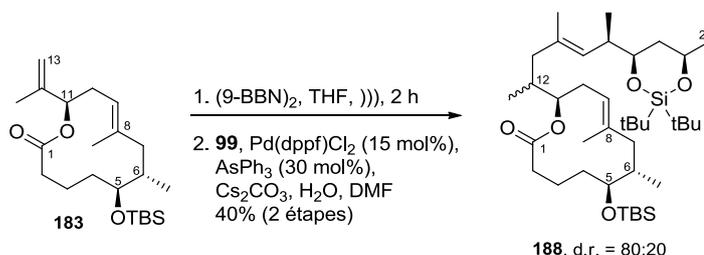


Schéma 49 : Rappel des étapes d'hydroboration et de couplage croisé de type Suzuki sur l'intermédiaire **183**

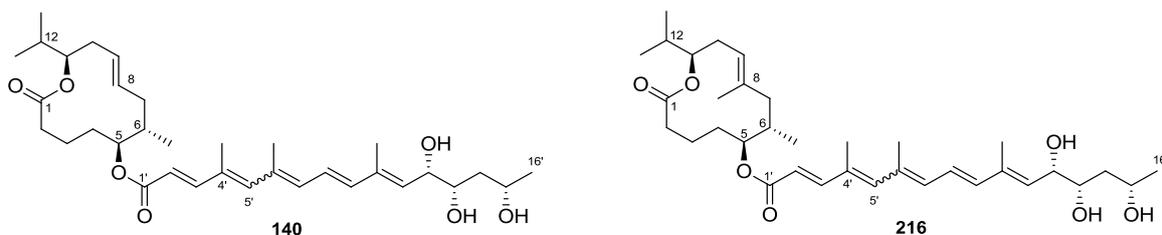


Figure 18 : Structures de l'analogue tronqué C8-desméthylé **140** et de l'analogue tronqué visé **216**

3.3.2.1. Préparation de l'analogue tronqué en C13-C20 de mycolactones

En repartant de l'intermédiaire de synthèse **183**, une optimisation des conditions de réduction du motif isopropényle a conduit à l'obtention quantitative, et de manière totalement chimiosélective, au composé **217**. Par soucis de cohérence, ce dernier a ensuite été soumis aux conditions de déprotection précédemment développées, à savoir la combinaison de l'acide acétique et de la résine sulfonique Dowex®. L'intermédiaire **126**, rapporté par le groupe d'Altmann au cours de leur synthèse d'analogues de mycolactones (voir Chap. 2.2.1),¹¹ a ainsi été obtenu avec un rendement de 48% (Schéma 50).

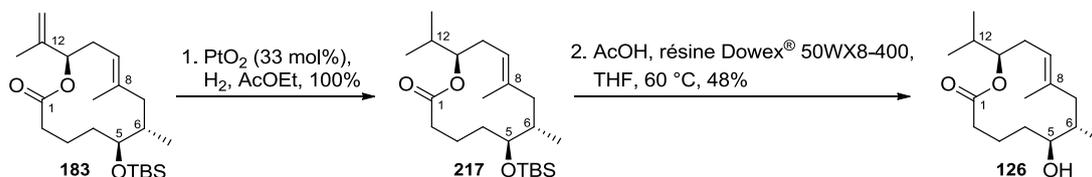


Schéma 50 : Synthèse de l'intermédiaire **126** par réactions d'hydrogénation sélective et déprotection

Enfin, les dernières étapes font intervenir le couplage de **126** avec la chaîne inférieure par estérification de Yamaguchi, suivi du clivage des éthers silylés par l'action d'une solution de TBAF (Schéma 51). Le nouvel analogue **216** a ainsi été obtenu en quantités suffisantes pour sa caractérisation complète et son évaluation biologique.

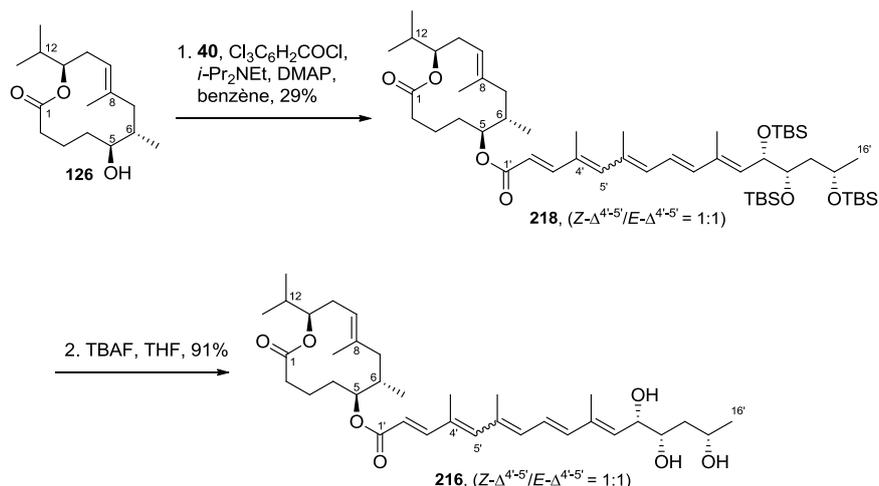


Schéma 51 : Etapes finales de la formation de l'analogue tronqué en C13-C20 de mycolactones **216**

Dans ces conditions, il a été démontré que la nouvelle voie de synthèse des mycolactones, développée au cours de ce projet de recherche, se trouve être modulaire et peut être adaptée à différents type de structure représentative des mycolactones. En effet, les étapes optimisées

permettent un accès rapide aux analogues possédant des points de diversification en C8 et C12 avec des rendements reproductibles et la stéréochimie souhaitée. Toutefois, la mise au point de chaque étape et la préparation des molécules cibles a requis un temps important. Or, la nécessité par nos collaborateurs de l'institut Pasteur d'une possession constante en toxine naturelle pour l'ensemble des études de la biologie de l'ulcère de Buruli a été primordiale ces dernières années. Il est à rappeler la très grande difficulté d'obtenir la mycolactone A/B à partir de cultures de *M. ulcerans*, impliquant ainsi le besoin d'une mise à disposition en toxine synthétique. Dans ce contexte, une partie de cette thèse a également fait l'objet de la préparation de mycolactone A/B à travers des intermédiaires et procédures décrits dans la littérature.

Les efforts menés pour la préparation de la mycolactone A/B, en parallèle à la conception de la nouvelle voie de synthèse, sont présentés dans les paragraphes suivants. Il est à préciser qu'une partie de ces travaux a été réalisée en début de thèse avec l'aide du Dr. Lise Bréthous-Parmentier, chercheur post-doctoral au sein de l'équipe jusqu'en décembre 2014.

3. 4. Synthèse de la mycolactone A/B par une voie synthétique décrite dans la littérature

En vue de fournir à l'équipe de Demangel (institut Pasteur), la mycolactone A/B indispensable pour réaliser des tests biologiques, il a été envisagé de commencer avec notre intermédiaire de synthèse **173** et de suivre les stratégies décrites dans la littérature.

3.4.1. Synthèse de la mycolactone A/B à partir de l'intermédiaire 173

Initialement, la préparation de la mycolactone A/B a été initiée par l'étude de la première génération de synthèse décrite par Kishi entre 2001 et 2002.^{66a} En effet, à partir de l'intermédiaire **173**, issu de notre voie synthétique, l'étape de déplacement du tosylate par l'action de l'iodure de sodium a permis d'intercepter le dérivé iodé **18** du groupe de Kishi (Schéma 52, éq. 1). Parallèlement, l'iodure vinylique **21** a été formé par réaction d'hydrozirconation/iodolyse, en partant du dérivé **20-anti** précédemment préparé par le Dr. Lise Bréthous-Parmentier et suivant la procédure décrite par Kishi en 2010.^{66c} Bien que le réactif de Schwartz ait été préparé au laboratoire spécifiquement pour cette réaction, via le dichlorure de zirconocène en présence de Red-Al®,¹²⁴ le rendement de cette étape ne s'élève qu'à 39% après purification sur colonne de silice (Schéma 52, éq. 2).

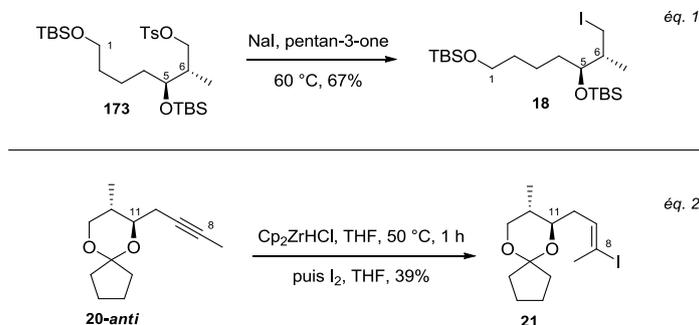


Schéma 52 : Synthèses des intermédiaires avancés **18** et **21**

Par la suite, la création de la liaison C7-C8 est réalisée à l'aide d'un couplage croisé de type Negishi entre les deux intermédiaires **18** et **21**, conduisant ainsi au fragment C1-C13 **25**. Un

enchaînement de protections/déprotections sélectives amène finalement au dérivé hydroxylé **219** avec un bon rendement global (Schéma 53).

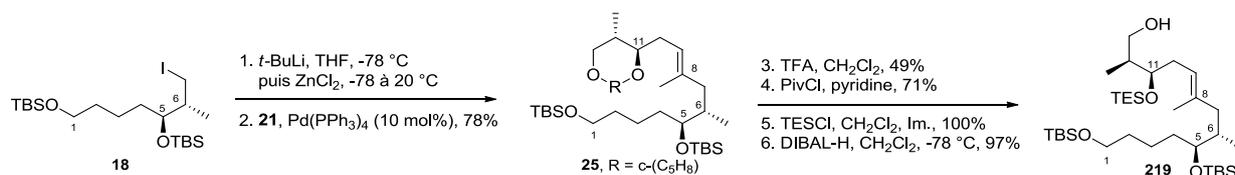


Schéma 53 : Synthèse de l'intermédiaire **219** par couplage croisé de type Negishi

Contrairement à la procédure décrite par Kishi, la transformation en une étape de **219** en son dérivé iodé **26** à l'aide d'une réaction de type Appel a conduit à la formation de produits de dégradation. Une stratégie en deux étapes a donc été employée afin de former l'iodure d'alkyle **26**, comme présenté sur le Schéma 54.

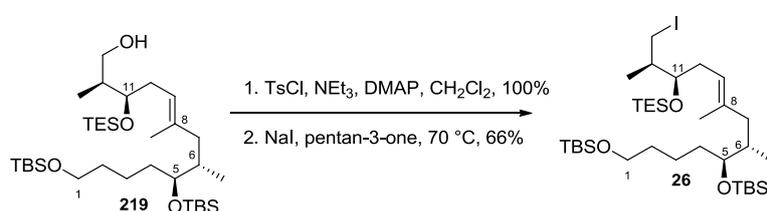


Schéma 54 : Synthèse de l'intermédiaire **26** par réaction de Finkelstein

L'intermédiaire **26** en main, l'extension du fragment linéaire jusqu'en C20 a ensuite été étudiée. Les premiers essais ont été réalisés dans les conditions de Kishi, à savoir par un couplage croisé de type Negishi avec la chaîne supérieure **50** (Schéma 55, éq. 1). Toutefois, les très faibles rendements obtenus, sur une étape pourtant décrite, nous ont déterminé à modifier complètement les conditions réactionnelles initiales. Ainsi, un couplage de type Suzuki, inspiré par les travaux d'Altmann,¹¹ a été exploité et a permis la formation de **221** avec un rendement de 48% sur deux étapes (Schéma 55, éq. 2). Bien que le rendement reste relativement modeste, il est à rappeler que ce couplage n'est pas initialement décrit sur l'intermédiaire acyclique mais sur la forme macrocyclique **97** (voir Chap. 1.3.6.1). Par conséquent, les conditions réactionnelles de cette étape restent à être optimisées.

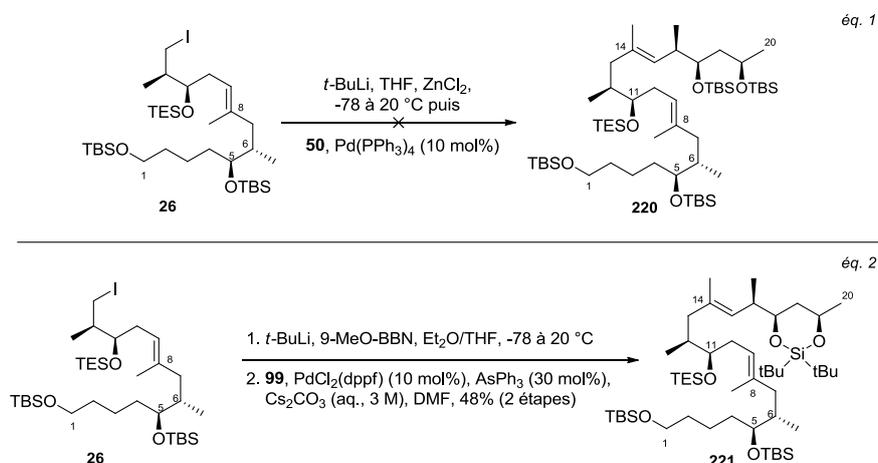


Schéma 55 : Essai de formation de l'intermédiaire **220** par réaction de couplage croisé de type Negishi (éq. 1) et synthèse de l'intermédiaire **221** par réaction de couplage croisé de type Suzuki (éq. 2)

Pour les étapes présentées Schéma 56, les conditions réactionnelles utilisées par le groupe de Negishi au cours de leur synthèse totale de la mycolactone A/B ont été reproduites.¹³ En effet, la structure de l'intermédiaire **221** se trouve être similaire à celle de la voie synthétique de Negishi. Par conséquent, le fragment linéaire C1-C20 **221** est dans un premier temps soumis à l'action de l'acide acétique afin de cliver sélectivement l'éther silylé en position C11. Puis, l'utilisation d'une solution de TBAF à une température constante de 0 °C permet la déprotection sélective de l'alcool primaire. Ce dernier subit ensuite une oxydation en deux temps, conduisant ainsi au séco-acide **222**. La fermeture de cycle a été réalisée dans les conditions de Yamaguchi, permettant la formation de la macrolactone **188** avec un rendement de 59%.

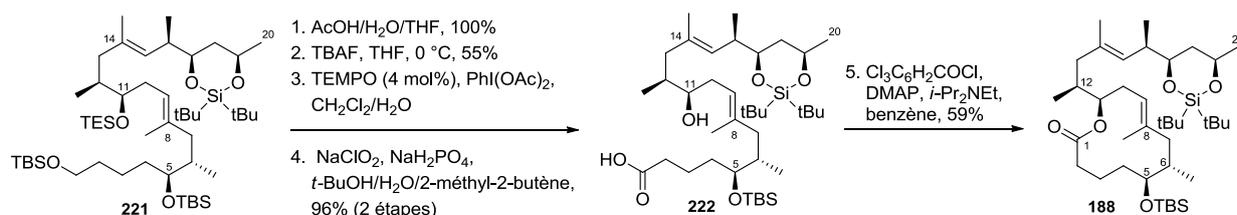


Schéma 56 : Synthèse de l'intermédiaire **188** par réaction de macrolactonisation

Or, la macrolactone **188** se trouve être un intermédiaire de la voie synthétique développée au cours de cette thèse. De ce fait, cette dernière est soumise aux conditions réactionnelles précédemment découvertes, à savoir la combinaison de l'acide acétique et de la résine sulfonique commerciale de type Dowex® (Schéma 57). Ainsi, le clivage sélectif de l'éther silylé en C5 permet la formation de **98** avec un rendement de 60% sur cette étape.

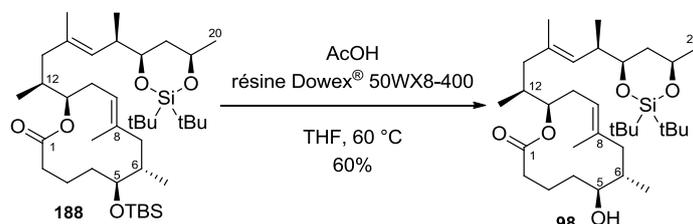


Schéma 57 : Synthèse de l'intermédiaire **98** par déprotection de l'alcool en position C5

Enfin, le fragment macrocyclique **98** a été estérifié avec la chaîne inférieure isomérisée dans les conditions de Yamaguchi. La mycolactone A/B totalement protégée **189** a alors été obtenue avec un rendement de 61% (Schéma 58). Malgré un rendement relativement correct, il est à préciser que les quantités engagées dans cette estérification étaient assez faibles. Par conséquent, seulement 4 mg de l'intermédiaire **189** ont été formés au cours de cette réaction. La déprotection des éthers silylés restants a été jugée comme délicate, et la poursuite de la synthèse vers l'obtention de la mycolactone A/B n'a donc pas été réalisée avec l'intermédiaire **189**.

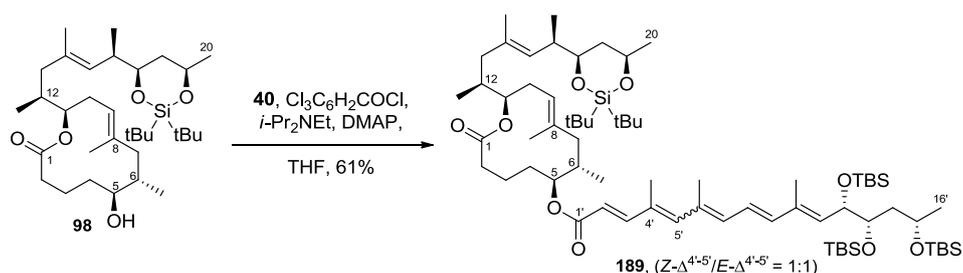


Schéma 58 : Synthèse de l'intermédiaire **189** par réaction d'estérification

Toutefois, considérant le souhait de nos collaborateurs de disposer de cette toxine rapidement, une collaboration avec le groupe d'Aggarwal a été constituée. En effet, bien qu'il ait été possible de recommencer la voie synthétique décrite dans les lignes précédentes, les circonstances nous ont dirigé vers la sollicitation d'Aggarwal, récemment impliqué dans la synthèse formelle de la mycolactone A/B (voir Chap. 1.3.7).^{66e}

3.4.2. Synthèse de la mycolactone A/B à partir de l'intermédiaire fourni par Aggarwal

En 2015, le groupe d'Aggarwal rapporte le développement d'une voie synthétique convergente et hautement stéréosélective, permettant un accès rapide au fragment C1-C20. De ce fait, une collaboration entre nos deux équipes semblait appropriée. Cette démarche a conduit à l'envoi, par Aggarwal à notre équipe, de 15 mg du fragment macrolactonique C1-C20 **28** dont la chaîne supérieure est protégée par un acétal et l'alcool C5 resté libre. Cet intermédiaire correspond à celui décrit par Kishi pour la première génération de sa synthèse totale.^{66a}

Ainsi, l'intermédiaire **28** a été engagé dans la réaction de couplage avec la chaîne inférieure à l'aide d'une estérification de Yamaguchi. La séquence de déprotection en deux étapes, décrite par Kishi, est ensuite appliquée. Ainsi, une première déprotection des éthers silylés de la chaîne inférieure est réalisée par l'action d'une solution de TBAF. Puis, le 1,3-diol de la chaîne supérieure est libéré de son acétonide par l'utilisation de conditions acides. Il est à préciser que le faible rendement obtenu sur cette dernière déprotection est attribué au manque de conversion totale. En effet, il est décrit que cette réaction ne peut être conduite jusqu'à la disparition complète du produit de départ sans la formation de produit de dégradation. Ainsi, 7,4 mg de mycolactone A/B et 6,3 mg de son précurseur ont été récupérés à l'issue de la réaction. Toutefois, cet intermédiaire n'a pas été engagé de nouveau dans l'étape de déprotection finale, mais a servi à d'autres expérimentations.

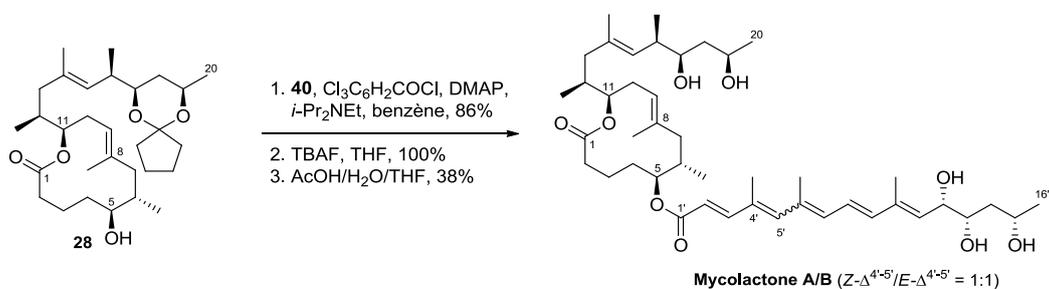


Schéma 59 : Etapes finales pour la préparation de la mycolactone A/B

La mycolactone A/B ainsi obtenue a été parfaitement caractérisée et répond au standard de pureté pour les tests biologiques. Cette dernière a alors été envoyée à l'institut Pasteur de Paris, en vue de nouvelles évaluations biologiques. Par ailleurs, afin d'évaluer l'activité biologique de l'analogue **216** et de la mycolactone synthétique issue de la nouvelle voie de synthèse, des échantillons des deux composés ont été envoyés à nos collaborateurs de l'institut Pasteur. Les examens biologiques de ces derniers sont présentés dans le sous-chapitre suivant.

3. 5. Evaluation biologique

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe « Unité d'Immunobiologie de l'Infection » (INSERM U1221) du Dr. Demangel de l'institut Pasteur de Paris, l'ensemble des composés synthétisés précédemment a été envoyé à l'institut Pasteur pour évaluation de leur activité biologique.

Pour rappel, il a été démontré que la présence de mycolactones dans l'organisme entraîne de nombreuses conséquences, se manifestant, entre autres, par la formation d'ulcères indolores. Bien que le mode d'action exact des mycolactones sur les cellules soit encore dans une phase exploratoire, deux effets biologiques principaux de ces toxines ont néanmoins été identifiés : un effet cytopathique et un effet immunosuppresseur.^{125,126} L'arrêt de la production de protéines (cytokines, chimiokines et autres) par les principaux acteurs de la réponse immunitaire et la perte d'adhésion cellulaire apparaît comme la cause de l'immunosuppression et de la nécrose des tissus.¹²⁷

Pour notre cas, seul l'effet immunosuppresseur de la toxine synthétique et des analogues produits au cours de ce projet de recherche a été analysé. Les résultats obtenus sont décrits dans les paragraphes suivants.

3.5.1. *Analyse de l'effet immunosuppresseur des composés synthétisés*

Les tests d'immunosuppression des composés préparés au laboratoire ont été effectués par le Dr. Laure Guenin-Macé, chercheur permanent au sein de l'équipe du Dr. Demangel de l'institut Pasteur. L'effet évalué au cours de ce test est la capacité de la mycolactone A/B et des analogues à bloquer la production d'IL-2 par des lymphocytes. Ainsi, le test de production d'interleukine-2, en présence de mycolactone A/B ou d'un des analogues, est effectué sur des lymphocytes de la lignée Jurkat (cellules T humaines). Les cellules sont traitées par la mycolactone A/B ou par les analogues pendant 30 minutes puis stimulées par un mélange PMA/calcimycine sur la nuit. La mesure de la production de cytokine IL-2 en réponse à la stimulation est effectuée par analyse du surnageant à l'aide d'un test ELISA (Enzym-Linked-Immuno Sorbent-Assay), comme présentée sur la Figure 19.

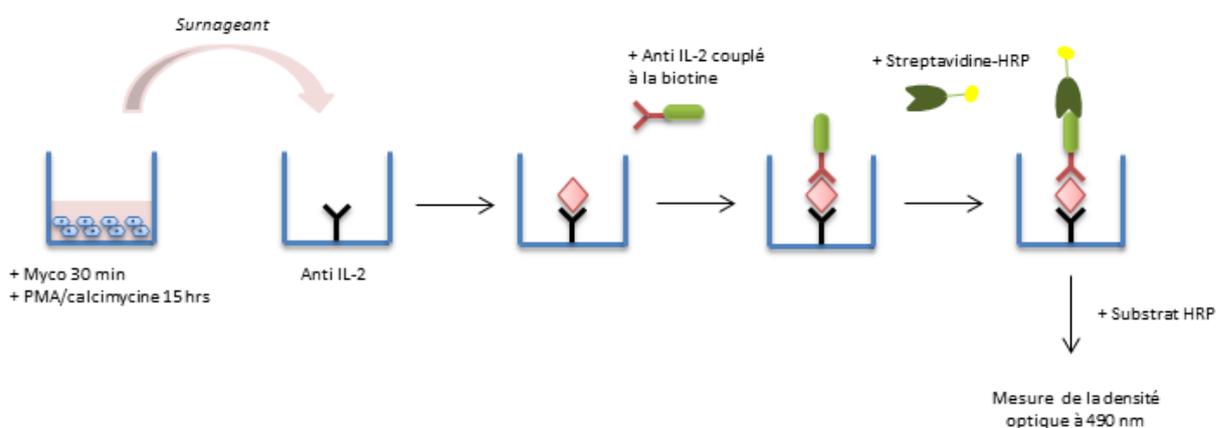


Figure 19 : Mesure de la production d'IL-2 par test ELISA

Les résultats obtenus au cours de ce test se sont révélés très satisfaisants. En effet, la Figure 20 indique que la mycolactone A/B synthétique en mélange de diastéréoisomères en position C12

égal à 8:2 et la mycolactone A/B synthétique stéréopure en C12 possèdent les mêmes activités biologiques au regard de ce test. Les points entre les courbes des deux mycolactone A/B synthétiques sont sensiblement identiques et affichent la très grande capacité de la toxine à inhiber la production d'interleukine-2. Toutefois, il est intéressant de remarquer que la mycolactone A/B issue de cultures de la mycobactérie (G5H5) possède une activité légèrement inférieure aux mycolactones synthétiques. Cet effet est dû à l'hétérogénéité des préparations obtenues et dont la purification est difficile. Ainsi, la nécessité de mycolactones synthétiques pour leur évaluation biologique est une nouvelle fois confirmée.

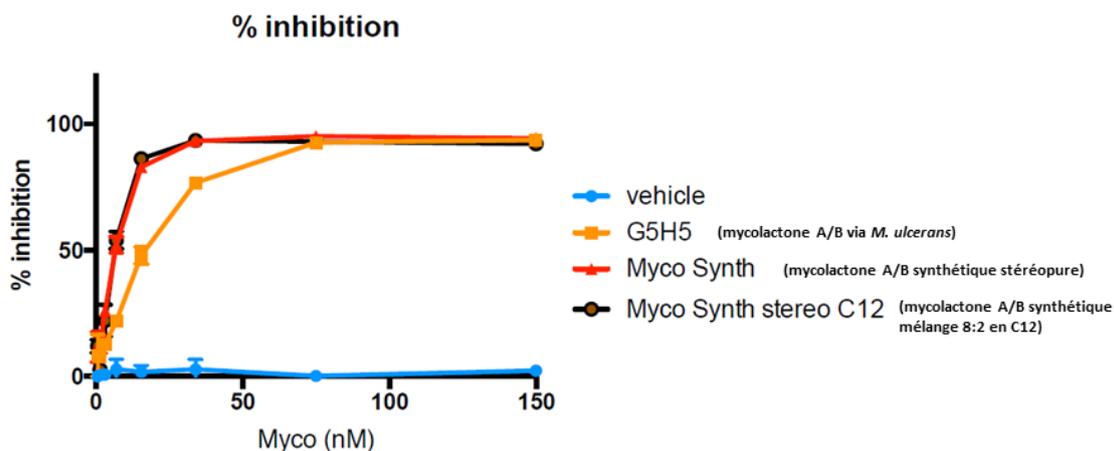


Figure 20 : Résultats du test de production d'IL-2 pour la mycolactone A/B

D'autre part, les évaluations biologiques des analogues de mycolactones tronqués en C13-C20 **140** et **216**, bien moins actifs que la toxine naturelle, signalent une perte d'activité lorsque la structure moléculaire est substituée par un méthyle en position C8 (Figure 21). En effet, l'analogue de mycolactones C8-desméthylé **140** montre une capacité d'inhibition de l'interleukine-2 deux fois supérieure à l'analogue disposant d'un groupement méthyle en position C8. Ce résultat inattendu pourrait s'expliquer par la présence d'interactions différentes de l'analogue **216** au sein de la cible biologique cellulaire, défavorisant l'inhibition de la production d'interleukine. Le méthyle positionné en C8 sur les structures tronquées pourrait avoir un rôle dans la transduction du signal conduisant à la synthèse d'IL-2. Par ailleurs, la conformation structurelle des deux macrocycles de **140** et **216** étant similaire et parfaitement superposable, cette dernière ne peut pas être mise en cause dans la baisse d'activité biologique de **216** (Figure 22). Cette étude des analyses conformationnelles des fragments macrocycliques **126** et **155** a été réalisée par le Dr. Stéphane Bourg (université d'Orléans) par la méthode MCMM (Monte Carlo Multiple Minimum) dans le cadre de la thèse du Dr. Anne-Caroline Chany.

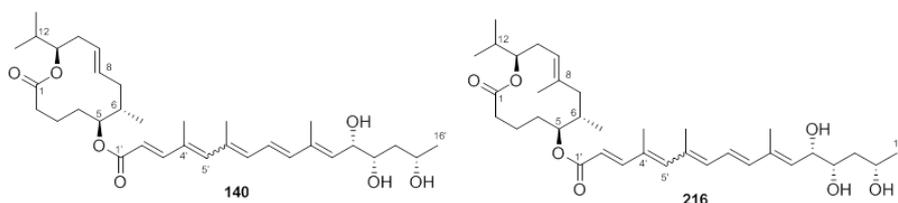
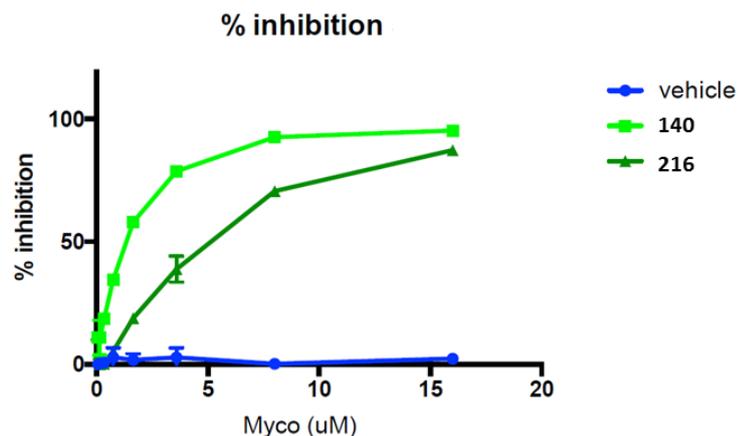


Figure 21 : Résultats du test de production d'IL-2 pour les analogues tronqués de mycolactones

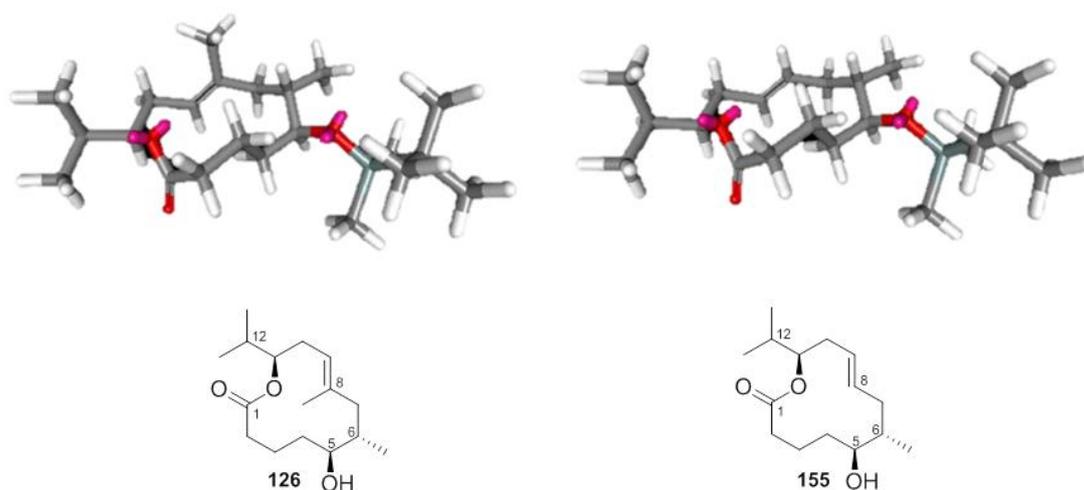


Figure 22 : Analyse conformationnelle des macrocycles 126 et 155

Par conséquent, l'analyse des différents résultats obtenus au cours de ces tests démontre la supériorité des composés synthétiques pour les études biologiques, en comparaison à ceux issus de cultures de bactérie, dans le cas de *M. ulcerans*. Par ailleurs, il est permis de conserver une activité biologique semblable à la mycolactone stéréopure en C12 en ayant un mélange de diastéréoisomères équivalent à 80:20 en position C12. Le caractère secondaire de la partie supérieure ayant subi de légères modifications de la toxine naturelle pour l'activité biologique est une nouvelle fois mis à jour. De plus, ces analyses ont souligné le rôle du groupement méthyle en position C8 dans la capacité de la structure tronquée à inhiber la production de protéines régulatrice de la réponse immunitaire, telle que l'interleukine-2.

En parallèle à ces études, l'équipe de Demangel de l'institut Pasteur nous a sollicité afin de leur fournir de nouveaux composés essentiels pour des contrôles négatifs de résultats biologiques. Ces derniers, qui ont fait l'objet des mêmes tests ELISA décrits précédemment, sont présentés dans le sous-paragraphe suivant.

3.5.2. Analyse de l'effet immunosuppresseur de deux composés saturés pour un contrôle négatif

Afin de valider un résultat biologique sur l'immunosuppression, dont les données ne sont pas encore rapportées dans la littérature, nous avons également fourni à nos collaborateurs de l'institut Pasteur un analogue saturé de l'analogue fluorescent **124**. En une seule étape, le composé **223** a été obtenu par hydrogénation directe de **124** à l'aide de palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. En effet, plusieurs groupes rapportent la réduction de groupes fonctionnels sur des molécules qui possèdent un fluorophore de type BODIPY en utilisant les conditions d'hydrogénation standard (10% Pd/C, H₂) sans qu'aucune décomposition du fluorophore ne soit observée.¹²⁸ Néanmoins, il est à noter que l'hydrogénation totale n'a été effectuée qu'à hauteur de 33%. En effet, le produit totalement saturé désiré est obtenu en mélange avec 48% de mono-alcène et de di-alcène en plus faible quantité (19%), composition quantifiée par analyses par spectrométrie de masse. Comme démontré sur la Figure 23, cet analogue constitue un contrôle négatif pour les tests sur la production d'interleukine-2 : la mycolactone naturelle (isolée par culture ou synthétique) bloque efficacement la production d'IL-2 de même que le composé **124** dans une certaine mesure. Au contraire, l'analogue saturé **223** se trouve être totalement inactif et permet de conserver une concentration en IL-2 constante malgré l'accumulation de la molécule dans le milieu.

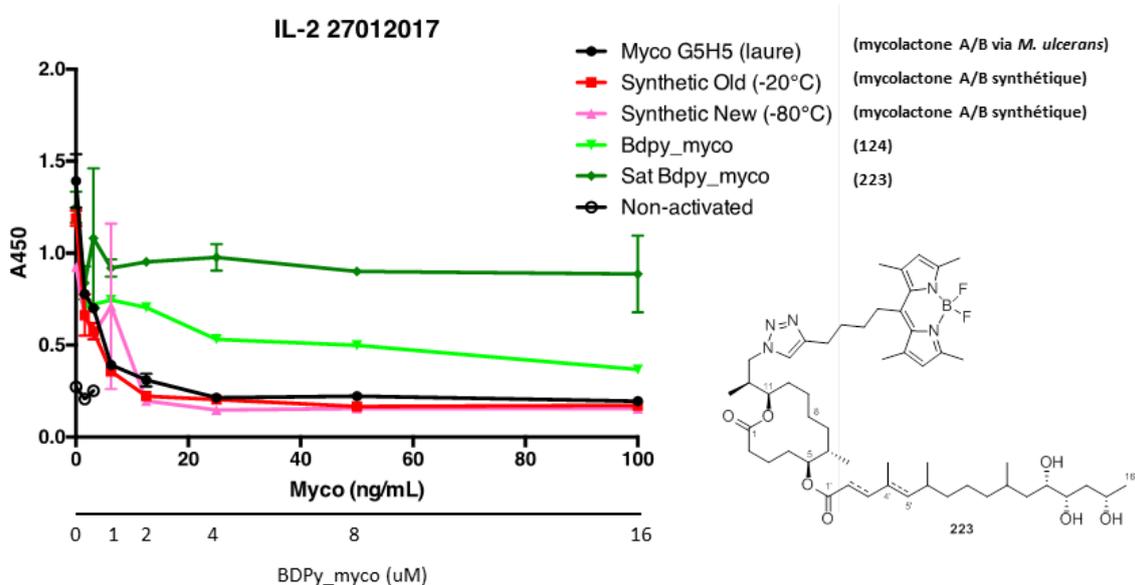


Figure 23 : Contrôle négatif réalisé à l'aide de l'analogue fluorescent saturé de mycolactones **223**

Cette stratégie a également été adoptée sur la mycolactone A/B synthétique obtenue à partir de l'intermédiaire de synthèse fourni par l'équipe d'Aggarwal. L'application des conditions standards d'hydrogénation (10% Pd/C, H₂) sur une période de 15 heures a permis l'obtention de la mycolactone entièrement saturée **224**. Pour ce contrôle de l'activité de production d'IL-2, la version saturée est encore une fois inactive, contrairement à la mycolactone A/B synthétique (Figure 24). En effet, la

concentration d'interleukine-2 est amenée à son minimum à l'aide d'une très faible quantité de mycolactone A/B, tandis que cette concentration en IL-2 reste constante malgré une augmentation de composé saturé **224** dans le milieu.

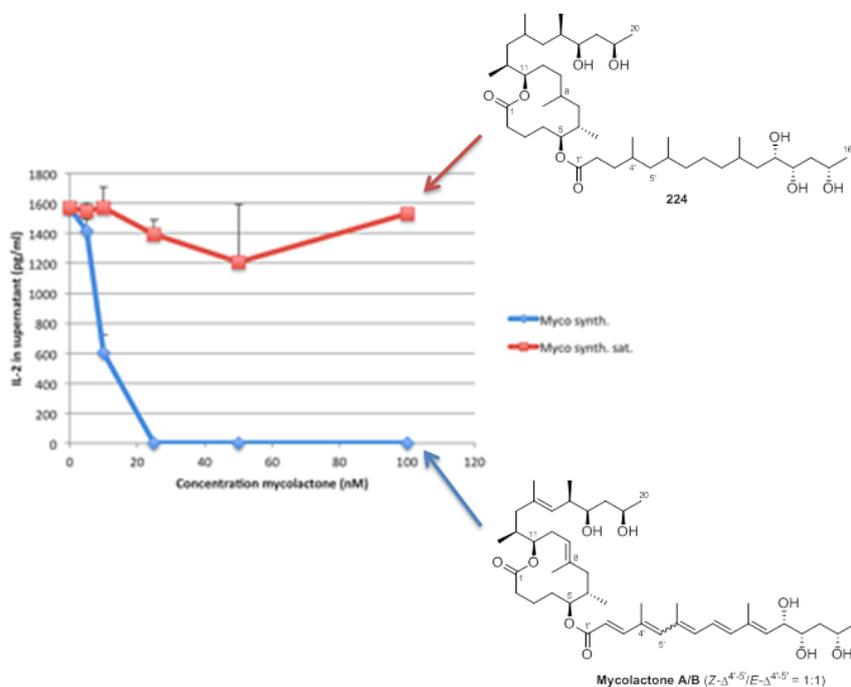


Figure 24 : Contrôle négatif réalisé à l'aide de l'analogue saturé de mycolactones **224**

3. 6. Conclusion

Au cours de cette thèse, une nouvelle approche de la synthèse totale de la mycolactone A/B a été mise au point. Plus précisément, une route alternative et générale pour l'accès au fragment macrocyclique a été étudiée, conduisant finalement à la toxine naturelle ainsi qu'à plusieurs de ces analogues. A partir du (S)-ester de Roche comme socle chiral, la construction stéréosélective du cœur des mycolactones est fondée sur diverses réactions clés, telles que la réaction de bromoallylation (Z)-sélective, la dihydroxylation asymétrique de Sharpless ou encore l'hydroboration diastéréosélective. Considérant la nécessité pour les biologistes de posséder la mycolactone A/B en quantités suffisantes en vue d'essais biologiques, une première voie a été initialement développée et optimisée pour la synthèse de la toxine naturelle. Il a ensuite été prouvé que cette nouvelle voie synthétique se trouvait être très modulaire. En effet, l'accès aux analogues possédant des points de diversification en C8 et C12 est facilité par l'utilisation de cette même voie synthétique (Schéma 60). En s'appuyant sur l'intermédiaire clé **169**, toutes les étapes ont été totalement transposées à la synthèse du fragment macrocyclique bromé **190**, permettant alors de réaliser des modulations structurales à une phase tardive de la synthèse. La voie originale et flexible ainsi développée a permis l'accès à la mycolactone A/B et à l'analogue **216**, les modulations en position C8 étant encore en cours au laboratoire.

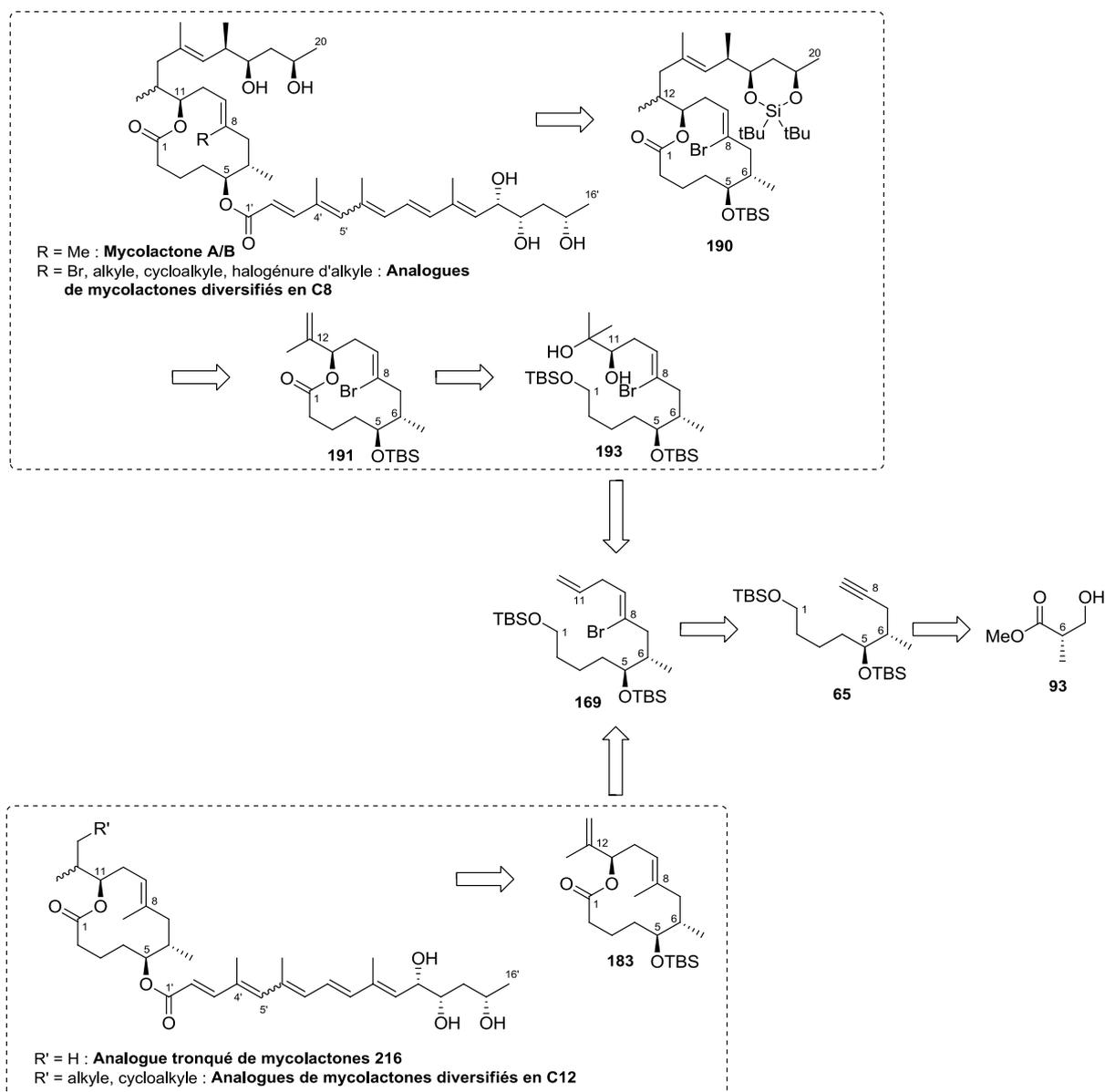


Schéma 60 : Diversités structurales accessibles avec la voie synthétique développée

L'évaluation biologique des composés synthétisés à l'aide de cette voie de synthèse ont révélé deux points importants. La première étant la possibilité de former une mycolactone A/B présentant un mélange de diastéréoisomères équivalent à 8:2 en position C12 tout en conservant une activité biologique identique à la toxine naturelle stéréopure en C12. Par ailleurs, l'étude biologique de l'analogue **216** démontre le rôle mineur joué par le groupement méthyle en position C8 dans l'effet immunosuppresseur observé lors de l'infection par *M. ulcerans*.

Il est à souligner que les diverses tentatives infructueuses et les résultats imprévus nous ont permis d'explorer plusieurs approches pour installer les groupes fonctionnels d'intérêts à l'aide de réactions régio- et stéréocontrôlées. A titre d'exemple, la réaction d'hydroboration diastéréosélective initialement réalisée en conditions thermiques sur un intermédiaire acyclique mais dont le manque crucial de réactivité nous a conduit à l'utilisation d'ultrasons sur le système contraint macrocyclique. L'importance des effets électroniques, stériques et conformationnels a également été distinguée tout au long du développement de la nouvelle voie synthétique. Le manque de stabilité de

l'intermédiaire possédant un groupement de type vinyl-bromé a été perçue seulement sous sa forme macrocyclique **190**. De plus, les différences importantes de réactivité ont été observées pour le couplage croisé de Negishi de l'intermédiaire bromé sous la forme acyclique **177** ou cyclique **190**, le premier montrant une conversion totale après 15 heures de réactions tandis que l'autre n'en présentait que 55% sur la même période (Schéma 61).

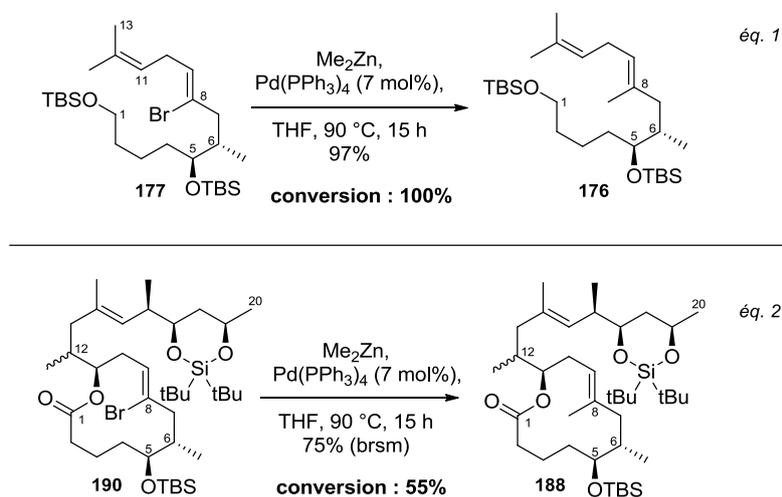


Schéma 61 : Réactions de couplage croisé de type Negishi sur l'intermédiaire **177** (éq. 1) et l'intermédiaire **190** (éq. 2)

Par ailleurs, Les conditions de la réaction de dihydroxylation asymétrique ont également été particulièrement étudiées, permettant ainsi la suppression de la formation du produit d'élimination. L'observation du milieu réactionnel, l'étude de la formation des produits secondaires ainsi que la compréhension des mécanismes réactionnels et des états de transition ont été les facteurs clés pour le développement efficace de la synthèse totale de la mycolactone A/B et de ses analogues.

3. 7. Références

- ¹ N. Scherr, P. Gersbach, J.-P. Dangy, C. Bomio, J. Li, K.-H. Altmann, G. Pluschke, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2143.
- ² A.-C. Chany, R. Veyron-Churlet, C. Tresse, V. Mayau, V. Casarotto, F. Le Chevalier, L. Guénin-Macé, C. Demangel, N. Blanchard, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7382-7395.
- ³ A.-C. Chany, V. Casarotto, M. Schmitt, C. Tarnus, L. Guenin-Macé, C. Demangel, O. Mirguet, J. Eustache, N. Blanchard, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14413-14419.
- ⁴ K. M. George, L. Pascopella, D. M. Welty, P. L. Small, *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 877-883.
- ⁵ L. Guenin-Mace, R. Veyron-Churlet, M. I. Thoulouze, G. Romet-Lemonne, H. Hong, P. F. Leadlay, A. Danckaert, M. T. Ruf, S. Mostowy, C. Zurzolo, P. Bouso, F. Chretien, M. F. Carlier, C. Demangel, *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 1501-15012.
- ⁶ E. E. Carlson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 639-653.
- ⁷ R. Bieri, N. Scherr, M.-T. Ruf, J.-P. Dangy, P. Gersbach, M. Gehringer, K.-H. Altmann, G. Pluschke, *ACS Chem. Bio.* **2017**, *12*, 1297-1307.
- ⁸ L. Baron, A. O. Paatero, J.-D. Morel, F. Impens, L. Guenin-Macé, S. Saint-Auret, N. Blanchard, R. Dillmann, F. Niang, S. Pellegrini, J. Taunton, V. O. Paavilainen, C. Demangel, *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 2885-2896.
- ⁹ a) M. Mc Kenna, R. E. Simmonds, S. High, *J. Cell. Sci.* **2016**, *129*, 1404-1415. b) M. McKenna, R. E. Simmonds, S. High, *J. Cell. Sci.* **2017**, *130*, 1307-1320.
- ¹⁰ E. Marion, O. R. Song, T. Christophe, J. Babonneau, D. Fenistein, J. Eyer, F. Letournel, D. Henrion, N. Clere, V. Paille, N. C. Guérineau, J.-P. Saint André, P. Gersbach, K.-H. Altmann, T. Stinear, Y. Comoglio, G. Sandoz, L. Preisser, Y. Delneste, E. Yeramian, L. Marsollier, P. Brodin, *Cell* **2014**, *157*, 1565-1576.
- ¹¹ a) P. Gersbach, A. Jantsch, F. Feyen, N. Scherr, J.-P. Dangy, G. Pluschke, K.-H. Altmann, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13017-13031. b) Pour les études préliminaires de 2007, voir : F. Feyen, A. Jantsch, K. H. Altmann, *Synlett* **2007**, 415-418.
- ¹² F. Song, S. Fidanze, A. B. Benowitz, Y. Kishi, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5739-5753.
- ¹³ a) G. W. Wang, N. Yin, E. Negishi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4118-4130. b) Pour les études préliminaires de 2006, voir : N. Yin, G. Wang, M. X. Qian, E. Negishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2916-2920.
- ¹⁴ a) U. S. Racherla, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 401-404. b) H. C. Brown, K. S. Bhat, R. S. Randad, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 319-320. c) H. C. Brown, P. K. Jadhav, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2092-2093.
- ¹⁵ V. Voorhees, R. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1922**, *44*, 1397-1405.
- ¹⁶ a) K. Kaneda, T. Uchiyama, Y. Fujiwara, T. Imanaka, S. Teranishi, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 55-63. b) V. H. Rawal, A. N. Thadani, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4317-4320.
- ¹⁷ H. Zhao, A. Ariafard, Z. Lin, *Organometallics* **2006**, *25*, 812-819.
- ¹⁸ a) A. O. King, N. Okukado, E. Negishi, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1977**, 683-684. b) E. Negishi, N. Okukado, A. O. King, D. E. Van Horn, B. I. Spiegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2254-2256.
- ¹⁹ X. Zeng, Q. Hu, M. Qian, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13636-13637.
- ²⁰ C. J. Morten, T. F. Jamison, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6678-6679.
- ²¹ P. Wender, A. J. Schrier, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9228-9231.
- ²² V. VanRheenen, R.C. Kelly, D. Y. Cha, *Tetrahedron* **1976**, *17*, 1973-1976.
- ²³ K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771.
- ²⁴ M. H. Junttila, O. O. E. Hormi, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3038-3047.
- ²⁵ R. Criegee, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1931**, *64*, 260-266.
- ²⁶ a) B. D. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156. b) B. D. Dess, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277-7287. c) M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.
- ²⁷ J. S. Clark, R. Berger, S. T. Hayes, H. M. Senn, L. J. Farrugia, L. H. Thomas, A. Morrison, L. Gobbi, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 673-696.
- ²⁸ a) E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5551-5553. b) E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata, C. Pin Chen, V. K. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7925-7926. c) J. Matsuo, T. Kozai, O. Nishikawa, Y. Hattori, H. Ishibashi, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6902-6904.
- ²⁹ a) E. J. Corey, C. J. Helal, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9153-9156. b) E. J. Corey, C. J. Helal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1987-2012.

- ³⁰ a) J. Mulzer, S. Dupré, J. Buschmann, P. Luger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1452-1454. b) H.-G. Schmalz, M. Arnold, J. Hollander, J. W. Bats, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 109-111. c) K. C. Nicolaou, R. J. Aversa, J. Jin, F. Rivas, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6855-6851. d) A. K. Ghosh, L. A. Kassekert, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 3274-3277.
- ³¹ J. A., Burlison, L. Neckers, A. B. Smith, A. Maxwell, B. S. J. Blagg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15529-15536.
- ³² a) W. A. Nugent, T. V. RajanBabu, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8561-8562. b) T. V. RajanBabu, W. A. Nugent, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4525-4527. c) T. V. RajanBabu, W. A. Nugent, M. S. Beattie, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6408-6409. d) T. V. RajanBabu, W. A. Nugent, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 986-997.
- ³³ J. Justicia, T. Jiménez, S. P. Morcillo, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10837-10841.
- ³⁴ a) Y. Tu, Z.-X. Wang, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9806-9807. b) Z.-X. Wang, W. Tu, M. Frohn, J.-R. Zhang, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11224-11235. c) M. Frohn, Y. Shi, *Synthesis* **2000**, *14*, 1979-2000. d) Z. Xiong, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4831-4832. e) G. L. Simpson, T. P. Heffron, E. Merino, T. F. Jamison, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1056-1057.
- ³⁵ Pour exemple, le catalyseur de Jacobsen est préférentiellement utilisé sur des alcènes 1,2-disubstitués de configuration *cis*. Voir : a) W. Zhang, J. L. Loebach, S. R. Wilson, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2801-2803. b) E. N. Jacobsen, W. Zhang, A. R. Muci, J. R. Ecker, L. Deng, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7063-7064. c) T. Linker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2060-2062.
- ³⁶ H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483-2547.
- ³⁷ a) J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-519. b) T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2451-2458.
- ³⁸ J. S. Yadav, S. V. Mysorekar, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 1057-1060.
- ³⁹ a) N. A. Petasis, M. A. Patane, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6799-6802. b) A. García-Granados, A. Martínez, A. Parra, F. Rivas, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1091-1102. c) X.-D. Zhou, W.-S. Zhou, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8291-8296.
- ⁴⁰ a) G. Darzens, *C. R. Acad. Sci.* **1911**, *152*, 1601-1603. a) M. S. Newman, A. Arkell, T. Fukunaga, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2498-2501. b) J. K. Stille, F. M. Sonnenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4915-4921.
- ⁴¹ H. C. Brown, S. Rao, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5694-5695.
- ⁴² a) R. Wilczynski, L. G. Sneddon, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *103*, 2857-2858. b) T. Hayashi, Y. Matsumoto, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3426-3428. c) S. A. Westcott, N. J. Taylor, T. B. Marder, R. T. Baker, N. J. Jones, J. C. Calabrese, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 304-305. d) K. Burgess, M. Jaspars, *Organometallics* **1993**, *12*, 4197-4200. e) C. M. Crudden, D. Edwards, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4695-4712. f) K. Endo, M. Hirokami, T. Shibata, *Organometallics* **2008**, *27*, 5390-5393. g) D. Noh, H. Chea, J. Ju, J. Yun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6062-6064.
- ⁴³ a) H. C. Brown, S. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5249-5255. b) C. Lane, G. W. Kabalka, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 981-990.
- ⁴⁴ a) E. F. Knights, H. C. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5280-5281. b) H. C. Brown, E. Knights, C. Scouten, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7765-7770. c) H. C. Brown, S. Krishnamurthy, M. N. Yoon, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1778-1791.
- ⁴⁵ a) M. T. Crimmins, R. O'Mahony, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5993-5996. b) K. Hirano, H. Yorimitsu, K. Oshima, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1541-1544. c) T. J. A. Graham, T. H. Poole, C. N. Reese, B. C. Goess, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4132-4138. d) D. O. Baumann, K. M. McGowan, N. Kedei, M. L. Peach, P. M. Blumberg, G. E. Keck, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7862-7883.
- ⁴⁶ H. C. Brown, R. Liotta, C. G. Scouten, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5297-5301.
- ⁴⁷ L. C. Vishwakarma, A. Fry, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5306-5308.
- ⁴⁸ G. D. Graham, S. C. Freilich, W. N. Lipscomb, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *103*, 2546-2552.
- ⁴⁹ H. C. Brown, C. Scouten, R. Liotta, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 96-99.
- ⁵⁰ H. C. Brown, *Organic Syntheses via Boranes*. Ed. Wiley-Interscience, New York, 1975.
- ⁵¹ D. Seyfert, *Prog. Inorg. Chem.* **1962**, *3*, 210.
- ⁵² A. Streitwieser, L. Verbit, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 1530-1532.
- ⁵³ D. J. Pasto, S. Z. Kang, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3797-3800.
- ⁵⁴ S. Nagase, N. K. Ray, K. Morokuma, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4536-4537.
- ⁵⁵ a) W. C. Still, J. C. Barrish, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2487-2489. b) H. C. Brown, G. Zweifel, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4708-4712. c) R. W. Hoffmann, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1841-1860.
- ⁵⁶ K. N. Houk, N. G. Rondan, Y.-D. Wu, J. T. Metz, M. N. Paddon-Row, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 2257-2274.
- ⁵⁷ M. M. Midland, Y. C. Kwon, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3725-3727.
- ⁵⁸ a) D. A. Evans, A. M. Ratz, B. E. Huff, G. S. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3448-3467. b) P. K. Park, S. J. O'Malley, D. R. Schmidt, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2796-2797. c) K. A. Parker, H. Cao, *Org.*

- Letts*. **2006**, *8*, 3541-3544. d) I. Paterson, A. D. Findlay, E. A. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6699-6702.
- ⁵⁹ a) A. Z. Gonzalez, J. G. Román, E. Gonzales, J. Martinez, J. R. Medina, K. Maton, J. A. Soderquist, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9218-9219. b) S. P. Thomas, V. K. Aggarwal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1896-1898. c) C. Mazet, D. Gérard, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 298-300. d) J.-H. Chen, T. Xi, Z. Lu, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6452-6455. e) L. Zhang, Z. Zuo, X. Wan, Z. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15501-15504. f) H. Zhang, Z. Lu, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 6596-6600.
- ⁶⁰ a) J. Bach, R. Berenguer, J. Garcia, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3425-3428. b) P. Phukan, S. Sasmal, M. E. Maier, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1733-1740. c) Y. Shin, J.-H. Fournier, A. Brückner, C. Madiraju, R. Balachandran, B. S. Raccor, M. C. Edler, E. Hamel, R. P. Sikorski, A. Vogt, B. W. Day, D. P. Curran, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8537-8562. d) D. G. Shklyaruck, *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25*, 644-649.
- ⁶¹ a) H. C. Brown, R. L. Sharp, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5851-5854. b) P. G. Gassman, J. L. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2822-2830. c) H. O. House, D. G. Melillo, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1398-1403. d) J. W. Wilt, V. P. Narutis, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4899-4905. e) G. Zweifel, M. R. Najafi, S. Rajagopalan, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1895-1897. f) M. C. Welch, T. A. Bryson, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 523-526. g) J. S. Panek, F. Xu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5288-5290.
- ⁶² A. H. Hoveyda, D. A. Evans, G. C. Fu, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1307-1370.
- ⁶³ W. C. Still, I. Galynker, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 3981-3996.
- ⁶⁴ A. De Mico, R. Margarita, L. Parlanti, A. Vescovi, G. Piancatelli, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6974-6977.
- ⁶⁵ a) B. O. Lindgren, T. Nilsson, *Acta Chem. Scand.* **1973**, *27*, 888-890. b) G. A. Kraus, B. Roth, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4825-4830. c) B. S. Bal, W. E. Childers, H. W. Pinnick, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091-2096.
- ⁶⁶ a) F. Song, S. Fidanze, A. B. Benowitz, Y. Kishi, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 647-650. b) F. Song, S. Fidanze, A. B. Benowitz, Y. Kishi, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5739-5753. c) K. L. Jackson, W. J. Li, C. L. Chen, Y. Kishi, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2263-2272. d) G. W. Wang, N. Yin, E. Negishi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4118-4130. e) C. A. Brown, V. K. Aggarwal, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 1-5.
- ⁶⁷ J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989-1993.
- ⁶⁸ G. W. Kabalka, T. M. Shoup, N. M. Goudgaon, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5930-5933.
- ⁶⁹ J. A. Soderquist, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4599-4600.
- ⁷⁰ R. Köster, *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 626-627.
- ⁷¹ a) J. A. Soderquist, I. Kock, M. E. Estrella, *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 1076-1079. b) A. B. Smith, A. H. Davulcu, L. Kürti, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1665-1668. c) I. Hayakawa, M. Ueda, M. Yamaura, Y. Ikeda, Y. Suzuki, K. Yoshizato, H. Kigoshi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1859-1862.
- ⁷² H. C. Brown, U. S. Racherla, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2187-2190.
- ⁷³ T. J. Mason, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 443-451.
- ⁷⁴ a) D. Sawada, M. Kanai, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10521-10532. b) J. E. Baldwin, D. A. James, V. Lee, *Tetrahedron* **2000**, *41*, 733-736. c) F. Yokokawaa, T. Asanoa, T. Okinob, W. H. Gerwickc, T. Shioirid, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6859-6880.
- ⁷⁵ Un essai de réaction d'hydroboration sous ultrasons avec un bain à température contrôlée à 25 °C a été réalisé, conduisant au même excès diastéréomérique.
- ⁷⁶ Afin de schématiser le mélange de diastéréoisomères, l'utilisation de liaison ondulée en C12 sera conservée pour la suite de l'étude.
- ⁷⁷ A. Rauk, I. R. Hunt, B. A. Keay, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6808-6816.
- ⁷⁸ M. N. Paddon-Row, H. K. Patney, R. N. Warrener, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3908-3917.
- ⁷⁹ D. A. Evans, G. C. Fu, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6917-6918.
- ⁸⁰ E. J. Corey, P.L.Fuchs, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 3769-3772.
- ⁸¹ D. W. Hart, J. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8115-8116.
- ⁸² Des essais de réaction d'hydrozirconation, réalisés par le Dr. Lise Bréthous-Parmentier (chercheur post-doctoral au sein de l'équipe en 2014), avec un réactif de Schwartz préparé en laboratoire a également conduit à des faibles rendements.
- ⁸³ S. R. Chemler, D. Trauner, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4544-4568.
- ⁸⁴ a) N. Miyaura, K. Yamada, H. Suginome, A. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 972-980. b) N. Miyaura, T. Ishiyama, H. Sasaki, M. Ishikawa, M. Satoh, A. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 314-321. c) T. Ishiyama, K. Nishijima, N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7219-7225.
- ⁸⁵ A. J. J. Lennox, G. C. Lloyd-Jones, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7362-7370.
- ⁸⁶ a) J.-i. Uenishi, J.-M. Beau, R. W. Armstrong, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4756-4758. b) S. A. Frank, H. Chen, R. K. Kunz, M. J. Schnaderbeck, W. R. Roush, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2691-2694.

- ⁸⁷ a) A. Fürstner, I. Konetzki, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15071-15078. b) A. Fürstner, I. Konetzki, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3072-3080.
- ⁸⁸ I. Paterson, P. Maltas, S. M. Dalby, J. H. Lim, E. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2749-2753.
- ⁸⁹ C. B. Lee, Z. Wu, F. Zhang, M. Chappell, S. Stachel, T.-C. Chou, Y. Guan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5249-5259.
- ⁹⁰ M. D. Alexander, S. D. Fontaine, J. J. La Clair, A. G. Dipasquale, A. L. Rheingold, M. D. Burkart, *Chem. Commun.* **2006**, 4602-4604.
- ⁹¹ K. Ko, M. D. Alexander, S. D. Fontaine, J. E. Biggs-Houck, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5159-5165.
- ⁹² A. Fürstner, J.-A. Funel, M. Tremblay, L. C. Bouchez, C. Nevado, M. Waser, J. Ackerstaff, C. C. Stimson, *Chem. Commun.* **2008**, 2873-2875.
- ⁹³ V. Farina, S. Kapadia, B. Krishnan, C. Wang, L. S. Liebeskind, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5905-5911.
- ⁹⁴ Voir la fiche de sécurité de l'AD-mix disponible sur <http://www.sigmaaldrich.com>
- ⁹⁵ a) J. A. Bodkin, E. J. Humphries, M. D. McLeod, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2869-2872. b) Q. I. Churches, J. M. White, C. A. Hutton, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2900-2903.
- ⁹⁶ Y. Ogino, H. Chen, H.-L. Kwong, K. B. Sharpless, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3965-3968.
- ⁹⁷ T. Tsuji, Palladium reagents and catalysts: innovation in organic syntheses. John Wiley and Sons Ltd.: Chichester, England, 1995.
- ⁹⁸ W. Tsang, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 2812-2817.
- ⁹⁹ a) G. C. Nwokogu, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3263-3266. b) G. C. Nwokogu, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3900-3908.
- ¹⁰⁰ K. Yamamoto, C. H. Heathcock, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1709-1712.
- ¹⁰¹ E. Cormer, M. G. Organ, S. J. Hynes, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16087-16092.
- ¹⁰² a) H. Wai Lam, G. Pattenden, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 508-511. b) L. Commeiras, J. Bourdron, S. Douillard, P. Barbier, N. Vanthuyne, V. Peyrot, J.-L. Parrain, *Synthesis* **2006**, *1*, 166-181.
- ¹⁰³ J. Hoecker, K. Gademann, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 670-673.
- ¹⁰⁴ D. Nelson, P. J. Cooper, R. Soundararajan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1414-1418.
- ¹⁰⁵ N. Miyaura, M. Ishikawa, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2571-2574.
- ¹⁰⁶ A. Klapars, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14844-14845.
- ¹⁰⁷ R. Martín, M. Rodríguez Rivero, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7079-7082.
- ¹⁰⁸ a) J. Inanaga, Y. Kawanami, M. Yamaguchi, *Chem. Lett.* **1981**, *10*, 1415-1418. b) V. V. Vintonyak, M. Calà, F. Lay, B. Kunze, F. Sasse, M. E. Maier, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3709-3720. c) J. Heppekausen, R. Stade, R. Goddard, A. Fürstner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11045-11057.
- ¹⁰⁹ D. T. Hung, J. B. Nerenberg, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11054-11080.
- ¹¹⁰ U. Klar, W. Skuballa, B. Buchmann, W. Schwede, T. Bunte, J. Hoffmann, R. B. Lichtner, Synthesis and Biological Activity of Epothilones Syntheses of Epothilone B and D Analogs. In *ACS Symposium Series Vol. 796*. I. Ojima, G. D. Vite, K.-H. Altmann Eds., American Chemical Society **2001**, 131-147.
- ¹¹¹ S. Ho, D. L. Sackett, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14047-14050.
- ¹¹² a) B. H. Lipshutz, M. R. Wood, R. Tirado, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6126-6127 b) P. Villiers, N. Vicart, Y. Ramondenc, G. Plé, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 561-574. c) Y. Kinoshita, S. Kanehira, Y. Hayashi, T. Harada, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3311-3314.
- ¹¹³ a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021. b) J. E. Hein, V. V. Folkin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315.
- ¹¹⁴ Les essais ont été réalisés avec l'aide du doctorant David Dailler en dernière année de ses études doctorales dans l'équipe du Prof. Baudoin à l'université de Bâle (Suisse).
- ¹¹⁵ C. Wang, T. Tobrman, Z. Xu, E.-i. Negishi, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4092-4095.
- ¹¹⁶ M. G. Organ, G. A. Chass, D.-C. Fang, A. C. Hopkinson, C. Valente, *Synthesis* **2008**, *17*, 2776-2797.
- ¹¹⁷ A. Krasovskiy, B. H. Lipshutz, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3818-3821.
- ¹¹⁸ a) V. B. Phapale, D. J. Cárdenas, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1598-1607. b) L. Melzig, T. Dennenwaldt, A. Gavryushin, P. Knochel, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8891-8906.
- ¹¹⁹ a) M. J. Rozema, A. R. Sidduri, P. Knochel, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1956-1958. b) M. J. Rozema, C. Eisenberg, H. Lütjens, R. Ostwald, K. Belyk, P. Knochel, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3225-3118.
- ¹²⁰ a) S. Wiedemann, I. Marek, A. de Meijere, *Synlett* **2002**, *6*, 879-882. b) G. R. Stanton, C. N. Johnson, P. J. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4399-4408.
- ¹²¹ Volume calculé sur www.molinspiration.com
- ¹²² A. G. Myers, S. D. Goldberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2732-2735.

-
- ¹²³ a) C. M. Hayward, D. Yohannes, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9345-9346. b) A. B. Smith III, S. S.-Y. Chen, F. C. Nelson, J. M. Reichert, B. A. Salvatore, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12013-12014.
- ¹²⁴ a) D. W. Hart, J. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8115-8116. b) S. L. Buchwald, S. J. LaMaire, R. B. Nielsen, B. T. Watson, S. M. King, *Org. Synth.* **1993**, *71*, 77.
- ¹²⁵ R. E. Krieg, W. T. Hockmeyer, D. H. Connor, *Arch. Dermatol.* **1974**, *110*, 783-788.
- ¹²⁶ a) J. K. Read, C. M. Heggie, W. M. Meyers, D. H. Connor, *Infect. Immun.* **1974**, *9*, 1114-1122. b) M. Pimsler, T. A. Sponsler, W. M. Meyers, *J. Infect. Dis.* **1988**, *157*, 577-580.
- ¹²⁷ B. Hall, R. E. Simmonds, *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 177-183.
- ¹²⁸ a) V. A. Azov, F. Diederich, Y. Lill, B. Hecht, *Helv. Chim. Acta.* **2003**, *86*, 2149-2155. b) T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10640-10641.

Chapitre 4 :
Conclusion générale et
perspectives

4. Conclusion générale et perspectives

L'ulcère de Buruli est une maladie tropicale négligée qui se manifeste par des lésions cutanées importantes et indolores, survenant surtout aux membres inférieurs et aux bras. Identifiée dès 1897, cette pathologie connaît une émergence rapide depuis 1980, essentiellement dans les pays d'Afrique de l'ouest et d'Afrique centrale. Bien que le taux de mortalité de la maladie soit faible, cette dernière est responsable d'une grande morbidité et de lourdes incapacités chez les personnes atteintes. Troisième infection mycobactérienne mondiale, celle-ci est causée par *Mycobacterium ulcerans*, une mycobactérie environnementale présente dans les régions tropicales humides. Le mode de transmission de *M. ulcerans* à l'humain est inconnu à ce jour et les connaissances épidémiologiques limitées, ce qui restreint les possibilités de contrôle de la maladie. Toutefois, il a été démontré que la mycobactérie sécrète une toxine macrolidique nommée mycolactone, responsable de l'ensemble des effets nécrotiques et immunosuppresseurs observés lors du développement de cette maladie. Selon la souche de *M. ulcerans*, différents types de mycolactones peuvent être biosynthétisés (A/B, C, D, E, F, *dia*-F, G, S1 et S2), se distinguant principalement par la longueur et le nombre d'insaturations ou de fonctions hydroxyles de la chaîne inférieure C1'-Cn'. Par ailleurs, ces variantes de mycolactones possèdent des activités cytotoxiques très différentes, la mycolactone A/B étant la plus toxique.

L'identification de la mycolactone en 1999 par l'équipe de Small a suscité l'intérêt de toute la communauté scientifique, amenant ainsi à des avancées et découvertes majeures. Compte tenu de la difficulté d'obtention de la toxine naturelle par culture de la mycobactérie, différents groupes de chimistes ont développé des synthèses totales conduisant à l'obtention d'une toxine synthétique avec un haut degré de pureté. Dans l'optique d'étudier les relations structure-activité, plus d'une trentaine d'analogues de mycolactones ont également été préparés. D'un point de vue biologique, quatre cibles cellulaires potentielles ont été dévoilées, permettant ainsi une première approche dans la compréhension des effets biologiques survenant au cours de l'infection. Bien que l'on ait beaucoup appris sur l'ulcère de Buruli au cours des dernières décennies, de nombreuses questions restent toutefois sans réponse. Par exemple, de nombreux chercheurs se sont demandé s'il serait possible de développer une méthode de diagnostic précoce pour la détection de l'ulcère de Buruli qui reposerait sur la reconnaissance des toxines dans la peau humaine.¹ D'autres domaines de recherche très importants sont centrés sur l'étude du trafic et des actions cellulaires des mycolactones, ainsi que sur l'identification de nouvelles cibles cellulaires de ces toxines. Par conséquent, il est nécessaire d'avoir des méthodes fiables et évolutives pour la production de mycolactones de haute pureté.

Le projet de recherche développé au sein du laboratoire s'inscrit dans ce contexte en évolution constante et relativement compétitif. L'approfondissement des connaissances sur les mécanismes biologique et moléculaire provoquant l'ulcère de Buruli est indispensable pour le développement de traitements spécifiques de l'infection et pour son diagnostic à un stade initial. L'objectif principal de cette thèse a été la préparation de la mycolactone A/B et de ses analogues sous forme pure et en quantités suffisantes pour une évaluation biologique. En outre, les variations structurales des analogues devaient être conçues non seulement de manière à mettre en place une nouvelle étude de relation structure-activité, mais également afin de générer des sondes de mycolactones permettant l'élucidation de leur mécanisme d'action au niveau moléculaire. À cette

fin, une nouvelle synthèse stéréosélective, originale et efficace du fragment macrocyclique a été conçue (Schéma 1). La stratégie de synthèse choisie implique plusieurs réactions de couplages catalysés par des métaux de transition (palladium, cuivre, ruthénium), permettant ainsi la création de liaisons carbone-carbone. La configuration des différents centres stéréogènes a, quant à elle, été contrôlée par des réactions d'allylboration asymétrique, d'hydroboration chimio- et diastéréosélective ainsi que par des réactions de dihydroxylation catalytique et asymétrique.

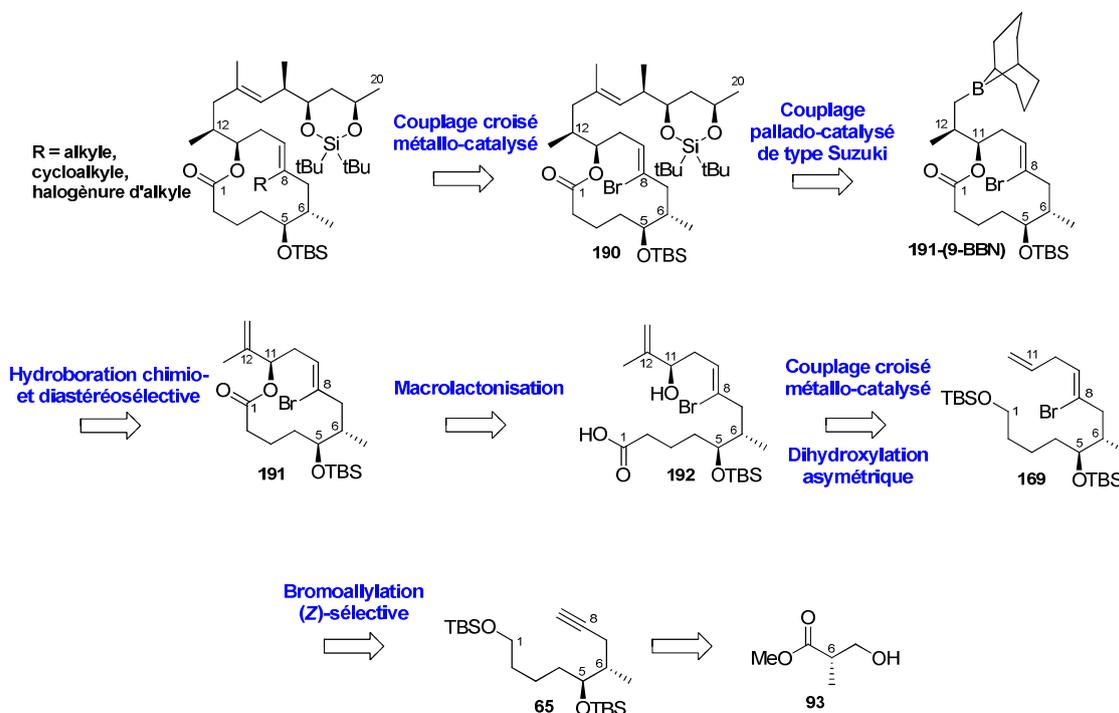


Schéma 1 : Schéma rétrosynthétique de la stratégie développée pour la préparation du fragment macrocyclique C1-C20

Au cours de ce travail de thèse, la mycolactone A/B synthétique a été obtenue en appliquant cette voie de synthèse. De plus, grâce à la flexibilité de la stratégie développée, un analogue essentiel a également été préparé via un intermédiaire de la voie synthétique (Figure 1). L'évaluation biologique de l'effet immunosuppresseur de ces deux composés a démontré l'inaction de la présence de diastéréoisomères en C12 à hauteur de 8:2 sur l'activité, tout comme le rôle mineur du groupement méthyle de **216** pour ce même effet biologique. Ainsi, la mycolactone A/B obtenue à partir de la nouvelle voie synthétique est aussi efficace que la toxine naturelle stéréopure en C12 au regard de l'inhibition de la production de protéines essentielles à la réponse immunitaire.

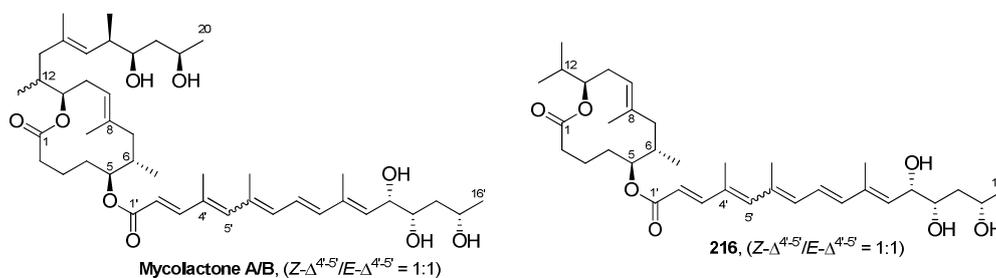


Figure 1 : Structures des molécules synthétisées

Il est à souligner que la route synthétique inédite, développée tout au long de ce travail de recherche, ouvre la voie à une toute nouvelle classe d'analogues encore jamais synthétisés, à savoir

les analogues en position C8. Cette position d'intérêt est connue pour jouer un rôle dans l'activité biologique mais ne s'avère pas nécessaire pour la liaison à l'une des cibles protéiques, WASP. De ce fait, nous poursuivons actuellement nos efforts pour la réaction de couplage croisé métallo-catalysé permettant une modulation sélective en cette position afin de former des analogues et des sondes spécifiques de mycolactones. Ces derniers serviraient d'outils précieux pour l'identification de nouvelles cibles et l'élucidation des mécanismes d'activation induits par les mycolactones. De façon plus générale, ces études centrées sur l'ulcère de Buruli sont essentielles dans la compréhension du dialogue entre cytosquelette et inflammation, ainsi que dans l'appréhension des différents processus cellulaires complexes.

Pour rappel, il a été envisagé de faciliter cette réaction de couplage croisé à l'aide d'un échange brome-iode sur l'intermédiaire **190**. Toutefois, cette tentative s'est révélée infructueuse et a conduit majoritairement au produit d'élimination **203**, formant alors une macrolactone C8-C9 alcynyle (Schéma 2, éq. 1). Par ailleurs, un essai identique sur la forme cyclique moins encombrée de **191** n'a abouti qu'à la récupération du produit de départ sans aucune présence de produit ni de dégradation, même sur un temps de réaction de réaction plus long (Schéma 2, éq. 2).

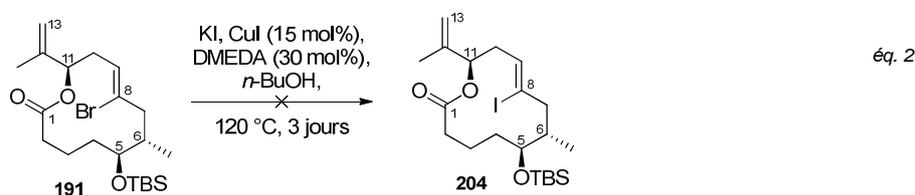
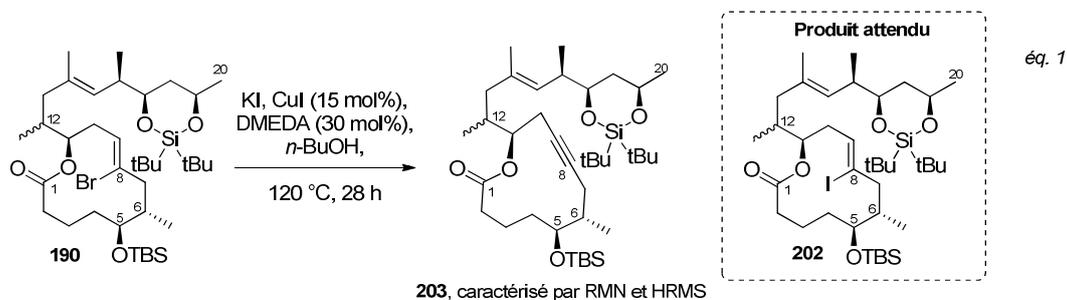


Schéma 2 : Rappel des essais de réaction cupro-catalysée d'échange brome-iode en position C8 sur l'intermédiaire **190** (éq. 1) et l'intermédiaire **191** (éq. 2)

Au contraire, la transposition de l'atome de brome par un atome d'iode s'est révélée productive sur l'intermédiaire de synthèse acyclique **169**, conduisant ainsi quantitativement à l'iodure vinylique **225** (Schéma 3). Bien que très lente, la conversion du dérivé bromé en son homologue iodé se produit sans aucune détection de sous-produits ou de dégradation. Par conséquent, il serait envisageable d'engager **225** dans la série d'étapes de la voie synthétique conçue, conduisant ainsi à un fragment macrocyclique C1-C20 **226** possédant un atome d'iode en C8. Ce dernier pourrait présenter une réactivité plus importante devant les réactions de couplage croisé et donc faciliter les modulations en position C8.

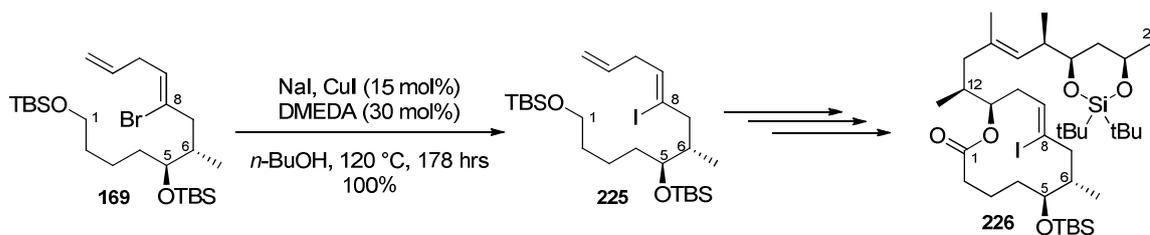


Schéma 3 : Synthèse de l'intermédiaire 225 par réaction d'échange d'halogène cupro-catalysé

En effet, il a également été démontré au cours de ce projet de recherche qu'il était possible de transformer l'iodure vinylique **225** en dérivé C8-trifluorométhylé **227**, comme présenté Schéma 4. Il est à préciser que cet échange est non accessible à partir de l'homologue bromé **169**. En s'appuyant sur des travaux développés au laboratoire par le Dr. Cédric Tresse, cette méthode fait appel à l'utilisation de fluorosulfonyldifluoroacétate de méthyle (MFSDA), en présence d'une source de cuivre(I). Ces conditions ont été appliquées sur l'intermédiaire **225**, en utilisant le CuTC en tant que source de cuivre(I) tel que décrit par Wipf,² en comparaison à l'iodure de cuivre initialement utilisé pour ce couplage par l'équipe de Chen.³

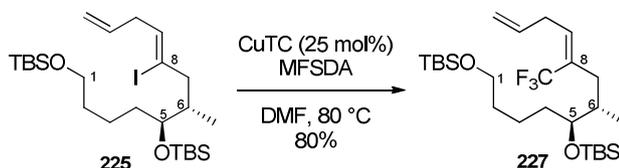


Schéma 4 : Synthèse de l'intermédiaire 227 par réaction de couplage croisé cupro-catalysé

Cette exploration de méthode de synthèse de mycolactones fluorées rentre dans le cadre de l'approfondissement de nos connaissances sur la capacité de la toxine à activer ses cibles protéiques, grâce notamment à des études du complexe ligand/WASP par RMN multinoyaux. Dès la découverte de WASP en 2013, des études préliminaires par RMN ¹H/¹⁵N du complexe formé par certains analogues synthétiques avec une construction simplifiée de la cible protéique WASP ont été menées en collaboration avec le Dr. Guittet et le Dr. Morellet du laboratoire de Chimie de Biologie Structurales de l'ICSN, Gif-sur-Yvette (Figure 2). L'objectif est d'étudier de manière fine l'environnement local du complexe mycolactone/WASP afin d'offrir la meilleure compréhension possible du mécanisme moléculaire de l'infection à *M. ulcerans*. Cette compréhension mécanistique est essentielle pour le développement rationnel de nouveaux outils de diagnostic et de thérapie. Ainsi la synthèse de sondes de mycolactones bien plus sensible et spécifique, en exploitant notamment les caractéristiques singulières de l'atome de fluor, permettrait de continuer ces études RMN. Cette stratégie est d'ailleurs à la pointe des études de biologie structurale et permet d'étudier des mécanismes biologiques complexes.⁴

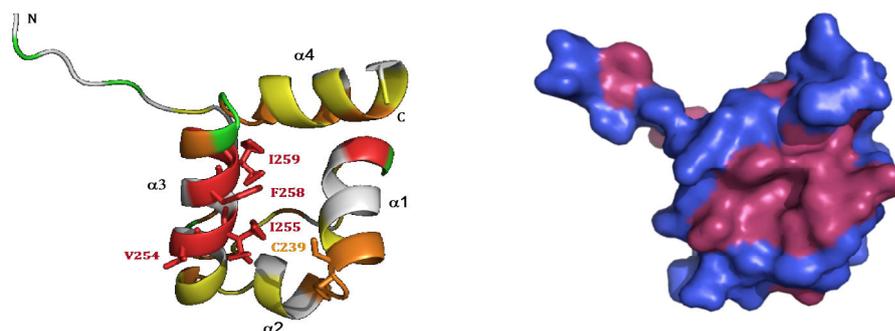


Figure 2 : Représentation des modèles tridimensionnels simplifiés de WASP illustrant les variations de déplacement chimique dues à la formation du complexe protéine-ligand après étude de l'interaction protéine-ligand par RMN ^1H et ^{15}N . Etude réalisée par les Drs. E Guittet et N. Morellet (ICSN).

Par ailleurs, bien que le produit d'élimination **203** n'était pas désiré lors de la réaction d'échange brome-iode, ce dernier pourrait également représenter un intermédiaire très intéressant pour l'étude du complexe ligand/WASP. En effet, à partir de ce dernier, la formation de sondes fonctionnelles de mycolactones apparaît comme accessible via une cycloaddition azoture-alcyne cupro-catalysée (CuAAC, Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition). Cette méthode, très utilisée en chimie de synthèse, représente une voie directe pour l'association covalente de deux entités possédant divers groupements fonctionnels.⁵ Pour notre cas, l'intermédiaire **203** portant l'alcyne pourrait être engagé dans cette réaction hautement sélective, également nommée « réaction-click », avec un dérivé azoturé possédant une étiquette spécifique en corrélation avec l'étude réalisée (Figure 3). Ainsi, l'étiquetage bio-orthogonal pourrait se révéler utile pour la détection, l'imagerie ou encore le suivi de la toxine dans l'organisme.

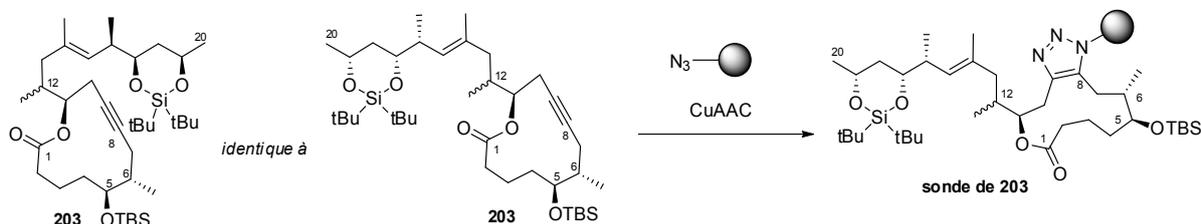


Schéma 5 : Synthèse de sondes de mycolactones à partir de l'intermédiaire 203

D'autre part, l'accès au fragment macrocyclique de la toxine naturelle étant désormais possible grâce à la nouvelle voie synthétique développée, il est tout à fait envisageable de réaliser une nouvelle étude SAR plus représentative des mycolactones. En effet, par simple estérification du fragment macrolactonique C1-C20 avec les différentes chaînes inférieures précédemment synthétisées par notre équipe, notamment dans le cadre du projet doctoral du Dr. Anne-Caroline Chany, une diversité d'analogues peut être obtenue (Figure 3). Cette série d'analogues inexplorée conduirait ainsi à la production de nouvelles informations relatives à la toxicité des mycolactones.

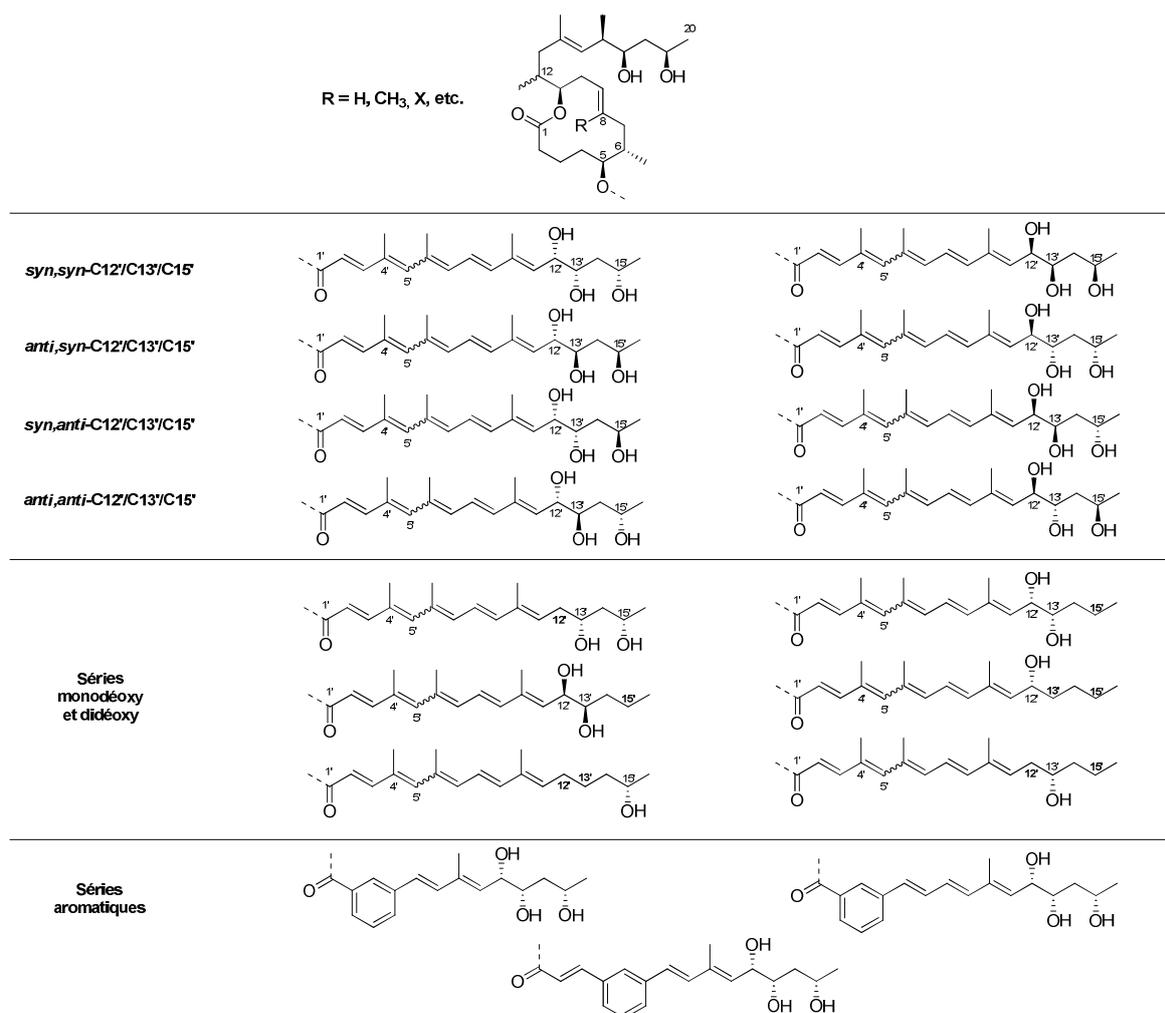


Figure 3 : Structures envisageables d'analogues inédits de mycolactones

Un autre point intéressant à explorer serait l'importance de la configuration d'un groupement C8-méthyle sp^3 . Sachant qu'aucune cristallisation de la mycolactone A/B n'a encore été accomplie, les informations concernant notamment la conformation exacte de la toxine au contact de ses cibles protéiques sont très limitées. Or, l'analyse SAR réalisée en 2014 par l'équipe de Demangel sur les molécules synthétisées au laboratoire révèle que l'analogue **158**, analogue C8,C9-dihydromycolactones C8-desméthylé et tronqué en C13-C20, conserve une affinité pour WASP similaire à la toxine naturelle (IC_{50} [**158**] = $65,0 \pm 0,7 \mu M$ et IC_{50} [toxine] = $32,3 \pm 22,1 \mu M$, voir Chap. 2.3.2). Ainsi, une hydrogénation diastéréosélective de l'intermédiaire **183**, facilement accessible via la nouvelle voie de synthèse, permettrait de fixer la configuration du centre stéréogène en C8 et de former de manière sélective **228**. En s'appuyant sur les travaux développés par le groupe de Pfaltz, un catalyseur chiral d'iridium basé sur des ligands de type P,N amènerait à une hydrogénation énantiosélective de l'oléfine trisubstituée C8-C9 qui ne possède pas de fonctionnalités ou de groupes coordinants voisins (Schéma 6).⁶ En fonction de la configuration du ligand chiral utilisé, les deux énantiomères d'intérêts de **228** peuvent être synthétisés. Les étapes de déprotection de l'alcool en position C5 suivie de l'estérification avec la chaîne supérieure et les clivages des éthers silylés qui composent cette dernière conduiraient ainsi à deux analogues utiles pour l'étude de la position du méthyle au cours de l'interaction de la toxine avec sa cible protéique. Par ailleurs, une réaction

d'hydrogénation utilisant un catalyseur achiral pourrait également se révéler intéressante dans la contribution de l'analyse structurale du complexe toxine/protéine.

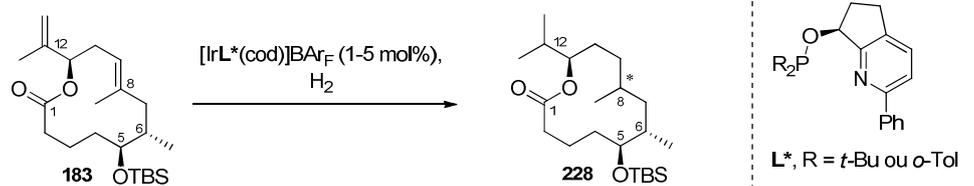


Schéma 6 : Synthèse de l'intermédiaire 228 par hydrogénation énantiosélective

Bien qu'une meilleure compréhension de la relation structure-activité des mycolactones soit maintenant permise, d'autres recherches sont encore nécessaires pour comprendre de manière fine le mécanisme d'action des mycolactones. Assurément, l'association des efforts menés par toute la communauté scientifique permettra, à terme, le contrôle global de l'ulcère de Buruli.

4. 1. Références

¹ J.-P. Dangy, N. Scherr, P. Gersbach, M. N. Hug, R. Bieri, C. Bomio, J. Li, S. Huber, K.-H. Altmann, G. Pluschke, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004808.

² P. Wipf, J. Xiao, S. Geib., *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1605-1613.

³ Q.-Y. Chen, S.-W. Wu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 705-706.

⁴ H. Chen, S. Viel, F. Ziarelli, L. Peng, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7971-7982.

⁵ J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315.

⁶ a) A. Lightfoot, P. Schnider, A. Pfaltz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2897-2899. b) S. Bell, B. Wüstenberg, S. Kaiser, F. Menges, T. Netscher, A. Pfaltz, *Science* **2006**, *311*, 642-644

Chapitre 5 : Partie expérimentale

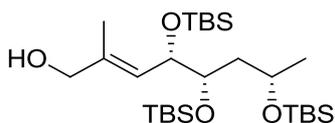
5. Partie expérimentale

5. 1. Material and methods

NMR spectra were recorded on Bruker AV 300, AV 400 or AV 600 spectrometer at 300 MHz, 400 MHz or 600 MHz for ^1H NMR, at 100 MHz or 150 MHz for ^{13}C NMR and at 376 MHz for ^{19}F . The spectra were calibrated using undeuterated solvent peaks as internal reference for ^1H NMR and ^{13}C NMR. Coupling constants (J) were reported in Hertz. Multiplicities are designed as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintuplet (quint), multiplet (m) and possible combinations between them. For inseparable isomers, ^1H NMR and ^{13}C NMR signals were assigned by HSQC and HMBC experiments. High resolution mass spectra (HRMS) in positive and negative modes were recorded using a 6520 series quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (Agilent) fitted with a multimode ion source (in mixed mode that enables both electrospray ionization, ESI, and atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Samples were directly infused into the source using 50/50-methanol/formic acid 0.2% in water. Specific optical rotations are expressed in (deg·mL)/(g·dm) and were recorded on a Perkin-Elmer polarimeter at a light wavelength of sodium D line ($\lambda = 589 \text{ nm}$) and at 20 °C. All sensitive reactions were carried out in oven-dried glassware under a nitrogen atmosphere using dry solvents, unless otherwise noted. THF was distilled under nitrogen from sodium-benzophenone. Toluene, CH_2Cl_2 and DMF were distilled over CaH_2 . All other anhydrous solvents were purchased from Sigma-Aldrich. Reagents were purchased from Aldrich, Acros or Alfa Aesar and used without further purification, unless otherwise noted. Concentration under reduced pressure was performed by rotary evaporation at appropriate temperature and pressure. Yields refer to chromatographically and spectroscopically (^1H , ^{13}C and ^{19}F NMR) homogenous materials, unless otherwise noted. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) carried out on Merck TLC silica gel 60 F254 glass-coated plates, using UV light, iodine vapor, potassium permanganate or ninhydrin (2,2-dihydroxy-1,3-indanedione) as visualizing agents. All separations were performed by column chromatography on Merck silica gel 60 (40-63 μm) or on a Combiflash Companion from Teledyne Isco. Preparative HPLC was carried out on an Interchim puriFlash®4250 instrument and using Interchim columns (Si, 5 μm , 250 \times 10.0 mm; Si, 5 μm , 250 \times 21.2 mm). The absorbance of HPLC samples was recorded for wavelengths between 200 nm and 400 nm. Sonication was performed on the Transsonic 275/H Prolabo instrument.

5. 2. Synthesis of the southern chain's precursors

(4*S*,5*S*,7*S*,*E*)-4,5,7-tris(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-methyloct-2-en-1-ol SI-1



To a stirred solution of ethyl-(2*E*,4*S*,5*S*,7*S*)-4,5,7-tris[*tert*-butyldimethylsilyloxy]-2-methyloct-2-enoate (300 mg, 0.52 mmol) in dry CH_2Cl_2 (5.5 mL) was added a solution of DIBAL-H (1.5 M in toluene 1.46 mL, 2.20 mmol) at -78 °C. The reaction mixture was allowed to reach 0 °C and was stirred this temperature for 1 hour. The solution was then quenched with a cooled saturated aqueous solution of Rochelle salt, and then the resultant solution was stirred at room temperature for 3 hours. The

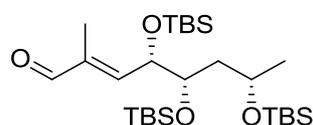
aqueous layer was extracted with Et₂O and the combined organic extracts were washed with water, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give **SI-1** (271 mg, 97%) as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.46 (dd, *J* = 9.1, 1.1 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J* = 9.1, 3.8 Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.91 (m, 1H), 3.60 (dt, *J* = 7.9, 3.8 Hz, 1H), 1.83 (ddd, *J* = 13.3, 8.4, 3.9, 8.4 Hz, 1H), 1.71 (q, *J* = 1.1 Hz, 3H), 1.59 (ddd, *J* = 13.3, 8.3, 5.0 Hz, 1H), 1.29 (m, 1H), 1.13 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.05 (s, 6H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 136.4, 125.8, 73.4, 70.9, 68.9, 66.1, 42.5, 25.9, 25.8, 23.4, 18.2, 18.1, 18.0, 14.6, -4.1, -4.2, -4.3, -4.5, -4.6, -4.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.¹

(4*S*,5*S*,7*S*,*E*)-4,5,7-tris((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-methyloct-2-enal **31**



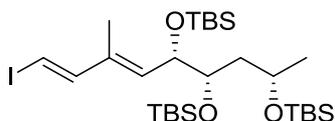
To a stirred solution of **SI-1** (250 mg, 0.469 mmol) in CH₂Cl₂ (2.71 mL) was added MnO₂ (611 mg, 7.04 mmol). The resulting mixture was warmed up to 40 °C and stirred for 24 hours. The reaction mixture was then cooled to room temperature, filtered through a pad of Celite® with CH₂Cl₂, and concentrated under reduced pressure to afford **31** (250 mg, quantitative yield) as a yellowish oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.45 (s, 1H), 6.44 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 4.56 (dd, *J* = 8.4, 3.7 Hz, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.72 (dt, *J* = 8.1, 3.9 Hz, 1H), 1.90 (ddd, *J* = 13.2, 8.2, 4.0 Hz, 1H), 1.80 (q, *J* = 1.3 Hz, 3H), 1.61 (m, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), -0.02 (18H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.6, 152.8, 138.9, 73.3, 71.2, 65.7, 42.4, 25.9, 25.8, 25.7, 23.3, 18.1, 18.0, 17.9, 10.2, -4.1, -4.3, -4.4, -4.5, -4.6.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.¹

(1*E*,3*E*)-(5*S*,6*S*,8*S*)-tris-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-iodo-3-methyl-nona-1,3-diene **SI-2**



To a stirred solution of CrCl₂ (347 mg, 2.82 mmol) in THF (3.02 mL) under nitrogen atmosphere was added dropwise a solution of **31** (250 mg, 0.471 mmol) and CHI₃ (200 mg, 1.41 mmol) dissolved in THF (2.07 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Then, the mixture was quenched with water and diluted with Et₂O. The aqueous layer was extracted three times with Et₂O and the combined organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography (elution with petroleum ether/ CH₂Cl₂ 10:0 to 9:1) to give after evaporation **SI-2** (262 mg, 85%) as a red oil.

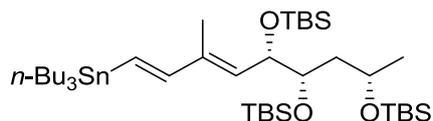
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.00 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 5.99 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 9.2, 3.8 Hz, 1H), 4.08 (dt, *J* = 7.5, 5.9 Hz, 1H), 3.81 (dt, *J* = 7.8, 3.8 Hz, 1H), 2.09 (ddd, *J* = 13.4, 7.8, 4.4 Hz, 1H), 1.86 (ddd, *J* = 13.4, 7.5, 5.6 Hz, 1H), 1.55 (q, *J* = 1.1 Hz, 3H), 1.26 (d, *J* = 5.9 Hz,

3H), 1.00 (s, 9H), 0.96 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.13 (s, 6H), 0.09 (s, 3H), 0.08 (s, 3H), 0.05 (s, 3H), 0.01 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 149.2, 135.2, 133.8, 76.5, 71.4, 73.9, 66.3, 43.4, 26.1, 26.0, 25.9, 23.9, 18.3, 12.9, -4.0, -4.1, -4.3, -4.5.

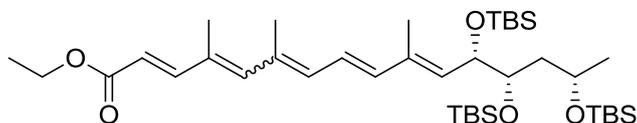
The spectral data are in agreement with those reported in the literature.²

(1*E*,3*E*)-(5*S*,6*S*,8*S*)-tris(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-tributylstannyl-3-methyl-nona-1,3-diene 154-(*E,E*)



To a solution of **SI-2** (205 mg, 0.313 mmol) in Et₂O (1.64 mL) at -78 °C was added a solution of *n*-BuLi (2.3 M in hexane, 0.204 mL, 0.47 mmol) and the reaction was stirred for 20 minutes before the addition of tributyltin chloride (0.127 mL, 0.47 mmol). The reaction mixture was then allowed to warm to room temperature and was stirred for 1 hour. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and diluted with Et₂O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **154-(*E,E*)** (256 mg) as a yellowish oil. The crude product was used without further purification for the next step.

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*,10*E*)-(12*S*,13*S*,15*S*)-Ethyl-12,13,15-tris(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate **SI-3**



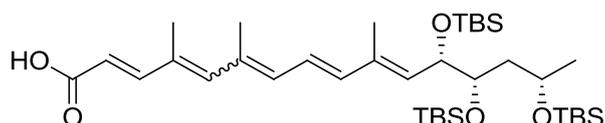
A degassed solution of **154-(*E,E*)** (256 mg, 0.314 mmol) and ethyl (2*E*,4*E*,6*E*)-7-iodo-4,6-dimethylhepta-2,4,6-trienoate (100 mg, 0.327 mmol) in DMF (1.98 mL) was added at room temperature to a flask containing a flame-dried tetrabutylammonium diphenyl phosphinate (185 mg, 0.377 mmol). After 5 minutes of stirring, CuTc (89.8 mg, 0.471 mmol) followed by Pd(PPh₃)₄ (29 mg, 0.0251 mmol) were added. The resulting black-brown mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Then, the reaction mixture was quenched with water and diluted with Et₂O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered through a short pad of silica and evaporated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 9:1) to give **SI-3** (197 mg, 89%) as a yellowish oil as a mixture of isomers that was not separated (*E*-Δ^{4'-5'}/*Z*-Δ^{4'-5'} 75:25).

¹H NMR *E*-Δ^{4'-5'} (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 15.5, 11.1, 1H), 6.37 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.27 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 5.86 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 8.9, 3.6 Hz, 1H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (dt, *J* = 7.6, 5.8 Hz, 1H), 3.64 (dt, *J* = 7.6, 3.6 Hz, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.80 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.05 (s, 9H), 0.04 (s, 3H), 0.02 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

^{13}C NMR $E-\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 167.5, 150.7, 143.7, 139.8, 135.1, 134.6, 134.3, 134.0, 132.2, 123.7, 116.2, 73.7, 71.4, 66.1, 60.2, 42.7, 25.9, 25.8, 23.5, 18.1, 18.0, 17.9, 17.1, 14.4, 14.2, 13.5, -4.1, -4.3, -4.5, -4.6, -4.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.³

(2E,4E,6E,8E,10E,12S,13S,15S)-12,13,15-tris(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoic acid **40**



To a stirred solution of **SI-3** (197 mg, 0.279 mmol) in a 4:1:1 mixture of THF (7 mL)/ H_2O (1.75 mL)/EtOH (1.75 mL) was added $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (116 mg, 2.79 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 38 hours. Then, the reaction mixture was quenched by addition of a saturated aqueous NH_4Cl solution and was diluted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:0 to 9:1) to afford **40** (153 mg, 81%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ 75:25).

^1H NMR $E-\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.36 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 15.0, 11.2$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.39 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 5.87 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.67 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J = 9.1, 3.4$ Hz, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.87 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.17 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 0.91 (27H), 0.09 (18H).

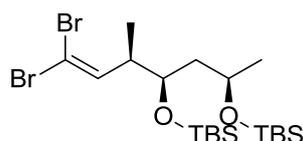
^{13}C NMR $E-\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 169.2, 152.6, 145.3, 141.2, 137.1, 136.4, 136.0, 135.7, 134.2, 126.3, 118.1, 76.3, 73.0, 67.7, 44.9, 27.4, 27.3, 25.2, 22.2, 18.2, 15.3, 14.8, -2.7, -2.9, -3.0, -3.1, -3.3, -3.4.

The carboxylic acid **40** was then photoisomerized in acetone for 1 hour, using a green fluorescent bulb, in order to obtain **40** with a $E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ = 1:1 ratio, as detected by ^1H NMR. The spectrum emission of the fluorescent bulb at 5 cm is the following: 365, 405, 435, 486, 541, 545, 576, 578 and 610 nm; the intensity integrated on 300-800 nm is 12 mW/cm^2 .

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.¹

5. 3. Synthesis of the northern chain's precursors

(5R,7R)-5-((R)-4,4-Dibromobut-3-en-2-yl)-2,2,3,3,7,9,9,10,10-nonamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundecane **SI-4**



To a solution of CBr_4 (2.66 g, 8.01 mmol) in CH_2Cl_2 (8 mL) was added PPh_3 (4.2 g, 16 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 minutes before the addition of Et_3N (1.71 mL, 12.3 mmol) and a solution of (2S,3R,5R)-3,5-bis[*tert*-butyldimethylsilyloxy]-2-methylhexanal (1 g, 2.67

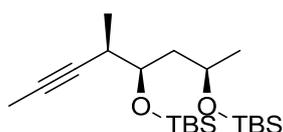
mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (2 mL). The resulting red mixture was then stirred at 0 °C for 3 hours. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO_3 solution and diluted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 9:1) to give **SI-4** (1.35 g, 95%) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.40 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 3.86 (qd, $J = 12.2, 6.1$ Hz, 1H), 3.77 (dt, $J = 6.5, 3.3$ Hz, 1H), 2.58 (ddq, $J = 9.7, 6.8, 3.3$ Hz, 1H), 1.62-1.57 (m, 2H), 1.15 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 142.3, 87.5, 70.8, 65.7, 44.6, 42.7, 25.1, 24.0, 18.0, 12.4, -4.2, -4.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

(5*R*,7*R*)-2,2,3,3,5,9,9,10,10-Nonamethyl-7-((*R*)-pent-3-yn-2-yl)-4,8-dioxa-3,9-disilaundecane **SI-4**



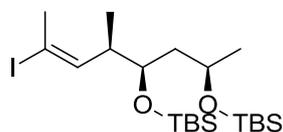
To a solution of **SI-4** (1.35 g, 2.54 mmol) in THF (25 mL) was added a solution of *n*-BuLi (2.3 M in hexane, 2.43 mL, 5.60 mmol) at -78 °C. After 30 minutes of stirring at -78 °C, MeI (2.38 mL, 38.20 mmol) was added. The resulting mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred for 2 hours. The reaction mixture was then quenched with a saturated aqueous NaHCO_3 solution and diluted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-5** (979 mg, quantitative yield) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.98 (sext., $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.67 (td, $J = 6.6, 5.1$ Hz, 1H), 2.50 (m, 1H), 1.83 (ddd, $J = 13.1, 6.6, 1.9$ Hz, 1H), 1.77 (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 1.56 (m, 1H), 1.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.07 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.89 (s, 18H), 0.09-0.06 (m, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 82.1, 73.8, 72.6, 65.9, 44.5, 32.2, 25.9, 25.8, 23.8, 18.1, 16.3, 3.5, -4.3, -4.5, -4.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁵

(5*R*,7*R*)-5-((*R*,*E*)-4-iodopent-3-en-2-yl)-2,2,3,3,7,9,9,10,10-nonamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundecane **50**



To a solution of **SI-5** (0.97 g, 2.52 mmol) in benzene (7 mL) was added Schwartz's reagent (1.37 g, 5.31 mmol). The reaction mixture was protected from light and stirred at 50 °C for 2 hours. The reaction mixture was then cooled down to room temperature before the addition of a solution of I_2 (1.35 g, 5.32 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL). The mixture was stirred for 30 more minutes at room temperature. Then, the reaction mixture was quenched with the addition of a saturated aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution before being diluted with EtOAc. The organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated.

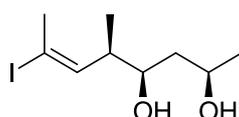
The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/ CH₂Cl₂ 10:0 to 9:1) to give **50** (390 mg, 30%) as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.13 (dd, *J* = 10.0, 1.5 Hz, 1H), 3.87 (sextet, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.65 (m, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.38 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.13 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 6H), 0.04 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 145.0, 93.1, 71.8, 65.8, 44.9, 40.3, 27.9, 25.9, 25.8, 24.0, 18.1, 14.1, -4.2, -4.6, -4.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.¹

(2*R*,4*R*,5*R*,*E*)-7-Iodo-5-methyloct-6-ene-2,4-diol **SI-6**



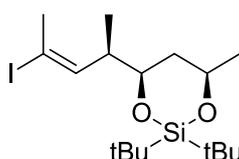
To a 50 mL polypropylene vial containing **50** (390 mg, 0.761 mmol) in THF (14 mL) was added HF•pyridine 70% (1.98 mL, 76.1 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 3 hours, with addition of HF•pyridine 70% (0.988 mL, 38 mmol) after 1 hour and 2 hours, respectively. The solution was then cooled in an ice bath and a saturated aqueous NaHCO₃ solution was added until gas evolution stopped. The reaction mixture was diluted with EtOAc and the layers were separated. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-6** (216 mg, quantitative yield) as a yellowish oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.02 (dd, *J* = 10.1, 1.4 Hz, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.09 (br. s, 1H), 2.56 (br. s, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.42 (d, *J* = 1.7 Hz, 3H), 1.62 (dt, *J* = 15.3, 2.1 Hz, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.04 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 143.4, 94.6, 76.1, 69.5, 42.3, 41.7, 28.0, 24.5, 15.9.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

(4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-Butyl-4-((*R*,*E*)-4-iodopent-3-en-2-yl)-6-methyl-1,3,2-dioxasilinane **99**



To a solution of **SI-6** (210 mg, 0.739 mmol) in CH₂Cl₂ (7.09 mL) and pyridine (0.598 mL, 7.39 mmol) was added di-*tert*-butylsilyl bis(trifluoromethanesulfonate) (0.372 mL, 1.11 mmol) at 0 °C and the reaction mixture was stirred at this temperature for 1.5 hours. Then, silica gel was then added and the volatiles were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 98:2) to give **99** (320 mg, quantitative yield) as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.02 (dd, *J* = 10.2, 1.5 Hz, 1H), 4.16 (m, 1H), 3.79 (ddd, *J* = 11.3, 6.8, 1.9 Hz, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.41 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 1.61 (dt, *J* = 13.9, 2.1 Hz, 1H), 1.33 (m, 1H), 1.21 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.04-0.95 (m, 21H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 143.5, 94.0, 76.6, 70.3, 43.0, 40.9, 28.1, 27.4, 27.0, 24.9, 22.7, 19.6, 15.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

5. 4. Synthesis of the natural toxin

(R)-3-Hydroxy-2-methylpropyl 4-methylbenzenesulfonate SI-7

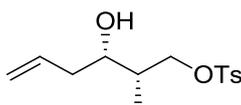


To a solution of (*S*)-Roche ester (5.50 mL, 49.63 mmol), DMAP (1.20 g, 9.82 mmol) and triethylamine (10.50 mL, 74.71 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) at 0 °C was added TsCl (13.25 g, 69.50 mmol) in 3 portions. The solution was allowed to warm up to room temperature and stirred for 4 hours. The suspension was then filtered over Celite® and the filtrate was washed with water, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude ester obtained was dissolved in toluene (100 mL) and the solution was cooled to -78 °C before the dropwise addition of a solution of DIBAL-H (1.5 M in toluene, 76.0 mL, 114.0 mmol). The solution was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight. Then, the solution was cannulated into a cooled mixture of saturated Rochelle salt (80 mL), water (160 mL) and diethyl ether (130 mL). The mixture was stirred for 5 hours. The aqueous layer was then extracted with ethyl acetate, and the combined organic extracts were washed successively with 0.5 N HCl (80 mL), a saturated solution of sodium bicarbonate, brine, filtered and concentrated. The crude compound was purified by flash chromatography on silica gel (elution with petroleum ether/ethyl acetate 10:0 to 6:4) to yield alcohol **SI-7** (10.41 g, 86% yield) as a yellowish oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.04-4.01 (2H), 3.63-3.50 (2H), 2.46 (s, 3H), 2.01 (m, 1H), 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 144.8, 132.8, 129.8, 127.8, 72.0, 63.5, 35.5, 21.6, 13.1.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁶

(2S,3S)-3-Hydroxy-2-methylhex-5-enyl 4-methylbenzenesulfonate SI-8



The alcohol **SI-7** (6 g, 24.56 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (25 mL) and the solution was cooled to 10 °C before addition of iodobenzene diacetate (8.70 g, 27.02 mmol) and TEMPO (0.383 g, 2.46 mmol). The orange solution was stirred and allowed to warm up to room temperature. After 2 hours, water was added to the reaction mixture and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to yield the corresponding aldehyde **143** that was used without further purification. Next, to a cooled (-78 °C) commercial solution of (-)-Ballydiisopinocampheylborane (25.00 mmol in 25 mL of pentane) in diethyl ether (50 mL) was slowly added the aldehyde dissolved in diethyl ether (70 mL). The temperature of the reaction mixture was maintained below -70 °C during the whole addition. The solution was then stirred for another 3 hours at -78 °C before addition of methanol (7 mL), water (25 mL) and NaBO₃•4H₂O (11.50 g, 74.74 mmol) 10 minutes later. The reaction mixture was allowed to warm up to room temperature overnight. The following morning more water was added and the aqueous layer was extracted with diethyl ether. The organic phase was washed with brine, dried over

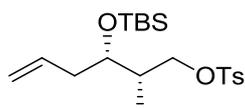
anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude alcohol obtained was purified by flash chromatography on silica gel (elution with petroleum ether/ethyl acetate 10:0 to 7:3) to yield alcohol **SI-8-syn** (3.61 g, 51%) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.76 (m, 1H), 5.14-5.09 (2H), 4.09 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.21-2.16 (2H), 1.94 (m, 1H), 1.59 (br s, 1H), 0.89 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 144.8, 134.6, 132.9, 129.8, 127.9, 118.3, 72.5, 69.3, 39.1, 37.3, 21.6, 9.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁷

(2S,3S)-3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-methylhex-5-enyl 4-methylbenzenesulfonate **170**



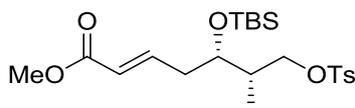
To a solution of alcohol **SI-8** (1.00 g, 3.51 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) were added imidazole (0.96 g, 14.1 mmol) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (1.27 g, 8.4 mmol). The solution was stirred at room temperature for 3 days. Then, water was added and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel (elution with petroleum ether/ethyl acetate 10:0 to 8:2) to afford compound **170** (0.97 g, 69%) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.66 (m, 1H), 5.04-4.99 (2H), 3.98 (m, 1H); 3.85 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.20-2.12 (2H), 1.93 (m, 1H), 0.84 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.82 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), -0.03 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 144.6, 134.5, 133.0, 129.8, 127.9, 117.2, 72.8, 71.0, 39.0, 37.0, 25.7, 25.7, 25.5, 21.6, 18.0, 10.1, -4.1, -5.0.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁸

Methyl (2*E*,5*S*,6*S*)-5-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-6-methyl-7-[[4-methylphenyl]sulfonyl]oxy}hept-2-enoate **171**



A solution of **170** (2 g, 5.02 mmol) and methyl acrylate (1.81 mL, 20.1 mmol) in dichloroethane (20.3 mL) was heated to 60 °C. Then Grubbs 2nd generation precatalyst (0.213 g, 0.251 mmol) diluted in dichloroethane (7.71 mL) was added dropwise to the solution over 15 minutes. After stirring for 3 hours at 60 °C, 20 mg of Grubbs 2nd generation precatalyst diluted in 1 mL of dichloroethane was added to the mixture, and then the resultant solution was stirred for further 30 minutes at 60 °C. The mixture was cooled to room temperature and filtrated through a pad of silica gel (elution with cyclohexane/EtOAc 6:4). The filtrate was evaporated and the crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (elution with petroleum ether/ethyl acetate 10:0 to 8:2) to afford **171** (2.15 g, 94%) as a yellowish oil.

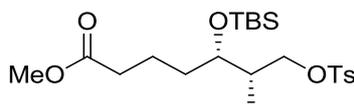
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.82 (dt, $J = 15.4, 7.3$ Hz, 1H), 5.81 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 3.98 (dd, $J = 9.3, 6.7$ Hz, 1H), 3.89-3.81 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.37-2.25 (m, 2H), 1.90 (m, 1H), 0.85 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.82 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 144.9, 144.7, 132.8, 129.7, 127.7, 123.1, 77.2, 71.9, 70.4, 51.3, 37.6, 37.1, 25.6, 21.4, 17.8, 10.5, 10.3, -4.5, -5.1.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -3.2 (c 0.5, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{SSi} + \text{H}^+$ 457.2075; found 457.2065 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Methyl (5*S*,6*S*)-5-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-6-methyl-7-[[4-methylphenyl]sulfonyl]oxy}heptanoate SI-9



To a solution of **171** (1.97 g, 4.31 mmol) in ethyl acetate (119 mL) was added PtO_2 (0.12 g, 0.526 mmol). Then the resultant solution was stirred for 1.5 hours at room temperature under an atmosphere of hydrogen. The mixture was filtered over Celite[®] and concentrated. The product **SI-9** (1.96 g, quantitative yield) was obtained as a light yellowish oil.

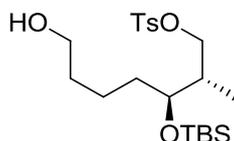
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 4.01 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 3.85 (dd, J = 9.3, 7.3 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.93 (m, 1H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.44-1.33 (m, 2H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.01 (s, 3H), -0.04 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 144.6, 132.9, 129.7, 127.8, 72.5, 71.4, 51.3, 37.2, 33.7, 33.0, 25.6, 21.4, 21.0, 17.8, 10.5, -4.4, -4.9.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +1.2 (c 0.6, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{SSi}_2 + \text{H}^+$ 459.2231; found 459.2231 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(5*S*,6*S*)-5-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-6-methyl-7-[[4-methylphenyl]sulfonyl]oxy}heptan-1-ol **172**



To a solution of **SI-9** (1.96 g, 4.27 mmol) dissolved in toluene (8 mL) and cooled at $-78\text{ }^\circ\text{C}$, a solution of DIBAL-H (1.5 M in toluene, 7.52 mL, 9.4 mmol) was added dropwise. The mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred for 2.5 hours. The solution was then quenched with a cooled saturated solution of Rochelle salt, and then the resultant solution was stirred at room temperature for 1 hour. The aqueous layer was extracted with Et_2O , washed with a 0.5 M aqueous HCl solution, a saturated aqueous NaHCO_3 solution and brine. The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated, affording **172** (1.82 g, quantitative yield) as a yellowish oil.

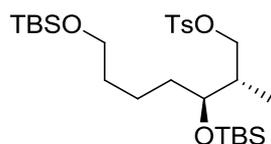
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 4.01 (dd, J = 9.3, 6.5 Hz, 1H), 3.85 (dd, J = 9.2, 7.2 Hz, 1H), 3.69-3.61 (m, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.93 (m, 1H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.44-1.33 (m, 2H), 1.30-1.25 (m, 2H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.01 (s, 3H), -0.04 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 144.6, 133.0, 129.8, 129.0, 128.2, 127.9, 125.2, 72.8, 71.7, 62.6, 37.3, 33.5, 32.7, 25.7, 21.8, 21.5, 17.9, 10.5, -4.2, -4.8.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +1.1 (c 1.0, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{SSi}_2 + \text{H}^+$ 431.2282; found 431.2283 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(2S,3S)-3,7-bis[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-2-methylheptyl-4 methylbenzene-1-sulfonate **173**



To a solution of **172** (1.79 g, 4.16 mmol) in dry DMF (41 mL) was added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (0.689 g, 4.57 mmol) and imidazole (0.622 g, 9.14 mmol). The resulting mixture was stirred for 15 hours at room temperature. The reaction was then quenched with water and extracted with Et₂O. The combined organic extracts were washed with brine, then dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **173** (2.40 g, quantitative yield) as a yellowish oil.

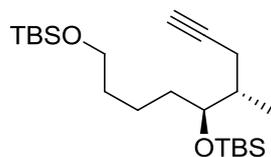
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.01 (dd, *J* = 9.2, 6.2 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J* = 9.2, 6.5 Hz, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.58 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.93 (m, 1H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.44-1.33 (m, 2H), 1.30-1.25 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.05 (s, 6H), 0.01 (s, 3H), -0.04 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 144.6, 133.1, 129.7, 127.9, 72.9, 71.9, 62.9, 37.4, 33.5, 32.8, 25.9, 25.7, 22.0, 21.6, 18.3, 17.9, 10.6, -4.3, -4.9, -5.4.

[α]_D²⁰ +0.8 (*c* 1.0, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₇H₅₂O₅SSi₂ + H⁺ 545.3147; found 545.3138 [M + H]⁺.

(5S)-2,2,3,3,11,11,12,12-Octamethyl-5-[(2S)-pent-4-yn-2-yl]-4,10-dioxo-3,11-disilatridecane **65**



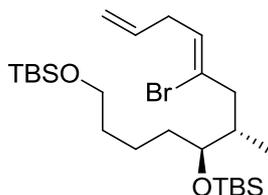
To a solution of **173** (1.05 g, 1.93 mmol) in a 1:1 mixture of dry THF/DMSO (11.5 mL) was added at 0 °C the commercial lithium acetylide ethylenediamine complex (1.58 g, 15.4 mmol). The mixture was stirred at 0 °C for 8.5 hours. The reaction was then carefully quenched with addition of a 1 M aqueous solution of HCl and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water then brine. The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (elution with petroleum ether/ethyl acetate 10:0 to 9:1) to give **65** (0.70 g, 72%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.70 (td, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 1H), 3.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.28 (ddd, *J* = 16.6, 6.4, 2.6 Hz, 1H), 2.04 (ddd, *J* = 16.8, 7.9, 2.6 Hz, 1H), 1.95 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.55-1.47 (m, 2H), 1.45-1.36 (m, 2H), 1.22-1.10 (m, 2H), 0.92 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 84.2, 74.0, 68.8, 63.1, 37.4, 33.6, 33.0, 26.0, 25.9, 22.3, 22.0, 18.3, 18.1, 13.6, -4.2, -4.6, -5.3.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.²

(5S)-5-[(2S,4Z)-4-Bromoocta-4,7-dien-2-yl]-2,2,3,3,11,11,12,12-octamethyl-4,10-dioxo-3,11-disilatridecane 169



A round bottom flask was charged with $\text{PdBr}_2(\text{PhCN})_2$ (61 mg, 0.129 mmol), NaHCO_3 (1.08 g, 12.9 mmol) and allyl bromide (11.2 mL, 128 mmol). The resulting solution was stirred for 20 minutes at room temperature. Then, a solution of **65** (1.03 g, 2.58 mmol) in THF (2.45 mL) was then added dropwise at room temperature over a period of 7 hours. After addition, the reaction was stirred for further 30 minutes before being filtered through a pad of silica gel and evaporated. The crude residue was then purified by flash chromatography on silica gel (elution with petroleum ether/dichloromethane 10:0 to 9:1) to afford **169** (1.30 g, 97%) as a colorless oil.

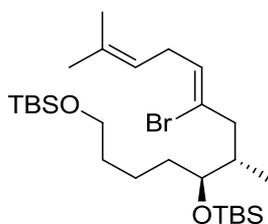
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.81 (ddt, $J = 16.9, 10.3, 6.3$, 1H), 5.66 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.13-5.09 (m, 2H), 3.61 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.56 (m, 1H), 2.94 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.60 (dd, $J = 13.4, 4.1$ Hz, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.55-1.48 (m, 2H), 1.46-1.37 (m, 2H), 1.35-1.22 (m, 2H), 0.92 (s, 18H), 0.78 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 135.0, 129.1, 126.9, 115.4, 74.9, 63.1, 44.7, 35.8, 35.7, 33.5, 33.0, 26.0, 22.4, 18.4, 18.2, 13.0, -4.1, -4.4, -5.3.

$[\alpha]_D^{20}$ -14.5 (c 0.6, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{BrO}_2\text{Si}_2 + \text{Na}^+$ 541.2503; found 541.2505 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(S)-5-[(S,Z)-4-Bromo-7-methylocta-4,6-dien-2-yl]-2,2,3,3,11,11,12,12-octamethyl-4,10-dioxo-3,11-disilatridecane 177



To a solution of **169** (0.50 g, 0.962 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (0.4 mL) was added 2-methyl-2-butene (3.7 mL, 34.8 mmol). Then Grubbs 2nd generation precatalyst (16.3 mg, 0.0192 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered through a pad of silica and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/dichloromethane 10:0 to 9:1) to give after evaporation **177** (521 mg, 99%) as a colorless oil.

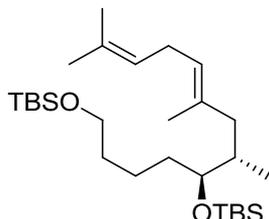
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.59 (t, $J = 6.9$, 1H), 5.14 (tsept, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H), 3.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.57 (m, 1H), 2.86 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 2.56 (dd, $J = 13.8, 3.5$ Hz, 1H), 2.18 (dd, $J = 13.8, 9.6$ Hz, 1H), 2.01 (m, 1H), 1.71 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.46-1.37 (m, 2H), 1.36-1.25 (m, 2H), 0.91 (s, 18H), 0.78 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 133.0, 128.5, 127.6, 120.9, 74.8, 63.1, 44.7, 35.7, 33.6, 33.1, 30.7, 26.0, 25.6, 22.3, 18.4, 18.2, 17.9, 12.9, -4.1, -4.4, -5.3.

$[\alpha]_D^{20}$ -10.0 (c 0.7, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₇H₅₅BrO₂Si₂ + Na⁺ 569.2816; found 569.2822 [M + Na]⁺.

(S)-5-((S,E)-4,7-Dimethylocta-4,6-dien-2-yl)-2,2,3,3,11,11,12,12-octamethyl-4,10-dioxaspiro[3.11]tridecane 176



To a dried sealable tub was added Pd(PPh₃)₄ (93.8 mg, 0.081 mmol). The tub was pumped out under high vacuum and backfilled with nitrogen (three times). Then, a solution of dimethylzinc (1.2 M in toluene, 4.83 mL, 5.8 mmol) was added and the yellow resulting mixture was cooled to 0 °C before the slow addition of **177** (635 mg, 1.16 mmol) dissolved in THF (4 mL). The reaction mixture was then stirred at 90 °C for 15 hours. The mixture was carefully quenched with water and extracted with Et₂O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/dichloromethane 10:0 to 9:1) to give **176** (541 mg, 97%) as a colorless oil.

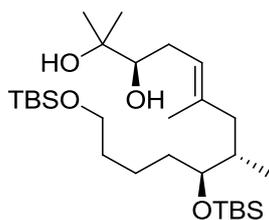
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.15-5.07 (m, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.46 (dt, *J* = 5.7, 3.1 Hz, 1H), 2.69 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 1.76-1.71 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.64 (s, 3H), 1.58, (s, 3H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.44-1.35 (m, 2H), 1.31-1.24 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.74 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 133.7, 131.1, 124.7, 123.5, 75.7, 63.2, 42.9, 35.4, 33.4, 33.1, 27.1, 26.0, 25.7, 22.3, 18.4, 18.2, 17.7, 15.8, 13.8, -4.1, -4.4, -5.3.

$[\alpha]_D^{20}$ -6.4 (c 1.0, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₈H₅₈O₂Si₂ + Na⁺ 505.3873; found 505.3850 [M + Na]⁺.

(3R,7S,8S,E)-8,12-Bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-2,5,7-trimethyldodec-4-ene-2,3-diol 179



A solution of AD-mix beta (1.65 g, 2.120 mmol) in H₂O (5.91 mL) and *tert*-butanol (5.91 mL) was stirred at room temperature until both phases were clear. Then, methanesulfonamide (112 mg, 1.180 mmol) was added before cooling the mixture to 0 °C. To this solution, **176** (570 mg, 1.180 mmol) was added at once. The heterogeneous slurry was vigorously stirred at 4 °C overnight. The resulting yellow mixture was quenched by addition of solid Na₂SO₃ (80 mg) at 0 °C and then allowed to warm at room temperature and stirred for further 45 minutes. The mixture was partitioned between water and EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution

with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 7:3) to give after evaporation **179** (455 mg, 75%) as a light yellowish oil.

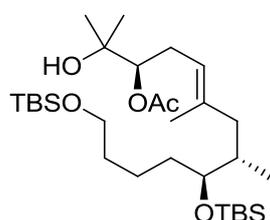
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.21 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.62 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.53 (m, 1H), 3.42 (m, 1H), 2.25-2.17 (m, 3H), 2.14 (s, 1H), 2.03 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.56-1.47 (m, 2H), 1.45-1.37 (m, 2H), 1.30-1.24 (m, 2H), 1.25 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 0.90 (s, 18H), 0.75 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 138.1, 121.9, 77.9, 76.0, 72.6, 63.1, 42.9, 35.5, 33.1, 30.5, 26.5, 26.0, 23.6, 22.3, 18.33, 18.1, 16.1, 13.9, -4.2, -4.4, -5.3.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +5.2$ (c 0.3, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{60}\text{O}_4\text{Si}_2 + \text{H}^+$ 517.4103; found 517.4094 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(3*R*,7*S*,8*S*,*E*)-8,12-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-hydroxy-2,5,7-trimethyldodec-4-en-3-yl acetate **181**



To a solution of **179** (120 mg, 0.232 mmol) in pyridine (240 μL , 2.97 mmol) was added acetic anhydride (240 μL , 2.56 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was diluted with EtOAc and water. The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **181** (130 mg, quantitative yield) as a yellowish oil.

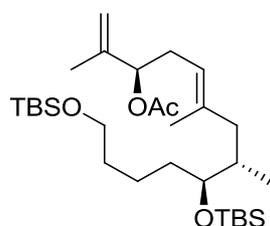
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.09 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.84 (dd, $J = 7.6, 5.6$ Hz, 1H), 3.61 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.50 (m, 1H), 2.37-2.32 (m, 2H), 2.24 (s, 1H), 2.18 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.74-1.67 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.57-1.49 (m, 2H), 1.45-1.34 (m, 2H), 1.29-1.25 (m, 2H), 1.23 (s, 6H), 0.90 (s, 18H), 0.71 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 168.3, 136.7, 121.0, 79.6, 75.9, 72.2, 63.0, 42.3, 35.7, 33.0, 32.8, 28.2, 26.6, 25.9, 25.0, 22.0, 20.9, 18.2, 18.0, 15.9, 13.9, -4.3, -4.4, -5.4.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -10.0$ (c 0.4, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}_5\text{Si}_2 + \text{Na}^+$ 581.4028; found 581.4024 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(3*R*,7*S*,8*S*,*E*)-8,12-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,5,7-trimethyldodeca-1,4-dien-3-yl acetate **167a**



A solution of **181** (170 mg, 0.304 mmol) in dry CH_2Cl_2 (1.41 mL) and pyridine (0.46 mL, 5.626 mmol) was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 10 minutes. Then, SOCl_2 (55 μL , 0.760 mmol) was added and the mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 5 minutes. The reaction mixture was poured into a suspension of ice, water and

Et₂O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **167a** (164 mg, quantitative yield) as a yellowish oil.

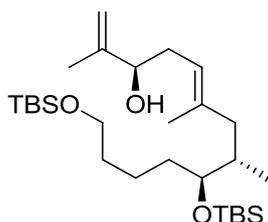
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.18 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 5.04 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.89 (s, 1H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.51 (m, 1H), 2.37 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 1.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.52-1.48 (m, 2H), 1.41-1.30 (m, 2H), 1.28-1.22 (m, 2H), 0.92 (s, 18H), 0.72 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.2, 142.9, 136.9, 128.4, 126.6, 120.1, 112.8, 77.1, 75.9, 63.1, 62.9, 42.4, 35.7, 33.1, 33.0, 31.4, 29.7, 25.9, 25.6, 22.3, 22.1, 21.2, 18.3, 18.1, 16.1, 13.9, -4.2, -4.4, -5.3.

[α]_D²⁰ -4.7 (c 0.3, CHCl₃).

HRMS calculated for C₃₀H₆₀O₄Si₂ + H⁺ 541.4103; found 541.4104 [M + H]⁺.

(3*R*,8*S*,9*S*,*E*)-9,13-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,6,8-trimethyltrideca-1,5-dien-3-ol **167**



To a solution of **167a** (165 mg, 0.305 mmol) in CH₂Cl₂ (2.92 mL) cooled at -78 °C was added a solution of DIBAL-H (1.5 M in toluene, 0.508 mL, 0.763 mmol). The reaction mixture was then allowed to reach room temperature and stirred for 1.5 hours. The solution was then quenched with a cooled saturated solution of Rochelle salt, and then the resultant solution was stirred at room temperature for 1 hour. The aqueous layer was extracted with Et₂O, washed with a 0.5 M aqueous HCl solution, a saturated aqueous NaHCO₃ solution and brine. The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 8:2) affording **167** (188 mg, 52% over 3 steps) as a yellowish oil.

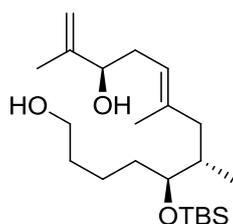
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.11 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.08 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.51 (m, 1H), 2.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.22 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.75-1.72 (m, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.54-1.49 (m, 2H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.32-1.28 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.74 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.06 (s, 6H), 0.04 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 147.0, 137.8, 120.9, 110.9, 75.9, 75.3, 63.2, 42.8, 35.5, 34.1, 33.2, 26.0, 22.3, 18.4, 18.2, 8.0, 16.2, 13.9, -4.2, -4.3, -5.3.

[α]_D²⁰ +5.7 (c 1, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₈H₅₈O₃Si₂ + H⁺ 499.3997; found 499.4014 [M + H]⁺.

(5*S*,6*S*,11*R*,*E*)-5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-6,8,12-trimethyltrideca-8,12-diene-1,11-diol **167b**



To a solution of **167** (135 mg, 0.271 mmol) in THF (14.6 mL) was slowly added a solution of TBAF (1 M in THF, 0.541 mL, 0.541 mmol) at 0 °C. The reaction was stirred at 0 °C overnight. Then, the reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 7:3) to give **167b** (85 mg, 82%) as a colorless oil.

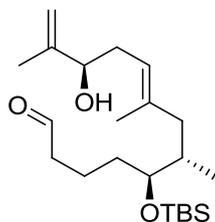
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.08 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.65 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.54 (m, 1H), 2.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.21 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.74-1.68 (m, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.59-1.54 (m, 3H), 1.44-1.39 (m, 2H), 1.32-1.25 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.75 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.05 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 147.0, 137.7, 121.0, 110.9, 75.7, 75.3, 62.9, 42.8, 35.5, 34.1, 33.1, 33.0, 26.0, 24.2, 22.1, 18.15, 18.0, 16.2, 14.0, -4.2, -4.3.

[α]_D²⁰ +4.6 (c 0.5, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₂H₄₄O₃Si + Na⁺ 407.2952; found 407.2953 [M + Na]⁺.

(5*S*,6*S*,11*R*,*E*)-5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-11-hydroxy-6,8,12-trimethyltrideca-8,12-dienal **SI-10**



To a solution of **167b** (160 mg, 0.416 mmol) in CH₂Cl₂ (15.5 mL) were added TEMPO (2.34 mg, 0.015 mmol) and iodobenzene diacetate (160 mg, 0.499 mmol). The reaction was vigorously stirred at room temperature for 25 hours. Then, the reaction was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-10** (159 mg, quantitative yield) as a yellowish oil. The crude residue was used directly and without further purification for the next step.

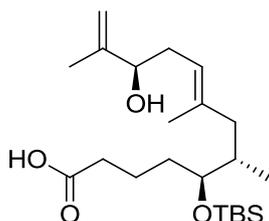
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.08 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.66 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.54 (m, 1H), 2.44 (td, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.24 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.74-1.67 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.44-1.34 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 1.30-1.27 (m, 2H), 0.74 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.05 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 202.5, 147.0, 137.5, 121.1, 110.9, 75.6, 75.3, 62.9, 44.1, 42.5, 35.7, 32.6, 29.7, 25.9, 22.1, 18.7, 17.9, 16.2, 14.1, -4.3, -4.3.

[α]_D²⁰ -3.2 (c 0.3, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₂H₄₂O₃Si + Na⁺ 405.2795; found 405.2775 [M + Na]⁺.

(5S,6S,11R,E)-5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-11-hydroxy-6,8,12-trimethyltrideca-8,12-dienoic acid
184



To a solution of **SI-10** (130 mg, 0.340 mmol) in *tert*-BuOH (9 mL), H₂O (4.5 mL) and 2-methyl-2-butene (4.5 mL) were added NaH₂PO₄ (244 mg, 2.04 mmol) and NaClO₂ (125 mg, 1.39 mmol). The reaction was vigorously stirred at room temperature for 4 hours. Then, the reaction was quenched with a saturated aqueous NH₄Cl solution and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with CH₂Cl₂/MeOH 10:0 to 98:2) to give after evaporation **184** (104 mg, 82% over 2 steps) as a colorless oil.

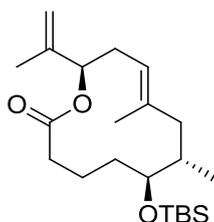
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.09 (t, *J* = 6.3, 1H), 3.66 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.54 (m, 1H), 2.37-2.30 (m, 4H), 2.21 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.73-1.68 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.47-1.42 (m, 2H), 1.34-1.27 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.74 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.05 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 178.0, 147.0, 137.6, 121.1, 111.0, 75.3, 75.7, 62.9, 42.7, 35.5, 34.1, 32.7, 29.7, 25.9, 22.1, 21.2, 18.1, 17.9, 16.2, 14.1, -4.2, -4.4.

[α]_D²⁰ -2.0 (c 0.5, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₂H₄₂O₄Si - H⁻ 397.2780; found 397.2783 [M - H]⁻.

(6S,7S,12R,E)-6-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-7,9-dimethyl-12-(prop-1-en-2-yl)oxacyclododec-9-en-2-one
183



To a solution of **184** (102 mg, 0.256 mmol) in benzene (5.1 mL) were added *i*-Pr₂NEt (0.334 mL, 2.02 mmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (0.16 mL, 1.02 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 hour. In a separate flask, DMAP (118 mg, 0.972 mmol) was dissolved in benzene (110 mL). To this solution was added dropwise the anhydride solution via a syringe pump over 12 hours. The mixture was then stirred for 6 more hours. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by column chromatographic (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 9:1) to give after evaporation **183** (85 mg, 87%) as a yellowish oil.

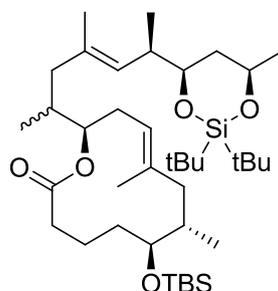
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.32 (dd, *J* = 12.1, 2.5 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 3.38 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H), 2.59-2.49 (m, 2H), 2.18 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H), 2.04-1.97 (m, 2H), 1.91-1.82 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.76-1.71 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.49-1.42 (m, 2H), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.1, 143.8, 138.0, 121.1, 111.5, 74.7, 45.5, 35.9, 33.4, 32.9, 25.9, 21.7, 18.9, 15.6, 15.8, -4.22, -4.73.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -9.9 (c 0.5, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{Si} + \text{Na}^+$ 403.2639; found 403.2640 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-6-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-12-((2*S*,6*R*,*E*)-6-((4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-butyl-6-methyl-1,3,2-dioxasilinan-4-yl)-4-methylhept-4-en-2-yl)-7,9-dimethyloxacyclododec-9-en-2-one 188



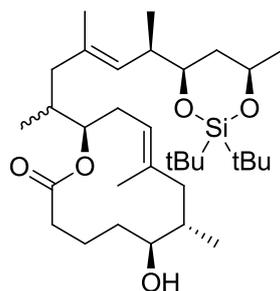
To a solution of **183** (20 mg, 0.0525 mmol) dissolved in THF (0.2 mL) and cooled at 0 °C was added 9-BBN dimer (25.6 mg, 0.105 mmol). The mixture was then allowed to warm up to room temperature and stirred for 2 hours under ultrasounds radiation (sonication). In the meantime, a mixture of **99** (24.1 mg, 0.057 mmol), Cs_2CO_3 (58.2 mg, 0.179 mmol) and AsPh_3 (4.83 mg, 0.0158 mmol) in a mixture of DMF (324 μL) and H_2O (60 μL) was prepared in a separate flask. The borane solution was cooled down to room temperature before being cannulated into the previously prepared compound **99** solution. The mixture was degassed by freeze-pump-thaw cycles and then $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (5.76 mg, 7.88 μmol) was added. The reaction was protected from light and stirred at room temperature overnight. Then, the reaction mixture was quenched by addition of water and Et_2O . The layers were separated and the aqueous layer was extracted twice with Et_2O . The combined organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated. The crude residue was purified by column chromatography (elution with petroleum ether/ EtOAc 10:0 to 95:5) to give **188** (14.4 mg, 40% over 2 steps) as a colorless oil and as a mixture of isomers that was not separated (C12-(*R*)/C12-(*S*) 2:8).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.96 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H), 4.83 (ddd, $J = 11.7, 5.7, 3.0$ Hz, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.69 (ddd, $J = 11.2, 7.7, 1.5$ Hz, 1H), 3.37 (dd, $J = 9.1, 2.3$ Hz, 1H), 2.54-2.30 (m, 3H), 2.10 (dd, $J = 13.1, 5.0$ Hz, 1H), 2.04-1.90 (m, 2H), 1.88-1.76 (m, 3H), 1.74-1.69 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.62 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H), 1.58 (m, 1H), 1.44-1.32 (m, 2H), 1.19 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.01 (s, 9H), 0.98 (s, 9H), 0.97 (m, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.85 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.04 (s, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 137.3, 132.8, 129.8, 121.4, 77.9, 77.5, 75.5, 70.5, 45.4, 43.4, 41.7, 40.5, 36.0, 35.3, 34.7, 33.4, 30.9, 29.6, 27.6, 27.2, 25.9, 24.9, 22.7, 21.7, 19.6, 18.6, 18.1, 16.7, 16.1, 15.7, 14.8, 14.5, -4.2, -4.7.

HRMS calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{O}_5\text{Si}_2 + \text{Na}^+$ 701.4967; found 701.4974 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-12-((2*S*,6*R*,*E*)-6-((4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-Butyl-6-methyl-1,3,2-dioxasilinan-4-yl)-4-methylhept-4-en-2-yl)-6-hydroxy-7,9-dimethyloxacyclododec-9-en-2-one **98**



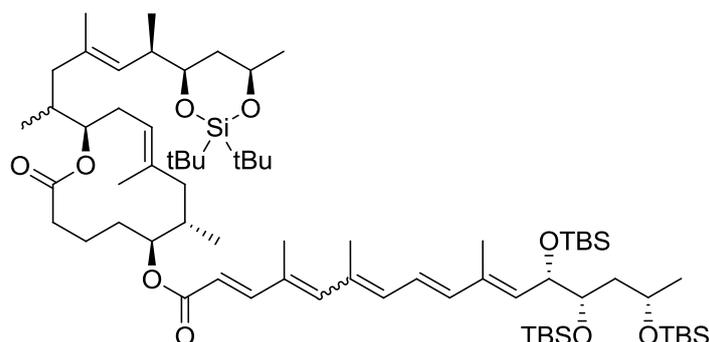
To a solution of **188** (33 mg, 0.049 mmol) in THF (1.41 mL) were added AcOH (1.57 mL, 27.5 mmol) and the commercial Dowex® 50WX8-400 hydrogen form resin pre-washed with MeOH (50 mg). The reaction mixture was stirred at 65 °C overnight. Then, the reaction mixture was cooled down to room temperature, filtered and partitioned between water and EtOAc. The organic layer was then washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (elution with CH₂Cl₂/MeOH 98:2) to give **98** (17.2 mg, 63%) as a light yellowish oil and as a mixture of isomers (C12-*R*)/C12-*S*) 2:8).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.04-4.95 (m, 3H), 4.14 (m, 1H), 3.70 (ddd, *J* = 11.5, 7.4, 1.8 Hz, 1H), 3.50 (m, 1H), 2.45 (td, *J* = 14.3, 11.2 Hz, 1H), 2.33-2.22 (m, 3H), 2.15-2.04 (m, 2H), 2.00-1.79 (m, 4H), 1.80-1.55 (m, 5H), 1.62 (s, 3H), 1.60 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 1.40-1.25 (m, 3H), 1.18 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.02-0.91 (m, 6H), 1.01 (s, 9H), 0.98 (s, 9H), 0.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.2, 137.0, 132.6, 129.9, 123.1, 77.8, 77.2, 71.0, 70.5, 45.4, 43.3, 41.7, 40.4, 35.0, 34.9, 34.8, 34.0, 30.0, 27.6, 27.2, 24.9, 22.7, 20.3, 19.6, 16.7, 16.5, 16.1, 14.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

(2*E*,8*E*,10*E*,12*S*,13*S*,15*S*)-(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-12-((2*S*,6*R*,*E*)-6-((4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-Butyl-6-methyl-1,3,2-dioxasilinan-4-yl)-4-methylhept-4-en-2-yl)-7,9-dimethyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-tris((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate **189**



To a solution of **40** (14.4 mg, 0.0212 mmol) in THF (1.24 mL) were added *i*-Pr₂NEt (14.2 μL, 0.086 mmol), 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (7 μL, 0.0435 mmol) followed by DMAP (13 mg, 0.106 mmol). Then, **98** (6 mg, 0.0106 mmol) dissolved in THF (0.460 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature protected from light for 2 hours. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was

purified by preparative TLC (elution with petroleum ether/EtOAc 9:1) to give after evaporation **189** (5.7 mg, 44%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ 1:1; C12-(*R*)/C12-(*S*) 2:8).

$^1\text{H NMR } Z-\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.93 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 15.1, 11.1$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.19 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 5.67 (m, 1H), 5.12-5.05 (m, 2H), 4.88 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.58 (dd, $J = 9.2, 3.1$ Hz, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.82-3.76 (m, 2H), 2.54-2.37 (m, 3H), 2.12-1.88 (m, 10H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.82-1.57 (m, 6H), 1.71 (br. s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.43-1.30 (m, 3H), 1.20 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H), 1.17 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.05 (br. s, 3H), 1.03 (s, 9H), 1.00 (s, 9H), 0.96-0.85 (m, 33H), 0.11-0.06 (m, 12H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).

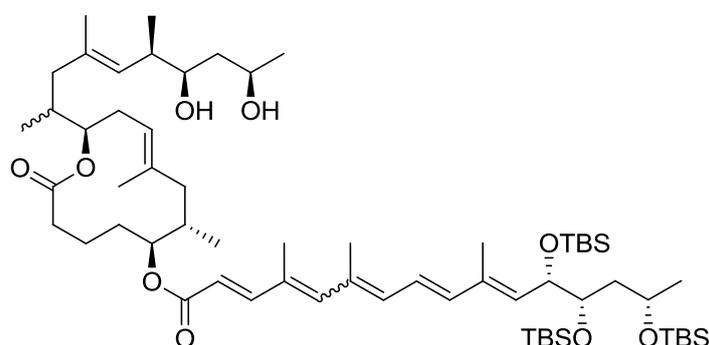
$^{13}\text{C NMR } Z-\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 173.3, 167.0, 143.1, 141.9, 140.1, 137.4, 135.8, 135.1, 134.8, 134.0, 132.1, 130.5, 125.3, 123.9, 119.8, 79.3, 79.0, 76.3, 74.4, 72.2, 71.5, 66.8, 46.5, 44.5, 44.1, 42.7, 41.4, 36.1, 35.5, 32.9, 31.7, 29.7 (obscured by acetone- d_6), 28.1, 27.7, 26.4-26.3 (m, 9C), 25.4, 24.3, 23.4, 21.2, 20.8, 20.6, 20.2, 18.8, 18.7, 17.7, 17.2, 16.3, 16.0, 15.1, 13.9, -3.8, -3.9, -4.1, -4.2, -4.3.

$^1\text{H NMR } E-\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.37 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.69 (dd, $J = 15.1, 11.0$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.37 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 5.89 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 5.67 (m, 1H), 5.12-5.05 (m, 2H), 4.88 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.58 (dd, $J = 9.2, 3.1$ Hz, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.82-3.76 (m, 2H), 2.54-2.37 (m, 3H), 2.12-1.88 (m, 10H), 2.09 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.82-1.57 (m, 6H), 1.71 (br. s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.43-1.30 (m, 3H), 1.20 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H), 1.17 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.05 (br. s, 3H), 1.03 (s, 9H), 1.00 (s, 9H), 0.96-0.85 (m, 33H), 0.11-0.06 (m, 12H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR } E-\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 173.3, 167.0, 151.3, 144.4, 140.4, 137.4, 136.0, 135.8, 135.5, 135.0, 134.0, 133.3, 130.5, 125.3, 123.9, 117.5, 79.3, 79.0, 76.3, 74.4, 72.2, 71.5, 66.8, 46.5, 44.5, 44.1, 42.7, 41.4, 36.1, 35.5, 32.9, 31.7, 29.7 (obscured by acetone- d_6), 28.1, 27.7, 26.4-26.3 (m, 9C), 25.4, 24.3, 23.4, 20.9, 20.8, 20.6, 20.2, 18.8, 18.7, 17.7, 17.2, 16.3, 16.0, 15.1, 13.9, -3.8, -3.9, -4.1, -4.2, -4.3.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*,10*E*,12*S*,13*S*,15*S*)-(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-12-((2*S*,6*R*,7*R*,9*R*,*E*)-7,9-Dihydroxy-4,6-dimethyldec-4-en-2-yl)-7,9-dimethyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-tris(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate SI-11



To a polypropylene vial containing **189** (5.5 mg, 4.49 μmol) in THF (450 μL) and pyridine (95 μL) was added HF•pyridine 70% (11.7 μL , 0.449 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The solution was then cooled in an ice bath and a saturated aqueous NaHCO_3 solution was added until gas evolution stopped. The reaction mixture was diluted with EtOAc and the layers were separated. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous

sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (eluent petroleum ether/EtOAc 6:4) to give **SI-11** (3.3 mg, 68%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ 1:1; C12-(R)/C12-(S) 2:8).

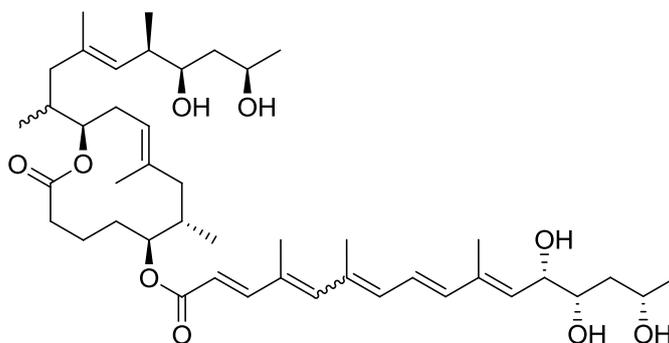
$^1\text{H NMR } Z-\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.93 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.70 (m, 1H), 6.47 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.19 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 5.92 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 5.68 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 5.04 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.58 (dd, $J = 9.0, 3.4$ Hz, 1H), 4.24-4.15 (m, 2H), 4.06-3.92 (m, 2H), 3.78 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.44-2.35 (m, 2H), 2.28-1.83 (m, 8H), 2.03 (s, 3H), 1.98 (br. s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.89-1.56 (m, 7H), 1.71 (br. s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.39 (m, 1H), 1.17 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H), 1.14 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.96-0.85 (m, 33H), 0.13-0.07 (m, 15H), 0.05-0.02 (m, 3H).

$^1\text{H NMR } E-\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.37 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.70 (m, 1H), 6.47 (m, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.35 (m, 1H), 5.89 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.68 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 5.04 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.58 (dd, $J = 9.0, 3.4$ Hz, 1H), 4.24-4.15 (m, 2H), 4.06-3.92 (m, 2H), 3.78 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.44-2.35 (m, 2H), 2.28-1.83 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (br. s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.89-1.56 (m, 7H), 1.71 (br. s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.39 (m, 1H), 1.17 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H), 1.14 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.96-0.85 (m, 33H), 0.13-0.07 (m, 15H), 0.05-0.02 (m, 3H).

HRMS calculated for $\text{C}_{62}\text{H}_{112}\text{O}_9\text{Si}_3 + \text{Na}^+$ 1107.7506; found 1107.7513 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

(2E,4E,6E,8E,10E,12S,13S,15S)-(6S,7S,12R,E)-12-((2S,6R,7R,9R,E)-7,9-Dihydroxy-4,6-dimethyldec-4-en-2-yl)-7,9-dimethyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-trihydroxy-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate - mycolactone A/B



To a stirred solution of **SI-11** (3.3 mg, 3.04 μmol) in THF (430 μL) was added a 1M solution of TBAF in THF (43 μL , 0.043 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 75 minutes. Then, CaCO_3 (10 mg), the commercial Dowex[®] 50WX8-400 hydrogen form resin (15 mg) and MeOH (0.1 mL) were added and the reaction mixture was stirred for 20 more minutes. The crude product was then filtered, concentrated under reduced pressure and purified on preparative TLC (elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) to give mycolactone A/B (1.6 mg, 71%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ 1:1; C12-(R)/C12-(S) 2:8).

$^1\text{H NMR } Z-\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.92 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 15.5, 11.3$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.16 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 5.94 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 5.04 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 2H), 4.03-3.92 (m, 4H), 3.66 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 2.54 (m, 1H), 2.44-2.34 (m, 2H), 2.22-1.94 (m, 7H), 2.02 (s, 3H), 1.98 (br. s, 3H), 1.91 (br. s, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.72-1.63 (m, 4H), 1.70 (br. s, 3H), 1.64 (br. s, 3H), 1.62-

1.45 (m, 4H), 1.39 (m, 1H), 1.14 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.11 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.98 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

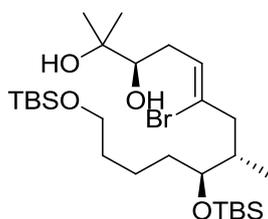
$^1\text{H NMR } E\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.37 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 15.4, 11.3$ Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.40 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.36 (m, 1H), 5.89 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 5.04 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 2H), 4.03-3.92 (m, 4H), 3.66 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 2.54 (m, 1H), 2.44-2.34 (m, 2H), 2.22-1.94 (m, 7H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (br. s, 3H), 1.91 (br. s, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.72-1.63 (m, 4H), 1.70 (br. s, 3H), 1.64 (br. s, 3H), 1.62-1.45 (m, 4H), 1.39 (m, 1H), 1.14 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.11 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.98 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

HRMS calculated for $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_9 + \text{Na}^+$ 765.4912; found 765.4908 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

5. 5. Synthesis of the C8-Br toxin's homologue

(3*R*,8*S*,9*S*,*Z*)-6-Bromo-9,13-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-2,8-dimethyltridec-5-ene-2,3-diol **193**



A solution of AD-mix beta (2.42 g, 3.100 mmol) in H_2O (8.63 mL) and *tert*-butanol (8.63 mL) was stirred at room temperature until both phases were clear. Then, methanesulfonamide (164 mg, 1.730 mmol) was added before cooling the mixture to 0 °C. To this solution, **177** (945 mg, 1.730 mmol) was added at once. The heterogeneous slurry was vigorously stirred at 4 °C overnight. The reaction mixture was quenched by addition of solid Na_2SO_3 (300 mg) at 0 °C and then allowed to warm at room temperature and stirred for further 45 minutes. The mixture was partitioned between water and EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 7:3) to give after evaporation **193** (895 mg, 89%) as a light yellowish oil.

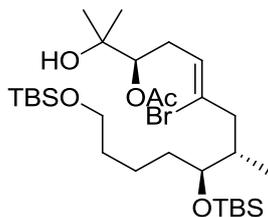
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.82 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.59 (m, 1H), 3.51 (dd, $J = 10.4, 2.4$ Hz, 1H), 2.61 (dd, $J = 13.8, 3.6$ Hz, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.31-2.21 (m, 2H), 2.13 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.57-1.48 (m, 2H), 1.45-1.35 (m, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 0.90 (s, 18H), 0.79 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 130.3, 126.5, 77.6, 75.0, 72.9, 63.1, 44.7, 35.9, 34.1, 33.4, 33.0, 26.5, 26.0, 25.9, 23.5, 22.3, 18.4, 18.1, 13.0, -4.1, -4.4, -5.3.

$[\alpha]_D^{20} +6.4$ (c 0.5, CHCl_3)

HRMS calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{57}\text{BrO}_4\text{Si}_2 + \text{H}^+$ 581.3052; found 581.3032 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(3*R*,8*S*,9*S*,*Z*)-6-Bromo-9,13-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-hydroxy-2,8-dimethyltridec-5-en-3-yl acetate SI-12



To a solution of **193** (335 mg, 0.576 mmol) in pyridine (595 μ L, 7.360 mmol) was added acetic anhydride (595 μ L, 6.340 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was diluted with EtOAc and water. The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-12** (359 mg, quantitative yield) as a yellowish oil. Due to instability issue on silica gel after a purification test, the crude residue was used directly and without further purification for the next step.

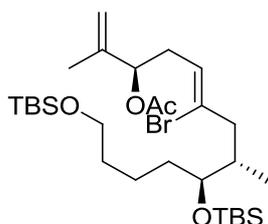
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.64 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 4.90 (dd, J = 9.2, 3.7 Hz, 1H), 3.61 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.55 (m, 1H), 2.62-2.48 (m, 3H), 2.15 (m, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.00 (ddd, J = 10.2, 6.8, 3.3 Hz, 1H), 1.70-1.59 (m, 2H), 1.54-1.48 (m, 2H), 1.44-1.36 (m, 2H), 1.31 (m, 1H), 1.25 (s, 6H), 0.90 (s, 18H), 0.76 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 130.5, 125.3, 78.6, 75.2, 72.3, 63.2, 44.4, 39.2, 33.1, 32.0, 26.7, 26.0, 26.0, 25.1, 22.4, 21.0, 18.1, 13.2, -4.2, -4.3, -5.3.

$[\alpha]_D^{20}$ -8.6 (c 0.5, CHCl₃)

HRMS calculated for C₂₉H₅₉BrO₅Si₂ + H⁺ 623.3157; found 623.3147 [M + H]⁺.

(3*R*,8*S*,9*S*,*Z*)-6-Bromo-9,13-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,8-dimethyltrideca-1,5-dien-3-yl acetate SI-13



A solution of **SI-12** (359 mg, 0.575 mmol) in dry CH₂Cl₂ (2.67 mL) and pyridine (0.86 mL, 10.60 mmol) was stirred at 0 °C for 10 minutes. Then, SOCl₂ (104 μ L, 1.44 mmol) was added and the mixture was stirred at 0 °C for 5 minutes. Then, the reaction mixture was poured into a suspension of ice, water and Et₂O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-13** (349 mg, quantitative yield) as a yellowish oil. Due to instability issue on silica gel after a purification test, the crude residue was used directly and without further purification for the next step.

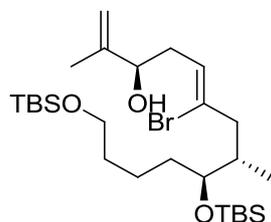
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.57 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 5.26 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.92 (s, 1H), 3.61 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.55 (m, 1H), 2.65-2.48 (m, 3H), 2.18 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.00 (ddd, J = 10.0, 6.5, 3.4 Hz, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.60-1.48 (m, 2H), 1.45-1.36 (m, 2H), 1.35-1.28 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.76 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.1, 142.5, 130.5, 124.4, 112.9, 75.7, 75.0, 63.1, 44.5, 36.0, 34.8, 33.2, 33.1, 30.3, 29.7, 26.0, 26.0, 22.4, 21.2, 18.1, 13.1, -4.2, -4.3, -5.3.

[α]_D²⁰ -5.3 (c 0.6, CHCl₃)

HRMS calculated for C₂₉H₅₇BrO₄Si₂ + H⁺ 605.3052; found 605.3055 [M + H]⁺.

(3*R*,8*S*,9*S*,*Z*)-6-Bromo-9,13-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,8-dimethyltrideca-1,5-dien-3-ol SI-14



To a solution of **SI-13** (349 mg, 0.574 mmol) in CH₂Cl₂ (5.50 mL) cooled at -78 °C was added a solution of DIBAL-H (1.5 M in toluene, 0.957 mL, 1.44 mmol). The reaction mixture was then allowed to reach room temperature and stirred for 1.5 hours. The solution was then quenched with a cooled saturated solution of Rochelle salt, and then the resultant solution was stirred at room temperature for 1 hour. The aqueous layer was extracted with Et₂O, washed with a 0.5 M aqueous HCl solution, a saturated aqueous NaHCO₃ solution and brine. The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-14** (324 mg, quantitative yield) as a yellowish oil. Due to instability issue on silica gel after a purification test, the crude residue was used directly and without further purification for the next step.

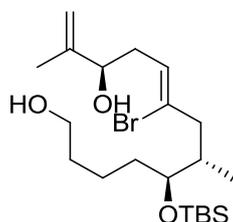
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.48 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 2.55-2.42 (m, 2H), 2.20 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.62-1.48 (m, 3H), 1.43-1.31 (m, 2H), 1.29-1.22 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.78 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 146.8, 130.2, 125.4, 111.3, 75.7, 75.0, 63.1, 44.7, 32.2, 35.9, 34.4, 33.0, 26.0, 25.9, 22.3, 18.1, 17.9, 13.1, -4.1, -4.4, -5.3.

[α]_D²⁰ +1.2 (c 0.7, CHCl₃)

HRMS calculated for C₂₇H₅₅BrO₃Si₂ + H⁺ 563.2946; found 563.2927 [M + H]⁺.

(5*S*,6*S*,11*R*,*Z*)-8-Bromo-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6,12-dimethyltrideca-8,12-diene-1,11-diol 194



To a solution of **SI-14** (324 mg, 0.573 mmol) in THF (31.0 mL) was slowly added a solution of TBAF (1 M in THF, 1.15 mL, 1.15 mmol) at 0 °C. The reaction was stirred at 0 °C overnight. Then, the reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 7:3) to give **194** (138 mg, 54% over 4 steps) as a light yellowish oil.

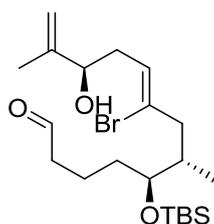
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.68 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.18 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.66 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.58 (td, $J = 5.9, 3.3$ Hz, 1H), 2.58 (dd, $J = 14.0, 3.4$ Hz, 1H), 2.56-2.41 (m, 2H), 2.21 (dd, $J = 14.0, 9.7$ Hz, 1H), 2.01 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.61-1.51 (m, 4H), 1.49-1.36 (m, 2H), 1.33-1.25 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.79 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.06 (d, $J = 5.0$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 146.8, 130.1, 125.5, 111.3, 74.8, 74.7, 62.9, 44.8, 37.2, 35.8, 33.4, 32.9, 25.9, 25.9, 22.1, 18.1, 17.9, 13.1, -4.1, -4.4.

$[\alpha]_D^{20} +2.3$ (c 0.6, CHCl_3)

HRMS calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{BrO}_3\text{Si} + \text{Na}^+$ 471.1901; found 471.1903 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(5S,6S,11R,Z)-8-Bromo-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-11-hydroxy-6,12-dimethyltrideca-8,12-dienal SI-15



To a solution of **194** (300 mg, 0.667 mmol) in CH_2Cl_2 (7.7 mL) were added TEMPO (10.4 mg, 0.067 mmol) and iodobenzene diacetate (322 mg, 1.00 mmol). The reaction was vigorously stirred at room temperature for 25 hours. Then, the reaction was quenched with a saturated aqueous NaHCO_3 solution and extracted with CH_2Cl_2 . The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-15** (298 mg, quantitative yield) as a yellowish oil. The crude residue was used directly and without further purification for the next step.

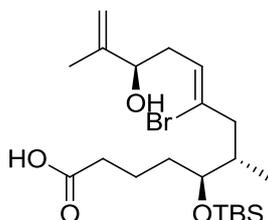
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.77 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.68 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.18 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.58 (m, 1H), 2.62 (dd, $J = 14.1, 3.8$ Hz, 1H), 2.52-2.40 (m, 3H), 2.18 (m, 1H), 2.02 (ddd, $J = 10.1, 6.7, 3.5$ Hz, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.74-1.57 (m, 2H), 1.55-1.41 (m, 2H), 1.40-1.28 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.79 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.06 (d, $J = 8.1$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 202.4, 146.8, 132.0, 125.7, 111.3, 75.8, 74.7, 62.9, 44.4, 43.9, 37.2, 36.0, 33.8, 32.9, 29.7, 25.9, 18.7, 18.1, 17.9, 13.2, -4.2, -4.3.

$[\alpha]_D^{20} -1.5$ (c 0.2, CHCl_3)

HRMS calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{BrO}_3\text{Si} + \text{Na}^+$ 469.1744; found 469.1749 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(5S,6S,11R,Z)-8-Bromo-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-11-hydroxy-6,12-dimethyltrideca-8,12-dienoic acid SI-16



To a solution of **SI-15** (298 mg, 0.666 mmol) in *tert*-BuOH (17.7 mL), H_2O (8.85 mL) and 2-methyl-2-butene (8.85 mL) were added NaH_2PO_4 (479 mg, 4.00 mmol) and NaClO_2 (246 mg, 2.73 mmol). The reaction was vigorously stirred at room temperature for 4 hours. Then, the reaction was quenched with a saturated aqueous NH_4Cl solution and extracted with EtOAc. The combined organic phases

were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-16** (309 mg, quantitative yield) as a yellowish oil. Due to instability issue on silica gel after a purification test, the crude residue was used directly and without further purification for the next step.

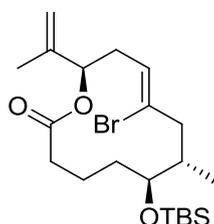
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.68 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.18 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 2.62 (dd, $J = 14.0, 3.9$ Hz, 1H), 2.55-2.43 (m, 2H), 2.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.72-1.55 (m, 2H), 1.51-1.38 (m, 2H), 1.34-1.21 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.80 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.08-0.06 (m, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 169.2, 146.8, 132.2, 128.4, 111.3, 74.7, 74.5, 44.5, 37.2, 35.9, 32.8, 29.7, 25.9, 22.7, 21.2, 18.1, 17.9, 13.3, -4.2, -4.3.

$[\alpha]_D^{20}$ -3.5 (c 0.4, CHCl_3)

HRMS calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Si} + \text{Na}^+$ 485.1693; found 485.1699 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(6S,7S,12R,Z)-9-Bromo-6-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-7-methyl-12-(prop-1-en-2-yl)oxacyclododec-9-en-2-one 191



To a solution of **SI-16** (309 mg, 0.700 mmol) in benzene (13.1 mL) were added $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ (0.859 mL, 5.20 mmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (0.412 mL, 2.63 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 hour. In a separate flask, DMAP (305 mg, 2.50 mmol) was dissolved in benzene (283 mL). To this solution was added dropwise the anhydride solution via a syringe pump over 12 hours. The mixture was then stirred for 6 more hours. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO_3 solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by column chromatographic (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 9:1) to give after evaporation **191** (141 mg, 48% over 3 steps) as a yellowish oil.

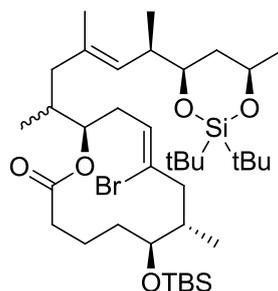
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.55 (dd, $J = 10.6, 3.8$ Hz, 1H), 5.40 (dd, $J = 12.0, 2.6$ Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.92 (s, 1H), 3.45 (ddd, $J = 9.0, 4.7, 2.1$ Hz, 1H), 2.94 (m, 1H), 2.59 (dt, $J = 12.4, 4.1$ Hz, 1H), 2.35-2.24 (m, 3H), 2.09 (ddd, $J = 9.3, 6.1, 3.8$ Hz, 1H), 2.01 (td, $J = 12.6, 4.0$ Hz, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.76-1.64 (m, 2H), 1.62-1.51 (m, 2H), 1.00 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 173.0, 143.0, 132.9, 124.7, 112.3, 76.6, 73.6, 46.5, 36.5, 35.9, 34.5, 33.6, 25.9, 20.8, 18.6, 18.5, 18.1, 14.1, -4.2, -4.8.

$[\alpha]_D^{20}$ -35.5 (c 0.5, CHCl_3)

HRMS calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{BrO}_3\text{Si} + \text{H}^+$ 445.1768; found 445.1762 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(6*S*,7*S*,12*R*,*Z*)-9-Bromo-6-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-12-((2*S*,6*R*,*E*)-6-((4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-butyl-6-methyl-1,3,2-dioxasilinan-4-yl)-4-methylhept-4-en-2-yl)-7-methyloxacyclododec-9-en-2-one 190



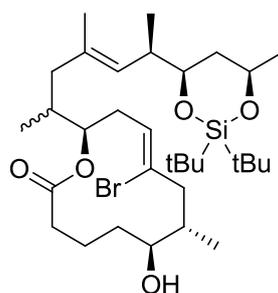
To a solution of **191** (100 mg, 0.225 mmol) dissolved in THF (0.854 mL) and cooled at 0 °C was added 9-BBN dimer (109 mg, 0.450 mmol). The mixture was then allowed to warm up to room temperature and stirred for 2 hours under ultrasounds radiation (sonication). In the meantime, a mixture of **99** (114 mg, 0.269 mmol), Cs₂CO₃ (248 mg, 0.761 mmol) and AsPh₃ (20.6 mg, 0.0671 mmol) in a mix of DMF (1.38 mL) and H₂O (0.256 mL) was prepared in a separate flask. The borane solution was cooled down to room temperature before being cannulated into the previously prepared compound **99** solution. The mixture was degassed by freeze-pump-thaw cycles and then Pd(dppf)Cl₂ (24.6 mg, 0.0336 mmol) was added. The reaction was protected from light and stirred at room temperature overnight. Then, the reaction mixture was quenched by addition of water and Et₂O. The layers were separated and the aqueous layer was extracted twice with Et₂O. The combined organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated. The crude residue was purified by column chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 95:5) to give **190** (100 mg, 60% over 2 steps) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated (C12-(*R*)/C12-(*S*) 2:8).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.45 (dd, *J* = 10.7, 3.7 Hz, 1H), 4.97 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 4.91 (ddd, *J* = 11.8, 5.9, 3.0 Hz, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.56 (dt, *J* = 12.2, 4.0 Hz, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.28-2.22 (m, 2H), 2.20-2.14 (m, 2H), 2.08-1.87 (m, 3H), 1.80-1.70 (m, 4H), 1.61 (s, 3H), 1.58-1.48 (m, 2H), 1.44-1.23 (m, 2H), 1.19 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.17-1.10 (m, 2H), 1.01 (s, 9H), 1.00-0.99 (m, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.05 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 132.6, 132.5, 129.9, 125.1, 77.8, 76.3, 74.5, 70.5, 46.4, 43.2, 41.7, 40.4, 35.9, 34.8, 34.5, 33.8, 33.6, 29.7, 27.6, 27.2, 25.9, 24.9, 22.7, 20.8, 19.6, 18.5, 18.1, 16.7, 16.1, 14.5, -4.2, -4.8.

HRMS calculated for C₃₈H₇₁BrO₅Si₂ + H⁺ 743.4096; found 743.4095 [M + H]⁺.

(6*S*,7*S*,12*R*,*Z*)-9-Bromo-12-((2*S*,6*R*,*E*)-6-((4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-butyl-6-methyl-1,3,2-dioxasilinan-4-yl)-4-methylhept-4-en-2-yl)-6-hydroxy-7-methyloxacyclododec-9-en-2-one 211



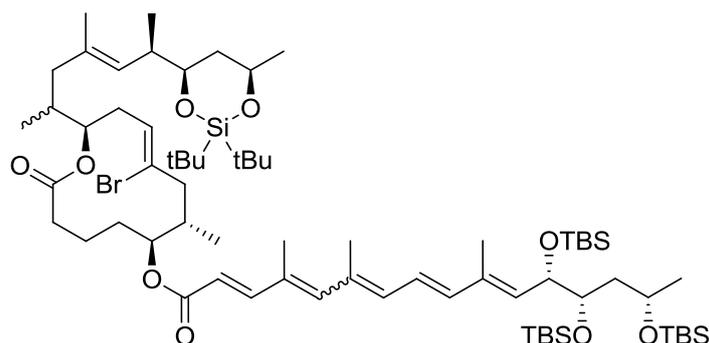
To a solution of **190** (15 mg, 0.020 mmol) in THF (0.920 mL) were added AcOH (1.85 mL, 32.3 mmol) and the commercial Dowex® 50WX8-400 hydrogen form resin pre-washed with MeOH (50 mg). The reaction mixture was stirred at 65 °C overnight. Then, the reaction mixture was cooled down to room temperature, filtered and partitioned between water and EtOAc. The organic layer was then washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative HPLC (analytical Si column, 5 μm, 250 x 10.0 mm, elution with CH₂Cl₂/MeOH 10:0 to 98:2) to give **211** (6.2 mg, 47%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated (C12-(*R*)/C12-(*S*) 2:8).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.54 (dd, *J* = 11.1, 3.5 Hz, 1H), 5.07 (ddd, *J* = 11.6, 5.6, 2.4 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.38-2.28 (m, 4H), 2.25 (m, 1H), 2.16-2.11 (m, 2H), 1.95-1.82 (m, 4H), 1.78-1.68 (m, 4H), 1.67-1.63 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.35-1.23 (m, 2H), 1.20 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 1.01 (s, 9H), 1.00-0.99 (m, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.6, 132.4, 130.7, 130.2, 126.6, 77.8, 75.8, 70.5, 64.3, 46.7, 43.0, 41.7, 40.4, 35.0, 34.9, 34.7, 34.5, 34.2, 29.7, 27.6, 27.2, 26.2, 24.9, 22.7, 19.8, 19.6, 16.6, 16.1, 14.8, 14.1.

HRMS calculated for C₃₂H₅₇BrO₅Si + Na⁺ 651.3051; found 651.3056 [M + Na]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*,10*E*,12*S*,13*S*,15*S*)-(6*S*,7*S*,12*R*,*Z*)-9-Bromo-12-((2*S*,6*R*,*E*)-6-((4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-butyl-6-methyl-1,3,2-dioxasilinan-4-yl)-4-methylhept-4-en-2-yl)-7-methyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-tris((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate SI-17



To a solution of **40** (12.9 mg, 0.019 mmol) in THF (1.11 mL) were added *i*-Pr₂NEt (12.7 μL, 0.077 mmol), 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (6 μL, 0.039 mmol) followed by DMAP (11.6 mg, 0.095 mmol). Then, **211** (6 mg, 0.0095 mmol) dissolved in THF (0.413 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature protected from light for 2 hours. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (elution with petroleum ether/EtOAc 9:1) to give after evaporation **SI-17** (3.4 mg, 28%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated (*E*-Δ^{4'-5'}/*Z*-Δ^{4'-5'} 1:1; C12-(*R*)/C12-(*S*) 2:8).

¹H NMR *Z*-Δ^{4'-5'} (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.95 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 14.6, 10.8 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.20 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 5.94 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.77 (m, 1H), 5.68 (dd, *J* = 9.6, 4.8 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.80 (m, 1H), 4.59 (dd, *J* = 9.2, 3.4 Hz, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.86-3.76 (m, 2H), 2.64 (m, 1H), 2.50-2.14 (m, 4H), 2.10-1.89 (m, 8H), 1.99 (br. s, 3H), 1.96 (br. s, 3H), 1.84-1.58 (m, 6H), 1.65 (br. s, 3H), 1.44-1.25 (m, 3H), 1.29 (br. s, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.18 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.06 (br. s, 3H), 1.01 (s, 9H), 0.99 (s, 9H), 0.94-0.86 (m, 30H), 0.13-0.06 (m, 12H), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H).

$^1\text{H NMR Z-}\Delta^{4'-5'}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.50 (m, 1H), 6.36 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.16 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 5.90 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 5.62-5.55 (m, 2H), 4.97 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.82 (m, 1H), 4.44 (dd, $J = 9.1, 3.5$ Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.65 (td, $J = 7.4, 3.7$ Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.49-2.40 (m, 2H), 2.37-2.27 (m, 4H), 2.20 (m, 1H), 2.15-2.09 (m, 2H), 1.97 (br. s, 3H), 1.96 (br. s, 3H), 1.93 (br. s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.78-1.65 (m, 5H), 1.63 (br. s, 3H), 1.58 (br. s, 3H), 1.38-1.28 (m, 2H), 1.29 (br. s, 3H), 1.19 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H), 1.01 (s, 9H), 0.98 (s, 9H), 0.89-0.86 (m, 30H), 0.08 (s, 3H), 0.07-0.05 (m, 6H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H).

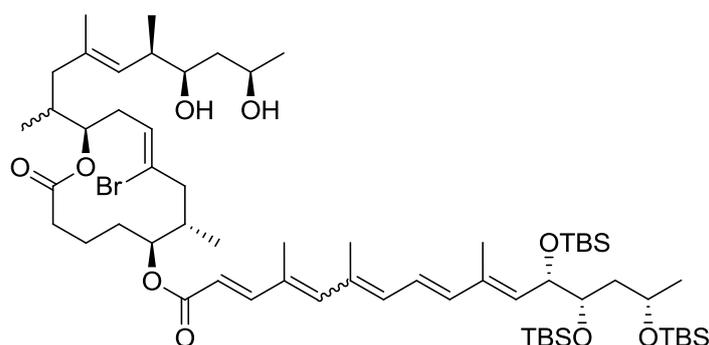
$^{13}\text{C NMR Z-}\Delta^{4'-5'}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 173.1, 168.8, 142.9, 141.6, 139.6, 134.7, 134.3, 134.0, 132.5, 132.2, 131.4, 130.0, 126.1, 123.7, 118.3, 77.8, 77.2 (obscured by CDCl_3), 74.9, 73.7, 71.4, 70.5, 66.1, 46.5, 43.1, 42.7, 41.7, 40.4, 35.5, 34.7, 33.8, 31.9, 29.7, 27.6, 27.2, 25.9-25.8 (m, 9C), 24.9, 23.5, 22.7, 21.5, 21.2, 19.6, 18.2, 18.1, 17.9, 17.5, 16.4, 16.1, 14.5, 14.1, 13.5, -4.1, -4.2, -4.3, -4.5, -4.7.

$^1\text{H NMR E-}\Delta^{4'-5'}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.49 (m, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.37 (m, 1H), 6.30 (m, 1H), 5.87 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 5.62-5.55 (m, 2H), 4.97 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.82 (m, 1H), 4.44 (dd, $J = 9.1, 3.5$ Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.65 (td, $J = 7.4, 3.7$ Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.49-2.40 (m, 2H), 2.37-2.27 (m, 4H), 2.20 (m, 1H), 2.15-2.09 (m, 2H), 2.08-2.04 (m, 6H), 1.96 (br. s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.78-1.65 (m, 5H), 1.63 (br. s, 3H), 1.58 (br. s, 3H), 1.38-1.28 (m, 2H), 1.29 (br. s, 3H), 1.19 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H), 1.01 (s, 9H), 0.98 (s, 9H), 0.89-0.86 (m, 30H), 0.08 (s, 3H), 0.07-0.05 (m, 6H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR E-}\Delta^{4'-5'}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 173.1, 168.8, 150.9, 143.8, 139.8, 135.2, 134.6, 134.1, 132.5, 131.5, 131.4, 130.8, 126.1, 123.8, 116.4, 77.8, 77.2 (obscured by CDCl_3), 74.9, 73.7, 71.4, 70.5, 66.1, 46.5, 43.1, 42.7, 41.7, 40.4, 35.5, 34.7, 33.8, 31.9, 29.7, 27.6, 27.2, 25.9-25.8 (m, 9C), 24.9, 23.5, 22.7, 21.5, 21.2, 19.6, 18.2, 18.1, 17.9, 17.5, 16.6, 16.1, 14.5, 14.2, 13.5, -4.1, -4.2, -4.3, -4.5, -4.7.

HRMS calculated for $\text{C}_{69}\text{H}_{125}\text{BrO}_9\text{Si}_4 + \text{Na}^+$ 1311.7476; found 1311.7480 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2E,4E,6E,8E,10E,12S,13S,15S)-(6S,7S,12R,Z)-9-Bromo-12-((2S,6R,7R,9R,E)-7,9-dihydroxy-4,6-dimethyldec-4-en-2-yl)-7-methyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-tris((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate 213



To a polypropylene vial containing **SI-17** (3.2 mg, 2.48 μmol) in THF (250 μL) and pyridine (53 μL) was added HF•pyridine 70% (6.5 μL , 0.248 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The solution was then cooled in an ice bath and a saturated aqueous NaHCO_3 solution was added until gas evolution stopped. The reaction mixture was diluted with EtOAc and the layers were separated. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (eluent petroleum ether/EtOAc 6:4) to give **213** (1.3 mg, 46%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ 1:1; C12-(R)/C12-(S) 2:8).

¹H NMR Z-Δ^{4'-5'} (400 MHz, Acetone-d₆) δ 7.94 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.71 (m, 1H), 6.45 (m, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.19 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 5.96 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.78 (m, 1H), 5.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 4.58 (dd, *J* = 9.1, 3.3 Hz, 1H), 4.20-4.15 (m, 2H), 4.03-3.92 (m, 2H), 3.78 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 2.70 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.33-2.23 (m, 2H), 2.13-1.92 (m, 6H), 2.10 (s, 3H), 1.98 (br. s, 3H), 1.95 (br. s, 3H), 1.85 (m, 1H), 1.72-1.59 (m, 7H), 1.65 (s, 3H), 1.17 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.95-0.86 (m, 33H), 0.14-0.06 (m, 15H), 0.04-0.02 (m, 3H).

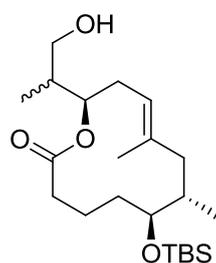
¹H NMR E-Δ^{4'-5'} (400 MHz, Acetone-d₆) δ 7.38 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.68 (m, 1H), 6.50 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.37 (m, 1H), 5.90 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.78 (m, 1H), 5.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 4.58 (dd, *J* = 9.1, 3.3 Hz, 1H), 4.20-4.15 (m, 2H), 4.03-3.92 (m, 2H), 3.78 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.33-2.23 (m, 2H), 2.13-1.92 (m, 6H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, obscured by acetone-d₆), 1.95 (br. s, 3H), 1.85 (m, 1H), 1.72-1.59 (m, 7H), 1.65 (s, 3H), 1.17 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.95-0.86 (m, 33H), 0.14-0.06 (m, 15H), 0.04-0.02 (m, 3H).

HRMS calculated for C₆₁H₁₀₉BrO₉Si₃ + Na⁺ 1171.6455; found 1171.6452 [M + Na]⁺.

5. 6. Synthesis of intermediates and analogues

5. 6. 1. *Synthesis of the intermediates of interest*

(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-6-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-12-((*S*)-1-hydroxypropan-2-yl)-7,9-dimethyloxacyclododec-9-en-2-one 185



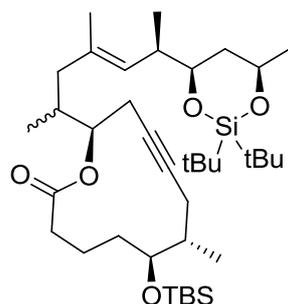
To a solution of **183** (8 mg, 0.021 mmol) dissolved in THF (80 μL) and cooled at 0 °C was added 9-BBN dimer (13 mg, 0.053 mmol). The mixture was then allowed to warm up to room temperature and was stirred for 2 hours under ultrasounds (sonication). The reaction was then quenched with H₂O (0.4 mL) and MeOH (0.4 mL) before the addition of NaBO₃•4H₂O (9.7 mg, 0.0315 mmol). The mixture was vigorously stirred at room temperature for 2 hours. The phases were separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3 times). The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (elution with petroleum ether/EtOAc 7:3) to give **185** (5 mg, 60% over 2 steps) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated (C12-(*R*)/C12-(*S*) 2:8).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.02 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.82 (ddd, *J* = 11.6, 9.1, 3.0 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 11.8, 3.3 Hz, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.46-2.34 (m, 2H), 2.20 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.04-1.97 (m, 2H), 1.91-1.82 (m, 2H), 1.76-1.64 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.59-1.41 (m, 3H), 1.07 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.96 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.2, 137.6, 121.4, 77.5, 74.2, 64.0, 45.4, 40.3, 35.9, 33.4, 33.3, 31.8, 27.4, 25.9, 22.7, 21.7, 18.5, 18.4, 15.8, 13.8, 10.1, -4.2, -4.8.

HRMS calculated for C₂₂H₄₂O₄Si + H⁺ 399.2925; found 399.2926 [M + H]⁺.

(6*S*,7*S*,12*R*)-6-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-12-[(2*S*,4*E*,6*R*)-6-[(4*R*,6*R*)-2,2-di-*tert*-butyl-6-methyl-1,3,2-dioxasilinan-4-yl]-4-methylhept-4-en-2-yl]-7-methyl-1-oxacyclododec-9-yn-2-one **203**



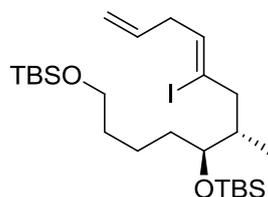
A microwave vial was charged with CuI (0.3 mg, 1.21 μmol), KI (2 mg, 12.10 μmol), evacuated and backfilled with N_2 . Then, DMEDA (0.30 μL , 2.42 μmol) followed by **190** (6 mg, 8.06 μmol) dissolved in *n*-BuOH (72 μL) were added under nitrogen atmosphere. The microwave vial was sealed and the reaction mixture was heated at 120 $^\circ\text{C}$ for 28 hours. The resulting tan suspension was allowed to reach room temperature and filtered through celite. The filtrate was partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to afford **203** (4.0 mg, 75%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated (C12-(*R*)/C12-(*S*) 2:8).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.94 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 4.83 (ddd, $J = 10.9, 5.2, 3.4$ Hz, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 2.35-2.28 (m, 2H), 2.12-2.00 (m, 2H), 1.96-1.82 (m, 4H), 1.80-1.73 (m, 2H), 1.65-1.52 (m, 6H), 1.61 (s, 3H), 1.37-1.23 (m, 2H), 1.19 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.01 (s, 9H), 1.00-0.99 (m, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 132.4, 130.0, 99.9, 81.6, 77.8, 76.5, 74.7, 70.5, 43.4, 41.7, 40.4, 36.9, 36.1, 34.3, 33.5, 29.7, 27.6, 27.2, 25.9, 24.9, 23.6, 22.7, 20.7, 19.6, 19.1, 18.1, 16.7, 16.0, 14.1, 1.0, -4.2, -5.0.

HRMS calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{70}\text{O}_5\text{Si}_2 + \text{Na}^+$ 685.4654; found 685.4634 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(*S*)-5-((*S*,*Z*)-4-Iodoocta-4,7-dien-2-yl)-2,2,3,3,11,11,12,12-octamethyl-4,10-dioxa-3,11-disilatridecane **225**



A microwave vial was charged with CuI (1.65 mg, 8.66 μmol), NaI (17.3 mg, 0.115 mmol), evacuated and backfilled with N_2 . Then, DMEDA (1.86 μL , 0.0173 mmol) followed by **169** (30 mg, 0.0577 mmol) dissolved in *n*-BuOH (75 μL) were added under nitrogen atmosphere. The microwave vial was sealed and the reaction mixture was heated at 120 $^\circ\text{C}$ for 178 hours. The resulting tan suspension was allowed to reach room temperature and filtered through celite. The filtrate was partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to afford **225** (33 mg, quantitative yield) as a yellowish oil.

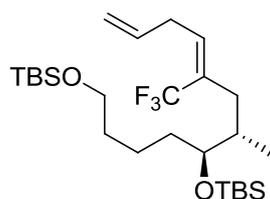
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.81 (ddt, $J = 16.9, 10.3, 6.3$ Hz, 1H), 5.52 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 5.14-5.02 (m, 2H), 3.62 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.57 (m, 1H), 2.90 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.64 (dd, $J = 13.3, 4.0$ Hz, 1H), 2.24 (dd, $J = 13.8, 9.8$ Hz, 1H), 1.98 (m, 1H), 1.56-1.47 (m, 2H), 1.46-1.32 (m, 2H), 1.31-1.24 (m, 2H), 0.91 (s, 18H), 0.77 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.06 (s, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 134.8, 133.0, 115.6, 111.0, 74.8, 63.1, 48.0, 40.8, 36.8, 33.7, 33.1, 26.0, 22.4, 18.4, 18.2, 12.9, -4.1, -4.3, -5.3.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -8.2 (c 0.5, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{IO}_2\text{Si}_2 + \text{NH}_4^+$ 584.2811; found 584.2804 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$.

(S)-2,2,3,3,11,11,12,12-Octamethyl-5-((S,Z)-4-(trifluoromethyl)octa-4,7-dien-2-yl)-4,10-dioxo-3,11-disilatridecane **227**



A dried scelled tub was charged with CuTc (2.52 mg, 0.0132 mmol). Then, **225** (30 mg, 0.0529 mmol) dissolved in dry and deoxygenated DMF (0.529 mL) was added, followed by MFSDA (34 μL , 0.265 mmol). The reaction mixture was stirred at 80 $^\circ\text{C}$ for 1 hour. The mixture was cooled to room temperature and diluted with Et_2O . The organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **227** (21 mg, 80%) as a yellowish oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.80 (ddt, $J = 17.0, 10.3, 6.4$ Hz, 1H), 5.69 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.11-5.04 (m, 2H), 3.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.56 (td, $J = 6.0, 3.0$ Hz, 1H), 3.04-2.95 (m, 2H), 2.45 (dd, $J = 13.8, 3.0$ Hz, 1H), 1.91-1.83 (m, 1H), 1.79-1.71 (m, 1H), 1.54-1.47 (m, 2H), 1.45-1.37 (m, 2H), 1.35-1.23 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.80 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.05 (s, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 135.7 (q, $J = 3.7$ Hz, 1C), 129.2 (q, $J = 27.9$ Hz, 1C), 127.2 (q, $J = 276.5$ Hz, 1C), 116.0, 75.4, 63.1, 36.2 (q, $J = 2.2$ Hz, 1C), 36.1, 33.4, 33.1, 32.7, 29.7, 26.0, 22.3, 18.6, 18.1, 13.0, -4.1, -4.5, -5.3.

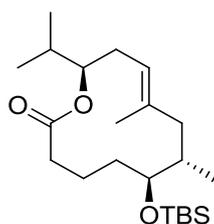
$^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CDCl_3) δ -59.1 (s, 3F).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -9.5 (c 0.3, CHCl_3).

HRMS calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{51}\text{F}_3\text{O}_2\text{Si}_2 + \text{NH}_4^+$ 526.3718; found 526.3718 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$.

5. 6. 2. Synthesis of the isopropyle analogue

(6S,7S,12R,E)-6-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-12-isopropyl-7,9-dimethyloxacyclododec-9-en-2-one **217**



To a solution of **183** (20 mg, 0.053 mmol) in EtOAc (8 mL) was added PtO₂ (4 mg, 0.018 mmol). The reaction was stirred under an atmosphere of H₂ for 1 hour at room temperature. Then, the reaction mixture was filtrated over Celite®. The filtrate was evaporated under reduced pressure to give **217** (20.1 mg, quantitative yield) as a colorless oil.

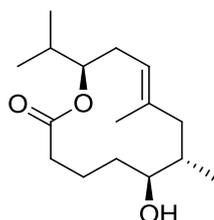
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.01 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.82 (ddd, *J* = 11.6, 6.4, 3.1 Hz, 1H), 3.38 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H), 2.49 (m, 1H), 2.39 (dt, *J* = 14.0, 11.5 Hz, 1H), 2.30 (m, 1H), 2.18-2.00 (m, 2H), 1.96 (m, 1H), 1.93-1.80 (m, 2H), 1.73-1.62 (m, 2H), 1.63 (s, 3H), 1.47-1.36 (m, 2H), 1.10-0.88 (m, 18H), 0.05 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.6, 137.3, 121.4, 77.4, 76.5, 45.3, 36.0, 33.4, 33.4, 32.6, 30.9, 25.9, 21.7, 18.7, 18.4, 18.4, 18.1, 15.7, -4.2, -4.7.

[α]_D²⁰ -17.1 (c 0.2, CHCl₃).

HRMS calculated for C₂₂H₄₂O₃Si + H⁺ 383.2976; found 383.2982 [M + H]⁺.

(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-6-Hydroxy-12-isopropyl-7,9-dimethyloxacyclododec-9-en-2-one **126**



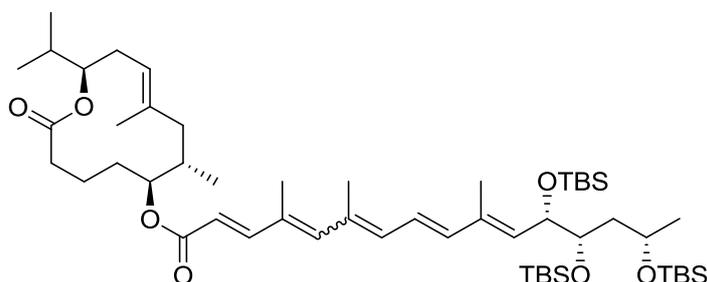
To a solution of **217** (15 mg, 0.039 mmol) in THF (1.79 mL) were added AcOH (3.6 mL, 62.8 mmol) and the commercial Dowex® 50WX8-400 hydrogen form resin pre-washed with MeOH (50 mg). The reaction mixture was stirred at 65 °C overnight. Then, the reaction mixture was cooled down to room temperature, filtered and partitioned between water and EtOAc. The organic layer was then washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative HPLC (analytical Si column, 5 μm, 250 x 10.0 mm, elution with CH₂Cl₂/MeOH 10:0 to 98:2) to give after evaporation **126** (5 mg, 48%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.07 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.98 (ddd, *J* = 11.5, 6.1, 2.5 Hz, 1H), 3.54 (ddd, *J* = 8.8, 4.5, 2.5 Hz, 1H), 2.46 (dt, *J* = 14.2, 11.6 Hz, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.01-1.90 (m, 3H), 1.86-1.79 (m, 2H), 1.73-1.69 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.56 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 0.97-0.88 (m, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.5, 136.9, 123.2, 77.9, 70.3, 45.5, 34.9, 34.8, 34.2, 32.6, 31.3, 20.3, 18.7, 18.1, 16.2, 15.8.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.⁴

(2E,4E,6E,8E,10E,12S,13S,15S)-(6S,7S,12R,E)-12-Isopropyl-7,9-dimethyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-tris((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate **218**



To a stirred solution of **40** (15.2 mg, 0.0224 mmol) in dry benzene (190 μ L) were added *i*-Pr₂NEt (13.8 μ L, 0.0835 mmol), 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (7 μ L, 0.0447 mmol) and DMAP (12.7 mg, 0.104 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 10 minutes before the addition of **126** (4 mg, 0.0149 mmol) dissolved in dry benzene (50 μ L). The reaction mixture was then stirred at room temperature for 15 hours. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (elution with petroleum ether/EtOAc 9:1) to give after evaporation **218** (4.0 mg, 29%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated (*E*- $\Delta^{4'-5'}$ /*Z*- $\Delta^{4'-5'}$ 1:1).

¹H NMR *Z*- $\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.50 (m, 1H), 6.36 (m, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.16 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.87 (ddd, *J* = 11.6, 6.3, 3.3 Hz, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.44 (dd, *J* = 9.2, 3.7 Hz, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 2.47-2.37 (m, 2H), 2.12-1.93 (m, 5H), 2.04 (br. s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.84-1.71 (m, 4H), 1.69 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.29 (m, 1H), 1.15 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 0.96-0.91 (m, 9H), 0.89 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.06 (s, 9H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

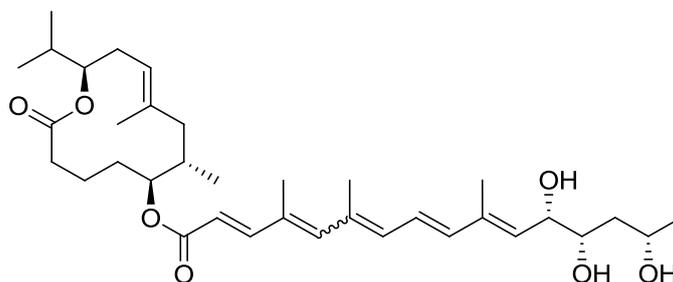
¹³C NMR *Z*- $\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 166.9, 142.7, 141.4, 139.6, 135.1, 134.0, 133.9, 132.2, 130.9, 123.8, 122.5, 118.6, 78.8, 76.1, 73.7, 71.4, 66.1, 45.5, 42.7, 35.4, 32.5, 31.9, 29.7, 25.9, 25.8, 23.5, 21.2, 20.4, 19.9, 18.2, 18.0, 17.5, 17.1, 15.7, 14.2, 13.5, -4.2, -4.3, -4.5, -4.6, -4.7.

¹H NMR *E*- $\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.50 (m, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.33 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 5.85 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.87 (ddd, *J* = 11.6, 6.3, 3.3 Hz, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.44 (dd, *J* = 9.2, 3.7 Hz, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 2.47-2.37 (m, 2H), 2.12-1.93 (m, 5H), 2.06 (br. s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.84-1.58 (m, 6H), 1.69 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H), 1.29 (m, 1H), 1.15 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 0.96-0.91 (m, 9H), 0.89 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.06 (s, 9H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

¹³C NMR *E*- $\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 166.9, 150.7, 143.6, 139.8, 136.6, 134.7, 134.6, 133.9, 130.9, 123.8, 122.5, 116.4, 78.8, 76.1, 73.7, 71.4, 66.1, 45.5, 42.7, 35.4, 32.5, 31.9, 29.7, 25.9, 25.8, 23.5, 21.2, 20.5, 20.0, 18.4, 18.1, 17.5, 17.1, 15.7, 14.2, 13.5, -4.2, -4.3, -4.5, -4.6, -4.7.

HRMS calculated for C₅₃H₉₆O₇Si₃ + Na⁺ 951.6356; found 951.6344 [M + Na]⁺.

**(2E,8E,10E,12S,13S,15S)-(6S,7S,12R,E)-12-Isopropyl-7,9-dimethyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl
12,13,15-trihydroxy-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate **216****



To a stirred solution of **218** (4 mg, 4.30 μmol) in THF (35 μL) was added a 1 M solution of TBAF in THF (40 μL , 0.0387 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 hours. Then, CaCO_3 (10 mg), the commercial Dowex[®] 50WX8-400 hydrogen form resin (15 mg) and MeOH (0.1 mL) were added and the reaction mixture was stirred for 1 more hour. The crude product was then filtered, concentrated under reduced pressure and purified on preparative TLC (elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) to give **216** (2.3 mg, 91%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E\text{-}\Delta^{4'-5'}/Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ 1:1).

$^1\text{H NMR Z-}\Delta^{4'-5'}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.59 (m, 1H), 6.34 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.11 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 5.91 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 5.48 (m, 1H), 5.15-5.09 (m, 2H), 4.87 (ddt, $J = 14.3, 11.2, 3.0$ Hz, 2H), 4.80-4.74 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 2.45-2.37 (m, 2H), 2.02 (m, 1H), 2.01 (br. s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.83 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H), 1.78 (m, 1H), 1.68 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 1.61 (m, 1H), 1.57-1.50 (m, 3H), 1.23-1.21 (m, 3H), 0.96-0.92 (m, 12H).

$^{13}\text{C NMR Z-}\Delta^{4'-5'}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 173.3, 166.8, 142.8, 141.0, 138.3, 136.6, 135.2, 134.4, 132.7, 131.6, 125.3, 122.6, 118.8, 78.8, 75.9, 75.8, 72.2, 68.6, 45.5, 40.4, 35.4, 32.5, 31.9, 30.9, 29.7, 26.9, 24.2, 22.7, 20.4, 18.4, 17.2, 15.7, 14.1, 13.4.

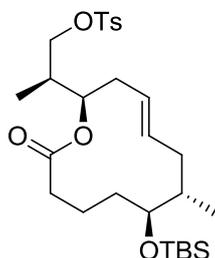
$^1\text{H NMR Z-}\Delta^{4'-5'}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.37 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.55 (m, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.34 (m, 1H), 6.30 (m, 1H), 5.87 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 5.48 (m, 1H), 5.15-5.09 (m, 2H), 4.87 (ddt, $J = 14.3, 11.2, 3.0$ Hz, 2H), 4.80-4.74 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 2.45-2.37 (m, 2H), 2.08 (m, 1H), 2.06 (br. s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.83 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H), 1.78 (m, 1H), 1.68 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 1.61 (m, 1H), 1.57-1.50 (m, 3H), 1.23-1.21 (m, 3H), 0.96-0.92 (m, 12H).

$^{13}\text{C NMR Z-}\Delta^{4'-5'}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 173.3, 166.8, 150.5, 143.3, 138.6, 138.0, 136.7, 134.9, 133.5, 131.6, 125.3, 122.6, 116.8, 78.8, 75.9, 75.8, 72.2, 68.6, 45.5, 40.4, 35.4, 32.5, 31.9, 30.9, 29.7, 26.9, 24.2, 22.7, 20.5, 18.4, 17.6, 15.7, 14.1, 13.4.

HRMS calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_7 + \text{Na}^+$ 609.3762; found 609.3769 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

5. 6. 3. Synthesis of the C8-desmethyl fluorescent analogue

(S)-2-((2R,7S,8S,E)-8-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-7-methyl-12-oxooxacyclododec-4-en-2-yl)propyl 4-methylbenzenesulfonate **161**



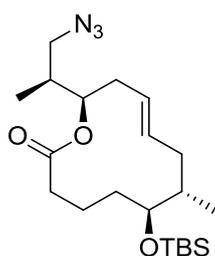
To a solution of (2S,3R)-2-methyl-1-[[[(4-methylphenyl)sulfonyl]oxy]hex-5-en-3-yl (5S,6S)-5-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-6-methylnon-8-enoate (79 mg, 0.139 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL) was dropwise a solution of Grubbs 2nd generation precatalyst (11.8 mg, 0.0139 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, the mixture was filtered through a short pad of silica and evaporated. The crude residue was purified by flash chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 95:5) to give **161** (52 mg, 69%) as a light yellowish oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.41 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.40 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.13-1.97 (m, 2H), 1.94-1.85 (m, 2H), 1.78-1.70 (m, 2H), 1.65 (m, 1H), 1.60-1.39 (m, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.0, 144.8, 136.3, 132.8, 129.8, 128.0, 124.0, 77.3, 71.6, 71.5, 37.9, 37.3, 36.6, 36.3, 35.6, 32.6, 26.9, 25.9, 21.7, 21.4, 18.2, 13.5, -4.2.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.³

(6S,7S,12R,E)-12-((S)-1-Azidopropan-2-yl)-6-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-7-methyloxacyclododec-9-en-2-one **SI-18**

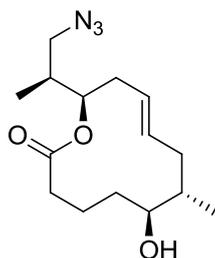


To a solution of **161** (91 mg, 0.169 mmol) in DMF (1.1 mL) was added sodium azide (20.9 mg, 0.321 mmol). The reaction mixture was warmed up to 75 °C and stirred for 4.5 hours. Then, the mixture was cooled to 0 °C before being diluted with water and diethyl ether. The aqueous layer was washed three times with diethyl ether. The organic layers were combined, washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **SI-18** (71 mg, quantitative yield) as a yellowish oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.42 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.84 (m, 1H), 3.35 (dd, *J* = 12.2, 5.0 Hz, 1H), 3.30 (m, 1H), 3.10 (dd, *J* = 12.2, 7.7 Hz, 1H), 2.51 (ddd, *J* = 11.9, 4.2, 3.4 Hz, 1H), 2.28 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 1.99-1.89 (m, 3H), 1.87-1.83 (m, 2H), 1.76-1.68 (m, 2H), 1.61-1.57 (m, 2H), 0.99 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.01 (s, 6H).

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.³

(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-12-((*S*)-1-Azidopropan-2-yl)-6-hydroxy-7-methyloxacyclododec-9-en-2-one **162**



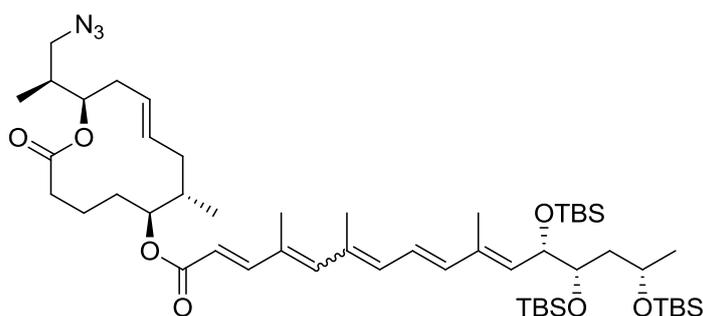
To a 50 mL polypropylene vial containing a solution of **SI-18** (71 mg, 0.173 mmol) in pyridine (5.7 mL) was added HF•pyridine 70% (2.02 mL, 77.9 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was warmed up at 40 °C and stirred overnight. The solution was then cooled in an ice bath and a saturated aqueous NaHCO₃ solution was added until gas evolution stopped. The reaction mixture was diluted with Et₂O and the layers were separated. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to give **162** (51 mg, quantitative yield) as a light yellowish oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.43 (m, 1H), 5.22 (m, 1H), 4.97 (ddd, *J* = 11.6, 6.7, 2.5 Hz, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.37 (dd, *J* = 12.1, 5.2 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 12.2, 7.5 Hz, 1H), 2.45-2.33 (m, 2H), 2.24-2.16 (m, 2H), 2.00-1.81 (m, 3H), 1.72-1.59 (m, 3H), 1.54-1.42 (m, 2H), 1.03 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.99 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.0, 135.1, 126.1, 73.9, 73.3, 54.0, 38.0, 37.8, 36.8, 36.5, 35.2, 33.0, 19.3, 18.3, 14.4.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.³

(2*E*,8*E*,10*E*,12*S*,13*S*,15*S*)-(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-12-((*S*)-1-Azidopropan-2-yl)-7-methyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-tris(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate **SI-19**



To a stirred solution of **40** (224 mg, 0.33 mmol) in benzene (2.79 mL) were added *i*-Pr₂NEt (0.204 mL, 1.23 mmol), 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (0.103 mL, 0.66 mmol) and DMAP (188 mg, 1.54 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 10 minutes before the addition of **162** (65 mg, 0.22 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 hours. Then, the reaction was quenched by addition of a saturated aqueous NaHCO₃ solution and was diluted with Et₂O. The organic layer was washed with a 1 M aqueous HCl solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (elution with petroleum ether/EtOAc 10:0 to 8:2) to give **SI-19** (215 mg,

quantitative yield) as a yellow oil and as a mixture of isomers that was not separated (E - $\Delta^{4'-5'}$ / Z - $\Delta^{4'-5'}$ 1:1).

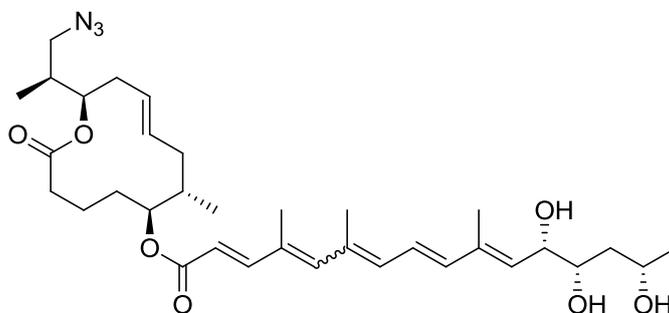
$^1\text{H NMR } Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.48 (dd, J = 14.7, 11.3 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.15 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 5.87 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.57 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.42 (m, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.73 (m, 1H), 4.46 (dd, J = 9.1, 3.6 Hz, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.19-2.08 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.95-1.85 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.79-1.56 (m, 8H), 1.13 (d, J = 5.9 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.87 (s, 9 H), 0.86 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.04 (s, 9 H), 0.03 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), -0.04 (s, 3H).

$^1\text{H NMR } E\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.36 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.50 (dd, J = 15.0, 11.4 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.29 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 5.84 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 5.54 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.42 (m, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.73 (m, 1H), 4.46 (dd, J = 9.1, 3.6 Hz, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.19-2.08 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.95-1.85 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.79-1.56 (m, 8H), 1.13 (d, J = 5.9 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.87 (s, 9 H), 0.86 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.04 (s, 9 H), 0.03 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), -0.04 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR } E\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.8, 166.8, 150.8, 143.7, 139.8, 135.4, 135.2, 134.6, 134.3, 134.1, 132.2, 125.1, 123.7, 116.3, 78.4, 73.6, 72.8, 71.3, 66.0, 54.1, 42.6, 37.9, 37.8, 36.5, 35.4, 34.3, 29.5, 25.9, 25.8, 23.5, 20.4, 19.1, 18.2, 18.1, 17.9, 17.1, 14.4, 14.2, 13.5, -4.2, -4.3, -4.5, -4.6, -4.7.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.³

(2*E*,8*E*,10*E*,12*S*,13*S*,15*S*)-(6*S*,7*S*,12*R*,*E*)-12-((*S*)-1-Azidopropan-2-yl)-7-methyl-2-oxocyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-trihydroxy-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate **163**



To a stirred solution of **SI-19** (215 mg, 0.225 mmol) in THF (1.87 mL) was added a 1 M solution of TBAF in THF (2.02 mL, 2.02 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4.5 hours. At the end of the reaction, CaCO_3 (545 mg), the commercial Dowex[®] 50WX8-400 hydrogen form resin (1.7 g) and MeOH (3.56 mL) were added and the reaction mixture was stirred for 1 more hour. The crude product was then filtered through Celite[®] and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by preparative TLC (elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) to give **163** (102 mg, 74%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated (E - $\Delta^{4'-5'}$ / Z - $\Delta^{4'-5'}$ 1:1).

$^1\text{H NMR } Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.92 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.66 (dd, J = 14.6, 11.1 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.16 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 5.94 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.53 (m, 1H), 5.28 (m, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.47 (dd, J = 12.3, 5.2 Hz, 1H), 3.23 (dd, J = 12.3, 7.3 Hz, 1H), 2.86 (br. s, 1H), 2.53

(m, 1H), 2.39 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.82 (m, 1H), 1.70-1.65 (m, 5H), 1.55-1.52 (m, 5H), 1.11 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H).

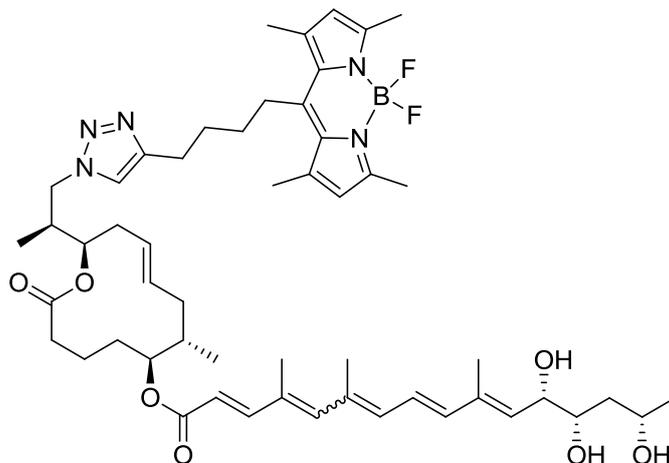
^{13}C NMR $Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 173.8, 167.8, 145.3, 144.1, 142.8, 138.3, 136.9, 136.3, 135.8, 135.6, 133.1, 127.5, 126.2, 120.6, 80.1, 76.7, 74.3, 73.3, 68.7, 55.6, 42.8, 39.5, 37.9, 37.0, 36.0, 25.2, 22.0, 21.6, 20.8, 18.6, 18.1, 15.4, 15.3, 14.4.

^1H NMR $E\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.36 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 15.5, 11.7$ Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.40 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.36 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 5.89 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.53 (m, 1H), 5.28 (m, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.47 (dd, $J = 12.3, 5.2$ Hz, 1H), 3.23 (dd, $J = 12.3, 7.3$ Hz, 1H), 2.86 (br. s, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.39 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.82 (m, 1H), 1.70-1.65 (m, 5H), 1.55-1.52 (m, 5H), 1.11 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR $E\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 173.8, 167.8, 152.2, 141.3, 141.0, 138.2, 137.2, 136.9, 136.3, 135.9, 133.1, 127.5, 126.2, 118.4, 80.1, 76.7, 74.3, 73.3, 68.7, 55.6, 42.8, 39.7, 37.9, 36.9, 36.0, 25.2, 22.0, 21.6, 20.8, 18.6, 18.1, 15.4, 15.3, 14.4.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.³

5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-10-(4-(1-((S)-2-((2R,4E,7S,8S)-7-methyl-12-oxo-8-(((2E,8E,10E,12S,13S,15S)-12,13,15-trihydroxy-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenyl)oxy)oxacyclododec-4-en-2-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide 124



To a solution of **163** (55 mg, 0.0896 mmol) in acetonitrile (2.75 mL) were added 5,5-difluoro-10-(hex-5-yn-1-yl)-1,3,7,9-tetramethyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (102 mg, 0.311 mmol), *i*-Pr₂NEt (14.8 μ L, 0.0896 mmol), CuI (1.71 mg, 0.00896 mmol) and L-ascorbic acid sodium salt (3.55 mg, 0.0179 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2.5 hours. Then, the reaction mixture was evaporated and the residue was partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. The crude residue was purified by column chromatography (elution with CH₂Cl₂/MeOH 10:0 to 9:1) to give after evaporation **124** (60 mg, 71%) as a red viscous solid and as a mixture of isomers that was not separated ($E\text{-}\Delta^{4'-5'}/Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ 1:1).

^1H NMR $Z\text{-}\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.92 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 6.64 (dd, $J = 15.0, 11.5$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 6.16 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 5.94 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.53 (m, 1H), 5.28 (m, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.91 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.47 (dd, $J =$

13.7, 5.2 Hz, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.05-3.94 (m, 2H), 3.66 (m, 1H), 3.07-3.02 (m, 2H), 2.83-2.77 (m, 3H), 2.52 (m, 1H), 2.45 (s, 6H), 2.43 (s, 6H), 2.35-2.30 (m, 2H), 2.25-2.19 (m, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.76-1.66 (m, 8H), 1.54-1.51 (m, 2H), 1.12 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C NMR $Z-\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 174.0, 167.8, 155.3, 148.7, 145.4, 144.1, 142.8, 138.3, 137.0, 136.3, 135.9, 135.8, 135.7, 134.2, 133.1, 127.3, 126.1, 123.8, 123.4, 120.6, 80.1, 76.8, 74.6, 73.3, 68.7, 53.6, 42.8, 40.5, 39.6, 38.0, 36.9, 36.0, 33.0, 29.9, 26.9, 25.3, 22.0, 21.7, 20.8, 18.6, 18.1, 17.4, 15.4, 15.3, 14.4.

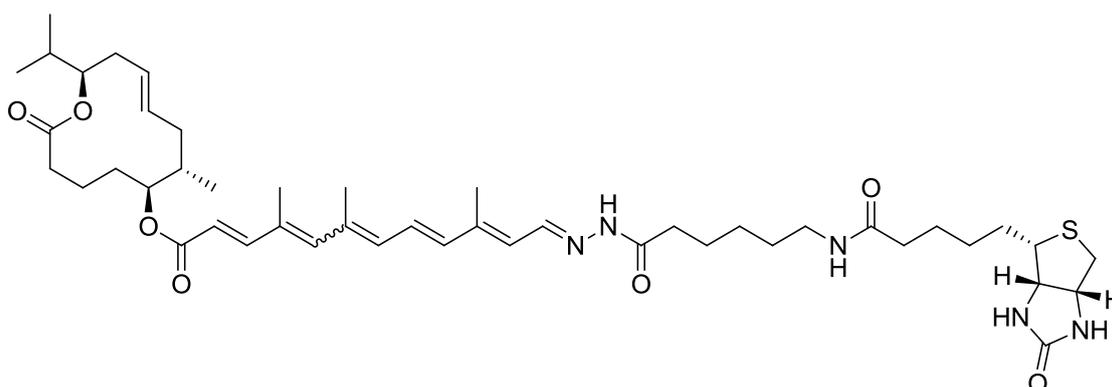
^1H NMR $E-\Delta^{4'-5'}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.74 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 14.8, 11.2$ Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.40 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 6.36 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.89 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.53 (m, 1H), 5.28 (m, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.91 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.47 (dd, $J = 13.7, 5.2$ Hz, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.05-3.94 (m, 2H), 3.66 (m, 1H), 3.07-3.02 (m, 2H), 2.83-2.77 (m, 3H), 2.52 (m, 1H), 2.45 (s, 6H), 2.43 (s, 6H), 2.35-2.30 (m, 2H), 2.25-2.19 (m, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.76-1.66 (m, 8H), 1.54-1.51 (m, 2H), 1.12 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C NMR $E-\Delta^{4'-5'}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 174.0, 167.8, 155.3, 152.2, 148.5, 141.4, 140.9, 138.3, 137.2, 137.0, 136.3, 135.9, 135.8, 134.2, 133.1, 127.3, 126.1, 123.8, 123.4, 118.3, 80.1, 76.8, 74.6, 73.3, 68.7, 53.6, 42.8, 40.5, 39.6, 38.0, 36.9, 36.0, 33.0, 29.9, 26.9, 25.3, 22.0, 21.6, 20.8, 18.6, 18.1, 17.4, 15.4, 15.3, 14.4.

The spectral data are in agreement with those reported in the literature.³

5.6.4. Synthesis of various mycolactones analogues

(2E,4E,6E,8E,10E,12E)-(6S,7S,12R,E)-12-isopropyl-7-methyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 4,6,10-trimethyl-12-(2-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanoyl)hydrazono)dodeca-2,4,6,8,10-pentaenoate 141



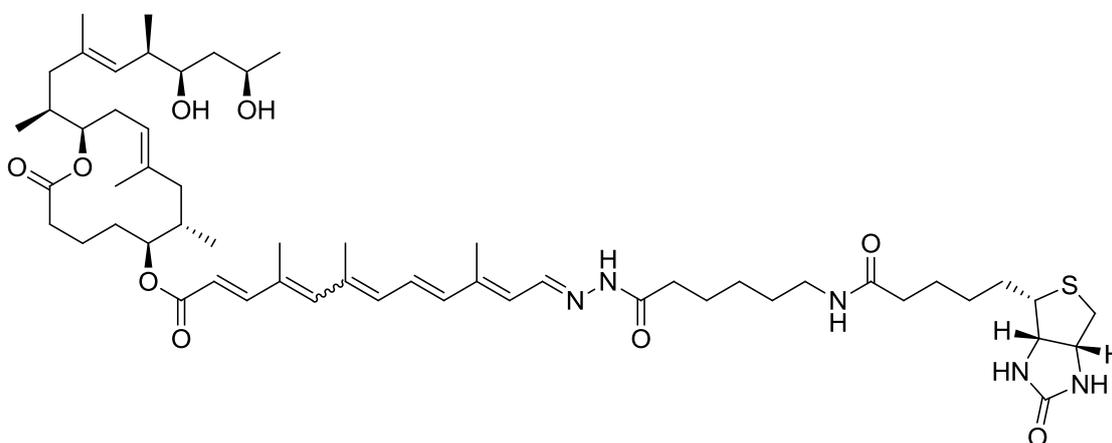
To (2E,8E,10E,12S,13S,15S)-(6S,7S,12R,E)-12-isopropyl-7-methyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 12,13,15-trihydroxy-4,6,10-trimethylhexadeca-2,4,6,8,10-pentaenoate (2 mg, 3.49 μmol) was added a 0.01 M solution of NaIO_4 (0.698 mL, 6.98 μmol) in a 1:1 mixture of THF/ H_2O (1 mL). The reaction was stirred, protected from light, at room temperature for 3.5 hours. Then, the reaction mixture was quenched by the addition of a 1 M aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution and diluted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude residue was resuspended in MeOH (66.7 μL) before the addition of (+)-biotinamidohexanoic acid hydrazide (2.59 mg, 6.98 μmol) dissolved in DMSO (66.7 μL). The resulting mixture was stirred,

protected from light, at room temperature for 48 hours. The reaction was then partitioned between water and EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (elution with AcOEt/MeOH 8:2) to give **141** (2.4 mg, 81%) and the corresponding sulfoxide (0.6 mg, 19%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ 1:1).

Determination of HPLC purity Purity > 95% of **141** at determined by HPLC (analytical C18 column (Eclipse XDB-C18), 3.5 μm , 3.1 x 30 mm, sample concentration: 0.2 mg/mL in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, injection: 5 μL , eluent: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 60:40 to 100:0, flow: 0.3 mL/min).

LCMS $t_{\text{R}}(\mathbf{141}) = 4.371$ min, m/z 837.5 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $t_{\text{R}}(\mathbf{141}\text{-sulfoxide}) = 2.338$ min, m/z 853.5 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

(2E,4E,6E,8E,10E,12E)-(6S,7S,12R,E)-12-((2S,6R,7R,9R,E)-7,9-Dihydroxy-4,6-dimethyldec-4-en-2-yl)-7,9-dimethyl-2-oxooxacyclododec-9-en-6-yl 4,6,10-trimethyl-12-(2-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanoyl)hydrazono)dodeca-2,4,6,8,10-pentaenoate **139**

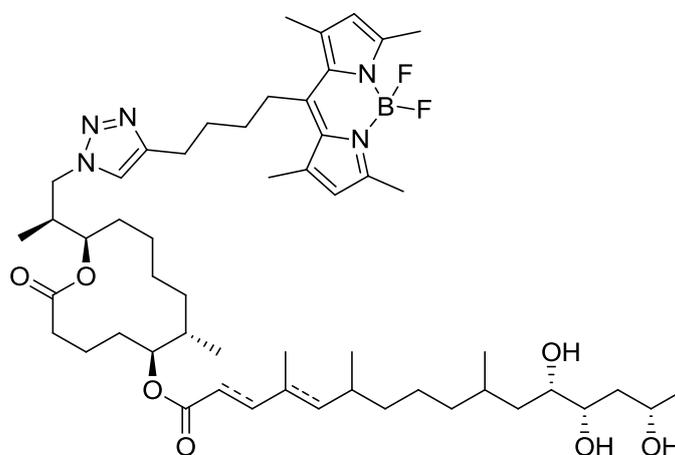


To mycolactone A/B (1 mg, 1.35 μmol) was added a 0.01 M solution of NaIO_4 (0.269 mL, 2.69 μmol) in a 1:1 mixture of THF/ H_2O (0.5 mL). The reaction was stirred, protected from light, at room temperature for 1.5 hours. Then, the reaction mixture was quenched by the addition of a 1 M aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution and diluted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude residue was resuspended in MeOH (167 μL) before the addition of (+)-biotinamidohexanoic acid hydrazide (1.5 mg, 4.04 μmol) dissolved in DMSO (167 μL). The resulting mixture was stirred, protected from light, at room temperature for 24 hours. The reaction was then partitioned between water and EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated. The crude residue was purified by preparative TLC (elution with AcOEt/MeOH 8:2) to give **139** (1.2 mg, 89%) and the corresponding sulfoxide (0.4 mg, 11%) as a yellowish oil and as a mixture of isomers that was not separated ($E-\Delta^{4'-5'}/Z-\Delta^{4'-5'}$ 1:1).

Determination of HPLC purity Purity > 95% of **139** was determined by HPLC (analytical C18 column (Eclipse XDB-C18), 3.5 μm , 3.1 x 30 mm, sample concentration: 0.2 mg/mL in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, injection: 5 μL , eluent: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 60:40 to 100:0, flow: 0.3 mL/min).

LCMS $t_{\text{R}}(\mathbf{139}) = 4.790$ min, m/z 503.9 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$); $t_{\text{R}}(\mathbf{139}\text{-sulfoxide}) = 2.704$ min, m/z 511.9 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$).

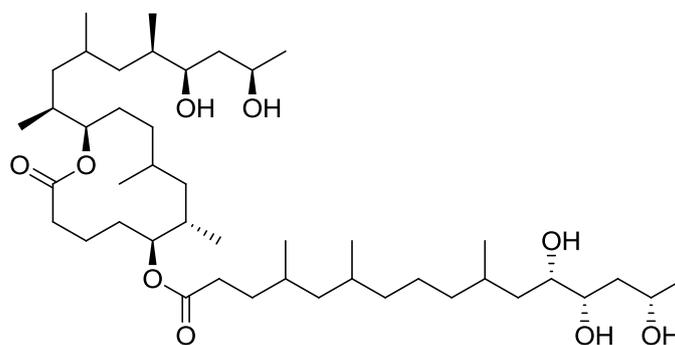
5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-10-(4-(1-((2S)-2-((2R,7S,8S)-7-methyl-12-oxo-8-(((12S,13S,15S)-12,13,15-trihydroxy-4,6,10-trimethylhexadecanoyl)oxy)oxacyclododecan-2-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide 223



To a solution of **124** (5 mg, 5.78 μmol) in EtOH (4 mL) was added a spatula tip of 10% Pd/C. The mixture was stirred under an atmosphere of H_2 at room temperature for 15 hours. The reaction mixture was then filtrated over Celite[®] and evaporated to give **223** (5.5 mg, quantitative yield) as a mixture of isomers (fully saturated product: 33.5%, mono-alkene product: 47.9%, di-alkene product: 18.6%) that was not separated as a red solid.

HRMS calculated for $\text{C}_{53}\text{H}_{86}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_7 + \text{H}^+$ 952.6625; found 952.6570 $[\text{M} + \text{H}]^+$. calculated for $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_7 + \text{H}^+$ 950.6468; found 950.6488 $[\text{M} + \text{H}]^+$. calculated for $\text{C}_{53}\text{H}_{82}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_7 + \text{H}^+$ 948.6312; found 948.6318 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(12S,13S,15S)-(6S,7S,12R)-12-((2S,6R,7R,9R)-7,9-Dihydroxy-4,6-dimethyldecan-2-yl)-7,9-dimethyl-2-oxooxacyclododecan-6-yl 12,13,15-trihydroxy-4,6,10-trimethylhexadecanoate 224



To a solution of mycolactone A/B (0.8 mg, 0.792 μmol) in EtOH (0.8 mL) was added a spatula tip of 10% Pd/C. The mixture was stirred under an atmosphere of H_2 at room temperature for 15 hours. The reaction mixture was then filtrated over Celite[®] and evaporated to give **224** (0.6 mg, 0.792 μmol , 74%) as a mixture of isomers that was not separated as a colorless oil.

Determination of HPLC purity Purity > 90% of **224** was determined by HPLC (analytical C18 column (Eclipse XDB-C18), 3.5 μm , 3.1 x 30 mm, sample concentration: 0.2 mg/mL in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, injection: 5 μL , eluent: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 60:40 to 100:0, flow: 0.3 mL/min).

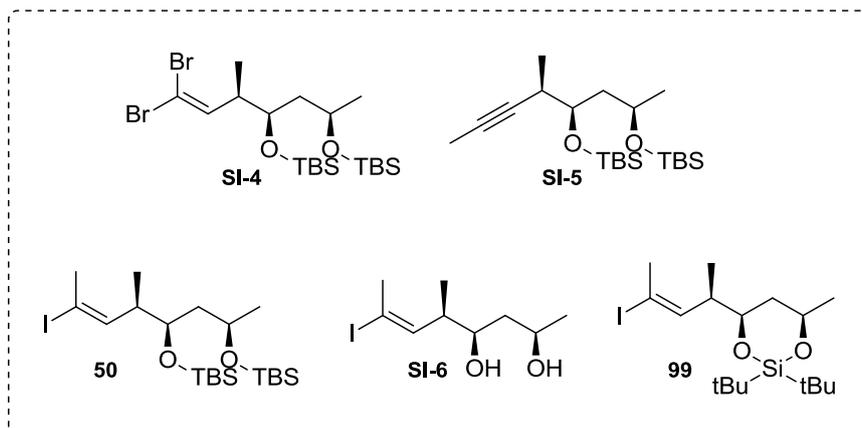
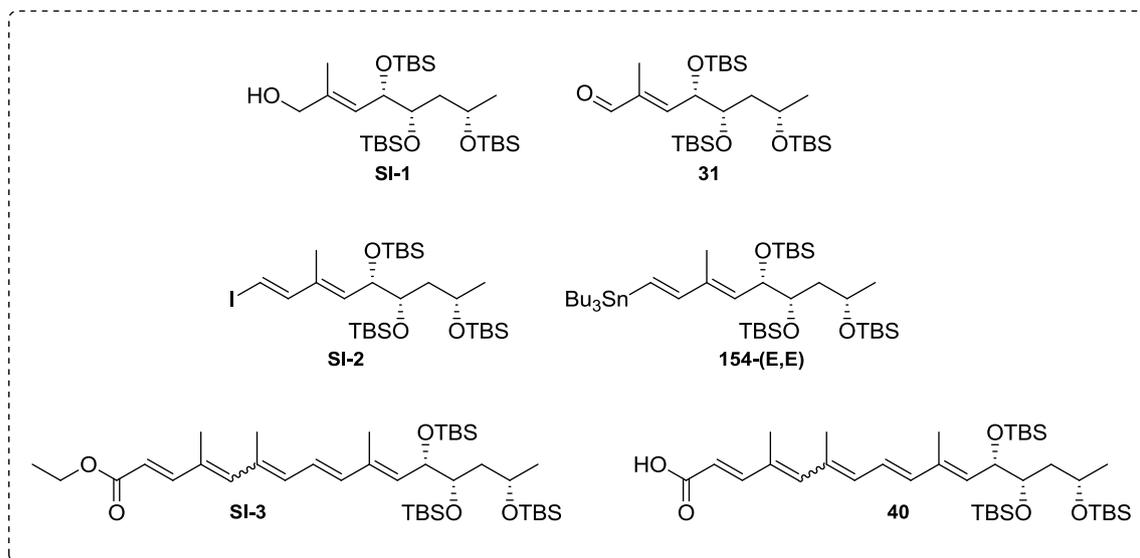
LCMS t_{R} -(**224**) = 11.378 min, m/z 757.6 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

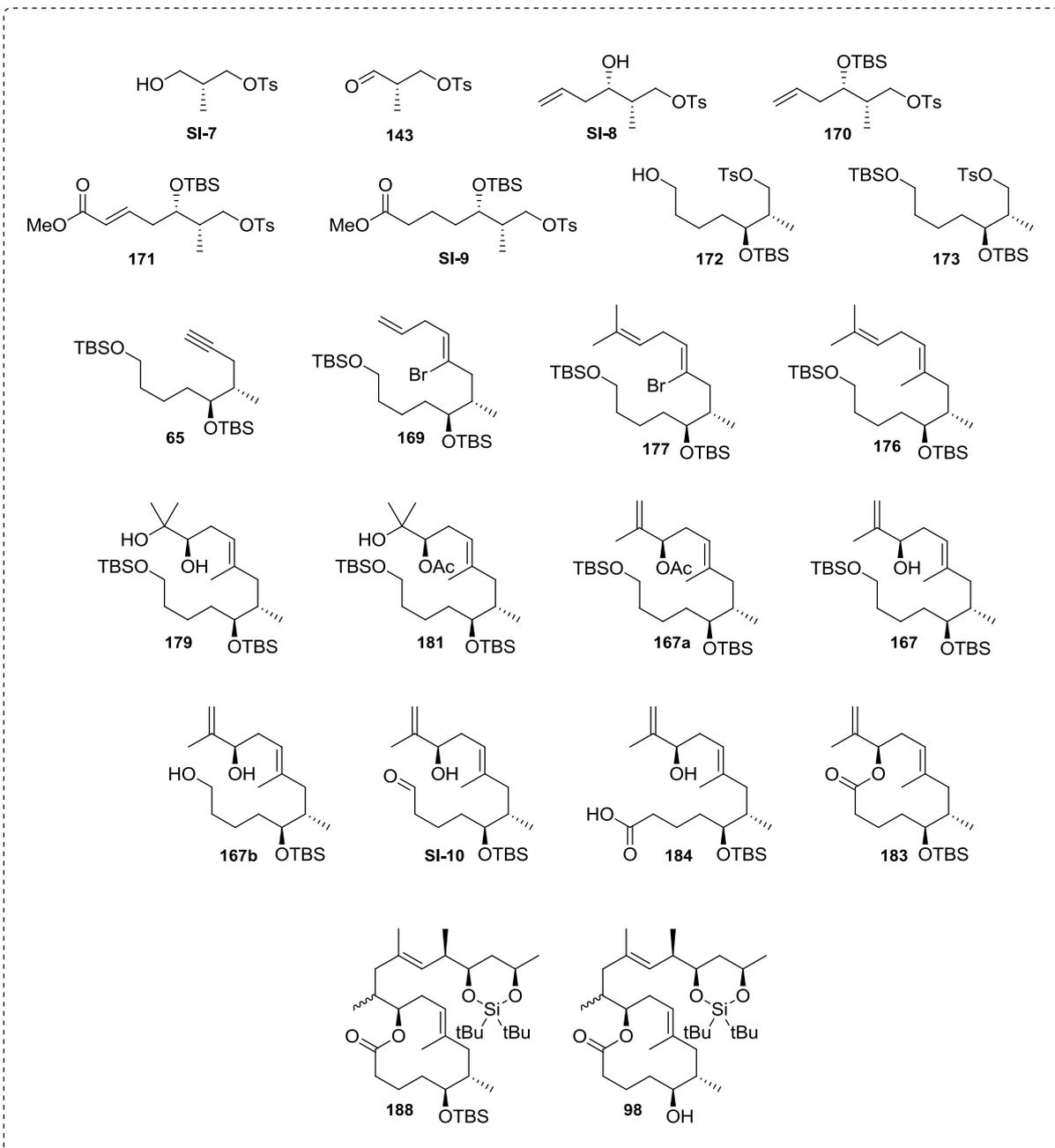
5. 7. References

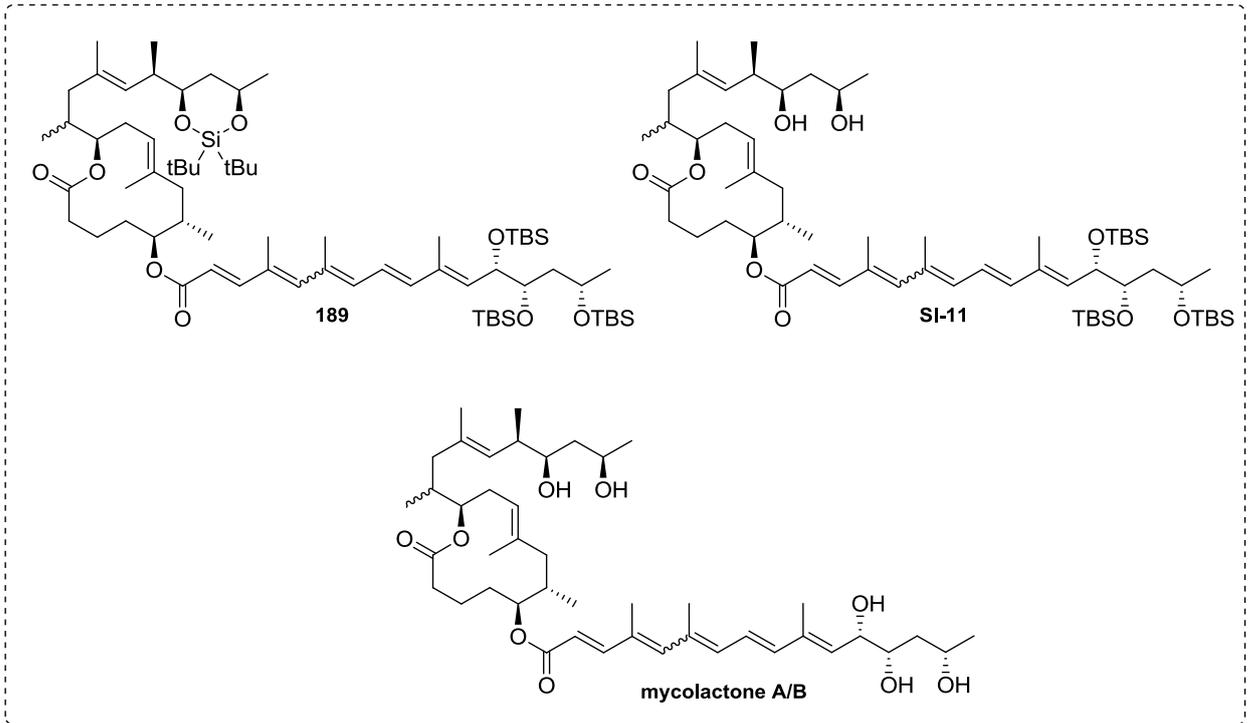
- ¹ F. Song, S. Fidanze, A. B. Benowitz, Y. Kishi, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 647-650.
- ² G. Wang, N. Yin, E.-i. Negishi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4118–4130.
- ³ A.-C. Chany, V. Casarotto, M. Schmitt, C. Tarnus, L. Guenin-Macé, C. Demangel, O. Mirguet, J. Eustache, N. Blanchard, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14413–14419.
- ⁴ P. Gersbach, A. Jantsch, F. Feyen, N. Scherr, J.-P. Dangy, G. Pluschke, K.-H. Altmann, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13017–13031.
- ⁵ K.-S. Ko, M. D. Alexander, S. D. Fontaine, J. E. Biggs-Houck, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5159-5165.
- ⁶ C. Nájera, M. Yus, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta.* **1984**, *67*, 289–300.
- ⁷ C. Aïssa, R. Riveiros, J. Ragot, A. Fürstner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15512-15520.
- ⁸ P. K. Sasmal, C. Abbineni, J. Iqbal, K. Mukkanti, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5000-5007.

Index des molécules

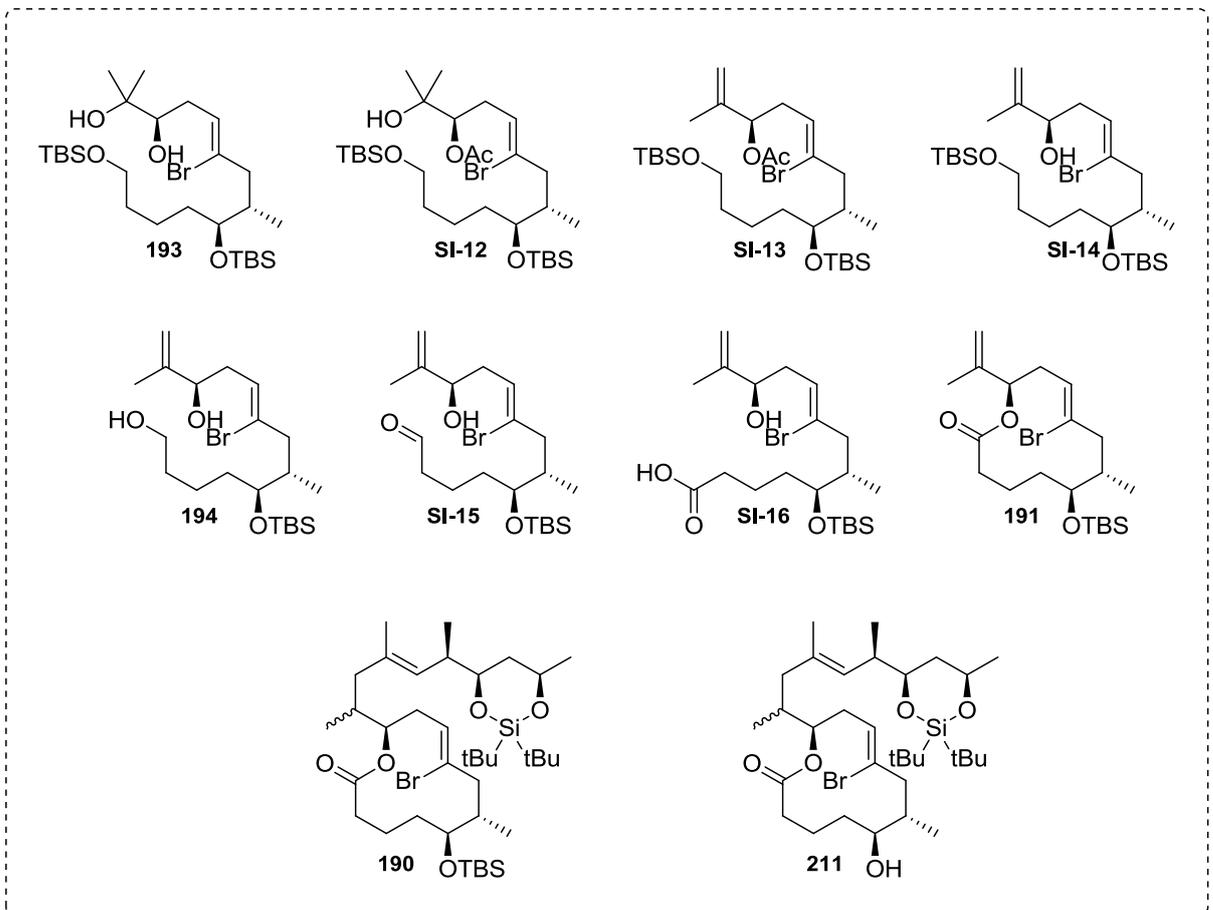
The natural toxin

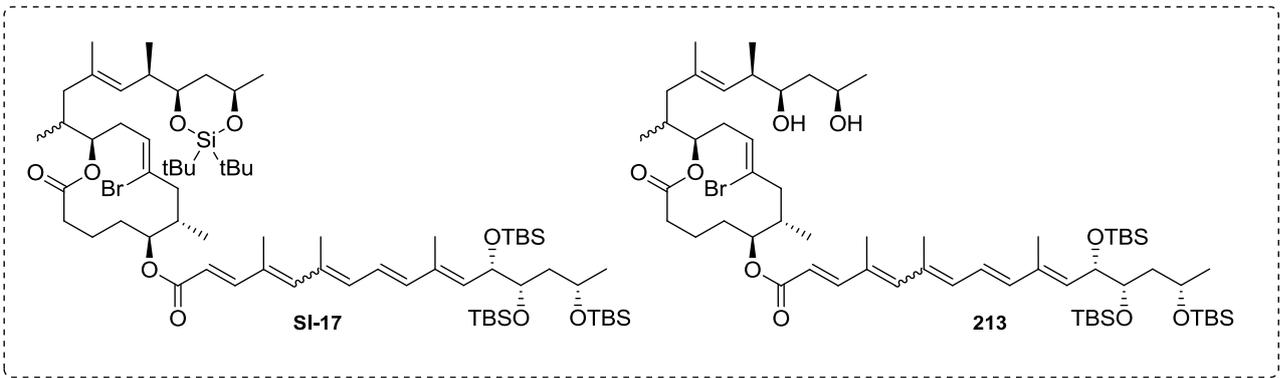




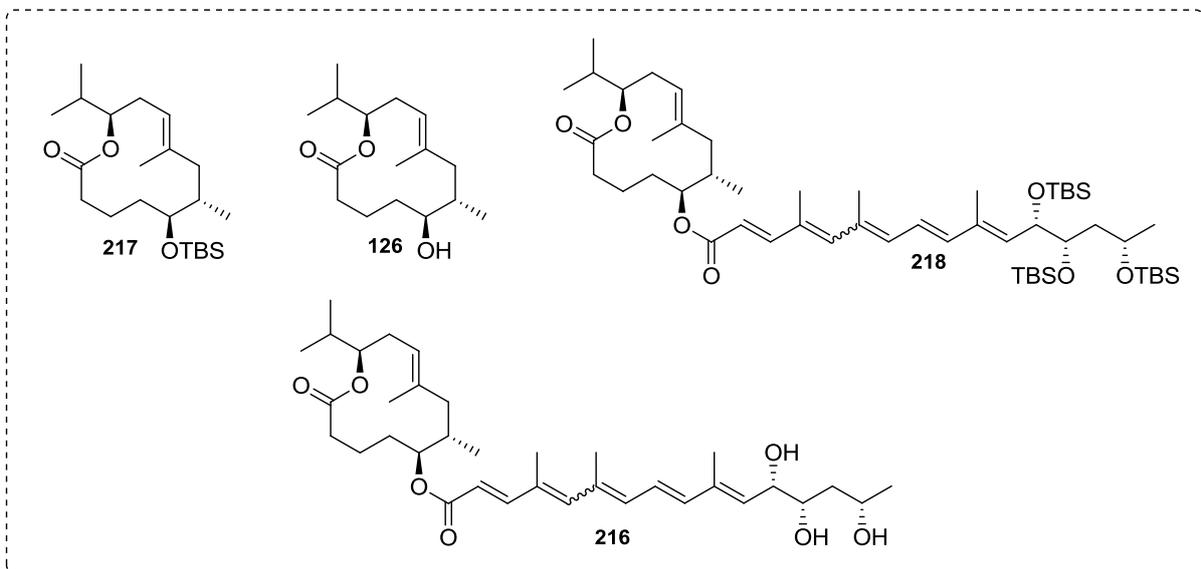
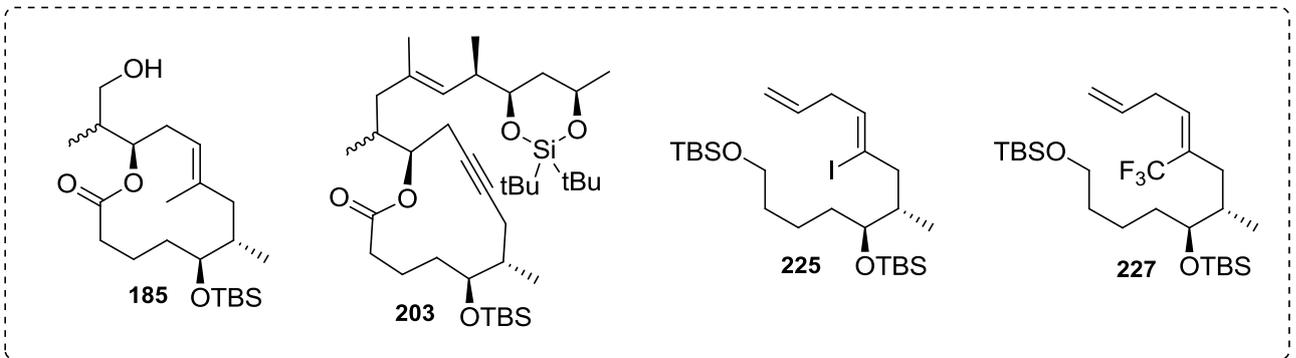


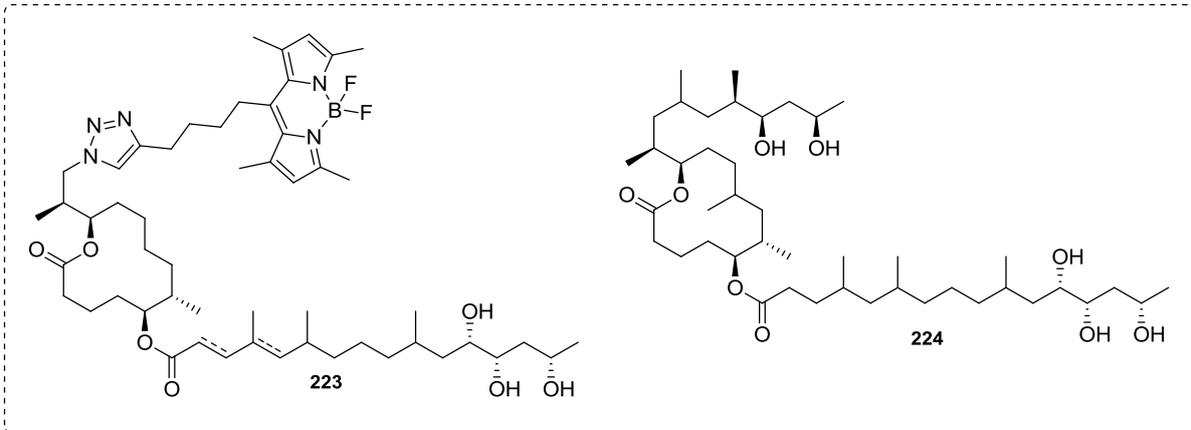
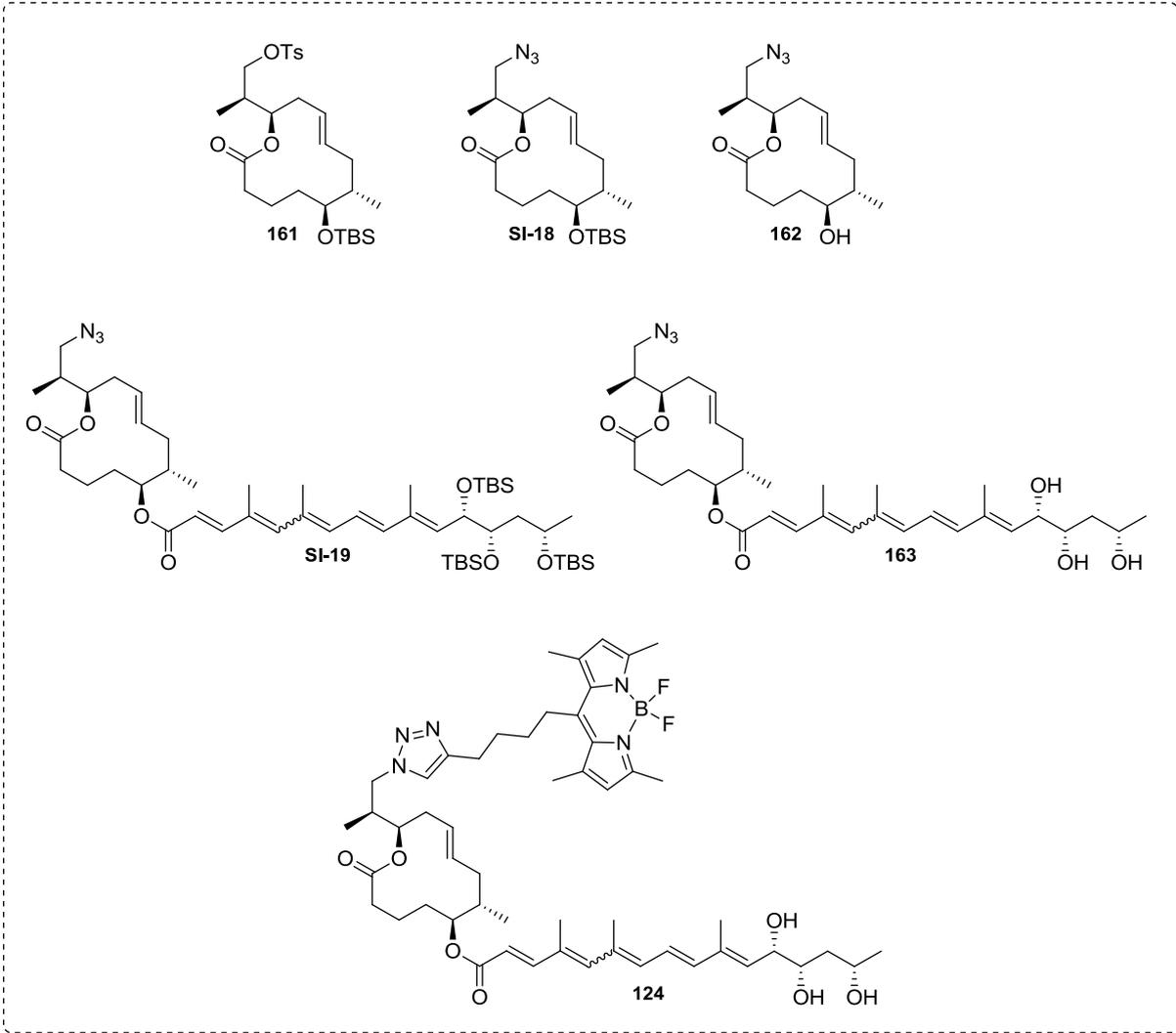
The C8-Br toxin's homologue

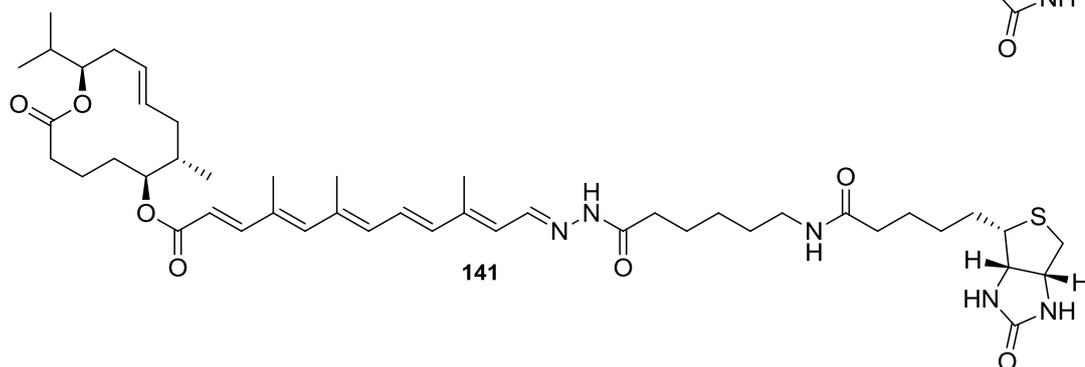
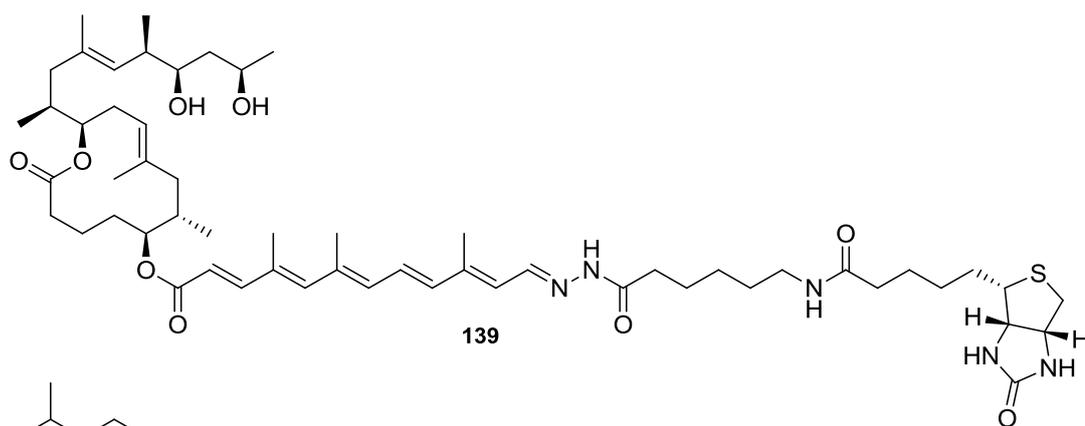




Intermediates and analogues







Synthèse totale de mycolactone A/B et d'analogues ciblés pour l'étude mécanistique de l'ulcère de Buruli

Résumé

L'ulcère de Buruli est une maladie nécrotique de la peau présente dans plus de trente pays dans le monde, et affectant principalement le continent africain et l'Océanie. L'infection est due à *Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*), un micro-organisme qui sécrète une exotoxine appelée mycolactone, représentant le premier polycétide isolé d'un pathogène humain. La maladie est caractérisée par la formation progressive de lésions nécrotiques combinée à une absence de réponse immunitaire et de sensation de douleur ; la mycolactone est connue pour être directement impliquée dans ce mécanisme biologique. A ce jour, aucun traitement totalement performant et spécifique contre l'ulcère de Buruli n'a été développé, ce qui révèle le manque crucial de connaissances sur les mécanismes chimique et biologique. Dans ce contexte, le projet développé s'intéresse à l'élucidation du mécanisme d'action des mycolactones en utilisant la synthèse totale comme outil principal. Pour cela, notre équipe a mis au point une voie de synthèse modulaire permettant la préparation de la toxine naturelle et de ses différents analogues en vue de les tester biologiquement et d'affiner ainsi notre compréhension mécanistique de cette infection.

Mot clés : ulcère de Buruli, mycolactone, analogue, activité biologique, synthèse totale, synthèse asymétrique

Abstract

Buruli ulcer is a necrotizing skin disease present in more than thirty countries in the world, located mainly in West and Central Africa but also in Australia and in Japan. This infection is caused by *Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*) that secretes a macrolide toxin called mycolactone, which is the first polyketide isolated from a human pathogen. The disease is characterized by the formation of painless progressive necrotic lesions combined with a lack of acute inflammatory response, and mycolactone is known to be directly involved in the biological mechanism. To date no specific and completely efficient treatment of Buruli ulcer has been developed which correlates with the dramatic lack of understanding of the associated chemical and biological mechanisms. In this context, this research project aims at a better understanding of mycolactone A/B molecular interactions by using total synthesis as main tool. To this end, our research team has developed an efficient synthetic pathway allowing the preparation of the natural toxin and its different analogues for purposes of their biological evaluation and fine-tuning our mechanical understanding of this infection.

Key words: Buruli ulcer, mycolactone, analogue, biological activity, total synthesis, asymmetric synthesis