

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
E
UNIVERSIDADE DE RENNES1

**SÍNTESE DE δ -VALEROLACTONES
E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA:
CITOTÓXICA, ANALGÉSICA E ANTIINFLATÓRIA**

PATRICIA DE AGUIAR AMARAL

Porto Alegre, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
E
UNIVERSIDADE DE RENNES1

**SÍNTESE DE δ -VALEROLACTONES
E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA:
CITOTÓXICA, ANALGÉSICA E ANTIINFLATÓRIA**

Tese apresentada por **Patrícia de Aguiar Amaral** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

**Tese em co-tutelle (Brasil/França)
n.418/03.**

Orientadora: Dr. Eifler-Lima, Vera Lucia (Brasil)
Orientadora: Dr. David, Michèle (França)

THÈSE

Présentée

devant l'Université Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS/Brésil

pour obtenir

le grade de : Docteur de l'Université Federal do Rio Grande do Sul et de Rennes1

Mention : Chimie

Patrícia de Aguiar AMARAL

Thèse en cotutelle (Brésil/France) n.418/03

Équipe d'accueil à Rennes : EA 4090 "Substances Lichéniques et Photoprotection"
École Doctorale : Sciences de la Matière

Titre de la thèse :

*Synthèse de diverses δ -valerolactones et évaluation biologique :
cytotoxicité, analgesie et antiinflammatoire*

Soutenance prévue le 12 Septembre 2008 devant la commission d'examen

COMPOSITION DU JURY

Rapporteurs	Arlene Corrêa Professeur à l'Université de São Carlos (UFSCAR/Brésil) Eliezer J. Barreiro Professeur à l'Université Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/Brésil)
Examineurs	René Greé Directeur de Recherche à Rennes1/France Michèle David (HDR) Maître de Conférences à l'Université de Rennes 1/France Vera Lucia Eifler Lima Professeur à l'Université Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS/Brésil)

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 12.09.2008 pela comissão examinadora constituída por :

Prof. Dr Arlene Corrêa
Universidade de São Carlos

Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr René Greé
Directeur de Recherche à Rennes1/France

A485s Amaral, Patrícia de Aguiar
Síntese de δ -valerolactones e avaliação biológica: citotóxica, analgésica e antiinflamatória / Patrícia de Aguiar Amaral – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xxix, 146 p. : il.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Universidade de Rennes 1.

1. δ -valerolactonas. 2. Kavalactonas. 3. Yangonina. 3. Citotoxicidade. 4. Analgesia. 5. Atividade antiinflamatória. I. Lima, Vera Lucia Eifler. II. Michele, David. III. Título.

CDU: 547.05

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Agradecimentos CAPES/COFECUB n. 418/03, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM/UFRGS) e ao Laboratoire de Chimie Therapeutique à Rennes1/França que disponibilizaram todos equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.

Agradecimentos

Estas breves linhas tentarão relatar o que para mim foi uma ocasião de comoção em lembrar alguns momentos e pessoas que fizeram e fazem parte desta tese. A junção desse Universo de ciência e mestres, quando bem compartilhados, te conduzem à descobertas que te despertam e te motivam à essa caminhada.

Primeiramente quero agradecer ao meu marido, Morvânio Anselmo, que não entende nada de química, mas foi o catalisador ideal e mais importante nesta transformação, além do apoio incondicional à Rennes/França.

A minha família: Manoel Carlos Amaral, Sônia Vitória de Aguiar e Viviane de Aguiar Casagrande, pelo apoio e carinho.

Em relação à academia quero agradecer a Minha Orientadora Vera Lucia Eifler-Lima pela oportunidade e incansável orientação durante todos esses anos.

Aos meus colegas do LaSOM/UFRGS: Cédric Graebin, Mônica Duarte, Rômulo Canto pela amizade e suporte.

Aos colegas das “valerolactones»: Daiana Dias, Taciana Augustini e Tiago Claudino pelo bom trabalho em conjunto, e o melhor, sempre otimistas, dispostos e de bom humor.

Aos professores: Grace Gossman, Eduardo Rolim, Stela Rates e Adriana Polmann a chance de ter convivido e aprendido ao longo desses anos; não só no plano da pesquisa mas também em relação ao profissionalismo e ao carácter destes pesquisadores.

À banca composta pelos Doutores Eliezer J. Barreiro, Arlene Corrêa e René Grée, por terem aceito o convite para avaliação deste manuscrito.

Aos nosso colaboradores de longa data e amigos: Valdir Cechinel Filho e Fátima Campus-Buzzi, pela realização dos testes *in vivo* sobre a analgesia (UNIVALI/Itajaí).

Aos colegas e amigos: Angela Erna Rossato, Indianara Renault, Juliana Lora, Marilúcia Pereira (Coordenadora do curso de Farmácia), Eduardo Agnes, Tatiana Barichelo (ex. Coordenadora) que me proporcionaram a segurança e a tranquilidade

Agradecimentos

de que precisava para me dedicar exclusivamente à tese durante o meu período de afastamento da Universidade/UNESC.

Aos amigos da ciência: Arlei Antunes, Maura Antunes, Simone Gnoato, Edlus da Silva e Lucia A. Corrêa, que nos oportunizaram um acolhimento bem brasileiro em terras estrangeiras.

As minhas amigas queridas e irmãs de alma: Andréia Adams, Vanessa Maio, Lorena dos Santos, Eloisa Schwinden e Aline Rigon Zimmer; nem a distância e nem o tempo conseguem abalar nossa fraternidade.

O momento de relatar e enumerar os agradecimentos são realmente um momento interessante... é neste momento que podemos “*olhar*” para estes últimos quatro anos e lembrar todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta etapa, à todos esses, os meus sinceros agradecimentos.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Michèle David pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse en France et pour toute son amitié. J'ai pu apprécier ses conseils avisés et j'ai été très sensible à son enthousiasme et à ses encouragements du début à la fin.

Pour m'avoir guidée et accompagnée dans ces travaux, pour leur confiance et leurs enseignements, leur bonne humeur et leur disponibilité exemplaire, je remercie chaleureusement Nicolas Gouault et Pierre Van-de-Weghe.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Philippe Uriac qui m'a ouvert, en confiance, les portes du laboratoire de Chimie Thérapeutique.

Merci à Françoise Lohézic-Le Dévéhat et Isabelle Rouaud pour la réalisation des tests de cytotoxicité au laboratoire de pharmacognosie.

A Corinne Martin-Chouly pour m'avoir acceptée et orienter aux essais sur le TNF α et pour sa confiance.

Pour avoir rendu ce séjour aussi productif qu'épanouissant, un grand merci à tous les membres des laboratoires. Merci à Joël Boustie, Myriam Le Roch (les dernier manip...merci), Jean-François Cupif, Béatrice Legouin (les spectres d'ultraviolets), Jacques Renault (l'artiste), David Horthnt, Emmanuel Baslé, Aurélie Bernard, Sophie Tomasi, Marie France Guitton, Patrice Gernigon, ma petite stagiaire (plus grande que moi, bien sûr) Marie Touleimat ; Alexandre Cariou pour le travail collectif sur le support fluoré, enfin un grand merci à tous pour tout ! Que soient ainsi remerciées toutes les personnes qui m'ont accompagnée et ont participé à ce travail !

A mon super père franco-brésilien : Jean Charles Corbel et sa famille, que nous a ouvert sa maison et nous a laissés faire partie de sa vie pendant ces 18 mois à Rennes...merci.

A Mickaël Jean pour « la réaction de Jean » et pour sa motivation contagieuse...

A M. René Grée pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et à Julien Petrignet pour sa collaboration.

Remerciements

Mes derniers remerciements, mais non les moindres...s'adressent à mes super copines : Anne-Cécile Le Lamer pour sa gentillesse et son grand sourire (j'ai jamais vu quelqu'un parler aussi vite !!!), Estelle Marchal (ma grande copine, je n'aurais pas pu mieux choisir comme voisine de paillasse et merci pour le petit bouquin *ar-ti-cu-ler* !!!) et Marion Millot (qui n'a jamais compris mon « bon français » au début et maintenant la plus à me comprendre. Je regard toujours le cadeau « bouquin !! »). Merci à vous pour les sympas soirées et votre amitié. Je vous attends ici au Brésil, peut-être « demain » ☺ !!

SOMMAIRE

AGRADECIMENTOS/REMERCIEMENTS	v
TABLEAUX	xiii
TABLE DE FIGURES	xiv
ABREVIATION	xvi
RESUMO	xviii
RESUME	xix
ABSTRACT	xx
APPAREILLAGES ET TECHNIQUES D'ANALYSE	xxi

CHAPITRE I – INTRODUCTION GENERALE

1. Introduction Générale	2
1.1. Exemples de stratégies de synthèses de valérolactones	5
1.1.1. Réaction de cycloaddition: réaction d'Hétéro-Diels-Alder (HDA)	5
1.1.2. La réaction de Réformatsky	9
1.1.3. Aldolisation /cyclisation	9
1.1.4. Modulations du cycle valérolactone par réactions de couplage	10
1.2. Synthèses des kavalactones	12
1.2.1. Synthèses racémiques des kavalactones	12
1.2.2. Synthèses asymétriques des kavalactones	13
1.3. La chimie combinatoire et les valérolactones	17
2. Le Motif δ-valérolactone	20
3. Objectifs et stratégie de synthèse	22

CHAPITRE II – SYNTHÈSE EN PHASE FLUORÉE

1. Introduction sur la synthèse fluorée	31
1.1. Concept de la synthèse fluorée.....	31
1.1.1. La synthèse "hautement fluorée"	31
1.1.2. Emergence de la synthèse "faiblement fluorée"	34
1.1.3. A l'interface entre la synthèse en solution et la synthèse sur support solide	36
1.2. Exemples de travaux développés sur support fluoré au laboratoire de Chimie Pharmaceutique à l'Université de Rennes1 – Rennes/France	38
1.2.1. Synthèse d' α -méthylène- γ -lactones mono- ou disubstituées	38
1.2.2. Séparation d'un mélange d'acides paraconiques sur support fluoré	39
1.2.3. Application de la synthèse d'amines secondaires en parallèle par utilisation de techniques fluorées	41
2. Résultats et discussion de la synthèse sur support fluoré de δ-valérolactones diversement substituées en position 5 et 6	43
2.1. Préparation de l'Acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (116)	45
2.2. Aldolisation : accès au β -hydroxyester (117)	47
2.3. Réaction de Heck	50
2.4. Aldolisation, cyclisation et clivage de δ -valérolactones sur support fluoré.....	52
3. Autres alternatives sur support fluoré	54
4. Conclusions	58
5. Données expérimentales du chapitre II : synthèse sur support fluorée	59
5.1. Synthèse de l'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (116)	59
5.2. Synthèse du β -hydroxyester α,β insaturés (117)	60
5.2.1. Procédure générale pour la purification des composés par FSPE (Fluorous Solid Phase Extraction)	61

5.3. Synthèse du produit de Heck (118)	61
6. Bibliographie.....	63

CHAPITRE III - TOWARDS SYNTHESIS OF KAVALACTONE DERIVATIVES

Introduction	67
Acknowledgments.....	69
Supplementary data.....	70
References	70
Supplementary data.....	71

CHAPITRE IV - DIFFERENT CROSS-COUPPLING APPROACHES TO THE SYNTHESIS OF NOVEL KAVAIINE-LIKE DERIVATIVES AND EVALUATION OF THEIR CYTOTOXICITY

Introduction	80
Experimental Section.....	82
Biological	92
Results and discussion	94
Conclusions	98
Acknowledgments.....	98
References	99

CHAPITRE V - EVALUATION DE L'ACTIVITE TNF

1. Introduction.....	106
2. Donnés expérimentales d'évaluations anti-inflammatoire.....	109
2.1. Principe et méthode de l'évaluation biologique anti-inflammatoire	110
2.2. Généralités sur le test ELISA.....	111
3. Résultats et discussion sur l'évaluation anti-inflammatoire	112
4. Conclusion.....	118
5. Bibliographie	119

CHAPITRE VI - EVALUATION DE L'ACTIVITE ANALGESIQUE

1. Introduction.....	121
2. Donnés expérimentales d'évaluations analgésique	122
2.1. Matériel biologique	122
2.2. Médicamente et solutions utilisées	122
2.3. Modèle de contorsions abdominales induites par l'acide acétique	123
2.4. Analyses statistique.....	123
3. Résultats et discussions	123
4. Conclusion	130
5. Bibliographie.....	131

CONCLUSIONS GENERALES.....	133
-----------------------------------	------------

BIOGRAFIA	138
------------------------	------------

TABLEAUX

Tableau 1.1 : Les principales kavalactones	4
Tableau 1.2 : Pourcentage d'inhibition de δ -valérolactones sur l'activité analgésique	21
Tableau 2.1 - Comparaison des principales caractéristiques des synthèses en solution, sur support solide et en support fluorée ⁹	37
Tableau 2.2 : essais d'optimisation de la 2 ^{ème} étape sur support fluoré (aldolisation)	48
Tableau 2.3 : Essais réalisés sur la réaction de Heck	51
Tableau 2.4 : essais réalisés pour la réaction d'aldolisation/cyclisation	53
Tableau 5.1: Pourcentage d'inhibition du TNF- α par les produits de la série 1.....	113
Tableau 5.2 : Pourcentage d'inhibition du TNF- α par les produits de la série 1/II...	114
Tableau 6.1 : Activité analgésique des dérivés δ -valérolactones sur le modèle de l'acide acétique 0,6% <i>via i.p.</i> dose de 10 mg/kg.	125
Tableau 6.2 : Etude théorique de solubilité et perméabilité des δ -valérolactones. .	128

TABLE DE FIGURES

Figure 1.1 : γ -butyrolactone 1 et δ -dodécalactone 2	3
Figure 1.2 : Structure générale d'une valérolactone	3
Figure 1.3 : Structure générale des kavalactones	3
Figure 2.1 : Extraction liquide-liquide triphasique solvant organique/eau/solvant fluoré.....	33
Figure 2.2 : Analogie des synthèses sur support solide et sur support fluoré.....	33
Figure 2.3 : Structure de la silice fluorée.	35
Figure 2.4 : (a) Structure de deux aminoanthraquinones non fluorée ou fluorée ; (b) Illustration de leur séparation par FSPE.....	35
Figure 2.5 : Robot utilisée pour la synthèse en parallèle	36
Figure 2.6 : Structure des plusieurs des acides paraconiques	39
Figure 2.7 : δ -valérolactones proposée par support fluoré.....	43
Figure 2.8 : RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) de l'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (116). Tétraméthylsilane (TMS) a été employé en tant que référence interne.....	46
Figure 2.9 : L'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle avec la chaîne fluorée.	46
Figure 2.10 : RMN ^{19}F (254 MHz, CDCl_3) de l'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (116).....	47
Figure 2.11 : l'hydroxypenténoate	49
Figure 2.12 : RMN ^1H (254 MHz, CDCl_3) de β -hydroxyester (117)	49
Figure 2.13 : Cycle catalytique sur la réaction de Heck.....	51
Figure 2.14 : β -cétoster fluoré (118).....	54
Figure 2.15 : l'alcool allylique (117)	55
Figure 5.1: Deméthoxyangonine 17.....	108
Figure 5.2 : δ -valérolactones	109
Figure 6.3 : Principe de la technique du test ELISA en « sandwich ».....	112
Figure 5.4 : Série 1	113
Figure 5.5 : Série 1/II	113

Figure 6.1 : molécules testées pour l'évaluation analgésique.....	123
Figure 6.2 : δ -valérolactones testée.....	125

ABREVIATIONS

AcOEt : Acétate d'éthyle

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CHU : (Hôpital Université à Ponchaillou/Rennes/France

CI₅₀ : Concentration d'Inhibitrice 50 %

CMI : Concentration Minimale d'Inhibitrice

COSY : Correlation Spectroscopy

DMPU : 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

Eb : température d'ébullition

ee : excès énantiomérique

EGCG : (-) - gallate d'epigallocatechin

éq. : Équivalent

FSPE : *Fluorous Solide Phase Extraction*

HDA : Hétéro-Diels-Alder

HMPA : d'hexaméthylphosphoramide

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HTS = high throughput screening

IL : linterleukines

IRFT : Infra-Rouge à Transformée de Fourier

LDA : diisopropylamidure de lithium

LHMDS : hexaméthylidisilylamidure de lithium

LPS : Lipopolysaccharide

m-CPBA : Acide meta-chloroperbenzoïque

MeOH : Méthanol

MMT : Microculture tetrazolium-(Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényltétrazolium)

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényltétrazolium

Ns : nosyle

n-BuLi : *n*-butyllithium

PF : Phase fluorée

R_f : facteur de Rétention

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

(*R,R*) TADDOL : (*R,R*)-(-)-*trans*-4,5-bis(hydroxydiphenylmethyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxacyclopentane)

SMHR : Spectrométrie de Masse Haute Résolution

SOPS = Synthèses organique en phase solide

SPE : *Solid Phase Extraction*

t.a. : Température ambiante

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TMSCl : chlorure de triméthylsilyle

TNF- α : Factor de Nécroses Tumoral alpha

tR : temps de Rétention

SÍNTESE DE DIVERSAS δ -VALEROLACTONAS E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

RESUMO

A pesquisa e desenvolvimento de medicamentos é um processo complexo e longo que se inicia com a pesquisa básica de um novo composto bioativo em modelos experimentais *in vitro* e pré-clínicos. Neste trabalho descreve-se a síntese de δ -valerolactonas e avaliação biológica. Uma primeira rota sintética permitiu obter análogos das kavalactonas com bons rendimentos através de reações de aldolização e acoplamentos do tipo Heck e Suzuki com o auxílio do forno de microondas. Paralelamente outra estratégia sintética foi realizada através de modulações no anel aromático ligado ao núcleo lactônico, com reações do tipo Heck, Suzuki e Sonogashira, com excelentes rendimentos. Outra sequência reacional foi desenvolvida a partir de álcoois alílicos utilizando a reação conhecida como tandem *isomerização/aldolização* com diversos aldeídos obtendo lactonas substituídas em posição 3, 5 e 6 do ciclo lactônico. Objetivou-se também neste estudo, a partir do princípio da química combinatória, preparar uma pequena quimioteca de δ -valerolactones. Para tanto se desenvolveu uma sequência reacional a partir do suporte fluorado em função das vantagens deste método em relação à Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS), esta rota sintética foi acompanhada em solução. No que se refere ao aspecto biológico, foram avaliados 35 compostos sintetizados sobre a atividade citotóxica. No entanto apenas um composto apresentou uma leve atividade ($CI_{50} < 10\mu M$) sobre as linhagens celulares testadas (A-375M e B16). Em relação à avaliação antiinflamatória *in vitro* observou-se atividade interessante sobre o composto **61** na inibição do $TNF\alpha$ no sangue total. A avaliação do potencial antinociceptivo dos 10 compostos testados (**5**, **129-137**) demonstrou um perfil promissor, sendo que o composto **131** apresentou uma inibição mais expressiva (69,4%) em relação aos outros compostos. Os resultados químicos e biológicos promissores aqui demonstrados indicam a viabilidade em utilizar essa classe química estudada para encontrar substâncias mais ativas as quais podem representar uma nova entidade terapêutica.

Palavras-chaves: δ -valerolactonas, kavalactonas, yangonina, acoplamento com paládio, suporte fluorado, $TNF\alpha$, citotoxicidade, analgesia.

SYNTHESE DE DIVERSES δ -VALEROLACTONES ET EVALUATION BIOLOGIQUE

RESUME

Le travail présenté dans ce manuscrit est consacré à la synthèse et à l'évaluation pharmacologique de quelques δ -valérolactones. Une première séquence réactionnelle a permis d'accéder aux analogues synthétiques des kavalactones avec de bons rendements en développant notamment des réactions de couplage par activation aux micro-ondes. Diverses modulations ont ensuite été réalisées par des couplages de type Heck, Suzuki et Sonogashira. Parallèlement une deuxième séquence réactionnelle a été mise au point au départ d'alcools allyliques en utilisant une réaction tandem *isomérisation-aldolisation* avec divers aldéhydes pour entrer différents substituants en position 3, 5 et 6 du cycle lactonique.

Notre intérêt s'est aussi porté sur la chimie combinatoire, pour préparer des petites chimiothèques de δ -valérolactones. Nous avons utilisé le couplage de Heck suivi d'une *aldolisation/lactonisation* à partir d'un support fluoré. Les avantages de ce support fluoré ont permis de simplifier les étapes de purification. La séquence réactionnelle choisie n'a cependant été validée qu'en solution.

Concernant l'aspect biologique, l'évaluation de l'activité cytotoxique *in vitro* de 34 δ -valérolactones seul un composé présente une cytotoxicité modérée sur les lignées cancéreuses B16 et A375M ($CI_{50} < 10\mu M$). Les effets inhibiteurs *in vitro* sur le sang total permettent de souligner l'intérêt thérapeutique éventuel de cette famille de molécules dans le traitement de l'inflammation. Enfin le test à l'acide acétique *in vivo* pour évaluer l'activité analgésique de quelques composés a montré une forte inhibition pour l'hétérocycle **131** (69,4%).

Mots-clés : δ -valérolactones, kavalactones, yangonine, couplage au palladium, support fluoré, inhibition du $TNF\alpha$, activité cytotoxique, activité analgésique.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF VARIOUS δ -VALEROLACTONE DERIVATIVES

ABSTRACT

This work describes the synthesis and the pharmacological evaluation of various δ -valerolactone derivatives. We first prepared some kavalactone analogues in good yields using microwave-promoted palladium-catalyzed coupling reactions. Several modulations have been done using Heck, Suzuki and Sonogashira reactions. At the same time, we developed a synthetic pathway starting from allylic alcohols and involving a tandem isomerisation-aldolisation reaction with various aldehydes in order to introduce diversity at the C-3, C-5 and C-6 positions of the valerolactone. We focused on the combinatorial chemistry in order to obtain a library of δ -valerolactone derivatives. The Heck coupling was followed by an isomerisation-aldolisation reaction using a fluorated support. The purification steps were much easier using fluorated supports. However, so far this synthetic pathway is only valid in solution.

We then tested 34 δ -valerolactones analogues to determine their *in vitro* cytotoxic activity and discovered that one δ -valerolactone was slightly active ($CI_{50} < 10\mu M$) on two cell lines (A-375M and B16). Moreover, the *in vitro* inhibitor effects on whole blood sample showed that δ -valerolactone derivatives might have an interesting anti-inflammatory activity. Finally, the *in vivo* acetic acid test evaluating the analgesic activity of several compounds displayed a high inhibition for the heterocyclic **131** (69.4%).

Key words : δ -valerolactone, yangonine, microwave activated Heck coupling, Suzuki-Miyaura, Sonogashira, fluorated support, inhibition of the $TNF\alpha$, anti-inflammatory activity, analgesic activity.

1. Appareillages et techniques d'analyse

Les différentes analyses réalisées sur toutes les molécules que nous avons synthétisées dans ce travail de thèse ont été effectuées à l'aide des appareils et techniques suivantes.

1.1. Résonance Magnétique Nucléaire

Appareil à Transformée de Fourier JEOL GSX WB 270 MHz (270 MHz pour le proton et 67.5 MHz pour le carbone 13) à Rennes1/France ; VARIAN, VXR200 (200 MHz pour le proton et 50 MHz pour le carbone 13) ; VARIAN, YH300 (300 MHz pour le proton et 75 MHz pour le carbone 13) à UFRGS/Brésil.

Les spectres ont été réalisés dans le CDCl_3 ou dans le DMSO-*d* deutérée. Les déplacements chimiques (\pm) sont exprimés en partie par millions (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée comme suit: s: singulet, d: doublet, t: triplet, m: multiplet, dd: doublet de doublet, etc. Dans certains cas, la réalisation de spectres RMN 2D (COSY, HMQC, HMBC ou NOESY) a été nécessaire pour l'attribution des signaux. Les spectres sont analysés au premier ordre.

1.2. Infra-Rouge à Transformée de Fourier. Spectromètre à Transformée de Fourier Perkin Elmer FTIR 1600.

Les échantillons solides sont analysés par réflexion diffuse après inclusion dans une matrice de KBr anhydre à une concentration de 1 %, alors que les échantillons liquides sont analysés par réflexion totale atténuée sur un cristal de séléniure de zinc. Les fréquences d'absorption (ν) des groupements fonctionnels sont exprimées en cm^{-1} à leur maximum d'intensité.

1.3. Spectrométrie de Masse Haute Résolution

Appareil VARIAN MAT 311 (CRMPO), ionisation par impact électronique. L'énergie du faisceau électronique est de 70 eV, l'intensité du courant d'émission est de 300 μ A et la tension d'accélération des ions est de 3 kV.

1.4. Micro-ondes

L'appareil Synthewave 402 Prolabo Power 600W, dimensions: largeur 220 mm, profondeur 525 mm, hauteur 360 mm. Masse: 15 kg. Système original à micro-ondes focalisées et matras ouvert. Fréquence d'émission 2,45 GHz. Protection de la carrosserie par un revêtement Polyuréthane et de la cavité micro-ondes par un doigt de gant en quartz.

1.5. Chromatographies

Les R_f et les t_R sont donnés à titre indicatif.

Les Chromatographies sur Couche Mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice avec indicateur de fluorescence (63-200 μ m, Kieselgel 60 F254, MERCK 5554). Après migration dans un éluant approprié, les plaques ont été systématiquement observées en lumière visible et sous UV (254 nm et 365 nm). Les chromatogrammes ont ensuite été révélés par une des solutions suivantes:

_ $\text{KMnO}_4/\text{NaOH}$: 1g de KMnO_4 dissous dans 500 mL de NaOH 1N. Trempage puis séchage à température ambiante.

_ Anisaldéhyde sulfurique: 0,5 mg de 4-méthoxybenzaldéhyde dissous dans 85 mL de méthanol et 10 mL d'acide acétique glacial, additionné extemporanément de 2 % d' H_2SO_4 concentré. Pulvérisation puis chauffage.

Les chromatographies sur couches minces préparatives ont été réalisées sur des plaques de verre recouvertes de gel de silice (63-200 μ m, Kieselgel 60, MERCK).

Les chromatographies sur colonnes ouvertes ont été effectuées sur gel de silice (63-200 μm , Kieselgel 60, MERCK 7734) soit à pression atmosphérique soit sous vide (chromatographie flash ou Solide Phase Extraction : SPE).

Chromatographie sur silice fluorée : *Fluorous Solide Phase Extraction* (FSPE)
Les FSPE sont réalisées sur Silice Fluorée (Silica gel 60 C₈-reversed phase perfluorinated 35-70 μm , FLUKA).

Chromatographie Liquide à Haute Performance: La chaîne HPLC utilisée est constituée d'un instrument Waters connectée au UV 996 associée à un détecteur à barrette de diodes avec une colonne Kromasil (100A SI 10 μm 250 x 4.6 mm). L'elution des δ -valérolactones a été effectuée à un débit de 1 mL.min⁻¹ à température ambiante : Hexane/AcOEt (55:45). La pureté de HPLC est donnée en pourcentages d'aire sous la coube à 220 nm.

1.6. Point de Fusion

Les points de fusion des composés purs et cristallisés sont mesurés à l'aide d'une Rampe Koffler LEICA VMHB (précision à ± 1 °C) et ne sont pas corrigés.

CHAPITRE I – *INTRODUCTION GENERALE*

1. Introduction Générale

Depuis l'antiquité, les composés d'origine naturelle sont intimement liés à la médecine au travers l'usage des plantes. Des études chimiques, pharmacologiques et cliniques de ces substances d'origine végétale ou d'organismes naturels autres ont conduit à la découverte de médicaments fondamentaux tels que l'aspirine, la morphine, la quinine, la pénicilline, la lovastatine, la ciclosporine, le paclitaxel, la vincristine, et autres. Ils constituent ainsi des molécules de référence dans de nombreux domaines thérapeutiques, tout particulièrement en infectiologie et en cancérologie. En effet 75 % des anti-infectieux et 60 % des anticancéreux utilisés sont d'origine naturelle ou sont inspirés de motifs naturels¹.

Les lactones ont fait l'objet de nombreuses études ces derniers temps². Ces composés représentent une partie importante des produits naturels connus³. Leur importance est liée à leur activité biologique^{4,5} et surtout à leur utilisation comme motif pour la construction de molécules plus élaborées⁶.

La fonction lactone est caractérisée par la présence d'un ester dans un cycle. Une lactone est donc un hétérocycle oxygéné, provenant de la cyclisation (ou lactonisation) d'hydroxy-acides⁷. Les γ - et δ -lactones, appelées aussi 4- et 5-olides, représentent les deux structures les plus fréquemment identifiées. Elles résultent, respectivement, de la cyclisation des acides hydroxylés en position 4 ou 5.

Les principales lactones comportent entre 4 (ex. : γ -butyrolactone **1**) et 12 (ex. : δ -dodécalactone **2**) atomes de carbone (Fig 1.1). Leur diversité repose sur la chiralité de ces molécules, la nature des groupements latéraux, ainsi que sur la présence ou non d'insaturation au niveau de la chaîne latérale ou du cycle.

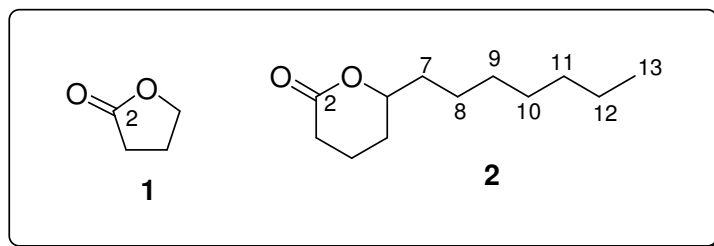


Figure 1.1 : γ -butyrolactone **1** et δ -dodécalactone **2**

Ainsi dans ce travail, notre intérêt se porte sur les lactones à 6 chaînons **3**, appelées valérolactones (Fig 1.2).

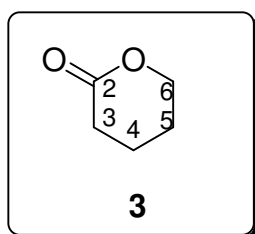


Figure 1.2 : Structure générale d'une valérolactone

Le motif valérolactone est très largement rencontré au sein des molécules d'origine naturelle. Ce motif a plusieurs activités pharmacologiques, par exemple : anti-tumorale, anti-inflammatoire, antifongique, antivirale, anxiolytique et anti-bactériologique⁸. Le cycle δ -lactone est fréquent dans les structures de produits naturels biologiquement actifs⁹ (Fig. 1.3).

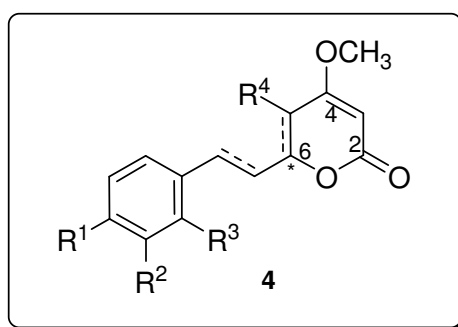


Figure 1.3 : Structure générale des kavalactones

Parmi les valérolactones naturelles nous trouvons les kavalactones dans les racines et rhizomes de *Piper methysticum* Forster (Piperaceae) plante d'origine du Pacifique Sud aussi connue comme Kava-Kava^{5a}. On peut citer par exemple les activités : anxiolytique, analgésique et neuroprotectrice¹⁰.

La synthèse de ce motif a suscité un grand intérêt auprès des chimistes organiciens. Il y a plusieurs travaux dans la littérature rapportant des synthèses racémiques et des synthèses asymétriques (Tab. 1.1).

Tableau 1.1 : Les principales kavalactones

N.	nom du composé	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	C5-C6	C7-C8
5	Kavaïne	H	H	H	H	-	=
6	dihydrokavaïne	H	H	H	H	-	-
7	11-hydro-12-méthoxydihydrokavaïne	OMe	OH	H	H	-	-
8	7,8-dihydro-5-hydroxykavaïne	H	H	-β-OH	H	-	-
9	hydroxykavaïne	H	H	H	OH	-	=
10	11,12-diméthoxydihydrokavaïne	OMe	OMe	H	H	H	-
11	11-methoxy-12-hydroxydehydrokavaïne	OH	OMe	H	H	=	=
12	méthysticine	-OCH ₂ O-		H	H	-	=
13	5,6-dihydrométhysticine	-OCH ₂ O-		H	H	=	=
14	dihydrométhysticine	-OCH ₂ O-		H	H	-	-
15	yangonine	OMe	H	H	H	=	=
16	11-hydroxyyangonine	OMe	OH	H	H	=	=
17	déméthoxyyangonine	H	H	H	H	=	=
18	5,6,7,8-tétrahydroyangonine	OMe	H	H	H	-	-
19	5,6-dihydroyangonine	OMe	H	H	H	-	=
20	7,8-dihydroyangonine	OMe	H	H	H	=	-
21	10-méthoxyyangonine	OMe	H	OMe	H	=	=
22	11-méthoxyyangonine	OMe	OMe	H	H	=	=

Le nombre de synthèses développées confirme l'intérêt scientifique accordé à ces molécules. Nous avons identifié plusieurs études sur ce sujet et nous allons décrire les travaux de synthèses qui se rapprochent le plus de notre sujet. Nous

allons voir donc dans ce chapitre une revue de la littérature sur les synthèses de δ -valérolactones.

1.1. Exemples de stratégies de synthèses de valérolactones

Les valérolactones ont montré une large gamme d'activités biologiques efficaces. En revanche un grand nombre de chercheurs ont développé plusieurs stratégies chimie pour arriver à ce type d'hétérocycle.

1.1.1. Réaction de cycloaddition: réaction d'Hétéro-Diels-Alder (HDA)

Une réaction de cycloaddition consiste en la formation d'un cycle par réaction entre deux molécules, un diénophile et un alcène dans le cas de la réaction de Diels-Alder. Ce mécanisme concerté implique un état de transition unique, et donc aucun intermédiaire.

La cyclocondensation d'un diène convenablement substitué avec un aldéhyde ou une cétone fournit une méthode potentiellement efficace et convergente pour synthétiser une variété de δ -valérolactones¹¹. La littérature rapporte une application de cette stratégie utilisant la réaction de HDA entre (trialkylsilyl)vinylcétènes (TAS-vinylcétènes) [4 + 2]¹² avec un composé carbonylé comme le cétomalonate de diéthyle pour synthétiser des δ -valérolactones α,β -insaturées avec de bons rendements (Schéma 1).

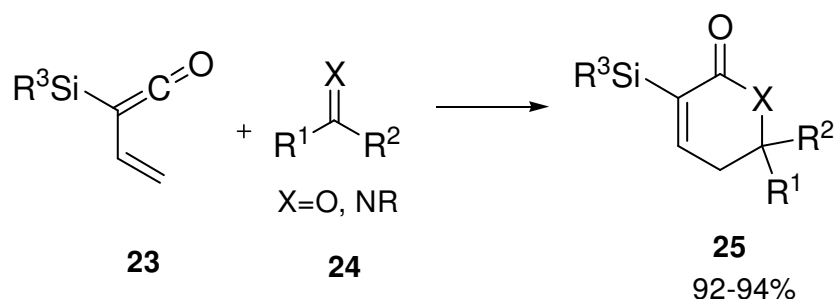


Schéma 1

Le substituant silyle dans le composé **23** diminue la tendance des vinylicétènes à la dimérisation et permet la cycloaddition [4+2]. Un tel produit peut donc servir de substrat dans les synthèses de cycles à cinq ou six chaînons. Ces cycloadditions n'ont pas besoin des acides de Lewis et en général poursuivent un degré élevé de stéréosélectivité.

La cyclocondensation de diènes silyloxylés ou de diènes de Brassard avec des diénophiles, catalysée par un acide de Lewis, est devenue une méthode puissante pour construire des structures complexes *one-pot*. La réaction des aldéhydes **26** avec du diène de Brassard **27** a été rapportée la première fois par Midland et al¹³ pour la synthèse asymétrique d'un métabolite fongique, la (-)-pestalotine et son analogue oxo (Schéma 2).

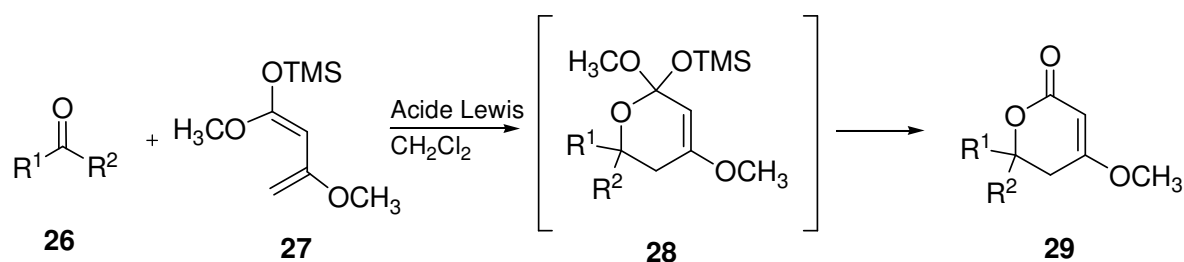


Schéma 2

Feng, X. et al¹⁴ ont utilisé plusieurs types de ligands sur le modèle de base de Schiff pour la synthèse de complexes de titane (IV) tridenté pour l'obtention de δ -lactones **33** avec un très bon excès énantiomérique (*ee*) par la réaction HDA. Le complexe **32** Titane permet l'excellente induction asymétrique dans la réaction du diène de Brassard **30** avec des aldéhydes aromatiques **31** dans des conditions douces (Schéma 3).

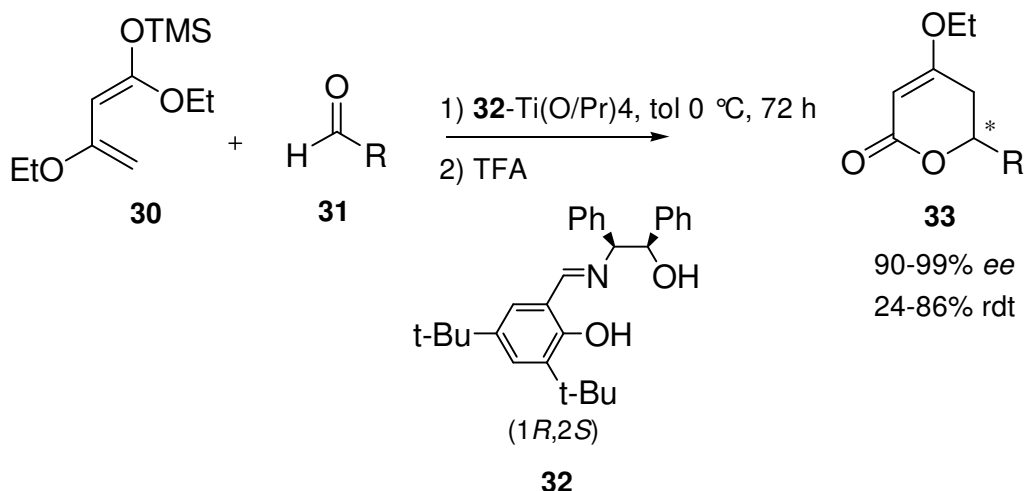


Schéma 3

Deux ans plus tard cette même équipe de Feng, X. et al¹⁵ a développé un nouveau complexe chiral avec une base de Schiff et le cuivre (II) pour une réaction HDA, entre le diène de Brassard **34** et l'aldéhyde aromatique **35**. Ce complexe a permis l'obtention de la 5-méthyl-δ-lactones α-β-insaturée **37** avec un *ee* de 94% et une diastérosélectivité *anti/syn* de 99:1 (Schéma 4).

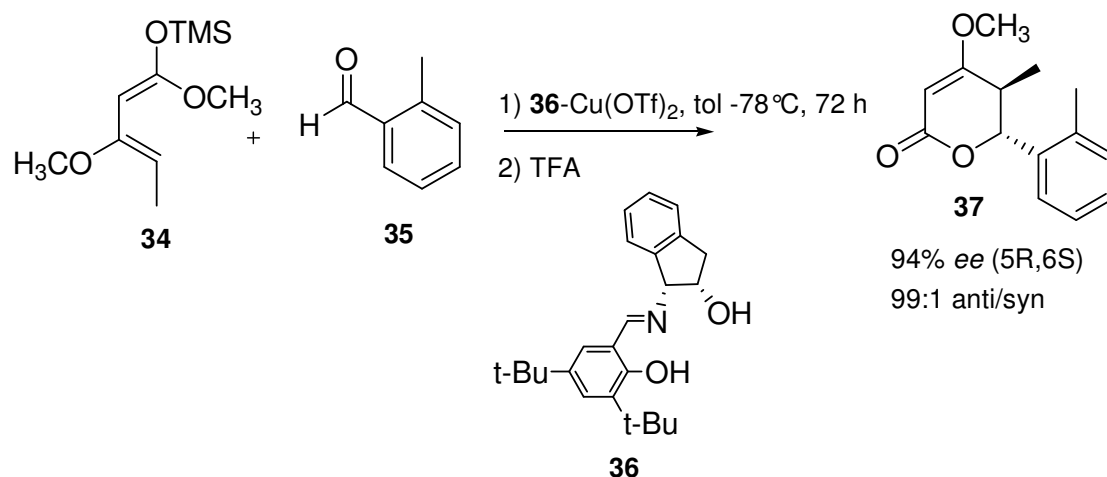


Schéma 4

Plus récemment Feng, X. et al¹⁶ ont développé une réaction asymétrique catalytique efficace, du type HDA, depuis le diène de Brassard **30**. Le catalyseur (*R*)-BINOL/Ti(*i*-PrO)₄ (**b**) et 4-picolyl chlorhydrate de chlorure (**a**) ont favorisé la réaction

pour avoir les produits correspondants dérivés des α,β -insaturés δ -lactones avec des modéré-à-bons rendements (46-79%) avec de hauts excès énantiomériques. Les produits naturels (*R*)-(+)-kavaïne (99% *ee* après simple recristallisation) **5** et (*S*)-(+)-dihydrokavaïne (84% *ee*) **6** ont été également préparés dans une étape en employant cette méthodologie (Schéma 5).

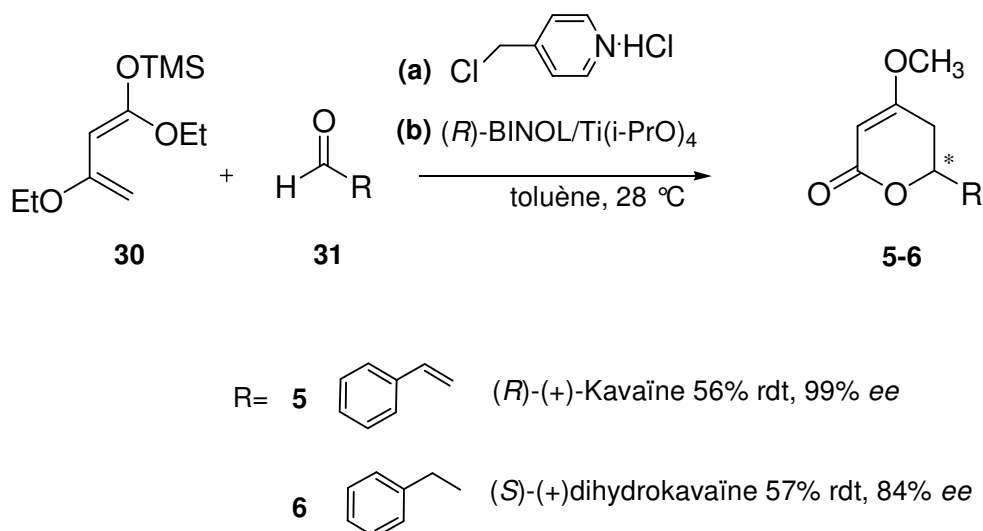


Schéma 5

On peut citer également les travaux de Winkler et Oh¹⁷ qui ont développé un protocole similaire pour la synthèse de dihydropyranones fonctionnalisées en 2 et 6. Les auteurs ont utilisé dans un premier temps la réaction HDA entre le diène de Brassard **30** et divers aldéhydes **31** apportant la première diversité sur le carbone 6 (Schéma 6).

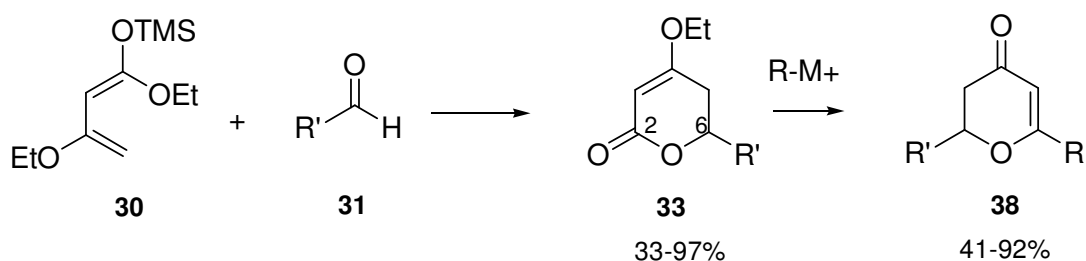
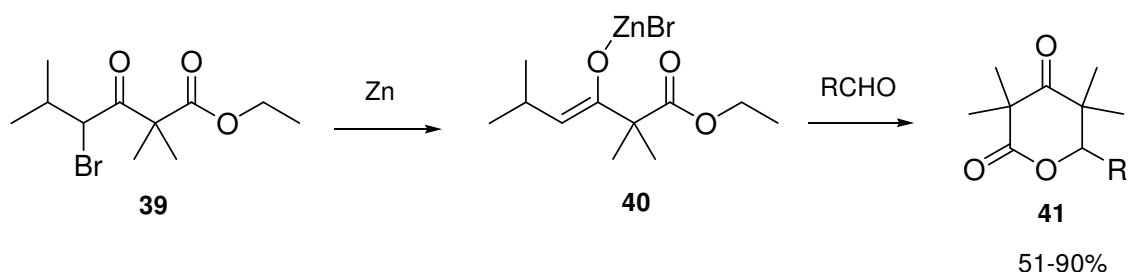


Schéma 6

1.1.2. La réaction de Réformatsky

Une équipe¹⁸ de chercheurs russes a utilisé la réaction de Réformatsky pour former des δ -valérolactones. L'énolate de zinc **40**, formé à partir du 4-bromo-2,2,4-triméthyl-3-oxopentanoate d'éthyle **39**, réagit avec des aldéhydes aliphatiques, insaturés ou aromatiques (Schéma 7). La formation du produit souhaité **41** 3,3,5,5-tétraméthyl-2,3,5,6-tétrahydropyran-2,4-diones substitués en position 6 est réalisée par le produit de l'aldolisation qui se cyclise spontanément avec des rendements de 51-90%.



1.1.3. Aldolisation /cyclisation

Ce travail¹⁹ décrit une réaction d'aldolisation/cyclisation du substrat **42** en milieu basique avec des aldéhydes **31** pour avoir les δ -valérolactones disubstituées souhaitées avec de bons rendements (Schéma 8). Ils ont préparé le substrat **42** avec la méthode de Huckin et Weiler²⁰ par alkylation avec un équivalent additionnel de *n*-BuLi. Pour la réaction d'aldolisation ils ont mis le **42** dans le THF à la température de 5 à 10°C et ajouté 1 Eq. de NaH et 1 Eq. *n*-BuLi pour la formation du dianion *in situ* et après addition lente de l'aldéhyde. Ils ont synthétisé les produits **43** avec des rendements acceptables. Dans un second moment ils ont mis le produit dans $\text{CH}_3\text{COOH}_{(\text{reflux})}$ avec $\text{CH}_3\text{COOK}_{(\text{cat})}$ pour arriver au produit **44** par décarboxylation. Ce phénomène est connu pour les β -cétocesters à des températures au dessus de 60 °C²¹.

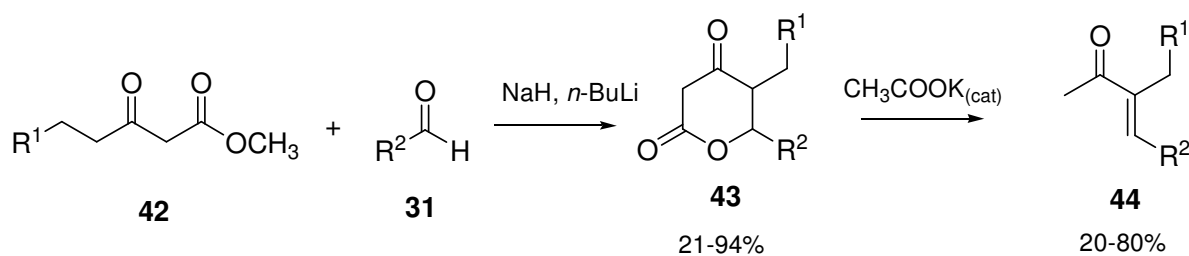


Schéma 8

1.1.4. Modulations du cycle valérolactone par réactions de couplage

Les réactions de couplage métal-catalysées ont trouvé une application très importante dans le domaine de la synthèse organique notamment pour la formation de liaisons carbone-carbone. La catalyse s'est considérablement développée en particulier pour la synthèse de petites molécules biologiquement actives obtenues avec de bons, voire d'excellents rendements.

Différentes études bibliographiques rapportent des exemples de réaction de couplage pour moduler le cycle lactonique²² comme la réaction de Suzuki-Miyaura qui utilise des acides boroniques **46** et **49** et des halogénures d'aryles **45** et **48** en présence de palladium, de phosphine et d'une base²³ (Schéma 9).

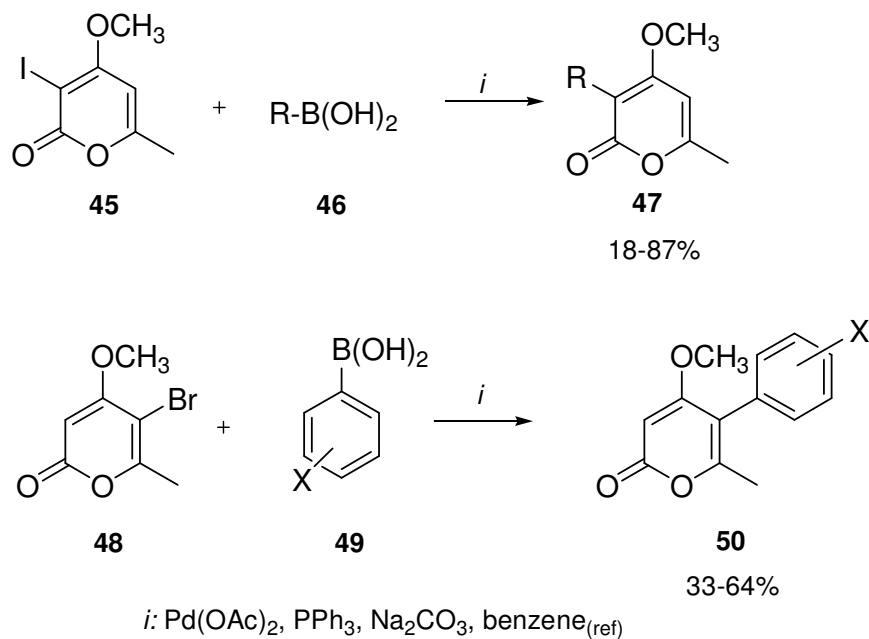


Schéma 9

La réaction de Sonogashira²⁴ est également utilisée pour introduire des substituants alcynes sur le noyau valérolactone. Ce couplage est devenu la méthode la plus importante pour préparer les arylalcynes et les ènynes conjugués.

Le protocole est effectué en présence de palladium, CuI et triéthylamine comme dans l'exemple ci-dessous de lactones **53** modifiées par des substituants R aliphatiques et aromatiques, obtenues avec de bons rendements (Schéma 10)²⁵.

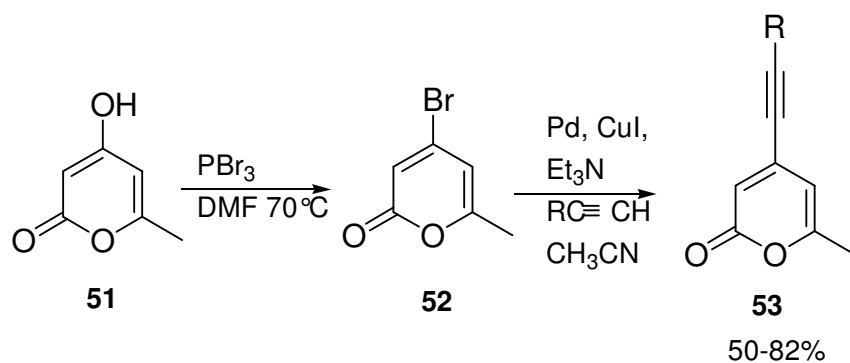


Schéma 10

1.2. Synthèses des kavalactones

1.2.1. Synthèses racémiques des kavalactones

Des travaux anciens²⁶ ont décrit l'utilisation de la réaction de Réformatsky pour la synthèse des kavalactones. En règle générale, les produits sont obtenus après condensation aldolique entre le produit **54** et cinnamaldéhyde **55** en présence de zinc, cuivre ou indium. La cyclisation en milieu acide fournit les kavalactones **5** ((±)-kavaïne) et **6** ((±)-7,8-dihydrokavaïne) (Schémas 11 et 12).

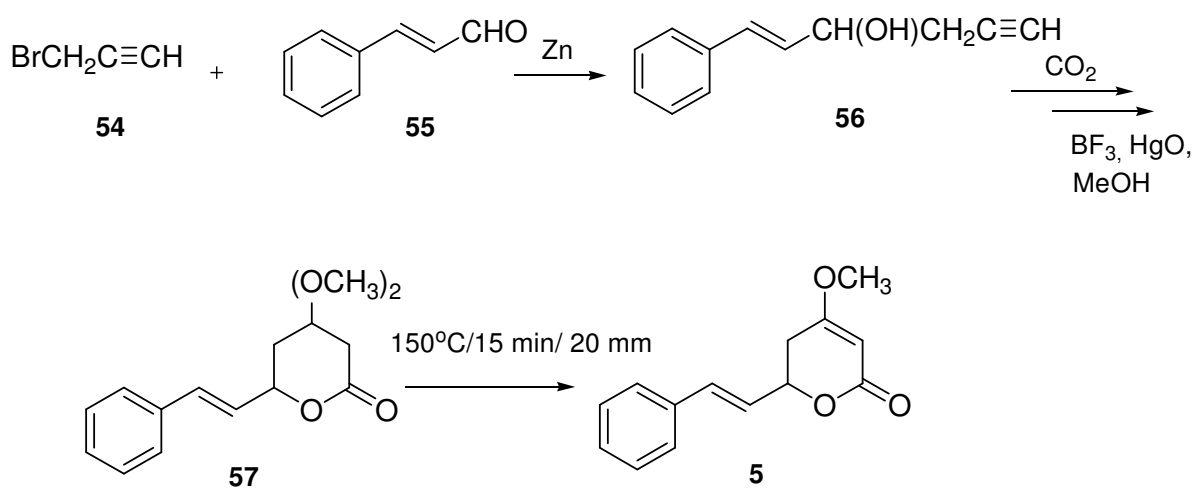


Schéma 11

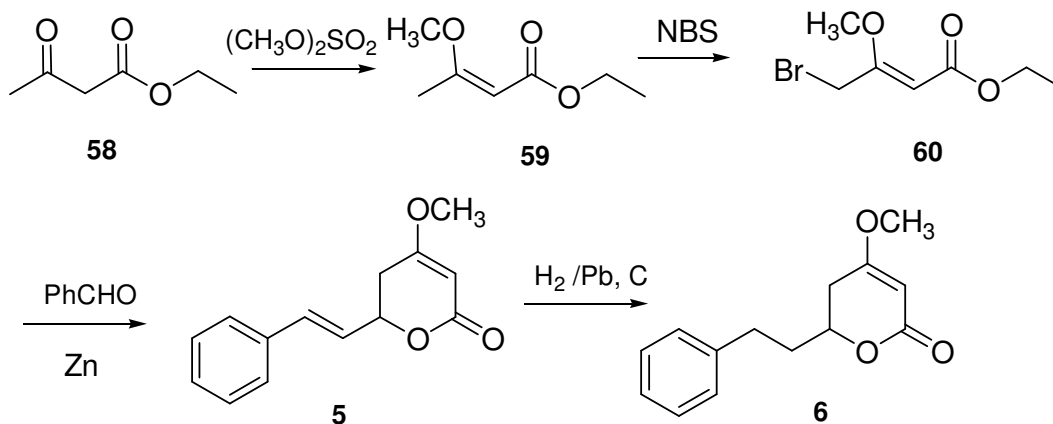


Schéma 12

Une excellente méthode d'obtention de kavalactones est la synthèse de la 4-hydroxy-2-pyrone²⁷ **61**. La synthèse part de la déprotonation de l'acetoacetate d'éthyle **58** par une base, suivie de l'addition de l'aldéhyde (ex. le cinnamaldéhyde) produisant la formation du produit désiré en une seule étape. Les rendements varient entre 55 et 90% selon l'aldéhyde. Une étape supplémentaire peut permettre l'alkylation²⁸ du produit **61** en produit **5** avec le diméthylsulfate dans le méthanol (Schéma 13).

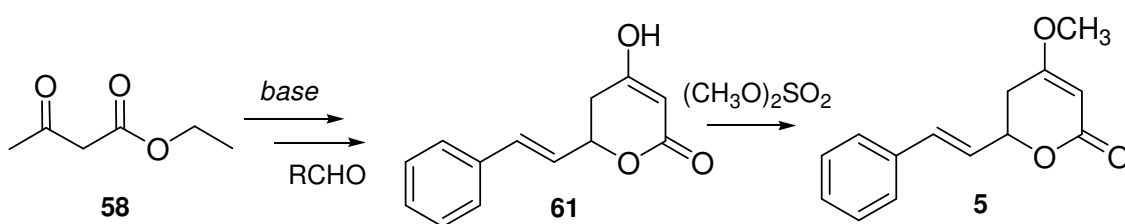


Schéma 13

Castellino et Sims²⁹ ont fait la synthèse totale de la (±)-kavaïne racémique **5** via la cycloaddition hétéro-diels-alder. La réaction entre le 1,3-diméthoxy-1-triméthylsilyloxybutadiène **30** et le cinnamaldéhyde **55**, après addition de catalyseur Eu(fod)₃ ou Yb(fod)₃. La (±) kavaïne **5** est obtenue avec 75% et 84% respectivement (Schéma 14).

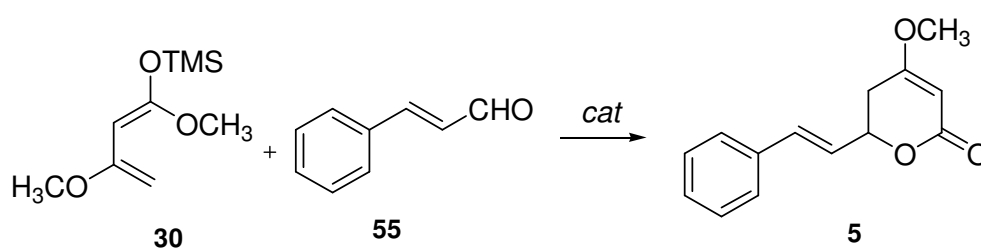


Schéma 14

1.2.2. Synthèses asymétriques des kavalactones

La première synthèse énantiosélective de la (+)-7,8-dihydrokavaïne **6** a été réalisée par Spino, *et al*³⁰ avec la réaction entre le β-cétoester **62** et le bromure de

benzyle pour fournir **63**. Ensuite, le composé **63** subit une réduction sélective en présence d'un complexe de ruthénium inducteur catalytique chiral conduisant à **64** avec 93% d'excès énantiomérique (*ee*). Après C-alkylation avec $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{t-Bu}$ de l'intermédiaire **65**, le composé est cyclisé avec TFA en lactone **66**. Celle-ci réagit avec le diméthylsulfate pour fournir le produit **6** avec 80% de rendement (Schéma 15).

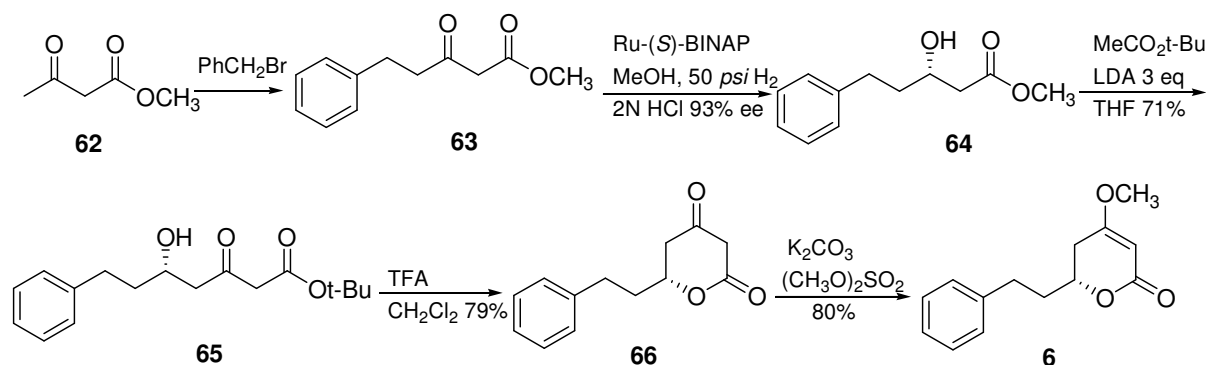


Schéma 15

En 2004, Du et al³¹ ont réalisé la première réaction énantiosélective de HDA entre le diène de Brassard **30** et l'aldéhyde **67** par catalyse avec des dérivés (*R,R*)-(-)-*trans*-4,5-bis(hydroxydiphénylméthyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxacyclopentane) - (*R,R*) TADDOL. Par l'activation de liaisons hydrogènes entre le (*R,R*) TADDOL et le groupement carbonyle des dérivés de δ -lactone sont obtenus avec des rendements, de modérés à bons, et avec une énantioselectivité élevée (91% *ee*). Le produit naturel, (*S*)-(+)-7,8-dihydrokavaïne **6**, a été préparé selon cette méthodologie. Ce système catalytique fournit donc une approche directe et "one-pot" de l'accès au motif kavalactones (Schéma 16).

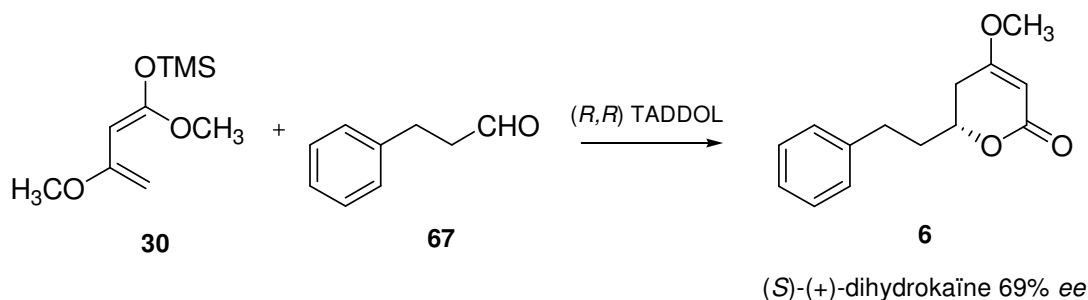


Schéma 16

Smith *et al.*³² ont rapporté la première synthèse asymétrique de (+)-kavaïne en trois étapes. Le composé **69**, obtenu après une réaction d'aldolisation avec l'auxiliaire chiral *N*-acétyl-thiazolidinethione **68**, réagit avec le malonate **70** pour fournir après décarboxylation **71**. L'étape 2 s'agit de l'addition du diénolate et finalement l'intermédiaire préparé permet d'obtenir la (+)-kavaïne **5** (Schéma 17).

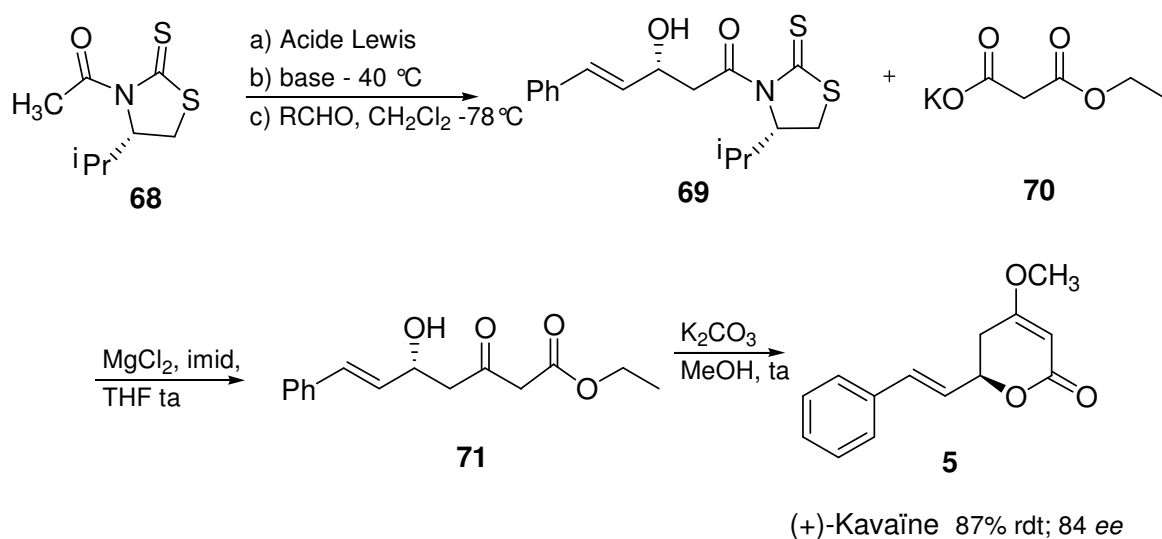


Schéma 17

Dans ce même travail les auteurs ont préparé des analogues de kavalactones substitués par le vinylstannane **72** leur permettant l'obtention d'autres kavalactones **5**, **12** et **19** par la réaction de Stille avec des dérivés iodés (Schéma 18).

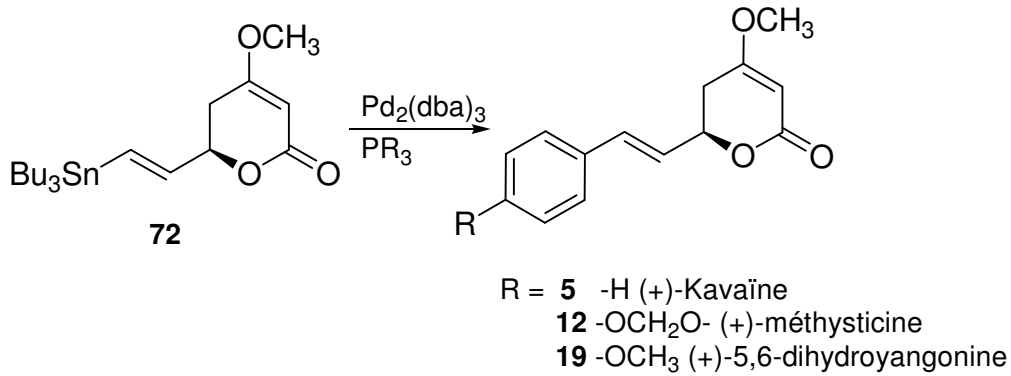


Schéma 18

Plus récemment³³, le couplage de Sonogashira pour la synthèse de kavalactones a été utilisé. Le schéma 19 représente l'étape clé de la séquence réactionnelle pour accéder aux kavalactones à partir de l'iodobenzène **73** et de l'alcyne **74** (90% de rendement). D'autres étapes ont ensuite été développées pour accéder à la kavaïne **5** et la dihydrokavaïne **6**.

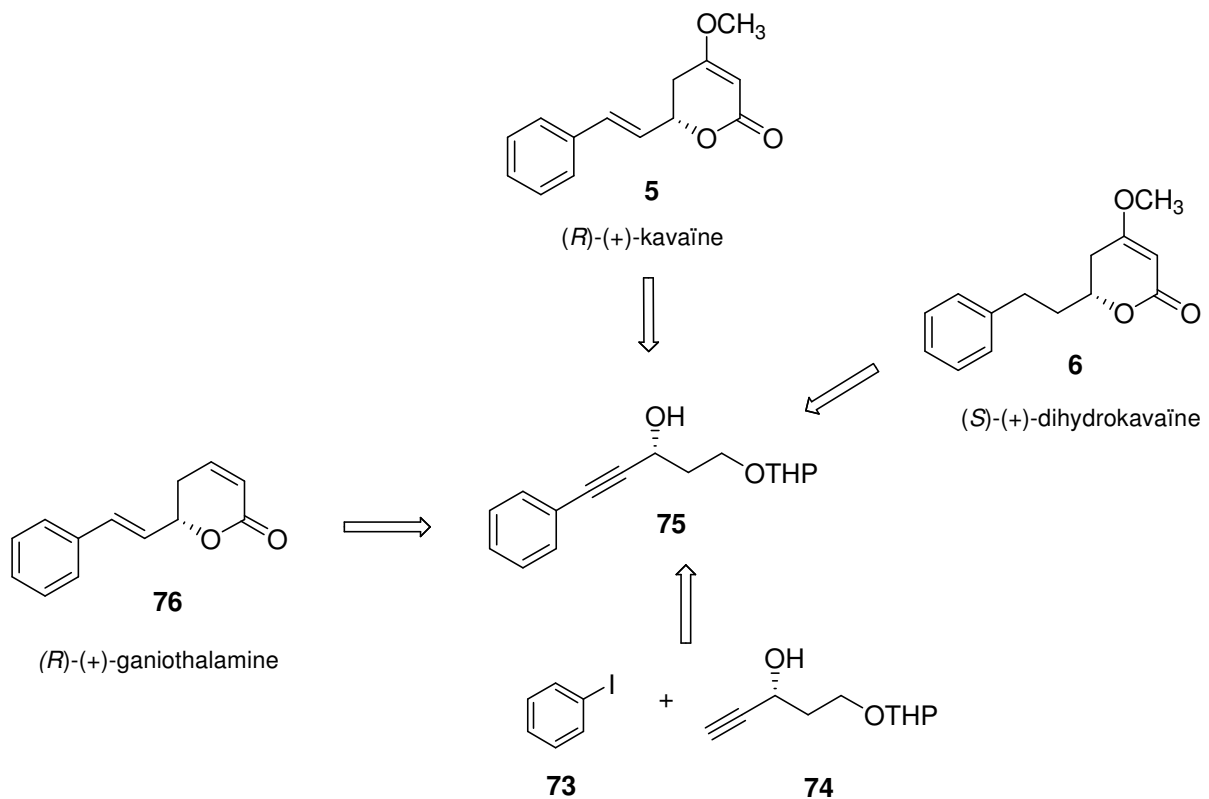


Schéma 19

1.3. La chimie combinatoire et les valérolactones

La chimie combinatoire trouve son origine dans les années 80 avec les synthèses de peptides réalisées sur support solide menées par deux équipes différentes menées par Robert Bruce Merrifield au Rockefeller University (New York/USA, 1984) et par le professeur Arpad Furka à Eötvös Lorand University (Budapest/Hongrie, 1988).

Les années 80 ont abouti aussi à une amélioration des performances des tests de criblage, due aux progrès remarquables de la biologie moléculaire au niveau de l'identification des enzymes et des récepteurs ainsi qu'à la robotisation et la miniaturisation des tests biologiques (*HTS = high throughput screening*). L'attention des tests réalisés à haut débit a été centrée au départ vers les collections de molécules d'origine naturelle.

En considérant que les purifications et l'identification des structures ne sont intéressantes que lorsqu'une activité biologique est détectée, le processus de recherche pourrait être accéléré par la synthèse simultanée d'un grand nombre de molécules dont l'évaluation de l'activité biologique se ferait avant même qu'il ne soit purifié. La nécessité de fournir un nombre plus important de composés pour les tests a orienté les recherches vers la synthèse de peptides. Cependant, à cause du fait que les peptides n'ont pas une bonne biodisponibilité, les recherches se sont tournées alors vers les composés de petit poids moléculaire, c'est-à-dire non peptidiques.

Les premières synthèses combinatoires de molécules non peptidiques ont été publiées par Ellman³⁴ et Bunin^{34,35} sur la synthèse des dérivés benzodiazépines en Synthèse Organique en Phase Solide (SOPS). Depuis ces travaux, beaucoup de composés ont été synthétisés sur support solide et en solution, par plusieurs équipes non seulement dans l'université, mais aussi dans l'industrie.

Au cours de la dernière décennie, la chimie combinatoire a connu un essor considérable dans l'industrie pharmaceutique, devenant une méthode de synthèse incontournable pour la découverte de nouveaux médicaments. Actuellement, la plupart des entreprises pharmaceutiques développent, dans leur stratégie de

découverte et d'optimisation de têtes de série (« *Lead* »), des programmes s'appuyant sur la chimie combinatoire³⁶. A ce propos-là nous pouvons citer le sorafenib (Nexavar®, Bayer), Imatinibe (Glivec®, Novartis, Brésil) et l'enfuvirtide (Fuzeon®, Roche/Trimeris), comme des médicaments synthétisés en utilisant la chimie combinatoire.

Dans son approche la chimie combinatoire est un outil permettant de réaliser des synthèses à haut débit, c'est à dire qu'elle permet de générer en un temps très court un nombre important de molécules, et ce avec une large diversité moléculaire.

La chimie combinatoire a été imaginée comme une réponse aux nouvelles techniques de criblage à haut débit développées par les biologistes, dans le processus de découverte de molécules d'intérêt thérapeutique. Ce concept a tout d'abord été initié pour la synthèse peptidique en support solide, avec notamment l'élaboration d'énormes chimiothèques de composés. Depuis quelques années, la synthèse combinatoire a profondément évolué, et se focalise à présent sur la synthèse de banques plus restreintes de petites molécules organiques (de l'ordre d'une centaine de composés).

Le principe de la synthèse sur support solide est le suivant: il s'agit de lier de façon covalente un substrat sur un support insoluble puis de le modifier par divers réactifs. A l'issue de la réaction, les réactifs et solvants sont éliminés par simple filtration. A la fin de la séquence réactionnelle, la liaison au support est rompue et le produit final est récupéré là encore après filtration.

D'après ce concept Pierres, *et al*³⁷ ont réalisé une petite chimiothèque des valérolactones selon une réaction d'hétéro-Diels-Alder. Ils ont préparé sur support solide le diène de Brassard en partant de la résine **77**. Un espacer avec 3 carbones a été attaché à la résine ensuite la résine modifiée **78** a été fonctionnalisée avec le dicétène. Le traitement de **79** avec un excès d'orthoformate de méthyle, en présence de traces d'acide sulfurique, à température ambiante permet la formation d'un éther d'énol **80**. Celui-ci est soumis à l'action du LDA en présence de 1,3-Diméthyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1*H*)-pyrimidinone (DMPU) dans le THF à -78°C durant 2 h, afin de réagir avec un excès de *t*-Bu(CH₃)₂SiCl (Schéma 20) et fournir **81**.

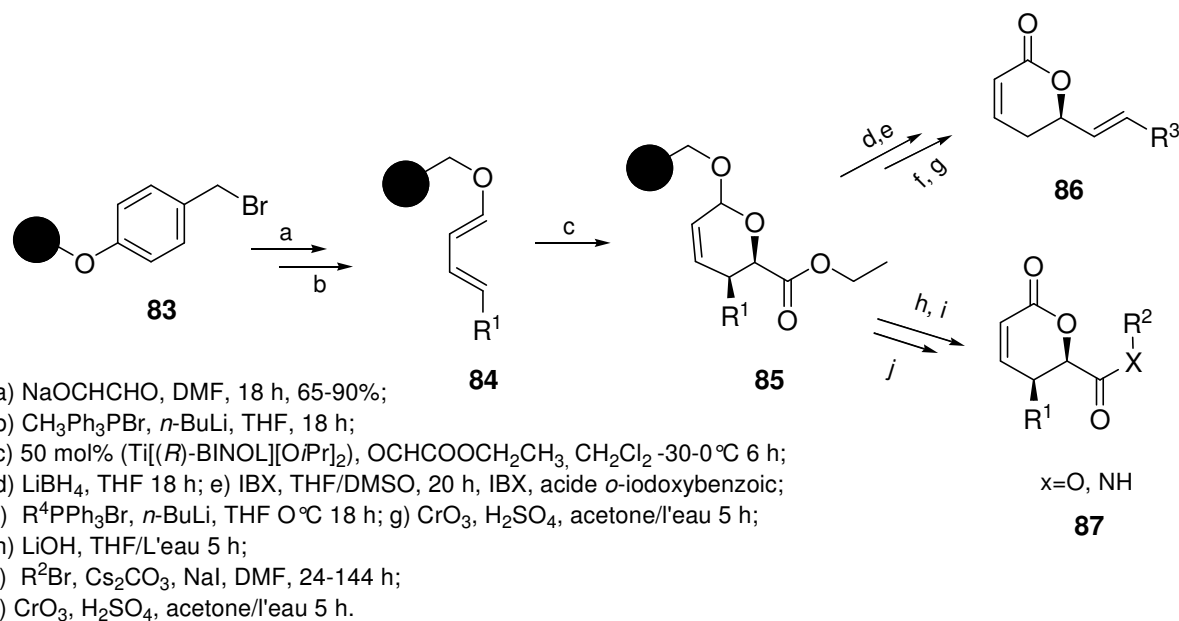


Schéma 22

Un autre outil **le support fluoré** semble tout-à-fait intéressant pour la chimie combinatoire car présente des avantages par rapport au support solide. Nous allons en parler plus en détail dans le **Chapitre II**. Nous n'avons cependant pas trouvé jusqu'à présent des exemples dans la littérature rapportant des synthèses de δ -valérolactones sur support fluoré.

2. Le Motif δ -valérolactone

Au cours de mon master, j'ai eu l'opportunité de synthétiser en solution quelques δ -valérolactones. La synthèse a été menée en une étape réactionnelle à partir de l'acétoacétate d'éthyle en réaction avec divers aldéhydes en milieu basique^{27b} (Schéma 23).

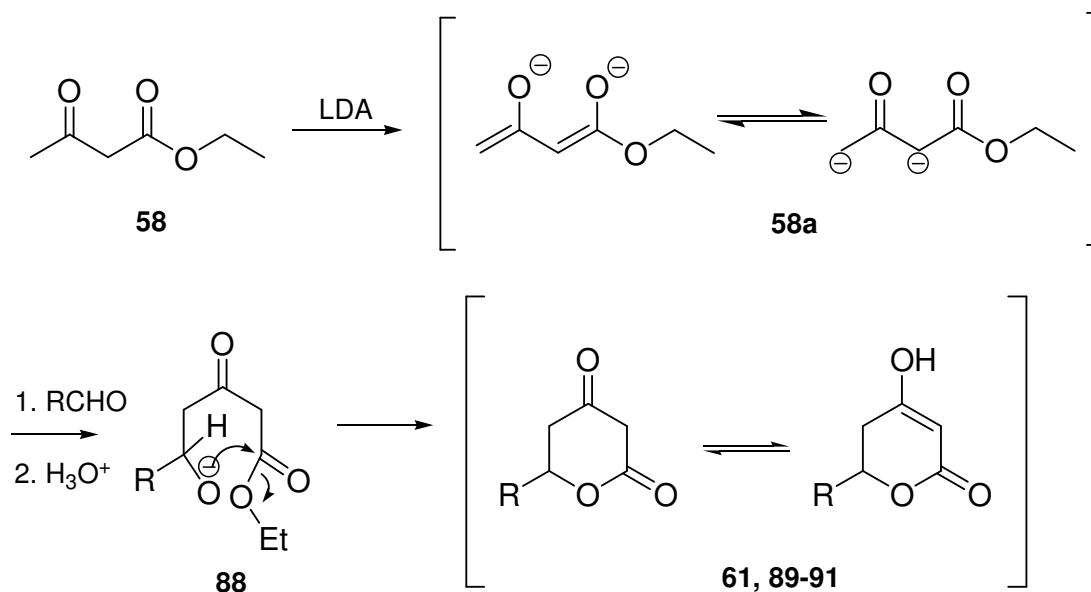


Schéma 23

L'activité analgésique *in vivo* de ces composés a été évaluée chez la souris et les résultats ont montré que les lactones synthétisées ont présenté un effet d'inhibition de la douleur plus importante que les substances de référence utilisées, en ce qui concerne l'inhibition de contorsions provoquée par une solution l'acide acétique, utilisant 10 mg/Kg la voie intrapéritonéal (IP) (Tab. 1.2).

Tableau 1.2 : Pourcentage d'inhibition de δ -valérolactones sur l'activité analgésique

Produit	R	Inhibition (%)
61	-CH=CH-Ph	69,1 ± 4,5
89	-Ph	90,4 ± 1,3
90	<i>p</i> -F-Ph	96,1 ± 1,3
91	(CH ₃) ₂ CH-	64,8 ± 4,9
Ac. Acétylsalicylique		35,0 ± 2,0
Acetaminophen		38,0 ± 1,0

Face à ces résultats encourageants nous avons décidé de continuer la recherche sur ce type de molécule, donc nous avons planifié diverses stratégies pour arriver aux δ -valérolactones diversifiées dans les positions 3, 4, 5 et 6 du cycle lactonique.

3. Objectifs et stratégie de synthèse

Le présent travail s'insère dans le contexte précédemment exposé: poursuivre la synthèse de certaines valérolactones et l'optimisation de la formation de ce motif, dans le but des fonctionnaliser en positions **3**, **4**, **5** et **6** pour obtenir de nouveaux hétérocycles d'intérêt pharmacologique, notamment analgésique, anti-inflammatoire et cytotoxique.

Les synthèses seront menées en solution, soit utilisant le support fluoré, soit la synthèse conventionnelle. Les synthèses sur support fluoré planifiées ont pour but principal l'utilisation de la chimie combinatoire pour construire rapidement une chimiothèque de valérolactones substituées (Schéma 24, **voie A**). Les synthèses conventionnelles, c'est-à-dire, en solution sans support (Schéma 24, **voie B** et Schéma 25) ont pour but principal l'optimisation de la synthèse et aussi l'obtention de quantités plus importante de produits pour continuer les essais *in vivo* pour l'activité analgésique.

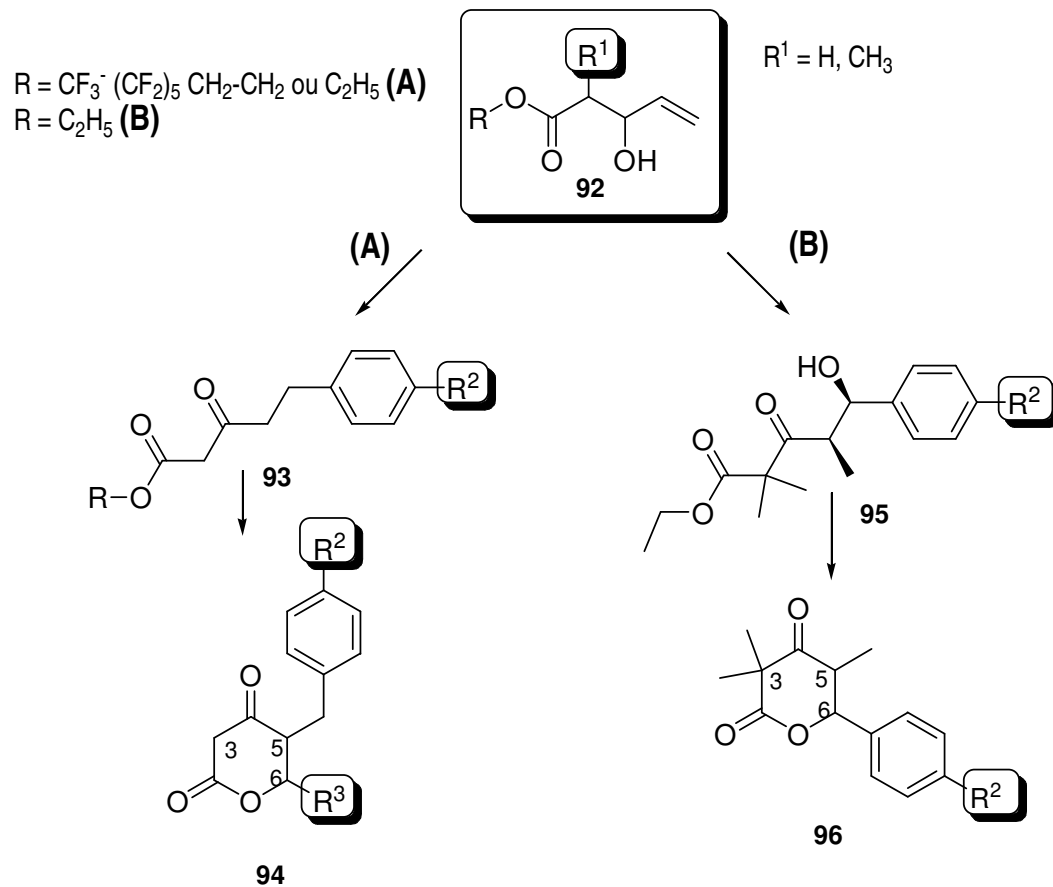


Schéma 24

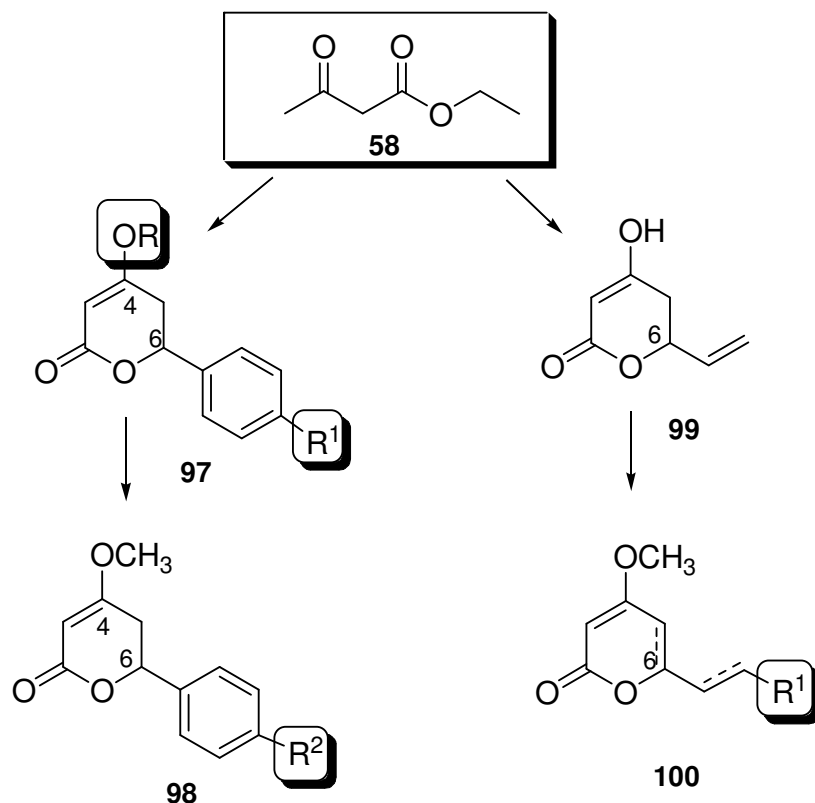


Schéma 25

Les composés obtenus seront soumis à une évaluation préliminaire de leurs potentialités pharmacologiques, notamment analgésique et anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus serviront de guide à des futures investigations pharmacologiques. Le plan que nous avons choisi pour exposer le travail est le suivant :

- **Le chapitre I** – l'Introduction et les objectifs ;
- **Le chapitre II** – Mise en œuvre d'une synthèse fluorée de 4-oxo- δ -valérolactones disubstituées dans les positions 5 et 6 du cycle lactonique ;
- **Le chapitre III** – *Towards synthesis of kavalactone derivatives* ([doi:10.1016/j.tetlet.2008.07.102](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.07.102) - publication acceptée au journal *Tetrahedron Letters*) ;
- **Le chapitre IV** – *Different cross-coupling approaches to the synthesis of novel kavaine-like derivatives and evaluation of their cytotoxicity* (manuscript à soumettre au *Journal of Brazil Chemical Society*) ;

- **Le chapitre V** – Evaluation de l'activité biologique anti-inflammatoire des δ -valérolactones ;
- **Le chapitre VI** – Evaluation de l'activité analgésique de δ -valérolactones ;
- **Conclusions générales.**

4. Bibliographie

1. NEWMAN D.J.; CRAGG G.M.; SNADER K.M. "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002". *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.
2. BOUCARD, V.; BROUSTAL, G.; CAMPAGNE, J.M. Synthetic Approaches to α,β -Unsaturated δ -Lactones and Lactols. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2, 225-236.
3. GIDDENS, A. C.; NIELSEN, L.; BOSHOFF, H.I.; TASDEMIR, D.; PEROZZO, R.; KAISER, M.; WANG, F.; SACCHETTINI, J.C.; COPP, B. Natural product inhibitors of fatty acid biosynthesis: synthesis of the marine microbial metabolites pseudopyronines A and B and evaluation of their anti-infective activities. *Tetrahedron.* **2008**, 64, 1242-1249.
4. (a) UENO, Y.; TADAND, K-I.; OGAWA, S.; MCLAUGHLIN, J.L.; ALKOFABI, A. Total Syntheses of (+)-Altholactone [(+)-Goniothalenol] and Three Stereocongeners and Their Cytotoxicity against Several Tumor Cell Lines. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 2328-2337. (b) BERMEJO, A.; LÉONCE, S.; CABEDO, N.; ANDREU, I.; CAIGNARD, D. H.; ATASSI, G.; CORTES, D. Semisynthesis and Cytotoxicity of Styryl-Lactone Derivatives. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1106-1109. (c) INAYAT-HUSSAIN, S. H.; OSMAN, A. B.; DIN, B. L.; TANIGUCHI, N. Altholactone, a novel styryl-lactone induces apoptosis via oxidative stress in human HL-60 leukemia cells. *Toxicol. Lett.* **2002**, 131, 153-159.
5. (a) SINGH, Y. N. Effects of Kava on Neuromuscular Transmission and muscle contractil. *J Ethnopharmacol.* **1983**, 7, 3, 267-276. (b) HASHIMOTO, T.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; YAMADA, M.; KOHNO, T.; ASAKAWA, Y. Isolation and synthesis of TNF- α release inhibitors from Fijian kava (*Piper methysticum*). *Phytomedicine.* **2003**, 10, 309-317.
6. (a) SUN, C-L.; PANG, R-F.; ZHANG, H.; YANG, M. Desing, synthesis, and biological evaluation of novel 4-hydroxypyronone derivatives as HIV-1 protease inhibitors. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3257-3262. (b) NEWMAN, D.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461-477.
7. MARCH, J. Advanced Organic Chemistry. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, **1992**. p. 211.
8. (a) CHO, J.Y.; BAYK, K.U.; JUNG J.H.; PARK, M.H. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 399-407. (b) SKAL TSA, H.; LAZARI, D.; PANAGOULCAS, C.; SOKOVIC, G.E.B.; SOROVIC, M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica* with Antifungal activity, *Phytochemistry.* **2000**, 55, 903-908. (c) BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia: sesquiterpenos*, Zaragoza: Acribia, S. A. **1991**. p. 284-290. (d) DUFFIELD, P. H.; JAMIESON, D.D.; DUFFIELD, A.M. Effect of Aqueous and Lipid-Soluble Extracts of Kava on the Conditioned Avoidance Response in Rats, *Arc Int Pharmacol.* **1989**, 81-90. (e) LAN, Y.; CHANG, F.; YU, J.; YANG, Y.; CHANG, Y.; LEE, S.; WU, Y. Cytotoxic Styrylpyronones from *Goniothalamus amuyon*. *J Nat Prod.* **2003**, 66, 487-490. (f) TIAN, Z.; CHENA, S.; ZHANG, Y.; HUANG, M.; SHIB, L.; HUANG, F.; FONG, C.; YANG, M.; XIAO, P. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine.* **2006**, 13, 181-186.
9. ALTMANN, K-H. Chemical tools from biology-Oriented Synthesis. *Chem. Biol.* **2007**, 14, 347-349.

10. (a) KELEDJIAN, J.; DUFFIELD, P.H.; JAMIESON, D.D.; LIDGARD, R.O.; DUFFIELD, M. Uptake into mouse brain of four compounds present in the Psychoactive Beverage Kava. *J Pharm Sci.* **1988**, 77, 12, 1003-1006. (b) SEITZ, U.; AMERI, A.; PELZER, H.; GLEITZ, J.; PETERS, T. Relaxation of evoked contractile activity of isolated guinea-pig ileum by (+/-)-kavain. *Planta Med.* **1997**, 63, 4, 303-306. (c) SCHIRRMACHER, K.; BUSSELBER, D.; LANGOSCH, J.M.; WALDEN, J.; WINTER, U.; BBINGMANN, D. Effects of (+/-)-kavain on voltage-activated inward currents of dorsal root ganglion cells from neonatal rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* **1999**, 171-176.
11. CHMIELEWSKI, M.; JURCZAK, J. General Approach to the Synthesis of Naturally Occurring δ -Lactones. *J. Chem. Soc.* **1981**, 46, 11, 2230-2233.
12. BENNET, D.M.; OKAMOTO, I.; DANHEISER, R.L. Hetero [4+2] Cycloadditions of (Trialkylsilyl)vinylketenes. Synthesis of α,β -Unsaturated δ -valerolactones and δ -Lactams. *Org. Lett.* **1999**, 1, 4, 641-644.
13. MIDLAND M.M.; GRAHAM, R.S. High Threo Diastereoselectivity via Europium(III)-Catalyzed Cyclocondensation of a Silyloxy Diene with α -Alkoxy Aldehydes. Synthesis of (-) – Pestalotin. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4294-4296.
14. FAN, Q.; LIN, L.; LIU, J.; HUANG, Y.; FENG, X.; ZHANG, G. Highly Enantioselective Hetero-Diels-Alder reaction Brassard Diene with Aromatic Aldehydes. *Org. Lett.* **2004**, 6, 13, 2185-2188.
15. LIN, L.; FAN, Q.; QIN, B.; FENG, X. Highly Enantio- and Diastereoselective Brassard Type Hetero-Diels-Alder Approach to 5-Methyl-Containing α,β -Unsaturated δ -lactones. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 4141-4146.
- ¹⁶ LIN, L.; CHEN, Z.; YANG, X.; LIU, X.; FENG, X. Efficient Enantioselective Hetero-Diels-Alder Reaction of Brassard's Diene with Aliphatic Aldehydes: A One-Step Synthesis of (R)-(+)-Kavain and (S)-(+)-Dihydrokavain. *Org. Lett.* **2008**, 10, 6, 1311-1314;
17. WINKLER, J.D. ; OH, KYUNGSOO. A One-Step Synthesis of 2,3-Dihydro-4H-pyran-4-ones from 3-Ethoxy α,β -Unsaturated Lactones. *Org. Lett.* **2005**, 7, 12, 2421-2423.
18. (a) SHCHEPIN, V.V.; SAZHNEVA, Y.K.; LITVINOV, D.N. Reaction of Zinc Enolates of Alkyl Esters of Substituted 4-Bromo-3-Oxoalkanoic Acids with Aldehydes. *Russ. J. Gen. Chem.* **2003**, 73, 4, 596-602. (b) SHCHEPIN, V.V.; SAZHNEVA, Y.K.; RUSSKIKH, N.Y.; VAKHRIN, M.I. Alkylation with Substituted Phenacyl Bromides of Enolates from 6-Aryl-3,5,5-trimethyl-2,3,5,6-tetrahydropyran-2,4-diones. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, 37, 10, 1512-1513. (c) SHCHEPIN, V.V.; RUSSKIKH, N.Y.; SAZHNEVA, Y.K. Unexpected O-Alkylation of sodium enolates obtained from 6-Aryl-2,3,5,6-tetrahydro-2,4-pyran-2,4-diones by 1-Aryl-2-bromoalkanoates. *Chem. Heterocy. Comp.* **2003**, 29, 2, 269-270.
19. KASHIHARA, H.; SHINOKI, H.; SUEMUNE, H.; SAKAI, K. Novel Synthesis of Indian Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 11, 4527-4532.
20. HUCKIN, S.N.; WEILER, L. Alkylation of Dianions of β -Keto Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 1082-1087.

21. WESTHEIMERAN, F.H.; JONES, W.A. The Effect of Solvent on Some Reaction Rates. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 3283-3286.
22. (a) CEREZO, S.; MORENO-MAFIAS, M.; PLEIXATS, R. 3-Aryl and 5-Aryl-4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-ones by Suzuki Cross-Coupling Reactions of 3- and 5-Halogeno-4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-ones. *Tetrahedron*. **1998**, 54, 7813-7818. (b) MARRISON, L.R.; DICKINSON, J.M.; FAIRLAMB, J. S. Suzuki Cross-coupling Approaches to the Synthesis of Bioactive 3-Substituted and 5-substituted-4-methoxy-6-methyl-2-pyrone. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 2667-2671.
23. MIYAURA, N.; YAMADA, K.; SUZUKI, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 36, 3437-3440.
24. CHINCHILLA, R.; NAJERA, C. The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 874-922.
25. MARRISON, L.R.; DICKINSON, J. M.; AHMED, R.; FAIRLAMB, I.J.S. An efficient synthesis of 4-alkenyl/alkynyl-6-methyl-2-pyrone via Pd-catalysed coupling on 4-bromo-6-methyl-2-pyrone. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8853-8857.
26. (a) FOWLER, E.M.F.; HENBEST, H.B. Researches on Acetylenic Compounds. Part XXV. Synthesis of (\pm) -Kawain. *Chem Soc.* **1950**, 3642-3645. (b) PIANTOSI, C.; SKULASON, V.G. Synthesis of Some α,β -Unsaturated β,δ -Disubstituted δ -Lactones. *J. Pharm. Sci.* **1964**, 53, 8, 902-905.
27. (a) ISRAILI, Z.H.; SMISSMAN, E. E. Synthesis of Kavain, Dihydrokavain, and Analogues. *J. Org Chem.* **1976**, 41, 26, 4070-4074. (b) AMARAL, P.A.; BERGOLD, A.M.; EIFLER-LIMA, V.L.; SANTOS, E.; OLIVEIRA, E.R.; CAMPOS-BUZZI, F.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive effects of some synthetic δ -valerolactones. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, 8, 69-75.
28. REFFSTRUP, T.; BOLL, P.M. The Preparation of 4-Hydroxy-5,6-dihydro-2-pyrone and Their Conversion to Kawa-lactones as well as to Other Precursors of Naturally Occurring 2-Pyrone. *Acta Chem. Scand. B.* **1976**, 30, 7, 613-617.
29. CASTELLINO, S.; SIMS, J.J. The total synthesis of (\pm) kawain via a hetero-Diels-Alder cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4059-4062.
30. SPINO, C.; MAYES, N; DESFOSSÉS, H. Enantioselective Synthesis of (+) and (-) dihydrokawain. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6503-6506.
31. DU, H.; DONGBO, Z.; DING, K. Enantioselective Catalysis of the Hetero-Diels-Alder Reaction between Brassard's Diene and Aldehydes by Hydrogen-Bonding Activation : A One-Step Synthesis of (S)-(+)-Dihydrokawain. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5964-5970.
32. SMITH, T E.; DJANG, M.; VELANDER, A. J.; DOWNEY, W.; CARROL, K. A.; VAN ALPHEN, S. Versatil Asymmetric Synthesis of the kavalactones: First Synthesis of (+)-Kavain. *Org. Lett.* **2004**, 6, 14, 2317-2320.

33. SABITHA, G.; SUDHAKAR, K.; YADAV, J.S. Application of the Cosford cross-coupling protocol for the stereoselective synthesis of (R)-(+)-goniothalamin, (R)-(+)-kavain and (S)-(+)-7,8-dihydrokavain. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 8599-8602.
34. THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, Jonathan A. Ellman. Solid Phase and Combinatorial Synthesis of compounds on a solid support. PCT/US93/08709. US WO 94/06291. 31 march 1994. International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT).
35. (a) BUNIN, B. A.; ELLMAN, J. A General and Expediente Method for the Solid-Phase Synthesis of 1,4-benzodiazepine Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10997-10998. (b) BUNIN, B.A.; PLUNKETT M.J.; ELLMAN, J.A. The combinatorial synthesis and chemical and biological evaluation of a 1,4-benzodiazepine library. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA.* **1994**, 91, 4708-4712.
36. (a) VERLANDER, M. Industrial applications of solid-phase peptide synthesis – A status report *Int J Pept Res Therap.* **2007**, 13 (1-2), 75-82. (b) PRÜHS, S.; DIENTER, C.; BLUME, T.; SCHÜLTZ, A.; HARRE, M.; NEH, H. Upscaling the Solid-Phase Synthesis of a Tetrahydrocarbazole in Chemical Development. *Org Process Res Dev.* **2006**, 10, 441-445. (c) MARX, V. Watching Peptide Drugs Grow UP. *Chem. Eng. News.* **2005**, 14, 83, 11, 17-24 (d) MEISENBACH, M.; ALLMENDINGER, T.; MAK, C-P. Scale-up of the synthesis of a Pyrimidine derivative directly on solid support. *Org Process Res Dev.* **2003**, 7, 553-558. (e) SHARMA, S. K.; WU, A. D.; CHANDRAMOULI, N.; FOSTCH, C.; KARDASH, G.; BAIR, K. W. Solid Phase Total Synthesis of Polymyxin B1. *J. Peptide Res.* **1999**, 53, 501-506.
37. PIERRES, C.; GEORGE, P.; HIJFTE, L.V.; DUCEP, J-B.; HIBERT, M.; MANN, A. Polymer-supported electron-rich diene for hetero Diels-Alder reactions. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3645-3647.
38. LEßMANN, T.; LEUENBERGER, M.G.; MENNINGER, S.; LOPEZ-CANET, M.; MÜLLER, O.; HÜMMER, S.; BORMANN, J.; KORN, K.; FAVA, E.; ZERIAL, M.; MAYER, T. U.; WALDMANN, H. Natural Product-Derived Modulators of Cell Cycle Progression and Viral Entry by Enantioselective Oxa Diels-Alder Reactions on the Solid Phase. *Chem. Biol.* **2007**, 14, 443-451.

CHAPITRE II – *SYNTHESE EN PHASE FLUOREE*

1. Introduction sur la synthèse fluorée

La nécessité d'obtenir rapidement de petites molécules organiques ces dernières années, la préparation commune – sous forme de mélanges ou parallèle - sous forme de substances pures - de collections avec un grand nombre de composés structurellement différents, a permis une évolution spectaculaire dans les méthodes jusqu'alors utilisées pour la recherche et le développement des médicaments.

Parmi les nouvelles approches dans la mise en œuvre des réactions et des méthodes de séparation la synthèse en phase fluorée a émergé comme une alternative très intéressante à la synthèse classique en solution ou même à la synthèse sur support solide car elle réunit les avantages de ces deux méthodes¹.

1.1. Concept de la synthèse fluorée

1.1.1. La synthèse "hautement fluorée"

C'est sous la forme de "catalyse fluorée biphasique" que la synthèse fluorée voit le jour en 1994, grâce aux travaux de Horváth et Rábai² (Schéma 26).

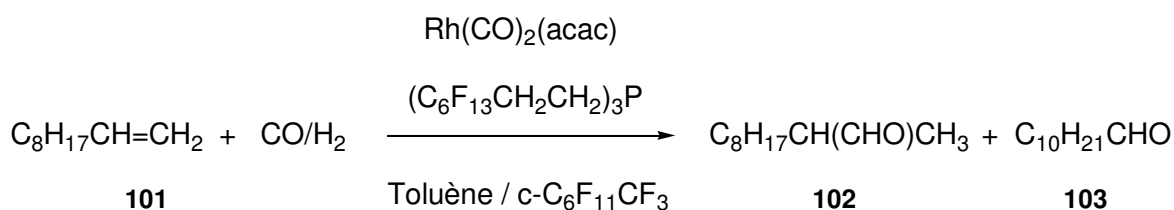


Schéma 26

Ces auteurs ont démontré au travers d'une réaction d'hydroformylation (synthèse OXO) que l'utilisation conjointe d'un mélange biphasique toluène - solvant fluoré et d'une phosphine "hautement fluorée" s'avérait très efficace pour d'une part faciliter la purification des produits de la réaction et d'autre part recycler le catalyseur fluoré dans la phase fluorée. Ce concept permet de travailler en catalyse homogène

à chaud et après refroidissement les composés organiques se partagent respectivement dans la phase organique et la phase fluorée.

En 1996, l'équipe du Pr. Dennis P. Curran à Pittsburgh reconnaît dans cette approche les fondements de la synthèse combinatoire en phase liquide et publie les premières synthèses en parallèle impliquant un réactif fluoré dans le but de faciliter les étapes de purification. Ils ont par exemple synthétisé une chimiothèque de 15 composés *via* un couplage de *Stille* mettant en jeu un dérivé organostannique "hautement fluoré" (Schéma 27)³.

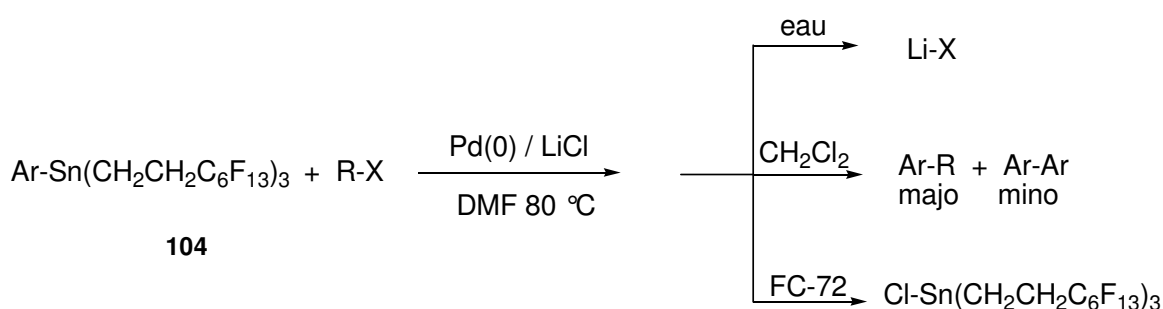


Schéma 27

Après évaporation des solvants, une étape d'extraction triphasique eau/dichlorométhane/FC-72 (mélange de fluorohexanes) permet en effet d'éliminer les sels dans la phase aqueuse et les dérivés hautement fluorés de chlorure d'étain dans la phase fluorée, ces derniers pouvant ensuite être recyclés et réutilisés. Les composés organiques sont enfin extraits sélectivement par la phase organique (Fig. 2.1).

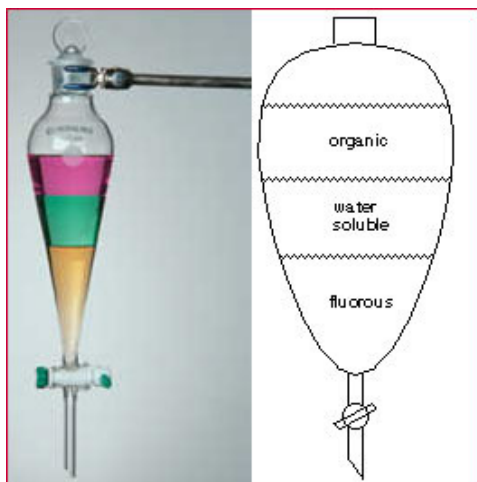


Figure 2.1 : Extraction liquide-liquide triphasique solvant organique/eau/solvant fluoré.

La voie vers la synthèse combinatoire en phase fluorée est alors ouverte et l'équipe du Pr. Curran propose en 1997 le concept de "synthèse fluorée"⁴. Différentes approches sont introduites⁵, faisant intervenir un composé "hautement fluoré" en tant que réactif, "scavenger", groupe protecteur ou substrat de départ.

L'utilisation d'un substrat de départ hautement fluoré s'est notamment rapidement démarquée de par son analogie avec la synthèse sur support solide (Fig. 2.2) et la possibilité de réaliser des synthèses multiétapes avec un clivage terminal des chaînes fluorées offrant des produits finaux avec une très bonne pureté (> 90 %)⁶.

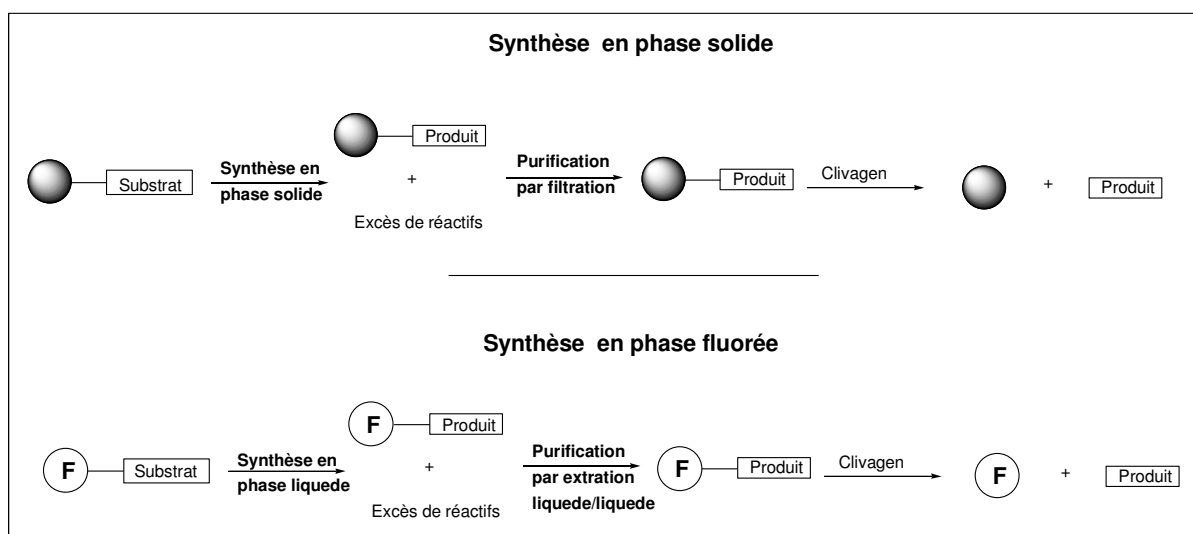


Figure 2.2 : Analogie des synthèses sur support solide et sur support fluoré.

Jusqu'en 1999, toutes les synthèses fluorées impliquaient un composé "hautement fluoré", une forte proportion de fluor étant indispensable pour séparer les composés par extraction liquide-liquide. Cependant, plus le nombre d'atomes de fluor augmente, plus la solubilité des composés fluorés dans les solvants organiques diminue et il est parfois nécessaire d'utiliser des solvants fluorés ou des hybrides tels que le trifluorobenzène ou encore d'effectuer les réactions sous micro-ondes⁷, pour que les réactions soient conduites en milieu homogène. L'utilisation de composés hautement fluorés requiert donc le plus souvent une phase d'adaptation des conditions réactionnelles décrites dans la littérature.

L'utilisation simultanée de composés "faiblement fluorés" et d'une silice fluorée s'est à ce moment là présentée comme la solution à ces inconvénients et s'est immédiatement imposée dans le domaine de la synthèse fluorée.

1.1.2. Emergence de la synthèse "faiblement fluorée"

Les composés dit "faiblement fluorés" étant solubles dans la plupart des solvants organiques, ils permettent de réaliser les réactions en milieu homogène (à température ambiante si cela est nécessaire et sans solvant fluoré) avec tous les avantages en terme de: cinétique réactionnelle favorable, d'analyses des intermédiaires. Leur faible proportion de fluor n'autorise cependant pas leur purification par extraction liquide/liquide. Ce n'est que lorsque la SPE (*Solid Phase Extraction*) avec de la silice fluorée s'est avérée efficace pour séparer aisément les composés "faiblement fluorés" des composés non fluorés, que leur utilisation s'est développée⁵.

Cette silice fluorée (Fig. 2.3)⁸ possède une très grande affinité pour les chaînes perfluoroalkyles. Les composés fluorés sont donc retenus sélectivement grâce à de fortes interactions fluor-fluor, alors que les composés non fluorés ne le sont pas ou très peu. Elle s'utilise en phase inverse le plus souvent. La séparation peut s'effectuer en deux temps par simple filtration sous vide (*Fluorous Solide Phase Extraction*: FSPE): dans un premier temps, un solvant dit "fluorophobe" (habituellement un mélange MeOH/eau, 5 à 25 % d'eau) va éluer spécifiquement les

composés non fluorés, tandis qu'un solvant dit "fluorophile" (MeOH, THF, Et₂O) va entraîner la désorption des composés fluorés dans un second temps (Fig. 2.4).

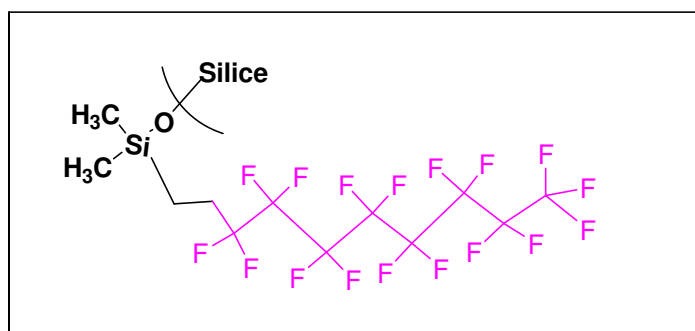


Figure 2.3 : Structure de la silice fluorée.

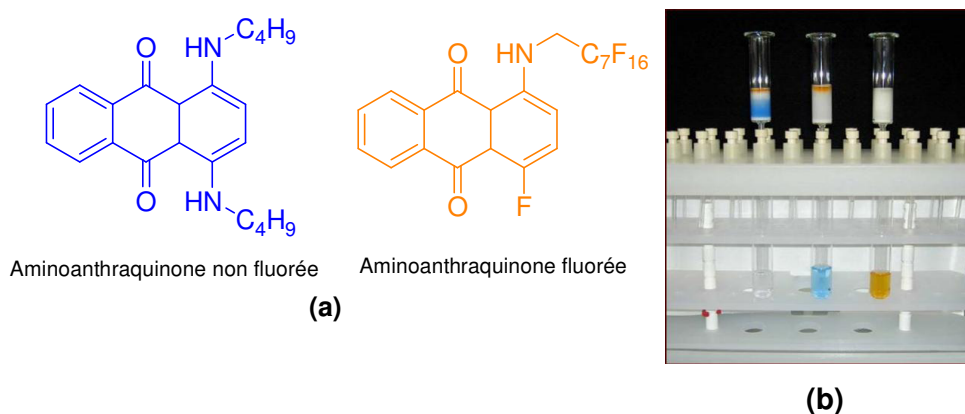


Figure 2.4 : (a) Structure de deux aminoanthraquinones non fluorée ou fluorée ; (b) Illustration de leur séparation par FSPE.

Cette puissante technique facilement automatisable a conduit à l'émergence de la synthèse en parallèle en phase fluorée, d'autant plus que la silice fluorée évite l'utilisation de solvant fluoré (souvent coûteux), est très stable et peut par conséquent être très facilement réutilisée (Fig. 2.5).



Figure 2.5 : Robot utilisée pour la synthèse en parallèle

Par ailleurs, la silice fluorée retient également les composés fluorés suivant leur teneur en fluor. La possibilité de séparer par HPLC (*High performance liquid chromatography*) un mélange de composés faiblement fluorés, marqués par des chaînes perfluoroalkyles de différentes longueurs a ainsi donné lieu au développement de la synthèse en phase fluorée en mélange (*Fluorous Mixture Synthesis*)^{1a}.

1.1.3. A l'interface entre la synthèse en solution et la synthèse sur support solide

La synthèse en phase fluorée est présentée par ses pères comme "une synthèse en solution se rapprochant très étroitement de la synthèse sur support solide d'un point de vue conceptuel, mais s'en éloignant fortement d'un point de vue pratique"⁹. Les chaînes perfluoroalkyles peuvent en effet être assimilées à des billes de polymère solides, leur rôle étant de "marquer" les composés dans le but de faciliter leur purification. Les techniques de manipulation des composés "marqués" par une chaîne perfluoroalkyle et des composés greffés à un support solide diffèrent cependant énormément. Le caractère liquide ou soluble des "marqueurs" fluorés permet de travailler en phase homogène, la purification des composés peut par conséquent être effectuée par les techniques usuelles de la synthèse en solution (extraction et chromatographie) rendues spécifiques par l'introduction d'un solvant

fluoré ou d'une silice fluorée. Cette technologie réunissant à la fois les avantages de la synthèse classique en solution et de la synthèse sur support solide (Tab. 2.1) peut donc constituer une alternative de choix pour la chimie combinatoire.

Tableau 2.1 - Comparaison des principales caractéristiques des synthèses en solution, sur support solide et en support fluorée⁹.

Caractéristiques	En solution	Synthèse Sur support solide	Fluorée
Cinétique réactionnelle favorable	☺	☺ ☺	☺
Facilité d'adaptation des méthodes décrites dans la littérature	☺		☺
Large spectre de réactions	☺		☺
Analyse conventionnelle (CCM, RMN...)	☺		☺
Facilité de passage à grande échelle	☺		☺
Purification facilitée		☺ ☺	☺
Utilisation d'un excès de réactifs		☺	☺
Possibilité d'automatisation		☺	☺
Synthèse en mélange		☺	☺
Faible coût	☺		

Elle présente tout de même quelques inconvénients liés notamment aux effets électroattracteurs du fluor susceptibles de modifier la réactivité de certains groupements et au coût relativement élevé des composés fluorés et de la silice fluorée. Ces problèmes n'ont cependant pas entravé son développement et depuis 1999 de nombreuses publications rapportent la synthèse de chimiothèques en phase fluorée à partir de substrats faiblement fluorés¹⁰.

Même si le terme de *Fluorous synthesis* est aujourd'hui utilisé pour désigner l'ensemble des techniques utilisant un composé fluoré (on distinguera tout de même le concept de *Fluorous biphasic catalysis*), il était à l'origine réservé aux techniques décrivant la conversion d'un substrat de départ fluoré en produit fluoré, par analogie avec la synthèse sur support solide.

La dénomination de ces techniques reste donc incertaine. C'est pourquoi, par souci de clarté et par comparaison avec les synthèses en phase liquide et en phase solide, il nous a semblé judicieux de regrouper toutes ces techniques sous le terme de "**synthèse en phase fluorée ou sur support fluoré**" celle utilisant un substrat de départ **faiblement** fluoré et ne nécessitant aucun solvant fluoré.

L'essor de cette méthodologie depuis une dizaine d'années est clairement illustré par la parution de plus de 500 publications sur le sujet. Les molécules fluorées disponibles sur le marché ne cessent de se multiplier et se diversifier, donnant ainsi lieu à l'adaptation de nombreuses réactions en phase fluorée (Mitsunobu, Heck, etc)^{1a,11}.

Après avoir séduit la communauté organométallique, elle a aujourd'hui fait sa place dans le domaine de la chimie combinatoire, notamment grâce à l'avènement des composés faiblement fluorés et de la silice fluorée.

1.2. Exemples de travaux développés sur support fluoré au laboratoire de Chimie Pharmaceutique à l'Université de Rennes1 – Rennes/France

1.2.1. Synthèse d' α -méthylène- γ -lactones mono- ou disubstituées

Le Lamer, et al.¹² a utilisé comme substrat de départ l'acrylate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadécafluorodécyle pour préparer des γ -lactones **107**. Cet acrylate fluoré comporte une chaîne perfluoroalkyle de 8 carbones et un bras espaceur éthyle. La séquence réactionnelle est résumée sur le schéma 28.

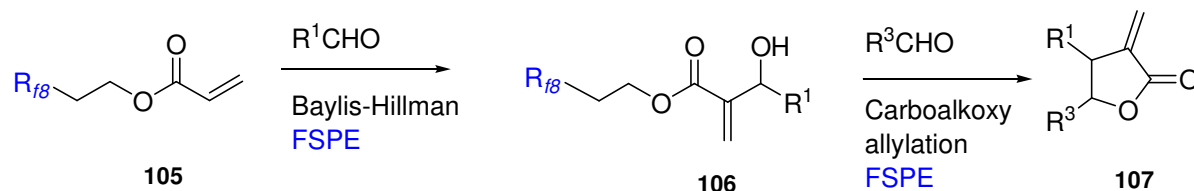


Schéma 28

La stratégie simple en deux étapes (réaction de Baylis Hillman et réaction de carboalkoxylallylation) associe deux avantages : l'introduction d'une diversité à chaque étape et la facilité de purification par FSPE permettant l'élimination du marqueur fluoré par hétérocyclisation-clivage lors de la dernière étape.

Ainsi 5 produits de Baylis-Hillman ont été préparés et ensuite couplés avec une série d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques de manière à synthétiser une petite chimiothèque de 25 α -méthylène- γ -lactones mono- ou di-substituées. La purification par FSPE a permis d'obtenir des produits finaux présentant une pureté tout à fait satisfaisante pour pouvoir effectuer une première évaluation de leur activité cytotoxique.

1.2.2. Séparation d'un mélange d'acides paraconiques sur support fluoré

Le support fluoré peut être un outil de séparation et d'isolement des substances organiques difficilement accessibles. Par exemple, Horhant et al.¹³ a utilisé le support fluoré en tant que *scavenger* pour la séparation des acides paraconiques de *Cetraria islandica* (L.) Ach. Les acides paraconiques sont les molécules **108**, **109**, **110** et **111** du type γ -butyrolactones trisubstituées avec un ou plusieurs centres stéréogéniques ; **108** et **109** sont très proches au niveau structure et donc très difficiles à séparer par les méthodes classiques (Fig. 2.6).

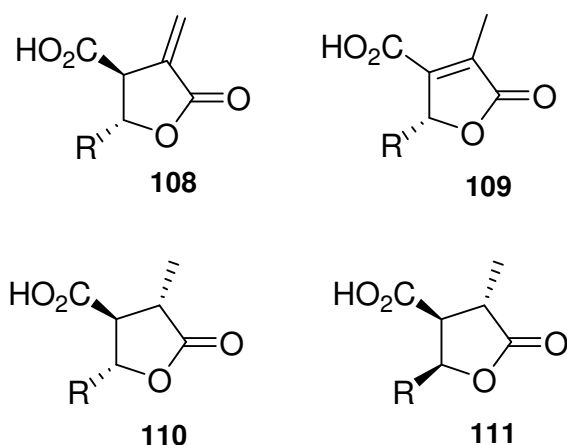


Figure 2.6 : Structure des plusieurs des acides paraconiques

La stratégie de séparation s'appuie sur l'addition de Michäel d'un thiol fluoré commercial $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ (*i*) sur la double liaison exocyclique présente uniquement sur la γ -butyrolactones **108**. Ceci permet d'isoler le composé d'addition fluoré **112** du mélange.

Les lactones **109** et **110** peuvent ensuite être séparées aisément par les méthodes chromatographiques classiques. Après oxydation du thioéther à l'aide de l'acide métachloroperbenzoïque (*m*-CPBA) (obtention du sulfoxyde fluoré **112**) l'élimination thermique du support fluoré libère la lactone **108** qui est facilement purifiée par FSPE (Schéma 29).

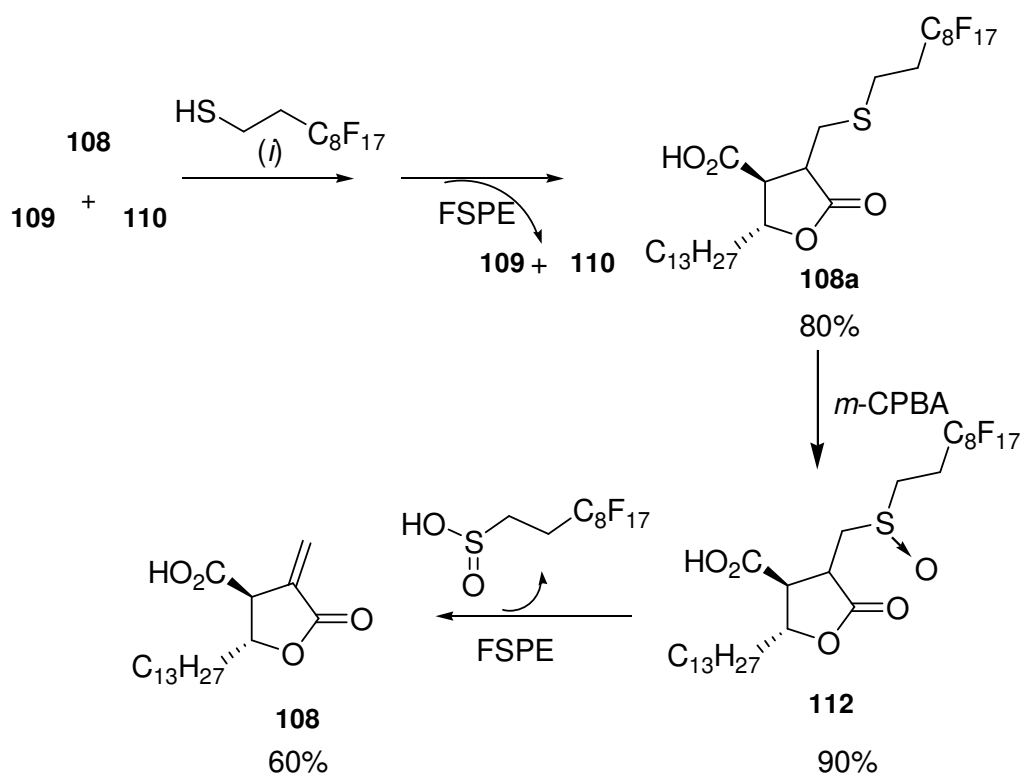


Schéma 29

Cette approche représente une méthode attractive et efficace pour isoler des métabolites secondaires des produits naturels présents en quantité peu importante et par conséquent difficilement identifiables (lactone **110** par exemple).

1.2.3. Application de la synthèse d'amines secondaires en parallèle par utilisation de techniques fluorées

Les amines secondaires sont des molécules très représentées parmi les composés ayant une activité thérapeutique. On peut citer par exemple les ligands des récepteurs β -adrénergiques (les β -bloquants utilisés pour l'hypertension, et les β_2 -stimulants utilisés dans les maladies asthmatiques)¹⁴.

Pour préparer les amines secondaires différentes stratégies ont été proposées dans la littérature. Les travaux de Fukuyama¹⁵ utilisent notamment le groupement nosyle (Ns) (2-nitro-benzenesulfonyl) comme groupement protecteur, facilement clivable dans des conditions douces, pour alkyler des sulfonamides secondaires par des composés halogénés ou des alcools.

L'objectif de Baslé, *et al.*¹⁶ a été de transposer la méthode de Fukuyama à la synthèse en parallèle à partir d'amines primaires en développant une méthode de purification efficace. Il a ainsi utilisé un dérivé halogéné fluoré comme *scavenger* de sulfonamides secondaires pour accéder rapidement et facilement à une grande diversité de sulfonamides tertiaires et d'amines secondaires **114** avec de bonnes puretés (83% des sulfonamides tertiaires purs à plus de 90%, et les 4 amines secondaires à plus de 90%) (Schéma 30).

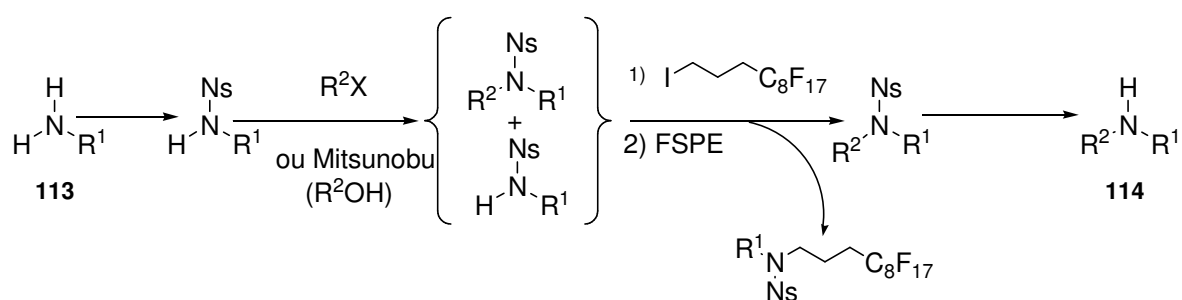


Schéma 30

Après ces rappels sur les avantages de la synthèse sur support fluoré et les expériences effectuées dans les laboratoires de synthèse avec un support solide (Brésil/UFRGS)¹⁷ ou un support fluoré (France/Rennes)^{12,13,16} nous allons

présenter les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, en synthèse organique avec le support fluoré pour accéder aux δ -valérolactones.

2. Résultats et discussion de la synthèse sur support fluoré de δ -valérolactones diversement substituées en position 5 et 6

La stratégie envisagée pour préparer des δ -valérolactones diversement substituées en 5 et 6 est résumée sur le schéma suivant (Fig. 2.7 – Schéma 31).

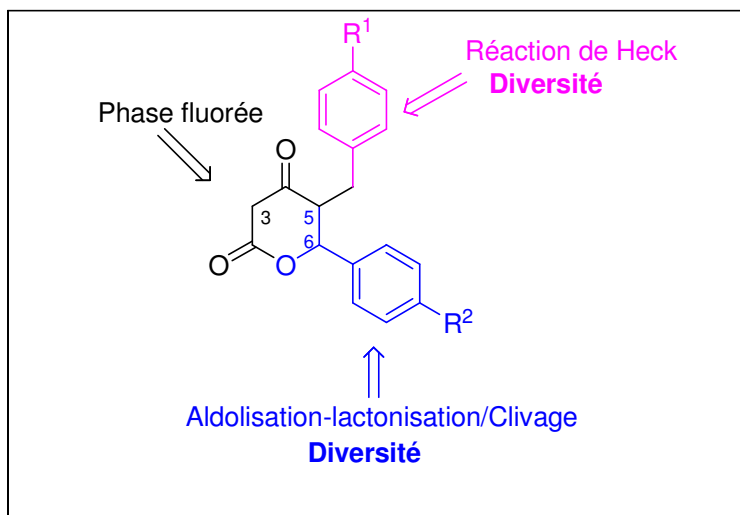


Figure 2.7 : δ -valérolactones proposée par support fluoré

La construction de l'hétérocycle utilise la condensation de β -cétoesters avec des aldéhydes et comporte les 3 étapes principales suivantes :

- ✓ Accès au produit de départ : le 3-hydroxypent-4-énoate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle à partir de l'alcool fluoré de départ. Il se fait en 2 étapes successives, sans introduction de diversité.
- ✓ Couplage de Heck : permettant d'introduire la 1^{ère} diversité en faisant varier l'iodure d'aryle et de générer la fonction cétone nécessaire à l'étape suivante.
- ✓ Condensation d'aldéhydes (2^{ème} diversité) et cyclisation/clivage.

La dernière étape est une approche de clivage très efficace, basée sur la mise en œuvre de réactions de cyclisation intramoléculaire s'accompagnant de la libération du produit final. Ce dernier concept a plus particulièrement retenu notre attention et a été à l'origine de ce projet de recherche.

Le développement de cette stratégie de cyclisation-clivage est appliqué à la préparation d'une série de δ -valérolactones sur support fluoré.

Le support fluoré utilisé pour développer cette partie expérimentale est le 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol, représentée par PF(CH₂)₂OH (**115**), disponible commercialement.

- Formule moléculaire C₈H₅F₁₃O
- Masse moléculaire = 364 g
- Point de ébullition 100-102 °C

La séquence réactionnelle est résumée dans le schéma 31. Chacune des étapes est ensuite détaillée.

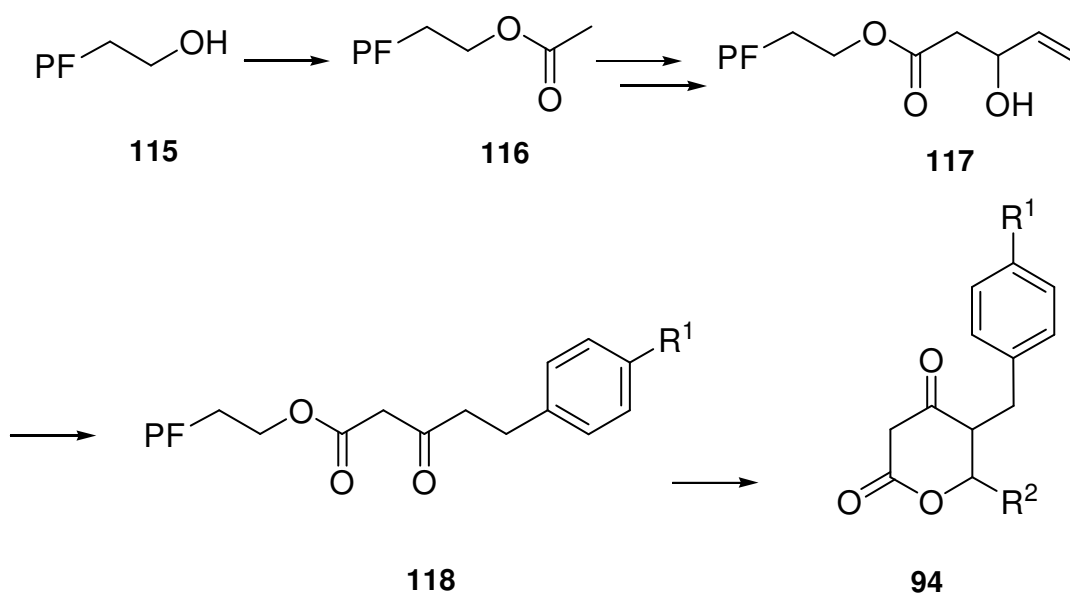


Schéma 31

2.1. Préparation de l'Acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (116)

Cette première étape réalisée suivant le protocole de Eames et Khanom¹⁸, à partir du 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol, nous a permis d'obtenir l'ester désiré avec un très bon rendement (Schéma 32).

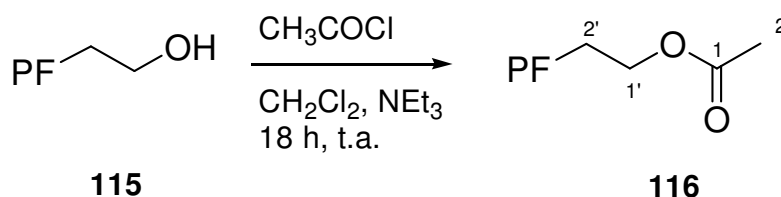


Schéma 32

Le composé **116** est obtenu quantitativement après purification par flash chromatographie sur colonne de silice (Ether/ Ether de pétrole : 50/50) puis identifié par RMN¹H.

A titre d'exemple nous avons fait figurer dans la figure 2.8 le spectre de RMN¹H du produit **116**. Nous observons à 2,00 ppm un singulet correspondant au CH₃ en 2 et un multiplet entre 2,25-2,45 ppm correspondant au CH₂ en 2' lié à la chaîne fluorée (Fig. 2.9). Le triplet à 4,38 ppm est attribué à l'autre CH₂ en position 1'. Nous retrouverons les signaux (1') et (2') dans tous les spectres des produits fluorés. Sur la figure 2.10 nous avons le spectre de RMN¹⁹F du même produit. Ce spectre de fluor réalisé en découplage total fait apparaître à -81,3 ppm un singulet -pic (a)-appartenant au CF₃ et entre -114,0 à 126,7 ppm les singulets du CF₂ (b-f). On peut noter pour le signal le plus déblindé (f) un couplage ³J_{F-H}. Ce profil de spectre fluoré est identique pour les autres produits avec la chaîne fluorée.

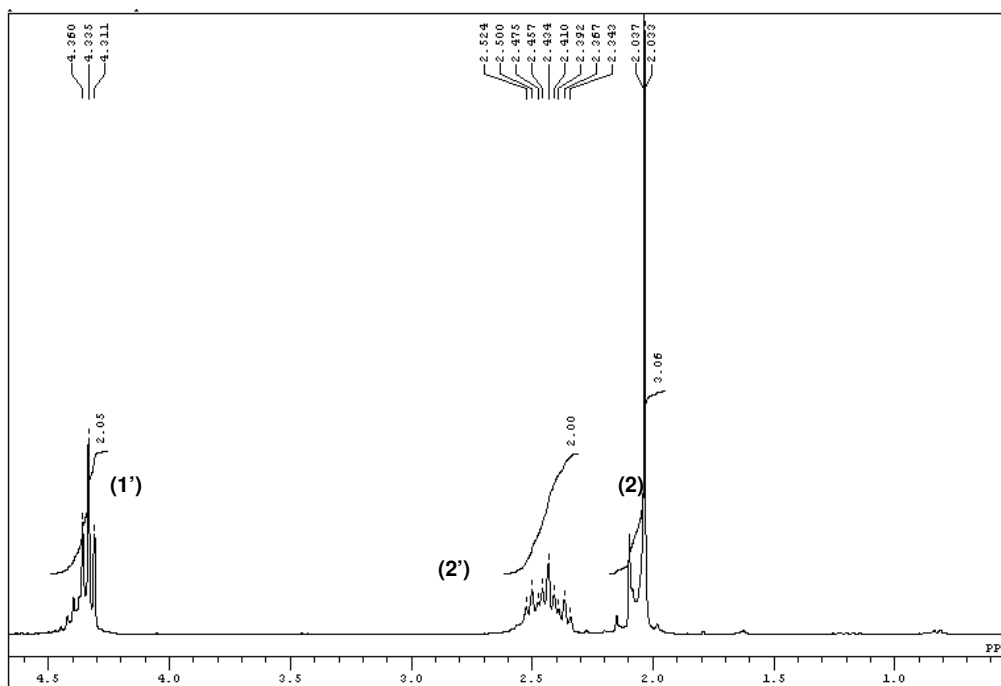


Figure 2.8 : RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) de l'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (116). Tétraméthylsilane (TMS) a été employé en tant que référence interne.

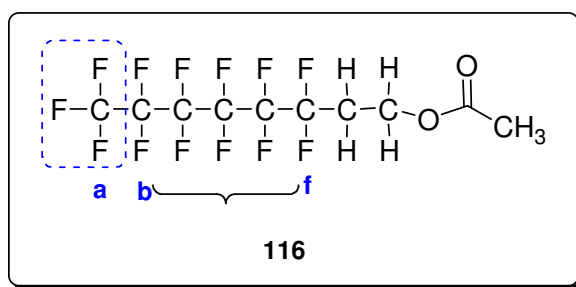


Figure 2.9 : L'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle avec la chaîne fluorée.

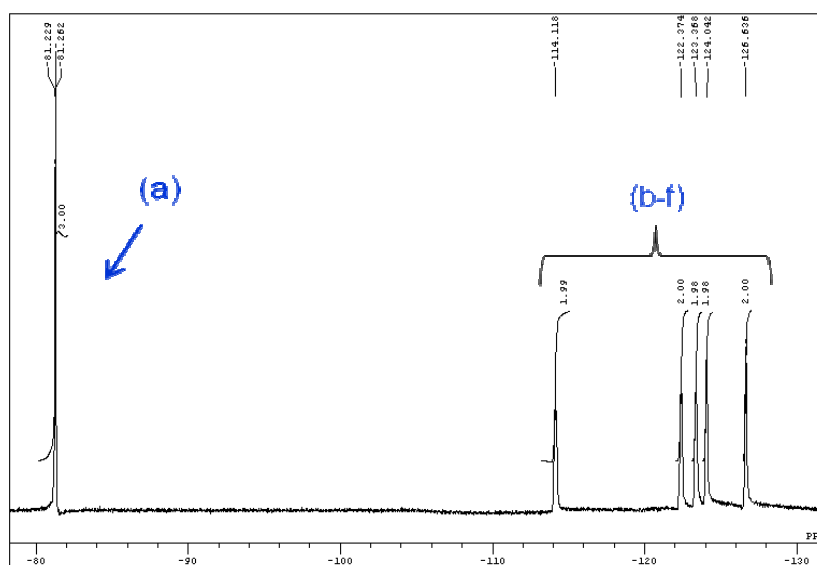


Figure 2.10 : RMN ^{19}F (254 MHz, CDCl_3) de l'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (**116**). Tétraméthylsilane (TMS) a été employé en tant que référence interne.

2.2. Aldolisation : accès au β -hydroxyester (**117**)

L'acroléine est condensée sur l'acétate précédemment formé (Schéma 33).

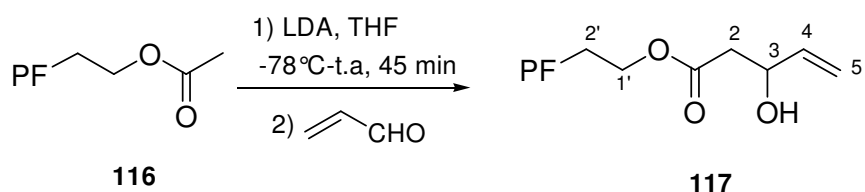


Schéma 33

Dans un premier temps l'énolate de lithium du composé **116** est obtenu par action du diisopropylamide de lithium (LDA). Ensuite l'addition de l'acroléine sur l'énolate généré permet la formation de **117** après hydrolyse.

Divers essais faisant varier les conditions réactionnelles (la température, la base et la durée), menés à partir de protocoles déjà décrits^{18,19} (Tab. 2.2) ont abouti aux conditions optimales correspondant à l'essai 3.

Tableau 2.2 : essais d'optimisation de la 2^{ème} étape sur support fluoré (aldolisation)

Essai	Base (1,2 Eq.)	Réactifs	Temp (°C)	Durée (h)	Rdt (%)
1	LDA	-	0 - t.a.	1	NR
2 (2x)	LDA	-	- 50 - t.a.	2	NR
3	LDA	-	- 78 - t.a.	1	70
4 (2x)	LDA	TMSCl	- 78 - t.a.	3	NR
5	LDA	HMPA	- 78 - t.a.	3	NR
6	LiHMDS	-	- 50 - t.a.	3	30
7	LiHMDS	-	- 50 - t.a.	3	64
8	LiHMDS	-	- 50 - t.a.	3	NR
9	LiHMDS	TMSCl	- 50 - t.a.	3	61

NR = no reaction

Lors des premiers essais (1 et 2), nous avons été confrontés à quelques difficultés : d'une part l'hydrolyse de l'ester conduisant à un dégreffage de la molécule du support fluoré, ceci est facilement vérifié par la présence de l'alcool fluoré de départ (CCM ou RMN ¹H) et d'autre part à une mauvaise reproductibilité. Ainsi il apparaît nécessaire de réaliser la réaction à -78 °C pendant 1 heure pour obtenir l'aldol avec un rendement de 70% (Essai 3).

Nous avons également testé un amidure plus encombré que le LDA, hexaméthylidisilylamidure de lithium (LHMDS) (Essais 6 à 9) ou l'emploi d'hexaméthylphosphoramide (HMPA) dans le milieu réactionnel (Essai 5) durant 3 heures sans améliorer le rendement.

Enfin l'ajout de chlorure de triméthylsilyle (TMSCl) pour stabiliser (ce n'est pas lui qui forme l'énoate) l'intermédiaire alcoolate formé n'a pas permis non plus un meilleur résultat et ceci quelle que soit la nature de la base (Essais 4 et 9).

La purification réalisée par FSPE nous a permis d'éliminer rapidement les impuretés et d'obtenir l'hydroxypenténoate **117** (Fig. 2.11 et 2.12).

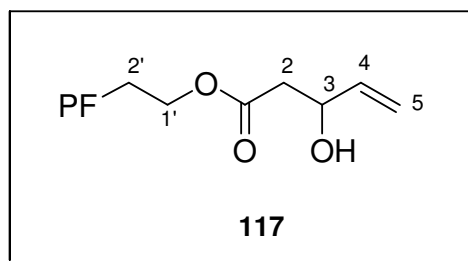


Figure 2.11 : l'hydroxypenténoate

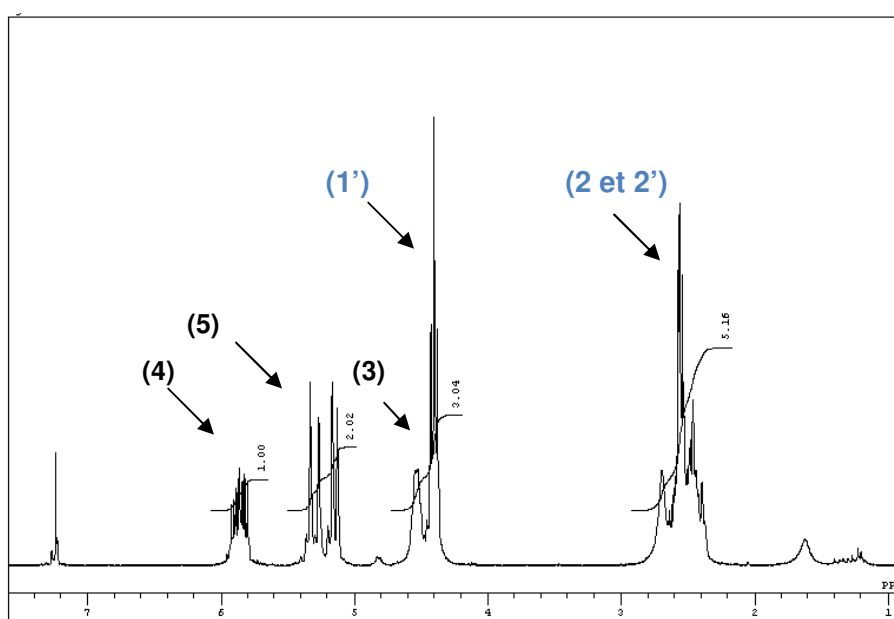


Figure 2.12 : RMN ^1H (254 MHz, CDCl_3) de β -hydroxyester (**117**)
Tétraméthylsilane (TMS) a été employé en tant que référence interne.

La figure 2.12 représente le spectre de RMN ^1H du produit **117**. Nous observons à 2,20-2,60 ppm un multiplet correspondant au CH_2 et CH_2 en **2** et **2'**, un triplet à 4,28 ppm correspondant au CH_2 en **1'** lié à la chaîne fluorée. Le multiplet entre 4,45-4,55 ppm correspondant au CH en **3** et le dd à 5,30 ppm ($J_{5a-H4} = 17,2$ Hz; $J_{H5a-H5b} = 10,5$ Hz) est attribué à l'autre CH_2 en position **5** et le ddd entre 5,78-5,95 ($J = 17,2; 10,5; 5,7$ Hz) ppm est attribué au CH en **4**.

Les problèmes inhérents à l'hydrolyse de l'ester et la mauvaise reproductibilité sont sans doute liés au caractère électroattracteur du support fluoré. Ceci a pu être vérifié en effectuant cette étape d'aldolisation dans les conditions classiques de la

chimie en solution. Dans ce cas nous avons utilisé l'acétate d'éthyle **119** comme substrat de départ (mimant l'ester fluoré) dans les conditions du protocole optimal (Essai 3 – Tab. 2.2). Nous avons obtenu le composé attendu **120** avec un rendement voisin de 95% et la réaction est reproductible (Schéma 34).

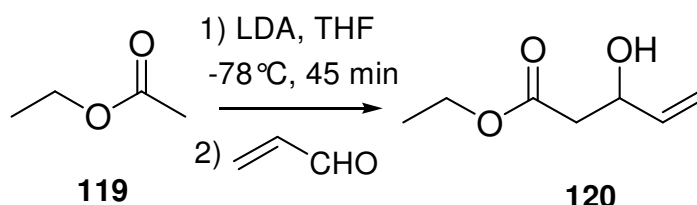


Schéma 34

2.3. Réaction de Heck

Cette étape permet l'introduction d'une première source de diversité (R^1) par l'utilisation de différents iodures d'aryles.

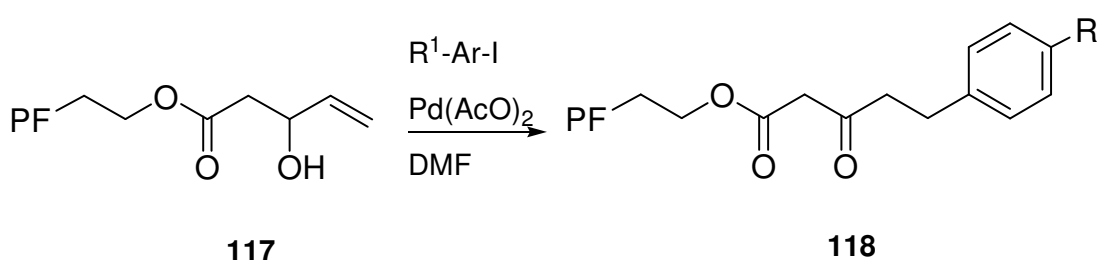


Schéma 35

La catalyse au palladium (0) permet, en présence d'un excès de base, de coupler un halogénure d'aryle avec une oléfine. Le cycle catalytique de la réaction de Heck est rappelé dans le schéma ci-après (Fig. 2.13). Il comporte l'addition oxydante de l'halogénure, l'insertion de l'oléfine et l'élimination (β -élimination) du produit. La catalyse au palladium (0) permet, en présence d'un excès de base, de coupler un halogénure d'aryle avec une oléfine.

Il est important de noter qu'au cours de la réaction, la bêta-élimination entraîne une tautomérie céto-énol aboutissant à la formation d'un β -cétoester nécessaire à la suite de la séquence (Schéma 36) (Fig. 2.13).

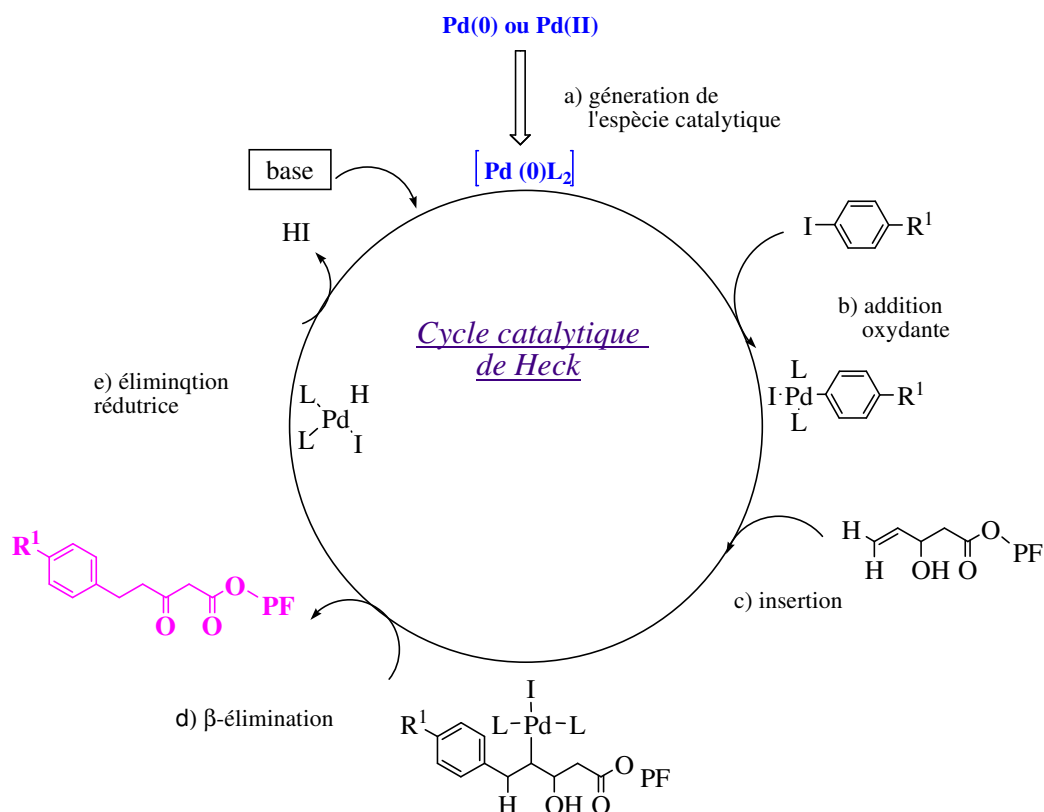


Figure 2.13 : Cycle catalytique sur la réaction de Heck

Dans un premier temps, nous avons recherché les conditions optimales avec l'iodobenzène. (1,1 Eq.). Nous avons ainsi étudié certains paramètres : nature de la base, présence de phosphine et température de la réaction (Tab. 2.3), en conservant une réaction à chaud catalysée par le palladium Pd(OAc)₂ durant 18 heures.

Tableau 2.3 : Essais réalisés sur la réaction de Heck

Essai	Base (1 Eq.)	Phosphine (1 Eq.)	Temp (°C)	R ^{dt} (%)
1	NaHCO ₃	-	50	65
2	NaHCO ₃	PPh ₃	50	-
3	NaHCO ₃	-	80	30
4	NEt ₃	-	50	52
5	NEt ₃	-	80	-

A la suite de ces essais nous avons retenu le protocole de l'essai 1 (diacétate de palladium sans phosphine, bicarbonate de sodium comme base, à 50 °C) qui aboutit à la formation du composé attendu **118** avec un bon rendement et en limitant le dégreffage.

La purification a été effectuée sur silice fluorée comme lors des étapes précédentes.

2.4. Aldolisation, cyclisation et clivage de δ -valérolactones sur support fluoré

La voie synthétique pour la formation du produit souhaité est inspirée sur le travail de Kashihara et al.²⁰ qui permet l'accès à un dérivé cyclisé en synthèse classique avec de bons rendements. Dans notre cas la stratégie pour accéder aux δ -valérolactones à partir de la molécule **118** met en jeu dans une première étape la formation d'un dianion de lithium en présence du LDA à basse température, ce dianion stabilisé sous la forme de diénolate réagit ensuite avec l'aldéhyde choisi. L'aldol obtenu se cyclise facilement en milieu acide induisant ensuite le clivage de la partie fluorée (Schéma 36).

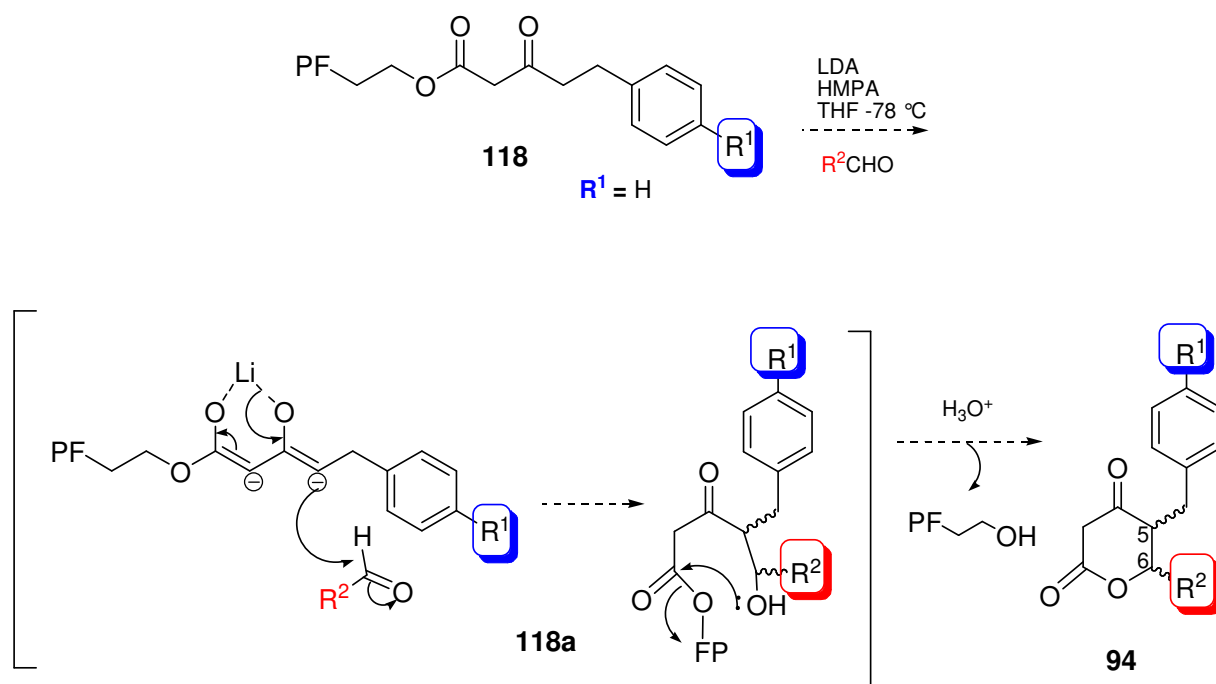


Schéma 36

La mise au point a été effectuée en menant différents essais en utilisant trois protocoles en milieu fortement basique (Tab. 2.4). Nous avons changé la nature de la base, la température et la durée de la réaction. A la suite de cette étude aucune condition n'a donné satisfaction. Le meilleur résultat est celui de l'essai 3 dans lequel seulement une faible quantité de produit (5%) a été mis en évidence en RMN 1H (présence d'un signal entre 5 et -6 ppm caractéristique du H6 des valérolactones).

Tableau 2.4 : essais réalisés pour la réaction d'aldolisation/cyclisation

Essai	Base (1 Eq.)	Temp (°C)	Temps (h)	Rdt (%)
1(5x)	LDA	0	5	-
2 (5x)	LDA	-78	4,5	-
3 (6x)	NaH / <i>n</i> -BuLi	-78	6	* 5 %

* produit non isolé

Les tentatives d'optimisation des différents paramètres ne nous ont jamais permis d'obtenir la lactone attendue en phase fluorée. La fragilité de la liaison au

support fluoré a empêché de garder le β -cétoester (produit de couplage Heck) sur le support, ce qui nous a incités à rechercher une autre alternative pour accéder aux δ -valérolactones 5,6-disubstituées.

3. Autres alternatives sur support fluoré

Nous avons envisagé une stratégie pour accéder directement au β -cétoester **118** fluoré (Fig. 2.14). Ainsi nous avons opté pour le protocole d'Izawa, *et al.*²¹ qui consiste à faire réagir dans un premier temps le benzaldéhyde sur le dicétène dans le CH_2Cl_2 à -78°C en présence du tétrachlorure de titane, puis le 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol à -20°C . Les conditions ont seulement permis d'isoler le composé **124** résultant de la réaction de l'alcool fluoré (FP-OH) avec le dicétène (Schéma 37).

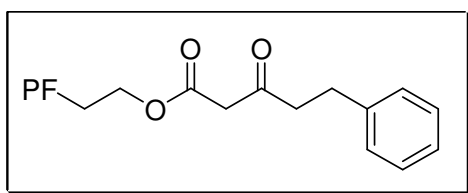


Figure 2.14 : β -cétoester fluoré (**118**)

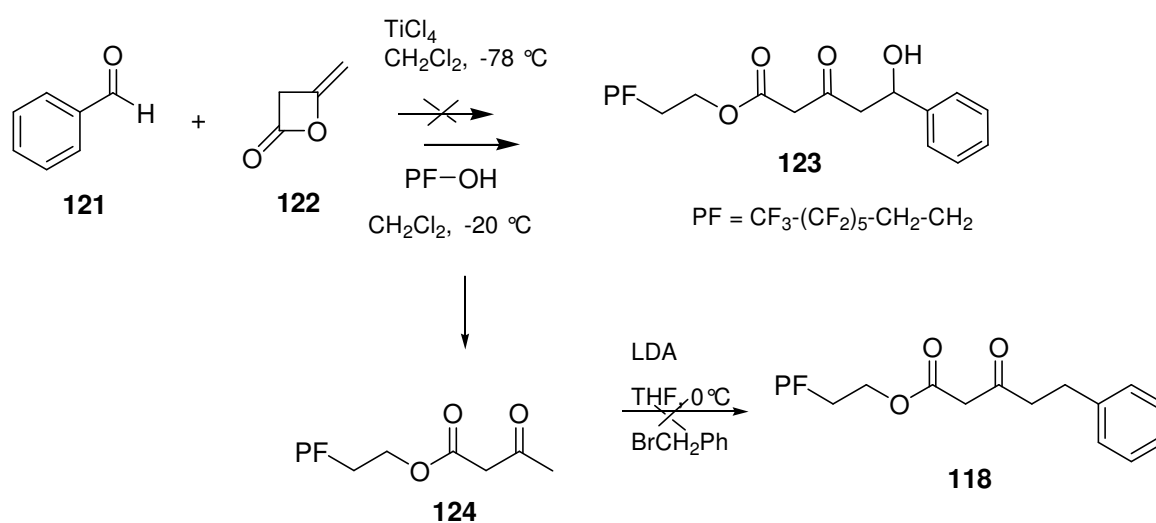


Schéma 37

Nous avons donc décidé de partir de l'alcool allylique **117** (Fig. 2.15) et d'effectuer la réaction de Heck pour obtenir l'intermédiaire suivant **118** pour l'accès aux valérolactones (Schéma 36).

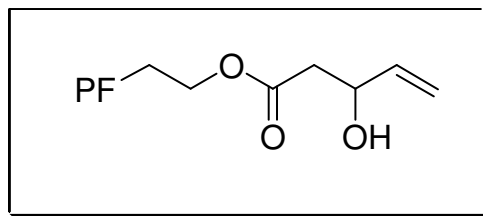


Figure 2.15 : l'alcool allylique (**117**)

Pour essayer les conditions, nous avons tenté la formation du produit bis(triméthylsilyl) énoil éther²² **126** sans le support fluoré. Le but était de passer après à la phase fluorée. Par contre, les conditions utilisées en chimie conventionnelle n'ont pas permis d'arriver au produit souhaité (Schéma 38).

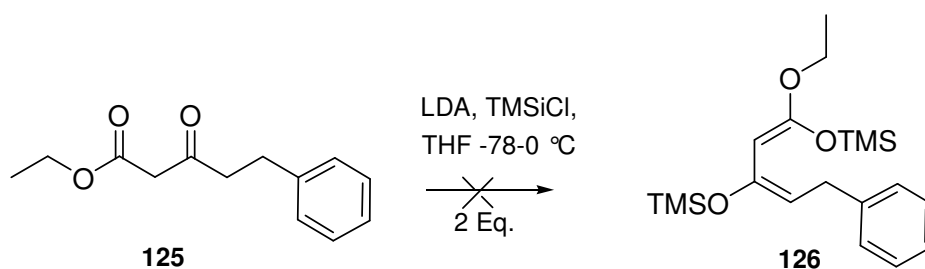


Schéma 38

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie du travail, mené en phase fluorée ouvre des possibilités pour l'extension à d'autres supports telles que les résines. En effet la séquence synthétique proposée en phase fluorée ne nous n'a jamais permis d'obtenir les valérolactones attendues dans des conditions satisfaisantes. Premièrement nous devons résoudre le problème d'hydrolyse observé lors d'étape **2** et de cyclisation de l'étape **4**, pour avoir le produit en quantité satisfaisante.

La séquence réactionnelle a été reprise dans un autre travail du laboratoire²³ à Rennes. Elle a permis de préparer une petite chimiothèque de 2,4-dihydropyrazol-3-ones **128** diversement substituées en 2 et en 5, potentiellement intéressantes dans le domaine de l'inflammation^{24,25} (Schème 39). Dans ce travail, la cyclisation a été réalisée sans problème entre l'ester **118** opposé à diverses hydrazines au reflux d'éthanol. Ce travail est en cours de rédaction pour soumis à publication.

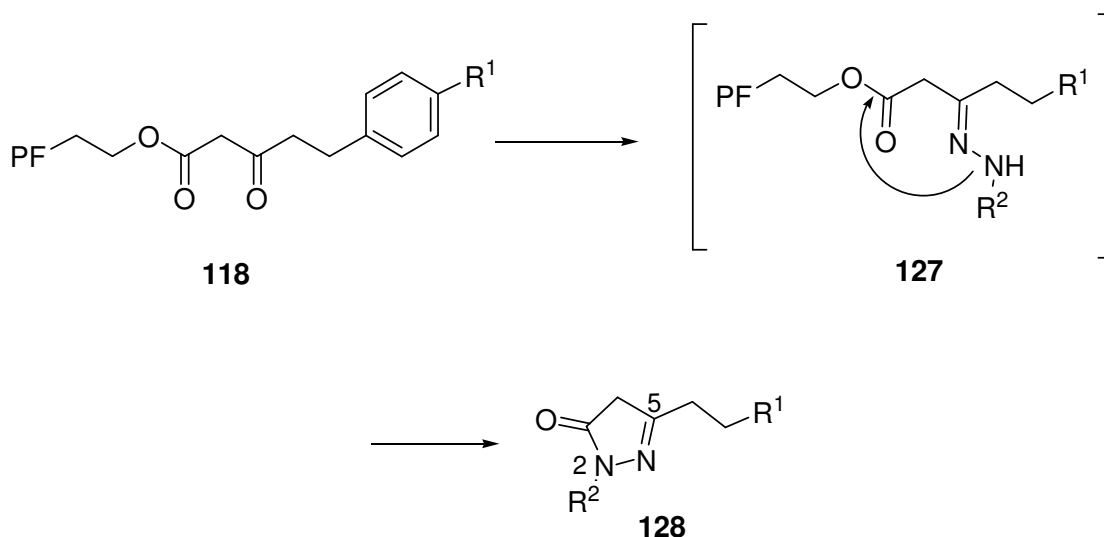


Schéma 39

La mise au point de cette synthèse sur support fluoré a nécessité un travail parallèle en chimie dite classique. Ainsi l'alcool allylique **120** a été choisi comme substrat équivalent de la molécule fluorée **117** pour valider la séquence réactionnelle.

Ces réactions ont fourni les composés désirés diversement substitués. Ces résultats mettent en évidence que la stratégie choisie permet de fournir les composés souhaités et que les problèmes seraient liés au support.

Parmi les explications possibles nous pensons que le problème provient surtout du changement de l'organisation supramoléculaire au moment de la formation de l'espèce intermédiaire lors de la déprotonation. En effet le diénolate intermédiaire à -78°C se trouve sous forme de gel (micelles) empêchant probablement l'approche de l'aldéhyde²⁶.

Afin de résoudre ce problème il serait peut-être judicieux de refaire l'étude de cette étape en milieu plus dilué ou en présence d'un solvant fluoré capable de casser cette organisation supramoléculaire.

Dans **les chapitres III et IV** de cette thèse seront décrites les stratégies synthétiques sans support pour arriver aux δ -valérolactones en solution.

4. Conclusions

La séquence synthétique planifiée a permis d'un point de vue méthodologique de développer les deux premières étapes de la séquence réactionnelle sur un support fluoré. Les conditions de la réaction d'aldolisation suivie de l'hétérocyclisation/clivage (dernière étape) semblent très difficiles à mettre au point et n'ont pas abouti au cycle attendu dans des conditions satisfaisantes.

Le travail a cependant été repris dans le cadre de la synthèse de pyrazolones pour laquelle l'étape de dégreffage a été réalisée dans des conditions plus douces préservant le cétoester.

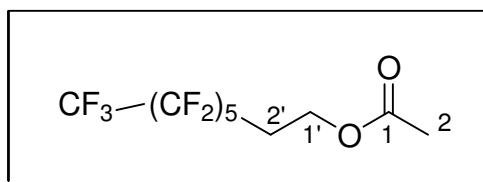
Le potentiel de la stratégie de départ a pu être démontré en chimie "classique" et est présenté dans **les chapitres III et IV**.

Cette technologie en support fluoré permet en outre de répondre à certaines exigences d'une chimie de plus en plus à vocation "écologique". Par rapport à la synthèse en phase liquide, le support fluoré permet de minimiser la quantité de solvant nécessaire tant au déroulement de la réaction qu'à la purification des produits, ainsi que de diminuer la quantité de réactifs par rapport à la synthèse sur support solide ou sur polymère soluble.

D'autre part, la synthèse sur support fluoré se présente donc comme une alternative de choix aux autres technologies de synthèse supportée, les rendements et les puretés sont en effet comparables voire supérieurs à ceux obtenus en phase solide. Cependant les problèmes d'aldolisation/cyclisation restaient à résoudre pour donner un rendement maximum et une bonne formation des produits attendus.

5. Données expérimentales du chapitre II : synthèse sur support fluorée

5.1. Synthèse de l'acétate de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (116)



Dans un ballon bicol de 250 mL nous avons introduit 95 mL de CH_2Cl_2 sous un courant d'azote, puis 5 g de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol (13,7 mmol, 1 éq.), 2,4 mL de Et_3N (16,4 mmol, 1,2 éq.) ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule et enfin 1,3 mL de chlorure d'acétyle (16,4 mmol, 1,2 éq.) dissous dans 5 mL de CH_2Cl_2 . Le courant d'azote est stoppé une fois l'addition terminée. Nous avons laissé sous agitation à température ambiante pendant 18 heures. Le brut réactionnel est lavé par 4 fois 30 mL d'eau. La phase aqueuse est alors lavée par 2 fois 30 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies et mises à sécher sur sulfate de sodium anhydre. Le solvant est enfin évaporé au rotavapor. Le produit 104 est purifié par chromatographie sur colonne de silice éther éthylique : EP (50:50).

Huile incolore (Rendement = 100%)

CCM : CH_2Cl_2 (100%) $R_f = 0,80$.

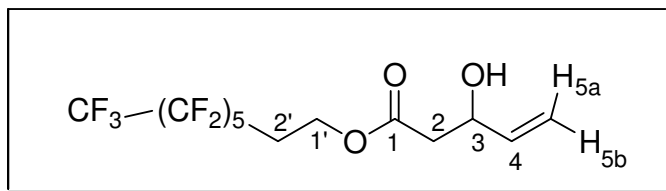
RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2,00 (3H, s, H_2); 2,25-2,45 (2H, m, H_2); 4,38 (2H, t, $\text{H}_{1'}$, $J = 6,8$ Hz).

RMN ^{13}C (67,5 MHz, CDCl_3): δ_{C} 20,7 (C_2); 30,5 ($\text{C}_{2'}$, $^2J_{\text{C}_{2'-\text{F}}} = 22$ Hz); 56,3 ($\text{C}_{1'}$); 170,6 (C_1).

RMN ^{19}F (254 MHz, CDCl_3): δ_{F} -81,3 (3F); -114,2 (2F); -122,4 (2F); -123,4 (2F); -124,1 (2F); -126,7 (2F).

IRTF: 1145 à 1234 (CF), 1369 (-OC-), 1751 (-OCO-).

SMHR: M^+ $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_2\text{F}_{13}$, masse calculée 406.02385, masse trouvée 406.0249.

5.2. Synthèse du β -hydroxyester α,β insaturés (117)

Nous avons introduit 50 mL de THF anhydre dans un ballon de 100 mL. Ensuite nous avons préparé *in situ* la base LDA dans un bain à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec 0,8 mL de diisoprylamine (5,4 mmol, 1,1 éq.) et 3,4 mL de *n*-butyllitium (5,4 mmol, 1,1 éq.). Après 45 min nous avons ajouté 2 g d'acétate de perfluorooctyle (5,0 mmol, 1 éq.). Nous avons ensuite laissé réagir 45 min avant d'ajouter 0,5 mL d'acroléine (7,5 mmol, 1,5 éq.). Nous avons laissé réagir à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 3 heures supplémentaires avant de stopper et d'effectuer l'hydrolyse. Le produit brut est extrait à l'éther, puis séché sur sulfate de sodium anhydre. Le solvant est enfin évaporé au rotavapor. Le produit **X** est purifié selon le protocole général de F-SPE.

Huile jaune (Rendement = 70%)

CCM: CH_2Cl_2 : AcOEt (90 : 10) $R_f = 0,40$.

RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2,20-2,60 (4H, m, H_2 et $\text{H}_{2'}$); 4,28 (2H, t, $\text{H}_{1'}$, $J = 6,5$ Hz); 4,45-4,55 (1H, m, H_3); 5,30 (2H, dd, H_5 , $J_{5a-H_4} = 17,2$ Hz; $J_{H_{5a}-H_{5b}} = 10,5$ Hz); 5,78-5,95 (1H, ddd, H_4 , $J = 17,2$; 10,5; 5,7 Hz).

RMN ^{13}C (67,8 MHz, CDCl_3): δ_{C} 30,5 ($\text{C}_{2'}$, t, $^2J_{\text{C}_{2'-\text{F}}} = 22$ Hz); 41,1 (C_2); 56,6 ($\text{C}_{1'}$); 68,9 (C_3); 115,7 (C_5); 138,6 (C_4); 171,6 (C_1).

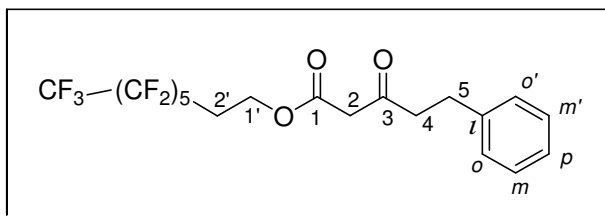
^{19}F (254 MHz, CDCl_3): δ_{F} -81,3 (3F), -114,2 (2F), -122,4 (2F), -123,4 (2F), -124,1 (2F), -126,7 (2F).

IRTF: 1144 à 1236 (CF), 1740 (-OCO-), 3435 (-OH).

5.2.1. Procédure générale pour la purification des composés par FSPE (Fluorous Solid Phase Extraction)

Le brut réactionnel à purifier sur silice fluorée est dilué dans le solvant fluorophobe (MeOH/H₂O: 80/20) et déposé sur une cartouche contenant 3 g de silice fluorée (au préalable pré conditionnée dans ce même solvant). Les composés organiques non fluorés sont élués sous vide par 2 fois 10 mL de solvant fluorophobe. La cartouche est ensuite nettoyée avant d'éluer les composés organiques fluorés par 2 fois 10 mL de solvant (Et₂O ou CH₂Cl₂). La cartouche de silice fluorée est ensuite lavée au méthanol puis à l'éther diéthylique pour permettre sa réutilisation. La même cartouche peut ainsi être réutilisée une dizaine de fois. Pour une grande quantité de produit (> 300 mg), l'ensemble du produit est dilué dans le solvant fluorophobe, puis la purification est effectuée de manière fractionnée sur la même cartouche de silice fluorée.

5.3. Synthèse du produit de Heck (118)



Nous avons introduit dans un ballon de 25 mL sous azote 300 mg du produit **105** (0,6 mmol, 1,0 éq.) et 4 mL de DMF anhydre. Puis nous avons ajouté 110 mg de NaHCO₃ (1,2 mmol, 2,0 éq.), 420 mg de NBu₄Br (1,2 mmol, 2,0 éq.) et 134,6 mg de iodure de phényle (0,7 mmol, 1,1 éq.). Nous avons fait buller la solution avec un courant d'azote avant d'ajouter le diacétate de palladium Pd(Ac)₂ (0,03 mmol, 0,05 éq.). Nous avons laissé réagir 18 h à 50 °C. À l'issue de la réaction, nous avons alors ajouté 25 mL d'eau avant d'extraire par 4 fois 10 mL de CH₂Cl₂. Puis le résidu est repris par 25 mL d'eau et on réextrait par 4 fois 15 mL d'éther. La phase étherée est mise à sécher sur Na₂SO₄. Le solvant est évaporé. Le produit **106** est purifié par F-SPE.

Huile jaune (Rendement = 65%)

RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2,38-2,50 (2H, m, H_2); 2,83-2,91 (4H, m, H_4 et H_5); 3,43 (2H, s, H_2); 4,40 (2H, t, H_1 , $J = 6,4$ Hz); 7,15-7,27 (5H, m, H_{arom}).

RMN ^{13}C (67,8 MHz, CDCl_3): δ_{C} 29,4 (C_2); 30,4 (C_2 , $^2J_{\text{C}_2\text{-F}} = 22$ Hz); 44,6 (C_5); 49 (C_4); 57,1 (C_1); 126,3 (C_p); 128,4 ($\text{C}_{\text{o,o',m,m'}}$); 140,4 (C_l); 166,6 (C_1); 201,2 (C_3).

RMN ^{19}F (67,8 MHz, CDCl_3): δ_{F} -81,2 (F3); -114,12 (F2); -122,4 (F2); -123,4 (F2); -124 (F2), -126,6 (F2).

IRTF: 698 et 746 (Arom monosubstituée), 1144 à 1235 (CF); 1751 (-OCO-); 1719 (-CO-).

SMHR: M^+ ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{F}_{13}$); masse calculée 538,0814, masse trouvée 538,0814.

6. Bibliographie

1. (a) CURRAN D.P. "Organic synthesis with light fluororous reagents, reactants, catalysts, and scavengers." *Aldrichimica ACTA*. **2006**, 39, 3-9. (b) ZHANG, W. "Fluorous synthesis of heterocyclic systems." *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2531-2556. (c) CURRAN, D.P. "Fluorous methods for synthesis and separation of organic molecules." *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1649-1653. (d) BARTHEL-ROSA, L.P. "Chemistry in fluororous media: a user's guide to practical considerations in the application of fluororous catalysts and reagents." *Coordin. Chem. Rev.* **1999**, 190-192, 587-605.
- 2.(a) HORVÁTH, I.T.; RÁBAI, J. Facile Catalyst Separation Without Water: Fluorous Biphasic Hydroformylation. *Science*. **1994**, 72-75. (b) HOPE, E.G ; STUART, A.M. Fluorous biphasic catalysis. *J. Fluor. Chem.* **1999**, 100, 75-83.
3. CURRAN, D.P. ; Hoshino, M. Stille couplings with fluororous tin reactants : Attractive features for preparative organic synthesis and liquid-phase combinatorial synthesis. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6480-6481.
4. STUDER, A.; HADIDA, S.; FERRITTO, R.; KIM, S.Y.; JEGER, P.; WIPF, P.; CURRAN, D.P. Fluorous synthesis : a fluororous-phase strategy for improving separation efficiency in organic synthesis. *Science*. **1997**, 275, 823-826.
5. CURRAN, D.P. Parallel synthesis with fluororous reagents and reactants. *Med. Res. Rev.* **1999**, 19, 432-438.
6. (a) STUDER, A.; JEGER, P.; WIPF, P ; CURRAN, D.P. Fluorous synthesis : fluororous protocols for the Ugi and Biginelli multicomponent condensations. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2917-2924. (b) Studer, A. ; Curran, D. P. A strategic alternative to solid phase synthesis : Preparation of a small isoxazoline library by fluororous synthesis. *Tetrahedron*. **1997**, 53, 6681-6696.
7. LARHED, M.; HOSHINO, M.; HADIDA, S.; CURRAN, D.; HALLBERG, A. Rapid fluororous stille coupling reactions conducted under microwave irradiation. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5583-5587.
8. CURRAN D. P. Fluorous reverse phase silica gel. A new tool for preparative separations in synthetic organic and organofluorine chemistry. *Synlett*. **2001**, 9, 1488-1496.
9. ZHANG, W. Fluorous technologies for solution-phase highthroughput organic synthesis. *Tetrahedron*. **2003**, 59, 4475-4489.
10. (a) NAGASHIMA, T.; ZHANG, W. Solution-phase parallel synthesis of an N-alkylated dihydropteridinone library from fluororous amino acids. *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 942-949. (b) VILLARD A.L.; WARRINGTON, B.H.; LADLOW, M.A fluororous-tagged, acid-labile protecting group for the synthesis of carboxamides and sulfonamides. *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 611-622. (c) WILCOX, C.S.; GUDIPATI, V.; LU, H.; TURKYILMAZ, S.; CURRAN D.P. Solution-phase mixture synthesis with double-separation tagging : Double demixing of a single mixture provides a stereoisomer library of 16 individual murisolin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6938-6940. (d) LU, Y.; ZHANG, W. Fluorous parallel synthesis of a hydantointhiohydantoin library. *Mol. Divers.* **2005**, 9, 91-98. (e) CURRAN, D.P.; MOURA-

LETTS, G.; POHLMAN, M. Solution-phase mixture synthesis with fluorous tagging en route : Total synthesis of an eight-member stereoisomer library of passifloricins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2423-2426.

11. CHU, Q.; HENRY, C.; CURRAN, D. Second-Generation tags for Fluorous Chemistry exemplified with a new Fluorous Mitsunobu reagent. *Org. Lett.* **2008**, 10, 5, 749-752.

12. LE LAMER, A-C.; GOUAULT, N.; DAVID, M.; BOUSTIE, J.; URIAC, P. Method for the Parallel Synthesis of α -Methylene- γ -lactones from a Fluorous Acrylate. *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 643-645.

13. HORTHANT, D.; LE LAMER, A-C.; BOUTIE, J.; URIAC, P.; GOUAULT, N. Separation of a mixture of paraconic acids from *Cetraria islandica* (L.) Ach. Employing a fluorous tag-cath and release strategy. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 6031-6033.

14. LAWRENCE S.A. *Amines: Synthesis, properties and applications*, Cambridge University: Cambridge, **2004**. 376 p.

15. KAN, T.; FUKUYAMA, T. *Ns strategies: a highly versatile synthetic method for amines*. *Chem. Commun.* **2004**, 353.

16. BASLÉ, E.; JEAN, M.; GOUAULT, N.; RENAULT, J.; URIAC, P. "Fluorous scavenger for parallel preparation of tertiary sulfonamides leading to secondary amines". *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 8138-8140.

17. (a) AMARAL, P.A. **Síntese de derivados de kavalactonas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 108 p. (b)) AMARAL, P.A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V. L. Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. *Rev. Bras. Ciên. Farm.* **2003**, 39, 4, 351-363.

18. EAMES, J.; KHANOM, H. investigation into the use of poyfluoro octanol as an auxiliary component for an aldol reaction. *Molecules.* **2004**, 9, 266-277.

19. ZIBUCK, R.; STREIBER, J.M. A New preparation of ethyl 3-oxo-4-pentenoate: a useful annelating agent. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4717-4719.

20. KASHIHARA, H.; SHINOKI, H.; HIROSHI, S.; KIYOSHI, S. Novel Synthesis of Indan Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 4527-4532.

21. IZAWA, T.; MUCKAIYAMA, T. A Convenient method for the preparation of δ -hidroxy- β -ketoesters and 6-alkyl-5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone. Application to the syntheses of kawain and dihydrokawain. *Chem Lett.* **1975**, 161-164.

22. MOLANDER, G.A.J.; CAMERON, K.O. Neighboring Group Participation in Lewis Acid-Promoted [3 + 4] and [3 + 5] Annulations. The Synthesis of Oxabicyclo [3.η.1]alkan-3-ones. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 830-846.

23. CARIOU, A. "Synthèse sur support fluoré de 2,4-dihydropyrazol-3-ones diversement substituées en 2 et en 5". Master 2 Mention Chimie (Spécialité Chimie Moléculaire), Université de Rennes1, **2006**

24. GOUAULT, N. "Mise au point de nouvelles méthodes de synthèse de lactones et de 4,5-dihydro-3(2H)-pyridazin-3-ones sur support solide : évaluation de leur activité biologique".

Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Chimie. Rennes : Université de Rennes1, **2002**, 174.

25. GOUAULT N.; CUPIF, J.F.; MARTIN-CHOULY, C.; DEPINCE, A.; BELLEGUIC, C.; DAVID M. "Synthesis and potential Anti-Inflammatory Activity of some Tetrahydrophthalazinones". *J. Enz. Inhib. Med Chem.* **2004**, 19, 6, 475-480.

26. PREHM, M.; LIU, F.; BAUMEISTER, U. ZENG, X.; UNGAR, G. TSCHERSKE, C. The Giant-Hexagon Cylinder Network—A Liquid-Crystalline Organization Formed by a T-Shaped Quaternary Amphiphile. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7972 –7975.

**CHAPITRE III – *TOWARDS SYNTHESIS OF
KAVALACTONES DERIVATIVES***

Supplementary data

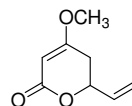
General Experimental Procedures. Microwave-assisted reactions were carried out in a Synthewave 402 Prolabo Power 600 W. HPLC analyses were performed on a Waters instrument connected to a UV 996 photodiode array detector with a column (Kromasil 100 A SI 10 μm 250 x 4.6 mm). Elution of δ -valerolactones was achieved at a flow rate of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ at room temperature: Hexane/EtOAc 55/45. HPLC purity was given as area percentages at 220 nm. Chromatographic purifications were carried out using silica gel 60 PF₂₅₄ for preparative layer chromatography. Melting points were determined on a System Kofler type WME apparatus and were not changed. IR spectra were run on a Perkin-Elmer Spectrum 16 PC spectrometer; only selected absorbances are quoted. Nuclear magnetic resonance spectra (¹H NMR and ¹³C NMR) were recorded on a Jeol GSX 270 WB at 270 MHz and 67.5 MHz, respectively. Chemical shifts (δ values) are given in parts per million downfield from tetramethylsilane as the internal standard. HRMS (EI) measurements were recorded on a Varian MAT 311 mass spectrometer at the Centre Régional de Mesures Physique de l'Ouest, Rennes (France).

General procedure for the preparation of pyrones 3 and 5

To a cold (0 °C) solution of diisopropylamine (2.60 mL, 18.5 mmol) in THF (35 mL) under argon was added *n*-butyllithium (7.40 mL, 18.5 mmol, 2.5 M in hexane) and the reaction mixture stirred 45 min at 0 °C. Ethyl acetoacetate (1.00 mL, 7.7 mmol) was added dropwise (20 min) at 0 °C and then, freshly distilled acrolein (0.55 mL, 8.5 mmol) or (*Z*) iodo acrolein prepared ¹²(1.55 g, 8.5 mmol) was slowly added and the reaction mixture stirred 20 min at 0 °C. After addition of cold water (100 mL), the mixture was left to stand at room temperature for 1 h. The crude mixture was extracted with Et₂O (60 mL) and the aqueous layer acidified with hydrochloric acid (pH = 1) at 0 °C. The oil was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered, and evaporated *in vacuo*. Powdered anhydrous K₂CO₃ (1.97 g 14.3 mmol) and Me₂SO₄ (1.35 mL, 14.3 mmol) were added to a solution of 4-hydroxy-6-vinyl-5,6-dihdropyran-2-one (1.00 g, 7.1 mmol) or 4-hydroxy-6-(2-iodovinyl)-5,6-dihdropyran-2-one (1.90 g, 3.7 mmol) in freshly distilled acetone (20 mL). The suspension was stirred overnight at room temperature. The reaction was diluted with EtOAc (60 mL) and washed with 0.5 M HCl (60 mL). The aqueous layer was extracted with

EtOAc (2 x 30 mL), the combined organic layers were washed with saturated sodium chloride, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The products **3** or **5** were purified by flash chromatography. (Eluent = 0 to 50% EtOAc in cyclohexane)

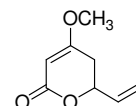
4-methoxy-6-vinyl-5,6-dihydropyran-2-one (3) :



572 mg (52% yield) isolated yellow viscous oil

¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.53 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.86-4.93 (m, 1H), 5.17 (s, 1H), 5.30 (dd, 1H, *J*=10.5, 1.1 Hz), 5.42 (dd, 1H, *J*=17.6, 1.1 Hz), 5.88-6.01 (m, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 32.7 (CH₂), 56.0 (CH₃), 75.7 (CH), 90.4 (CH), 118.0 (CH₂), 135.0 (CH), 166.6 (C), 172.1 (C). FT-IR ZnSe crystal (cm⁻¹): 1706, 1622. HMRS (EI) calcd for [M-CO₂]⁺ (C₇H₁₀O): 110.0732; found: 110.0738.

(Z) 4-methoxy-6-(2-iodovinyl)-5,6-dihydropyran-2-one (5):



420 mg (40% yield) isolated orange viscous oil

¹H NMR (C₆D₆, 270 MHz): 1.87 (ddd, 1H, *J*=16.9, 10.8, 1.3 Hz), 2.04 (dd, 1H, *J*=16.9, 4.6 Hz), 2.80 (s, 3H), 4.85-4.94 (m, 1H), 4.89 (d, 1H, *J*=1.5 Hz), 5.80 (dd, 1H, *J*=7.9, 1.0 Hz), 5.94 (dd, 1H, *J*=7.6 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 31.2 (CH₂), 56.1 (CH₃), 78.2 (CH), 84.9 (CH), 90.5 (CH), 137.9 (CH), 166.1 (CO), 171.9 (C). FT-IR, ZnSe crystal (cm⁻¹): 1704, 1621.

General procedure for microwave-accelerated Heck cross-coupling reaction (4a-d).

Aryl iodides (2 Eq, 1.3 mmol), lactone **3** (100 mg, 0.6 mmol), Hünig's base (220 μL, 1.3 mmol), palladium catalyst (5 or 10 mol %) and DMF (2 mL) were combined in a 10 mL microwave tube. The mixture was stirred and irradiated by microwave (300 W) from 4 to 8 min. The reaction mixture was filtered through Celite® and the filtrate was diluted with water and ethyl acetate. The organic layer was extracted, dried (Na₂SO₄) and removed. The product was purified by chromatography preparative plates (EtOAc/Cyclohexane 1:1)

Under conventional thermal heating conditions reaction was stirred at 80 °C for 16 h. The reaction mixture was treated with the same general procedure as microwave.

(E)-6-(4-methoxystyryl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (4a):

42 mg (50% yield) isolated as a white solid. mp=108-112 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.62 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.85 (s, 3H),

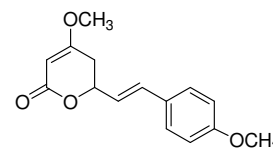
4.95-5.08 (m, 1H), 5.11 (s, 1H), 6.12 (dd, 1H, *J*=15.7, 6.5 Hz), 6.68 (d, 1H, *J*=15.7 Hz), 6.86

(d, 2H, *J*=8.6 Hz), 7.33 (d, 2H, *J*=8.6 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 33.4 (CH₂), 55.3

(OCH₃), 56.0 (OCH₃), 76.2 (CH), 90.6 (CH), 114.1 (2xCH), 123.3 (CH), 128.0 (2xCH), 128.5

(C), 133.0 (CH), 160.0 (C), 166.8 (C), 172.3 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1708, 1625.

HMRS (EI) calcd for M⁺ (C₁₅H₁₆O₄): 260.1049, found: 260.1050.

**(E)-4-methoxy-6-styryl-5,6-dihydropyran-2-one (4b):**

50 mg (40% yield) isolated as a pale white solid. mp=141-143 °C.

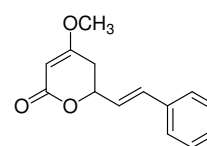
¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.52 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 4.93-5.01 (m, 1H), 5.11 (s, 1H),

6.16 (dd, 1H, *J*=16.0, 6.3 Hz), 6.64 (d, 1H, *J*=16.0 Hz), 7.15-7.32 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃,

67.5 MHz): 33.0 (CH₂), 56.0 (OCH₃), 76.0 (CH), 90.5 (CH), 125.5 (CH), 126.7 (2xCH),

128.3 (CH), 128.7 (2xCH), 133.4 (CH), 135.7 (C), 166.7 (C), 172.3 (C). FT-IR, KBr pellets

(cm⁻¹): 1713, 1625. HMRS (EI) calcd for M⁺ (C₁₄H₁₄O₃): 230.0943, found: 230.0935.

**(E)-6-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)vinyl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (4c):**

75 mg (42% yield) isolated as an orange solid. mp=129-131 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.62 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 5.00-5.07 (m, 1H), 5.19 (s, 1H),

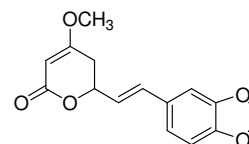
5.97 (s, 2H), 6.08 (dd, 1H, *J*=15.9, 6.5 Hz), 6.64 (d, 1H, *J*=15.9 Hz), 6.85 (m, 2H), 6.92 (s,

1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 33.2 (CH₂), 56.0 (OCH₃), 75.9 (CH), 90.4 (CH), 101.2

(CH₂), 105.7 (CH), 108.2 (CH), 121.6 (CH), 123.6 (CH), 130.1 (C), 132.8 (CH), 147.7 (C),

148.0 (C), 166.6 (C), 172.2 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1706, 1623, 1249, 1221, 825, 800.

HMRS (EI) calcd for M⁺ (C₁₅H₁₄O₅): 274.0841, found: 274.0853.

**(E)-6-(4-fluorostyryl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (4d):**

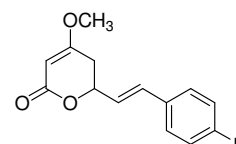
32 mg (40% yield) isolated as an orange solid. mp=187-189 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.62 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 5.01-5.09 (m, 1H), 5.20 (s, 1H), 6.19

(dd, 1H, *J*=15.6, 6.2 Hz), 6.71 (d, 1H, *J*=15.6 Hz), 7.02 (t, 2H, *J*=8.6 Hz), 7.36 (dd, 2H, *J*=8.9,

5.7 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 33.4 (CH₂), 56.1 (OCH₃), 75.7 (CH), 90.6 (CH),

115.6 (2xCH, ²*J*_{CF}=21.8 Hz), 125.3 (CH), 128.3 (2xCH, ³*J*_{CF}=8.4 Hz), 128.7 (CH), 132.0 (C),

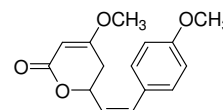


162.6 (C, $^1J_{CF}=247$ Hz), 166.6 (C), 172.2 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1702, 1622. HMRS (EI) calcd for M^{+} ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{F}$): 248.0849, found: 248.0859.

General procedure for Suzuki- Miyaura cross-coupling reaction (4a, 4b et 4e).

To a solution of pyrone **5** (100 mg, 0.36 mmol) and arylboronic acid (1.5 Eq., 0.54 mmol) in degassed toluene (3 mL) under an argon flow, were successively added K_3PO_4 (153 mg, 0.72 mmol), S-Phos 13 (15 mg, 0.036 mmol) and $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4 mg, 0.018 mmol). The mixture was stirred at 80 °C for 20 h. The reaction mixture was allowed to cool down and was poured into a mixture of 10 mL H_2O and 10 mL EtOAc. The aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane 1:1).to afford a mixture of separable diastereoisomers.

(Z)-6-(4-methoxystyryl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (4a):

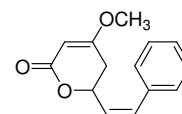


22 mg (24 % yield) isolated as a pale yellow oil

^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.44 (dd, 1H, $J=17.0$, 3.7 Hz), 2.65 (dd, 1H, $J=17.0$, 10.9 Hz), 3.74 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 5.21-5.28 (m, 1H), 5.17 (s, 1H), 5.72 (dd, 1H, $J=10.2$ Hz), 6.71 (d, 1H, $J=11.3$ Hz), 6.89 (d, 2H, $J=7.9$ Hz), 7.25 (d, 2H, $J=7.9$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 33.3 (CH_2), 55.3 (OCH_3), 56.1 (OCH_3), 72.2 (CH), 90.6 (CH), 114.0 (2xCH), 126.2 (CH), 130.1 (2xCH), 128.2 (C), 134.8 (CH), 159.4 (C), 166.8 (C), 172.3 (C). FT-IR, crystal ZnSe (cm^{-1}): 1703, 1623. HMRS (EI) calcd for M^{+} ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$): 260.1049, found: 260.1050.

(Z)-4-methoxy-6-styryl-5,6-dihydropyran-2-one (4b):

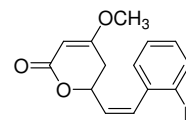
10 mg (12 % yield) isolated as a white solid. mp= 86-88 °C.



^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.43 (dd, 1H, $J=17.2$, 4.2 Hz), 2.65 (dd, 1H, $J=17.2$, 11.0 Hz), 3.74 (s, 3H), 5.16 (s, 1H), 5.20-5.29 (m, 1H), 5.82 (dd, 1H, $J=11.5$, 9.4 Hz), 6.78 (d, 1H, $J=11.5$ Hz), 7.26-7.39 (m, 5H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 33.3 (CH_2), 56.1 (OCH_3), 72.1 (CH), 90.6 (CH), 127.7 (CH), 127.9 (CH), 128.6 (2xCH), 128.7 (2xCH), 135.0 (CH), 135.7 (C), 166.7 (C), 172.2 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1708, 1623. HMRS (EI) calcd for M^{+} ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$): 230.0943, found: 230.0935.

(Z)-6-(2-fluorostyryl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (4e):

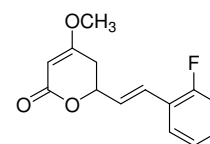
49 mg (55 % yield) isolated as a pale yellow oil.



^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.45 (dd, 1H, $J=17.0$, 3.7 Hz), 2.65 (dd, 1H, $J=17.0$, 11.0 Hz), 3.74 (s, 3H), 5.09-5.13 (m, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.94 (dd, 1H, $J=10.2$ Hz), 6.76 (d, 1H, $J=11.5$ Hz), 7.04-7.17 (m, 2H), 7.27-7.37 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 32.9 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 72.3 (CH), 90.5 (CH), 115.6 (CH, $^2J_{\text{CF}}=21.8$ Hz), 123.3 (C, $^2J_{\text{CF}}=15.1$ Hz), 124.2 (CH, $^3J_{\text{CF}}=3.3$ Hz), 127.8 (CH, $^3J_{\text{CF}}=2.2$ Hz), 129.7 (CH), 129.9 (CH, $^3J_{\text{CF}}=7.8$ Hz), 130.6 (CH), 160.0 (C, $^1J_{\text{CF}}=247.5$ Hz), 166.6 (C), 172.3 (C). FT-IR, crystal ZnSe (cm^{-1}): 1709, 1624. HMRS (EI) calcd fo $\text{M}^{+\bullet}$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{F}$): 248.0849, found: 248.0859.

(E)-6-(2-fluorostyryl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (4e):

16 mg (18% yield) isolated as a pale yellow oil.

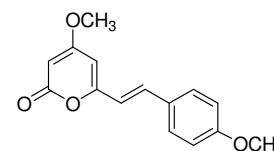


^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.56 (dd, 1H, $J=16.9$, 4.1 Hz), 2.70 (dd, 1H, $J=16.9$, 11.1 Hz), 3.78 (s, 3H), 5.06-5.10 (m, 1H), 5.21 (s, 1H), 6.38 (dd, 1H, $J=16.1$ Hz, 5.9 Hz), 6.88 (d, 1H, $J=16.1$ Hz), 7.02-7.15 (m, 2H), 7.22-7.48 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 33.3 (CH_2), 56.1 (OCH_3), 76.0 (CH), 90.6 (CH), 115.9 (CH, $^2J_{\text{CF}}=19.5$ Hz), 123.6 (C, $^2J_{\text{CF}}=12.3$ Hz), 125.9 (CH, $^3J_{\text{CF}}=2.2$ Hz), 127.9 (CH, $^3J_{\text{CF}}=2.8$ Hz), 128.2 (CH, $^3J_{\text{CF}}=5.6$ Hz), 129.6 (CH), 129.7 (CH), 160.5 (C, $^1J_{\text{CF}}=250.3$ Hz), 166.6 (C), 172.3 (C). FT-IR, crystal ZnSe (cm^{-1}): 1707, 1622. HMRS (EI) calcd fo $\text{M}^{+\bullet}$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{F}$): 248.0849, found: 248.0859.

Oxidation 4a and 4b. DDQ (1.2 Eq, 0.53 mmol) was added to a solution of δ -valerolactone (0.44 mmol) in anhydrous benzene (5 mL). The reaction mixture was heated to reflux for 2 hours, filtered through celite® and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel with cyclohexane-EtOAc 50/50.

(E)-6-(4-methoxystyryl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one (1) (Yangonin):

40 mg (80%) isolated yield yellow solid. mp=148-150 °C



(lit. 153-154, Dutta *et al.*, *Phytochemistry*. **1972**, 11, 2891). ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 3.82 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 5.47 (d, 1H, $J=1.9$ Hz), 5.90 (d, 1H, $J=1.9$ Hz), 6.44 (d, 1H, $J=16.2$ Hz), 6.90 (d, 2H, $J=10.8$ Hz), 7.43-7.49 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 55.4 (OCH_3), 55.9 (OCH_3), 88.4 (CH), 100.4 (CH), 114.4 (2xCH), 116.4 (CH), 129.0 (2xCH), 130.8 (C), 135.5 (CH), 159.2 (C), 160.8 (C), 164.2 (C), 171.3 (C). FT-IR, KBr

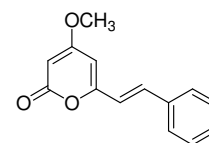
pellets (cm^{-1}): 1726, 1640, 1602. HMRS (EI) calcd for M^+ ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$): 258.0892, found: 258.0885.

(E)-4-methoxy-6-styryl-2H-pyran-2-one (2) (Desmethoxyyangonin):

37 mg (75%) isolated yield yellow solid. mp=134-136 °C

(lit. 138-140, Rezende *et al.*, *Phytochemistry*. **1971**, 10, 3167). ^1H NMR

(CDCl_3 , 270 MHz): 3.80 (s, 3H), 5.48 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 5.94 (s, 1H), 6.57 (d, 1H, $J=15.9$ Hz), 7.34-7.52 (m, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 55.9 (OCH_3), 88.8 (CH), 101.3 (CH), 118.6 (CH), 127.4 (2xCH), 128.8 (2xCH), 129.4 (CH), 135.2 (C), 135.7 (CH), 158.6 (C), 166.7 (C), 172.3 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1731, 1636, 1609. HMRS (EI) calcd for M^+ ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$): 228.0786, found: 228.0799.





Pergamon

TETRAHEDRON
LETTERS

Towards synthesis of kavalactone derivatives¹

Patrícia A. Amaral^{a,b}, Nicolas Gouault^a, Myriam Le Roch^a, Vera L. Eifler-Lima^b
and Michèle David^{a*}

^a EA 4090 Substances lichéniques et photoprotection, Université Européenne de Bretagne, Université de Rennes1, 2 Av. du Pr L. Bernard, 35043 Rennes, France.

^b Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, University Federal of Rio Grande of Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre/RS, Brazil.

Abstract—Kavalactone derivatives were synthesized using a Heck reaction of the 4-methoxy-6-vinyl-5,6-dihydropyran-2-one with aryl iodides. The Suzuki-Miyaura reaction of an aryl boronic acid and (*Z*)-4-methoxy-6-(2-iodovinyl)-5,6-dihydropyran-2-one has also been successfully used to produce both *Z* and *E* isomers of lactones. © 2008 Elsevier Science. All rights reserved

Piper methysticum (kava-kava) is a plant native to the oceanic Islands of the South Pacific, that has been used as a folklore medicine and in the preparation of a traditional ceremonial beverage for thousands of years.¹ Modern use of kava root as a natural anxiolytic in several studies showed favourable results compared to a number prescription medications including benzodiazepines. In fact, kavalactones comprise 15% of the dried rootstock and display various and important biological properties such as sedative, anxiolytic, anti-inflammatory and analgesic effects.² The psychoactive ingredients consist of a group of structurally related lipophilic lactones derivatives with an arylethylene- α -pyrone core known as kavalactones (Figure 1). Among these compounds, yangonin **1** is one of the major components of kava extract and it has been reported to be responsible for the pharmacological activity.³ It has shown a promising TNF- α release inhibitory activity.⁴

The pharmacological actions found for the kavalactones justify their synthesis and the preparation of original analogues. The lack of systematic studies of the pharmacological activities for the isolated kavalactones⁵ motivates their production in sufficient quantities for further structure-activity relationship investigations. In addition, it is still unknown which compound is responsible for the pharmacological effects observed for the vegetal extracts or even whether these actions are due to one or more of these compounds.

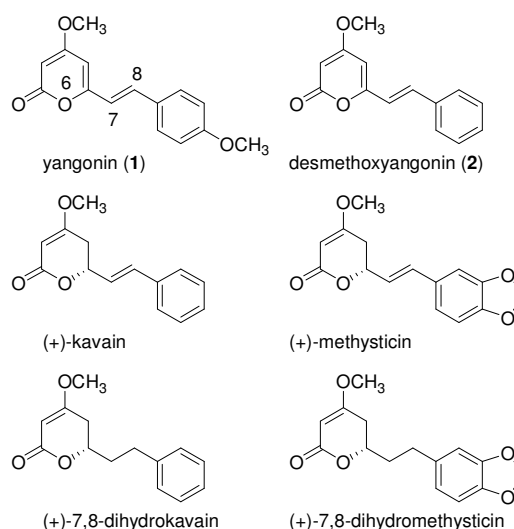


Figure 1. Kavalactones isolated from *Piper methysticum*

The synthesis of six membered unsaturated δ -lactones has generated a widespread interest, due to their occurrence in a large number of natural products possessing potent biological activities.⁶ Various synthetic pathways, aiming to racemic⁷ or enantiopure compounds,⁸ have been studied to access kavalactones *via* standard aldol-based strategies involving the corresponding electron-rich cinnamaldehydes but none of them are generally applicable to the synthesis of oxygen substituted kavalactone derivatives such as yangonin and methysticin.

¹ [doi:10.1016/j.tetlet.2008.07.102](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.07.102)

Keywords: kavalactones; Heck reaction; Suzuki-Miyaura reaction ; yangonin

* Corresponding author. Tel.: +33(0)223234860; fax: +33(0)223234425; email: michele.david@univ-rennes1.fr

In connection with a program devoted to the synthesis of 4-oxo valerolactones derivatives and the evaluation of their *in vivo* analgesic effect,⁹ we present in this work two approaches to the synthesis of yangonin **1**, desmethoxyyangonin **2** and structural analogues.

In order to devise a synthesis that would provide rapid access to novel compound libraries for biological evaluation we first planned a strategy based on the Heck¹⁰ cross-coupling reaction between the pyrone **3** and various aryl iodides. (Figure 2)

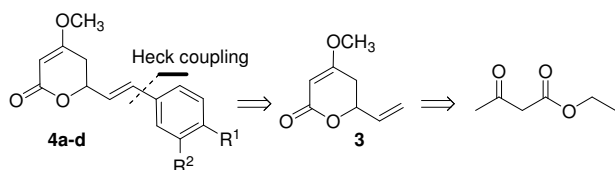
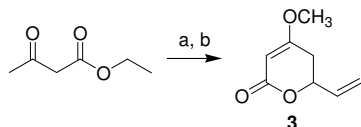


Figure 2. Retrosynthetic analysis.

The precursor for the Heck reaction was successfully prepared by aldol condensation of ethyl acetoacetate with acrolein and subsequent lactonisation according to a reported method.⁹ Although it was possible to isolate and purify the β -ketone-intermediate, we decided to carry out the methylation with dimethyl sulfate in acetone at room temperature^{8c} to afford **3** in a 52% yield overall. (scheme 1)



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) LDA, THF 0 °C, acrolein. (b) dimethylsulfate, K₂CO₃, dry acetone, r.t.

We then focused on the palladium-catalyzed cross coupling of **3** with some aryl iodides. To the best of our knowledge, no example related to the transformation of **3** to **4** has been reported in the literature.

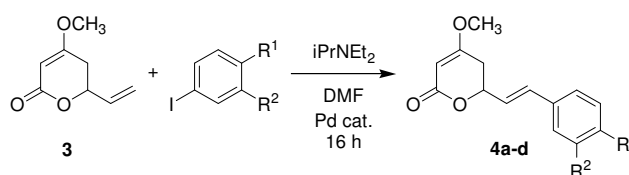
First, reactions were carried out using various substituted iodobenzenes as the coupling partners, 5 or 10 mol % of tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0) in the presence of Hünig's base in DMF for 16 hours at 80 °C (Table 1).

Under these conventional thermal heating conditions, we observed that reactions did not proceed satisfactorily due to the heat-induced decomposition of the pyrone **3**. In addition we noticed that increasing the reaction temperature to 180 °C or longer reaction time led to total pyrone moiety decomposition. This prompted us to run the reaction under controlled microwave irradiation.

Microwave-promoted palladium-catalyzed coupling reaction is known to reduce reaction times. In addition the microwave irradiation procedures have received great

attention due to their efficient and environmentally benign conditions.^{11,12} The reaction conditions were optimized using 4-iodoanisole as substrate over a wide temperature range: 25 to 150 °C. After some experimentation, we found it essential to employ a moderate microwave power (300 W) to avoid decomposition of lactone **3** as observed by HPLC monitoring. The best result, 47% isolated yield of **4a**, was obtained in 5.5 minutes (entry 1 Table 2). If prolonged irradiation or higher temperatures were used, more side products resulting from total decomposition of the pyrone moiety were observed by ¹H NMR. It has been noticed that the decomposition pathway might involve a "ring-opening-decarboxylation" sequence. No improvement was observed by increasing the amounts of Pd catalyst or change the source of Pd. Employing this protocol to other aryl iodides afforded the compounds **4b**, **4c** and **4d** within 5.5 minutes (entries 2-5), but the yields were only slightly improved. Less activated aryl iodide (*p*-nitro-iodobenzene) failed to afford the corresponding cross-coupling product regardless of heating procedure is used. (Table 1, entry 5 and table 2, entry 5)

Table 1. Heck cross-coupling reactions under thermal heating conditions



Entry	Aryl Iodide R ¹ R ²	Mol % / Catalyst	Product/ Yield (%)
1	OCH ₃ H	5% Pd(PPh ₃) ₄	4a 35
2	H H	10% Pd(PPh ₃) ₄	4b 40
3	O-CH ₂ -O	10% Pd(PPh ₃) ₄	4c 40
4	F H	10% Pd(PPh ₃) ₄	4d 40
5	NO ₂ H	10% Pd(PPh ₃) ₄	nr ^a

^a no reaction

Table 2. Fast palladium-catalysed coupling reactions under microwave irradiation (300 W, 5.5 min)

Entry ^a	Aryl Iodide R ¹ R ²	Catalyst	Product /Yield (%)
1	OCH ₃ H	10% Pd(PPh ₃) ₄	4a 46
2	H H	10% Pd(PPh ₃) ₄	4b 42
3	F H	10% Pd(PPh ₃) ₄	4d 40
4	O-CH ₂ -O	10% Pd(PPh ₃) ₄	4c 42
5	NO ₂ H	10% Pd(PPh ₃) ₄	nr ^b

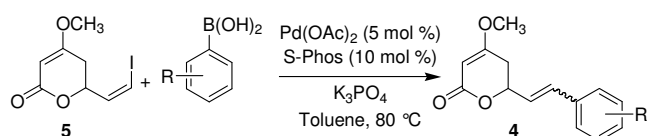
^a Initial microwave irradiation of 300 W was used, the temperature being ramped from rt to 150 °C

^b no reaction

According to the disappointing results we decided to investigate the Suzuki-Miyaura cross coupling reaction of

various aryl boronic acids with (*Z*)-6-(2-iodovinyl)-4-methoxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one **5**. Therefore the pyrone **5** was prepared following our optimized reaction conditions for the synthesis of the pyrone **3** (scheme 1). Aldol condensation of ethyl acetoacetate with (*Z*)-iodoacrolein,¹³ subsequent lactonisation and then methylation afforded *Z* isomer in 46% yield overall.

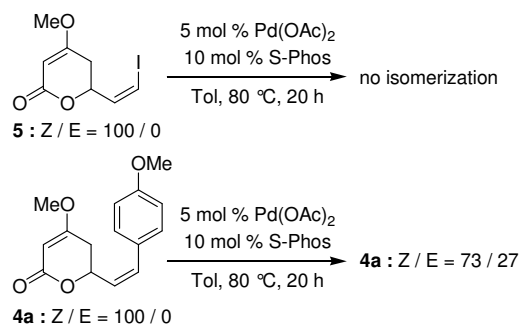
In order to optimize the yield of cross-coupled products **4** we focused on the employment of efficient catalyst system with Pd(OAc)₂ and 2-(2,6-dimethoxybiphenyl)dicyclohexyl-phosphine (S-Phos)^{14,15} as ligand. Thus treatment of pyrone **5** with boronic acids in toluene at 80 °C for 20 hours in the presence of K₃PO₄ as base afforded the required kavalactone derivatives **4a**, **4b** and **4c** in satisfactory yields (Scheme 2). However, we were surprised to obtain a *E/Z* mixture since the Suzuki-Miyaura reaction was known to be a stereoselective cross coupling reaction.^{16,17} ¹H NMR analysis of each crude compound indicated the *E/Z* ratio: 70/30, 83/17 and 24/76 for **4a**, **4b** and **4c** respectively.



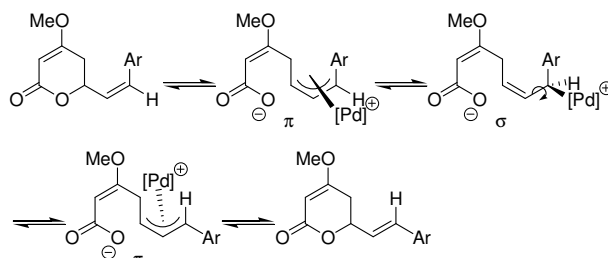
R = <i>p</i> -OCH ₃	4a 78%	<i>E/Z</i> = 70/30
R = H	4b 70%	<i>E/Z</i> = 83/17
R = <i>o</i> -F	4c 73%	<i>E/Z</i> = 24/76

Scheme 2. Suzuki cross coupling reaction

Initially we thought that the formation of *E*-isomers was the result of thermal isomerization of the pyrone **5** or the cross-coupling products **4**. Nevertheless no notable isomerization has been observed when these pyrones were heated in toluene at 80 °C for 24 hours. Yet we observed that treatment of pyrone **4a** (*Z* isomer) in the cross coupling conditions without boronic acid led to partial isomerization (*Z/E* = 100/0 to 73/27) after 20h at 80 °C in toluene (Scheme 3). This could be explained by possible formation of a π -allyl-Pd(II) intermediate in the reaction mixture and well-known syn-anti isomerization *via* a π - σ - π process¹⁸ (Scheme 4). On the other hand no isomerization occurred with the vinylic iodide **5**. Probably the oxidative addition of Pd(0) in the carbon-iodine bond is faster than the formation of the π -allylpalladium intermediate. More experiments are needed and the results of these studies will be reported in due course.

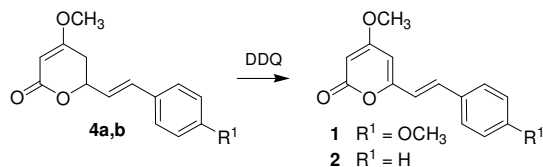


Scheme 3.



Scheme 4

In the final step of the reaction sequence product (*E*)-**4a** and (*E*)-**4b** were easily converted into the desired target yangonin **1** and desmethoxyyangonin **2** refluxing benzene with DDQ for 2 hours⁴ (80 and 75% yields respectively) (Scheme 5).



Scheme 5. Synthesis of Yangonin **1** and Desmethoxyyangonin **2**.

In summary, we have devised two approaches for the preparation of kavalactone derivatives, a class of compounds with interesting biological activities. The potential of yangonin to inhibit the LPS-stimulated TNF- α production in human whole blood is currently in progress. Further work to extend the Suzuki-Miyaura cross coupling to a diverse range of easily available boronic acids with *Z* and *E* iodoacrolein is underway in our laboratory.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES/COFECUB project 418/03. The authors thank Pr. P. van de Weghe, for helpful discussion, one of reviewers for his comments and Centre

Régional de Mesures Physiques de L'Ouest (CRMPO) in Rennes (France) for performing HRMS analyses.

Supplementary data

Supplementary data for all products associated with this article can be found, in the online version, at

References

- (a) Hansel, V.R.; WeiB, D.; Schmidt, B. *Planta Med.* **1966**, *14*, 1-9; (b) Singh, Y. N. *J. Ethnopharmacol.* **1983**, *7*, 267-276; (c) Sung, Y. N.; Blumentahl, M. *Herbalgram.* **1997**, *39*, 33-56.
- (a) Keledjian, J.; Duffield, P. H.; Jamieson, D. D.; Lidgard, R. O.; Duffield, M. *J. Pharm. Sci.* **1988**, *77*, 1003-1006; (b) Backhauss, C.; Krieglstein, J. *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *215*, 265-269; (c) Gleitz, J.; Friese, J.; Beile, A.; Peters, T. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *315*, 89-97; (d) Seitz, U.; Ameri, A.; Pelzer, H.; Gleitz, J.; Peters, T. *Planta Med.* **1997**, *63*, 303-306; (e) Schmidt, N.; Ferger B. *Synapse* **2001**, *40*, 47-54; (f) Bilia, A. R.; Gallori, S.; Vincieri, F. F. *Life Science* **2002**, *70*, 2581-2597.
- Matsuda, H.; Hirata, N.; Kawaguchi, Y.; Naruto, S.; Takata, T.; Oyama, M.; Inuma, M.; Kubo, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 834-837.
- Hashimoto, T.; Suganuma, M.; Fujiki, H.; Yamada, M.; Kohno, T.; Asakawa, Y. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 309-317.
- (a) Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M.; Phytochemistry **1997**, *64*, 597-673; (b) Dharmaratne, H. R. W.; Nanayakkara, N. P. D.; Khan, I. A. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 429-433.
- (a) Boucard, V.; Broustal, G.; Campagne, J.-M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 225-236; (b) Marco, J. A.; Carda, M.; Murga, J. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2929-2958.
- (a) Piantosi, C.; Skulason, V. G. *J. Pharm. Sci.* **1964**, *53*, 902-905; (b) Izawa, T.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1975**, 161-164; (c) Israili, Z. H.; Smisman, E. E. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 4070-4074; (d) Feffstrup, T.; Boll, P. M. *Acta Chem. Scand. B.* **1976**, *30*, 613-618; (e) Rosen, J. D.; Nelson, T. D.; Huffman, M. A.; McNamara, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 365-368; (f) Pierres, C.; George, P.; Hijfte, L. V.; Ducep, J.-B.; Hibert, M.; Mann, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3645-3647.
- (a) Fowler, E. M. F.; Henbest, H. B. *Chem Soc.* **1950**, 3642-3652; (b) Castellino, S.; Sims, J. J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4059-4062; (c) Spino, C.; Mayes, N.; Desfossés, H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6503-6506; (d) Du, H.; Zhai, D.; Ding, K. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5964-5970; (e) Smith, T. E.; Djang, M.; Velandar, A. J.; Downey, M.; Carroll, K. A.; Alphen, S. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2317-2323; (f) Xang, Dao-F.; Yue, Min-J. *Synlett.* **2005**, *13*, 2077-2079; (g) Sabitha, G.; Sudhakar, K.; Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8599-8602; (h) Kamal, A.; Krishnaji, T.; Khanna, G. B. R. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8657-8660.
- Amaral, P. A.; Bergold, A. M.; Eifler-Lima, V. L.; Santos, E. M.; Oliveira, E. R.; Campos-Buzzi, F.; Cechinel-Filho, V. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *8*, 69-75.
- Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3009-3066.
- Lahred, M.; Hallberg, A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9582-9584.
- Kappe, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250-6283.
- Marek, I.; Meyer, C.; Normant J. F. *Org. Synthesis* **1997**, *74*, 194-204.
- Barder, T. E.; Walker, S. D.; Martinelli J. R., Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4685-4696.
- Miura, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2201-2203.
- Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Hepworth, L. A. Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8135-8138.
- Katayama, H.; Nagao, M.; Ozawa, F. Ikegami, M.; Arai, T. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2699-2705.
- Ogasawara, M.; Takizawa, K.-I.; Hayashi, T. *Organometallics.* **2002**, *21*, 4853-4861 and references cited herein.

CHAPITRE IV – *Different cross-coupling approaches to the synthesis of novel kavaine-like derivatives and evaluation of their cytotoxicity*

Different cross-coupling approaches to the synthesis of novel kavaine-like derivatives and evaluation of their cytotoxicity

Patricia de A. Amaral^{a,b}, Julien Petriguet^c, Nicolas Gouault^b, Taciane Agustini^a, Françoise Lohézic-
Ledévéhat^b, Alexandre Cariou^b, René Grée^c, Vera L. Eifler-Lima^{a*} and Michèle David^b

^a*Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal/LaSOM, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.*

^b*Laboratoire de Chimie Thérapeutique, UPRES 4090, Université de Rennes 1, Rennes, France.*

^c*Laboratoire de Chimie et Photonique Moléculaires, CNRS UMR 6510, Université de Rennes 1,
Rennes, France.*

* Corresponding author: eifler@farmacia.ufrgs.br

Diferentes abordagens de cross-coupling para a síntese de novos derivados kavaine-like e avaliação da toxicidade.

Reações de acoplamento do tipo Heck, Sonogashira-Hagihara, Suzuki-Miyaura e reação de aldolização catalizadas por metal foram utilizadas para a obtenção de três séries de δ -valerolactonas substituídas em posições **3**, **4**, **5** e **6** do anel lactônico. As 26 δ -valerolactonas sintetizadas foram testadas contra três linhagens celulares e cinco delas exibiram uma moderada atividade citotóxica.

Four types of transition metal-catalyzed reactions Sonogashira-Hagihara, Suzuki-Miyaura, Heck coupling and nickel hydride-mediated tandem isomerization aldolisation, have been used for the synthesis of three series of δ -valerolactones substituted in positions **3**, **4**, **5** and **6** of the lactone ring. The 26 δ -valerolactones were tested against three cell lines and five of them exhibited a moderate cytotoxic activity.

Keywords: δ -valerolactones, Heck, Sonogashira-Hagihara, Suzuki-Miyaura, tandem isomerization-aldolization, cytotoxicity.

Introduction

The extract of roots and stems of a plant called kava, *Piper methysticum* Forster, Piperaceae, is used in the traditional medicine of the Pacific cultures (Polynesia, Melanesia, Micronesia) for the treatment of several disorders.¹ In western countries, the preparations of kava are known as kava-kava and are indicated to treat anxiety, stress and insomnia due to the soothing effects produced by these medicine preparations.² The literature has reported several potential activities for *P. methysticum* extracts such as sedative, anxiolytic, anti-inflammatory and analgesic.³ The main substances responsible for the therapeutic actions of kava extract are constituted by the styrylpyrone skeleton and they are named kavalactones or kavapyrones. The kavalactones possess a molecular framework constituted by two rings - the aromatic moiety (benzene nucleus) and the valerolactone ring (4-*O*-Methyl) - linked by a spacer containing the ethylene or ethane subunit (Figure 1). The literature reports 18 isolated and characterized kavalactones but the six most important for the pharmacological effects are Kavain **1**, Methysticin **2**, Desmethoxyyangonin **3**, Dihydrokavain **4**, Dihydromethysticin **5** and Yangonin **6** (Figure 1).

Figure 1

Despite the fact that pharmacological activities found for the kava extracts have been known for a long time, the investigations with the isolated kavalactones remained poorly studied.^{1,3} The styryl lactones class has already been investigated as cytotoxic and antitumor agents.⁴ Altholactone a furano-pyrone first isolated in 1977 and recently identified as the major compound from the stem bark of *Goniothalamus arvensis* is known to possess significant cytotoxicity against several tumor cell lines.⁵ More recently, a simple styryl lactone goniothalamine structurally closer of the kavalactones also exhibited significant effect on

various cancer cell lines (MCF-7, P-388, WEH1164, HG-27).⁶ So, a large number of compounds structurally related to the natural styryl lactones remains to be screened for antitumor activity. Because of the biological interest focused on this class of compounds, there is a tremendous potential for medicinal chemists to study structure-activity relationships of styryl lactones in order to find a chemotherapeutic agent for the treatment of cancer.⁷

The array of transition-metal-catalyzed cross-coupling reactions can easily be considered nowadays as the unique tool in the field of organic synthesis. The carbon-carbon bond formation reactions are among the most important processes in chemistry because they represent key steps in the synthesis of the more complex molecules from simple building blocks. Among them the metal-catalyzed coupling reaction between phenyl, vinyl halides with allylic alcohols has become an important method to prepare building blocks for the synthesis of both natural products and analogs of much interest in medicinal chemistry.⁸ Consequently, the development of many fields of the organometallic chemistry has given support for the synthesis of new hits and lead compounds. Its scope and relevance for other areas of the chemistry, as well as the deep understanding of its numerous facets is very impressive.⁹ This is mostly due to the very large diversity of the catalysis available to provide efficient methods for the synthesis of small biologically active molecules with excellent yields.

The δ -valerolactones are an important class of organic compounds due to their high occurrence in nature, and also because they are versatile building blocks in the synthesis of a wide range of natural and synthetic products.¹⁰ In a previous work, we described the one-pot synthesis of some δ -valerolactones by the reaction of ethyl acetoacetate with several aldehydes in the presence of LDA. These compounds were tested *in vivo* and the first results revealed a potential analgesic effect.¹¹ More recently, two approaches using Heck and Suzuki-

Miyaura reactions for the synthesis of yangonin, demethoxyyangonin, kavain-*rac* and derivatives were published by our research group.¹² Continuing these investigations, in the present work we report the synthesis of three sets of novel kavain-like derivatives (Figure 2) through different cross-coupling approaches and their *in vitro* cytotoxicity evaluation against three cell lines.

Figure 2

In order to generate diversity, we have designed the structures bearing substituents in all positions of the lactone nucleus. These methods allow us to synthesise three sets of novel valerolactones substituted at positions C-3, C-4, C-5 and C-6, as shown in Figure 2. For this proposal, we have focused our attention, specifically, on four procedures of cross-coupling reactions: Suzuki-Miyaura¹³, Sonogashira⁹, Heck-Mizoroki¹⁴ and Nickel hydride-mediated tandem isomerization-aldolization reaction¹⁵. The results will be significant for further medicinal chemistry investigations in order to perform structure-activity relationships and to verify the importance of corresponding substituents at pharmacological levels.

Experimental Section

Chemical analysis

Solvents were distilled prior to use, following standard procedures, and reactions were performed under nitrogen or argon atmosphere. Silica gel 60 F₂₅₄ plates were used to monitor synthetic transformation, visualization being done under UV light, 2% KMnO₄ or anisaldehyde sulphuric 2% solutions. Chromatographic purifications were carried out using 70-230 mesh silica gel. Melting points were determined on a System Kofler type WME apparatus and were uncorrected. Infrared (FT-IR) spectra were recorded with an Perkin Elmer 1600 spectrometer. Nuclear magnetic resonance spectra (¹H NMR and ¹³C NMR) spectrometer at 270 MHz and 75.5

MHz, respectively. Chemicals shifts (δ values) are given in parts per million downfield from tetramethylsilane as the internal standard. Mass spectral analyses were performed at the Centre Régional de Mesures Physiques de L'Ouest (CRMPO) in Rennes (France).

General procedure aldolisation/lactonization reaction of **8a-g**. To a cold (0 °C) solution of Diisopropylamine (0.77 mL, 5.54 mmol) in THF (12 mL) under argon was added n-buthyllitium (2.22 mL, 5.54 mmol 2.5 M in hexanes) and the reaction mixture stirred 45 minutes at 0 °C. Ethyl acetoacetate (0.3 mL, 2.31 mmol) was added drop wise (20 min) at 0 °C and then the corresponding aldehyde (2.54 mmol) was slowly added and the reaction mixture stirred 20 minutes at 0 °C. After addition of coldwater (75 mL), the mixture was left to stand at room temperature for 1-3 hours. The crude mixture was extracted with Et₂O (3 x 20 mL) and the aqueous layer acidified with hydrochloric acid (pH = 1) under ice bath. The solid thus obtained was filtered off, washed with cold water and Et₂O.

4-hydroxy-6-(*α*-*trans*-styryl)-5,6-dihydro-2-pyrone (**8a**): 448 mg (90%) isolated yield pale yellow solid. mp=98 – 106 °C. ¹H RMN (DMSO-d₆, 270 MHz): 2.57-2.87 (m, 2H), 5.00 (s, 1H), 5.02-5.05 (m, 2H), 6.42 (dd, 1H, *J*=16.0, 6.2 Hz), 6.73 (d, 1H, *J*=16.0 Hz), 7.25-7.51 (m, 5H); ¹³C RMN (DMSO-d₆, 67.5 MHz): 33.0 (CH₂), 75.0 (CH), 91.0 (CH), 127.0 (CH), 128.0 (CH), 129.0 (C), 127.0 (CH), 132.0 (CH), 136.0 (C), 167.0 (C), 173.0 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1699, 1208. HMRS (EI) calc for (C₁₃H₁₂O₃): 216.0786; found 216.0793.

4-hydroxy-6-phenyl-5,6-dihydropyran-2-one (**8b**): 377 mg (86%) isolated yield pale yellow solid. mp=122-132°C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 270 MHz): 2.70 (m, 2H), 5.11 (s, 1H), 5.45 (m, 1H), 7.38-7.44 (m, 5H); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 67.5 MHz): 34.0 (CH₂), 76.0 (CH), 91.0 (CH), 126.0 (CH), 128.3 (CH), 128.5 (CH), 139.0 (C), 167.0 (C), 173.0 (C); FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1600, 1581, 1287. HMRS (EI) calc for (C₁₁H₁₀O₃): 190.0630; found: 190.0637.

6-(4-fluorophenyl)-4-hydroxy-5,6-dihydropyran-2-one (**8c**): 330 mg (53%) isolated yield pale yellow solid. mp=105-110 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 270 MHz): 2.67 (m, 2H), 5.10 (s, 1H), 5.70 (m, 1H), 7.20-7.40 (m, 2H), 7.50-7.60 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 67.5 MHz): 34.0 (CH₂), 76.0 (CH), 91.0 (CH), 115.4 (CH), 115.1 (CH), 128.7 (CH), 128.8 (CH), 135.0 (C), 162.0 (d, CF, *J*_{CF} = 244 Hz), 167.0 (C), 173.0 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1600, 1581, 1208. HMRS (EI) calc for (C₁₁H₉O₃F): 208.0536; found: 208.0544.

4-hydroxy-6-(4-methoxyphenyl)-5,6-dihydropyran-2-one (**8d**): 355 mg (70%) isolated yield yellow solid, mp = 136-138 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 270 MHz): 2.49 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 5.03 (s, 1H), 5.36 (d, 1H, *J*=8.7 Hz), 6.94 (d, 2H *J* = 8.3 Hz), 7.30 (d, 2H *J*=8.3 Hz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 67.5 MHz): 34.0 (CH₂), 55.2 (OCH₃), 76.0 (CH), 91.0 (CH), 113.8 (2 CH), 128.0 (2CH), 131.0 (C), 167.0 (C), 173.0 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1712, 1727, 1289. HMRS (EI) calc for (C₁₂H₁₂O₄): 220.0736; found: 220.0743.

4-(4-hydroxy-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)benzotrile (**8e**): 377 mg (76%) isolated yield yellow solid, mp = 115-120 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 270 MHz): 2.63-2.85 (m, 2H), 5.08 (s, 1H), 5.54 (dd, 1H *J*=11.0, 8.7 Hz), 7.65 (d, 2H *J*=8.0 Hz), 7.88 (d, 2H *J*=8.0 Hz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): 33.9 (CH₂), 75.3 (CH), 90.8 (CH), 111.0 (C), 118.6 (CN), 127.2 (2CH), 132.5 (2CH), 144.6 (C), 166.3 (C), 172.7 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1700, 1720, 1289. HMRS (EI) calc for (C₁₁H₉NO₃): 171.0684; found: 171.0669.

6-(4-bromophenyl)-4-hydroxy-5,6-dihydropyran-2-one (**8f**): 236 mg (40%) isolated yield yellow solid, mp = 165-167 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 270 MHz): 2.74-2.85 (m, 2H), 5.04 (s, 1H), 5.44 (d, 1H *J*=9.0 Hz), 7.40 (d, 2H *J*=8.0 Hz), 7.60 (d, 2H *J*=8.0 Hz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 67.5 MHz): 34.0 (CH₂), 75.4 (CH), 90.7 (CH), 121.4 (C), 128.6 (2CH), 131.4 (2 CH), 138.5 (C), 166.5 (C), 172.7 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1648, 1589. HMRS (EI) calc for (C₁₁H₉O₃79Br): 267.9735; found: 267.9739.

4-hydroxy-6-(4-iodophenyl)-5,6-dihydropyran-2-one (**8g**): 240 mg (33%) isolated yield yellow solid, mp = 153-155 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 270 MHz): 2.49-2.72 (m, 2H), 4.93 (s, 1H), 5.31 (d, 1H *J*=8.1 Hz), 7.15 (d, 2H *J*=5.4 Hz), 7.66 (d, 2H *J*=8.1 Hz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 67.5 MHz): 34.0 (CH₂), 75.4 (CH), 90.7 (CH), 94.4 (C), 128.6 (2CH), 137.2 (2CH), 138.9 (C), 166.4 (C), 172.6 (C). FT-IR, KBr pellets (cm⁻¹): 1678, 1649. HMRS (EI) calc for (C₁₁H₉O₃I): 315.9597; found: 315.9586.

General procedure methylation reaction of **9a-g**. The acetone dried (3 mL) was added δ-hydroxy-β-ketoester (150 mg, 0.750 mmol). Powdered anhydrous K₂CO₃ (210 mg, 1.50 mmol) and Me₂SO₄ (150 μL, 1.50 mmol) were added and the suspension was stirred overnight at room temperature. The reaction was diluted with EtOAc (26 mL) and was washed with 0.5 M HCl (26 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 10 mL)

and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The product was purified by Flash chromatography (solvent= 0 to 50% EtOAc in cyclohexane).

(*E*)-4-methoxy-6-styryl-5,6-dihydropyran-2-one (**9a**): 128 mg (80% yield) isolated as a pale white solid. mp=141-143 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.52 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 4.93-5.01 (m, 1H), 5.11 (s, 1H), 6.16 (dd, 1H, $J=16.0, 6.3$ Hz), 6.64 (d, 1H, $J=16.0$ Hz), 7.15-7.32 (m, 5H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 33.0 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 76.0 (CH), 90.5 (CH), 125.5 (CH), 126.7 (2xCH), 128.3 (CH), 128.7 (CH), 133.4 (CH), 135.7 (C), 166.7 (C), 172.3 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1713, 1625. HMRS (EI) calcd for M^+ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$): 230.0943, found: 230.0935.

4-methoxy-6-phenyl-5,6-dihydropyran-2-one (**9b**): 122 mg (76%) isolated yield white solid, mp = 143-145 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.53-2.86 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 5.22 (s, 1H), 5.40 (dd, 1H $J=12.0, 3.6$ Hz), 7.15-7.40 (m, 5H), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 76.5 (CH), 90.6 (CH), 126 (3CH), 128,6 (2CH), 138.2 (C), 166.8 (C), 172.5 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1714, 1621. HMRS (EI) calc for ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$): 204.0786; found: 204.0764.

6-(4-fluorophenyl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (**9c**): 106 mg (66%) isolated yield white solid, mp= 191-193 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.50-2.82 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 5.21 (s, 1H), 5.40 (dd, 1H $J=12.0, 3.6$ Hz), 7.02-7.08 (m, 2H), 7.34-7.39 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 76.5 (CH), 90.5 (CH), 115.5 (2CH), 127.7 (2CH), 161.0 (CF $J=246,8$ Hz), 166.6 (C), 172.4 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1711, 1618. HMRS (EI) calc for ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{F}$): 222.0692; found: 222.0695.

4-(4-methoxy-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)benzotrile (**9d**): 96 mg (60%) isolated yield white solid, mp=169-171 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.57-2.80 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 5.24 (s, 1H), 5.45 (dd, 1H $J=11.5, 4.4$ Hz), 7.0 (d, 2H $J=8,2$ Hz), 7.70 (d, 2H $J=8,2$ Hz), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz) : 35.0 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 76.5 (CH), 90.5 (CH), 112.5 (C), 118.3 (CN), 126.5 (2CH), 132.6 (2CH), 143.3 (C), 166.0 (C), 172.0 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 2229, 1704, 1618. HMRS (EI) calc for ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$): 229.0739; found: 229.0740.

4-methoxy-6-(4-methoxyphenyl)-5,6-dihydropyran-2-one (**9e**): 120 mg (75%) isolated yield white solid, mp=103-105 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.51-2.89 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 5.24 (s, 1H), 5.36

(dd, 1H $J=12.0, 3.9$ Hz), 6.90 (d, 2H $J=8,7$ Hz), 7.30 (d, 2H $J=8,7$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 55.0 (OCH_3), 56.0 (OCH_3), 77.0 (CH), 90.6 (CH), 114.0 (2CH), 126.5 (2CH), 130.0 (C), 167.0 (C), 172.0 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1716, 1626. HMRS (EI) calc for ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$): 234.0892; found: 234.0902.

6-(4-bromophenyl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (**9f**): 154 mg (74%) isolated yield white solid, mp=161-163 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.54-2.83 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 5.24 (s, 1H), 5.45 (dd, 1H $J=10.8, 5.4$ Hz), 7.30 (d, 2H $J=8,1$ Hz), 7.54 (d, 2H $J=8,1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 76.0 (CH), 90.7 (CH), 122.6 (C), 127.7 (2CH), 132.0 (2CH), 137.4 (C), 167.0 (C), 172.0 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1702, 1620. HMRS (EI) calc for ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{Br}$): 281.9892; found: 281.9883.

6-(4-iodophenyl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (**9g**): 114 mg (73%) isolated yield yellow solid, mp=121-123 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.54-2.82 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 5.24 (s, 1H), 5.40 (dd, 1H $J=10.8, 5.4$ Hz), 7.30 (d, 2H $J=8,1$ Hz), 7.54 (d, 2H $J=8,1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 76.4 (CH), 90.6 (CH), 127.8 (2CH), 137.8 (2CH), 138.0 (C), 166.4 (C), 172.3 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1704, 1620. HMRS (EI): calc for ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{I}$): 329.9753; found: 329.9749.

Heck reaction of (E)-methyl 3-(4-(4-methoxy-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)phenyl)acrylate (**10**). The DMF (1 mL) was added 6-(4-iodophenyl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (30 mg, 0.090), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1.3 mg, 0.009). Methyl acrylate (20 μL , 0.180 mmol) and Net_3 (25 μL , 0.180) were then added, and the mixture was stirring at 80 °C for 16 h. The reaction was filtered through Celite and the filtrate was diluted with water and ethyl acetate. The organic layer was stripped off, then water. The organic layer was separated, dried and concentrated *in vacuo*. The product was purified by column chromatography (EtOAc/Cyclohexane 1:1). To afford 26 mg (78%) isolated yield yellow solid, mp=157-159 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 2.57-2.81 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 5.26 (s, 1H), 5.45 (dd, 1H $J=10.8, 5.4$ Hz), 6.60 (d, 1H $J=16.2$ Hz), 7.45 (d, 2H, $J=8,1$ Hz), 7.55 (d, 2H, $J=16.2$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 51.7 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 76.4 (CH), 90.6 (CH), 118.6 (CH), 126.4 (2CH), 128.3 (2CH), 134.7 (C), 140.3 (C), 144.0 (CH), 166.5 (C), 167.2 (C), 172.3 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1704, 1620. HMRS (EI) calc for ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$) 288.0998; found: 288.0991.

Suzuki reaction of 4-methoxy-6-(4-(2-fluorophenyl)phenyl)-5,6-dihydropyran-2-one (**11**). The toluene (1 mL) was added 6-(4-iodophenyl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (50 mg, 0.150 mmol), K_3PO_4 (64 mg, 0.270 mmol), S-Phos (1,3 mg, 0.003 mmol), 2-fluorophenylboronic acid (31,5 mg, 0.225 mmol). $Pd(OAc)_2$ (4 mg, 0.0015 mmol) was added and the mixture was stirring at 80 °C for 24 h. The reaction was filtered through Celite and the filtrate was dried and concentrated *in vacuo*. The product was purified by column chromatography (EtOAc/Cyclohexane 1:1). To afford 42 mg (72%) isolated yield white solid, mp=157-159 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 270 MHz): 2.60-2.90 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 5.26 (s, 1H), 5.48 (dd, 1H $J=11.9$, 4.1 Hz), 7.12-7.60 (m, 8H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 56.2 (OCH_3), 76.9 (CH), 90.7 (CH), 116.0 (CH), 124.3 (C), 124.4 (CH), 126.0 (2CH), 128.0 (CH), 129.0 (2CH), 130.6 (CH), 136.2 (C), 137.6 (C), 160.09 (CF $J=247$ Hz), 166.7 (C), 172.5 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1707, 1621. HMRS (EI) calc for ($C_{18}H_{15}O_3F$): 298.1005; found: 288.1003.

Sonogashira reaction of 4-methoxy-6-(4-(2-phenylethynyl)phenyl)-5,6-dihydropyran-2-one (**12**). The DMF (1 mL) was added 6-(4-iodophenyl)-4-methoxy-5,6-dihydropyran-2-one (39 mg, 0.1168 mmol), $PdCl_2(PPh_3)_2$ (X, 0.0012 mmol), CuI (X, 0.0012 mmol). 1-ethynylbenzene (20 μ L, 0,175 mmol) and iPr_2NEt (30 μ L, 0,175 mmol) were then added, and the mixture was stirring 60 h at room temperature. The reaction was filtered through Celite and the filtrate was diluted with water and ethyl acetate. The organic layer was stripped off, then water. The organic layer was separated, dried and concentrated *in vacuo*. The product was purified by column chromatography (EtOAc/Cyclohexane 1:1). To afford 32 mg (90%) isolated yield white solid, mp=185-187 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 270 MHz): 2.56-2.85 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 5.25 (s, 1H), 5.40 (dd, 1H $J=10.8$, 5.4 Hz), 7.34-7.57 (m, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 67.5 MHz): 35.0 (CH_2), 56.2 (OCH_3), 76.7 (CH), 88.7 (C), 90.0 (C), 90.6 (CH), 123.0 (C), 123.6 (C), 126.0 (2CH), 128.3 (4CH), 131.6 (CH), 132.0 (2CH), 138.2 (C), 166.5 (C), 172.4 (C). FT-IR, KBr pellets (cm^{-1}): 1711, 1619, 835, 755, 692. HMRS (EI) calc for ($C_{20}H_{16}O_3$): 304.1099; found: 304.1110.

General procedure for aldolization reaction (**14 and 19**). To a stirred solution of THF (70 mL) and diisopropylamine (4.35 mL, 30.96 mmol), at -78 °C was added n-BuLi (12.4 mL, 30.96 mmol, 2.5 M in hexanes). The reaction was stirred at -78 °C for 15 min followed by of dropwise addition of the ester (25.8 mmol). Upon completion of addition of ester, the reaction was stirred 50 min. Distilled acrolein (1,54 mL, 27 mmol) in THF (10 mL) was added via cannula, and reaction stirred at -78 °C for 10 min. The reaction was quenched by the rapid injection of a saturated NH_4Cl solution (10 mL), immediately poured into a separatory funnel containing diethyl ether (50 mL), and washed with brine (2 x 20 mL). The organic layer was dried,

filtered, and evaporated in vacuo to give a yellow oil which was purified by column chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1).

Ethyl 3-hydroxypent-4-enoate (**14**): 3.24 g (88%) isolated yield pale yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 1.28 (t, 3H, *J*=7.1 Hz), 2.51-2.57 (m, 2H), 3.29 (s, OH), 4.16 (q, 2H, *J*=7.1 Hz), 4.51-4.58 (m, 1H), 5.15 (dd, 2H *J*=16.9, 10.5 Hz), 5.89 (ddd, 1H *J*=16.9, 10.5, 5.6 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 14.0 (CH₂), 41.2 (CH₂), 60.6 (CH₃), 68.8 (CH), 115.1 (CH₂), 138.8 (CH), 172.0 (C). FT-IR (cm⁻¹): 1715, 3434. HMRS (EI) calc for (C₅H₆O₂) [M-EtOH]⁺: 98.0368; found: 98.0368.

Ethyl 3-hydroxy-2,2-dimethylpent-4-enoate (**19**): 3.97 g (97%) isolated yield pale yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 1.18 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.28 (t, 3H, *J*=7.2 Hz), 2.82 (s, OH), 4.11-4.22 (m, 3H), 5.27 (dd, 2H *J*=17.1, 10.5 Hz), 5.89 (ddd, 1H *J*=17.1, 10.5, 6.6 Hz), ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 14.0 (CH₂), 19.8 (CH₃), 22.3 (CH₃), 46.5 (C), 60.6 (CH₃), 77.8 (CH), 117.4 (CH₂), 136.2 (CH), 177.2 (C). FT-IR (cm⁻¹): 1719, 3497. HMRS (EI) calc for (C₆H₁₂O₂) [M-C₃H₃O]⁺: 116.0837; found: 116.0841.

General procedure for the Heck reaction (**15 and 16**). The DMF (15 mL) were added ethyl 3-hydroxypent-4-enoate (6.94 mmol, 1 g), NaHCO₃ (13.88 mmol, 1.16 g), NBu₄Br (13.88 mmol, 1.16 g), 1-iodobenzene and Pd(OAc)₂ (0.0094 mmol, 25 mg). The mixture was stirring at 60 °C for 16 h. The reaction was filtered through Celite and the filtrate was diluted with water and Et₂O. The organic layer was separated, dried and concentrated *in vacuo*. The product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂ 100%).

Ethyl 3-oxo-5-phenylpentanoate (**15**): 992 mg (65%) isolated yield pale yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 1.24 (t, 3H, *J*=7.1 Hz), 2.80-3.00 (m, 4H), 3.40 (s, 2H), 4.16 (q, 2H, *J*=7.1 Hz), 7.15-7.35 (m, 5H), ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 14.0 (CH₃), 29.3 (CH₂), 44.3 (CH₂), 49.3 (CH₂), 61.3 (CH₂), 126.0 (CH), 127.6 (2CH), 128.4 (2CH), 140.4 (C), 167.0 (C), 201.7 (C). FT-IR (cm⁻¹): 699, 754, 1719, 1739. HMRS (EI) calc for (C₁₃H₁₆O₃): 220.1099; found: 220.1100.

Ethyl 5-(4-methoxyphenyl)-3-oxopentanoate (**16**): 1.13 g (65%) isolated yield pale yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 1.24 (t, 3H, *J*=7.5 Hz), 2.82-3.04 (m, 4H), 3.40 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.16 (q, 2H, *J*=7.5 Hz), 6.80 (d, 2H, *J*=8.1 Hz), 7.07 (d, 2H, *J*=8.1 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 14.1 (CH₃), 28.5 (CH₂), 44.6 (CH₂), 49.0

(CH₂), 55.3(OCH₃), 61.3 (CH₂), 114.1 (2CH), 130.8 (2CH), 132.5 (CH), 157.9 (C), 167.0 (C), 202.0 (C). FT-IR (cm⁻¹): 699, 754, 1719, 1739. HMRS (EI) calc for (C₁₄H₁₈O₄): 250.1205; found: 250.1208.

General procedure aldolisation/lactonization reaction of **17h-l**. To a cold (-78 °C) solution of Diisopropylamine (0.8 mL, 5.68 mmol) in THF (13 mL) under argon was added n-buthyllitium (2.3 mL, 5.68 mmol 2.5 M in hexanes) and HMPA (0.4 mL, 2.27 mmol) the reaction mixture stirred 15 minutes. The ester (2.27 mmol) was added drop wise (30 min) at -78 °C and then the corresponding aldehyde (2.72 mmol) was slowly added and the reaction mixture stirred 30 minutes at -78 °C. After addition of NaOH 1 M (100 mL), the mixture was left to stand at room temperature for 1 h 30 - 3 hours. The crude mixture was extracted with Et₂O (3 x 20 mL) and the aqueous layer acidified with hydrochloric acid (pH = 1) under ice bath. The oil obtained was purified by column chromatography (CHCl₂:AcOEt 8:2).

(5S,6S,5R,6R)-5-benzyl-6-phenyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**17h**): 127 mg (14%) isolated yield white solid, mp=96-100 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.77-3.12 (m, 2H), 3.17-3.24 (m, 1H), 3.45 (s, 2H), 5.35 (d, 1H, J=8,1 Hz), 6.99-7.44 (m, 10H); ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 32.8 (CH₂), 47.4 (CH₂), 53.5 (CH), 79.6 (CH), 126.2 (2CH), 128.7 (4CH), 129.7 (4CH), 136.6 (C), 138.2 (C), 166.6 (C), 201.9 (C). FT-IR (cm⁻¹): 1591, 1664, 1721, 1744. HMRS (EI) calc for (C₁₈H₁₆O₃): 280.1099; found: 280.1085.

(5S,6R,5R,6S)-5-benzyl-6-phenyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**17i**): 89 mg (20%) isolated yield white solid, mp=96-100 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.63-2.98 (m, 2H), 3.19-3.22 (m, 1H), 3.46 (syst AB, 2H J= 20,4 Hz), 5.72 (d, 1H, J=3,8 Hz), 6.92-7.40 (m, 10H), ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 30.5 (CH₂), 45.5 (CH₂), 54.4 (CH), 78.7 (CH), 126.2 (2CH), 128.7 (4CH), 129.7 (4CH), 134.4 (C), 137.0 (C), 167.0 (C), 201.2 (C). FT-IR (cm⁻¹): 1591, 1664, 1721, 1744. HMRS (EI) calc for (C₁₈H₁₆O₃): 280.1099; found: 280.1085.

(5S,6R,5R,6S)-5-(4-methoxybenzyl)-6-phenyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**17j**): 211 mg (30%) isolated yield white solid, mp=100-115 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.57-2.64 (dd, 2H J=13.9, 4.9), 2.92-3.08 (m, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 5.25 (d, 1H, J=8,2 Hz), 6.75 (dd, 4H, J=37.8, 10.8), 7.15-7.30 (m, 5H), ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) : 31.8 (CH₂), 47.4 (CH₂), 53.5 (OCH₃), 79.6 (CH), 114.0 (4CH), 127.3 (C), 128.7 (4CH), 130.0 (C), 135.6 (C), 158.5 (C), 166.6 (C), 201.2 (C). White solid, mp = 110-115 °C. FT-IR (cm⁻¹): 1582, 1666, 1721, 1754. HMRS (EI) calc for (C₁₉H₁₈O₄): 310.1205; found: 310.1191.

(5S,6R,5R,6S)-5-benzyl-6-(4-methoxyphenyl)-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**11k**): 225 mg (30%) isolated yield white solid, mp=102-116 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 2.63-3.09 (m, 2H), 3.20-3.26 (m, 1H), 3.43 (syst AB, 2H, *J*=20.4 Hz), 3.67 (s, 3H), 5.25 (d, 1H, *J*=8,2 Hz), 7.23-7-7.26 (m, 9H), ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 30.6 (CH₂), 45.6 (CH₂), 54.4 (OCH₃), 55.5 (CH), 78.7 (CH), 114.0 (4CH), 127.3 (C), 129.0 (4CH), 130.0 (C), 137.2 (C), 160.0 (C), 167.2 (C), 201.5 (C). FT-IR (cm⁻¹): 1601, 1688. HMRS (EI) calc for (C₁₉H₁₈O₄): 310.1205; found: 310.1191.

(5S,6R,5R,6S)-5-benzyl-6-isopropyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**11l**): 173 mg (31%) isolated yield white solid, mp=131-133 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 0.94 (d, 3H, *J*=6.7 Hz), 1.00 (d, 3H, *J*=6.7 Hz), 2.04 (m, 1H), 2.72-2.87 (m, 1H), 2.80-3.09 (m, 2H), 3.20 (syst AB, 2H, *J*=19.0 Hz), 4.12 (dd, 1H, *J*=8.0, 4.2 Hz), 7.08-7.27 (m, 5H); ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 15.2 (CH₃), 19.6 (CH₃), 29.6 (CH), 33.0 (CH₂), 46.8 (CH₂), 50.5 (CH), 82.3 (CH), 127.2 (CH), 129.0 (4CH), 136.5 (C), 167.0 (C), 201.8 (C). FT-IR (cm⁻¹): 1598, 1672. HMRS (EI) calc for (C₁₅H₁₈O₃): 246.1256; found: 246.1250.

General procedure for aldolization of an allylic alcohol with an aldehyde by means of a nickel complex as catalyst (**20m-p**). A 1 M solution of LiBHEt₃ in THF (3 mL) (54 μL, 0.0567 mmol) was added to a solution of [NiCl₂(dppe)] (30 mg, 0.0567 mmol) at room temperature under nitrogen. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min before to be transferred into a flask containing anhydrous MgBr₂ (10 mg, 0.0567 mmol). This reaction mixture was stirred 5 minutes at room temperature and was cooled to -50 °C. Then, the aldehyde (2.08 mmol) and allylic alcohol (1.89 mmol) were added successively. The reaction mixture was raised to room temperature and the reaction was monitored by TLC until the disappearance of the allylic alcohol. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (15 mL) and the aqueous phase was extracted with Et₂O (3 x 50 mL). The organic phase was dried and concentrate under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel (Pentane:Ether 8:2) the desired aldol products were isolated.

(4S,5S)-ethyl 5-hydroxy-2,2,4-trimethyl-3-oxo-5-phenylpentanoate (**20m**): 489 mg (93%) isolated yield colourless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 1.10 (d, 3H, *J*=7.2 Hz), 1.30 (t, 3H, *J*=7,1 Hz), 1.35 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 3.15 (m, 1H), 4.25 (q, 2H, *J*=13,9, 7.1 Hz), 5.05 (d, 1H, *J*=3.0 Hz), 7.20-7.10 (m, 5H), ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 11.5 (CH₃), 14.1 (CH₃), 21.7 (2CH₃), 48.4 (CH), 56.5 (C), 61.6 (CH₂), 115.1 (CH), 127.6 (4CH),

137.0 (C), 173.1 (C), 214.1 (C). FT-IR (cm^{-1}): 701, 1702, 1731, 3517. HMRS (EI) calc for $(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_3)$ $[\text{M}-\text{PhCHOH}]^+$: 172.1099; found: 172.1080.

(4*S*,5*S*)-ethyl 5-(4-fluorophenyl)-5-hydroxy-2,2,4-trimethyl-3-oxopentanoate (**20n**): 530 mg (95%) isolated yield colourless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 1.10 (d, 3H, $J=6.9$ Hz), 1.30 (t, 3H, $J=7.2$ Hz), 1.35 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 3.15 (m, 1H), 4.25 (q, 2H, $J=13.9, 7.2$ Hz), 5.05 (d, 1H, $J=3.0$ Hz), 7.05 (m, 2H), 7.35 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 11.5 (CH_3), 14.1 (CH_3), 21.7 (2CH_3), 48.4 (CH), 56.2 (C), 61.6 (CH_2), 115.1 (2CH), 127.6 (2CH), 137.0 (C), 162 (CF $J=241.6$ Hz), 173.1 (C), 214.1 (C). FT-IR (cm^{-1}): 834, 850, 1700, 1731, 3515. HMRS (EI) calc for $(\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{F})$: 296.1424; found: 296.1408.

(4*S*,5*S*)-ethyl 5-hydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-2,2,4-trimethyl-3-oxopentanoate (**20o**): 465 mg (80%) isolated yield colourless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 1.05 (d, 3H, $J=6.9$ Hz), 1.30 (t, 3H, $J=7.2$ Hz), 1.35 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 3.05 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.20 (q, 2H, $J=13.9, 7.2$ Hz), 5.05 (d, 1H, $J=3.4$ Hz), 6.85 (d, 2H, $J=6.7$ Hz), 7.25 (d, 2H, $J=6.7$ Hz), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 11.9 (CH_3), 14.1 (CH_3), 21.7 (2CH_3), 48.4 (CH), (OCH_3), 56.4 (C), 61.6 (CH_2), 73.2 (CH), 113.6 (2CH), 127.1 (2CH), 133.5 (C), 158.9 (C), 173.2 (C), 214.1 (C). FT-IR (cm^{-1}): 830, 1702, 1730, 3508. HMRS (EI) calc for $(\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5)$: 308.1624 found: 308.1628.

(4*S*,5*S*)-ethyl 5-(4-bromophenyl)-5-hydroxy-2,2,4-trimethyl-3-oxopentanoate (**20p**): 629 mg (90%) isolated yield colourless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): 0.98 (d, 3H, $J=5.4$ Hz), 1.25 (t, 3H, $J=7.8$ Hz), 1.28 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 3.00 (m, 1H), 3.48 (s, OH), 4.18 (q, 2H, $J=13.9, 7.8$ Hz), 4.92 (d, 1H, $J=2.8$ Hz), 7.15 (d, 2H, $J=8.1$ Hz), 7.43 (d, 2H, $J=8.1$ Hz), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67.5 MHz): 11.3 (CH_3), 14.0 (CH_3), 21.7 (2CH_3), 48.3 (CH), 56.4 (C), 61.6 (CH_2), 72.8 (CH), 121.2 (C), 127.7 (2CH), 133.4 (2CH), 140.4 (C), 173.1 (C), 214.1 (C). FT-IR (cm^{-1}): 1702, 1731, 3511. HMRS (EI) calc for $(\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{Br})$: 356.0623; found: 356.0623.

General procedure for the preparation of lactones (**21m-p**): The aldol product (2.88 mmol) was dissolved in toluene (20 mL) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.288 mmol, 70 mg) added. The solution was stirred 8 h at 80 °C. The mixture washed with saturated aqueous NaHCO_3 solution (10 mL) and brine (10 mL). The organic phase was dried and evaporated. The oily residue was purified by column chromatography on silica gel using (Pentane:Ether 6:4) to give the lactones as an inseparable *Cis/Trans* mixture.

3,3,5-trimethyl-6-phenyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**21m**): 401 mg (70%) *Cis/Trans* (25:75) isolated yield white solid, mp=98-104 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 1.00 (d, 3H, *J*=7.4 Hz), 1.55 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 3.02-3.07 (m, 1H), 5.16 (d_(trans), 1H, *J*=11.2 Hz), 5.82 (d_(cis), 1H, *J*=3.3 Hz), 7.30-7.50 (m, 5H), ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 10.5 (CH₃), 23.0 (CH₃), 25.5 (CH₃), 47.6 (CH), 60.8 (C), 81.1 (CH), 125.7 (CH), 128.8 (4CH), 135.3 (C), 174.2 (C), 209.7 (C). FT-IR (cm⁻¹): 701, 727, 1744, 1713. HMRS (EI) calc for (C₁₄H₁₆O₃): 232.1099; found: 232.1090.

6-(4-fluorophenyl)-3,3,5-trimethyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**21n**): 504 mg (60%) *Cis/Trans* (20:80) isolated yield white solid, mp=90-94 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 0.90 (d, 3H, *J*=7.3 Hz), 1.43 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 2.86-2.95 (m, 1H), 5.05 (d_(trans), 1H, *J*=11.3 Hz), 5.70 (d_(cis), 1H, *J*=3.1 Hz), 7.00-7.10 (m, 2H), 7.25-7.33 (m, 2H), ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 9.2 (CH₃), 21.0 (CH₃), 25.4 (CH₃), 47.0 (CH), 61.6 (C), 80.3 (CH), 115.8 (2CH), 127.6 (2CH), 131.1 (C), 162.5 (CF *J*=247.8 Hz), 174 (C), 209.5 (C). FT-IR (cm⁻¹): 833, 848, 1714, 1745. HMRS (EI) calc for (C₁₄H₁₅O₃F): 250.1005; found: 250.0999.

6-(4-methoxyphenyl)-3,3,5-trimethyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**21o**): 452 mg (60%) *Cis/Trans* (13:87) isolated yield white solid, mp=100-106 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 0.97 (d, 3H, *J*=6.8 Hz), 1.53 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 2.84-2.93 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 5.10 (d_(trans), 1H, *J*=11.2 Hz), 5.75 (d_(cis), 1H, *J*=3.1 Hz), 6.90-7.00 (m, 2H), 7.22-7.43 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 11.0 (CH₃), 22.4 (CH₃), 22.7 (CH₃), 48.0 (CH), 55.7 (OCH₃), 61.6 (C), 81.2 (CH), 114.3 (2CH), 128.9 (2CH), 132.0 (C), 160.7 (C), 174.5 (C), 208.4 (C). FT-IR (cm⁻¹): 817, 842, 1711, 1740. HMRS (EI) calc for (C₁₅H₁₈O₄): 262.1205; found: 262.1201.

6-(4-bromophenyl)-3,3,5-trimethyl-dihydro-3H-pyran-2,4-dione (**21p**): 580 mg (65%) *Cis/Trans* (13:87) isolated yield white solid, mp=98-106 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): 0.94 (d, 3H, *J*=6.7 Hz), 1.50 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 2.74-2.80 (m, 1H), 5.09 (d_(cis), 1H, *J*=11.3 Hz), 5.75 (d_(trans), 1H, *J*=3.1 Hz), 7.27 (d, 2H, *J*=8.5 Hz), 7.53 (d, 2H, *J*=8.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 67.5 MHz): 10.4 (CH₃), 23.4 (CH₃), 22.5 (CH₃), 47.5 (CH), 51.7 (C), 80.3 (CH), 127.3 (C), 128.7 (2CH), 132.1 (2CH), 135.5 (C), 173.7 (C), 207.2 (C). FT-IR (cm⁻¹): 816, 859, 1712, 1739. HMRS (EI) calc for (C₁₄H₁₅O₃79Br): 312.0184; found: 312.0169.

Biological

Cell culture and treatments

In vitro studies were performed using two tumor cell lines cell lines, a human skin melanoma A375 human cells (ATCC CRL-1619) and a murine cancer cell line B16-F1 (melanoma; ATCC CRL-6323). Cytotoxicity was also evaluated on a non-tumorigenic human keratinocyte cell line HaCaT (ATCC, Rockville, Md., USA; human keratinocytes). A375M and B16 cell lines were grown in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 500 U mL⁻¹ penicillin, 500 µg mL⁻¹ streptomycin. HaCaT cells were maintained as previously described for B16 and A375M except the use of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) as culture medium.

After 24 h incubation at 37°C under respectively 5% carbon dioxide for HaCaT and 10% for B16 and A375M cells to allow attachment, the cells were treated with different concentrations of the compounds (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 µM) and incubated for 48 h for B16 and 72 h for human cell lines under the same conditions. Stock solutions of compounds were prepared in DMSO (50 mM) so as the amount of this solvent was adjusted to give a final concentration lower than 0.1%. Control cultures received DMSO alone.

MTT bioassay

MTT assay was performed as previously described.¹⁶ Briefly, the cells were set up 3000, 1500, 2000 cells per well of a 96-well for respectively A375M, HaCaT and B16 cells. They were incubated at 37°C in a humidified 5% or 10% CO₂ air mixture and treated with cisplatin, used as positive control and with the tested compounds (**8a-g**, **9a-g**, **10**, **11**, **12**, **17h-l** and **21m-p**) at different concentrations for 48 h or 72 h. Four hours before the end treatment time, 10 µL of MTT were added to each microwell and plates were replaced at 37°C. After 4 hours, the supernatant was removed and crystals of formazan were dissolved in 150 µL of DMSO. The optical density of each well sample was measured with a microplate

spectrophotometer reader at 540 nm. Each experiment was repeated at least three times and three different wells were used for each concentration to allow the determination of the IC₅₀ (cytotoxicity for which the absorbance is reduced to 50%).

Results and discussion

Chemistry

Among several reports with deal with the synthesis of different δ -lactones, the aldol reactions are frequently used to prepare these heterocycles.¹¹ Because of that and due to our previous experience in performing this reaction, we selected approach 1 to synthesize the first set of lactones (**8a-g** and **9a-g** - Scheme 1). The synthesis was carried out by an aldolisation-lactonization process using ethyl acetoacetate in reaction with several aromatic aldehydes, in the presence of LDA, as published before.¹¹ The nature of the substituent can affect the reactivity of the aromatic aldehyde, as well as the bioactivity of final compounds. So, we have chosen some substituents that could, possibly, activate or deactivate the ring (Table 1) to produce the lactones **8a-g** in moderate to good yields (33-90%). After isolation and purification, these polar intermediary δ -oxo-lactones (**8a-g**) were methylated using a classical procedure¹⁷ with (CH₃)₂SO₄ in acetone, leading to the formation of targeted enol ether compounds **9a-g** with good yields (60 – 80%).

Table 1

Scheme 1

Following three different established protocols, the *para* position of the benzene nucleus of this series was modified aiming to introduce diversity at lactones. For this purpose, using the iodo lactone **9g** as the starting material, we selected the organometallic cross coupling

reactions Heck (route a), Suzuki (route b) and Sonogashira (route c) to furnish compounds **10**, **11** and **12** as outlined in Scheme 2.

Scheme 2

Initial experiments, carried out under Heck conditions with bromopyrone **9f** in opposition to methyl acrylate, have failed. If time was prolonged, temperatures were increased and/or mineral bases like CH₃COONa were used, more side products resulting from decomposition of bromopyrone were observed by ¹H NMR. The iodo- δ -lactone derivative **9g** was briefly evaluated (entry 7, Table 1) and Heck reaction occurred in DMF at 80°C with Pd(PPh₃)₄ and NEt₃, affording compound **10** in good yield (Scheme 2). Some optimization was required to carry out Suzuki reaction with **9g** and (OH)₂B-*o*-F-C₆H₄. Test experiments have showed that the reaction was best performed using Pd(PPh₃)₄ and 2-(2,6-dimethoxybiphenyl)dicyclohexylphosphine (S-Phos) as ligand in toluene at 70°C, affording compound **11** in good yield (Scheme 2, route b).

There are several protocols published in the literature showing the use of Sonogashira reaction. We have selected to react **9g** with phenylacetylene in the presence of PdCl₂(PPh₃)₄ and CuI in DMF at room temperature and the desired product **12** was obtained in a very good yield (90%).

With successful introduction of substituents at the *para*-position of benzene at C-5 of the lactone ring, a different approach was considered in order to elaborate the modifications at positions 5 and 6. As illustrated in Scheme 3, a strategy for the synthesis could involve the aldol condensation of the ethyl acetate **13** with acrolein to afford allylic alcohol **14** with excellent yield. The next step was the formation of β -ketoesters **15** and **16** through Heck reactions by the treatment with two different iodobenzenes (C₆H₅-I and *p*-OMeC₆H₄-I,

respectively). In some cases, the isomerisation is considered undesirable but this one with allylic alcohol **14** proved to be an elegant shortcut to carbonyl compounds,^{14,18} which leads to the formation of new bond carbon-carbon in good yield. Then, the transformation of **15** and **16** into 4-oxo-lactones **17h-l** was accomplished by aldolisation/cyclisation reaction under basic conditions with different aldehydes, but in relatively low yields (Table 2). The low yields obtained for **15** and **16** (Table 2) suggested that the presence of the group CH₂CH₂Ph was bulky enough to disturb the formation of the dianion. Compounds **17h-l** were obtained in a diastereoisomers *cis* and *trans* mixture (40:60, determined by ¹H NMR in a crude product). However, only in the case of **17h** and **17i** separation of *cis* and *trans* isomers have been carried out.

Scheme 3

Table 2

The last series in which that is a substitution in all positions of the oxo-lactone ring was prepared in good yield by the reaction of allylic alcohol **19** with different aldehydes (Scheme 4). The key step was the aldol reaction through a Nickel-Mediated tandem reaction as discussed bellow. The synthesis started with the aldolisation between ethyl isobutyrate **18** and acrolein to furnish the allylic intermediate **19** with excellent yield. With **19** in hand, the proclivity of this allylic alcohol for aldolisation in the presence on Nickel hydrides was probed. The Nickel hydrides can be attractive catalysts, since they can be prepared from nickel dichloride precursors bearing a large variety of ligands, including chiral nonracemic derivates. In fact, one of our research group¹⁹ has demonstrated that the [NiHCl-(dppe)]/MgBr₂ combination is a very active catalytic system for the tandem isomerization-aldolisation reaction of allylic alcohols with aldehydes. Therefore, we utilized this source of Nickel hydrides for the successful synthesis of the intermediates **20m-p**. The conversion of

these intermediates into δ -valerolactones **21m-p** was easily performed by heating in the presence of *p*-TSA in toluene at 80°C as a mixture of *trans* and *cis* stereoisomers (Table 3). The configurational assignments of these diastereoisomers were based on ¹H NMR chemical shifts and coupling constants of the protons at the lactone ring junction (see experimental).

Scheme 4

Table 3

Biology

The cytotoxicity assay is a good first step, a rapid and cost-effective tool to help choose an optimal candidate a lead compound. In this work, we have evaluated the potential cytotoxicity of valerolactones **8a-g**, **9a-g**, **10**, **11**, **12**, **17h-l** and **21m-p** against two human melanone cell lines: A375-M and B16 and against the human normal keratinocytes HaCaT. The results are tabulated and compared to standard drug cisplatin data.

According to the results, the valerolactones did not affect the cell viability for most of the compounds even at 100 μ M (see experimental). Among the 26 valerolactones tested on the three cell lines, 5 of them exhibited moderate cytotoxic activity (Table 4) on HaCaT and A375M cell lines compared with the positive control cisplatin. These 5 compounds were more active on human keratinocytes (HaCaT) than on the other cell lines in which confer a more specificity against this cell line (**8g**>**8f**>**17j**>**12**>**9g**). Among them, **8g** was the most active compound especially on HaCaT cells and could be a potential candidate as a lead compound according to NCI criteria.²⁰

Table 4

It is difficult to establish a complete structure-activity relationship study but some remarks could be suggested in series 1. The structures with iodine (**8g**, **9g**), bromine (**8f**) or 2-phenylethynyl on *para*-position of the 6-phenyl ring (structure **12**) exhibited a higher activity. Moreover, comparing **8f**, **8g**, **9f** and **9g**, it can be observed that the substitution at carbon 4 with an hydroxyl enhanced the cytotoxic effect and, especially on keratinocytes compared to the corresponding 4-methoxy-substituted derivatives (**8f**>**9f** and **8g**>**9g**).

Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that transition metal catalyzed reactions can be very useful for the synthesis of the three series δ -valerolactones designed for these studies. Among the 26 valerolactones tested on the three cell lines, 5 of them exhibited a moderate cytotoxic activity. In such cases, further investigation is required to determine the anticancer potentiality of the valerolactones synthesized. Long-term objectives have been studied in order to establish structure-activity relationships (SAR) for such lactones, mainly regarding cytotoxicity and analgesic properties. Corresponding studies will be reported in due course.

Acknowledgments

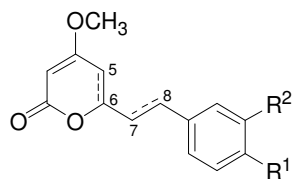
This work was supported by CAPES/COFECUB project 418/03 and CNPq. The authors thank Centre Régional de Mesures Physiques de L'Ouest (CRMPO) in Rennes (France) for performing the HRMS analyses.

References

1. Singh, Y. N. *Ethnopharmacol.* **1983**, 7,3, 267-276.
2. PDR for herbal medicines. 2 .th ed. Montvale, N.J: Medical Economics Company, 2000. 858 p.
3. (a) Keledjian, J.; Duffield, P. H.; Jamieson, D. D.; Lidgard, R. O.; Duffield, M. *J. Pharm Sci.* **1988**, 77, 1003-1006; (b) Backhauss, C.; Krieglstein, J. *Eur J. Pharmacol.* **1992**, 215, 265-269; (c) Gleitz, J.; Friese, J.; Beile, A.; Peters, T. *Eur J. Pharmacol.* **1996**, 315, 89-97.
4. McLaughlin, J.L; Chang C; Smith D.L, In human MEDICINAL Agents from Plantes; Khinghorn A.D Balandrin, M Eds American Chemical Society:Washington D.C, **1993**. 112-137.
5. (a) Gesson, J.P, Jacquesy, J.C, Mondon, M. *Tetrahedron.* **1989**, 45, 2627-2640. (b) Ueno, Y, Tadano, K. I, Ogawa, S, McLaughlin, J. L, Alkofahi, A. *Bull Chem Soc Jpn*, **1989**, 62, 2328-2337.
6. Cao, S. G; Wu, X.H.; Sim, K. Y.; Tan, B. K. H.; Pereira, J. T.; Goh, S. H. *Tetrahedron.* **1998**, 2143-2148.
7. Bermejo A, Léonce S, Cabedo N, Andreu I, Caignard DH, Atassi G, Cortes D. *J. Nat Prod* 1999, 62, 1106-1109.
8. Cuperly, D.; Petrignet, J.; Crévisy, C.; Grée, R. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 3261-3274 and references therein.
9. Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 874-922.
10. Boucard, V.; Brustal, G.; Campagne, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2, 225-236.
11. Amaral, P. A.; Bergold, A; M.; Eifler-Lima, V. L.; Santos, E.; Oliveira, E. R.; Campos-Buzzi, F.; Cechinel-Filha, V; *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, 8, 68-75.
12. Amaral, P. A.; Gouault, N.; Eifler-Lima, V. L.; David, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 47, 6607-6609.
- 13.(a) Felpin, F-X.; Ayad, T.; Mitra, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2679-2690. (b) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 36, 3437-3440.
14. Beletkaya, I. P.; Cheprakov. A. V. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 3009-3066.
15. (a) Dickinson, J.M. *Nat Prod. Reports.* **1993**, 71-98. (b) Boucard, V.; Broustal, G.; Campagne, J.M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2, 225-236.
16. Millot, M.; Tomasi, S.; Articus, K.; Rouaud, I.; Bernard, A.; Boustie. J. *J. Nat. Prod.* **2007**; 70, 2; 316-318.
17. Carey, F.A.; Sundberg, R. J. In *Alkylation of Nucleophilic Carbon Intermediates*; 4 Ed.; New York: Plenum Press, 2001, Part B, pp 23-28.
18. Van der Drift, R.C.; Bouwman, E.; Drent, E. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 650, 1-24.

19. Nerurkar, P. V.; Dragull, K.; Tang, C-S. *Toxicol. Sci.* **2004**, 79, 106-107.

20 Abbott, B. J. *Can. Treat. Rep.* **1976**, 60, 8, 1007-1009.



	Kavalactones	R ¹	R ²	C5-C6	C7-C8
1	Kavain	H	H	-	=
2	Methysticin	OCH ₂ O		-	=
3	Desmethoxyyangonin	OCH ₂ O		=	=
4	Dihydrokavain	H	H	-	-
5	Dihydromethysticin	OCH ₂ O		-	-
6	Yangonin	OCH ₃	H	=	=

Figure 1: General structure for Kavalactones and the most representative derivatives isolated from *P. methisticum*.

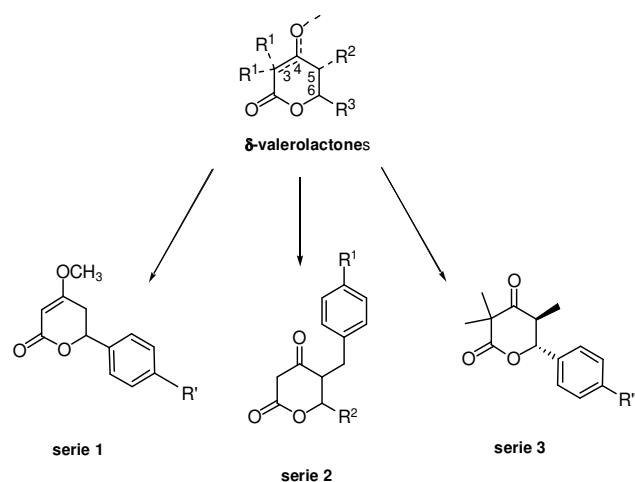


Figure 2: General structure of the targets compounds.

Table 1. δ -lactones **9a-g** produced via Scheme 1

Entry	R	8 (yield %)	9 (yield %)
a	-CH=CH-Ph	90	80
b	-Ph	86	76
c	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	53	66
d	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	70	75
e	<i>p</i> -CN-C ₆ H ₄	76	60
f	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	40	74
g	<i>p</i> -I-C ₆ H ₄	33	73

Table 2. Synthesis of the 4-oxo-lactones substituted (17) via Scheme 3

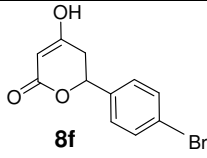
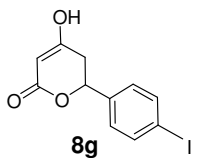
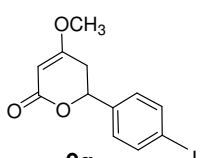
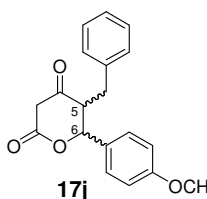
Entry	R ¹	R ²	Configuration	Yield %	mp ^a (°C)
17h	H	Ph	<i>Cis</i>	14	96-100
17i	H	Ph	<i>Trans</i>	20	96-100
17j	OCH ₃	Ph	<i>Trans</i>	30	100-115
17k	H	OCH ₃	<i>Trans</i>	30	102-116
17l	H	CH(CH ₃) ₂	<i>Trans</i>	31	131-133

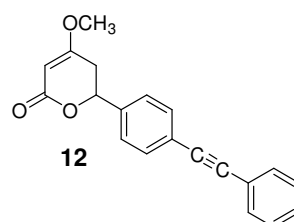
^aThe products mp.(°C) for decomposition.

Table 3. δ-lactones **21m-p** produced via Scheme 4

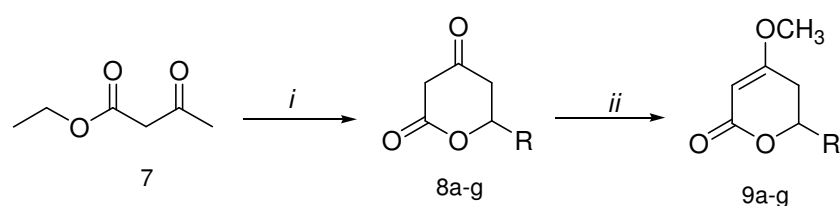
Entry	R	Ratio <i>cis:trans</i>	21 (yield %)
m	-Ph	25:75	70
n	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	20:80	60
o	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	13:87	60
p	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	13:87	65

Table 4. Cell growth inhibition of the most active compounds on the three cell lines HaCaT, A375M and B16. The MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of the compounds.

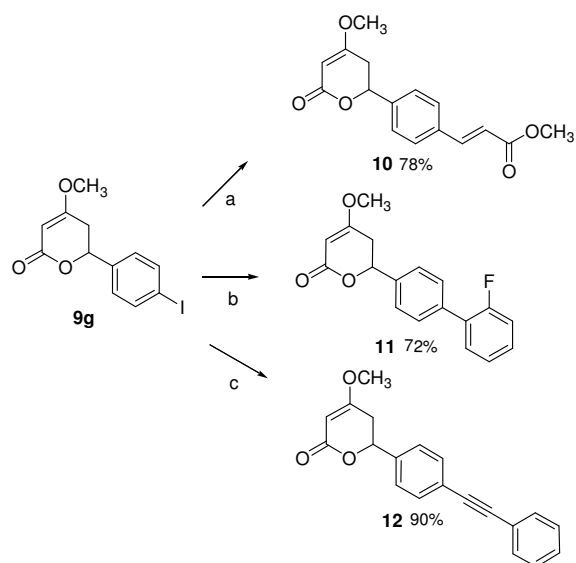
Compounds	IC ₅₀ on HaCaT (μM)	IC ₅₀ on A375M (μM)	IC ₅₀ on B16 (μM)
 8f	60 ± 10	> 100	> 100
 8g	29 ± 6	65 ± 10	>100
 9g	> 100	90 ± 8	>100
 17j	68 ± 11	102 ± 10	>100

	88 ± 12	>100	>100
Cisplatin	3 ± 1.5	8.5 ± 4.9	14 ± 3

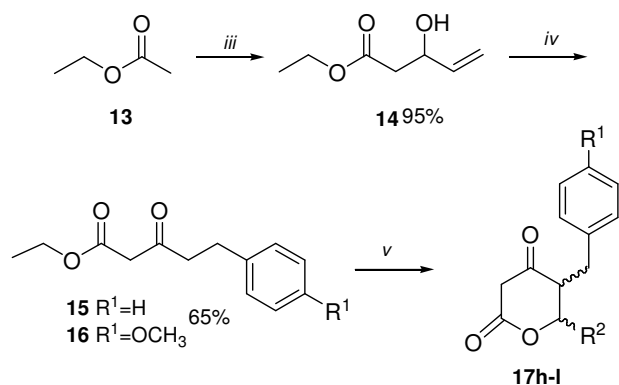
The IC₅₀ value, relative to untreated control, represents the concentration that inhibited cell viability by 50%.



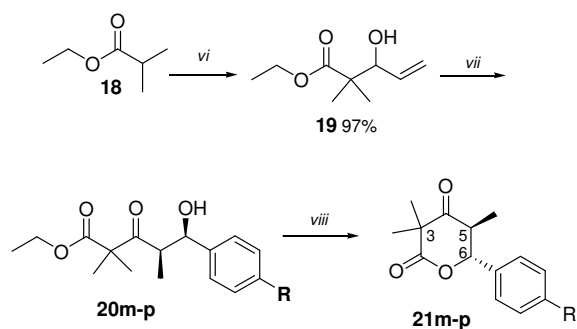
Scheme 1. Serie I/I – Reagents and conditions: (i) (a) C₆H₁₅N, *n*-BuLi, THF 0°C, RCHO (b) H₃O⁺; (ii) acetone rt, K₂CO₃, (CH₃)₂SO₄.



Scheme 2. Serie I/II - Reagents and conditions: (a) H₂C=CHCO₂CH₃, NEt₃, Pd(PPh₃)₄, DMF 80°C; (b) (OH)₂B-*o*-F-C₆H₄, Pd(OAc)₂, S-Phos, Toluene 70°C; (c) HC≡C-Ph, *i*Pr₂NEt, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, DMF rt.



Scheme 3. Serie II - *Reagents and conditions:* (iii) H₂C=CHCHO, C₆H₁₅N, *n*-BuLi, THF -78°C; (iv) *p*-R¹-C₆H₄-I, NaHCO₃, NBu₄Br, Pd(OAc)₂, DMF 60°C; (v) R²CHO, C₆H₁₅N, *n*-BuLi, HMPA, THF -78°C, H₃O⁺



Scheme 4. Serie III - *Reagents and conditions:* (vi) H₂C=CHCHO, C₆H₁₅N, *n*-BuLi, THF -78°C; (vii) *p*-R-C₆H₄CHO, NiCl₂, MgBr₂, LiBH(Et)₃, THF -50 °C – rt; (viii), *p*-TSA, toluene 80°C.

**CHAPITRE V – *EVALUATION DE L'ACTIVITE
ANTIINFLAMMATOIRE***

1. Introduction

Dans ce Chapitre nous allons parler des résultats sur les évaluations anti-inflammatoires réalisées pour les valérolactones synthétisées aux cours de ce travail de thèse. Alors nous avons eu de bons résultats à propos de la douleur, mentionnée dans le **Chapitre I**, donc nous avons-nous intéressé par ce test biologique car le douleur être lieu au développement de l'inflammation

Les kavalactones sont étudiées par l'inhibition de Factor de Nécroses Tumoral (TNF). La réponse immunisée contre des inflammations dépend d'une réponse négociée par des cellules, dont l'interaction de lymphocytes et les monocytes culminent avec la production de médiateurs pro et d'anti-inflammatoires. Parmi des cytokines engagées, le facteur de nécrose de tumoral alpha (TNF- α) a été bien caractérisé comme une des molécules le plus important dans la promotion de la réponse inflammatoire.

La réaction inflammatoire est un phénomène de défense non spécifique répondant à une agression. Elle est responsable d'un syndrome à la fois clinique, et biologique. Toutes les causes d'agression cellulaire peuvent déclencher une réaction inflammatoire. Les agents initiateurs le plus souvent rencontrés sont : l'hypoxie, les agents physiques, chimiques et microbiens ou les maladies auto-immunes.

Lors de la réaction inflammatoire, les cellules de l'inflammation vont être activées :

- Cellules sanguines circulantes (lymphocytes, monocytes, basophiles, plaquettes, polynucléaires éosinophiles et neutrophiles).
- Cellules résidentes tissulaires (macrophages, mastocytes, plasmocytes, fibroblastes, cellules endothéliales).

Ces cellules vont sécréter et libérer des médiateurs de l'inflammation dont les cytokines.

Les principales cytokines de l'inflammation sont : les interleukines IL-6 et IL-1, l'interféron, le TGF β et le **TNF α** que nous doserons au cours de nos tests biologiques.

Les traitements anti-inflammatoires actuels appartiennent à différentes classes thérapeutiques.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), dont le chef de file est l'acide acétylsalicylique (AAS), est une classe hétérogène constituée par des produits de structure chimique différente. Ils ont en commun un ensemble de propriétés pharmacologiques : anti-inflammatoire, antalgique, antipyrétique, et antiagrégants plaquettaires. Cependant ils présentent un risque thérapeutique du fait d'effets secondaires importants : toxicité gastrique élevée et risque d'ulcères impliquant l'action sur la synthèse des prostaglandines.

Des études récentes ont montré l'intérêt des inhibiteurs de phosphodiesterases de type IV (rolipram) dans le traitement de l'inflammation¹. Toutefois, ils présentent des effets indésirables similaires à ceux des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Les corticoïdes, dont la dexaméthasone, forment une autre classe thérapeutique. Ils sont très efficaces contre l'inflammation. En contrepartie, un risque thérapeutique élevé apparaît en cas de traitement prolongé. De nombreux effets indésirables sont à surveiller au cours d'une corticothérapie: œdème, hypertension, glycosurie, hyperglycémie, signes d'infection intercurrente.

Les nombreux effets indésirables observés avec les classes thérapeutiques existantes montrent l'intérêt de développer de nouvelles molécules avec une activité anti-inflammatoire mais présentant un meilleur profil thérapeutique (moins d'effets indésirables).

Hashimoto et al.² ont isolé six kavalactones connus et soumis à l'analyse de dégagement de TNF- α (facteur- α de nécrose de tumeur) des cellules BALB/3T3 traitées

avec de l'acide okadaic, un instigateur de tumeur. Yangonine **15** et deméthoxyyangonine **17** TNF- α release sensiblement empêché avec les valeurs IC₅₀ = 40 μ M et 17 μ M un pouvoir aussi grand que (-) - gallate d'epigallocatechin (EGCG) d'isolement dans l'extrait vert de thé.

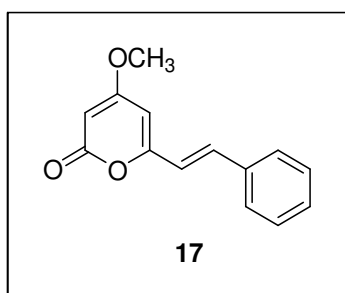


Figure 5.1: Deméthoxyyangonine **17**

Plus récemment Folmer et al³ ont étudié les mécanismes moléculaires induits par des lactones et des chalcones d'isolement dans le kava de Fijian (*Piper methysticum*) utilisé dans la médecine traditionnelle contre des infections d'appareil urinaire et l'asthme. Afin de comprendre les mécanismes de normalisation fondamentaux un élément de réponse de consensus a été réalisé aux concentrations de 320 μ M (flavokavain A), de 175 μ M (flavokavain B) et de 870 μ M (kavaïne **5** et dihydrokavaïne **6**). Les résultats prouvent que, parmi les dérivés examinés de kava, les kavachalcones sont sensiblement plus des inhibiteurs efficaces de l'activation de TNF α , qui donne une nouvelle motivation dans les potentiels pharmaceutiques des chalcones kava-dérivées, car des kavalactones ont été longtemps considérés comme seuls composés bioactive responsables des propriétés pharmacologiques du kava.

Il faut aussi rappeler le travail⁴ sur l'inhibition de la douleur par des δ -valérolactones réalisée par notre équipe de recherche en 2005. Cinq molécules ont été synthétisées et évaluées sur le modèle de douleur connu par l'acide acétique. Les résultats indiquent que les δ -valérolactones présentent un profil intéressant d'action analgésique. Les résultats indiquent que les lactones synthétisées ont montré un effet

antinociceptive important à 10 mg/kg que nous avons administrés en intrapéritonéale chez les souris. Les résultats, tous les composés examinés, **61**, **89**, **90** et **91** a empêché de manière significative les contractions abdominales induites par l'acide acétique, causant des inhibitions de 69,1%, de 90,4%, de 96,1% et de 64,8%, respectivement.

Les médicaments utilisées comme référence, acide acétylsalicylique et acetaminophen, montré moins d'inhibition à la même dose, 35% et 38%, respectivement (Fig (5.2)).

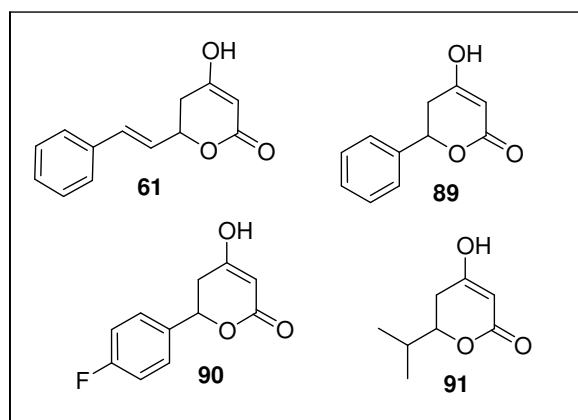


Figure 5.2 : δ -valérolactones

2. Données expérimentales d'évaluations anti-inflammatoire*

Les tests ont été effectués chez quatorze patients de type Caucasiens, âgés entre 42 et 86 ans, atteints de BPCO (stade I, II et III) avec une altération des volumes respiratoires définie par un VEMS de $59 \pm 20\%$ et une FVC de 83% de la valeur prévue, selon le critère Gold4.

* Cette partie du travail a été réalisée dans le laboratoire INSERM U620 sous la responsabilité du Dr Corinne Martin-Chouly.

Trois tubes de sang pour chaque patient atteint de BPCO ont été prélevés au sein du service de pneumologie du CHU de Rennes (Hôpital Ponchaillou) Ce travail a été soumis à la comite d'éthique de l'Université.

Le sang, conservé à température ambiante, est collecté dans un tube de 50 ml et distribué dans une plaque de culture 96 puits: 250 µL par puits. Le sang est ensuite mis à incuber pendant 30 min à 37 °C et 5% de CO₂. Les valérolactones à tester ainsi que les produits de référence (dexaméthasone et rolipram) sont préparés à différentes concentrations (0,01 à 30 µM) puis un volume de 25 µL est déposé par puits selon le schéma de plaque et la concentration testée. Les puits sans produits contiennent le même volume d'une dilution de DMSO correspondante à la concentration de produits testée la plus forte (30 µM). La microplaque est mise à incuber pendant 1 heure à 37°C et 5% de CO₂.

Le sang est ensuite stimulé par le LPS d'Escherichia coli. Un volume de 25µl de LPS à 50 µM est ajouté dans les puits stimulés ou de véhicule (NaCl 0,9%) dans les puits non stimulés. La microplaque est ensuite incubée pendant 24 heures à 37°C et 5% de CO₂.

Le lendemain, les plasmas surnageant sont récupérés dans des microtubes et congelés à – 20°C pour analyses ultérieures du taux de TNF-α par test ELISA.

2.1. Principe et méthode de l'évaluation biologique anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire d'agents pharmacologiques est classiquement étudiée *in vivo* chez des souris auxquelles du LPS (Lipopolysaccharide) est administré ou, *in vitro* sur divers modèles cellulaires impliquant des cellules inflammatoires incubées en présence de LPS. Le LPS est un extrait de la paroi de bactérie gram négative telle qu'Escherichia Coli. Il est donc utilisé pour induire une inflammation. Les marqueurs inflammatoires peuvent alors être dosés. Ouaged et coll^{1b} ont utilisé ce modèle *in vitro* sur du sang total de volontaires sains et de patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Ils ont montré que le sang des

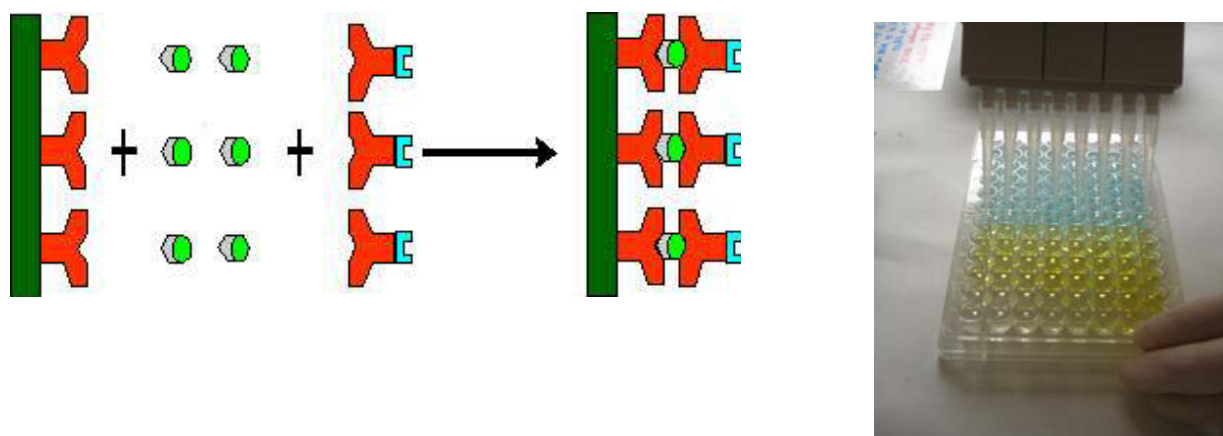
patients atteints de BPCO était plus sensible aux traitements anti-inflammatoires tels que les glucocorticoïdes et les inhibiteurs de phosphodiesterase de type IV.

Nous avons donc choisi d'utiliser cette méthode où l'activité anti-inflammatoire des composés est évaluée par leur capacité à inhiber la production de TNF- α induite par le LPS dans du sang total de patient atteints de BPCO. Le dosage du TNF- α est réalisé par un test ELISA (R&D systèmes, France).

2.2. Généralités sur le test ELISA

Le test ELISA est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser un antigène (TNF- α) dans un liquide biologique (le plasma). La technique de dosage utilisée pour cette étude est la technique dite "en sandwich" (Fig. 6.3), les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée « *coating* », l'anticorps de capture (b) se fixe au plastique des puits d'une microplaque 96 puits (a) par interactions électrostatiques. L'anticorps de capture assure la spécificité du test. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et si l'antigène (c) recherché est présent il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture. Un deuxième anticorps, l'anticorps de détection (d), capable de se lier à l'antigène capturé est alors ajouté dans le puits et les anticorps de détection non fixés sont éliminés par rinçage.

L'anticorps de détection est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré (jaune). La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène puisque le nombre de molécules d'anticorps de détection fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes immobilisées par l'anticorps de capture.



- a : puits de la microplaque
- b : anticorps de capture
- c : antigène (TNF- α)
- d : anticorps de détection
- e : microplaque 96 puits

Figure 6.3 : Principe de la technique du test ELISA en « sandwich »

3. Résultats et discussion sur l'évaluation anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des produits testés est évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la production de TNF- α induite par le LPS. Lorsque cela est possible la CI_{50} est calculée. La CI_{50} représente la concentration de produit qui inhibe 50 % de la production de TNF- α induit par le LPS. Elle permet de comparer la puissance inhibitrice des produits vis-à-vis de cet effet inflammatoire.

Deux séries de produits ont été testées : la série 1 et la série 1/II.

La série 1 comporte 2 diversités : R en position 4 et R¹ substituant en *para* du groupement phényle placé en 6 du cycle lactone (Fig. 5.4 ; Tab. 5.1).

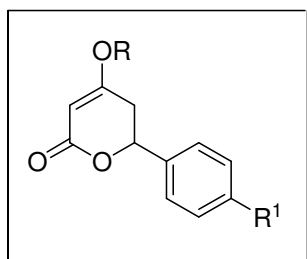


Figure 5.4 : Série 1

 Tableau 5.1: Pourcentage d'inhibition du TNF- α par les produits de la série 1

Produit	R	R ¹	% d'inhibition du TNF- α à 30 μ M (nombre de patients)
89	H	H	-13,07 \pm 15,86 (n=3)
90	H	F	-21,53 \pm 26,13 (n=3)
129	H	CN	3,99 \pm 4,31 (n=4)
130	H	OCH ₃	22,43 \pm 10,37 (n=6)
131	CH ₃	F	-17,6 (n=1)

La série 1/II (Fig. 5.5, Tab. 5.2) est la série proche des kavalactones naturelles avec un substituant R en position 4 et en 6 un motif aryléthylène portant R¹ et R². Il s'agit des lactones **61**, **5**, **145**, **19** et **12**.

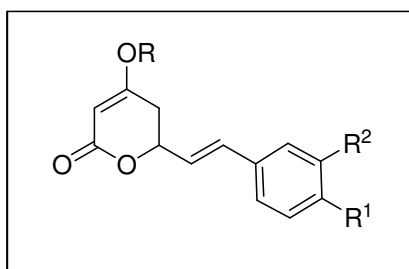


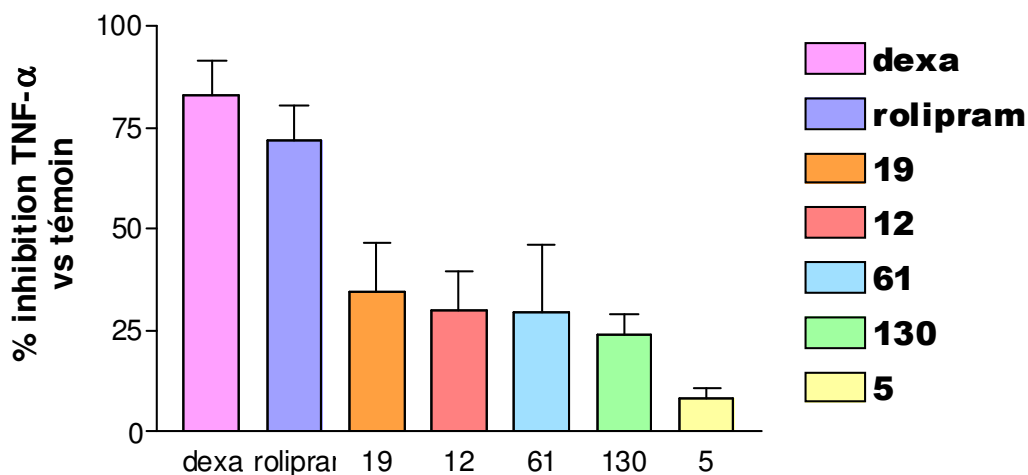
Figure 5.5 : Série 1/II

Tableau 5.2 : Pourcentage d'inhibition du TNF- α par les produits de la série 1/II

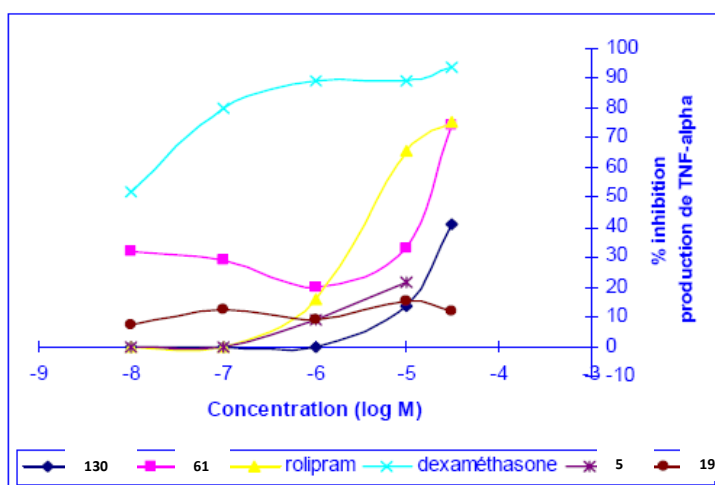
Produit	R	R ¹	R ²	% d'inhibition du TNF- α à 30 μ M (nombre de patients)
61	H	H	H	40,50 \pm 27,24 (n=5)
5	CH ₃	H	H	8,11 \pm 2,57 (n=2)
132	CH ₃	F	H	3,90 \pm 6,89 (n=3)
19	CH ₃	OCH ₃	H	11,91 \pm 2,98 (n=3)
12	CH ₃	O-CH ₂ -O		16,03 (n=1)

A la concentration de 30 μ M, seuls les produits **130**, **61**, **19** et **12** montrent une activité inhibitrice intéressante, avec un effet plus marqué du produit **61** avec lequel on observe 40,5% d'inhibition (Graph. 5.1). De plus, la dexaméthasone et le rolipram inhibent fortement la production de TNF α de 83,1% et 72,2% respectivement.

Les autres produits testés ne montrent pas d'effet inhibiteur reproductible vis-à-vis de la production de TNF- α induite par le LPS dans le sang total de patients atteints de BPCO (Graph. 5.1 et 5.2).



Graphique 5.1 : Pré-trétement avec les composés **130**, **61** et **19** ont résulté un modérée inhibition de TNF- α de $22,4 \pm 10,4$ % (n=3), $40,5 \pm 27,4$ % (n=3) et $11,9 \pm 2,9$ % (n=3) respectivement, comparé aux dexaméthasone ($83,1 \pm 8,4$ %, n=4) et rolipram ($72,2 \pm 8,5$ %, n=2).



Graphique 5.2 : Inhibition du TNF α induit par le LPS (50 μ M) en fonction des différentes concentrations en produits.

Selon le graphique 5.2, la CI_{50} (concentration inhibant 50 % de l'effet) des produits **130**, **5** et **19**, ne peut pas être calculée, elle est supérieure à la concentration maximale utilisée 3×10^{-5} M. Il en est de même pour la dexaméthasone dont la CI_{50} est inférieure à 10^{-8} M.

Les CI_{50} du produit **61** et du rolipram sont respectivement de $5,9 \times 10^{-5}$ et de $5,8 \times 10^{-6}$ M.

Comme l'a précédemment montré l'étude de Ouaged et coll^{1b}, dans le sang total de volontaires sains et de patients BPCO, nous observons que la dexaméthasone et le rolipram inhibe fortement la production de TNF- α induite par le LPS, de 83,1% et 72,2 % respectivement. Parmi les kavalactones, quatre produits apparaissent efficaces avec des pourcentages d'inhibitions variant de 8,1 à 40,5%. Cette première analyse nous permet d'établir un classement par ordre décroissant d'effet anti-inflammatoire *in vitro* : dexaméthasone > rolipram > produit **61** > produit **130** > produit **19** > produit **5**.

Par ailleurs, le calcul de la CI_{50} nous permet de comparer la puissance des produits par rapport à celle de la dexaméthasone et du rolipram. La dexaméthasone reste la plus puissante pour inhiber la production de TNF- α *in vitro* ($CI_{50} > 10^{-8}$ M). Il apparaît que la concentration de produit nécessaire pour obtenir un effet inhibiteur de 50% est supérieure à 3×10^{-5} M pour trois des produits les plus efficaces. Cependant, la puissance du produit **61** est proche de celle du rolipram et n'est que 10 fois inférieure à celle-ci.

Parmi les kavalactones testées dans cette étude, le produit **61** apparaît donc comme la kavalactone à la fois la plus efficace et la plus puissante dans l'inhibition de la production de TNF- α induite par le LPS *in vitro*.

En terme de Relations structure/activité les résultats ne nous permettent pas de tirer des conclusions cependant quelques constatations peuvent être émises :

Dans la série 1, le composé **130** avec un substituant $R=CH_3$ et $R^1 = OCH_3$ (Effet électronique : donneur d'électrons) entraîne une inhibition du taux de TNF- α de 22,5%.

Les autres produits ont tous $R = H$. Si $R^1 = F$ (donc très électronégatif) ou H, aucune activité inhibitrice de la production de TNF- α n'est décelée ou on observe une action inverse. Le composé avec $R^1 = CN$ montre une légère inhibition.

Nous ne pouvons pas conclure sur l'effet de la substitution R dans cette série car il faudrait synthétiser de nouveaux produits avec comme substituants : R = CH₃ et R¹ = H, F ou CN ainsi que le composé analogue à **130** avec R = H

Cette série est caractérisée par la présence d'une double liaison entre le motif lactone et le phényle. Trois composés : **61**, **12** et **19** présentent une activité inhibitrice de la production de TNF- α intéressante de respectivement 40,5%, 16,3% et 11,9%.

Le composé **61** avec un substituant R = R¹ = R² = H présente la meilleure activité.

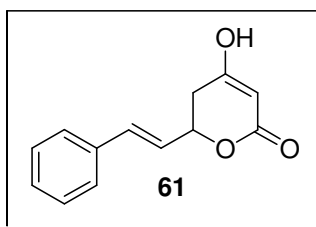
Parmi les composés ayant R = CH₃, c'est le produit **19** avec R¹ = OCH₃ qui a la meilleure activité, vient ensuite le produit **6** avec R¹ = H.

Comme pour la série 1 la substitution R¹ = F (très électronégatif) diminue l'activité du produit **90**.

Le produit **12** avec R¹ = R² = O-CH₂-O semble avoir une bonne activité inhibitrice (16%). Pour pouvoir confirmer ce résultat il faudrait tester ce produit sur d'autres patients.

4. Conclusion

Sur le sang total permettent de souligner l'intérêt thérapeutique éventuel de cette famille de molécules dans le traitement de l'inflammation car les kavalactones testées dans cette étude, le produit **61** apparaît donc comme la kavalactone à la fois la plus efficace et la plus puissante dans l'inhibition de la production de TNF- α induite par le LPS *in vitro*.



Elle est actuellement poursuivie pour confirmée ces résultats obtenu.

5. Bibliographie

1. (a) LAGENTE, V.; MARTIN-CHOULY, C.; BOICHOT, E. ; MARTINS, M.A ; SILVA, P.M. Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2005**, 100 Suppl 1, 131-136. (b) OUAGUED. M.; MARTIN-CHOULY, M.C.; BRINCHAULT, G.; LEPORTIER-COMOY, C.A.; BERTRAND, D.C.; LAGENTE, V.; BELLEGUIC, C.; PRUNIAUX, M.P. The novel phosphodiesterase 4 inhibitor, CI-1044, inhibits LPS-induced TNF-alpha production in whole blood from COPD patients. *Pulm Pharmacol Ther*, **2005**, 18, 49-54.
2. HASHIMOTO, T. ; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; YAMADA, M.; KOHNO, T.; ASAKAWA, Y. Isolation and synthesis of TNF-a release inhibitors from Fijian kava (*Piper methysticum*). *Phytomedicine*, **2003**, 10, 309-317.
3. FOLMER, F.; BLASIUS, R.; MORCEAU, F.; TABUDRAVU, J.; DICATO, M.; JASPARS, M.; DIEDERICH, M. Inhibition of TNF α -induced activation of nuclear factor kB by kava (*Piper methysticum*) derivatives. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 1206-1218.
4. AMARAL, P. A. ; BERGOLD, A. M. ; EIFLER-LIMA, V. L. ; SANTOS, E. ; OLIVEIRA, E. R. ; CAMPOS-BUZZI, F. ; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive effects of some synthetic δ -valerolactones. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, 8, 69-75.

**CHAPITRE VI – *EVALUATION DE L'ACTIVITE
ANALGESIQUE***

1. Introduction

Les lactones sont une classe importante des composés avec un éventail d'activité biologique : inhibition de la biosynthèse de cholestérol¹, antifongique², activité antivirale, antiprotéase³, anxiolytique⁴, anti-inflammatoire⁵ et certaines d'entre elles ont été testées *in vivo* pour une recherche d'activité nociceptive^{6,7}.

La nociception est la sensation éprouvée par un organisme dont le système nerveux détecte un stimulus nociceptif, elle correspond à un signal d'alarme. Les connaissances concernant les voies neurologiques de la douleur sont actuellement en pleine mutation⁸.

Au début du XX^e siècle Sherrington⁹ a développé le concept sur l'expression *nociception*, du Latin *nocere* « le mal ». La complexité des systèmes de modèle de nociception, avec l'intention de produire la douleur, il a augmenté le nombre des méthodes pour obtenir des lésions ou l'aggravation de ces lésions et la responsabilité de mesurer ces expérimentations¹⁰.

Actuellement, il est individualisé par les voies nociceptives ascendantes de la périphérie du corps vers le cortex cérébral en passant par la moelle épinière et les voies de contrôles de la sensation nociceptive partant du cortex cérébral vers la périphérie. Leur but est la modulation de la perception de la douleur dans le sens d'une diminution ou aggravation de la sensation douloureuse. Ces voies nociceptives transmettent l'information du stimulus nociceptif grâce à des mécanismes électro-biochimiques faisant intervenir de nombreuses molécules. Les douleurs surviennent à partir de systèmes complexes. Elles se résument schématiquement aux 3 types suivants : douleurs *par excès de nociception*, douleurs *neurogéniques*, douleurs *psychosomatiques et chroniques*.

En revanche la recherche des molécules pour l'inhibition de la douleur et de leurs mécanismes d'action est tellement expressive quand on constate le nombre de publications vers ces objectifs. Parmi ces travaux on peut trouver des molécules qui

contiennent le noyau lactonique : des lactones à cinq chaînons¹¹, sesquiterpènes¹² et valérolactones¹³.

Notre équipe s'est intéressée à la recherche des molécules du type δ -valérolactones pour poursuivre l'étude en 2005⁷ concernant l'inhibition de la douleur, avec des résultats encourageants pour quelques composés. Cette partie de la thèse décrira les résultats obtenus jusque là*.

2. Données expérimentales d'évaluations analgésique

2.1. Matériel biologique

Nous avons utilisées des souris *Swiss* mâles ou femelles pesant entre 25 à 35 grammes (n = 8 par groupe), acclimatées à la température de 22 °C avec cycle clair/sombre de 12 heures, maintenues dans le local animal central de l'Université de Vale de Itajaí (UNIVALI/Brésil), traitées avec l'eau et ration « *ad libitum* ». Les animaux sont restés dans l'environnement de l'essai au moins 1 h avant la réalisation des expériences pour s'adapter. Ce travail a été soumis au comite d'éthique de l'Université¹⁴.

2.2. Médicaments et solutions utilisées

Les réactifs utilisés ont été de haut degré de pureté analytique, toutes les substances ont été solubilisées dans la solution de saline (NaCl 0,9%) sauf pour certains composés qui ont été dissous à l'aide 5% de Tween® 80 (E. Merck) ou 0,5% de Diméthylsulfoxyde (DMSO).

* Ces résultats ont été réalisés par collaboration avec l'Université do Vale do Itajaí/SC (UNIVALI/Brésil) sous la responsabilité du Dr. Valdir Cechinel Filho et Dr. Fátima Campos-Buzzi.

2.3. Modèle de contorsions abdominales induites par l'acide acétique

Ce modèle de douleur consiste en injections intra-péritonéales d'acide acétique à 0,6%, dilué dans la solution de saline (NaCl 0,9%) avec une dose de 0,15 mL/10 g de poids. Les animaux réagissent à cette stimulation pénible par des torsions de la région abdominale¹⁵. Ces contorsions abdominales consistent en une contraction de la musculature abdominale conjointement avec l'extension d'une des jambes postérieures.

Les groupes de souris ont été préparés avec les composés synthétisés 30 minutes avant la réalisation de l'essai. Le modèle de l'acide acétique est un essai pour douleur **non** spécifique. Le test permet de quantifier les contorsions cumulativement pendant 20 minutes et l'indicateur d'antidouleurs est la réduction de la réponse à la douleur. Le groupe contrôle négatif a reçu comme prétraitement seulement la solution de saline (NaCl 0,9%). Les molécules de référence positive choisies : l'acide acétylsalicylique (AAS®), le paracétamol et le méthamyazole.

2.4. Analyses statistique

Les résultats ont été mesurés par le programme *GraphPad InStat* et sont présentés par comparaison des différences entre les groupes et le groupe contrôle par analyse de variance (ANOVA), puis par test Dunnett's. La valeur de **P** est 0,05 quand $P < 0,05$ est un indicatif de significative (*) et $P < 0,01$ (**).

3. Résultats et discussions

Nous avons étudié l'activité analgésique périphérique test à l'acide acétique. Le principe du test est le suivant : l'injection intra-péritonéale d'acide acétique à 0,6% chez la souris provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractéristiques de type de mouvement d'étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale¹⁶. Ce modèle biologique est très utilisé pour l'analyse de l'activité analgésique de différents types de composés, par contre il s'agit d'un test

préliminaire^{17,18} Tous d'abord le composé est introduit chez la souris. On attend 30 minutes, on administre l'acide acétique et puis le nombre d'étirements est comptabilisé pendant 20 minutes à partir de la première contorsion qui fait suite à l'injection d'acide acétique. Les substances analgésiques provoquent une **diminution significative** de ces contorsions.

Il est clair que pour ce test *in vivo* nous n'avons pas pu tester toutes les molécules. Ainsi, nous avons choisi 8 molécules de la série 1 (**129-135 et 5**) et **2** molécules de la série 3 (**136 et 137**). Notre choix s'est porté en priorité pour les molécules de la série 1, parce que nous voulions continuer la recherche commencée en 2005⁷ ; la quantité en gramme de ces produits était aussi déterminante (Fig. 6.1).

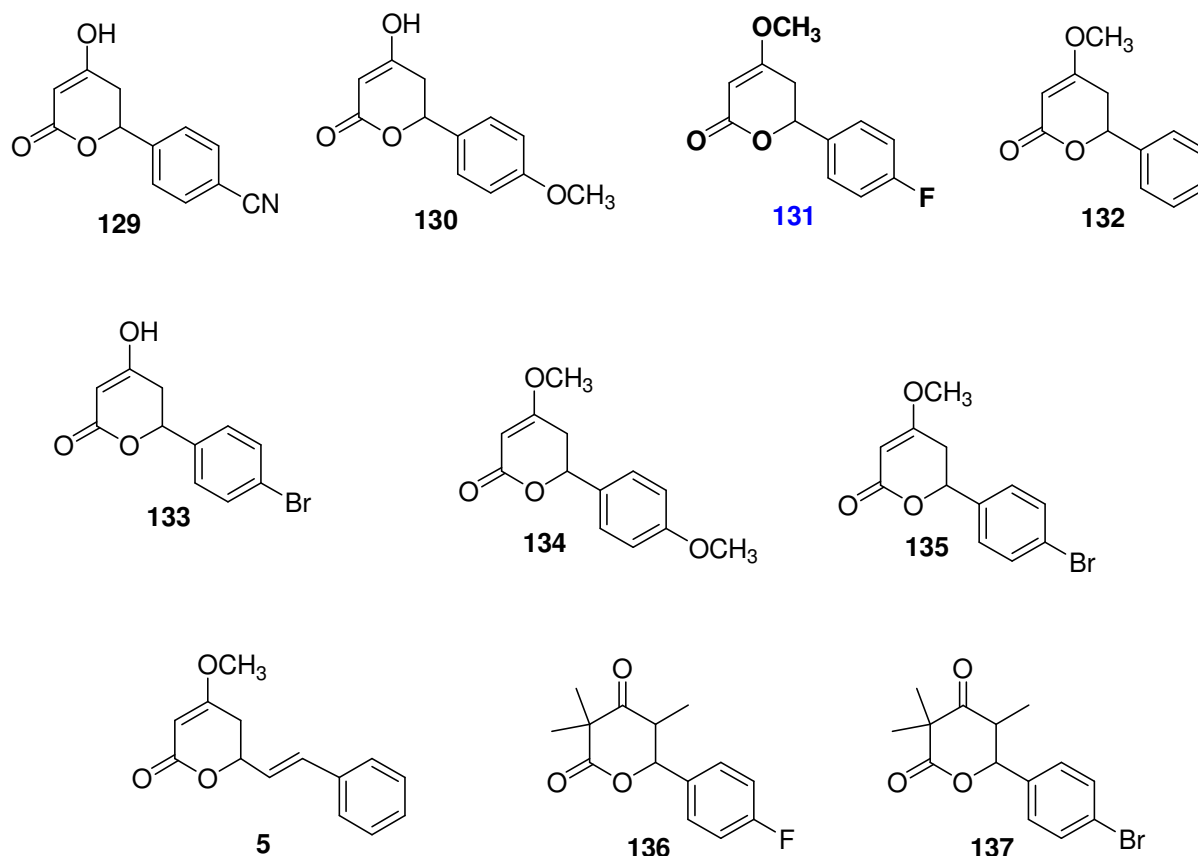


Figure 6.1 : molécules testées pour l'évaluation analgésique

Nous pouvons observer les premiers résultats obtenus avec cette méthodologie. Les composés testés ont inhibé les contorsions abdominales induites

par l'acide acétique, en causant des inhibitions de 32,5 à 69,4% avec la dose de 10 mg/Kg par voie intrapéritonéal, versus 3 composés de référence (Tab. 6.1). Tous ces composée ont été plus actifs que les médicaments de référence acide acétylsalicylique, paracétamol et méthamyzole.

Tableau 6.1 : Activité analgésique des dérivés δ -valérolactones sur le modèle de l'acide acétique 0,6% *via i.p.* dose de 10 mg/kg.

Aucune entrée de table d'illustration n'a été trouvée. Composé	% Inhibition
131	69,4 \pm 4,2**
5	62,0 \pm 4,8**
129	60,6 \pm 4,3**
134	59,8 \pm 3,3**
135	58,0 \pm 3,2 **
137	50,3 \pm 3,8*
133	37,8 \pm 3,3*
132	36,8 \pm 3,3*
136	32,5 \pm 2,8*
130	ns
Référence	% Inhibition
AAS ¹⁹	35,0 \pm 2,0*
PARACETAMOL ¹⁹	38,0 \pm 1,0**
DIPIRONA ¹⁹	33,0 \pm 3,5*

Obs. : Chaque groupe représente une moyenne de 6 expériences. (**p<0.01 e *p<0.05). **ns** : n'est pas significatif.

Il faut rappeler que la molécule avec un motif énoI en position 3,4 du cycle lactonique et un atome de fluor en position para du cycle aromatique s'est montrée la plus active 96,1% lors de la première étude (Fig. 6.2 – composé **90**).

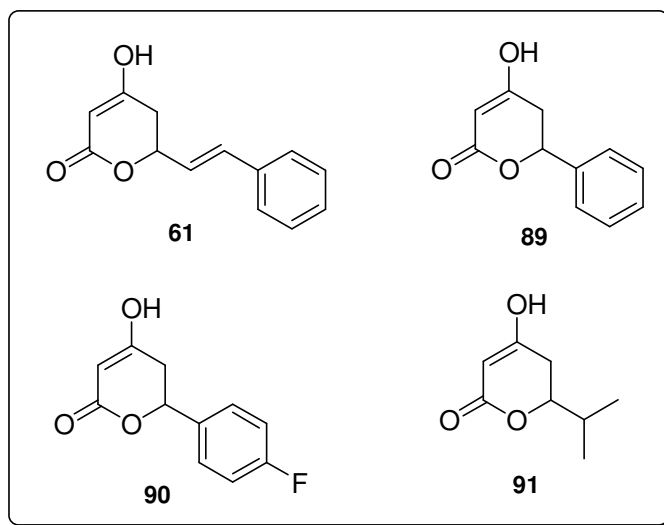


Figure 6.2 : δ -valérolactones testée⁷

Lors de cette 2^{ème} étude les composés testés ont inhibé les contorsions abdominales induites par l'acide acétique avec un pourcentage d'inhibition allant de 32,5 à 69,4% (Tab. 6.1). Il faut noter :

- Aucun produit de cette gamme n'a entraîné une inhibition aussi importante que celle observée avec **90** lors de la première étude ;

- Le composé **132** a présenté le plus fort effet dans la dose de 10 mg/kg, dans ce modèle, il sera analysé dans d'autres modèles de douleur pour la recherche du mécanisme d'action contre la douleur ;

- Il est difficile d'émettre des conclusions concernant les relations structure/activité des différents composés car le nombre des composés est trop faible. Cependant nous pouvons faire quelques observations dans chaque série. Le rôle du substituant en *para* sur le noyau benzénique **131** et **134** ;

- Les meilleurs taux d'inhibition dans cette série 1 sont obtenus avec les composés **129** et les produits méthyles en 4 : **131**, **134** et **135**. Le produit **61** avec une lactone dans sa forme énolique, induit une inhibition de $69,1 \pm 4,5\%$ alors que le composé **5** homologue méthyle présente un taux de $62,0 \pm 4,8^{**}\%$.

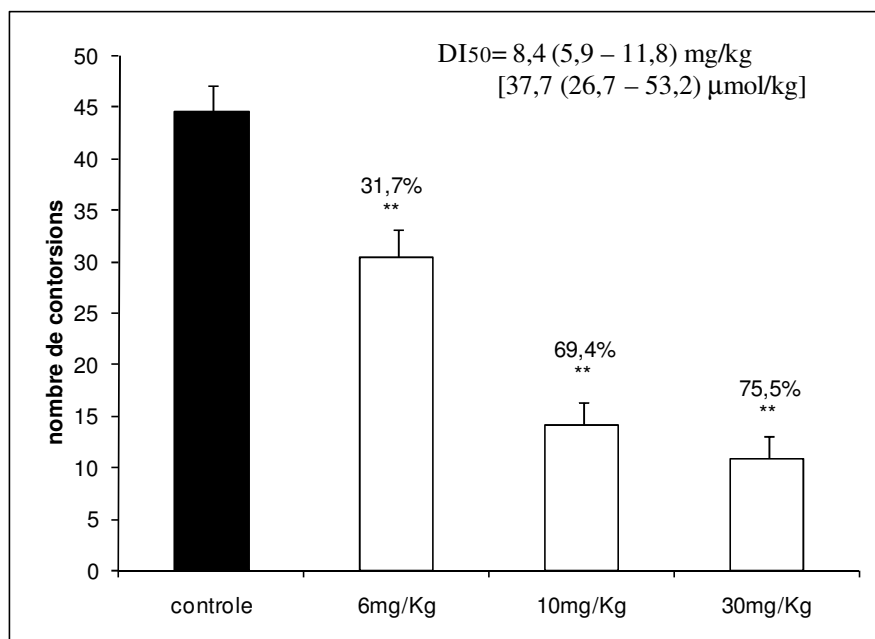
- Série 3 les 2 composés permettent une inhibition moyenne. La structure avec le brome en 4 donne un meilleur résultat **1137** (50%) comparativement à **136** avec un Fluor à la place du brome. La polarité et la nature du substituant sur le cycle aromatique de ces types de molécules peut modifier l'action nociceptive.

- Il serait intéressant pour continuer l'évaluation analgésique afin de pouvoir établir des études de relation structure /activité (RSA) entre les diverses structures chimiques testées.

Afin de comparer le plus actif **131** et le moins actif **136**, il serait nécessaire de synthétiser d'autres δ -valérolactones avec des substituants différents (OH, NH₂) et des orientations ortho et méta sur le noyau aromatique pour évaluer plus précisément l'impact des diverses modulations

Le composé **131** qui contient le groupe fluor dans la position *para* du cycle aromatique ayant présenté le résultat plus intéressant à la dose de 10 mg/kg, administré par voie intrapéritonéal, Il a semblé intéressant de le tester aux doses 6, 10 et 30 mg/Kg pour déterminer la DI₅₀. Cela a présenté un profil dose-dépendant avec des valeurs DI₅₀ 8,4 (5,9 – 11,8) mg/ kg ou 37,7 (26,7 – 53,2) μ mol/kg (Graph. 6.1).

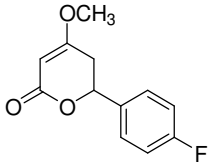
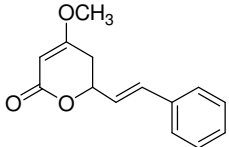
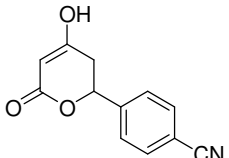
En comparaison aux médicaments références, le composé **131** a été vers 4 fois plus puissant que l'acide acétylsalicylique et le paracétamol qui possèdent la DI₅₀ de 133 (73-243) μ mol/kg et 125 (104-150) μ mol/kg, respectivement et environ 3 fois plus puissant que le méthamyazole) avec une DI₅₀ de 162 (88–296) μ mol/kg.

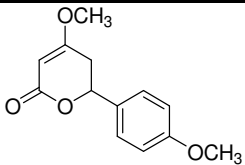
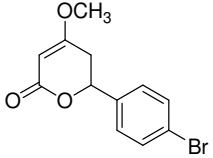
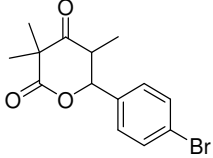
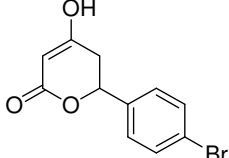
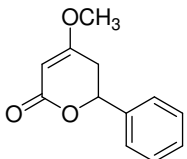
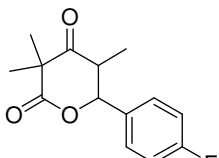
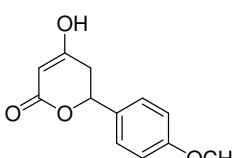


Graphique 6.1 : DI50 de la δ -valérolactone **131** en 3 concentrations 0,6, 10 e 30 mg/kg, vie i.p. dans le modèle de l'acide acétique 0,6 %. Chaque colonne représente une moyenne de 06 expériences. Les valeurs ont été mesuré par (ANOVA) depuis le test Dunnet's suivant comparaison au groupe contrôle (**p<0,01).

Nous avons analysé les propriétés pharmacocinétiques relatives à l'absorption et perméabilité estimée à partir du concept de Lipinski²⁰ (Tableau 6.2).

Tableau 6.2 : Etude théorique de solubilité et perméabilité des δ -valérolactones.

Composé	Cod	MM ^a (g/mol)	CLogP ^b	N+O ^c	NH+OH ^d
	131	222,215	1,57	3	0
	5	230,26	2,16	3	0
	129	215,21	1,83	4	1

	134	234,251	1,46	4	0
	135	283,12	2,21	3	0
	137	311,18	3,50	3	0
	133	269,09	2,88	3	1
	132	204,22	1,40	3	0
	136	250,27	2,86	3	0
	130	220,22	2,13	4	1

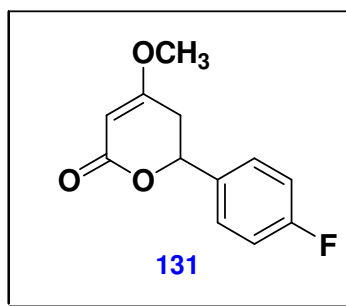
^aMasse Molaire ; ^bLogarithme de coefficient de partition; ^cN et O (accepteurs de liaison hydrogène); ^dNH et OH (donneur de liaison de hydrogène). *Valeurs calculée par le programma Molinspiration.

Le composé **131** sera analysé dans d'autres modèles de douleur pour la recherche des mécanismes d'action contre la douleur, comme par exemple les modèles : capsaïcine, formaline et la plaque thermique.

4. Conclusion

Le travail de recherche à l'interface chimie-biologie présenté dans ce manuscrit avait pour objectif de synthétiser divers analogues dérivés δ -valérolactones et d'évaluer leur activité analgésique dans le but de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques.

Concernant l'aspect biologique, le test *in vivo* sur l'activité analgésique, le produit **131**, a montré la plus forte inhibition avec 69,4% et une DI₅₀ de 8,4 (5,9 – 11,8) mg/ kg ou 37,7 (26,7 – 53,2) μ mol/kg.



Cela représente une diminution de l'activité par rapport l'analogue avec un énol dans la position 4. Cette diminution peut-être lieu au caractère acide des ces valérolactones.

Cette étude est actuellement poursuivie avec le produit le plus efficace et le plus puissant sur un nombre plus important d'expériences afin de confirmer leurs effets inhibiteurs et montrer que ces effets sont statistiquement significatifs.

5. Bibliographie

1. SLISKOVIC D.R.; ROTH B.D.; WILSON M.W.; HOEFLE M.L.; NEWTON R.S. Inhibitors of cholesterol biosynthesis 1,3,5-Trisubstituted[2-(tetrahydro-4-hydroxy-2-oxopyran-6-yl)ethyl]pyrazoles. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 31-38.
2. SKAL TSA, H., LAZARI, D., PANAGOULCAS, C., SOKOVIC, GARCIA, E. B., SOROVIC, M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica* with Antifungal activity. *Phytochem.* **2000**, 55, 903-908.
3. TAIT, B.D.; HAGEN, S.; DOMAGALA, J.; ELLSWORTH, E.; GADJA, C.; HAMILTON, H.; VARA PRASAD, J.V.; GRAHAM, N.; HUPE, D.; NOUHAN, C.; TUMMINO, P.; HUMBLET, C.; LUNNEY, E.; PAVLOVSKY, A.; RUBIN, J.; GRACHECK, S.; BALDWIN, E.; BHAT, T.; ERICKSON, J.; GULNIK, S.; LIU, B. 4-Hydroxy-5,6-dihydropyrone Potent Non-Peptide Inhibitors of HIV Protease. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3781-3792.
4. MAL SCH, U. AND KIESER, M. Efficacy of kava-kava in the treatment of non-psychotic anxiety following pre-treatment with benzodiazepines. *Psychopharmacol.* **2001**, 157, 277-283.
5. Cho, J.Y., Bayk, K.U., Jung J.H. and Park, M.H. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 399-407.
6. Fowler E.M.F. and Henbest, H.B. Researches on Acetylenic Compounds. Part XXV. Synthesis of (\pm)-Kawain. *Chem. Soc.* **1950**, 3642-3645.
7. AMARAL, P.A.; BERGOLD, A.M.; EIFLER-LIMA, V.L.; SANTOS, E.; OLIVEIRA, E.R.; CAMPOS-BUZZI, F.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive effects of some synthetic δ -valerolactones. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, 8, 69-75.
8. LE BARS, D.; OZARIU, M.; CADDEN S. W. Animal Models of Nociception. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 597-652.
9. SHERRINGTON, C. S. Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex and reflex stepping and standing. *J. Physiol.* **1901**, 40, 28-121.
10. WALTERS, M. T. injury behavior and neuronal plasticity: an evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia and analgesia. *Int. Rev. Neurobiol.* **1994**, 36, 325-427.
11. (a) WESOŁOWSKAA, A.; NIKIFORUK, A.; MICHALSKA, K.; KISIEL, W.; CHOJNACKA-WÓJCIK, A. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 107, 254-258. (b) SILVA, R.; SOUZA, G.H.B.; SILVA, A.A.; SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; DONATE, P.M.; ARAÚJO, A.L.S.M.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1033-1037.
12. VALÉRIO, D.A.R.; A., CUNHA, T.M.; ARAKAWA, N.S.; LEMOS, H.P.; A.; DA COSTA, F.B.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI JR, W.A. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 562, 155-163.
13. (a) HEYNEKAMP, J.J.; HUNSAKER, L.A.; VANDER JAGT, T.A.; ROYER, R.E.; DECK, L.M.; VANDER JAG, D.L. Isocoumarin-based inhibitors of pancreatic cholesterol esterase.

Bioor. Med. Chem. **2008**, 16, 5285–5294. (b) Rao, P. N. P.; Amini, M.; Li, H.; Habeeb, A. G.; Knaus, E. E. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 6-Substituted-3-(4-methanesulfonylphenyl)-4-phenylpyran-2-ones: A Novel Class of Diarylheterocyclic Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4872-4882.

14. ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* **1983**, 16, 109-110.

15. COLLIER, R. F. ; DINNEN, H.O.J, JOHNSON, C.A., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J. Pharmacol.* **1968**, 32, 295.

16. SOUZA, M. M. ; DE JESUS, R. A. P. ; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine.* **1998**, 5, 2, 103-107.

17. (a) CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* **1998**, 18, 225-258. (b) OCHI, T.; MOTOYAMA, Y.; GOTO, T. The analgesic effect profile of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 391, 1-2, 49-54. (c) DE JESUS, R. A. P.; CECHINEL-FILHO, V. ; OLIVEIRA, A. E. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine.* **1999**, 7, 2, 111-115.

18. (a) SOUZA, T. M. ; BUZZI-CAMPOS, F. ; CECHINEL-FILHO, V.; HESS, S.; MONACHE, F. D.; NIERO, R. Phytochemical and Antinociceptive Properties of *Matayba elaeagnoides* Rladk. Barks. *Z. Naturforsch.* **2007**, 62c, 550-554. (b) CAMPOS-BUZZI, F.; PADARATZ, P.; MEIRE, A. V.; CORRÊA, R.; NUNES, R. J.; CECHINEL-FILHO, V. 4'-Acetamidochalcone derivatives as potential Antinociceptive Agents. *Molecules.* **2007**, 12, 896-906. FISCHER, L. G. O.; LEITÃO, R., ETCHEVERRY, S. R.; BUZZI-CAMPOS, F.; VÁZQUEZ, A. A.; HEINZEN, H. A.; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic properties of extracts and fraction from *Erythrina crista-galli* (Fabaceae) leaves. *Natural Product Research.* **2007**, 21, 8, 759-766.

19. CAMPOS-BUZZI, F. **Síntese e Atividade Biológica de Imidas Derivadas da 4 – Aminoantipirina**. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

20. LIPINSKI, C. A. ; LOMBARDO, F. ; DOMINY B. W.; FEENEY. P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews.* **2001**. 46, 3-26.

❖ CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail a essentiellement consisté à développer des approches méthodologiques innovantes pour la synthèse de dérivés δ -valérolactones originaux. Le concept de chimie combinatoire, décliné ici sous ses formes "en parallèle" et "supportée" a démontré son efficacité, au travers de ces premiers essais, pour la simplification des étapes de purification dans les processus de découverte de nouveaux composés d'origine naturelle ou inspirés de motifs naturels dans l'optique de découvrir une molécule d'intérêt thérapeutique, réaliser un criblage systématique des librairies constituées.

➤ Chapitre II

L'intérêt de développer une réaction de cyclisation intramoléculaire pour libérer le produit final de son support a été largement démontré par de multiples exemples de la littérature. Au cours de ce travail nous avons exploité cette méthode d'hétérocyclisation-clivage pour la formation δ -valérolactones.

- ✓ La séquence synthétique planifiée a permis d'un point de vue méthodologique de développer les deux premières étapes de la séquence réactionnelle sur phase fluoré. Les conditions de la réaction d'aldolisation suivie de l'hétérocyclisation/clivage (dernière étape) semblent très difficiles à mettre au point et n'ont pas abouti au cycle attendu dans des conditions satisfaisantes.
- ✓ Cette technologie en phase fluoré permet en outre de répondre à certaines exigences d'une chimie de plus en plus à vocation "écologique". Par rapport à la synthèse en phase liquide, le support fluoré permet de minimiser la quantité de solvant nécessaire tant au déroulement de la réaction qu'à la purification des produits, ainsi que de diminuer la quantité de réactifs par rapport à la synthèse sur support solide ou sur polymère soluble.

- ✓ D'autre par, la synthèse sur phase fluoré se présente donc comme une alternative de choix aux autres technologies de synthèse supportée, les rendements et les puretés sont en effet comparables voire supérieurs à ceux obtenus en phase solide. Cependant les problèmes d'aldolisation/cyclisation restaient à résoudre pour donner un rendement maximum et une bonne formation des produits attendus.

➤ Chapitre III

- ✓ Nous avons conçu deux approches pour la préparation des dérivés des kavalactones, une classe des composés avec intéresser des activités biologiques. Davantage de travail pour prolonger le Suzuki-Miyaura interconnectant à une gamme diverse des acides boroniques facilement disponibles avec l'iode acroléine démontrent l'isomérisation *Z* et *E*.

➤ Chapitre IV

- ✓ Nous avons démontré la formation de δ -valérolactones avec la combinaison de complexe-métal, couplage Heck, Suzuki et Sonogashira, sont un système très efficace pour arriver aux dérivées des intéresse thérapeutique de trois séries δ -valérolactones substitués.
- ✓ Si l'on considère qu'une molécule n'est intéressante qu'à partir d'une $CI_{50} < 10\mu M$ seul un composé présente une cytotoxicité modérée sur les lignées cancéreuses B16 et A375M. De ce fait les résultats ne permettent pas de faire des comparaisons de relation structure-activité entre les différentes séries synthétisées.
- ✓ Ces résultats montrent également que la majorité des produits ne présentent pas d'effet cytotoxique sur les kératinocytes humains. Cette constatation peut s'avérer intéressante dans la recherche d'une activité analgésique et/ou anti-inflammatoire.

➤ Chapitre V

- ✓ Sur le sang total permettent de souligner l'intérêt thérapeutique éventuel de cette famille de molécules dans le traitement de l'inflammation car les kavalactones testées dans cette étude, le produit **61** apparaît donc comme la kavalactone à la fois la plus efficace et la plus puissante dans l'inhibition de la production de TNF- α induite par le LPS *in vitro*.
- ✓ Elle est actuellement poursuivie pour confirmée ces résultats obtenu.

➤ Chapitre VI

- ✓ Le travail de recherche à l'interface chimie-biologie présenté dans ce manuscrit avait pour objectif de synthétiser divers analogues dérivés δ -valérolactones et d'évaluer leur activité analgésique dans le but de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques.
- ✓ Concernant l'aspect biologique, le test *in vivo* sur l'activité analgésique, le produit **131**, a montré la plus forte inhibition avec 69,4% et une DI_{50} de 8,4 (5,9 – 11,8) mg/ kg ou 37,7 (26,7 – 53,2) μ mol/kg.
- ✓ Cela représente une diminution de l'activité par rapport l'analogue avec un énoI dans la position 4. Cette diminution peut-être lieu au caractère acide des ces valérolactones.
- ✓ Cette étude est actuellement poursuivie avec le produit le plus efficace et le plus puissant sur un nombre plus important d'expériences afin de confirmer
- ✓
- ✓

leurs effets inhibiteurs et montrer que ces effets sont statistiquement significatifs.

BIOGRAFIA

Dados Pessoais

Currículo *lattes* -

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=P787049>

Nome : Patrícia de Aguiar Amaral

Filiação: Manoel Carlos Amaral e Sônia Vitória de Aguiar

Nascimento: 28.03.1976, Criciúma, SC – Brasil

Formação Acadêmica

1997-2000: Graduação em Farmácia. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC.

2001-2003: Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Programa de Pos-Graduação em Ciências Farmacêutica - UFRGS.

2004-2008 : Doutora pelo Curso de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pos-Graduação em Ciências Farmacêutica – UFRGS (Regime cotutelle CAPES/COFECUB n.418/03).

Produção Científica

Artigos completos publicados em periódicos

AMARAL, P. A.; GOUAULT, N., LE ROCH, M.; EIFLER-LIMA, V. L. DAVID, M. Towards synthesis of kavalactone derivatives. *Tetrahedron Lettes*. **2008**. doi:10.1016/j.tetlet.2008.07.102

AMARAL, P. A.; Bergold, A. M.; SANTOS, E. M.; OLIVEIRA, E. R.; BUZZI, F. C.; CECHINEL FILHO, V.; EIFLER-LIMA, V. L. Antinociceptive effects of δ -valerolactones. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. , v.8, p.69 - 75, **2005**.

ARRUDA, A. M.; ZANETTE, V. C.; ROSSATO, A. E.; AMARAL, P. A. Piper metysticum L. (kava-kava): histórico do uso e aspectos taxonômicos, farmacológicos e toxicológicos. *Pesquisa e Extensão em Saúde*. , p.59 - 68, **2005**.

AMARAL, P. A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V. L. Química Combinatória: Moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.39, p351-363, **2003**.

AMARAL, P. A.; CLAUDINO, T. S.; BERGOLD, A. M.; EIFLER-LIMA, V. L. Aplicação da Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS) para a funcionalização do Éster Acetoacetato. *Caderno de Farmácia - UFRGS*. p.121 - 124, **2001**.

AMARAL, P. A., RATES, S. M. K.; EIFLER-LIMA, V. L. Kava em alerta. *Revista AFARGS- Porto Alegre*. **2002**.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

1999-2007 : 14 resumos publicados em Anais de Congressos

Atuação Profissional

2003-2005: Professora Substituta do Curso de Farmácia-UFRGS. Disciplina: Síntese de Fármacos.

2003-atual: Professora Adjunta do Curso de Farmácia - Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) : 2003-2006-UNESC – 14 orientações concluídas.