

Institut de Chimie Organique
de l'Université de Fribourg (Suisse)

Catabolisme de la chlorophylle *b*

Structures, mécanismes et synthèses

THESE

Présentée à la Faculté des sciences de l'Université
de Fribourg (Suisse)
pour l'obtention du grade
de Docteur ès sciences naturelles

par

PATRICK FOLLY

de

Villarepos (FR)

Thèse N° 1287

Imprimerie St-Paul, Fribourg

2000

Acceptée par la faculté des Sciences de L'Université de Fribourg (Suisse) sur la proposition de M. Dr. N. Engel, M. Prof. Dr. R. Neier (Université de Neuchâtel, Suisse) et de M. Prof. Dr. A. Gossauer président du jury.

Fribourg, le 18 février 2000

Le Directeur de thèse :

Le Doyen :

Dr N. Engel

Prof. Dr B. Hirsbrunner

A Esthel
et à Odette.

Remerciements

Le présent travail a été réalisé sous la direction de M. le Dr. N. Engel, à l'institut de chimie organique de l'Université de Fribourg (Suisse) d'avril 1996 à décembre 1999.

Je remercie le Dr. N. Engel pour son accueil au sein de son groupe, pour son soutien et pour les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de cette thèse. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa grande disponibilité.

Tout ma gratitude va à M. le Prof. Dr. R. Neier pour avoir accepté de lire ce mémoire et pour s'être engagé comme expert lors de l'examen de soutenance.

Je remercie également M. le Prof. Dr. A. Gossauer pour son accueil au sein de son institut. Je lui exprime ma gratitude pour m'avoir permis d'exercer la tâche d'assistant durant toute l'élaboration de ce travail.

Messieurs les Prof. Dr. T. A. Jenny et P. Renaud sont vivement remerciés pour les enrichissantes discussions que nous avons eues lors des séminaires d'institut.

J'adresse des remerciements particuliers à M. F. Fehr pour les mesures de spectroscopie RMN très pointues qu'il a effectuées. Merci également à M. F. Nydegger pour les mesures très poussées de spectrométrie de masse qu'il a entreprises. Je remercie aussi Mme I. Müller pour tous les spectres de masse qu'elle a accomplis.

M. N. Hoyler et Mlles S. Uldry et S. Linder reçoivent toute ma sympathie pour leur disponibilité et pour leur bonne humeur.

J'exprime de vifs remerciements à Fosca Gattoni, Fabrice Levrat et Andreas Salathe pour leur aide et pour la bonne ambiance de groupe à laquelle ils ont contribué.

Je remercie également tous mes collègues et camarades de l'université qui m'ont soutenu pendant l'élaboration de cette thèse.

Enfin, merci à Florence Mabboux et à Fosca Gattoni pour avoir lu et corrigé ce document.

Cette thèse a reçu les soutiens financiers du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique, et des Industries Chimiques Bâloises.

Les abréviations utilisées

AcOET	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
Bch	bactéριοchlorophylle
CCE	chromatographie sur couche épaisse
CCM	chromatographie sur couche mince
Chl	chlorophylle
EtOH	éthanol
HPLC	high performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
LHC	light harvesting complexe (complexe collecteur de lumière)
MPLC	medium performance liquid chromatography (chromatographie liquide à moyenne performance)
MeOH	méthanol
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PSI	photosystème I
PSII	photosystème II
SAM	S-adénosyl-méthionine
THF	tétrahydrofurane

Abstract

Isolation and characterization of a new chlorophyll (chl) catabolite from a *Magnolia* species collected at the Botanical Garden of the University of Fribourg, Switzerland.

A chlorophyll catabolite of *Magnolia hybr. spec. hort.* was isolated and purified. Chemical degradation experiments and mass spectroscopic investigation showed that the new catabolite has a similar constitution as the catabolites previously isolated from *Cercidiphyllum japonicum* and *Brassica napus*. The difference between them appears to be the presence of a glycosylic residue, which is covalently attached to the hydroxy group of the ethyl side chain of the catabolite. A secure elucidation of constitution was hampered by the inherent insolubility of the compound in suitable solvents, which did not allowed to obtain sufficiently resolved NMR spectra.

Experimental proof that in higher plants chl *b* is converted to chl *a* before degradation.

Chl *b* occurs as an accessory pigment of the light harvesting systems in higher plants and green algae, and comprises up to 30% of the total Chls. With the discovery of the Chl *b(a)* interconversion cycle it has been occasionally speculated that in higher plants Chl *b* is converted to Chl *a* before degradation. This work evidences, by high resolution ^1H -, ^2H - NMR and MS-ICR spectroscopic methods, that a significant fraction of the key methyl group of the Chl *a* catabolite becomes mono-deuterium labeled when green barley leaves (*Hordeum vulgare*) are de-greened by permanent darkness in heavy water (80 atom% ^2H). These results indicate that Chl *b* is converted to Chl *a* before degradation *i.e.* the Chl *a* catabolite isolated has emerged from both Chl *a* and Chl *b*. It was surprising to find that exclusively one deuterium atom was incorporated into the methyl-group of the Chl *b* catabolite. This result suggests the involvement of at least two distinguishable redox enzymes. From this result, it was concluded that the cofactor of the first enzyme transfers a hydride ion and that the cofactor of the second one mediates electron(s). The lack of label in the remaining methyl groups of the catabolite confirms, except from Chl *b(a)* conversion, the general assumption that angiosperms form no Chl in the dark.

Chemical synthesis of the corresponding maleimide fragments obtained from the chemical degradation procedure of the chlorophyll catabolites.

This part deals with the partial and total chemical synthesis of the maleimides isolated from the chromic acid degradation products of the above mentioned chlorophyll catabolite. For this purpose, suitable protoporphyrin IX derivatives, 3,4-substituted pyrroles and pyrrol derivatives were synthesized and subsequently treated with chromic acid. Both methods yielded the desired maleimides although, up to now, only in small quantities.

Résumé

L'isolation et la caractérisation d'un nouveau catabolite de la chlorophylle (chl) à partir d'un *Magnolia* cultivé au jardin botanique de l'Université de Fribourg, Suisse.

Un catabolite de la chlorophylle provenant du *Magnolia hybr. spec. hort.* a été isolé et purifié. Des expériences de dégradation chimique et de spectrométrie de masse ont montré que le nouveau catabolite possède une constitution similaire aux catabolites de la chlorophylle déjà isolés à partir de *Cercidiphyllum japonicum* et de *Brassica napus*. La différence entre ces catabolites consiste en la présence d'un résidu glycosylique lié de manière covalente au groupe hydroxy de la chaîne latérale éthyle du catabolite. Une détermination sûre de la constitution du catabolite a été empêchée par l'insolubilité inhérente du composé dans les solvants adéquats, ce qui n'a pas permis d'obtenir un spectre RMN suffisamment résolu.

Démonstration de la conversion de la chl *b* en chl *a* avant dégradation dans les plantes supérieures.

La chl *b* constitue le pigment secondaire du système collecteur de lumière dans les plantes supérieures et dans les algues vertes. Elle représente 30% de la quantité totale de chlorophylle. Avec la découverte d'un cycle d'interconversion chl *a(b)* il a été avancé que dans les plantes évoluées la chl *b* est convertie en chl *a* avant dégradation. Ce travail met en évidence, par spectrométrie à haute résolution RMN-¹H, -²H et de masse, qu'une fraction significative du groupe méthyle clé du catabolite contient un atome de deutérium lorsque les feuilles d'orge (*Hordeum vulgare*) sont placées dans l'obscurité en présence d'eau deutérée à 80%. Ces résultats indiquent que la chl *b* est convertie en chl *a* avant dégradation, ce qui signifie que le catabolite isolé jusqu'ici provient des chl *a* et *b*. Il est surprenant de ne trouver l'insertion que d'un atome de deutérium dans le groupe méthyle du catabolite provenant de la chl *b*. Ceci suggère l'implication d'au moins deux enzymes rédox différentes. De ce résultat, on peut conclure que le cofacteur du premier enzyme transfère un hydrure et que le cofacteur du second utilise un (des) électron(s). L'absence de marquage sur les autres groupes méthyle du catabolite confirme qu'à l'exception de conversion chl *b(a)*, les angiospermes ne forment pas de chlorophylle dans l'obscurité.

Synthèse des maléimides, fragments obtenus lors de la procédure de dégradation chimique de catabolites de la chlorophylle.

Cette partie du travail traite de la synthèse partielle et totale des maléimides isolés lors de la dégradation à l'acide chromique des catabolites de la chlorophylle sus-mentionnés. Pour cela, des dérivés appropriés de la protoporphyrine IX, des pyrroles substitués aux positions 3 et 4, et d'autres dérivés de pyrrole ont été synthétisés et traités avec de l'acide chromique. Bien que les quantités obtenues restent restreintes, les deux méthodes ont fourni les maléimides désirés.

LA PARTIE THÉORIQUE	7
1. LES CHLOROPHYLLES.....	7
1.1. LA NOMENCLATURE.....	7
1.1.1. NUMÉROTATIONS	7
1.2. LA CHLOROPHYLLE A	9
1.3. LA CHLOROPHYLLE B	10
1.4. LES AUTRES CHLOROPHYLLES	11
1.4.1. LES CHLOROPHYLLES C ET D	11
1.4.2. LES BACTÉRIOCHLOROPHYLLES	12
1.4.3. LA BIOSYNTHÈSE DES CHLOROPHYLLES A ET B	12
1.5. LA PHOTOSYNTHÈSE	16
1.5.1. LES RÉACTIONS LUMINEUSES	17
1.5.2. LES RÉACTIONS OBSCURES.....	20
2. LE PHÉNOMÈNE DE LA DÉGRADATION DE LA CHLOROPHYLLE	21
2.1. POURQUOI LA CHLOROPHYLLE EST-ELLE DÉGRADÉE ?.....	22
2.2. LA DÉGRADATION	24
2.3. LES RÉACTIONS DE TYPE I.....	24
2.4. LES RÉACTIONS DE TYPE II.....	28
2.4.1. DANS UN SYSTÈME IN VIVO.....	28
2.4.2. DANS UN SYSTÈME EX VIVO	34
2.4.3. DANS UN SYSTÈME IN VITRO	35
2.4.4. LA RÉGIOSÉLECTIVITÉ	38
2.5. LA PROPOSITION D'UN MÉCANISME DE DÉGRADATION DE LA CHLOROPHYLLE A DANS LES PLANTES.	39
2.6. LA COMPARAISON AVEC LE CATABOLISME DE L'HÈME.....	41
3. LES MALÉIMIDES PROVENANT DES DÉRIVÉS DE LA CHLOROPHYLLE	45
3.1. L'OXYDATION À L'ACIDE CHROMIQUE	45
3.2. L'OXYDATION DE PORPHYRINES ET DE PIGMENTS BILIAIRES	46
3.3. LA SYNTHÈSE DES MALÉIMIDES PROVENANT DES DÉRIVÉS DE LA CHLOROPHYLLE	50
3.3.1. LA SYNTHÈSE DE MALÉIMIDES À PARTIR D'ESTERS DE L'ACIDE ACÉTOACÉTIQUE.....	50
3.3.2. LA SYNTHÈSE DE MALÉIMIDES À PARTIR D'ESTERS DE L'ACIDE CITRACONIQUE OU DE L'ANHYDRIDE CITRACONIQUE.....	51
3.3.3. LA FORMATION DE MALÉIMIDES SUBSTITUÉS PAR OXYDATION DES PYRROLES CORRESPONDANTS	52

LES BUTS	55
4. LA PRÉSENTATION DU TRAVAIL.....	55
4.1. L'ISOLATION D'UN NOUVEAU PRODUIT DE LA DÉGRADATION DE LA CHLOROPHYLLE.....	55
4.2. LE CATABOLISME DE LA CHLOROPHYLLE B	55
4.3. LA SYNTHÈSE DES MALÉIMIDES 101 ET 102	56
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	58
5. LA TENTATIVE D'ISOLATION D'UN NOUVEAU CATABOLITE.....	58
5.1. LE CHOIX DE L'ESPÈCE	58
5.2. LA DÉTECTION DU CATABOLITE.....	58
5.3. L'ISOLATION DU CATABOLITE	60
5.4. LA SPECTROSCOPIE DU CATABOLITE.....	62
5.4.1. LA SPECTROSCOPIE RMN	62
5.4.2. LA SPECTROSCOPIE MS	63
5.5. UNE PROPOSITION DE STRUCTURE POUR LE CATABOLITE ISSU DU MAGNOLIA.	64
5.6. LA TENTATIVE DE CLIVAGE DU DISACCHARIDE	67
6. LA DÉGRADATION DE LA CHLOROPHYLLE B DANS L'ORGE	70
6.1. LA DESCRIPTION DU PROBLÈME.....	70
6.2. LA MISE EN ÉVIDENCE DE LA CONVERSION CHLOROPHYLLE B - CHLOROPHYLLE A	72
6.2.1. LES EXPÉRIENCES DE MARQUAGE IN VIVO AU MOYEN DE DEUTÉRIUM EXPLIQUANT UN MÉCANISME BIOCHIMIQUE RÉPERTORIÉES DANS LA LITTÉRATURE.....	73
6.2.2. LA DESCRIPTION DE L'EXPÉRIENCE DE MARQUAGE IN VIVO	74
6.3. L'ISOLATION DES MALÉIMIDES 101, 102 ET 53A	76
6.3.1. L'ISOLATION ET LA CARACTÉRISATION DE 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (102).....	77
6.3.2. L'ISOLATION ET LA CARACTÉRISATION DE 3-(1,2-DIHYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (101).....	79
6.3.3. L'ISOLATION ET LA CARACTÉRISATION DE L'IMIDE DE L'ACIDE HÉMATINIQUE (53A).....	82
6.3.4. LA CONCLUSION À PROPOS DE L'ISOLATION ET DE LA PURIFICATION DES MALÉIMIDES NATURELS NON- MARQUÉS	83
6.3.5. L'EXPÉRIENCE DE MARQUAGE	84
6.4. L'ISOLATION DES MALÉIMIDES LORS DE L'EXPÉRIENCE DE MARQUAGE.....	85
6.4.1. L'ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE RMN- ¹ H, - ² H DES ISOTOPOMÈRES 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL- MALÉIMIDE.....	85
6.4.2. L'ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE DES ISOTOPOMÈRES 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL- MALÉIMIDE.....	88

6.4.3.	CONCLUSION A PROPOS DES MESURES SPECTROSCOPIQUES DE L'ÉCHANTILLON OBTENU LORS DE L'EXPÉRIENCE DE MARQUAGE.....	91
6.4.4.	LA DIMINUTION DE LA CHLOROPHYLLE DURANT LA SÉNESCENCE.....	91
6.4.5.	LA TENEUR EN DEUTÉRIUM DE L'EAU DURANT LA SÉNESCENCE.....	93
6.5.	LA DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS LORS DE L'EXPÉRIENCE DE MARQUAGE EN CONSIDÉRANT TOUS LES CALCULS.....	96
6.5.1.	LA QUANTIFICATION DE L'INSERTION DE DEUTÉRIUM EN CONSIDÉRANT L'ÉCHANGE H_2O/D_2O	97
6.5.2.	L'INSERTION D'UN SEUL ATOME DE DEUTÉRIUM.....	99
6.5.3.	L'EXCLUSION D'UNE BIOSYNTHÈSE DE NOVO DE LA CHLOROPHYLLE JUSTE AVANT LA DÉGRADATION.....	101
7.	LA SYNTHÈSE DU 3-(1,2-DIHYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (101) ET DU 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (102).....	103
7.1.	LA SYNTHÈSE DES 3-SUBSTITUÉ-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE.....	104
7.2.	LA SYNTHÈSE DU 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (102).....	104
7.2.1.	LE CLIVAGE OXYDATIF D'UN TÉTRAPYRROLE.....	104
7.2.2.	L'OXYDATION D'UN PYRROLE POSSÉDANT LES GROUPES FONCTIONNELS ADÉQUATS.....	107
7.2.3.	LES DEUX APPROCHES UTILISÉES POUR LA SYNTHÈSE DU 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (102).....	111
7.3.	LA SYNTHÈSE DU 3-(1,2-DIHYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (101).....	112
7.3.1.	LE CLIVAGE OXYDATIF D'UN TÉTRAPYRROLE.....	112
7.3.2.	LA SYNTHÈSE D'UN PYRROLE POSSÉDANT LES GROUPES FONCTIONNELS ADÉQUATS.....	115
7.3.2.1.	LES TENTATIVES D'ÉLIMINATION-1,2.....	115
7.4.	LA SYNTHÈSE DU 4-MÉTHYL-3-(1,2-DIHYDROXYÉTHYL)-PYRROLE.....	118
7.4.1.	L'APPROCHE ENVISAGÉE.....	118
7.4.2.	LA SYNTHÈSE DU 3-MÉTHYL-1H-PYRROLE.....	120
7.4.3.	LA SYNTHÈSE DU 3-ACÉTYL-4-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE.....	121
7.4.4.	LA FONCTIONNALISATION DE LA POSITION 3.....	122
7.4.5.	L'ÉLIMINATION DE LA FONCTION TOSYLE.....	123
7.4.6.	PROPOSITION POUR TERMINER LA SYNTHÈSE JUSQU'AU 3-(1,2-DIHYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (101).....	125
7.5.	LA MISE EN ÉVIDENCE DU POTENTIEL DE SYNTHÈSE QUE PERMET CETTE APPROCHE.....	126
7.5.1.	LA SYNTHÈSE DU 3-ÉTHYL-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE.....	126
7.5.2.	LA SYNTHÈSE DU 3-VINYL-4-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE, DU 3-ACÉTYL-4-MÉTHYL-1H-PYRROLE ET DU 3-(1-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE.....	127
7.6.	LA CONCLUSION CONCERNANT LA SYNTHÈSE DES MALÉIMIDES ET DES PYRROLES.....	128

PARTIE EXPÉRIMENTALE	130
8. LES CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES	130
8.1. LES PRODUITS CHIMIQUES.....	130
8.2. LES PROCÉDURES GÉNÉRALES.....	131
8.3. LES APPAREILS DE MESURE	131
8.4. LES DIFFÉRENTS PETITS APPAREILS.....	133
9. L'ISOLATION D'UN NOUVEAU CATABOLITE DANS LES FEUILLES DE MAGNOLIA	134
9.1. PRÉPARATION D'UNE SOLUTION NON CONCENTRÉE EN CATABOLITE	134
9.2. TEST D'OXYDATION EN PHASE AQUEUSE.....	134
9.3. CONCENTRATION DE LA SOLUTION DE CATABOLITE.....	135
9.4. PREMIÈRE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À MOYENNE PERFORMANCE (MPLC).....	135
9.5. ANALYSE QUALITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC) DES FRACTIONS RÉCOLTÉES	136
9.6. CHROMATOGRAPHIE PAR EXCLUSION DE MASSE.....	136
9.7. DEUXIÈME CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À MOYENNE PERFORMANCE (MPLC)	137
9.8. LE DESSALAGE ET LA LYOPHILISATION	137
9.9. LES TENTATIVES DE CLIVAGE DES SUCRES AU MOYEN DE β -GLYCOSIDASE	137
10. L'ISOLATION DES MALÉIMIDES NATURELS MARQUÉS ET NON-MARQUÉS.....	138
10.1. LA CULTURE DE L'ORGE (<i>HORDEUM VULGARE</i>)	138
10.2. LA SÉNESCENCE DE LA CHLOROPHYLLE CONTENUE DANS LES FEUILLES D'ORGE.....	138
10.3. LA DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN DEUTÉRIUM DE L'EAU CONTENUE DANS LE FOND DES RÉCIPIENTS	139
10.4. LE SUIVI DE LA DISPARITION DE LA CHLOROPHYLLE DANS LES FEUILLES DURANT LA SÉNESCENCE.....	139
10.5. L'ISOLATION DU 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (102) À PARTIR DES FEUILLES D'ORGE JAUNIES	140
10.6. L'ISOLATION DU 3-(1,2-DIHYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (101) À PARTIR DES FEUILLES D'ORGE JAUNIES	142
10.7. L'ISOLATION DE L'IMIDE DE L'ACIDE HÉMATINIQUE (53A) À PARTIR DES FEUILLES D'ORGE JAUNIES	142
11. LA SYNTHÈSE DU 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE	143
11.1. LA FORMATION DU MALÉIMIDE 102 PAR OXYDATION D'UN TÉTRAPYRROLE	143
11.1.1. LA FORMATION DU DIESTER MÉTHYLIQUE DE LA 3,8-BIS(2-OXOÉTHYL)-DEUTÉROPORPHYRINE IX.	143
11.1.2. LA FORMATION DU DIESTER MÉTHYLIQUE DE LA 3,8-BIS(2-HYDROXYÉTHYL)-DEUTÉROPORPHYRINE IX. ...	145
11.1.3. LA FORMATION DE L'ESTER MÉTHYLIQUE DE L'IMIDE DE L'ACIDE HÉMATINIQUE (53B) ET DU 3-(2-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (102).....	146

11.2.	LA FORMATION DU MALÉIMIDE 102 PAR OXYDATION DU PYRROLE CORRESPONDANT	148
11.2.1.	LA PRÉPARATION DU 3-ACÉTYL-4-OXOPENTANOATE DE MÉTHYLE.....	148
11.2.2.	LA PRÉPARATION DU 2-(HYDROXYIMINO)-3-OXOBUTANOATE DE BENZYLE.....	149
11.2.3.	LA PRÉPARATION DU 4-MÉTHOXYCARBONYLMÉTHYL-3,5-DIMÉTHYL-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.	150
11.2.4.	LA PRÉPARATION DU 4-(2-HYDROXYHÉTHYL)-3,5-DIMÉTHYL-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.	152
11.2.5.	LA PRÉPARATION DU 3-(2-HYDROXYHÉTHYL)-2,4-DIMÉTHYL-1H-PYRROLE.....	153
11.2.6.	LA PRÉPARATION DU 5-FORMYL-4-MÉTHOXYCARBONYLMÉTHYL-3-MÉTHYL-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.....	154
11.2.7.	LA PRÉPARATION DU 4-MÉTHOXYCARBONYLMÉTHYL-5-MÉTHOXYCARBONYL-3-MÉTHYL-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.....	155
11.2.8.	LA PRÉPARATION DU 4-(2-HYDROXYHÉTHYL)-5-MÉTHOXYCARBONYL-3-MÉTHYL-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.....	158
11.2.9.	LA PRÉPARATION DU 3-(2-HYDROXYHÉTHYL)-4-MÉTHYL-1H-PYRROLE.....	159
11.2.9.	LA PRÉPARATION DU 3-(2-HYDROXYHÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE PAR OXYDATION DU 3-(2-HYDROXYHÉTHYL)-4-MÉTHYL-1H-PYRROLE.....	160
12.	LA SYNTHÈSE DU 3-(1,2-DIHYDROXYHÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (101).....	161
12.1.	LA FORMATION DU MALÉIMIDE 101 PAR OXYDATION D'UN TÉTRAPYRROLE	161
12.1.1.	LA FORMATION DU DIESTER MÉTHYLIQUE DE LA 3,8-BIS(1,2-DIHYDROXYHÉTHYL)-DEUTÉROPORPHYRINE IX.....	161
12.1.2.	LA FORMATION DE L'ESTER MÉTHYLIQUE DE L'IMIDE DE L'ACIDE HÉMATINIQUE (53B) ET DU 3-(1,2-DIHYDROXYHÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE (101).....	163
12.2.1.	LA PRÉPARATION DU 5-MÉTHOXYCARBONYL-3-MÉTHYL-4-(2-{{4-MÉTHYLPHÉNYL}SULFONYL}OXY)HÉTHYL)-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.	164
12.2.2.	LA PRÉPARATION DU 4-(2-CHLOROÉTHYL)-5-MÉTHOXY-CARBONYL-3-MÉTHYL-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.....	165
12.2.3.	LA PRÉPARATION DU 1-TERT-BUTOXYCARBONYL-4-(2-CHLOROÉTHYL)-5-MÉTHOXY-CARBONYL-3-MÉTHYL-PYRROLE-2-CARBOXYLATE DE BENZYLE.	167
12.3.	VERS LA SYNTHÈSE DU 3-(1,2-DIHYDROXYHÉTHYL)-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE	168
12.3.1.	LA SYNTHÈSE DU N-TOSYL-GLYCINATE D'ÉTHYLE.....	168
12.3.2.	LA SYNTHÈSE DU 3-HYDROXY-3-MÉTHYL-1-P-TOLUÈNESULFONYL)-PYRROLIDINE-2-CARBOXYLATE D'ÉTHYLE..	169
12.3.3.	LA SYNTHÈSE DU MÉLANGE 3-MÉTHYL-1-P-TOSYL- Δ^3 -PYRROLINE-2-CARBOXYLATE D'ÉTHYLE.	170
12.3.4.	LA SYNTHÈSE DU 3-MÉTHYL-1H-PYRROLE-2-CARBOXYLATE D'ÉTHYLE	171
12.3.5.	LA SYNTHÈSE DU 3-MÉTHYL-PYRROLE	172
12.3.6.	LA SYNTHÈSE DU 3-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE.....	173
12.3.7.	LA SYNTHÈSE DU 3-ACÉTYL-4-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE	174

12.3.8.	LA SYNTHÈSE DU 3-(1,2-DIHYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE	175
12.3.9.	LA SYNTHÈSE DU 3-(1,2-BIS{[TERT-BUTYL(DIMÉTHYL)SILYL]-OXY}ÉTHYL-4-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE .	177
12.3.10.	LA SYNTHÈSE DU 3-ÉTHYL-4-MÉTHYL-MALÉIMIDE.....	178
12.3.11.	LA SYNTHÈSE DU 3-(1-HYDROXYÉTHYL)-4-MÉTHYL-N-TOSYL-PYRROLE.....	179
12.3.12.	LA SYNTHÈSE DU 3-(1-{[TERT-BUTYL(DIMÉTHYL)SILYL]OXY}-ÉTHYL-4-MÉTHYL-1-TOSYL-PYRROLE.....	181
12.3.13.	LA SYNTHÈSE DU 3-MÉTHYL-1-TOSYL-4-VINYL-PYRROLE	182
12.3.14	. LA SYNTHÈSE DU 3-ACÉTYL-4-MÉTHYL-1H-PYRROLE	183
BIBLIOGRAPHIE :		185

La partie théorique

1. Les chlorophylles

Les chlorophylles font partie d'un groupe de pigments tétrapyrroliques avec des fonctions et des éléments structuraux communs. Elles sont caractérisées par un isocycle à cinq membres et par la présence d'un atome de magnésium complexé en leur centre. On trouve ces pigments verts dans tous les organismes photosynthétiques, à savoir les photobactéries, les cyanobactéries, les algues et les plantes supérieures. Les chlorophylles jouent un rôle biologique primordial dans la photosynthèse, durant laquelle l'énergie lumineuse du soleil est captée et canalisée. Vu l'importance de la photosynthèse, les chlorophylles sont aussi appelées « pigments de la vie » [1]. C'est vraisemblablement pour cette raison que la chlorophylle¹ et ses processus biologiques ont de tout temps fasciné les hommes, créant de surcroît de nombreux sujets de recherche.

Aujourd'hui, on dénombre plus de 50 chlorophylles différentes. Les plus répandues et également les plus étudiées sont les chlorophylles *a* et *b*. Les chlorophylles *c* et *d*, ainsi que les bactériochlorophylles, ont également largement été répertoriées.

1.1. La nomenclature

1.1.1. Numérotations

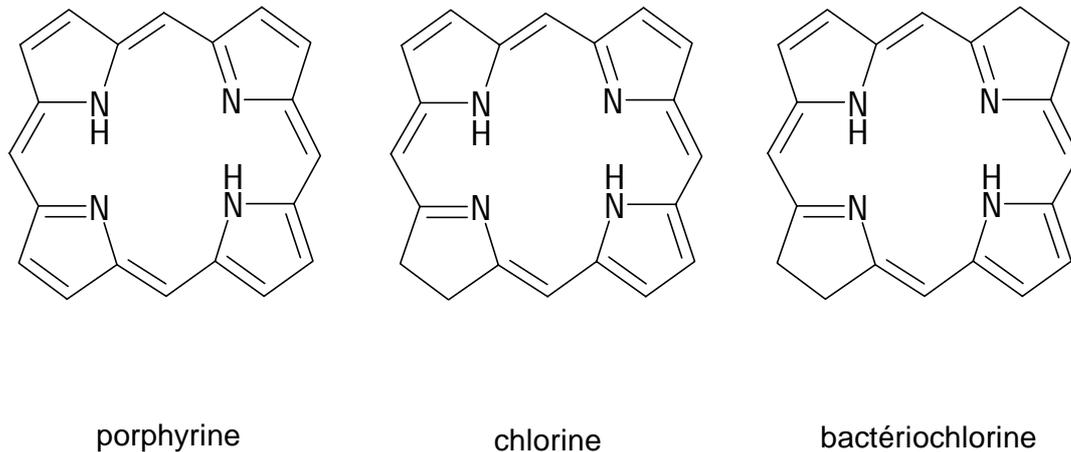
Les chlorophylles sont des tétrapyrroles cycliques. On peut en distinguer 3 : les porphyrines, les chlorines (dihydroporphyrines) dont font partie les chlorophylles, et les bactériochlorines (tétrahydroporphyrines) (*Figure 1.1.*).

Ce qui différencie les chlorophylles des autres chlorines, c'est la présence sur leur squelette d'un anneau cyclopentanoïque leur conférant le nom de phorbine. La numérotation des phorbines devrait s'effectuer selon IUPAC-IUB 1987 [2] (*Figure 1.2a.*). Cependant, c'est le système de numérotation selon IUPAC-IUB 1979 [3] qui

¹ Il faut noter que si le type de chlorophylle n'est pas précisé tout de suite après, il faut comprendre le terme de chlorophylle dans son contexte général comme « les chlorophylles ». Par exemple, « la dégradation de la chlorophylle » signifie la dégradation des différentes chlorophylles, alors que « la dégradation de la chlorophylle *a* » ne s'applique que pour la chlorophylle *a*.

reste le plus couramment utilisé. Ce système emploie une numérotation allant de 1 à 24. Les ponts méthines sont représentés par les valeurs 5, 10, 15 et 20 ; les 5 cycles sont symbolisés par les lettres majuscules A, B, C, D et E (*Figure 1.2b.*).

Figure 1.1. : Squelettes de base des chlorophylles.



Dans l'ancienne littérature, il est également possible de trouver la nomenclature de Fischer [4]. Les positions périphériques du macrocycle de la phorbine sont numérotées de 1 à 8 et les ponts méthines, également décrits comme étant les carbones méso du macrocycle, sont représentés par les quatre premières lettres de l'alphabet grec. Les anneaux pyrroliques sont numérotés à l'aide de chiffres romains (*Figure 1.2c.*). Pour des raisons d'uniformité et de simplicité, c'est le système de numérotation de 1 à 24 établi par IUPAC-IUB 1979 (*Figure 1.2b.*) [3] qui est utilisé au cours de ce travail. Les noms semi-systématiques basés sur le squelette de la phorbine ne sont pas employés.

Figure 1.2. : Différentes numérotations du squelette de base des phorbines.

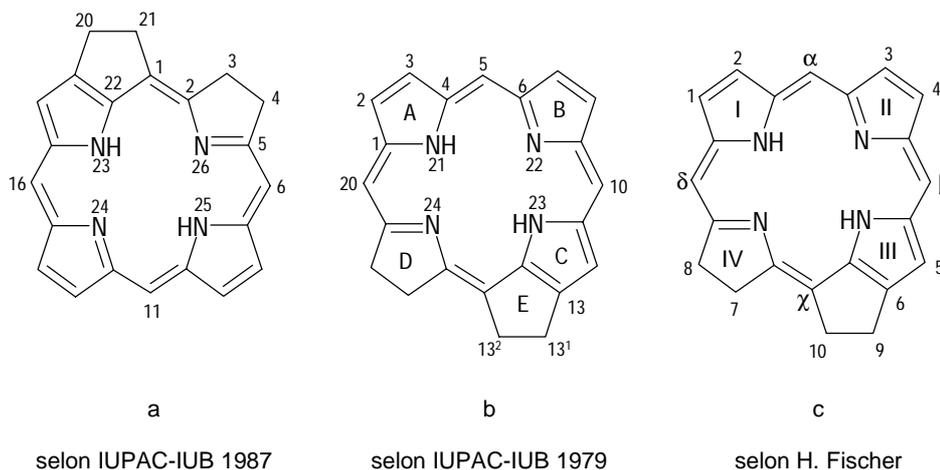
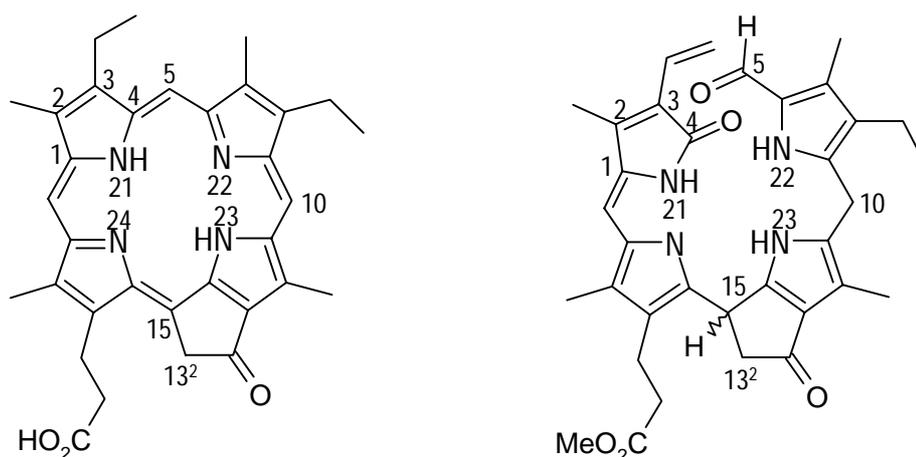


Figure 1.3. : Exemple de nom semi-systématique dérivé du nom trivial phytoporphyrine.

phytylporphyrine

ester méthylique de la 3¹,3²-didéhydro
10,15,22,24-tétrahydro-4,5-dioxo-
4,5-seco[21H, 23H]phytylporphyrine

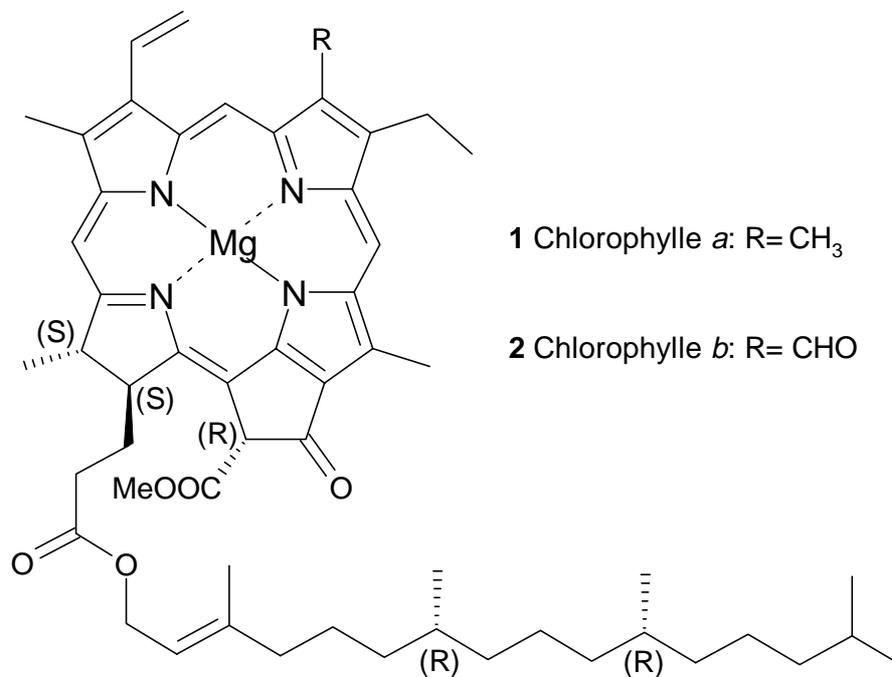
Le préfixe *seco* est ajouté au nom des produits résultant d'une ouverture du macrocycle de la chlorophylle sans perte d'atome de carbone constituant le macrocycle original (Règle S-7.4) [5]. Ce préfixe est précédé de la numérotation des positions qui sont concernées par la rupture de la liaison. Il indique l'ouverture du cycle avec l'addition d'un ou plusieurs atomes d'hydrogène sur chacun des nouveaux groupes terminaux (*Figure 1.3.*) [6]. Le préfixe *seco* est dit non-séparable (Règle C-16.11). Il est directement lié au nom de la structure fondamentale. La numérotation de ces dérivés est donc identique à celle de la structure fondamentale (*Figure 1.3.*).

1.2. La chlorophylle *a*[7]

La chlorophylle *a* (*Figure 1.4a.*), la plus répandue, est présente dans tous les organismes capables d'effectuer la photosynthèse aérobie. C'est en 1910 que Willstätter [8] propose la formule brute de la chlorophylle *a*. Il faut alors attendre 1940 pour que Fischer révèle sa constitution, et 1960 pour voir apparaître sa première synthèse totale réalisée par Woodward [9]. La configuration absolue des centres C(17) et C(18) de la chlorophylle *a* est établie en 1968 par Fleming [10] et Brockmann [11].

La chlorophylle *a* est présente dans le centre réactionnel ainsi que dans l'antenne captant la lumière (cf. photosynthèse).

Figure 1.4. : Structure des chlorophylles *a* et *b* avec leur configurations absolues.



1.3. La chlorophylle *b*[7]

La chlorophylle *b* se différencie de la chlorophylle *a* par la présence d'un groupe formyle à la place d'un groupe méthyle en position C(7) (Figure 1.4b.). Sa structure a été établie par corrélation chimique avec la chlorophylle *a*. La stéréochimie et l'alcool estérifiant des chlorophylles *a* et *b* (le phythol) sont identiques. La chlorophylle *b* est un pigment qui accompagne la chlorophylle *a* dans les prochlorophytes, les chlorophytes, les micromonadophytes et les plantes vertes. Ces dernières sont phylogénétiquement les plus évolués des organismes capables de photosynthèse. La chlorophylle *b* n'est présente que dans les complexes jouant le rôle d'antennes qui captent l'énergie lumineuse, contrairement à la chlorophylle *a* qui est aussi impliquée dans les centres réactionnels. Ainsi, un rapport approximatif de 1 chlorophylle *b* pour 3 chlorophylles *a* peut généralement être mesuré dans les prochlorophytes, les algues vertes et les plantes vertes. Comme la chlorophylle *b* absorbe la lumière à des longueurs d'onde différentes de celles de la chlorophylle *a*,

elle lui est complémentaire. En effet, elle permet aux organismes qui la possèdent d'utiliser plus efficacement l'énergie lumineuse du soleil. Ceci justifie sa présence exclusive dans le système d'antenne.

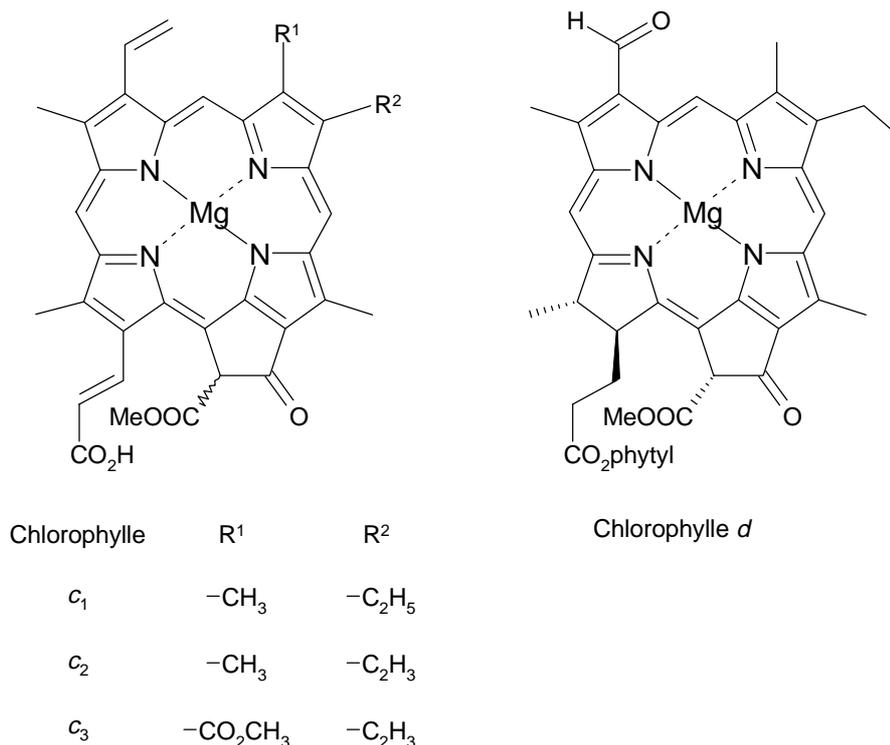
1.4. Les autres chlorophylles

1.4.1. Les chlorophylles *c* et *d* [7]

Les chlorophylles *c* existent dans certaines variétés d'algues (chromophytes). Ces pigments appartiennent à la famille des porphyrines. Ils pourraient se nommer chlorophyllides *c*, car ils ne contiennent pas de longue chaîne alcoolique estérifiant l'acide acrylique de la position C(17). La configuration absolue de leur unique stéréocentre C(13²) n'est pas connue (Figure 1.5.).

La chlorophylle *d* diffère de la chlorophylle *a* par la présence d'un groupe formyle à la place d'un groupe vinyle à la position C(3) (Figure 1.5.). Elle a été découverte accompagnée d'isochlorophylle *d* (structure inconnue) dans des extraits de rhodophytes (algues rouges). La chlorophylle *d* proviendrait de la chlorophylle *a*, ce qui résulterait d'une biosynthèse erronée.

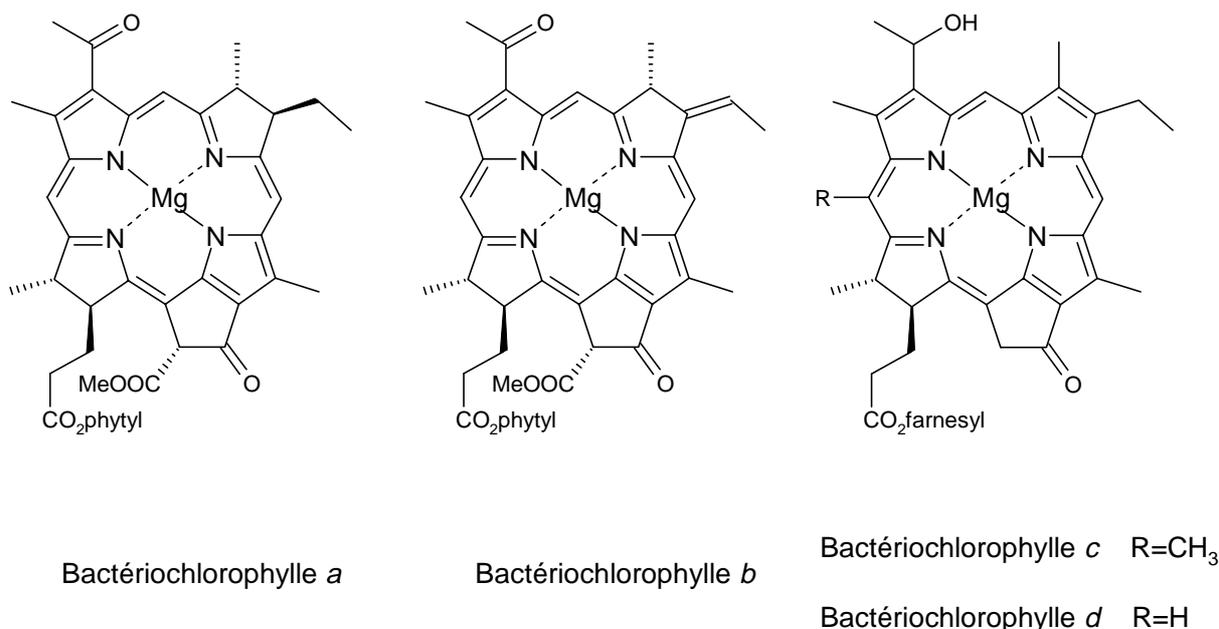
Figure 1.5. : Structures des chlorophylles *c* et *d*.



1.4.2. Les bactériochlorophylles[7]

Les bactériochlorophylles constituent un groupe complexe de pigments qui se trouvent dans les bactéries sulfuriques vertes, brunes ou rouges.

Figure 1.6. : Structures des bactériochlorophylles les plus courantes.



La majeure partie des bactériochlorophylles se distinguent de la chlorophylle *a* par leur cycle B réduit (BChl *a* et *b*) (Figure 1.6.). Par contre, les autres sont constituées de simples chlorines (BChl *c* et *d*) qui possèdent un substituant en position C(20) (Figure 1.6.).

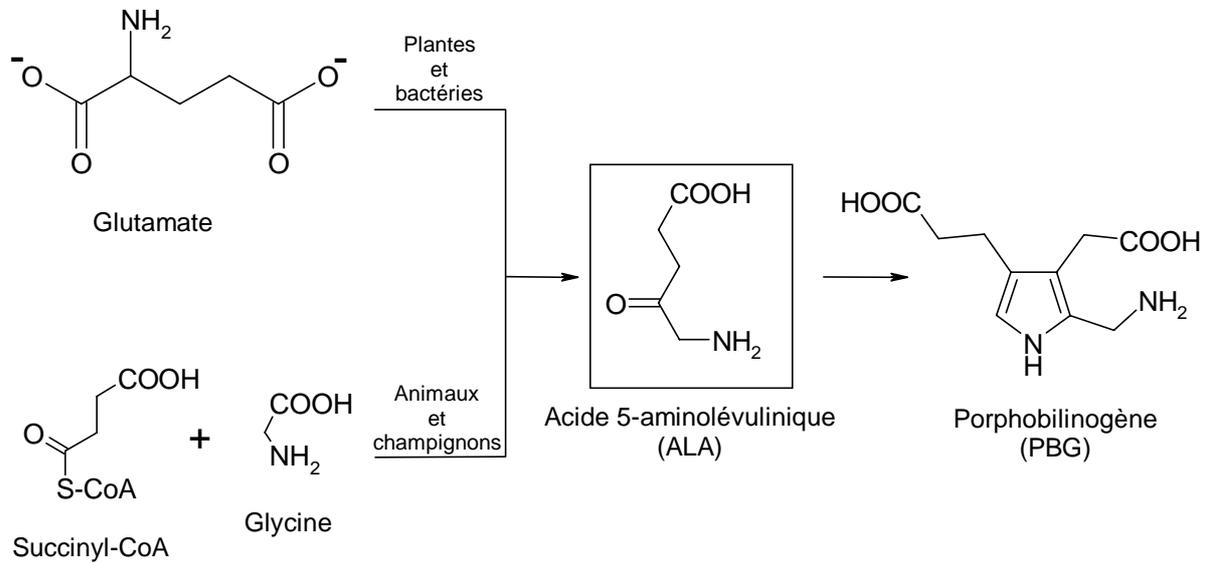
1.5. La biosynthèse des chlorophylles *a* et *b* [12,13]

La chlorophylle, de même que l'hème, provient d'un précurseur identique, la protoporphyrine IX (3). Cette porphyrine est produite par une série de réactions bien caractérisée à partir de l'acide 5-aminolévulinique (ALA), via un important intermédiaire pyrrolique, le porphobilinogène (PBG). Pour synthétiser cet acide 5-aminolévulinique, les plantes et les bactéries utilisent la voie du glutamate aussi appelée « C-5 pathway », alors que les animaux et les champignons empruntent la voie liée à la succinyl-coenzyme A et à la glycine (gly, G) (Schéma 1.1a.). Le

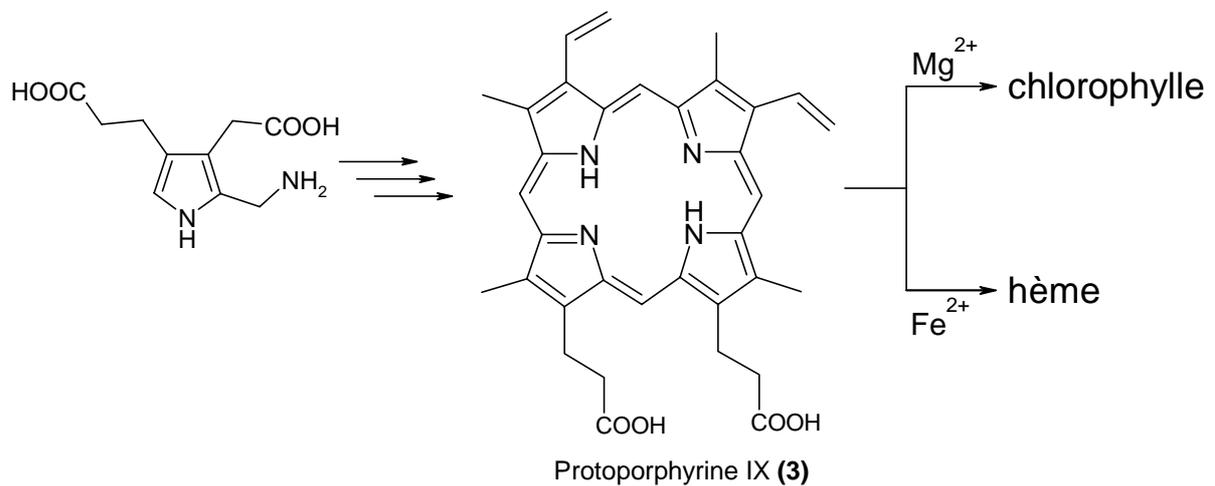
processus biochimique continue par la jonction de quatre molécules de porphobilinogène qui fournit une molécule de protoporphyrine IX (**3**) (*Schéma 1.1b.*).

Schéma 1.1. : Biosynthèse de la protoporphyrine IX.

a)



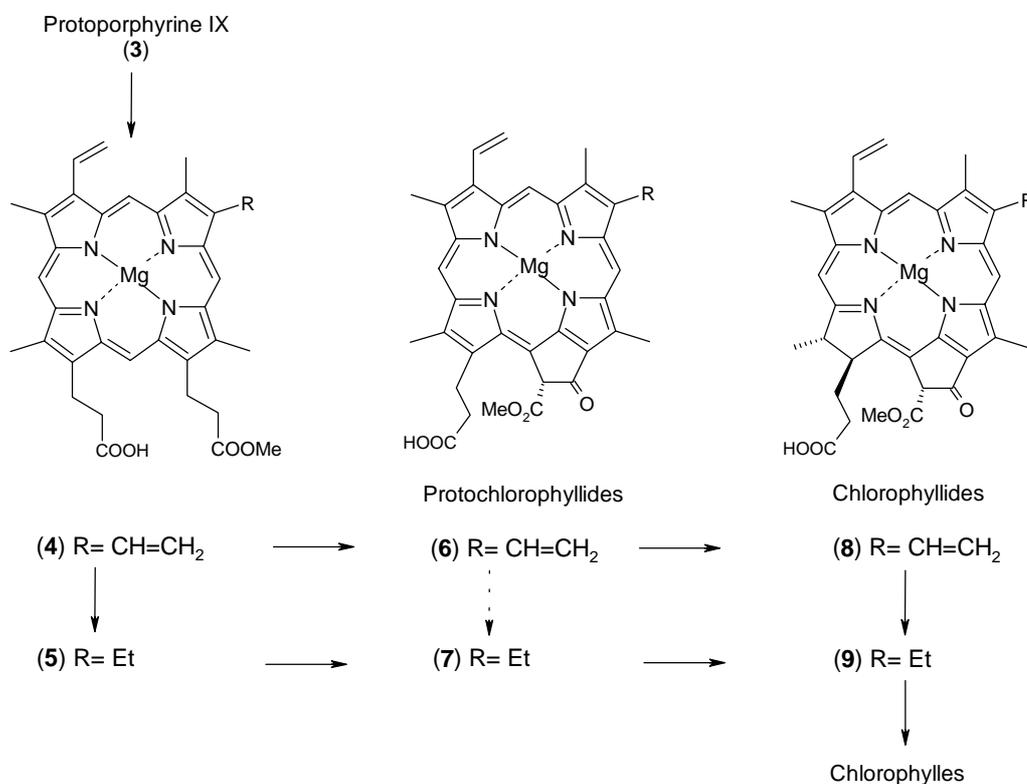
b)



La formation de l'hème à partir de la protoporphyrine IX (**3**) nécessite l'insertion du fer, tandis que celle de la chlorophylle exige l'incorporation du magnésium. La formation de la chlorophylle à partir de la protoporphyrine IX (**3**) débute par l'insertion de magnésium à l'aide d'une magnésium-chélatase. Cette insertion est suivie par

l'estérification de la chaîne propionique présente sur le carbone C(13) pour fournir l'ester méthylique (4). Cette opération est effectuée au moyen de la S-adénosyl méthionine (SAM) (Schéma 1.2.). C'est probablement après cette méthylation qu'une séparation de la voie biosynthétique a lieu. Il existe encore une ambiguïté concernant la réduction de la fonction vinyle en fonction éthyle. A-t-elle lieu à ce stade de la biosynthèse ou plus tard ? Cette question reste ouverte. Au début, on pensait que cette réduction avait lieu au stade de la protochlorophyllide (6), mais après avoir isolé les porphyrines 4 et 5, ainsi que les chlorophyllides 8 et 9, les deux voies 4 → 5 → 7 → 9 et 4 → 6 → 8 → 9 restent ouvertes.

Schéma 1.2. : Voies de conversion de la protoporphyrine IX en chlorophylle a.

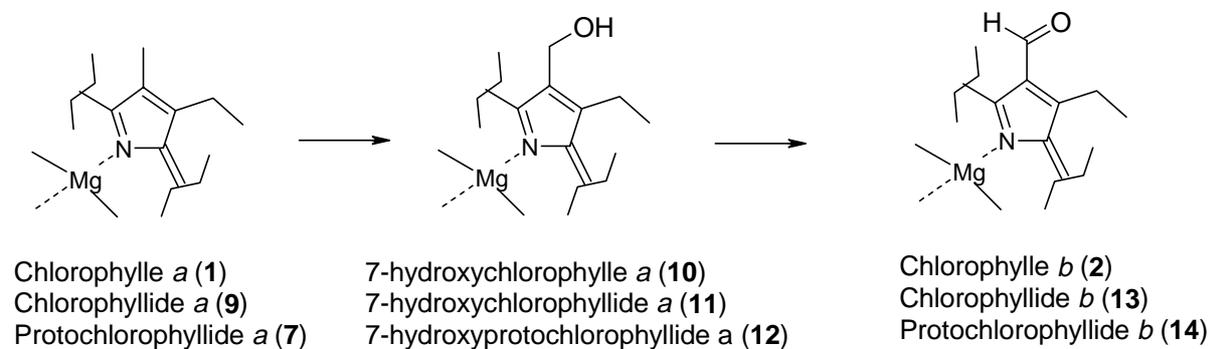


La formation de l'exocycle E par cyclisation oxydative de la chaîne propionate greffée sur C(13) a été prouvée par isolation d'un système enzymatique capable d'effectuer cette étape. Il a également été démontré que ce processus requiert de l'oxygène et du NADPH. La conversion des protochlorophyllides 6 et 7 en chlorophyllides 8 et 9 nécessite aussi la réduction photochimique du cycle D, catalysée par la protochlorophyllide-réductase.

La dernière étape consiste à alkyler la chaîne propionique au moyen du géranylgéranylpyrophosphate pour fournir l'ester correspondant. Ce dernier est finalement réduit pour livrer le reste phytyle.

La biosynthèse de la chlorophylle *b* n'est pas connue en détail [14]. La conversion de la chlorophylle *a* en chlorophylle *b* semble être le mécanisme qui a été adopté [15]. Il est maintenant accepté que le groupe 7-méthyle est oxydé en groupe 7-formyle [16]. L'étude par marquage à $^{18}\text{O}_2$ a permis de conclure que la réaction est effectuée par une oxygénase, et que la poche enzymatique doit être hydrophobe [16]. La présence d'un intermédiaire 7-hydroxyméthyle a été largement reportée [16]. Cependant, le stade où a lieu l'oxydation n'est pas encore clair. Est-ce le protochlorophyllide *a*, le chlorophyllide *a* ou la chlorophylle *a* qui est oxydé ? Il semble que les 3 substrats cités soient en mesure d'être oxydés [15] (*Schéma 1.3.*). Malgré tout, le fait que la poche enzymatique soit extrêmement hydrophobe semble favoriser la proposition d'un composé phytylé comme la chlorophylle *a* [15].

Schéma 1.3. : Transformation de la chlorophylle *a* en chlorophylle *b*.



D'un autre côté, la réduction enzymatique de Zn-protochlorophyllide *b* en Zn-chlorophyllide *b* [17] indique que le groupe formyle en position C(7) n'empêche pas l'enzyme protochlorophyllide-réductase d'effectuer la réduction du cycle D. Ceci suggère que la formation du groupe formyle de la position C(7) peut tout de même avoir lieu à l'étape de la protochlorophyllide.

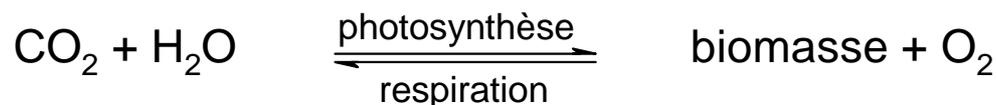
Finalement, on peut admettre que la biosynthèse des chlorophylles *a* et *b* est identique lors des premières étapes, et que l'oxygène est introduit lors d'une étape

finale de la biosynthèse de la chlorophylle *b*. Malgré tout, le moment exact où a lieu l'oxygénation durant la biosynthèse (avant ou après phytylation) reste inconnu [14].

1.6. La photosynthèse [18,19]

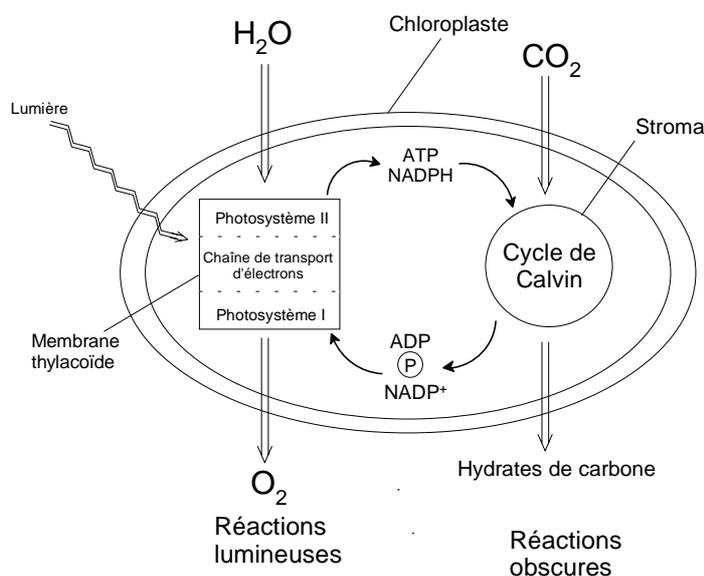
La vie sur terre dépend du soleil. Les plantes et les cyanobactéries captent l'énergie solaire grâce à la photosynthèse, un processus dépendant de la lumière où le CO_2 est « fixé » pour former des glucides (*Schéma 1.4.*). Durant le phénomène de la photosynthèse, la biomasse (réserve d'énergie) est synthétisée à partir de CO_2 et d'eau avec libération d'oxygène sous l'action de l'énergie solaire. La photosynthèse permet de convertir les photons (énergie lumineuse) en énergie chimique.

Schéma 1.4. : Représentation sommaire des phénomènes de la respiration et de la photosynthèse.



La photosynthèse est en réalité un phénomène très complexe. On peut en simplifier les deux processus principaux de la manière suivante : i) des réactions lumineuses et ii) des réactions obscures (cycle de Calvin) (*Figure 1.7.*).

Figure 1.7. : Le phénomène de la photosynthèse.

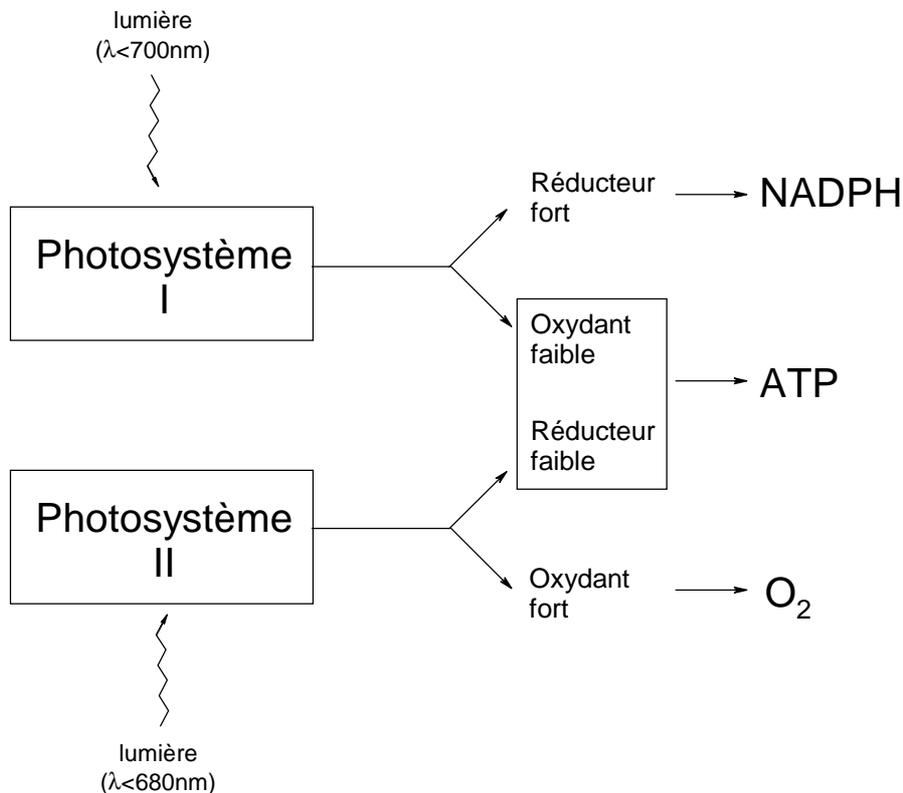


Chez les eucaryotes, la membrane du thylacoïde est le site des réactions lumineuses alors que le cycle de Calvin se déroule dans le stroma du chloroplaste.

1.6.1. Les réactions lumineuses

La production d'oxygène (O_2) par la photosynthèse nécessite deux photosystèmes successifs. Le photosystème I (PSI) assure la formation d'un puissant réducteur capable de réduire $NADP^+$, et, de façon concomitante, celle d'un oxydant faible. Le photosystème II (PSII) garantit la formation d'un oxydant puissant apte à oxyder H_2O ainsi que celle d'un réducteur faible (*Figure 1.8.*). Le réducteur faible réduit l'oxydant faible, si bien que PSI et PSII constituent un stimulateur d'électrons à deux étapes. Il faut donc que les 2 systèmes fonctionnent pour que la photosynthèse soit assurée.

Figure 1.8. : Interaction des photosystèmes I et II dans la photosynthèse des végétaux verts.



Un photosystème est l'association de diverses chlorophylles et caroténoïdes en vue de former un centre de plusieurs centaines de pigments (environ 300 molécules de chlorophylles). De cette association de pigments, seul le centre réactionnel constitué d'une ou deux molécules de chlorophylle *a* (il n'y a pas de chlorophylle *b* dans le centre réactionnel) peut jouer un rôle de donneur d'électrons. Les autres molécules, ainsi que les autres chlorophylles, fonctionnent comme antenne à lumière. Ces antennes de chlorophylles captent l'énergie de la lumière et transfèrent de molécule à molécule cette énergie photonique absorbée, jusqu'à ce que l'excitation atteigne un centre réactionnel photosynthétique (*Figure 1.9.*).

L'excitation se trouve alors piégée, car les molécules de chlorophylle *a* du centre réactionnel, bien que chimiquement identiques aux chlorophylles de l'antenne, ont des énergies d'états excités légèrement inférieures en raison de leur environnement différent (*Figure 1.10.*).

Figure 1.9. : Flux d'énergie à travers un complexe d'antennes photosynthétiques. L'excitation provoquée par l'absorption d'un photon se déplace au hasard par transfert d'exciton parmi les molécules de complexes d'antennes (cercles gris clair) jusqu'à ce qu'elle soit piégée par une chlorophylle *a* d'un centre réactionnel (cercles les plus foncés) ou, moins fréquemment, réémise sous forme de fluorescence.

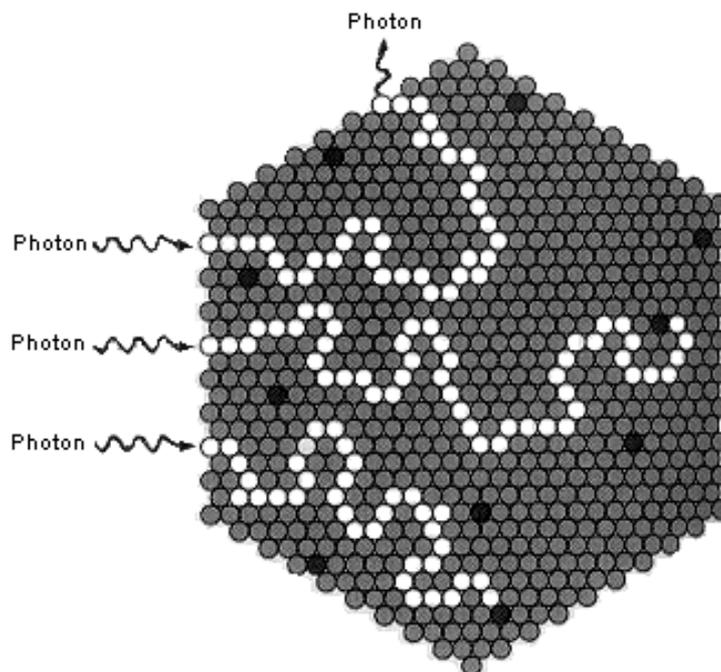
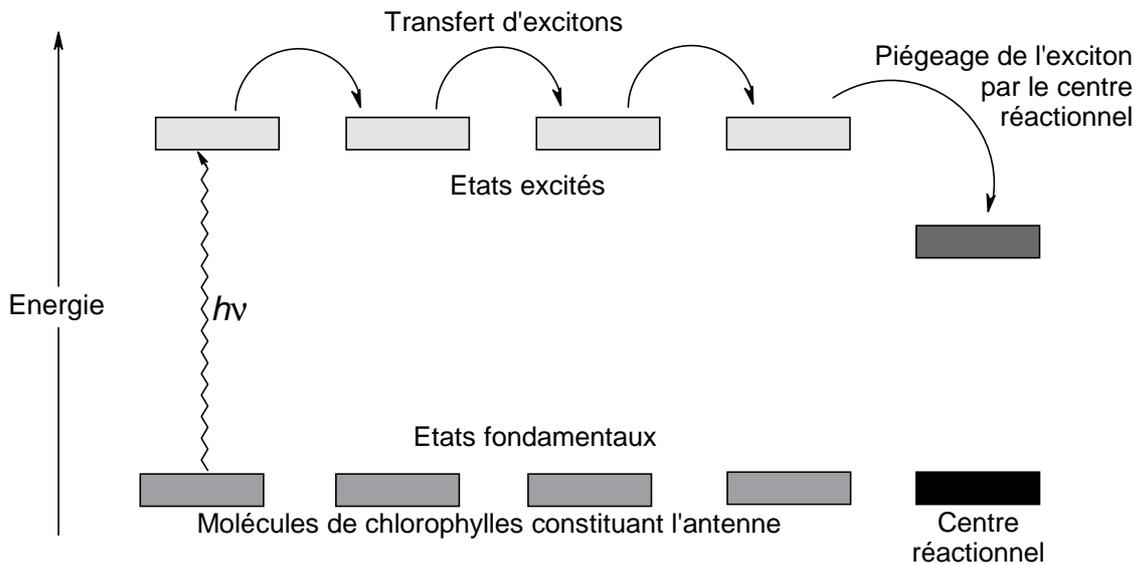


Figure 1.10. : L'exciton est piégé par la chlorophylle *a* d'un centre réactionnel parce que son état excité le plus faible a une énergie inférieure à celle des molécules de pigments de l'antenne.

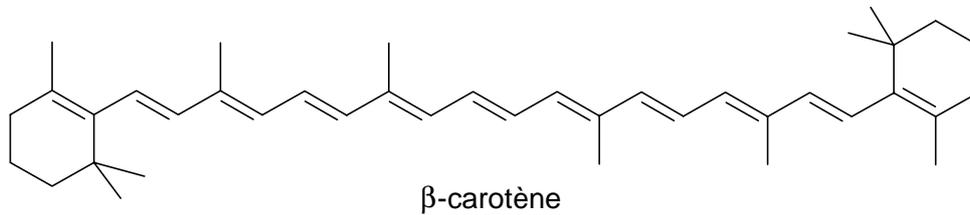


Le transfert de l'énergie du système d'antennes à un centre réactionnel se fait en moins de 1 ns avec un rendement >90%. Cette très grande efficacité est due à l'espacement approprié et aux orientations respectives des molécules de chlorophylle. Ce complexe constitué de protéines et de pigments est appelé complexe photocollecteur (LHC pour « Light harvesting complexe »).

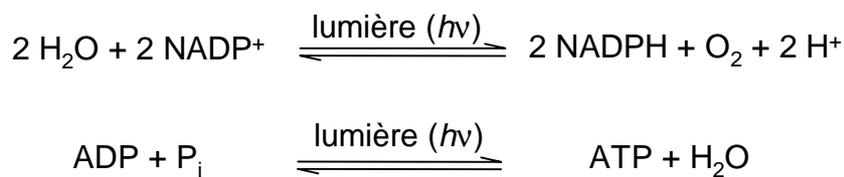
La plupart des complexes photocollecteurs possèdent d'autres substances organisées en réseaux qui absorbent la lumière en plus de la chlorophylle. Ces pigments accessoires captent la lumière dans des régions du spectre où les chlorophylles ne l'absorbent que faiblement. Les caroténoïdes, polyènes linéaires comme le β -carotène (*Figure 1.11.*), se trouvent dans toutes les plantes vertes, ainsi que dans de nombreuses bactéries photosynthétiques, ce qui en fait les pigments ancestraux les plus courants (ils sont en grande partie responsables des magnifiques couleurs automnales des arbres et aussi de la couleur orange des carottes). Par exemple, le LHC-II, la protéine membranaire dont les chloroplastes des plantes vertes abondent, est une protéine transmembranaire de 232 résidus liée au moins à 7 chlorophylles *a*, 5 chlorophylles *b* et 2 caroténoïdes. Il faut noter toutefois que les caroténoïdes de LHC-II ont une fonction autre que celle de rassembler la lumière pour les antennes. Grâce à des interactions électroniques, ils empêchent les

molécules de chlorophylle excitées par la lumière auxquelles ils sont associés de transférer cette excitation à O_2 , ce qui conduirait à une forme d'oxygène moléculaire très réactive et destructrice appelée 1O_2 (oxygène singulet).

Figure 1.11. : Structure du β -carotène.



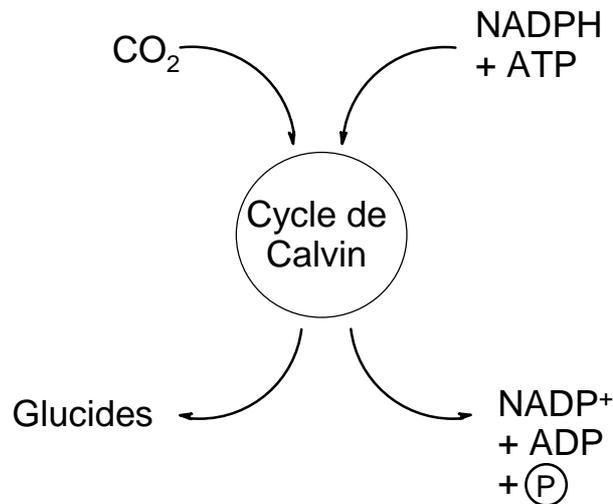
On peut donc résumer les réactions lumineuses par l'équation chimique suivante :



Les produits des réactions lumineuses sont donc NADPH et ATP.

1.6.2. Les réactions obscures

Les réactions obscures sont appelées ainsi car elles ne nécessitent pas de lumière pour fonctionner. Leur rôle principal est l'assimilation du CO_2 en le transformant en glucides. Cette voie métabolique élucidée par Melvin Calvin, James Bassham et Andrew Benson entre 1946 et 1953 est également appelée cycle de Calvin. Etant donné qu'il s'agit d'un métabolisme complexe, les détails ne seront pas traités ici. On retiendra cependant que pour transformer le CO_2 en sucre (glucides), le cycle de Calvin nécessite une source d'électrons et de l'énergie chimique. Ces deux éléments sont fournis par les réactions lumineuses. En effet, la source d'électrons se trouve sous forme de NADPH et l'énergie chimique est obtenue par transformation de l'ATP en ADP et phosphate. Ainsi, le cycle de Calvin produit des glucides à l'aide de NADPH et d'ATP, qui sont régénérés par les réactions lumineuses (*Figure 1.12.*).

Figure 1.12 : Résumé simplifié du cycle de Calvin.

Ainsi, lors de la photosynthèse, l'énergie lumineuse est initialement convertie par une série de réactions lumineuses en énergie chimique sous la forme de deux composés : le NADPH, une source d'électrons, et l'ATP, le stock d'énergie versatile des cellules. Le NADPH et l'ATP ainsi formés réduisent alors le CO_2 et le transforment en hydrates de carbone par une série de réactions obscures. La quantité d'énergie stockée par la photosynthèse est énorme. Plus de 10^{17} kcal d'énergie libre est stockée chaque année sur terre par la photosynthèse, ce qui correspond à l'assimilation de plus de 10^{10} tonnes de carbone dans des glucides et autres formes de matière organique [19].

2. Le phénomène de la dégradation de la chlorophylle

Le métabolisme de la chlorophylle est certainement le processus biochimique le plus visible. Sa biosynthèse laisse apparaître la couleur verte des plantes au printemps, tandis que sa dégradation se manifeste par la perte du pigment vert en automne et l'apparition des couleurs jaunes, oranges, rouges et brunes. Ces couleurs sont dues à la présence des caroténoïdes, des anthocyanines et les produits d'oxydation de phénols [20]. Alors que la biosynthèse de la chlorophylle est relativement bien comprise [Leeper, 1991 #147], son catabolisme est resté longtemps une énigme. Il

est estimé qu'environ 1 milliard de tonnes de chlorophylle sont dégradées chaque année dans les mers et sur la terre [21].

La majeure partie de la dégradation de la chlorophylle se passe probablement dans un environnement marin. Les organismes vivant dans les mers, les lacs et les rivières produisent environ 40 cycles annuels durant lesquels ils synthétisent et dégradent la chlorophylle. Par contre, dans le système terrestre, ces cycles sont beaucoup plus lents et produisent annuellement la dégradation d'un tiers de la chlorophylle.

La cinétique de la dégradation de la chlorophylle est peu décrite et relativement variable [21]. Elle diminue avec l'augmentation de l'âge de la plante. Outre la maturité, les temps de demi-vie de la chlorophylle varient d'une espèce et d'une région à l'autre. Par exemple, le noisetier d'Angleterre (*Corylus avellanu* L.) et celui d'Amérique du nord (*Corylus americanu* L.) possèdent en automne pour le renouvellement de la chlorophylle des temps de demi-vie respectivement de 15 jours et de 40 jours [21].

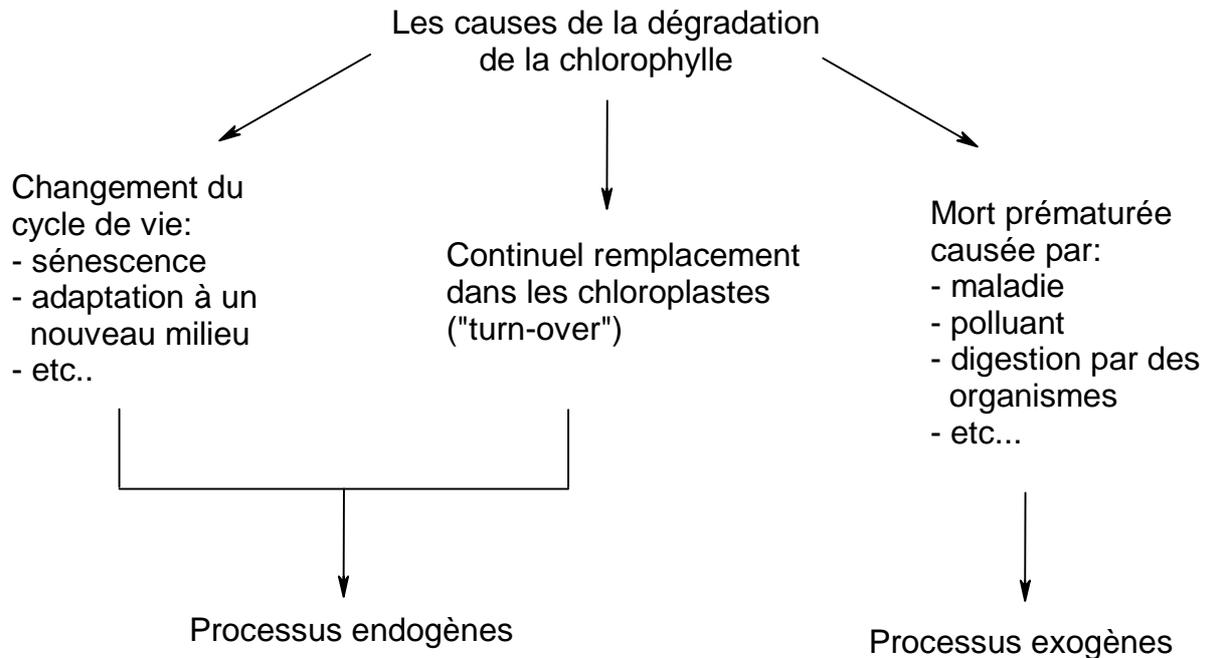
La connaissance du catabolisme de la chlorophylle est importante, non seulement pour la compréhension de la physiologie et de la biochimie des plantes, mais aussi pour l'exploitation du phénomène. En agriculture, la disparition de la chlorophylle, et ainsi de la couleur verte, est associée au mûrissage des fruits. Ce phénomène peut aussi jouer un rôle important pour le contrôle de la sénescence et pour la longévité des plantes. Dans l'industrie alimentaire, la dégradation de la chlorophylle joue un rôle économique important, puisque la couleur verte est souvent associée au label « naturel ». L'attrait touristique pour les paysages automnaux est aussi d'une grande importance économique [21].

2.1. Pourquoi la chlorophylle est-elle dégradée ?

La destruction de la chlorophylle concerne aussi bien les cellules vivantes et/ou mourantes que les tissus morts. Cette destruction peut être associée à des changements importants dans le cycle de vie de l'organisme (sénescence, adaptation à un nouveau milieu, ...), à un continuel renouvellement de la chlorophylle

(«turn-over » cellulaire) et à la mort prématurée (provoquée par la variation de la température, les polluants,... ; digestion par un autre organisme ; maladie,...)[21] (Figure 2.1.).

Figure 2.1. : Causes de la dégradation de la chlorophylle.



Il fut spéculé que la chlorophylle était réutilisée lors d'un processus endogène pour la biogenèse des caroténoïdes secondaires dans certaines algues vertes [22]. La présence de ces caroténoïdes secondaires dans les cellules des plantes avant la perte de la chlorophylle exclut cette spéculation. Il fut aussi argumenté que la dégradation de la chlorophylle servait à récupérer les atomes d'azote contenus dans le chromophore [20]. Certes, la réutilisation des nutriments des autres parties de la plante doit être relativement importante. L'azote est continuellement transféré des organes sénescents à ceux qui grandissent. Finalement, l'azote est accumulé dans les protéines de réserve des tissus de stockage. Mais l'azote contenu dans la chlorophylle est estimé à 4% par rapport à celui contenu dans l'apoprotéine à laquelle la chlorophylle est associée dans le chloroplaste. Ainsi, une complète dégradation de la chlorophylle n'est pas à envisager. La dégradation de la chlorophylle dans les plantes sert certainement à empêcher l'accumulation de tétrapyrroles photodynamiquement actifs durant le processus de vieillissement pendant lequel les nutriments sont relocalisés [23].

2.2. La dégradation

L'étude du devenir de la chlorophylle lors de son catabolisme distingue deux sortes de dégradations suivant qu'elles sont dues à des réactions de type I et II [21].

Les réactions de type I comprennent l'extrusion du magnésium, l'hydrolyse de l'ester phytylique et les modifications des chaînes secondaires de la chlorophylle. Le noyau tétrapyrrolique est quant à lui laissé intact.

Les réactions de type II produisent le clivage du macrocycle aromatique du tétrapyrrole. Les dégradations subséquentes fournissent de plus petits fragments [24].

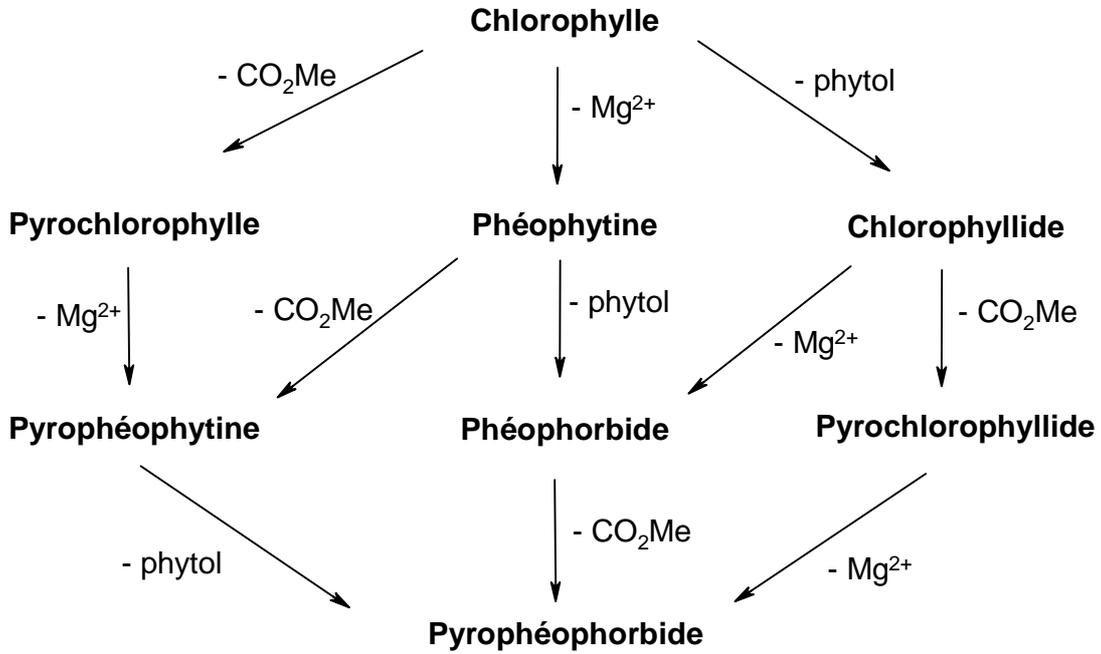
2.3. Les réactions de type I

Les chlorophylles peuvent être modifiées chimiquement ou enzymatiquement sans ouverture du macrocycle. Le *schéma 2.1.* donne un aperçu des dérivés obtenus par les différentes combinaisons possibles de la démétallation, de l'hydrolyse de l'ester phytylique et de la décarbométhoxylation sur la position C(13²) [21].

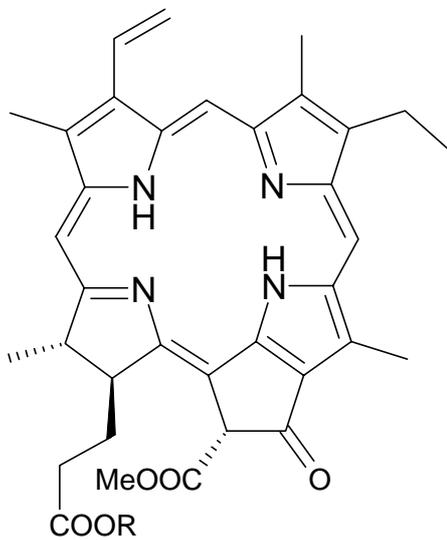
L'hydrolyse de l'ester phytylique de la chlorophylle, ainsi que sa formation, sont catalysées par l'enzyme chlorophyllase. Cette enzyme possède donc un rôle biosynthétique et dégradatif [25]. L'hydrolyse de l'ester phytylique de la chlorophylle peut aussi être réalisée par des solutions basiques diluées. Le chlorophyllide est ainsi formé. L'emploi de solutions acides diluées aboutit à la formation des phéophorbides ; il y a extrusion simultanée du magnésium.

Schéma 2.1. : a) Pigments dérivés de la chlorophylle.
 b) Structure de la phéophorbide et de la pyrophéophorbide et des esters méthyliques correspondants obtenus par estérification.

a)

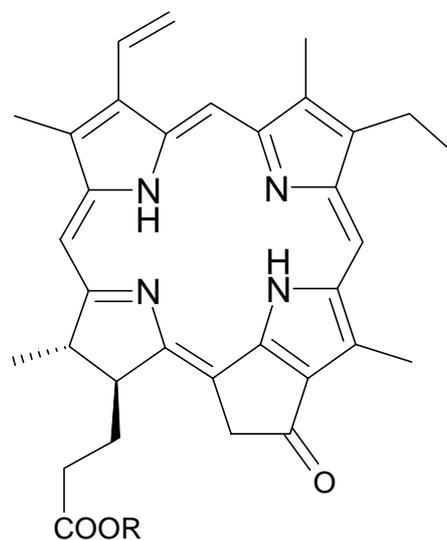


b)



Phéophorbide a (15a) R=H

Ester méthylique de la phéophorbide a (15b) R=CH₃



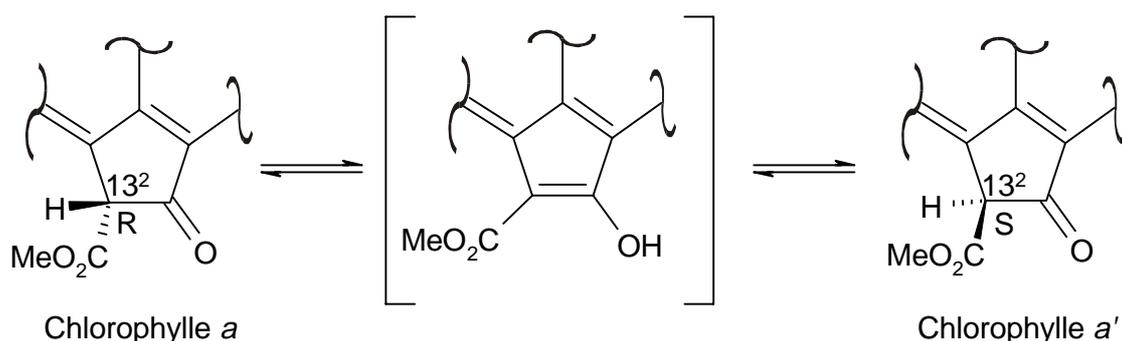
Pyrophéophorbide a (16a) R=H

Ester méthylique de la pyrophéophorbide a (16b) R=CH₃

L'action d'acide minéral dilué sur la chlorophylle provoque une rapide extrusion du magnésium pour former la phéophytine. A cause de la facilité de la perte du magnésium chlorophyllien, il est difficile de dire si ce type de réaction dépend d'un système enzymatique. L'activité de l'enzyme Mg-déchelatase est décrite par Ziegler *et al.* [26], ainsi que par Owens et Falkowski [27]. Par contre, Shioi *et al.* [28] reportent l'activité d'une substance non-protéique capable de catalyser l'extrusion du magnésium. Le caractère non-enzymatique de la substance est démontré par le fait que cette dernière conserve toute son activité catalytique après chauffage.

L'isocycle de la chlorophylle est un site très réactif. L'épimérisation du centre C(13²) de la chlorophylle est observée lors de son isolation. L'équilibre s'établit, probablement par la formation de l'intermédiaire énonol représenté dans le schéma 2.2., dans une fraction d'environ 85 :15 de l'épimère (13²R)-Chl *a* par rapport au (13²S)-Chl *a'* [29].

Schéma 2.2. : Epimérisation sur position C(13²) de la chlorophylle *a*.



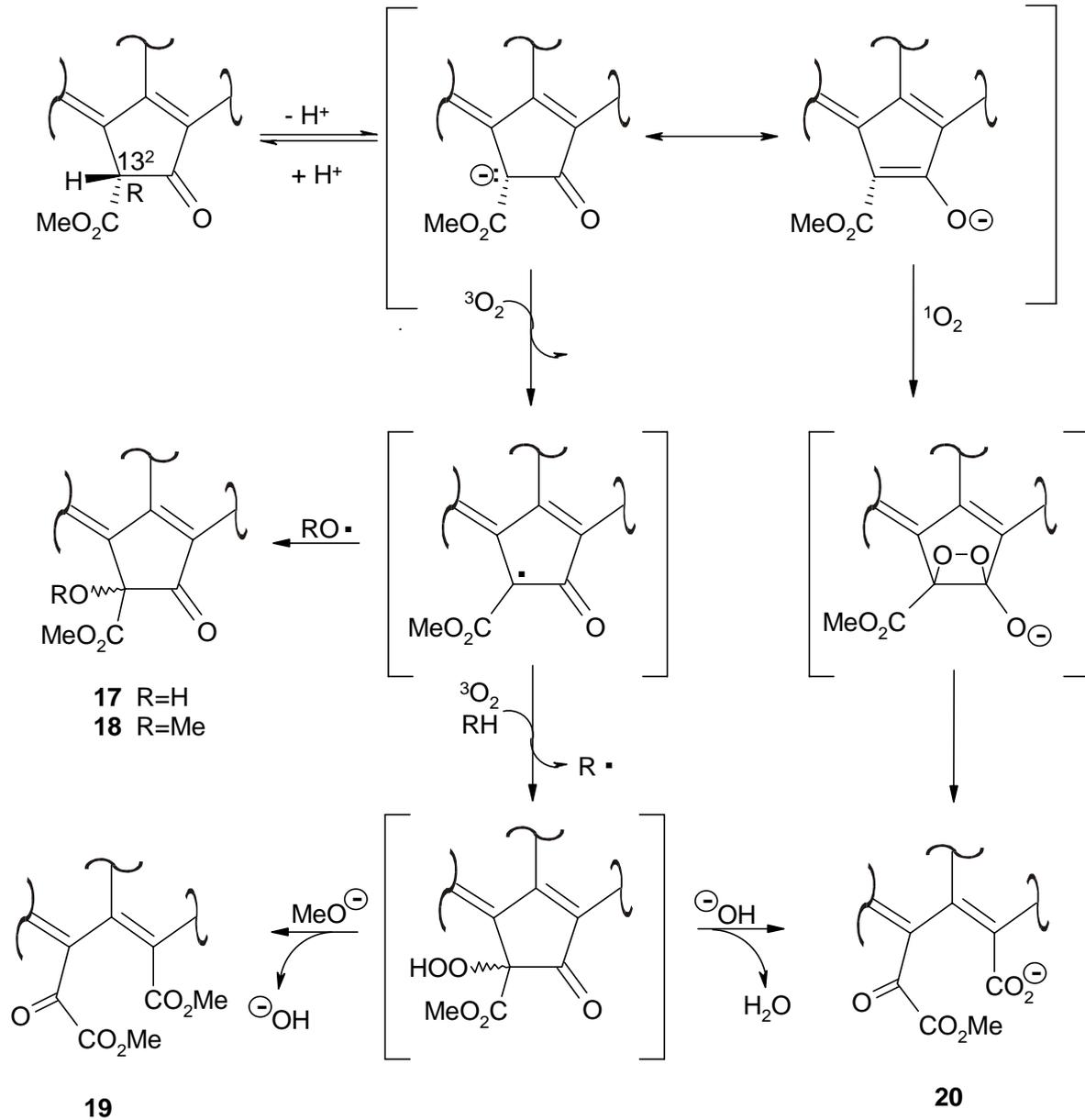
Les oxydations *in vitro* de la position C(13²) passant par des intermédiaires radicalaires et/ou anioniques forment les dérivés hydroxy **17** et méthoxy **18**, ainsi que les purpurines **19** et **20** [30]. De telles réactions sont connues sous le nom d'allomérisation et elles se passent lorsque les solutions de chlorophylles sont exposées à l'air dans des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol (*Schéma 2.3.*).

L'oxydation de la position C(13²) est aussi observée dans le système *in vivo*. La 13²-hydroxy-chlorophylle *a* constitue le premier produit isolé qui est formé par l'action d'une peroxydase [31].

Outre ces réactions d'oxydation, l'isocycle peut perdre enzymatiquement son groupe carbométhoxy. Cette décarbométhoxylase transforme la phéophorbide *a* (**15a**) en

pyrophéophorbide *a* (**16**) [32 ,33]. La même réaction peut être réalisée à l'aide de collidine ou de pyridine à reflux.

Schéma 2.3. : Réactions d'allomérisation.



La dégradation exogène de la chlorophylle par les organismes donne essentiellement des produits de type I [21] [34]. La chlorophylle, échappant au processus destructif et survivant comme fossile moléculaire dans toutes sortes de

sédiments, subit au fil du temps géologique une série de modifications chimiques aboutissant aussi à la formation de produits de type I [35].

Lors de l'étude de la dégradation *in vivo* ou *in vitro* de la chlorophylle, on trouve toujours les mêmes types de produits (*Schéma 2.1.*). L'accumulation de ces produits n'est pas observée, sinon à des taux très faibles. Les produits provenant des réactions de type I ne représenteraient que l'étape initiale de la dégradation de la chlorophylle. Malgré tout, il existe des exceptions qui, comme l'algue *Euglena*, accumulent la pyrophéophytine. Dans la nature, les produits de telles réactions sont surtout trouvés dans les tissus contenant une faible concentration d'oxygène et/ou soumis à une faible intensité lumineuse. A côté de ces réactions à caractère biologique, Hynninen reporte toute une série de modifications *in vitro* purement chimiques [36].

2.4. Les réactions de type II

Les produits de la dégradation de type II, la résolution des structures, la caractérisation des systèmes d'enzymes et surtout la compréhension des mécanismes constituent les sujets principaux de recherche dans le domaine de la dégradation de la chlorophylle.

La réaction de type II la plus fréquemment observée est l'ouverture oxydative du macrocycle tétrapyrrolique.

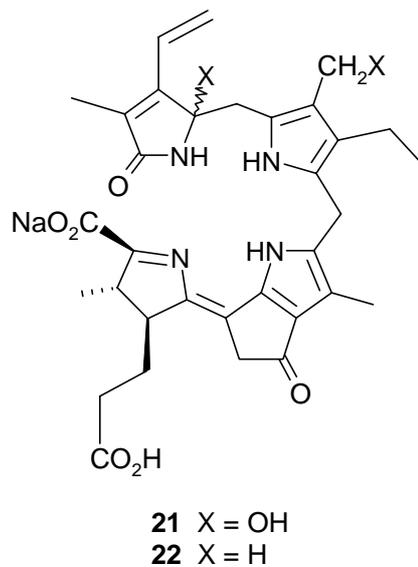
2.4.1. Dans un système *in vivo*

Plusieurs catabolites isolés de milieux naturels différents ont pu être caractérisés récemment. Bien que les enzymes responsables d'une telle dégradation ne soient pas encore connues, il semble certain que les réactions de type II nécessitent l'emploi d'oxygène moléculaire [34].

a) Catabolites isolés de planctons

Les premiers éléments de structures de produits résultant d'une réaction de type II apparaissent dans les années 1980. Shimomura *et al.* publient deux travaux dans lesquels ils isolent un composé fluorescent [37] et une luciférine [38] à partir de planctons bioluminescents (respectivement l'hétérotrophe *Euphausia pacifica* et le photo-autotrophe *Pyrocystis lunula*). Les constitutions de ces substances **21** (à partir d'*Euphausia pacifica*) et **22** (luciférine), sensibles aux oxydants, sont résolues par le groupe de travail de Kishi [39,40] (Figure 2.2.). Les deux composés possèdent un macrocycle ouvert oxydativement entre les carbones C(20) et C(1) ; ils diffèrent l'un de l'autre par la présence de deux groupes hydroxy.

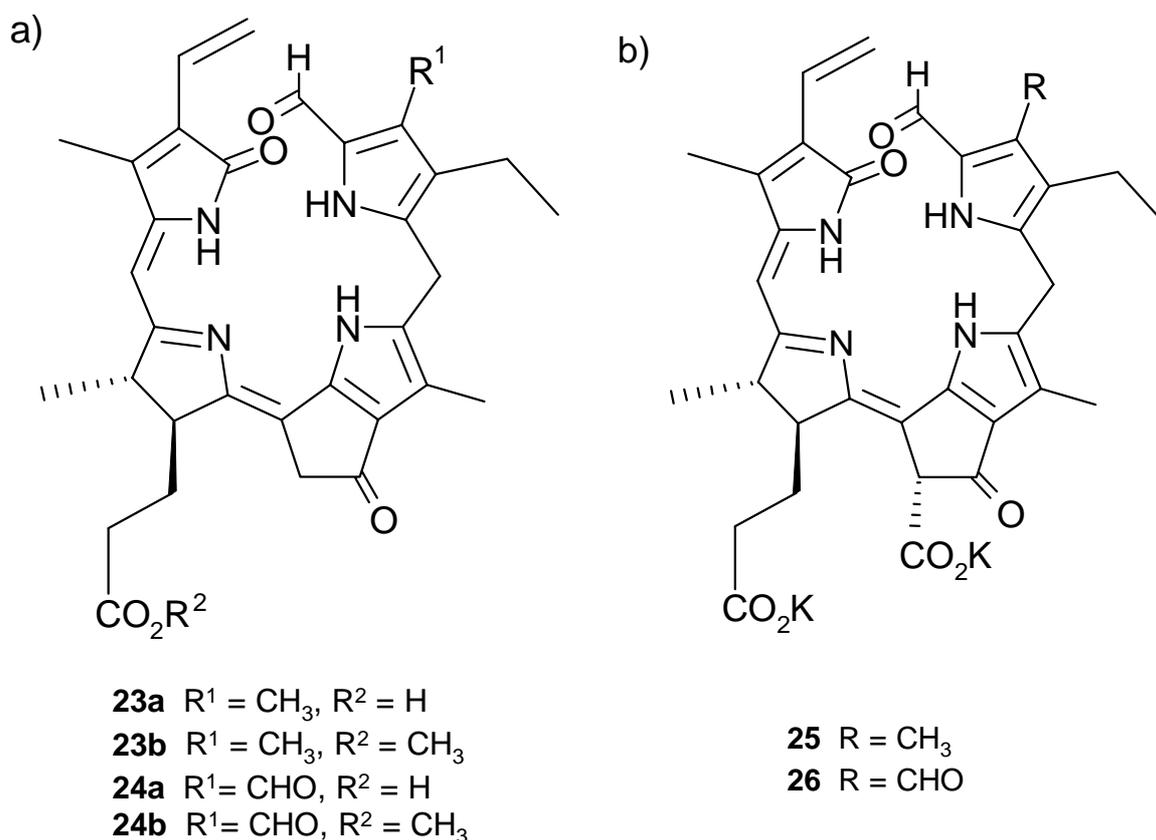
Figure 2.2. : Produits **21** et **22** de la dégradation de la chlorophylle obtenus respectivement à partir d'*Euphausia pacifica* et d'un dinoflagélate (*Pyrocystis lunula*).



b) Catabolites isolés de chlorophytes

Oshio et Hase ont observé que le chlorophyte *Chlorella protothecoides* excrète, sous certaines conditions, des pigments rouges dans le milieu d'incubation [41,42]. C'est en 1991 que Engel *et al.* identifient la structure **23a** d'un de ces pigments rouges dérivés de la chlorophylle *a* [43] (Figure 2.3a.). Cette structure est confirmée peu de temps après par des analyses aux rayons-X [44] et par sa synthèse partielle [45].

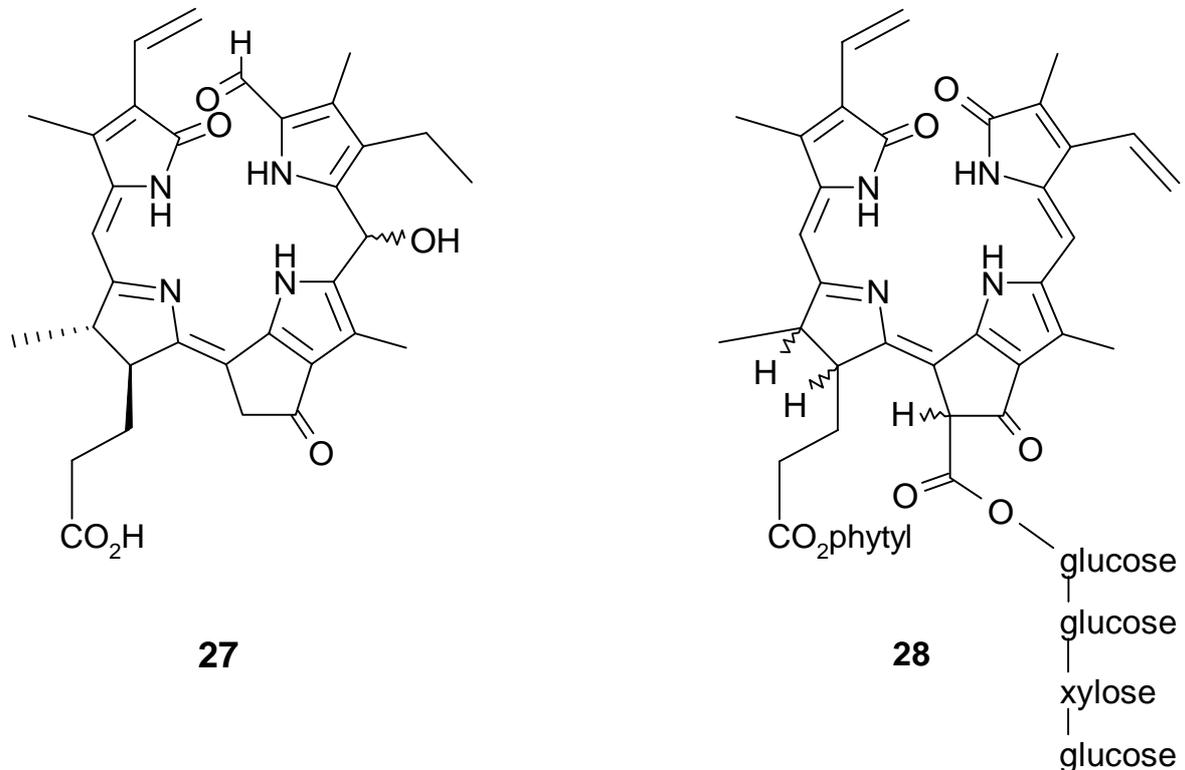
Figure 2.3. : a) Premiers produits de la dégradation des chlorophylles *a* (**23a**) et *b* (**24a**) obtenus à partir de *Chlorella protothecoides*.
 b) Véritables produits de la dégradation des chlorophylles *a* (**24**) et *b* (**25**) obtenus à partir de *Chlorella protothecoides*.
 Les esters méthyliques **23b** et **24b** sont obtenus par estérification des acides correspondants.



L'algue verte *Chlorella protothecoides* possédant les chlorophylles *a* et *b*, il n'était pas surprenant de parvenir à isoler également une structure provenant de la chlorophylle *b*. Le pigment **24a**, contenant encore le groupe formyle caractéristique de la chlorophylle *b* en position C(7), a pu être isolé d'un milieu de culture de *Chlorella protothecoides* [46] (Figure 2.3a.).

Ce n'est que plus tard qu'Engel *et al.* ont montré que les catabolites isolés jusqu'ici dans l'algue verte *Chlorella protothecoides* (**23a**, **24a**) constituent en réalité des composés modifiés lors de l'isolation, et que les principaux pigments rouges excrétés par ce chlorophyte sont véritablement **25** et **26** [47] (Figure 2.3b.).

Figure 2.4. : Produits de la dégradation de la chlorophylle *a* obtenus à partir de *Chlorella Kessleri* (27) et de *Bryopsis maxima* (28).



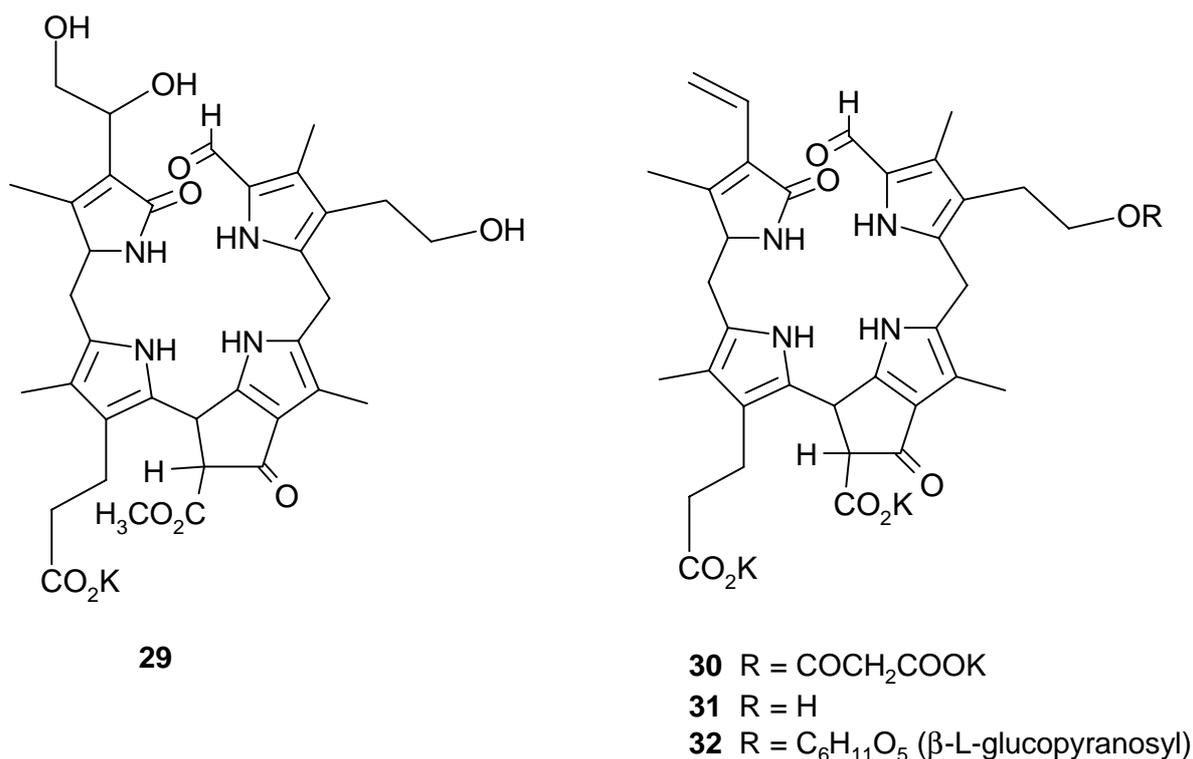
Deux autres chlorophytes se comportent de manière similaire à l'algue *C. protothecoides* en excréant eux aussi des pigments colorés dans leurs milieux de culture, permettant ainsi l'isolation de deux nouvelles structures : les pigments **27** et **28** isolés respectivement de *Chlorella kessleri* [48] et *Bryopsis maxima* [49] (Figure 2.4.).

c) Catabolites isolés d'angiospermes

Dès 1990, Matile *et al.* confirment la présence d'un catabolite incolore et non-fluorescent lors de la sénescence de feuilles d'orge (*Hordeum vulgare* L. de la classe des monocotylédones) induite par l'obscurité. Ce catabolite se colore en brun-rouille lorsqu'il est oxydé sur des plaques de gel de silice [50]. L'utilisation de marquage radioactif démontre que ce catabolite est dérivé de la chlorophylle *a* [51]. En plus du produit non-fluorescent déjà observé, ce procédé permet de détecter par HPLC un catabolite fluorescent en très faible quantité. Ce n'est qu'en 1991 que les groupes de recherche de Matile et Kräutler parviennent à élucider la constitution de ce composé

non-fluorescent **29** [52] (*Figure 2.5.*). L'isolation se fait également par HPLC. Le macrocycle est ouvert avec la même régiosélectivité que celle observée chez les pigments extraits du chlorophyte *Chlorella protothecoides*. La réduction des ponts méthines et le réarrangement de la pyrroline en pyrrole rendent ce catabolite incolore. Les hydroxylations de certaines chaînes secondaires augmentent la polarité de ce composé et facilitent ainsi sa solubilité dans les phases aqueuses. Bien que ce catabolite manifeste des effets Cotton [53], les configurations absolues des centres asymétriques ne sont pas déterminées. Seule la configuration relative des centres C(13²) et C(15) est discutée. Pour des raisons stériques, les deux protons attachés sur ces derniers doivent se trouver dans une configuration anti. De plus, le spectre RMN ¹H ne présente aucun effet dû à la présence d'un deuxième diastéréomère.

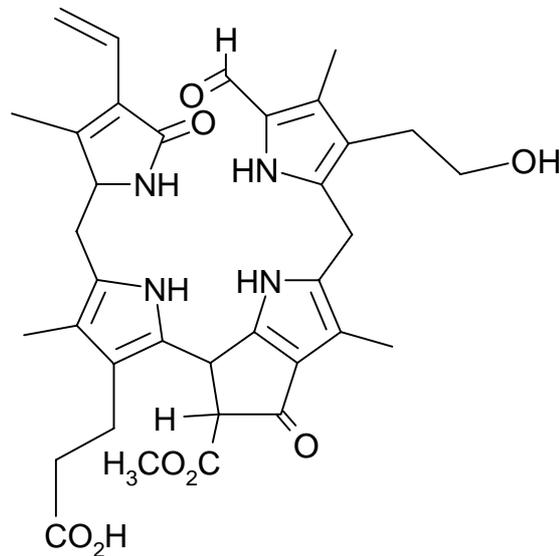
Figure 2.5. : Produits de la dégradation de la chlorophylle *a* obtenus à partir de feuilles d'orge (**29**) (*Hordeum vulgare* L.) et de colza (**30**, **31**, **32**) (*Brassica napus* L.).



En 1993, Ginsburg et Matile détectent la présence de trois catabolites non-fluorescents et d'un autre fluorescent dans les feuilles sénescentes de colza (*Brassica napus* L. de la classe de dicotylédones) [54]. La même année, Mühlecker *et al.* reportent la constitution du catabolite **30** non-fluorescent le plus abondant [55] (*Figure 2.5.*). Celui-ci contient un groupe hydroxy estérifié avec un reste malonyle et

il présente les mêmes caractéristiques que **29**. Quelques années plus tard, les deux autres catabolites non-fluorescents **31** et **32** sont identifiés [56] (*Figure 2.5*). Ces derniers diffèrent du précédent catabolite incolore non-fluorescent **29** seulement par la modification d'un substituant périphérique. **31** possède un groupe terminal hydroxy libre et **32** contient le même groupe glycosylé avec un reste β -L-glucopyranosyle. Indépendamment de ces travaux, deux groupes distincts ont trouvé le même catabolite incolore et non fluorescent **33** : Iturraspe *et al.* [57] l'ont mis en évidence à partir de feuilles de *Liquidambar styraciflua* L. et de *L. orientalis* Mill., puis ce fut au tour de Curty et Engel de l'isoler du *Cercidiphyllum japonicum* [58] (*Figure 2.6*).

Figure 2.6. : Catabolite isolé à partir de *Liquidambar styraciflua* L., de *L. orientalis* Mill. et de *Cercidiphyllum japonicum*.



33

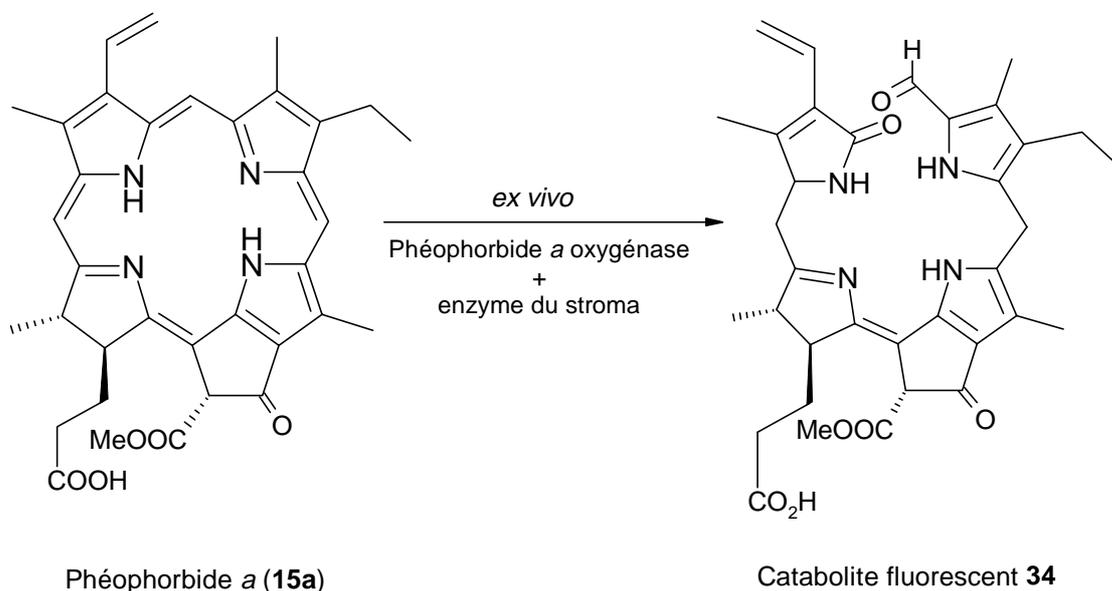
Il est très important de noter qu'aucun catabolite provenant de la chlorophylle *b* possédant un groupe formyle en position C(7) n'a pu être isolé dans les plantes évoluées. Cette observation permet de se demander ce qui se passe avec la chlorophylle *b* dans les plantes plus évoluées.

2.4.2. Dans un système *ex vivo*

Afin de mieux comprendre le mécanisme de la dégradation de la chlorophylle, des systèmes *ex-vivo* ont été créés à partir d'extraits de plantes.

En utilisant des thylacoïdes sénescents du colza dicotylédone (*Brassica napus* L.), Hörtensteiner *et al.* transforment *ex vivo* la phéophorbide *a* (**15a**) en un composé incolore et fluorescent **34** [59]. Sa constitution est proche des catabolites isolés de feuilles sénescents de colza [60]. L'hydroxylation n'a pas eu lieu et, surtout, **34** conserve une unité pyrrolinique (Schéma 2.4.). Pour que cette transformation ait lieu, il faut que deux enzymes soient présentes : la phéophorbide *a* oxygénase et une autre enzyme présente dans le stroma. Hörtensteiner *et al.* pensent que ce catabolite **34** constitue un produit intermédiaire de la dégradation de la chlorophylle dans le colza, car d'une part il se trouve en très petite quantité, et d'autre part la fonctionnalisation des chaînes secondaires n'a pas encore eu lieu [60].

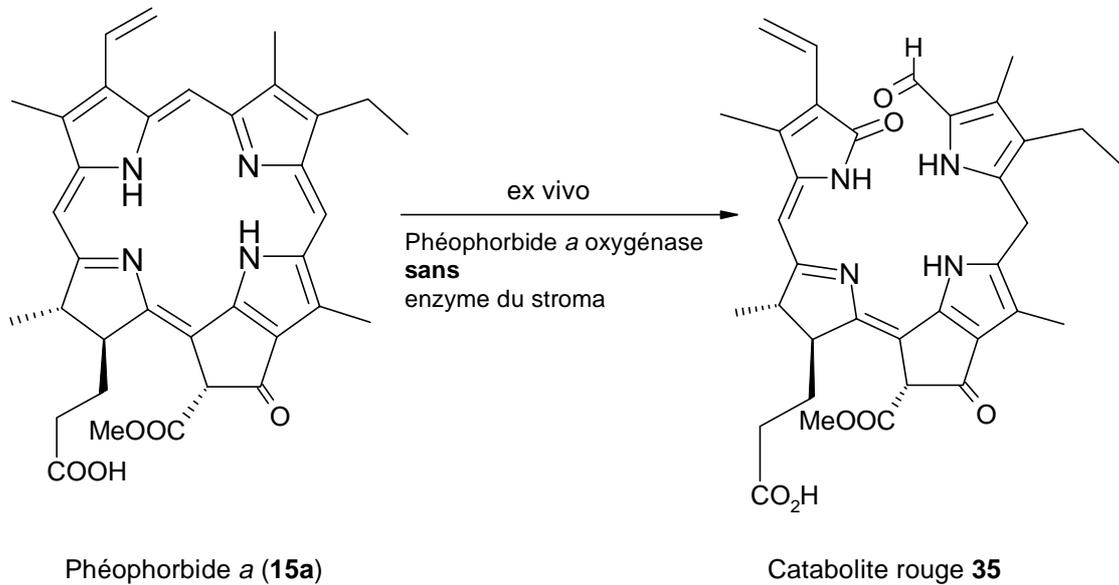
Schéma 2.4. : Transformation *ex vivo* de la phéophorbide *a* (**15a**) en un catabolite fluorescent et incolore **34**.



Lorsque le même système *ex vivo* est utilisé uniquement en présence de la phéophorbide *a* oxygénase (c'est-à-dire en absence de l'enzyme présente dans le stroma), un autre produit intermédiaire peut être isolé et caractérisé. Il s'agit du tétrapyrrole linéaire de couleur rouge **35** dont la constitution est très proche de celle

des pigments rouges découverts dans le milieu de culture de l'algue *Chlorella protothecoides* [61,62].

Schéma 2.5. : Transformation *ex vivo* de la phéophorbide *a* (**15a**) en un catabolite rouge **35**.



Les auteurs ont à nouveau considéré ce composé tétrapyrrolique linéaire rouge comme un intermédiaire à cause de la très petite quantité de produit présent dans les systèmes *in vivo*. Il a en effet fallu stopper la dégradation en omettant l'enzyme du stroma dans le but d'accumuler le catabolite **35** afin de pouvoir l'isoler et le caractériser.

2.4.3. Dans un système *in vitro*

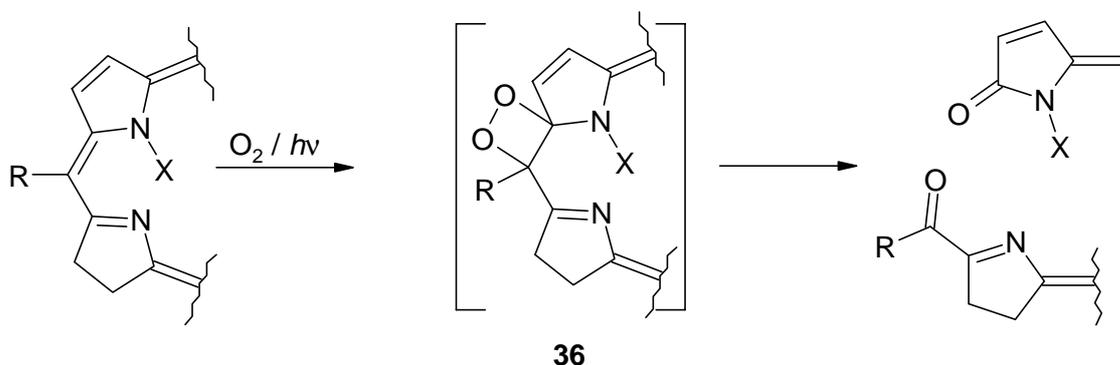
Lors de la dégradation de la chlorophylle, l'étape la plus importante est en réalité l'ouverture oxydative du macrocycle. Afin de comprendre cette ouverture, de nombreux systèmes d'étude *in vitro* ont été élaborés. Cependant, peu de réactions chimiques connues sont capables d'ouvrir le macrocycle de la pyropheophorbide .

Seule la dégradation photochimique semble être la réaction de choix pour étudier cette ouverture de manière rigoureuse.

Jen et MacKinney montrent qu'une solution de chlorophylle irradiée en présence d'oxygène forme un certain nombre d'intermédiaires rouges et d'autres incolores non caractérisés [63,64].

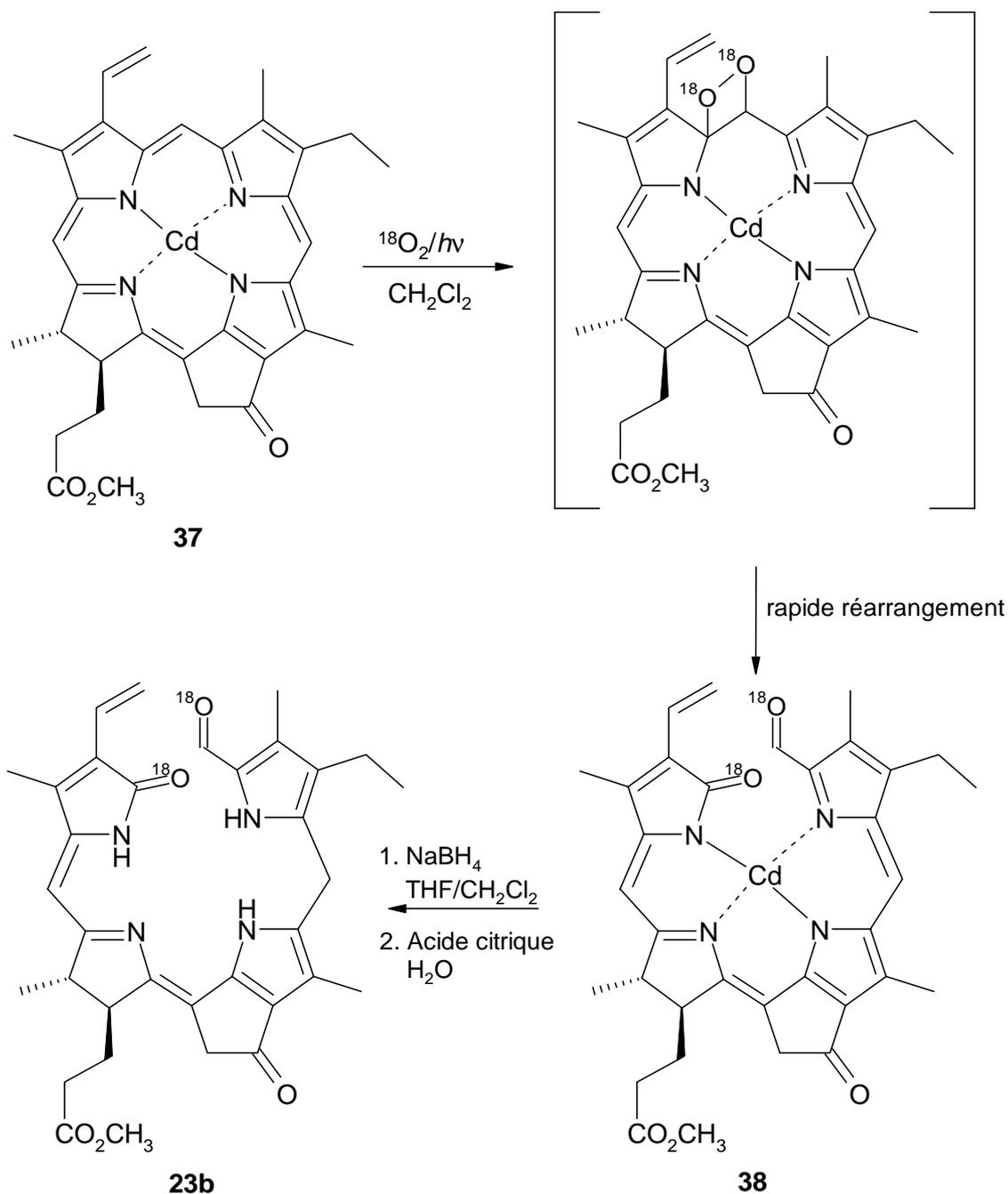
La photo-oxydation des dérivés 20-chloro et 20-trifluoroacétoxy de la pyrophéophorbido *a* de zinc(II) [65], ainsi que des dérivés de bactériochlorophylles *c* et *e* [66-68], fournit les tétrapyrroles linéaires résultant de l'ouverture du macrocycle en position C(1) et C(20) selon un mécanisme « une molécule ». Cette réaction est typique de tous les dérivés de la chlorophylle qui contiennent un substituant en position C(20). La cycloaddition $[\pi^2+\pi^2]$ de l'oxygène singulet sur les positions C(1) et C(20), formant l'intermédiaire dioxétane **36**, produit le clivage du macrocycle aromatique (*Schéma 2.6.*).

Schéma 2.6. : Mécanisme de l'ouverture photo-oxydative du macrocycle des dérivés de la chlorophylle substitués en position C(20). Les chaînes secondaires du macrocycle ne sont pas représentées. R=CH₃, Cl ou OOCF₃; X=H ou Mg²⁺.



Il faut attendre 1991 pour qu'Iturraspe et Gossauer décrivent l'ouverture photo-oxydative d'un complexe métallique de l'ester méthylique de la pyrophéophorbide *a* [69]. Son complexe de Zn(II) produit une ouverture entre les carbones C(20) et C(1) donnant un dérivé de la 1,20-dioxo-1,20-seco[21H, 23H]pyrophéophorbide *a* tandis que le complexe de Cd(II) **37** produit dans les mêmes conditions une ouverture entre les carbones C(4) et C(5). Ce dernier composé **38** peut être transformé par démétallation réductrice en un pigment **23b** identique au premier pigment isolé du milieu de culture de *C. protothecoides* [45] (*Schéma 2.7.*).

Schéma 2.7. : Mécanisme de l'ouverture photo-oxydative du macrocycle de l'ester méthylique de la pyrophéophobidato *a* de cadmium (II) (**37**).



Les expériences de photo-oxydation de l'ester méthylique de la pyrophéophorbide *a* chélaté au Cd(II) (**37**) effectuées en présence de $^{18,18}\text{O}_2$ démontrent que l'ouverture du macrocycle se passe selon le mécanisme « une molécule » [70]. Ainsi, un intermédiaire dioxétane doit être formé par cycloaddition $[\pi^2+\pi^2]$ de l'oxygène moléculaire sur la double liaison C(4)=C(5) (Schéma 2.7.).

2.4.4. La régiosélectivité

Lors de la dégradation de la chlorophylle, on observe une ouverture oxydative du macrocycle sur la liaison aromatique C(4)=C(5). Ce résultat s'oppose à celui observé chez des luciférines isolées de planctons bioluminescents [39,40] et à celui obtenu lors de la photo-oxydation de dérivés de la bactériochlorophylle *c* [66,68] durant laquelle l'ouverture oxydative du macrocycle a lieu sur la liaison double C(20)=C(1). De nombreux modèles d'étude sont basés sur l'observation que les chlorines (sans isocycle) montrent une forte réactivité aux attaques des électrophiles sur les positions méso C(15) et C(20) (i.e. voisines du cycle réduit) tandis que les autres positions méso C(5) et C(10) ne réagissent pas dans les mêmes conditions [71,72]. En accord avec ces résultats, des calculs théoriques montrent que les carbones méso adjacents à la pyrroline possèdent de plus fortes densités électroniques [73]. Ces positions sont donc plus sensibles aux électrophiles. Ainsi, il n'est pas étonnant que l'introduction d'un groupe chloro sur l'ester méthylique de la pyrophéophorbide *a* se fasse en position C(20) [65].

Il est établi que la complexation d'un métal aux chlorines et aux porphyrines modifie leurs propriétés rédox [74]. Malgré cela, le complexe de Zn(II) de l'ester méthylique de la pyrophéophorbide *a* effectue une méso-trifluoroacétoxylation en position C(20) [65]. Cette régiosélectivité est donc typique d'une chlorine. L'ester méthylique de la pyrophéophorbide *a* peut, après la complexation avec Zn(II) ou Cd(II), être photo-oxydé régiosélectivement sur la liaison double C(19)=C(20), respectivement C(4)=C(5) [69]. La photo-oxydation du complexe de Cd(II) fournit, avec un rendement de seulement 30%, la seule réaction d'ouverture oxydative du macrocycle de l'ester méthylique de la pyrophéophorbide *a* sur la position méso non-voisine au cycle réduit, et elle démontre l'importance du métal complexant pour la régiosélectivité de l'oxydation. Étonnamment, le potentiel rédox du complexe de Cd(II) est identique à celui de la chlorophylle *a* [69].

Isaac *et al.* observent aussi une régiosélectivité différente suivant le métal utilisé lors de la méso-trifluoroacétoxylation de métallo-*b*-oxochlorines [75]. Le complexe de Zn(II) réagit principalement en position méso C(5), fournissant un produit d'oxydation inattendu, tandis que le complexe de Ni(II) donne uniquement le produit d'oxydation attendu en position C(20).

Lors de la dégradation de la chlorophylle dans l'algue verte *C. protothecoides* [76], Curty et Engel décrivent le marquage de la position C(10) au moyen de deutérium. Les algues sont en effet placées dans un milieu de culture contenant de l'eau $^2\text{H}_2\text{O}$ à 59%, alors que la sénescence est induite dans de l'eau normale ($^1\text{H}_2\text{O}$). Les résultats ont montré que, lors de la dégradation, un proton était introduit de manière régiosélective en position C(10), mais également de manière stéréosélective. Cette expérience a permis de démontrer la stabilité du deutérium (et du proton) de la position C(10), en plus d'une remarquable régio- et diastéréosélectivité.

2.5. La proposition d'un mécanisme de dégradation de la chlorophylle *a* dans les plantes.

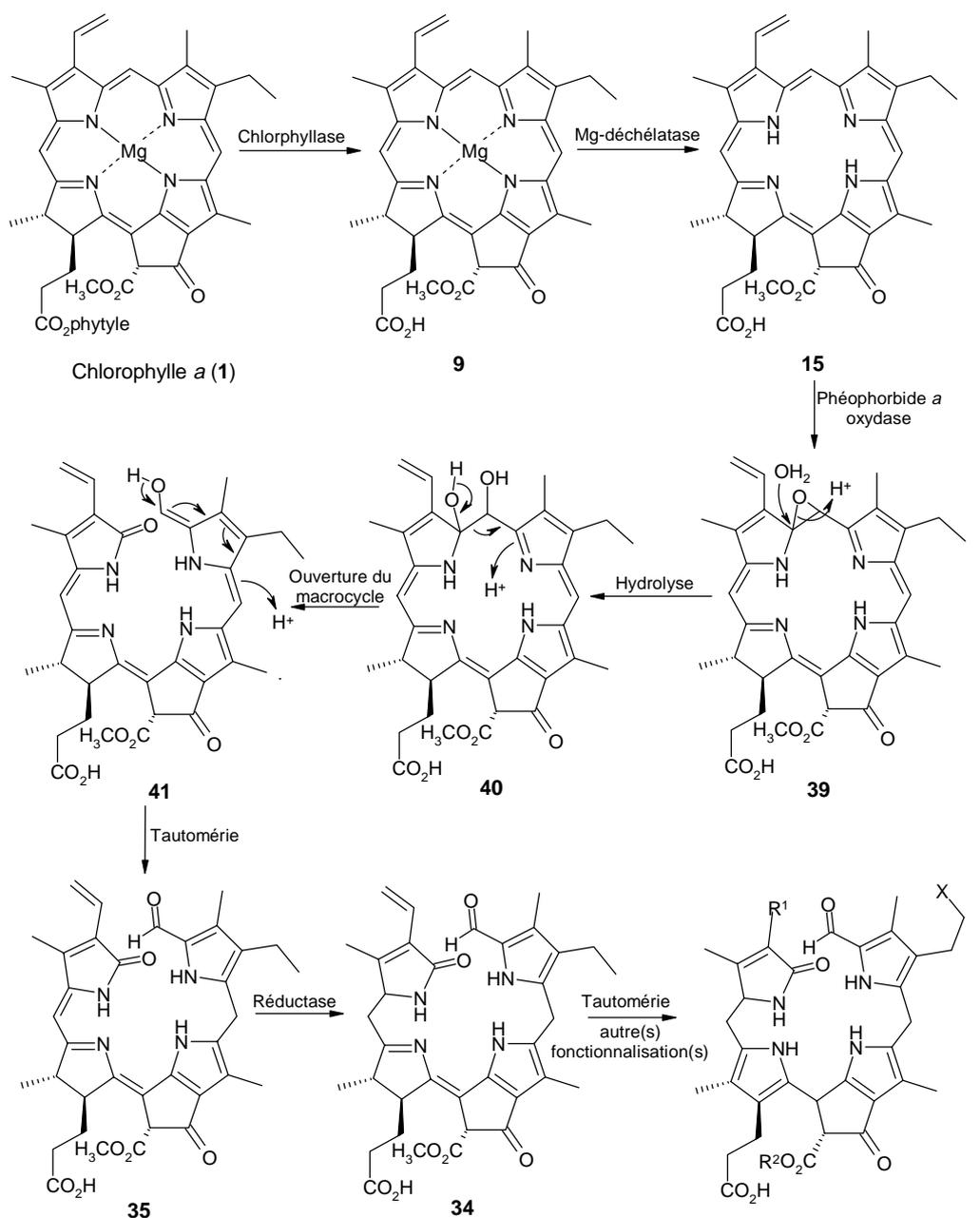
A la suite des investigations de ces dernières années, un mécanisme de dégradation de la chlorophylle *a* dans les plantes a pu être formulé.

L'hydrolyse de l'ester phytylique au moyen de la chlorophyllase est considérée depuis longtemps comme étant la première étape du catabolisme [26]. Cette enzyme permet la transformation de la chlorophylle *a* (**1**) en chlorophyllide *a* (**9**). Cette estérase semble suivie d'une magnésium-déchélatase pour obtenir la phéophorbide *a* (**15a**) comme il a été décrit par Matile *et al.* [77].

Aujourd'hui, il est admis que la phéophorbide *a* (**15a**) constitue le substrat pour une ouverture oxydative du macrocycle [59]. Il faudrait encore déterminer si le substrat reste lié à une protéine ou non durant le processus de dégradation. Quelques investigations ont permis de déduire que le catabolisme de la chlorophylle avait lieu dans un environnement riche en protéines lipophyles [78-80]. Le mécanisme de l'ouverture oxydative demeure assez secret. Malgré tout, grâce aux expériences de marquages *in vivo* effectuées par Curty *et al.* [81] à l'aide d'oxygène moléculaire $^{18,18}\text{O}_2$, il a pu être démontré que seul le groupe formyle de la position C(5) contenait un atome d'oxygène provenant de l'oxygène moléculaire de l'air. Quant à l'oxygène de la fonction lactame, il provient de l'eau. C'est sur ces résultats que Curty *et al.* postulent l'emploi d'une monooxygénase pour la première étape de cette ouverture oxydative [81]. L'époxyde **39**, intermédiaire probablement très instable de cette

oxydation, n'a pas pu être isolé. Une hydrolyse sélective convertit l'époxyde **38** en diol **39**, qui, par une ouverture du macrocycle, fournit le composé **40**. Ce dernier tautomérise aussitôt pour former le pigment **32**. La structure de ce pigment ressemble étroitement à celle du catabolite **21** isolé de *C. protothecoides*, et à celle du produit intermédiaire **32** observé dans la transformation *ex vivo* de la phéophorbide *a* (**15a**) dans le colza (*B. napus*) [61,62].

Schéma 2.8. : Proposition d'un mécanisme de dégradation de la chlorophylle *a* dans les plantes [81,82].



- 29** R¹=CHOHCH₂OH R²=CH₃ X=OH
30 R¹=CH=CH₂ R²=K X=OCOCH₂COOK
31 R¹=CH=CH₂ R²=K X=OH
32 R¹=CH=CH₂ R²=K X=OC₆H₁₁O₅
33 R¹=CH=CH₂ R²=CH₃ X=OH

Pour isoler l'intermédiaire fluorescent **34** [59], la présence de ferrédoxine réduite est nécessaire. Ceci révèle l'existence d'une réductase dans le but de transformer le composé **35** en un composé incolore fluorescent. Une tautomérie des protons du cycle D conduit à la formation d'un pyrrole. Cette étape est favorisée par la formation d'un composé aromatique hétérocyclique thermodynamiquement plus stable. Des oxydations supplémentaires permettent de fonctionnaliser les chaînes secondaires des catabolites pour finalement former les catabolites principaux isolés dans l'orge **29**, le colza **30**, **31**, **32**, ainsi que dans les *Liquidambar* et le *C. japonicum* **33**. La séquence et le rôle de ces fonctionnalisations des chaînes latérales ne sont pas connus. Seul un rapprochement avec les fonctionnalisations des anthocyanines a été relevé dans la littérature à propos de l'étude de la malonylation du catabolite du colza [83]. Le rôle probable de cette fonctionnalisation consiste en l'adressage des catabolites dans les vacuoles [84].

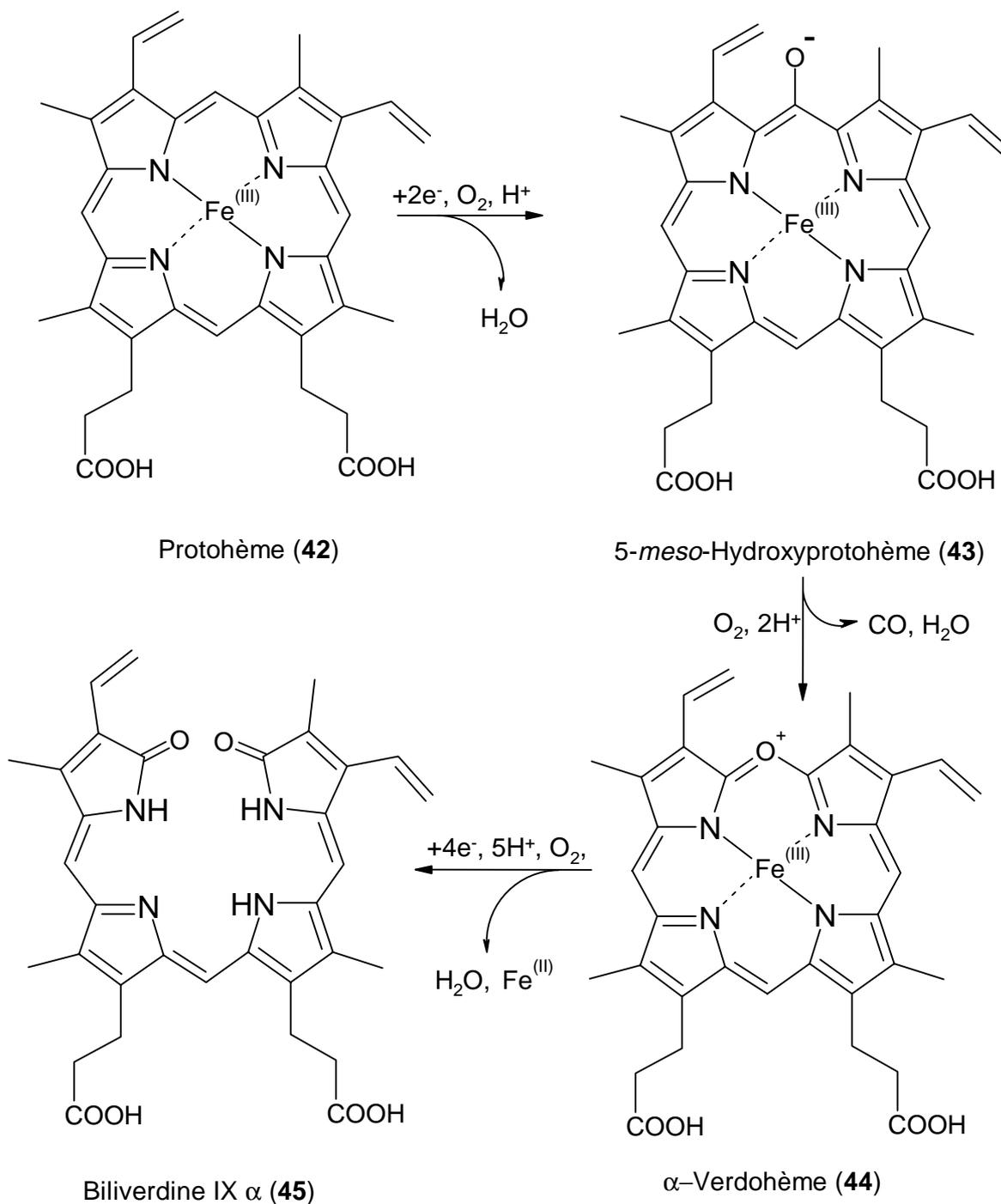
Concernant la dégradation de la chlorophylle *b*, le mécanisme reste une énigme. En effet, le seul catabolite provenant de la chlorophylle *b* qui a pu être isolé jusqu'à aujourd'hui provient des algues vertes *C. protothecoides*. [46] Aucun produit de dégradation provenant de la chlorophylle *b* n'a pu être isolé des plantes supérieures [52,55-58]. Comme aucun mécanisme n'a pu être démontré jusqu'à ce jour, il n'est pas possible d'en formuler un ici. Ito *et al.* ont montré la présence d'une enzyme d'interconversion entre les chlorophylles *a* et *b* afin de réguler le taux de chlorophylle *b* dans les plantes supérieures [85,86]. Dès lors, une transformation de chlorophylle *b* en chlorophylle *a* avant dégradation a été postulée.

2.6. La comparaison avec le catabolisme de l'hème.

La réaction de type II la mieux étudiée est celle de l'ouverture du macrocycle de l'hème qui aboutit à la formation des pigments biliaires. La compréhension d'un tel phénomène a des implications multiples en médecine, car les pigments biliaires sont éliminés dans les excréments et l'urine. L'importance de l'hème oxygénase est encore renforcée par la découverte du fait que la biliverdine est un précurseur biogénétique des phycocyanines [87]. Les phycocyanines sont les molécules

photoréceptrices des organismes (cyanobactéries) qui se trouvaient sur Terre avant que l'oxygène ne soit en quantité suffisante dans l'atmosphère.

Schéma 2.9. : Catabolisme de l'hème chez les mammifères.



L'ouverture du macrocycle du protohème (42) s'effectue en position C(5), avec perte

du carbone C(5) sous forme de monoxyde de carbone pour former la (proto)biliverdine IX α (**45**) (*Schéma 2.9.*). En utilisant $^{18,18}\text{O}_2$, Brown et ses collaborateurs démontrent que l'ouverture du macrocycle de la protoporphyrine se passe avec un mécanisme « deux molécules » [88-91]. Malgré ces évidences, le mode d'action de l'hème oxygénase reste toujours controversé. L'oxygène moléculaire, le NADPH, un système de transport d'électrons et enfin la présence de l'atome central de fer de l'hème sont essentiels à l'activité de cette enzyme. La transformation de l'hème en biliverdine nécessite trois molécules d'oxygène et elle passe probablement par les intermédiaires 5-méso-hydroxyprotohème (**43**) et α -verdohème (**44**) [87]. Par la suite, la biliverdine (**45**), produite par l'ouverture de l'hème dans le foie des mammifères, est réduite en bilirubine (**46**) par la biliverdine réductase avant d'être à nouveau réduite et excrétée dans la bile sous forme de dérivés de l'urobilinogène (**47**) et de la stercobilinogène (**48**) (*Figure 2.7.*).

Les connaissances acquises dans la dégradation enzymatique de l'hème pourraient contribuer à l'élucidation du catabolisme de la chlorophylle. Mais la chlorophylle n'est pas un substrat pour l'hème oxygénase, puisque le magnésium ne peut pas lier et activer l'oxygène comme le fait l'atome de fer de l'hème [34]. Malgré cela, il y a une trentaine d'années, il fut proclamé que la formylbilinone **49**, pour laquelle l'ouverture du macrocycle a lieu avec une régiosélectivité analogue au catabolite de la dégradation de la chlorophylle isolé à partir du milieu de culture de *C. protothecoides*, avait été obtenue lors de l'ouverture du macrocycle de l'hème par une enzyme du foie [92,93] (*Figure 2.8.*). Malheureusement, la structure du produit **49** ne put être confirmée par la suite [94].

Figure 2.7. : Les principaux pigments biliaires formés par la réduction dans les intestins des mammifères.

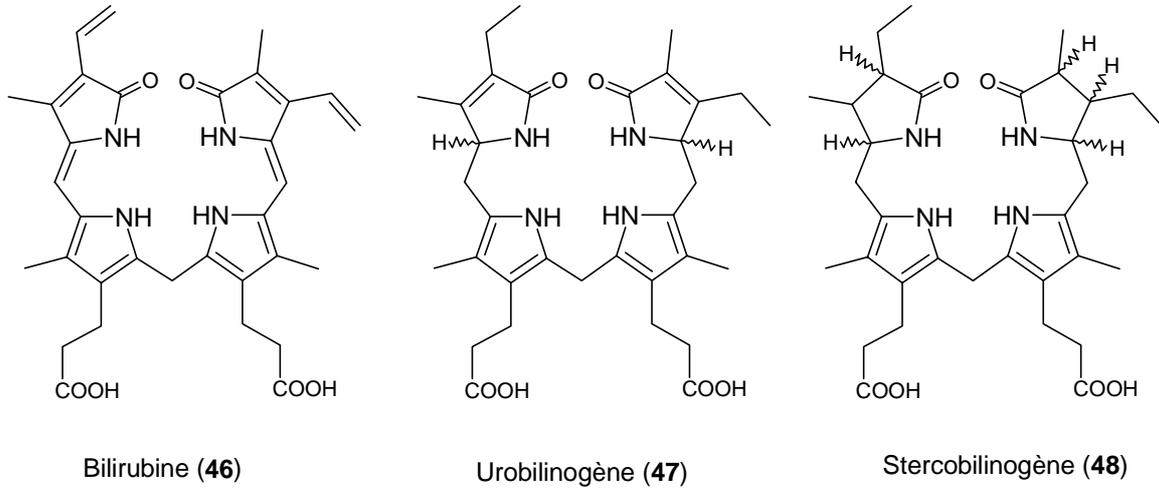
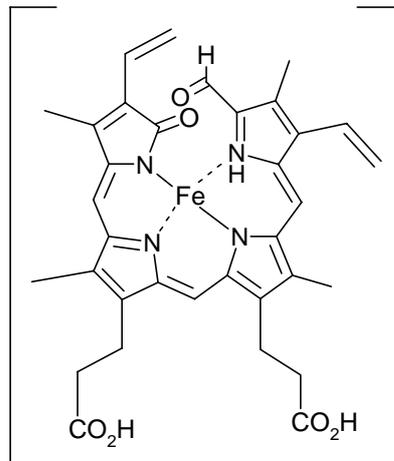


Figure 2.8. : Structure proposée pour le composé obtenu par dégradation enzymatique de l'hème.



49

3. *Les maléimides provenant des dérivés de la chlorophylle*

3.1. L'oxydation à l'acide chromique

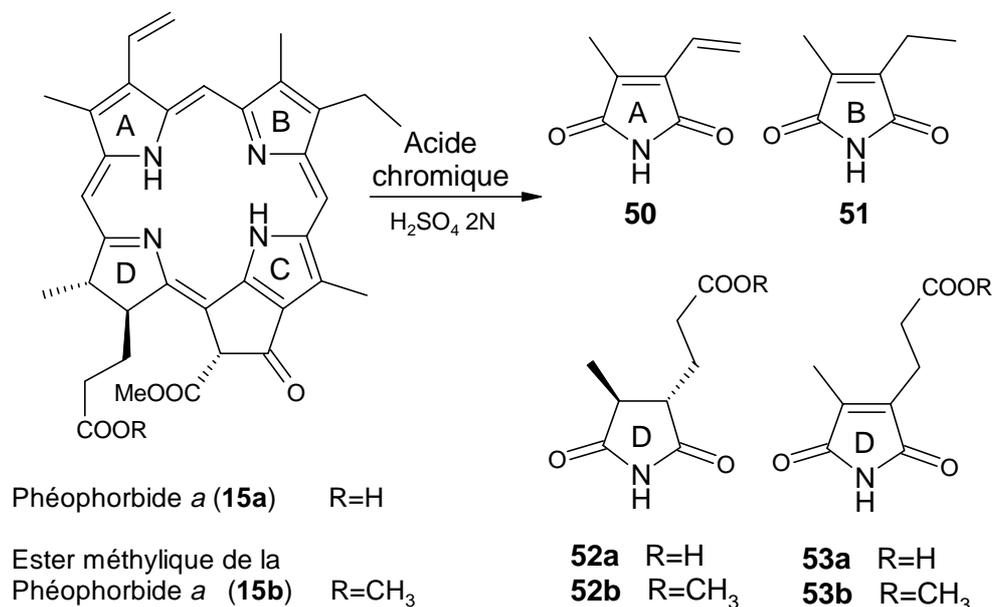
En 1896 déjà, Küster utilise une réaction d'oxydation dégradative pour analyser la structure de plusieurs porphyrines (hémimes) [95]. Cette réaction consiste à oxyder le tétrapyrrole au moyen de chromate. Cette oxydation, qui ne constitue pas un modèle pour la dégradation *in vivo* de la chlorophylle, fut utilisée plus tard pour déterminer la structure de la chlorophylle [96]. Plus particulièrement, cette réaction est employée pour déterminer la configuration absolue des deux stéréocentres du cycle D [10,11].

L'oxydation de la phéophorbide *a* (**15a**) par cette méthode fournit 4 imides : 3 principaux et un secondaire. Les cycles A et B de la phéophorbide *a* procurent le méthyl-vinyl-maléimide (**50**) et l'éthyl-méthyl-maléimide (**51**), alors que le cycle D donne principalement l'imide de l'acide (2S,3S)-dihydro-hématinique (**52a**), mais aussi son produit d'oxydation : l'imide de l'acide hématinique² (**51a**) (*Schéma 3.1.*).

Cette réaction permet de fragmenter une grosse molécule tétrapyrrolique ; les morceaux résultant de cette fragmentation conservent les fonctionnalités intéressantes du macrocycle.

² Il faut cependant noter que l'on trouve dans la littérature deux nomenclatures possibles pour cette substance : celle de Hans Fischer, qui dénomme le composé **51** acide hématinique [97], et celle de Wolfhart Rüdiger, qui appelle le même composé imide de l'acide hématinique [98]. Lors de ce travail, la nomenclature émise par Rüdiger sera désormais utilisée.

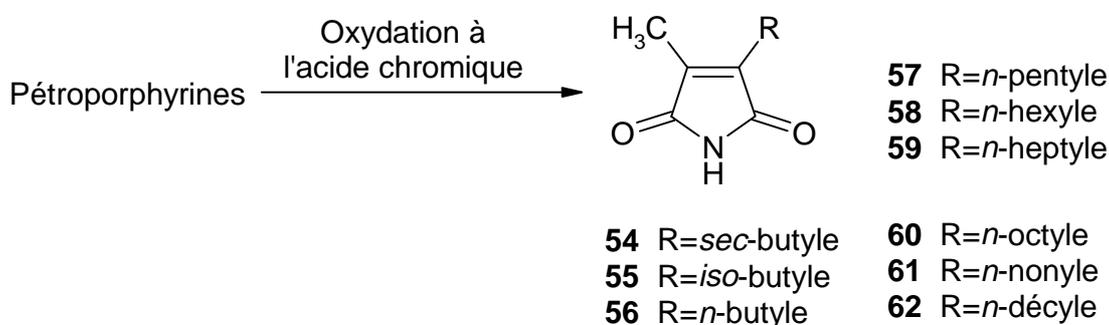
Schéma 3.1. : Différents imides obtenus par dégradation à l'acide chromique de la phéophorbide *a* (**15a**) et de son ester méthylique **15b**.



3.2. L'oxydation de porphyrines et de pigments biliaires

L'oxydation de porphyrines au moyen de l'acide chromique est largement répertoriée dans la littérature : l'oxydation de la mésoporphyrine fournit les maléimides **51** et **53a** [99,100], la dégradation de la protoporphyrine IX permet d'isoler les maléimides **50** et **53a**, la réaction de l'acide chromique avec des pétroporphyrines conduit à de nombreux maléimides substitués par une chaîne alkyle (**54-62**) [101] (*Schéma 3.2.*).

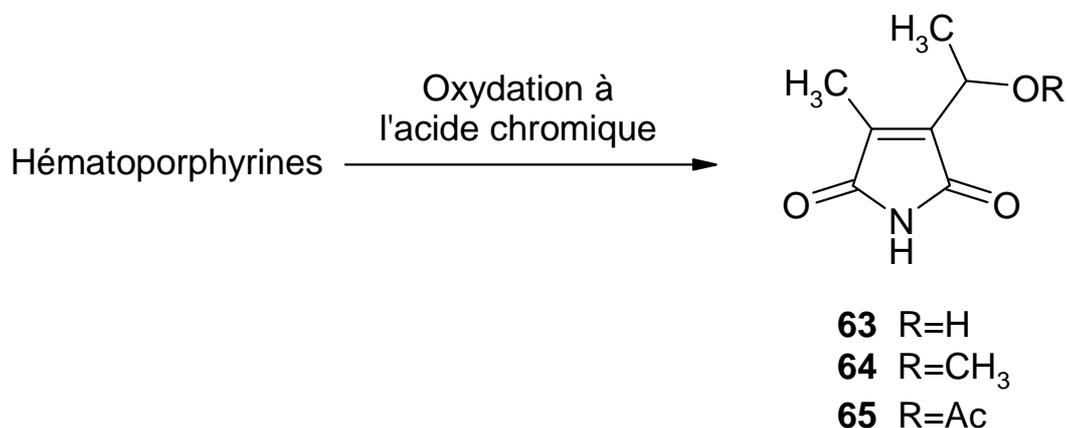
Schéma 3.2. : Oxydation des pétroporphyrines au moyen de l'acide chromique.



Le clivage de dérivés porphyriniques en maléimides au moyen de l'acide chromique reste une réaction largement utilisée pour déterminer la composition de mélanges de

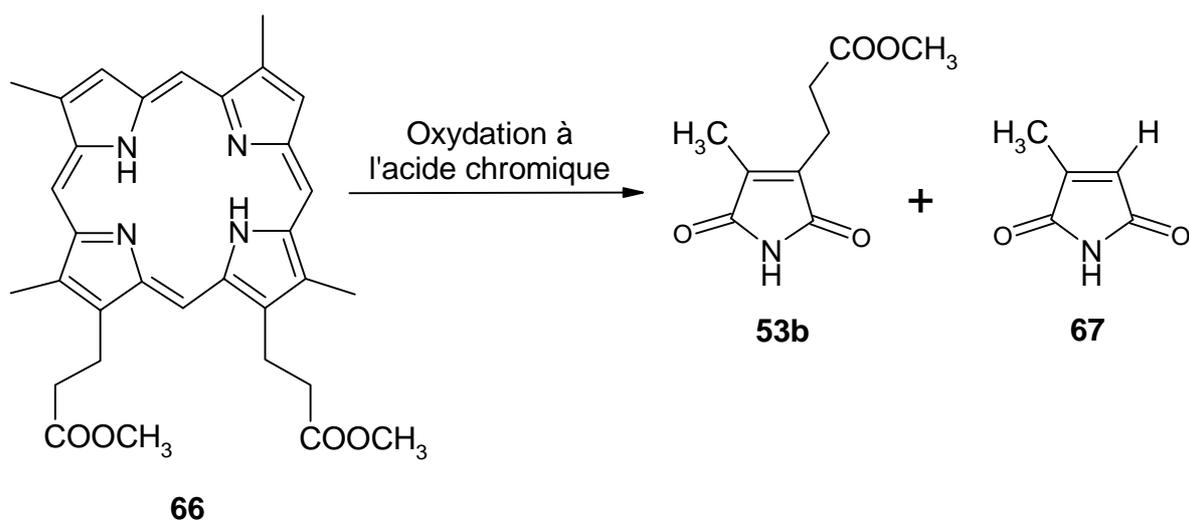
différentes hématorphyrines utilisées pour la thérapie photodynamique [102]. Ainsi, les maléimides **63**, **64**, **65** et **53** sont répertoriés (*Schéma 3.3.*).

Schéma 3.3. : Oxydation des hématorphyrines pour déterminer la composition des mélanges utilisés en thérapie photodynamique.



L'oxydation du diester de la deutérohémimine **66** permet la caractérisation du maléimide **53b**, ainsi que celle du maléimide **67** possédant une position 3 libre aussi appelé imide de l'acide citraconique. (*Schéma 3.4.*).

Schéma 3.4. : Oxydation de l'ester diméthylrique de la deutéroporphyrine (**66**) à l'acide chromique.



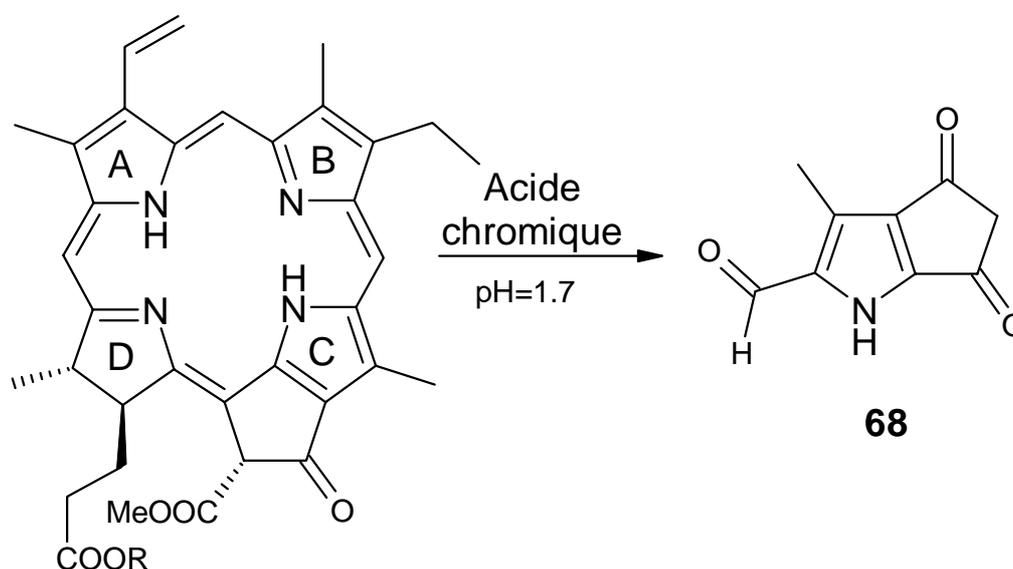
L'oxydation de pigments biliaires comme la bilirubine **46** permet de détecter les maléimides **50** et **53a** [103]. L'étude de l'oxydation de ptérobilines et de

néoptérobilines au moyen de l'acide chromique a permis d'isoler l'ester **53b**, le composé vinylé **50**, ainsi que d'autres fragments [104].

Au vu de ces nombreux exemples, l'oxydation au moyen de l'acide chromique constitue une réaction de choix pour déterminer de manière qualitative la constitution des cycles A, B et D d'une porphyrine, d'un tétrapyrrole, ou encore d'un produit de dégradation de la chlorophylle ou de l'hème.

Comme c'est le cas pour les chlorophylles et la plupart de leurs dérivés, le cycle C est accolé à l'isocycle typique des phorbines. L'oxydation de ces composés à l'acide chromique ne permet pas de détecter un maléimide provenant de ce cycle C, car l'oxydation au chrome n'est pas assez forte. Toutefois, en modifiant légèrement les conditions de réaction, le composé **68** peut être isolé et caractérisé [105] (*Schéma 3.5.*).

Schéma 3.5. : Modification des conditions de réaction à l'acide chromique pour isoler l'aldéhyde **68** qui provient du cycle C d'un tétrapyrrole.



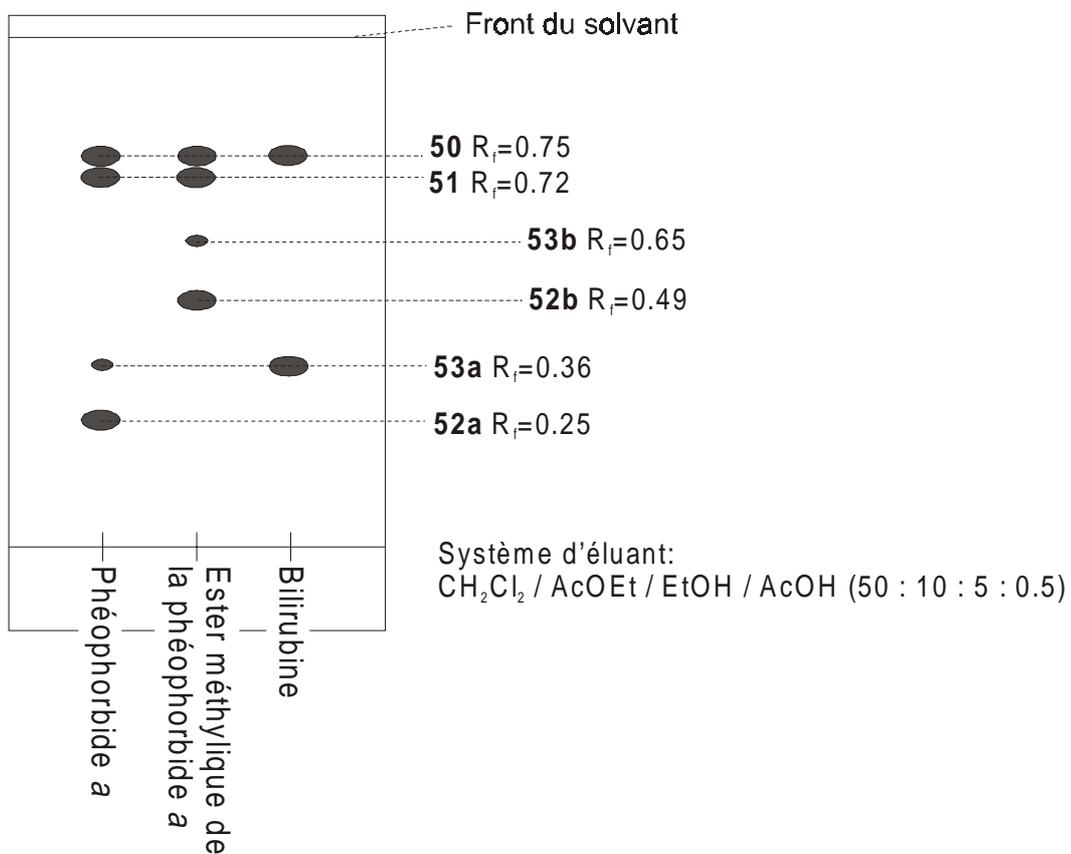
Phéophorbide *a* R=H

Ester méthylique de la
phéophorbide *a* R=CH₃

Rüdiger a même développé une méthode de détermination chromatographique de la constitution des pigments biliaires par oxydation à l'acide chromique [98]. L'avantage de cette méthode réside dans le fait qu'avec une quantité minimale de pigment biliaire, il est possible de déterminer la constitution de ce pigment en comparant sur une chromatographie couche mince (CCM) les maléimides formés avec des références connues (*Figure 3.1.*). Cette technique est rendue possible par le fait qu'une infime quantité de maléimide peut être révélée au moyen du système Cl₂/benzidine [106]. En effet, en plaçant dans une chambre de chlore (Cl₂) une CCM contenant une très faible quantité de maléimide, la plaque chromatographique exposera un spot bleu après avoir été sprayée au sortir de la chambre de chlore avec une solution de benzidine.

Cette méthode permet d'avoir rapidement des informations sur la nature du pigment présent dans la solution analysée.

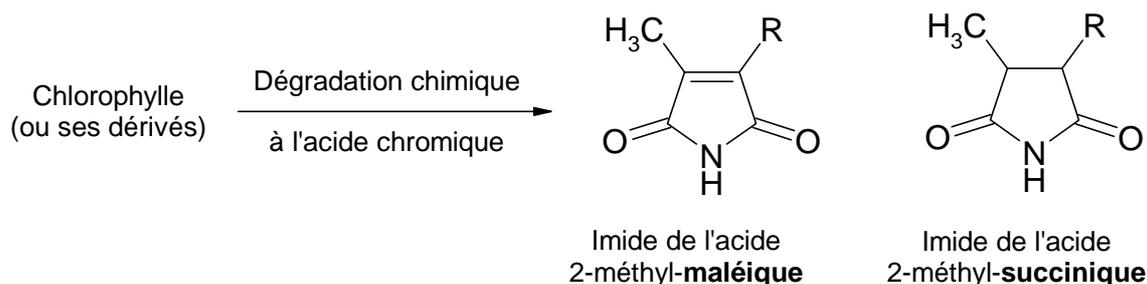
Figure 3.1. : Aspect typique d'un test chromatographique selon la méthode de Rüdiger.



3.3. La synthèse des maléimides provenant des dérivés de la chlorophylle

Tous les maléimides (et les succinimides) provenant de la dégradation de la chlorophylle et de ses dérivés possèdent un groupe méthyle en position 3 (*Schéma 3.6.*). Or, peu de 3-méthyl-maléimides (imides de l'acide citraconique) ont pu être synthétisés autrement que par la dégradation chimique à l'acide chromique des porphyrines ou des tétrapyrroles correspondants. Il est toutefois possible de trouver 3 différentes approches de synthèses pour obtenir des maléimides méthylés en position 3, et fonctionnalisés en position 4 par un autre substituant.

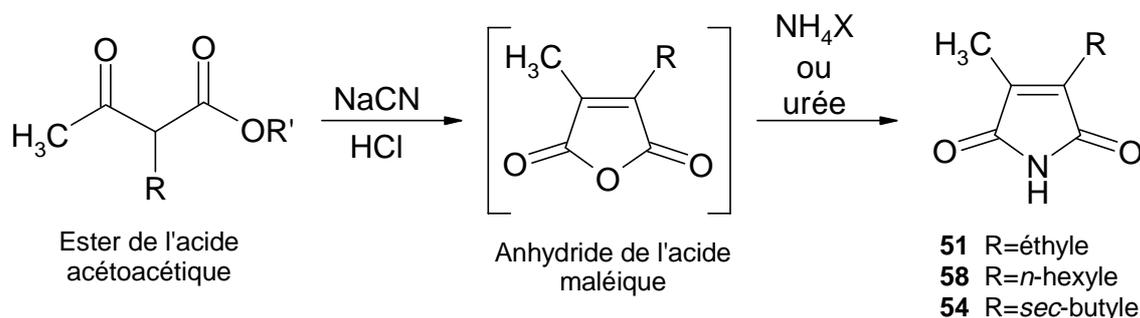
Schéma 3.6. : 2 sortes d'imides obtenus lors de la dégradation chimique de la chlorophylle ou de ses dérivés : un maléimide ou un succinimide.



3.3.1. La synthèse de maléimides à partir d'esters de l'acide acétoacétique

Certains 3-méthyl-maléimides ont déjà été formés au moyen d'esters de l'acide acétoacétique et de cyanure comme source du carbone manquant (*Schéma 3.6.*).

Schéma 3.7. : Synthèse des maléimides **51**, **54** et **58** à partir des esters de l'acide acétoacétique correspondants.



Cette méthode a été rapportée pour la synthèse de l'éthyl-méthyl-maléimide **51** [105]. En effet, en alkylant l'acétoacétate d'éthyle déprotoné avec le iodure d'éthyle, on obtient le 2-éthyl-acétoacétate d'éthyle, qui réagit avec le cyanure de sodium pour conduire à la cyanhydrine correspondante. Cette dernière réagit avec l'acide chlorhydrique concentré et condense pour former l'anhydride de l'acide maléique. En échangeant l'atome d'oxygène contre un atome d'azote au moyen de l'urée, on obtient finalement le produit désiré **51**.

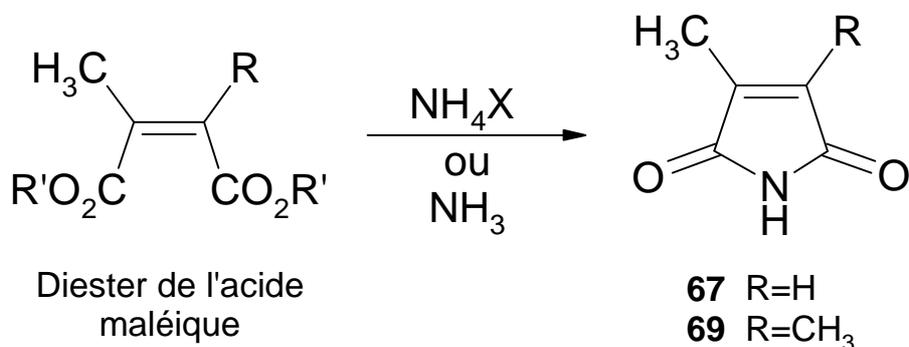
Cette méthode de synthèse est aussi utilisée pour produire les maléimides **54** et **58**, mais uniquement avec des rendements faibles (0.5% pour le composé **54** et 5% pour le **58**).

Cette voie de synthèse équivaut à former l'anhydride *in situ* comme produit intermédiaire et à substituer l'atome d'oxygène par un atome d'azote au moyen d'une source d'azote (un sel d'ammonium ou l'urée).

3.3.2. La synthèse de maléimides à partir d'esters de l'acide citraconique ou de l'anhydride citraconique

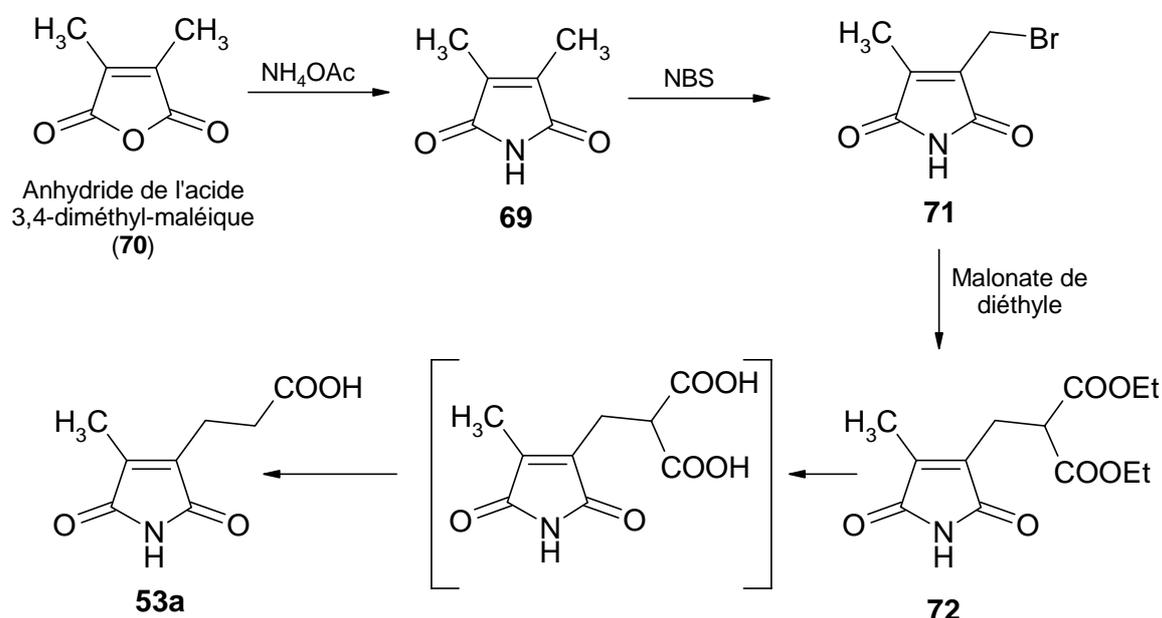
La formation de 3-méthyl-maléimide substitué aussi en position 4 peut être effectuée en utilisant des esters de l'acide citraconique (acide méthylmaléique) comme illustré dans le schéma 3.8.. C'est le cas pour le 3,4-diméthyl-maléimide (**69**) [107] ou pour l'imide de l'acide citraconique (**67**) [108,109].

Schéma 3.8. : Formation des maléimides **67** et **69** au moyen de diesters citraconiques.



Une récente publication décrit la synthèse de l'imide de l'acide hématinique (**53a**) à partir de l'anhydride de l'acide 3,4-diméthyl-maléique. Le 3,4-diméthyl-maléimide (**69**) est formé au moyen d'acétate d'ammonium comme source d'azote, et fonctionnalisé par la suite sur la position 4 au moyen du malonate de diéthyle, comme l'illustre le schéma 3.9.. Ce travail effectué en 1998 montre que l'étude des produits de dégradation de l'hème comme l'imide de l'acide hématinique (**53a**) reste actuellement un sujet de vif intérêt.

Schéma 3.9. : Récente synthèse de l'imide de l'acide hématinique (**53a**) au moyen de l'anhydride de l'acide 3,4-diméthyl-maléique.



3.3.3. La formation de maléimides substitués par oxydation des pyrroles correspondants

On peut dénombrer plus d'une dizaine de maléimides synthétisés par oxydation des pyrroles correspondants (Schéma 3.10.). Plusieurs oxydants différents ont été utilisés : l'oxyde de plomb, l'acide chromique, l'eau oxygénée et le trioxyde de chrome, l'acide nitrique, voire le brome. Toutes ces réactions sont résumées dans le schéma 3.10.. Les rendements de ces réactions sont tous modestes ; ils ne dépassent pas les 50%. Malgré tout, il semble que cette méthode soit la plus

couramment utilisée pour obtenir des maléimides avec des substituants en position 3 et 4 qui soient asymétriques (en gris dans le *tableau 3.1.*).

Schéma 3.9. : Différents maléimides formés par oxydation des pyrroles correspondants.



Tableau 3.1. : Synthèse des maléimides à partir des pyrroles correspondants.

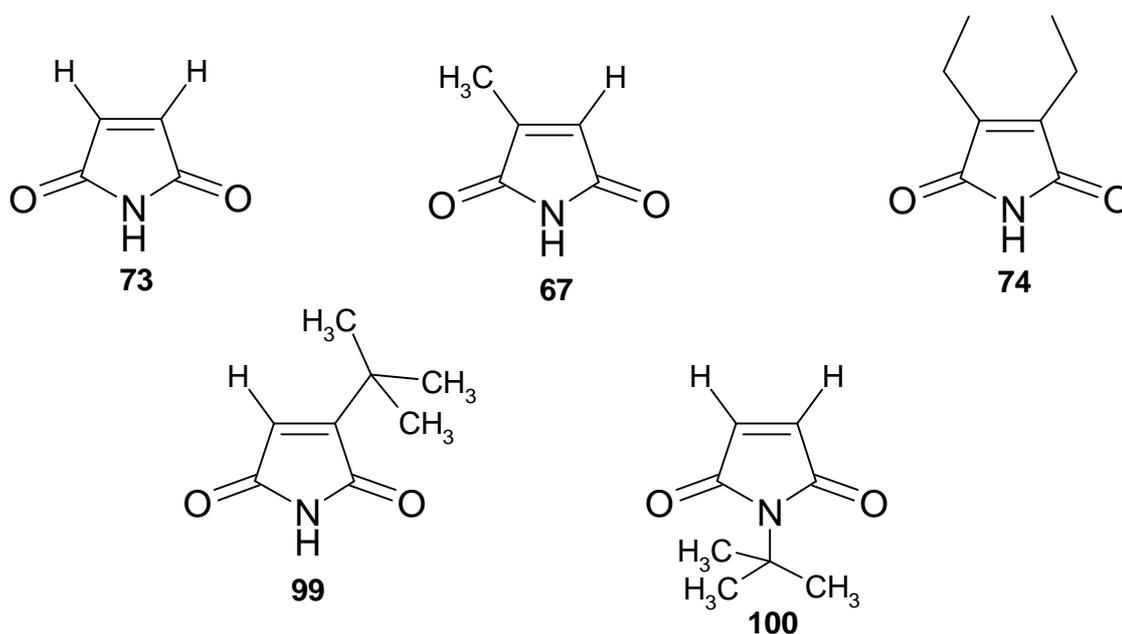
pyrrole	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Maléimide
84	H	H	H	H	73 [110]
85	Me	H	Me	H	67 [111]
86	H	Me	Me	Me	69 [112]
87	Me	Me	Et	Me	51 [113]
88	H	Me	Et	H	51 [114,115]
89	H	Et	Et	H	74 [114]
90	H	H	<i>i</i> Pr	H	75 [116]
91	H	Me	<i>i</i> Pr	H	76 [117]
92	H	Et	<i>i</i> Pr	H	77 [118]
93	Me	H	Ethoxycarbonyle	Me	78 [119]
94	H	Me	Ethoxycarbonyle	Me	79 [120]
95	Cl	Cl	H	Cl	80 [121]
96	Cl	Cl	Br	Cl	81 [122]
97	Br	Br	Br	Br	82 [123]
98	I	I	I	I	83 [124]

Il existe encore une autre méthode d'oxydation pour obtenir des maléimides substitués en position 3 et 4 à partir des pyrroles correspondants ; il s'agit de la

photo-oxydation. La littérature relate à plusieurs reprises la formation de maléimides au moyen de lumière, d'oxygène et d'un sensibilisateur.

Une revue rédigée par George et Bhat sur la photo-oxygénation des hétérocycles contenant un ou plusieurs atomes d'azote indique la formation des 5 maléimides **67**, **73**, **74**, **99** et **100** [125] (*Figure 3.2*). Le fait que ces composés constituent en réalité des produits secondaires de la réaction de photo-oxydation explique les rendements très modestes.

Figure 3.2. : Maléimides obtenus par photo-oxydation.



Deux autres travaux intéressants mentionnent aussi la formation des maléimides au moyen de la photo-oxydation [126,127]. Les rendements obtenus restent à nouveau très modérés étant donné que les composés désirés sont une fois de plus des produits secondaires. Ce mode d'oxydation n'est pas présenté comme méthode pour obtenir des maléimides, mais l'optimisation des conditions de réaction pourrait favoriser la formation des produits désirés.

Les buts

4. La présentation du travail

4.1. L'isolation d'un nouveau produit de la dégradation de la chlorophylle

L'isolation de nouveaux produits de la dégradation de la chlorophylle demeure l'étape clé pour comprendre les mécanismes du phénomène de la dégradation de la chlorophylle. C'est pourquoi il sera intéressant d'essayer de détecter, d'isoler et de caractériser un (ou plusieurs) catabolite(s) présent(s) dans les feuilles jaunies d'une plante supérieure appartenant à une classe encore inexploree. Ce catabolite supplémentaire devrait permettre de soutenir et de généraliser la connaissance actuelle de la biodégradation de la chlorophylle chez les plantes supérieures.

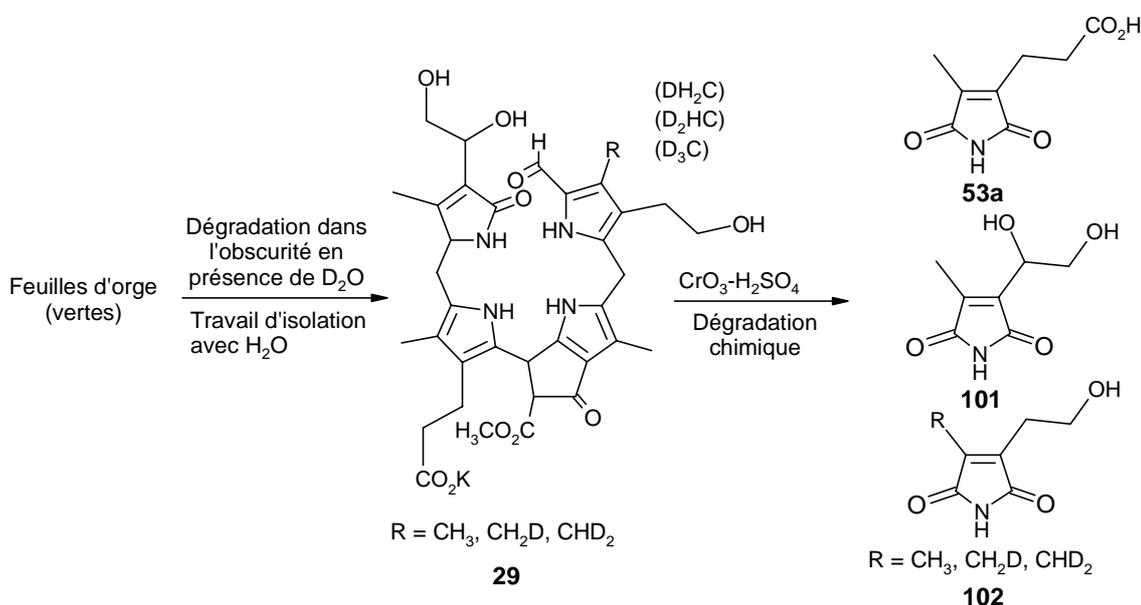
4.2. Le catabolisme de la chlorophylle *b*

En 1991, deux catabolites provenant des algues vertes *Chlorella protothecoides* [43,46] et un autre catabolite issu de l'orge (*Hordeum vulgare*) [52] ont pu être isolés, et leur constitution élucidée. Les deux structures isolées de l'algue verte sont des catabolites dérivant des chlorophylles *a* et *b*, alors que le composé issu de l'orge, ne provient que de la chlorophylle *a*. Cette étonnante observation s'est confirmée plus tard par l'isolation d'autres catabolites issus uniquement de la chlorophylle *a* dans des plantes évoluées comme le colza [55,56], le *Cercidiphyllum japonicum* [58] et les *Liquidambar styraciflua* et *orientalis* [57]. Les premières ébauches d'explications ont été avancées par Ito et ses collaborateurs [85,128,129], qui ont émis l'hypothèse d'une conversion de la chlorophylle *b* en chlorophylle *a* avant dégradation dans les plantes. Cette explication se base sur l'existence potentielle d'une enzyme d'interconversion qui jouerait un rôle fondamental dans l'ajustement du rapport chl *a* : chl *b* dans les plantes.

En utilisant des feuilles d'orge (*H. vulgare*) et en provoquant la sénescence de la chlorophylle en les plaçant dans l'obscurité, il a été montré que l'on peut isoler le catabolite principale **29** (Schéma 4.1.). Cependant, si l'on pouvait effectuer la

sénescence en présence d'eau deutérée à 80%, on serait en mesure de retrouver un marquage au deutérium sur le groupe méthyle engendré par la réduction du groupe formyle de la chlorophylle *b*. Il faut toutefois noter que la position C(7¹) ne serait certainement pas la seule position marquée. Les positions C(10), C(15) et C(20) peuvent en théorie aussi être deutérées. Ceci rendrait l'analyse de la petite quantité de catabolite provenant de la chlorophylle *b* extrêmement difficile du fait que les signaux des positions C(10), C(15) et C(20) seraient plus intenses que celui de la position C(7¹).

Schéma 4.1. : Projet de marquage au deutérium lors de la dégradation de la chlorophylle *b* dans l'orge.



Pour cette raison, il serait intéressant de soumettre le catabolite **29** à une dégradation chimique au moyen de l'acide chromique pour isoler les maléimides **53a**, **101** et **102**. Une analyse approfondie de ces maléimides paraît plus aisée à effectuer pour montrer une éventuelle insertion de deutérium.

4.3. La synthèse des maléimides 101 et 102

Il serait utile de trouver une méthode permettant de synthétiser les maléimides **101** et **102** pour la première fois. Cette synthèse permettrait d'une part de comparer les données spectroscopiques de la très petite quantité de produit naturel isolée avec

une référence synthétique, et pourrait d'autre part fournir une quantité non négligeable de substances de référence pour la recherche de nouveaux catabolites et pourrait également permettre la détermination de la configuration absolue du maléimide **101**.

Résultats et discussions

5. La tentative d'isolation d'un nouveau catabolite

Afin de déterminer si les faits établis jusqu'ici sur le phénomène de la dégradation de la chlorophylle peuvent être généralisés, l'isolation de nouveaux catabolites reste un travail de la plus haute importance. En effet, la découverte d'une structure qui différerait considérablement de celles isolées jusqu'à aujourd'hui serait une grande surprise et viendrait quelque peu bouleverser le mécanisme proposé.

5.1. Le choix de l'espèce

Curty et Engel ont réussi à détecter, isoler et caractériser un nouveau catabolite dans l'arbre *Cercidiphyllum japonicum* [58]. Cet arbre, qui fait partie de la famille des dicotylédones, a révélé un catabolite qui correspond bien au mécanisme proposé. Il serait alors aussi très intéressant de choisir un arbre d'une famille toute différente.

Dans ce travail, le choix de l'arbre s'est arrêté sur le magnolia pour 2 raisons.

- i) C'est un arbre qui pousse naturellement au jardin botanique de l'université de Fribourg ; il est par conséquent aisé de suivre son jaunissement en automne.
- ii) D'un point de vue phylogénétique, le magnolia est un des premiers arbres à fleurs à être apparu sur terre, ce qui en fait un individu très intéressant pour étudier l'influence de l'évolution des plantes sur le catabolisme.

L'arbre choisi est le *Magnolia hybridosa Speciosa hort.*. Il appartient à la sous-classe des Magnolidae, à l'ordre des magnoliales et à la famille des magnoliacés. Les magnolias possèdent leurs propres sous-classe, ordre et famille, et se distinguent ainsi des autres plantes à fleurs.

5.2. La détection du catabolite

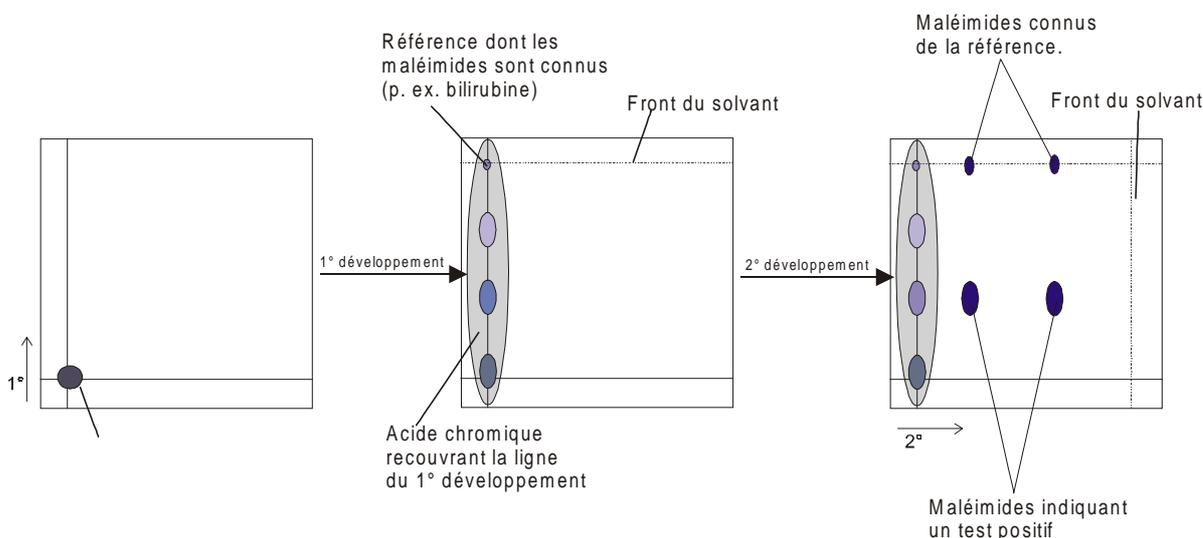
Lors de la tentative d'isolation d'un nouveau catabolite à partir d'une espèce nouvelle, la difficulté réside en la détection d'un nouveau catabolite. En effet, si l'on examine les résultats obtenus par Curty durant sa thèse, on s'aperçoit que sur tous les arbres qui ont été testés, seul le *Cercidiphyllum japonicum* a montré un test positif à l'oxydation chromique de la phase organique [130]. Il paraît impossible que les espèces montrant un résultat négatif au test d'oxydation selon Rüdiger ne possèdent

pas de catabolite [98,131]. La fiabilité de ce test dépend de la manière dont il est effectué, mais aussi de la solubilité du catabolite.

La méthode de détection utilisée par Curty consiste d'abord à extraire le catabolite en homogénéisant les feuilles jaunes dans une solution d'acétone et de méthanol. Les résidus solides sont éliminés par centrifugation et filtration, puis la solution est concentrée par évaporation. De l'eau est versée sur cette solution concentrée, et la phase aqueuse obtenue est extraite à plusieurs reprises avec du dichlorométhane. Cette phase organique est séchée, concentrée, à la suite de quoi une fraction de cette solution est portée sur une CCM. La plaque chromatographique est développée dans une première direction avec un éluant très polaire. Une solution d'acide chromique est appliquée directement sur toute la bande de la plaque où a migré le produit dans la première direction (*Figure 5.1.*). Après avoir laissé réagir et sécher la plaque, celle-ci est développée dans la direction perpendiculaire afin de détecter les maléimides formés au moyen du système chlore/benzidine (*Figure 5.1.*) [98,105].

Une des difficultés d'un tel test réside dans le fait que l'oxydation effectuée directement sur la plaque ne fonctionne pas toujours, et il est alors nécessaire d'y appliquer une référence après la première élution (p. exemple la bilirubine). Mis à part le fait que cette oxydation est relativement aléatoire, il y a également le danger de détecter de la phéophorbide, ou encore des restes de chlorophylle ; tous deux sont suffisamment solubles dans la phase organique.

Figure 5.1. : Description d'un test d'oxydation permettant la détection d'un catabolite de la chlorophylle dans une phase organique directement sur une plaque CCM.



Malgré tout, la solubilité des catabolites constitue la plus grande difficulté pour la détection par cette méthode. Un catabolite hydrosoluble (insoluble dans les solvants organiques) ne sera pas décelé par cette méthode d'oxydation directe de la phase organique sur la CCM.

Le test d'oxydation décrit ci-dessus a été appliqué aux feuilles de magnolia. Aucun catabolite n'a été identifié par cette méthode. Il semble alors très probable que le catabolite présent dans les feuilles de magnolia soit hydrosoluble. Il est donc nécessaire d'élaborer un test capable de détecter les catabolites solubles dans l'eau.

L'élaboration dans un tube Eppendorf® d'un nouveau test à partir d'une solution homogène de feuilles dans du tampon phosphate (250 µl) oxydée avec 250 µl d'acide chromique a permis de montrer la présence de 3 spots bleus, révélant que la phase aqueuse contient un catabolite de la chlorophylle. Ce test à l'échelle « micro » sera désormais dénommé **test d'oxydation en phase aqueuse**.

5.3. L'isolation du catabolite

Grâce à la mise au point du test d'oxydation en phase aqueuse, il est certain que le magnolia contient un catabolite soluble dans l'eau. Le prochain but à atteindre est l'isolation et la purification de ce composé.

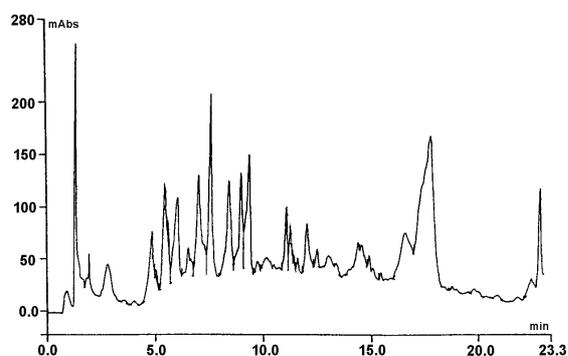
La chromatographie semble être la méthode de choix pour purifier une telle substance. Le gel de silice ne peut pas être utilisé ici parce qu'il n'est pas approprié aux phases aqueuses. Il va alors falloir employer la phase inverse comme support solide. Les premiers essais effectués au moyen d'une colonne RP-18 et d'eau comme solvant ont montré que le catabolite restait emprisonné dans le support, et qu'un mélange eau : acétone (1 :1 v/v) était capable d'éluer à nouveau le catabolite hors de la colonne. Après évaporation de l'acétone, il est alors possible d'obtenir une solution concentrée en catabolite.

Dans l'optique de purifier ce catabolite, il faut effectuer une chromatographie en phase inverse avec un éluant contenant une quantité d'acétone inférieure à 50%

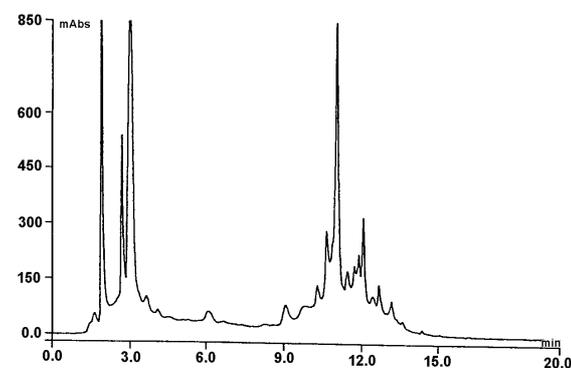
(v/v). Après plusieurs essais, il apparaît que le mélange constitué de 58% de tampon phosphate 0.1M à pH=6.8 et de 42% d'acétone fournit quelques fractions de couleur jaune clair, positives au test d'oxydation. Suite à de nombreuses tentatives il a pu être démontré que l'HPLC constitue le moyen analytique le plus adapté pour contrôler la pureté du produit obtenu, et ainsi de juger de l'efficacité de la méthode de purification. Dans la *figure 5.2.*, on peut observer le chromatogramme HPLC obtenu avec la solution non concentrée (chromatogramme a) et celui obtenu avec la fraction jaune clair qui provient de la colonne en phase inverse (chromatogramme b). L'information principale que l'on peut déduire de ces chromatogrammes est que cette séparation sur colonne est efficace, mais pas suffisante. Pour pouvoir purifier encore mieux ce produit positif au test d'oxydation, il faut une méthode de purification complémentaire qui emploie une autre propriété que la polarité. Pour cette raison, une chromatographie par exclusion de masse est testée.

Figure 5.2. : Chromatogrammes HPLC obtenus lors du contrôle de la méthode de purification d'un catabolite du magnolia.

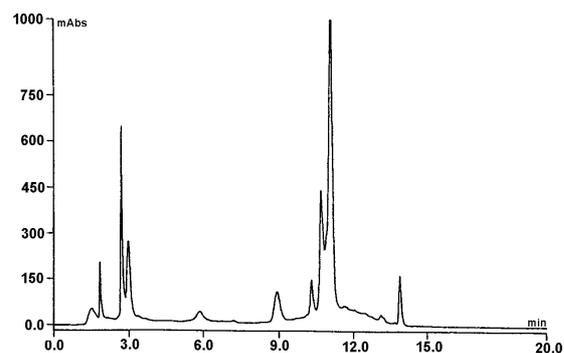
a :



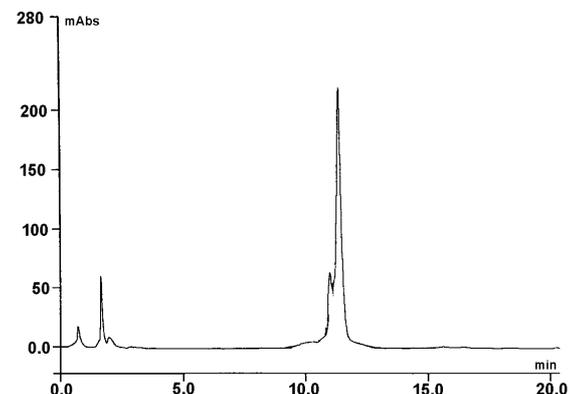
b :



c :



d :



En utilisant un gel de marque Toyopearl[®] permettant de séparer les petites masses, on peut tenter d'éliminer des impuretés qui ont une polarité très proche de celle du catabolite désiré, mais une masse bien différente. Après une multitude d'essais pour définir les meilleures conditions, le bon tampon a pu être déterminé. Il s'agit d'un tampon TRIS 50mM. En effectuant une colonne par exclusion de masse avec ce tampon, on obtient 3 fractions légèrement colorées, dont une (la deuxième) montre un test d'oxydation en phase aqueuse très positif. En analysant la pureté de cette fraction au moyen de l'HPLC, on obtient le chromatogramme c de la *figure 5.2.*. Ce chromatogramme montre que cette nouvelle purification est efficace, mais que le produit obtenu n'est pas suffisamment pur pour pouvoir être analysé par spectroscopie RMN ou de masse. Une nouvelle purification par chromatographie en phase inverse avec un éluant plus polaire (60% tampon phosphate 0.1M à pH=6.8 et 40% d'acétone) permet d'apporter à nouveau une bonne séparation des impuretés comme le montre le chromatogramme d de la *figure 5.2.*

L'échantillon ainsi obtenu est constitué d'un produit principal et d'un produit secondaire. Ce dernier peut être décrit comme un épimère du produit principal. La chlorophylle *a* est toujours accompagnée de son épimère, la chlorophylle *a'*. Il est donc possible que ce soit aussi le cas ici. A ce stade, il est décidé de dessaler l'échantillon en emprisonnant le produit dans une cartouche RP-18, en le lavant avec de l'eau déminéralisée, et en éluant le composé avec un mélange eau/acétone (1 :1 v/v). L'acétone est évaporé et la solution aqueuse est lyophilisée.

A partir de 50 g de feuilles on obtient 3.6 mg d'une substance solide incolore.

5.4. La spectroscopie du catabolite

5.4.1. La spectroscopie RMN

Une mesure ¹H-RMN du solide obtenu est effectuée afin de déterminer la constitution du catabolite isolé de feuilles de magnolia (*Magnolia hybr. Speciosa hort.*). Après avoir essayé différents solvants (D₂O, CD₃OD, DMSO-d₆, DMF-d₇) et plusieurs mélanges constitués des solvants précités, il n'a malheureusement pas été possible d'établir la constitution de ce catabolite. Les conclusions qui ont pu être tirées à partir des spectres RMN-¹H sont au nombre de 3.

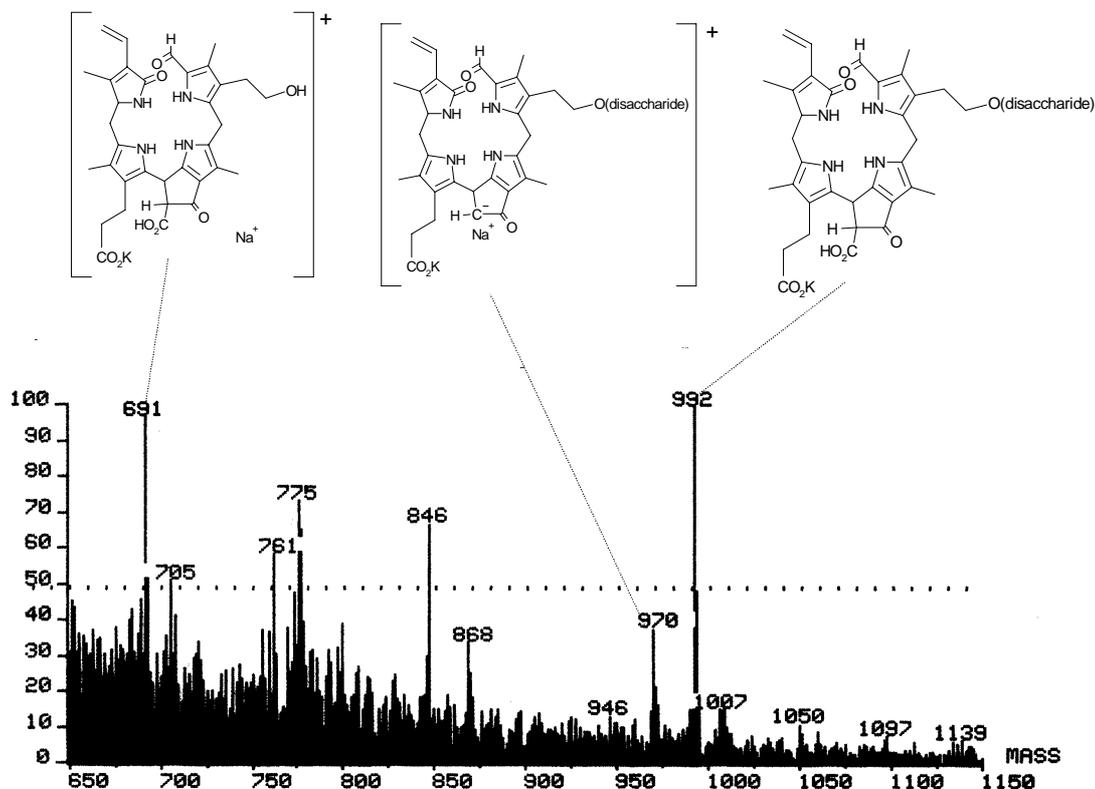
- i) Une partie du spectre est bien résolue alors que l'autre ne l'est pas. Cette observation fait penser à un problème de solubilité, où une partie de la molécule est bien dissoute, et l'autre partie ne l'est pas. La mesure à une température plus élevée n'apporte pas d'amélioration significative.
- ii) La molécule comporte un groupe formyle et une fonction vinyle. En effet, le singulet présent à 8.3 ppm peut être attribué à un groupe formyle sur le carbone C(5) d'un catabolite de la chlorophylle, et les 3 signaux à 5.2 ppm, 5.7 ppm et 6.2 ppm dont les intégrales valent chacune 1 sont typiques d'un groupe vinyle.
- iii) La région entre 3 et 4 ppm présente des signaux identiques à ceux décrits pour le catabolite isolé du colza contenant un saccharide dont Mühlecker et Kräutler ont pu déterminer la constitution [56].

C'est à partir de ces renseignements obtenus à partir de l'analyse RMN qu'une première idée de constitution a pu être émise. Il s'agirait d'un catabolite du même genre que celui extrait du colza, avec un ou plusieurs monosaccharide(s) (p. exemple le glucopyranose).

5.4.2. La spectroscopie MS

Une analyse de la masse moléculaire pourrait confirmer ou infirmer ces présomptions. La mesure de la masse moléculaire en mode de ionisation FAB a montré un pic moléculaire à $m/z = 992$. L'étude des fragments observés sur le spectre de masse correspondent à des fragments qui peuvent provenir de **103** (*Figure 5.3.*).

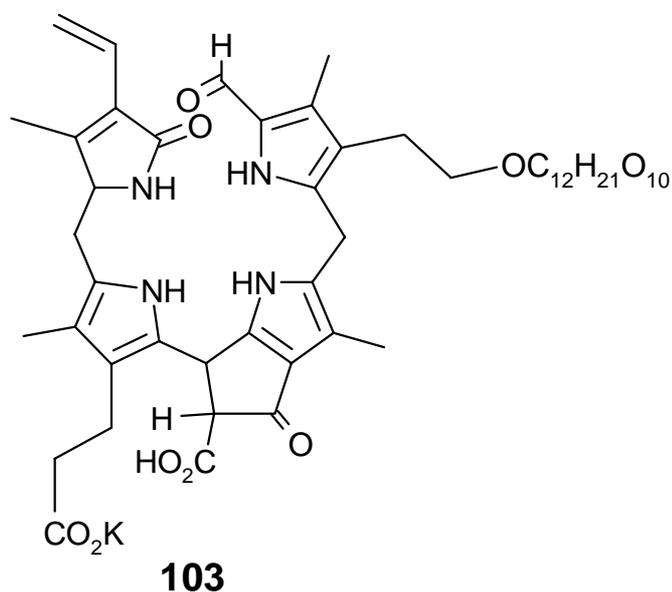
Figure 5.3. : Résultat obtenu par mesure de spectrométrie de masse en mode FAB positif et identification de deux fragments importants.



5.5. Une proposition de structure pour le catabolite issu du magnolia.

Compte tenu des informations réunies avec les mesures spectroscopiques, il est possible de proposer une structure pour le catabolite du magnolia ; il s'agirait de la molécule **103** (Figure 5.4.). Cette molécule contient bien un groupe formyle, un groupe vinyle et 2 monosaccharides ou un disaccharide. Une telle structure peut aussi expliquer la solubilité particulière attribuée à l'aglycon est peu soluble dans l'eau, contrairement aux sucres. Cette structure démontre aussi la polarité très élevée.

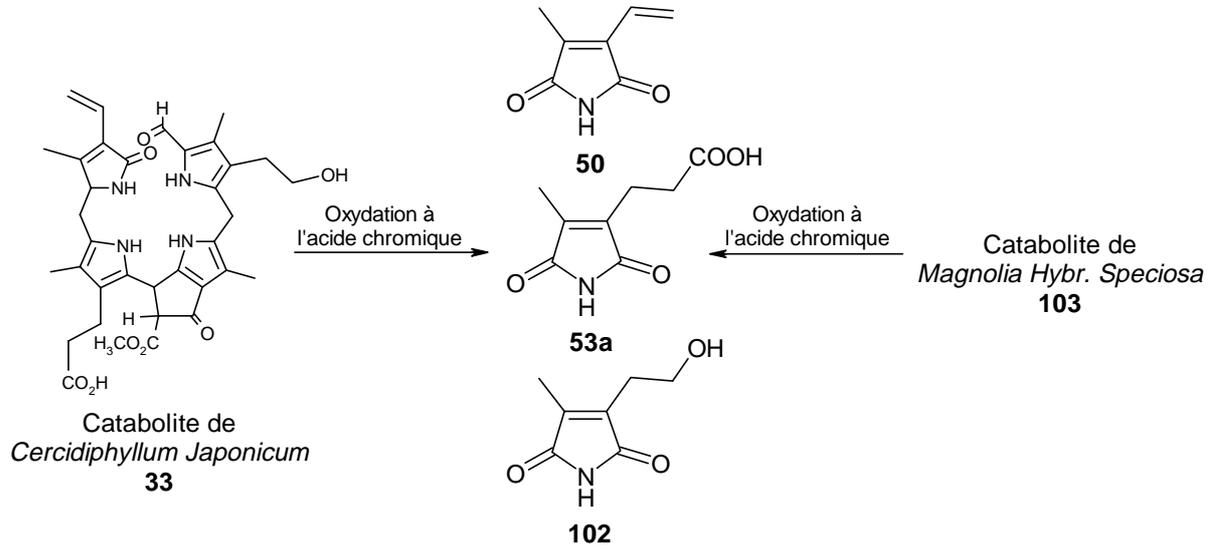
Figure 5.4. : Proposition d'une structure pour la catabolite isolé à partir de feuilles de *Magnolia hybr. speciosa hort.*.



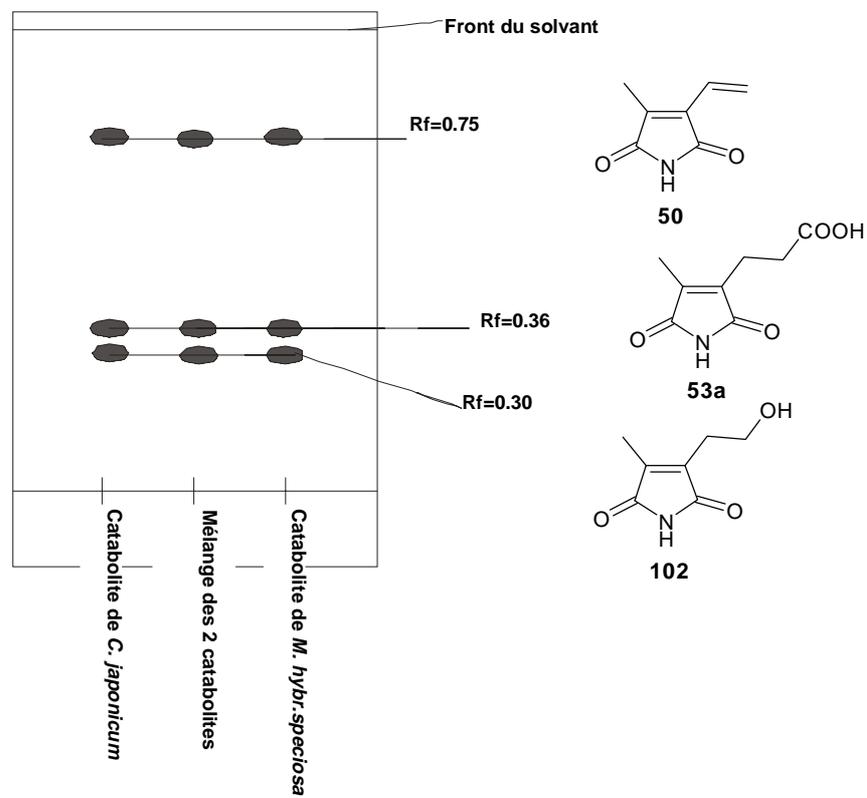
D'autres mesures RMN n'ayant rien donné de plus satisfaisant, il n'a pas été possible de donner de manière sûre la constitution de ce catabolite. Cependant, afin de confirmer les résultats déjà obtenus, une étude des maléimides formés par oxydation chromique du catabolite peut confirmer la constitution des cycles A, B et D. Cette analyse a été effectuée en parallèle avec un échantillon du catabolite de *Cercidiphyllum japonicum* isolé par Curty et Engel [58]. Or, les deux composés montrent exactement les mêmes maléimides (*Schéma 5.1.*).

Schéma 5.1. : Etude des maléimides obtenus par oxydation chromique du catabolite effectuée parallèlement à un échantillon du catabolite de *C. japonicum*.

a) réactions effectuées.



b) CCM obtenue lors de l'oxydation.



En résumé, il a été établi que :

- i) la masse moléculaire du catabolite du magnolia est de 992 g/mol.
- ii) le composé fournit les maléimides **50** et **53a** (qui ont pu être comparés à des références connues) lors de son oxydation à l'acide chromique.
- iii) le composé fournit un maléimide qui migre de façon identique au troisième maléimide issu du test d'oxydation chromique du catabolite isolé dans le *Cercidiphyllum japonicum*. (La structure **102** a été attribuée à ce maléimide³ par analogie au 2 premiers déjà formés.)

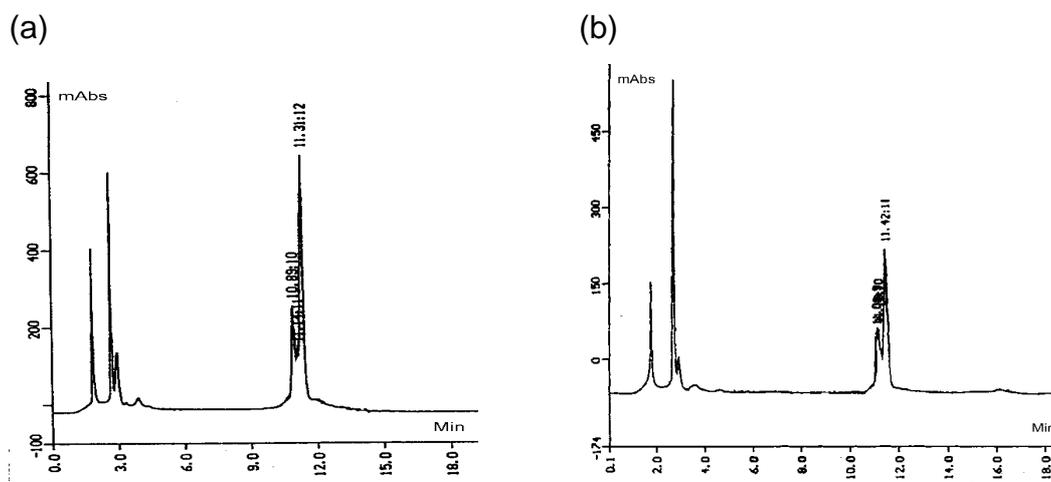
C'est à partir de ces différents faits établis que la structure **103** a été postulée comme étant la constitution du catabolite contenu dans les feuilles jaunes du *Magnolia hybr. speciosa hort.*.

5.6. La tentative de clivage du disaccharide

Afin de confirmer la présence du disaccharide et de modifier la polarité du catabolite obtenu, une réaction enzymatique en présence de β -glycosidase est tentée. Après plusieurs essais pratiqués au moyen de la glycosidase extraite des amandes, les chromatogrammes HPLC du milieu réactionnel avant et après réaction ne montrent pas de différence suggérant un clivage des sucres (*Figure 5.6.*).

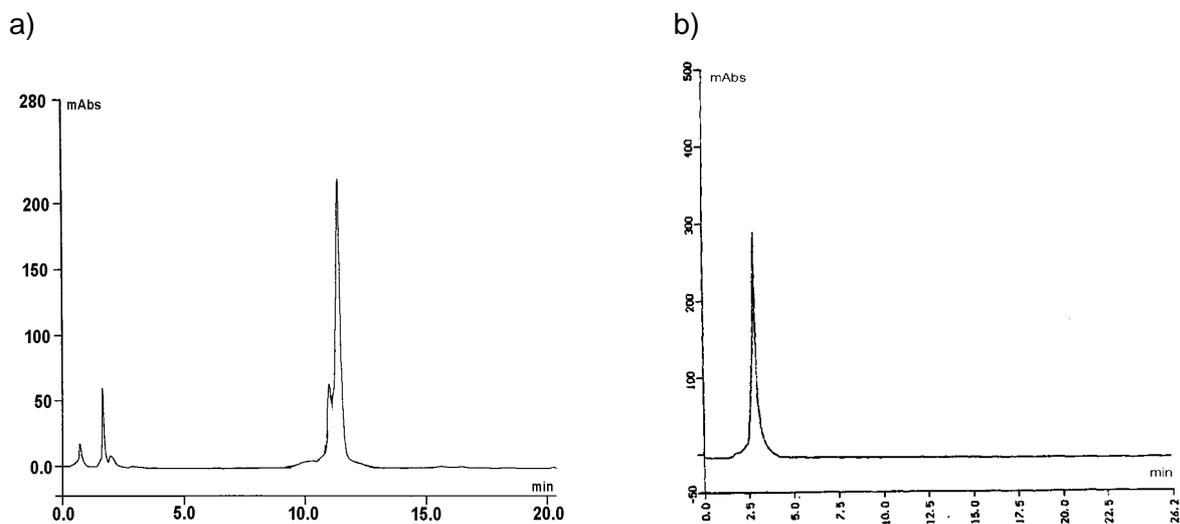
³ Il sera prouvé plus tard que la structure attribuée ici est correcte.

Figure 5.6. : Chromatogrammes avant (a) et après (b) l'ajout de β -glycosidase et l'incubation à 37°C.



Il faut cependant remarquer qu'il n'est plus possible de détecter le catabolite par HPLC si le pH de la solution contenant le catabolite est abaissé à 5 (*Figure 5.7*). Il semble donc qu'une réaction chimique ait lieu.

Figure 5.7. : (a) Chromatogramme à pH=6.9. (b) Chromatogramme à pH=5.



En milieu acide, il est connu que le groupe carboxylate de la position C(13²) est éliminé par décarboxylation [130]. Cette réaction modifie alors fortement la polarité de la molécule, la rendant probablement beaucoup moins polaire puisqu'il y a perte d'un groupe acide carboxylique. Il faudrait alors recommencer la détection du catabolite au moyen du test d'oxydation en phase aqueuse. Cette dernière opération n'a pu être effectuée correctement, comme si le nouveau produit formé était très

instable au point de ne plus retrouver le catabolite intact. Les tests d'oxydation effectués après acidification du milieu ne montrent plus les mêmes fragments maléimides que ceux du catabolite natif.

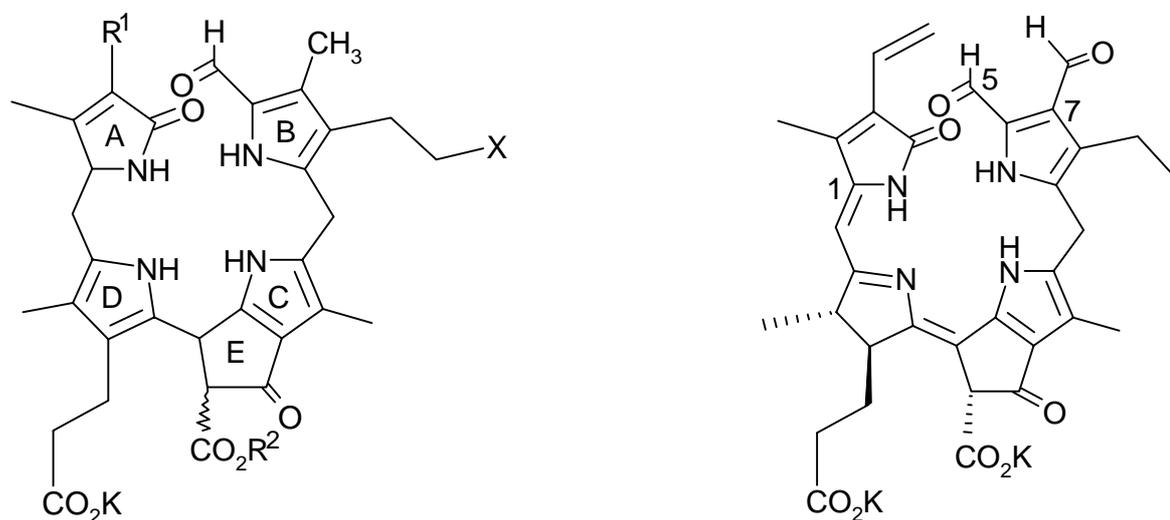
Ainsi, il n'a pas été possible de déterminer de manière univoque la constitution du catabolite isolé à partir du *Magnolia hybr. speciosa hort.*. La méthode de purification est certainement adaptée à la purification de cette structure, mais la solubilité et la stabilité du composé sont si particulières qu'il sera difficile de trouver les conditions adaptées à l'analyse constitutionnelle du catabolite.

6. La dégradation de la chlorophylle *b* dans l'orge

6.1. La description du problème

Il est important de rappeler que, jusqu'ici, seuls des catabolites provenant de la chlorophylle *a* ont pu être isolés dans les plantes évoluées (composés **29**, **30**, **31**, **32** et **33**) (Figure 6.1.). Les algues, par contre, excrètent un catabolite issu de la chlorophylle *b* (**26**) (Figure 6.1.). Ce dernier contient encore le groupe formyle typique d'un dérivé de la chlorophylle *b* sur le carbone C(7).

Figure 6.1. : Catabolites provenant de la chlorophylle *a* isolés dans les plantes évoluées (**29-33**) et catabolite issu de la chlorophylle *b* isolé de l'algue verte *C. protothecoides* (**26**).



- 29** $R^1=CH(OH)CH_2OH$ $R^2=CH_3$ $X=OH$
30 $R^1=CH=CH_2$ $R^2=K$ $X=OCOCH_2COOK$
31 $R^1=CH=CH_2$ $R^2=K$ $X=OH$
32 $R^1=CH=CH_2$ $R^2=K$ $X=C_6H_{11}O_5$ (β -L-glucopyranosyl)
33 $R^1=CH=CH_2$ $R^2=CH_3$ $X=OH$

26

Cette observation engendre une grande question : « Que se passe-t-il avec la chlorophylle *b* lors de la dégradation de la chlorophylle dans les plantes évoluées ? ». On peut esquisser plusieurs hypothèses :

- i) La chlorophylle *b* se dégrade d'une toute autre manière que la chlorophylle *a*, et les produits de dégradation ne peuvent pas être isolés car la recherche n'est pas

focalisée sur la découverte de produits dont la constitution est complètement différente.

- ii) La dégradation de la chlorophylle *b* se passe de la même manière que pour la chlorophylle *a*, mais les catabolites formés sont tellement moins stables qu'ils n'ont pas pu être isolés.
- iii) La chlorophylle *b* est transformée en chlorophylle *a* avant d'être dégradée, si bien qu'on ne peut plus observer des produits qui proviendraient de la chlorophylle *b*.

La première hypothèse implique que la plante possède deux voies différentes pour la dégradation, donc deux systèmes enzymatiques distincts. D'un point de vue biologique, cette idée semble peu favorable. Si l'on examine les causes de la dégradation de la chlorophylle dans les plantes, on peut s'apercevoir qu'elle est souvent due à un stress où à la mort de l'organisme. Il paraît alors peu probable que la plante induise la biosynthèse de deux systèmes enzymatiques différents pour la dégradation, étant donné que ceci lui coûterait encore plus d'énergie.

La deuxième hypothèse est également peu probable. Un produit de dégradation de la chlorophylle *b* a été trouvé dans l'algue verte *C. protothecoides*, ce qui montre que la stabilité de ce pigment n'est pas si faible. De plus, même si les produits de la dégradation de la chlorophylle *b* étaient différents de ceux de la chlorophylle *a* (dipyrroyles, pyrroles, ...), il serait tout de même possible de les détecter au moyen du test d'oxydation à l'acide chromique. Il ne serait certes pas aisé de détecter les produits au moyen de ce test si les catabolites étaient à nouveau métabolisés par la plante. Encore une fois, il ne serait pas logique que seuls les produits de dégradation d'un pigment accessoire soient métabolisés alors que ceux du pigment principal (la chlorophylle *a*) ne le sont pas. Ainsi, l'hypothèse d'une transformation de la chlorophylle *b* en chlorophylle *a* semble plus plausible. Cette dernière hypothèse peut encore être renforcée par les observations suivantes :

- i) La chlorophylle *b* est convertie en chlorophylle *a* dans des étioplastes isolés à partir de concombre (*Cucumis sativus*) [85]. Cette conversion est attribuée à une adaptation à une intensité lumineuse faible. Ito *et al.* parlent même d'une réaction qui convertit la chlorophylle *a* en chlorophylle *b* et vice versa en transformant la chlorophylle *b* du LHC II en chlorophylle du centre réactionnel [85]. Une étude supplémentaire effectuée de manière *in vitro* au moyen d'étioplastes d'orge

(*Hordeum vulgare*) a montré non seulement une transformation de la chlorophylle *b* en chlorophylle *a*, mais également la présence de 7¹-hydroxychlorophylle *a*, un produit intermédiaire accumulé durant le processus de conversion.

- ii) Une étude *in vitro* de la dégradation de la chlorophylle avec des membranes de chloroplastes sénescents de cotylédons de colza a montré que la phéophorbide *a* est acceptée comme substrat pour la phéophorbide oxygénase, alors que la phéophorbide *b* n'est pas acceptée [59].
- iii) La conversion du complexe de Zn(II)phéophorbide *b* en un autre complexe Zn(II)-7¹-hydroxychlorophylle *a* au moyen d'étioplastes d'orge intacts a été effectuée [128]. Cette réduction nécessite la présence de NADPH ou de NADH. Ce dernier étant moins efficace. Durant cette investigation, il a également pu être établi que l'ATP n'est pas essentiel à cette réduction. Les auteurs pensent alors que l'ATP est nécessaire à la deuxième étape de la transformation, la réduction de 7¹-hydroxychlorophylle *a* en chlorophylle *a* [128].

La conversion de la chlorophylle *a* en chlorophylle *b* semble appartenir à une interconversion plus générale **chlorophylle *a* (*b*)**. Il est maintenant considéré que ce cycle d'interconversion joue un rôle important dans la formation et la réorganisation du dispositif photosynthétique [129], permettant aux plantes de s'adapter aux conditions de fortes luminosités pour lesquelles le rapport Chl *a* :Chl *b* se situe entre 3.8 et 4.8, comme aux basses luminosités pour lesquelles le rapport passe à 2.7-3.0 [132].

6.2. La mise en évidence de la conversion chlorophylle *b* - chlorophylle *a*

Le travail entrepris ici a pour but de montrer que la transformation de chlorophylle *b* en chlorophylle *a* a aussi lieu lors de la dégradation, ce qui explique pourquoi il n'est pas possible de détecter des catabolites de chlorophylle *b* dans les plantes évoluées. Ce travail va montrer par un marquage *in vivo* au deutérium que cette conversion a lieu.

6.2.1. Les expériences de marquage *in vivo* au moyen de deutérium expliquant un mécanisme biochimique répertoriées dans la littérature

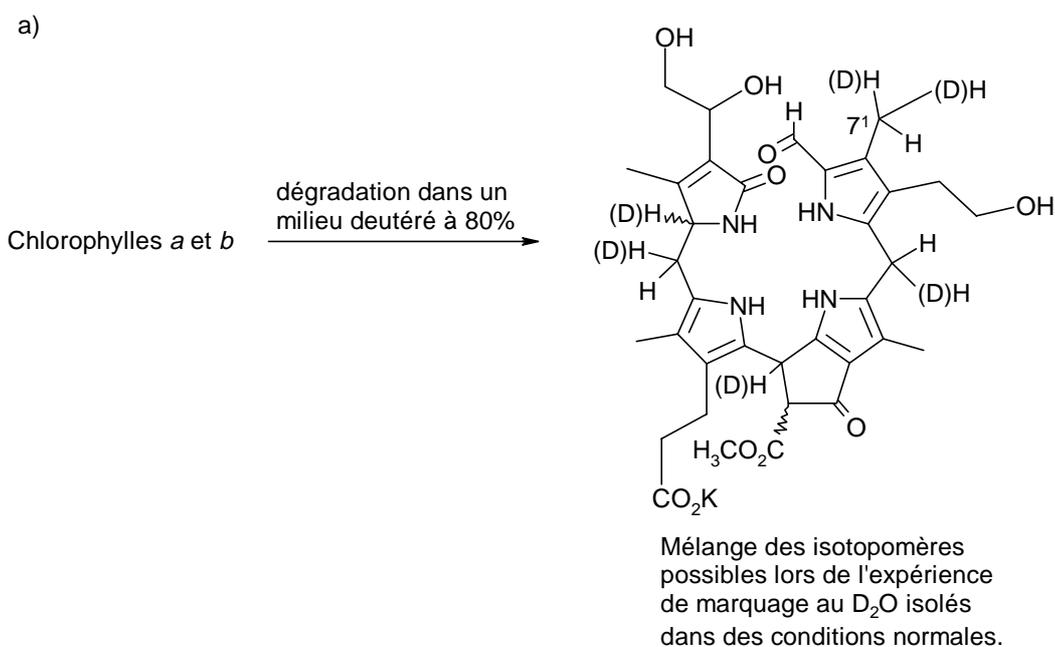
Les expériences de marquage *in vivo* au moyen d'eau lourde (D_2O) en vue d'élucider des mécanismes biochimiques sont assez peu répertoriées dans la littérature. On peut cependant trouver quelques exemples intéressants. Outre l'étude des changements périphériques du système porphyrinique durant la biosynthèse de la bactériochlorophylle *a* dans la bactérie photosynthétique *Rhodospirillum rubrum* [133,134], un marquage avec de l'eau lourde a aussi été utilisé pour suivre l'insertion d'un atome de deutérium pendant la cyclisation de précurseurs acycliques de caroténoïdes dans l'algue *Senedesmus obliquus* [135]. Deux autres travaux au sujet de la biosynthèse de la vitamine B_{12} ont également recours à l'eau lourde comme marqueur *in vivo*. Le premier relate la stéréochimie de l'étape de décarboxylation produisant l'acide 12-*si*-méthyl-cobyrinique [136] ; l'organisme utilisé dans ce travail est le *Propionibacterium shermanii*. Le second effectué avec le même organisme, concerne l'origine des protons des ponts méthines du noyau corrinique de la vitamine B_{12} [137]. De plus, un travail relatant la stéréochimie de la formation des groupes méthyles et éthyles du cycle B de la bactériochlorophylle *a* dans le *Rhodopseudomonas spheroides* [138], ainsi qu'une étude de la transformation microbienne de déhydrogriséofulvine et griséofulvine au moyen du *Streptomyces cinereocrocatu*s [139], font également état de l'utilisation d'eau lourde comme marqueur isotopique. Finalement, lors de la dégradation de la chlorophylle dans l'algue *C. protothecoides*, il est démontré par marquage *in vivo* au deutérium qu'un atome d'hydrogène provenant de l'eau est inséré de manière hautement stéréospécifique durant la dernière étape du clivage du macrocycle de la chlorophylle [76].

6.2.2. La description de l'expérience de marquage *in vivo*

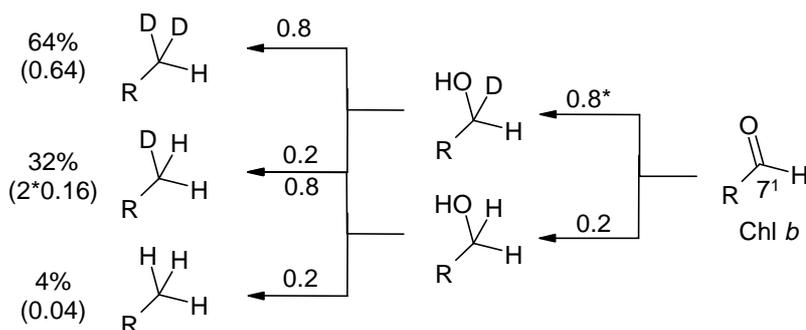
Dans notre travail, l'eau lourde devrait permettre de démontrer qu'une partie du catabolite provenant de la chlorophylle *a* (**29**) est marquée au deutérium lorsque la sénescence de la chlorophylle contenue dans les feuilles d'orge est effectuée en présence de D₂O. Cette partie devrait refléter la quantité de chlorophylle *b* contenue dans les feuilles d'orge avant la dégradation de la chlorophylle.

Schéma 6.1. : Positions marquées attendues d'après une distribution statistique en utilisant de l'eau deutérée à 80%.

- selon le mécanisme de dégradation de la chlorophylle *a* pour un catabolite entier
- insertion de deutérium sur le groupe formyle caractéristique de la chl *b*



- b) Distribution théorique statistique du deutérium sur le groupe méthyl de la position C(7'):



* Expérience de marquage en utilisant du D₂O à 80%.

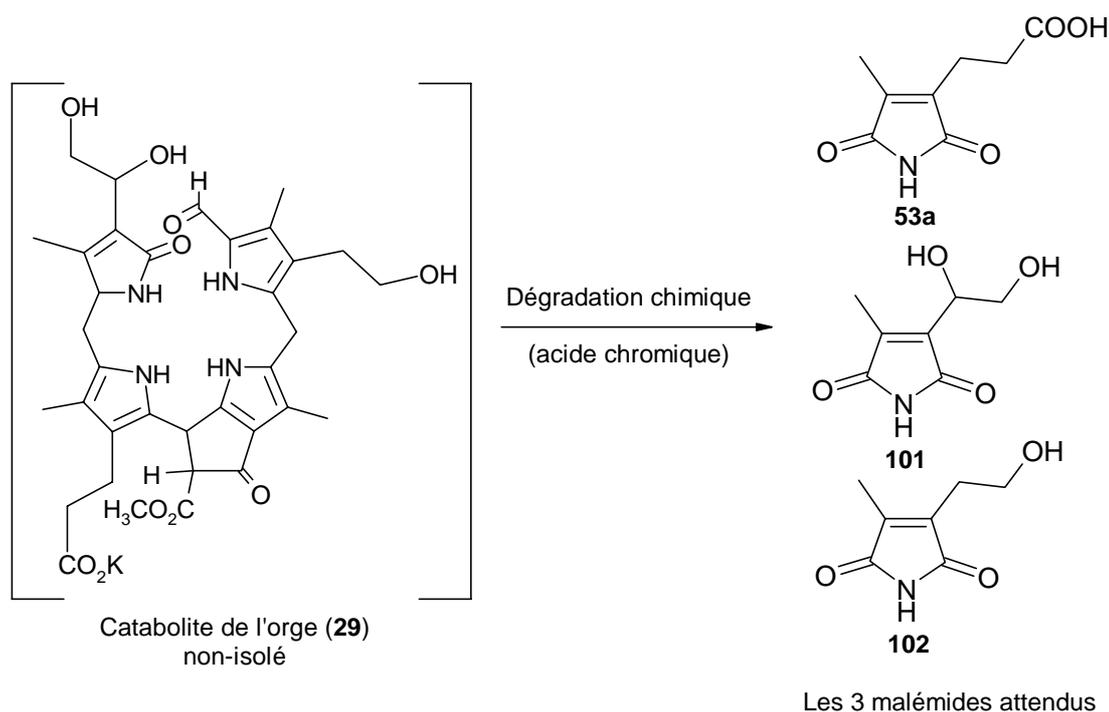
Comme c'est uniquement la chlorophylle *b* qui va permettre l'introduction de deutérium dans le groupe méthyle 7¹ du catabolite, seul ¼ du catabolite au maximum va être marqué. Ceci peut facilement se comprendre, si l'on sait que les feuilles vertes d'orge contiennent 75% de chlorophylle *a* et 25% de chlorophylle *b* (valeurs mesurées par HPLC et valeurs tabellées [21]). Or, si d'autres positions sont marquées lors la dégradation de la chlorophylle, ce qui devrait théoriquement être le cas (Cf. proposition de mécanisme (*Schéma 2.8.*)), celles-ci pourraient masquer celle qui nous intéresse (*Schéma 6.1. et Tableau 6.1.*).

Tableau 6.1. : Pourcentages de marquage attendus sur les positions 1, 10, 15, 20 et 7¹.

Positions	1	7 ¹		10	15	20
%D théorique	80	(CHD ₂) 16	(CH ₂ D) 8	80	80	80

Comme on peut l'observer dans le *schéma 6.1.* et le *tableau 6.1.*, le marquage provenant de la chlorophylle *b* en position 7¹ est très faible par rapport au marquage des autres positions (1,10,15 et 20). Pour cette raison, le catabolite marqué va être soumis à une dégradation chimique au moyen de l'acide chromique. Cette dégradation devrait alors fournir 3 maléimides (*Schéma 6.2.*). De ces trois maléimides, on connaît déjà le composé **53a**, mais on devrait observer 2 nouveaux maléimides qui n'ont encore jamais été décrits dans la littérature ; il s'agit des maléimides **101** et **102**. Avant de commencer l'expérience de marquage, il est plus indiqué de procéder à l'isolation des 3 maléimides afin d'observer si l'expérience planifiée est réalisable et si les maléimides **101** et **102** spéculés sont isolables et ne sont pas oxydés en d'autres composés.

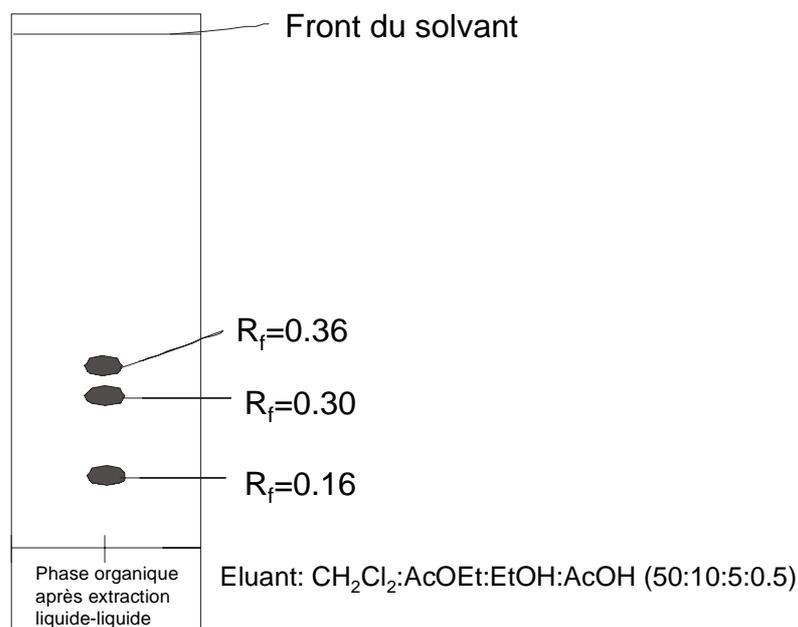
Schéma 6.2. : Oxydation du catabolite de l'orge fournissant les 3 maléimides **53a**, **101** et **102**.



6.3. L'isolation des maléimides 101, 102 et 53a

Après avoir mixé 150 g de feuilles d'orge ayant dégradé la chlorophylle, on obtient une solution aqueuse concentrée qui est oxydée à l'acide chromique. Par extraction liquide-liquide de cette phase aqueuse oxydée, on reçoit une solution organique contenant les trois maléimides qui peuvent être mis en évidence par CCM (Figure 6.2.). Il a ainsi pu être montré que 3 maléimides de polarité différente sont présents dans la solution organique après oxydation. Afin de séparer les 3 maléimides, on dépose la totalité du produit obtenu sur 4 plaques CCM de 20 cm par 20 cm et on élue avec le même éluant que celui utilisé pour détecter les maléimides (CH₂Cl₂ : AcOEt : EtOH : AcOH (50 :10 :5 :0.5) (v/v)). Cette technique permet une purification assez grossière des 3 maléimides.

Figure 6.2. : Détection des 3 maléimides obtenus par oxydation du catabolite de l'orge **29**.



6.3.1. L'isolation et la caractérisation de 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**)

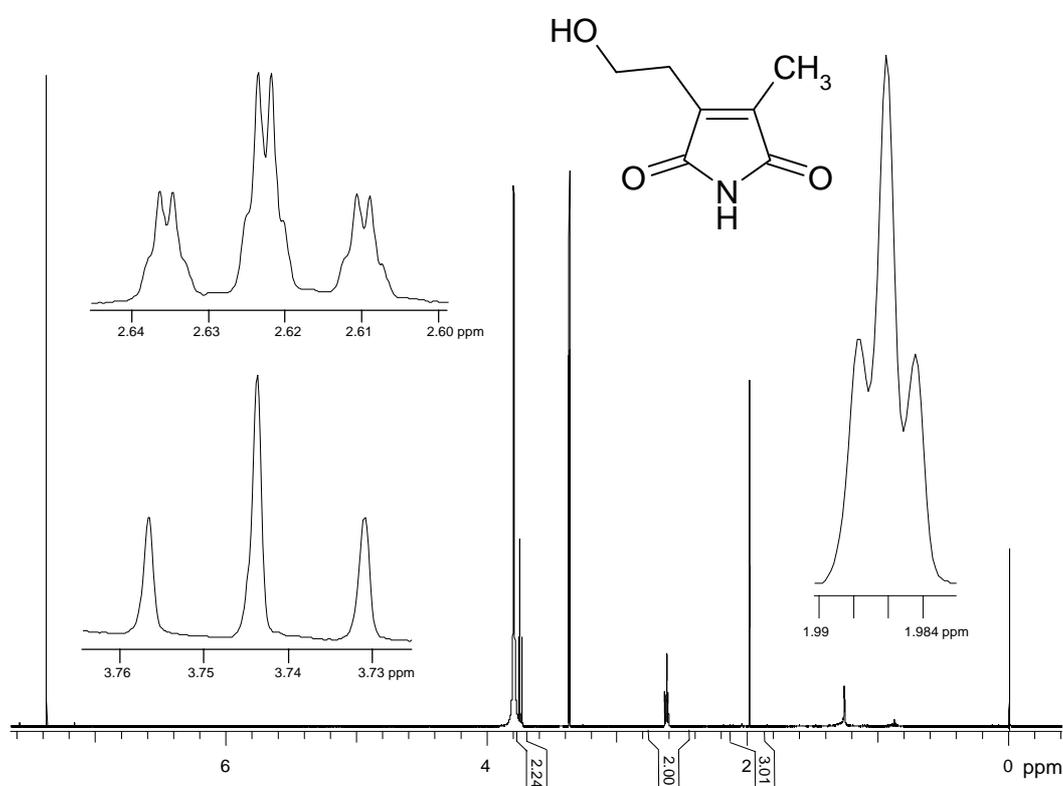
Afin de purifier de manière plus approfondie les 3 maléimides grossièrement séparés, il faut reprendre une à une chaque fraction. Par comparaison avec des références connues, il est possible d'attribuer la structure **53a** au composé qui montre un R_f de 0.36 (*Figure 6.2.*). Ainsi, les deux autres composés doivent être les maléimides **102** et **101**. Comme le composé **101** devrait être plus polaire que le composé **102**, on assigne la structure **102** au composé montrant un R_f de 0.30, et la structure **101** à celui qui possède un R_f de 0.16.

Pour parfaire la purification de **102**, une chromatographie sur colonne est effectuée avec un nouveau mélange d'éluant qui permet à la substance désirée de migrer et à la contamination (le maléimide acide **53a**) de rester collée dans la colonne. On obtient ainsi 1.5 mg d'une huile qui cristallise au réfrigérateur. Le point de fusion de cette substance se mesure entre 104 et 109°C.

L'analyse ^1H -RMN (*Figure 6.3.*) montre que la structure attribuée au composé **102** est correcte. Tous les signaux présents sur le spectre ont pu être assignés (cf. partie expérimentale). Il faut remarquer le couplage intéressant J_5 entre les protons du

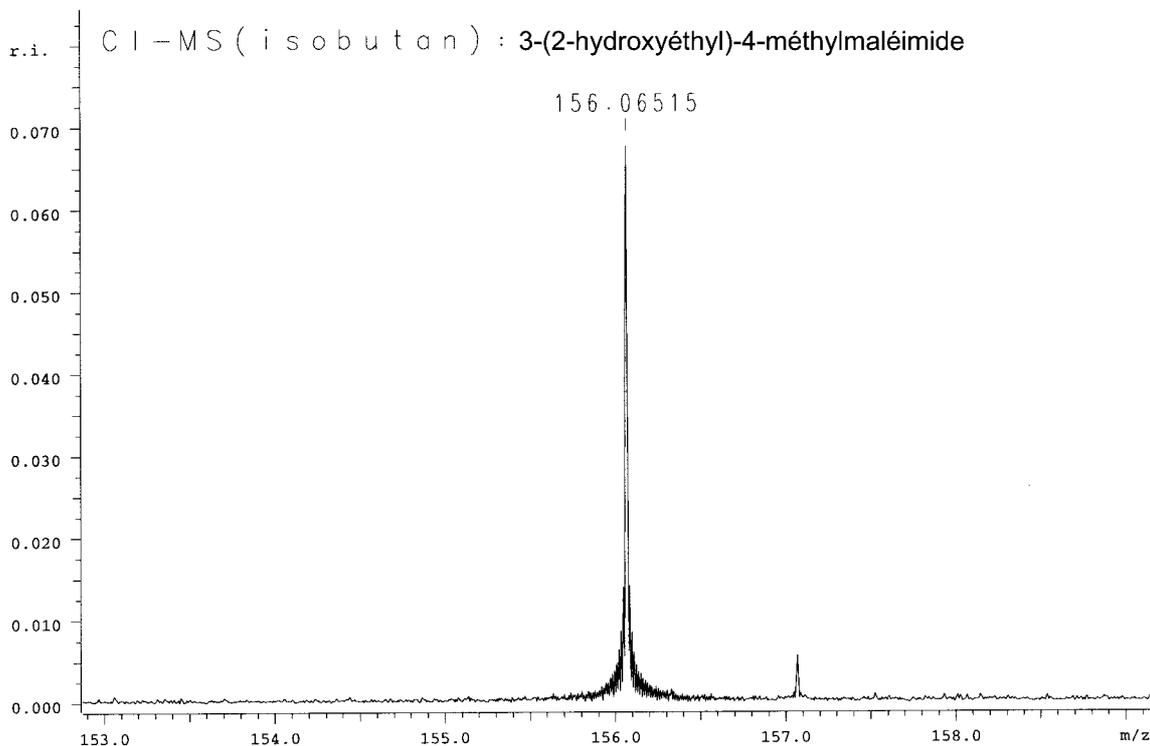
groupe méthyle C(4¹) et les protons du groupe méthylène C(3¹). Ce couplage, certes faible, induit un triplet pour la résonance du groupe méthyle en position C(4¹). Après avoir analysé ce spectre de résonance magnétique nucléaire plus à fond, on peut conclure qu'un marquage au deutérium du groupe méthyle à 2.01 ppm doit être détectable. Le spectre RMN ¹³C confirme la présence des 7 atomes de carbone, dont un groupe méthyle, deux groupes méthylènes et 4 carbones quaternaires (cf. partie expérimentale).

Figure 6.3. : Spectre RMN-¹H du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide mesuré dans un mélange de CD₃OD et de CDCl₃.



L'analyse au moyen de la spectrométrie de masse est effectuée selon deux modes d'ionisation différents : l'ionisation chimique (CI) et l'électrospray (ESI). Une mesure de la masse à haute résolution par ionisation chimique fournit une valeur de $m/z=156.06515$ pour une formule brute $C_7H_{10}NO_3$ (Figure 6.4.). Cette mesure correspond à l'ion $[MH]^+$ de la molécule, qui est calculé à $m/z=156,06551$. La mesure effectuée en mode ESI montre une distribution du pic moléculaire conforme, à savoir un pic moléculaire à $m/z=178.05$ correspondant à l'ion $[M+Na]^+$.

Figure 6.4. : Spectre de masse à haute résolution du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide avec mode d'ionisation chimique.



La spectroscopie infrarouge (cf. partie expérimentale) correspond également aux groupes fonctionnels présents sur la molécule.

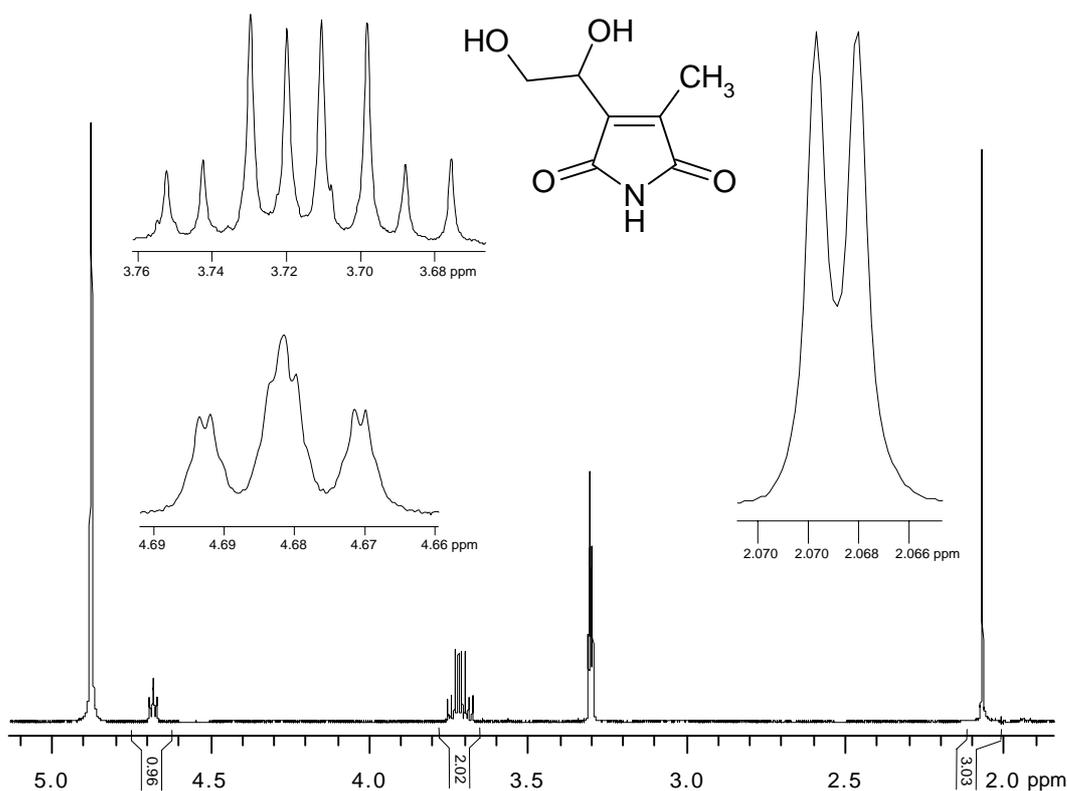
Les mesures de RMN et de spectrométrie de masse montrent que la méthode d'isolation et de purification est bien adaptée au problème. Il est alors possible d'isoler et de purifier une très faible quantité (1.5 mg) de produit naturel. Il est impératif que cette molécule soit très pure, car il faudra répéter l'expérience avec les mêmes méthodes de purification, mais cette fois avec un produit qui devrait présenter une faible insertion de deutérium sur le groupe méthyle C(4¹).

6.3.2. L'isolation et la caractérisation de 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide (101)

La structure **101** est attribuée au composé ayant un R_f de 0.16 lors de sa mise en évidence par CCM. Il faut maintenant terminer la purification de ce composé par une chromatographie sur colonne. Une chromatographie est effectuée au moyen de

l'éluant CH_2Cl_2 : AcOEt : EtOH (10 : 2 : 1) (v/v). On obtient 1.4 mg d'une huile incolore qui ne cristallise pas.

Figure 6.5. : Spectre RMN- ^1H de 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide mesuré dans le CD_3OD .



Le spectre RMN- ^1H (Figure 6.5.) prouve que la structure attribuée au composé **101** est correcte. Tous les signaux présents dans le spectre RMN ont pu être assignés (cf. partie expérimentale). Le couplage J_5 entre les protons groupe méthyle de la position 4 et la fonction méthylène 3^1 que l'on trouvait dans le composé **102** se retrouve ici. La seule différence est qu'à la place d'observer un triplet pour le group méthyle, on observe un doublet. La spectroscopie RMN- ^{13}C confirme la présence de 7 atomes de carbone, dont 1 groupe méthyle, 1 groupe méthylène, 1 groupe méthine et 4 carbones quaternaires.

Comme ce maléimide contient un centre de chiralité en position 3^1 et que cette molécule provient de la dégradation d'un catabolite naturel, il paraît normal que ce

centre soit de configuration absolue unique. Le maléimide **101** devrait constituer un composé énantiomériquement pur. Si tel est le cas, ce composé doit alors montrer un spectre de dichroïsme circulaire avec au moins un effet Cotton. Ceci est effectivement le cas, si l'on observe la superposition des spectres d'absorption et du dichroïsme circulaire de la *figure 6.6.*. On peut donc affirmer que le composé **101** isolé n'a pas racémisé sur son centre C(3¹). Pour que cette racémisation ait lieu, il faudrait que le cation **105** se forme par élimination d'eau de la forme protonée **106**. (*Schéma 6.3.*) Or il semble que cette élimination ne se passe pas puisque le composé **101** isolé à partir d'un milieu acide est toujours énantiomériquement pur.

Figure 6.6. : Superposition des spectres d'absorption (traitillés) et de dichroïsme circulaire (trait continu) du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide (**101**) mesurés dans le MeOH.

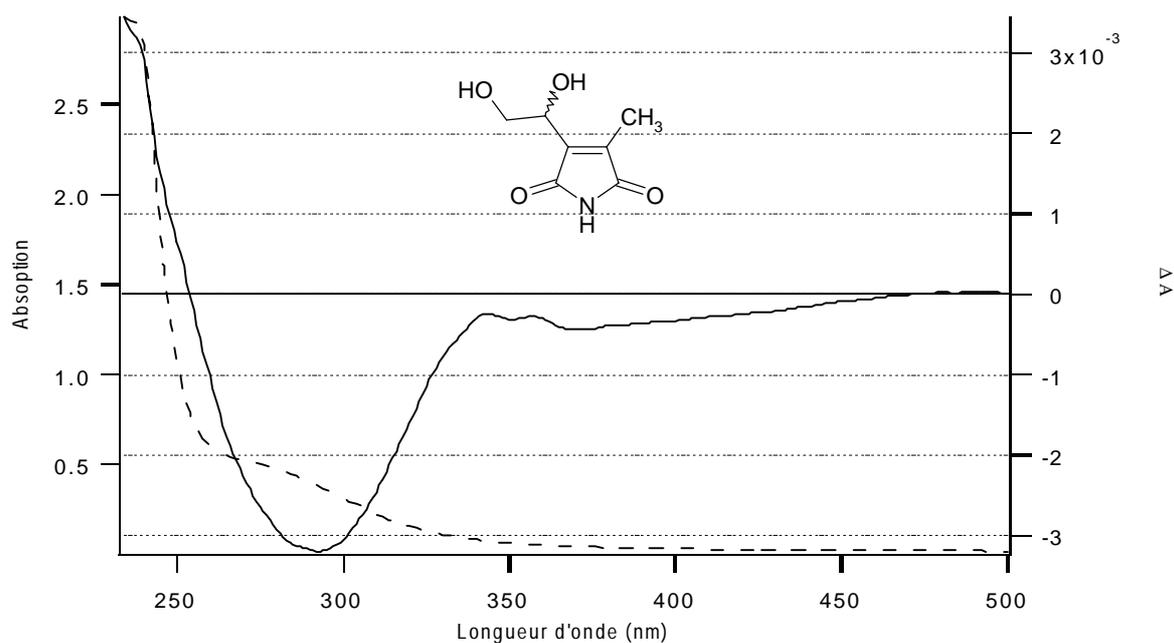
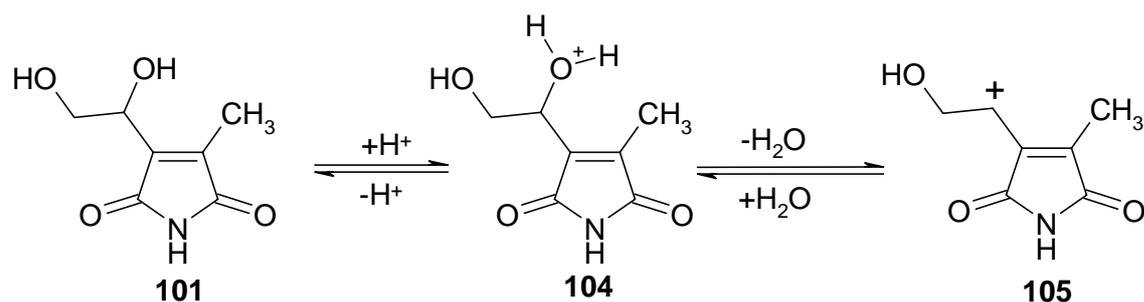


Schéma 6.3 : Proposition de mécanisme mettant en évidence une absence de racémisation.



Il est aussi important d'obtenir le dihydroxymaléimide **101** de manière très pure, car il servira de contrôle afin de montrer que le marquage a eu lieu pendant la dégradation de la chlorophylle et non pas durant la biosynthèse.

6.3.3. L'isolation et la caractérisation de l'imide de l'acide hématinique (53a)

Etant donné que ce maléimide a déjà été caractérisé à maintes reprises, comme en témoignent les nombreuses publications dans lesquelles il figure, seule les spectrométrie RMN-¹H et de masse seront effectuées pour confirmer qu'il s'agit bien du composé recherché. Comme pour le dihydroxymaléimide **101**, ce composé servira de contrôle afin de montrer que le marquage a eu lieu pendant la dégradation et non pas durant la biosynthèse.

Après avoir accompli une purification supplémentaire suite à la séparation grossière déjà effectuée, on obtient 1.6 mg d'une substance dont le spectre RMN-¹H correspond tout à fait à celui décrit dans la littérature pour le même composé (cf. partie expérimentale).

6.3.4. La conclusion à propos de l'isolation et de la purification des maléimides naturels non-marqués

L'isolation et la caractérisation des 3 maléimides provenant de la dégradation chimique du catabolite de la chlorophylle dans l'orge ont pu être achevées. Ceci démontre que l'oxydation à l'acide chromique permet de fragmenter un catabolite et cette réaction peut être utilisée pour déterminer la constitution d'un catabolite.

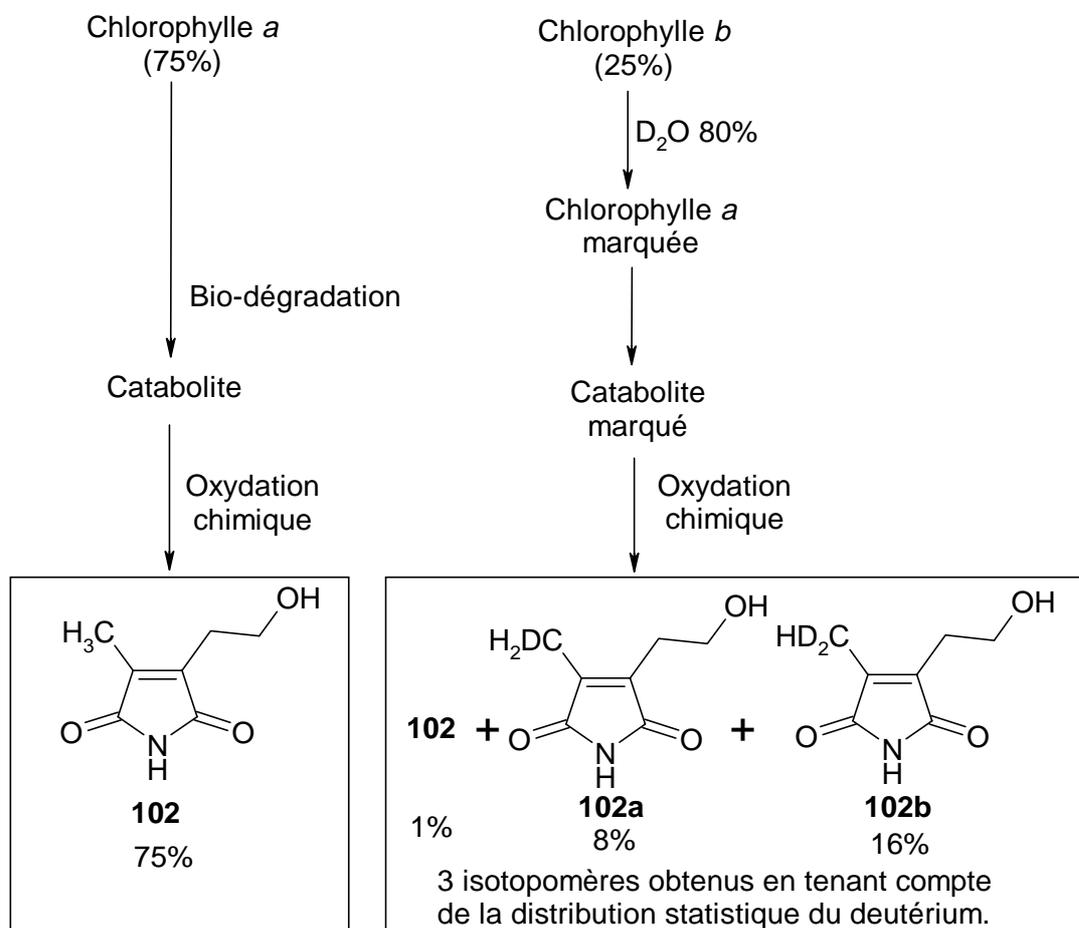
Il faut noter que dans le cas présent, les 3 maléimides isolés sont présents en quantités similaires, cela signifie qu'il n'y en a pas un qui subi une suroxydation. Ceci peut s'expliquer par la bonne solubilité du catabolite intact dans la phase aqueuse, alors que les maléimides le sont plutôt dans la phase organique. Une fois formés, les maléimides se dissolvent dans la phase organique et sont ainsi protégés de l'acide chromique hydrosoluble. Le rendement obtenu, à savoir environ 1.5 mg de maléimide à partir de 150 g de feuilles, correspond aussi très bien à tout ce qui figure dans la littérature. Le rendement peut être déterminé par calcul en se basant sur des données présentées dans la littérature. 115 g de feuilles fournissent 13 mg de catabolite intact **29** [52], ce qui représente environ 10% de la chlorophylle originale. Une oxydation chromique quantitative du catabolite en maléimides fournirait approximativement 3.7 mg de 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide pour 150 g de feuilles. Dans le cas rencontré ici, l'isolation de 1.5 mg de maléimide **102** fournit un rendement d'oxydation de 46% correspondant bien à ceux généralement avancés dans la littérature pour l'oxydation des porphyrines au moyen de l'acide chromique [103].

Dans les spectres RMN-¹H des deux nouveaux maléimides **101** et **102**, il est impératif que la région du groupe méthyle situé vers 2 ppm soit totalement exempte d'impuretés, car lors de l'expérience de marquage au D₂O, c'est dans cette région que l'on attend des signaux qui résulteraient du marquage. Dans le cas présent, on peut constater la remarquable efficacité des méthodes de purification par l'absence de signaux dans cette région.

6.3.5. L'expérience de marquage

Lorsque l'on répète l'expérience d'isolation des maléimides **101** et **102** en effectuant cette fois la dégradation de la chlorophylle en présence d'eau deutérée à 80%, il doit être possible de constater s'il y a insertion de deutérium dans le catabolite. L'expérience de marquage se déroule de la même manière qu'auparavant pour les produits naturels, sauf que l'eau utilisée pour recouvrir les fonds des récipients lors de la dégradation de la chlorophylle est remplacée par du D₂O à 80% (cf. partie expérimentale). On s'attend donc à obtenir un mélange de 3 isotopomères **102**, **102a** et **102b** qui diffèrent l'un de l'autre uniquement par un ou deux isotope(s) (*Schéma 6.4.*). La constitution de ce mélange doit refléter le contenu de la plante en chlorophylle *a* et *b*, ainsi que le taux de deutérium de l'eau utilisée.

Schéma 6.4. : Constitution attendue du mélange des isotopomères reflétant le contenu de la plante en chlorophylle *a* et *b* (3 :1), ainsi que le taux de deutérium dans l'eau (80%).



Lors de cette expérience de marquage, on s'attend à obtenir 76% de produit non-marqué **102** dont 75% proviennent de la chlorophylle *a* et 1% de la chlorophylle *b*, 8% de composé marqué avec un seul atome de deutérium provenant de la chlorophylle *b*, ainsi que 16% du maléimide **102b** marqué avec deux atomes de deutérium.

Au vu de ces calculs, il paraît alors assez aisé d'observer l'insertion de deutérium, car les pourcentages attendus peuvent être mis en évidence aussi bien par analyse de spectrométrie RMN que par analyse de spectroscopie de masse.

6.4. L'isolation des maléimides lors de l'expérience de marquage

L'isolation de l'échantillon s'effectue de la même manière qu'avec l'échantillon non marqué. Il a aussi été possible d'isoler 3 fractions, la première contenant le maléimide **53a**, la deuxième renfermant le maléimide **101** et la troisième qui contient le maléimide **102** et éventuellement ses isotopomères **102a** et **102b**. Après avoir effectué le même procédé d'extraction avec les feuilles d'orges *Hordeum vulgare* employées pour l'expérience de marquage à l'eau lourde, on obtient à nouveau 1.5 mg d'un composé qui cristallise au réfrigérateur.

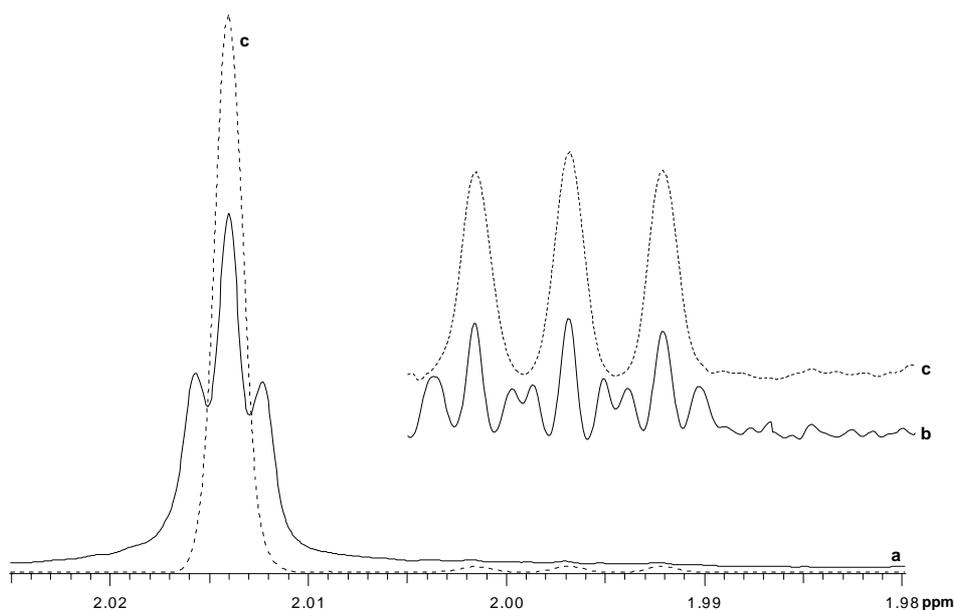
6.4.1. L'analyse par spectroscopie RMN-¹H, -²H des isotopomères 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide

L'analyse RMN-¹H a montré de manière univoque la présence de deutérium sur le groupe méthyle placé en position C(4¹). En effet, dans le spectre RMN-¹H, on peut apercevoir un groupe de très faibles signaux à la base de la résonance située à 2.01 ppm. Après une multiplication de Gauss appliquée directement sur le FID et une amplification de la région intéressante voisine de 2.01 ppm, on peut affirmer que la solution analysée contient un mélange de 2 isotopomères, les composés **102** et **102a** (Figure 6.7.). Il semble que seul un atome de deutérium ait été introduit dans la molécule. Cette constatation est soutenue par le fait que les signaux présents à

proximité du groupe méthyle du maléimide **102** non marqué montrent un déplacement chimique plus petit, caractéristique d'un effet isotopique d'un seul atome de deutérium. Dans la littérature, on remarque que l'effet isotopique obtenu par l'insertion d'un atome de deutérium à la place d'un proton dans un groupe méthyle peut se mesurer par la diminution du déplacement chimique de 0.017 ppm [140,141]. Dans le cas présent, la molécule non marquée montre un déplacement chimique de 2.012 ppm⁴ pour le groupe méthyle en question. La même résonance engendrée par l'isotopomère marqué se situe à 1.995 ppm. La différence est bien du même ordre de grandeur que celui donné par la littérature pour un tel effet. De plus, le groupe de signaux obtenus apparaît comme un triplet fois triplet (*Figure 6.7.*). Le premier triplet correspond à un couplage entre le groupe méthylène de la fonction méthyle marquée et le groupe méthylène de la position C(3¹) ; c'est le couplage J₅ déjà observé avec le composé non-marqué. Le deuxième triplet d'intensité 1 :1 :1 correspond au couplage du groupe méthylène de la fonction méthyle marquée avec l'atome de deutérium dont le spin vaut 1. En effectuant une expérience d'irradiation sur le groupe méthylène 3¹ à 2.67 ppm, le couplage J₅ est éliminé. Il est alors possible d'observer uniquement le triplet engendré par le couplage du groupe méthylène de la fonction méthyle marquée avec l'atome de deutérium, qui montre une constante de couplage de 2.4 Hz (*Figure 6.7.*). Cette valeur faible équivaut tout à fait à la valeur que l'on peut attendre d'un tel couplage, puisqu'il s'agit d'un couplage géminale H-D. Un tel couplage H-H se monterait à environ 15 Hz, mais comme le facteur gyromagnétique du noyau deutérium vaut 6.5 fois moins, on doit trouver une valeur située entre 2 et 3 Hz. Cette expérience permet de confirmer le fait qu'il y a bien eu insertion d'un seul atome de deutérium.

⁴ Le nombre élevé de chiffres significatifs n'a pas pour but d'indiquer un déplacement chimique précis, mais plutôt de pouvoir mesurer une très petite différence de déplacement chimique.

Figure 6.7. : Agrandissement de la région proche de 2 ppm du spectre RMN- ^1H du mélange d'isotopomères obtenus lors de l'expérience de marquage. La trace **a** met en évidence le couplage J_5 du groupe méthyl en question avec le groupe méthylène en C(3 1). La trace **b** est obtenue après une multiplication Gaussienne du FID. La trace **c** découle d'une expérience de découplage en irradiant sur la résonance du groupe méthylène de la position C(3 1).

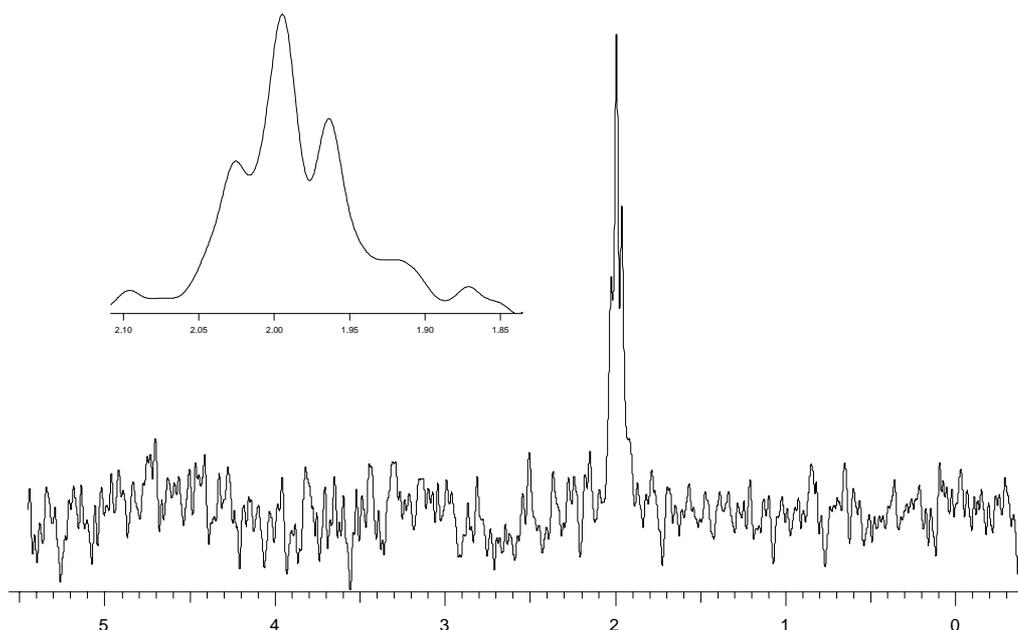


S'il y avait eu l'insertion d'un deuxième atome de deutérium, cela aurait engendré la présence d'un groupe de signaux supplémentaire situé proche de la résonance déjà notée, et avec un effet isotopique d'une amplitude environ 2 fois plus importante que celle déjà observée. Cela signifie que la présence d'un deuxième atome de deutérium sur le groupe méthyle engendrerait un quintet à 1.978 ppm. Ce dernier n'étant pas constaté, on peut affirmer que l'insertion d'un deuxième atome de deutérium n'a pas eu lieu.

L'intégrale des deux signaux (2.012 ppm et 1.995 ppm) regroupant le groupe méthyle de l'isotopomère **102** et le groupe méthylène de l'isotopomère **102a** s'élève à 2.93 au lieu de 3.00. Ceci permet de déduire les pourcentages relatifs des deux maléimides **102** et **102a** ; la solution analysée est constituée de 93% de maléimide **102** et 7% de son isotopomère **102a**.

La spectrométrie RMN-²H confirme l'insertion d'un seul atome de deutérium par la présence d'un triplet centré sur 1.99 ppm (*Figure 6.8.*). Il s'agit d'un triplet parce que l'atome de deutérium couple avec les deux protons voisins. La constante de couplage est identique à celle observée lors de la mesure du spectre RMN-¹H ; elle est de 2.4 Hz. Le bruit de fond pour cette mesure est très élevé, car la quantité de substance marquée au deutérium est très faible. D'après la valeur des intégrales, on estime cette quantité à 7% de 1.5 mg, soit environ 105 µg.

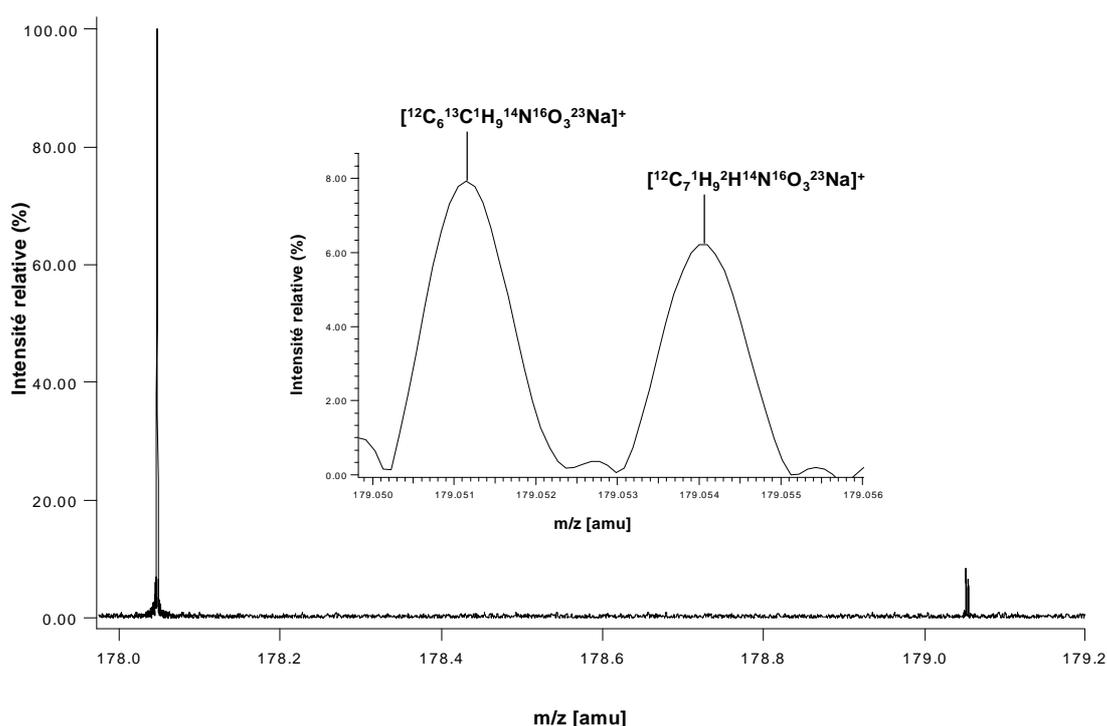
Figure 6.8. : Spectre RMN-²H de la solution contenant les deux isotopomères **102** et **102a**. Seul un triplet est observé, confirmant qu'uniquement l'insertion d'un atome de deutérium à eu lieu.



6.4.2. L'analyse par spectrométrie de masse des isotopomères 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide

La spectrométrie de masse devrait confirmer les résultats obtenus par spectroscopie RMN-¹H et -²H. Il reste à confirmer l'insertion d'un seul atome de deutérium. On s'aperçoit rapidement que cette mesure n'est pas facile à réaliser. En effet, le pic moléculaire attendu pour la petite quantité de maléimide marqué **102a** va se situer à

la même place que le pic $[MH]^+$ du maléimide non marqué **102**, car tous deux possèdent la même masse nominale. On devrait certes observer une augmentation du pic $[MH]^+$ du composé **102** lorsque le mélange des isotopomères est analysé, mais après avoir effectué la mesure, cette différence n'est pas suffisante pour un résultat univoque. Afin de lire un résultat plus probant, la mesure de l'échantillon est entreprise avec une résolution de 150'000. Une telle résolution est capable de séparer jusqu'à la ligne de base, deux molécules ayant une différence de masse très petite. Il devrait alors être possible de distinguer le signal appartenant à l'isotopomère naturel contenant un atome ^{13}C , de l'isotopomère contenant un atome de deutérium provenant de l'expérience de marquage. La différence de masse de ces deux isotopomères est de 0.003 uma. Le résultat obtenu avec une telle mesure, est tout à fait satisfaisant, car comme on peut le remarquer dans la *figure 6.9*, les deux pics ont pu être séparés. Le *tableau 6.2* met en exergue les résultats calculés et les valeurs mesurées. En examinant ce tableau, il est aisé de voir avec quelle justesse les résultats mesurés coïncident avec ceux attendus d'après les calculs. Le pic moléculaire $[M+Na]^+$ dont la masse nominale est calculée à 178.04755 est étalonné à 178.047 avec une intensité ajustée à 100%. Ce calibrage va permettre de mesurer les différences de masses des différents isotopomères attendus, ainsi que les quantités des isotopomères en question. On peut apercevoir sur le spectre de masse un pic à 179.051 amu qui correspondrait au pic de l'isotopomère contenant un atome ^{13}C . Ce pic constitue, d'après les calculs, 7.6% par rapport au pic moléculaire de 100%, puisque la molécule contient 7 atomes de carbone ($7 \times 1.08\%$). Comme la différence de masse entre l'isotopomère contenant un atome de ^{13}C et celui contenant un atome d' ^{17}O est extrêmement faible, il n'est pas possible avec une telle résolution de séparer distinctement ces deux pics. Ainsi le pic obtenu avec une masse de 179.051 correspond aux deux isotopomères contenant 1 atome de ^{13}C ou 1 atome d' ^{17}O . L'intensité de ce signal doit alors théoriquement avoisiner les 7.7%. La mesure permet effectivement de lire une valeur de 7.7%. Ainsi la valeur de l'intensité mesurée à 6.2% pour le pic ayant une masse exacte de 179.054, correspond sans aucun doute à l'isotopomère contenant 1 atome de ^2H . En soustrayant à 6.2% la quantité de cet isotopomère dû à l'abondance naturelle du deutérium ($9 \times 0.0115 \approx 0.1\%$), il est permis d'affirmer que l'échantillon contient 6.1% de l'isotopomère **102a** provenant de l'expérience de marquage.

Figure 6.9. : Spectre de masse du mélange des isotopomères **102** et **102a**.**Tableau 6.2. :** Données pour la spectroscopie de masse calculées et mesurées. Description des combinaisons possibles pour les masses nominales 178 et 179 des maléimides **102** et **102a**.

Masse nominale	Combinaisons isotopiques possibles	Non marqué (calculé) ^a		Marqué (mesuré)	
		Masse exacte	Abondance naturelle relative	Masse exacte	Abondance relative
178	$[^{12}\text{C}_7^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{16}\text{O}_3^{23}\text{Na}]^+$	m/z (uma)	(%)	m/z (uma)	(%)
178		178.04755	100	178.047 ^b	100
179	$[^{12}\text{C}_7^1\text{H}_9^{15}\text{N}^{16}\text{O}_3^{23}\text{Na}]^+$	179.04449	0.4	- ^c	
179	$[^{12}\text{C}_6^{13}\text{C}^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{16}\text{O}_3^{23}\text{Na}]^+$	179.05081	7.6	} 179.051 ^d	7.7
179	$[^{12}\text{C}_7^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{17}\text{O}^{23}\text{Na}]^+$	179.05167	0.1		
179	$[^{12}\text{C}_7^1\text{H}_8^2\text{H}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_3^{23}\text{Na}]^+$	179.05365	0.1	179.054	6.2

^a : La masse isotopique utilisée et les abondances naturelles employées proviennent de la littérature [142]. Pour un soucis de correction $0.55 \cdot 10^{-3}$ uma (masse d'un électron) a été soustraite de la molécule non-chargée.

^b : L'échelle a été ajustée à la masse théorique m/z du pic moléculaire.

^c : Ce signal est resté caché dans le bruit de fond.

^d : Les signaux correspondant aux isotopomères contenant 1 atome ^{13}C et 1 atome ^{17}O ne peuvent pas être résolus, compte tenu de leur trop petite différence.

6.4.3. Conclusion a propos des mesures spectroscopiques de l'échantillon obtenu lors de l'expérience de marquage

Les mesures spectroscopiques effectuées sur l'échantillon obtenu lors de l'expérience de marquage *in vivo* à l'eau lourde ont montré qu'il y avait bien eu insertion de deutérium. Cependant, 2 faits surprenants sont observés. D'une part, l'insertion d'un seul atome de deutérium a eu lieu alors qu'un mélange statistique de maléimide mono- et di-deutéié était attendu, et d'autre part, les 6% de deutérium insérés sont loin des pourcentages calculés. (*Schéma 6.1. et 6.4., Tableau 6.2.*). Une erreur expérimentale a d'abord été attribuée à ces deux faits étonnants, et l'expérience a été effectuée une deuxième fois. Les mêmes résultats sont observés lors de la répétition de l'expérience. A ce stade, la faible insertion de deutérium peut être expliquée par plusieurs facteurs :

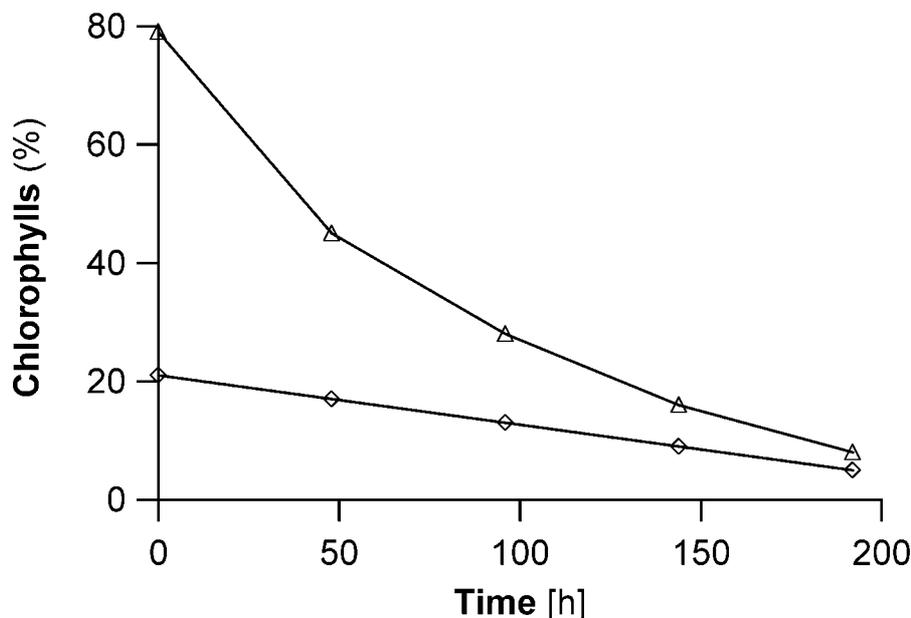
- i) Lors du bleaching, toute la chlorophylle n'a pas été dégradée, et le rapport Chl *a*/Chl *b* tiré de la littérature, ne correspond plus pour l'expérience effectuée. Il sera alors judicieux de suivre la diminution de la chlorophylle durant la sénescence.
- ii) Lorsque les feuilles sont placées dans l'eau lourde à 80%, elles contiennent encore une grande quantité d'eau normale, non-marquée. Cette eau va alors diluer l'eau lourde utilisée et ainsi diminuer le marquage. Il sera aussi important de mesurer la teneur en deutérium de l'eau durant la sénescence.

6.4.4. La diminution de la chlorophylle durant la sénescence

Pour étudier la diminution de la chlorophylle dans les feuilles d'orge lors de la sénescence, une analyse au moyen de l'HPLC est effectuée. On prélève 4 feuilles d'orge qui sont broyées. La chlorophylle est extraite avec du méthanol, et la solution verte contenant la chlorophylle est injectée. On détermine ensuite le rapport Chl *a* / Chl *b*. On effectue de même avec d'autres prélèvements effectués tout au

long de la sénescence. Il est ainsi possible d'observer la disparition des chlorophylles *a* et *b* durant la sénescence (*Figure 6.10.*).

Figure 6.10. : Diminution des chlorophylles *a* (Δ) et *b* (\diamond) durant la sénescence des feuilles d'orge *Hordeum vulgare* en présence d'eau lourde.



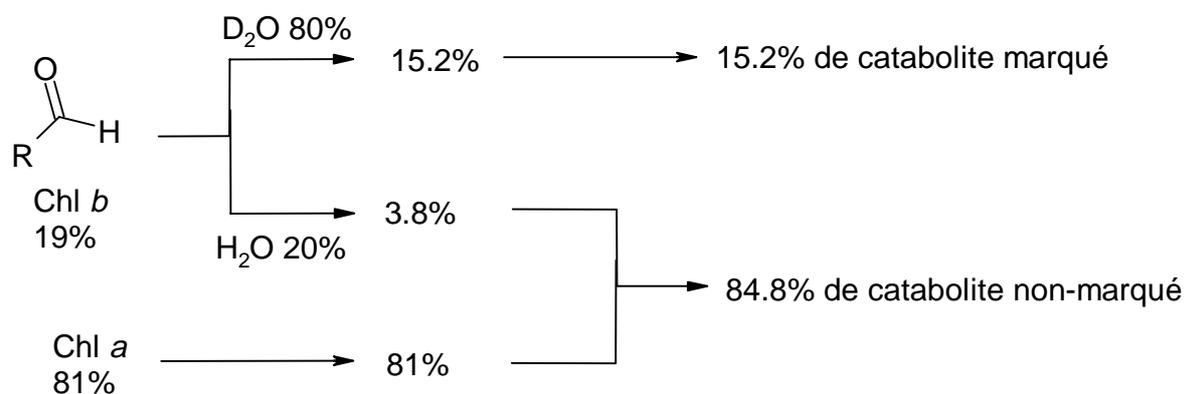
Cette analyse de la dégradation des chlorophylles *a* et *b* contenues dans les feuilles d'orge, permet de remarquer que la dégradation de la chlorophylle *a* est plus rapide que celle de la chlorophylle *b*. De plus, le rapport Chl *a*/Chl *b* mesuré avant la dégradation de la chlorophylle dans l'orge est de 79 :21, ce qui représente un facteur s'élevant à 3.76. Cette valeur correspond assez bien avec celles qui ont été tabellées pour des organismes ayant grandi en présence de forte luminosité [132]. Après 8 jours d'obscurité permanente, la phase de sénescence est terminée. Les feuilles ont perdues leur belle coloration verte contre une coloration jaune-vert. Il serait certes recommandé de continuer cette opération jusqu'à disparition complète de coloration verte, mais après 8 jours les feuilles restent en bon état, alors qu'un jour supplémentaire laisse apparaître des moisissures. Grâce aux mesures HPLC effectuées, il est possible de déterminer les quantités relatives totales de chlorophylle *a* et de chlorophylle *b* qui ont été dégradées. A partir du graphe de la *figure 6.10.*, il est alors aisé de remarquer que lors de la période de dégradation de la chlorophylle, seulement 10% de la chlorophylle *a* initiale reste inchangée, alors que pour la chlorophylle *b* cette valeur s'élève à 24%. En considérant que la disparition

de ces deux espèces chimiques est exclusivement due à la dégradation et à la formation des catabolites respectifs, il est permis d'affirmer que 90% de la chlorophylle *a* est dégradée, alors que durant le même processus seulement 76% de la chlorophylle *b* est transformée. Ceci permet de déterminer l'origine du catabolite formé à savoir : 81% provenant de la chlorophylle *a* et 29% provenant de la chlorophylle *b*.

6.4.5. La teneur en deutérium de l'eau durant la sénescence

Sachant maintenant que le catabolite provenant de la dégradation de la chlorophylle dans l'orge est constitué de 81% provenant de la chlorophylle *a* et de 29% provenant de la chlorophylle *b*, il est possible de déterminer le taux de deutérium que devra montrer l'échantillon de maléimide final. En ne considérant pas l'eau non-deutérée contenue dans les feuilles qui ont été placées dans l'obscurité, on est en mesure d'attendre 84.8% de maléimide non-marqué provenant des chlorophylles *a* et *b*, et 15.2% de maléimide marqué provenant de la chlorophylle *b* (Schéma 6.5).

Schéma 6.5. : Pourcentages de marquage de la chlorophylle dans l'orge en ne tenant pas compte de l'eau non-deutérée contenue dans les feuilles.



Cependant la réalité est autre, car si l'on contrôle la teneur en deutérium de l'eau deutérée utilisée lors de la sénescence on s'aperçoit que celle-ci diminue

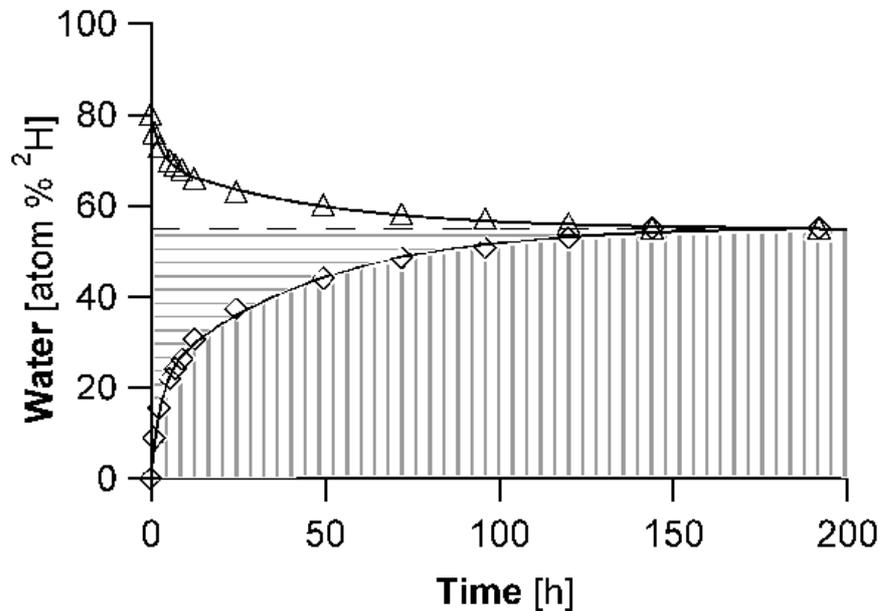
(Figure 6.11.). Elle passe de 80% au début de l'expérience à 55% à la fin de l'expérience. Après réflexion cette diminution est tout à fait normale, car elle correspond à une dilution de l'eau lourde. Cette dilution est attribuée sans conteste à l'eau contenue dans les feuilles au moment où ces dernières sont placées à l'obscurité. Après la lyophilisation d'un échantillon de feuilles d'orge, la diminution de la masse de cet échantillon a montré que les feuilles sont constituées de 88% d'eau. Donc si l'on place dans un récipient 100 g de feuilles et 100 ml d'eau deutérée, il n'est pas étonnant d'observer après un certain temps (192 heures) un échange aboutissant à un équilibre. Cet équilibre est caractérisé par une teneur en eau deutérée de 55% (Figure 6.11.). Il devient alors possible par calcul d'estimer de manière assez précise la teneur en deutérium de l'eau se trouvant à l'intérieur des feuilles. En utilisant l'équation

$$X_l = \frac{(X_{t=0} - X_{t=S})}{(X_{t=0} - X_{\text{equ}})} \cdot X_{\text{equ}} \quad (\text{équation 1})$$

où X_l =pourcentage de deutérium contenu dans les feuilles au moment du prélèvement de l'échantillon ; $X_{t=0}$ =pourcentage de deutérium contenu dans l'eau du récipient au début de l'expérience (80%) ; $X_{t=S}$ =pourcentage de deutérium contenu dans l'eau du récipient au moment du prélèvement ; X_{equ} =pourcentage de deutérium contenu dans l'eau du récipient une fois l'équilibre atteint ; il est alors possible d'estimer la teneur en deutérium de l'eau à l'intérieur des feuilles.

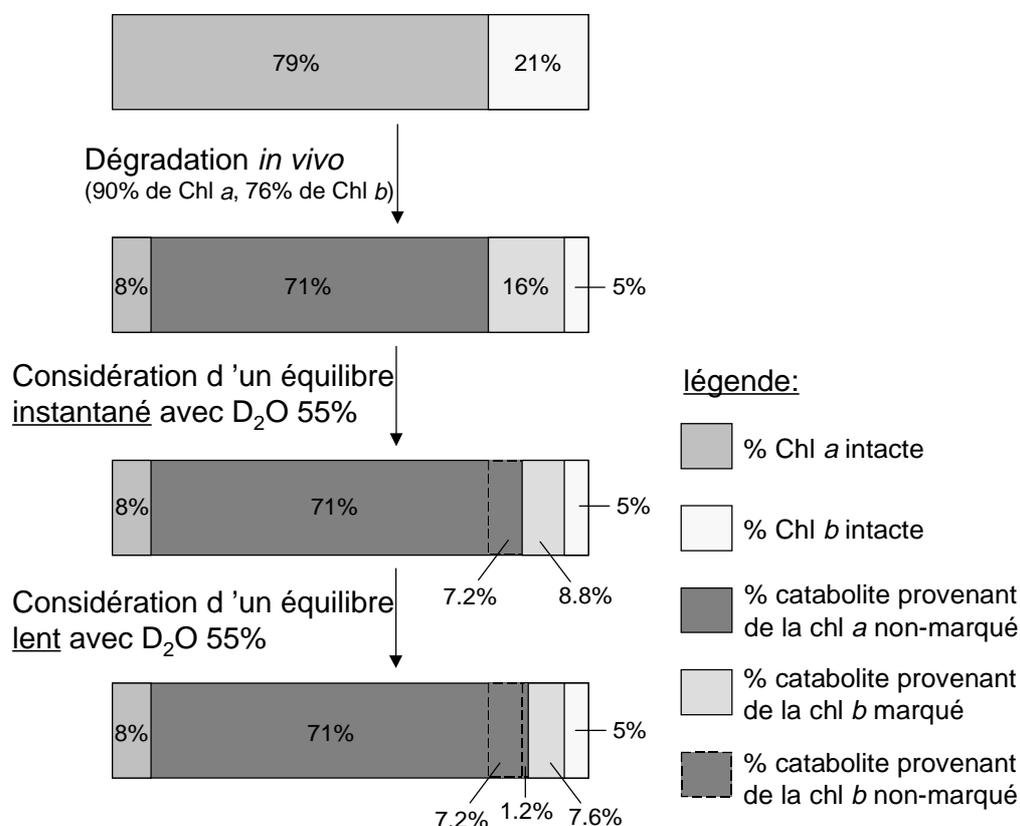
La courbe obtenue lorsque l'on représente graphiquement l'équation 1 nous permet de calculer le taux de deutérium attendu dans la solution de maléimide finale.

Figure 6.11. : La courbe supérieure (Δ) représente la diminution du deutérium dans l'eau du récipient. La courbe inférieure (\diamond) fournit par calcul le taux de deutérium contenu à l'intérieur des feuilles. Un équilibre (symbolisé par un traitillé) est atteint après 192 heures, et le taux de deutérium est alors de 55%.



La *figure 6.11.* met en évidence un équilibre lent (après 192 heures). Le pourcentage de deutérium à l'équilibre s'élève à 55%. Cela signifie que le taux de deutérium à l'intérieur des feuilles est identique à celui de l'eau du récipient. Le taux de deutérium à l'intérieur des feuilles est alors au maximum de 55%, mais en examinant le graphe de la *figure 6.11.* on peut remarquer que durant les 50 premières heures, ce taux est nettement inférieur à 55% à l'intérieur des feuilles. Afin de corriger ceci, le calcul de l'intégral sous la courbe inférieure permet de tenir compte de ce fait. Ainsi le rapport entre l'intégrale sous la courbe inférieure (aire hachurée verticalement) représentant la quantité de deutérium réellement présente dans les feuilles et la somme des intégrales des 2 aires représentant un taux constant de 55% (aires hachurées verticalement et horizontalement) vaut 0.86. Ces calculs permettent dès lors de formuler les valeurs corrigées du deutérium attendu dans l'échantillon final, à savoir 91% de maléimide non-marqué et 9% de produit marqué (*Figure 6.12.*).

Figure 6.12. : Calcul du taux de deutérium attendu dans l'échantillon final, considérant les quantités de chlorophylles dégradées et la présence d'un échange lent de l'eau présente dans les feuilles avec l'eau du récipient.



6.5. La discussion des résultats obtenus lors de l'expérience de marquage en considérant tous les calculs

Considérant le rôle joué par un échange lent entre l'eau présente dans les feuilles et l'eau lourde utilisée lors de l'expérience de deutération, et tenant compte de l'insertion d'un seul atome de deutérium, on peut affirmer que dans les feuilles d'orge la chlorophylle *b* est transformée en chlorophylle *a* avant dégradation. De plus, l'insertion d'un seul atome de deutérium permet d'affirmer que les atomes d'hydrogène requis pour la réduction du groupe formyle de la chlorophylle *b* en chlorophylle *a*, proviennent de deux source d'hydrogène différentes.

6.5.1. La quantification de l'insertion de deutérium en considérant l'échange H₂O/D₂O

D'un point de vue quantitatif, les calculs effectués montrent que 60 à 70% de la chlorophylle *b* qui a disparu durant la sénescence est retrouvée avec un marquage au deutérium. En effet, les calculs prédisent que le mélange final doit être constitué de 9% de maléimide marqué **102a** et de 91% de maléimide non-marqué **102**. Les mesures RMN montrent que la quantité de maléimide marqué **102a** est de 7% et que celle du composé non-marqué est de 93%. Ceci signifie que plus de 70% de la chlorophylle *b* qui a disparu est retrouvée marquée à la fin. La précision de ce résultat est à considérer avec une attention particulière, car la valeur d'une intégrale pour un pourcentage si petit n'est pas très exacte. Par contre la mesure effectuée par spectrométrie de masse, offrant une précision plus élevée, montre que dans le mélange les deux isotopomères se retrouvent dans un rapport 102/102a = 100/6.1 ; ce qui peut se traduire par le fait que le mélange est constitué de 94.2% de maléimide **102** non-marqué et de 5.8% de maléimide **102a** marqué avec un atome de deutérium. D'après la spectrométrie de masse, plus de 60% de la chlorophylle *b* présente dans les feuilles au début est retrouvée marquée.

Après avoir effectué l'expérience à 3 reprises, il a chaque fois été possible de retrouver entre 60 et 70% de la chlorophylle *b* qui a disparu lors de la dégradation. Ce résultat est certes légèrement inférieur à celui calculé s'élevant à 9%, mais de nombreuses raisons expérimentales peuvent expliquer cette valeur légèrement inférieure :

- i) Les conditions d'obscurité permanente, l'usage de feuilles coupées (ne possédant plus de racine) et la contamination par de nombreux micro-organismes de l'eau utilisée pour le marquage, sont des facteurs de stress imprévisibles pour la plante.
- ii) Une plus grande viscosité, une densité accrue et l'acidité plus faible de l'eau lourde peuvent avoir une influence non négligeable sur le processus de dégradation.
- iii) Les expériences de dégradation sont effectuées dans un système de récipient ouvert, permettant ainsi une évaporation continue de l'eau qui se trouve sur les

feuilles ainsi que de l'eau qui recouvre le fond du récipient. La concentration du deutérium dans l'eau qui recouvre le fond du récipient change continuellement jusqu'à atteindre un équilibre mesuré à 55%. Compte tenu de cette valeur, seulement 40 ml de l'eau contenue dans les feuilles a été échangée. Or une expérience de lyophilisation a montré que 100 g de feuilles contiennent 88 g d'eau. Il est alors judicieux de penser qu'une partie de l'eau protique contenue dans les feuilles s'est évaporée durant le processus de dégradation, ou bien que dans l'eau protique des feuilles, une grande partie de l'eau n'est pas « échangeable », et ne vient pas diluer l'eau lourde placée dans le fond du récipient.

- iv) La concentration en deutérium à l'intérieur des feuilles a été calculée par rapport à la concentration en deutérium mesurée dans l'eau du récipient, en considérant que la distribution de l'eau deutérée se faisait de manière uniforme à l'intérieur des feuilles. De plus, pour ce calcul, il a été considéré que la dégradation de la chlorophylle *b* se faisait de manière linéaire, ce qui ne semble pas être le cas, du moins pour la chlorophylle *a* (*Figure 6.10*).
- v) La détérioration de la voie enzymatique qui transforme la Chl *b* en Chl *a* sans que celle de la dégradation de la chlorophylle *a* soit endommagée, influence fortement le rapport final obtenu entre les maléimides **102** et **102a**, en défavorisant uniquement la quantité de maléimide marqué **102a**. Contrairement à cela, une détérioration de la voie enzymatique de dégradation de la chlorophylle *a* n'a aucun effet sur le rapport final des maléimides **102** et **102a**.
- vi) La quantité de chlorophylle *a* et *b* qui est dégradée, est déterminée par HPLC en fonction de la quantité de chlorophylle *a* et *b* qui est restée inchangée. Cette manière de procéder ne tient pas compte de la quantité de chlorophylle *a* et *b* qui a disparue et qui ne s'est pas transformée en catabolite (par exemple, les intermédiaires comme la phéophytine, le chlorophyllide, la phéophorbide, etc..).
- vii) Les effets isotopiques ne devraient pas entrer en ligne de compte ici, car on parle d'effet isotopique lorsque une liaison C-D est cassée. Dans le mécanisme qui sera proposé dans le *schéma 6.6* il n'y a pas de rupture d'une liaison C-D. On considérera que les effets isotopiques n'influencent pas sur la quantité de deutérium attendu dans ce travail.

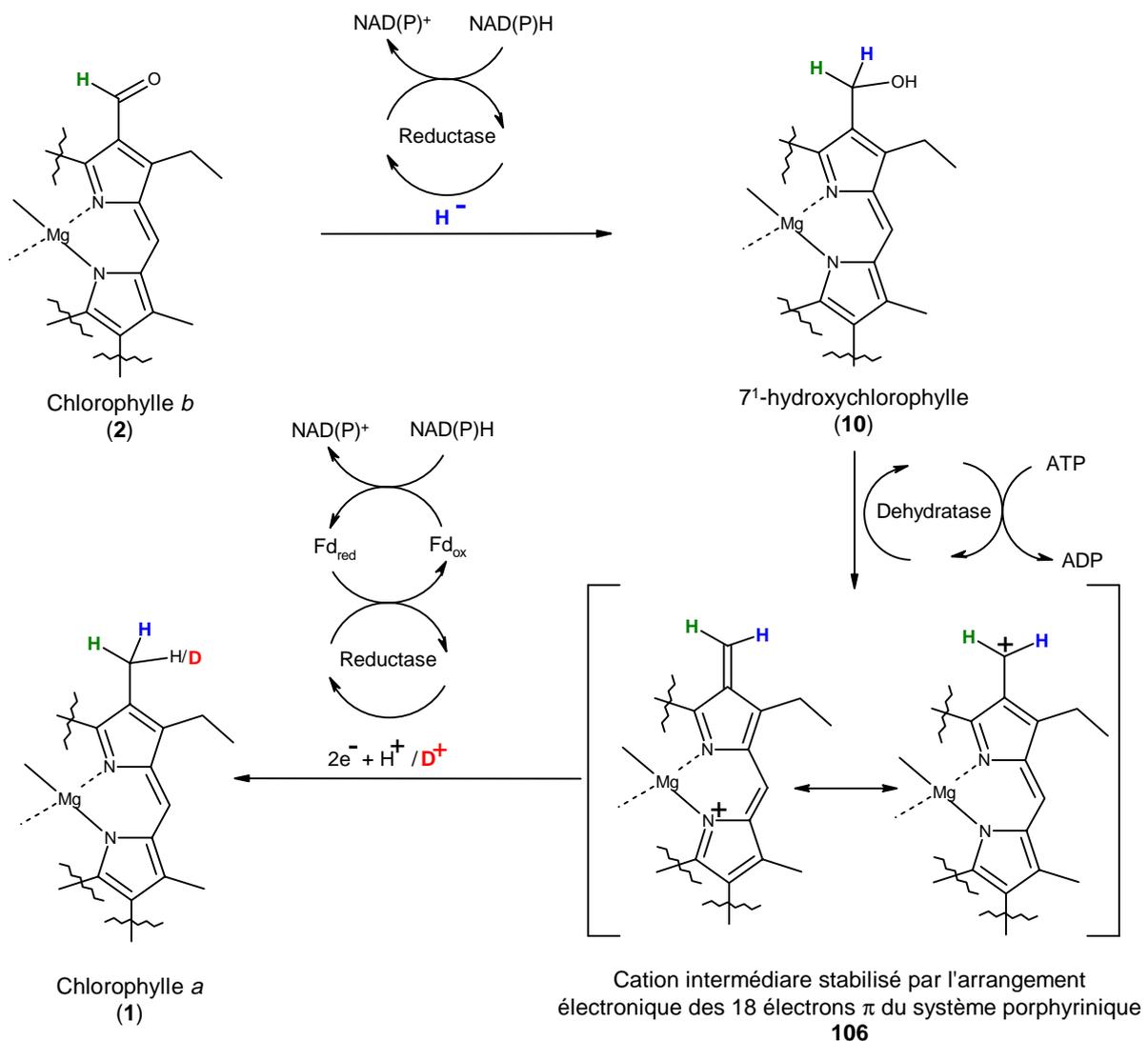
6.5.2. L'insertion d'un seul atome de deutérium

Le fait de ne trouver dans le maléimide finale **102a** qu'un seul atome de deutérium est un résultat surprenant. En effet, les calculs ont d'abord été effectués en considérant la possibilité de l'insertion de 2 atomes de deutérium selon une distribution statistique, qui constitue le mécanisme usuellement accepté pour la réduction d'un groupe formyle en groupe méthyle en présence de deutérium (*Schéma 6.1.*). Donc, des 3 atomes d'hydrogène qui constituent le groupe méthyle du catabolite de la chlorophylle *a* marqué, le premier était déjà présent sur la fonction formyle de la chlorophylle *b*, le deuxième provient d'une source encore inconnue où le proton est lié à un carbone (C-H) qui n'effectue pas d'échange avec le milieu et le troisième doit provenir de l'eau présente dans le milieu.

Les réductions enzymatiques usuelles observées pour la transformation d'un groupe formyle en alcool emploient généralement le NADH ou le NADPH comme source d'hydrogène [143,144]. Il est établi que ces coenzymes n'échangent pas avec le deutérium qui se trouve dans le milieu [145]. Il semble alors qu'une enzyme dépendante de NAD(P)H soit impliquée dans la première réduction du groupe formyle de la chl *b* pour fournir la 7¹-hydroxychlorophylle *a* comme intermédiaire. Il est permis de penser qu'un atome d'hydrogène est transféré d'une source comme des (poly)saccharides vers le groupe formyle au moyen du coenzyme NAD(P)⁺/NAD(P)H. Comme les sucres sont biosynthétisés durant la croissance phototrophe des feuilles d'orge en présence d'eau ordinaire, il est normal que l'hydrure inséré ne conduise pas à un marquage. Ce début de mécanisme correspond à l'observation faite par Scheumann *et al.*, affirmant que le NADH et le NADPH sont tous deux capables de réaliser la réduction *ex vivo* de la Zn(II)phéophorbide *b* en 7¹-hydroxyphéophorbide *a*, et pour laquelle le NADPH est plus efficace [128]. Une élimination réductrice d'un groupe hydroxyle est généralement une étape difficile. La cause en est la forte liaison carbone-oxygène qui est difficile à rompre. Des exemples illustrant une telle élimination de manière enzymatiques sont assez rares [129,146]. Néanmoins, dans le cas présent, l'élimination réductrice peut vraisemblablement être facilitée par l'arrangement électronique des 18-électrons π du système porphyrinique livrant alors le cation stabilisé **106** (*Schéma 6.6.*). Ce processus d'élimination réductrice exige un

activateur capable de transformer le groupe hydroxyle en un meilleur groupe partant. Il faut alors remarquer que l'ATP peut jouer ce rôle d'activateur, surtout si l'on admet que l'ATP est nécessaire pour la transformation de la chlorophylle *b* en chlorophylle *a* dans les étioplastes d'orge [129] mais pas pour la première réduction fournissant la 7¹-hydroxychlorophylle *a* [55].

Schéma 6.6. : Mécanisme postulé pour la réduction enzymatique *in vivo* de la chlorophylle *b* en chlorophylle *a*.



Plus récemment il a été démontré que l'étape de réduction finale a lieu lorsque de la ferrédoxine réduite provenant d'épinard est ajoutée à des étioplastes préalablement lysés [14]. La ferrédoxine participant généralement à des réactions de transferts d'électrons, il est alors raisonnable de penser qu'ici aussi il s'agisse d'un transfert d'électron impliquant le NADH et/ou des flavoprotéines [144]. C'est pourquoi il est

proposé ici une réduction finale du cation **106** par un transfert de 2 électrons fournissant dans un premier temps l'anion dont la charge est tout de suite neutralisée par un proton ou un deutéron.

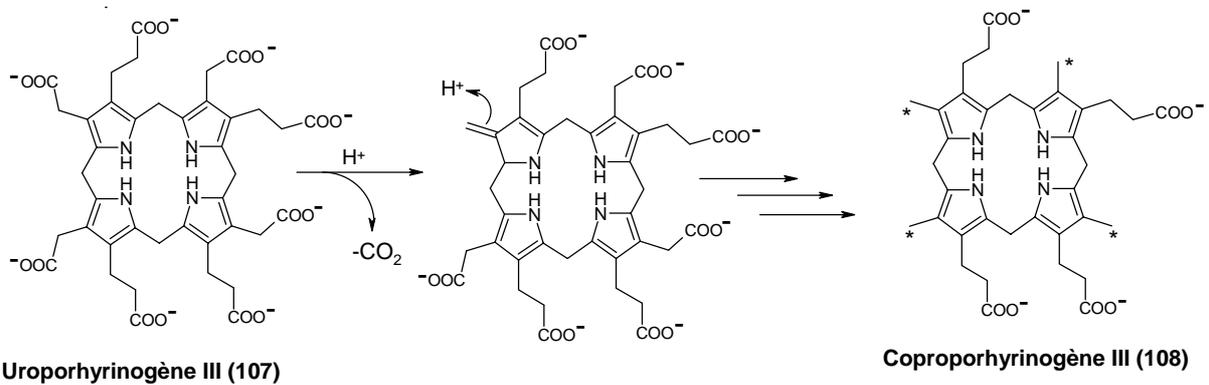
6.5.3. L'exclusion d'une biosynthèse de novo de la chlorophylle juste avant la dégradation.

Il est logique de penser que l'insertion de l'atome de deutérium observée puisse provenir de la biosynthèse de novo de la chlorophylle juste avant la dégradation. En effet, les feuilles sont placées dans l'obscurité avant d'être coupée afin de stopper la biosynthèse. Si ce temps n'est pas assez long, et que la biosynthèse continue malgré tout, on peut imaginer que du deutérium est inséré dans la chlorophylle, et que le marquage observé ne provienne pas de la dégradation, mais plutôt de la biosynthèse. Afin d'exclure cette hypothèse, il faut observer la phase de biosynthèse et voir où le marquage potentiel aurait lieu.

La possibilité d'observer une insertion de deutérium en position 7¹ durant la biosynthèse de la chlorophylle est envisageable, car lors de la décarboxylation de l'uroporphyrinogène III pour fournir le coproporphyrinogène III, l'anion formé est neutralisé par un proton. Or si cette neutralisation de la charge négative a lieu dans un milieu deutéré, il peut y avoir insertion d'un atome de deutérium.

Cependant, d'après le mécanisme de biosynthèse (*Schéma 6.7.*) les quatre groupes méthyle, à savoir les positions 2¹, 7¹, 12¹ et 18¹, doivent être marqués. Par conséquent, les maléimides **53a** et **101** isolés lors de l'expérience de marquage devraient aussi montrer l'insertion d'un atome de deutérium dans leur groupe méthyle en position 4. Ceci n'étant pas le cas, l'insertion de deutérium observée sur le maléimide **102a** ne peut donc pas provenir d'une biosynthèse de la chlorophylle mal arrêtée.

Schéma 6.7. : Décarboxylation de l'uroporphyrinogène III pour former le coproporphyrinogène III durant la biosynthèse de la chlorophylle. Les groupes méthyles devant montrer l'incorporation d'un atome de deutérium lorsque la réaction est effectuée dans l'eau lourde, sont marqués avec un astérisque (*).



Cette expérience de contrôle permet d'aller encore plus loin, car elle confirme que mis à part l'interconversion chl *a*-chl *b*, il n'y a pas de biosynthèse de la chlorophylle dans l'obscurité chez les angiospermes [12].

7. La synthèse du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide (101) et du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylmaléimide (102)

Il y a 4 raisons principales de pratiquer la synthèse de ces deux nouveaux maléimides isolés ici pour la première fois :

- i) L'isolation de ces maléimides à partir de feuilles d'orge ne permet la purification que d'une quantité minime de produit, de l'ordre du milligramme. Pour pouvoir en obtenir plus, il faudrait pratiquer cette isolation avec une très grande quantité de feuilles d'orge. Cette opération est difficile, voire impossible à effectuer avec le matériel mis à disposition. Afin d'obtenir 250 mg de maléimide naturel, il faudrait commencer l'isolation avec plus de 40 kg de feuilles, nous obligeant ainsi à travailler avec des récipients adéquats, introuvables dans le monde universitaire, ou à refaire près de 100 fois la même isolation avec des volumes acceptables. Afin d'éviter de répéter ces manipulations un grand nombre de fois, la synthèse du composé permettrait de confirmer les analyses chimiques effectuées avec une très petite quantité de produit naturel.
- ii) La possession d'une quantité appréciable de chacun de ces deux maléimides permettrait d'utiliser ces composés comme référence dans des tests d'oxydation en phase aqueuse, facilitant ainsi une détection rapide et une isolation aisée de nouveaux catabolites. Comme exemple, on citera la technique utilisée pour tenter d'identifier la constitution du catabolite de la chlorophylle présent dans le magnolia. En effectuant le test d'oxydation et en comparant les fragments avec des références, il a été possible d'identifier une fonction vinyle, un groupe propionate et un reste 2-hydroxyéthyle. A la longue, il devrait ainsi être possible de créer une base de données contenant de nombreux maléimides dérivés de chlorophylles et/ou de leur(s) catabolite(s).
- iii) Lors de la synthèse totale ou partielle de nouveaux catabolites de la chlorophylle, les produits intermédiaires obtenus durant la synthèse des maléimides recherchés peuvent être de grande utilité ; leur caractérisation est donc importante.
- iv) La synthèse du maléimide **101** possédant un centre asymétrique en position 3¹ est très importante parce que la stéréochimie centre 3¹ du catabolite issu de

l'orge (**29**) n'est pas connue. Une synthèse en grande quantité du mélange racémique suivie de la résolution pourraient permettre l'élucidation de la stéréochimie du centre asymétrique en question.

7.1. La synthèse des 3-substitué-4-méthyl-maléimide

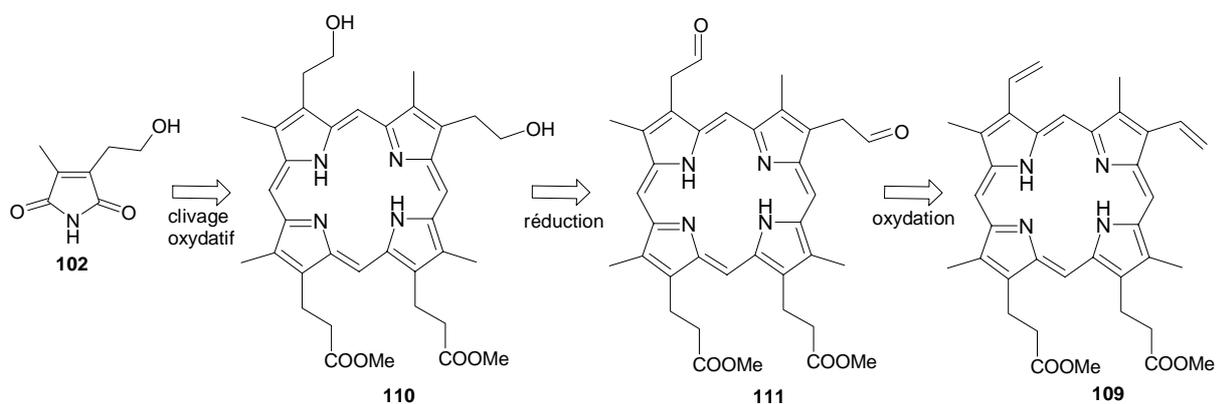
La synthèse de ces maléimides, fragments provenant des chlorophylles ou de ses dérivés, peut être approchée selon plusieurs voies différentes. Premièrement, selon la même approche que pour l'isolation du produit naturel, à savoir le clivage oxydatif d'une molécule tétrapyrrolique. La seconde possibilité consiste en l'oxydation d'un pyrrole contenant les groupes fonctionnels adéquats.

7.2. La synthèse du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**)

Pour la synthèse du maléimide **102**, ce sont les deux approches citées qui ont été appliquées. Dans un premier temps, le maléimide a été synthétisé par clivage oxydatif d'une porphyrine ; dans un second temps, l'oxydation d'un pyrrole possédant les groupes fonctionnels adéquats a été mise en œuvre.

7.2.1. Le clivage oxydatif d'un tétrapyrrole

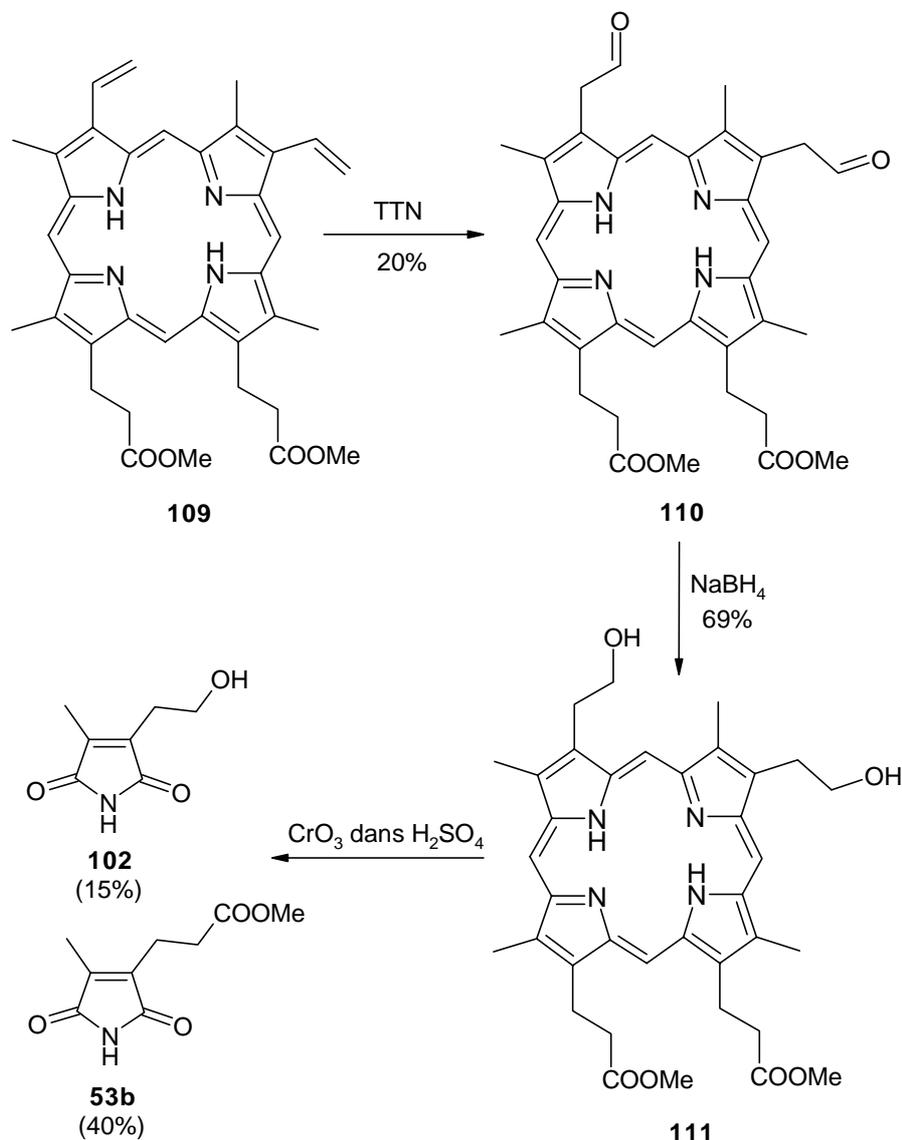
Une analyse rétrosynthétique succincte permet d'élaborer rapidement une méthode de synthèse débutant avec le diester méthylique de la protoporphyrine IX (**109**) (*Schéma 7.1.*). Cette analyse montre que le clivage oxydatif du diester méthylique de la 3,8-*bis*(2-hydroxyéthyl)-deutéroporphyrine IX (**110**) obtenu par réduction au moyen de NaBH₄ du diester méthylique de la 3,8-*bis*(2-oxoéthyl)-deutéroporphyrine IX (**111**) semble être une méthode rapide pour obtenir le produit désiré. Mis à part le clivage oxydatif, la difficulté rencontrée dans cette approche, réside dans l'obtention du composé *bis*-formylé **111** par oxydation au trinitrate de thalium du diester méthylique de la protoporphyrine IX (**109**).

Schéma 7.1. : Analyse rétrosynthétique de l'approche par oxydation d'une porphyrine.

La première étape qui consiste à oxyder le diester méthylique de la protoporphyrine IX (**109**) au moyen de trinitrate de thalium (III) a été effectuée selon la procédure déjà utilisée par Kahl *et al.* pour obtenir exactement le même produit que celui recherché ici [147] (*Schéma 7.2.*). Contrairement à ce qui est mentionné dans la littérature, le rendement obtenu n'est que de 20%, alors que la littérature annonce un rendement de 90%. On peut alors se demander si cette réaction constitue le moyen le plus approprié pour obtenir le composé désiré, car non seulement le rendement est faible, mais en plus l'agent oxydant utilisé possède une toxicité extrêmement élevée. Cette étape permet **toutefois** d'obtenir rapidement le composé *bis*-formylé recherché.

La seconde étape envisagée est décrite dans le même travail que celui qui a été consulté pour l'oxydation au thalium [147]. En effet, la réduction au moyen de borohydrure de sodium dans le méthanol de la porphyrine obtenue à l'étape précédente a permis l'isolation du *bis*-alcool (**110**) recherché (*Schéma 7.2.*). A nouveau, les 69% de rendement obtenus ici sont inférieurs aux 93% avancés dans la littérature. La seule différence apportée ici par rapport au travail de Kahl *et al.*, se situe dans la purification du produit de départ pour cette réduction. En effet, les auteurs de la publication consultée ne purifient pas le produit avant la réduction, alors que dans notre cas, une purification poussée est entreprise.

Schéma 7.2. : Voie de synthèse effectuée pour transformer le diester méthylique de la protoporphyrine IX (**109**) en 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**).



La troisième étape consiste en la réaction de clivage oxydatif proprement dit. Cette réaction est inspirée des nombreux travaux d'oxydation des porphyrines déjà mentionnés au chapitre 3. Comme l'indique le schéma 7.2., cette réaction permet d'isoler deux maléimides différents : le 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**) et l'ester méthylique de l'imide de l'acide hématinique (**53b**). En effectuant cette oxydation en présence d'un large excès d'oxydant, il est possible que l'oxydation continue pour fournir un composé suroxydé. Ceci peut se remarquer en notant une différence de rendement pour les deux maléimides produits lors de cette étape. C'est effectivement le cas, on observe un rendement de 40% pour l'ester qui ne peut plus être suroxydé, alors que l'alcool est isolé avec un rendement de seulement 15%.

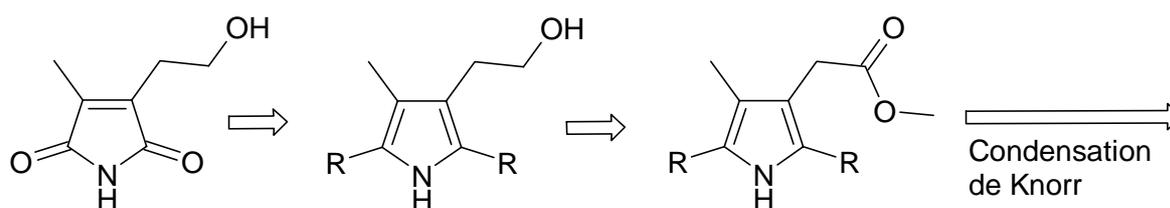
Ceci indique bien qu'une suroxydation du produit possédant une fonction alcool a lieu, alors que cette suroxydation ne semble pas avoir lieu dans le cas de l'ester.

La synthèse du maléimide **102** par clivage oxydatif d'un tétrapyrrole a été effectuée avec succès. Il faut cependant noter que les 3 étapes nécessaires à l'obtention du produit désiré, n'offrent que de faibles rendements, et ne permettent alors que difficilement la synthèse d'une quantité plus intéressante de produit. De plus, la toxicité de l'oxydation au nitrate de thallium étant très élevée, l'élaboration d'une méthode plus adaptée s'avère indispensable.

7.2.2. L'oxydation d'un pyrrole possédant les groupes fonctionnels adéquats

La synthèse d'un pyrrole possédant une fonction méthyle en position 4 ainsi qu'une fonction 2-hydroxyéthyle en position 3 peut être accomplie en réduisant un pyrrole possédant une fonction méthoxycarbonylméthyle en position 3. Cette approche est celle envisagée ici, comme l'illustre le *Schéma 7.3.*

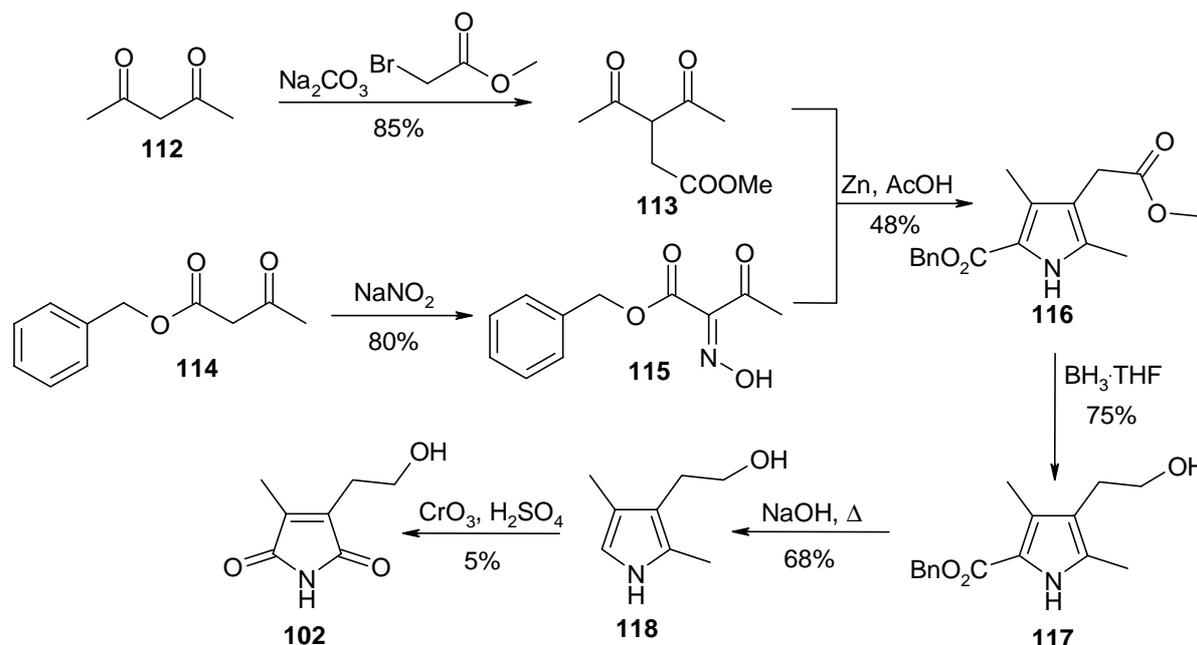
Schéma 7.3. : Analyse rétrosynthétique de l'approche par oxydation d'un pyrrole judicieusement fonctionnalisé.



Pour synthétiser le maléimide **102** par cette deuxième approche, la synthèse du 4-méthoxycarbonylméthyl-3,5-diméthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**116**) est entreprise (*Schéma 7.4*). Le pyrrole **116**, déjà répertorié dans plus de 15 publications, est préparé conformément au travail de Dolphin *et al.*, c'est-à-dire par condensation de Knorr avec un rendement de 48% [148]. Les produits de départ (**113** et **115**) de cette condensation sont facilement obtenus par alkylation de l'acétylacétone (**112**) avec le bromoacétate de méthyle avec un rendement de 85%

pour le premier (**113**), et par formation de l'oxime de l'acétoacétate de benzyle (**114**) au moyen de nitrite de sodium avec un rendement de 80% pour le second (**115**).

Schéma 7.4. : Première synthèse du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide par oxydation d'un pyrrole correspondant.



L'introduction de la fonction 2-hydroxyéthyle en position 4 se fait par réduction de la fonction ester selon la méthode similaire utilisée par Carr *et al.* [149]. Ainsi, la réduction du pyrrole **116** au moyen du complexe de borane-THF fournit le pyrrole 4-(2-hydroxyéthyl)-3,5-diméthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**117**) désiré avec un rendement de 75% après purification sur colonne. A partir de ce dernier, il est aisé de supprimer la fonction ester benzylique en position 2 afin d'obtenir un pyrrole libre en position α . Pour ce faire, la saponification de l'ester, directement suivie de la décarboxylation initiée par chauffage, sont effectuées selon un travail réalisé sur des dipyrrolylméthanés par Jackson *et al.* [150]. Un rendement de 68% après purification par chromatographie sur colonne est obtenu pour cette étape, et les premiers essais d'oxydation du 3-(2-hydroxyéthyl)-2,4-diméthyl-1H-pyrrole (**118**) au moyen d'acide chromique peuvent commencer. Après de nombreux essais et de multiples changements dans la méthode d'oxydation tels que la température, le solvant et le temps de réaction, le meilleur résultat observé n'a permis d'isoler le maléimide (**102**) désiré qu'avec un rendement de 5%. Après de si nombreuses étapes, un tel résultat

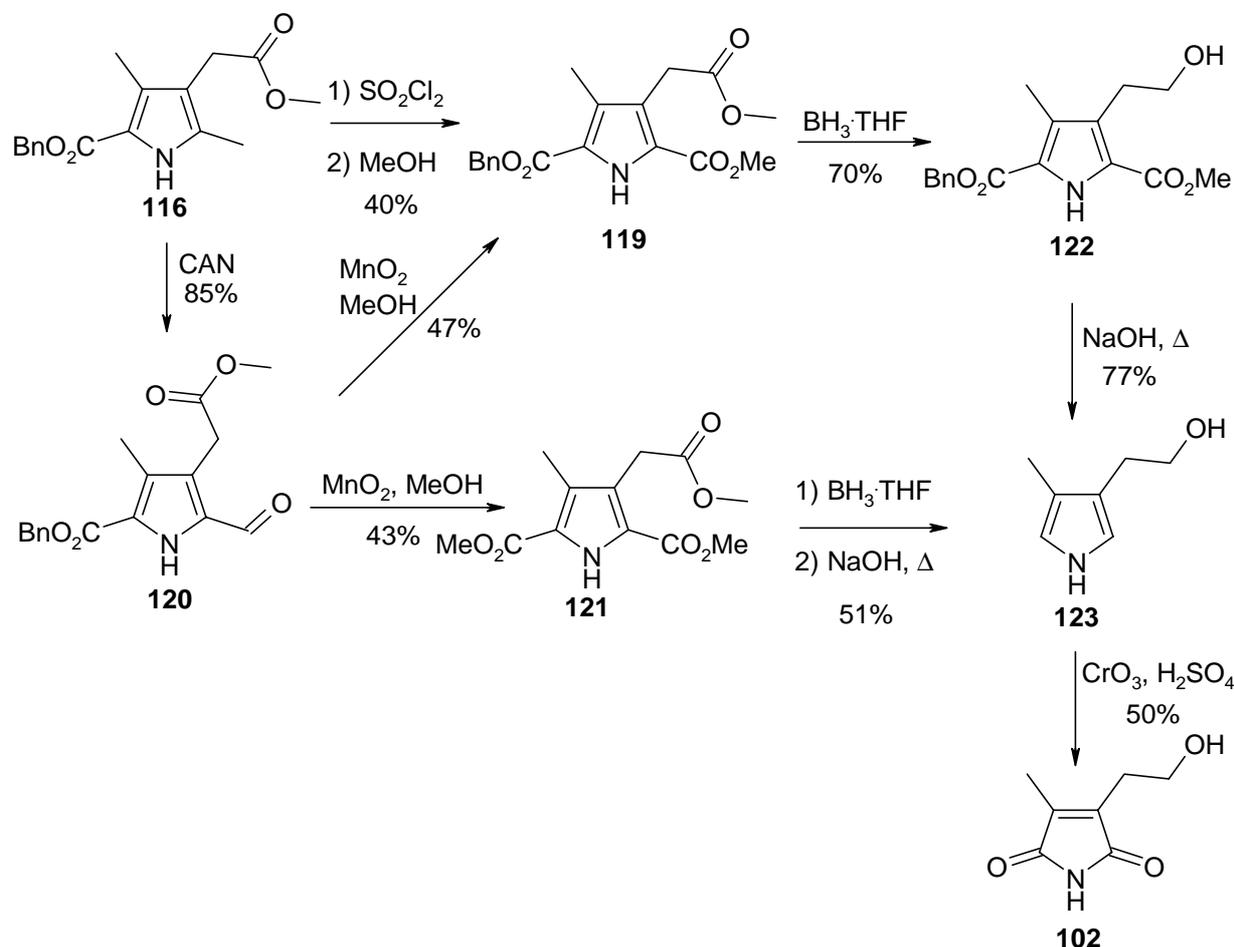
ne peut être considéré comme satisfaisant ; il faut donc trouver une solution pour augmenter le rendement de cette dernière étape.

Un rendement si faible pour cette étape peut s'expliquer par le groupe méthyle en position 2 qui semble difficile à oxyder parce qu'il nécessite la perte d'un atome de carbone. Il serait alors judicieux d'essayer d'oxyder le même pyrrole possédant les deux positions α libres.

Pour synthétiser un tel pyrrole, la saponification et la décarboxylation ont été maintenues vu que cela fonctionne relativement bien. Il suffit alors de transformer le groupe méthyle de la position 2 en un groupe ester. Une telle réaction est largement décrite dans la littérature pour synthétiser le même pyrrole que celui qui est recherché ici [151,152]. La méthode couramment utilisée est l'oxydation radicalaire du groupe méthyle au moyen de chlorure de sulfuryle afin de former le trichlorure qui est transformé en ester méthylique par réaction avec le méthanol [151,152]. Cette réaction a permis l'isolation du diester **119** (*Schéma 7.5.*) avec un rendement de 40%. Si l'on compare ce rendement avec celui publié par Valasinas *et al.*, on s'aperçoit que le résultat obtenu ici reste bien inférieur aux 70% de rendement annoncé [152]. Lors de nombreuses tentatives d'optimisation, il n'a pas été possible d'augmenter le rendement de cette oxydation. Il a même souvent été impossible de reproduire le rendement initial de 40%. Avec une telle incertitude dans la méthode de synthèse, il a fallu prendre la décision de trouver une autre voie pour transformer le groupe méthyle de la position 5 en un groupe ester méthylique.

Suite à une recherche de littérature sur les différentes méthodes d'oxydation d'un groupe méthyle en position α d'un pyrrole, la méthode qui a été retenue, est l'oxydation de la fonction méthyle en formyle, au moyen du nitrate cérique d'ammonium, comme le prescrit le travail de Tyrann et Lightner [153].

Schéma 7.5. : Modifications de la première synthèse du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide par oxydation d'un pyrrole correspondant afin d'augmenter le rendement de la dernière étape.



Après avoir oxydé la fonction méthyle, il sera possible de transformer le groupe formyle en fonction ester méthylique selon les conditions décrites par Corey *et al.* [154] et déjà appliquées à la chimie des pyrroles par Baciocchi *et al.* [155]. L'application de cette méthode pour la molécule recherchée ici a permis de synthétiser dans un premier temps le composé formyle **120** avec un bon rendement s'élevant à 85%. Cependant, une transestérification partielle de l'ester benzylique a eu lieu lors de l'oxydation du groupe formyle en ester méthylique dans les conditions de Corey, livrant ainsi deux produits dont le rendement total après purification sur colonne se monte à 90%. Cette réaction a donc non seulement conduit à l'isolation de 47% de l'ester désiré **119**, mais également à 43% du produit de la transestérification, le triester méthylique **121** (Schéma 7.5.). Ce produit secondaire n'est pas gênant ; il peut en effet être utilisé exactement comme le produit désiré

pour livrer finalement le pyrrole **123** avec les deux positions en α libres. Celui-ci est obtenu en réduisant la fonction ester greffée sur la position 4 des pyrroles **119** et **121** pour fournir après saponification et décarboxylation le pyrrole libre en position α **123**. Il faut noter toutefois que le produit résultant de la réduction du pyrrole **121** n'a pas été isolé et caractérisé. La raison en est purement pratique. En effet, la synthèse du pyrrole **123** a d'abord été achevée en réduisant l'ester **119** isolé après oxydation au chlorure de sulfuryle, conduisant au pyrrole **122** avec un rendement de 70%. Puis, en saponifiant et décarboxylant l'alcool alors obtenu, le pyrrole **123** est isolé avec un rendement de 77%. Comme cette méthode a pu fournir le 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1*H*-pyrrole recherché, elle a été appliquée directement sur les 2 produits obtenus lors de l'oxydation de Corey, fournissant directement le pyrrole **123** avec un rendement de 51% pour les deux étapes. Ce rendement correspond tout à fait aux rendements individuels déjà observés.

Après avoir synthétisé le pyrrole libre en α **123**, celui-ci peut être oxydé à l'acide chromique pour fournir le maléimide **102** tant recherché. Après plusieurs essais le meilleur rendement atteint se monte à 50% ; il est relativement modeste, mais tout de même 10 fois plus élevé que celui obtenu avec le pyrrole précédent possédant encore un groupe méthyle en position α **118**. Ainsi, il est possible de conclure que les pyrroles libres en position α s'oxydent plus facilement que ceux dont une des positions est encore substituée.

Par rapport au clivage oxydatif du diol **110** où le rendement n'est que de 15%, cette étape d'oxydation du pyrrole libre en positions α offre un rendement nettement supérieur. Dans le cas de l'oxydation du pyrrole une suroxydation a aussi lieu, mais la différence de rendement réside surtout dans le fait qu'il ne faut pas rompre un macrocycle comme c'est le cas dans le clivage oxydatif des porphyrines.

7.2.3. Les deux approches utilisées pour la synthèse du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (102)

Grâce aux 2 approches planifiées, il a été possible de synthétiser la molécule recherchée. Chacune de ces deux approches comporte des avantages et des

inconvenients. La première, par exemple, nécessite l'utilisation du sel de thallium, qu'il vaudrait mieux éviter vu sa très haute toxicité ; de plus, il s'agit d'une chimie « destructrice » qui consiste à dégrader oxydativement une molécule certes commerciale, mais dont la taille est grande. Cette approche dégradative empêche le travail en grande quantité, c'est-à-dire à l'échelle du gramme.

La seconde approche met en évidence le fait que le travail à plus grande échelle paraît possible, mais le nombre élevé d'étapes est plutôt gênant.

Il ne faut toutefois pas oublier que le but premier de la synthèse de ce maléimide est de pouvoir confirmer les mesures obtenues en analyse instrumentale avec une très petite quantité de produit naturel. Dans ce sens, le but de cette synthèse est tout à fait atteint.

7.3. La synthèse du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (101)

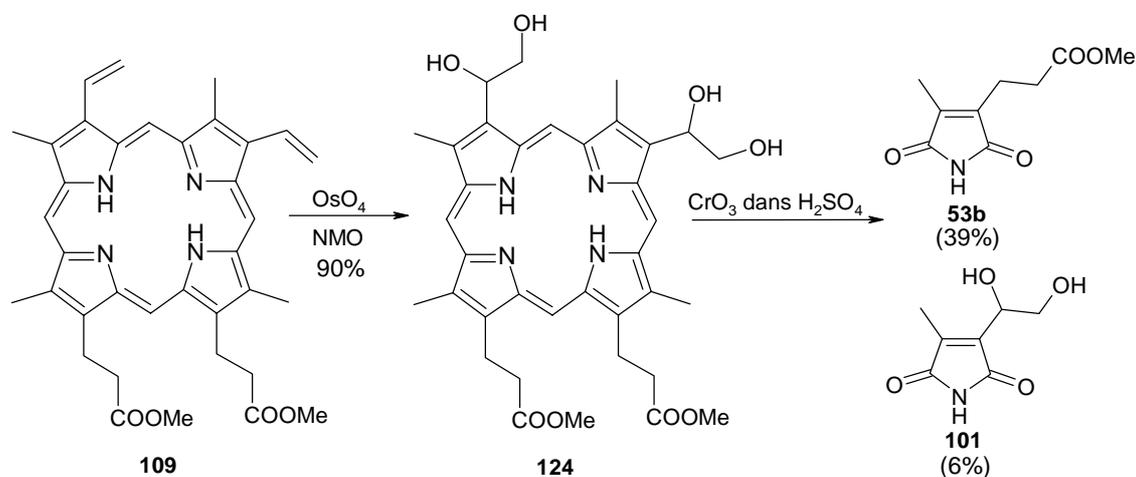
La synthèse du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**) a été entreprise pour la même raison que la synthèse du maléimide **102**, à savoir la confirmation des données spectroscopiques.

Pour la synthèse du maléimide **101**, les deux mêmes approches que celles qui ont été utilisées pour la synthèse du maléimide **102** ont été appliquées. Dans un premier temps, le maléimide a été synthétisé par clivage oxydatif d'une porphyrine ; dans un second temps, la synthèse d'un pyrrole possédant les groupes fonctionnels adéquats a été entreprise.

7.3.1. Le clivage oxydatif d'un tétrapyrrole

A nouveau, une analyse rétrosynthétique succincte (*Schéma 7.6.*) indique que l'oxydation du bis-diol **124** obtenu par dihydroxylation au moyen de tétraoxyde d'osmium du diester méthylique de la protoporphyrine IX (**109**) semble constituer une méthode rapide pour obtenir le dihydroxymaléimide **101** recherché.

Schéma 7.7. : Voie de synthèse effectivement effectuée pour transformer le diester méthylique de la protoporphyrine IX (**109**) en 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**)



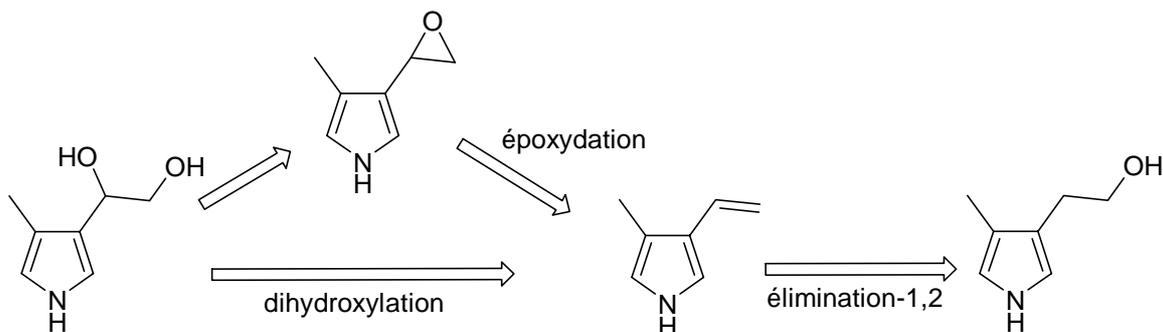
La deuxième étape, le clivage oxydatif du bis-diol **124** obtenu, est effectuée dans les mêmes conditions que pour l'obtention du maléimide **102** (Schéma 7.7.). A nouveau cette réaction permet l'isolation de 2 maléimides : l'ester méthylique de l'imide de l'acide hématinique (**53b**) avec un rendement de 39%, et le dihydroxy-maléimide **101** avec un rendement de seulement 6%. On peut constater qu'une différence de rendement est ici aussi présente et qu'elle est encore plus élevée. Ceci indique, selon toute vraisemblance, que le dihydroxy-maléimide **101** est suroxydé. De plus, cette suroxydation est encore plus présente avec ce composé qu'avec le monohydroxy-maléimide **102**. Cette constatation peut être argumentée par le fait que le composé **101** possède deux fonctions alcool qui peuvent être suroxydées.

Malgré le faible rendement de la deuxième étape, cette méthode a permis de fournir suffisamment de produit pour confirmer les analyses instrumentales. Une fois de plus, il s'agit de chimie « destructrice » et très toxique. Mais cependant, par ce moyen, il est possible d'obtenir **rapidement** une petite quantité de la substance désirée.

7.3.2. La synthèse d'un pyrrole possédant les groupes fonctionnels adéquats

Afin de synthétiser le dihydroxymaléimide **101** en oxydant un pyrrole possédant les groupes fonctionnels adéquats, il faut synthétiser un pyrrole libre en positions α ayant les bons substituants, à savoir un groupe méthyle en position 4 et le groupe 1,2-dihydroxyéthyle en position 3. Le moyen le plus rapide pour obtenir un tel pyrrole consiste à reprendre le pyrrole **123** et d'effectuer une élimination-1,2 pour obtenir le groupe vinyle. Ce dernier peut être époxydé ou dihydroxylé afin d'obtenir la fonction dihydroxyle désirée (*Schéma 7.8.*).

Schéma 7.8. : Approche envisagée par élimination-1,2.



Afin de préparer l'étape importante de l'élimination-1,2, les premiers essais sont effectués sur le pyrrole **122**, plus aisé à obtenir que le pyrrole **123**.

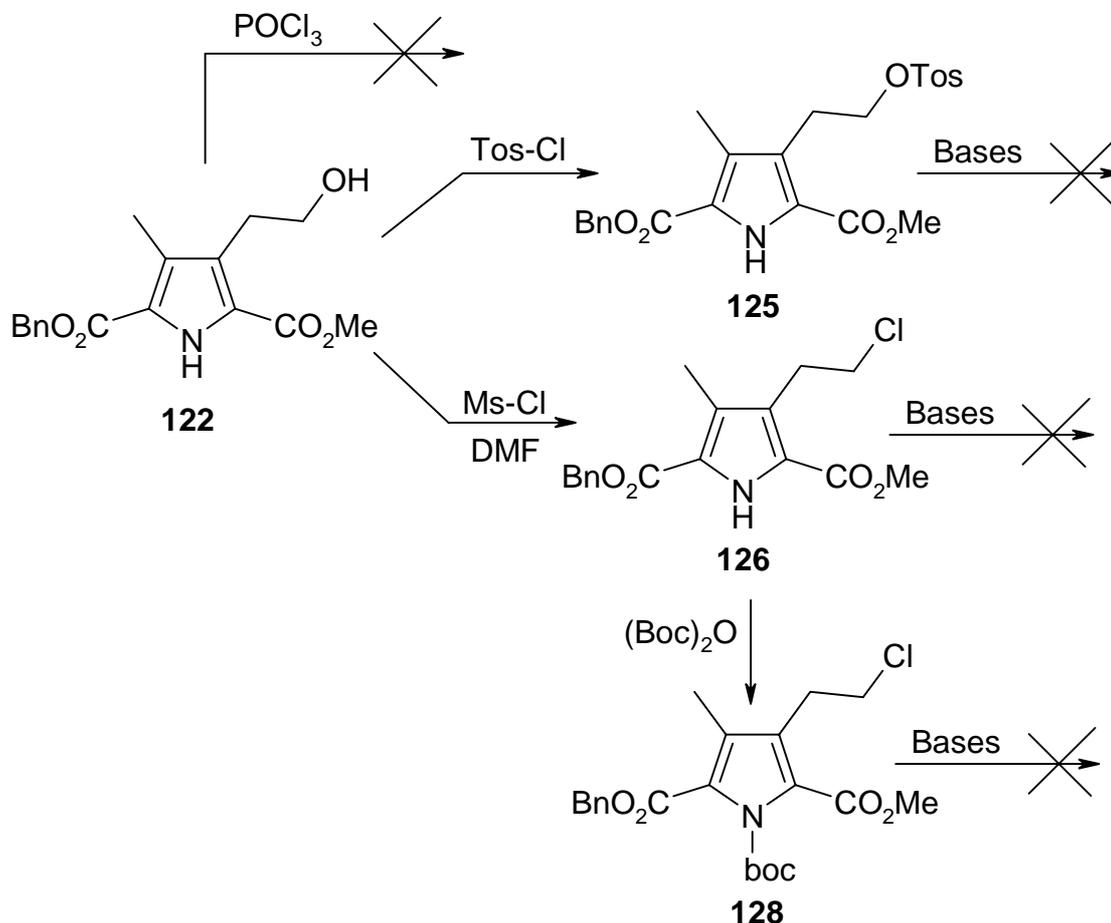
7.3.2.1. Les tentatives d'élimination-1,2

Les premiers essais effectués sur le pyrrole **122** au moyen d'oxychlorure de phosphore n'ont pas permis d'obtenir la fonction vinyle attendue (*Schéma 7.9.*). La formation d'un ester de phosphore intermédiaire n'étant certainement pas suffisante, il a été décidé d'activer la fonction -OH de différentes manières :

- i) La première façon envisagée est la formation du tosylate correspondant (*Schéma 7.9.*). Le pyrrole tosylé sur sa fonction alcool une fois obtenu, de nombreux essais d'élimination utilisant différentes bases (NaOH, KOH, Pyridine,

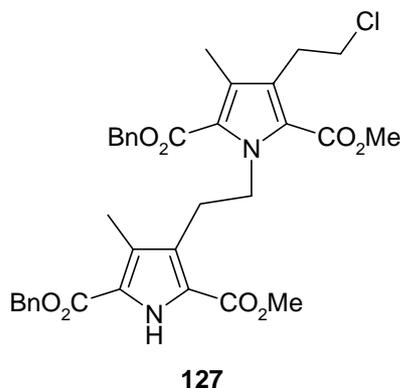
Et₃N, DBU, diisopropylamine) ont été réalisés. Cependant, aucun produit d'élimination n'a été détecté lors de toutes ces tentatives.

Schéma 7.9. : Les tentatives d'élimination-1,2.



- ii) La réaction du pyrrole **122** avec le chlorure de mésyle dans le DMF fournit le composé **126** possédant une fonction –Cl à la place de la fonction alcool. En soumettant ce composé à un milieu basique à haute température, il a été possible d'isoler un important produit intermédiaire (*Figure 7.1.*). Le dimère **127** met en évidence une substitution sur l'azote pyrrolique. Ceci nous indique que le problème se situe au niveau de l'atome d'azote. En effet, le proton de l'atome d'azote est plus acide que le proton de la position 3¹ qui doit impérativement être arraché pour que la réaction d'élimination-1,2 puisse avoir lieu. Ce résultat indique que le même pyrrole protégé sur la fonction azote doit alors fournir le composé désiré.

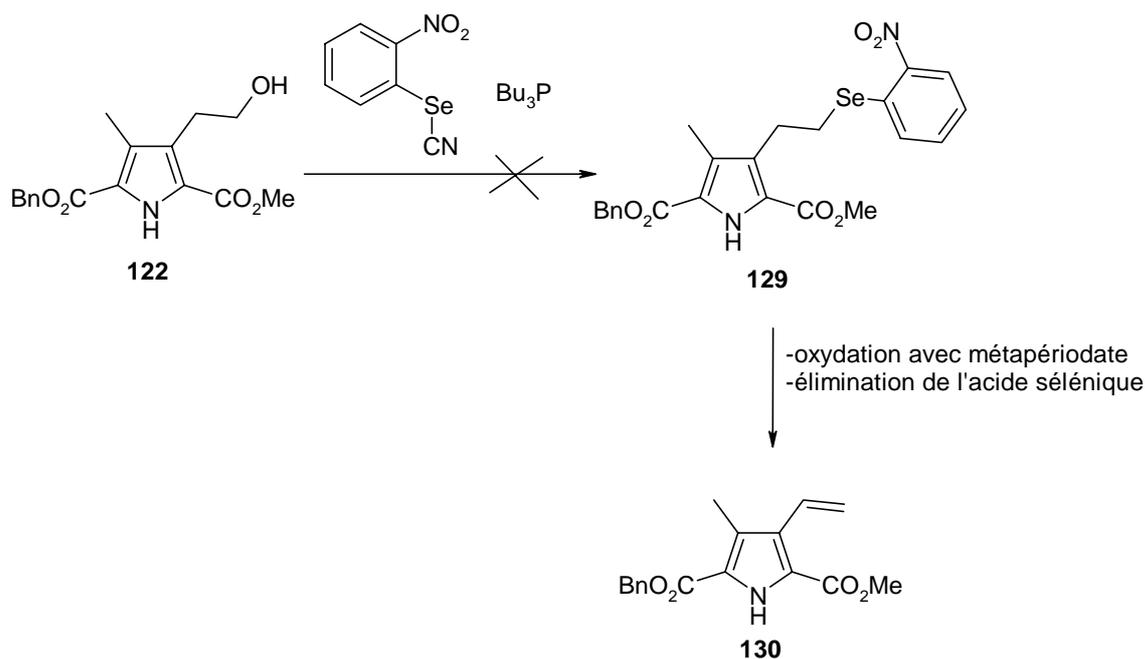
Figure 7.1. : Le dimère **127** isolé lors de la tentative d'élimination-1,2 effectuée sur le pyrrole **126**.



iii) La protection de la fonction azote entreprise au moyen du dicarbonate BocOBoc a fourni le pyrrole *N*-protégé **128** (*Schéma 7.9.*). Malgré cela, lorsque ce dernier est traité avec une base, une disparition du produit de départ est observée sans pour autant apercevoir la formation d'un autre produit intéressant. Les CCM effectuées durant la réaction suggèrent une décomposition de la molécule de départ quelle que soit la base utilisée.

Avant d'abandonner complètement cette voie qui débute par la réaction d'élimination, une dernière tentative est envisagée. Il s'agit d'essayer la méthode qui est décrite dans le *schéma 7.10.*. Cette approche est souvent utilisée lors de réactions d'élimination-1,2 où le proton est difficile à arracher. Dans le cas présent, l'application de cette méthode n'a rien donné.

Schéma 7.10. : Approche utilisée lorsque la déprotonation est difficile.



A ce stade, il a été décidé d'envisager une tout autre approche pour synthétiser un pyrrole possédant une fonction méthyle en position 3 et une fonction 1,2-dihydroxyéthyle en position 4.

7.4. La synthèse du 4-méthyl-3-(1,2-dihydroxyéthyl)-pyrrole

En se référant à 5 publications concernant la réactivité des positions 2 et 3 des pyrroles [157-161], une possibilité de synthèse très intéressante apparaît. En effet, l'acylation du pyrrole *N*-tosylé a déjà permis de fonctionnaliser les positions 2 et 3 avec les fonctions acétyle, vinyle et 1-hydroxyéthyle [157,158,160,161]. L'application de ces méthodes sur le 2-méthyl-1*H*-pyrrole devrait pouvoir fournir la possibilité de synthétiser le pyrrole possédant aux positions 3 et 4 les substituants désirés.

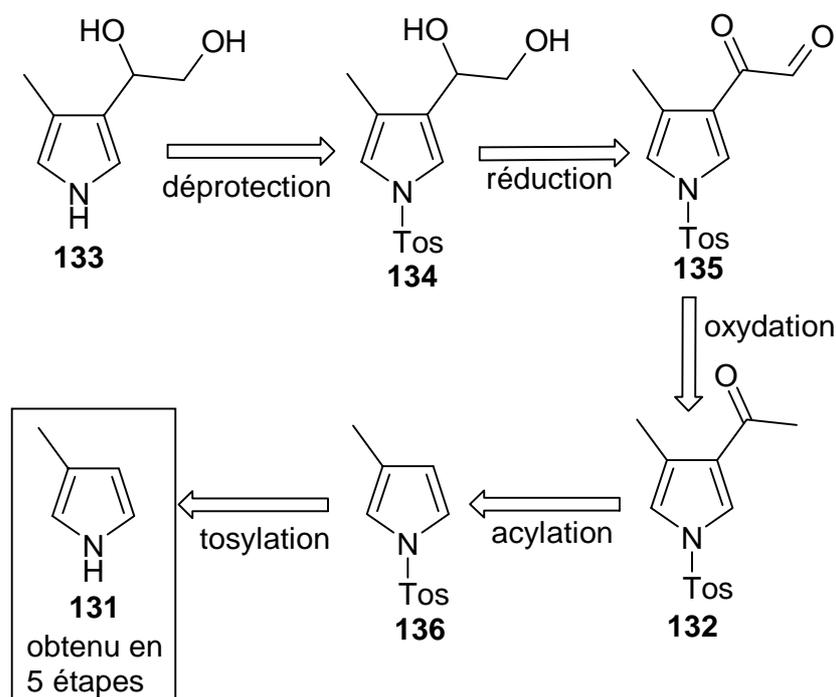
7.4.1. L'approche envisagée

L'approche envisagée se base sur deux composés importants : le 3-méthyl-1*H*-pyrrole (**131**) et le 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**). Une analyse rétrosynthétique tenant compte de ces deux composés-clés, a permis de mettre au

point une synthèse intéressante pour obtenir le pyrrole (**133**) possédant une fonction méthyle en position 4 et une fonction 1,2-dihydroxyéthyle en position 3 (*Schéma 7.11.*).

Le pyrrole (**133**) peut alors être synthétisé par hydrolyse de la fonction tosyle située en position 1 du produit **134**. La fonction 1,2-dihydroxy recherchée peut être obtenue par réduction du produit acquis par oxydation au moyen de SeO_2 de la fonction acétyle du pyrrole **132** (*Schéma 7.11.*). Le pyrrole acétylé est obtenu par acylation de Friedel-Crafts du 3-méthyl-1*H*-pyrrole tosylé (**136**). Une méthode en vue de synthétiser le 3-méthyl-1*H*-pyrrole est envisagée en 5 étapes, d'après une synthèse connue [162].

Schéma 7.11. : L'analyse rétrosynthétique en vue d'obtenir un pyrrole possédant une fonction méthyle en position 4 et une fonction 1,2-dihydroxyéthyle en position 3.



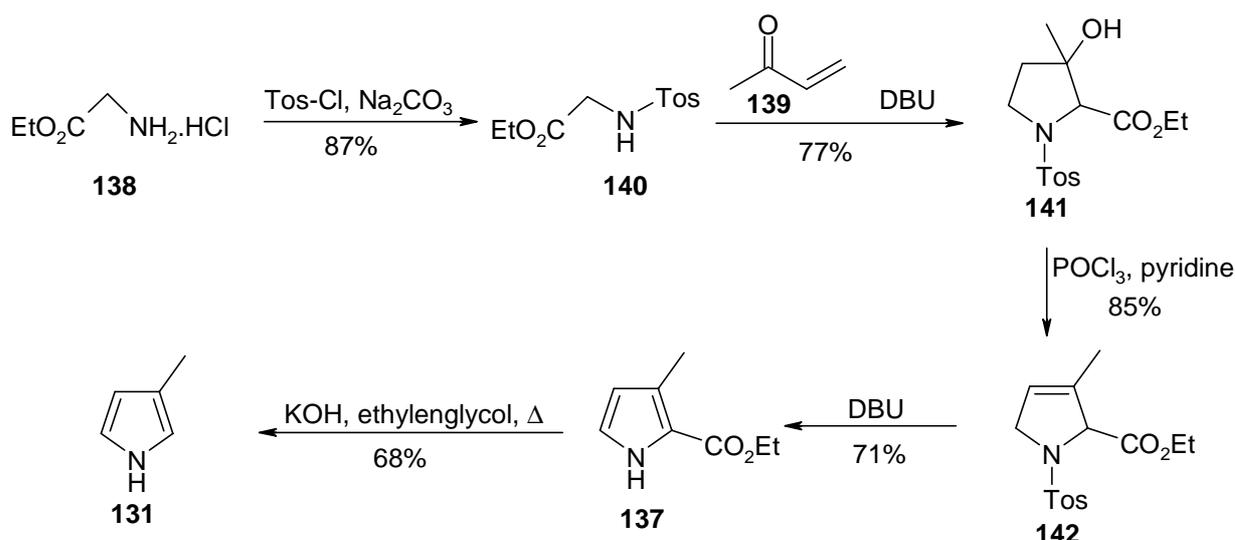
7.4.2. La synthèse du 3-méthyl-1*H*-pyrrole

Dans un premier temps, il faut mettre en œuvre une méthode simple et efficace pour synthétiser le 3-méthyl-1*H*-pyrrole (**131**) qui pourra être tosylé et acylé. L'approche envisagée en vue de recevoir ce composé simple passe par la décarboxylation du pyrrole **137** obtenu en 4 étapes à partir de glycinate d'éthyle **138** et de méthyl-vinyl-cétone **139** selon la méthode mise au point par Lash et Hoehner [162] (*Schéma 7.12.*). La synthèse commence par la tosylation du glycinate d'éthyle (**138**) afin de rendre la fonction amine du *N*-tosyl-glycinate d'éthyle (**140**) assez acide pour pouvoir effectuer l'addition de Michael avec la méthyl-vinyl-cétone (**139**) dans le but d'isoler l'hydroxy-pyrrolidine **141** correspondante. Le traitement de la pyrrolidine **141** avec l'oxychlorure de phosphore dans la pyridine comme solvant permet la déshydratation qui conduit à la 3-pyrroline **142**. Bien que la formation de la 2-pyrroline, l'autre isomère, soit possible, le spectre RMN proton a montré qu'il n'y avait qu'une très faible quantité de ce deuxième isomère qui s'était formée. La littérature donne deux explications à ce phénomène [162] :

- i) La première raison avancée par les auteurs est que la formation de la 3-pyrroline est favorisée car la gêne stérique entre le reste *N*-tosyl et le groupe ester est minimale dans ce cas, alors qu'elle serait plus élevée dans le cas de la 2-pyrroline.
- ii) La deuxième raison est que la tension de cycle est plus faible dans le cas de la 3-pyrroline.

Le traitement de la 3-pyrroline **142** avec le DBU induit l'élimination du *p*-toluènesulfinate, qui est directement suivi d'une tautomérie qui conduit au pyrrole **137**. La saponification et la décarboxylation de ce dernier, effectuées d'après un travail déjà accompli sur le 4-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate d'éthyle [163], fournit le 3-méthyle-1*H*-pyrrole (**131**) recherché (*Schéma 7.12.*). Les rendements de chacune de ces 5 étapes sont tous bons, voire excellents ; ils fournissent en effet un rendement global supérieur à 27% pour les 5 étapes. Lorsque l'on sait que le rendement d'une condensation de Knorr ne dépasse que rarement 50%, les résultats atteints ici sont plus que satisfaisants.

Schéma 7.12. : L'approche utilisée pour synthétiser le 3-méthyl-1*H*-pyrrole (**131**).



Maintenant que le 3-méthyl-1*H*-pyrrole est synthétisé, il faut observer si la tosylation et l'acylation de Friedel-Crafts peuvent être menées à bien.

7.4.3. La synthèse du 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole

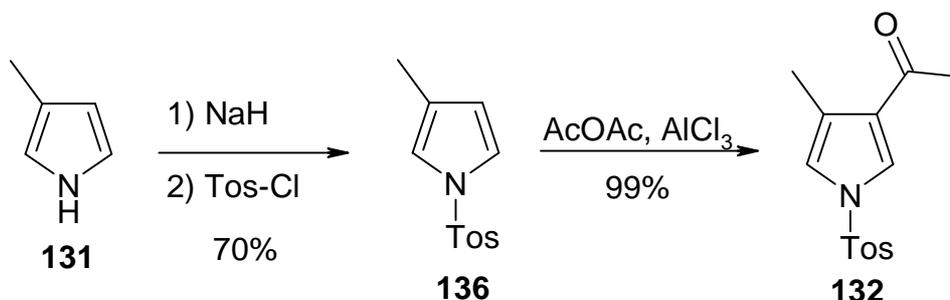
Afin de pouvoir tosyler le 3-méthyl-1*H*-pyrrole obtenu, il faut le déprotoner. Or la déprotonation du 1*H*-pyrrole peut se faire par catalyse de transfert de phase avec de bons rendements [164]. Cependant, le pyrrole utilisé ici possède un groupe méthyle qui rend le pyrrole légèrement moins acide, ce qui oblige l'utilisation d'hydrure de sodium comme base. Ce changement permet d'isoler le 3-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**136**) avec un rendement de 70% après purification.

L'étape clé est maintenant l'acylation de Friedel-Crafts. Un important travail effectué sur le 1-tosyl-pyrrole a montré que le produit de la réaction est acylé en position 3 si la réaction est effectuée en présence d' AlCl_3 comme catalyseur, alors qu'il est acylé en position 2 si le catalyseur utilisé est le $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ [161]. Seule une explication basée sur la gêne stérique due à la taille des acides de Lewis a été formulée dans le même travail [161].

Dans le cas qui nous intéresse ici, il s'agit d'observer si la régiosélectivité est toujours la même avec un pyrrole possédant un groupe méthyle légèrement donneur. Cette question est importante, parce que l'acylation effectuée par Anderson *et al.* sur le 3-

éthyl-1-phénylsulfonyl-pyrrole avec le trichlorure d'aluminium comme catalyseur a fourni le produit acylé en position 2 de manière fortement majoritaire [164]. Après avoir effectué la réaction de Friedel-Crafts avec l'anhydride acétique et le trichlorure d'aluminium sur le 3-méthyl-1-tosyl-pyrrole **136**, un seul produit a été détecté de manière quantitative. Les premières analyses RMN-¹H ont suggéré que le produit obtenu est bien celui désiré, à savoir le composé acylé en position 3, et non en position 2. Afin d'être absolument certain de ce résultat, une expérience RMN INADEQUATE a permis d'affirmer qu'il s'agit bien du produit attendu acylé en position 3. Le produit alors obtenu de manière quantitative est le 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**).

Schéma 7.13. : La formation du 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**).

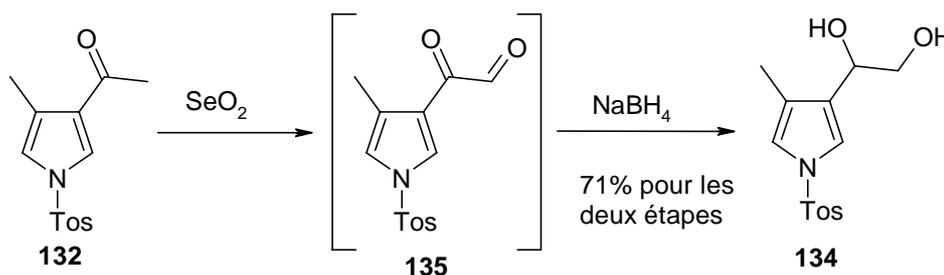


7.4.4. La fonctionnalisation de la position 3

La première réaction à réaliser pour obtenir la fonction 1,2-dihydroxyéthyle désirée est l'oxydation du groupe acétyle de la position 3 avec le dioxyde de sélénium. Une telle réaction a déjà été effectuée en position 3 d'un pyrrole [165].

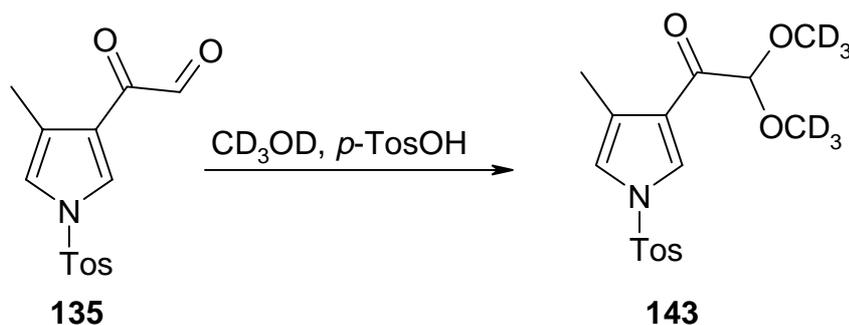
En répétant la méthode utilisée par Fuji *et al.*, il a été possible d'atteindre directement le composé 3-(1,2-dihydroxyéthyle) recherché avec un rendement de 71% (Schéma 7.14.).

Schéma 7.14. : L'oxydation au moyen de SeO₂, suivie de la réduction au NaBH₄



Il est intéressant de noter que le produit intermédiaire de cette réaction a été isolé. Cependant, sa caractérisation au moyen des spectroscopies RMN et de masse ont été difficiles à effectuer et à interpréter. Tout d'abord, le proton aldéhydique attendu montrait un signal dont l'intégrale était bien trop faible, et dont les autres signaux étaient dédoublés et mal résolus. En ajoutant alors dans le tube RMN du méthanol deutéré et une petite pointe de spatule d'acide *p*-toluène-sulfonique, on forme l'acétal. Ainsi, le signal du proton aldéhydique disparaît et une nouvelle résonance apparaît à 5.2 ppm indiquant la formation d'un acétal. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse de l'acétal formé dans le tube RMN a montré qu'il s'agissait bien de l'acétal attendu (*Figure 7.15.*).

Schéma 7.15. : Formation d'un acétal afin de caractériser le produit intermédiaire recherché.



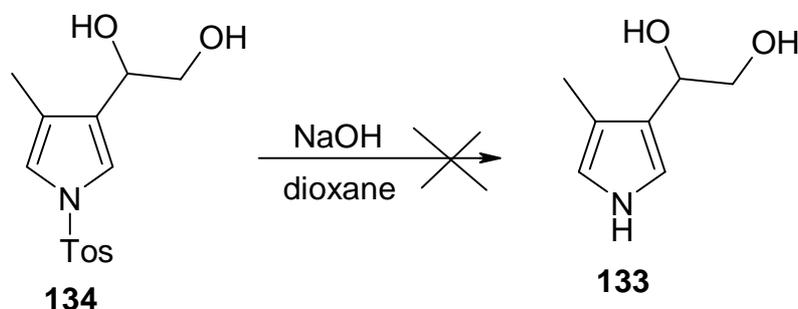
Le pyrrole possédant un groupe méthyle en position 4 et une fonction 1,2-dihydroxyéthyle en position 3 a ainsi pu être synthétisé. Pour obtenir le maléimide **101** tant convoité, il suffit d'enlever la fonction tosyle du pyrrole obtenu et d'oxyder le pyrrole qui en résulte avec l'acide chromique.

7.4.5. L'élimination de la fonction tosyle

La méthode la plus utilisée pour enlever une fonction tosyle est la saponification [157,161,164]. En appliquant cette méthode au pyrrole **134** obtenu, il n'a pas été

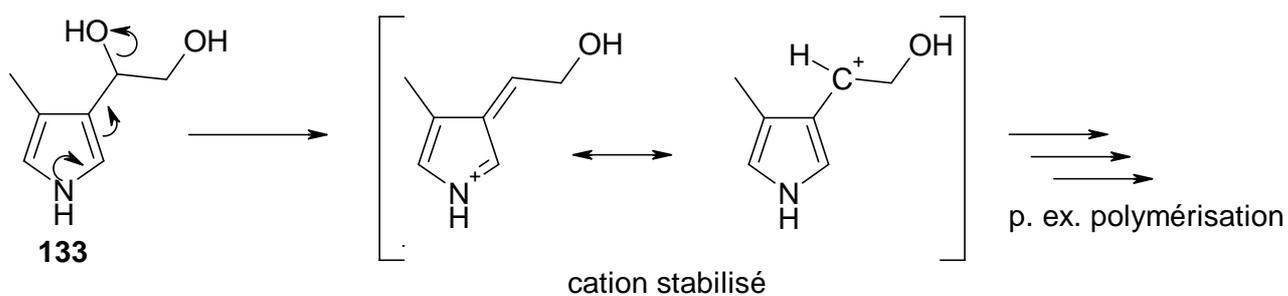
possible d'isoler le pyrrole libre en position 1, et possédant les fonctions méthyle et 1,2-dihydroxyéthyle désirées **133** (Schéma 7.16.).

Schéma 7.16. : Tentative de saponification du pyrrole **134**.

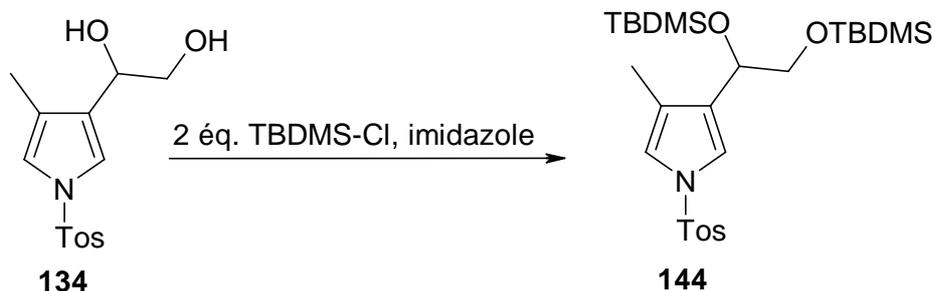


L'explication que l'on peut alors donner pour une telle observation est le fait que le doublet d'électrons de l'azote du pyrrole libre en position 1 provoque une assistance anchimérique permettant l'élimination de groupe HO⁻ et livrant un cation stabilisé (cation pseudo-benzylique) qui peut réagir de plusieurs manières (p. ex. polymérisation) pour fournir de nombreux produits (Schéma 7.17.).

Schéma 7.17. : Mécanisme possible d'une réaction secondaire empêchant l'isolation du composé désiré.

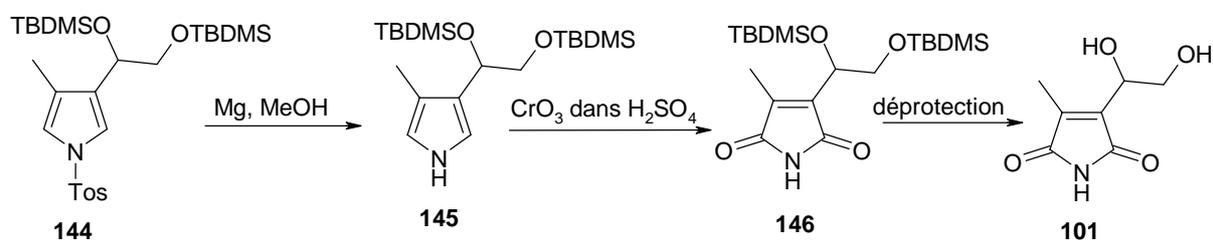


La solution alors préconisée est la protection des deux fonctions -OH avec le chlorure de *tert*-butyl-diméthyl-silyle. Cette réaction, effectuée en présence d'imidazole, a fourni le produit doublement protégé avec un très bon rendement de 87% après purification sur colonne (Schéma 7.18.).

Schéma 7.18. : Protection des 2 fonctions alcool.

7.4.6. Proposition pour terminer la synthèse jusqu'au 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**)

Même si ce projet n'a pas pu être terminé, il semble possible de pouvoir synthétiser le maléimide **101** en poursuivant dans la même voie. En effet, le produit avec les fonctions alcools protégées **144** devrait pouvoir être détosylé. Le clivage de la fonction tosyl ne doit pas être effectué dans les conditions basiques déjà essayées à l'étape précédente, car la protection des alcools ne résiste pas à de telles conditions basiques. Il serait alors plus judicieux d'utiliser ici une déprotection réductrice avec le magnésium métallique dans le méthanol. Une oxydation subséquente au moyen de l'acide chromique devrait fournir le maléimide protégé, qui peut être déprotégé avec un sel de fluorure pour aboutir finalement au maléimide **101** tant attendu (*Schéma 7.19.*).

Schéma 7.19. : Proposition pour terminer la synthèse du maléimide **101**.

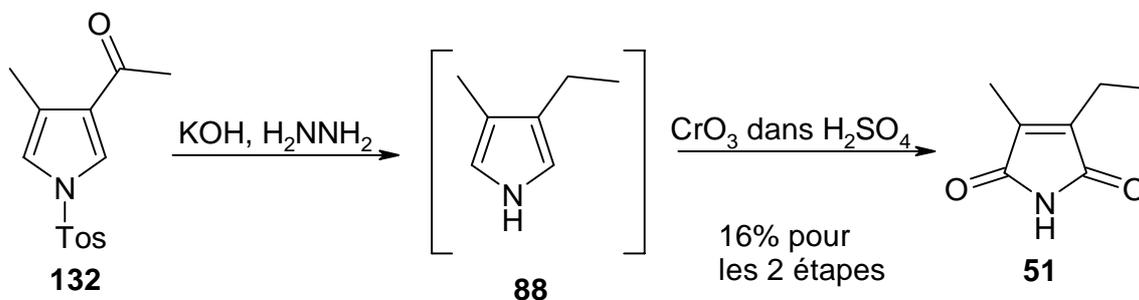
7.5. La mise en évidence du potentiel de synthèse que permet cette approche

Malgré qu'il n'a pas été possible de compléter la synthèse du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**) à partir de cette méthode, il est possible de montrer que l'approche utilisée ici permet de synthétiser plusieurs molécules d'un intérêt tout particulier dans la chimie des pyrroles et des maléimides dissymétriquement substitués.

7.5.1. La synthèse du 3-éthyl-4-méthyl-maléimide

D'après la littérature déjà consultée, il est aisé de transformer le 3-acétyl-1-tosyl-pyrrole en 3-éthyl-1*H*-pyrrole en une seule étape [164]. L'application de cette méthode au 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**) va permettre de le transformer en 3-éthyl-4-méthyl-1*H*-pyrrole (**88**) (composé non isolé), qui peut facilement être oxydé en 3-éthyl-4-méthyl-maléimide (**51**) (*Schéma 7.20.*).

Schéma 7.20. : La formation du 3-éthyl-4-méthyl-maléimide (**51**).

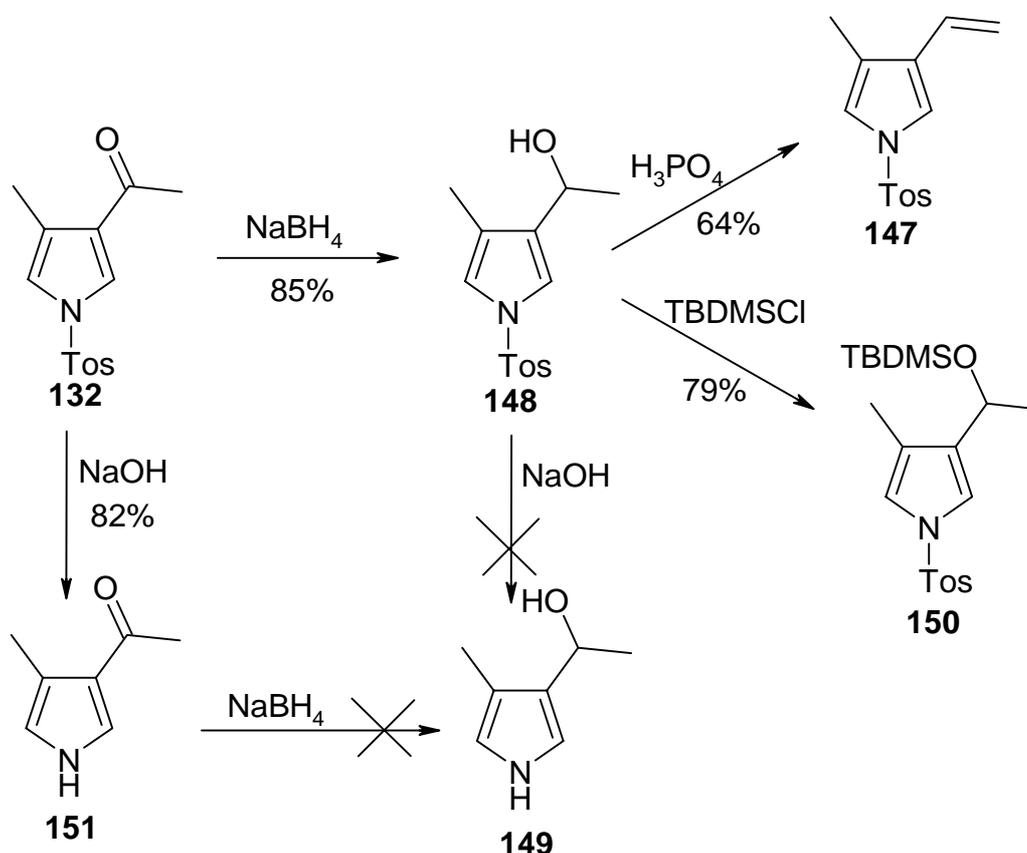


La conversion du pyrrole **141** en 3-éthyl-4-méthyl-pyrrole par une réaction de Wolff-Kishner permet non seulement la réduction de la fonction acétyle en éthyle, mais également l'hydrolyse du groupe tosyl. La deuxième étape, qui consiste à oxyder le pyrrole en maléimide, est également une réaction souvent utilisée pour obtenir ce genre de composé, et le rendement est connu pour être très bas. Le fait d'atteindre un rendement de 16% pour les deux étapes constitue un bon résultat.

7.5.2. La synthèse du 3-vinyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole, du 3-acétyl-4-méthyl-1*H*-pyrrole et du 3-(1-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole

Le 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**) obtenu devrait aussi permettre la synthèse du 3-vinyl-4-méthyl-maléimide (**50**). En effet, en réduisant la fonction acétyle avec le NaBH_4 il a été possible d'isoler avec un rendement de 85% le 3-(1-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**148**), et de transformer cette fonction 1-hydroxyéthyle en groupe vinyle par une élimination-1,2 à l'aide d'acide phosphorique. Cette nouvelle transformation, inspirée du travail de Xiao et Ketcha [158], a permis d'isoler le 4-méthyl-1-tosyl-3-vinyl-pyrrole (**147**) avec un rendement d'élimination de 64%, et permet d'envisager par la suite la synthèse du maléimide correspondant, le 4-méthyl-3-vinyl-maléimide (**50**) (Schéma 7.21.). De plus amples essais n'ont pas été tentés, parce que le composé **147** n'a pas été suffisamment stable pour être réutilisé après les mesures RMN effectuées.

Schéma 7.21. : La synthèse de pyrroles importants.



Il faut cependant noter que l'isolation du pyrrole résultant du clivage du groupe tosyle du pyrrole **148** pour fournir le 3-(1-hydroxyéthyle)-4-méthyl-1*H*-pyrrole (**149**) n'a pas été possible. La raison est vraisemblablement la même que pour le composé dihydroxylé (*Schéma 7.17.*). Ainsi, la protection de la fonction alcool avec le TBDMSCI effectuée dans les mêmes conditions que pour le diol-pyrrole **134** fournit le pyrrole protégé **150** (*Schéma 7.21.*). Il doit ensuite être possible de supprimer le groupe tosyle pour obtenir le pyrrole libre en position 1 qui peut entrer dans la synthèse des bactériochlorophylles *c* et *d*.

La synthèse du 3-acétyl-4-méthyl-1*H*-pyrrole (**151**), important pyrrole entrant dans la synthèse des bactériochlorophylles *a* et *b*, a été effectuée en enlevant le groupe tosyle du 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**) par hydrolyse basique avec un rendement de 82% (*Schéma 7.21.*).

7.6. La conclusion concernant la synthèse des maléimides et des pyrroles

Dans un premier temps, la synthèse des 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**) et 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**) a été possible. Si l'on tient compte que le 1^{er} but était de confirmer les analyses spectroscopiques, on peut affirmer que les buts sont atteints. Mais le fait de n'avoir pas pu synthétiser ces maléimides en quantité plus grande (de l'ordre du gramme) montre que ce genre de composé n'est pas si évident à atteindre.

Cependant, tout le travail de synthèse fourni ici a permis d'élaborer de nouvelles molécules dont l'intérêt est grand, puisque celles-ci découlent toutes de dérivés de pigments tétrapyrroliques comme les chlorophylles et les bactériochlorophylles. En effet, il serait alors possible d'appliquer les méthodes synthétiques utilisées ici pour élaborer des pyrroles entrant dans la synthèse de catabolites connus ou inconnus afin de permettre des études mécanistiques poussées de la dégradation de la chlorophylle.

Les composés obtenus permettent une grande panoplie de fonctionnalisations sur les positions 3 et 4, tout en conservant les positions 2 et 5 libres.

Partie expérimentale

8. Les considérations générales

8.1. Les produits chimiques

Les produits chimiques proviennent des firmes Fluka Chemie AG (Suisse), Aldrich-Chemie GmbH (Allemagne) et Merck AG (Allemagne).

Les graines d'orge *Hordeum vulgare* sont un cadeau de la firme Florimond Desprez, Capelle-en-Pévèle, 59242 Templeuve (France).

Les feuilles jaunes ont été cueillies en automne 1996 sur les branches du *Magnolia hybridosa speciosa* cultivé naturellement au jardin botanique de Fribourg (Suisse).

L'eau deutérée à 80% provient de la firme Armar AG (Suisse).

La CCM est effectuée sur des plaques d'aluminium recouvertes de 0.2 mm de gel de silice 60 F₂₅₄ de la firme Merck.

La chromatographie sur couche épaisse (CCE) est réalisée sur des plaques de verre (20 cm*20 cm) recouvertes s'environ 1.32 mm de gel de silice 60 PF₂₅₄₊₃₆₆.

Les chromatographies sur colonne sont effectuées avec du gel de silice 60 de granulométrie 0.040-0.063 mm de la firme Merck.

Les cartouches RP-18 pour concentrer les solution de catabolite sont du type Sep-Pak[®] Vac 35CC (10 g) C18 Cartridges Pat. No. WAT 043345 de la firme Waters. Les mêmes cartouches de taille plus réduite Sep-Pak[®] C18 Cartridges Pat. No. WAT 051910 de la firme Waters sont également utilisée pour concentrer des volumes plus restreints.

Pour les colonnes à exclusion de masse un gel de marque TOYOPEARL[®] intitulé : column packing for fast flow chromatography HW-40F (taille des particules 40 microns) est utilisé.

8.2. Les procédures générales

Tous les solvants utilisés sont distillés. Si nécessaire, ils sont séchés et distillés selon les procédures décrites dans l'Organikum [166].

L'ouate dégraissée est obtenue par extraction avec du dichlorométhane en continu, durant 70 h, de l'ouate de pansement.

A la fin d'une CCE ou d'une CCM sur les plaques de silice 20 cm*20 cm, et après prélèvement de la bande désirée, le produit est extrait du gel de silice au moyen de méthanol. On évapore le solvant et on redissout le composé dans CH₂Cl₂ ou dans un mélange CH₂Cl₂ :MeOH. La solution est filtrée sur de l'ouate dégraissée. Le solvant est évaporé. Cette procédure permet d'éliminer les traces de gel de silice.

La révélation des CCM avec le réactif d'Ehrlich s'effectue en sprayant la couche mince avec une solution composée de 1.5 g de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde et 150 ml d'acide chlorhydrique demi-concentré. La CCM est chauffée si nécessaire.

La révélation des CCM avec une solution de benzidine s'effectue en plaçant la CCM durant une minute dans une chambre à Cl₂. Ce dernier est généré en mélangeant 50 ml d'HCl demi-concentré et 10 ml d'une solution aqueuse de KMnO₄ 10%. La CCM est ensuite sprayée avec une solution de benzidine qui est préparée en dissolvant 300 mg de benzidine et quelques cristaux d'iode dans 100 ml de mélange eau :méthanol (1 :1)(v/v). La CCM est chauffée si nécessaire.

8.3. Les appareils de mesure

Les spectres RMN-¹H 360.13 MHz sont mesurés avec un spectromètre Brucker AM-360 équipé d'un ordinateur Aspect 3000. Les spectres RMN-¹H 500.13 MHz et RMN-¹³C à 125.76 MHz sont mesurés par M. F. Fehr sur un spectromètre Brucker Avance DRX-500. Les spectres RMN-¹H à 200 MHz et RMN-¹³C à 50.3 MHz sont mesurés avec un spectromètre Varian Gemini 200. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au TMS (tétraméthylsilane) ou au solvant deutéré

utilisé. Les constantes de couplage (J) sont données en hertz (Hz). Les multiplicités des signaux sont indiquées par les symboles s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet) et $s br$ (large singulet).

Les spectres UV/vis sont mesurés dans une cuvette en quartz de 1 cm de longueur avec un spectromètre à rangées de diodes Hewlett Packard 8452A. Les longueurs d'onde sont exprimées en nm .

Les spectres infrarouges (IR) sont effectués avec un spectrophotomètre FT-IR Mattson 5000 Unicam. Les échantillons sont mesurés sous forme de pastilles de KBr ou d'un film placé entre deux fenêtres de KBr. Les bandes sont données en cm^{-1} et les abréviations suivantes sont utilisées : w (faible), m (moyen), s (fort), v (très fort).

Les spectres de dichroïsme circulaire (CD) sont mesurés dans une cuvette en quartz de 1 cm de longueur avec un spectromètre Auto-Dichrograph Mark V de la firme Jobin Yvon. Les longueurs d'onde et $\Delta\epsilon$ sont exprimés respectivement en nm et en $l \cdot mole^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Les spectres de masse (SM) et de masse à haute résolution (SM-HR) sont mesurés par Mme I. Müller et M. F. Nydegger sur un spectromètre Vacum Generators Micromass VG 7070 E équipé d'un ordinateur DS 11-250. Le procédé d'ionisation FAB (Fast Atom Bombardment), mesuré en mode positif, utilise une tension d'accélération de 6 kV et un bombardement de xénon (7 kV, 1 mA). Dans le cas d'une mesure en mode EI, l'énergie d'ionisation est de 70 eV, alors qu'en mode CI l'utilisation de CH_4 est requise. Les intensités relatives sont notées entre parenthèses.

Les mesures en mode ESI (electrospray) sont effectuées par M. F. Nydegger avec un spectromètre Bruker FTMS 4.7T BioAPEXII.

L'HPLC utilisé est constitué d'un système HPLC Kontron System 450 équipé d'un détecteur DAD Kontron 440. Les 3 pompes montées sur l'appareil sont du type Kontron 414, et l'ordinateur couplé pour commander tout le système est du type DEC (digital) PC LP $\alpha 466d_2$. Les colonnes utilisées proviennent de la firme Macherey-

Nagel et sont du type Nucléosil 100-5C₁₈ avec un grosseur de particule de 5 micron, une longueur de 250 mm et un diamètre de 4 mm. La précolonne est de type CC 8/4 Nucleosil 100-5C₁₈. Les solvants sont de qualité Chromosolv[®], Riedel-de-Haen.

Le système MPLC est constitué d'une pompe duramat CFG Pro Minent équipée d'une colonne RP-18 Lobar LiChrorep[®] RP-18 de grandeur B (310-25) Art. 10625 de la firme Merck.

Les points de fusion sont mesurés à l'aide d'un microscope à platine chauffante Thermovar, de la firme Reichert AG à Vienne, équipé d'un thermomètre digital Doric Trendicator 400A.

8.4. Les différents petits appareils

Les centrifugations sont réalisées avec une centrifugeuse Sorvall[®] RC 5C Plus de la firme DuPont.

Un mixeur Waring Blendor Model 32BL79 est utilisé pour l'extraction des feuilles d'orge.

Pour la chromatographie par exclusion de masse, un système de pompe péristaltique couplé à un récolteur de fraction de marque BIO-RAD est utilisé. Les fractions sont analysées avec un spectrophotomètre de type LDC Analytical SM4000.

9. L'isolation d'un nouveau catabolite dans les feuilles de magnolia

9.1. Préparation d'une solution non concentrée en catabolite

Une solution aqueuse homogène est obtenue par broyage de feuilles de magnolia (150 g) avec 750 ml de tampon de désintégration constitué de phosphate de sodium 0.1 M (pH=6.8), de MeOH et d'acétone (1 :1 :1 (v/v)). Après filtration au moyen de fins morceaux de coton (gaze), centrifugation durant 10 minutes à 8000 t/min et évaporation de l'acétone et du méthanol, on obtient une solution contenant le catabolite et les restes de chlorophylle. Ceux-ci sont enlevés par extraction au dichlorométhane, livrant alors 250 ml d'une solution aqueuse non concentrée en catabolite et exempte de chlorophylle.

9.2. Test d'oxydation en phase aqueuse

Afin de tester si cette solution contient un catabolite (composé tétrapyrrolique), 200 μ l sont prélevés et placés dans un tube Eppendorf[®] de 1 ml. 200 μ l d'acide chromique 1% dans H₂SO₄ 2 N y sont ajoutés. Après une agitation suivie de 5 minutes de réaction, 200 μ l d'éther diéthylique sont utilisés pour extraire les éventuels maléimides obtenus. La phase organique est portée sur une CCM au moyen de plusieurs pipettes capillaires, et la plaque chromatographique est éluée (mélange : CH₂Cl₂ :AcOEt :EtOH :AcOH (50 :10 :5 :0.5) (v/v)). Les maléimides formés sont par la suite mis en évidence par le système chlore/benzidine déjà utilisé [98; 105]. Pour ce faire, on place la CCM durant 1 minute dans une chambre de Cl₂ où ce dernier est généré en mélangeant une solution de KMnO₄ 1% et d'HCl demi-concentré. La CCM est finalement sprayée sous très forte ventilation avec un solution constituée de 300 mg de benzidine, quelques cristaux d'iode et 100 ml d'un mélange eau :méthanol 1 :1 (v/v). La présence de spots bleus indique la position des maléimides.

9.3. Concentration de la solution de catabolite

Pour concentrer 250 ml de solution de catabolite, on fait passer la phase aqueuse à travers une cartouche RP-18 préalablement équilibrée avec 50 ml de tampon phosphate de sodium 0.1 M (pH=6.8). Le produit reste pris dans la cartouche lui conférant une couleur brun foncé. On élue ensuite le produit avec 50-70 ml de mélange constitué de tampon phosphate de sodium 0.1 M (pH=6.8) et d'acétone (1 :1 (v/v)), livrant après évaporation de l'acétone une solution concentrée en catabolite (25-35 ml). Un test d'oxydation effectué en prélevant 200 µl de cette solution concentrée montre que les maléimides sont présents en concentration plus élevée.

9.4. Première chromatographie liquide à moyenne performance (MPLC)

La colonne est équilibrée avec un éluant constitué de 70% de tampon phosphate de sodium 0.1 M à pH=6.8 et 30% d'acétone. A l'aide d'un injecteur, on dépose au sommet de la colonne 15 ml du mélange concentré en catabolite, puis on élue le système jusqu'à ce que la première bande foncée de produit soit entièrement sortie de la colonne en prenant garde à ce que la pression ne dépasse pas 6 bar. Après quoi, l'éluant est changé, et la chromatographie est reprise avec un mélange 58% de tampon phosphate 0.1 M (pH=6.8) et 42% d'acétone. Ce nouvel éluant fournit des fractions de 10 ml de couleur jaune ; Chacune d'entre elles est analysée au moyen du test d'oxydation en phase aqueuse afin de définir lesquelles contiennent le catabolite. Toutes les fractions positives sont rassemblées. Cette solution est à nouveau concentrée sur cartouche afin de travailler avec des volumes minimums.

9.5. Analyse qualitative par chromatographie à haute performance (HPLC) des fractions récoltées

Une injection de 50 µl d'une fraction est effectuée dans l'HPLC.

Colonne analytique : 4.0 mm x 250 mm.

Matériel de remplissage : RP-100-5C₁₈ Nucleosil.

Gradient : - 6 minutes isocratique 25% acétonitrile et 75% H₂O.

- en 10 minutes, l'éluant passe de 25% acétonitrile et 75% H₂O à un mélange 60% acétonitrile et 40% H₂O.

- en 14 minutes, l'éluant passe de 60% acétonitrile et 40% H₂O à un mélange 65% acétonitrile et 35% H₂O.

Flux d'élution : 1.0 ml/min.

Détection UV/vis : 320 nm.

Temps de rétention du catabolite : 11.3 min.

9.6. Chromatographie par exclusion de masse

On utilise une colonne de 16 cm de long et de 10 mm de diamètre. Le gel, de marque Toyopearl[®], est suspendu dans un tampon TRIS 50 mM à pH=6.8. Ce tampon sera aussi utilisé comme éluant. On injecte 5 ml du concentrat obtenu après chromatographie MPLC. La détection se fait à 320 nm avec un spectrophotomètre et 3 fractions légèrement colorées sont récoltées. Un test d'oxydation effectué sur chacune d'elles a permis d'établir que la deuxième contient le catabolite recherché. Sa pureté est déterminée par HPLC.

9.7. deuxième chromatographie liquide à moyenne performance (MPLC)

Une deuxième MPLC est effectuée avec le même appareillage que pour la première, en injectant le même volume (15 ml) de concentrat, mais en utilisant un éluant légèrement différent, à savoir 60% de tampon phosphate 0.1 M à pH=6.8 et 40% d'acétone. Seule la partie centrale de la fraction jaune récoltée montre un test d'oxydation positif, et l'analyse de la pureté par HPLC montre un chromatogramme satisfaisant pour les mesures spectroscopiques.

9.8. Le dessalage et la lyophilisation

Pour dessaler un échantillon, on place la substance sur une cartouche, on lave la cartouche et son contenu avec de l'eau déminéralisée, puis on élue la substance avec un mélange eau :acétone (1 :1 (v/v)). L'acétone est évaporée et la substance est lyophilisée. On obtient 4 mg d'une substance incolore (à partir de 150 g de feuilles).

9.9. Les tentatives de clivage des sucres au moyen de β -glycosidase

1 ml de la solution concentrée obtenue en 9.7. est placé dans un ballon avec 5 ml de tampon phosphate 0.1 M pH=6.8, auxquels sont ajoutés 10 mg de β -glycosidase d'amande. La solution est incubée durant une nuit à 37°C, puis filtrée sur un filtre millipore approprié pour l'HPLC, et la solution est analysée par HPLC.

10. L'isolation des maléimides naturels marqués et non-marqués

10.1. La culture de l'orge (*Hordeum vulgare*)

Les graines d'orge (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) sont semées très serrées (5 graines/cm²) dans 2 bacs à fleurs (14 cm-55 cm) contenant du terreau acheté dans un centre commercial de la région. Les bacs sont placés sur un bord de fenêtre afin d'avoir une luminosité naturelle pendant 7 à 10 jours, jusqu'à ce que les pousses atteignent 10-15 cm.

10.2. La sénescence de la chlorophylle contenue dans les feuilles d'orge

La procédure de sénescence est similaire à celle décrite par Kräutler *et al.* [167] mais avec les changements suivants : les bacs contenant les pousses d'orge sont placés dans l'obscurité à 25°C pour une durée de 12 heures afin de stopper la biosynthèse de la chlorophylle.

Les jeunes feuilles (10-15 cm) sont coupées à la base et des portions de 100 g poids mouillé (12 g masse après lyophilisation) sont placées dans des bechers de 1 l en position « debout », c'est-à-dire la base fraîchement coupée vers le fond du récipient. Le fond de chaque récipient est recouvert de 100 ml d'eau (ou de D₂O 80% dans le cas de l'expérience de marquage). Le haut des récipients est recouvert d'une feuille d'aluminium percée afin de permettre les échanges d'air. Les feuilles ainsi préparées sont placées dans une chambre noire à 25°C durant 7-8 jours. Lorsque la belle coloration verte a cédé sa place à un ton jaune-vert, les feuilles sont placées au congélateur jusqu'à leur prochain usage.

10.3. La détermination de la composition en deutérium de l'eau contenue dans le fond des récipients

Lors de l'expérience de marquage, les feuilles sont plongées dans de l'eau deutérée à 80%. Ce taux de deutérium est analysé durant toute la période de sénescence au moyen de la RMN-¹H standard (360.13 MHz). Pour ce faire, un tube RMN de qualité 5 UP ainsi qu'un tube capillaire d'acétone scellé sont utilisés. On mesure dans un premier temps de l'eau non deutérée en présence du capillaire. On calcule la valeur de intégrale pour l'acétone, en définissant celle de l'eau à 100% H₂O (0% D₂O). Ceci permet de connaître la valeur de l'intégrale de l'acétone utilisée dans le capillaire, et de réutiliser cette valeur pour déterminer le contenu en D₂O des autres échantillons inconnus. Puis, les autres mesures sont effectuées avec le même capillaire d'acétone, permettant ainsi de déterminer le taux de deutérium contenu dans l'eau. Il est important pour cette mesure de prendre un temps de relaxation de 60 s, afin d'obtenir des valeurs les plus précises possible pour les intégrales.

10.4. Le suivi de la disparition de la chlorophylle dans les feuilles durant la sénescence

Pour quantifier le catabolite formé, il faut observer la diminution des chlorophylles *a* et *b* au moyen de l'HPLC.

a) dans un premier temps, il faut extraire les chlorophylles des feuilles. Pour cela, quelques (5-10 pièces) feuilles d'orge sont placées dans un mortier, et de l'azote liquide est versée. Les feuilles sont alors finement broyées avec le pistil de manière à obtenir une fine poudre. Du méthanol est ensuite versé sur la poudre obtenue et la suspension est filtrée. Les petits morceaux de feuilles sont rincés au méthanol jusqu'à ce que les résidus sont incolores. La solution verte obtenue est concentrée jusqu'à un volume d'environ 2 ml.

b) Une injection de 50 µl de la solution verte obtenue est effectuée dans l'HPLC.

Colonne analytique : 4.0 mm x 250 mm.

Matériel de remplissage : RP-100-5C₁₈ Nucleosil.

Gradient :	- débuter avec le mélange 56% acétonitrile, 19% MeOH, 25% H ₂ O. - en 20 minutes l'éluant passe de 56% acétonitrile, 19% MeOH et 25% H ₂ O à un mélange 75% acétonitrile, 25% MeOH et 0% H ₂ O. - isocratique durant 30 minutes avec 75% d'acétonitrile, 25% de MeOH et 0% d'H ₂ O.
Flux d'élution :	1.0 ml/min.
Détection UV/vis :	canal 3 : 430 nm canal 4 : 460 nm
Temps de rétention :	chl <i>a</i> : 41 min. (canal 3) chl <i>b</i> : 26 min. (canal 4)

Afin de quantifier la chlorophylle, les carotènes (temps de rétention : 36 minutes) sont utilisés comme standard interne, car ils ne sont pas dégradés, alors que les chlorophylles le sont.

10.5. L'isolation du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (102) à partir des feuilles d'orge jaunies

150 g (poids mouillé) de feuilles d'orge (*Hordeum vulgare*) jaunies sont homogénéisés au moyen d'un mixeur en présence de 300 ml de tampon de désintégration constitué de tampon phosphate de sodium 0.1 M pH=6.8, de méthanol et d'acétone dans les proportions 1 :1 :1 (v/v). La suspension obtenue est filtrée au travers d'un double tissu en coton (gaze). Le résidu solide est repris dans la même quantité de tampon de désintégration et homogénéisé une seconde fois. On filtre à nouveau sur un coton et le résidu solide est jeté. Les filtrats sont récoltés et centrifugés à 8000 t/min durant 10 minutes. Les culots sont jetés et le surnageant est extrait avec 2 x 400 ml de dichlorométhane. Après séparation, la phase aqueuse est évaporée afin d'éliminer les restes de solvants organiques. La solution restante (env. 200 ml) est concentrée sur une cartouche RP-18. La cartouche est lavée avec 50 ml de tampon phosphate 0.1 M et le produit est élué avec 120 ml de mélange

tampon phosphate 0.1 M pH=6.8 et acétone (1 :1 (v/v)). Un test d'oxydation en phase aqueuse permet de s'assurer que le catabolite est bien présent en solution. Une fois l'acétone éliminée, une solution brune de catabolite (60 ml) est obtenue. Cette dernière est soumise à une dégradation chimique en la versant dans 60 ml d'une solution constituée de CrO₃ 1% dans H₂SO₄ 2N, et en agitant ce mélange durant 5 minutes. Le milieu réactionnel est extrait en continu avec du diéthyléther durant la nuit. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, et le solvant est évaporé jusqu'à ce qu'il reste environ 5-10 ml de solvant. Le résidu est ensuite appliqué sur 4 plaques CCM (20 cm x 20 cm). Les plaques sont développées dans l'éluant constitué de CH₂Cl₂ :AcOEt :EtOH :AcOH (50 :10 :5 :0.5 (v/v)). La bande contenant le produit désiré est découpée et le produit est extrait selon la procédure générale décrite au point 8.1.2.. Une deuxième purification au moyen d'un chromatographie sur micro-colonne (\varnothing = 4 mm, l= 10 cm), remplie avec du gel de silice comme phase stationnaire et un mélange dichlorométhane :acétone (8 :2 (v/v)) comme éluant, a permis d'isoler 1.7 mg de 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**) pur.

Point de fusion : 104-109°C.

CCM : R_f=0.27 (gel de silice, CH₂Cl₂ : acétone (8 :2 (v/v)), chlore/benzidine).

RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 2.01 (*t*, $J=0.9$ Hz, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.67 (*tq*, $J_1=6.1$ Hz, $J_2=0.9$ Hz, 2H, H₂C(3¹)) ; 3.82 (*t*, $J=6.1$ Hz, 2H, H₂C(3²)) ; 7.17 (*s br*, 1H, NH).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ (CDCl₃)) : 8.82 (C(4¹)) ; 27.53 (C(3¹)) ; 60.54 (C(3²)) ; 139.29, 140.49 (C(4)+C(3)) ; 171.25, 171.96 (2xC=O).

SM (Cl, *iso*-butane) : 156 ([MH]⁺, 100%), 138 (58%), 125 (6%).

IR (KBr) : 3398 (v), 1712 (v), 1360 (s), 1437 (s), 1086 (s), 1041 (s), 738 (s).

Le composé deutéré (**102a**) a été isolé de la même manière que le composé non marqué. Les différences observées pour les analyses expérimentales RMN-¹H, -²H et SM sont largement discutées dans la partie *résultats et discussion*.

10.6. L'isolation du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (101) à partir des feuilles d'orge jaunies

Le procédé d'isolation du maléimide **101** est identique à celui du composé **102**. Après la séparation effectuée sur les 4 plaques CCM (20 cm x 20 cm), une chromatographie sur micro-colonne ($\varnothing = 4$ mm, $l = 10$ cm, gel de silice comme phase stationnaire) avec l'éluant constitué de CH_2Cl_2 : AcOEt : EtOH (10 : 2 : 1 (v/v)) est entreprise. Cette purification permet d'isoler 1.4 mg de 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**) sous la forme d'une huile qui ne cristallise pas.

CCM : $R_f = 0.16$ (gel de silice, CH_2Cl_2 : AcOEt : EtOH (10 : 2 : 1 (v/v)), chlore/benzidine).

RMN-¹H : (500.13 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{CD}_3\text{OD})$) : 2.06 (*d*, $J = 0.84$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{C}(4^1)$) ; 3.69 (*ABX*, $J_{AB} = 11.62$ Hz, $J_{AX} = 6.14$ Hz, 1H, $\text{H}_A\text{C}(3^2)$) ; 3.73 (*ABX*, $J_{AB} = 11.62$ Hz, $J_{BX} = 4.89$ Hz, 1H, $\text{H}_B\text{C}(3^2)$) ; 4.67 (*ABX*, $J_{AX} = 6.14$ Hz, $J_{BX} = 4.89$ Hz, $J_3 = 0.84$ Hz, 1H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$) ; 7.17 (*s br*, 1H, NH).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{CD}_3\text{OD})$) : 7.41 ($\text{C}(4^1)$) ; 64.20 ($\text{C}(3^2)$) ; 67.13 ($\text{C}(3^1)$) ; 138.79, 140.47 ($\text{C}(4) + \text{C}(3)$) ; 172.29, 172.96 ($2 \times \text{C}=\text{O}$).

SM (Cl , CH_4) : 172 ($[\text{MH}]^+$, 5%), 154 (11%), 138 (6%), 112 (7%).

10.7. L'isolation de l'imide de l'acide hématinique (53a) à partir des feuilles d'orge jaunies

Le procédé d'isolation du maléimide **53a** est identique à celui des composés **102** et **103**. Après la séparation effectuée sur les 4 plaques CCM (20 cm x 20 cm), une chromatographie sur micro-colonne ($\varnothing = 4$ mm, $l = 13$ cm, gel de silice comme phase stationnaire) avec l'éluant constitué de CH_2Cl_2 : AcOEt : EtOH : AcOH (50 : 10 : 5 : 0.5 (v/v)) est entreprise. Cette purification permet d'isoler 1.6 mg de l'imide de l'acide hématinique (**53a**) sous la forme cristalline.

Point de fusion : 113-115°C.

CCM : Rf=0.36 (gel de silice, CH₂Cl₂ :AcOEt :EtOH :AcOH (50 :10 :5 :0.5 (v/v)), chlore/benzidine).

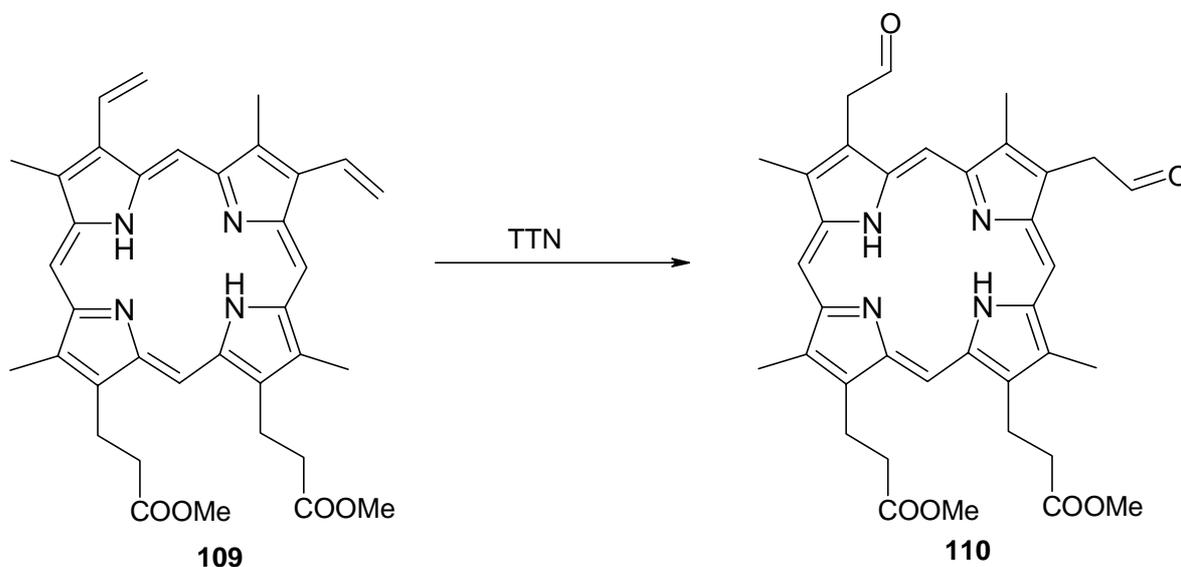
RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 1.99 (s, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.65 (m, 4H, H₂C(3¹)+H₂C(3²)) ; 9.47 (s br, 1H, NH).

SM (Cl, CH₄) : 184 ([MH]⁺, 65%), 166 (100%), 138 (10%).

11. La synthèse du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide

11.1. La formation du maléimide 102 par oxydation d'un tétrapyrrole

11.1.1. La formation du diester méthylique de la 3,8-bis(2-oxoéthyl)-deutéroporphyrine IX.



134.4 mg

590.7 g/mol

0.23 mmol

360.0 mg

444.44 g/mol

0.81 mmol

(143.2 mg)

622.7 g/mol

(0.23 mmol)

134.4 mg (0.23 mmol) de diester méthylique de la protoporphyrine IX (**109**) sont dissous dans 1 ml de THF et 20 ml de MeOH. 360 mg (0.81 mmol) de nitrate de

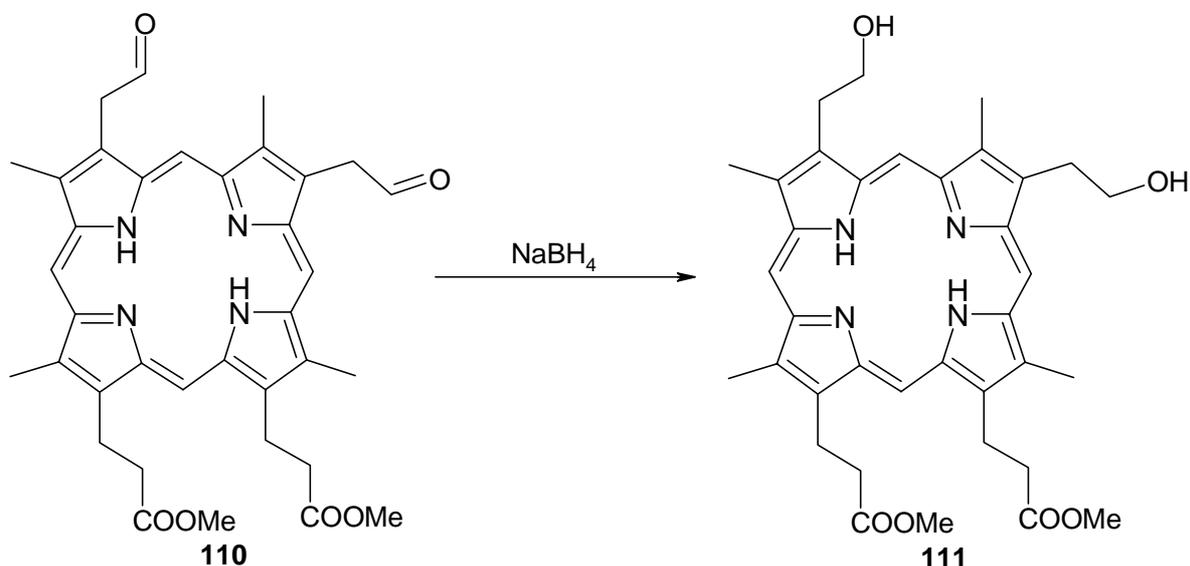
thallium(III) trihydrate sont ajoutés au milieu réactionnel. La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, après quoi 100 ml d'HCl 4M sont ajoutés et la solution est à nouveau agitée à température ambiante durant 30 minutes. Le milieu réactionnel est versé sur 300 ml d'eau et la phase aqueuse est extraite avec 5x70 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont lavées avec 2x100 ml d'eau et séchée sur sulfate de sodium anhydre. Le produit est purifié en le portant sur 4 plaques CCE avec l'éluant CH₂Cl₂ : MeOH (95 :5 (v/v)). On obtient ainsi 28 mg (20%) du produit désiré.

CCM : Rf=0.45 (gel de silice, CH₂Cl₂ : MeOH (95 :5 (v/v)), vis).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : -3.9 (s, 2H, 2xNH) ; 3.25-3.29 (m, 2x2H, H₂C(13²+17²)) ; 3.56 (s, 3H, H₃C(7¹)) ; 3.57 (s, 3H, H₃C(2¹)) ; 3.58 (s, 3H, H₃C(12¹)) ; 3.60 (s, 3H, H₃C(18¹)) ; 3.65 (2xs, 2x3H, 2xH₃CO) ; 4.38 (m, 4H, H₂C(13¹+17¹)) ; 4.99 (d, J=2.47 Hz, 2H, H₂C(8¹)) ; 5.00 (d, J=2.47 Hz, 2H, H₂C(3¹)) ; 9.81, 9.82, 10.01, 10.04 (4xs, 4x1H, 4xH meso) ; 10.2 (m, 2x1H, 2xCHO).

SM (FAB, NOBA) : 623 ([M]⁺, 65%).

11.1.2. La formation du diester méthylique de la 3,8-bis(2-hydroxyéthyl)-deutéroporphyrine IX.



102.8 mg

622.7 g/mol

0.16 mmol

0.3 g

37.8 g/mol

8.0 mmol

(103.5 mg)

626.7 g/mol

(0.16 mmol)

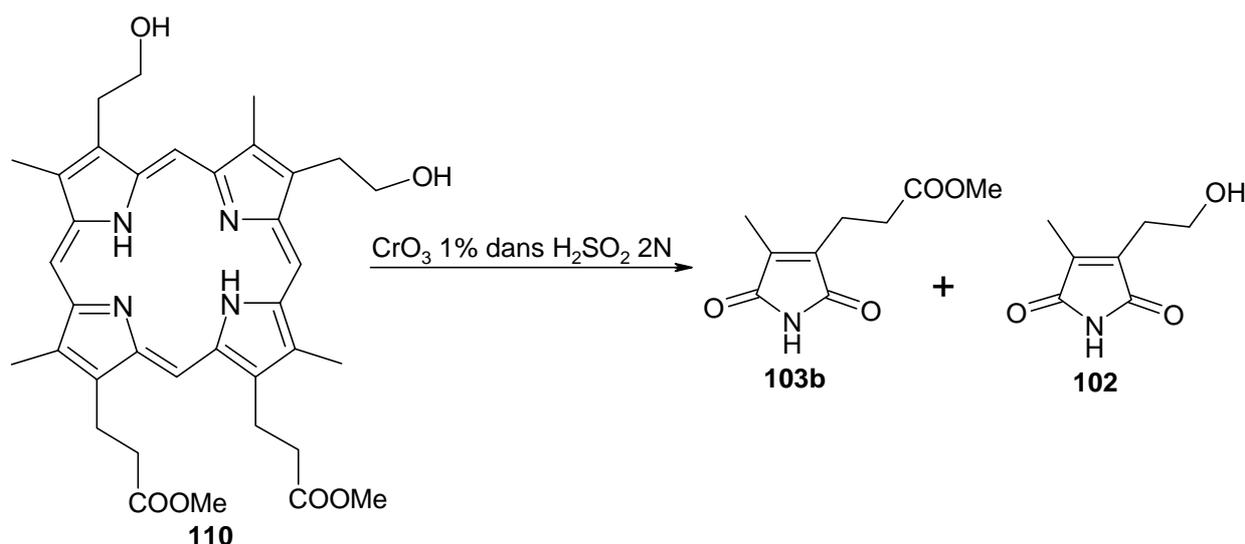
102.8 g (0.16 mmol) de diester méthylique de la 3,8-bis(2-oxoéthyl)-deutéroporphyrine IX (**110**) sont dissous dans 20 ml du mélange CH_2Cl_2 : THF : MeOH (1 : 1 : 1). 300 mg (8 mmol) de NaBH_4 suspendus dans 20 ml de MeOH y sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 40 minutes en absence de lumière. L'excès de NaBH_4 est alors neutralisé au moyen de 3 ml d'acide acétique. Le milieu réactionnel est versé sur 200 ml d'eau et la phase aqueuse ainsi obtenue est extraite avec 3x50 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium 5% (2x50 ml), puis avec 50 ml d'eau ; elle est finalement séchée sur sulfate de sodium anhydre et filtrée. Le solvant est éliminé à pression réduite. Le produit est purifié en le portant sur 4 plaques CCE avec l'éluant dichlorométhane : MeOH (95 : 5). 66.6 mg (69%) de diester méthylique de la 3,8-bis(2-hydroxyéthyl)-deutéroporphyrine IX sont obtenus.

CCM : Rf=0.30 (gel de silice, CH₂Cl₂ : MeOH (95 : 5 (v/v)), vis).

RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 3.25 (*m*, 2x2H, H₂C(3¹+8¹)) ; 3.35 (2xm, 2x2H, H₂C(13²+17²)) ; 3.42-3.61 (4xs, 4x3H, H₃C(2¹+7¹+12¹+18¹)) ; 3.84 (2xs, 2x3H, 2xH₃CO) ; 4.35 (*m*, 2x2H, H₂C(3²+8²)) ; 4.75 (2xm, 2x2H, H₂C(13¹+17¹)) ; 10.0-10.3 (4xs, 4x3H, H₂C(2¹+7¹+ 22¹+18¹)).

SM (FAB, NOBA) : 627 ([M]⁺, 100%).

11.1.3. La formation de l'ester méthylique de l'imide de l'acide hématinique (53b) et du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (102).



65.0 mg		(39.4 mg)	(31.0 mg)
626.7 g/mol		197.2 g/mol	155.2 g/mol
0.1 mmol	6 mmol	(0.2 mmol)	(0.2 mmol)

65 mg (0.1 mmol) de diester méthylique de la 3,8-bis(2-hydroxyéthyl)-deutéroporphyrine IX (111) dissous dans 60 ml d'acétone sont placés dans un extracteur liquide-liquide. Une solution (60 ml) de CrO₃ 1% dans H₂SO₄ 2N est ajoutée, puis le milieu réactionnel est extrait en continu durant une nuit avec de l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et

filtrée ; le solvant est évaporé. Le résidu redissous dans le mélange MeOH :chlorure de méthylène (1 :1) est appliqué une première fois sur 4 plaques CCM développées avec l'éluant CH₂Cl₂ :AcOEt :EtOH :AcOH (50 :10 :5 :0.5 (v/v)). Cela permet une première séparation des deux produits principaux. Chaque produit est ensuite chromatographié une seconde fois sur le même support (2 plaques pour chaque produit). L'ester est élué avec le mélange CH₂Cl₂ :acétone (9 :1) alors que l'alcool est élué avec le mélange CH₂Cl₂ :acétone (8 :2). Selon ce procédé, il est ainsi possible d'obtenir 16.6 mg (40%) d'ester méthylique de l'imide de l'acide hématinique (**53b**) et 4.8 mg (15 %) de 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**).

Les données spectroscopiques de 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**) sont toutes identiques à celles de la substance naturelle décrites au point 10.5..

Les données spectroscopiques de l'ester méthylique de l'imide de l'acide hématinique (**53b**) :

Point de fusion : 64-65°C.

CCM : Rf=0.63 (gel de silice, CH₂Cl₂ :acétone (9 :1 (v/v)), Cl₂/benzidine).

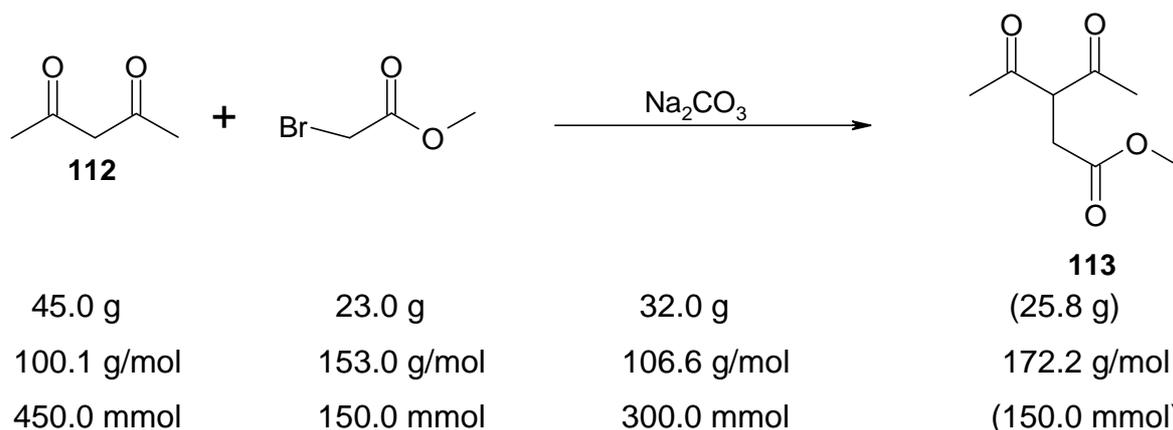
RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.01 (*s*, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.64 (*m*, 2H, H₂C(3²)) ; 2.70 (*m*, 2H, H₂C(3¹)) ; 3.68 (*s*, 3H, H₃CO) ; 7.36 (*s br*, 1H, NH).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CD₃OD, δ(CDCl₃)) : 8.67 (C(4¹)) ; 19.28 (C(3¹)) ; 31.65 (C(3²)) ; 51.85 (CH₃O) ; 139.73,139.75 (C(4)+C(3)) ; 171.24,171.4,172.5 (3xC=O).

SM (Cl, CH₄) : 198 ([MH]⁺, 100%), 166 (87%).

11.2. La formation du maléimide 102 par oxydation du pyrrole correspondant

11.2.1. La préparation du 3-acétyl-4-oxopentanoate de méthyle



Dans un ballon tricol de 250 ml surmonté d'un réfrigérant, on place 45 g (450 mmol) d'acétylacétone (**112**) et 50 ml d'acétone sèche. 32 g (300 mmol) de carbonate de sodium est ajouté en une fois, et la réaction est agitée à température ambiante durant 30 minutes. 23 g (150 mmol) de bromoacétate de méthyle dissous dans 20 ml d'acétone sèche sont ajoutés en 10 minutes au moyen d'une ampoule à addition. Après l'ajout complet de l'agent alkylant, le milieu réactionnel est chauffé à reflux durant 1h30.

Après avoir laissé refroidir jusqu'à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, puis l'acétone est évaporé. 22 g (85%) du produit désiré sont obtenus par distillation à basse pression.

Point d'ébullition : 96°C à 0.9 mmHg.

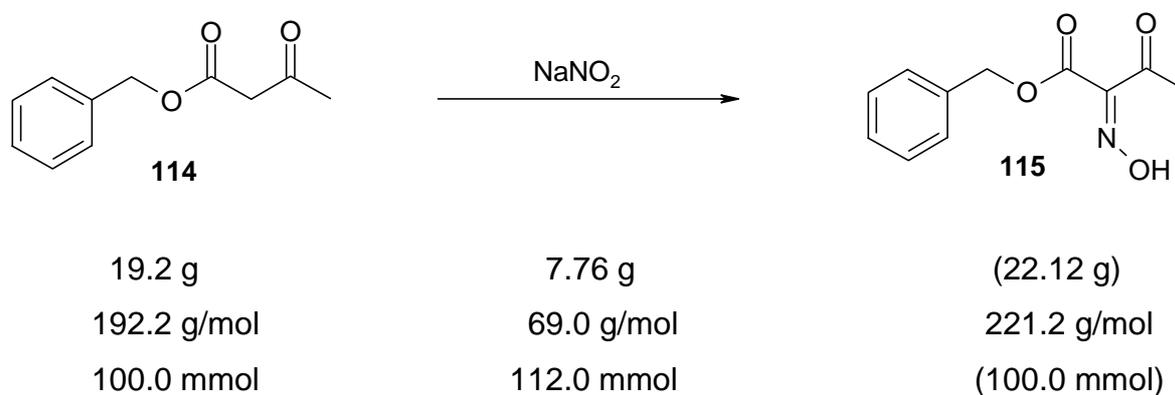
Forme céto :

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.16 (s, 2x3H, H₃C(5+3²)) ; 2.77 (d, J=7.22 Hz, 2H, H₂C(2)) ; 3.56 (s, 3H, H₃CO) ; 4.05 (t, J=7.22 Hz, 1H, HC(3)).

Forme émol :

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.04 (s, 2x3H, H₃C(5+3²)) ; 3.17 (s, 2H, H₂C(2)) ; 3.60 (s, 3H, H₃CO).

11.2.2. La préparation du 2-(hydroxyimino)-3-oxobutanoate de benzyle.



Dans un ballon de 250 ml équipé d'un bain d'eau pour maintenir la température à environ 25°C, on place 19.2 g (100 mmol) d'acétoacétate de benzyle (**114**) dissous dans 20 ml d'acide acétique glacial. Une solution nitrante constituée de 7.76 g (112 mmol) de NaNO₂ dissous dans 20 ml d'eau est ajoutée au milieu réactionnel goutte à goutte durant 20 minutes, après quoi 50 ml d'eau sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité durant 30 minutes, puis dilué dans 100 ml d'eau. Le produit est extrait avec 3x80 ml de diéthyléther. La phase organique est lavée avec 3x30 ml d'une solution de carbonate de sodium préparée en dissolvant 13 g de Na₂CO₃ dans 100 ml d'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre, et l'éther est éliminé. Une huile jaune qui cristallise lorsqu'elle est placée au réfrigérateur est obtenue. L'oxime est recristallisé en dissolvant le solide obtenu dans un minimum de dichlorométhane chaud, puis en ajoutant progressivement de l'hexane jusqu'à ce qu'un trouble persiste. Le ballon de recristallisation est refroidi dans un bain de glace et 17.51 g (80%) de cristaux blanc crème sont obtenus.

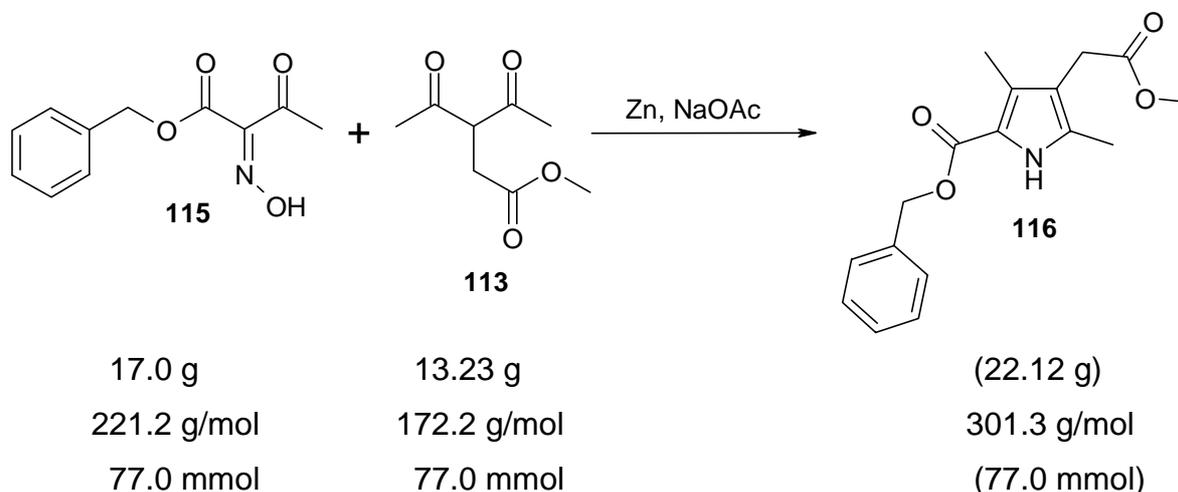
Point de fusion : 79°C.

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.4 (s, 3H, H₃C(4)) ; 5.4 (s, 2H, OCH₂Ar) ; 7.4 (s, 5H, 5xH_{aromatiques}) ; 10.1 (s br, 1H, NOH).

RMN-¹³C : (50.3 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 25.79 (C(4)) ; 68.42 (OCH₂Ar) ; 128-129 (5xC_{aromatiques}) ; 134.9 (C_{aromatique} quaternaire) ; 151.3 (C(2)) ; 162.2 (C(1)) ; 194.8 (C(3)).

SM (Cl, CH₄) : 222 ([M]⁺, 3%), 91 (100%).

11.2.3. La préparation du 4-méthoxycarbonylméthyl-3,5-diméthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.



Dans un ballon de 250 ml muni d'un réfrigérant, on place 13.3 g (77 mmol) de 3-acétyl-4-oxopentanoate de méthyle (**113**). 17 g (77 mmol) de 2-hydroxyimino-3-oxobutanoate de benzyle (**115**) dissous dans 140 ml d'acide acétique glacial sont ajoutés. La solution est fortement agitée, et de petites portions d'un mélange solide constitué de 15 g de poudre de zinc et de 15 g de NaOAc anhydre sont ajoutées durant une période d'1 heure. Une élévation de la température est observée. Après l'ajout complet de zinc et d'acétate, le milieu réactionnel est chauffé à reflux durant 2 heures. La solution passe d'une couleur jaune foncée à vert, puis à jaune clair. La solution est reposée durant la nuit à température ambiante.

La solution, qui a partiellement durci, est versée sur 300 ml d'eau. Cette phase aqueuse est extraite avec 3x200 ml de diéthyléther et la phase organique ainsi obtenue est lavée avec du carbonate jusqu'à ce que l'eau de lavage présente un pH

neutre ou légèrement basique. La phase organique est ensuite séchée sur du sulfate de sodium anhydre et l'éther est éliminé. On obtient finalement une huile que l'on dissout dans du méthanol, puis on y ajoute de l'eau jusqu'à ce que le trouble persiste. On chauffe le mélange en permettant à un peu de méthanol de s'évaporer, jusqu'à ce qu'un nouveau trouble apparaisse. La recristallisation est ensuite forcée en plongeant le ballon dans un bain de glace. On obtient 11.1 g (48%) du pyrrole désiré.

Point de fusion : 93°C.

CCM : Rf=0.78 (gel de silice, hexane :AcOEt (1 :1 (v/v)), UV).

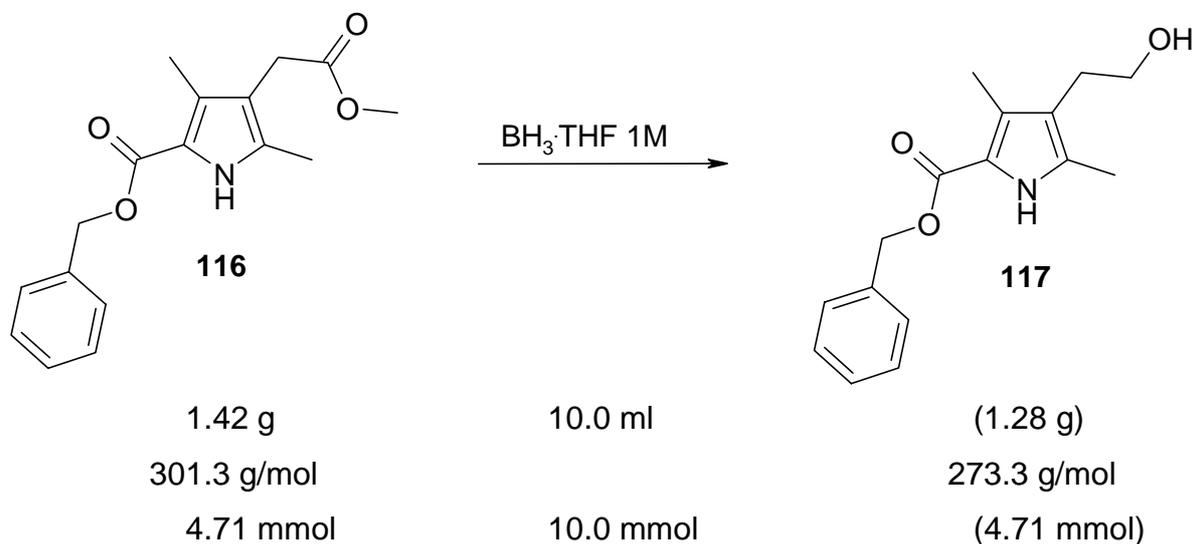
RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.2 (s, 3H, H₃C(5¹)) ; 2.28 (s, 3H, H₃C(3¹)) ; 3.35 (s, 2H, H₂C(4¹)) ; 3.64 (s, 3H, H₃CO) ; 5.29 (s, 2H, OCH₂-Ar) ; 7.38 (m, 5H, 5xH_{aromatiques}) ; 8.9 (s *br*, 1H, NH).

RMN-¹³C : (50.3 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 11.26, 11.96 (2xCH₃ (C(3)+C(5))) ; 30.45 (C(4¹)) ; 52.36 (C(OCH₃)) ; 66.0 (OCH₂-Ar) ; 115.0, 117.3, 128.5, 132.0 (4xC_{quaternaires} pyrrole) ; 128,4-129.0 (5xC_{aromatiques tertiaires}) ; 137.0 (C_{aromatique quaternaire}) ; 161.9, 172.7 (2xC=O_{ester}).

SM (EI) : 301 ([M]⁺, 2%), 242 (12%), 91 (100%).

IR (KBr) : 3445 (s), 2955 (m), 1699 (v), 1437 (s), 1246 (v), 1172 (s), 1068 (s).

11.2.4. La préparation du 4-(2-hydroxyéthyl)-3,5-diméthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.



1.42 g (4.71 mmol) de 4-méthoxycarbonylméthyl-3,5-diméthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**116**) sont dissous dans 20 ml de THF sec. Après avoir placé le système sous argon, 10 ml d'une solution de $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ 1M sont ajoutés en une fois, puis le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante. La réaction est stoppée en ajoutant du MeOH jusqu'à ce que le dégagement gazeux cesse. 50 ml d'eau sont ensuite ajoutés, et le milieu réactionnel est extrait avec 3x50 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis le solvant est évaporé. Après une purification sur colonne ($\varnothing=30$ mm, $l=25$ cm, gel de silice) avec comme éluant AcOEt :hexane (1 :1 (v/v)), il est possible d'obtenir 0.97 g (75%) du pyrrole désiré.

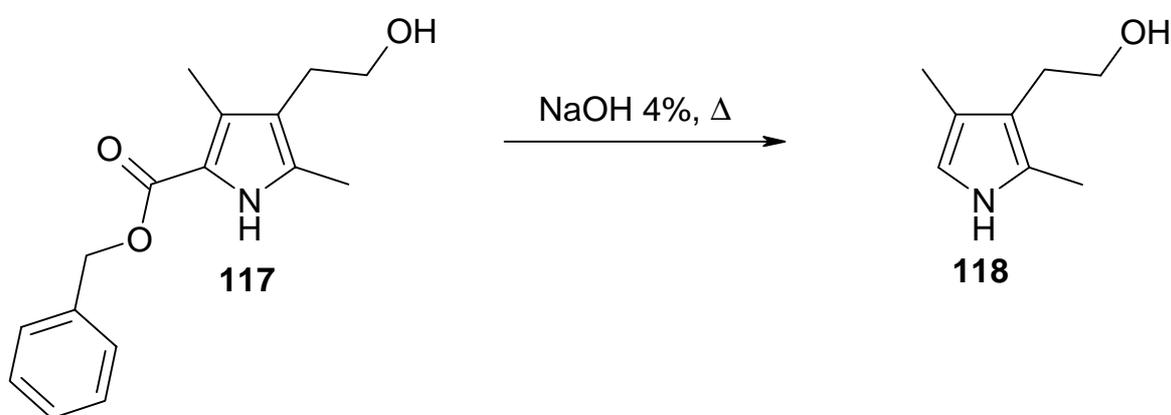
Point de fusion : 118-120°C.

CCM : $R_f=0.33$ (gel de silice, hexane : AcOEt (1 :1 (v/v)), UV).

RMN- ^1H : (500.13 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{TMS})$) : 1.76 (*br*, 1H, OH) ; 2.19 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{C}(5^1)$) ; 2.29 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{C}(3^1)$) ; 2.63 (*t*, $J=6.97$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4^1)$) ; 3.63 (*t*, $J=6.97$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4^2)$) ; 5.28 (*s*, 2H, $\text{OCH}_2\text{-Ar}$) ; 7.3-7.4 (*m*, 5H, $5 \times \text{H}_{\text{aromatiques}}$) ; 9.1 (*s br*, 1H, NH).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 10.75, 11.47 (C(5¹)+C(3¹)) ; 27.44 (C(4¹)) ; 62.62 (C(4²)) ; 65.45 (OCH₂-Ar) ; 116.69, 117.57, 128.5, 132.0 (4xC_{quaternaires} pyrrole) ; 127.9-128.4 (5xC_{aromatiques} tertiaires) ; 136.5 (C_{aromatique} quaternaire) ; 161.4 (C=O_{ester}).
SM (EI) : 273 ([M]⁺, 14%), 242 (31%), 91 (100%).

11.2.5. La préparation du 3-(2-hydroxyhéthyl)-2,4-diméthyl-1H-pyrrole.



1.0 g	100 ml	(0.515 g)
273.3 g/mol		139.2 g/mol
3.7 mmol	100.0 mmol	(3.7 mmol)

On place dans un autoclave 1 g (3.74 mmol) de 4-(2-hydroxyhéthyl)-3,5-diméthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**117**) avec 100 ml de NaOH 4% et quelques gouttes d'hydrazine. L'autoclave est refermé et le milieu réactionnel est chauffé à 170°C durant 2 heures. Le système est refroidi jusqu'à température ambiante durant la nuit. Après dilution du milieu réactionnel avec 100 ml d'eau, la solution aqueuse obtenue est extraite avec 4x50 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est finalement séchée sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé. Une purification sur colonne (Ø=25 mm, l=25 cm, gel de silice) avec comme éluant AcOEt :CH₂Cl₂ (2 : 8 (v/v)) fournit 350 mg (68%) du pyrrole recherché.

Point de fusion : 114-116°C.

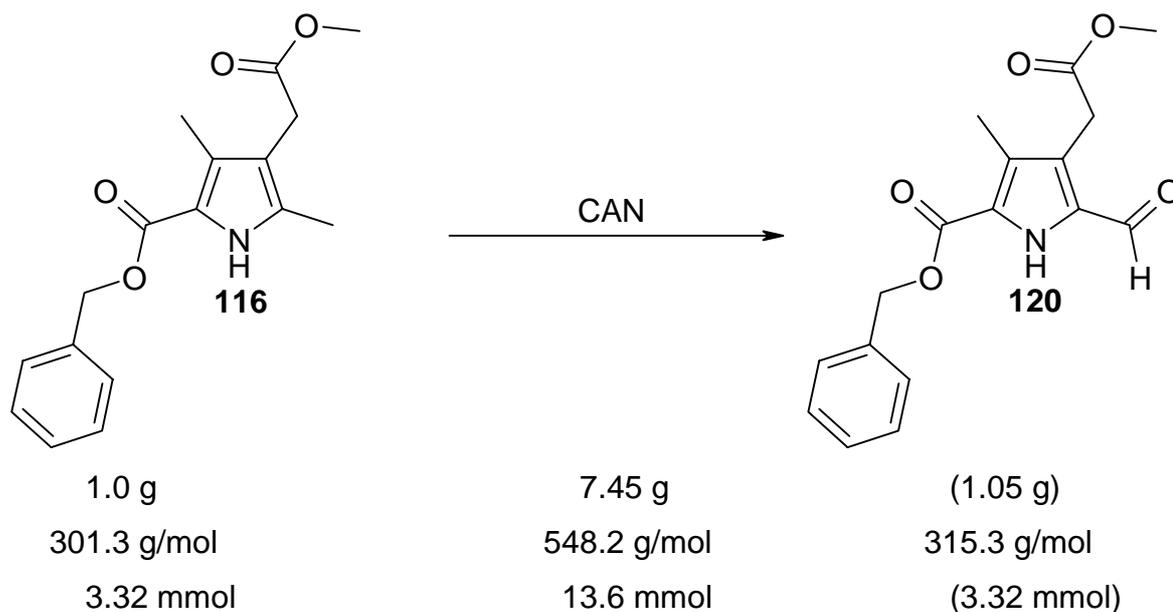
CCM : Rf=0.33 (gel de silice, hexane :AcOEt (1 :1 (v/v)), Ehrlich).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.03 (s, 3H, H₃C(2¹)) ; 2.18 (s, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.65 (t, J=6.7 Hz, 2H, H₂C(3¹)) ; 3.66 (t, J=6.7 Hz, 2H, H₂C(3²)) ; 6.39 (s, 1H, HC(5)) ; 7.7-7.8 (s br, 1H, NH).

RMN-¹³C : (50 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 10.36 C(4¹) ; 11.30 (C(2¹)) ; 27.75 (C(3¹)) ; 62.77 (C(3²)) ; 113.3 (C(5)) ; 113.8, 118.3, 125.2 (3xC_{quaternaires} pyrrole).

SM (Cl, CH₄) : 140 ([MH]⁺, 94%), 139 ([M]⁺, 47%), 122 (100%), 108 (29%).

11.2.6. La préparation du 5-formyl-4-méthoxycarbonylméthyl-3-méthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.



1 g (3.32 mmol) de 4-méthoxycarbonylméthyl-3,5-diméthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**116**) est dissous dans 30 ml de THF, 36 ml d'acide acétique et 30 ml d'eau. 7.45 g (13.6 mmol, 4.1 éq.) de nitrate cérique d'ammonium sont ajoutés au mélange et la solution est agitée à température ambiante durant 1 heure. Le milieu réactionnel est ensuite extrait avec 5x100 ml de dichlorométhane, puis la phase organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium saturée, séché sur

sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé. 0.89 g (85%) d'une huile qui cristallise aussitôt est obtenue.

Point de fusion : 108-109°C.

CCM : Rf=0.34 (gel de silice, hexane :AcOEt (2 :1 (v/v)), UV).

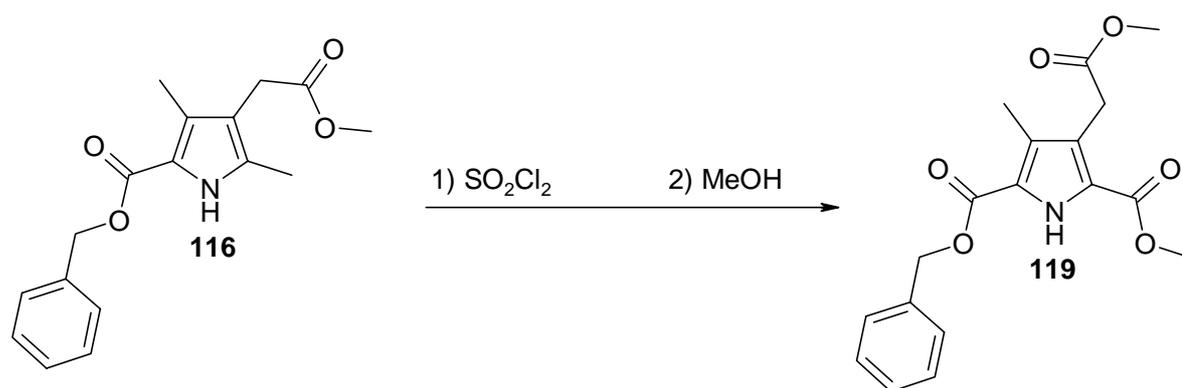
RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.31 (s, 3H, H₃C(3¹)) ; 3.70 (s, 3H, H₃CO) ; 3.75 (s, 2H, H₂C(4¹)) ; 5.34 (s, 2H, OCH₂-Ar) ; 7.37-7.41 (m, 5H, 5xH_{aromatiques}) ; 9.57 (s br, 1H, NH) ; 9.78 (s, 1H, CHO).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 10.21 C(3¹) ; 29.68 (C(4¹)) ; 52.73 (H₃CO) ; 67.12 (OCH₂-Ar) ; 124.39, 125.74, 128.24, 130.79 (4xC_{quaternaires} pyrrole) ; 128.7-128.9 (5xC_{tertiaires} aromatiques) ; 135.67 (C_{quaternaire} aromatique) ; 160.77, 171.04 (2xC=O_{ester}) ; 179.64 (CHO).

SM (EI) : 315 ([M]⁺, 43%), 287 (31%), 256 (17%), 228 (24%), 148 (51%), 91 (100%).

11.2.7. La préparation du 4-méthoxycarbonylméthyl-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.

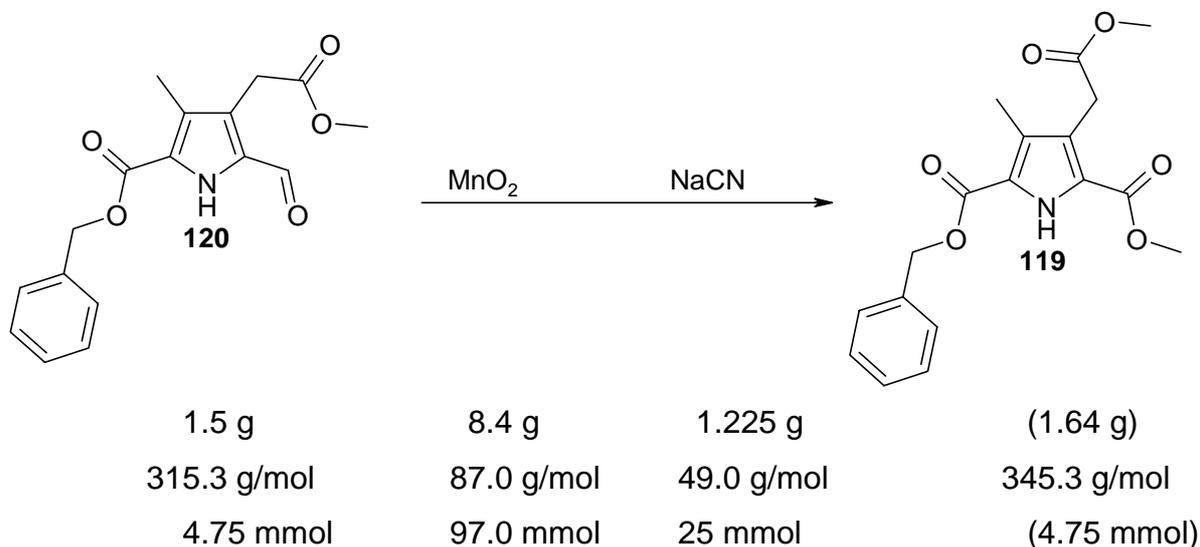
- a) Oxydation du 4-méthoxycarbonylméthyl-3,5-diméthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle au moyen de chlorure de sulfuryle.



1.0 g	1.4 g	55 ml	(1.14 g)
301.3 g/mol	135.0 g/mol		345.3 g/mol
3.32 mmol	10.3 mmol		(3.32 mmol)

Dans un ballon de 100 ml, 1 g (3.32 mmol) de 4-méthoxycarbonylméthyl-3,5-diméthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**116**) est dissous dans 50 ml de CCl₄. 1.4 g (10.3 mmol) de chlorure de sulfuryle dissous dans 5 ml de CCl₄ sont ajoutés le plus rapidement possible (réaction exothermique violente !). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 7 heures. Le tétrachlorure de carbone est évaporé avec un léger vide, et le résidu est dissous dans 55 ml de MeOH qui contiennent également 0.9 g d'acétate de sodium anhydre. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 60°C durant 24 heures, après quoi le contenu du ballon de réaction est versé sur 100 ml d'eau. Cette solution aqueuse est extraite avec 3x100 ml de CH₂Cl₂, la phase organique est séchée sur du sulfate de sodium anhydre et le solvant est éliminé. Une purification sur colonne (Ø=25 mm, l=28 cm, gel de silice) avec comme éluant AcOEt :hexane (1 :2 (v/v)) fournit 460 mg (40%) du pyrrole recherché.

- b) Oxydation du 5-formyl-4-méthoxycarbonylméthyl-3-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle au moyen du MnO₂.



1.5 g (4.75 mmol) de 5-formyl-4-méthoxycarbonylméthyl-3-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**120**) sont placés dans un ballon de 100 ml avec 50 ml de MeOH, 8.4 g (97 mmol) de MnO₂ actif, 1.22 g (25 mmol) cyanure de sodium et 1 ml d'acide acétique glacial. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant une nuit, puis il est filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 50 ml d'eau, et la

phase aqueuse est extraite avec 3x50 ml de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, le solvant est éliminé et l'huile obtenue est purifiée par chromatographie ($\varnothing=30$ mm, $l=27$ cm, gel de silice, hexane :AcOEt (3 :1)). Cette étape livre 764 mg (47%) du pyrrole désiré (**119**) et 712 mg (43%) de 4-méthoxycarbonylméthyl-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de méthyle (**121**).

Point de fusion : 90-91°C.

CCM : Rf=0.24 (gel de silice, hexane : AcOEt (3 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 2.28 (s, 3H, H₃C(3¹)) ; 3.69 (s, 3H, H₃CO) ; 3.84 (s, 2H, H₂C(4¹)) ; 3.86 (s, 3H, H₃CO) ; 5.34 (s, 2H, OCH₂-Ar) ; 7.34-7.44 (m, 5H, 5xH_{aromatiques}) ; 9.62 (s br, 1H, NH).

RMN-¹³C : (50.3 MHz, CDCl₃, δ (CDCl₃)) : 10.36 C(3¹) ; 30.63 (C(4¹)) ; 52.14, 52.37 (2xH₃CO) ; 66.89 (OCH₂-Ar) ; 122.22, 122.79, 123.91, 128.39 (4xC_{quaternaires} pyrrole) ; 128.7-129.10 (5xC_{tertiaires} aromatiques) ; 136.2 (C_{quaternaire} aromatique) ; 160.98, 161.13, 171.83 (3xC=O_{ester}).

SM (EI) : 345 ([M]⁺, 20%), 286 (16%), 254 (8%), 91 (100%).

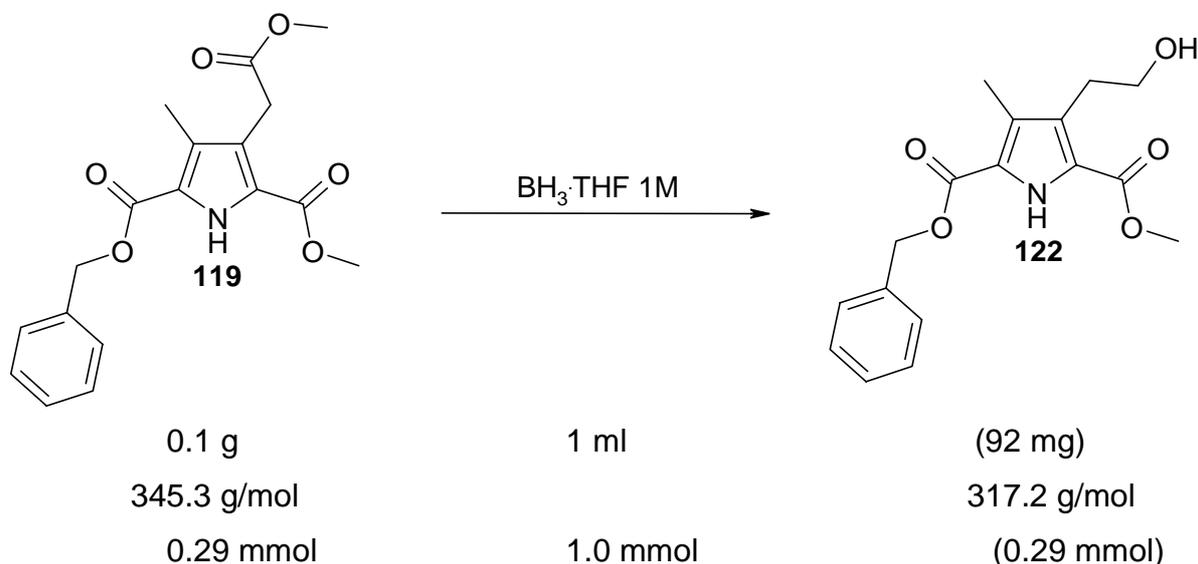
Produit secondaire de la méthode b : 4-méthoxycarbonylméthyl-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de méthyle (**121**).

Point de fusion : 87-89°C.

CCM : Rf=0.14 (gel de silice, hexane : AcOEt (3 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 2.26 (s, 3H, H₃C(3¹)) ; 3.69 (s, 3H, H₃CO) ; 3.83 (s, 2H, H₂C(4¹)) ; 3.86 (s, 3H, H₃CO) ; 3.88 (s, 3H, H₃CO) ; 9.49 (s br, 1H, NH).

11.2.8. La préparation du 4-(2-hydroxyéthyl)-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.



100 mg (0.29 mmol) de 4-méthoxycarbonylméthyl-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**119**) sont placés dans un ballon de 10 ml. 1 ml (1 mmol) de $\text{BH}_3 \cdot \text{THF } 1\text{M}$ est ajouté et le milieu réactionnel est agité durant une nuit sous atmosphère inerte. La réaction est stoppée en ajoutant du MeOH jusqu'à ce que le dégagement gazeux cesse. 15 ml d'eau sont ensuite ajoutés, et le milieu réactionnel est extrait avec 3x20 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis le solvant est évaporé. Après une purification sur colonne ($\varnothing=15$ mm, h=19 cm, gel de silice) avec comme éluant AcOEt :hexane (1 :1 (v/v)), il est possible d'obtenir 64.5 mg (70%) du pyrrole désiré.

Point de fusion : 125-126°C.

CCM : Rf=0.21 (gel de silice, hexane : AcOEt (1 :1 (v/v)), UV).

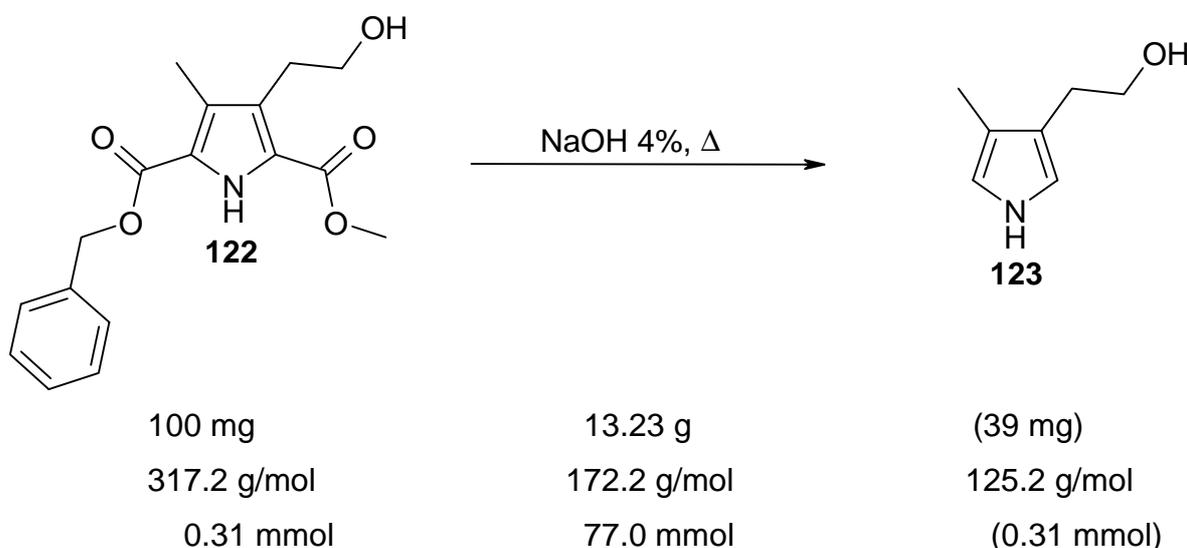
RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{TMS})$): 2.30 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(3^1)$) ; 3.00 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4^1)$) ; 3.76 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4^2)$) ; 3.87 (s, 3H, H_3CO) ; 5.33 (s, 2H, $\text{OCH}_2\text{-Ar}$) ; 7.3-7.4 (m, 5H, $5x\text{H}_{\text{aromatiques}}$) ; 9.47 (s br, 1H, NH).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{CDCl}_3)$): 10.59 C(3^1) ; 28.46 (C(4^1)) ; 52.12 (H_3CO) ; 63.46 (C(4^2)) ; 66.87 ($\text{OCH}_2\text{-Ar}$) ; 119.52, 122.26, 123.45, 128.7

(4x $C_{\text{quaternaires pyrrole}}$) ; 128.1-129.1 (5x $C_{\text{aromatiques tertiaires}}$) ; 136.23 ($C_{\text{aromatique quaternaire}}$) ; 161.05, 162.31 (2x $C=O_{\text{ester}}$).

SM (EI) : 318 ($[MH]^+$, 5%), 242 (7%), 196 (15%), 91 (100%).

11.2.9. La préparation du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1H-pyrrole.



On place dans un autoclave 100 mg (0.31 mmol) de 4-(2-hydroxyéthyl)-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**122**) avec 100 ml de NaOH 4% et quelques gouttes d'hydrazine. L'autoclave est fermé et le milieu réactionnel est chauffé à 170°C durant 2 heures. Le système est refroidi jusqu'à température ambiante durant la nuit. Après dilution du milieu réactionnel avec 100 ml d'eau, la solution aqueuse obtenue est extraite avec 4x50 ml de CH_2Cl_2 . La phase organique est finalement séchée sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé. Une purification sur colonne ($\varnothing=10$ mm, $l=16$ cm, gel de silice) avec comme éluant CH_2Cl_2 : acétone (9 : 1 (v/v)) fournit 30 mg (77%) d'une huile rouge qui ne cristallise pas.

CCM : $R_f=0.32$ (gel de silice, CH_2Cl_2 : acétone (9 : 1 (v/v)), Ehrlich).

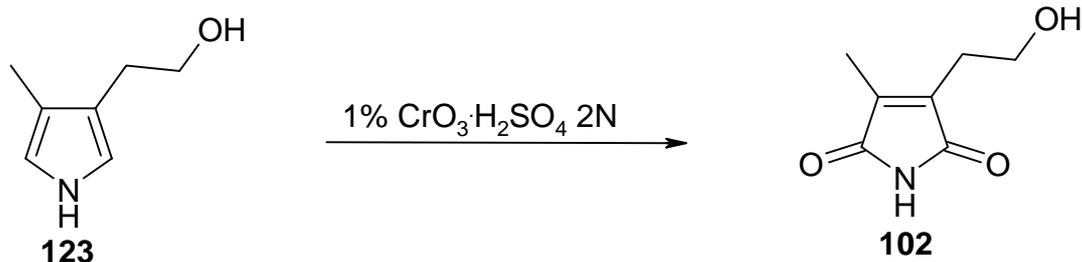
RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.06 (*d*, *J*=0.9 Hz, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.72 (*dt*, *J*₁=6.4 Hz, *J*₂=0.7 Hz, 2H, H₂C(3¹)) ; 3.75 (*t*, *J*=6.4 Hz, 2H, H₂C(3²)) ; 6.55 (*dq*, *J*₁=2.3 Hz, *J*₂=0.9 Hz, 1H, HC(5)) ; 6.60 (*dt*, *J*₁=2.3 Hz, *J*₂=0.7 Hz, 1H, HC(2)) ; 7.8-7.9 (*s br*, 1H, NH).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 10.39 C(4¹) ; 29.01 (C(3¹)) ; 62.91 (C(3²)) ; 116.59, 116.61 (C(2)+C(5)) ; 118.19, 118.75 (C(3)+C(4)).

SM (EI) : 125 ([M]⁺, 40%), 94 (100%).

IR (film, KBr) : 3678 (*m*), 3007 (*m*), 2361 (*m*), 1724 (*s*), 1701 (*s*), 1369 (*s*), 1228 (*m*).

11.2.10. La préparation du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide par oxydation du 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1*H*-pyrrole.



5.0 mg
125.2 g/mol
0.04 mmol

2 ml

0.2 mmol

(6.2 mg)
155.2 g/mol
(0.04 mmol)

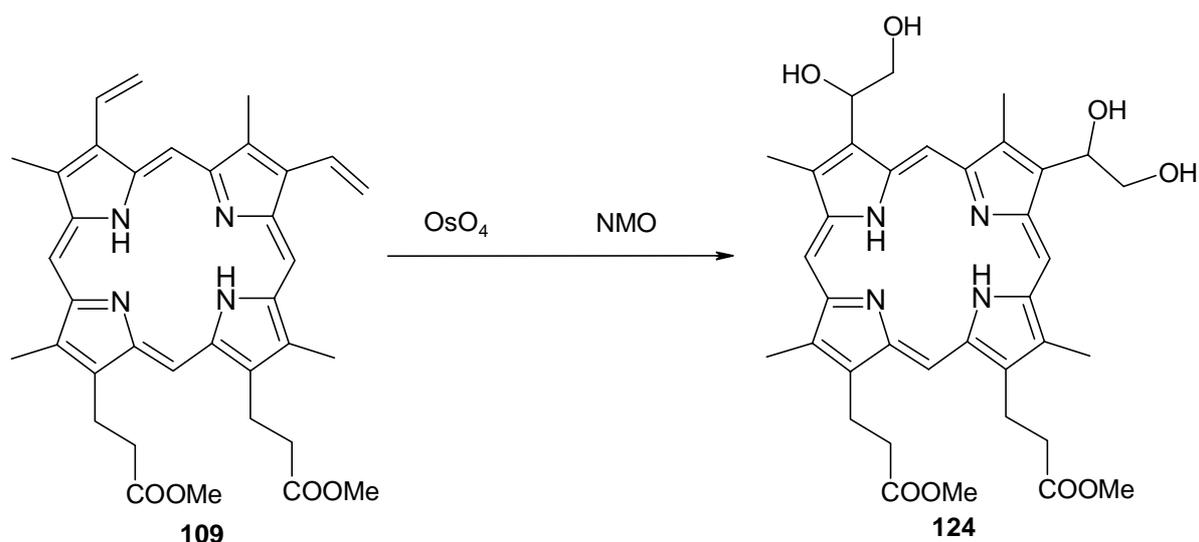
5 mg (0.04 mmol) de 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1*H*-pyrrole (**123**) dissous dans 2 ml d'acide acétique sont ajoutés goutte à goutte dans un ballon de 10 ml contenant 2 ml d'acide chromique (1% CrO₃ dans H₂SO₄ 2N) plongé dans un bain de glace. Le milieu réactionnel est agité durant 4 heures. Il est ensuite extrait avec du diéthyléther, et la phase organique résultante est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis filtrée. Après avoir évaporé le solvant, le résidu est purifié sur colonne (Ø=10 mm, l=12 cm, gel de silice, CH₂Cl₂ :acétone (8 :2)). 3.1 mg (50%) du maléimide désiré sont ainsi obtenus.

Les données spectroscopiques de 3-(2-hydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**102**) sont toutes identiques à celle de la substance naturelle qui ont été décrites au point 10.5..

12. La synthèse du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**)

12.1. La formation du maléimide **101** par oxydation d'un tétrapyrrole

12.1.1. La formation du diester méthylique de la 3,8-bis(1,2-dihydroxyéthyl)-deutéroporphyrine IX



24.4 mg	2.25 mg	17.0 mg	(27.0 mg)
590.7 g/mol	254.2g/mol	135.2 g/mol	658.7 g/mol
0.041 mmol	0.009 mmol	0.12 mmol	(0.041 mmol)

Après avoir préparé 11 ml d'une solution dégazée constituée de dioxane et d'eau (9 : 1 (v/v)), 24.4 mg (0.041 mmol) d'ester diméthyle de la protoporphyrine IX (**109**), 2.25 mg (0.009 mmol) de tétraoxyde d'osmium et 17 mg (0.12 mmol) de NMO, le milieu réactionnel placé sous argon est agité à température ambiante durant

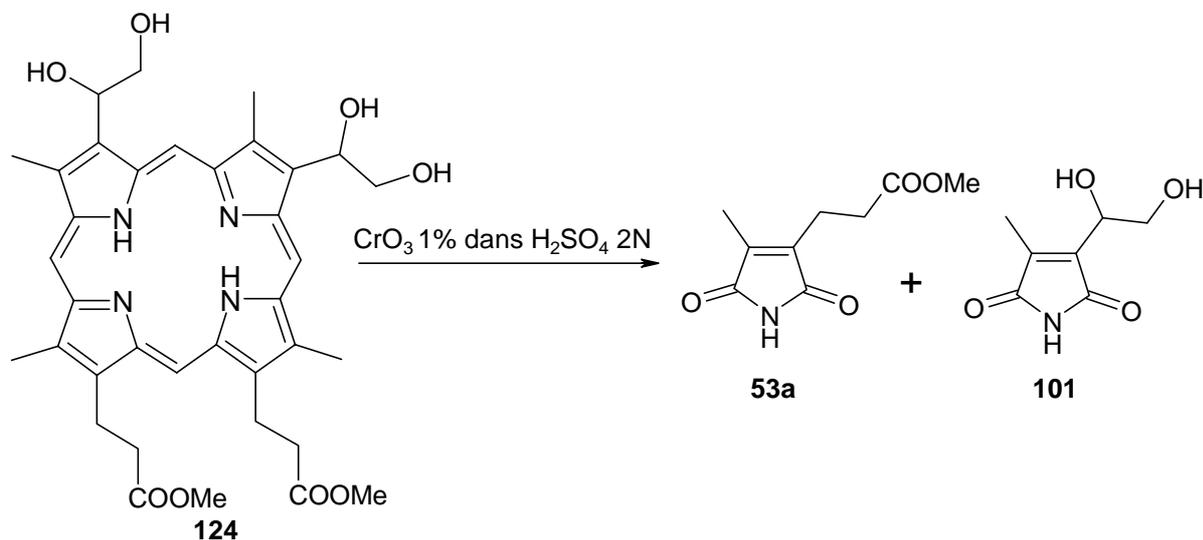
24heures. Un gros excès de métabisulfite de sodium est ajouté afin de se débarrasser de la forme toxique de l'osmium et le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 1 heure. Le mélange est ensuite chauffé à 63°C pendant 25 minutes, et la solution est refroidie à environ 56°C. Le milieu réactionnel est alors filtré sur un verre fritté (porosité no 4). La solution est réduite de moitié par évaporation du solvant, puis 150 ml d'eau sont ajoutés. Cette phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (5x50 ml). La phase organique obtenue est séchée sur sulfate de sodium anhydre, le chlorure de méthylène est évaporé, et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne ($\varnothing=25$ mm, l=18 cm, gel de silice, dichlorométhane :EtOH (9 :1)). 24 mg (90%) de la substance désirée sont obtenus.

CCM : Rf=0.19 (gel de silice, dichlorométhane :EtOH (9 :1 (v/v)), vis).

Compte tenu de la complexité du spectre due aux différents diastéréomères obtenus, ainsi qu'à sa solubilité particulière, le spectre **RMN-¹H** n'a pas pu être interprété.

SM (FAB, NOBA) : 657 ($[M-2H]^+$, 100%).

12.1.2. La formation de l'ester méthylique de l'imide de l'acide hématinique (53b) et du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (101).



40.0 mg	(23.6 mg)	(20.4 mg)
658.7 g/mol	197.2 g/mol	171.1 g/mol
0.06 mmol	6 mmol	(0.12 mmol) (0.12 mmol)

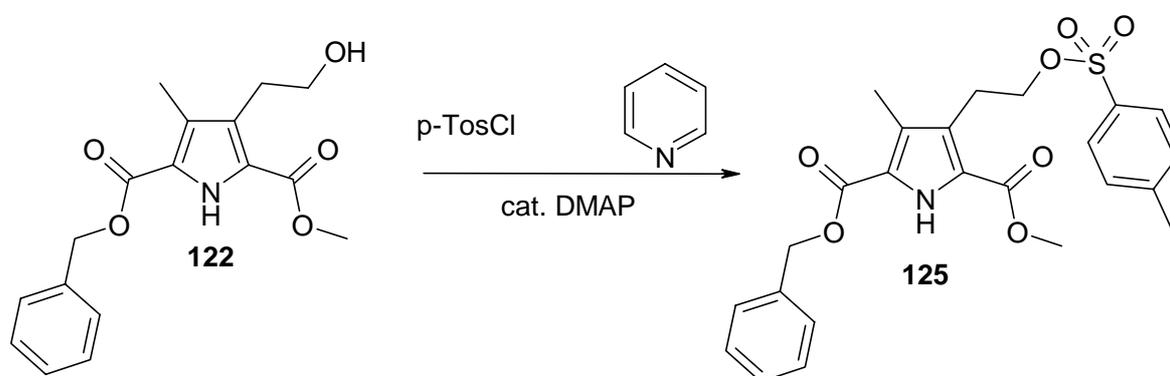
40 mg de diester méthylique de la 3,8-bis(1,2-dihydroxyéthyl)-deutéroporphyrine IX (**124**) dissous dans 60 ml d'acétone sont placés dans un extracteur liquide-liquide. Une solution (60 ml) de CrO_3 1% dans H_2SO_4 2N est ajoutée puis le milieu réactionnel est extrait en continu durant une nuit à l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur du sulfate de sodium, filtrée et le solvant est évaporé. Le résidu redissous dans du MeOH : chlorure de méthylène (1 :1) est appliqué une première fois sur 4 plaques chromatographiques développées avec l'éluant CH_2Cl_2 :AcOEt :EtOH :AcOH (50 :10 :5 :0.5 (v/v)). Cela permet une première séparation des deux produits principaux. Chaque produit est ensuite chromatographié une seconde fois sur le même support (2 plaques pour chaque produit). L'ester est élué avec le mélange CH_2Cl_2 :acétone (9 :1 (v/v)), alors que le diol est élué avec le mélange CH_2Cl_2 :AcOEt :EtOH (10 :2 :1 (v/v)). Selon ce procédé, il est ainsi possible d'obtenir 9.1 mg (39%) d'ester méthylique de l'imide de

l'acide hématinique (**53b**) et 1.2 mg (6%) de 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**).

Les données spectroscopiques de l'ester méthylique de l'imide de l'acide hématinique (**53b**) sont identiques à celles de la substance obtenue par synthèse au point 11.1.3..

Les données spectroscopiques de 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide (**101**) sont identiques à celles de la substance naturelle décrites au point 10.6..

12.2.1. La préparation du 5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-4-(2-[[4-méthylphényl)sulfonyl]oxy]éthyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.



111 mg	100 mg	120 μ l	(165 mg)
317.13 g/mol	190.6 g/mol		471.13 g/mol
0.35 mmol	0.5 mmol		(0.35 mmol)

111 mg (0.35 mmol) de 4-(2-hydroxyéthyl)-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**122**) sont placés dans un ballon de 25 ml avec 10 ml de CH_2Cl_2 . 100 mg (0.5 mmol) de chlorure de tosyloxy, une pointe de spatule de DMAP (cat.) et 120 μ l de pyridine sont ajoutés ; le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant une semaine. Le milieu réactionnel est dilué avec 100 ml de CH_2Cl_2 ,

et la phase organique est lavée avec 3x50 ml d'acide citrique 5%, 3x50 ml de carbonate de sodium 5%, puis 3x50 ml d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée, et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne ($\varnothing=15$ mm, $l=16$ cm, gel de silice, hexane :AcOEt (3 :1) (v/v)). 132 mg (80%) de 5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-4-(2-([4-méthylphényl]-sulfonyl]oxy)éthyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle sont obtenus.

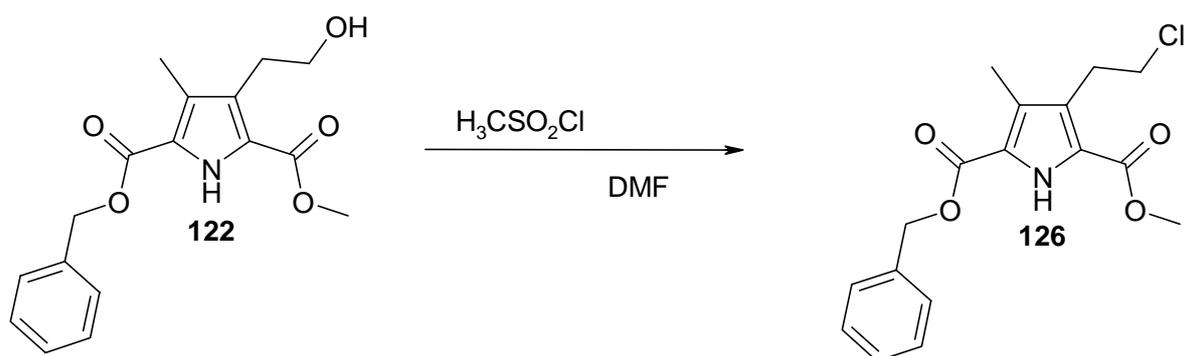
Point de fusion : 123-124°C.

CCM : R_f=0.16 (gel de silice, hexane :AcOEt (3 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 2.21 (s, 3H, H₃C(3¹)) ; 2.39 (s, 3H, H₃C-Ar) ; 3.05 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, H₂C(3¹)) ; 3.79 (s, 3H, H₃CO) ; 4.14 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, H₂C(3²)) ; 5.33 (s, 2H, H₂C-Ar) ; 7.21 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, 2xH_{aromatiques}) ; 7.37-7.42 (m, 5H, 5xH_{aromatiques}) ; 7.63 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, 2xH_{aromatiques}).

SM (FAB, NOBA) : 471 ([M]⁺, 100%).

12.2.2. La préparation du 4-(2-chloroéthyl)-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.



100 mg

317.13 g/mol

0.33 mmol

1 ml

114.55 g/mol

≈13 mmol

(111 mg)

335.8 g/mol

(0.33 mmol)

100 mg (0.33 mmol) de 4-(2-hydroxyéthyl)-5-méthoxycarbonyl-3-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**122**) sont dissous dans 9 ml de DMF. 1 ml de chlorure de mésyle est ajouté, puis le milieu réactionnel est chauffé à 80°C durant 4 heures. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi et extrait avec 3x50 ml de dichlorométhane. Une fois la phase organique séchée sur sulfate de sodium anhydre et le solvant évaporé, le résidu fourni est purifié par chromatographie sur colonne ($\varnothing=15$ mm, $l=13$ cm, gel de silice, hexane :AcOEt (5 :1)). 72 mg (65%) du chlorure désiré sont ainsi obtenus.

Point de fusion : 99-100°C.

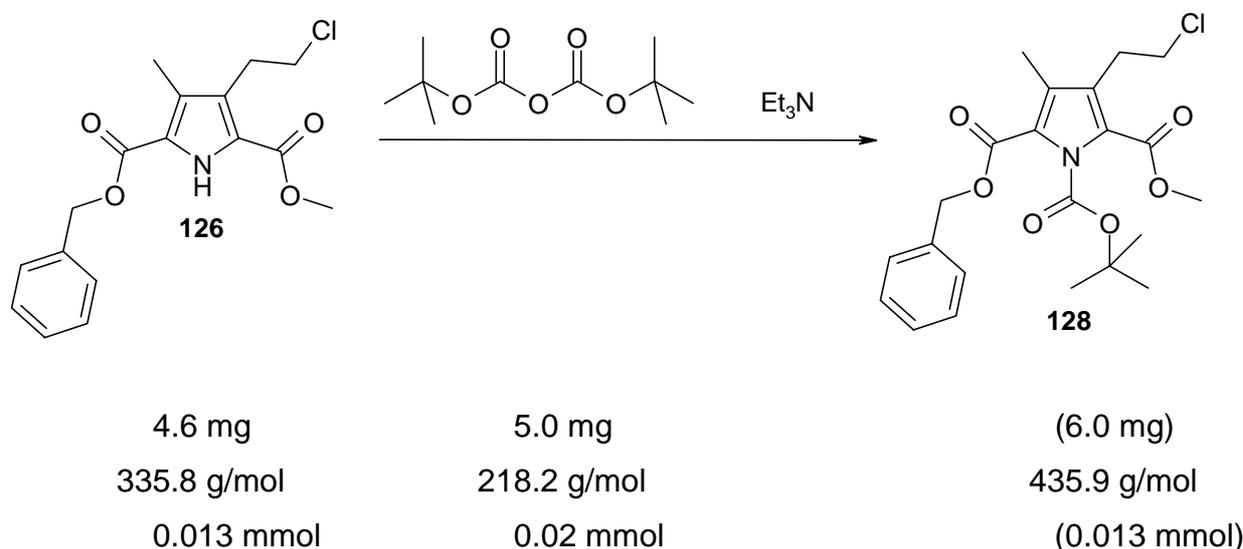
CCM : R_f=0.21 (gel de silice, hexane :AcOEt (5 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 2.32 (s, 3H, H₃C(3¹)) ; 3.18 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, H₂C(4¹)) ; 3.63 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, H₂C(4²)) ; 3.88 (s, 3H, H₃CO) ; 5.33 (s, 2H, OCH₂-Ar) ; 7.37-7.42 (m, 5H, 5xH_{aromatiques}).

RMN-¹³C : (50 MHz, CDCl₃, δ (CDCl₃)) : 10.6 C(3¹) ; 28.5 (C(4¹)) ; 44.58 (C(4²)) ; 52.28 (H₃CO) ; 66.96 (OCH₂-Ar) ; 122.18, 122.29, 128.58, 128.84 (4xC_{quaternaires} pyrrole) ; 128.0-129.13 (5xC_{aromatiques} tertiaires) ; 136.11 (C_{aromatique} quaternaire) ; 161.05, 162.13 (2xC=O_{ester}).

SM (Cl, CH₄) : 336 ([M]⁺, 26%), 91 (100%).

12.2.3. La préparation du 1-*tert*-butoxycarbonyl-4-(2-chloroéthyl)-5-méthoxy-carbonyl-3-méthyl-pyrrole-2-carboxylate de benzyle.



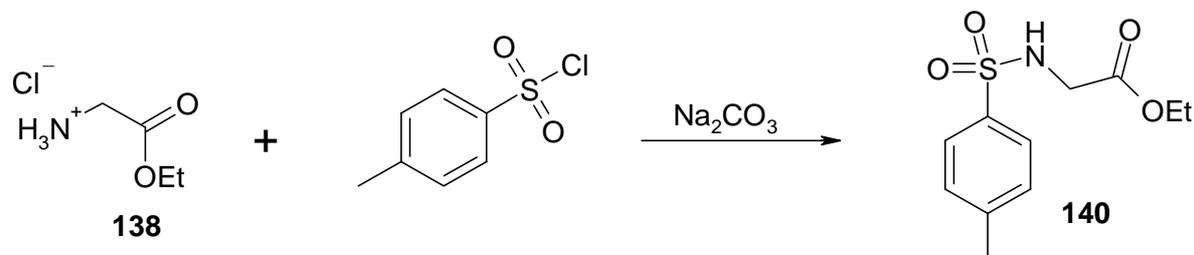
4.6 mg (0.013 mmol) de 4-(2-chloroéthyl)-5-méthoxy-carbonyl-3-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de benzyle (**126**) sont dissous dans 1 ml de CH₂Cl₂. Une quantité catalytique de DMAP est ajoutée en même temps que 3 gouttes de triéthylamine et 5 mg de (BOC)₂O. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 48 heures sous argon, puis il est versé sur 10 ml d'eau. Le mélange obtenu est extrait avec 3x15 ml de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne (Ø=10 mm, l=9 cm, gel de silice, hexane :AcOEt (5 :1) (v/v)). 5.5 mg (92%) d'une huile légèrement jaune sont obtenus.

CCM : R_f=0.39 (gel de silice, hexane :AcOEt (5 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 1.59 (s, 9H, *tert*-Bu) ; 2.24 (s, 3H, H₃C(3¹)) ; 3.13 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, H₂C(4¹)) ; 3.59 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, H₂C(4²)) ; 3.87 (s, 3H, H₃CO) ; 5.33 (s, 2H, OCH₂-Ar) ; 7.37-7.40 (*m*, 5H, 5xH_{aromatiques}).

12.3. Vers la synthèse du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-maléimide

12.3.1. La synthèse du N-tosyl-glycinate d'éthyle



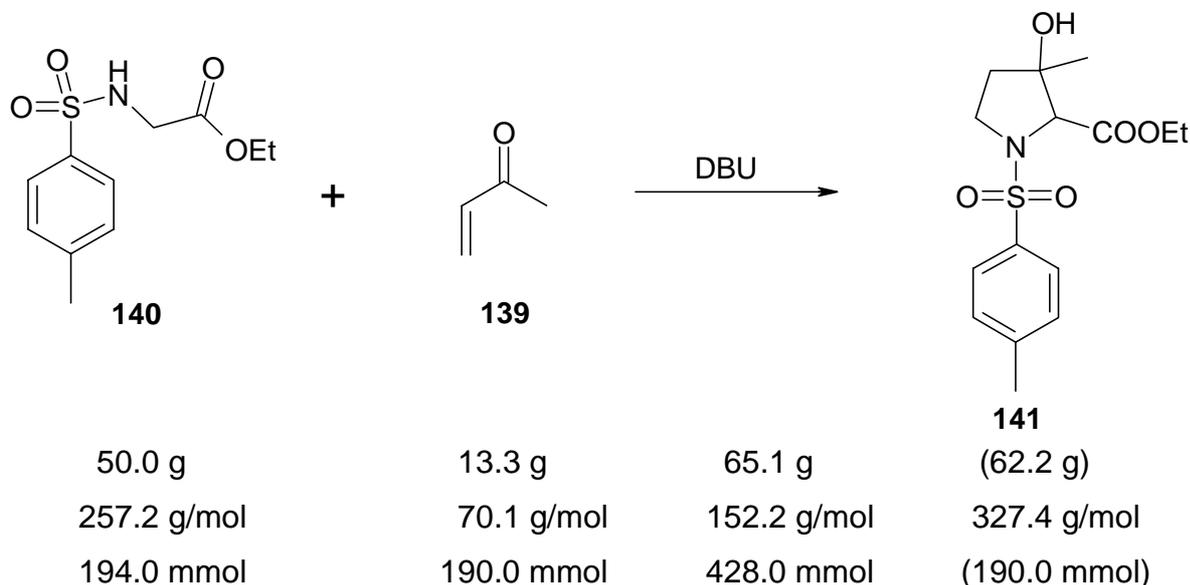
40.0 g	48.0 g	30.0 g	(64.3 g)
139.6 g/mol	190.6 g/mol	106.0 g/mol	257.2 g/mol
290.0 mmol	250.0 mmol	283.0 mmol	(250.0 mmol)

40 g (290 mmol) d'hydrochlorure de glycinate d'éthyle (**138**) sont dissous dans un ballon de 500 ml contenant 80 ml d'eau. 48 g (250 mmol) de chlorure de *p*-toluènesulfonyl dissous dans 280 ml d'éther sont ajoutés. Le mélange est fortement agité à température ambiante et 30 g (283 mmol) de carbonate de sodium sont ajoutés gentiment. Après 3 heures de forte agitation, la phase organique est séparée, lavée à l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre. La solution est filtrée et le solvant est éliminé pour fournir 56 g (87%) d'une huile qui cristallise aussitôt en un composé blanc.

Point de fusion : 63-64°C.

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 1.15 (*t*, *J*=11 Hz, 3H, OCH₂CH₃) ; 2.38 (*s*, 3H, Ar-CH₃) ; 3.73 (*d*, *J*=9 Hz, 2H, NCH₂) ; 4.03 (*q*, *J*=11 Hz, 2H, OCH₂) ; 5.55 (*t*, *J*=9 Hz, 1H, N-H) ; 7.27, 7.75 (*d*, *J*=12 Hz, 2x2H, 4xH_{aromatiques}).

12.3.2. La synthèse du 3-hydroxy-3-méthyl-1-(*p*-toluènesulfonyl)-pyrrolidine-2-carboxylate d'éthyle.

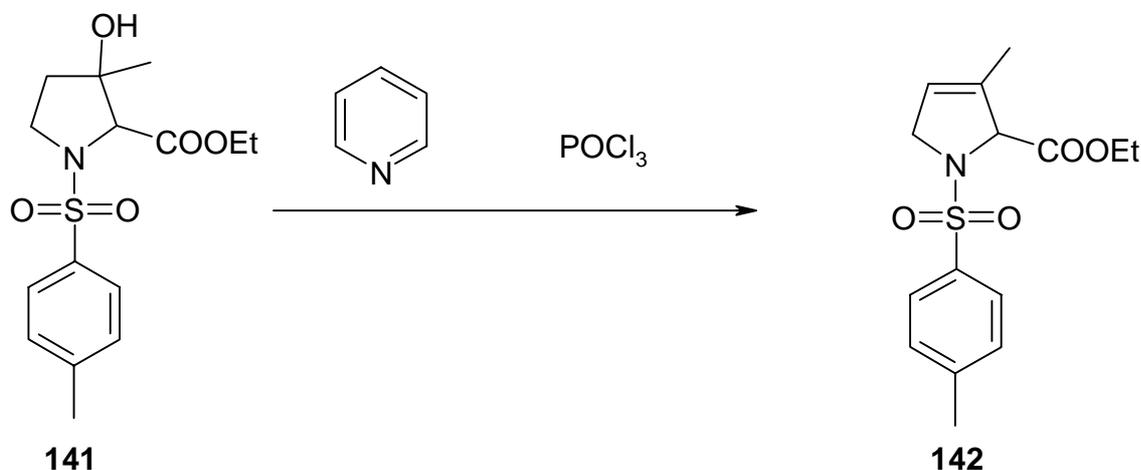


65.1 g (428 mmol) de DBU sont ajoutés à une solution composée de 13.32 g (190 mmol) de méthyl-vinyl-cétone (**139**) et 50 g (194 mmol) de 1-(*p*-toluènesulfonyl)-glycinate d'éthyle (**140**) dans 165 ml de THF. Ce mélange brunâtre est agité à température ambiante durant une nuit. Il est ensuite dilué avec du diéthyléther (500 ml). La phase organique est ensuite lavée avec une solution d'HCl 5%. Une fois le pH de la phase aqueuse acide, la phase organique est lavée avec une solution de Na₂CO₃ 5%, puis à l'eau jusqu'à pH neutre. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée, puis le solvant est évaporé. On obtient 48 g (77%) d'une huile brunâtre qui cristallise sporadiquement.

Point de fusion : 106-108°C.

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 1.20 (*t*, *J*=8 Hz, 3H, OCH₂CH₃) ; 1.23 (*s*, 3H, H₃C(3¹)) ; 1.98 (*t*, *J*=8 Hz, 2H, H₂C(4)) ; 2.37 (*s*, 3H, CH₃-Ar) ; 2.50 (*s*, 1H, OH) ; 3.43 (*t*, *J*=8 Hz, 2H, H₂C(5)) ; 4.05 (*s*, 1H, CH) ; 4.13 (*q*, *J*=8 Hz, 2H, OCH₂) ; 7.28, 7.77 (*d*, *J*=8 Hz, 2x2H, 4xH_{aromatiques}).

12.3.3. La synthèse du mélange 3-méthyl-1-*p*-tosyl- Δ^3 -pyrroline-2-carboxylate d'éthyle.



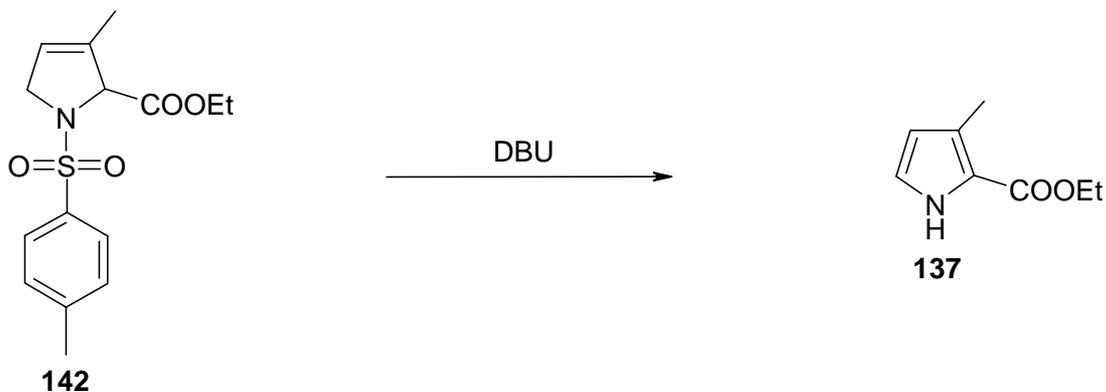
35.0 g	280.0 ml	41.0 g	(33.1 g)
327.4 g/mol	79.1 g/mol	153.3 g/mol	309.4 g/mol
107.0 mmol	3.5 mol	267.0 mmol	(107.0 mmol)

Dans un ballon tricol de 500 ml muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à ajout, 35 g (107 mmol) 3-hydroxy-3-méthyl-1-*p*-toluènesulfonyl-pyrrolidine-2-carboxylate d'éthyle sont dissous dans 280 ml de pyridine. Par l'ampoule à ajout, 41 g (267 mmol) d'oxychlorure de phosphore sont rajoutés en l'espace de 10 minutes et le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite versé sur de la glace et extrait au diéthyloxy (750 ml). La phase organique est lavée avec une solution d'HCl 5%. Une fois le pH de la phase aqueuse acide, la phase organique est lavée avec une solution de Na₂CO₃ 5%, puis à l'eau jusqu'à pH neutre. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée, puis évaporée. Une huile (28.1 g, 85%) qui cristallise lorsqu'elle est placée au réfrigérateur est récoltée.

Point de fusion : 124-125°C.

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 1.28 (*t*, *J*=8 Hz, 3H, OCH₂CH₃) ; 1.70 (*s*, 3H, H₃C-C(3)) ; 2.43 (*s*, 3H, Ar-CH₃) ; 4.0-4.5 (*m+q*, *J*=8 Hz, 4H, H₂C(5)+OCH₂CH₃) ; 4.8 (*m*, 1H, HC(2)) ; 5.5 (*m*, 1H, HC(4)) ; 7.33, 7.75 (*d*, *J*=8 Hz, 2x2H, 4xH_{aromatiques}).

12.3.4. La synthèse du 3-méthyl-1H-pyrrole-2-carboxylate d'éthyle



20.0 g	22.3 g	(10.0 g)
309.4 g/mol	152.2 g/mol	153.2 g/mol
65.0 mmol	146 mmol	(65.0 mmol)

Dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à ajout, 20 g (65 mmol) de 3-méthyl-1-*p*-tosyl- Δ^3 -pyrroline-2-carboxylate d'éthyle (**142**) sont dissous dans 150 ml de THF. 22.3 g (146 mmol) de DBU sont ajoutés progressivement et le mélange est agité une nuit à reflux. Le mélange est refroidi à température ambiante, puis il est dilué avec 500 ml d'éther diéthylique. La phase organique est lavée avec une solution d'HCl 5%. Une fois le pH de la phase aqueuse acide, on lave la phase organique avec une solution de Na₂CO₃ 5%, puis à l'eau jusqu'à pH neutre. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée, puis évaporée pour fournir une huile, qui cristallise dans un bain de glace. Après recristallisation dans de l'hexane, on obtient 7.1 g (71%) de solide blanc.

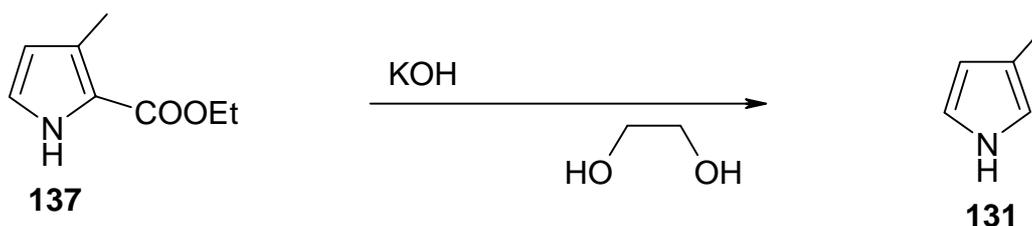
Point de fusion : 56-57°C.

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 1.35 (*t*, $J=7.15$ Hz, 3H, OCH₂CH₃) ; 2.37 (*s*, 3H, H₃C(3¹)) ; 4.32 (*q*, $J=7.15$ Hz, 2H, OCH₂CH₃) ; 6.09 (*dd*, $J_1=J_2=2.7$ Hz, 1H, HC(4)) ; 6.81 (*dd*, $J_1=J_2=2.7$ Hz, 1H, HC(5)) ; 8.3 (*s br*, 1H, H-N).

RMN-¹³C : (50.3 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 13.25 (C(3¹)) ; 14.92 (C(CO₂CH₂CH₃)) ; 60.41 (C(CO₂CH₂CH₃)) ; 112.9, 122.6 (2xC_{tertiaires}) ; 119.8, 128.4 (2xC_{quaternaires}) ; 162.4 (C(CO₂Et)).

SM (EI) : 153 (100%), 124 (72%), 108 (91%), 80 (52%).

12.3.5. La synthèse du 3-méthyl-pyrrole



6.3 g	12.6 g	76.0 ml	(3.3 g)
153.2 g/mol	56.1 g/mol	63.1 g/mol	81.1 g/mol
41.0 mmol	225 mmol		(41.0 mmol)

Un appareil à distillation est monté avec dans le ballon de départ 6.3 g (41 mmol) de 3-méthylpyrrole-2-carboxylate d'éthyle (**137**) mélangé avec 12.6 g (225 mmol) de KOH et 76 ml d'éthylène glycol. Le milieu réactionnel est distillé à pression atmosphérique en chauffant le mélange progressivement jusqu'à 200°C. Durant ce temps, le distillat est récolté, puis, lorsque les vapeurs atteignent environ 150°C, la distillation est stoppée et le milieu réactionnel est refroidi jusqu'à température ambiante. 65 ml d'eau sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel et la distillation est reprise selon le même procédé. Les distillats sont rassemblés, puis dilués dans 26 ml d'eau. Cette solution est alors extraite 4 fois avec 50 ml de dichlorométhane. La phase organique est finalement séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et le CH₂Cl₂ est évaporé. Le résidu est encore distillé à pression réduite et 2.25 g (68%) de produit final qui distille à 62-64°C à une pression d'environ 30 mmHg est récolté.

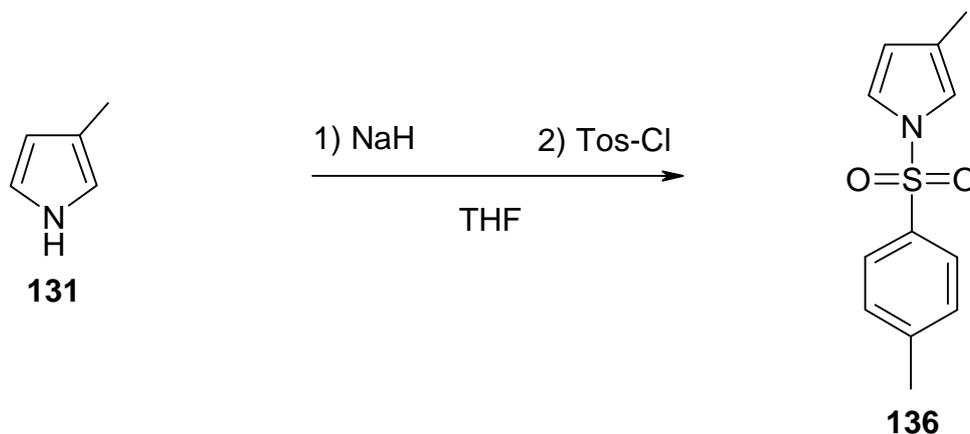
CCM : R_f=0.44 (gel de silice, hexane :acétone (3 :1 (v/v)), Ehrlich).

RMN-¹H : (500 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.37 (s, 3H, H₃C) ; 6.06 (m, 1H, HC(4)) ; 6.52 (m, 1H, HC(2)) ; 6.66 (m, 1H, HC(5)) ; 7.87 (s br, 1H, H-N).

RMN-¹³C : (50 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 12.31 (C(3¹)) ; 110.17, 116.1, 118.3 (3xC_{tertiaires} C(2)+C(4)+C(5)) ; 119.2 (1xC_{quaternaire} C(3)).

SM (EI): 80 ([M]⁺, 100%).

12.3.6. La synthèse du 3-méthyl-1-tosyl-pyrrole



2.0 g	1.2 g	5.7 g	(5.9 g)
80.0 g/mol	24.0 g/mol	191.0 g/mol	235 g/mol
25.0 mmol	50.0 mmol	30.0 mmol	(25.0 mmol)

2 g (25 mmol) de 3-méthyl-pyrrole (**131**) sont dissous dans 25 ml de THF sec. 1.2 g de NaH (50 mmol) sont ajoutés, et le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 1 heure. La solution devient jaune vert et se trouble. 1.2 éq. de chlorure de tosylo (5.7 g ; 30 mmol) dissous dans 15 ml de THF sont ajoutés, et la solution résultante est agitée à température ambiante durant une nuit. La réaction est ensuite stoppée en versant le milieu réactionnel sur de l'eau glacée. Cette phase aqueuse est extraite 4-5 fois avec 50 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée 3 fois avec 50 ml de carbonate de sodium 5%, puis séchée et le solvant organique est évaporé. L'huile foncée qui cristallise est dissoute dans 50 ml de dichlorométhane, puis 5 g de gel de silice y sont ajoutés. Le solvant est complètement éliminé, et le produit avec le gel de silice est déposé sur une colonne de gel de silice pour être filtré avec comme éluant hexane : acétone (1 :1 (v/v)). Une

fois le solvant évaporé, 4.11 g (70%) d'une huile rose qui cristallise aussitôt sont obtenus.

Point de fusion : 59-60°C.

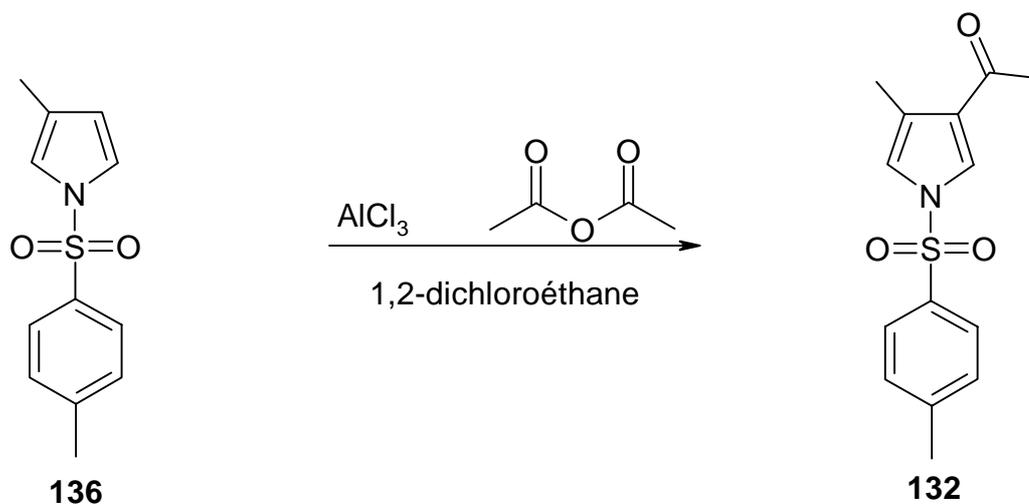
CCM : $R_f = 0.48$ (gel de silice, hexane :acétone (3 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (360.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.02 (*d*, $J=0.9$ Hz, 3H, H₃C(3¹)) ; 2.40 (*s*, 3H, H₃C-Ar) ; 6.12 (*m*, 1H, HC(4)) ; 6.88 (*m*, 1H, HC(2)) ; 7.06 (*m*, 1H, HC(5)) ; 7.27, 7.72 (*d*, $J=8$ Hz, 2x2H, 4xH_{aromatiques}).

RMN-¹³C : 12.33 (C(3¹)) ; 22.07 (CH₃-Ar) ; 116.26, 118.3, 121.33 (C(2)+C(4)+C(5)) ; 136.58 (C(3)) ; 125.0, 127.2, 130.3, 145.1 (6xC_{aromatiques}).

SM (EI): 235 ([M]⁺, 76%), 155 (80%), 91 (100%), 80 (37%).

12.3.7. La synthèse du 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole



0.5 g	1.7 g	0.65 g	(0.589 g)
235.0 g/mol	133.0 g/mol	102.0 g/mol	277.0 g/mol
2.12 mmol	12.72 mmol	6.36 mmol	(2.12 mmol)

1.7 g d'AlCl₃ sont suspendus dans 25 ml de 1,2-dichloroéthane. 650 mg d'anhydride acétique sont ajoutés et la solution est agitée à température ambiante durant 10 minutes. 0.5 g (2.12 mmol) de 3-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**136**) dissous dans 10 ml de 1,2-dichloroéthane sont ensuite ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à

température ambiante pour une nuit, puis il est versé sur un mélange eau/glace, et ce dernier est extrait 3 fois avec 50 ml de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ anhydre et le solvant est éliminé. Cette étape fournit 589 mg (99%) d'un produit qui cristallise dans le ballon.

Point de fusion : 135-137°C.

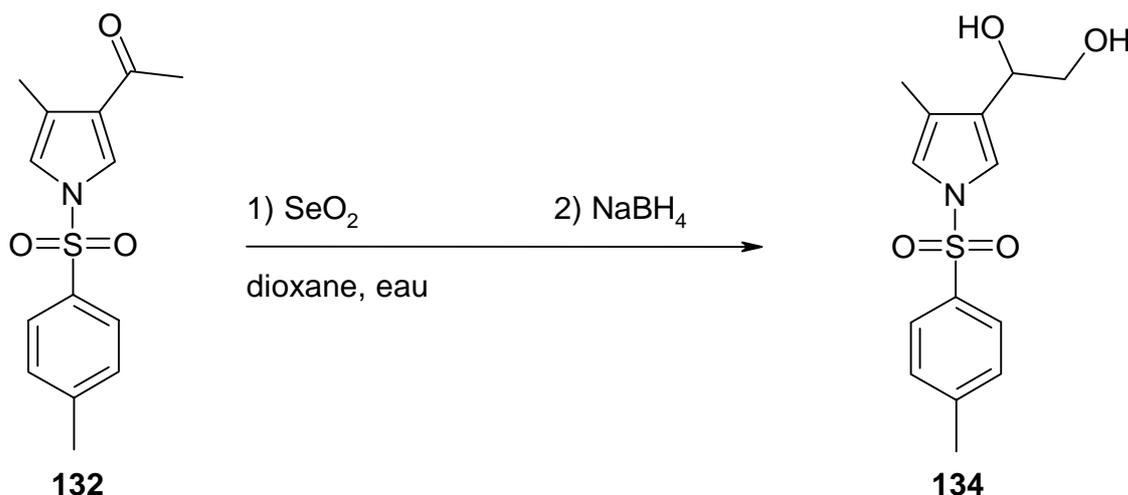
CCM : R_f= 0.34 (gel de silice, hexane :acétone (3 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 2.17 (dd, J₁=1.2 Hz, J₂=0.25 Hz, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.36 (s, 3H, H₃C(3²)) ; 2.38 (s, 3H, H₃C-Ar) ; 6.88 (dd, J₁=2.32 Hz, J₂=1.2 Hz, 1H, HC(5)) ; 7.67 (dd, J₁=2.32 Hz, J₂=0.25 Hz, 1H, HC(2)) ; 7.29, 7.76 (d, J=8 Hz, 2x2H, 4xH_{aromatiques}).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 11.9 (C(4¹)) ; 21.5 (CH₃-Ar) ; 27.7 (C(3²)) ; 119.1, 126.0 (C(2)+C(5)) ; 124.7, 127.4 (C(3)+C(4)) ; 126.9, 130.1, 135.0, 145.6 (6xC_{aromatiques}) ; 193.8 (C(3¹)).

SM (EI): 277 ([M]⁺, 72%), 262 (43%), 155 (63%), 122 (100%), 91 (96%), 80 (24%).

12.3.8. La synthèse du 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole



2.5 g	4.0 g	1.0 g	(2.65 g)
277.0 g/mol	111.0 g/mol	37.9 g/mol	295.3 g/mol
9.0 mmol	36.0 mmol	27.0 mmol	(9.0 mmol)

4 g de SeO_2 (36 mmol) sont suspendus dans 45 ml de dioxane et 18 ml d'eau. La solution est chauffée à reflux durant 30 min. afin d'obtenir une solution claire. Le milieu réactionnel est refroidi jusqu'à température ambiante, puis 2.5 g (9 mmol) de 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**) dissous dans 18 ml de dioxane sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux durant 5 heures avant d'être refroidi jusqu'à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré sur célite, et les résidus sont lavés avec du dichlorométhane. Le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans 80 ml d'EtOH. La solution ainsi obtenue est refroidie dans un bain de glace à 0°C , après quoi 1.0 g (27 mmol) de NaBH_4 est ajouté. La solution résultante est agitée durant 1 heure, après quoi la réaction est stoppée avec une solution de NH_4Cl saturée. Une extraction du milieu réactionnel au moyen de dichlorométhane, le séchage de la phase organique sur du Na_2SO_4 anhydre et l'évaporation du solvant fournissent 1.88 g (71%) d'un composé huileux.

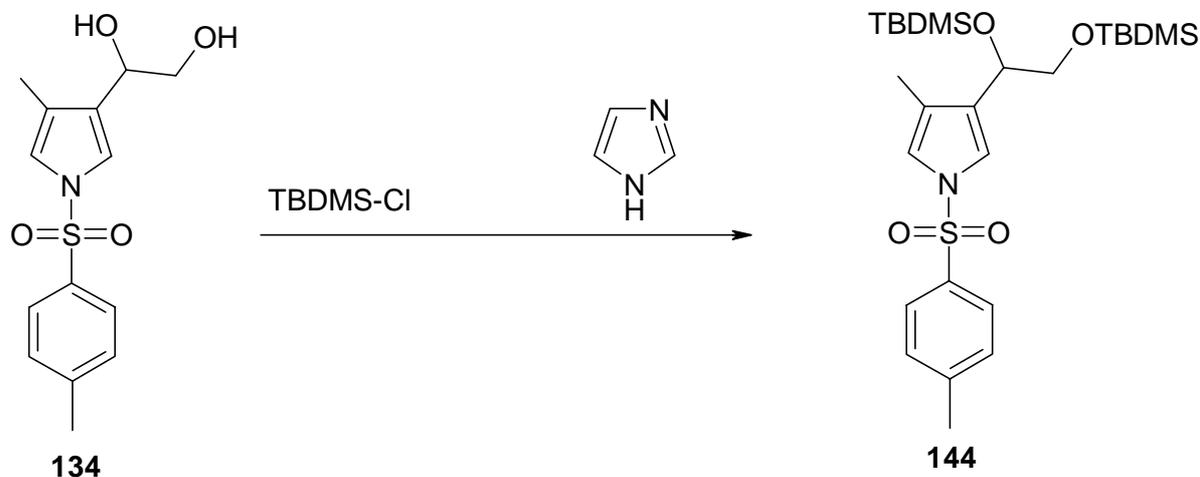
CCM : $R_f = 0.15$ (gel de silice, hexane :acétone (2 :1 (v/v)), UV).

RMN- ^1H : (500.13 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{TMS})$) : 1.90 (*dd*, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 0.3$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{C}(4^1)$) ; 2.39 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{C-Ar}$) ; 2.60, 2.80 (2xs *br*, 2H, 2xOH) ; 3.60 (*ABX*, $J_{AB} = 11.3$ Hz, $J_{AX} = 8.05$ Hz, 1H, $\text{H}_A\text{C}(3^2)$) ; 3.70 (*ABX*, $J_{AB} = 11.3$ Hz, $J_{BX} = 3.3$ Hz, 1H, $\text{H}_B\text{C}(3^2)$) ; 4.65 (*ABX*, $J_{AX} = 8.05$ Hz, $J_{BX} = 3.3$ Hz, 1H, $\text{H}_X\text{C}(3^1)$) ; 6.86 (*dd*, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, HC(5)) ; 7.10 (*dd*, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 0.3$ Hz, 1H, HC(2)) ; 7.27, 7.72 (*d*, $J = 8$ Hz, 2x2H, 4x $\text{H}_{\text{aromatiques}}$).

RMN- ^{13}C : (125.76 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{CDCl}_3)$) : 10.4 ($\text{C}(4^1)$) ; 21.4 ($\text{CH}_3\text{-Ar}$) ; 66.3 ($\text{C}(3^2)$) ; 68.2 ($\text{C}(3^1)$) ; 118.1, 118.5 ($\text{C}(2)+\text{C}(5)$) ; 122.6, 128.0 ($\text{C}(3)+\text{C}(4)$) ; 126.8, 129.9, 135.9, 144.9 (6x $\text{C}_{\text{aromatiques}}$).

SM (ESI): 296 ($[\text{MH}]^+$, 95%), 278 ($[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 75%).

12.3.9. La synthèse du 3-(1,2-bis{*tert*-butyl(diméthyl)silyl}-oxy)éthyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole



83.0 mg	102.0 mg	95 mg	(146.0 mg)
295.4 g/mol	150.7 g/mol	68.1 g/mol	523.9 g/mol
0.28 mmol	0.68 mmol	1.4 mmol	(0.28 mmol)

Dans un ballon de 5 ml, 83 mg (0.28 mmol) de 3-(1,2-dihydroxyéthyl)-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**134**), 2 ml de DMF, 102 mg de TBDMSCl, et 95 mg d'imidazole sont agités à température ambiante. Après 3 heures, le milieu réactionnel est versé sur 20 ml d'eau, et est extrait avec 3x30 ml de chlorure de méthylène. La phase organique est lavée avec 2x30 ml d'acide citrique 5%, 2x30 ml du carbonate de sodium 5%, 2x30 ml d'eau. Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne (Ø=25 mm, l=12 cm, gel de silice, hexane :CH₂Cl₂ (2 :1) (v/v)). 127 mg (87%) du pyrrole doublement silylé est obtenu.

Point de fusion : 75-76°C.

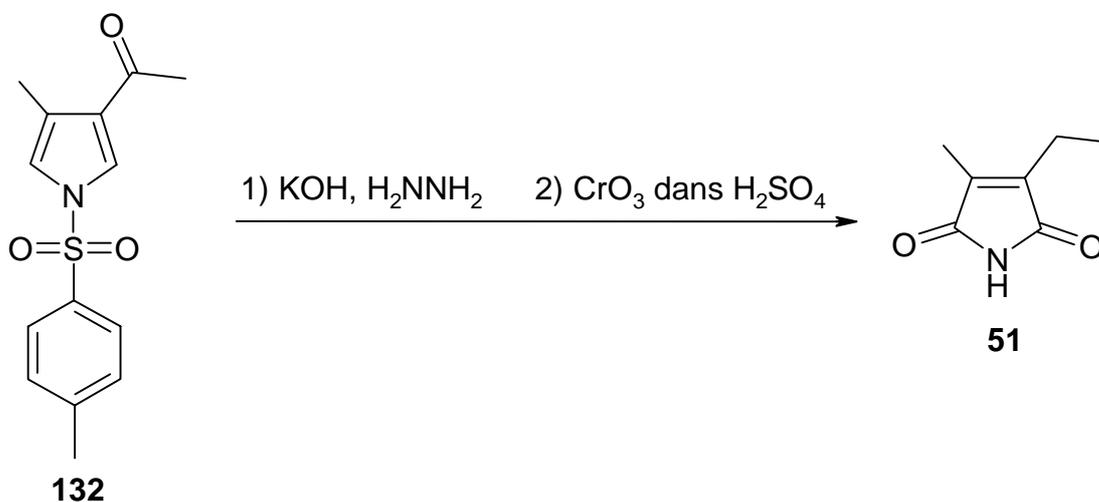
CCM : R_f = 0.50 (gel de silice, hexane :CH₂Cl₂ (2 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : -0.15, -0.07, -0.05, -0.02 (4xs, 4x3H, 4xH₃CSi) ; 0.9 (2xs, 2x9H, 2x*tert*-Bu) ; 1.97 (s, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.38 (s, 3H, H₃C-Ar) ; 3.52 (m, 2H, H₂C(3²)) ; 4.53 (m, 1H, HC(3¹)) ; 6.80, 6.97 (2xm, 2x1H, HC(2+5)) ; 7.22, 7.69 (d, J=8 Hz, 2x2H, 4xH_{aromatiques}).

RMN-¹³C : (50.3 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : -5.48, -5.38, -5.00, -4.82 (4xCH₃-Si) ; 10.81 (C(4¹)) ; 18.26, 18.41 (2xC_{quaternaire} *tert*-Bu) ; 21.56 (CH₃-Ar) ; 25.8, 25.96 (6xCH₃ *tert*-Bu) ; 68.77 (C(3²)) ; 70.15 (C(3¹)) ; 118.27, 118.89 (C(2)+C(5)) ; 122.92, 130.84 (C(3)+C(4)) ; 126.75, 129.78 (4xC_{aromatiques} tertiaires) ; 136.41, 135.0 (2xC_{aromatiques} quaternaires).

SM (ESI) : 546.26 ([M+Na]⁺, 100%), 524.27 ([MH]⁺, 40%).

12.3.10. La synthèse du 3-éthyl-4-méthyl-maléimide



200.0 mg	180.0 mg, 180.0 mg	(100.0 mg)
277.3 g/mol	40 g/mol, 50 g/mol	139.1 g/mol
0.72 mmol	3.2 mmol, 3.6 mmol	(0.72 mmol)
	3 mmol	

Un mélange constitué de 200 mg de 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (0.72 mmol), 180 mg de KOH, 180 mg d'hydrazine monohydrate et de 2 ml de triéthylenglycol est chauffé à reflux durant 1h30. La distillation au moyen d'un microdistillateur du milieu réactionnel permet de retirer le mélange de solvants. Le ballon de départ est refroidi, puis de l'eau est ajoutée (25 ml). Une extraction au diéthyloéther (3x25 ml) permet d'extraire le 3-éthyl-4-méthyl-1*H*-pyrrole formé. Une fois la phase organique séchée sur sulfate de sodium anhydre et l'éther évaporé, le résidu est dissous dans 5 ml d'acétone et 30 ml d'une solution d'acide chromique 1% dans H₂SO₄ 2N. Après 3 heures de réaction, le mélange réactionnel est extrait au moyen de diéthyloéther. La

phase organique est séchée sur Na_2SO_4 anhydre et l'éther est évaporé. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne ($\varnothing=10$ mm, $l=19$ cm, gel de silice, CH_2Cl_2 :acétone (95 :5) (v/v)). 16.0 mg (16%) du éthyl-méthyl-maléimide sont obtenus.

Point de fusion : 66-67°C.

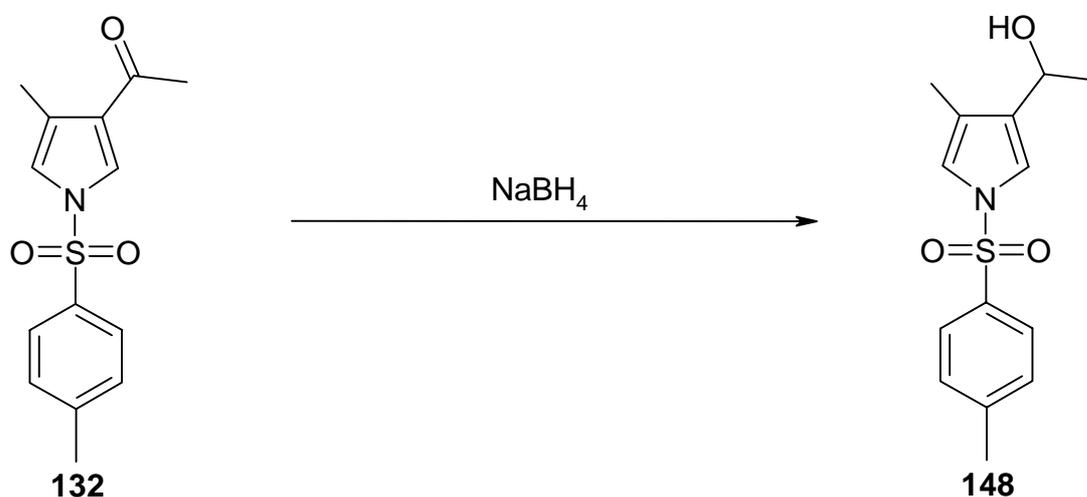
CCM : $R_f=0.49$ (gel de silice, CH_2Cl_2 :acétone (95 :5 (v/v)), Cl_2 /benzidine).

RMN- ^1H : (200 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{TMS})$) : 1.12 (*t*, $J=7.7$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{C}(3^2)$) ; 1.97 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{C}(4^1)$) ; 2.40 (*q*, $J=7.7$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$) ; 7.7 (*s br*, 1H, NH).

RMN- ^{13}C : (50.3 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{CDCl}_3)$) : 8.91 ($\text{C}(4^1)$) ; 13.08 ($\text{C}(3^2)$) ; 17.51 ($\text{C}(3^1)$) ; 138.12, 143.83 ($\text{C}(3)+\text{C}(4)$) ; 172.25, 172.65 ($2\times\text{C}=\text{O}$).

SM (EI) : 123 ($[\text{M}]^+$, 83%) ; 108 (100%) ; 80 (50%).

12.3.11. La synthèse du 3-(1-hydroxyéthyl)-4-méthyl-N-tosyl-pyrrole



124.0 mg

277.0 g/mol

0.45 mmol

34.0 mg

37.9 g/mol

0.9 mmol

(125.0 mg)

279.3 g/mol

(0.45 mmol)

124 mg (0.45 mmol) de 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**) sont dissous dans 2 ml d'EtOH et le milieu réactionnel est refroidi à 0°C dans un bain de glace. 34 mg (0.9 mmol) de NaBH₄ suspendus dans 2 ml d'EtOH sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité durant 2 heures, après quoi de l'eau est ajoutée jusqu'à ce que le dégagement gazeux cesse. Le milieu réactionnel est versé sur 10 ml d'eau et la phase aqueuse obtenue est extraite avec 3x20 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec du carbonate de sodium 5% (2x20 ml), puis avec de l'eau (2x20 ml). Après séchage de la phase organique sur sulfate de sodium anhydre, le solvant est évaporé et les 106 mg (85%) de l'huile obtenue ne nécessitent pas d'autre purification.

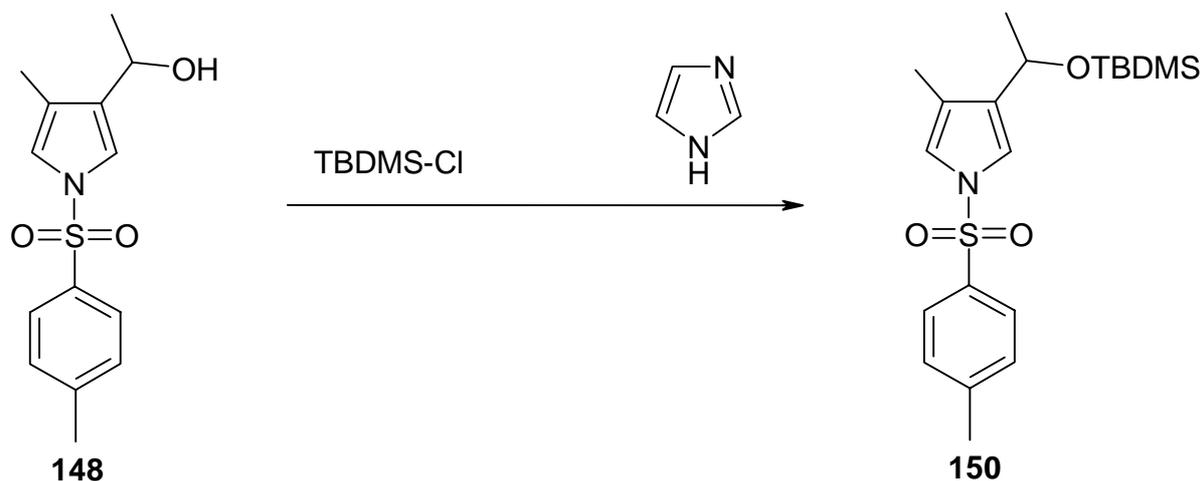
CCM : R_f = 0.25 (gel de silice, hexane :acétone (3 :1 (v/v)), UV).

RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ(TMS)) : 1.42 (*d*, *J*=6.5 Hz, 3H, H₃C(3²)) ; 1.92 (*s br*, 1H, OH) ; 2.05 (*d*, *J*=1.19 Hz, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.38 (*s*, 3H, H₃C-Ar) ; 4.73 (*qd*, *J*₁=6.5 Hz, *J*₂=0.8 Hz, 1H, HC(3¹)) ; 6.86 (*dq*, *J*₁=2.3 Hz, *J*₂=1.19 Hz, 1H, HC(5)) ; 7.03 (*dd*, *J*₁=2.3 Hz, *J*₂=0.8 Hz 1H, HC(2)) ; 7.26 (*m*, 2H, 2xH_{aromatiques}) ; 7.31 (*m*, 2xH, 2xH_{aromatiques}).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : 10.38 (C(4¹)) ; 21.49 (CH₃-Ar) ; 23.13 (C(3²)) ; 63.34 (C(3¹)) ; 116.87, 118.57 (C(2)+C(5)) ; 122.92, 133.18 (C(3)+C(4)) ; 126.73, 129.84 (4xC_{aromatiques} tertiaires) ; 136.04, 144.71 (2xC_{aromatiques} quaternaires).

SM (EI) : 279 ([M]⁺, 84%), 264 (93%), 262 (77%), 155 (90%), 91 (100%).

12.3.12. La synthèse du 3-(1-[[*tert*-butyl(diméthyl)silyl]oxy]-éthyl)-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole



100.0 mg	65.0 mg	61.0 mg	(141.7 mg)
279.3 g/mol	150.7 g/mol	68.1 g/mol	393.6 g/mol
0.36 mmol	0.43 mmol	0.9 mmol	(0.36 mmol)

100 mg (0.36 mmol) de 3-(1-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**148**) sont dissous dans 2 ml de DMF. 65 mg de TBDMSCl et 61 mg d'imidazol sont ajoutés. La solution est agitée à température ambiante. Après 3 heures, le milieu réactionnel est versé sur 20 ml d'eau, et extrait avec 3x30 ml de chlorure de méthylène. La phase organique est lavée avec 2x30 ml d'acide citrique 5%, 2x30 ml de carbonate de sodium 5%, 2x30 ml d'eau. Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne ($\varnothing=25$ mm, $l=14$ cm, gel de silice, hexane :CH₂Cl₂ (2 :1)). 112 mg (79%) de pyrrole silylé sont obtenus.

Point de fusion : 57-59°C.

CCM : $R_f=0.13$ (hexane :CH₂Cl₂ (2 :1 (v/v)), gel de silice, UV)

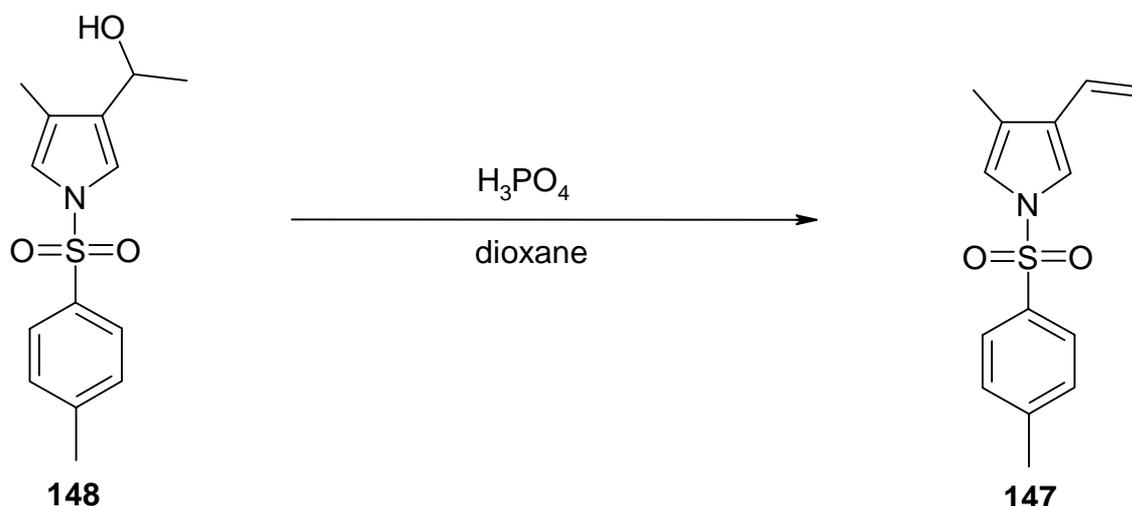
RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : -0.11, -0.03 (2xs, 2x3H, 2xH₃CSi) ; 0.83 (s, 9H, *tert*-Bu) ; 1.33 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, H₃C(3²)) ; 1.98 (d, $J=1.1$ Hz, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.38

(s, 3H, H₃C-Ar) ; 4.70 (*qd*, $J_1=6.3$ Hz, $J_2=0.6$ Hz, 1H, H-C(3¹)) ; 6.81 (*dq*, $J_1=2.3$ Hz, $J_2=1.1$ Hz, 1H, H-C(5)) ; 6.96 (*dd*, $J_1=2.3$ Hz, $J_2=0.6$ Hz, 1H, H-C(2)) ; 7.25 (*m*, 2H, 2xH_{aromatiques}) ; 7.68 (*m*, 2H, 2xH_{aromatiques}).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ(CDCl₃)) : -4.96, -4,95 (2xC-Si) ; 10.71 (C(4¹)) ; 18.14 (C_{quaternaire} *tert*-Bu) ; 21.52 (CH₃-Ar) ; 25.21 (C(3²)) ; 25.76 (3xCH₃ *tert*-Bu) ; 64.88 (C(3¹)) ; 117.32, 118.56 (C(2)+C(5)) ; 122.45, 134.62 (C(3)+C(4)) ; 126.65, 129.73 (4xC_{aromatiques} tertiaires) ; 136.37, 144.44 (2xC_{aromatiques} quaternaires).

SM (ESI) : 416 ([M+Na]⁺, 100%), 394 ([MH]⁺, 10%).

12.3.13. La synthèse du 3-méthyl-1-tosyl-4-vinyl-pyrrole



100.0 mg

279.3 g/mol

0.36 mmol

90 mg

98 g/mol

0.9 mmol

(93.5 mg)

261.3 g/mol

(0.36 mmol)

A 100 mg (0.36 mmol) de 3-(1-hydroxyéthyl)-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**148**) dissous dans 2 ml de dioxane sont ajoutés 90 mg d'acide phosphorique. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux durant 12 heures, puis refroidit jusqu'à température ambiante. Après une dilution avec 20 ml d'eau, le milieu réactionnel est extrait avec du dichlorométhane (3x30 ml). La phase organique est lavée avec du carbonate de sodium 5% (3x30 ml), puis avec de l'eau (3x30 ml). Après séchage de la phase organique sur sulfate de sodium anhydre, le solvant est évaporé et le résidu est

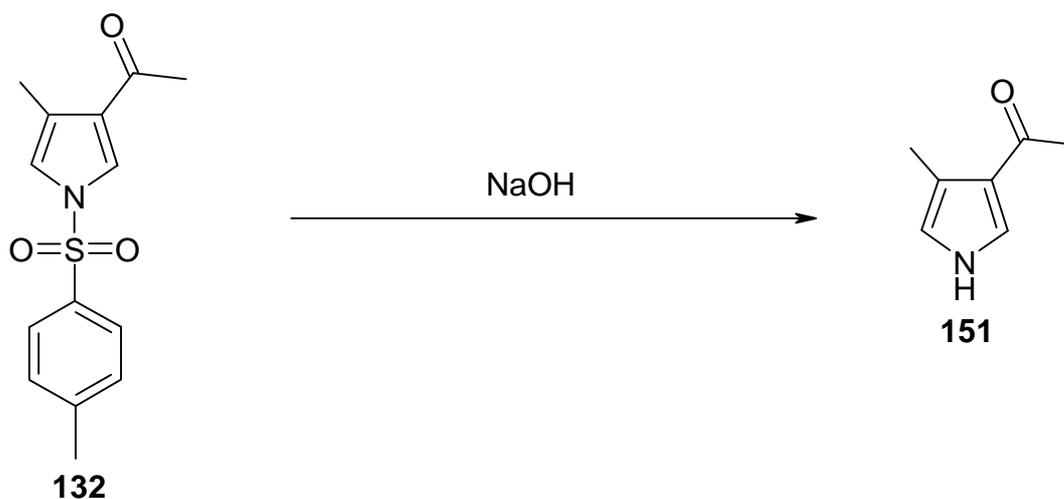
purifié par chromatographie sur colonne ($\varnothing=15$ mm, $l=11$ cm, gel de silice, hexane :CH₂Cl₂ (3 :1) (v/v)). 60.0 mg (64%) de vinyl-pyrrole sont obtenus.

CCM : $R_f=0.31$ (gel de silice, hexane :CH₂Cl₂ (3 :1) (v/v)), UV).

RMN-¹H : (500.13 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 2.05 (*d*, $J=1.19$ Hz, 3H, H₃C(4¹)) ; 2.39 (*s*, 3H, H₃C-Ar) ; 5.12 (*dd*, $J_1=11.25$ Hz, $J_2=1.37$ Hz, 1H, H_{cis}C(3²)) ; 5.45 (*dd*, $J_1=17.75$ Hz, $J_2=1.37$ Hz, 1H, H_{trans}C(3²)) ; 6.45 (*dd*, $J_1=17.75$ Hz, $J_2=11.25$ Hz, 1H, HC(3¹)) ; 6.85 (*dq*, $J_1=2.38$ Hz, $J_2=1.19$ Hz, 1H, HC(5)) ; 7.14 (*d*, $J=2.38$ Hz, 1H, HC(2)) ; 7.25 (*m*, 2H, 2xH_{aromatiques}) ; 7.72 (*m*, 2H, 2xH_{aromatiques}).

RMN-¹³C : (125.76 MHz, CDCl₃, δ (CDCl₃)) : 11.28 (C(4¹)) ; 21.59 (CH₃-Ar) ; 113.97 (C(3²)) ; 118.01, 118.68 (C(2)+C(5)) ; 123.26, 127.16 (C(3)+C(4)) ; 128.13 (C(3¹)) ; 126.82, 129.92 (4xC_{aromatiques} tertiaires) ; 136.10, 144.81 (2xC_{aromatiques} quaternaires).

12.3.14. La synthèse du 3-acétyl-4-méthyl-1H-pyrrole



238.0 mg

277.3 g/mol

0.86 mmol

10 mmol

(125.0 g)

123 g/mol

(0.86 mmol)

238 mg (0.86 mmol) de 3-acétyl-4-méthyl-1-tosyl-pyrrole (**132**) sont placés dans un ballon de 10 ml contenant 4 ml de MeOH et 2 ml de NaOH 5M. Le mélange est chauffé à reflux durant 4 heures. Le milieu réactionnel est versé sur 50 ml d'eau et la

phase aqueuse est extraite avec 3x25 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'acide citrique 5% (3x30 ml), du carbonate de sodium 5% (3x30 ml), puis avec de l'eau (3x30 ml). La phase organique est séchée et le solvant est évaporé. 103 mg (82%) de 3-acétyl-4-méthyl-1*H*-pyrrole sont obtenus.

Point de fusion : 117-119°C

CCM : $R_f=0.13$ (gel de silice, hexane :AcOEt (3 :1 (v/v)), Ehrlich).

RMN-¹H : (200 MHz, CDCl₃, δ (TMS)) : 2.32, 2.44 (2xs, 2x3H, H₃C(3²+4¹)) ; 6.55, 7.38 (2xm, 2x1H, H-C(2+5)) ; 9.1 (s br, 1H, NH).

RMN-¹³C : (50 MHz, CDCl₃, δ (CDCl₃)) : 12.16 (C(4¹)) ; 27.74 (C(3²)) ; 118.21, 125.37 (C(2)+C(5)) ; 120.52, 123.95 (C(3)+C(4)) ; 194.85 (C(3¹)).

SM (EI) : 123 ([M]⁺, 83%) ; 108 (100%) ; 80 (50%).

Bibliographie :

- [1] Battersby, A. R., *Natl. Prod. Reports* **1987**, 4, 83-87.
- [2] Moss, G. P., *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 779-832.
- [3] Merritt, J. and Loening, K. L., *Pure Appl. Chem.* **1979**, 51, 2251-2304.
- [4] Fischer, H. and Orth, H., *Die Chemie des Pyrrols*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, **1940**, volume II, 2^{ème} moitié, p. 7.
- [5] Commission on Nomenclature of Biological Chemistry, **1960**, *J. Amer. Chem. Soc.*, 82, 5575-5584.
- [6] Panico, R., Powell, W. H. and Richer, J. C., *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds: Recommendations*, **1993**, Blackwell, Oxford.
- [7] Scheer, H. dans *Chlorophylls*, H. Scheer (éd.), CRC Press, Boca Raton, USA, **1991**, p. 3-30.
- [8] Willstätter, R. and Stoll, A., *Ann. Chem.* **1910**, 378, 18-72.
- [9] Woodward, R. B., *Angew. Chem.* **1960**, 72, 651-662.
- [10] Fleming, I., *J. Chem. Soc. (C)* **1968**, 2765-2770.
- [11] Brockmann jr., H., *Angew. Chem.* **1968**, 80, 233-243.
- [12] Leeper, F.J. dans *Chlorophylls*, H. Scheer (éd.), CRC Press, Boca Raton, USA, **1991**, p. 407-431.
- [13] Jordan, P. M., *Biosynthesis of Tetrapyrroles*, P. M. Jordan (éd.), Elsevier, London, **1991**.
- [14] Scheumann, V., Schoch, S. and Rüdiger, W., *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 35102-35108.
- [15] Porra, R. J., *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 492-516.
- [16] Porra, R. J., Schäfer, W., Cmiel, E., Katheder, I. and Scheer, H., *Eur. J. Biochem.* **1993**, 219, 671-679.
- [17] Schoch, S., Helfrich, M., Wiktorsson, B., Sundquist, C., Rüdiger, W. and Ryberg, M., *Eur. J. Biochem.* **1995**, 229, 291-298.
- [18] Voet, D. and Voet, J.G., *Biochimie*, De Boeck Université, Paris, **1998**.
- [19] Stryer, L., *Biochimie*, W. H. Freeman and company, New York, Stanford University, **1992**.
- [20] Stahl, E., *Zur Biologie des Chlorophylls*, G. Fischer Verlag, Jena, **1909**, pp. 132 et suivantes.

- [21] Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. and Brown, S. B., *New Phytol.* **1987**, *107*, 255-302.
- [22] Czygan, F. C., *Archiv. Mikrobiol.* **1968**, *62*, 209-236.
- [23] Peoples, M.B. and Dalling, M.J. dans *Senescence and Aging in plants*, Noodén, L.D. and Leopold, A.C., (éd.), Academic press, New York. **1988** , pp. 181-217.
- [24] Suzuki, Y. and Shioi, Y., *Plant Cell Physiol.* **1999**, *40*, 909-915.
- [25] Holden, M. dans *Chemistry and Biochemistry of Plants Pigments*, Goodwin, T.W., (éd.), Academic Press, London, New York, San Francisco, **1976**, 2^{ème} édition, volume 2, pp. 28-37.
- [26] Ziegler, R. and Schanderl, S. H., *Photosynthetica* **1969**, *3*, 45-54.
- [27] Owens, T. G. and Falkowski, P. G., *Phytochemistry* **1982**, *21*, 979-984.
- [28] Shioi, Y., Tomita, N., Tsuchiya, T. and Takamiya, K., *Plant Physiol. Biochem.* **1996**, *34*, 41-47.
- [29] Lötjönen, S. and Hynninen, P. H., *Synthesis* **1983**, 708-710.
- [30] Hynninen, P. H., *Z. Naturforsch.* **1981**, *36b*, 1010-1016.
- [31] Schoch, S., Rüdiger, W., Lüthy, B. and Matile, P., *J. Plant Physiol.* **1984**, *115*, 85-89.
- [32] Shioi, Y., Tatsumi, Y. and Shimakawa, K., *Plant Cell Physiol.* **1991**, *32*, 87-93.
- [33] Watanabe, K., Takaniya, K. and Shioi, Y., *Plant Cell Physiol.* **1995**, *26*, *Supplement*, s116.
- [34] Brown, S. B., Houghton, J. D. and Hendry, G. A. F. dans *Chlorophylls*, Scheer, H., (éd.), CRC Press, Boca Raton, USA, **1991**, pp. 465-489.
- [35] Callot, H.J. . dans *Chlorophylls*, Scheer, H., (éd.), CRC Press, Boca Raton, USA, **1991**, pp. 339-364.
- [36] Hynninen, P.H. (1991) dans *Chlorophylls*, Scheer, H., (éd.), CRC Press, Boca Raton, USA, **1991**, pp.181.
- [37] Shimomura, O., *FEBS Lett.* **1980**, *116*, 203-206.
- [38] Dunlap, J.C., Hastings, J.W. and Shimomura, O., *FEBS Lett.* **1981**, *135*, 273-276.
- [39] Nakamura, H., Musicki, B. and Kishi, Y., *J. Amer. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2683-2685.

-
- [40] Nakamura, H., Kishi, Y., Shimomura, O., Morse, D. and Hastings, J.W., *J. Amer. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7607-7611.
- [41] Oshio, Y. and Hase, E., *Plant Cell Physiol.* **1969**, *10*, 41-49.
- [42] Oshio, Y. and Hase, E., *Plant Cell Physiol.* **1969**, *10*, 51-59.
- [43] Engel, N., Jenny, T. A., Mooser, V. and Gossauer, A., *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 131-133.
- [44] Engel, N., Gossauer, A., Gruber, K. and Kratky, C., *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2236-2238.
- [45] Iturraspe, J. and Gossauer, A., *Tetrahedron* **1992**, *48*, 6807-6812.
- [46] Iturraspe, J., Engel, N. and Gossauer, A., *Photochemistry* **1994**, *35*, 1387-1390.
- [47] Engel, N., Curty, C. and Gossauer, A., *Plant Physiol. Biochem.* **1996**, *34*, 77-83.
- [48] Gossauer, A., *Chimia* **1994**, *48*, 352-361.
- [49] Miyake, K., Ohtomi, M., Yoshizawa, H., Sakamoto, Y., Nakayama, K. and Okada, M., *Plant Cell Physiol.* **1995**, *36*, 109-113.
- [50] Bortlik, K., Peisker, C. and Matile, P., *J. Plant. Physiol.* **1990**, *136*, 161-165.
- [51] Peisker, C., Thomas, H., Keller, F. and Matile, P., *J. Plant. Physiol.* **1990**, *136*, 544-549.
- [52] Kräutler, B., Jaun, B., Bortlik, K., Schellenberg, M. and Matile, P., *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1354-1357.
- [53] Kräutler, B., Jaun, B., Amrein, W., Bortlik, K., Schellenberg, M. and Matile, P., *Plant Physiol. Biochem.* **1992**, *30*, 333-346.
- [54] Ginsburg, S. and Matile, P., *Plant Physiol.* **1993**, *102*, 521-527.
- [55] Mühlecker, W., Kräutler, B., Ginsburg, S. and Matile, P., *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2976-2980.
- [56] Mühlecker, W. and Kräutler, B., *Plant Physiol. Biochem.* **1996**, *34*, 61-75.
- [57] Iturraspe, J., Moyano, N. and Frydman, B., *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6664-6665.
- [58] Curty, C. and Engel, N., *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1531-1536.
- [59] Hörtensteiner, S., Vincentini, F. and Matile, P., *New Phytol.* **1995**, *129*, 237-246.

- [60] Mühlecker, W., Ongania, K.-H., Kräutler, B., Matile, P. and Hörtensteiner, S., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 401-404.
- [61] Rodoni, S., Mühlecker, W., Anderl, M., Kräutler, B., Moser, D., Thomas, H., Matile, P. and Hörtensteiner, S., *Plant Physiol.* **1997**, *115*, 669-676.
- [62] Rodoni, S., Vicentini, F., Schellenberg, M., Matile, P. and Hörtensteiner, S., *Plant Physiol.* **1997**, *115*, 677-682.
- [63] Jen, J. J. and MacKinney, G., *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11*, 297-302.
- [64] Jen, J. J. and MacKinney, G., *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11*, 303-308.
- [65] Iturraspe, J. and Gossauer, A., *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 43-49.
- [66] Troxler, R. F., Smith, K. M. and Brown, S. B., *Tetrahedr. Lett.* **1980**, *21*, 491-494.
- [67] Risch, N., Schormann, A. and Brockmann, H., *Tetrahedr. Lett.* **1984**, *25*, 5993-5996.
- [68] Brown, S.B., Smith, K.M., Bisset, G.M.F. and Troxler, R.F., *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8063-8068.
- [69] Iturraspe, J. and Gossauer, A., *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1713-1717.
- [70] Curty, C., Engel, N., Iturraspe, J. and Gossauer, A., *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 552-556.
- [71] Woodward, R.B. and Skaric, V., *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4676-4678.
- [72] Bonnett, R., Gale, I.A.D. and Stephenson, G.F., *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 1168-1172.
- [73] Gouterman, M., Wagnière, G.H. and Snyder, L.C., *J. Mol. Spectrosc.* **1963**, *11*, 108-127.
- [74] Fuhrhop, J.-H., *Porphyryns and Metalloporphyryns*, Smith, K. M. (éd.), Elsevier, Amsterdam, **1975**, 593-623
- [75] Isaac, M., Senge, M. O. and Smith, K. M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 705-714.
- [76] Curty, C. and Engel, N., *Plant Physiol. Biochem.* **1997**, *35*, 707-711.
- [77] Langmeier, M., Ginsburg, S. and Matile, P., *Physiol. Plant.* **1993**, *89*, 347-353.
- [78] Lüthy, B., Thomas, H. and Matile, P., *Plant Physiol.* **1986**, *123*, 203-209.
- [79] Thomas, H., Lüzhy, B. and Matile, P., *Planta* **1985**, *164*, 400-405.
- [80] Schoch, S. and Brown, J., *Plant Physiol.* **1987**, *126*.
- [81] Curty, C., Engel, N. and Gossauer, A., *FEBS Lett.* **1995**, *364*, 41-44.

-
- [82] Kräutler, B. and Matile, P., *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 35-43.
- [83] Hörtensteiner, S., *Phytochemistry* **1998**, *49*, 953-956.
- [84] Hinder, B., Schellenberg, M., Rodoni, S., Ginsburg, S., Vogt, E., Matile, P. and Hörtensteiner, S., *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27233-27236.
- [85] Ito, H., Tanaka, Y., Tsuji, H. and Tanaka, A., *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *306*, 148-151.
- [86] Ito, H., Takaichi, S., Tsuji, H. and Tanaka, A., *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22034-22038.
- [87] Beale, S. I., *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 785-802.
- [88] Brown, S. B. and King, R. F. G. J., *Biochem. J.* **1978**, *170*, 297-311.
- [89] Brown, S. B. and King, R. F. G. J., *Biochem. J.* **1975**, *150*, 565-567.
- [90] Docherty, J. C., Schacter, B. A., Firneisz, G. D. and Brown, S. B., *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13066-13069.
- [91] King, R. F. G. J. and Brown, S. B., *Biochem. J.* **1978**, *174*, 103-109.
- [92] Nakajima, H., Takemura, T., Nakajima, O. and Yamaoka, K., *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 3784-3796.
- [93] Nakajima, H., *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 3797-3801.
- [94] Fuhrhop, J.-H., Wasser, P. K. W., Subramanian, J. and Schrader, U., *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, , 1450-1466.
- [95] Küster, W., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1896**, *29*, 821.
- [96] Ficken, G. E., Johns, R. B. and Linstead, R. P., *J. Chem. Soc.* **1956**, , 2272-2280.
- [97] Fischer, H. and Orth, H., *Die Chemie des Pyrrols*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, **1940**, p. 400 et suivantes
- [98] Rüdiger, W., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1969**, *350*, 1291-1300.
- [99] Küster, W., *Chem. Ber.* **1912**, *45*, 1945.
- [100] Fischer, H. and Meyer-Betz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1912**, *82*, 104.
- [101] Martin, J., Quirke, E., Shaw, G. J., Soper, P. D. and Maxwell, J. R., *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3261-3268.
- [102] Gauler, R., Hesse, U. and Risch, N., *Liebigs Ann.* **1995**, , 2227-2230.
- [103] Bonnett, R. and McDonagh, A. F., *Chemistry and Industry* **1969**, , 107-108.
- [104] Choussy, M. and Barbier, M., *Helvetica Chimica Acta* **1975**, *58*, 2651-2661.
- [105] Fischer-Drsek, R., Thèse no 1107, Fribourg, **1995**, pp. 42-50.

- [106] Burns, E. A., *Analytical Chemistry* **1960**, 32, 1800.
- [107] Molinari, E., *Chem. Ber.* **1900**, 33, 1408-1419.
- [108] Ciamician and Dennstedt, *Gazz. Chim. Ital.* **1882**, 12, 501.
- [109] Gottlieb, *Jutus Liebigs Ann. Chem.* **1851**, 77, 274.
- [110] Kwart and Burchuk, *J. Amer. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3094-3095.
- [111] Plancher and Cattadori, *Gazz. Chim. Ital.* **1903**, 33, 405.
- [112] Fischer and Hahn, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1913**, 84, 259.
- [113] Roese, H. F., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1912**, 82.
- [114] Schoenleber, H., Kim, Y. and Rapoport, H., *J. Amer. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2645-2651.
- [115] Fischer, H. and Eismayer, K., *Chem. Ber.* **1914**, 47.
- [116] Ueno, Y., Nawa, H., Ueyanagi, J., Morimoto, H., Nakamori, R. and Matsuoka, T., *Chem. Abstr.* **1956**, , 4116.
- [117] Miyazaki, M., *Chem. Abstr.* **1956**, , 3396.
- [118] Nawa, H., Ueyanagi, J., Nakamori, R., Matsuoka, T. and Kimata, S., *Chem. Abstr.* **1956**, , 4122.
- [119] Küster and Maag, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 65.
- [120] Küster, W., *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1922**, 121, 143.
- [121] Mazzara and Borgo, *Gazz. Chim. Ital.* **1904**, 34, 416.
- [122] Mazzara and Borgo, *Gazz. Chim. Ital.* **1904**, 34, 181.
- [123] Plancher and Soncini, *Gazz. Chim. Ital.* **1902**, 32, 466.
- [124] Cousin, *Zentralbl.* **1901**, 72, 946.
- [125] George, M.V. and Bhat, V., *Chemical Reviews* **1979**, 79, 447-478.
- [126] Franck, R. W. and Auerbach, J., *J. Org. Chem* **1971**, 36, 31-36.
- [127] Quistad, G. B. and Lightner, D. A., *Chemical Communication* **1971**, , 1099-1100.
- [128] Scheumann, V., Ito, H., Tanaka, A., Schoch, S. and Rüdiger, W., *Eur. J. Biochem.* **1996**, 242, 163-170.
- [129] Ito, H., Ohtsuka, T. and Tanaka, A., *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 1475-1479.
- [130] Curty, C., Thèse no 1143, Fribourg, **1996**, pp. 177.
- [131] Rüdiger, W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, 9, 473-480.
- [132] Porra, R. J., Thompson, W. A. and E., Kriedmann, E. P., *Biochem. Biophys. Acta* **1989**, 975, 384-394.

-
- [133] Dougherty, R. C., Crespi, H. L., Stain, H. H. and Katz, J. J., *J. Amer. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2854-2855.
- [134] Katz, J. J., Dougherty, R. C., Crespi, H. L. and Strain, H. H., *J. Amer. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2856-2875.
- [135] Britton, G., Lockley, W., Powls, R., Goodwin, T. and Heyes, L. M., *Nature* **1977**, *268*, 81-82.
- [136] Battersby, A. R., Deutscher, K. R. and Martinoni, B., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 698-700.
- [137] Scott, I. A., Kajivara, M. and Santander, P. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6616-6618.
- [138] Battersby, A. R., Gutman, A. L. and Fookes, C. J. R., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1981**, , 645-647.
- [139] Sato, Y. and Oda, T., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1977**, 415-417.
- [140] Davis, D. B., Christofides, J. C. and Hoffman, R. D., *Spec. Publ., R. Soc. Chem.* **1988**, *68*, 147-172.
- [141] Allred, A. L. and Wilk, W. D., *Chem. Comm.* **1969**, 273.
- [142] Commission on Atomic Weights and Isotopic Abundances Report for the International Union of Pure and Applied Chemistry, *Pure and Applied Chemistry* **1998**, *70*, 217.
- [143] Walsh, C. dans *Enzymatic* (1979) , Vol. Sect. III, pp. 311-357 Freeman W. H. and Compagny, San Fransisco.
- [144] Clarke, A.R. and Dafforn, T.R. (1997) in: *Comprehensive Biological Catalysis. A mechanistic reference*, Vol. III, pp. 1 (Sinnot, M., Ed.) Academic press.
- [145] Colowick, S.P., van Eys, J. and Park, J.H. (1966) in: *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 14, chap. 1 (Florkin, M.a.S., E. H., Ed.) Elsevier, Amsterdam.
- [146] Stubbe, J., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1990**, *63*, 349-419.
- [147] Kahl, S.B., Schaeck, J.J. and Koo, M.-S., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1875-1880.
- [148] Dolphin, D., Yon-Hin, P. and Wijesekera, T.P., *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 2875-2878.
- [149] Carr, R.P., Jackson, A.H., Kenner, G.W. and Sach, G.S., *J. Chem. Soc. (C)* **1971**, , 487-502.

- [150] Jackson, A.H., Jenkins, R.M., Jones, D.M. and Matlin, S.A., *Tetrahedron* **1983**, *39*, 1849-1858.
- [151] Cox, M.T., Jackson, A.H., Kenner, G.W., McCrombie, S.W. and Smith, K.M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, , 517.
- [152] Valasinas, A., Hurst, J. and Frydman, B., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1239-1243.
- [153] Thyran, T. and Lightner, D.A., *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 4345-4348.
- [154] Corey, E.J., Gilman, N.W. and Ganem, B.E., *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5616-5617.
- [155] Baciocchi, E., Muraglia, E. and Sleiter, G., *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2486-2490.
- [156] publiés, R.n., .
- [157] Zelikin, A., Shastri, V.R. and Langer, R., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3379-3380.
- [158] Xiao, D. and Ketcha, D.M., *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, *32*, 499-503.
- [159] Settambolo, R., Mariani, M. and Caiazza, A., *J. Org. Chem* **1998**, *63*, 10022-10026.
- [160] Settambolo, R., Lazzaroni, R., Messeri, T., Mazzetti, M. and Salvadori, P., *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7899-7902.
- [161] Kakushima, M., Hamel, P., Frenette, R. and Rokach, J., *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3214-3219.
- [162] Lash, D.T. and Hoehner, M.C., *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 1671-1676.
- [163] Alonso Garrido, D.O., Buldain, G., Ojea, M.I. and Frydman, B., *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 403-407.
- [164] Anderson, H.J., Loader, C.E., Xu, R.X., Lê, N., Gogan, N.J., McDonald, R. and Edwards, L.G., *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 896-902.
- [165] Fuji, M., Muratake, H. and Natsume, M., *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2338-2343.
- [166] Schwertlick, K. (1986) , Vol. 16. bearbeitete Auflage, pp. p. 638 et suivantes VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- [167] Kräutler, B., Jaun, B., Bortlik, K., Schellenberg, M. and Matile, P., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1315-1318.

Curriculum vitae

Données personnelles

- Nom : FOLLY
- Prénom : Patrick
- Date de naissance : 2 décembre 1970
- Nationalité : Suisse
- Etat civil : Marié
- Lieu d'origine : Villarepos



Formation

- 1986 – 1991 Gymnase au Collège St-Michel, Fribourg.
- 1991 Baccalauréat et maturité fédérale, section scientifique (Type C).
- 1991 – 1996 Etudes de chimie à l'Université de Fribourg.
- 1996 – 1999 Elaboration d'une thèse de doctorat en sciences naturelles à l'institut de chimie organique de l'Université de Fribourg, sous la direction de M. Dr. N. Engel sur le thème de la dégradation de la chlorophylle dans les plantes.

Langues

- Français (langue maternelle)
- Allemand (couramment et utilisée comme langue d'étude)
- Anglais (bonnes connaissances)

Travaux

Présentations par poster :

- 10th European Symposium on Organic Chemistry, 22-27 juin 1997, Bâle (Suisse). Patrick Folly, Christophe Curty, Norbert Engel et Albert Gossauer : « The Catabolic Pathway of the Chlorophylls in Plants. »
- 3rd Lausanne Conference on Bioorganic Chemistry, 4-5 mars 1999, Lausanne (Suisse). Patrick Folly and Norbert Engel : « Chlorophyll *b* to Chlorophyll *a* Conversion Precedes Chlorophyll Degradation in *Hordeum vulgare* L. »
- European Research Conferences on Tetrapyrrole Photoreceptors in photosynthetic Organisms. 3-8 Septembre 1999, Castelvecchio Pascoli, (Italy). Patrick Folly and Norbert Engel : « Chlorophyll *b* Catabolism in *Hordeum vulgare* L. ».
- Fall meeting of the New Swiss Chemical Society, 12 October 1999, Basel (Suisse). Patrick Folly and Norbert Engel : « Chlorophyll *b* Catabolism in *Hordeum vulgare* ».

Publication :

- Patrick Folly and Norbert Engel (1999). Chlorophyll *b* to Chlorophyll *a* Conversion Precedes Chlorophyll Degradation in *Hordeum vulgare* L. *Journal of Biological Chemistry*, **Vol. 274**, Issue 31, 21811-21816.