

THESE

présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

SPECIALITE : Chimie

**SYNTHESE ORGANIQUE D'APO-LYCOPENOÏDES
ETUDE DES PROPRIETES
ANTIOXYDANTES ET DE COMPLEXATION
AVEC L'ALBUMINE DE SERUM HUMAIN**

par Eric REYNAUD

soutenue le 23 novembre 2009 devant un jury composé de

Hanspeter PFANDER	Professeur, Université de Berne (Suisse)	Rapporteur
Catherine BELLE	Chargée de recherche, CNRS Grenoble	Rapporteur
Paul-Henri DUCROT	Directeur de recherche, INRA Versailles	Examineur
Patrick BOREL	Directeur de recherche, INRA Marseille	Examineur
Olivier DANGLES	Professeur, Université Avignon	Directeur de thèse
Catherine CARIS-VEYRAT	Chargée de recherche, INRA Avignon	Directeur de thèse

Mes remerciements

Je remercie l'ensemble du jury pour avoir accepté de juger ce travail :

- Pr. Dr. h. c. Hanspeter PFANDER (rapporteur)
- Dr. Catherine BELLE (rapporteur)
- Dr. Paul-Henri DUCROT (examineur)
- Dr. Patrick BOREL (examineur)

Je remercie Monsieur Christophe N'GUYEN THE pour son accueil dans l'unité mixte de recherche qu'il dirige.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes deux directeurs de thèse pour m'avoir fait confiance tout au long de ces trois années concernant mon projet de recherche. A Catherine CARIS-VEYRAT pour m'avoir soutenu et encouragé tant au niveau scientifique que humain, pour sa disponibilité, sans oublier sa gaieté communicative. A Olivier DANGLES pour ses conseils enrichissants son optimisme ainsi que pour avoir suivi ce travail avec beaucoup de patience et de rigueur.

Je tiens à remercier Michel CARAIL pour son aide quotidienne, son soutien dans les moments difficiles et surtout pour son amitié.

Je remercie Pascale GOUPY pour sa grande participation et ses conseils précieux concernant les "manips" de pouvoir antioxydant ainsi que pour son enthousiasme.

Je remercie Michelle LOONIS pour son aide concernant les études sur l'albumine de sérum humain.

Je remercie tous les membres de l'équipe et de l'unité SQPOV en particulier, Claire DUFOUR, Christian GINIES, Marie-José VALLIER, Gérard BEAUVILLE, Eric PIETRY, Dominique LOONIS, Marielle BAUGE, Line TICHIT, David PAGES, Catherine RENARD, Julien BRILLARD pour leur gentillesse au quotidien.

Je ne saurais oublier tous mes collègues de boulot avec qui j'ai passé des moments exceptionnels, Guillaume QUINONERO, Cyril KELLER, Yann LEBLANC, Adeline MOISES, Bénédicte LORRAIN, Aurélie CENDRES, Charlotte SY et Céline CHANFORAN.

Je remercie pour leur sympathie tous les membres de l'Université d'Avignon Valérie TOMAO, Nathalie MORA-SOUMILLE, Njara RAKOTOMANOMANA ainsi que mes amis Matthieu VIROT, Stéphanie GALLAND et Guillaume CUOCCO.

Je remercie tous les membres du projet européen « LYCOCARD » et plus particulièrement les équipes de Marseille, Jena et Débrécen.

Je remercie Bettina WUESTENBERG et Simon WENER de la société DSM Nutritional Product pour leur intérêt en vers notre laboratoire mais aussi pour la gentillesse qu'ils m'ont témoigné durant mon stage dans leurs laboratoires. Je remercie Hansgeorg ERNST de la société BASF pour nous avoir fourni la pseudoionone et le vinylpseudoionol.

Un très grand merci à Joëlle FIDANZA de l'Université d'Avignon sans qui je n'aurais jamais pu être ici aujourd'hui.

Je remercie toute ma famille de m'avoir soutenu tout au long de mes études.

Table des matières

<u>Présentation du centre INRA d'Avignon</u>	<u>1</u>
<u>Introduction</u>	<u>3</u>
<u>I) Les caroténoïdes.....</u>	<u>6</u>
1.1) Généralités.....	6
1.2) Structure et nomenclature	6
1.2.1) Structure.....	6
1.2.2) Nomenclature	8
1.3) Biosynthèse des caroténoïdes.....	13
1.3.1) Biosynthèse de l'isopentényl pyrophosphate (IPP).....	14
1.3.2) De l'IPP au phytoène	15
1.3.3) Désaturation du phytoène.....	16
1.3.4) Les caroténoïdes : Diversité via un processus enzymatique.....	17
1.4) Propriétés des caroténoïdes.....	19
1.4.1) Leurs couleurs.....	19
1.4.2) Protection contre les dommages oxydatifs.....	21
1.4.2.1) Chez la plante : piégeage de l'oxygène singulet	21
1.4.2.2) Chez l'homme : rôle antioxydant ?	22
1.4.3) Effet santé des caroténoïdes.....	23
1.4.4) Focus sur le lycopène	25
1.4.4.1) Structure	25

1.4.4.2) Sources de lycopène.....	25
1.4.4.3) Effet santé du lycopène.....	26

II) Produits "d'oxydation" des caroténoïdes.....27

2.1) Dans la nature et les systèmes biochimiques.....	28
---	----

2.2) Produits par autoxydation	29
--------------------------------------	----

2.2.1) Autoxydation dans les systèmes organiques.....	29
---	----

2.2.2) Autoxydation dans les systèmes aqueux.....	30
---	----

2.2.3) Autoxydation dans les systèmes micellaires	31
---	----

2.2.4) Autoxydation dans les systèmes liposomiaux.....	31
--	----

2.2.5) Autoxydation dans les systèmes cellulaires.....	31
--	----

2.2.6) Autoxydation chez l'homme	32
--	----

2.3) Produits par oxydation chimique.....	32
---	----

2.3.1) Via l'oxygène singulet.....	32
------------------------------------	----

2.3.2) Via ozonolyse	33
----------------------------	----

2.3.3) Via tétr oxyde d'osmium/peroxyde d'hydrogène	33
---	----

2.3.4) Via le permanganate de potassium.....	33
--	----

2.3.5) Via les métalloporphyrines	35
---	----

2.4) Dans l'aliment : produits durant un procédé agro-industriel	38
--	----

2.5) Choix des produits d'oxydation potentiels métabolites du lycopène ciblés pour la synthèse organique.....	40
--	----

III) Synthèse organique du lycopène et des apo-lycopénoïdes...43

3.1) Couplages carbone-carbone pour la synthèse des structures polyconjuguées des caroténoïdes	43
3.1.1) Stratégies de synthèse des structures caroténoïdes.....	43
3.1.2) Le couplage carbone-carbone via la réaction de Wittig et Horner-Wadsworth-Emmons (HWE).	44
3.1.2.1) Voie rétrosynthétique pour les couplages de Wittig et HWE.	44
3.1.2.2) Mécanistique de la réaction de Wittig et HWE	45
3.1.3) Le couplage carbone-carbone via la réaction de Julia	47
3.1.4) Couplage carbone-carbone via la condensation aldolique	49
3.1.5) Couplages impliquant des dérivés organométalliques.....	49
3.1.5.1) Voie rétrosynthétique pour les couplages via les réactions organométalliques.....	50
3.1.5.2) couplage carbone-carbone via les métaux acétyles.....	50
3.1.5.3) couplage carbone-carbone via la réaction de Stille	51
3.1.5.4) couplage carbone-carbone via la réaction de Suzuki.....	52
3.2) Stratégie de synthèse des lycopénoïdes : rétrosynthèse.....	52
3.3) Synthèse organique du lycopène et des apo-lycopénoïdes.....	57
3.3.1) Tout-(E)-2,6,10,14,19,23,27,31-octaméthyltridécatriéna-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridécaène (lycopène) 4.....	57
3.3.2) Tout-(E)-3,7,11-triméthyltridécatriéna-2,4,6,10-tétraénoïdes	59
(apo-11-lycopénoïdes).....	59
3.3.3) Tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyltridécatriéna-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes (apo-14'-lycopénoïdes).....	61
3.3.4) Tout-(E)-2,7,11,15,19-pentaméthyltridécatriéna-2,4,6,8,10,12,14,18-octaénoïdes (apo-12'-lycopénoïdes).....	63

3.3.5) Tout-(E)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïdes (apo-10'-lycopénoïdes)	68
3.4) Stratégie d'identification des apo-lycopénoïdes par résonance magnétique nucléaire (RMN)	69
3.4.1) Les expériences RMN	69
3.4.1.1) La RMN Homonucléaire.....	69
3.4.1.2) La RMN hétéronucléaire.....	70
3.4.2) Stratégie d'attribution.....	71
3.4.2.1) La famille tout-(E)-3,7,11-triméthyl-dodéca-2,4,6,10-tétraénoïdes (apo-11-lycopénoïdes): l'acide carboxylique 10	71
3.4.2.2) La famille tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyl-octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes (apo-14'-lycopénoïdes): l'acide carboxylique 18	72
3.4.3.3) La famille tout-(E)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïdes (apo-10'-lycopénoïdes): l'acide carboxylique 25	74
3.5) Conclusions / Perspectives.....	76
<u>IV) Etude de pouvoir antioxydant des lycopénoïdes.</u>	78
4.1) La peroxydation lipidique	78
4.1.1) Mécanisme de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI)	78
4.1.2) Inhibition de la peroxydation lipidique par les antioxydants.....	82
4.2) Modélisation chimique de la peroxydation lipidique dans le tractus digestif.....	82

4.3) Peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobline et inhibée par les apo-lycopénoïdes : résultats et discussion.	85
4.4) Conclusions/perspectives	92
<u>V) Interactions apo-lycopénoïdes/albumine du sérum humain..</u>	93
5.1) Généralités.....	93
5.2) Structure de la molécule d'albumine	94
5.2.1) Structure primaire	94
5.2.2) Structures secondaire et tertiaire.....	95
5.3) Propriétés spectrale de l'albumine humaine	95
5.4) Les ligands de l'albumine.....	96
5.5) Interaction apo-lycopénoïdes/albumine.....	98
5.5.1) Analyse par spectroscopie UV-Vis.....	99
5.5.2) Analyse par spectroscopie de fluorescence.....	101
5.6) Conclusions/Perspectives.....	104
<u>VI) Conclusion générale</u>	105
<u>VII) Partie expérimentale</u>	107
7.1) Matériel et méthodes général.....	107
7.1.1) Produits chimiques	107

7.1.2) Analyses.....	107
7.2) Méthode de synthèse organique du lycopène et des apo-lycopénoïdes	109
7.2.1) Tout-(E)-2,6,10,14,19,23,27,31-octaméthyl-dotriaconta- 2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridécaène (lycopène) 4.....	109
7.2.2) Famille des tout-(E)-3,7,11-triméthyl-dodéca-2,4,6,10-tétraénoïdes (apo-11-lycopénoïdes).....	111
7.2.3) Famille des tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyl-octadéca- 2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes (apo-14'-lycopénoïdes).....	114
7.2.4) Famille des tout-(E)-2,7,11,15,19-pentaméthyl-icosa- 2,4,6,8,10,12,14,18-octaénoïdes (apo-12'-lycopénoïdes).....	122
7.2.5) Famille des tout-(E)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa- 2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïdes (apo-10'-lycopénoïdes).....	124
7.3) Méthode de mesure du pouvoir antioxydant	129
7.4) Méthode de mesure de l'interaction albumine du sérum humain/apo-lycopénoïdes	129
<u>Liste des abréviations</u>	<u>131</u>
<u>Liste des tableaux.....</u>	<u>133</u>
<u>Liste des figures.....</u>	<u>134</u>
<u>Liste des schémas.....</u>	<u>136</u>

Liste des communications.....138Liste bibliographique139Annexes.....152

<i>Annexe 1 : spectre RMN homonucléaire 1D ¹H de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18</i>	152
<i>Annexe 2 : spectre RMN homonucléaire 1D DEPT 135 de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18</i>	153
<i>Annexe 3 : spectre RMN homonucléaire 2D COSY de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18...</i>	154
<i>Annexe 4 : spectre RMN homonucléaire 2D COSY de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18...</i>	155
<i>Annexe 5 : spectre RMN hétéronucléaire 2D HSQC de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18.</i>	156
<i>Annexe 6 : spectre RMN hétéronucléaire 2D HMBC de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18</i>	157
<i>Annexe 7 : schémas structuraux de la myoglobine et de son site l'hémique</i>	158
<i>Annexe 8 : cinétique des apo-lycopénoïdes pour le calcul du PAO</i>	160
<i>Annexe 9 : programme de calcul des constantes d'affinités (Scientist, MicroMath)</i>	161
<i>Annexe 10 : glossaire des structures chimiques des molécules synthétisées</i>	162

Présentation du centre INRA d'Avignon

Fondé en 1953, le centre INRA d'Avignon fait partie de l'un des plus importants centres du dispositif INRA et doit cette renommée principalement aux thématiques qui lui sont confiées. Ses recherches s'organisent autour de trois pôles de compétences qui sont le pôle horticole intégré, le pôle d'adaptation au changement global et le pôle de santé des plantes.

UMR 408 - Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale

Les objectifs de cette unité sont d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, hygiéniques et nutritionnelles des fruits et légumes frais et transformés.

Les travaux de recherche concernent l'ensemble de la filière

- élaboration de la qualité avant récolte,
- mise au point de technologies de conservation ou de transformations permettant de valoriser au mieux cette qualité,
- intérêt en nutrition préventive et maîtrise du risque microbiologique associé au développement des produits réfrigérés prêt à l'emploi.

Pour répondre à ces objectifs, l'activité est répartie entre trois équipes de recherches :

- Microbiologie et Sécurité des aliments
- Qualité des fruits
- Chimie des antioxydants

Equipe Chimie des antioxydants

L'activité de l'équipe chimie des antioxydants est centrée sur les microconstituants des plantes d'importance alimentaire, en particulier les polyphénols et les caroténoïdes.

Les microconstituants sont présents :

- dans la plante où les fonctions sont généralement bien établies,

- dans l'aliment d'origine végétale où ils peuvent subir différentes transformations chimiques (oxydation) au cours des procédés technologiques ou des traitements domestiques,
- chez l'homme (après ingestion) ou les questions de leurs biodisponibilités, métabolismes et effets santé sont reconnues depuis une vingtaine d'années comme un enjeu scientifique majeur.

L'équipe chimie des antioxydants déploie son activité sur l'ensemble de ces trois champs (plante, aliment, homme) :

- Plante : analyse de la composition en microconstituants, optimisation des procédures d'extraction.
- Aliment : analyse de la composition en microconstituants et son évolution au cours d'opérations technologiques.
- Homme : étude des bases physico-chimiques des effets santé potentiels des polyphénols et caroténoïdes (biodisponibilité, interaction, pouvoir antioxydant, oxydation). Un effort particulier est mené sur la synthèse chimique (métabolites oxydés de caroténoïdes, formes conjuguées de polyphénols).

Le lycopène pourrait être en partie responsable des effets bénéfiques sur la santé qui lui sont attribués, les molécules issues de son métabolisme pourraient également être impliquées dans des mécanismes de protection. Certains métabolites ont pu être identifiés et caractérisés chez l'animal [5-6]. Des produits d'oxydation du lycopène pouvant mimer des métabolites produits *in vivo* ont été obtenus *in vitro* ; le plus fréquemment il s'agit de molécules issues d'une coupure oxydante d'une ou plusieurs doubles liaisons [7].

Le projet européen "LYCOCARD" (2006-2011) contraction de "LYCOpène" et "CARDIOvasculaire", a été mis en place pour comprendre le rôle physiologique, biochimique et génétique du lycopène dans la protection contre les maladies cardiovasculaires. Un de ses objectifs est de produire des potentiels « métabolites », produits d'oxydations du lycopène appelés apo-lycopénoïdes ; d'évaluer les propriétés antioxydantes et complexantes de ces molécules et enfin de tester leurs activités sur des cellules. La première stratégie développée au laboratoire pour obtenir les apo-lycopénoïdes a été de séparer par chromatographie préparative, les produits d'oxydation obtenus par coupure oxydante de la molécule de lycopène en présence de KMnO_4 [7]. Cette stratégie comporte de nombreuses difficultés telles que le contrôle de l'oxydation ou encore la séparation des différents fragments générés lors de celle-ci. La voie de la synthèse organique a donc été envisagée pour obtenir des « métabolites » potentiels du lycopène. Dans le projet quatre grandes familles d'apo-lycopénoïdes ont été ciblées en accord avec les partenaires nutritionnistes, biologistes et physico-chimistes, les apo-11-lycopénoïdes, les apo-14'-lycopénoïdes, les apo-12'-lycopénoïdes et les apo-10'-lycopénoïdes (figure 3). Les partenaires du projet européen pensent qu'il peut s'agir de molécules produites *in vivo* et biologiquement actives.

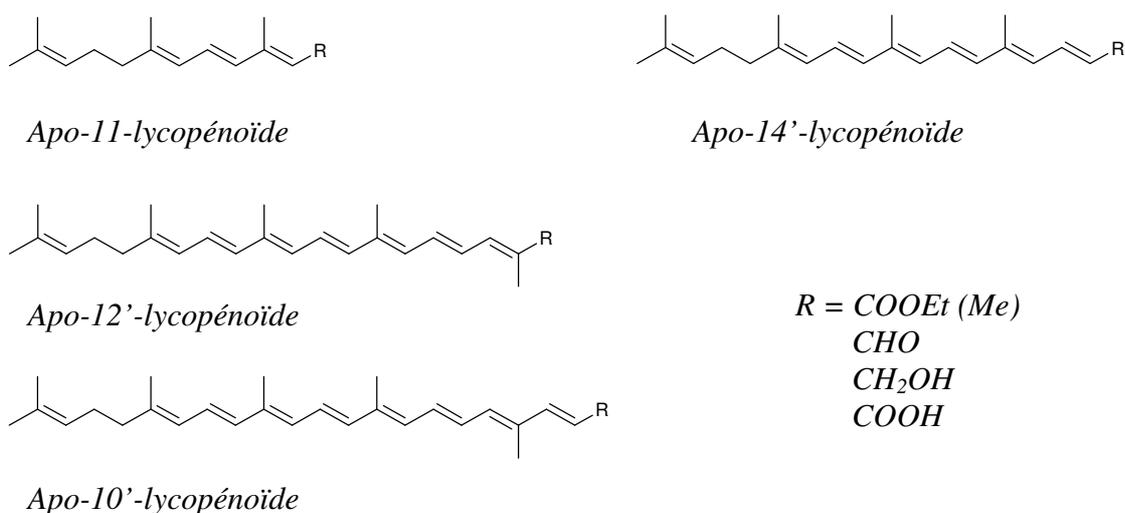


Figure 3 : structure chimique des apo-lycopénoïdes ciblés

Après un rappel sur la structure, la nomenclature et les propriétés des caroténoïdes dans un premier chapitre, nous exposerons dans une deuxième partie, l'importance des produits de coupure des caroténoïdes.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons les principales stratégies de synthèse des caroténoïdes puis nous nous attarderons sur la voie de synthèse des quatre familles d'apocyclopénoïdes ciblées ayant une pertinence biologique et chimique, ainsi que sur leurs élucidations structurales par résonance magnétique nucléaire.

Dans un quatrième chapitre nous présenterons les études effectuées sur la capacité antioxydante de ces molécules via la peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine.

Enfin dans une cinquième partie nous déterminerons les interactions entre ces composés et l'albumine du sérum humain, cette dernière étant connue comme transporteur d'acides gras dans le plasma.

Chapitre 1

Les caroténoïdes

Dans ce premier chapitre nous présenterons les caroténoïdes, (définition, règles de nomenclature etc..) puis nous énoncerons les propriétés physico-chimiques et biologiques propres à la famille des caroténoïdes. Enfin nous présenterons plus spécifiquement la molécule de lycopène.

I) Les caroténoïdes

1.1) Généralités

Caroténoïde est un mot dérivé de "*Daucus Carota*" le nom latin de la carotte dont le β -carotène fut extrait et isolé, pour la première fois, en 1831 par *Wackenroder*. Le β -carotène (figure 4) est le représentant le plus connu de cette famille de molécules, et une des plus répandue dans la nature et dans notre alimentation. Plus de 700 membres de cette famille sont aujourd'hui connus et la structure chimique de 500 d'entre eux est pleinement élucidée [8]. Les caroténoïdes sont la plus grande famille de pigments naturels de couleur jaune - orangé à rouge lorsqu'ils sont à l'état libre. Ils sont à l'origine de la coloration jaune et rouge de nombreux fruits et légumes (carotte, tomate), de champignons, d'algues et bactéries. Les animaux, pas plus que l'homme, ne sont capables de synthétiser des caroténoïdes, seules les plantes et certaines bactéries sont capables de les produire. La couleur de certains crustacés (Homard, langouste), de poissons (saumon) ou d'oiseaux (flamant, cardinal) est due à des caroténoïdes présents dans leur alimentation. Lorsqu'un caroténoïde est associé à une protéine, la coloration peut être bleue ou verte.

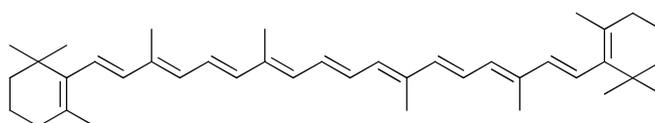


Figure 4 : structure chimique du β -carotène

1.2) Structure et nomenclature

1.2.1) Structure

Chimiquement les caroténoïdes sont des molécules organiques insaturées liposolubles plus ou moins complexes composées d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène pour certaines d'entre elles. Ils ont une structure relativement "linéaire" et ont pour point commun la

présence de plusieurs doubles liaisons conjuguées constituant le chromophore de la molécule. En effet ce dernier est en partie responsable de leur couleur à l'état libre. Les caroténoïdes sont par définition des tétraterpénoïdes ayant un enchaînement de huit unités isoprénoïdes (figure 5) de ce fait ils possèdent un squelette carboné comprenant 40 atomes de carbone. Ces unités sont renversées au centre de la molécule donnant une relation 1-6 entre les deux groupements méthyles centraux, alors que les autres méthyles de la molécule ont une relation 1-5. Tous les caroténoïdes dérivent de cette structure de base acyclique en $C_{40}H_{56}$ ayant subi des déshydrogénations, des cyclisations, des oxydations, ou encore une combinaison de ces processus.

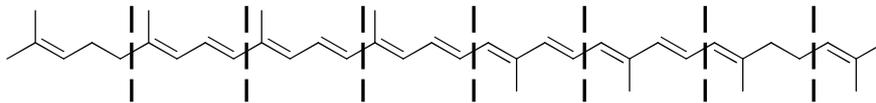
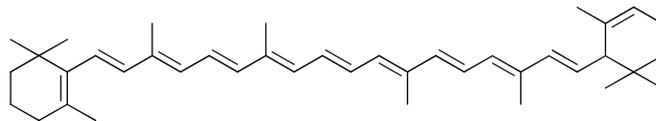
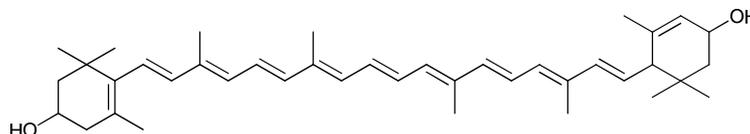


Figure 5 : squelette carboné de base des caroténoïdes

Les caroténoïdes peuvent être classés dans deux sous groupes. Les carotènes étant les molécules hydrogénocarbonées aliphatiques tels que le β -carotène (figure 4) et le α -carotène (figure 6). Les xanthophylles étant leurs homologues oxygénés comme la lutéine (figure 6).



α -carotène (famille des carotènes)



lutéine (famille des xanthophylles)

Figure 6 : exemples d'un carotène et d'un xanthophylle

1.2.2) Nomenclature

L'utilisation des règles IUPAC (*International Union of Pure Applied and Chemistry*) classiques de chimie organique devient vite complexe et fastidieuse pour la nomenclature des caroténoïdes. Au début des recherches sur les caroténoïdes, ces derniers portaient des noms triviaux se référant à leur découverte ou à des caractéristiques de la molécule. C'est ainsi que le lycopène provient du nom latin de la tomate "*solanum lycopersium*" quand à la lutéine elle provient du latin "*luteus*" signifiant jaune, en référence à sa couleur. De nombreux caroténoïdes ont une étymologie grecque tel que la zéaxanthine que l'ont trouve dans le maïs, "*zéa*" signifiant sorte de blé et "*xantho*" pour jaune. Pour rendre plus évidente la dénomination de ces molécules, en 1971 la première nomenclature des caroténoïdes à été publiée [9] puis en 1974 elle fût légèrement modifiée et publiée dans *Pure and Applied Chemistry*. Cette dernière a été approuvée par IUPAC-IUB (*International Union of Pure and Applied Chemistry- International Union of Biochemistry*) [10]. La numérotation des caroténoïdes est spécifique à cette famille. La structure générale des caroténoïdes étant symétrique le squelette est numéroté de 1 à 15 jusqu'au point de symétrie centrale de la molécule puis de 15' à 1'. Les groupements méthyles sont numérotés de 16 à 20 et de même du côté "prime" (figure 7). Le nom de base de cette structure est "carotène", c'est ce dernier qui est la base nominative de tous les caroténoïdes.

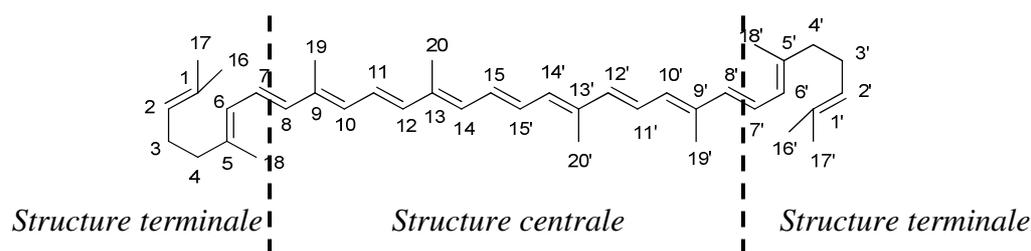


Figure 7 : nomenclature, numérotation du squelette des carotènes

Plusieurs structures terminales existent dans la nature (figure 8). Elles sont acycliques (ψ) cyclohexéniques (β et ϵ), cyclopenténique (κ), elles peuvent aussi contenir un groupement

méthylène cyclohexane (γ) ou encore aryles (φ et χ). Pour les désigner les lettres grecques nommant chacune des structures terminales sont positionnées devant le nominatif "carotène".

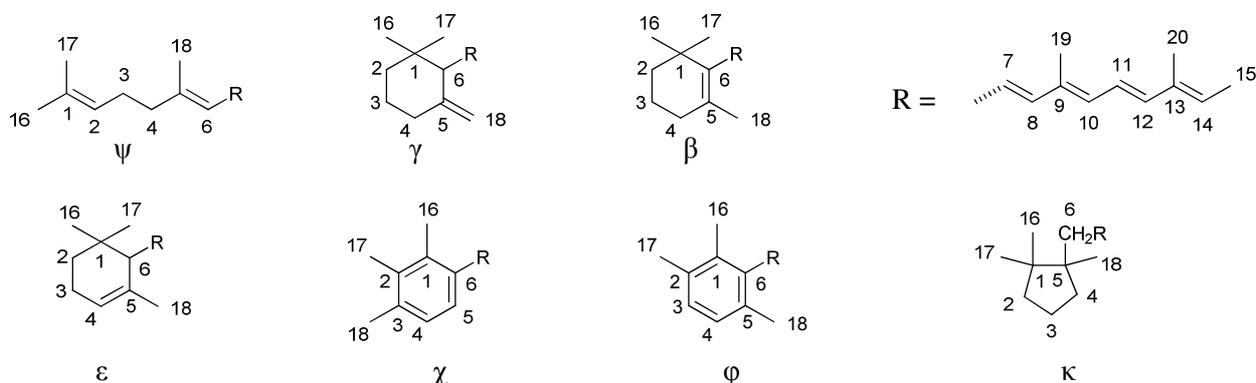


Figure 8 : nomenclature, structures terminales des caroténoïdes

Dans le cas où les deux structures terminales sont identiques la molécule est parfaitement symétrique comme le ψ,ψ -carotène connu sous le nom de lycopène (figure 9) ou encore le β,β -carotène simplifié sous le nom de β -carotène. Si les structures terminales sont différentes la molécule n'est plus symétrique comme le β,ψ -carotène appelé aussi plus simplement α -carotène (figure 9).

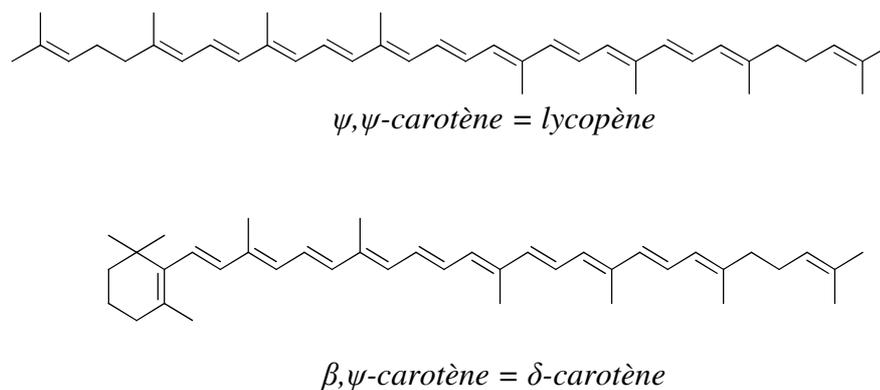


Figure 9 : structure et nomenclature de deux carotènes

Pour leurs homologues oxygénés, les xanthophylles ; les règles concernant la désignation du groupe terminal ainsi que la numérotation de la molécule sont identiques. Afin de notifier la position et la nature de la fonction du groupement oxygéné ou de tout autre modification

fonctionnelle ou structurale ; les règles générales de chimie organique sont appliquées (figure 10).

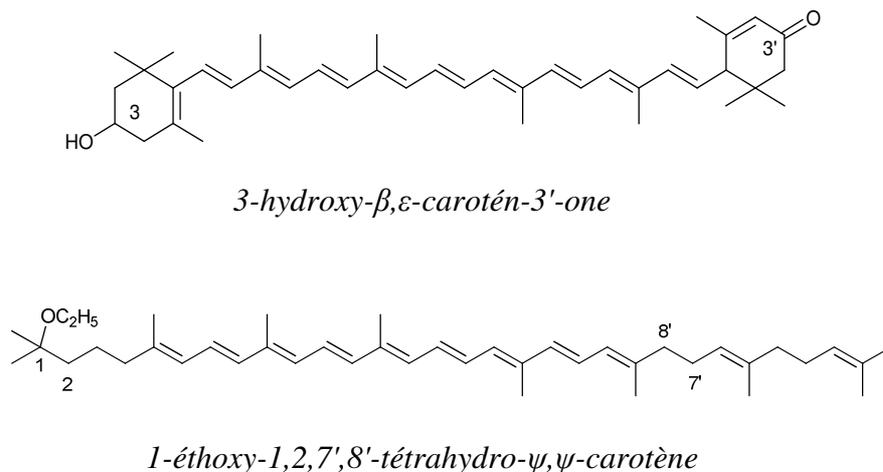


Figure 10 : structure et nomenclature de deux xanthophylles

La famille des caroténoïdes comprend aussi des composés ayant plus de 40 atomes de carbone tel que le 2-(3-méthylbut-2-ényl)-ε,ψ-carotène (figure 11), mais aussi des caroténoïdes ayant perdu des atomes de carbone appelés norcaroténoïdes tel que le 16,17,16',17'-tétranor-ε,ε-carotène (figure 11). Enfin nous pouvons y ajouter les molécules de cette famille ayant subi des coupures sur un cycle terminal appelées les séco-caroténoïdes tel que le 2,3-séco-ε,ε-carotène (figure 11).

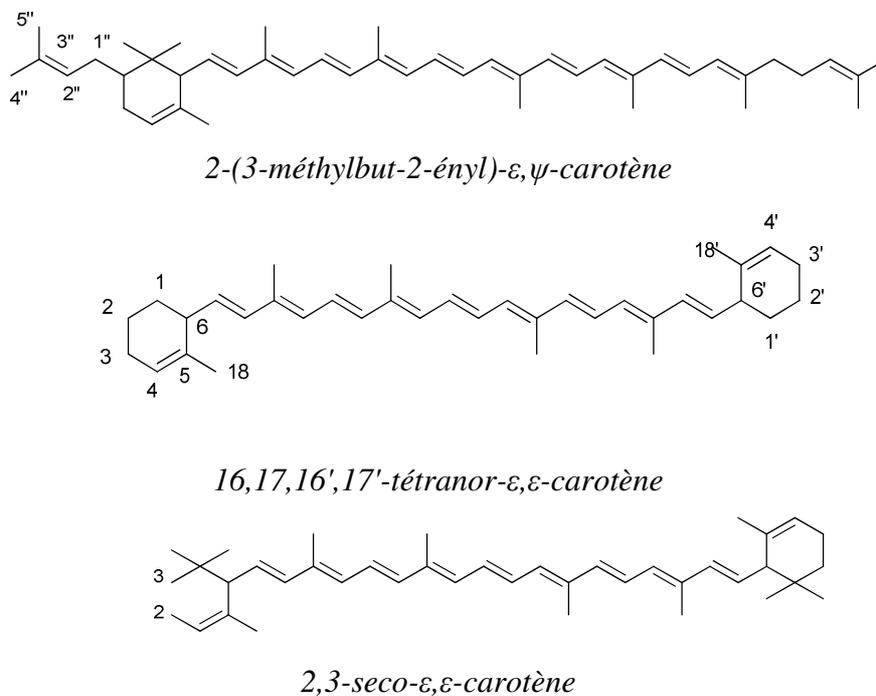
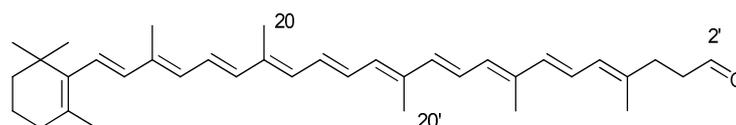
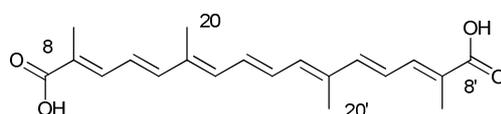


Figure 11 : exemples de C45, nor et séco-caroténoïdes

Faisons un "focus" sur la sous famille des caroténoïdes qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de ma thèse : les apo-caroténoïdes et notamment les "apolycopénoïdes". Le préfixe d'origine grecque "Apo" signifie une séparation, un éloignement d'une partie de la molécule. La rupture peut s'effectuer soit d'un seul côté de la molécule soit des deux cotés de la molécule. Le préfixe "apo" ou "diapo" respectivement est précédé du numéro du carbone concerné, quand au nominatif "carotène" il est agrémenté du suffixe correspondant à la nouvelle fonction présente sur la molécule comme le montrent les exemples ci-dessous (figure 12).



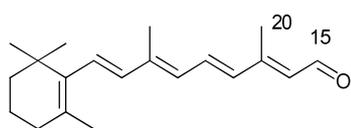
2'-apo- β,ψ -carotène-2'-al



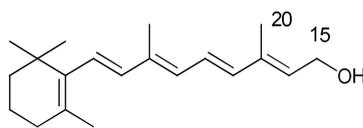
acide 8,8'-diapocarotène-8,8'-dioïque

Figure 12 : exemples de apo et diapo caroténoïdes

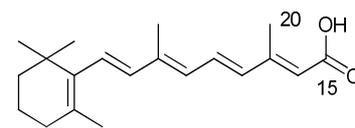
D'après les règles IUPAC les apo-caroténoïdes doivent posséder les deux méthyles centraux 20 et 20' pour appartenir à cette famille. Il se posait alors un dilemme concernant les rétinoïdes tels que le rétinol, le rétinol et l'acide rétinoïque (figure 13). Ces molécules proviennent d'un clivage entre le carbone 15 et 15' de la molécule de β,β -carotène, ils ont donc un caroténoïde comme molécule parent mais ne possèdent pas le méthyle 20'. A partir de 1983, l'IUPAC a autorisé la famille des rétinoïdes comme pouvant bénéficier officiellement des règles des apo-caroténoïdes [11].



15-apo- β -carotène-15-al
Rétinal



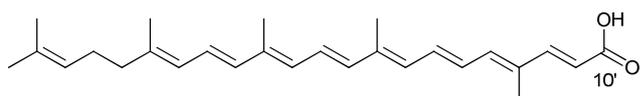
15-apo- β -carotène-15-ol
Rétinol



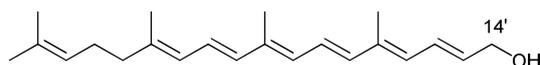
Acide 15-apo- β -carotène-15-oïque
Acide rétinoïque

Figure 13 : molécules rétinoïdes

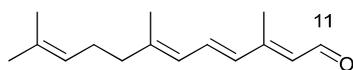
Depuis quelques années les études sur le ψ,ψ -carotène communément appelé lycopène ainsi que ses produits d'oxydations se multiplient. Aujourd'hui le monde scientifique qui travaille sur les caroténoïdes ne parle plus de ψ,ψ -carotène mais de lycopène, et même "lycopénoïdes" pour les molécules ayant une similarité avec le lycopène et d'apo-lycopénoïdes pour des fragments oxydés du lycopène (figure 14). Les règles des caroténoïdes ont alors été officieusement transposées voire légèrement modifiées pour les appliquer aux "lycopénoïdes". Le terme nominatif devient "lycopène", le clivage de la molécule est toujours désigné par le préfixe "Apo" ce dernier est suivi du numéro du carbone concerné. Puis le suffixe désigne la nouvelle fonction chimique générée sur le fragment du lycopène. Cette nouvelle nomenclature officieuse a été utilisée à plusieurs reprises dans des articles portant aussi bien sur des études en chimie ou en biologie effectuées sur les lycopénoïdes [5-7, 12-14].



Acide 10'-apo- ψ -carotène-10'-oïque = acide apo-10'-lycopénoïque



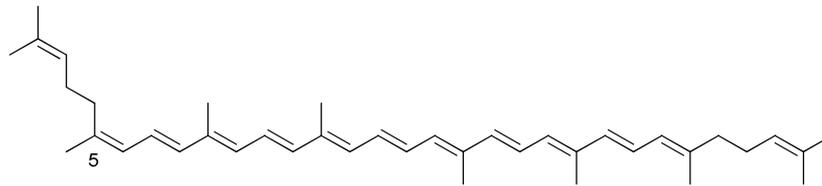
14'-apo- ψ -carotène-14'-ol = apo-14'-lycopénol



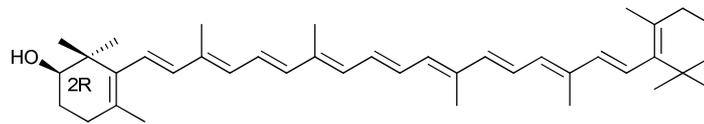
11-apo- ψ -carotène-11-al = apo-11-lycopénal

Figure 14 : exemples d'apo-lycopénoïdes avec leurs nomenclatures officielle et officieuse.

De nombreux caroténoïdes ont été identifiés sous plusieurs formes diastéréoisomériques ou présentant des centres chiraux. Les précisions concernant leurs énantioméries ou diastéréoisoméries sont notées en premier dans la nomination de la molécule (figure 15)



(5Z)-lycopène



(2R)-β,β-carotène-2-ol

Figure 15 : exemples d'isomères de caroténoïde

1.3) Biosynthèse des caroténoïdes

Chaque année plus de 100 millions de tonnes d'une grande variété de caroténoïdes sont fabriqués dans la nature par les plantes et certaines bactéries. Leurs voies de biosynthèse dérivent de la biosynthèse générale des isoprénoïdes et restent commune jusqu'au niveau du phytoène (figure 16) pouvant être considéré comme le premier caroténoïde. C'est à ce niveau que des voies de biosynthèses diffèrent pour générer une grande diversité de caroténoïdes.

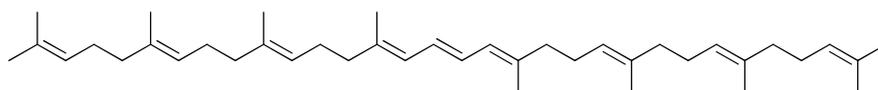


Figure 16 : structure du phytoène

1.3.1) Biosynthèse de l'isopentényl pyrophosphate (IPP)

Les isoprénoïdes sont présents chez tous les animaux, leurs biosynthèses peuvent provenir soit de la voie de l'acide mévalonique soit de la voie du déoxyxylulose phosphate via l'unité commune isopentényl pyrophosphate [15] (schéma 1).

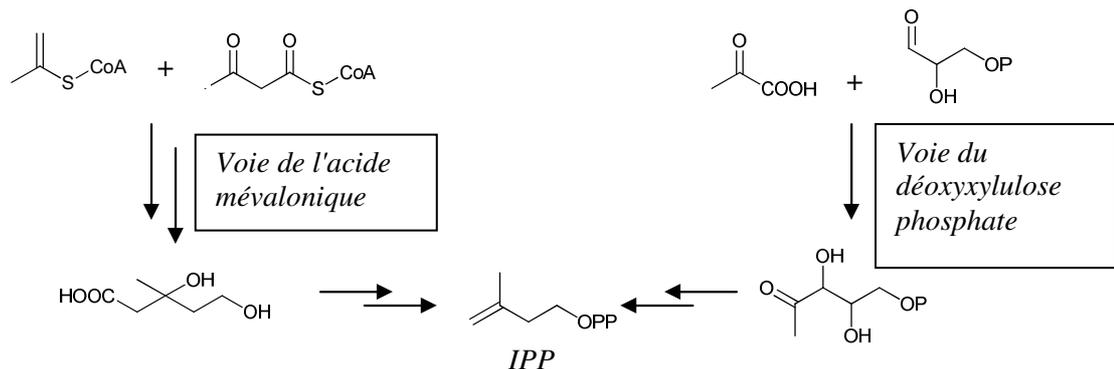


Schéma 1 : voies de biosynthèse simplifiées de l'isopentényl pyrophosphate (IPP)

La voie de biosynthèse de l'IPP via l'acide mévalonique a été longtemps considérée comme ubiquitaire. Depuis quelques années une deuxième voie de biosynthèse via le 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate a été découverte chez les eubactéries [16]. Cette dernière est considérée comme une alternative à la voie mévalonate [17]. La voie de la déoxyxylulose phosphate pour la biosynthèse de l'IPP est relativement répandue dans la nature [18], elle a été identifiée chez les algues vertes *Scenedesmus obliquus* [19], chez la plante supérieure [20] et chez bien d'autres organismes.

Ces deux voies de biosynthèse ne sont pas exclusives car certains organismes ont la particularité d'utiliser les deux voies pour la biosynthèse de l'IPP (tableau 1). En effet les plantes supérieures utilisent la voie de l'acide mévalonique pour la biosynthèse des stérols cytoplasmiques alors que pour la biosynthèse de substances liées aux chloroplastes tels que les caroténoïdes, elles utilisent l'IPP provenant de la voie du déoxyxylulose phosphate [20].

Organismes	Mévalonate	Déoxyxylulose
Bactéries	✓	✓
Archaeobactéries	✓	
Champignons	✓	
Algues	✓	✓
Plantes : compartiment plastidique		✓
Plantes : compartiment cytosolique	✓	
Protozoaires	✓	✓
Animaux	✓	

Tableau 1 : distribution des voies mévalonate et déoxyxylulose pour la biosynthèse d'isoprénoïdes [18]

1.3.2) De l'IPP au phytoène

L'isopentenyl pyrophosphate est la molécule clef pour la construction du squelette des composés polyisoprénoïdes constituant les caroténoïdes et d'autres terpénoïdes. La première étape consiste en l'isomérisation de IPP en diméthyl allyl pyrophosphate (DMAPP) via un processus enzymatique. La condensation du carbone 1 du DMAPP avec le carbone 4 de l'IPP forme le géranyl pyrophosphate (GPP) puis par condensations successives avec un nouvel élément d'IPP on obtient respectivement le farnésyl pyrophosphate (FPP) puis le géranyl géranyl pyrophosphate (GGPP). La condensation de deux unités de GGPP forme le phytoène, premier tétraterpène précurseur de la famille des caroténoïdes (schéma 2).

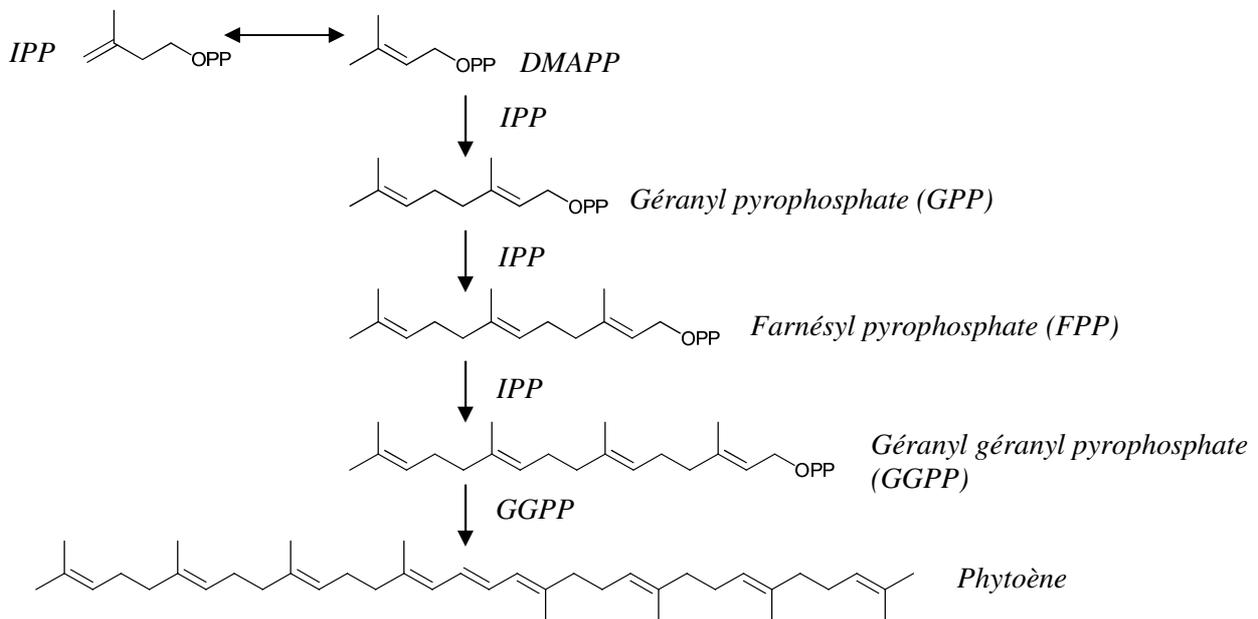


Schéma 2 : voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes

1.3.3) Désaturation du phytoène

La voie de biosynthèse du phytoène le classe comme étant la première molécule de la famille des caroténoïdes même si ce dernier n'est pas coloré. En effet il contient 9 doubles liaisons mais avec seulement trois conjuguées, ce qui fait de lui une molécule incolore absorbant à 285 nm [21]. L'apparition des couleurs va se faire via des réactions de désaturations enzymatiques successives qui vont permettre l'élongation du chromophore. Une première désaturation va former le phytofluène. La deuxième désaturation est fonction des organismes, elle formera soit le 7,8,11,12-tétrahydrolycopène ou le ζ -carotène qui constitue la première molécule colorée de la famille des caroténoïdes. Puis successivement le neurosporène et enfin le lycopène (schéma 3).

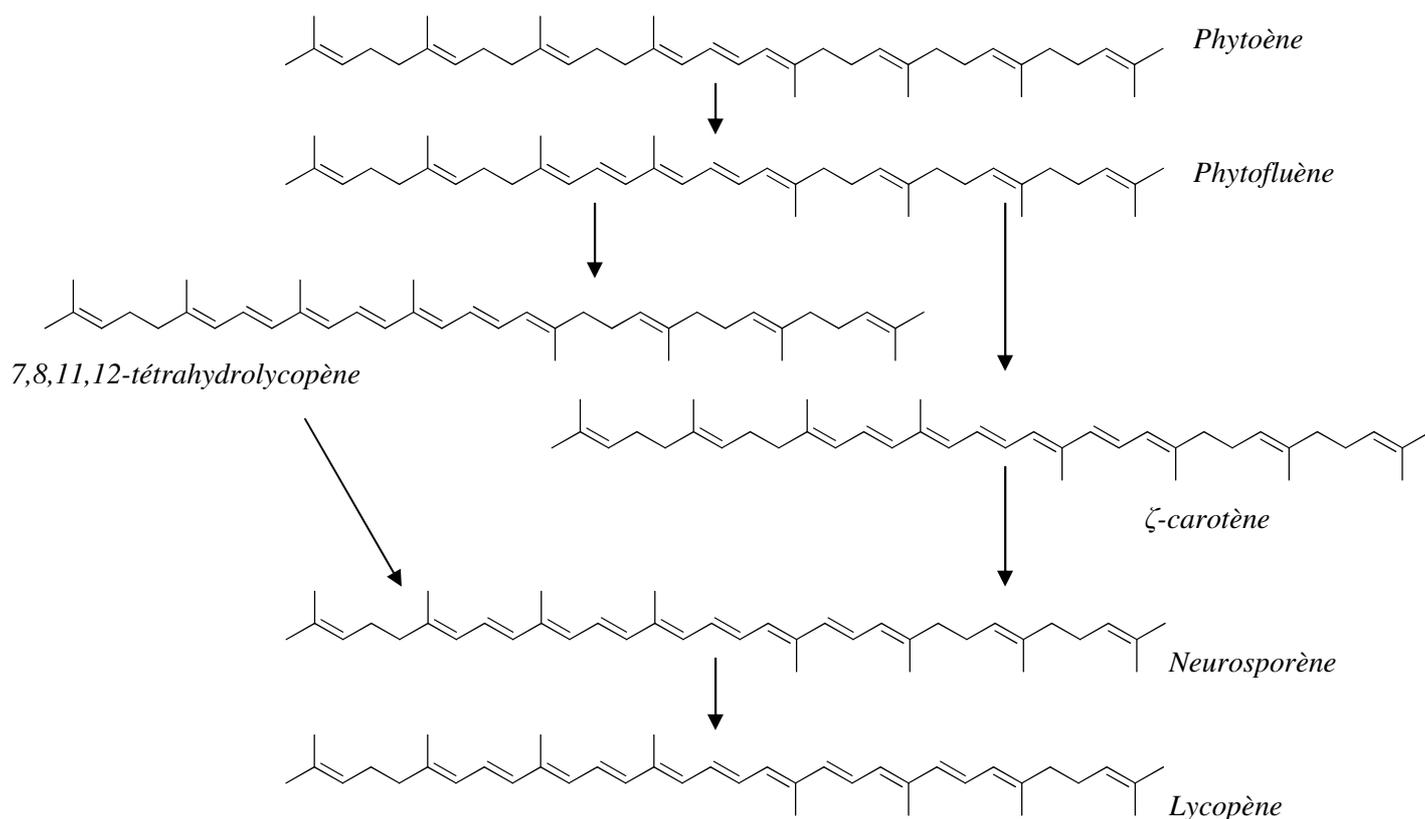
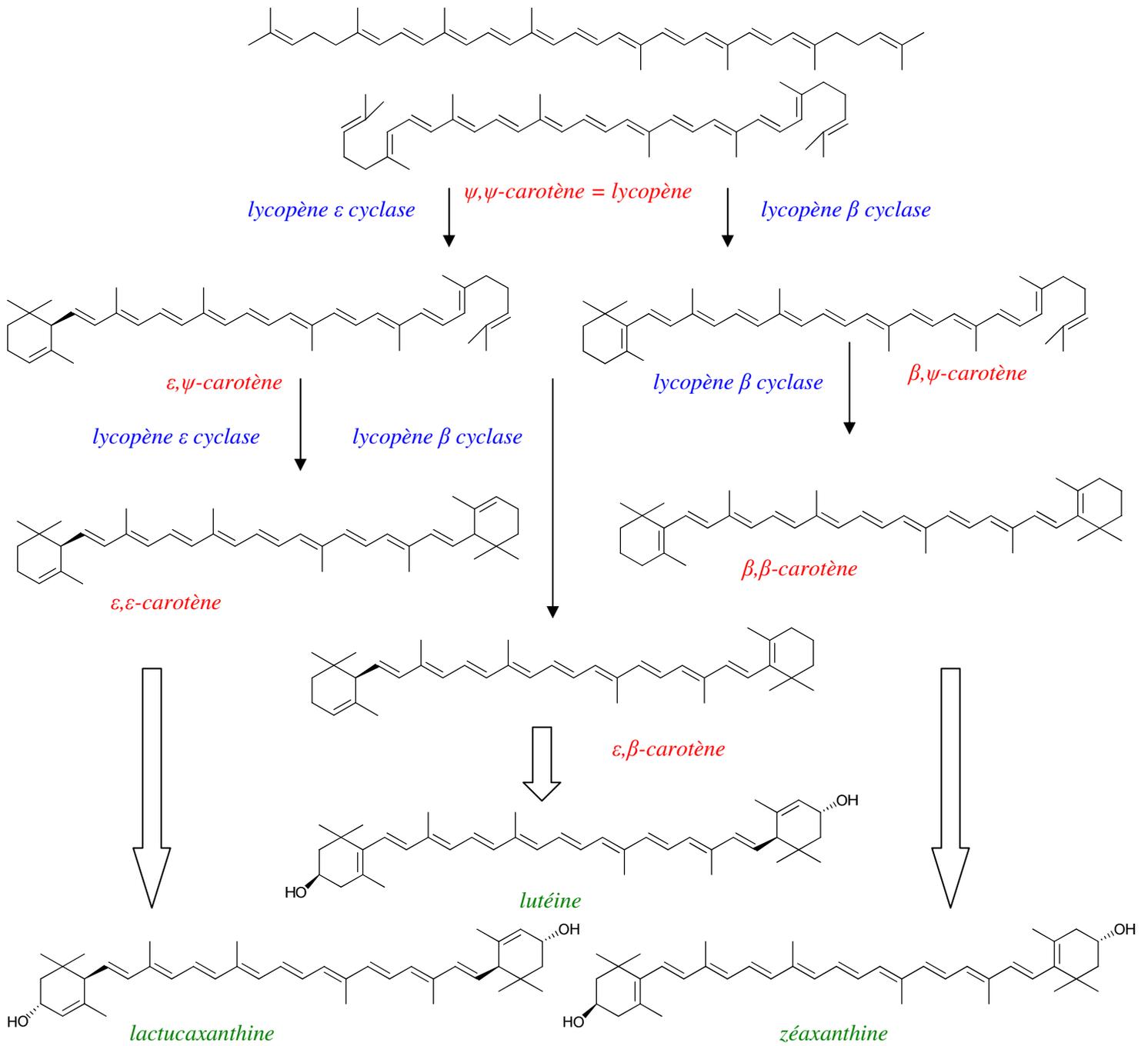


Schéma 3 : désaturations successives du phytoène

1.3.4) Les caroténoïdes : Diversité via un processus enzymatique

Il serait fastidieux de décrire toutes les voies enzymatiques permettant l'obtention des 700 caroténoïdes répertoriés. Nous prendrons un exemple pour illustrer l'intervention enzymatique sur la diversité des caroténoïdes. Une partie des caroténoïdes est obtenue via la cyclisation enzymatique de la chaîne terminale de la molécule de lycopène. Le β,ψ -carotène est obtenu par intervention de la β -cyclase sur le lycopène, une deuxième cyclisation produit le β,β -carotène. Le β,β -carotène étant le précurseur de certains xanthophylles tels que la zéaxanthine, la violaxanthine ou encore la néoxanthine, ces derniers sont formés par l'intervention d'enzymes d'oxydation spécifiques. D'après les mêmes considérations le ϵ,ψ -carotène est obtenu par cyclisation du lycopène via l'enzyme lycopène ϵ cyclase puis une nouvelle

cyclisation par cette même enzyme produit le ϵ,ϵ -carotène. L'action d'enzymes oxydantes conduit à la lactuaxanthine (schéma 4).



Légende : bleu : enzymes, rouge : carotènes, vert : xanthophylles

Schéma 4 : diversité des caroténoïdes par voie enzymatique

1.4) Propriétés des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels présent chez de nombreuses plantes et organismes. La structure moléculaire de ces derniers joue un rôle important quant à leurs propriétés chimiques, physico-chimiques mais aussi biologiques.

1.4.1) Leurs couleurs

Les caroténoïdes sont des molécules pour la plupart naturellement colorées. Cette propriété est due à leurs structures moléculaires, en effet ils possèdent plusieurs doubles liaisons conjuguées constituant le chromophore de la molécule (figure 17).

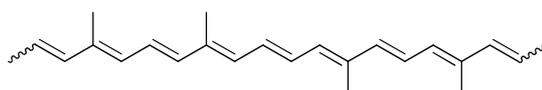
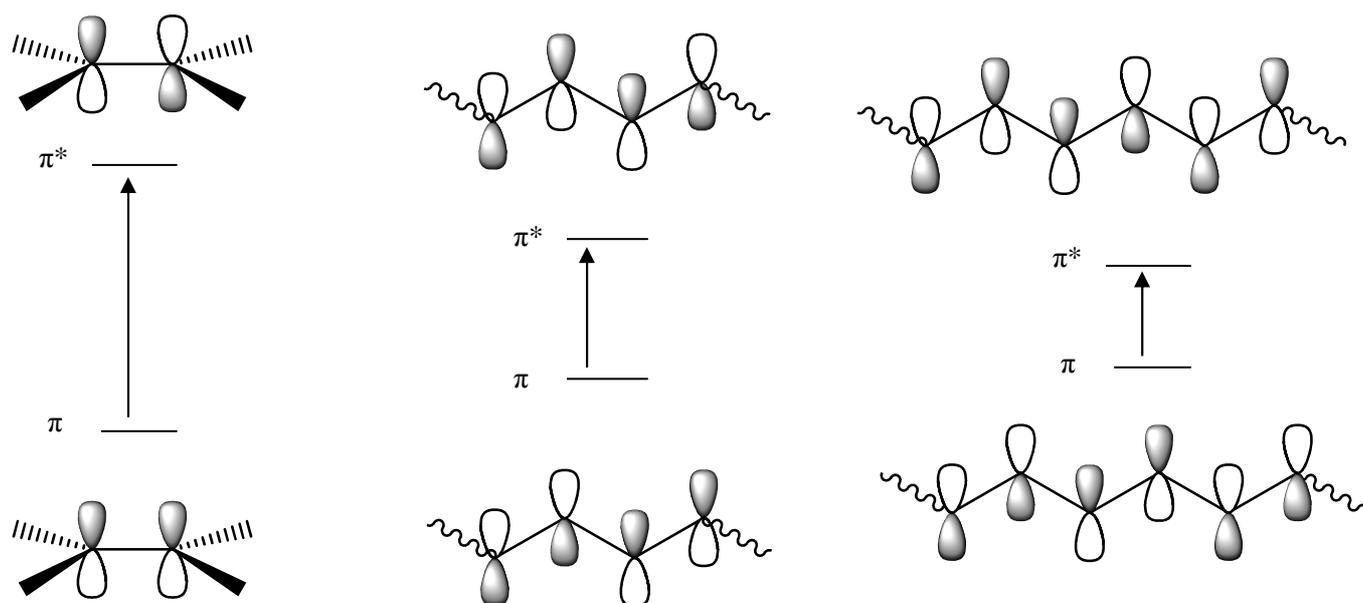


Figure 17 : chromophore commun de nombreux caroténoïdes

En effet le chromophore porté par les caroténoïdes est un enchaînement de carbones hybridés Csp^2 ; ces derniers formant des doubles liaisons conjuguées avec des électrons π fortement délocalisés qui nécessitent une énergie correspondant au domaine du visible pour transiter de l'orbitale moléculaire haute occupée (HOMO) du système π vers l'orbitale moléculaire vide de basse énergie (LUMO) considéré comme l'état excité π^* . Lors de la désexcitation une couleur intense jaune, orangé ou rouge est émise. En effet l'enchaînement des liaisons π diminue l'écart énergétique entre l'orbitale moléculaire de basse énergie vide (π) et la haute occupée (π^*) (figure 18) de la molécule. C'est ainsi que l'écart énergétique diminue de 2,14 eV entre le système éthylène et butadiène et de 1,08 eV entre le butadiène et le système hexatriène. La simulation de calcul de la longueur d'onde de ces systèmes nous montre une augmentation du λ_{max} (nm) avec l'augmentation de la conjugaison (figure 18).



Orbitales moléculaires	éthylène	1,3-butadiène	1,3,5-hexatriène
E(HOMO) / eV	-10.64	-9.47	-8.90
E(LUMO) / eV	1.23	0.26	-0.25
λ_{\max} / nm	204.7 (0.23*)	243.3 (0.86*)	282.9 (1.20*)

* force de l'oscillateur (mesure de l'intensité de la bande d'absorption)

Figure 18 : diagrammes des orbitales moléculaires d'un système π en fonction de sa conjugaison et leurs valeurs associées en eV

La longueur d'onde d'absorption des caroténoïdes est aussi fonction des groupements terminaux liés au chromophore. En effet ces derniers ont un effet bathochrome ($\lambda_2 > \lambda_1$) ou hypsochrome ($\lambda_2 < \lambda_1$) important sur l'absorption et par conséquent sur la couleur émise par les caroténoïdes. A titre d'exemple le β -carotène absorbe à 450 nm (hexane), le lycopène à 470 nm (hexane), le 2'-apo- β -caroténol à 473 nm (EtOH) et 2'-apo- β -caroténal à 498 nm (EtOH). Les caroténoïdes ayant plus de 40 atomes de carbone peuvent absorber jusqu'à 528 nm dans le cas de 2,2'-dikétopirilloxanthine (hexane).

Les caroténoïdes, via leurs structures, ont des propriétés de colorant naturel, c'est ainsi qu'ils se trouvent dans de nombreux fruits et légumes (tableau 2) [22] ayant des rôles multiples pouvant intervenir dans un processus de protection ou de régulation de la plante, mais aussi d'attraction pour favoriser la pollinisation.

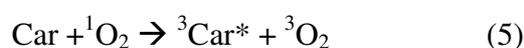
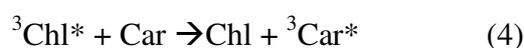
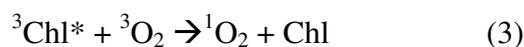
Caroténoïdes	Sources
Lycopène	Tomate, Pastèque, Papaye....
β -Carotène	Carotte, Abricot, Mangue, Poivron rouge, Epinard, Brocoli....
α -Carotène	Carotte, Poivron jaune, Blé, Courge....
Lutéine et zéaxanthine	Epinard, Brocoli, Petit pois, Chou de Bruxelles....
β -Cryptoxanthine	Avocat, Orange, Papaye, Poivre, Fruit de la passion....

Tableau 2 : distribution de caroténoïdes dans l'alimentation

1.4.2) Protection contre les dommages oxydatifs

1.4.2.1) Chez la plante : piégeage de l'oxygène singulet

Chez la plante les caroténoïdes interviennent entre autre dans le processus de la photosynthèse en tant que molécules photo-protectrices. En effet la lumière est un élément essentiel au processus de la photosynthèse mais cette dernière associée à l'oxygène peut avoir des effets néfastes par formation d'oxygène singulet très réactif qui pourrait causer des dommages cellulaires (eq 1-3). Les caroténoïdes présents dans la plante sont capables via leurs polyconjugaisons d'accumuler une quantité importante d'énergie lumineuse et donc de jouer un rôle de filtre lumineux protégeant la plante. Plusieurs processus peuvent dissiper l'énergie lumineuse. Ils peuvent récupérer l'excédant énergétique de la chlorophylle (eq 4) ou encore intervenir physiquement lors d'un "quenching physique" pour transférer l'oxygène d'un état excité singulet à son état fondamental triplet (eq 5). Enfin la forme excitée du caroténoïde peut revenir à son état fondamental en dissipant de la chaleur (eq 6). Les différents processus sont décrits ci dessous.



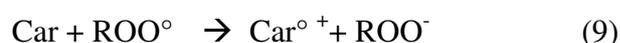
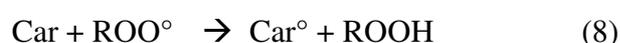
1.4.2.2) Chez l'homme : rôle antioxydant ?

Les fruits et légumes sont la première source d'approvisionnement en microconstituants caroténoïdes pour l'homme. Sur les quelques 700 caroténoïdes répertoriés, seul une centaine se trouve dans notre alimentation et seul une dizaine a été détectée dans le plasma et les tissus humains. Des études menées sur des personnes ayant une consommation régulière en fruits et légumes ont permis de déterminer une concentration moyenne de certains caroténoïdes dans le plasma [23] (tableau 3).

Caroténoïdes	Concentration plasmatique (µmol/L)
α-Carotène	0,14
β-Carotène	0,44
β-Cryptoxanthine	0,29
Lycopène	0,73
Lutéine	0,41
Zéaxanthine	0,009

Tableau 3 : concentration plasmatique moyenne de quelques caroténoïdes dans le plasma humain

Les caroténoïdes présents dans l'organisme peuvent agir en tant qu'antioxydant via leurs chaînes polyconjuguées sensibles à l'oxydation [24]. Des études *in vitro* ont montré que les caroténoïdes sont des molécules antioxydantes pouvant piéger des radicaux [25-26]. Les espèces oxygénées réactives (EOR) libres peuvent être générées de multiples façons dans les cellules et tissus. Un exemple, les lipides insaturés peuvent former des radicaux peroxydes. Ces derniers peuvent être neutralisés par des molécules antioxydantes telles que les caroténoïdes [27]. Cette propriété antioxydante se manifeste par formation d'adduits entre le caroténoïde et le radical peroxyde (eq 7), par arrachement d'hydrogène sur le caroténoïde (eq 8) ou encore par transfert d'électron entre le caroténoïde et la radical peroxyde pour former des radicaux cations dérivés stables (eq 9), ces derniers ne pouvant à priori plus réagir avec d'autres molécules biologiques.



Le rôle antioxydant des caroténoïdes *in vivo* fait actuellement objet de controverses. En effet les concentrations plasmatiques seraient trop faibles pour justifier d'une activité antioxydante après absorption des caroténoïdes. Notre équipe a proposé que l'action antioxydante des caroténoïdes pourrait s'exercer avant absorption, i.e dans le tractus digestif [28].

D'autres études ont montré que les caroténoïdes pourraient avoir un rôle prooxydant en présence d'une pression partielle en O₂ élevée [29] ou d'autres radicaux pouvant provenir par exemple de la fumée de cigarette [30]. En effet un équilibre peut s'instaurer entre °Car-OOR et le dioxygène pour former °OOCar-OOR (eq 10). De la même manière l'oxygène peut réagir avec les radicaux caroténoïdes et lipidiques induisant l'auto-oxydation de Car° et L° (eq 11-12). Ces espèces (°OOCar-OOR, CarOO°, LOO°) acquièrent donc des propriétés oxydantes.



1.4.3) Effet santé des caroténoïdes

Un effet santé des caroténoïdes à été démontré, de nombreuses études épidémiologiques ont montré une relation entre une consommation régulière en caroténoïdes et la diminution d'un certain nombre de maladies [31-33]. Les caroténoïdes en synergie avec d'autres micronutriments interviendraient dans de nombreux processus biologiques permettant la réduction de maladies, notamment les cancers dont les plus importants sont les poumons, la gorge, le colorectal et de la prostate.

En effet des études *in vitro* ont montré que les caroténoïdes inhiberaient la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses, interviendraient dans la communication intercellulaire et pourraient jouer un rôle dans la modulation de l'expression de certains gènes. Tous ces facteurs auraient un effet protecteur contre la cardiogénèse [32].

Les caroténoïdes peuvent aussi jouer un rôle dans la prévention des maladies de la vision. De nombreuses études indiquent que la lutéine et la zéaxanthine interviendraient dans la santé de l'oeil. Ces deux xanthophylles sont particulièrement concentrés dans la partie centrale de l'oeil de la rétine appelée *macula lutéa* et forment une couche protectrice qui absorbe la lumière bleue. Une absorption régulière de ces deux caroténoïdes via une consommation en épinard et maïs diminuerait le risque de maladie maculaire liée à l'âge communément connue sous le nom de DMLA, voir aussi de la cataracte [34].

Le schéma 5 synthétise brièvement et simplement le rôle des caroténoïdes dans la prévention des maladies.

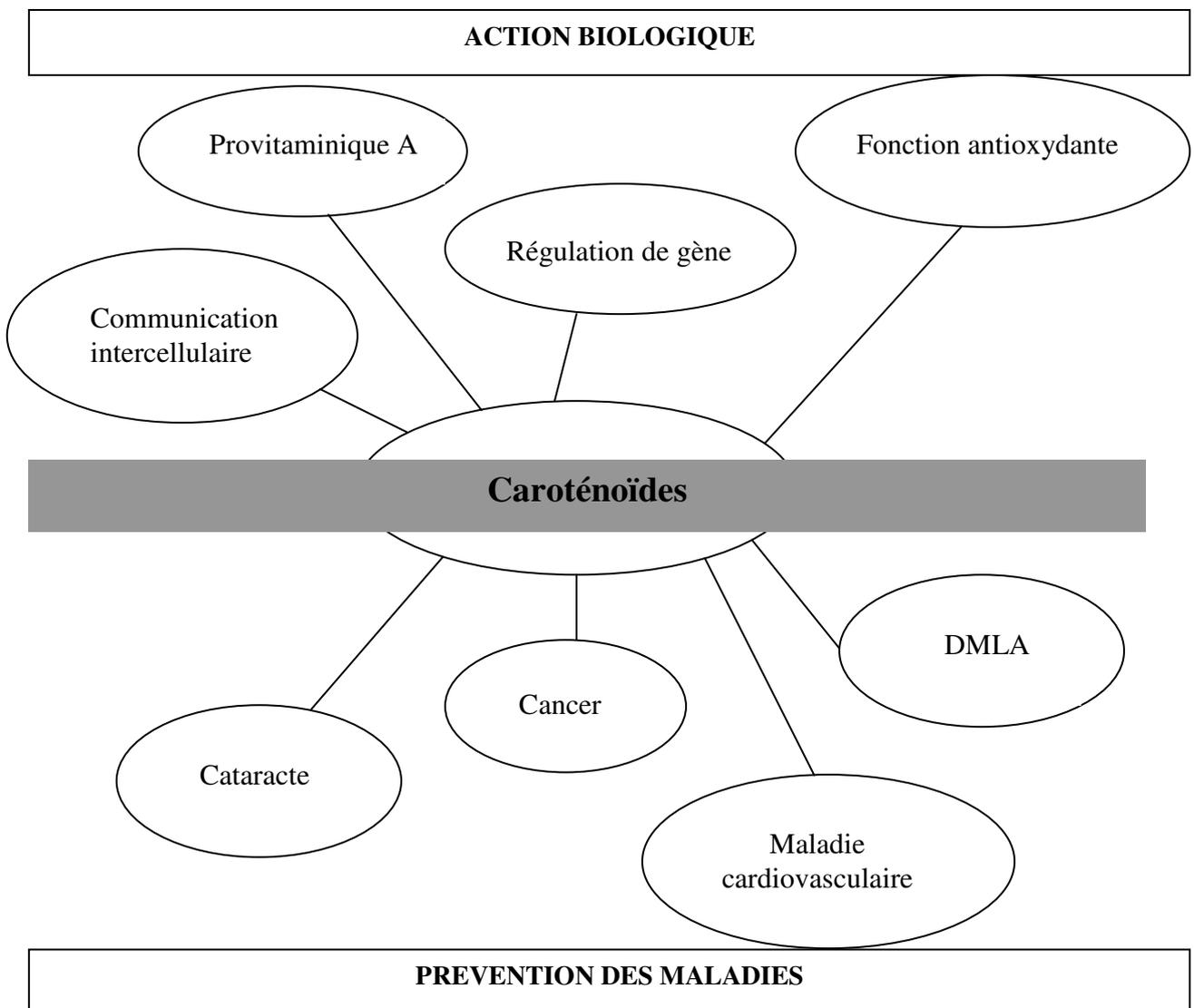


Schéma 5 : action biologique des caroténoïdes pour la prévention des maladies

1.4.4) Focus sur le lycopène

1.4.4.1) Structure

Le lycopène ou ψ,ψ -carotène est une molécule hydrogénocarbonée aliphatique ayant pour formule brute $C_{40}H_{56}$. Elle a une structure linéaire liée à ses 13 insaturations, parmi lesquelles 11 doubles liaisons sont conjuguées et lui confère une absorption à 470 nm (éther de pétrole) correspondant à la couleur complémentaire rouge. Le lycopène tout (*E*) dont la structure est thermodynamiquement la plus stable est une molécule parfaitement symétrique en son centre. Les doubles liaisons peuvent s'isomériser via un apport énergétique ou lumineux, mais aussi via un processus enzymatique ou une réaction chimique. Les isomères les plus courants du lycopène sont le (*5Z*), (*9Z*), (*13Z*) et (*15Z*)-lycopène (figure 19).

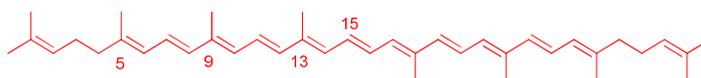


Figure 19 : lycopène tout (*E*) et ses positions les plus fréquemment isomérisées

1.4.4.2) Sources de lycopène

Les sources de lycopène sont diverses (tableau 4) [35], la plus connue étant la tomate, en fonction des cultivars et des conditions de culture sa concentration peut varier de 2,1 mg/100g fruit frais à 7,3 mg/100g. Les procédés industriels pour la préparation des produits transformés à base de tomate augmente la concentration en lycopène de ces préparations comparativement au fruit de tomate. Mais le lycopène est aussi présent dans la papaye et la pastèque dans des concentrations similaires à la tomate fraîche. Malgré un écart important entre les différentes études, la meilleure source de lycopène provient d'un fruit vietnamien appelé le "gac", elle a été évaluée entre 26,8 et 305,4 mg/100g fruit frais.

Fruit	Concentration en lycopène (mg/100g fruit frais)
Tomate fraîche	2,1-7,3
Tomate transformée	3,0-55,5
Papaye	1,7-3,1
Pastèque	7,6
Gac	26,8-305,4

Tableau 4 : sources et concentrations en lycopène

1.4.4.3) Effet santé du lycopène

Des études épidémiologiques montrent une relation entre une consommation en produit de tomate et la diminution du risque de maladies chroniques [28-31]. Le lycopène interviendrait dans la prévention de nombreux cancers tels que la gorge, le foie, les ovaires et la prostate, ce dernier étant le plus étudié [4]. Il interviendrait aussi dans la prévention des maladies cardiovasculaires [36-37]. En effet le lycopène est le caroténoïde commun se trouvant en plus grande concentration dans le plasma et les tissus humains, sa forme circulante est majoritairement constituée d'isomères Z [38]. La nature lipophile du lycopène lui permet de s'associer aux lipoprotéines de basse densité (LDL), on le retrouve aussi au niveau des cellules grasses appelées adipocytes, des cellules du foie, des testicules et de la prostate. Les effets préventifs s'expliqueraient par une action du lycopène sur la modulation de l'expression de certains gènes mais aussi par sa propriété antioxydante. Le schéma 6 synthétise brièvement et simplement le rôle du lycopène dans la prévention des maladies chroniques.

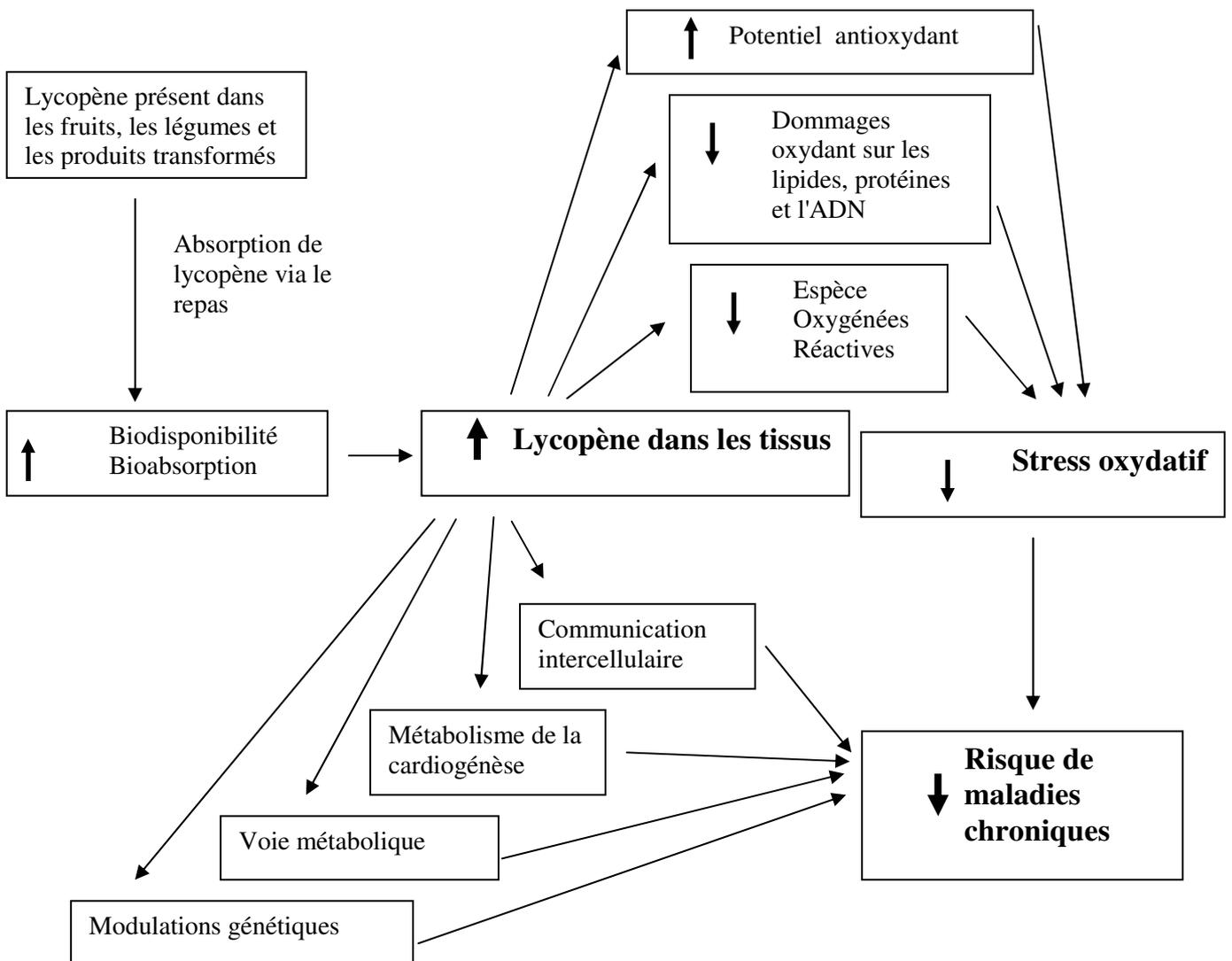


Schéma 6 : rôle du lycopène dans la prévention des maladies chroniques

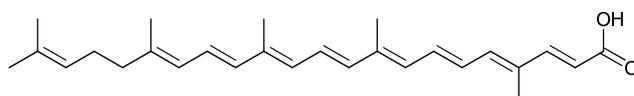
Chapitre 2

Les produits d'oxydation des caroténoïdes

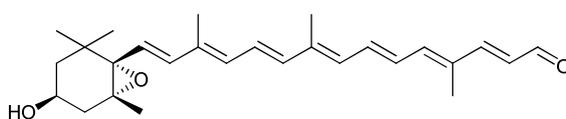
Dans ce deuxième chapitre nous nous attarderons sur l'obtention des produits d'oxydation des caroténoïdes, notamment dans les systèmes biochimiques, par autoxydation, par oxydation chimique, ainsi que la présentation de ceux présents dans l'alimentation. Enfin nous consacrerons une partie du chapitre à la présentation des apocyclopénoïdes ciblés pour la synthèse organique et nos études physico-chimiques.

II) Produits "d'oxydation" des caroténoïdes

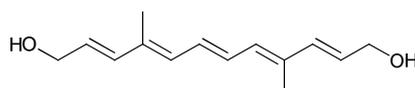
Les molécules formées à partir des caroténoïdes peuvent être des produits d'oxydations "classiques" c'est-à-dire des molécules provenant d'un caroténoïde et ayant additionné un ou plusieurs atomes d'oxygènes, par exemple les époxy-lycopènes. Nous pouvons aussi considérer comme produits d'oxydation de caroténoïdes toutes les molécules provenant à l'origine d'un caroténoïde ayant perdu au moins un atome de carbone sur sa chaîne et cette dernière s'étant oxydée (exemples figure 20) comme faisant partie intégrante de la famille des produits dérivés de caroténoïdes, on les retrouve sous plusieurs dénominations telles que produits de dégradation de caroténoïdes [15], produits de décomposition de caroténoïdes [39], produits d'oxydation de caroténoïdes, produits d'oxydation et de dégradation de caroténoïdes [39], produits de coupure oxydante de caroténoïdes [40], produits issus de clivage oxydant de caroténoïdes, apo-caroténoïdes, et lycopénoïdes [14]. Ces molécules peuvent être produites dans la nature par voie biochimique, par autoxydation de caroténoïdes, par voie chimique ou encore lors de procédés de transformation industrielle.



Acide apo-10'-lycopénoïque



Apo-10'-violaxanthal



10,10'-diapocarotène-10,10'-diol

Figure 20 : produits naturels issus de coupures oxydantes de caroténoïdes

2.1) Dans la nature et les systèmes biochimiques.

Dans la nature, une centaine de produits d'oxydation des caroténoïdes a été répertoriée, dont 88 sont pleinement caractérisés [8]. Les rétinoïdes tels que l'acide rétinoïque, le rétinol ou encore le rétinol (vitamine A) sont issus d'une coupure oxydante de caroténoïdes provitaminiques, tels que le β -carotène ou la β -cryptoxanthine, cette coupure se produit dans l'organisme humain via un processus enzymatique. Leurs mécanismes de formation sont encore controversés avec deux hypothèses basées sur un clivage central ou excentrique de ces molécules.

Des études ont montré que la coupure excentrique du β -carotène produit des apo-caroténals et quelque fois l'acide rétinoïque en fonction du système biochimique [41-44]. C'est récemment que l'enzyme responsable de ce clivage a été identifiée. La première enzyme effectuant des clivages centraux (CMO I) a été extraite de différents organismes et partiellement purifiée [41-44]. Elle a été caractérisée comme étant une enzyme de type monooxygénase [45].

Concernant l'enzyme clivant excentriquement, le β -carotène est coupé entre le carbone 9' et 10' produisant l'apo-10'-caroténal [46]. Une enzyme similaire a été identifiée chez le furet, bon modèle de métabolisation des caroténoïdes chez l'homme, des études menées *in vitro* ont démontré que cette enzyme coupe le β -carotène mais aussi le (5Z) et (13Z)-lycopène au niveau de la double liaison 9'-10' [5] pour générer les apo-caroténals et apo-lycopénals correspondants. L'apo-10'-lycopénol a été détecté dans les tissus des poumons du furet [10, 47], les auteurs supposent qu'il pourrait provenir du clivage du lycopène par la CMO II produisant l'apo-10'-lycopénal, ce dernier n'ayant pas été détecté mais par la présence de NAD^+ et NADH génèrerait l'apo-10'-lycopénol et l'acide apo-10'-lycopénoïque non identifié mais aussi fortement supposé.

Par la suite et pour la première fois les produits d'oxydation apo-8'-lycopénal et apo-12'-lycopénal ont été identifiés *in vivo* chez le rat [6]. Toutes ces découvertes sur la formation biosynthétique des apo-caroténals ainsi que la découverte d'une enzyme clivant asymétriquement les caroténoïdes ont généré un engouement sur l'étude des produits d'oxydation des caroténoïdes et leurs rôles *in vivo*.

Par ailleurs, il est connu que les apo-caroténoïdes présents chez la plante ont un rôle de médiateur bioactif. Ces composés interviendraient au niveau de la pollinisation, des interactions allélopathiques mais aussi sur le système de défense et d'architecture de la plante [47]. Par exemple l'acide abscissique, métabolite provenant du clivage de la double liaison 11'-12' de la (9'Z)-néoxanthine est essentiel chez la plante. De nombreux autres apo-caroténoïdes plus volatils comprenant 9 ou 13 atomes de carbone ont été identifiés dans les fruits, le vin ou encore le tabac. Beaucoup d'entre eux sont des composés ayant des propriétés odorantes et sont fréquemment utilisés comme arôme naturel commercial.

2.2) Produits par autoxydation

L'autoxydation a été définie comme "une oxydation spontanée à l'air d'une substance, sans agent catalyseur" [48]. L'état triplet de l'oxygène moléculaire nous entourant et l'état singulet de la majorité des biomolécules rend impossible la réaction entre ces deux derniers. Cependant une autoxydation se produit au cours du temps, dûe à une réaction lente entre la molécule organique et l'oxygène de l'air. En effet la longue polyconjugaison des caroténoïdes ainsi que la probable présence de traces d'ions métalliques, lumière ou chaleur favoriseraient ce processus d'autoxydation.

2.2.1) Autoxydation dans les systèmes organiques

Plusieurs études ont été menées via des réactions chimiques non radicalaires sans catalyseurs métalliques dans des solvants organiques sous flux d'oxygène afin de comprendre le mécanisme de formation de ces produits d'autoxydation.

Les premières études ont été menées sur le β -carotène à 60°C dans le toluène en présence d'oxygène [49]. Les produits issus de la réaction ont été identifiés comme étant probablement 5,6- et 5,8-époxydes, 5,6 ; 5',6'- et 5,8 ; 5',8'-diépoxydes du β -carotène ainsi que d'autres produits carbonylés qui n'ont pas été identifiés. Les auteurs ont déduit que les doubles liaisons intracycliques 5,6 et 5',6' sont les premières à s'oxyder en présence d'oxygène sachant qu'elles sont les plus riches en électrons sur la molécule. Ils ont aussi déduit des résultats

expérimentaux une cinétique réactionnelle d'ordre zéro avec une énergie d'activation de 10,2 kcal/mol. A partir de ces données ils ont conclu à la formation "d'un complexe intermédiaire entre le β -carotène et l'oxygène ayant un "caractère radicalaire". Plus de 20 ans plus tard des expériences similaires ont été reproduites (β -carotène, toluène, 60°C, oxygène, 120 min) [50], les analyses par CLHP-SM ont permis d'identifier le 5,6-époxyde du β -carotène et des apo-caroténals.

Puis de nouvelles expériences à température plus basse mais avec un temps de réaction plus long (β -carotène, benzène ou dichlorométhane, 30°C, oxygène, obscurité, 48 et 77 heures) [51] ont permis d'identifier les mono- et di-époxydes du β -carotène comme précédemment détectés, ainsi que des isomères (Z), des apo-caroténals de différentes longueurs de chaîne, des molécules courtes volatiles et des composés oligomériques non identifiés auparavant. Les auteurs expliquent la formation de ces composés via un processus "semi-radicalaire" par lequel l'initiation de la réaction produirait un diradical du β -carotène. Des études complémentaires confirment la formation des mêmes produits d'oxydation mais s'appuient sur des modèles différents tels que des modèles cinétique [52] ou radicalaire [53].

2.2.2) Autoxydation dans les systèmes aqueux

Des études d'autoxydation ont été menées dans des systèmes aqueux sur plusieurs caroténoïdes [54]. Les caroténoïdes sont absorbés sur une phase solide greffée C-18 et exposés à un flux continu d'eau saturée en oxygène ou en ozone à 30°C. Les produits de la réaction sont principalement des isomères (9Z), (13Z) et di-(Z), des produits issus du clivage oxydatif tels que le β -apo-13-caroténone et le β -apo-14'-caroténal, mais aussi du 5,8-époxyde et 5,8-endoperoxyde du β -carotène. Récemment l'autoxydation du β -carotène dans un modèle aqueux en présence de lumière pendant 30 jours a montré la formation d'isomère (Z), des produits hydroxylés en position 4 et époxydés en position 5,6 ; 5',6' ; 5,8 et 5',8' mais aussi des apo-8', -10', -12', -14' et -15'-caroténals [55].

2.2.3) *Autoxydation dans les systèmes micellaires*

Dans un système micellaire, l'autoxydation du lycopène à 37°C pendant 72 heures génère 8 produits d'oxydation 3,7,11-triméthyl-2,4,6,10-dodécapentaèn-1-al, 6,10,14,triméthyl-3,5,7,9,13-pentadécapentaèn-2-one, l'acyclorétinal, l'apo-14'-lycopénel, l'apo-12'-lycopénel, l'apo-10'-lycopénel, l'apo-8'-lycopénel et l'apo-6'-lycopénel [56].

2.2.4) *Autoxydation dans les systèmes liposomiaux*

D'autres équipes ont étudié l'autoxydation des caroténoïdes dans une suspension lyposomiale, cette dernière pourrait mimer l'environnement des caroténoïdes *in vivo* [56-58]. La stabilité des caroténoïdes à l'oxydation à température ambiante à été étudiée dans des microsomes de foie de cochon [59]. Cette dernière a révélée une plus grande stabilité des xanthophylles comparativement aux carotènes tels que le lycopène et β -carotène. En effet des études préalables montraient un effet protecteur des lipides ou d'autres antioxydants tel que l' α -tocophérol sur l'autoxydation des caroténoïdes [61-63].

2.2.5) *Autoxydation dans les systèmes cellulaires*

L'autoxydation des caroténoïdes dans des cellules est très probable sur une période de plusieurs heures. L'apo-4'-lycopénel à été produit via des études cellulaires sur CACO-2 en présence de 3,4-didéhydrolycopène [60].

L'autoxydation de la canthaxanthine dans une culture cellulaire produit le tout-(*E*)-4-oxorétinoïque et de l'acide (13*Z*)-4-oxorétinoïque, deux produits d'oxydation intervenant dans la communication cellulaire [61].

2.2.6) *Autoxydation chez l'homme*

L'interaction des caroténoïdes avec la fumée de cigarette a été étudiée depuis la publication des résultats de deux études épidémiologiques : ATBC (alpha-tocopherol and β -carotene for cancer prevention) [62] et CARET (β -carotene and retinol efficacy trial) [63]. En effet le β -carotène promouvrait la carcinogénèse du poumon chez les fumeurs par un effet prooxydant. L'autoxydation du β -carotène en présence de fumée de cigarette a été étudiée dans un modèle chimique et montrerait la formation de 4-nitro- β -carotène comme espèce prooxydante, mais il se formerait aussi des apo-caroténals et des époxydes du β -carotène [64].

2.3) *Produits par oxydation chimique*

Les produits d'oxydation de caroténoïdes ont été élaborés par voie chimique dès 1950 pour aider à l'élucidation structurale de molécules caroténoïdes [65]. En effet la structure du caroténoïde parent peut être déduite des produits d'oxydation issus de ce dernier. Les fragments sont obtenus par clivage oxydant du caroténoïde en présence de permanganate de potassium en milieu alcalin ou d'acide chromique ou encore en pratiquant une ozonolyse qui produit de plus gros fragments [65]. Pour compléter l'élucidation structurale, l'oxydation du caroténoïde par le dioxyde de manganèse permet de confirmer la présence d'alcool primaire ou secondaire sur la structure par formation d'un aldéhyde ou d'une cétone α,β insaturée caractérisé par un effet bathochrome sur le spectre UV-Vis initial [66].

2.3.1) *Via l'oxygène singulet*

Les caroténoïdes sont connus pour intervenir au niveau de tissus photosynthétiques et inactiver l'oxygène singulet moléculaire via un « quenching chimique ». L'utilisation d'oxygène singulet est une voie de production de produits d'oxydation de caroténoïdes. L'utilisation d'un photosensibilisateur tel que le rose de Bengale en présence d'oxygène triplet sous illumination d'une lampe halogène à quartz permet de générer de l'oxygène singulet

réactif. Ce système en présence de β -carotène produit des produits de coupure apo-caroténoïdes, la β -ionone et le 5,8-endoperoxyde du β -carotène [67].

2.3.2) *Via ozonolyse*

L'ozonolyse des caroténoïdes a été employée pour cibler des produits de coupure pour des tests biologiques. Dans le cas du lycopène, le tout-(*E*)-4-méthyl-8-oxo-2,4,6-nonatriénal a été produit via cette méthode, il est issu d'une double coupure oxydante de la molécule de lycopène. Les tests biologiques ont montré une activité de ce produit sur l'induction de l'apoptose dans les cellules HL-60 [68].

2.3.3) *Via tétroxyde d'osmium/péroxyde d'hydrogène*

Le tétroxyde d'osmium et le peroxyde d'hydrogène ont d'abord été utilisés pour effectuer des clivages oxydants sur le β -carotène [69]. Plus tard cette méthode a été transposée sur le lycopène pour obtenir l'analogue acyclique du rétinol appelé apo-15-lycopénal ou acyclorétinal, cette molécule présentant un potentiel intérêt biologique. L'acide acyclorétinoïque et de l'acyclorétinol sont obtenus respectivement par oxydation et réduction de la fonction aldéhyde [70]. Cette méthode ne produit pas quantitativement l'acyclorétinal, mais aussi plusieurs autres produits d'oxydation tel que le 2,7,11-triméthyltétradécahexaène-1,14-dial ayant des propriétés stimulantes sur la communication cellulaire [71].

2.3.4) *Via le permanganate de potassium*

L'oxydation du β -carotène avec le permanganate de potassium dans un mélange dichlorométhane/eau n'est pas quantitative et produit les apo-8'- et 15-lycopénals, la semi- β -caroténone, des mono époxydes et l'hydroxy- β -carotène-5,8-époxyde [55]. Afin de pallier aux problèmes de solubilité, un protocole d'oxydation en milieu biphasique a été développé dans notre laboratoire et appliqué sur le lycopène [7]. Le bromure de cetyltriméthylammonium a été utilisé comme agent de transfert de phase pour favoriser le contact entre l'oxydant hydrophile et le lycopène lipophile dissous dans le dichlorométhane/toluène (1/1, v/v).

L'analyse du milieu réactionnel révèle la formation d'apo-lycopénals et lycopénone issus du mono clivage oxydant du lycopène et de diapo-caroténedials provenant d'un double clivage oxydant (figure 21). Aucun acide apo-lycopénoïque n'a été détecté ce qui prouve que les conditions expérimentales ne produisent pas de suroxydation dans le milieu réactionnel.

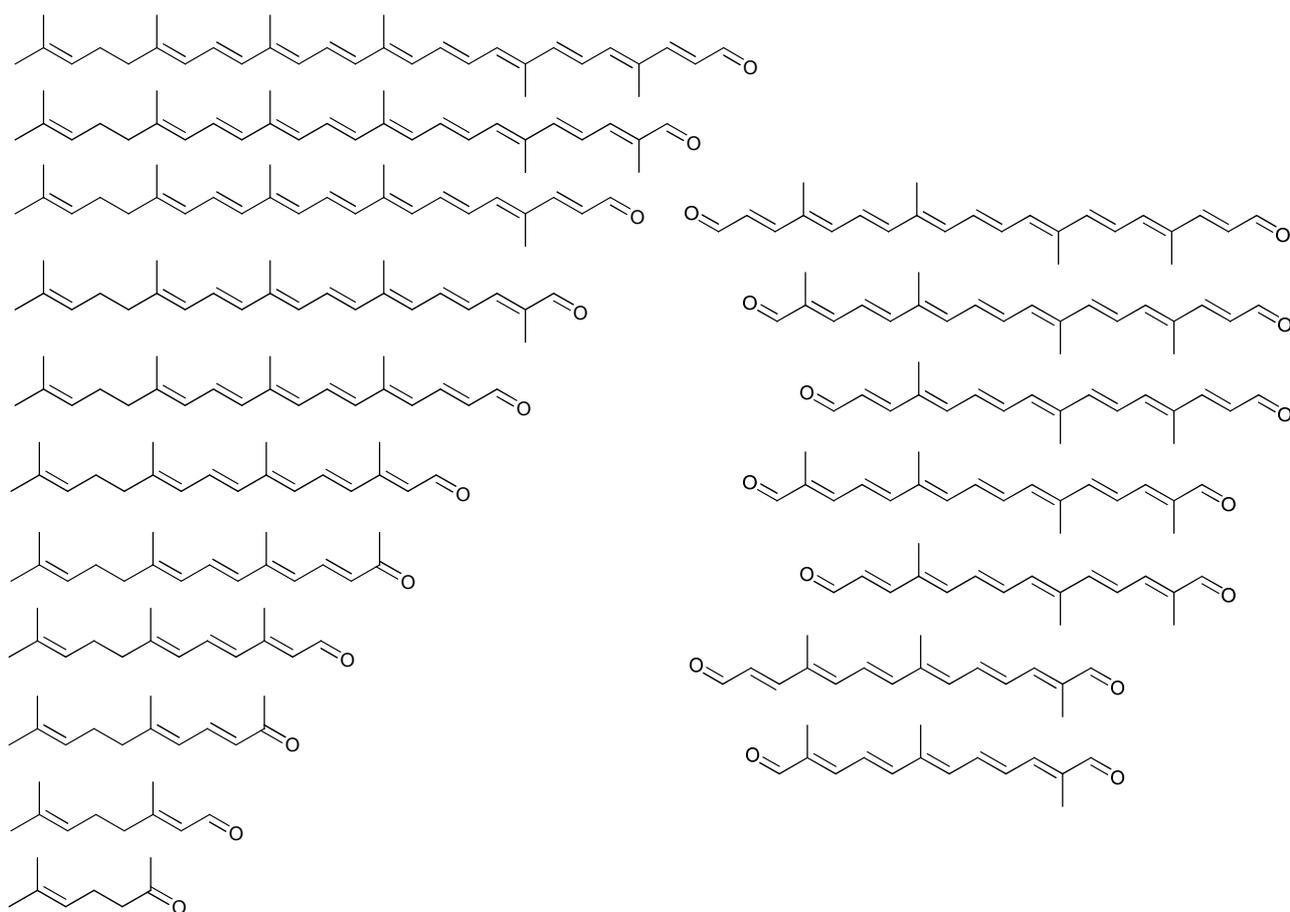
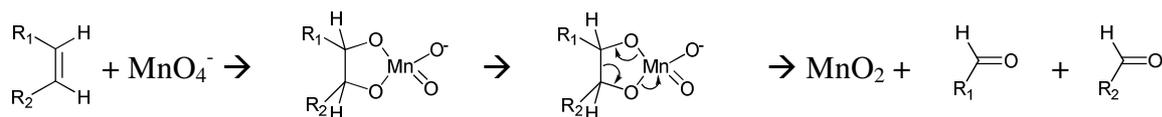


Figure 21 : produits d'oxydation du lycopène via l'oxydation du lycopène par $KMnO_4$, apo-lycopénone et apo-lycopénals (colonne de gauche), diapo-caroténedials (colonne de droite) [7]

Le permanganate de potassium est un réactif versatile car il peut réagir avec des doubles liaisons carbone-carbone par différents mécanismes et produire différents composés d'oxydation [72]. Dans nos conditions et celles utilisées par Rodriguez [55] l'utilisation de permanganate de potassium comme oxydant des doubles liaisons produit uniquement des apo-

caroténoïdes sans suroxydation. L'étape initiale serait une addition électrophile [3+2] du permanganate de potassium sur la liaison π pour former un cycle hypomanganate d'ester Mn(V) (schéma 7). Un transfert électronique pourrait former un cycle manganate d'ester Mn(VI) à un degré d'oxydation supérieur, lequel se réarrangerait puis se fragmenterait pour générer des produits de clivage comportant chacun la fonction carbonyle.



Schema 7 : mécanisme probable d'oxydation de liaison π par $KMnO_4$

2.3.5) Via les métalloporphyrines

Le clivage oxydant du β -carotène par le *tert*-butylhydroperoxyde en présence catalytique de la porphyrine de ruthénium liée à la cyclodextrine a été décrit comme particulièrement régiosélectif de la position 15-15' [73]. Simultanément notre équipe utilisait la porphyrine de ruthénium en présence d'oxygène moléculaire pour l'oxydation de caroténoïdes, plus particulièrement sur le clivage oxydant excentrique du β -carotène [74] ainsi que celui du lycopène [7]. Lors de ces études plusieurs produits ont été identifiés par CLHP-DAD-SM au cours du temps. Jusqu'à 24 heures de réaction on observe la présence des isomères (9Z, 13Z et 15Z) du lycopène, des époxydes, des apo-lycopénals et des apo-lycopénoles. Après 24 heures les isomères disparaissent alors que les produits d'oxydation apo-lycopénoïdes et époxydes continuent à évoluer jusqu'à 96 heures de réaction.

De plus les études menées par Groves [75] sur l'oxydation des doubles liaisons par une quantité catalytique de métalloporphyrine montrent une réactivité dix fois supérieure des isomères (Z) comparativement aux isomères (E) vis à vis de la métalloporphyrine. Toutes ces données conduisant à penser que les isomères (Z) se formeraient dans un premier temps, puis seraient oxydés en époxyde, et ces derniers se décomposeraient pour former les apo-

lycopénaux qui pourraient se décomposer via la même séquence en apo-lycopénaux plus courts (schéma 8).

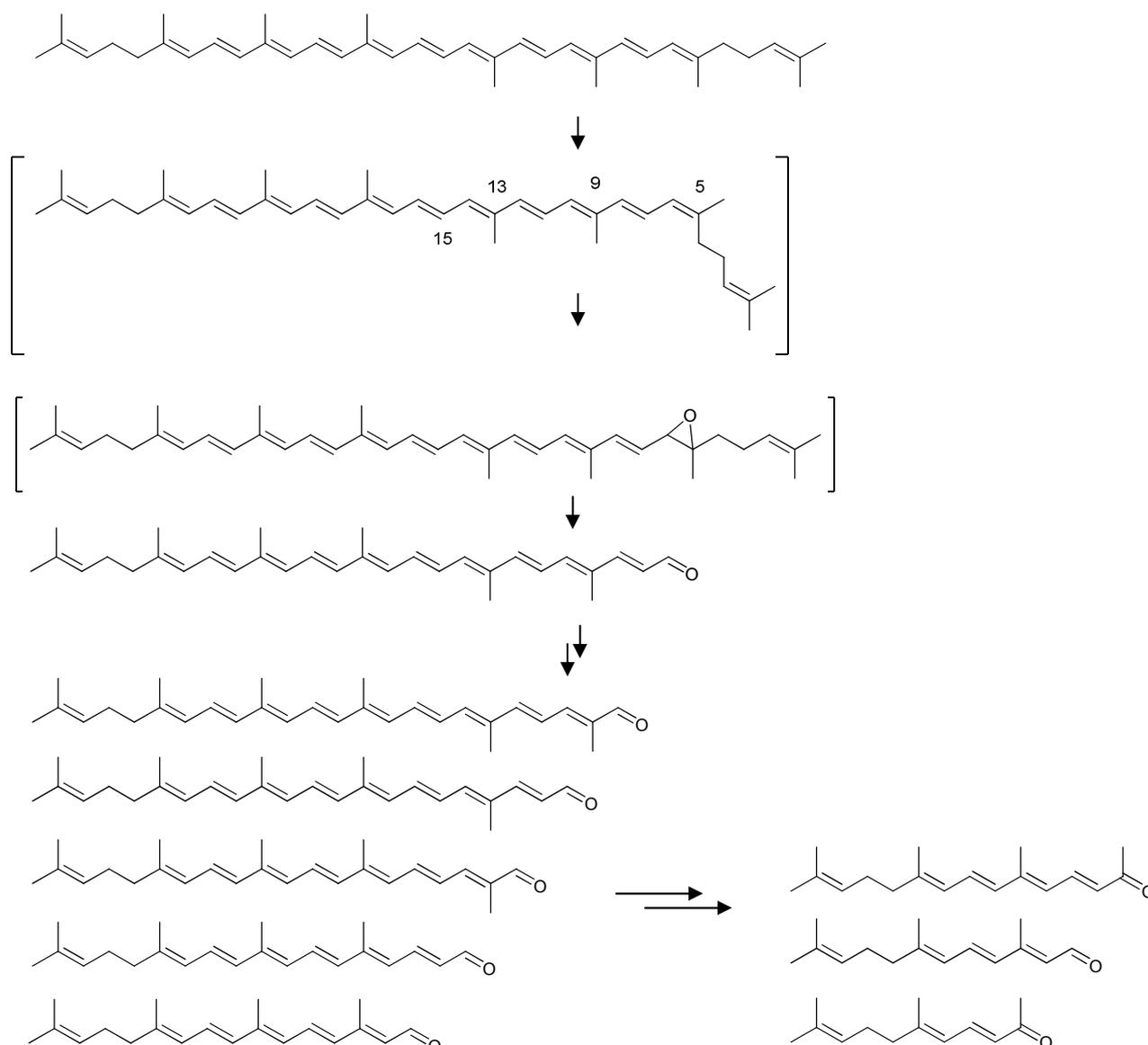


Schéma 8 : mécanisme probable de l'oxydation du lycopène par O_2 catalysée par la tétraphényl porphyrine de ruthénium[75]

Un autre système catalytique faisant intervenir la tétramésitylporphyrine, une porphyrine stériquement plus encombrée a été étudié pour l'oxydation du β -carotène par de l'oxygène moléculaire [74]. Cette dernière a été utilisée afin de ralentir la cinétique de réaction et tenter

de caractériser plus de composés intermédiaires. En effet dans un premier temps il se forme majoritairement des isomères (*Z*). Après six heures le mélange devient plus complexe, mais on peut identifier sur un chromatogramme trois grandes familles, les isomères du β -carotène, les apo-caroténals, et les époxydes du β -carotène (figure 22).

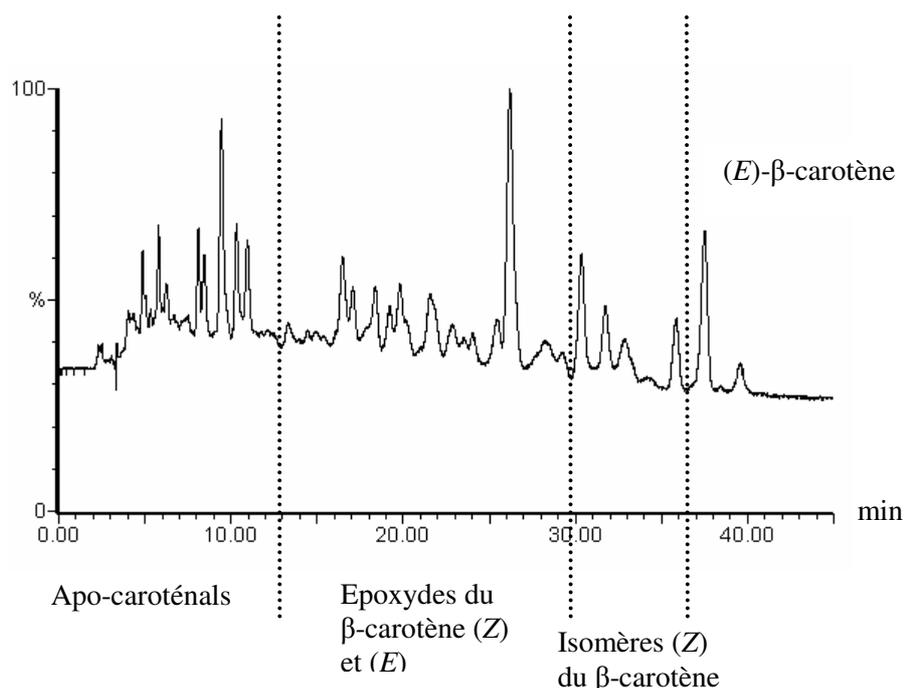


Figure 22 : chromatogramme à 450 nm à $t = 6$ h de l'oxydation du β -carotène par O_2 catalysée par la mésitylporphyrine de ruthénium [74]

Après 24 heures le β -carotène a totalement disparu mais le processus d'oxydation continue pour former des apo-caroténals ainsi que des époxydes d'apo-caroténals notamment des époxydes en position 5,6 ; ces derniers peuvent s'isomériser pour former une fonction furanoxyde en position 5,8. Les époxydes et furanoxydes d'apo-lycopénals n'ont jamais été détectés [7]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le β -carotène s'isomériser puis s'oxyde et se clive pour former des apo-caroténals, ce processus peut se répéter pour former d'autres produits d'oxydation (schéma 9).

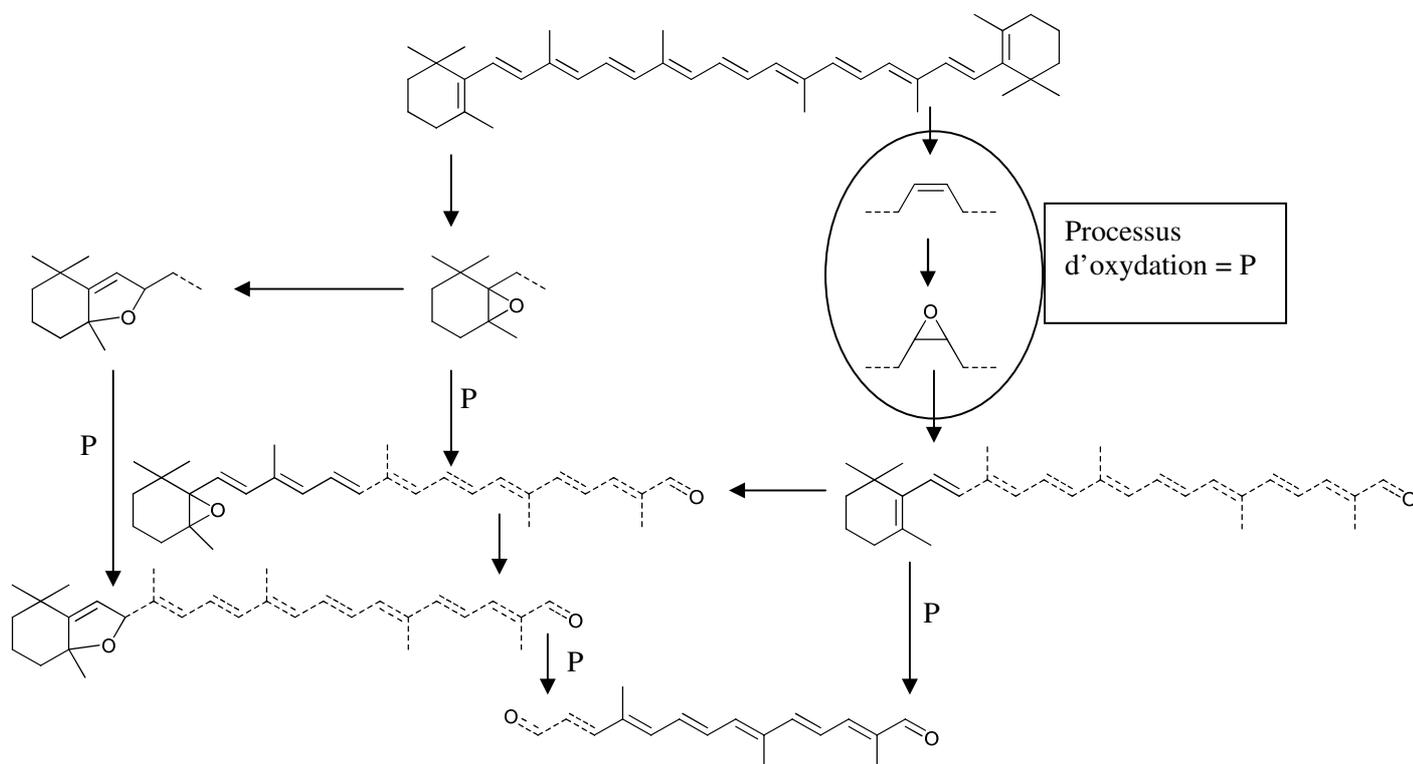


Schéma 9 : mécanisme probable de l'oxydation du β -carotène par O_2 catalysée par la tétramésityl porphyrine de ruthénium (les liaisons en pointillé indiquent que la longueur de la chaîne carbonée peut varier) [74]

2.4) Dans l'aliment : produits durant un procédé agro-industriel

Les traitements thermiques utilisés durant les procédés agro-industriels sont les causes principales affectant l'intégrité structurale des caroténoïdes. Les traitements thermiques produisent des produits de clivage oxydant mais aussi des produits d'oxydation sans clivage de la structure des caroténoïdes. Ces derniers peuvent être des époxydes le plus souvent en position 5,6 et 5',6' car il s'agit de la double liaison la plus riche en électron, des furanoxydes en position 5,8 et 5',8' de caroténoïdes ont aussi été identifiés. Ils proviennent du réarrangement d'un caroténoïde époxydé, ce dernier étant initialement présent dans le milieu [76] ou issu de l'oxydation de caroténoïdes durant le procédé [77].

Le traitement thermique génère aussi des produits de coupure de caroténoïdes sans introduction d'atome d'oxygène par réarrangement de la chaîne polyénique via un mécanisme radicalaire [78]. Des études ont montré que la dégradation du β -carotène durant un procédé industriel thermique produit des apo-caroténals mais aussi des époxydes de carotène (*E*) et (*Z*) [79-80]. Les auteurs pensent que le clivage de la chaîne serait fonction de la température, il commencerait depuis l'extrémité du squelette de la molécule vers le centre de la molécule. En effet l'apo-8'- et -10'-caroténals se forment pour tous les traitements alors que l'apo-12'- et -14'-caroténals nécessitent un chauffage plus élevé. L'apo-15-caroténal est une exception car il est présent quelque soit le traitement thermique. Ces résultats sont confirmés par des études de désodorisation d'huile de palme à 170-250°C [81], les produits de coupure du β -carotène identifiés sont les apo-13-caroténone, apo-14'- et -15-caroténals, ils seraient produits via un mécanisme impliquant la dégradation d'un cycle dioxétane. Un traitement de quatre heures à 210°C sur le β -carotène dans des conditions similaires [82] génère 3 composés volatils identifiés, plus de 70 composés non volatils dont l'apo-13-caroténone et l'apo-14'-caroténal. Les autres produits sont issus de coupures de la chaîne hydrogénocarbonée via un réarrangement sans introduction d'atome d'oxygène.

D'autres études privilégient l'identification des composés volatils issus de la dégradation thermique dans différents systèmes tels que le paprika, les tomates et la marigold [83]. Deux groupes de composés ont été identifiés, les oléfines cycliques avec ou sans atome d'oxygène telles que m-xylène, toluène, méthylbenzaldéhyde, éthanone etc...; et les composés qualifiés de "cétone linéaire" tels que la méthyl-3,5-heptadièn-2-one et la 6-méthyl-5-heptèn-2-one, ces derniers se formeraient via une cyclisation intramoléculaire suivie d'une réaction d'élimination puis oxydation.

D'autres études sur les mécanismes de formation de composés volatils via un traitement thermique ont été menées sur le β -carotène et le lycopène [77]. Concernant le lycopène, deux composés volatils connus ont été identifiés, le 2-méthyl-2-heptèn-6-one et le citral, ainsi que la 5-hexèn-2-one, l'hexane-2,5-dione, la 6-méthyl-3,5-heptadièn-2-one, trois nouveaux composés provenant probablement de la pseudoionone et du géranyl acétate. En accord avec la cinétique de formation de ces composés, ils seraient formés à partir du (*E*)-lycopène et non des isomères (*Z*) du lycopène qui se trouvent en minorité dans le milieu réactionnel.

2.5) Choix des produits d'oxydation potentiels métabolites du lycopène ciblés pour la synthèse organique

Le projet européen "LYCOCARD" (2006-2011) a été mis en place pour comprendre le rôle physiologique, biochimique et génétique du lycopène dans la protection contre les maladies cardiovasculaires.

Un de ses objectifs est de produire des molécules issues de l'oxydation du lycopène dans l'organisme, ces molécules seraient alors par définition des métabolites et plus précisément des catabolites du lycopène. Les fluides biologiques sont complexes à analyser car il y a une grande diversité de composés organiques. Il est donc nécessaire de posséder des molécules étalons afin de les identifier dans ces fluides biologiques et également d'étudier leurs propriétés biologiques, antioxydantes et complexantes. Nous avons vu précédemment que le lycopène intervient dans la prévention de cancer mais aussi de maladies dégénératives, on a vu de même une importance biologique des produits d'oxydation des caroténoïdes, la vitamine A en est un bon exemple chez l'homme. Plusieurs études mentionnées précédemment sur des modèles *in vivo* tels que le rat et le furet ont démontré l'existence de métabolites du lycopène mais aussi d'enzymes capables de cliver excentriquement des caroténoïdes et notamment le lycopène.

Pour produire des potentiels métabolites deux voies se proposent à nous, la dégradation oxydante du lycopène et la synthèse organique. Des produits d'oxydation ont été obtenus au laboratoire par coupure oxydante de la molécule de lycopène en présence de KMnO_4 [7]. Cette stratégie comporte de nombreuses difficultés, le clivage des doubles liaisons n'est pas sélectif et ne produit pas toutes les molécules désirées, de plus le clivage oxydant par KMnO_4 génère uniquement les fonctions terminales aldéhydes. Récemment l'utilisation des oxydes d'argent a permis l'obtention des fonctions acides carboxyliques à partir du mélange d'apolycopénals. La séparation des molécules par CLHP préparative est fastidieuse pour obtenir une trop faible quantité de produit (quelques milligrammes), soit trop peu pour une caractérisation complète par résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) puis pour effectuer toutes les analyses physico-chimiques et biologiques. Pour ces raisons, nous avons utilisé la synthèse organique pour l'obtention des "métabolites" du lycopène désirés, ces derniers n'étant pas commerciaux.

Les données de la littérature et surtout les discussions scientifiques avec les physico-chimistes, les nutritionnistes et biologistes du projet européen LYCOCARD nous a mené à cibler la familles des apo-11-lycopénoïdes, cette dernière n'a pas de pertinence biologique mais est très importante pour les études physico-chimiques, en particulier pour déterminer les relations activité/structure des apo-lycopénoïdes. Les autres familles ont été ciblées pour leur pertinence biologique. Concernant la famille des apo-14'-lycopénoïdes, les partenaires Hongrois pensent que l'acide apo-14'-lycopénoïque pourrait intervenir dans l'expression des enzymes BCO₁ (CMO I) et BCO₂ (CMO II). Les mêmes hypothèses ont été émises pour l'acide apo-12'-lycopénoïque. La quatrième famille est celle des apo-10'-lycopénoïdes, cette dernière a été ciblée par l'équipe de Marseille pour des études de médiation cellulaire sur MAP Kinase et par l'équipe hongroise pour les mêmes considérations que l'acide apo-14'-lycopénoïque. Toutes ces familles de molécules doivent être synthétisées avec quatre fonctions chimiques terminales différentes, la fonction acide carboxylique et aldéhyde ciblées plutôt pour les études biologiques et la fonction ester et alcool ainsi que les deux précédentes pour des études physico-chimiques (schéma 10).

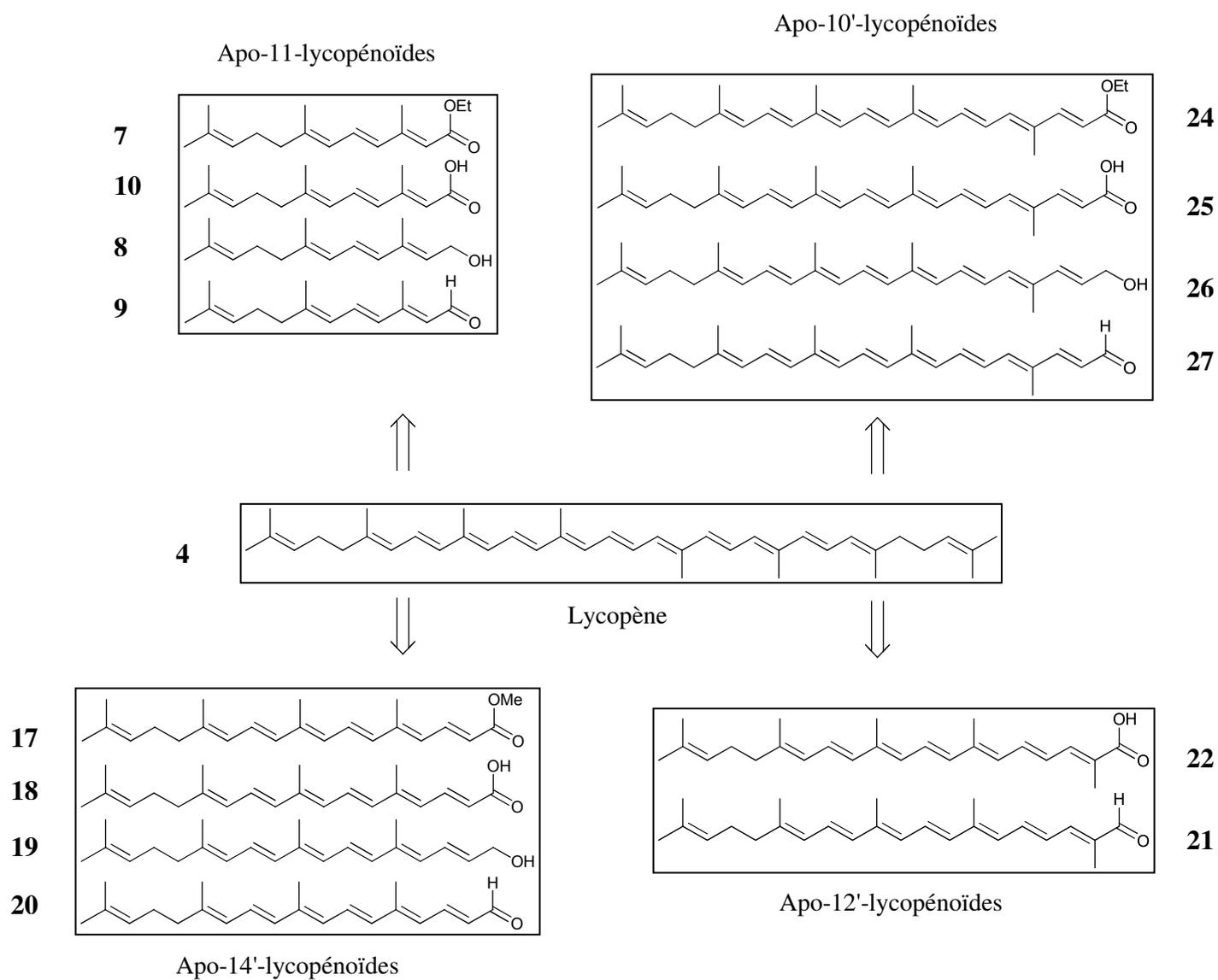


Schéma 10 : produits d'oxydation potentiels métabolites du lycopène ciblés pour la synthèse organique

Chapitre 3

Synthèse organique du lycopène et des apo- lycopénoïdes

Dans ce troisième chapitre nous présenterons les couplages et stratégies mis en œuvre pour la synthèse de caroténoïdes. Après avoir développé la stratégie rétrosynthétique de nos molécules cibles nous discuterons les voies de synthèse pour l'obtention de ces dernières. Enfin nous verrons la stratégie d'identification des apo-lycopénoïdes via la résonance magnétique nucléaire (RMN).

III) Synthèse organique du lycopène et des apo-lycopénoïdes

Dans la première partie du siècle dernier, les caroténoïdes étaient produits par des modifications chimiques des caroténoïdes naturels isolés par extraction et purifiés par chromatographie. Cette méthode avait l'inconvénient d'avoir des rendements très faibles et ne permettait pas de produire des quantités importantes. La chimie organique moderne a permis la synthèse de caroténoïdes plus spécifiques et complexes à plus grande échelle. En effet, le développement des réactions de couplage carbone-carbone a permis de développer des stratégies de synthèse efficace pour la production de caroténoïdes.

Dans ce chapitre, nous ne ferons pas une liste exhaustive de toutes les réactions chimiques et voies de synthèse utilisées pour la production des nombreux caroténoïdes. Mais nous essaierons de comprendre les principales stratégies adoptées pour la synthèse des structures polyconjuguées des caroténoïdes possédant une diastéréoisomérisation toute *E*.

3.1) Couplages carbone-carbone pour la synthèse des structures polyconjuguées des caroténoïdes

3.1.1) Stratégies de synthèse des structures caroténoïdes

Le couplage carbone-carbone est la clef pour la construction de la structure polyconjuguée des caroténoïdes. En effet, deux approches peuvent être envisagées (figure 23)

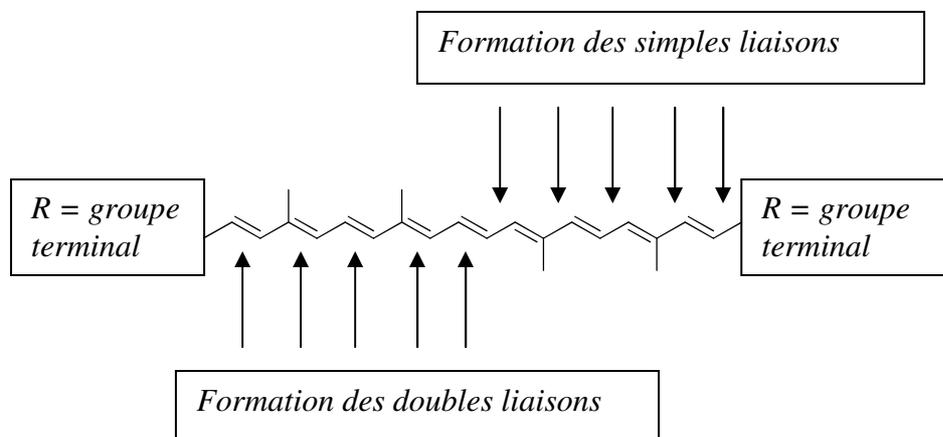


Figure 23 : stratégie de synthèse via la formation de simples ou doubles liaisons C-C

La formation des doubles liaisons π via des réactions de couplage carbone-carbone telles que la condensation de *Wittig* qui fait réagir un ylure de phosphonium sur un carbonyle, la réaction de *Julia* mettant en présence une sulfone et un dérivé halogéné ou carbonyle, ou encore la réaction d'aldolisation (addition nucléophile d'un énolate sur un carbonyle).

Le squelette carboné du caroténoïde peut être construit via la formation d'une liaison simple σ entre deux doubles liaisons. Cette technique a longtemps été laissée pour compte, mais aujourd'hui de plus en plus utilisée au travers de réactions de couplage catalysées par des complexes de métaux de transitions tels que Pd ou Pt. Elle est fréquemment utilisée pour la synthèse de caroténoïdes complexes ou pour la synthèse d'apo-caroténoïdes. Elle fait intervenir des métaux acétylides et alkényles, des espèces zinciques, mais aussi des réactions en présence de quantités catalytiques de complexes de palladium telles que les réactions de *Stille*, *Suzuki* etc...

3.1.2) Le couplage carbone-carbone via la réaction de *Wittig* et *Horner-Wadsworth-Emmons* (HWE).

3.1.2.1) Voie rétrosynthétique pour les couplages de *Wittig* et HWE.

La coupure rétrosynthétique entre les carbones disubstitués C11-C12 et C11'-C12' est la stratégie la plus utilisée pour la synthèse de caroténoïdes symétriques et asymétriques (schéma 11). Cette voie consiste en l'assemblage de deux synthons terminaux portant des groupements fonctionnels phosphonium, le plus souvent triphénylphosphonium, et un synthon central symétrique contenant dix atomes de carbone (schéma 11). Il s'agit du dialdéhyde 11,11'-diapocarotèn-11,11'-dial communément appelé "C₁₀-dialdéhyde" qui a été développé pour la synthèse de caroténoïdes [84]. Le couplage de *Wittig* entre le synthon C₁₀-dialdéhyde et les groupements phosphonium est le plus utilisé pour la synthèse de nombreux caroténoïdes [12, 84-90]. D'autres coupures rétrosynthétiques ont été envisagées pour la synthèse de caroténoïdes via la réaction de *Wittig*, mais ces dernières restent largement moins utilisées, telles que la coupure entre les carbones C7-C8 et C7'-C8' [91-92] pour obtenir un synthon central symétrique de type dialdéhyde, le 8,8'-diapocarotèn-8,8'-dial appelé crocétindial ou

"C₂₀-dialdéhyde" ou encore une coupure centrale entre les carbones C15-C15' [93] (schéma 12).

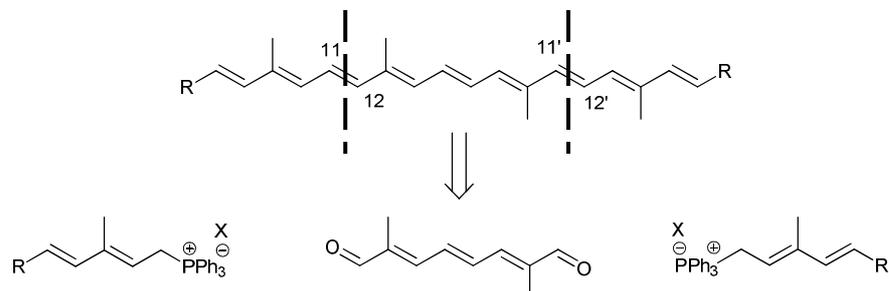


Schéma 11 : stratégie de synthèse courante pour la construction du squelette des caroténoïdes via la réaction Wittig (R = groupement terminal, confère chapitre nomenclature)

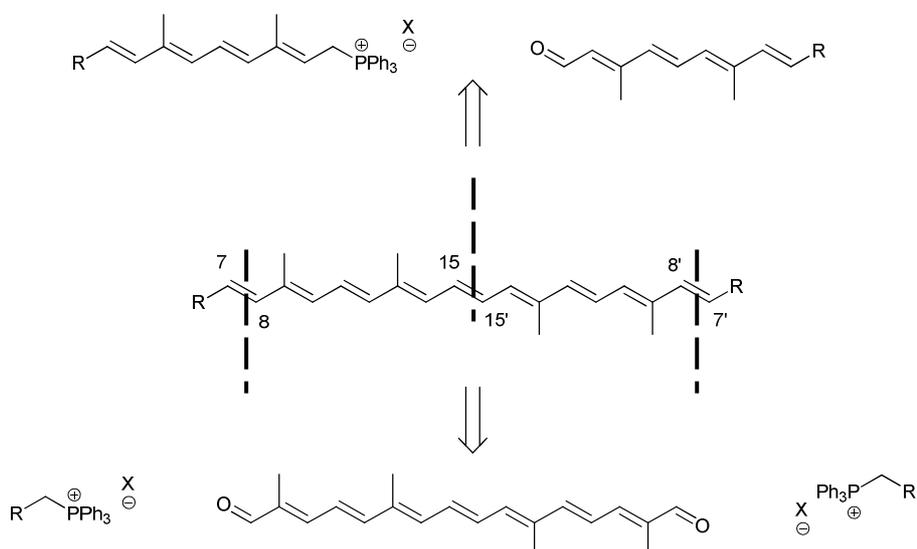


Schéma 12 : autres stratégies de couplage pour la synthèse de caroténoïdes via la réaction de Wittig (R = groupement terminal, confère chapitre nomenclature)

3.1.2.2) Mécanistique de la réaction de Wittig et HWE

La "réaction de Wittig" appelée aussi "condensation de Wittig" a été découverte en 1953 par Wittig et Geissler [94] puis a été longtemps étudiée par Maryanoff [95-99] et Vedejs [100-106]. Cette réaction consiste au couplage entre un ylure créé par l'attaque d'une base sur un halogénure de phosphonium (ici de triphénylphosphonium) et une fonction carbonyle pour générer une double liaison π de configuration (E) ou (Z) en fonction de la stabilité de l'ylure (schéma 13). En effet, un ylure non stabilisé favorise un contrôle cinétique donc la formation d'une double liaison (Z), alors qu'un ylure stabilisé est sous contrôle thermodynamique

(réversibilité de l'addition nucléophile) et génère une double liaison (*E*). De ce fait, un ylure semi stabilisé donne un mélange (*Z*) et (*E*) (tableau 5).

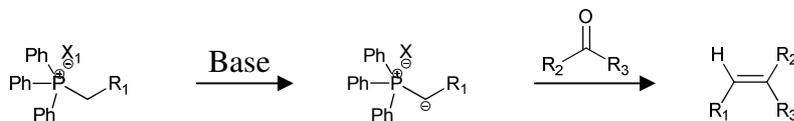


Schéma 13 : réaction générale de Wittig, condensation d'un sel de triphénylphosphonium sur un carbonyle

R_1	diastéréoisomérie
H ou alkyle...	<i>Z</i>
Vinyle...	<i>Z</i> et <i>E</i>
Ph, COOR....	<i>E</i>

Tableau 5 : diastéréosélectivité de la réaction de Wittig en fonction des substituants R_1 sur le sel de triphénylphosphonium.

Nous allons rappeler plus précisément le mécanisme de la réaction de *Wittig* relatif aux systèmes polyconjugués des caroténoïdes pour la production d'une double liaison (*E*) (schéma 14). Le proton en alpha de l'atome de phosphore est relativement acide et peut être arraché par une base forte. L'ylure formé est un bon nucléophile qui s'additionne sur la fonction carbonyle électrophile pour former un cycle à quatre atomes appelé oxaphosphétane. Ce dernier se décompose pour générer une double liaison majoritairement (*E*) (schéma 14).

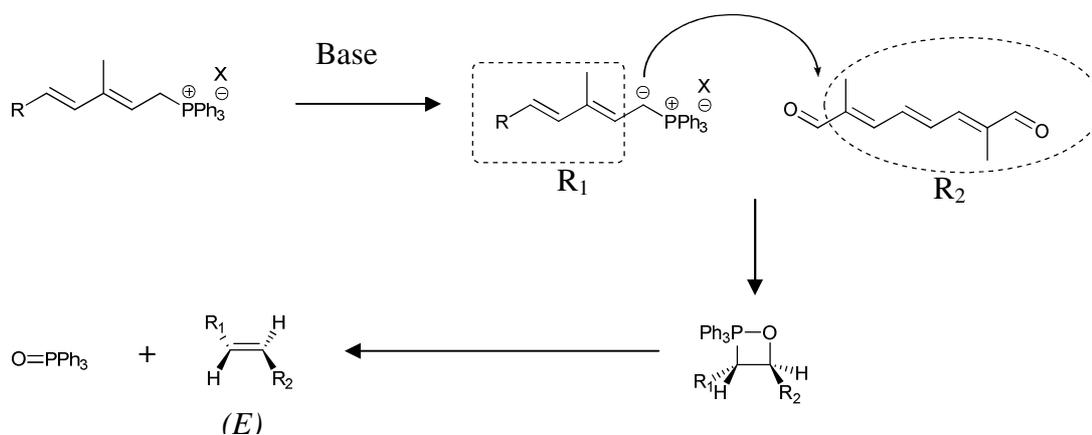


Schéma 14 : mécanisme de la réaction de Wittig sur un système polyconjugué

La réaction de *Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)*, variante de la réaction de *Wittig*, est fréquemment utilisée pour la synthèse de structures polyconjuguées des caroténoïdes [92, 107-111]. Cette dernière met en jeu un groupement phosphonate au lieu de phosphonium. L'anion phosphonate généré après attaque de la base est plus nucléophile qu'un ylure. La double liaison créée suite à la réaction est majoritairement (*E*) (schéma 15) et les sous-produits phosphates sont facilement éliminables en phase aqueuse [112].

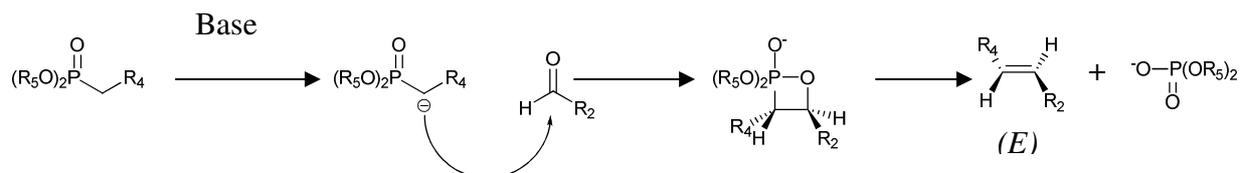


Schéma 15 : mécanisme général de la réaction de *Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)*.

3.1.3) Le couplage carbone-carbone via la réaction de *Julia*

Le couplage de *Julia* [113-114] est une alternative à la réaction de *Wittig* pour la formation de doubles liaisons C-C. Il consiste en l'alkylation du carbanion en α d'une sulfone par substitution nucléophile sur un synthon halogéné. Dans une deuxième étape, la sulfone subit un β -élimination en milieu basique pour générer la double liaison de configuration (*E*). Cette méthode a été utilisée pour la synthèse de l'acétate de la vitamine A [115-116] (schéma 16).

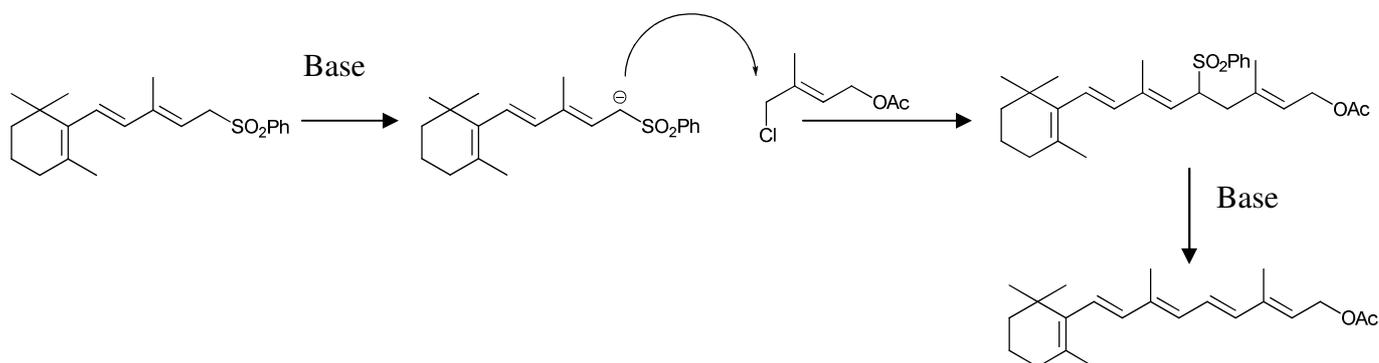


Schéma 16 : synthèse de l'acétate de la vitamine A via la réaction de *Julia*

Le couplage de *Julia* suivi d'une double élimination est une alternative pour l'obtention de structures polyconjuguées. Une première étape consiste à additionner l'anion d'une sulfone sur un aldéhyde pour former l'alcoolate correspondant. Ce dernier est converti en éther pour accroître le pouvoir nucléofuge du groupement oxygéné. Puis la deuxième étape nécessite un traitement basique pour effectuer une double élimination et générer la structure polyconjuguée (schéma 17). Cette méthode a été appliquée pour la synthèse de caroténoïdes tels que le lycopène, le β -carotène et l'acétate de la vitamine A [117-119] (schéma 17).

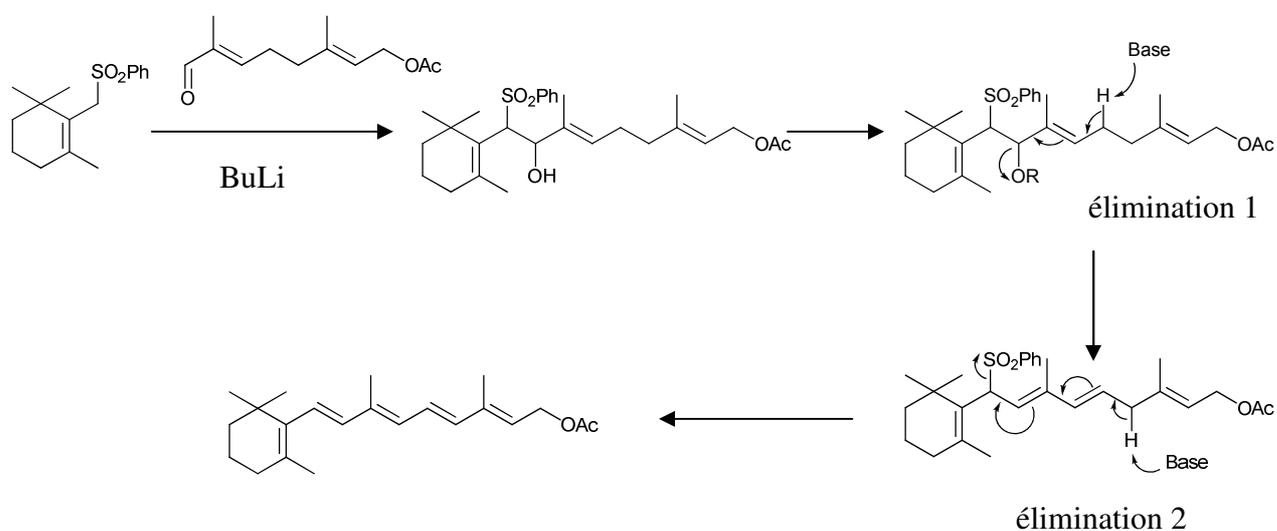


Schéma 17 : synthèse de l'acétate de la vitamine A via la réaction de Julia suivie d'une double élimination

3.1.4) Couplage carbone-carbone via la condensation aldolique

La formation d'une double liaison carbone-carbone par condensation aldolique est fréquemment utilisée pour des caroténoïdes possédant un groupement terminal κ (schéma 18 et partie nomenclature). Avec le synthon central symétrique crocétindial (schéma 18) et deux équivalents d'énolate, ce type de couplage permet la formation des liaisons C7-C8 et C7'-C8'. La capsorubine (schéma 18) et la citranaxanthine répondant à ces critères ont été synthétisées via cette voie [120-121].

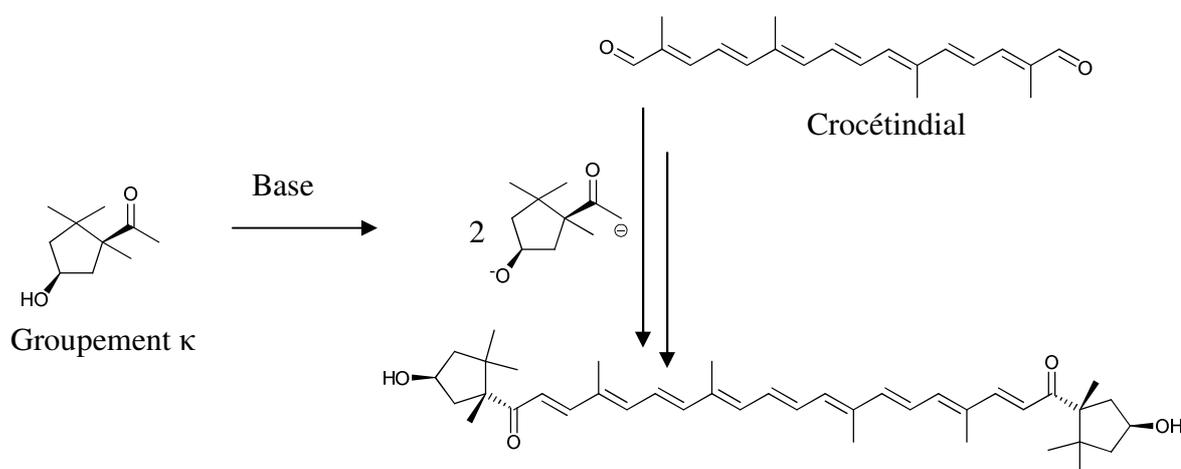


Schéma 18 : synthèse de la capsorubine par condensation aldolique

3.1.5) Couplages impliquant des dérivés organométalliques

De nombreuses réactions d'organométalliques sont utilisées pour la formation de liaisons carbone-carbone simples σ . Elles sont souvent considérées comme une nouvelle voie de synthèse des caroténoïdes car ce sont des réactions qui permettent de conserver la diastéréoisométrie des synthons de départ. Elles sont souvent utilisées en complément de réactions classiques de *Wittig* ou *Julia* pour la synthèse de caroténoïdes complexes [122-124]. Dans ce chapitre, nous présenterons quelques réactions d'organométalliques pour la synthèse de structures polyconjuguées, telles que les couplages faisant intervenir les métaux acétyles et les réactions catalysées par Pd de type *Stille et Suzuki*.

3.1.5.1) Voie rétrosynthétique pour les couplages via les réactions organométalliques.

La stratégie rétrosynthétique est fonction de la structure de la molécule et de la faisabilité des synthons obtenus. Toutes les liaisons simples peuvent constituer des coupures rétrosynthétiques potentielles.

3.1.5.2) couplage carbone-carbone via les métaux acétylés

Dans la synthèse de caroténoïdes, les métaux acétylés sont principalement utilisés pour coupler deux synthons de part et d'autre d'une triple liaison réductible diastélectivement en alcène (*Z*) ou (*E*). Le (15*E*)- β -carotène peut être synthétisé par double réaction de *Grignard*, puis réduction *anti* en présence du catalyseur de *Lindlar* Pd/H₂ suivit d'une isomérisation thermique de la fonction alcène (schéma 19). La réduction *syn* de la triple liaison en présence du catalyseur de *Lindlar* Pd/ H₂ produit le (15*Z*)- β -carotène.

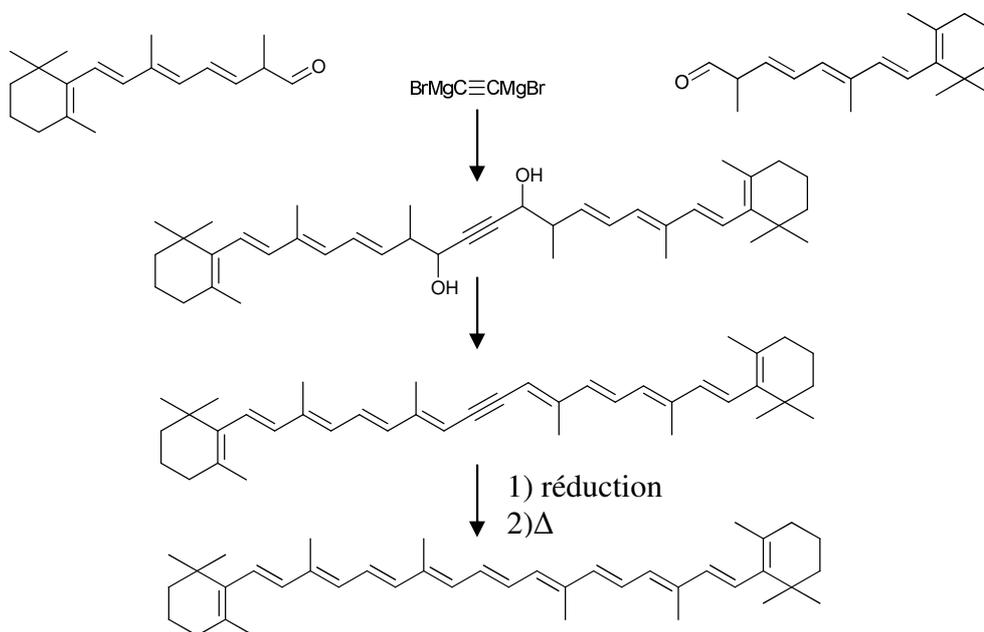


Schéma 19 : synthèse du (15*E*)- β -carotène par double réaction de Grignard

3.1.5.3) couplage carbone-carbone via la réaction de Stille

Le couplage de *Stille* est une bonne alternative pour la construction d'un squelette polyconjugué via la création d'une liaison simple entre deux doubles liaisons. En effet il s'agit d'un couplage entre un vinylstannane et un halogénure de vinyle ou électrophile équivalent (triflate, nonaflate ($C_4F_9SO_3$)). C'est une réaction qui est de plus en plus utilisée pour la synthèse de caroténoïdes [122-130] car elle permet de préserver la diastéréoisomérie portée par les deux précurseurs. Cette réaction s'effectue en présence d'un complexe de Pd^0 (généralement produit par réduction de Pd^{II} par le vinylstannane lui-même) selon le cycle catalytique suivant (schéma 20). Ce dernier commence par une addition oxydante de l'halogénure R_6-I au catalyseur palladium $Pd(0)$ pour former $Pd(II)$. Puis une étape de transméallation consiste en l'échange de l'halogénure lié au palladium avec le groupement alkyl de l'alkylstannane R_7-SnBu_3 . Enfin une élimination réductive pour former la liaison σ R_6-R_7 et régénérer le catalyseur $Pd(0)$.

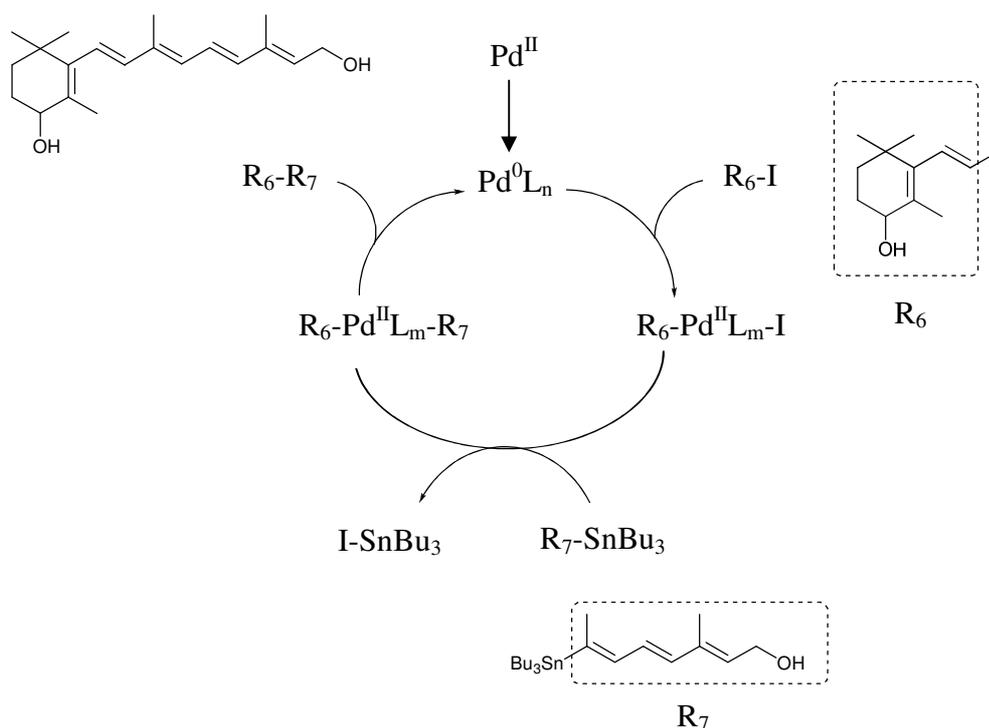


Schéma 20 : cycle catalytique du couplage de Stille, synthèse du 4-hydroxyrétinol [127].

3.1.5.4) couplage carbone-carbone via la réaction de Suzuki

Le couplage de Suzuki a lieu entre un boronate ou acide boronique et un dérivé halogéné en solution hydro-organique. Certains apo-caroténoïdes ont été synthétisés via ce couplage [131-134]. Un milieu basique est requis pour la formation in situ de l'entité nucléophile, l'anion hydroxyboronate (schéma 21). Brièvement, le cycle catalytique commence par une addition oxydante de l'halogénure R_8-I au catalyseur palladium $Pd(0)$ pour former $Pd(II)$. Puis une étape de transmétallation consiste en l'échange de l'halogénure lié au palladium avec le groupement alkyl de l'alkylborane $R_9-B(OH)_2$. Enfin une élimination réductive pour former la liaison σ R_8-R_9 et régénérer le catalyseur $Pd(0)$.

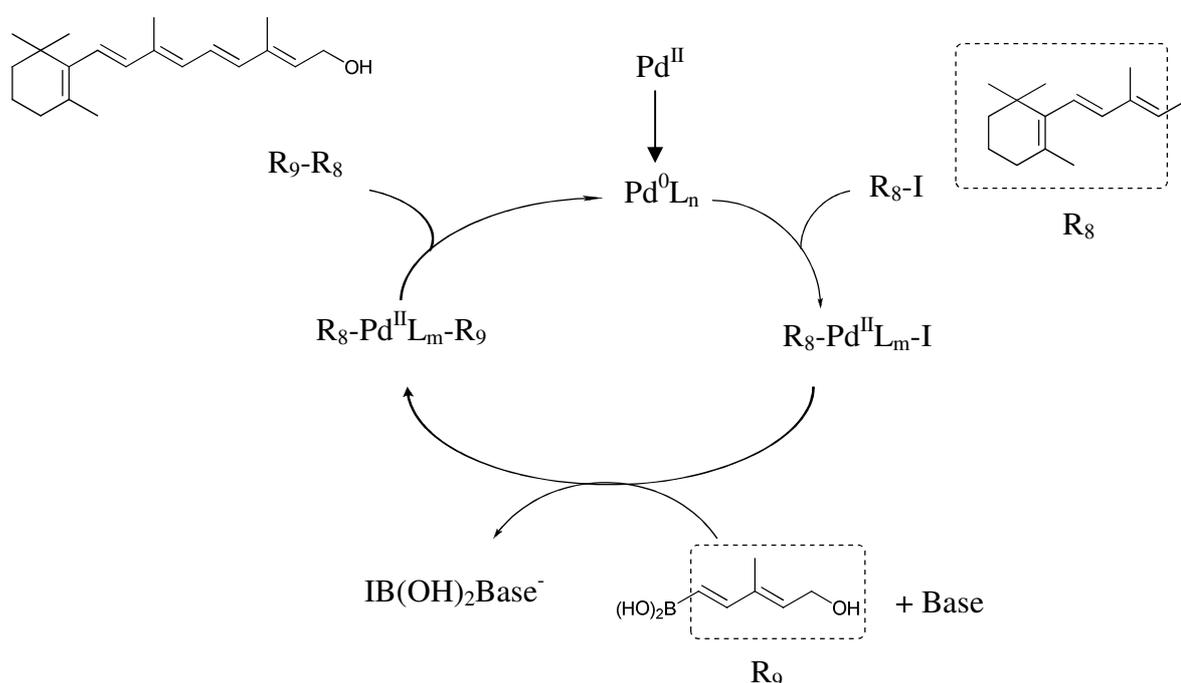


Schéma 21 : cycle catalytique du couplage de Suzuki, synthèse du rétinol [133].

3.2) Stratégie de synthèse des lycopénoïdes : rétrosynthèse

Pour chacune des familles d'apo-lycopénoïdes, on retrouve une structure relativement similaire par la présence du groupement ψ (confère partie nomenclature). Au laboratoire nous avons décidé de mettre en place une stratégie de synthèse convergente simple à partir de synthons commerciaux ou facilement accessibles via des collaborations. Notre stratégie rétrosynthétique s'est orientée vers les déconnexions de doubles liaisons pour former des

synthons complémentaires pouvant réagir via les couplages de *Wittig* ou *HWE* les plus couramment utilisés pour la synthèse de caroténoïdes. Nous nous attarderons sur la rétrosynthèse du squelette carboné de chacune des familles à synthétiser. Les fonctions terminales nécessaires ont été obtenues via des réactions de substitution nucléophile, d'oxydation, de réduction et de saponification.

Toutes les molécules utilisées au cours de la synthèse organique du lycopène et des apolycopénoïdes ne sont pas considérées comme des caroténoïdes. De ce fait, par souci d'homogénéité dans la discussion, nous utiliserons uniquement la nomenclature IUPAC traditionnelle.

**Tout-(*E*)-2,6,10,14,19,23,27,31-octaméthyltriaconta-
2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridécaène
(lycopène) (4)**

Pour la rétrosynthèse de **4** (schéma 22) nous avons envisagé une double déconnection entre les carbones C12-C13 et C20-C21 fréquemment utilisée par d'autres équipes. Compte tenu de la diastéréoisomérisation et de la symétrie de la molécule, deux synthons sont envisagés. Le premier est le dialdéhyde **3** très couramment utilisé pour la synthèse de caroténoïdes et dont nous disposons via une collaboration avec la société *DSM Nutritional Product*. Le deuxième synthon est le mésylate de triphénylphosphonium **2** provenant d'une transformation fonctionnelle de **1**. Ce dernier composé, lui aussi très utilisé dans la synthèse de lycopénoïdes, a été obtenu via une collaboration avec la société *BASF*.

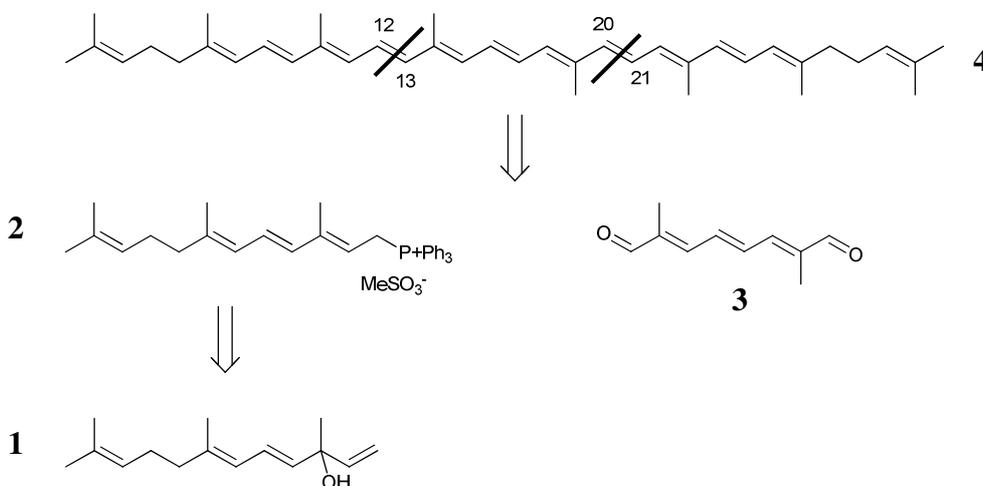


Schéma 22 : rétrosynthèse simplifiée de **4**

**Tout-(*E*)-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraénoïdes
(apo-11-lycopénoïdes)**

Pour la rétrosynthèse de **7** (schéma 23) nous avons envisagé une déconnection de la double liaison C2-C3 pour obtenir la cétone **5** et le phosphonate **6**. La cétone **5** de configuration toute (*E*) a été obtenue via des collaborations avec la société BASF car elle n'est disponible commercialement que sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères (*E*, *Z*) très difficile à purifier.

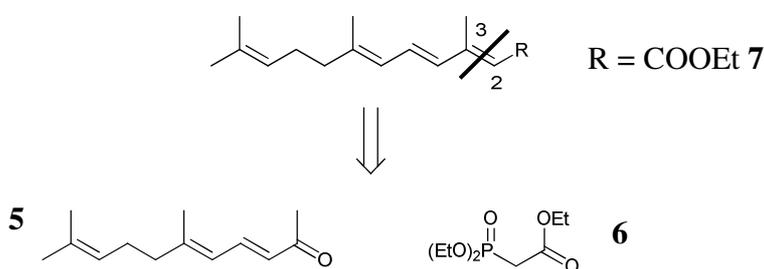


Schéma 23 : rétrosynthèse simplifiée de **7**

**Tout-(*E*)-5,9,13,17-tétraméthyl octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes
(apo-14'-lycopénoïdes).**

Concernant la rétrosynthèse de l'ester **17** (schéma 24), molécule mère de la famille des tout-(*E*)-5,9,13,17-tétraméthyl octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes, nous avons opté pour une déconnection au niveau de la double liaison C7-C8 afin d'obtenir le synthon **2** issu de **1** (précédemment décrit lors de la rétrosynthèse du lycopène **4**) et un synthon possédant une fonction ester et une fonction aldéhyde **16**. Par déconnexion entre les carbones C2 et C3 et transformations fonctionnelles de type protection-déprotection et réduction, ce dernier peut être issu des molécules commerciales **11** et **6**.

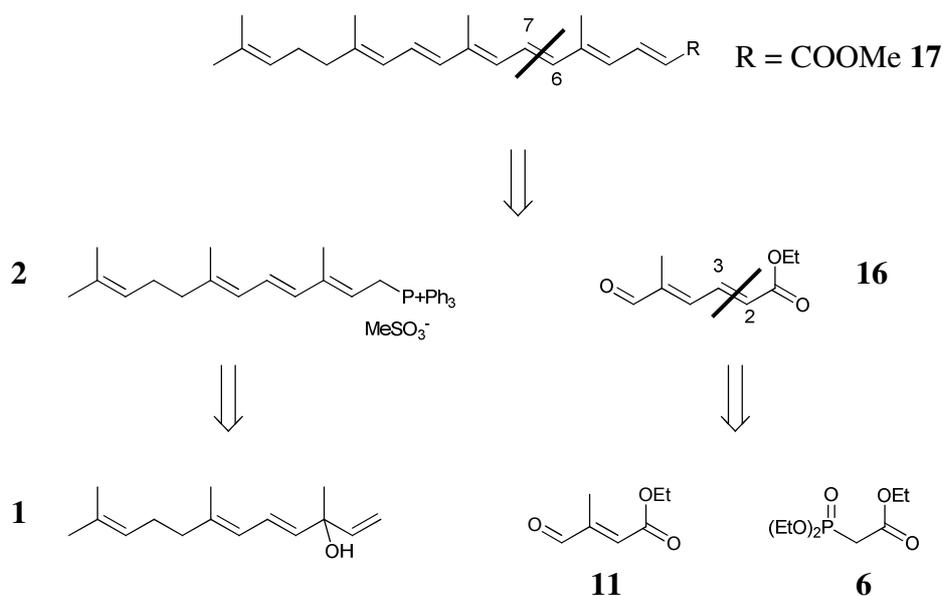


Schéma 24 : rétrosynthèse simplifiée de 17

Tout-(E)-2,7,11,15,19-pentaméthylcosa-2,4,6,8,10,12,14,18-octaénoïdes (apo-12'-lycopénoïdes).

La rétrosynthèse de l'aldéhyde **21** (schéma 25) est similaire à celle du lycopène **4**, et conduit aux mêmes composés de départ **1** et **3**. Cependant, le lycopène **4** est issu d'un dicouplage de *Wittig*, ce qui nécessite au moins deux équivalents de **2** alors que l'aldéhyde **21** est issu d'un simple couplage de *Wittig* mettant en jeu un seul équivalent de **2**.

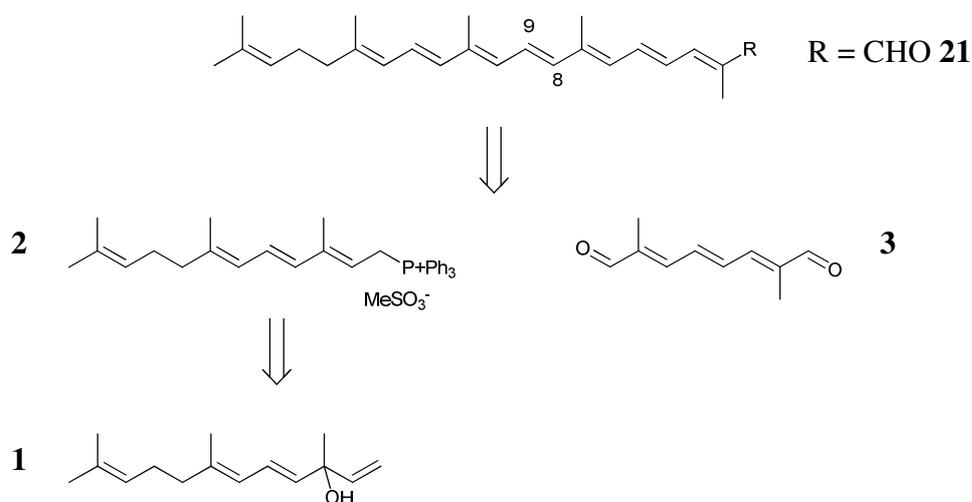


Schéma 25 : rétrosynthèse simplifiée de 21

Tout-(*E*)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïdes (apo-10'-lycopénoïdes).

Pour **24** (schéma 26), nous avons envisagé une déconnection au niveau de la double liaison C10-C11 pour obtenir le mésylate de phosphonium (**2**) (décrit précédemment) et le synthon polyconjugué **23**. Ce dernier peut être engagé dans une déconnection entre les carbones C2 et C3 pour obtenir les molécules de départ **3** et **6** disponibles.

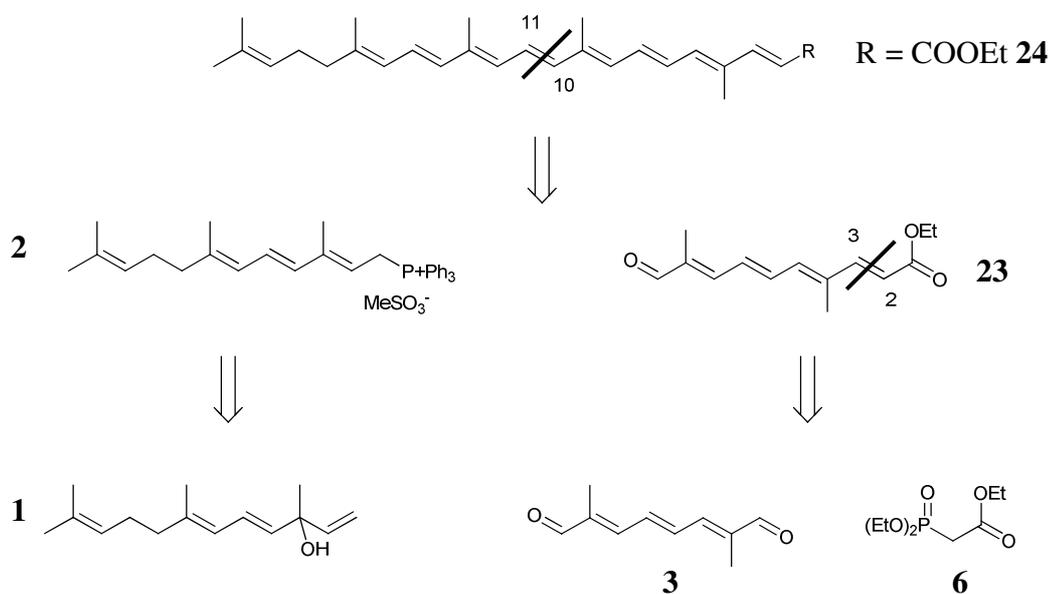
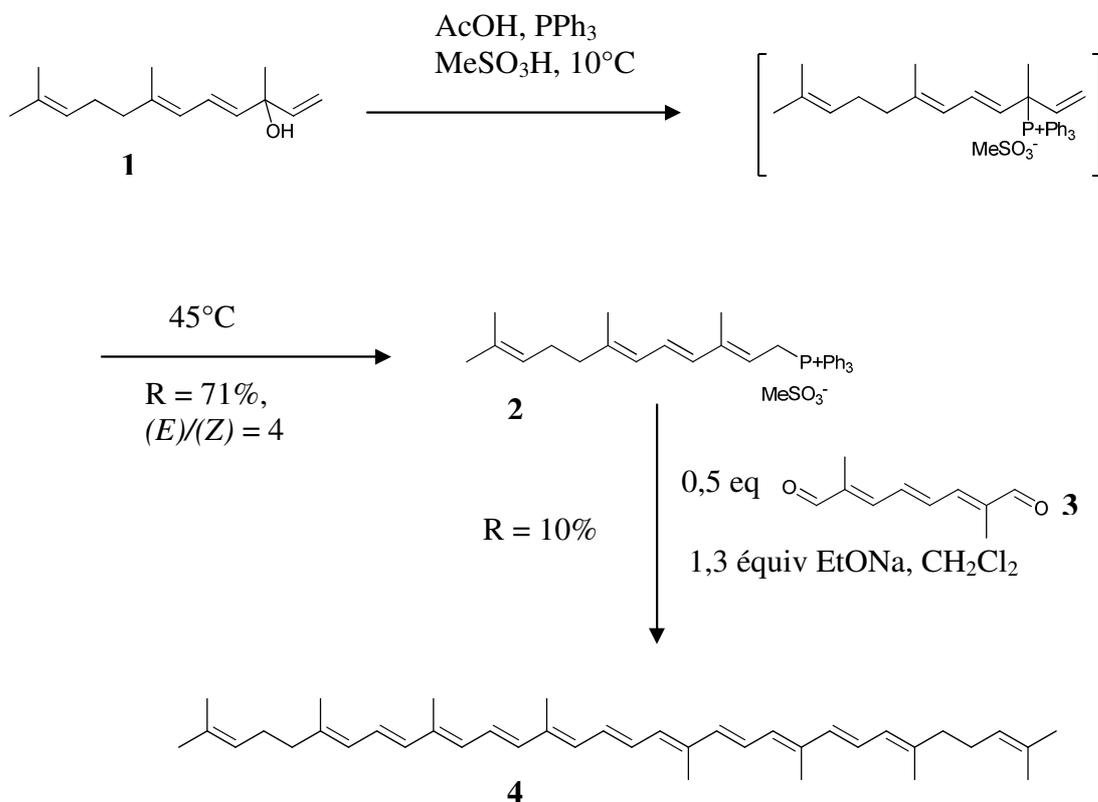


Schéma 26 : rétrosynthèse simplifiée de **24**

3.3) Synthèse organique du lycopène et des apo-lycopénoïdes

L'étude rétrosynthétique précédente a permis de définir une voie de synthèse convergente pour chacune des molécules cibles. La synthèse de toutes les molécules cibles est bâtie sur le même raisonnement et met en oeuvre des "réactions simples" et "économiquement accessibles". Le squelette carboné des molécules est construit via les couplages de *Wittig* et *HWE* et les transformations fonctionnelles font appels à des réactions de saponification, réduction, oxydation, transposition et substitution. Les molécules de départ utilisées sont soit commerciales, soit obtenues via des collaborations.

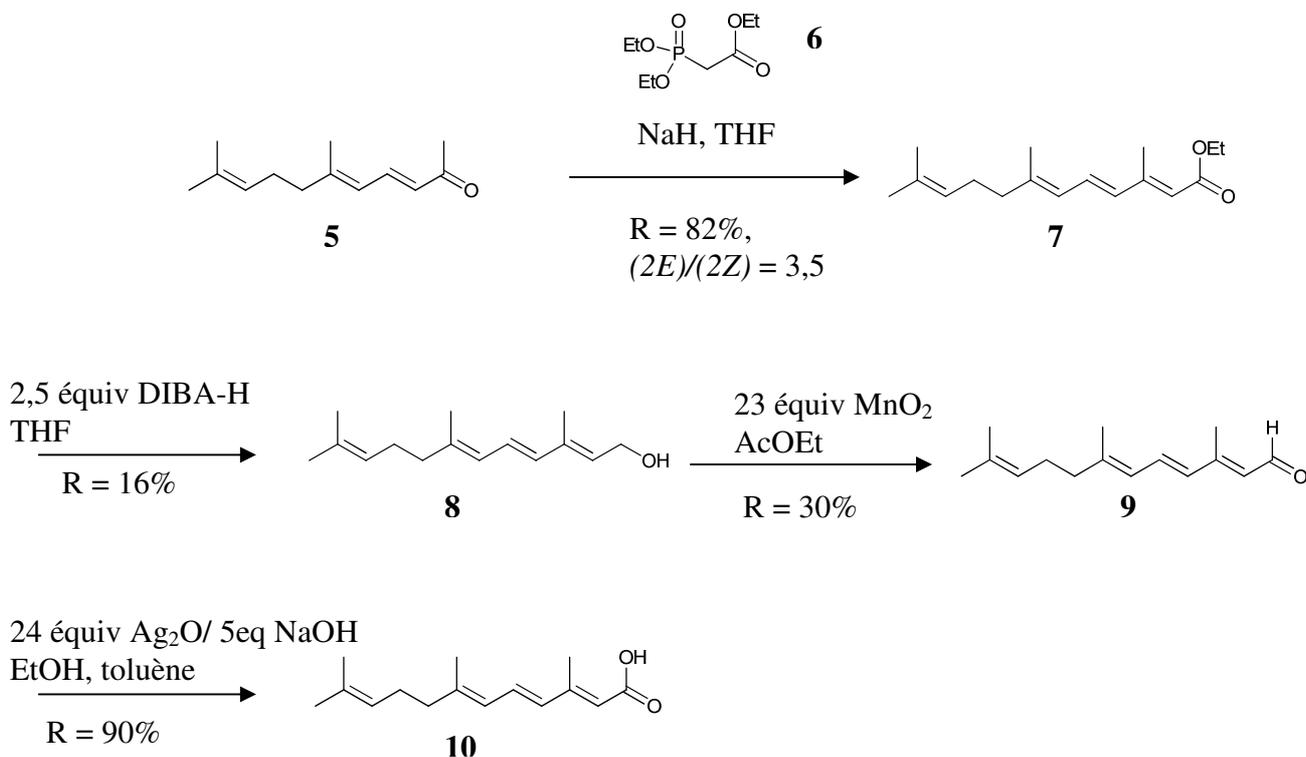
3.3.1) Tout-(*E*)-2,6,10,14,19,23,27,31-octaméthyl-dotriacont-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridécaène (lycopène) 4



Le lycopène est synthétisé en deux étapes impliquant la formation du mésylate de phosphonium **2** puis le dicouplage de *Wittig* entre ce dernier et le dialdéhyde **3**.

La synthèse du sel de phosphonium **2** est une étape essentielle car il constitue le synthon commun des voies de synthèse d'une majorité d'apo-lycopénoïdes. Il est obtenu par réaction entre le vinylpseudoionol **1** et la triphénylphosphine en présence d'acide méthanesulfonique (MeSO_3H). Nous avons noté dans la littérature que l'utilisation de HBr/PPh_3 dans le méthanol, condition usuelle pour cette réaction, favorise la stéréomutation du carbone 6 et donc l'obtention du diastéréoisomère (*6Z*) [12, 135]. C'est pour cela que la réaction se déroule dans l'acide acétique qui joue le rôle de solvant mais aussi minimise la stéréomutation du carbone 6. Concernant le mécanisme de la réaction, l'acide méthanesulfonique permet la protonation de la fonction alcool du vinylpseudoionol **1** et donc l'élimination de H_2O . Puis la triphénylphosphine s'additionne sur le carbocation allylique ainsi formé pour conduire à un cation triphénylphosphonium. Dans une première étape, le vinylpseudoionol **1** est ajouté lentement au milieu réactionnel à 10°C ce qui favorise la formation du mésylate de phosphonium tertiaire, espèce intermédiaire. Puis l'augmentation de la température à 45°C permet au phosphonium tertiaire de se réarranger en phosphonium primaire **2** via une transposition allylique du groupement PPh_3^+ [136]. Le mésylate de phosphonium **2**, purifié par chromatographie sur gel de silice, est obtenu sous forme de mélange diastéréoisomérique (*(E)/(Z)* = 4) avec un rendement global de 71%. Le dicouplage de *Wittig* sur le dialdéhyde **3** donne le lycopène **4** avec un rendement de 10% après purification. Ce faible rendement s'explique par une perte importante de produit brut à l'issue de l'étape de purification sur colonne de gel de silice. Il aurait fallu laver préalablement cette dernière avec une solution de triéthylamine pour neutraliser la silice dont l'acidité est certainement responsable de la dégradation d'une partie du lycopène **4**.

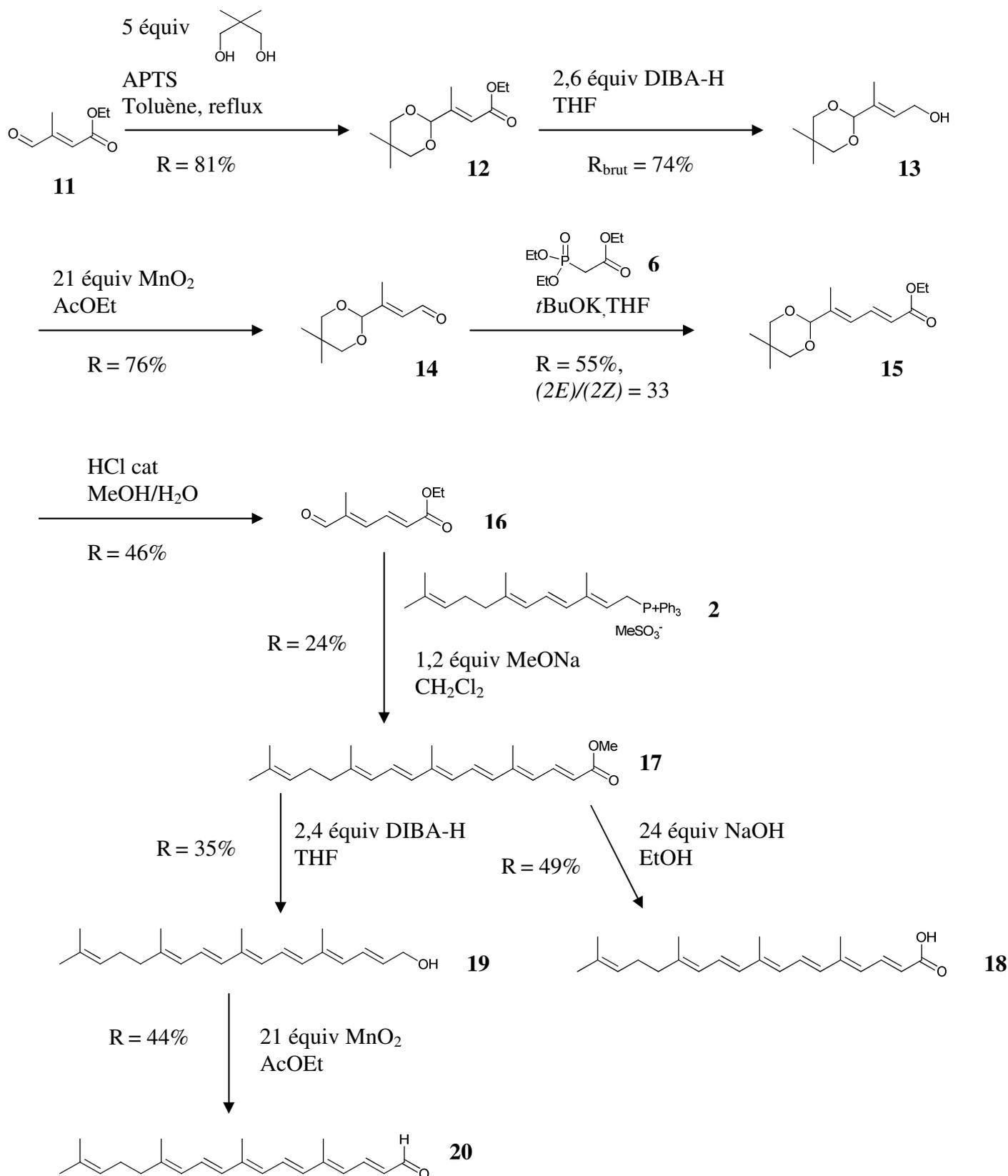
3.3.2) *Tout-(E)-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraénoïdes*
(apo-11-lycopénoïdes)



La première étape consiste en le couplage de *Horner-Wadsworth-Emmons* (*HWE*) entre la pseudoionone **5** et l'anion du triéthylphosphonoacétate **6**. Ce dernier est formé dans un premier temps par action de la base forte NaH sur **6**, ce qui a pour effet de produire un dégagement gazeux de H₂. Il est important que NaH soit entièrement consommé dans cette réaction pour éviter la réaction parasite d'auto-condensation cétole de la pseudoionone **5**. L'ester **7** est obtenu sous forme d'un mélange diastéréoisomérique ((*2E*)/(*2Z*) = 3,5) avec un rendement global de 82%. Il est difficile de séparer les deux isomères avec un rendement raisonnable. Puis le mélange d'isomères **7** est réduit par deux équivalents de DIBA-H considéré comme un réducteur doux. Un premier équivalent réduit l'ester α,β -insaturé en

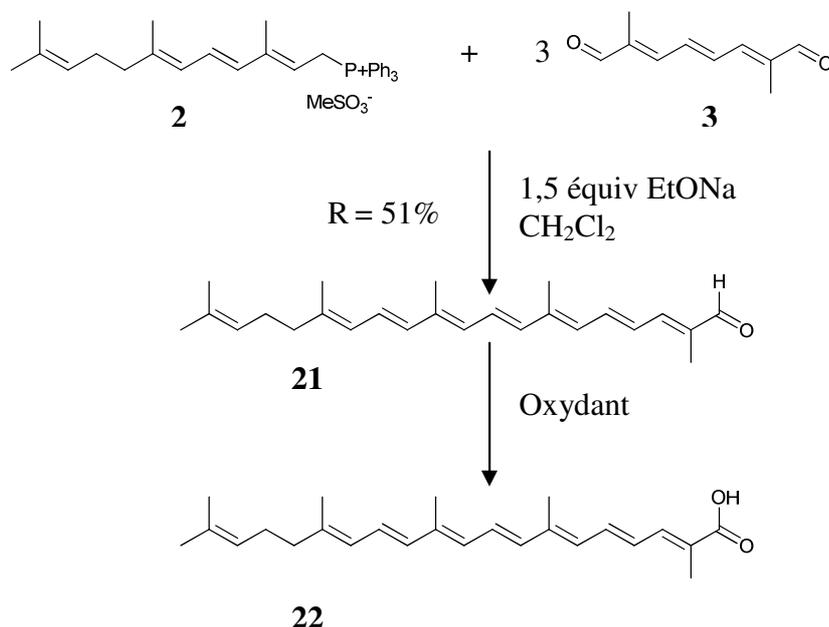
aldéhyde α,β -insaturé. Ce dernier étant plus réactif est instantanément réduit en alcool allylique primaire. Après purification sur colonne de gel de silice, l'isomère tout (*E*) **8** est obtenu avec un rendement de 16%. L'aldéhyde **9** est obtenu par oxydation du mélange diastéréoisomérique **8** en présence d'un excès de MnO_2 , oxydant de choix pour l'oxydation des alcools allyliques. Après purification sur colonne de gel de silice, le diastéréoisomère tout (*E*) est obtenu avec un rendement de 30%. L'acide **10** peut être obtenu par saponification du mélange diastéréoisomérique **7** mais sous forme de mélange d'isomères difficile à séparer par chromatographie sur gel de silice. Pour pallier ce problème, nous avons décidé de préparer l'acide **10** par oxydation en milieu basique (solution de NaOH) de **9** en présence d'oxyde d'argent I. Cette réaction conduit au composé **10** avec un rendement de 90%.

3.3.3) Tout-(*E*)-5,9,13,17-tétraméthyl-octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes (apo-14'-lycopénoïdes).



L'aldéhyde **11** est protégé par acétalisation en présence de quantités catalytiques d'acide *p*-toluènesulfonique et de 2,2-diméthylpropanediol afin de préserver la fonction aldéhyde jusqu'à l'étape de couplage avec le mésylate de phosphonium **2**. Nous avons choisi le 2,2-diméthylpropanediol qui conduit à un acétal de type dioxane relativement stable comparativement aux acétals acycliques et cycliques de type dioxolane (5 atomes). Le système réactionnel est équipé d'un appareil *Dean-Stark* et la réaction est effectuée dans le toluène à reflux afin d'éliminer par hétéroazéotropie l'eau produite durant la réaction. Le composé **12** est obtenu avec un rendement de 81%. Ce dernier est ensuite réduit par deux équivalents de DIBA-H pour former l'alcool allylique correspondant **13** après hydrolyse. Un gel difficile à éliminer se forme durant cette étape. Pour pallier ce problème, un nouveau traitement a été mis au point. Le gel est dissous sous vive agitation dans une solution concentrée de tartrate de potassium et sodium, qui permet de complexer les ions aluminium responsables de ce gel et donc de les éliminer dans la phase aqueuse. Puis l'alcool allylique brut **13** est oxydé par MnO₂ en aldéhyde α,β insaturé **14** avec un rendement global de 56%. La chaîne carbonée est allongée de deux carbones supplémentaires pour produire **15** via le couplage de *HWE* entre l'anion du phosphonate **6** et l'aldéhyde **14** avec un rendement de 55% et la création d'un double liaison très majoritairement (*E*) ((*E*)/(*Z*) = 33). Le synthon **16** est obtenu par hydrolyse acido-catalysée de l'acétal **15** avec un rendement de 46%. La molécule cible **17** est obtenue avec un rendement de 24% par couplage de *Wittig* entre l'ylure nucléophile du mésylate de phosphonium **2** (généralisé par la base MeONa) et l'aldéhyde **16**. Au cours du couplage, la fonction ester éthylique est convertie en ester méthylique par transestérification induite par MeONa. L'acide **18** est obtenu par saponification de l'ester **17** dans de la soude éthanolique avec un rendement de 49% après acidification et cristallisation. L'alcool **19** est obtenu avec un rendement de 35% suite à la réduction de la fonction ester méthylique de **17**. L'alcool allylique obtenu précédemment est oxydé par MnO₂ pour former l'aldéhyde **20** avec un rendement de 44%.

3.3.4) Tout-(E)-2,7,11,15,19-pentaméthylcosa-2,4,6,8,10,12,14,18-octaénoïdes (apo-12'-lycopénoïdes).



Le composé **21** est obtenu par couplage de *Wittig* entre le mésylate de phosphonium **2** et le dialdéhyde **3**. Afin de favoriser le simple couplage et donc éviter la formation de lycopène **4** (confère synthèse du lycopène précédemment décrite), nous avons utilisé 3 équivalents de composé **3**, soit 6 équivalents d'aldéhyde. Après purification, le produit de simple couplage **21** est obtenu avec un rendement de 51%. Malgré de nombreuses tentatives et l'utilisation d'une grande variété d'oxydant, nous n'avons pu obtenir l'acide **22**. En effet, en présence d'oxydant, ce dernier se dégrade ou tout simplement ne réagit pas. Voyons ci-dessous les réactions d'oxydation mises en œuvre pour les tentatives d'obtention de **22**.

- Oxydant = AgO, Ag₂O, Ag₂CO₃/célite[®]

Ag₂O a déjà été utilisé avec succès pour l'oxydation d'apo-caroténals en acides apo-caroténoïques [137]. Cette méthode a été reproduite au laboratoire pour l'obtention d'acides apo-lycopénoïques et a été utilisée pour la synthèse de l'acide carboxylique **10** décrite précédemment. Les oxydants AgO et Ag₂O s'apparentent :

- au réactif de *Tollens* communément appelé réactif au "miroir d'argent" mettant en jeu le complexe Ag(NH₃)₂⁺, NO₃⁻ et produisant de l'argent métallique sous forme d'un miroir en fin de réaction.

- au réactif de *Fétizon* Ag₂CO₃/célite[®]

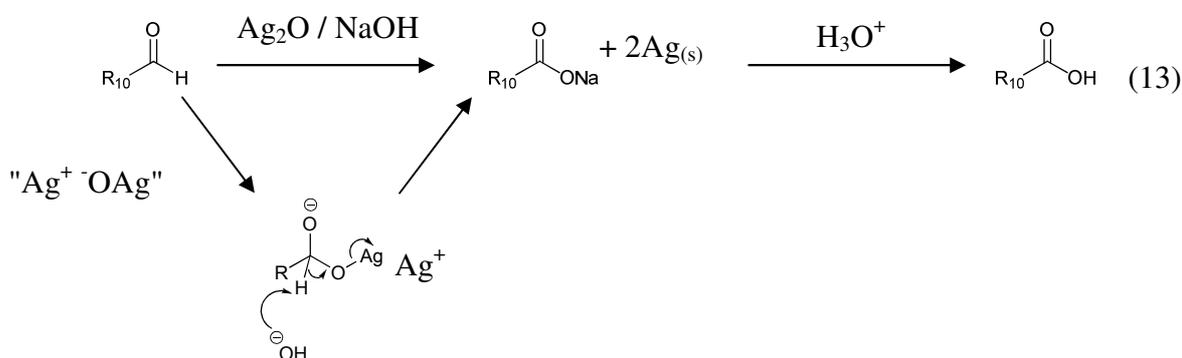
- Ag₂O

Ag₂O est un oxydant doux mettant en jeu Ag^I dont le potentiel standard d'oxydo-réduction est 0,342 V (eq 12) [138] qui est couramment utilisé pour l'oxydation d'aldéhydes en acides carboxyliques.



Ag₂O est un oxydant commercial mais il est préférable de le préparer juste avant utilisation à partir de carbonate d'argent Ag₂CO₃ en milieu NaOH. La procédure est inspirée de celle utilisant Ag₂NO₃ [139].

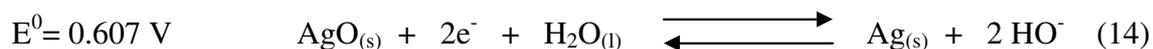
Le mécanisme général d'oxydation d'un aldéhyde en acide carboxylique par Ag₂O consiste en l'addition de "l'anion AgO⁻" sur le groupement carbonyle pour former une espèce intermédiaire tétraédrique. Le milieu basique permet alors l'arrachement de l'atome d'hydrogène et l'élimination d'argent au degré d'oxydation 0 sous forme d'un miroir. Le carboxylate obtenu est ensuite traité par une solution acide pour l'obtention de l'acide carboxylique correspondant (eq 13).



La tentative d'oxydation de **21** en présence de Ag₂O a échoué, il n'y a pas eu de conversion de la fonction aldéhyde présente sur **21** en acide carboxylique **22**.

- AgO

La réaction d'oxydation de **21** n'ayant pas fonctionné, nous avons décidé d'utiliser un oxydant plus fort tel que AgO. En effet, le couple AgO/Ag a un potentiel standard d'oxydo-réduction de 0,607 V (eq 14) [138]. Le mécanisme d'oxydation est similaire à celui présenté précédemment avec Ag₂O. L'oxydation de **21** par AgO génère de nombreux produits de dégradation.

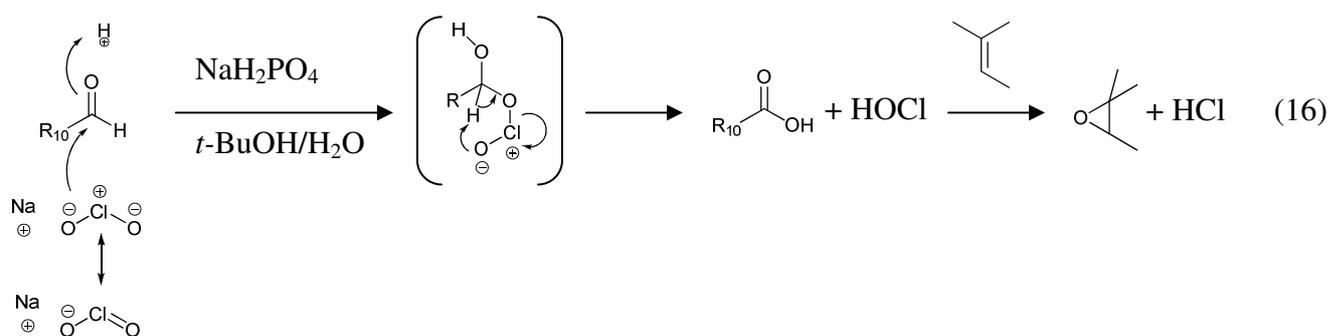


- Ag₂CO₃/célite[®]

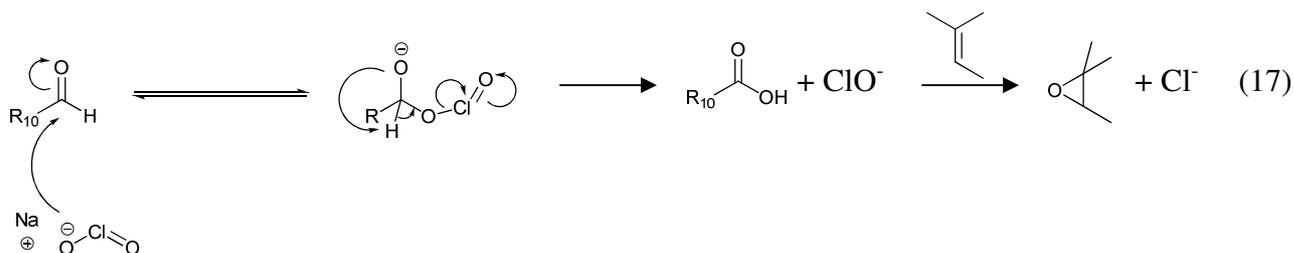
Le système Ag₂CO₃/célite[®] est connu sous le nom de réactif de *Fétizon*. D'après les potentiels standards (eq 15) d'oxydo-réduction (équation ci dessous) [138], ce dernier est plus oxydant que Ag₂O mais moins que AgO. De plus, la réaction a lieu en conditions neutres donc plus douces. Dans ce cas malheureusement, **21** ne réagit pas.

**- Oxydant = NaClO₂, réaction de *Dalcanale***

La réaction de *Dalcanale* permet, de façon relativement douce, d'oxyder les aldéhydes et aldéhydes α,β -insaturés en acides carboxyliques sans oxyder les doubles liaisons [140-142]. De plus, cette réaction a déjà été utilisée pour l'oxydation de l'acyclorétinal en acide acyclorétinoïque [70]. C'est une méthode très utilisée dans le milieu industriel car les réactions sont assez rapides, les réactifs peu coûteux et les conditions opératoires faciles à mettre en œuvre. Le mécanisme de cette réaction n'a pas été expérimentalement démontré mais deux mécanismes simplifiés probables peuvent être proposés (eq 16 et 17) :

Mécanisme 1 :

Pour le mécanisme proposé (eq 16), il y aurait dans un premier temps une addition de l'anion chlorite sur la fonction aldéhyde électrophile. L'ouverture de la double liaison du carbonyle conduit à la formation d'un oxy-anion qui se protone en présence de NaH₂PO₄. Dans un deuxième temps, l'intermédiaire tétraédrique se décompose avec β -élimination de HOCl (piégé par époxydation de 2-méthylbut-2-ène en excès) et formation de l'acide carboxylique.

Mécanisme 2 :

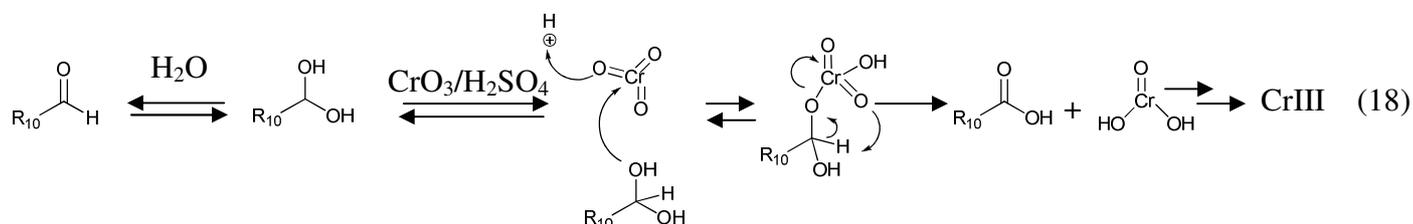
Pour ce deuxième mécanisme (eq 17), après addition de l'anion chlorite sur le carbone de l'aldéhyde et ouverture de la double liaison, l'oxy-anion formé arrache le proton voisin et enclanche l'élimination de l'anion hypochlorite.

Oxydation de 21 via la réaction de *Dalcanale* :

Lors de la mise en présence de l'oxydant NaClO_2 et de l'aldéhyde polyconjugué **21**, le milieu réactionnel a très rapidement évolué du rouge vif au jaune pâle, ce qui suggère une perte de conjugaison. Nous pouvons penser que plusieurs doubles liaisons ont été oxydées.

- Oxydant = $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, réactif de *Jones*

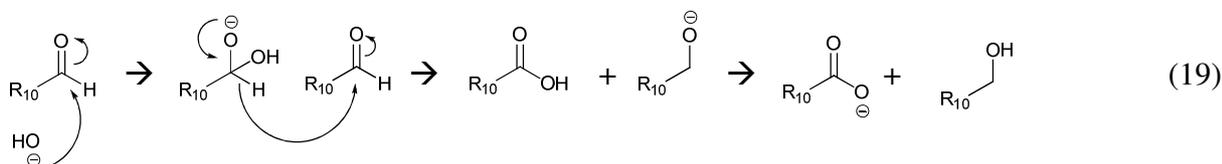
L'échec des réactions d'oxydation précédentes nous a conduit à essayer une réaction plus traditionnelle, la réaction de *Jones*, faisant intervenir du trioxyde de chrome dans une solution aqueuse d'acide sulfurique. Dans ce milieu, l'aldéhyde s'hydrate pour former un diol géminé. Ce dernier vient s'additionner sur le trioxyde de chrome pour former un chromate d'ester qui se décompose pour générer l'acide carboxylique et du chrome IV (eq 18).



Lors de la mise en présence du réactif de *Jones* et de l'aldéhyde polyconjugué **21**, le milieu réactionnel a très rapidement évolué du rouge vif au jaune pâle. Nous pouvons penser qu'il s'est produit une oxydation de plusieurs doubles liaisons.

- réaction de Cannizaro

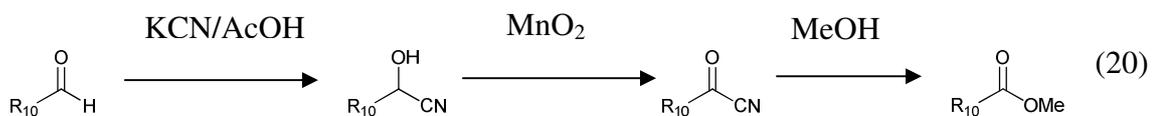
Cette dernière (eq 19) consiste en la dismutation en présence d'un excès de base forte d'un aldéhyde en alcool et anion carboxylate correspondants.



Il n'y a pas eu de réaction entre la soude et le composé **21**

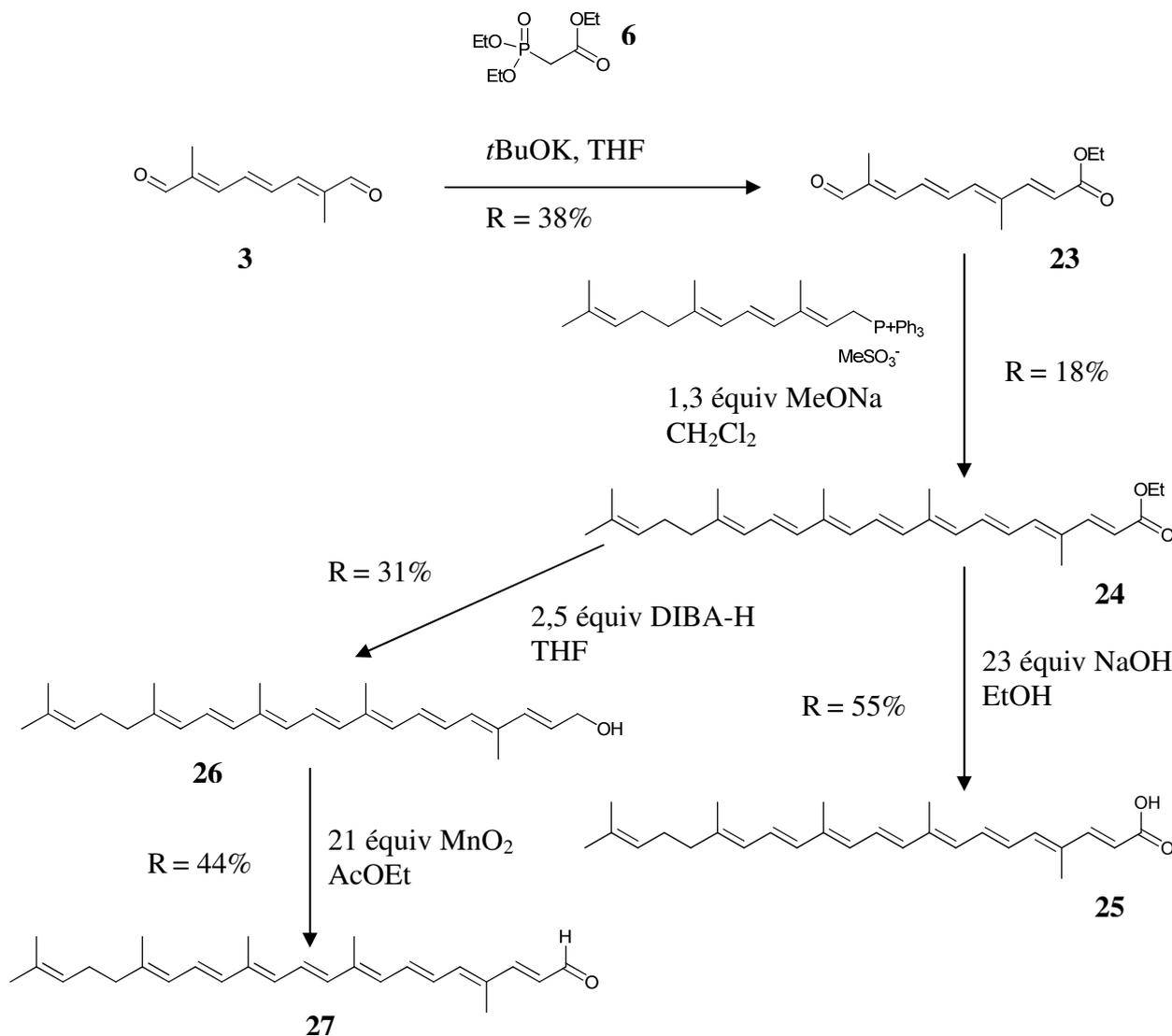
-Oxydant = KCN/MnO₂/MeOH, réaction de Corey

Nous avons essayé d'oxyder l'aldéhyde **21** en ester méthylique via la réaction de Corey [143]. Ce dernier pourra ensuite être saponifié pour obtenir l'acide carboxylique. La réaction de Corey (eq 20) consiste en l'addition de cyanure sur un aldéhyde en milieu acide pour former une cyanohydrine, qui est ensuite oxydée par MnO₂ en α-cétonitrile. Ce dernier, en présence de méthanol, forme un ester méthylique avec élimination de cyanure.



La réaction fût aussi un échec, il s'est formé de multiples produits excepté le composé **22** désiré.

3.3.5) *Tout-(E)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïdes (apo-10'-lycopénoïdes).*



Le composé **23** est obtenu avec un rendement de 38% par simple couplage *HWE* entre **6** et le dialdéhyde **3**. Le couplage de *Wittig* entre l'aldéhyde **23** et l'ylure du mésylate de phosphonium **2** conduit à l'ester éthylique **24** avec un rendement de 18%. Notons que ce dernier n'a pas été sujet à la transestérification qui s'était produite dans les mêmes conditions avec **17**.

L'acide **25** est obtenu par saponification de l'ester **24** dans un excès de soude éthanolique avec un rendement de 55% après acidification et cristallisation. L'alcool **19** est obtenu par réduction de l'ester éthylique **24** avec un rendement de 31%. Ce dernier est oxydé par MnO_2 pour produire l'aldéhyde **27** avec un rendement de 44%.

3.4) Stratégie d'identification des apo-lycopénoïdes par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'identification par résonance magnétique nucléaire (RMN) des apo-lycopénoïdes est une tâche difficile compte tenu de la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées dans cette famille de molécules. Cette identification doit confirmer non seulement le squelette hydrocarboné des molécules, mais aussi la diastéréoisomérisation, c'est-à-dire la configuration (*Z*) ou (*E*) de chaque double liaison.

Six expériences de RMN complémentaires (RMN homonucléaire, hétéronucléaire, mono- ou bidimensionnelle (à titre d'exemple, RMN complète de **18** annexe 1-6)) ont été effectuées afin d'attribuer les déplacements chimiques et constantes de couplage de chacun des atomes H et C des composés synthétisés.

3.4.1) Les expériences RMN

3.4.1.1) La RMN Homonucléaire

- RMN 1D de ^1H

La RMN du proton en mode 1D est la première approche pour la détermination de structures. Chaque proton de la molécule est caractérisé par son déplacement chimique et par sa multiplicité issue des couplages scalaires (spin-spin) entre deux protons en ^3J (deux protons portés par deux carbones vicinaux), voire en ^2J (deux protons diastérotopiques portés par un même C). Les constantes de couplage nous donnent aussi des informations intéressantes sur l'environnement du proton (conformation, diastéréoisomérisation).

- COSY (COrelated SpectroscopY)

L'expérience 2D COSY montre les couplages scalaires entre les protons, principalement en ^3J mais aussi en ^2J (deux protons géminés) voire à longue distance (^4J). Cette expérience permet de déterminer l'environnement de chaque proton de proche en proche tout au long de la molécule.

- *NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)*

L'expérience NOESY est une analyse 2D de choix pour confirmer la structure spatiale de la molécule (conformation, configuration). En effet, elle établit des corrélations de type couplage dipolaire (n'impliquant pas les électrons des liaisons) entre deux protons proches dans l'espace.

- *DEPT 135 (Distortionless Enhanced Polarisation Transfer)*

L'expérience DEPT 135 est une analyse apparentée à la RMN de ^{13}C mais qui a pour avantage de distinguer les divers types de carbones en fonction de leur couplage aux protons qu'ils portent. Ainsi, les carbones primaires et vinyliques apparaissent du côté positif du spectre alors que les carbones secondaires et quaternaires apparaissent du côté négatif du spectre.

3.4.1.2) *La RMN hétéronucléaire*

- *HSQC (Heteronuclear Single Quantum Spectroscopy)*

Dans l'analyse 2D HSQC, la première dimension présente les déplacements chimiques des protons et la deuxième dimension ceux des carbones auxquels ils sont directement liés. Cette analyse donne donc les corrélations ^1J proton - carbone. Elle permet donc d'attribuer aisément le déplacement chimique des carbones à partir des déplacements chimiques des protons préalablement déterminés. Cette technique ne permet pas d'identifier les carbones quaternaires car par définition ils ne portent pas de proton.

- *HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)*

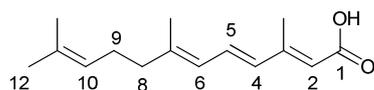
C'est également une expérience 2D portant les mêmes axes que HSQC. Cette analyse est complémentaire à HSQC car elle donne les couplages scalaires entre un proton et les carbones en ^2J , ^3J et ^4J . Elle permet souvent d'attribuer les déplacements chimiques des carbones quaternaires mais aussi de confirmer l'enchaînement des carbones présents sur la molécule.

3.4.2) Stratégie d'attribution.

La multiplicité des protons et carbones vinyliques mais aussi des groupements méthyles rend difficile l'interprétation des spectres des apo-lycopénoïdes. Il est donc nécessaire d'adopter une stratégie cohérente pour combiner les données RMN, les données de la littérature [21] et les informations issues des données expérimentales complémentaires (spectres de masse, spectres UV-visible...).

Prenons pour exemple l'acide de chacune des familles d'apo-lycopénoïdes synthétisés. Cette stratégie est similaire pour les molécules d'une même famille.

3.4.2.1) La famille tout-(E)-3,7,11-triméthyl-dodéca-2,4,6,10-tétraénoïdes (apo-11-lycopénoïdes) : l'acide carboxylique **10**.



-RMN du ^1H

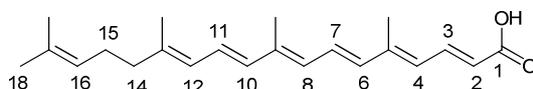
Le proton H-C(2) correspond au seul singulet intégrant pour 1 proton et présent dans la zone vinylique du spectre ; il est donc identifié à 5,77 ppm. Le doublet à 6,21 ppm avec $J = 15,1$ Hz correspondant à une corrélation scalaire entre deux protons vinyliques en position (E) ; ce doublet est attribué au proton H-C(4). Cette dernière constante de couplage est retrouvée pour le proton H-C(5) dont le signal est de type dd ($J = 10,9$ et $15,1$ Hz) à 6,90 ppm. Le doublet à 5,98 ppm et $J = 10,9$ Hz est alors attribué à H-C(6). Le dernier signal vinylique du spectre est un multiplet correspondant à H-C(10) à 5,09 ppm. Le multiplet à 2,13 ppm intégrant pour 4 protons correspond à H₂C(8 et 9). Le méthyle H₃C-C(3) en β de la fonction acide carboxylique est le plus déblindé et résonne à 2,34 ppm. Par effet de la conjugaison H₃C-C(7) est lui aussi déblindé, bien que plus faiblement, et résonne à 1,85 ppm. Enfin, nous pouvons attribuer H₃C-C(11) au singulet à 1,61 ppm et H₃C(12) au singulet à 1,69 ppm car H₃C-C(11) est en *cis* par rapport à la chaîne hydrocarbonée donc plus blindé.

- RMN du ^{13}C

Les signaux des ^{13}C sont attribués à partir du spectre HSQC pour les ^{13}C ayant une corrélation scalaire ^1J avec un ou plusieurs protons et à partir du spectre HMBC pour les carbones quaternaires.

Ainsi, les protons identifiés précédemment permettent d'identifier les carbones qui les portent. Les déplacements chimiques en ppm sont les suivants: 14,2 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(3)$) ; 17,4 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(7)$) ; 17,9 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(11)$) ; 25,9 ($\text{C}(12)$) ; 26,6 ($\text{C}(9)$) ; 40,4 ($\text{C}(8)$) ; 117,1 ($\text{C}(2)$) ; 123,7 ($\text{C}(10)$) ; 125,0 ($\text{C}(6)$) ; 132,2 ($\text{C}(5)$) et 133,4 ($\text{C}(4)$). Les carbones quaternaires sont déterminés grâce aux corrélations scalaires en ^2J du spectre HMBC entre les protons portés par le groupement méthyle et le carbone quaternaire qui porte ce dernier. On peut donc attribuer $\text{C}(11)$ à 132,2 ppm, $\text{C}(7)$ à 145,0 ppm et 155,9 ppm pour $\text{C}(3)$. Le carbone de l'acide carboxylique $\text{C}(1)$ est le plus déblindé du spectre ^{13}C et résonne à 172,0 ppm.

3.4.2.2) La famille tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyl-octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes (apo-14'-lycopénoïdes) : l'acide carboxylique **18**.

- RMN de ^1H

Nous pouvons attribuer avec certitude le signal de type dd ($J = 14,9$ et $12,1$ Hz) à 7,79 ppm au $\text{H}-\text{C}(3)$, ce signal étant le plus déblindé par conjugaison avec le groupement CO_2H . Les deux constantes de couplage sont respectivement retrouvées pour le doublet ($J = 14,9$ Hz) à 5,88 ppm que nous pouvons attribuer à $\text{H}-\text{C}(2)$ et le doublet ($J = 12,1$ Hz) à 6,24 ppm que nous pouvons attribuer à $\text{H}-\text{C}(4)$. Ces attributions sont confirmées par les corrélations COSY entre les trois signaux. L'enchaînement des protons en couplage ^3J étant interrompu par la présence du carbone quaternaire $\text{C}(5)$, nous pouvons attribuer $\text{H}-\text{C}(6)$ au signal à 6,36 ppm à l'aide de la corrélation NOESY. Puis le COSY nous permet à nouveau d'attribuer les protons de proche en proche grâce aux couplages ^3J : $\text{H}-\text{C}(7)$ à 6,85 ppm et $\text{H}-\text{C}(8)$ à 6,19 ppm. Ces attributions sont corroborées par le spectre 1D du proton qui présente un doublet ($J = 15,0$ Hz) à 6,36 ppm pour $\text{H}-\text{C}(6)$, un doublet de doublets ($J = 15,0$ Hz et $11,4$ Hz) pour $\text{H}-\text{C}(7)$ et un doublet ($J = 11,4$ Hz) pour $\text{H}-\text{C}(8)$. Le spectre du proton ne comprend plus que deux doublets et un

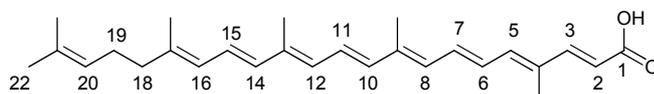
doublet de doublets résolus dans sa zone vinylique. On peut donc attribuer le dd ($J = 15,0$ Hz et $11,0$ Hz) à $6,57$ ppm à H-C(11), le doublet ($J = 15,0$ Hz) à $6,25$ ppm à H-C(10) et le doublet ($J = 11,0$ Hz) à $5,96$ ppm à H-C(12). Ces attributions sont confirmées par les corrélations COSY entre les trois signaux. Le spectre 1D du proton présente également un multiplet à $2,12$ ppm intégrant pour 4 protons qui peut être attribué à H₂C(14 et 15). Le dernier signal non attribué de la zone vinylique est un multiplet à $5,11$ ppm qui correspond à H-C(16). Les protons des groupements méthyles sont attribués via le spectre NOESY. H-C(16) à $5,11$ ppm corrèle avec H₃C(18) qui résonne à $1,69$ ppm. La corrélation NOE entre le signal de H-C(11) à $6,57$ ppm et les singulets à $1,83$ ppm et $1,99$ ppm et celle entre le signal de H₂C(14 et 15) à $2,12$ ppm et les singulets à $1,62$ ppm et $1,83$ ppm nous permettent de d'attribuer H₃C-C(17) à $1,62$ ppm, H₃C-C(13) à $1,83$ ppm et H₃C-C(9) à $1,99$ ppm. Enfin, H-C(7) est en corrélation NOE avec H₃C-C(9) à $1,99$ ppm et un 2^e signal à $2,08$ ppm que l'on peut attribuer à H₃C-C(5). Ces attributions sont corroborées avec les corrélations allyliques ⁴J du COSY, par exemple entre H-C(12) à $5,96$ ppm et H₃C-C(13) à $1,83$ ppm.

Toutes ces corrélations NOESY entre groupements méthyles et protons vinyliques, ainsi que celles établies entre les protons 12 et 10, 10 et 8, 8 et 6, 6 et 4 et enfin 4 et 2 confirment bien les configurations (2*E*), (4*E*), (6*E*), (8*E*), (10*E*), (12*E*) et (16*E*) de la chaîne polyénique.

- RMN de ¹³C

L'attribution complète du spectre proton permet d'attribuer facilement les déplacements chimiques des carbones qui les portent via le spectre HSQC. On en déduit les attributions suivantes (en ppm): $13,2$ (H₃C-C(9)) ; $13,4$ (H₃C-C(5)) ; $17,2$ (H₃C-C(13)) ; $17,9$ (H₃C-C(17)) ; $25,9$ (C(18)) ; $26,8$ (C(15)) ; $40,4$ (C(14)) ; $119,3$ (C(2)) ; $124,0$ (C(16)) ; $125,8$ (C(12)) ; $126,4$ (C(11)) ; $128,5$ (C(4)) ; $129,3$ (C(7)) ; $130,8$ (C(8)) ; $135,1$ (C(10)) ; $136,0$ (C(6)) ; $142,8$ (C(3)). Ces données sont corroborées par le spectre DEPT 135. Le carbone C(1) étant le plus déblindé, nous pouvons lui attribuer le signal à $172,8$ ppm correspondant à la zone des acides carboxyliques. L'analyse du spectre HMBC nous permet d'attribuer les carbones quaternaires via les corrélations ²J avec les protons portés par les groupements méthyles. Les protons H₃C-C(17) à $1,62$ ppm corrélient avec les carbones vinyliques à $124,0$ ppm (précédemment attribué à C(16)) et $132,0$ ppm ; ce dernier déplacement chimique peut donc être attribué à C(17). Avec le même raisonnement, nous pouvons attribuer C(13) à $140,8$ ppm, C(9) à $139,1$ ppm et C(5) à $145,8$ ppm.

3.4.3.3) La famille tout-(*E*)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïdes (apo-10'-lycopénoïdes) : l'acide carboxylique **25**.



- RMN de ^1H

Nous pouvons attribuer à H-C(3) le signal le plus déblindé (d, $J = 15,5$ Hz) à 7,46 ppm. La constante de couplage est retrouvée dans le doublet à 5,87 ppm qui correspond donc à H-C(2). Ces attributions sont corroborées par les corrélations COSY entre ces deux protons. La corrélation NOE entre 7,46 ppm et 6,56 ppm nous permet d'attribuer à H-C(5) le signal à 6,56 ppm. Les couplages scalaires du spectre COSY permettent l'attribution de H₃C-C(4) à 1,94 ppm (couplage ^4J) puis successivement de H-C(6) à 6,59 ppm, H-C(7) à 6,80 ppm et H-C(8) à 6,27 ppm (couplages ^3J). Ce dernier est en couplage ^4J avec H₃C-C(9) à 2,01 ppm. Le spectre NOESY nous permet d'attribuer H-C(10) à 6,35 ppm. Les corrélations ^3J successives du spectre COSY donnent alors H-C(11) à 6,72 ppm et H-C(12) à 6,19 ppm. Ces données sont confirmées par le spectre du proton qui présente un doublet ($J = 14,8$ Hz) à 6,35 ppm (H-C(10)), un dd ($J = 11,5$ et 14,8 Hz) à 6,72 ppm (H-C(11)) et un doublet ($J = 11,5$ Hz) à 6,19 ppm (H-C(12)). Grâce à la corrélation COSY de type ^4J entre les signaux à 6,19 ppm et 1,98 ppm, nous pouvons attribuer H₃C-C(13) à 1,98 ppm. Le spectre NOESY attribue H-C(14) à 6,25 ppm (corrélation avec H-C(12)) puis par corrélations COSY successives H-C(15) à 6,52 ppm et H-C(16) à 6,95 ppm. La corrélation ^4J du spectre COSY avec ce dernier donne H₃C-C(17) à 1,82 ppm. Les similitudes structurales entre les séries apo-10' et apo-14' permettent de transposer les attributions de l'acide apo-14'-lycopénoïque à l'acide apo-10'-lycopénoïque. Nous pouvons donc proposer les attributions suivantes : H₂C(18 et 19) à 2,12 ppm, H-C(20) à 5,11 ppm, H₃C-C(21) à 1,62 ppm et H₃C(22) à 1,69 ppm. Les corrélations NOESY entre H₃C(22) et H-C(20), H-C(16) et H-C(14), H-C(14) et H-C(12), H-C(12) et H-C(10), H-C(10) et H-C(8), H-C(8) et H-C(6), H-C(6) et H₃C-C(4), H₃C-C(4) et H-C(2) confirment la configuration toute (*E*) de l'acide **25**.

- RMN de ^{13}C

Comme pour l'acide **18**, l'attribution des signaux des protons permet d'attribuer facilement les déplacements chimiques des carbones qui les portent par analyse du spectre HSQC. On en déduit les attributions suivantes (en ppm) : 12,7 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(4)$) ; 13,1 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(9)$) ; 13,1 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(13)$) ; 17,1 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(17)$) ; 17,8 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(21)$) ; 25,8 ($\text{C}(22)$) ; 26,8 ($\text{C}(19)$) ; 40,4 ($\text{C}(18)$) ; 115,3 ($\text{C}(2)$) ; 124,1 ($\text{C}(20)$) ; 125,5 ($\text{C}(15)$) ; 125,8 ($\text{C}(16)$) ; 126,8 ($\text{C}(11)$) ; 128,7 ($\text{C}(6)$) ; 131,4 ($\text{C}(12)$) ; 131,9 ($\text{C}(8)$) ; 134,7 ($\text{C}(7)$) ; 135,4 ($\text{C}(14)$) ; 137 ($\text{C}(10)$) ; 140,6 ($\text{C}(5)$) ; 151,1 ($\text{C}(3)$). Ces données sont corroborées par le spectre DEPT 135 via le déplacement chimique et le signe des signaux. Le carbone $\text{C}(1)$ étant le plus déblindé, nous pouvons lui attribuer le signal à 172,6 ppm. L'analyse du spectre HMBC nous permet d'attribuer les carbones quaternaires via les corrélations ^2J avec les protons des groupements méthyles. Ainsi, en utilisant la même stratégie que pour l'acide apo-14'-lycopénoïque, nous pouvons proposer les attributions suivantes : 131,9 ppm à $\text{C}(21)$, 140,2 ppm à $\text{C}(17)$, 137,7 ppm à $\text{C}(13)$, 139,6 ppm à $\text{C}(9)$ et 133,4 ppm à $\text{C}(4)$.

3.5) Conclusions / Perspectives

- Conclusions

Afin d'identifier les produits d'oxydation et potentiels métabolites du lycopène dans des tissus et fluides biologiques complexes et étudier leurs propriétés ; il a été nécessaire de préparer en quantités suffisantes certains de ces composés par synthèse chimique. Nous avons opté pour des synthèses convergentes avec élongation de la chaîne carbonée par formation de doubles liaisons C-C via les réactions de *Wittig* et *HWE*. Toutes les molécules ciblées ont été obtenues, excepté l'acide **22** dont la synthèse est encore à l'étude. La deuxième étape consiste en la caractérisation complète des molécules obtenues par synthèse. La masse molaire exacte de chaque composé a été obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR). La structure et la configuration de chaque composé ont été établies sans ambiguïté par RMN homonucléaire et hétéronucléaire. Enfin, la pureté des composés et certaines caractéristiques supplémentaires (spectres d'absorption, fragmentation) ont été obtenues par analyse CLHP couplée à une double détection par spectroscopie UV-visible à barrettes de diodes et spectrométrie de masse en mode *electrospray*.

Dans la suite de ce travail, les propriétés antioxydantes des composés synthétisés ainsi que leurs affinités pour la sérum albumine humaine seront étudiées.

- Perspectives

L'acide apo-12'-lycopénoïque reste à synthétiser. La transformation chimique de l'apo-12'-lycopénoïque en acide apo-12'-lycopénoïque ayant échoué, il faudra mettre en oeuvre une autre stratégie. La tentative d'oxydation d'un des deux groupements CHO de **3** produit un mélange difficile à purifier de composé de départ et de produits mono- et di-oxydés. Par ailleurs, il est alors possible d'envisager la voie de synthèse ci-dessous (schéma 27) qui implique une double protection de **3** puis une hydrolyse sélective d'un des deux acétals [84]. L'aldéhyde ainsi libéré serait oxydé en acide carboxylique ou en ester méthylique selon l'un des protocoles présentés dans la partie 3.3.4. Ce dernier serait ensuite couplé avec le mésylate de phosphonium par réaction de *Wittig* pour l'obtention de l'acide **22** ou de l'ester méthylique correspondant, ce dernier restant à saponifier pour l'obtention de **22**.

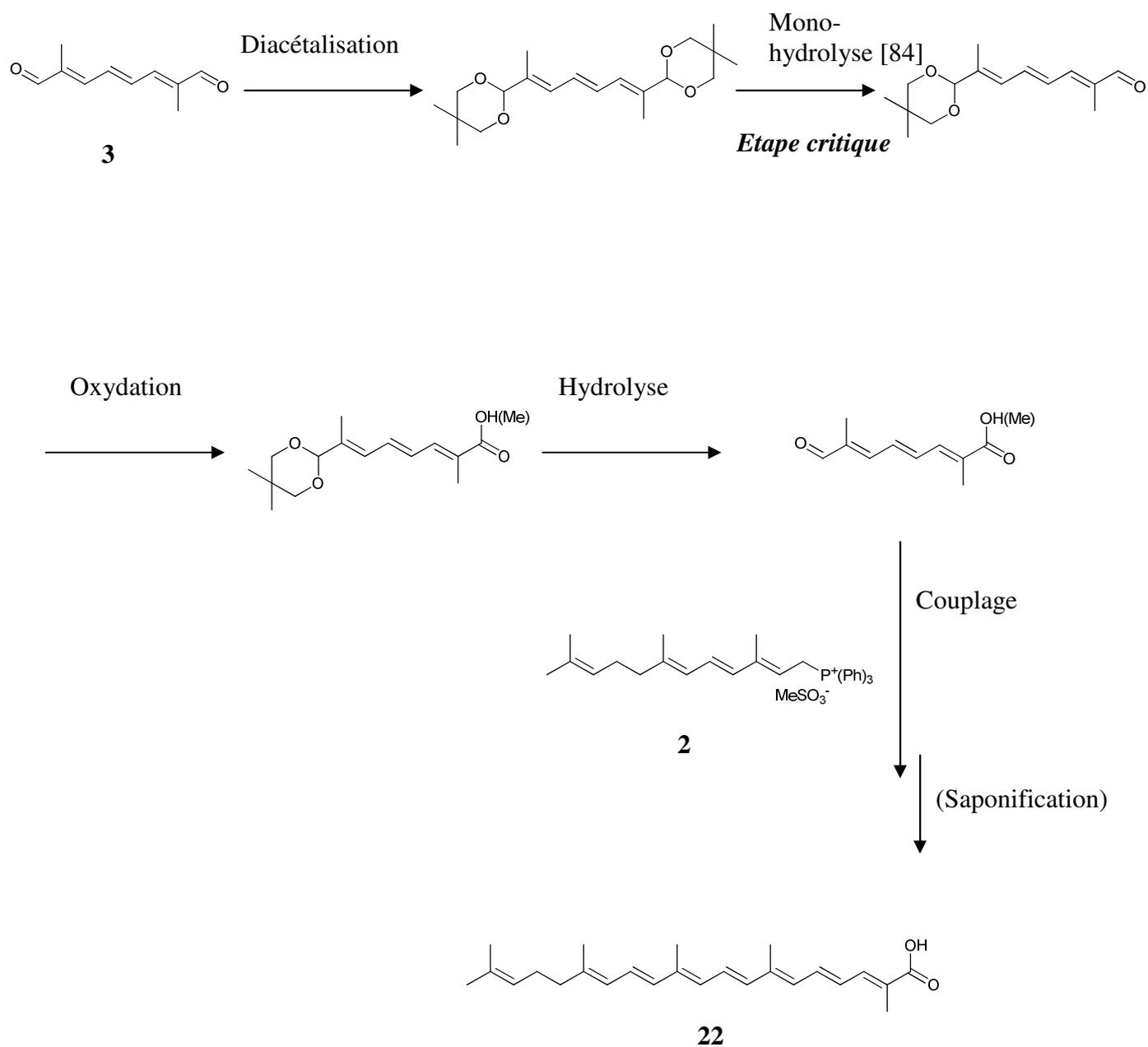


Schéma 27 : voie de synthèse possible pour l'obtention de 22

Chapitre 4

Etude de Pouvoir antioxydant

Dans cette quatrième partie, après avoir défini le processus de peroxydation lipidique de l'acide linoléique initié par les métalloporphyrines (metmyoglobine dans notre étude) nous discuterons les résultats des mesures de la capacité antioxydante des apolycopénoïdes synthétisés.

IV) Etude de pouvoir antioxydant des lycopénoïdes.

Le tractus digestif peut être un site important de stress oxydant en relation avec l'alimentation [144]. Par exemple, l'acidité du compartiment gastrique et l'ingestion de fer héminique (notamment apporté par les viandes rouges) créent des conditions oxydantes pour les lipides insaturés de l'alimentation. Les produits d'oxydations formés (hydroperoxydes, aldéhydes) sont partiellement biodisponibles et potentiellement toxiques en raison de leur caractère oxydant et/ou électrophile. Une alimentation riche en fruits et légumes, notamment en tomate et produits dérivés, fournit divers antioxydants comme les polyphénols et les caroténoïdes [145] qui sont susceptibles d'atteindre le compartiment gastrique en concentration suffisante pour inhiber la peroxydation lipidique ainsi que les dommages cellulaires qu'elle peut entraîner [27, 146]. Deux métabolites du lycopène, l'apo-6'-lycopénil et l'apo-8'-lycopénil, initialement présents dans la tomate, pourraient aussi intervenir dans ce processus [147].

En outre, il est envisageable que certaines molécules synthétisées telles que l'apo-14'-lycopénil et l'apo-10'-lycopénil puissent se former par dégradation oxydante du lycopène, soit pendant les procédés de transformation pour la préparation de produits dérivés de tomate, soit directement dans le tractus digestif avant absorption. De ce fait, on se propose d'évaluer la capacité antioxydante des produits d'oxydation synthétisés au laboratoire et d'établir une relation structure/activité.

4.1) La peroxydation lipidique

4.1.1) Mécanisme de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI)

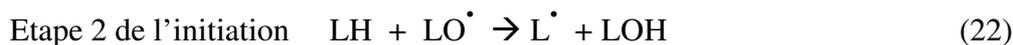
La peroxydation lipidique est un phénomène physiologique normal qui intervient dans la production de métabolites importants pour la signalisation cellulaire (prostaglandines, leucotriènes). Cependant, dans des conditions de stress oxydant correspondant à une surproduction de radicaux libres, ce phénomène peut être préjudiciable pour divers systèmes biologiques possédant des lipides polyinsaturés tels que les membranes cellulaires et les lipoprotéines du sang. Ces réactions peuvent constituer les premières étapes du

développement des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Elles sont aussi impliquées dans le processus de vieillissement, le cancer, la cataracte, l'arthrite et certaines maladies neurodégénératives [148].

La peroxydation lipidique se déroule selon un mécanisme radicalaire en chaîne typique qui comporte les trois étapes suivantes : l'initiation (ou amorçage), la propagation et la terminaison

Initiation : formation de radicaux libres en présence d'un initiateur.

Dans les aliments ou dans le tractus digestif, les principaux agents responsables de l'amorçage de l'autoxydation des lipides sont les ions de métaux de transition (y compris les métalloprotéines) d'origine endogène ou exogène (contaminants métalliques) et la lumière UV. Dans le cas de la metmyoglobine MbFe(III) (annexe 7), l'une des principales formes de fer alimentaire (fer hémunique), la réaction d'amorçage implique des traces de peroxyde d'hydrogène ou d'hydroperoxydes lipidiques (eq 21) pour générer des espèces très réactives (forme hypervalente du fer, radical oxyl ferryl) responsables de l'attaque oxydante sur la molécule d'acide gras poly-insaturé (eq 22-23) :



Le schéma 28 représente l'étape 2 de l'initiation détaillée dans le cas de l'acide linoléique, AGPI de type C18:2 ω -6 (le premier carbone insaturé est le 6^e à partir du début de la chaîne carbonée). En effet, l'acide linoléique possède deux atomes d'hydrogène bis-allylique qui peuvent être arrachés par une espèce oxygénée réactive (EOR) durant la phase d'initiation. Le radical pentadiényl formé est stabilisé comme le montrent ses trois formes mésomères (schéma 28).

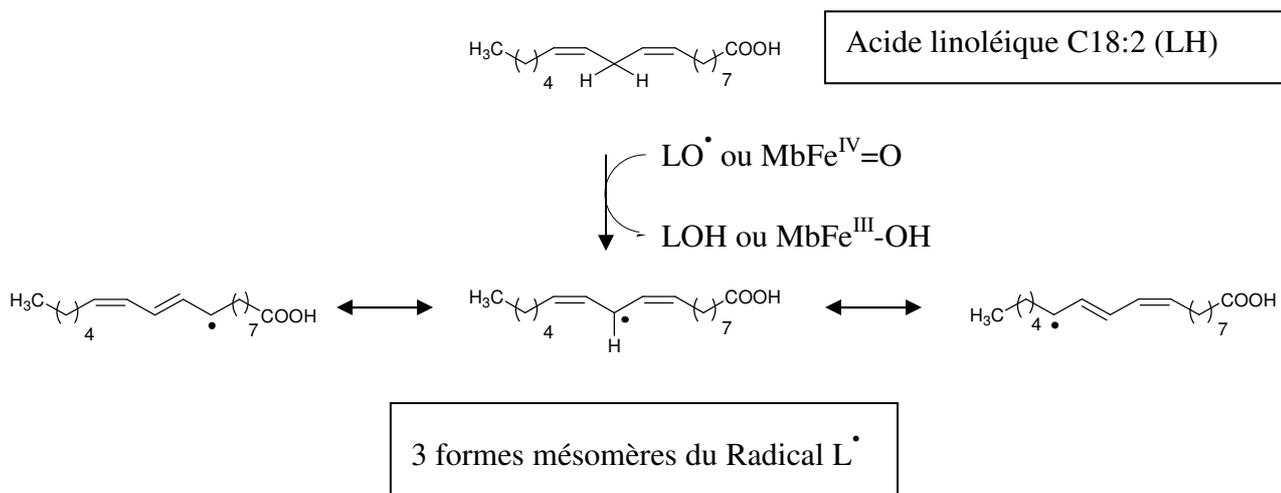
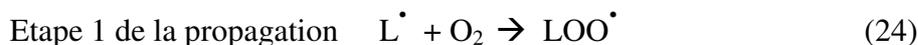


Schéma 28 : amorçage de la peroxydation de l'acide linoléique induit par la metmyoglobine

Propagation : production auto-entretenu de radicaux libres



La première étape (eq 24) consiste en la réaction entre le radical pentadiényl (L[•]) et O₂, lui-même un diradical, ce qui fait de ce processus une réaction très rapide contrôlée par la diffusion.

Dans la deuxième étape (eq 25), le radical LOO[•] formé est assez réactif pour attaquer une 2^{ème} molécule d'acide linoléique LH bouclant ainsi le cycle de propagation (schéma 29). Les hydroperoxydes formés sont un mélange de régioisomères 9 et 13 et de diastéréoisomères (Z,E) et (E,E) (figure 24).

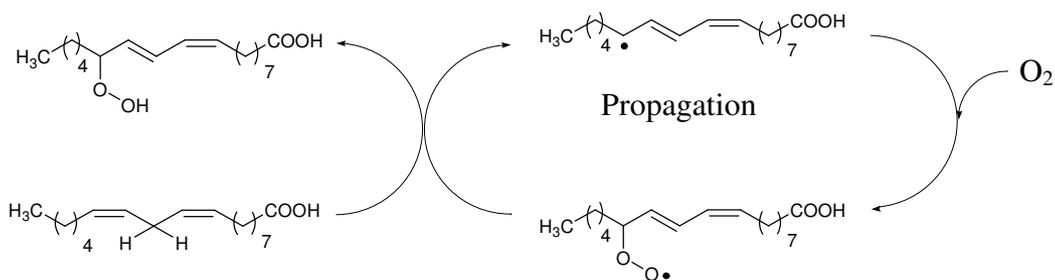


Schéma 29 : processus de propagation lors de la peroxydation de l'acide linoléique



Figure 24 : structure des hydroperoxydes formés lors de la peroxydation de l'acide linoléique

Terminaison : combinaison des radicaux libres aboutissant à la formation de produits non radicalaires stables (schéma 30).

$2 \text{ LOO}^\bullet \longrightarrow$ produits non radicalaires (LOH, composés carbonylés) via un intermédiaire de type LOO-OOL instable, qui se décompose en éliminant H_2O_2 ou O_2 (schéma 30).

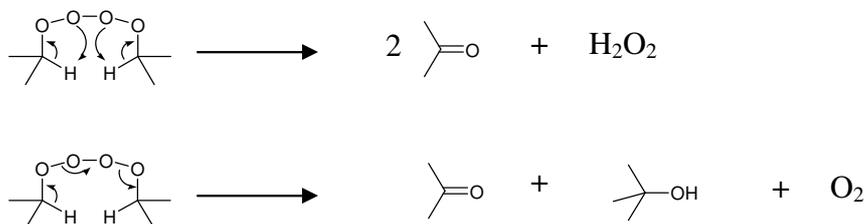


Schéma 30 : décomposition des tétraoxydes initialement formés dans la phase de terminaison

Outre les hydroperoxydes (LOOH), des alcools (LOH), des composés carbonylés (L=O), des époxydes et des produits de coupure de la chaîne hydrocarbonée peuvent également être formés, notamment à partir des radicaux LO^\bullet .

4.1.2) Inhibition de la peroxydation lipidique par les antioxydants

Un antioxydant est défini comme « toute substance qui, présente en faible concentration relativement à celle d'un substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat » [149].

Typiquement, un antioxydant est une espèce réductrice qui entre en compétition avec le substrat oxydable (l'acide linoléique dans notre modèle) pour réagir rapidement avec les espèces initiatrices et/ou propagatrices de l'oxydation. Dans ce processus, l'antioxydant est converti en produits d'oxydation stables.

Dans ce travail, la méthode utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant s'appuie sur un modèle d'inhibition de la peroxydation des lipides polyinsaturés approchant les conditions gastriques.

L'étude physico-chimique détaillée [28] d'un cas simple (micelles d'acide linoléique et de tween 20) montre que la peroxydation lipidique peut-être inhibée différemment par les antioxydants selon leur caractère lipophile-hydrophile. Les antioxydants hydrophiles tels que les composés phénoliques agissent dans la phase aqueuse par réduction du fer hypervalent au sein de la cavité de l'hème et inhibent donc l'étape d'initiation de la peroxydation lipidique. Les antioxydants lipophiles interviennent dans la phase lipidique en réduisant (voire en additionnant dans le cas des caroténoïdes) les radicaux peroxydes (LOO[•]) qui diffusent hors de l'hème. Ces antioxydants, qualifiés de 'briseurs de chaînes', inhibent donc la phase de propagation.

4.2) Modélisation chimique de la peroxydation lipidique dans le tractus digestif

- **Principe de la méthode** : l'acide linoléique (0,7 mM) est solubilisé dans un tampon phosphate à pH 5,8 contenant l'agent tensio-actif tween 20 (2 mM). La metmyoglobine en faible concentration (0,1 µM) est choisie comme initiateur de la peroxydation. L'antioxydant est ajouté au milieu réactionnel pour atteindre une concentration finale comprise entre de 0 et 10 µM.

Les études cinétiques consistent à enregistrer les changements spectraux entre 200 et 700 nm en fonction du temps. La croissance de l'absorbance à 234 nm correspondant à l'accumulation des diènes conjugués (LOOH) au cours du temps est suivie en absence ou présence d'antioxydants à plusieurs concentrations.

Les antioxydants testés dans notre modèle, les apo-lycopénoïdes et le lycopène, absorbent dans le domaine visible (excepté les apo-11-lycopénoïdes qui absorbent dans l'UV), ce qui permet de suivre commodément leur consommation au cours de la peroxydation.

- **Pertinence nutritionnelle d'un effet antioxydant dans le tractus digestif** : durant un repas, un homme absorbe en moyenne une dizaine de milligrammes de caroténoïdes par jour [35]. Si ce repas comporte des tomates ou produits dérivés, le caroténoïde majoritaire sera le lycopène. Il a été estimé que la concentration de lycopène dans le tractus digestif après un repas peut atteindre 50 μM [145]. Cette concentration diminue au cours du temps jusqu'à atteindre 10 μM après trois heures de digestion. Ces quantités paraissent suffisantes pour envisager une action antioxydante bénéfique du lycopène dans le tractus digestif. A contrario, la concentration plasmatique de lycopène est inférieure à 1 μM [23], ce qui est sans doute trop faible pour qu'un effet antioxydant significatif se manifeste après absorption intestinale.

- **Acide linoléique C18 : 2** : les lipides alimentaires sont principalement apportés sous forme de triglycérides (85 à 95% des lipides). Le recours à un acide gras libre, l'acide linoléique, est donc un des aspects simplificateurs de notre modèle qui a l'avantage de conduire à des solutions micellaires transparentes permettant d'effectuer des mesures directes au spectrophotomètre des diènes conjugués formés lors de la peroxydation. Il faut cependant noter que la digestion des triglycérides débute dès l'estomac grâce à la lipase gastrique, de sorte que de faibles concentrations d'acides gras libres sont présentes en ce site. Par ailleurs, un nouveau modèle à base d'émulsions de triglycérides stabilisées par des phospholipides et/ou des protéines alimentaires est en cours de développement au laboratoire pour se rapprocher des conditions du tractus digestif [150].

- **pH 5,8** : à jeun, le pH du milieu gastrique est très faible ($\text{pH} \leq 2$). Par contre, le pH moyen d'un repas est quasi neutre. De ce fait, après ingestion d'un repas, le pH gastrique se situe typiquement entre 5,4 et 6,2 en début de digestion [145].

- **37°C** : cette température correspond à la température intrinsèque du corps humain.

- **Tween 20** : le tween 20 est un tensio-actif non ionique (polyéthylène glycol sorbitan mono laurate) qui permet de solubiliser le lycopénoïde ainsi que l'acide linoléique dans le milieu modèle aqueux.

- **Metmyoglobine** : la myoglobine (MbFe^{II}) est une protéine contenant un cofacteur hématine (porphyrine de Fe^{II}) qui permet le transport intracellulaire du dioxygène dans les tissus musculaires. Sa forme oxydée, la metmyoglobine (MbFe^{III}), qui s'accumule dans le muscle après abattage de l'animal et dans la viande lors de la cuisson, est capable d'initier efficacement la peroxydation lipidique [28].

- **O₂** : des études *in vitro* [151] et *in vivo* chez l'animal [152-153] ont démontré que le compartiment gastrique peut être considéré comme un milieu aérobie.

- **Antioxydants** : les molécules étudiées sont les apo-11-lycopénoïdes, apo-14'-lycopénoïdes, apo-10'-lycopénoïdes, l'apo-12'-lycopénoïde et le lycopène, tous synthétisés lors de ce travail, ainsi que l'apo-8'-lycopénoïde fournis par la société DSM. Ces composés sont susceptibles de se former dans la tomate (catabolisme du lycopène), lors des procédés d'élaboration de produits à base de tomate, voire même dans le tractus digestif en conséquence de l'autoxydation du lycopène.

4.3) Peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine et inhibée par les apo-lycopénoïdes : résultats et discussion.

La figure 25 montre les évolutions spectrales observées lors de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par l'acide apo-10'-lycopénoïque **25**.

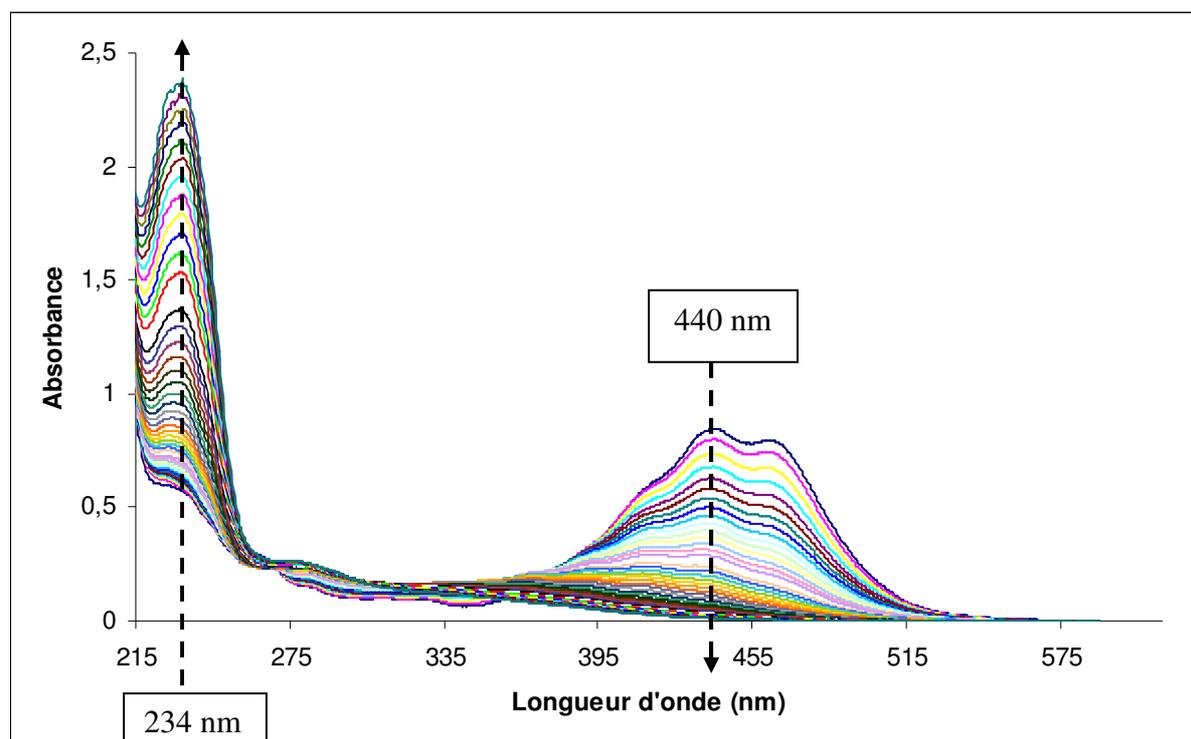


Figure 25 : changements spectraux au cours de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine en présence d'acide apo-10'-lycopénoïque **25** à 10 μM .

La croissance de l'absorbance à 234 nm correspond à la formation des hydroperoxydes de l'acide linoléique. On constate qu'au temps initial (avant l'addition de l'initiateur) l'absorbance à 234 nm est de l'ordre de 0,5, ce qui traduit la présence d'hydroperoxydes en faible concentration (de l'ordre de 20 μM , soit environ 3% de la concentration totale de lipide) en provenance de l'échantillon commercial d'acide linoléique. Ces contaminants jouent un rôle clé dans l'initiation de la réaction (schéma 28). L'absorption à 440 nm est caractéristique de

l'acide apo-10'-lycopénoïque **25** et diminue au cours du temps jusqu'à atteindre une valeur nulle, ce qui confirme la consommation de l'antioxydant durant la peroxydation lipidique.

Les variations de l'absorbance à 234 nm et 440 nm en fonction du temps (figure 26) sont déduites des spectres obtenus précédemment (figure 25) à différentes concentrations de **25**.

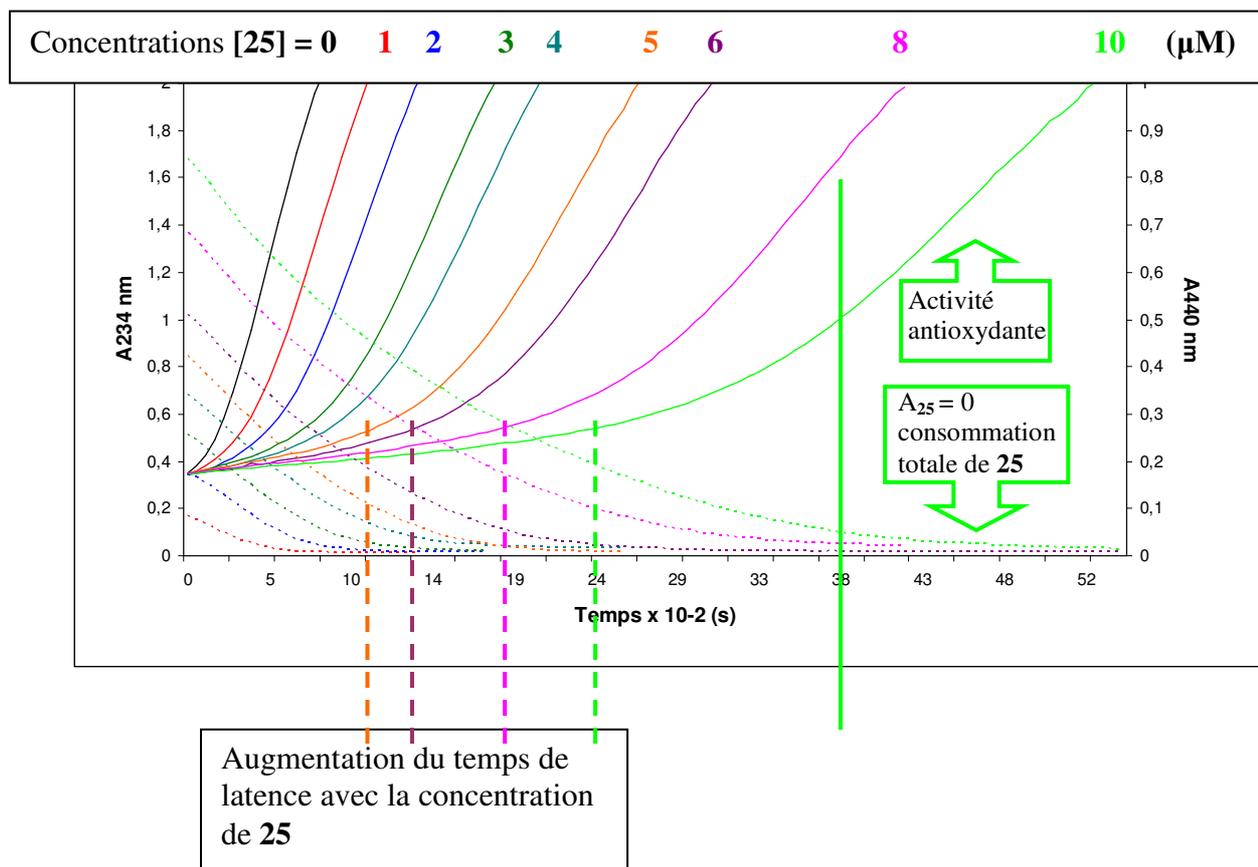


Figure 26 : cinétiques de peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine en présence d'acide apo-10'-lycopénoïque **25** à 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 (μM) ; absorbance à 234 nm (trait plein) et à 440 nm (trait pointillé)

Plusieurs informations intéressantes peuvent en être déduites (figure 26).

- En absence d'antioxydant (peroxydation non inhibée), la cinétique présente une seule phase au cours de laquelle l'absorbance à 234 nm augmente rapidement, ce qui correspond à une forte accumulation de diènes conjugués (courbe noire [**25**] = 0 μM).

- En présence d'antioxydant, on observe deux phases : une phase dite 'de latence' présentant une faible augmentation de l'absorbance à 234 nm, suivie d'une phase dite 'de propagation' au cours de laquelle A(234 nm) augmente rapidement. La durée de la phase de latence pour la formation des diènes conjugués (courbes en traits pleins) augmente avec la concentration d'acide apo-10'-lycopénoïque. En outre, l'absorbance à 440 nm, longueur d'onde d'absorption maximale de l'antioxydant **25**, diminue pendant cette phase de latence jusqu'à atteindre une valeur proche de zéro quand s'amorce la phase de propagation. Ainsi, la phase de latence correspond à la période nécessaire à la consommation de l'antioxydant. Les produits d'oxydation de **25** accumulés à la fin de la phase de latence semblent peu inhibiteurs d'où la reprise de la peroxydation.

- Durant la phase de propagation, la vitesse d'accumulation des diènes conjugués diminue avec l'augmentation de la concentration d'antioxydant **25**, particulièrement à partir d'une concentration de 5 μ M (figure 26). Deux interprétations sont possibles : à forte concentration d'antioxydant, une activité inhibitrice résiduelle se manifeste dans les produits d'oxydation de l'antioxydant (figure 26). Elle serait cependant insuffisante pour prolonger la phase de latence au delà de la consommation de l'antioxydant. Plus probablement, une dégradation oxydante de l'hème intervient à long terme qui se traduit par une libération de fer non héminique dans le milieu, ce dernier étant un initiateur de peroxydation moins efficace que la metmyoglobine. Les travaux de l'équipe ont effectivement montré une disparition rapide de la bande de Soret (caractéristique du noyau porphyrine) au cours de la peroxydation [28].

Les différents lycopénoïdes sont comparés en mesurant à différentes concentrations d'antioxydant C, la période T nécessaire pour accumuler une concentration donnée de diènes conjugués (par convention, concentration correspondant à une augmentation d'absorbance de 0,7 par rapport au temps 0, avant addition de metmyoglobine, figure 27).

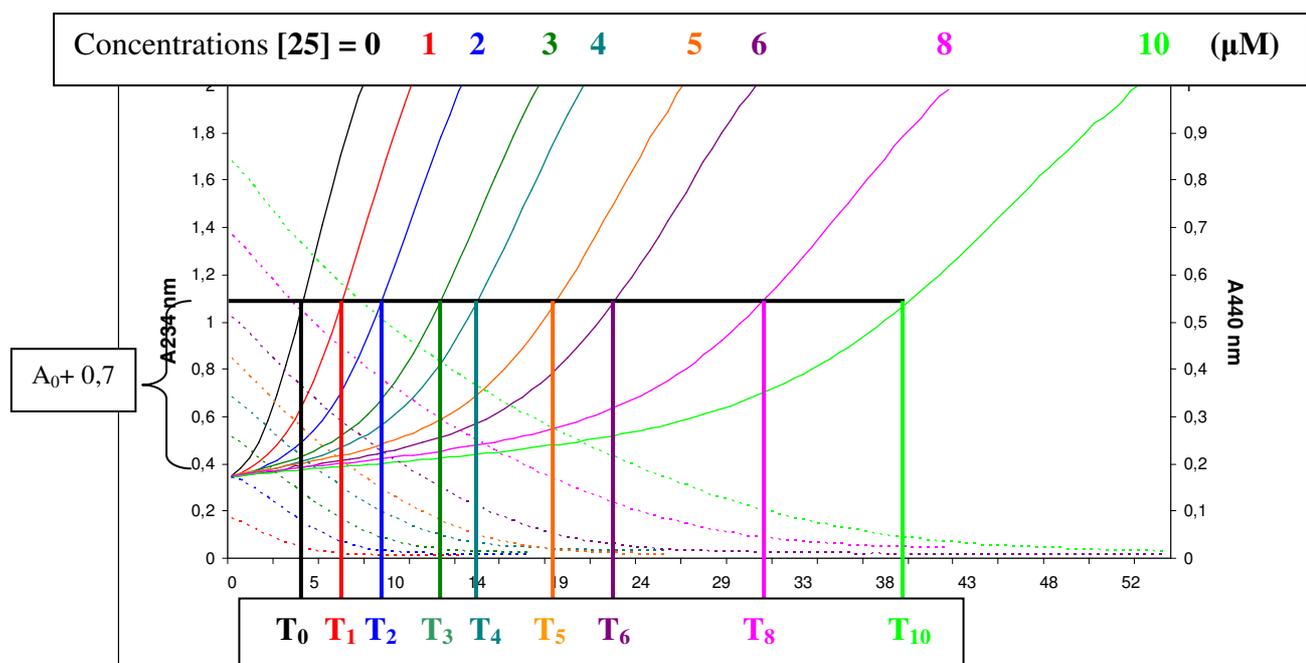


Figure 27 : cinétique de peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine en présence d'acide apo-10'-lycopénoïque 25, calcul du paramètre IC₅₀

La période T croît de manière quasi-linéaire avec C. Cependant, une meilleure reproduction des variations expérimentales est obtenue en utilisant la fonction quadratique suivante : $T/T_0 = 1 + aC + bC^2$, T₀ étant le temps nécessaire pour accumuler la même concentration de diènes conjugués en absence d'antioxydant (figure 28).

Par définition, le paramètre IC₅₀ est la concentration d'antioxydant correspondant à T = 2T₀. On obtient donc : $IC_{50} = (\sqrt{a^2 + 4b} - a)/2b$.

A partir des données cinétiques (figure 27), il est possible de tracer $T/T_0 = f(C)$ (figure 28) puis d'analyser la courbe obtenue à partir de la loi quadratique pour estimer les paramètres "a" et "b" et en déduire la valeur de IC_{50} . Le classement des molécules en fonction de leur capacité antioxydante est alors possible (tableau 6) : plus la valeur IC_{50} d'un antioxydant est faible, plus son activité antioxydante est importante.

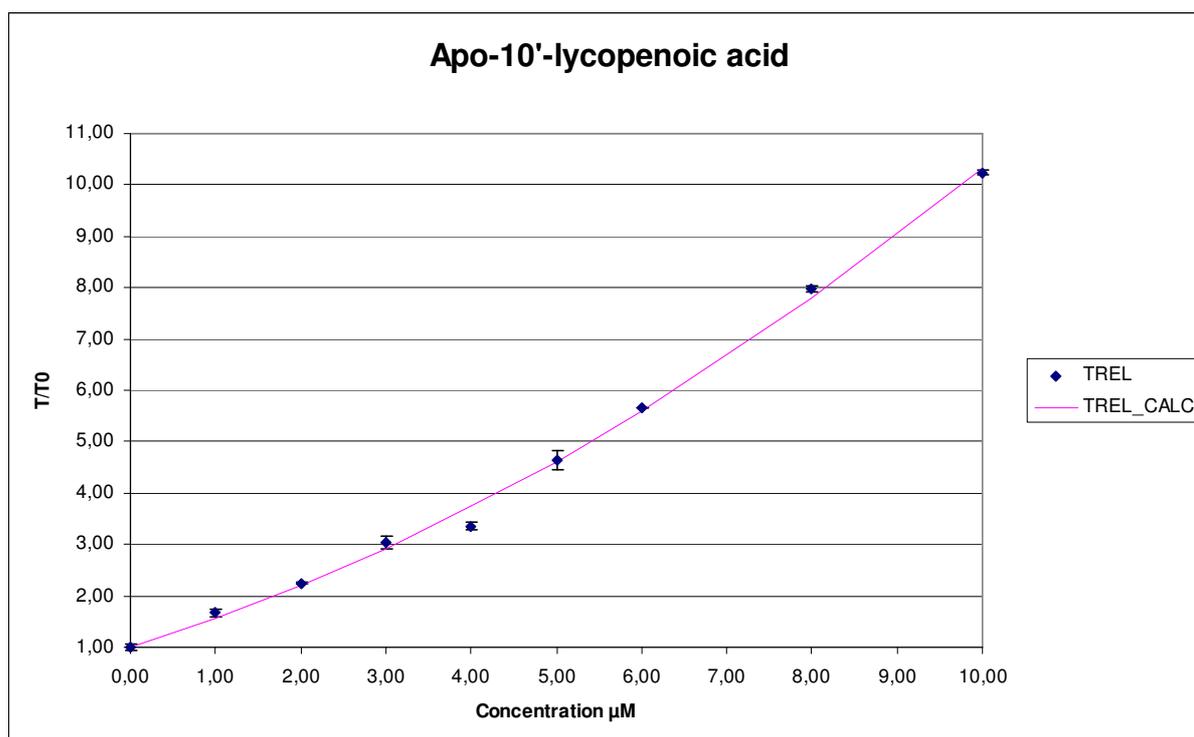


Figure 28 : calcul du paramètre IC_{50} de 25

Dans le tableau 6 figurent également la valeur théorique de l'énergie de la HOMO (en phase gazeuse) de chaque antioxydant déduite d'un calcul de mécanique quantique semi-empirique. En première approximation, on a : $E_I = -E_{HOMO}$, E_I étant l'énergie d'ionisation qui mesure le pouvoir réducteur du composé en phase gazeuse. Plus la valeur de E_I est faible, plus la molécule est réductrice.

Antioxydant	IC ₅₀ / μ M	r	sigma	E(HOMO) / eV a)
Lycopène	2,0*	0,9968	0,2	-7,74
Apo-8'-lycopéнал 28	1,4	0,9985	0,2	-7,95
Apo-10'-lycopéнал 27	2,1	0,9959	0,2	-8,02
Apo-12'-lycopéнал 21	2,9	0,9979	0,5	-8,09
Apo-14'-lycopéнал 20	3,5	0,9996	0,3	-8,22
Acide apo-10'-lycopénoïque 25	1,7	0,9985	0,2	-8,04
Apo-10'-lycopéнал 27	2,1	0,9959	0,2	-8,02
Apo-10'-lycopénoate d'éthyle 24	2,6	0,9990	0,2	-8,02
Apo-10'-lycopéanol 26	12,2	0,9951	0,5	-7,84
Acide apo-14'-lycopénoïque 18	1,6	0,9996	0,1	-8,25
Apo-14'-lycopéнал 20	3,5	0,9996	0,3	-8,22
Apo-14'-lycopénoate de méthyle 17	3,6	0,9967	0,4	-8,21
Apo-14'-lycopéanol 19	4,1	0,9971	0,1	-7,98
Apo-11-lycopéнал 9	nd	nd		
Apo-11-lycopéanol 8	11,8	0,9993	6,8	-8,40
Acide apo-11-lycopénoïque 10	nd	nd		
Apo-11-lycopénoate d'éthyle 7	nd	nd		

a) Logiciel HyperChem, programme PM3

*Concentration maximale : 2,5 μ M

nd : non déterminé

Tableau 6 : IC₅₀ et énergie de la HOMO du lycopène et des apo-lycopénoïdes

A partir des données du tableau 6, nous pouvons discuter les relations structure/activité antioxydante des apo-lycopénoïdes.

- Influence de la conjugaison

La capacité antioxydante des lycopénoïdes ne se manifeste qu'à partir d'un nombre suffisant de doubles liaisons conjuguées. En effet, les apo-11-lycopénoïdes **7, 8, 9, 10** possédant trois doubles conjuguées n'inhibent pas la peroxydation lipidique.

La comparaison des IC₅₀ des apo-lycopénals **20, 21, 27, 28** montre une capacité antioxydante croissante avec la conjugaison. Cette hypothèse est corroborée par les valeurs décroissantes de l'énergie d'ionisation. Les apo-lycopénals sont des molécules peu polaires qui pourraient agir dans la phase lipidique (au sein des micelles) pour inhiber la propagation de la peroxydation lipidique par capture directe des radicaux peroxy lipidiques. Cette hypothèse est en accord avec l'allure des cinétiques d'inhibition (figures 26 et 27 et annexe 8) qui présentent une phase de latence très marquée caractéristique d'une inhibition du processus de propagation [28].

- Influence de la fonction chimique terminale

Les valeurs des IC₅₀ calculées pour les apo-10'-lycopénoïdes **25, 27, 24, 26** et les apo-14'-lycopénoïdes **18, 20, 17, 19** montrent que, pour une longueur de chaîne hydrocarbonée donnée, l'activité antioxydante croît dans la série alcool < ester < aldéhyde < acide carboxylique alors que ce sont curieusement les alcools qui possèdent l'énergie d'ionisation la plus faible. Il est particulièrement frappant de constater que l'apo-10'-lycopénol est un antioxydant très médiocre alors que c'est le plus réducteur des lycopénoïdes (énergie d'ionisation minimale). On peut aussi noter que ce composé, bien que très peu inhibiteur, est rapidement consommé dans le milieu au profit de composés vraisemblablement inertes.

Globalement, il n'est pas possible d'interpréter la relation structure/activité sur la simple base du pouvoir réducteur intrinsèque de ces composés. En effet, la fonction terminale, dont la polarité est très variable, joue un rôle décisif dans la partition de l'antioxydant entre phase lipidique et phase aqueuse. Ainsi, il est probable que les aldéhydes et les esters agissent uniquement dans la phase lipidique alors que les lycopénoïdes amphiphiles (alcools et surtout acides) localisés à l'interface, peuvent également interagir avec l'initiateur. En effet, l'acide linoléique, lui-même composé amphiphile à tête polaire carboxylate, peut accéder à l'hème au cours de l'initiation de la peroxydation. Il est probable que les acides apo-lycopénoïques, structurellement proches des AGPI, puissent en faire autant et soient ainsi capables d'inhiber l'initiation.

4.4) Conclusions/perspectives

Les apo-lycopénoïdes à plus de trois liaisons conjuguées sont des inhibiteurs de la peroxydation de l'acide linoléique induite par la metmyoglobine. L'efficacité est fonction du nombre de doubles liaisons conjuguées ainsi que de la polarité de la fonction chimique terminale. Globalement, il est clair que divers produits de coupure oxydante du lycopène conservent une activité antioxydante notable, éventuellement plus forte que celle du lycopène lui-même, ce qui peut avoir des implications nutritionnelles intéressantes en terme de prévention du stress oxydant dans le tractus digestif.

Des études complémentaires seraient cependant nécessaires pour confirmer les mécanismes antioxydants à l'œuvre :

- étude de la capacité des apo-lycopénoïdes les plus polaires à réduire la ferrylmyoglobine ($\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$), l'initiateur de la peroxydation.
- analyse des produits d'oxydation des lycopénoïdes produits au cours de l'inhibition pour mettre en évidence des composés susceptibles de participer à l'activité antioxydante globale.

Chapitre 5

Interactions apo- lycopénoïdes/albumine du sérum humain

Dans ce cinquième chapitre, après avoir défini les caractéristiques de l'albumine du sérum humain, nous présenterons l'étude des propriétés complexantes de l'albumine du sérum humain avec les apo-14' et apo-10'-lycopénals et les acides apo-14' et apo-10'-lycopénoïques.

V) Interactions apo-lycopénoïdes/albumine du sérum humain

L'albumine du sérum humain (ASH) (figure 29) est une protéine majoritaire du plasma humain. Elle joue un rôle de transporteur, notamment des acides gras. Sa capacité de liaison d'une grande variété de ligands (médicaments, micronutriments, ions métalliques...) et sa forte concentration plasmatique en font une protéine de transport et de détoxification très importante pour l'organisme.

5.1) Généralités

Le sang est un tissu liquide circulant dans un espace vasculaire délimité par les cellules endothéliales. Il est composé de cellules (érythrocytes et globules blancs), de fragments de cellules (thrombocytes), le tout circulant dans une phase liquide appelée plasma. Le plasma a un pH compris entre 7,35 et 7,45 ; il est composé de 92% d'eau, de petits solutés (gaz, minéraux, nutriments) et de protéines. Par sa concentration élevée (5 g/100 mL), l'albumine (figure 29) représente 60% des protéines totales présentes dans la circulation sanguine. Elle joue un rôle dans différentes fonctions physiologiques comme l'homéostasie ou la fixation, le transport et le relargage des acides gras, du tryptophane, de la thyroxine (hormone thyroïdienne) et des stéroïdes [154].



Figure 29 : albumine du sérum humain (ASH)

5.2) Structure de la molécule d'albumine

5.2.1) Structure primaire

L'albumine est synthétisée par le foie puis délivrée dans la circulation sanguine où elle reste en moyenne 27 jours avant d'être éliminée.

L'albumine du sérum est une protéine globulaire de 66500 Da composée de 585 acides aminés. Dans le tableau 7 suivant sont répertoriés les acides aminés présents dans la structure de l'albumine humaine.

Acides aminés	Nombre
Acide aspartique	36
Asparagine	17
Thréonine	28
Sérine	24
Acide glutamique	62
Glutamine	20
Proline	24
Glycine	12
Alanine	62
Valine	41
Cystéine	35
Méthionine	6
Isoleucine	8
Leucine	61
Tyrosine	18
Phénylalanine	31
Lysine	59
Histidine	16
Tryptophane	1
Arginine	24
Total	585
Masse Molaire (Da)	66438,41

Tableau 7 : composition en acides aminés de l'albumine du sérum humain

5.2.2) Structures secondaire et tertiaire

L'albumine est composée de 67% d'hélices α , 10% de coudes β et 23% de chaînes faiblement structurées. Les 35 cystéines participent à la formation de 17 ponts disulfures qui s'établissent au sein d'hélices α . L'albumine est de nature flexible et peut adopter rapidement différentes conformations [155]. L'albumine est constituée de 9 boucles avec trois domaines I, II et III homologues. Chaque domaine est composé de 10 hélices α et divisé en deux sous-domaines A et B [156]. L'étude par diffraction X montre que l'albumine présente une forme triangulaire en forme de coeur de 8 nm de côté et 3 nm d'épaisseur en moyenne pour un volume moléculaire de 88 nm^3 [155, 157] (figure 30).

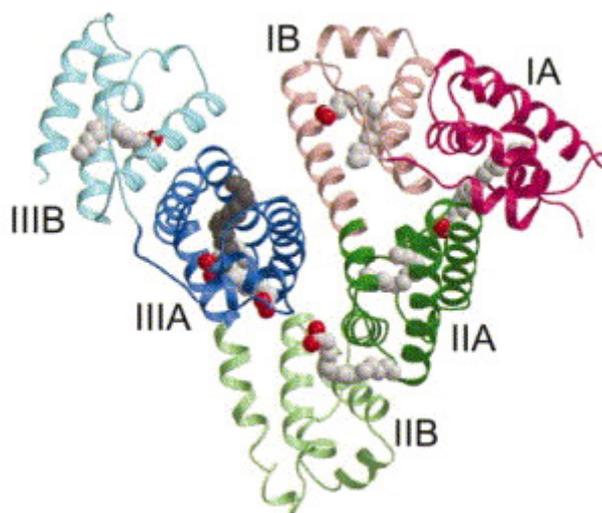


Figure 30 : domaines et sous-domaines de l'albumine humaine (complexé à l'acide oléique C18 : 1) rouge = I, vert = II, bleu = III, couleurs claires = sous-domaines A, foncées = sous-domaines B

5.3) Propriétés spectrale de l'albumine humaine

Les acides aminés responsables des propriétés spectrales de l'albumine sont essentiellement les résidus tryptophane (Trp ou W), tyrosine (Tyr ou Y) et phénylalanine (Phe ou F). L'albumine humaine possède un seul Trp (position 214, sous-domaine IIA) ainsi que 18 Tyr. Ces résidus sont responsables d'une absorption maximale à une longueur d'onde proche de 280 nm. La comparaison des coefficients d'absorption molaire à 280 nm des résidus Tyr ($\epsilon_{280} = 1480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et Trp ($\epsilon_{280} = 5540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) montre que ce dernier contribue fortement à

l'absorption de la molécule d'albumine à cette longueur d'onde. Par ailleurs, lors des études d'affinité, l'irradiation à 295 nm permet une excitation sélective du résidu Trp dont l'émission de fluorescence est maximale à 345 nm.

5.4) Les ligands de l'albumine

L'albumine de sérum a une grande capacité de liaison de petits ligands endogènes ou apportés par l'alimentation comme les acides gras, les vitamines, les ions métalliques et les oligo-éléments. Elle transporte aussi divers médicaments et anesthésiques [158-159], ce qui lui confère un rôle d'épurateur de la circulation sanguine. La flexibilité de sa structure et ses différents sites de liaisons lui permettent de s'adapter à une grande variété de ligands avec des constantes d'association variables (tableau 8) [155].

Composés	Constante d'association K_a (M^{-1})	Nombre de ligand liés n
Acides biliaires	$(3-200) \times 10^3$	3
Acides gras	$(1-69) \times 10^7$	1 à 7
Acide eicosanoïque	$7,0 \times 10^4$	2
Aldostérone	$3,2 \times 10^3$	1
Ascorbate	$3,5 \times 10^4$	0,1
Bilirubine	$9,5 \times 10^7$	1
Ca^{2+}	$15,1 \times 10^2$	1 à 4
Folate	$9,0 \times 10^2$	
Hématine	$1,1 \times 10^8$	1
Mg^{2+}	$1,0 \times 10^2$	12
Progestérone	$3,6 \times 10^5$	1
Salicylate	$1,9 \times 10^5$	
Testostérone	$2,4 \times 10^4$	1
L-Tyroxine	$1,6 \times 10^6$	1
L-Tryptophane	$1,0 \times 10^4$	1
Vitamine D ₃	$6,0 \times 10^5$	1
Zn^{2+}	$3,4 \times 10^7$	1

Tableau 8 : quelques ligands de l'albumine du sérum humain

La liaison réversible des divers ligands à l'albumine diminue la concentration de molécules libres dans le plasma et de ce fait, modifie la distribution, la pharmacocinétique, la toxicité et le taux d'excrétion de la molécule considérée [160]. La liaison réversible à l'albumine peut étendre le temps de demi-vie d'une substance dans le plasma par stabilisation et protection, mais peut également diminuer la concentration de substance libre. D'un point de vue pharmacocinétique, la liaison à l'albumine est bénéfique tant que l'extension du temps de demi-vie n'affecte pas la concentration de substance libre nécessaire à l'efficacité thérapeutique. Le bénéfice peut être très important pour les composés qui ont une faible solubilité dans le plasma et dont l'albumine régule la diffusion. Par contre, une trop forte affinité et une diffusion trop lente peut stopper ou restreindre considérablement l'action d'un médicament. Ainsi, pour déterminer leur pharmacocinétique, il est important de connaître l'affinité pour l'albumine des composés à but thérapeutique.

Malgré quelques divergences, les différentes études d'interactions ligand-albumine indiquent l'existence de 8 à 11 sites de fixation prédominants :

-2 sites de forte affinité pour les composés aromatiques et hétérocycles localisés dans les sous-domaines IIA et IIIA. Le sous-domaine IIIA est séparé du sous-domaine IIA par une surface chargée positivement qui lui permet de lier de petits acides aromatiques sous forme d'anions carboxylates.

-1 site de liaison des ions métalliques au niveau de l'extrémité N terminal et de Cys-34

-7 sites à affinité pour les acides gras à moyennes et longues chaînes saturées et insaturées. Ces derniers sont distribués sur les différents domaines [161-162]. Par exemple, les complexes des acides gras insaturés C20:4 ont été cristallisés et les sites identifiés (figure 31).

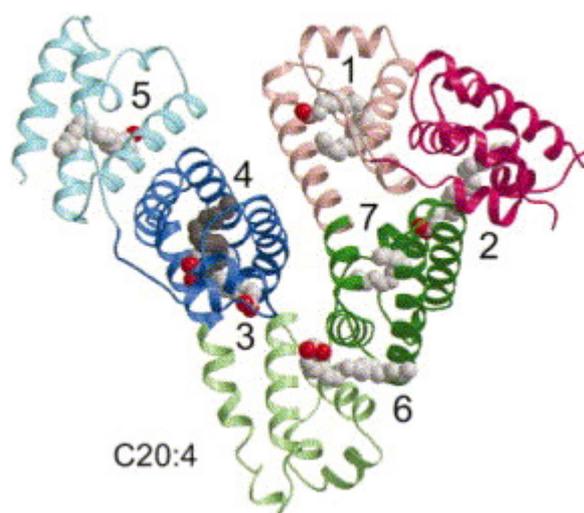


Figure 31 : sites de complexation entre l'albumine et l'acide gras arachidonique C20 : 4

5.5) Interaction apo-lycopénoïdes/albumine

A ce jour, les apo-lycopénoïdes n'ont jamais été détectés dans le plasma humain. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette constatation :

- Ils ne seraient pas formés chez l'homme ou, bien que présents dans les aliments, ne seraient pas absorbés depuis le tractus digestif.
- Ils ne seraient pas sécrétés dans la circulation générale.
- Ils circuleraient en trop faibles concentrations pour être détectés en l'absence de composés de référence authentique. C'est justement une des raisons de la synthèse des apo-11-14'-12'-10'-lycopénoïdes que de pallier cette carence.

Etudier l'affinité des apo-lycopénoïdes avec l'albumine doit permettre de calculer une constante d'affinité dont la valeur nous indiquera si la complexation apo-lycopénoïdes/albumine est envisageable dans la circulation sanguine. Les molécules étudiées pour leur affinité avec l'albumine sont l'apo-14'-lycopénal et acide apo-14'-lycopénoïque ainsi que des produits d'oxydation ayant une chaîne carbonée plus longue, les apo-10'-lycopénal et acide apo-10'-lycopénoïque (figure 32). Ces molécules ont une structure assez proche de celles des acides gras saturés et insaturés : une longue chaîne hydrocarbonée essentiellement linéaire et un groupement polaire oxygéné terminal, voire un groupement carboxylate comme dans le cas des acides gras. L'albumine présente une forte capacité de complexation des acides gras [161-162], notamment à proximité de Trp-214. Un phénomène du même type pourrait avoir lieu avec les apo-lycopénoïdes.

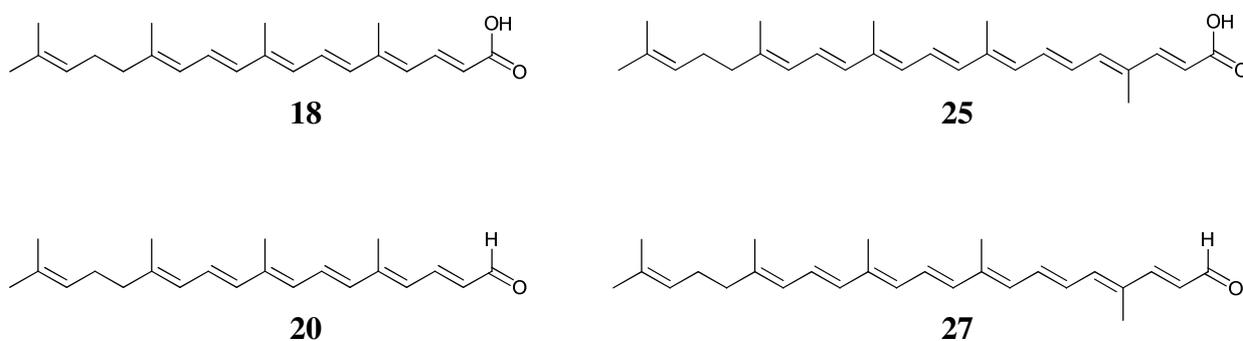


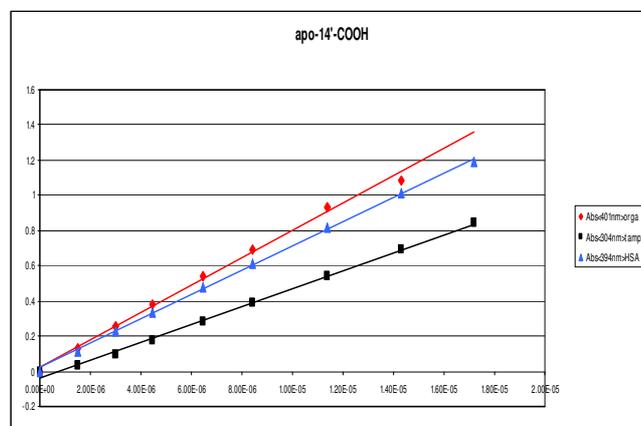
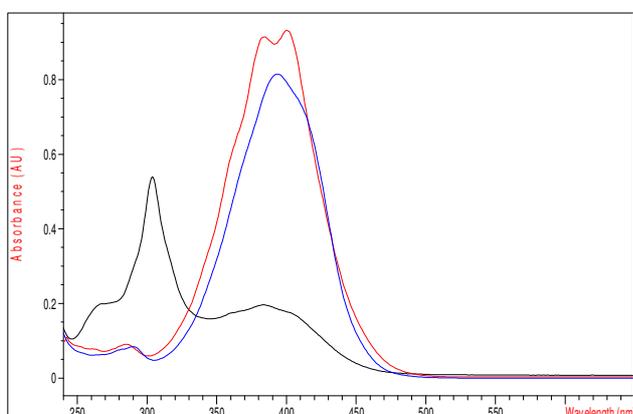
Figure 32 : apo-lycopénoïdes étudiés pour leur affinité avec l'albumine du sérum humain

Des mesures spectrophotométriques UV-Vis en présence et en l'absence d'albumine du serum humain ainsi que la mesure de la décroissance de la fluorescence du tryptophane par fluorimétrie permettront de définir l'interaction apo-lycopénoïdes/albumine.

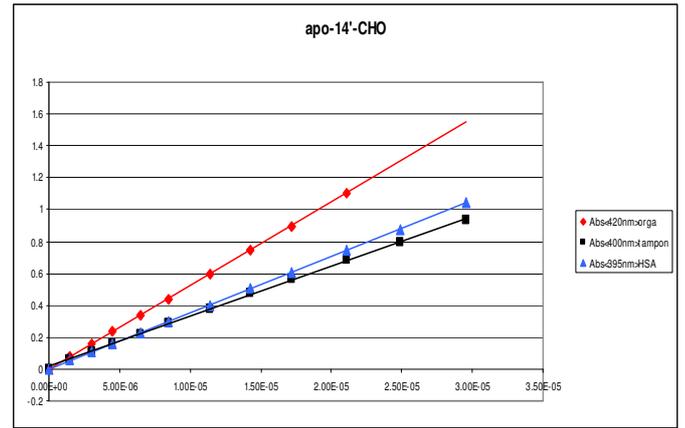
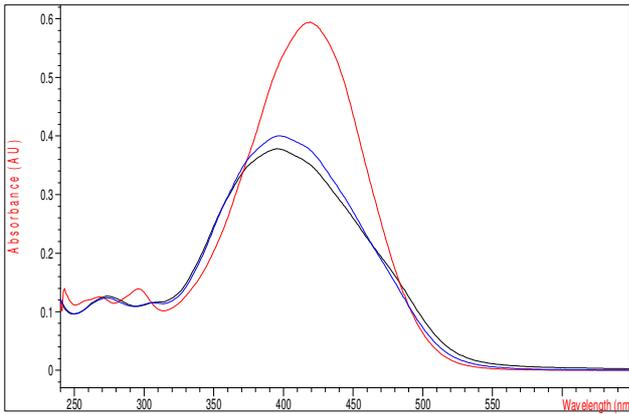
5.5.1) Analyse par spectroscopie UV-Vis.

Les spectres UV-visible (figure 33) des molécules **18**, **20**, **25** et **27** ont été enregistrés dans le mélange DMSO/MeOH (9/1 ; v/v) et dans un tampon phosphate en absence ou en présence de sérum albumine. Pour les quatre apo-lycopénoïdes, on constate des différences importantes entre les spectres en milieu organique et en tampon phosphate. Pour **18**, **25** et **27**, la bande d'absorption dans le domaine visible disparaît en milieu aqueux au profit d'une bande dans le domaine UV. Malgré l'apparence transparente et homogène du milieu, ce phénomène pourrait traduire la formation d'agrégats ou de micelles (pour les acides carboxyliques **18** et **25**) en milieu aqueux. Lorsque la protéine est présente dans le milieu, la bande d'absorption dans le domaine visible des deux acides est de nouveau présente mais décalée et moins intense. On peut admettre que la complexation de **18** et **25** par l'albumine entraîne une dissociation des agrégats. Cette dissociation ne serait que partielle pour l'acide à longue chaîne **25** d'où la restauration partielle du spectre de la molécule individuelle. Pour les aldéhydes **20** et **27**, l'influence de la ASH est beaucoup moins nette en accord avec la forte tendance à l'auto-association dans l'eau de ces molécules peu polaires. Le tableau 9 rapporte les valeurs des coefficients d'absorption molaires à la longueur d'onde d'absorption maximale.

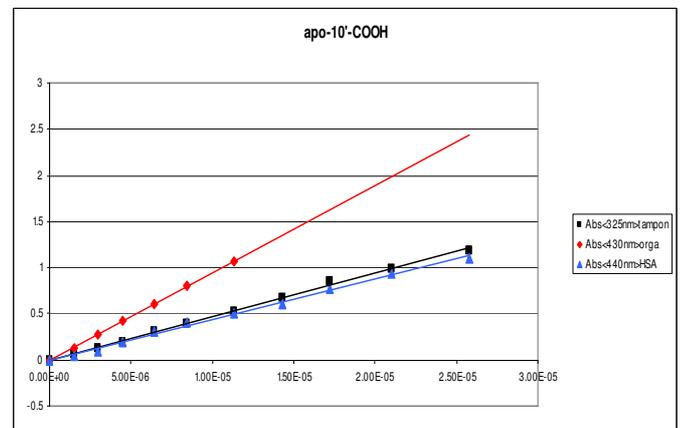
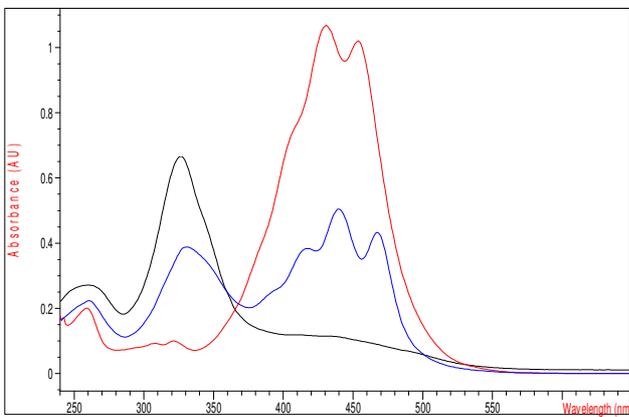
- Acide apo-14'-lycopénoïque **18**



- Apo-14'-lycopénil 20



- Acide apo-10'-lycopénoïque 25



- Apo-10'-lycopénil 27

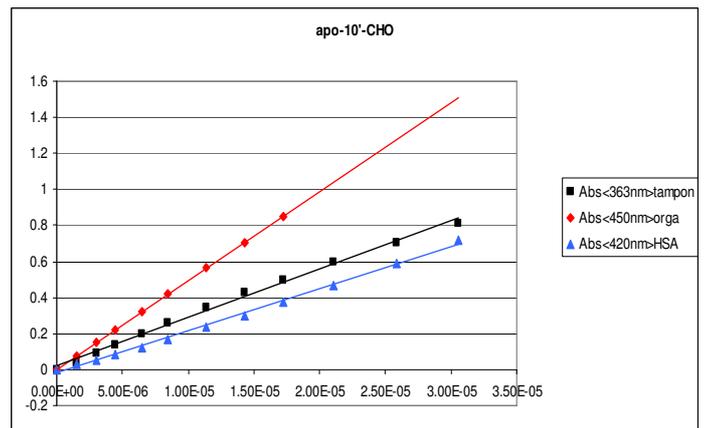
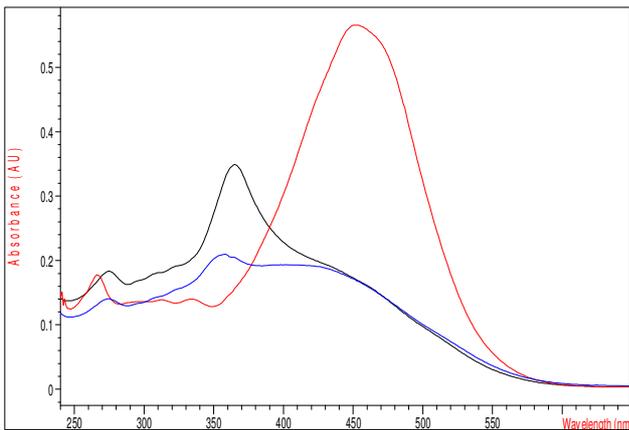


Figure 33 : à gauche : spectres UV-Vis des molécules 18, 20, 27, 25 à 11,5 μM ; à droite : graphique représentant $A = f([\text{composé}])$ à λ_{max} . (rouge : DMSO/MeOH, 9/1 (v/v) ; bleu : solution à 3,75 μM d'albumine de sérum humain dans tampon phosphate ; noir : tampon phosphate).

	Acide apo-14'-lycopénoïque 18	Apo-14'-lycopénoïde 20	Acide apo-10'-lycopénoïque 25	Apo-10'-lycopénoïde 27
DMSO/MeOH (1/9, v/v)	77610 (401)	52390 (420)	94530 (430)	49230 (450)
Tampon phosphate + ASH	69090 (394)	35210 (395)	44080 (440)	23420 (420)
Tampon phosphate	50590 (304)	31540 (400)	47390 (325)	26930 (363)

(λ_{\max} considéré en nm)

Tableau 9 : effet de milieu sur les coefficients d'absorption molaires de **18**, **20**, **25** et **27**

5.5.2) Analyse par spectroscopie de fluorescence

Nous avons étudié l'affinité des quatre apo-lycopénoïdes **18**, **20**, **25** et **27** pour l'albumine du sérum humain via leur quenching de la fluorescence de Trp-214. L'étude par spectroscopie UV-visible suggère que ce quenching est statique et procède par la formation de complexes dans l'état fondamental de la protéine. Le quenching peut être direct par liaison à proximité de Trp, ou indirect par liaison dans un site voisin suivie d'un changement conformationnel de la protéine affectant la fluorescence de Trp.

-Description de l'expérience

Des ajouts dosés d'une solution concentrée d'apo-lycopénoïde dans le méthanol (faible dilution) sont réalisés dans une solution d'albumine en tampon phosphate neutre. Les spectres d'émission sont enregistrés avec une excitation à 295 nm du seul résidu tryptophane (Trp-214) de l'albumine de sérum humaine. La valeur moyenne de l'intensité émise à 340 nm est tracée en fonction de la concentration totale de ligand dans la cuve (figure 34).

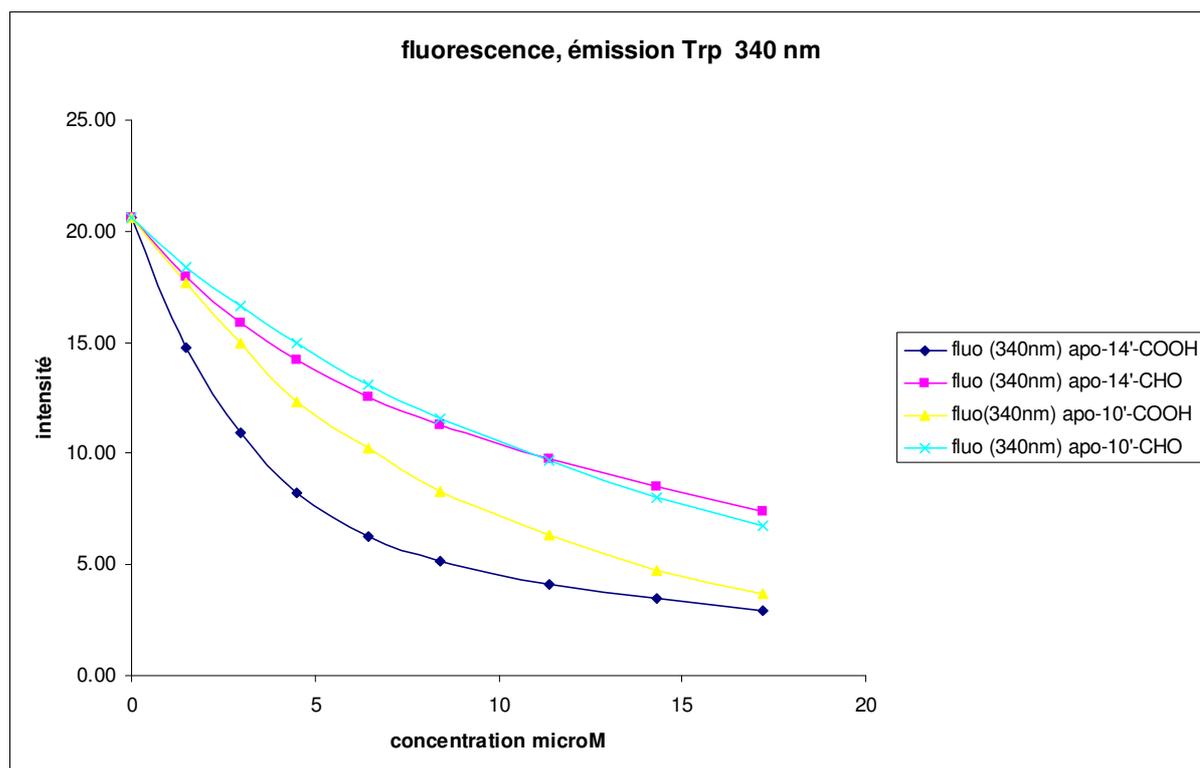


Figure 34 : intensité de fluorescence de Trp-214 à 340 nm pour différentes concentrations d'apo-lycopénoïdes (apo-14' et 10'-lycopénals ; acides apo-14' et 10'-lycopénoïques).

Pour le calcul des constantes d'affinité, une analyse mathématique a été développée qui est analogue à celle déjà publiée par l'équipe à propos de métabolites de polyphénols alimentaires (glucuronides d'acides hydroxycinnamiques) [163].

En bref :

1-On fait l'hypothèse de la formation d'un complexe de stoechiométrie 1:1 (constante d'affinité K), non fluorescent ou faiblement fluorescent (fluorescence molaire f).

2-On corrige l'intensité brute émise pour prendre en compte l'absorption du ligand aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ce phénomène produit en effet un quenching de fluorescence indépendant du phénomène de complexation. Soit ϵ_{ex} et ϵ_{em} les coefficients d'absorption molaires du ligand à ces longueurs d'onde (préalablement déterminés dans les

mêmes conditions à partir des spectres UV-visible du ligand à différentes concentrations), la correction est $\exp[-(\epsilon_{\text{ex}} + \epsilon_{\text{em}})lC]$, C désignant la concentration totale de ligand et l le trajet optique moyen parcouru par la lumière incidente jusqu'au site de détection de la lumière émise.

- Une analyse mathématique (régression non linéaire, annexe 9) des courbes expérimentales permet la détermination des valeurs optimales de K et f . Les très bons coefficients de corrélation obtenus (typiquement de l'ordre de 0,999) confirment la validité du modèle. L'analyse est répétée trois fois pour chaque ligand. Les valeurs de K sont rapportées dans le tableau 10 ci-dessous :

Ligand	$10^{-3} K (\text{M}^{-1}), n = 3$
Acide apo-14'-lycopénoïque 18	962 (± 82)
Apo-14'-lycopénal 20	99 (± 13)
Acide apo-10'-lycopénoïque 25	176 (± 28)
Apo-10'-lycopénal 27	77 (± 2)

Tableau 10 : constantes d'affinité des apo-lycopénoïdes pour l'albumine du sérum humain.

La constante d'affinité de l'acide apo-14'-lycopénoïque **18** pour l'albumine est 5-6 fois supérieure à celle de l'acide apo-10'-lycopénoïque **25**. Par contre, les constantes d'affinité des deux aldéhydes **20** et **27** pour l'albumine sont voisines mais nettement plus faibles.

Ces premiers résultats appellent les commentaires suivants :

- Les acides carboxyliques ont une plus grande affinité pour la protéine que les aldéhydes. A pH 7,4, il est probable que le groupement CO_2H est déprotoné en anion carboxylate, ce dernier pouvant former une liaison ionique forte avec un ou plusieurs résidus chargés positivement (ex.: Arg, Lys) du site de liaison.

- La chaîne hydrocarbonée influence aussi l'affinité pour la protéine via des interactions de van der Waals avec les résidus peu polaires du site de liaison. La longue chaîne de l'acide apo-10'-lycopénoïque induit probablement des phénomènes de répulsion stérique difficiles à minimiser (compte tenu de la rigidité de la chaîne polyconjuguée) et qui rendent le complexe moins stable que celui formé avec l'acide apo-14'-lycopénoïque plus court. Avec les aldéhydes, le phénomène est moins net, probablement en raison de l'absence de liaison ionique qui permet des ajustements structuraux propres à réduire la gêne stérique. En outre, la

liaison des apo-lycopénoïdes à la ASH est probablement en compétition avec leur agrégation, ce qui peut également expliquer pourquoi l'affinité pour la ASH décroît quand la longueur de chaîne augmente et quand on remplace le groupement CO₂H par le groupement CHO.

5.6) Conclusions/Perspectives.

Les premiers résultats sont intéressants et suggèrent que la liaison des apo-lycopénoïdes à l'albumine serait assez forte pour induire une complexation quasi-totale de ces composés (compte tenu de la forte concentration plasmatique d'albumine) s'ils entrent dans la circulation générale. Des études complémentaires mettant en compétition les apo-lycopénoïdes et divers acides gras ou marqueurs de site fluorescents permettraient de préciser la localisation des apo-lycopénoïdes au sein de la matrice d'albumine. Une compétition entre acides gras et apo-lycopénoïdes pourrait significativement réduire la complexation des apo-lycopénoïdes par l'albumine *in vivo* compte tenu de la très forte affinité des acides gras pour cette protéine.

Chapitre 6

Conclusion générale

VI) Conclusion générale

L'étude bibliographique menée dans la première partie nous a montré que les caroténoïdes sont des molécules possédant des structures chimiques particulières qui leur confèrent de multiples propriétés pouvant trouver des applications dans l'industrie agro-alimentaire. Le lycopène pigment rouge la tomate, présente des effets bénéfiques sur la santé, des études ont montré que le lycopène préviendrait du cancer de la prostate et des maladies cardiovasculaires.

Dans une deuxième partie nous avons défini les différentes voies de productions des produits d'oxydation de caroténoïdes appelés aussi produits de coupure oxydante ou apo-caroténoïdes. Ces molécules jouent un rôle important aussi bien chez la plante (rôle photo-protecteur, allélopathique) que chez l'homme (signalisation cellulaire). Dans le cadre de ma thèse, quatre familles de molécule les apo-11, -14', -12' et -10'-lycopénoïdes "potentiel métabolites" et fragments de la molécule de lycopène ont été ciblées pour la synthèse organique puis pour les études physico chimiques et biologiques (via les collaborations au sein du projet).

La structure chimique des molécules a été obtenue via la création de nouvelles doubles liaisons entre deux synthons précurseurs au travers des réactions de couplage carbone-carbone de *Wittig* et *Horner-Wadsworth-Emmons*. Les fonctions chimiques terminales souhaitées (COOH, CH₂OH, CHO) ont été obtenues respectivement par saponification de l'ester correspondant, réduction de la fonction ester ou oxydation de la fonction alcool. La structure de chacune des molécules synthétisées a été confirmée par des analyses RMN et SMHR. Les composés ciblés ont été obtenus en quantité suffisante pour diverses études physico-chimiques.

Dans une quatrième partie des études de pouvoir antioxydant dans un modèle biomimétique ont été effectuées. Les composés synthétisés ont été testés en tant qu'inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine. Via les valeurs du IC₅₀ calculées, lesquelles reflètent la capacité antioxydante, nous avons pu montrer que les composés portant une fonction aldéhyde terminale ont une capacité antioxydante croissante

avec le nombre de doubles liaisons conjuguées ; et pour une même longueur de chaîne la capacité antioxydante décroît pour les fonctions $\text{COOH} > \text{CHO} > \text{COOEt(Me)} > \text{CH}_2\text{OH}$.

Enfin dans une cinquième partie, les études d'interaction des composés **18**, **20**, **25**, **27** avec l'albumine de sérum humain montrent un quenching statique donc une complexation entre les apo-lycopénoïdes et la protéine.

Concernant la synthèse organique, toutes les molécules ciblées ont été obtenues et pleinement caractérisées excepté l'acide apo-12'-lycopénoïque sur lequel un effort de synthèse devra être effectué. Compte tenu des résultats physico-chimiques encourageants, des expérimentations complémentaires sont envisagées. Concernant les propriétés antioxydantes il faudra établir une relation activité/structure plus précise. Au niveau des interactions avec l'albumine il serait nécessaire d'effectuer des tests de compétition de complexation entre des acides gras et les apo-lycopénoïdes afin de déterminer de nouvelles constantes d'associations lesquelles mimeraient de façon plus réaliste ce qui pourrait se produire dans notre organisme.

Outre les propriétés physico-chimiques, les molécules synthétisées pendant ma thèse seront testées par plusieurs partenaires du projet Lycocard pour leur activité de signalisation cellulaire en milieu modèle.

Chapitre 7

Partie expérimentale

VII) Partie expérimentale

7.1) Matériel et méthodes général

7.1.1) Produits chimiques

Le vinylpseudoionol **1** et la pseudoionone **5** ont été fournis par la société BASF, le tout-(*E*)-2,7-diméthyl-octa-2,4,6-triène-dial **3** a été donné par la société DSM Nutritional Product. Les dioxyde de manganèse, le tartrate de potassium sodium, le tert-butoxide de potassium, le méthylate de sodium, l'éthylate de sodium, le formate d'ammonium, la triphénylphosphine, le sodium, le tamis moléculaire 3 Å, et l'éthyl-3-méthyl-4-oxocrotonate **11**, le tween 20, l'acide linoléique, l'albumine de sérum humain ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'acide méthane sulfonique, le triéthyl phosphonoacétate **6**, la benzophénone et le 2,2-diméthylpropan-1,3-diol proviennent de Alfa Aesar. Les oxydes d'argent, le carbonate d'argent, le trioxyde de chrome proviennent de Across. Le DIBA-H a été acheté chez Across et Sigma-Aldrich. Tous les produits ont été achetés avec une pureté comprise entre 95 et 99% et ont été utilisés sans purification complémentaire. Le gel de silice (Si 60, 40-63 µm) a été obtenu chez Merck. Tous les solvants sont de qualité analytique. Le THF utilisé pour les réactions chimiques est fraîchement distillé sur Na-benzophénone. L'acétate d'éthyle, acide acétique, le dichlorométhane et le toluène sont séchés sur tamis moléculaire 3 Å (préalablement séché à 150°C pendant 4 heures). Toutes les réactions sont menées dans un laboratoire ayant une lumière atténuée et sous atmosphère d'argon.

7.1.2) Analyses

Les analyses CLHP-SM sont effectuées sur un chromatographe Hewlett Packard 1100 couplé à avec un détecteur spectrophotométrique UV/visible et à un spectromètre de masse Micromass platform LCZ 4000. Les analyses de masse sont menées en mode d'ionisation *electrospray* positif avec un voltage du capillaire voltage à 15 V et une température de désolvatation de 250°C. Les conditions analytiques de la méthode 1 sont : une colonne YMC C30 (150 x 2.1 mm, avec une précolonne de 10 x 2 mm) maintenue à une température constante de 40°C. Le gradient utilisé pour cette méthode comprend en voie A (formate d'ammonium 25 mM dans l'eau + acide formique 2,6 mM dans l'eau), B (formate d'ammonium 25 mM dans le méthanol) et D (éther de méthyl-*t*-butyle), avec 60% B, 40% A à t = 0, 40% A, 60% B à t = 1.25 min ; 30% A, 70% B à t = 2.50 min ; 25% A, 70% B, 5% D

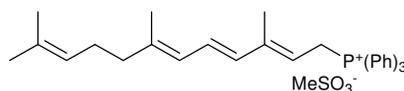
à $t = 3.75$ min ; 20% A, 70% B, 10% D à $t = 5$ min ; 5% A, 10% B, 85% D à $t = 15$ min ; 5% A, 10% B, 85% D à $t = 25$ min (débit = 0.5 mL/min). Pour l'analyse du phosphonium, composé **2**, les conditions utilisées sont [12] : une colonne chromatographique Macherey-Nagel C18 (250 x 4.6 mm, avec une précolonne 10 x 4.6 mm) à une température constante de 50°C. Un système de solvants CH₃CN/H₂O (13/7, v/v) contenant (n-Bu)₄NHSO₄ (0.4 %) et du sulfate de dodécyl sodium (0.2 %) a été utilisé en mode isocratique (1 mL/min). Les analyses chromatographiques sur couche mince ont été effectuées sur les plaques de silice (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄) avec une détection UV à 254 ou 365 nm. Les composés volatils ont été analysés par CG-SM (CP2010; Shimadzu, Kyoto) : les échantillons (1 µL) sont injectés sur une colonne capillaire UBWAX 52 CB (30 m, 0.25 mm d.i, 0.5 µm épaisseur). L'injection a été effectuée en mode split avec un ratio (R = 1/10). La vitesse du gaz vecteur (He) est constante à (60 cm s⁻¹). La température initiale du four était de 60°C et a été augmentée de 5°C par min jusqu'à 230°C. La température finale est maintenue pendant 15 min. Le spectromètre de masse a opéré en mode impact électronique à 70 eV avec des scans continus (chaque 0.5 s) dans un domaine d'analyse m/z compris entre 29 - 350. Les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C ont été enregistrés sur un appareillage Bruker Advance DRX 500 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm calibrés relativement au pic du solvant (CDCl₃) [164]. Concernant la multiplicité les abréviations utilisées sont s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet. Les constantes de couplage ¹H-¹H sont données en Hz. Les signaux ont été déduits par la combinaison des données spectrales des H, HSQC, DEPTQ 135, NOESY, COSY et HMBC. Les analyses de masse haute résolution (excepté **19***) ont été effectuées sur une QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) en mode d'ionisation électrospray et détection TOF. ***19** a été analysé par la société Bruker, sur ultraflex extreme TOF/TOF, en mode d'ionisation NALDITM.

7.2) Méthode de synthèse organique du lycopène et des apo-lycopénoïdes

Toutes les molécules cibles apo-lycopénoïdes ont été obtenues avec une pureté minimale de 98 % déterminée par CLHP-UV/Vis.

7.2.1) Tout-(E)-2,6,10,14,19,23,27,31-octaméthyltridécatriène-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridécaène (lycopène) **4**

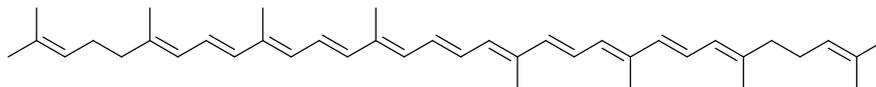
Mésylate de triphényl-tout-(E)-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraèneylphosphonium **2**.



Dans un ballon sont introduits la triphénylphosphine (2,13 g, 8,1 mmol), l'acide acétique (10 mL) et l'acide méthanesulfonique (0,4 mL, 6,3 mmol). Puis le vinylpseudoionol **1** (1 mL, 6,3 mmol) est lentement additionné en 1 h dans le milieu réactionnel maintenu à 10°C, à la fin de l'ajout le milieu est agité 1 h de plus à cette température. Ensuite la température est augmentée et maintenue à 45°C pendant 20 h. En fin de réaction l'acide acétique est éliminé sous pression réduite puis les dernières traces d'acide acétique sont éliminées par distillation azéotropique en présence de toluène (3x10 mL). Le résidu est dissous dans du CH₂Cl₂ et lavé par de l'eau distillée (3x10 mL). La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant CH₂Cl₂/MeOH (9/1, v/v)). Le composé (**2**), mélange diastéréoisomérique, est obtenu sous forme d'une huile visqueuse jaune pâle (2,50 g, rendement 71%, (E)/(Z) = 4). Ce dernier est utilisé sans purification complémentaire pour les réactions de couplage.

CLHP-UV-SM : t_R 21.8 min ; λ_{max} 294 nm ; m/z 466 ([M – MeSO₃]⁺).

**Tout-(E)-2,6,10,14,19,23,27,31-octaméthyltriaconta-
2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridécaène (lycopène) 4**



Le composé **3** (400 mg, 2,41 mmol) et le phosphonium **2** (mélange diastéréoisomérique, 2,7 g, 4,8 mmol) sont dissous dans 20 mL de CH₂Cl₂. Une solution de EtONa dans le EtOH (21% wt, 2,4 mL, 6,4 mmol) est lentement additionnée en 2 h dans le milieu réactionnel maintenu à 0°C, puis agité pendant 20 h à température ambiante. Après évaporation du solvant le résidu est purifié sur colonne chromatographique de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH (8/2, v/v)), puis cristallisé dans le CH₂Cl₂/hexane/méthanol. Le composé **4** est obtenu sous forme de cristaux rouges (133 mg, rendement 10%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 1,62 (s, H₃C-C(17, 17')); 1,69 (s, H₃C(16, 16')); 1,82 (s, H₃C-C(18, 18')); 1,96 (s, H₃C-C(19, 19', 20, 20')); 2,12 (m, H₂C(3, 3', 4, 4')); 5,11 (m, H-C(2, 2')); 5,96 (d, J = 10,9 H-C(6, 6')); 6,18 (d, J = 11,3, H-C(10, 10')); 6,25 (m, H-C(14, 14')); 6,26 (m, H-C(8, 8')); 6,35 (d, J = 14,9, H-C(12, 12')); 6,48 (dd, J = 11,3, 14,9, H-C(7, 7')); 6,62 (m, H-C(15, 15')); 6,63 (m, H-C(11, 11')).

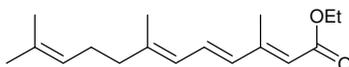
RMN-¹³C (CDCl₃) : 12,9 (C(20, 20')); 13,1 (C(19, 19')); 17,1 (C(18, 18')); 17,9 (C(17, 17')); 25,9 (C(16, 16')); 26,9 (C(3, 3')); 40,4 (C(4, 4')); 124,1 (C(2, 2)); 124,9 (C(7, 7')); 125,3 (C(11, 11')); 125,9 (C(6, 6')); 130,2 (C(15, 15')); 131,7 (C(10, 10')); 131,9 (C(1, 1')); 132,8 (C(14, 14')); 135,6 (C(8, 8')); 136,3 (C(9, 9')); 136,7 (C(13, 13')); 137,5 (C(12, 12')); 139,6 (C(5, 5')).

SMHR : *m/z* 536,4349 ([M]⁺) (536, 4377 calculé pour C₄₀H₅₆).

CLHP-UV-SM : *t_R* 17,9 min, λ_{max} 444, 472, 503 nm; *m/z* 537 ([M+H]⁺).

7.2.2) Famille des tout-(E)-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraénoïdes
(apo-11-lycopénoïdes)

2E et 2Z,4E,6E-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraénoate d'éthyle (apo-11-lycopénoate d'éthyle) 7.



Le triéthyl phosphonoacétate commercial **6** (10 mL, 49 mmol) est ajouté en 1 h dans le milieu hétérogène maintenu à 0°C contenant le THF anhydre (30 mL) et le NaH (1,96 mg, 48 mmol) préalablement lavé par 3x20 mL d'hexane. Lorsque le dégagement gazeux cesse la pseudoionone **5** (2,2 mL, 9,8 mmol) est ajoutée à température ambiante en 1 h dans le milieu réactionnel. Après 30 h la réaction est stoppée par ajout d'une solution aqueuse de NH₄Cl (10%, 25 mL). Après décantation, la phase organique est lavée par 3x10 mL d'une solution de saumure puis les phases aqueuses réunies sont lavées par 2x10 mL de diéthyléther. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄ anhydre puis le solvant est évaporé. Le résidu est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant : hexane/AcOEt (98/2, v/v)). Le composé **7** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (2,1 g, rendement 82 %, *E/Z* = 3,5).

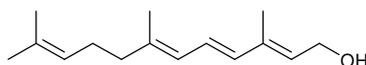
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,29 (t, J=7,1, H₃C-C(ethyl)); 1,61 (s, H₃C-C(11)); 1,69 (s, H₃C(12)); 1,85 (s, H₃C-C(7)); 2,13 (m, H₂C(8, 9)); 2,32 (s, H₃C-C(3)); 4,16 (q, J = 7,1, H₂C-C(ethyl)); 5,09 (m, H-C(10)); 5,62 (s, H-C(2Z)); 5,74 (s, H-C(2E)); 5,96 (d, J = 11,1, H-C(6)); 6,18 (d, J = 15,3, H-C(4)); 6,84 (dd, J = 11,1, 15,3, H-C(3)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 14,1 (H₃C-C(3)); 14,9 (H₃C(ethyl)); 17,4 (H₃C-C(7)); 18,2 (H₃C-C(11)); 26,4 (C(12)); 27,0 (C(9)); 40,8 (C(8)); 59,9 (H₂C(ethyl)); 116,5 (C(2Z)); 118,4 (C(2E)); 123,9 (C(10)); 125,2 (C(6)); 131,5 (C(5)); 132,2 (C(11)); 133,6 (C(4)); 144,1 (C(7)); 153,2 (C(3)); 167,3 (C(1)).

SMHR : *m/z* 263,2003 ([M+H]⁺) (263,2005 calculé pour C₁₇H₂₇O₂).

CLHP-UV-SM : *t_{R(2Z)}* 9,76 min, *t_{R(2E)}* 10,40 min; λ_{max} 318 nm; *m/z* 263,2 ([M+H]⁺).

GC-SM : *t_{R(2Z)}* 34,3 min, *t_{R(2E)}* 34,9 min, *m/z* 262 (M⁺).

Tout-(E)-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraèneol (apo-11-lycopéno)l 8.

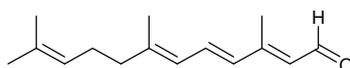
Le composé **7** (210 mg, 0,75 mmol) est dissous dans du THF anhydre (5 mL). Une solution de DIBA-H dans l'hexane (1M, 1,9 mL, 1,9 mmol) est précautionneusement ajoutée dans le milieu réactionnel maintenu à 0°C en 1 h puis agité pendant 3 h à température ambiante. La réaction est ensuite stoppée par ajout lent d'une solution saturée de NH₄Cl (10 mL) puis vigoureusement agitée pour dissoudre le gel formé. Le produit est ensuite extrait avec du diéthyléther (3x10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le résidu est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant hexane/AcOEt (80/20, v/v)). Le composé **8** est obtenu sous forme d'un solide blanc (27 mg, rendement 16%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 1,61 (s, H₃C-C(11)); 1,69 (s, H₃C(12)); 1,79 (s, H₃C-C(3)); 1,83 (s, H₃C-C(7)); 2,11 (m, H₂C(8, 9)); 4,27 (d, J = 7, H₂C(1)); 5,10 (m, H-C(10)); 5,63 (t, J = 7, H-C(2)); 5,9 (d, J = 10,8, H-C(6)); 6,17 (d, J = 15,3, H-C(4)); 6,46 (dd, J = 10,8, 15,3, H-C(5)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 12,6 (H₃C-C(3)); 16,8 (H₃C-C(7)); 17,6 (H₃C-C(11)); 25,6 (C(12)); 26,6 (C(9)); 40,1 (C(8)); 59,4 (C(1)); 123,9 (C(10)); 125,0 (C(5)); 125,2 (C(6)); 129,0 (C(2)); 131,7 (C(11)); 134,3 (C(4)); 136,9 (C(3)); 139,6 (C(7)).

SMHR : *m/z* 243,1717 ([M+Na]⁺) (243,1719 calculé pour C₁₅H₂₄ONa).

CLHP-UV-SM : *t_R* 7,79 min, *λ_{max}* 279 nm; *m/z* 203,1 ([M+H-18]⁺).

Tout-(E)-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraèneal (apo-11-lycopéno)l 9.

MnO₂ (14 g, 140 mmol) est ajouté dans une solution du composé **8** sous forme de mélange diastéréoisomérique (1,37 g, 6,2 mmol) dans AcOEt (25 mL). Le mélange hétérogène est vigoureusement agité pendant 3 h. La réaction est stoppée par filtration sur célite[®], puis le filtrat est séché sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant hexane/AcOEt (9/1, v/v)). Le composé (**9**) est obtenu sous forme d'un liquide jaune pâle (400 mg, rendement 30%).

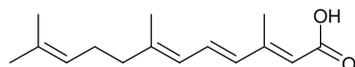
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,61 (s, H₃C-C(11)); 1,69 (s, H₃C(12)); 1,87 (s, H₃C-C(7)); 2,14 (m, H₂C(8, 9)); 2,30 (s, H₃C-C(3)); 5,09 (m, H-C(10)); 5,95 (d, J = 8, H-C(2)); 6,01 (d, J = 11,1, H-C(6)); 6,26 (d, J = 15,3, H-C(4)); 6,99 (dd, J = 11,1, 15,3, H-C(5)); 10,10 (d, J = 8, H-C(1)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 13,7 (H₃C-C(3)); 17,7 (H₃C-C(7)); 18,3 (H₃C-C(11)); 26,2 (C(12)); 26,9 (C(9)); 40,7 (C(8)); 123,7 (C(10)); 125,2 (C(6)); 129,1 (C(2)); 132,4 (C(11)); 132,9 (C(5)); 133,3 (C(4)); 146,5 (C(7)); 155,3 (C(3)); 191,6 (C(1)).

SMHR : *m/z* 241,1563 ([M+Na]⁺) (241,1562 calculé pour C₁₅H₂₂ONa).

CLHP-UV-SM : t_R 7,90 min, λ_{max} 344 nm; *m/z* 219,0 ([M+H]⁺).

**Acide tout-(*E*)-3,7,11-triméthyl dodéca-2,4,6,10-tétraénoïque (acide apo-11-lycopénoïque)
10.**



Ag₂O (3,7 g, 26 mmol) et NaOH (230 mg, 5,3 mmol) dans l'éthanol (20 mL) sont ajoutés à une solution du composé **7** (230 mg, 1,1 mmol) dans du toluène (20 mL). Le mélange hétérogène est vigoureusement agité pendant 20 h. La réaction est stoppée par filtration sur célite[®], puis le filtrat est lavé par 3x10 mL d'une solution de HCl (10%, v/v). La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄ anhydre. Puis après évaporation du solvant le composé **10** est obtenu sous forme d'un solide amorphe jaunâtre (221 mg, rendement 90%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 1,61 (s, H₃C-C(11)); 1,69 (s, H₃C(12)); 1,85 (s, H₃C-C(7)); 2,13 (m, H₂C(8, 9)); 2,34 (s, H₃C-C(3)); 5,09 (m, H-C(10)); 5,77 (s, H-C(2)); 5,98 (d, J = 10,9, H-C(6)); 6,21 (d, J = 15,1, H-C(4)); 6,90 (dd, J = 10,9, 15,1, H-C(5)).

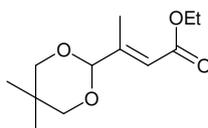
RMN-¹³C (CDCl₃) : 14,2 (H₃C-C(3)); 17,4 (H₃C-C(7)); 17,9 (H₃C-C(11)); 25,9 (C(12)); 26,6 (C(9)); 40,4 (C(8)); 117,1 (C(2)); 123,7 (C(10)); 125,0 (C(6)); 132,2 (C(5)); 132,2 (C(11)); 133,4 (C(4)); 145,0 (C(7)); 155,9 (C(3)); 172,0 (C(1)).

SMHR : *m/z* 257,1515 ([M+Na]⁺) (257,1512 calculé pour C₁₅H₂₂O₂Na).

CLHP-UV-SM : t_R = 5,83 min, λ_{max} 301 nm; *m/z* 235,3 ([M+H]⁺).

7.2.3) Famille des tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyl-octa-déca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïdes (apo-14'-lycopénoïdes)

(E)-3-(5,5-diméthyl-1,3-dioxan-2-yl)but-2-énoate d'éthyle **12**.



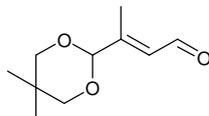
Une solution d'aldéhyde éthyl-3-méthyl-4-oxocrotonate commerciale **11** (1.4 mL, 10,3 mmol), de 2,2-diméthylpropanediol (5,3 g, 51 mmol) et d'APTS (210 mg, 1,1 mmol) dans le toluène (25 mL) est chauffée à reflux pendant 4 h dans un ballon surmonté d'un Dean-Stark. Après refroidissement une solution de saumure est ajoutée (20 mL) puis le produit est extrait par lavage de la phase aqueuse au diéthyléther (2x20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de saumure (3x20 mL), puis séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le résidu est purifié par colonne chromatographique de gel de silice (éluant CH₂Cl₂/MeOH (98/2, v/v)). Le composé **12** est obtenu sous forme d'une huile incolore (1,90 g, rendement 81%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 0,74 (s, H_{3a}C-C((5) dioxane)); 1,20 (s, H_{3c}C-C((5) dioxane)); 1,26 (t, J = 7,1, CH₃(ethyl)); 2,18 (d, J = 1,7, H₃C-C(3)); 3,50 (d, J = 10,7, H_{2e}C (dioxane)); 3,67 (d, J = 10,7, H_{2a}C (dioxane)); 4,16 (q, J = 7,1, H₂C(ethyl)); 4,73 (s, H-C (4)); 6,04 (s, H-C(2)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 14,0 (CH₃-C(3)); 14,2 (H₃C(ethyl)); 21,8 (CH_{3a}-C((5) dioxane)); 22,9 (CH_{3c}-C((5) dioxane)); 30,2 (C((5)dioxane)); 59,8 (H₂C(ethyl)); 77,3 (2 H₂C(dioxane)); 102,7 (C(4)); 118,1 (C(2)); 152,3 (C(3)); 166,5 (C(1)).

SMHR : *m/z* 229,1433 ([M+H]⁺) (229,1434 calculé pour C₁₂H₂₁O₄).

CG-SM : *t_R* 24,34 min; *m/z* 227 ([M-H]⁺).

(E)-3-(5,5-diméthyl-1,3-dioxan-2-yl)but-2-èneal 14.

Etape de réduction : Le composé **12** (1,82 g, 8 mmol) est dissous dans du THF anhydre (7 mL). Puis, une solution de DIBA-H dans le toluène (1M, 21 mL, 21 mmol) est précautionneusement ajoutée en 30 min dans le milieu réactionnel maintenu à 0°C. Le mélange est agité pendant 1h, puis une solution MeOH/eau (1/1, v/v, 10 mL) est lentement ajouté à 0°C pour stopper la réaction. Le gel formé est détruit par ajout d'une solution aqueuse de tartrate de potassium sodium (2 M, 60 mL) qui est vigoureusement agité pendant 10 h à température ambiante. Le produit est ensuite extrait avec du diéthyléther (3x10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant l'alcool brut **13** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (1,1 g, rendement 74 %) qui est ensuite oxydée sans étapes de purification complémentaire.

CG-SM : t_R 18,13 min; *m/z* 185 ([M-H]⁺).

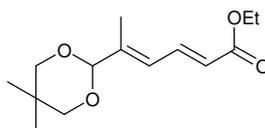
Etape d'oxydation : L'alcool allylique brut **13** (1,1 g, 5,9 mmol) est dissous dans AcOEt (25 mL). Après addition de MnO₂ (12,8 g, 125 mmol), le mélange hétérogène est vigoureusement agité pendant 45 min. La réaction est stoppée par filtration sur célite[®], puis le filtrat est séché sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant hexane/AcOEt (3/7, v/v)). Le composé **14** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (0,83 mg, rendement 76%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 0,76 (s, H_{3a}C-C((5) dioxane)); 1,21 (s, H_{3e}C-C((5) dioxane)); 2,20 (d, J = 1,7 H₃C-C(3)); 3,52 (d, J = 10,4, H_{2a}C(dioxane)); 3,69 (d, J = 10,4, H_{2e}C(dioxane)); 4,82 (s, H-C (4)); 6,17 (d, J = 7,9, H-C(2)); 10,09 (d, J = 7,9, H-C(1)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 12,6 (CH₃-C(3)); 21,8 (CH_{3a}-C((5)dioxane)); 22,9 (CH_{3e}-C((5)dioxane)); 30,3 (C((5)dioxane)); 77,3 (2 H₂C(dioxane)); 102,3 (C(4)); 127,6 (C(2)); 155,6 (C(3)); 191,6 (C(1)).

SMHR : *m/z* 207,0988 ([M+Na]⁺) (207,0991 calculé pour C₁₀H₁₆O₃Na).

CG-SM : t_R 19,98 min; *m/z* 184 (M⁺).

(2E,4E)-éthyl 5-(5,5-diméthyl-1,3-dioxan-2-yl)hex-2,4-dièneoate 15.

Le composé **14** (1,46 g, 7,9 mmol) et le triéthyl phosphonoacétate (1,7 mL, 8,6 mmol) sont dissous dans du THF anhydre (100 mL). Une solution de t-BuOK dans le THF (1M, 8,6 mL, 8,6 mmol) est ajoutée en 50 min puis le mélange est agité pendant 24 h température ambiante. La réaction est stoppée par ajout d'une solution saturée de NH₄Cl (20 mL). Le produit brut est ensuite extrait avec du diéthyléther (3x20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de saumure (3x20mL), puis séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le résidu est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant AcOEt/hexane (1/9, v/v)). Le composé **15** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (1,1 g, rendement 55%, (E)/(Z) = 33).

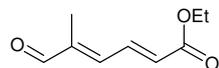
RMN-¹H (CDCl₃): 0,75 (s, H_{3a}C-C((5)dioxane)); 1,22 (s, H_{3e}C-C((5)dioxane)); 1,30 (t, J = 7,1, CH₃(ethyl)); 1,95 (d, J = 1,4, H₃C-C(5)); 3,50 (d, J = 10,5, H_{2e}C(dioxane)); 3,67 (d, J = 10,5, H_{2a}C(dioxane)); 4,21 (q, J = 7,1, H₂C(ethyl)); 4,78 (s, H-C(6)); 5,92 (d, J = 15,3, H-C(2)); 6,24 (d, J = 11,4, H-C(4)); 7,57 (dd, J = 11,4, 15,3, H-C(3)).

RMN-¹³C (CDCl₃): 13,0 (CH₃-C(5)); 14,5 (H₃C(ethyl)); 22,1 (CH_{3a}-C((5)dioxane)); 23,2 (CH_{3e}-C((5)dioxane)); 30,5 (C(5)dioxane); 60,6 (H₂C(ethyl)); 77,6 (2 H₂C(dioxane)); 103,7 (C(6)); 123,0 (C(2)); 125,4 (C(4)); 139,7 (C(3)); 143,5 (C(5)); 167,3 (C(1)).

SMHR : *m/z* 255,1587 [M+H]⁺ (255,1590 calculé pour C₁₄H₂₃O₄)

CLHP-UV-SM : *t_R* 4,63 min; *λ_{max}* 268 nm; *m/z* 255,1 ([M+H]⁺).

CG-SM : *t_R* 30,76 min, *m/z* 254 (M⁺).

(2E,4E)-éthyl 5-formylhex-2,4-dièneate 16.

Une quantité catalytique de HCl (12 M, 3 gouttes) est ajoutée dans une solution du composé **15** (1 g, 3,9 mmol) dans du MeOH/H₂O (100 mL, 1/1, v/v). La solution est agitée pendant 8 h à température ambiante, puis neutralisée par ajout d'une solution aqueuse de NaHCO₃ (10%, m/v). Le produit est extrait avec du diéthyléther (3x30 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de saumure (3x30mL), puis séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le résidu est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant AcOEt/hexane (2/8, v/v)). Le composé **16** est obtenu sous forme d'une huile jaune (300 mg, rendement 46%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 1,33 (t, J = 7,1, CH₃(ethyl)); 1,96 (d, J = 1,2, H₃C-C(5)); 4,26 (q, J = 7,1, H₂C(ethyl)); 6,27 (d, J = 15,2, H-C(2)); 6,92 (d, J = 11,8, H-C(4)); 7,69 (dd, J = 11,8, 15,2, H-C(3)); 9,55 (s, H-C (6)).

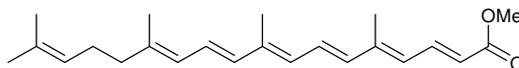
RMN-¹³C (CDCl₃) : 10,0 (CH₃-C(5)); 14,2 (H₃C(ethyl)); 61,0 (H₂C(ethyl)); 128,6 (C(2)); 137,5 (C(4)); 143,8 (C(3)); 143,9 (C(5)); 165,8 (C(1)); 194,4 (C(6)).

SMHR : *m/z* 169,0857 ([M+H]⁺) (169,0859 calculé pour C₉H₁₃O₃).

CLHP-UV-SM : *t_R* 1,85 min; λ_{\max} 283 nm; *m/z* 169,0 ([M+H]⁺).

CG-SM : *t_R* 19,35 min; *m/z* 168 (M⁺).

Tout-(E)-méthyl-5,9,13,17-tétraméthyl-octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoate (apo-14'-lycopénoate de méthyle) 17.



Le composé **16** (0,57 g, 3,4 mmol) et le phosphonium **2** (2,2 g, 4 mmol, mélange diastéréoisomérique) sont dissous dans du CH₂Cl₂ (5 mL). Une solution de MeONa dans le MeOH (0,5 M, 8 mL, 4 mmol) est lentement ajoutée dans le milieu réactionnel maintenu à 0°C en 30 min puis agité pendant 20 h température ambiante. La réaction est ensuite stoppée par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (5 mL). Le produit est extrait au CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau distillée (3x5 mL), puis séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant AcOEt/hexane (2/8, v/v)) puis cristallisé dans l'hexane à 0°C. Le composé **17** est obtenu sous forme d'une poudre orange (280 mg, rendement 24%).

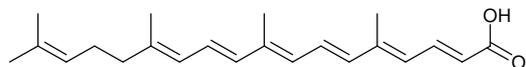
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,61 (s, H₃C-C(17)); 1,69 (s, H₃-C(18)); 1,83 (s, H₃C-C(13)); 1,99 (s, H₃C-C(9)); 2,06 (s, H₃C-C(5)); 2,12 (m, H₂-C(14, 15)); 3,76 (s, H₃C(methyl)); 5,11 (m, H-C(16)); 5,88 (d, J = 15,0, H-C(2)); 5,96 (d, J = 11,0, H-C(12)); 6,18 (d, J = 11,3, H-C(8)); 6,22 (d, J = 12,1, H-C(4)); 6,25 (d, J = 14,8, H-C(10)); 6,35 (d, J = 14,8, H-C(6)); 6,55 (dd, J = 11,3, 14,8, H-C(11)); 6,81 (dd, J = 11,3, 14,8, H-C(7)); 7,7 (dd, J = 12,1, 15, H-C(3)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 13,1 (H₃C-C(9)); 13,3 (H₃C-C(5)); 17,2 (H₃C-C(13)); 17,9 (H₃C-C(17)); 25,8 (C(18)); 26,8 (C(15)); 40,4 (C(14)); 51,6 (H₃C(methyl)); 119,9 (C(2)); 124,0 (C(16)); 125,7 (C(12)); 126,2 (C(11)); 128,7 (C(4)); 128,7 (C(7)); 130,9 (C(8)); 132,0 (C(17)); 135,2 (C(10)); 136,1 (C(6)); 138,7 (C(9)); 140,7 (C(13)); 140,8 (C(3)); 144,7 (C(5)); 168,0 (C(1)).

SMHR : *m/z* 341,2465 ([M+H]⁺) (341,2475 calculé pour C₂₃H₃₃O₂).

CLHP-UV-SM : *t_R* 12,71 min; λ_{max} 406 nm; *m/z* 341,4 ([M+H]⁺).

Acide tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyl-octadeca-2,4,6,8,10,12,16-heptaénoïque (acide apo-14'-lycopénoïque) 18.



Le composé **17** (250 mg, 0,74 mmol) est dissous dans une solution de NaOH (720 mg, 18 mmol) dans l'éthanol (20 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à 35°C. Puis la réaction est stoppée par ajout d'une solution HCl (10%, v/v) jusqu'à obtention d'un pH acide. Le produit est extrait avec du CH₂Cl₂ (3x10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié par cristallisation dans CH₂Cl₂/hexane à 0°C. Le composé **18** est obtenu sous forme d'une poudre orange (120 mg, rendement 49%).

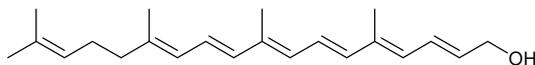
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,62 (s, H₃C-C(17)); 1,69 (s, H₃C(18)); 1,83 (s, H₃C-C(13)); 1,99 (s, H₃C-C(9)); 2,08 (s, H₃C-C(5)); 2,12 (m, H₂C(14, 15)); 5,11 (m, H-C(16)); 5,88 (d, J = 14,9, H-C(2)); 5,96 (d, J = 11,0, H-C(12)); 6,19 (d, J = 11,4, H-C(8)); 6,24 (d, J = 12,1, H-C(4)); 6,25 (d, J = 15,0, H-C(10)); 6,36 (d, J = 15,0, H-C(6)); 6,57 (dd, J = 11,0, 15, H-C(11)); 6,85 (dd, J = 11,4, 15, H-C(7)); 7,79 (dd, J = 12,1, 14,9, H-C(3)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 13,2 (H₃C-C(9)); 13,4 (H₃C-C(5)); 17,2 (H₃C-C(13)); 17,9 (H₃C-C(17)); 25,9 (C(18)); 26,8 (C(15)); 40,4 (C(14)); 119,3 (C(2)); 124 (C(16)); 125,8 (C(12)); 126,4 (C(11)); 128,5 (C(4)); 129,3 (C(7)); 130,8 (C(8)); 132,0 (C(17)); 135,1 (C(10)); 136,0 (C(6)); 139,1 (C(9)); 140,9 (C(13)); 142,8 (C(3)); 145,8 (C(5)); 172,8 (C(1)).

SMHR : *m/z* 327,2320 ([M+H]⁺) (327,2319 calculé pour C₂₂H₃₁O₂).

CLHP-UV-SM : *t_R* 10,22 min; λ_{max} 399 nm; *m/z* 327,3 ([M+H]⁺).

Tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyl-octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaène-1-ol (apo-14'-lycopénole) 19.



Le composé **17** (500 mg, 1,47 mmol) est dissous dans du THF anhydre (20 mL). Une solution de DIBA-H dans le toluène (1M, 3,5 mL, 3,5 mmol) est précautionneusement ajoutée dans le milieu réactionnel maintenu à 0°C en 1 h puis agité pendant 3 h à température ambiante. La réaction est ensuite stoppée par ajout lent d'une solution de MeOH/eau (5 mL, 1/1, v/v) à 0°C. Le gel formé est détruit par ajout d'une solution aqueuse de tartrate de potassium sodium (2 M, 20 mL) puis vigoureusement agité pendant 10 h. Le produit est ensuite extrait avec du diéthyléther (3x10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le résidu est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant hexane/AcOEt (1/1, v/v)), puis cristallisé dans CH₂Cl₂/hexane à 0°C. Le composé **19** est obtenu sous forme d'une poudre orange (163 mg, rendement 35%).

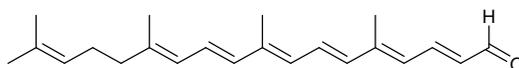
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,4 (t, J = 5,8, H-O); 1,61 (s, H₃C-C(17)); 1,69 (s, H₃C(18)); 1,82 (s, H₃C-C(13)); 1,94 (s, H₃C-C(5)); 1,95 (s, H₃C-C(9)); 2,12 (m, H₂C(14, 15)); 4,25 (t, J = 5,9, H₂-C(1)); 5,11 (m, H-C(16)); 5,89 (dt, J = 5,9, 14,9, H-C(2)); 5,95 (d, J = 11,0, H-C(12)); 6,12 (d, J = 11,4, H-C(4)); 6,16 (d, J = 11,4, H-C(8)); 6,24 (d, J = 15,0, H-C(10)); 6,31 (d, J = 14,9, H-C(6)); 6,49 (dd, J = 11,0, 15, H-C(11)); 6,63 (m, H-C(3, 7)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 12,8 (H₃C-C(5)); 13,0 (H₃C-C(9)); 17,1 (H₃C-C(13)); 17,8 (H₃C-C(17)); 25,8 (C(18)); 26,8 (C(15)); 40,4 (C(14)); 63,9 (C(1)); 124,1 (C(16)); 125,1 (C(11)); 125,7 (C(7)); 125,8 (C(12)); 128,4 (C(3)); 130,5 (C(8)); 131,1 (C(17)); 131,3 (C(4)); 132,4 (C(2)); 135,4 (C(10)); 136,4 (C(9)); 136,7 (C(5)); 137,1 (C(6)); 139,7 (C(13)).

SMHR* (NALDI-TOF) : *m/z* 312,2441 [M]⁺ (312,2448 calculé pour C₂₂H₃₂O).

CLHP-UV-SM : t_R 11,28 min; λ_{max} 348, 366, 387 nm; *m/z* 313,3 ([M+H]⁺); 295,2 ([M-H₂O+H]⁺).

Tout-(E)-5,9,13,17-tétraméthyl-octadéca-2,4,6,8,10,12,16-heptaèneal (apo-14'-lycopénel) **20.**



MnO₂ (175 mg, 1,7 mmol) est ajouté dans une solution du composé **19** (26 mg, 0,08 mmol) dans AcOEt (1 mL). Le mélange hétérogène est vigoureusement agité pendant 1 h. La réaction est stoppée par filtration sur célite[®], puis le filtrat est séché sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant hexane/AcOEt (2/8, v/v)). Le composé **20** est obtenu sous forme d'une poudre orange (11 mg, rendement 44%).

RMN-¹H (CDCl₃): 1,62 (s, H₃C-C(17)); 1,69 (s, H₃C(18)); 1,83 (s, H₃C-C(13)); 2 (s, H₃C-C(9)); 2,11 (s, H₃C-C(5)); 2,12 (m, H₂C(14, 15)); 5,11 (m, H-C(16)); 5,96 (d, J = 11,1, H-C(12)); 6,17 (dd, J = 7,9, 14,8, H-C(2)); 6,20 (d, J = 11,5, H-C(8)); 6,26 (d, J = 15,0, H-C(10)); 6,35 (d, J = 11,9, H-C(4)); 6,38 (d, J = 15,0, H-C(6)); 6,59 (dd, J = 11,1, 15, H-C(11)); 6,91 (dd, J = 11,5, 15, H-C(7)); 7,52 (dd, J = 11,8, 14,8, H-C(3)); 9,61 (d, J = 8,0, H-C(1)).

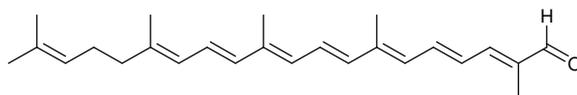
RMN-¹³C (CDCl₃) : 13,3 (H₃C-C(9)); 13,6 (H₃C-C(5)); 17,2 (H₃C-C(13)); 17,8 (H₃C-C(17)); 25,8 (C(18)); 26,8 (C(15)); 40,4 (C(14)); 124,0 (C(16)); 125,7 (C(12)); 126,8 (C(11)); 128,7 (C(4)); 130,1 (C(7)); 130,7 (C(8)); 130,9 (C(2)); 132 (C(17)); 135 (C(10)); 135,7 (C(6)); 139,8 (C(9)); 141,2 (C(13)); 146,8 (C(5)); 147,7 (C(3)); 193,7 (C(1)).

SMHR : *m/z* 311,2369 ([M+H]⁺) (311,2369 calculé pour C₂₂H₃₁O).

CLHP-UV-SM : t_R 13,61 min; λ_{max} 422 ; *m/z* 377,5 ([M+H]⁺).

7.2.4) Famille des tout-(*E*)-2,7,11,15,19-pentaméthyllicosa-2,4,6,8,10,12,14,18-octaénoïdes (*apo*-12'-lycopénoïdes)

Tout-(*E*)-2,7,11,15,19-pentaméthyllicosa-2,4,6,8,10,12,14,18-octaèneal (*apo*-12'-lycopénal)
21.



Le composé **3** (2,76 g, 16,8 mmol) et le phosphonium **2** (mélange diastéréoisomérique, 3,15 g, 5,6 mmol) sont dissous dans du CH₂Cl₂ (10 mL). Une solution de EtONa dans le EtOH (21% wt, 3 mL, 8 mmol) est lentement additionnée en 2 h dans le milieu maintenu à 0°C, puis agité pendant 5 h à température ambiante. En fin de réaction une solution hexane/AcOEt (4/2 (v/v), 10 mL) est ajoutée dans le milieu. La phase organique est lavée avec de l'eau distillée (2x5 mL) puis séchée sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne de gel de silice (éluant AcOEt/hexane (3/7, v/v)), puis cristallisé dans CH₂Cl₂/MeOH à 0°C. Le composé **21** est obtenu sous forme d'une poudre rouge (1g, rendement 51%).

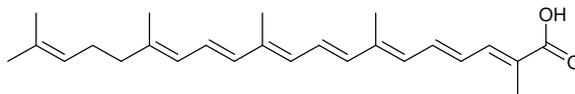
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,62 (s, H₃C-C(19)); 1,69 (s, H₃C(20)); 1,82 (s, H₃C-C(15)); 1,88 (s, H₃C-C(2)); 1,99 (s, H₃C-C(11)); 2,04 (s, H₃C-C(7)); 2,12 (m, H₂C(16, 17)); 5,11 (m, H-C(18)); 5,96 (d, J = 11,3, H-C(14)); 6,20 (d, J = 11,7, H-C(10)); 6,26 (d, J = 15,1, H-C(12)); 6,3 (d, J = 11,6, H-C(6)); 6,37 (d, J = 14,9, H-C(8)); 6,55 (dd, J = 15,1, 11, H-C(13)); 6,68 (dd, J = 11,7, 14,3, H-C(4)); 6,79 (dd, J = 11,5, 14,9, H-C(9)); 6,95 (d, J = 11,6, H-C(3)); 7,03 (dd, J = 11,6, 14,3, H-C(5)); 9,45 (s, H-C(1)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 9,8 (H₃C-C(2)); 13,2 (H₃C-C(11)); 13,2 (H₃C-C(7)); 17,2 (H₃C-C(15)); 17,9 (H₃C-C(19)); 25,9 (C(20)); 26,8 (C(17)); 40,4 (C(16)); 124,0 (C(18)); 125,8 (C(14)); 126 (C(13)); 127,5 (C(4)); 127,9 (C(9)); 131,1 (C(6)); 131,2 (C(10)); 132,0 (C(19)); 135,2 (C(12)); 136,6 (C(8)); 137,0 (C(2)); 137,9 (C(5)); 138,3 (C(11)); 140,6 (C(15)); 141,9 (C(7)); 149,1 (C(3)); 194,6 (C(1)).

SMHR : *m/z* 351,2671 ([M+H]⁺) (351,2682 calculé pour C₂₅H₃₅O).

CLHP-UV-SM : *t_R* 13,02 min; λ_{max} 442 nm; *m/z* 351 ([M+H]⁺).

Acide tout-(E)-2,7,11,15,19-pentaméthylcosa-2,4,6,8,10,12,14,18-octaénoïque (acide apo-12'-lycopénoïque) 22.



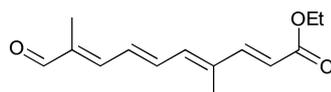
Procédure générale : Le composé **21** est vigoureusement agité en présence d'un oxydant pour l'obtention de **22**.

Les oxydants sont :

- Les oxydes d'argent (Ag_2O , AgO , Ag_2CO_3 /célite[®] (réaction de *Fétizon*))
- $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (réaction de *Jones*)
- NaClO_2 (réaction de *Dalcanale*)
- NaOH (réaction de *Cannizaro*)
- $\text{KCN}/\text{MnO}_2/\text{MeOH}$ (réaction de *Corey*) puis saponification de l'ester méthylique.

7.2.5) Famille des tout-(*E*)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïdes (*apo-10'*-lycopénoïdes)

Tout-(*E*)-9-formyl-4-méthyl-déca-2,4,6,8-tétraénoate d'éthyle **23.**



Le composé **3** (400 mg, 2,4 mmol) et le triéthyl phosphonoacétate **6** (0,5 mL, 2,4 mmol) sont dissous dans 40 mL de THF anhydre. Une solution de *t*-BuOK dans le THF (1,7M, 1,4 mL, 2,4 mmol) est ajoutée en 1 h puis le milieu réactionnel à 0°C puis agité pendant 18 h à température ambiante. La réaction est stoppée avec 10 mL d'une solution de NH₄Cl saturée puis le produit est extrait avec du diéthyléther (2x10 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de saumure (3x10 mL), puis séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant AcOEt/hexane (2/8, v/v)) puis cristallisé dans diéthyléther/hexane à 0°C. Le composé **23** est obtenu sous forme d'une poudre jaune (215 mg, rendement 38%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 1,31 (t, J=7,1, H₃C-C(ethyl)); 1,90 (s, H₃C-C(9)); 1,99 (s, H₃C-C(4)); 4,23 (q, J = 7,1, H₂C-C(ethyl)); 6,01 (d, J = 15,6, H-C(2)); 6,54 (d, J = 11,7, H-C(5)); 6,85 (dd, J = 11,7, 14,3, H-C(7)); 6,96 (d, J = 11,7, H-C(8)); 6,99 (dd, J = 11,7, 14,3, H-C(6)); 7,37 (d, J = 15,6, H-C(3)); 9,50 (s, H-C(10)).

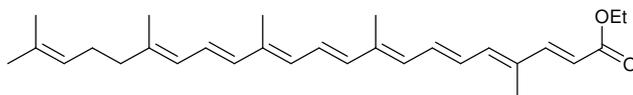
RMN-¹³C (CDCl₃) : 9,9 (H₃C-C(9)); 13,0 (H₃C-C(4)); 14,5 (H₃C(ethyl)); 60,7 (H₂C(ethyl)); 119,4 (C(2)); 131,0 (C(7)); 136,2 (C(6)); 137,2 (C(5)); 138,4 (C(4)); 139,1 (C(9)); 147,7 (C(8)); 147,9 (C(3)); 167,2 (C(1)); 194,7 (C(10)).

SMHR : *m/z* 235,1328 ([M+H]⁺) (235,1328 calculé pour C₁₄H₁₉O₃).

CLHP-UV-SM : *t_R* 5,76 min; *λ_{max}* 357 nm ; *m/z* 235,1 ([M+H]⁺).

CG-SM : *t_R* 37,04 min; *m/z* 234 (M⁺).

Tout-(*E*)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoate d'éthyle (apo-10'-lycopénoate d'éthyle) 24.



Le composé **23** (240 mg, 1 mmol) et le phosphonium **2** (mélange diastéréoisomérique, 710 mg, 1,3 mmol) sont dissous dans le CH₂Cl₂ (5 mL). Une solution de MeONa dans le MeOH (0,5M, 2,6 mL, 1,3 mmol) est lentement additionnée en 30 min dans le milieu maintenu à 0°C, puis agitée pendant 20 h à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout d'une solution saturée de NH₄Cl (1 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau distillée (3x5 mL) puis séchée sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant AcOEt/hexane (2/8, v/v)), puis cristallisé dans l'hexane à 0°C. Le composé **24** est obtenu sous forme d'une poudre rouge-orangée (74,5 mg, rendement 18%).

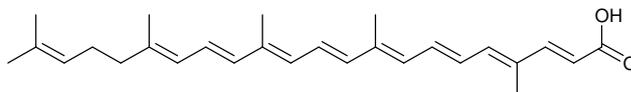
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,31 (t, J=7,1, H₃C-C(ethyl)); 1,61 (s, H₃C-C(21)); 1,69 (s, H₃C(22)); 1,82 (s, H₃C-C(17)); 1,92 (s, H₃C-C(4)); 1,98 (s, H₃C-C(13)); 1,99 (s, H₃C-C(9)); 2,12 (m, H₂-C(18, 19)); 4,22 (q, J = 7,1, H₂C-C(ethyl)); 5,11 (m, H-C(20)); 5,87 (d, J = 15,5, H-C(2)); 5,95 (d, J = 11,1, H-C(16)); 6,18 (d, J = 11,5, H-C(12)); 6,25 (d, J = 15,2, H-C(14)); 6,26 (d, J = 11,5, H-C(8)); 6,35 (d, J = 14,8, H-C(10)); 6,52 (m, H-C(5, 15)); 6,59 (m, H-C(6)); 6,69 (dd, J = 11,5, 14,8, H-C(11)); 6,78 (m, H-C(7)); 7,37 (d, J = 15,5, H-C(3)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 12,7 (H₃C-C(4)); 13,1 (H₃C-C(9)); 13,1 (H₃C-C(13)); 14,5 (H₃C(ethyl)); 17,1 (H₃C-C(17)); 17,9 (H₃C-C(21)); 25,8 (C(22)); 26,8 (C(19)); 40,4 (C(18)); 60,3 (H₂C(ethyl)); 116,5 (C(2)); 124,1 (C(20)); 125,5 (C(15)); 125,8 (C(16)); 126,6 (C(11)); 128,9 (C(6)); 131,4 (C(12)); 131,9 (C(21)); 131,9 (C(8)); 133,6 (C(4)); 133,9 (C(7)); 135,4 (C(14)); 137,1 (C(10)); 137,3 (C(13)); 139,1 (C(9)); 139,4 (C(5)); 140,1 (C(17)); 148,9 (C(3)); 167,7 (C(1)).

SMHR : *m/z* 421,3087 ([M+H]⁺) (421,3101 calculé pour C₂₉H₄₁O₂).

CLHP-UV-SM : *t_R* 14,15 min; λ_{max} 442 nm; *m/z* 421,6 ([M+H]⁺).

Acide tout-(E)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonénoïque (acide apo-10'-lycopénoïque) 25.



Le composé **24** (300 mg, 0,71 mmol) est dissous dans une solution de NaOH (630 mg, 16 mmol) dans EtOH (20 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à 35°C, puis neutralisé avec une solution HCl (10%, v/v). Le produit est extrait avec du CH₂Cl₂ (2x20 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié par cristallisation dans CH₂Cl₂/hexane à 0°C. Le composé **25** est obtenu sous forme d'une poudre rouge (154 mg, rendement 55%).

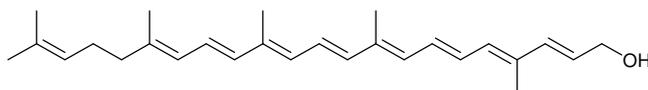
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,62 (s, H₃C-C(21)); 1,69 (s, H₃C(22)); 1,82 (s, H₃C-C(17)); 1,94 (s, H₃C-C(4)); 1,98 (s, H₃C-C(13)); 2,01 (s, H₃C-C(9)); 2,12 (m, H₂C(18, 19)); 5,11 (m, H-C(20)); 5,87 (d, J = 15,5, H-C(2)); 5,95 (d, J = 11, H-C(16)); 6,19 (d, J = 11,5, H-C(12)); 6,25 (d, J = 14,9, H-C(14)); 6,27 (d, J = 11,5, H-C(8)); 6,35 (d, J = 14,8, H-C(10)); 6,52 (m, H-C(15)); 6,56 (m, H-C(5)); 6,59 (m, H-C(6)); 6,72 (dd, J = 11,5, 14,8, H-C(11)); 6,8 (m, H-C(7)); 7,46 (d, J = 15,5, H-C(3)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 12,7 (H₃C-C(4)); 13,1 (H₃C-C(9)); 13,1 (H₃C-C(13)); 17,1 (H₃C-C(17)); 17,8 (H₃C-C(21)); 25,8 (C(22)); 26,8 (C(19)); 40,4 (C(18)); 115,3 (C(2)); 124,1 (C(20)); 125,5 (C(15)); 125,8 (C(16)); 126,8 (C(11)); 128,7 (C(6)); 131,4 (C(12)); 131,9 (C(8)); 131,9 (C(21)); 133,4 (C(4)); 134,7 (C(7)); 135,4 (C(14)); 137 (C(10)); 137,4 (C(13)); 139,6 (C(9)); 140,2 (C(17)); 140,6 (C(5)); 151,1 (C(3)); 172,6 (C(1)).

SMHR : *m/z* 393,2787 ([M+H]⁺) (393,2788 calculé pour C₂₇H₃₇O₂).

CLHP-UV-SM : t_R 12,46 min; λ_{max} 430,453 nm; *m/z* 393,4 ([M+H]⁺).

Tout-(E)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonèn-1-ol (apo-10'-lycopérol) 26.



Le composé **24** (287 mg, 0,68 mmol) est dissous dans du THF anhydre (5 mL). Une solution de DIBA-H dans le toluène (1,2M, 1,4 mL, 1,7 mmol) est précautionneusement ajoutée en 30 min dans le milieu maintenu à 0°C puis agité pendant 4 h. La réaction est stoppée par ajout très lent d'une solution MeOH/eau (3 mL, 1/1, v/v) à 0°C. Le gel formé est détruit par ajout d'une solution aqueuse de tartrate de potassium sodium (2M, 10 mL) qui est vigoureusement agitée pendant 10 h à température ambiante. Ensuite le produit est extrait par du diéthyléther (3x10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant hexane/AcOEt (1/1, v/v)), puis cristallisé dans CH₂Cl₂/hexane à 0°C. Le composé **26** est obtenu sous forme d'une poudre rouge (80 mg, rendement 31%).

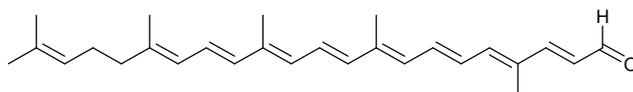
RMN-¹H (CDCl₃) : 1,39 (t, J = 5,85, H-O); 1,61 (s, H₃C-C(21)); 1,69 (s, H₃C(22)); 1,82 (s, H₃C-C(17)); 1,91 (s, H₃C-C(4)); 1,97 (s, H₃C-C(9, 13)); 2,12 (m, H₂-C(18, 19)); 4,25 (t, J = 6,1, C(1)); 5,11 (m, H-C(20)); 5,88 (dt, J = 6,1, 15,6, H-C(2)); 5,95 (d, J = 11,0, H-C(16)); 6,18 (d, J = 11,5, H-C(12)); 6,21 (d, J = 11,5, H-C(8)); 6,23 (d, J = 11,0, H-C(5)); 6,25 (d, J = 15,2, H-C(14)); 6,34 (d, J = 15,6, H-C(3)); 6,35 (d, J = 15,0, H-C(10)); 6,49 (dd, J = 11,0, 15,2, H-C(15)); 6,59 (m, H-C(6)); 6,61 (m, H-C(7)); 6,64 (m, H-C(11)),

RMN-¹³C (CDCl₃) : 13,0 (H₃C-C(4)); 13,0 (H₃C-C(9)); 13,0 (H₃C-C(13)); 17,1 (H₃C-C(17)); 17,9 (H₃C-C(21)); 25,9 (C(22)); 26,8 (C(19)); 40,4 (C(18)); 64,1 (C(1)); 124,1 (C(20)); 125,0 (C(15)); 125,5 (C(11)); 125,9 (C(16)); 127,5 (C(2)); 129,6 (C(6)); 130,6 (C(7)); 131,6 (C(12)); 131,9 (C(21)); 132,4 (C(8)); 132,5 (C(5)); 134,9 (C(4)); 135,5 (C(14)); 136,4 (C(13)); 136,5 (C(3)); 136,9 (C(9)); 137,4 (C(10)); 139,7 (C(17))

SMHR : *m/z* 379,2978 ([M+H]⁺) (379,2995 calculé pour C₂₇H₃₉O)

CLHP-UV-SM : *t_R* 13,02 min; *λ_{max}* 396, 418, 444 nm; *m/z* 379,5 ([M+H]⁺), 361,5 ([M-18+H]⁺),

Tout-(E)-4,9,13,17,21-pentaméthyl-docosa-2,4,6,8,10,12,14,16,20-nonèneal (apo-10'-lycopénel) 27.



Le composé **26** (90 mg, 0,24 mmol) est dissous dans AcOEt (5 mL). Après addition de MnO₂ (510 mg, 5 mmol), le mélange hétérogène est vigoureusement agité à température ambiante pendant 2 h. La réaction est stoppée par filtration sur célite[®], puis le filtrat est séché sur Na₂SO₄ anhydre. Après évaporation du solvant le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant hexane/AcOEt (2/8, v/v)). Le composé **27** est obtenu sous forme d'une poudre rouge (40 mg, rendement 44%).

RMN-¹H (CDCl₃) : 1,61 (s, H₃C-C(21)); 1,69 (s, H₃C(22)); 1,82 (s, H₃C-C(17)); 1,96 (s, H₃C-C(4)); 1,98 (s, H₃C-C(13)); 2,01 (s, H₃C-C(9)); 2,12 (m, H₂C(18, 19)); 5,11 (m, H-C(20)); 5,95 (d, J = 11,0, H-C(16)); 6,18 (dd, J = 7,8, 15,3, H-C(2)); 6,18 (d, J = 11,6, H-C(12)); 6,25 (d, J = 15,1, H-C(14)); 6,28 (d, J = 12,1, H-C(8)); 6,36 (d, J = 14,9, H-C(10)); 6,53 (dd, J = 11,0, 15,1, H-C(15)); 6,61 (m, H-C(6)); 6,61 (m, H-C(5)); 6,73 (dd, J = 11,6, 14,9, H-C(11)); 6,86 (m, H-C(7)); 7,15 (d, J = 15,3, H-C(3)); 9,58 (d, J = 7,8, H-C(1)).

RMN-¹³C (CDCl₃) : 12,9 (H₃C-C(4)); 13,1 (H₃C-C(9)); 13,1 (H₃C-C(13)); 17,1 (H₃C-C(17)); 17,8 (H₃C-C(21)); 25,8 (C(22)); 26,8 (C(19)); 40,4 (C(18)); 124,0 (C(20)); 125,7 (C(15)); 125,8 (C(16)); 127,2 (C(2)); 127,2 (C(11)); 128,6 (C(6)); 131,3 (C(12)); 131,7 (C(8)); 131,8 (C(21)); 133,8 (C(4)); 135,3 (C(14)); 135,5 (C(7)); 136,8 (C(10)); 137,7 (C(13)); 140,2 (C(9)); 140,3 (C(17)); 141,3 (C(5)); 156,7 (C(3)); 193,8 (C(1)).

SMHR : *m/z* 377,2823 ([M+H]⁺) (377,2839 calculé pour C₂₇H₃₇O).

CLHP-UV-SM : t_R 13,61 min; λ_{max} 458 nm; *m/z* 377,5 ([M+H]⁺).

7.3) Méthode de mesure du pouvoir antioxydant

Les mesures de pouvoir antioxydant ont été effectuées sur un spectrophotomètre UV-vis Specord S600-01 à barrettes de diodes et équipé d'un passeur d'échantillons (8 cuves), d'un système d'agitation magnétique et thermostaté à 37°C par bain-marie. Les absorbances sont enregistrées sur une gamme de 200-700 nm toutes les 25 s (400 mesures) sous agitation à 1000 tours/min.

La metmyoglobine (19,9 mg) est dissoute dans 100 mL de solution tampon phosphate à pH 5,8 pour obtenir une solution à 10 μM (standardisé par spectrophotométrie $\epsilon_{525} = 7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Dans un ballon sont mélangés 0,5 mL de Tween 20 (40 mM dans le CHCl_3), 0,25 mL d'acide linoléique (28 mM dans le CHCl_3) et un volume fixé d'antioxydant (1mM dans le CHCl_3). Le solvant est évaporé sous pression réduite puis le résidu repris dans dans 10 mL de tampon phosphate à pH 5,8. Les concentrations finales étaient : 0,7 mM acide linoléique, 2 mM Tween, 1-10 μM de molécule testée. Deux mL de solution sont ensuite transférés dans la cellule du spectrophotomètre. L'échantillon est en contact avec le dioxygène de l'air au niveau de l'espace de tête. A t_0 20 μL de solution de metmyoglobine (10 μM) ont été additionnés sous agitation et le spectre UV-Vis a été enregistré à des intervalles de temps régulier (25s).

Les spectres obtenus sont traités à l'aide des logiciels Win aspect et Scientist pour calculer les valeurs expérimentales.

7.4) Méthode de mesure de l'interaction albumine du sérum humain/apo-lycopénoïdes

-Mesures fluorimétriques

L'étude de liaison est réalisée sur le fluorimètre SAFAS Xenius équipé d'un système d'agitation et thermostaté à 25°C par bain-marie.

Des ajouts dosés du composé (1 mM, MeOH/DMSO (9/1 v/v)) sont réalisés dans la solution d'albumine du sérum humain (3,75 μM , tampon phosphate pH = 7,4). Les spectres sont enregistrés avec $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ qui est la λ_{ex} du tryptophane (Trp) de l'albumine. La

diminution à $\lambda_{em} = 340$ nm correspondante à la longueur d'onde d'émission du Trp est observée, ce qui traduit une fixation de notre composé à proximité du Trp.

-Mesures spectrophotométriques UV-Vis

Les études de complexation des apo-lycopénoïdes avec l'albumine du sérum humain ont été effectuées sur un spectrophotomètre UV-vis HP8453 à barrettes de diodes équipé d'un système d'agitation magnétique et thermostaté à 25°C par bain-marie. Les absorbances sont enregistrées sur une gamme de 200-700 nm sous agitation.

Des ajouts dosés du composé (1 mM, MeOH/DMSO (9/1 v/v)) sont réalisés dans la cuve spectrophotométrique contenant 2 mL d'une solution d'albumine du sérum humain (3,75 μ M, tampon phosphate pH = 7,4) pour étudier l'influence de la protéine, ou dans 2 mL de solvant organique (1 mM, MeOH/DMSO (9/1 v/v)) pour obtenir le spectre du composé en milieu organique ou dans 2 mL de solution tampon phosphate pour obtenir le spectre du composé en solution aqueuse. Le spectre est enregistré sur la gamme 200-700 nm.

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des schémas

Liste des communications

Liste Bibliographique

Liste des abréviations

AcOEt	acétate d'éthyle
AGPI	acide gras polyinsaturé
Ag ₂ CO ₃	carbonate d'argent
Ag ₂ O	oxyde d'argent I
AgO	oxyde d'argent II
AO	antioxydant
APTS	acide paratoluène sulfonique
Ar	argon
ASH	albumine de sérum humain
Car	caroténoïde
CCM	chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	chloroforme deutéré
CG	chromatographie gazeuse
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
CH ₃ COOH	acide acétique
CLHP	chromatographie liquide haute performance
Da	dalton
DIBA-H	hydrure de diisobutylaluminium
EOR	espèce oxygénée réactive
Et ₂ O	diéthyl éther
EtONa	éthylate de sodium
H ₂ O	eau
HCl	acide chlorhydrique
IC 50	concentration inhibitrice 50
KCN	cyanure de potassium
LH	lipide polyinsaturé
LOH	lipide polyinsaturé alcool
LOOH	peroxyde lipidique polyinsaturé
λ_{em}	longueur d'onde d'émission
λ_{ex}	longueur d'onde d'excitation
λ_{max}	longueur d'onde maximale

MbFe(III)	metmyoglobine
MeOH	méthanol
MeONa	méthylate de sodium
MeSO ₃ H	acide méthane sulfonique
MnO ₂	dioxyde de manganèse
MTBE	méthyl- <i>tert</i> -butyl éther
NaH	hydrure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium (soude)
Na ₂ SO ₄	sulfate de sodium
NH ₄ Cl	chlorure d'ammonium
PAO	pouvoir antioxydant
PPh ₃	triphénylphosphine
RMN	résonance magnétique nucléaire
SM	spectrométrie de masse
SMHR	spectrométrie de masse haute résolution
<i>t</i> -BuOK	<i>tert</i> -butylate de potassium
THF	tétrahydrofurane
UV-Vis	ultra violet –visible
v/v	volume à volume

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : distribution des voies mévalonate et déoxyxylulose pour la biosynthèse d'isoprénoïdes [18].</i>	15
<i>Tableau 2 : distribution de caroténoïdes dans l'alimentation.</i>	21
<i>Tableau 3 : concentration plasmatique moyenne de quelques caroténoïdes dans le plasma..</i>	22
<i>humain.</i>	22
<i>Tableau 4 : sources et concentrations en lycopène.</i>	25
<i>Tableau 5 : diastéréosélectivité de la réaction de Wittig en fonction des substituants R_1 sur le sel de triphénylphosphonium.</i>	46
<i>Tableau 6 : IC_{50} et énergie de la HOMO du lycopène et des apo-lycopénoïdes</i>	90
<i>Tableau 7 : composition en acides aminés de l'albumine du sérum humain</i>	94
<i>Tableau 8 : quelques ligands de l'albumine du sérum humain</i>	96
<i>Tableau 9 : effet de milieu sur les coefficients d'absorption molaires de 18, 20, 25 et 27</i>	101
<i>Tableau 10 : constantes d'affinité des apo-lycopénoïdes pour l'albumine du sérum humain.</i>	103

Liste des figures

Figure 1 : trois microconstituants végétaux	3
Figure 2 : structure chimique de la molécule de lycopène	3
Figure 3 : structure chimique des apo-lycopénoïdes ciblés.....	4
Figure 4 : structure chimique du β -carotène	6
Figure 5 : squelette carboné de base des caroténoïdes	7
Figure 6 : exemples d'un carotène et d'un xanthophylle.....	7
Figure 7 : nomenclature, numérotation du squelette des carotènes	8
Figure 8 : nomenclature, structures terminales des caroténoïdes.....	9
Figure 9 : structure et nomenclature de deux carotènes	9
Figure 10 : structure et nomenclature de deux xanthophylles.....	10
Figure 11 : exemples de C45, nor et séco-caroténoïdes	10
Figure 12 : exemples de apo et diapo caroténoïdes.....	11
Figure 13 : molécules rétinoides.....	11
Figure 14 : exemples d'apo-lycopénoïdes avec leurs nomenclatures officielle et officieuse...	12
Figure 15 : exemples d'isomères de caroténoïde	13
Figure 16 : structure du phytoène.....	13
Figure 17 : chromophore commun de nombreux caroténoïdes	19
Figure 18 : diagrammes des orbitales moléculaires d'un système π en fonction de sa conjugaison et leurs valeurs associées en eV.....	20
Figure 19 : lycopène tout (E) et ses positions les plus fréquemment isomérisées	25
Figure 20 : produits naturels issus de coupures oxydantes de caroténoïdes.....	27
Figure 21 : produits d'oxydation du lycopène via l'oxydation du lycopène par KMnO_4 , apo-lycopénones et apo-lycopénals (colonne de gauche), diapo-caroténedials (colonne de droite) [7].....	34
Figure 22 : chromatogramme à 450 nm à $t = 6$ h de l'oxydation du β -carotène par O_2 catalysée par la mésitylporphyrine de ruthénium [74].....	37
Figure 23 : stratégie de synthèse via la formation de simples ou doubles liaisons C-C	43
Figure 24 : structure des hydroperoxydes formés lors de la peroxydation de l'acide linoléique	81
Figure 25 : changements spectraux au cours de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine en présence d'acide apo-10'-lycopénoïque 25 à $10 \mu\text{M}$	85

Figure 26 : cinétiques de peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine en présence d'acide apo-10'-lycopénoïque 25 à 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 (μM) ; absorbance à 234 nm (trait plein) et à 440 nm (trait pointillé).....	86
Figure 27 : cinétique de peroxydation de l'acide linoléique initiée par la metmyoglobine en présence d'acide apo-10'-lycopénoïque 25 , calcul du paramètre IC_{50}	88
Figure 28 : calcul du paramètre IC_{50} de 25	89
Figure 29 : albumine du sérum humain (ASH).....	93
Figure 30 : domaines et sous-domaines de l'albumine humaine (complexé a l'acide oléique C18 : 1) rouge = I, vert = II, bleu = III, couleurs claires = sous-domaines A, foncées = sous-domaines B.....	95
Figure 31 : sites de complexation entre l'albumine et l'acide gras arachidonique C20 : 4... 97	
Figure 32 : apo-lycopénoïdes étudiés pour leur affinité avec l'albumine du sérum humain .. 98	
Figure 33 : à gauche : spectres UV-Vis des molécules 18, 20, 27, 25 à 11,5 μM ; à droite : graphique représentant $A = f([\text{composé}])$ à λ_{max} . (rouge : DMSO/MeOH, 9/1 (v/v); bleu : solution à 3,75 μM d'albumine de sérum humain dans tampon phosphate ; noir : tampon phosphate).	100
Figure 34 : intensité de fluorescence de Trp-214 à 340 nm pour différentes concentrations d'apo-lycopénoïdes (apo-14' et 10'-lycopénals ; acides apo-14' et 10'-lycopénoïques).	102

Liste des schémas

<i>Schéma 1 : voies de biosynthèse simplifiées de l' isopentényl pyrophosphate (IPP).....</i>	<i>14</i>
<i>Schéma 2 : voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes</i>	<i>16</i>
<i>Schéma 3 : désaturations successives du phytoène.....</i>	<i>17</i>
<i>Schéma 4 : diversité des caroténoïdes par voie enzymatique</i>	<i>18</i>
<i>Schéma 5 : action biologique des caroténoïdes pour la prévention des maladies</i>	<i>24</i>
<i>Schéma 6 : rôle du lycopène dans la prévention des maladies chroniques</i>	<i>26</i>
<i>Schema 7 : mécanisme probable d'oxydation de liaison π par $KMnO_4$.....</i>	<i>35</i>
<i>Schéma 8 : mécanisme probable de l'oxydation du lycopène par O_2 catalysée par la tétraphényl porphyrine de ruthénium[75].....</i>	<i>36</i>
<i>Schéma 9 : mécanisme probable de l'oxydation du β-carotène par O_2 catalysée par la tétramésityl porphyrine de ruthénium (les liaisons en pointillé indiquent que la longueur de la chaîne carbonée peut varier) [74]</i>	<i>38</i>
<i>Schéma 10 : produits d'oxydation potentiels métabolites du lycopène ciblés pour la synthèse organique</i>	<i>42</i>
<i>Schéma 11 : stratégie de synthèse courante pour la construction du squelette des caroténoïdes via la réaction Wittig (R = groupement terminal, confère chapitre nomenclature).....</i>	<i>45</i>
<i>Schéma 12 : autres stratégies de couplage pour la synthèse de caroténoïdes via la réaction de Wittig (R = groupement terminal, confère chapitre nomenclature)</i>	<i>45</i>
<i>Schéma 13 : réaction générale de Wittig, condensation d'un sel de triphénylphosphonium sur un carbonyle.....</i>	<i>46</i>
<i>Schéma 14 : mécanisme de la réaction de Wittig sur un système polyconjugué.....</i>	<i>46</i>
<i>Schéma 15 : mécanisme général de la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE).</i>	<i>47</i>
<i>Schéma 16 : synthèse de l'acétate de la vitamine A via la réaction de Julia.....</i>	<i>47</i>
<i>Schéma 17 : synthèse de l'acétate de la vitamine A via la réaction de Julia suivie d'une double élimination.....</i>	<i>48</i>
<i>Schéma 18 : synthèse de la capsorubine par condensation aldolique.....</i>	<i>49</i>
<i>Schéma 19 : synthèse du (15E)-β-carotène par double réaction de Grignard.....</i>	<i>50</i>
<i>Schéma 20 : cycle catalytique du couplage de Stille, synthèse du 4-hydroxyrétinol [126]....</i>	<i>51</i>
<i>Schéma 21 : cycle catalytique du couplage de Suzuki, synthèse du rétinol [132].....</i>	<i>52</i>
<i>Schéma 22 : rétrosynthèse simplifiée de 4</i>	<i>53</i>
<i>Schéma 23 : rétrosynthèse simplifiée de 7</i>	<i>54</i>

<i>Schéma 24 : rétrosynthèse simplifiée de 17</i>	55
<i>Schéma 25 : rétrosynthèse simplifiée de 21</i>	55
<i>Schéma 26 : rétrosynthèse simplifiée de 24</i>	56
<i>Schéma 27 : voie de synthèse possible pour l'obtention de 22</i>	77
<i>Schéma 28 : amorçage de la peroxydation de l'acide linoléique induit par la metmyoglobine</i>	80
<i>Schéma 29 : processus de propagation lors de la peroxydation de l'acide linoléique</i>	81
<i>Schéma 30 : décomposition des tétraoxydes initialement formés dans la phase de terminaison</i>	81

Liste des communications

Communications par affiches

E.Reynaud, P. Goupy, O. Dangles, C. Caris-Veyrat

"Synthesis and evaluation of physio-chemical properties of apo-lycopenoids"

1^{ère} assemblée générale annuelle LYCOCARD, Murcia (Espagne), du 20 au 23 mars 2007

E.Reynaud, O. Dangles, C. Caris-Veyrat

"Synthèse de produits d'oxydation du lycopène"

20^{ème} journée régionale de la chimie SFC-PACA, Avignon, le 24 mai 2007

E.Reynaud, O. Dangles, C. Caris-Veyrat

"Synthesis and evaluation of physico-chemical properties of apo-lycopenoids"

2^{ème} assemblée générale LYCOCARD, Liverpool (Angleterre), du 2 au 6 juin 2008

E.Reynaud, G. Aydin, R. Rühl, O. Dangles and C. Caris-Veyrat

"Organic Synthesis of new putative metabolites of lycopene and their cellular signalling effects"

3rd FAVHealth International congress, Avignon, du 18-21 octobre 2009

Communications orales

E.Reynaud, O. Dangles, C. Caris-Veyrat

"Isolation of lycopene metabolites from acellular and/or by organic synthesis"

3^{ème} assemblée générale LYCOCARD, Debrecen (Hongrie), du 2 au 5 juin 2009

E.Reynaud, O. Dangles, C. Caris-Veyrat

"Synthèse organique d'apo-lycopénoïdes"

Journée de l'école doctorales SP-SA, Montpellier, 18 juin 2009

E.Reynaud

"Synthèse organique d'apo-lycopénoïdes : le nouveau chapitre de la thèse"

Ecole doctorale SP-SA, Montpellier, 28 mai 2009

E.Reynaud, P. Goupy, O. Dangles, C. Caris-Veyrat

"Organic synthesis of apo-lycopenoids and their antioxidant properties in biomimetic system"

Tomato, lycopene and health, Lycocoard conference, Avignon, 22 octobre 2009

Liste bibliographique

1. Vincent-Baudry, S., C. Defoort, M. Gerber, M.C. Bernard, P. Verger, O. Helal, H. Portugal, R. Planells, P. Grolier, M.J. Amiot-Carlin, P. Vague, and D. Lairon, The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**. 82(5): p. 964-971.
2. Kris-Etherton, P.M., K.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel, and T.D. Etherton, Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, **2002**. 113: p. 71-88.
3. Galan, P., P. Preziosi, and I. Triol, Antioxydant et prévention. *Cah. Nutr. Diét.*, **1997**. 32(6): p. 359-370.
4. Giovannucci, E., Tomato products, lycopene, and prostate cancer: A review of the epidemiological literature. *Journal of Nutrition*, **2005**. 135(8): p. 2030S-2031S.
5. Hu, K.Q., C. Liu, H. Ernst, N.I. Krinsky, R.M. Russell, and X.D. Wang, The biochemical characterization of ferret carotene-9', 10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **2006**. 281(28): p. 19327-19338.
6. Gajic, M., S. Zaripheh, F.R. Sun, and J.W. Erdman, Apo-8'-lycopenal and apo-12'-lycopenal are metabolic products of lycopene in rat liver. *Journal of Nutrition*, **2006**. 136(6): p. 1552-1557.
7. Caris-Veyrat, C., A. Schmid, M. Carail, and V. Bohm, Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: Characterization and mechanisms of formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(25): p. 7318-7325.
8. Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, *Carotenoids : Handbook*. Birkhäuser Verlag ed. **2004**.
9. Chem, I.C.o.t.N.o.O. and I.-I.C.o.B. Nomenclature, Tentative rules for the nomenclature of carotenoids. *Biochemistry*, **1971**. 10(26): p. 4827-4837.
10. Report of Iupac Commission on Nomenclature of Organic-Chemistry and Iupac-Iub Commission on Biochemical Nomenclature - Nomenclature of Carotenoids (Rules Approved 1974. *Pure and Applied Chemistry*, **1975**. 41(3): p. 405-431.
11. Nomenclature, I.-I.J.C.o.B., Nomenclature of retinoids : Recommendations 1981. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1983**. 224(2): p. 728-731.
12. Hengartner, U., K. Bernhard, K. Meyer, G. Englert, and E. Glinz, Synthesis, Isolation, and Nmr-Spectroscopic Characterization of 14 (Z)-Isomers of Lycopene and of Some Acetylenic

- Didehydrolycopenes and Tetradehydrolycopenes. *Helvetica Chimica Acta*, **1992**. 75(6): p. 1848-1865.
13. Lian, F.Z., D.E. Smith, H. Ernst, R.M. Russell, and X.D. Wang, Apo-10'-lycopenoic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro, and suppresses lung tumorigenesis in the A/J mouse model in vivo. *Carcinogenesis*, **2007**. 28(7): p. 1567-1574.
 14. Lindshield, B.L., K. Canene-Adams, and J.W. Erdman Jr, Lycopene metabolites bioactive? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2007**. 458(2): p. 136-140.
 15. Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, *Carotenoids : Biosynthesis and metabolism*. Birkhäuser Verlag ed. Vol. 3. **1998**.
 16. Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, and H. Sahn, Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria - a Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochemical Journal*, **1993**. 295: p. 517-524.
 17. Rohmer, M., M. Seemann, S. Horbach, S. BringerMeyer, and H. Sahn, Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **1996**. 118(11): p. 2564-2566.
 18. Eisenreich, W., F. Rohdich, and A. Bacher, Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, **2001**. 6(2): p. 78-84.
 19. Schwender, J., M. Seemann, H.K. Lichtenthaler, and M. Rohmer, Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochemical Journal*, **1996**. 316: p. 73-80.
 20. Lichtenthaler, H.K., J. Schwender, A. Disch, and M. Rohmer, Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters*, **1997**. 400(3): p. 271-274.
 21. Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, *Carotenoids : Spectroscopy*. Birkhäuser Verlag ed. Vol. 1B. **1995**.
 22. Osganian, S.K., M.J. Stampfer, E. Rimm, D. Spiegelman, J.E. Manson, and W.C. Willett, Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *Am J Clin Nutr*, **2003**. 77(6): p. 1390-1399.
 23. Al-Delaimy, W.K., A.L. van Kappel, P. Ferrari, N. Slimani, J.P. Steghens, S. Bingham, I. Johansson, P. Wallstrom, K. Overvad, A. Tjonneland, T.J. Key, A.A. Welch, H.B. Bueno-de-Mesquita, P.H.M. Peeters, H. Boeing, J. Linseisen, F. Clavel-Chapelon, C. Guibout, C. Navarro, J.R. Quiros, D. Palli, E. Celentano, A. Trichopoulou, V. Benetou, R. Kaaks, and E. Riboli, Plasma levels of six carotenoids in nine European countries: report from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutrition*, **2004**. 7(6): p. 713-722.

24. Miller, N.J., J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley, and C.A. Rice-Evans, Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, **1996**. 384(3): p. 240-242.
25. RiceEvans, C.A., J. Sampson, P.M. Bramley, and D.E. Holloway, Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? *Free Radical Research*, **1997**. 26(4): p. 381-398.
26. Mortensen, A., L.H. Skibsted, and T.G. Truscott, The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2001**. 385(1): p. 13-19.
27. Stahl, W. and H. Sies, Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, **2003**. 24(6): p. 345-351.
28. Vulcain, E., P. Goupy, C. Caris-Veyrat, and O. Dangles, Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radical Research*, **2005**. 39(5): p. 547-563.
29. El-Agamey, A., G.M. Lowe, D.J. McGarvey, A. Mortensen, D.M. Phillip, T.G. Truscott, and A.J. Young, Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2004**. 430(1): p. 37-48.
30. Young, A.J. and G.M. Lowe, Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2001**. 385(1): p. 20-27.
31. Faure, H., V. Fayol, C. Galabert, P. Grolier, G. Le Moel, J.P. Steghens, and F. Nabet, Carotenoids: 2. Diseases and supplementations studies. *Annales De Biologie Clinique*, **1999**. 57(3): p. 273-282.
32. Krinsky, N.I., S.T. Mayne, and H. Sies, Carotenoids in Health and Disease. Marcel Dekker ed. **2004**.
33. Mayne, S.T., Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *Faseb Journal*, **1996**. 10(7): p. 690-701.
34. Snodderly, D.M., Evidence for Protection against Age-Related Macular Degeneration by Carotenoids and Antioxidant Vitamins. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1995**. 62(6): p. S1448-S1461.
35. Socaciu, C., Food Colorants Chemical and Functional Properties. CRC Press ed. **2008**.
36. Rissanen, T., S. Voutilainen, K. Nyssonen, R. Salonen, and J.T. Salonen, Low plasma lycopene concentration is associated with increased intima-media thickness of the carotid artery wall. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **2000**. 20(12): p. 2677-2681.
37. Arab, L. and S. Steck, Lycopene and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2000**. 71(6): p. 1691S-1695S.
38. Schierle, J., W. Bretzel, I. Bühler, N. Faccin, D. Hess, K. Steiner, and W. Schüep, Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chemistry*, **1997**. 59(3): p. 459-465.

39. Wang, X.D., Carotenoid oxidative/degradative products and their biological activities, in Carotenoids in Health and Disease, S.T.M. N.I. Krinsky, H. Sies, Editor. **2004**, Marcel Dekker: New York. p. 313-335.
40. Bonnie, T.Y.P. and Y.M. Choo, Oxidation and thermal degradation of carotenoids. Journal of Oil Palm Research, **1999**. 11(1): p. 62-78.
41. Tang, G., X.-D. Wang, R.M. Russel, and N.I. Krinsky, Characterization of β -apo-13 carotenone and β -apo-14'-carotenal as enzymatic products of the excentric cleavage of β -carotene. Biochemistry, **1991**. 30: p. 9829-9834.
42. Wang, X.D., N.I. Krinsky, G.W. Tang, and R.M. Russell, Retinoic acid can be produced from excentric cleavage of beta-carotene in human intestinal mucosa. Arch Biochem Biophys, **1992**. 293(2): p. 298-304.
43. Wang, X.D., G.W. Tang, J.G. Fox, N.I. Krinsky, and R.M. Russel, Enzymatic conversion of beta-carotene into beta-apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissue. Arch. Biochem. Biophys., **1991**. 285(1): p. 8-16.
44. Yeum, K.-J., Y.C. Lee-Kim, S. Yoon, K.Y. Lee, I.S. Park, K.S. Lee, B.S. Kim, G. Tang, R.M. Russel, and N.I. Krinsky, Similar metabolites formed from beta-carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase, or linoleic acid hydroperoxyde. Archives of Biochemistry and Biophysics, **1995**. 321(1): p. 167-174.
45. Leuenberger, M.G., C. Engeloch-Jarret, and W.D. Woggon, The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. Angewandte Chemie International Edition, **2001**. 40(14): p. 2614-2617.
46. Kiefer, C., S. Hessel, J.M. Lampert, K. Vogt, M.O. Lederer, D.E. Breithaupt, and J. vonLintig, Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. Journal of Biological Chemistry, **2001**. 276(17): p. 14110-14116.
47. Bouvier, F., J.C. Isner, O. Dogbo, and B. Camara, Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. TRENDS in Plant Science, **2005**. 10(4): p. 187-194.
48. Miller, D.M., G.R. Buettner, and S.D. Aust, Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radical Biology & Medicine, **1990**. 8: p. 95-108.
49. El-Tinay, A.H. and C.O. Chichester, Oxidation of beta-carotene. Site of initial attack. J.Org.Chem., **1970**. 56(7): p. 2290-2293.
50. Handelman, G.J., F.J.G.M. van Kuijk, A. Chatterjee, and N. Krinsky, Characterization of products formed during the autoxidation of β -carotene. Free Radical Biology & Medicine, **1991**. 10: p. 427-437.
51. Mordi, R.C., J.C. Walton, G.W. Burton, L. Hughes, K.U. Ingold, D.A. Lindsay, and D.J. Moffat, Oxidative degradation of beta-carotene and b-apo-8'-carotenal. Tetrahedron, **1993**. 49(4): p. 911-928.

52. Takahashi, A., N. Shibasaki, Kitakawa, and T. Yonemoto, Kinetic model for autoxidation of beta-carotene in organic solutions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **1999**. 76(8): p. 897-903.
53. Martin, H.D., C. Ruck, M. Schmidt, S. Sell, S. Beutner, B. Mayer, and R. Walsh, Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure and Applied Chemistry*, **1999**. 71(12): p. 2253-2262.
54. Henry, L.K., N.L. Puspitasari, Nienaber, M. Jaren, Galan, R.B. van Breemen, G.L. Catignani, and S.J. Schwartz, Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**. 48(10): p. 5008-5013.
55. Rodriguez, E.B. and D.B. Rodriguez-Amaya, Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from beta-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. *Food Chemistry*, **2007**. 101(2): p. 563-572.
56. Kim, S.J., E. Nara, H. Kobayashi, J. Terao, and A. Nagao, Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids*, **2001**. 36(2): p. 191-199.
57. Kim, S.J., Cleavage products formed through autoxidation of zeta-carotene in liposomal suspension. *Food Science and Biotechnology*, **2004**. 13(2): p. 202-207.
58. Kim, S.J., H.L. Kim, and H.G. Jang, Oxidative cleavage products derived from phytofluene by pig liver homogenate. *Food Science and Biotechnology*, **2005**. 14(3): p. 424-427.
59. Socaciu, C., R. Jessel, and H.A. Diehl, Carotenoid incorporation into microsomes: yields, stability and membrane dynamics. *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2000**. 56(14): p. 2799-2809.
60. Estrada, A.F., D. Maier, D. Scherzinger, J. Avalos, and S. Al-Babili, Novel apocarotenoid intermediates in *Neurospora crassa* mutants imply a new biosynthetic reaction sequence leading to neurosporaxanthin formation. *Fungal Genetics and Biology*, **2008**. 45(11): p. 1497-1505.
61. Hanusch, M., W. Stahl, W.A. Schulz, and H. Sies, Induction of gap junctional communications by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**. 317(2): p. 423-428.
62. Goodman, G.E., Prevention of lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **2000**. 33(3): p. 187-197.
63. Omenn, G.S., G.E. Goodman, M.D. Thornquist, J. Balmes, M.R. Cullen, A. Glass, J.P. Keogh, F.L. Meyskens, Jr, B. Valanis, J.H. Williams, Jr, S. Barnhart, and S. Hammar, Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New Eng. J. Med.*, **1996**. 334: p. 1150-1155.
64. Baker, D.L., E.S. Krol, N. Jacobsen, and D.C. Liebler, Reactions of beta-carotene with cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of

- the prooxidant antioxidant effect. *Chemical Research in Toxicology*, **1999**. 12(6): p. 535-543.
65. Karrer, P. and E. Jucker, Carotenoids, ed. P. Karrer and E. Jucker. **1950**: Elsevier.
66. Peter, U. and E. Conrad Hans, Synthesen von enantiomerenreinen Apoviola-xanthin-säuren, -olen und -alen (Persicaxanthin, Sinensia-xanthin und beta-Citraurin-epoxid) und ihrer furanoiden Umlagerungsprodukte. *Helvetica Chimica Acta*, **1988**. 71(8): p. 1983-1998.
67. Stratton, S.P., W.H. Schaefer, and D.C. Liebler, Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of beta-carotene. *Chem Res Toxicol*, **1993**. 6(4): p. 542-7.
68. Zhang, H., E. Kotake-Nara, n. O, H., and A. Nagao, A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med.*, **2003**. 35(12): p. 1653-63.
69. Wendler, N.L. and ... The oxidation of beta-carotene. *JACS*, **1950**. 72: p. 234239.
70. Wingerath, T., D. Kirsch, B. Spengler, and W. Stahl, Analysis of cyclic and acyclic analogs of retinol, retinoic acid, and retinal by laser desorption ionization-, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, and UV/Vis spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, **1999**. 272(2): p. 232-242.
71. Aust, O., N. Ale-Agha, L. Zhang, H. Wollersen, H. Sies, and W. Stahl, Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food and Chemical Toxicology*, **2003**. 41(10): p. 1399-1407.
72. Fatiadi, A.J., The Classical Permanganate Ion - Still a Novel Oxidant in Organic-Chemistry. *Synthesis-Stuttgart*, **1987**(2): p. 85-127.
73. French, R.R., P. Holzer, M.G. Leuenberger, and W.D. Woggon, A supramolecular enzyme mimic that catalyzes the 15,15' double bond scission of beta,beta-carotene. *Angewandte Chemie-International Edition*, **2000**. 39(7): p. 1267-+.
74. Caris-Veyrat, C., M.J. Amiot, R. Ramasseul, and J.C. Marchon, Mild oxidative cleavage of beta,beta-carotene by dioxygen induced by a ruthenium porphyrin catalyst: characterization of products and of some possible intermediates. *New J. Chem.*, **2001**. 25(2): p. 203-206.
75. Groves, J.T. and R. Quinn, Aerobic epoxidation of olefins with ruthenium porphyrin catalysts. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**. 107: p. 5790-5792.
76. Dhuique-Mayer, C., M. Tbatou, M. Carail, C. Caris-Veyrat, M. Dornier, and M.J. Amiot, Thermal degradation of antioxidant micronutrients in Citrus juice: Kinetics and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. 55(10): p. 4209-4216.
77. Kanasawud, P. and J.C. Crouzet, mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium.1 beta- carotene. *J.Agric Food Chem.*, **1990**. 38(1): p. 237-243.

78. Edmunds, F.S. and R.A. Johnstone, Constituents of Cigarette Smoke. IX. the Pyrolysis of Polyenes and the Formation of Aromatic Hydrocarbons. *J Chem Soc*, **1965**. 46: p. 2892-7.
79. Marty, C. and C. Berset, Degradation of trans-beta-carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. *Journal of Food Science*, **1986**. 51(0).
80. Marty, C. and C. Berset, Factors Affecting the thermal degradation of all-trans-beta-carotene. *J.Agric.Food Chem.*, **1990**. 38(4): p. 1063-1067.
81. Ouyang, J.M., H. Daun, S.S. Chang, and C.T. Ho, Formation of Carbonyl-Compounds from Beta-Carotene During Palm Oil Deodorization. *Journal of Food Science*, **1980**. 45(5): p. 1214-&.
82. Onyewu, P.N., C.-T. Ho, and H. Daun, Characterization of β -carotene thermal degradation products in a model food system. *JAOCs*, **1986**. 63(11): p. 1437-1441.
83. Rios, J.J., E. Fernandez-Garcia, M.I. Minguez-Mosquera, and A. Perez-Galvez, Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry*, **2008**. 106(3): p. 1145-1153.
84. Ernst, H., Recent advances in industrial carotenoid synthesis (vol 74. pg 2213, 2002). *Pure and Applied Chemistry*, **2002**. 74(11): p. 2213-2226.
85. Aareskjold, K. and S. Liaaen-Jensen, Total synthesis of 3,4,3',4'-Tetrahydro-. *Acta Chemica Scandinavica B*, **1984**. 38: p. 43-47.
86. Eidem, A., R. Buchecker, H. Kjosén, and S. Liaaen-Jensen, Bacterial carotenoids. XLVIII. Total syntheses of carotene of the 1,2- dihydro series. *Acta Chemica Scandinavica B*, **1975**. 29: p. 1015-1023.
87. Englert, G., K. Noack, and A.E. Broger, Synthesis, isolation and full spectroscopic characterization of eleven (Z)-isomers of (3R,3R')-zeaxanthin. *Helvetica Chimica Acta*, **1991**. 74: p. 969-982.
88. Ito, M., Y. Yamano, S. Sumiya, and A. Wada, Recent Progress in Carotenoid and Retinoid Synthesis. *Pure and Applied Chemistry*, **1994**. 66(5): p. 939-946.
89. Lanz, M., B. Bartels, and H. Pfander, C-45- and C-50-carotenoids .7. Total synthesis of (all-E,2R,6R,2'R,6'R)- and (all-E,2R,6S,2'R,6'S)-2,2'-bis(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-gamma,gamma -carotene (sarcinaxanthin). *Helvetica Chimica Acta*, **1997**. 80(3): p. 804-817.
90. Traber, B. and H. Pfander, 2,6-cyclolycopene-1,5-diol: Total synthesis of a naturally occurring oxidation product of lycopene. *Tetrahedron*, **1998**. 54(31): p. 9011-9022.
91. Jackson, H.L., G.T. Nadolski, C. Braun, and S.F. Lockwood, Efficient total synthesis of lycophyll (psi,psi-carotene-16,16'-diol). *Organic Process Research & Development*, **2005**. 9(6): p. 830-836.

92. Kjosén, H. and S. Liaaen-Jensen, Total synthesis of 1,2-dihydro- and 1,2,1',2'-tetrahydroycopene. *Acta Chemica Scandinavica*, **1970**. 24(6): p. 2259.
93. Bernhard, K. and H. Mayer, Recent Advances in the Synthesis of Achiral Carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, **1991**. 63(1): p. 35-44.
94. Wittig, G. and G. Geissler, *Liebigs Ann. Chem.*, **1953**: p. 44-57.
95. Maryanoff, B.E. and A.B. Reitz, The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects. *Chemical Reviews*, **1989**. 89(4): p. 863-927.
96. Maryanoff, B.E., A.B. Reitz, and B.A. Duhl-Emswiler, Stereochemistry of the Wittig reaction. Effect of nucleophilic groups in the phosphonium ylide. *Journal of the American Chemical Society*, **1985**. 107(1): p. 217-226.
97. Reitz, A.B., M.S. Mutter, and B.E. Maryanoff, Observation of cis and trans oxaphosphetanes in the Wittig reaction by high-field phosphorus-31 NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, **1984**. 106(6): p. 1873-1875.
98. Maryanoff, B.E., A.B. Reitz, M.S. Mutter, R.R. Whittle, and R.A. Olofson, Stereochemistry and mechanism of the Wittig reaction. Diastomeric reaction intermediates and analysis of the reaction course. *Journal of the American Chemical Society*, **1986**. 108(24): p. 7664-7678.
99. Maryanoff, B.E., A.B. Reitz, M.S. Mutter, R.R. Inners, and H.R. Almond, Detailed rate studies on the Wittig reaction of nonstabilized phosphorus ylides via phosphorus-31, proton, carbon-13 NMR spectroscopy. Insight into kinetic vs. thermodynamic control of stereochemistry. *Journal of the American Chemical Society*, **1985**. 107(4): p. 1068-1070.
100. Vedejs, E., T. Fleck, and S. Hara, Evidence against reversible Wittig reaction of a stabilized ylide: high (E)-olefin selectivity under kinetic control. *The Journal of Organic Chemistry*, **1987**. 52(20): p. 4637-4639.
101. Vedejs, E. and T.J. Fleck, Kinetic (not equilibrium) factors are dominant in Wittig reactions of conjugated ylides. *Journal of the American Chemical Society*, **1989**. 111(15): p. 5861-5871.
102. Vedejs, E. and P.L. Fuchs, Olefin inversion by the phosphorus betaine method. *Journal of the American Chemical Society*, **1971**. 93(16): p. 4070-4072.
103. Vedejs, E. and C.F. Marth, Mechanism of the Wittig reaction: the role of substituents at phosphorus. *Journal of the American Chemical Society*, **1988**. 110(12): p. 3948-3958.
104. Vedejs, E. and C.F. Marth, Oxaphosphetane pseudorotation: rates and mechanistic significance in the Wittig reaction. *Journal of the American Chemical Society*, **1989**. 111(4): p. 1519-1520.
105. Vedejs, E. and C.F. Marth, Mechanism of Wittig reaction: evidence against betaine intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, **1990**. 112(10): p. 3905-3909.

106. Vedejs, E. and K.A.J. Snoble, Direct observation of oxaphosphetanes from typical Wittig reactions. *Journal of the American Chemical Society*, **1973**. 95(17): p. 5778-5780.
107. Acemoglu, M. and H. Eugster, (5R,6S,5'R,6'S)-5,6,5',6'-diepoxy-beta,beta-carotin: syntheses, spektroskopische, chiroptische und chromatographische eigenschaften. *Helvetica Chimica Acta*, **1984**. 67(1).
108. Buchecker, R., U. Marti, and H. Eugster, Synthese von optisch aktiven carotinoiden mit 3,5,6-trihydroxy-5,6-dihydro-beta-endgruppen. *Helvetica Chimica Acta*, **1984**. 67.
109. Gebhard, R., K. Hoef, C.A. Violette, H.J.M. Groot, H.A. Frank, and J. Lugtenburg, ¹³C Magic angle spinning NMR evidence for a 15,15' - Z configuration of the spheroidene chromophore in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center; synthesis of ¹³C- 2H-labelled spheroidene. *Pure and Applied Chemistry*, **1991**. 63(1): p. 115-122.
110. Gebhard, R., K. Van der Hoef, L.A.W. M., and J. Lugtenburg, Synthesis and spectroscopy of (14'-¹³C)- and (15'-¹³C) spheroidene. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1990**. 109: p. 378-387.
111. Haag, A. and H. Eugster, Isozeaxanthine: chiralität und enantioselektive synthese von (4R,4'R)-Isozeaxanthin((-)-(4R,4'R)-beta,beta-4,4'-diol. *Helvetica Chimica Acta*, **1982**. 65(6).
112. Boutagy, J. and R. Thomas, Olefin synthesis with organic phosphonate carbanions. *Chemical reviews*, **1974**. 74(1): p. 87-99.
113. Julia, M., M. Launay, J.-P. Stacino, and J.-N. Verpeaux, Synthèse stéréosélective des sulfones vinyliques Z et E. *Tetrahedron Letters*, **1982**. 23(24): p. 2465-2468.
114. Julia, M. and J.-M. Paris, Syntheses a l'aide de sulfones v(+)- methode de synthese generale de doubles liaisons. *Tetrahedron Letters*, **1973**. 14(49): p. 4833-4836.
115. Chabardes, P., J.P. Decor, and J. Varagnat, Elimination de groupements arylsulfonyles en milieu heterogene. *Tetrahedron*, **1977**. 33(21): p. 2799-2805.
116. Cheol Jeong, Y., M. Ji, J. Sup Lee, J.-D. Yang, J. Jin, W. Baik, and S. Koo, General and systematic synthetic entry to carotenoid natural products. *Tetrahedron*, **2004**. 60(45): p. 10181-10185.
117. Otera, J., H. Misawa, T. Onishi, S. Suzuki, and Y. Fujita, Stereocontrolled synthesis of vitamin A through a double elimination reaction. A novel convergent C10 + C10 route. *The Journal of Organic Chemistry*, **2002**. 51(20): p. 3834-3838.
118. Choi, E., J.E. Yeo, and S. Koo, Expedient and practical synthesis of lycopene. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2008**. 350(3): p. 365-369.
119. Guha, S.K. and S. Koo, Sulfone Coupling and Double-Elimination Strategy for Carotenoid Synthesis. *J. Org. Chem.*, **2005**. 70(23): p. 9662-9665.

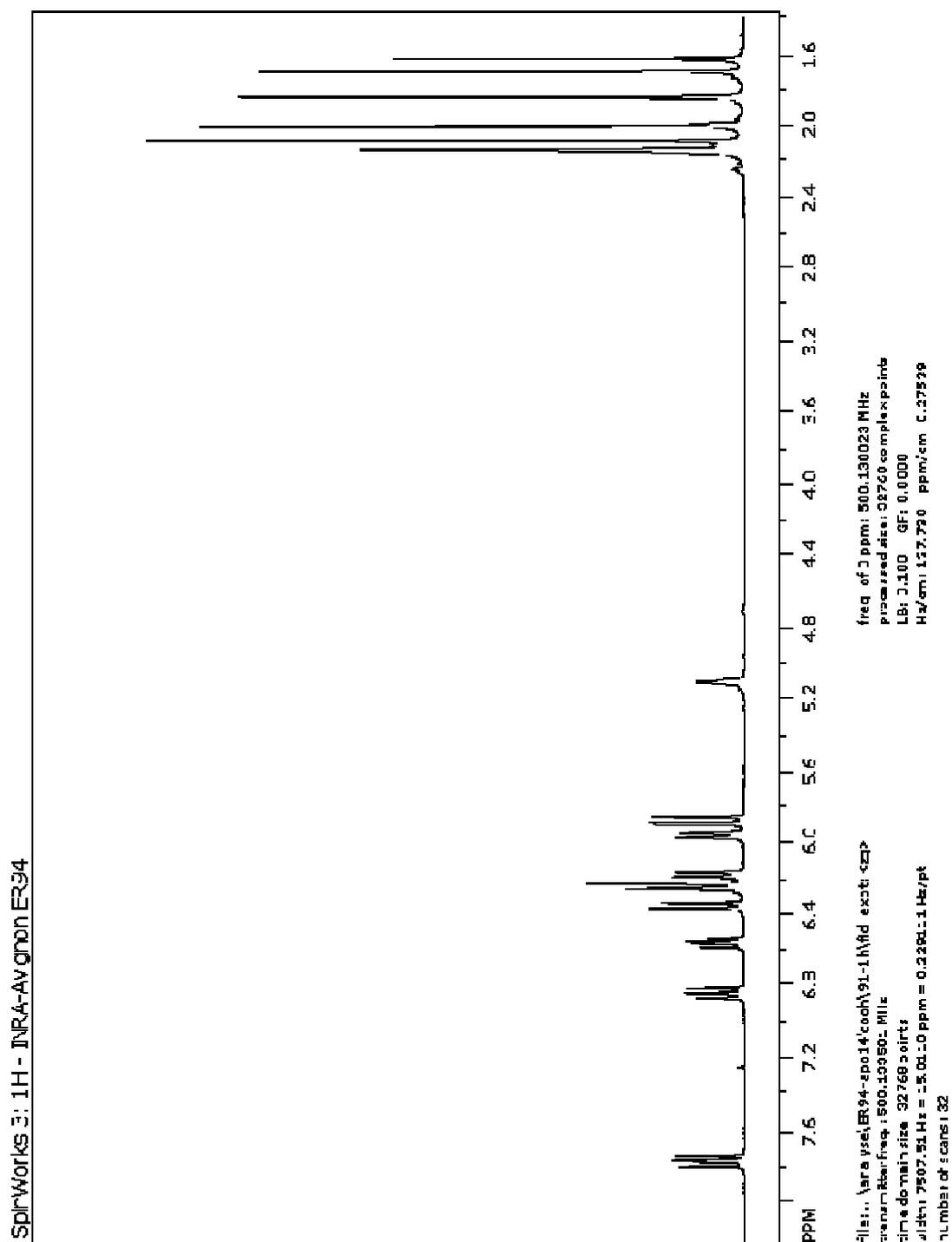
120. Yokoyama, H. and M.J. White, Citrus Carotenoids. II. The Structure of Citranaxanthin, a New Carotenoid Ketone. *The Journal of Organic Chemistry*, **2002**. 30(7): p. 2481-2482.
121. Frederico, D., M.G. Constantino, and P.M. Donate, Total Synthesis of (3S, 5R, 3' S, 5' R)-Capsorubin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2009**. 20(5): p. 888-U148.
122. Ito, M., Y. Yamano, C. Tode, and A. Wada, Carotenoid synthesis: Retrospect and recent progress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2009**. 483(2): p. 224-228.
123. Murakami, Y., M. Nakano, T. Shimofusa, N. Furuichi, and S. Katsumura, Total synthesis of paracentrone, C-31-allenic apo-carotenoid. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2005**. 3(8): p. 1372-1374.
124. Vaz, B., R. Alvarez, R. Bruckner, and A.R. deLera, The Stille Reaction in the Synthesis of Carotenoid Butenolides: Synthesis of 6'-epi-Peridinin. *Org. Lett.*, **2005**. 7(4): p. 545-548.
125. Dominguez, B., B. Iglesias, and A.R. de Lera, Tetraenylstannanes in the synthesis of retinoic acid and its ring-modified analogues. *Journal of Organic Chemistry*, **1998**. 63(12): p. 4135-4139.
126. Domínguez, B., B. Iglesias, and A.R. de Lera, A comprehensive survey of stille-type Csp²-Csp² single bond forming processes in the synthesis of retinoic acid and analogs. *Tetrahedron*, **1999**. 55(52): p. 15071-15098.
127. Dominguez, M., R. Alvarez, S. Martras, J. Farres, X. Pares, and A.R. de Lera, Synthesis of ring-oxidized retinoids as substrates of mouse class I alcohol dehydrogenase (ADH1). *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2004**. 2(22): p. 3368-3373.
128. Vaz, B., R. Alvarez, and A.R. de Lera, Synthesis of symmetrical carotenoids by a two-fold Stille reaction. *Journal of Organic Chemistry*, **2002**. 67(14): p. 5040-5043.
129. Vaz, B., M. Dominguez, R. Alvarez, and A.R. de Lera, The Stille Reaction in the Synthesis of the C37-Norcarotenoid Butenolide Pyrroloxanthin. Scope and Limitations. *The Journal of Organic Chemistry*, **2006**. 71(16): p. 5914-5920.
130. Wada, A., Y. Ieki, S. Nakamura, and M. Ito, Palladium-catalyzed coupling reaction of an enol nonaflate with (vinyl)tributylstannanes and acetylenes: A highly stereoselective synthesis of 8,18-C-13(2)-labeled retinal. *Synthesis-Stuttgart*, **2005**(10): p. 1581-1588.
131. Alvarez, R., B. Dominguez, and A.R. de Lera, An expedient stereocontrolled synthesis of 7-CIS-retinoids. *Synthetic Communications*, **2001**. 31(13): p. 2083-2087.
132. Alvarez, R., M. Dominguez, Y. Pazos, F. Sussman, and A.R. de Lera, (9Z)- and (11Z)-8-methylretinals for artificial visual pigment studies: Stereoselective synthesis, structure, and binding models. *Chemistry-a European Journal*, **2003**. 9(23): p. 5821-5831.
133. Torrado, A., B. Iglesias, S. Lopez, and A.R. Delera, The Suzuki Reaction in Stereocontrolled Polyene Synthesis - Retinol (Vitamin-a), Its 9-Demethyl and/or 13-Demethyl Analogs, and Related 9-Demethyl-Dihydroretinoids. *Tetrahedron*, **1995**. 51(8): p. 2435-2454.

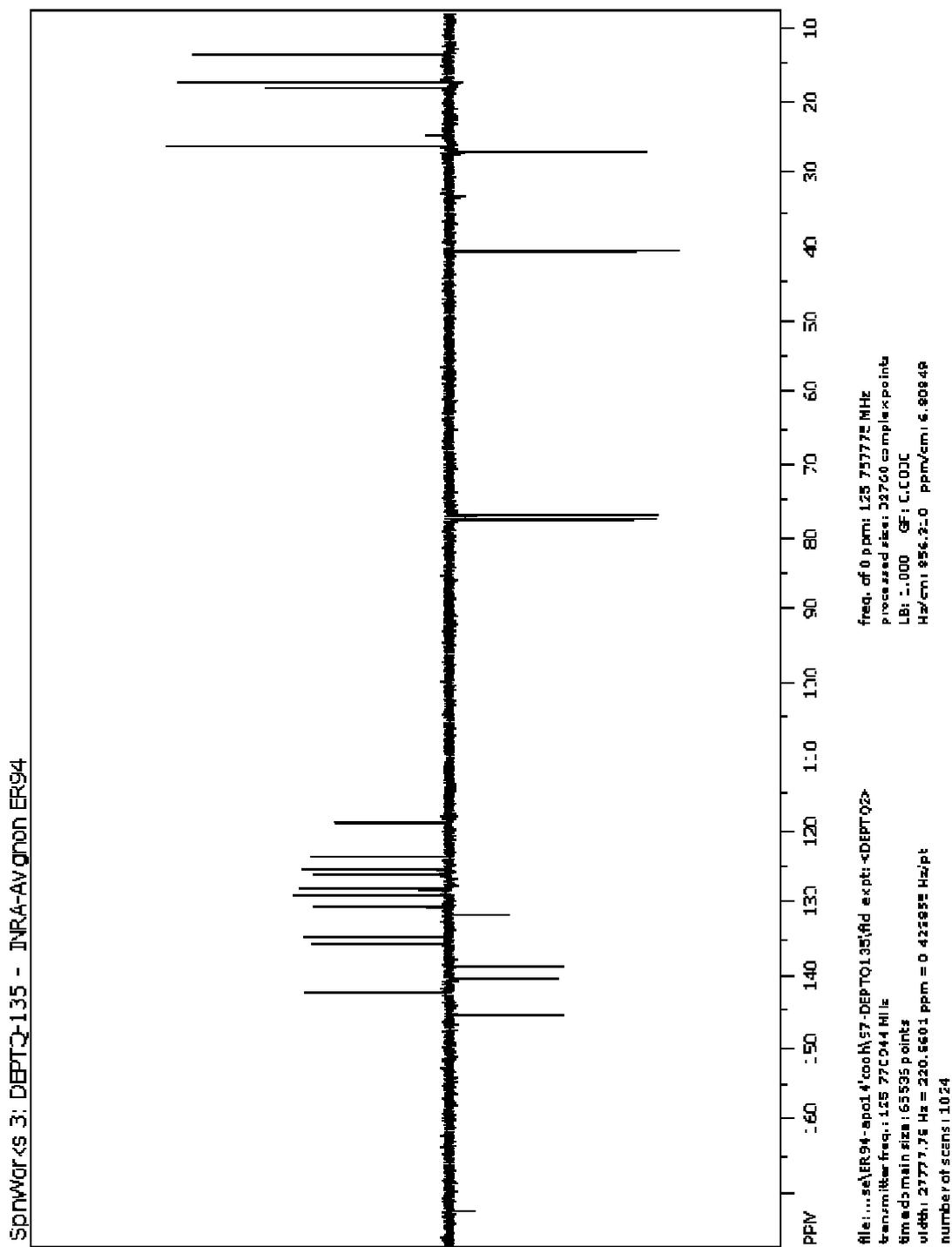
134. Uenishi, J.i., K. Matsui, and A. Wada, Trienylboronic acid, a versatile coupling tool for retinoid synthesis; stereospecific synthesis of 13-aryl substituted (11Z)-retinal. *Tetrahedron Letters*, **2003**. 44(15): p. 3093-3096.
135. Muller, R.K., K. Bernhard, A. Giger, G. Moine, and U. Hengartner, (E/Z)-isomeric carotenes. *Pure and Applied Chemistry*, **1997**. 69(10): p. 2039-2046.
136. Wegner, C., Process for preparing phosphonium salts. United State Patent, **2002**. 6,423,873
137. Singh, H., J. John, and H.R. Cama, oxidation of beta-apocarotenals to beta-apocarotenoic acids with silver oxide. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **1973**. 43: p. 148-149.
138. Lide, d.R., *Handbook of chemistry and physics*. 85 ed. **2004**: CRC PRESS.
139. Pearl, I.A., Vanillic Acid. *Organic Syntheses*, **1963**. 4: p. 101.
140. Bal, B.S., W.E. Childers, and H.W. Pinnick, Oxidation of [alpha],[beta]-un saturated aldehydes. *Tetrahedron*, **1981**. 37(11): p. 2091-2096.
141. Boyer, F.D. and P.H. Ducrot, Synthesis of agarofuran antifeedants, part II: Stereoselective construction of the tetrahydrofuran ring. *Synthesis-Stuttgart*, **2000**(13): p. 1868-1877.
142. Dalcanale, E. and F. Montanari, Selective oxidation of aldehydes to carboxylic acids with sodium chlorite-hydrogen peroxide. *J. Org. Chem.*, **1986**. 51(4): p. 567-569.
143. Corey, E.J., N.W. Gilman, and B.E. Ganem, New methods for the oxidation of aldehydes to carboxylic acids and esters. *Journal of the American Chemical Society*, **2002**. 90(20): p. 5616-5617.
144. Halliwell, B., K.C. Zhao, and M. Whiteman, The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *Free Radical Research*, **2000**. 33(6): p. 819-830.
145. Tyssandier, V., E. Reboul, J.F. Dumas, C. Bougteloup-Demange, M. Armand, J. Marcand, M. Sallas, and P. Borel, Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **2003**. 284(6): p. G913-G923.
146. Vulcain, E., *Propriétés antioxydantes de la peroxydation lipidique initiée par des métalloprotéines*. 2005, Avignon. p. 387.
147. Benaziz, A., G. Britton, and T.W. Goodwin, Carotene Epoxides of *Lycopersicon-Esculentum*. *Phytochemistry*, **1973**. 12(11): p. 2759-2764.
148. Niki, E., Y. Yoshida, Y. Saito, and N. Noguchi, Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**. 338(1): p. 668-676.

149. Frankel, E.N. and A.S. Meyer, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**. 80(13): p. 1925-1941.
150. Lorrain, B., modelisation chimique du pouvoir antioxydant des polyphénols dans le compartiment gastrique, inhibition de l'oxydation lipidique initiée par la metmyoglobine dans des émulsions stabilisées par la sérum albumine ou les phospholipîdes. 2008, Avignon. p. 319.
151. Gorelik, S., T. Lapidot, I. Shaham, R. Granit, M. Ligumsky, R. Kohen, and J. Kanner, Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: Health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**. 53(9): p. 3397-3402.
152. He, G.L., R.A. Shankar, M. Chzhan, A. Samouilov, P. Kuppusamy, and J.L. Zweier, Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1999**. 96(8): p. 4586-4591.
153. Hillman, K., A.L. Whyte, and C.S. Stewart, Dissolved-Oxygen in the Porcine Gastrointestinal-Tract. *Letters in Applied Microbiology*, **1993**. 16(6): p. 299-302.
154. Alluis, B., Modifications chimiques de flavonoïdes, étude de leurs pouvoirs complexant (protéines, métaux, pigments) et antioxydants. 2000, Université Claude Bernard de Lyon I.
155. Peters, T., All About Albumin : Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, ed. A. Press. **1995**.
156. He, X.M. and D.C. Carter, Atomic-Structure and Chemistry of Human Serum-Albumin. *Nature*, **1992**. 358(6383): p. 209-215.
157. Carter, D.C. and J.X. Ho, Structure of Serum-Albumin, in *Advances in Protein Chemistry*, Vol 45. **1994**. p. 153-203.
158. Bhattacharya, A.A., S. Curry, and N.P. Franks, Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin - High resolution crystal structures. *Journal of Biological Chemistry*, **2000**. 275(49): p. 38731-38738.
159. Fitos, I., J. Visy, and M. Simonyi, Species-dependency in chiral-drug recognition of serum albumin studied by chromatographic methods. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2002**. 54(1-3): p. 71-84.
160. Epps, D.E., T.J. Raub, and F.J. Kezdy, A General, Wide-Range Spectrofluorometric Method for Measuring the Site-Specific Affinities of Drugs toward Human Serum-Albumin. *Analytical Biochemistry*, **1995**. 227(2): p. 342-350.
161. Bhattacharya, A.A., T. Grune, and S. Curry, Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, **2000**. 303(5): p. 721-732.

162. Petitpas, I., T. Grune, A.A. Bhattacharya, and S. Curry, Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Molecular Biology*, **2001**. 314(5): p. 955-960.
163. Galland, S., N. Rakotomanomana, C. Dufour, N. Mora, and O. Dangles, Synthesis of hydroxycinnamic acid glucuronides and investigation of their affinity for human serum albumin. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2008**. 6(22): p. 4253-4260.
164. Gottlieb, H.E., V. Kotlyar, and A. Nudelman, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of Organic Chemistry*, **1997**. 62(21): p. 7512-7515.
165. Gaillard, O., La myoglobineMyoglobin. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **2003**. 18(2): p. 64-66.

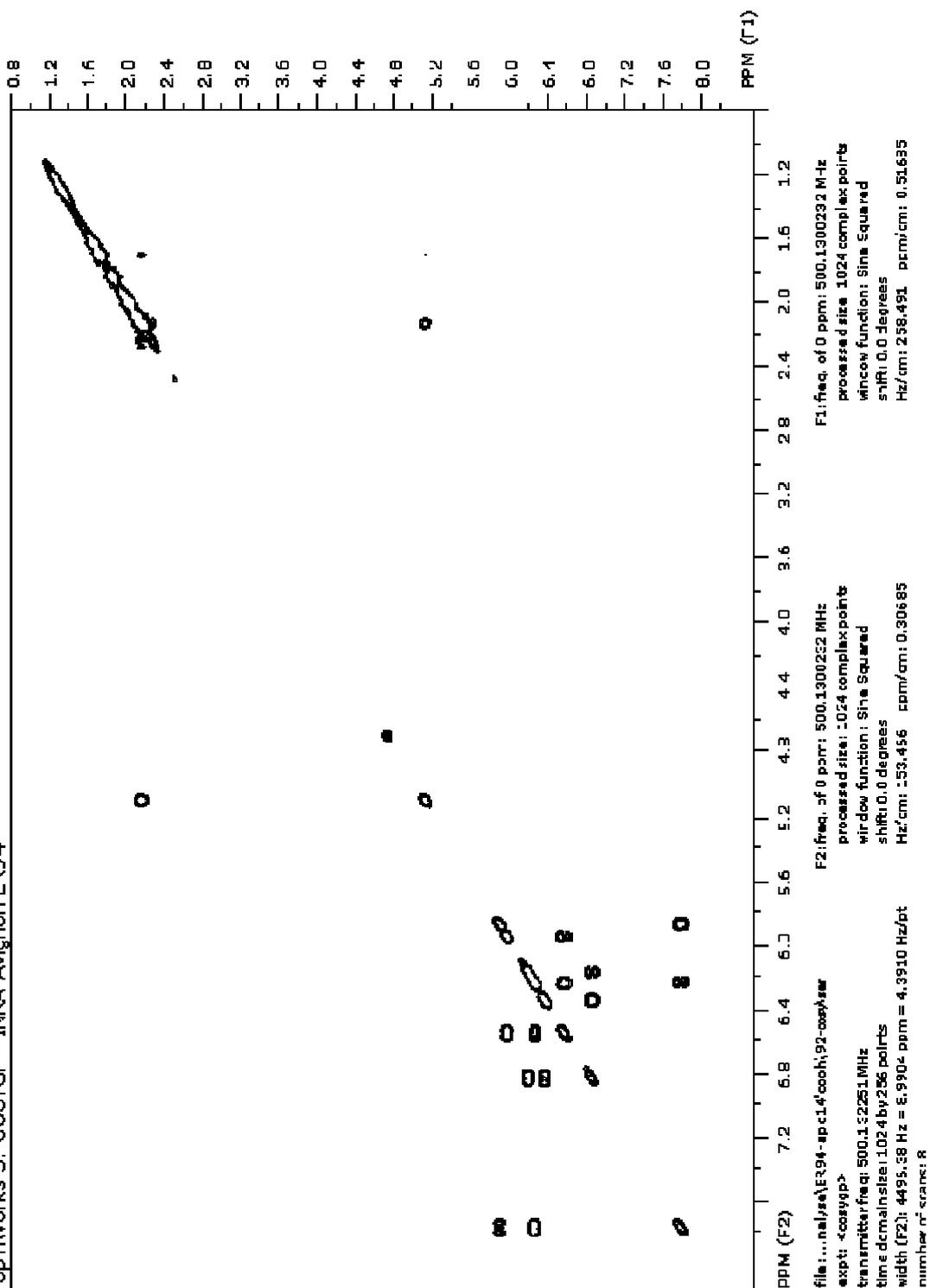
Annexes

AnnexesAnnexe 1 : spectre RMN homonucléaire 1D ^1H de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18



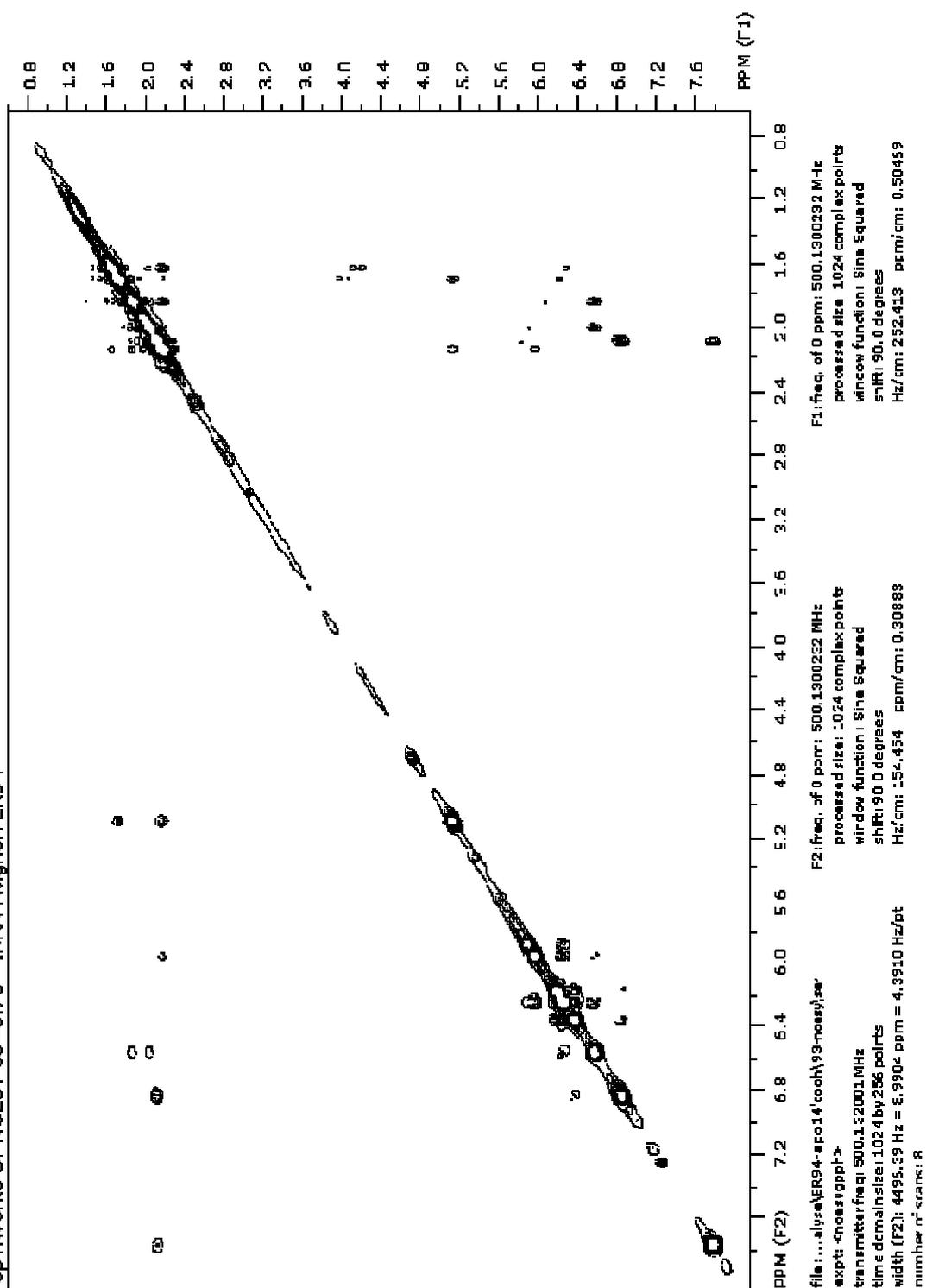
Annexe 2 : spectre RMN homonucléaire 1D DEPT 135 de l'acide apo-10'-lycopenoïque 18

SpinWorks 3: COSYGP - INRA-AviGiron E394



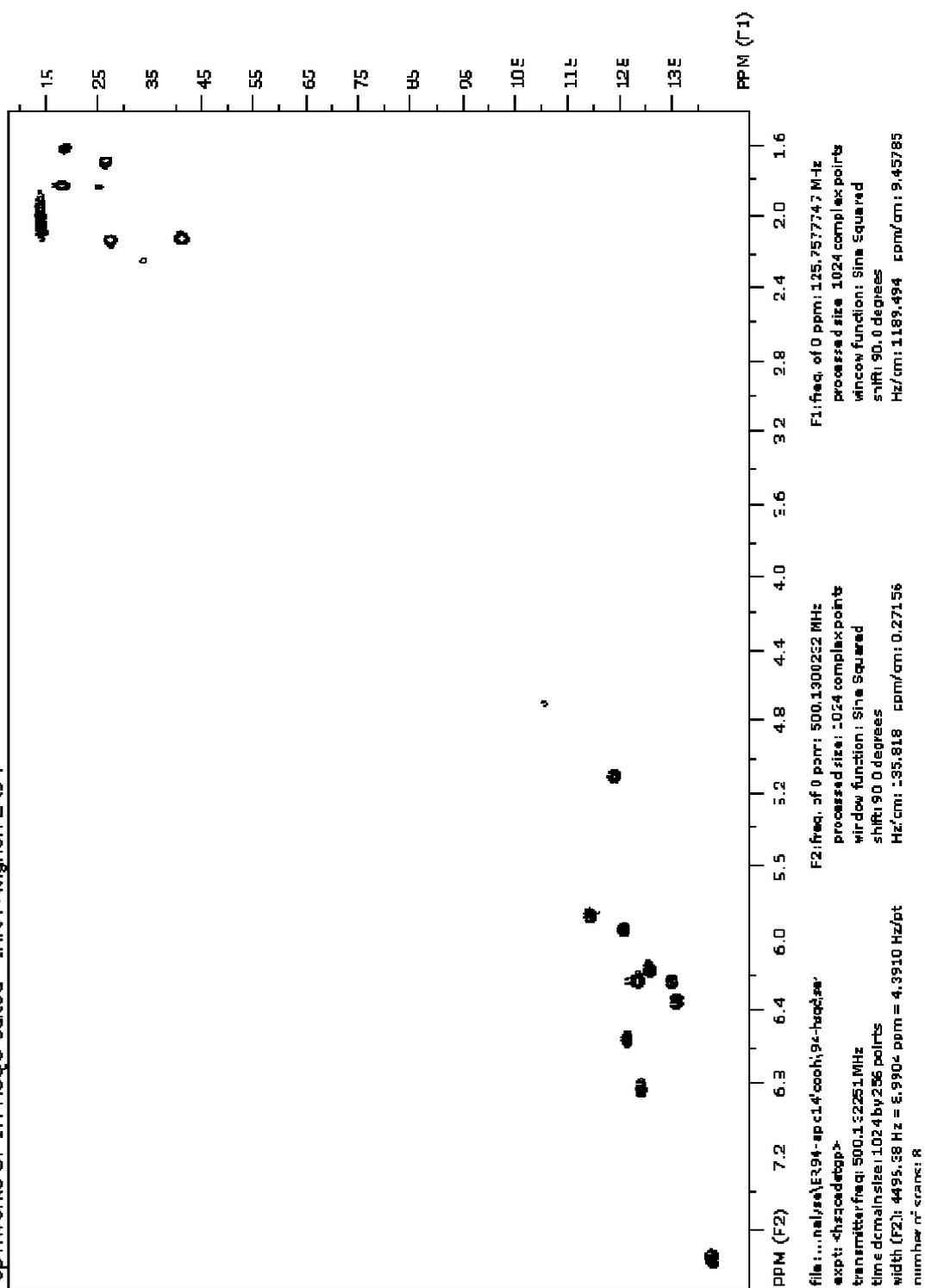
Annexe 3 : spectre RMN homonucléaire 2D COSY de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18

SpinWorks 3: NOESY c8=0.7 s - INRA-Avignon ERS4

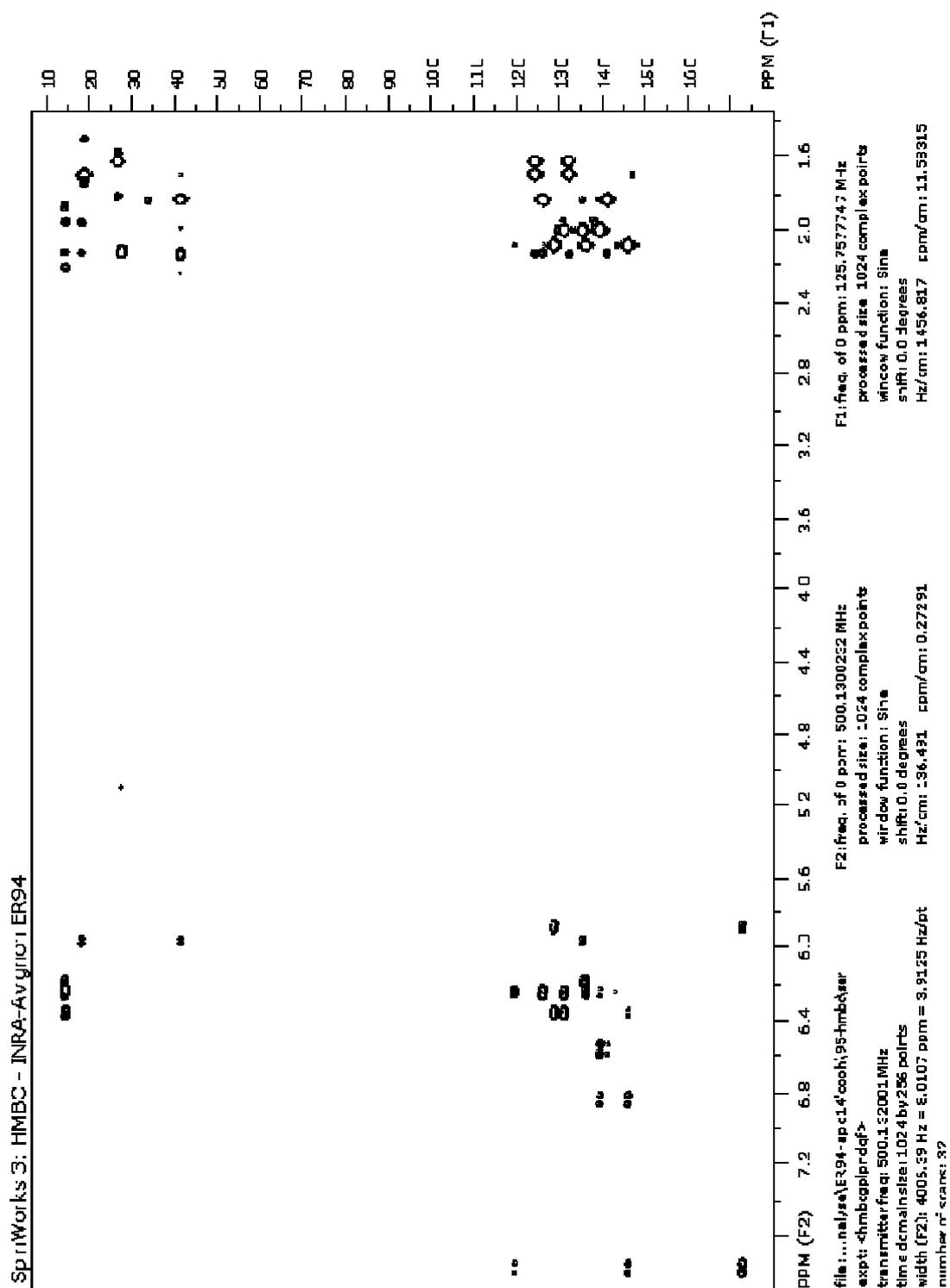


Annexe 4 : spectre RMN homonucléaire 2D COSY de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18

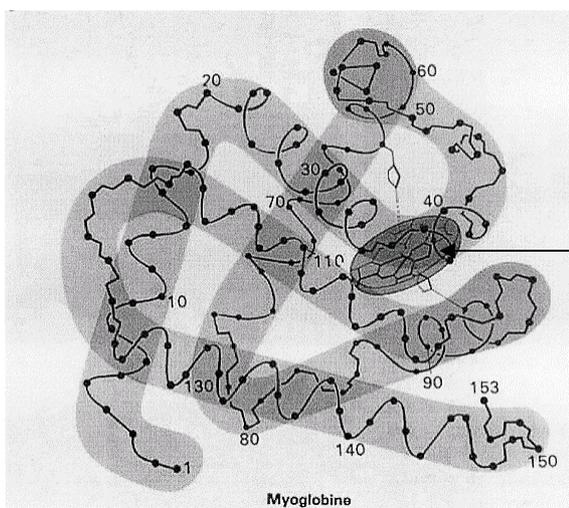
SpinWorks 3: 1H HSQC edited - INRA-Avignon1 ER94



Annexe 5 : spectre RMN hétéronucléaire 2D HSQC de l'acide apo-10'-lycopénoïque 18

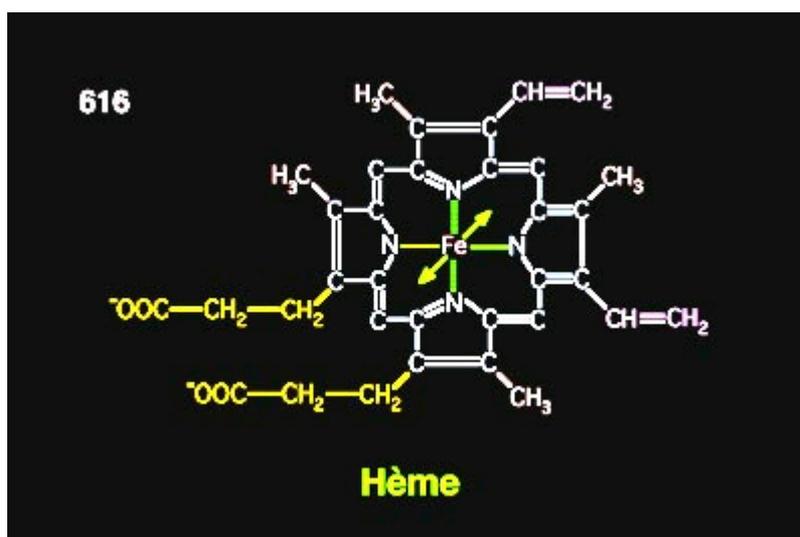


Annexe 6 : spectre RMN hétéronucléaire 2D HMBC de l'acide apo-10'-lycopenoïque 18



Site héminique responsable de l'initiation de la peroxydation de l'acide linoléique

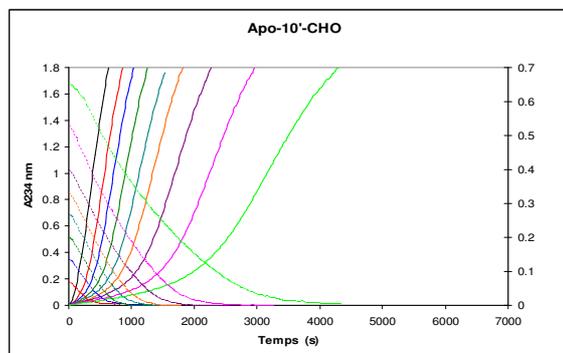
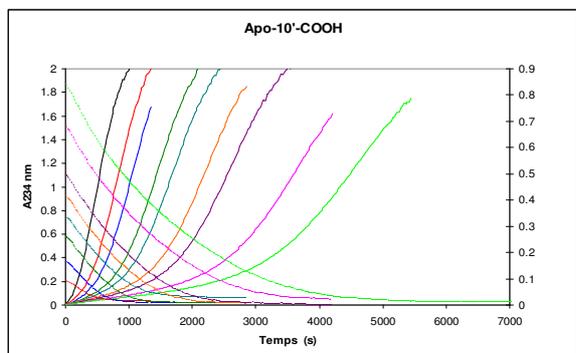
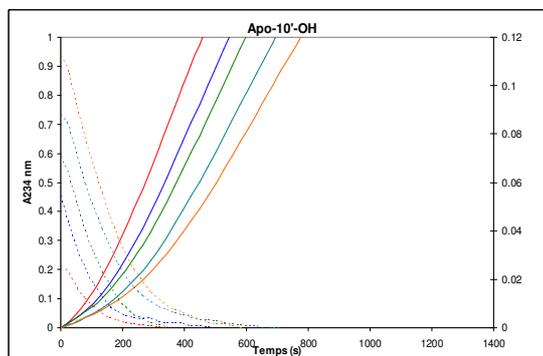
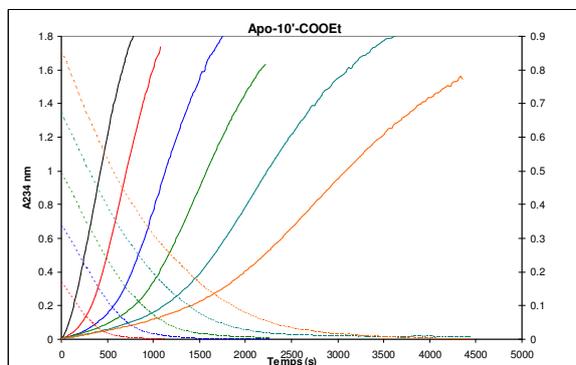
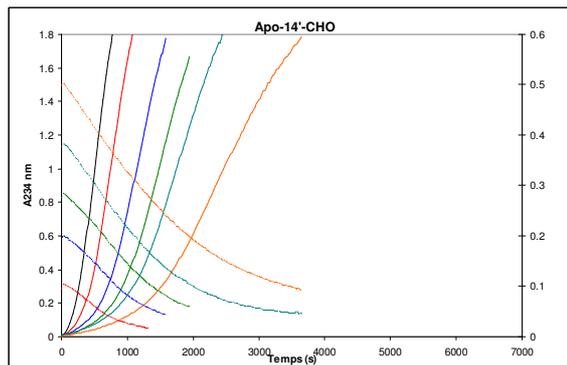
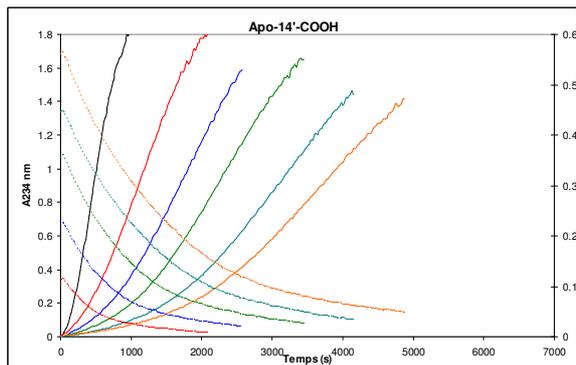
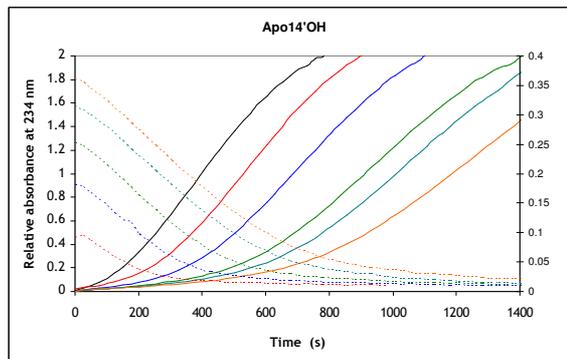
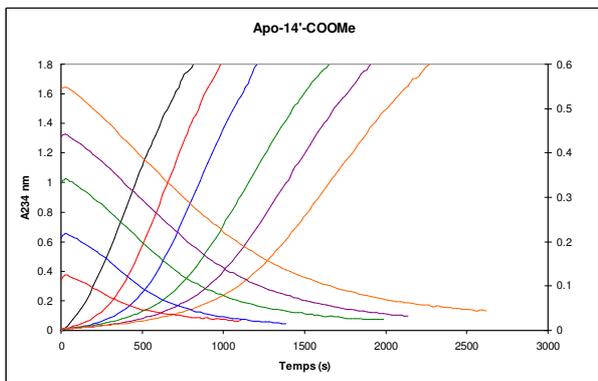
Structure spatiale de la myoglobine[165]

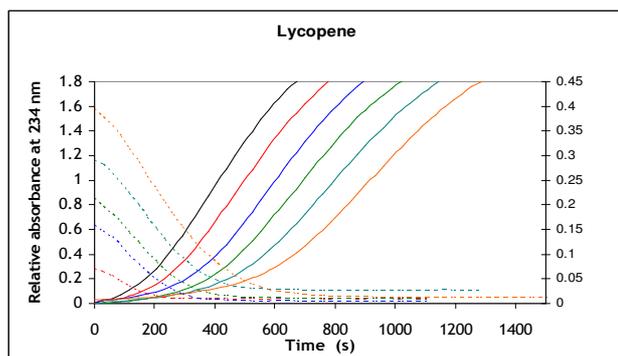
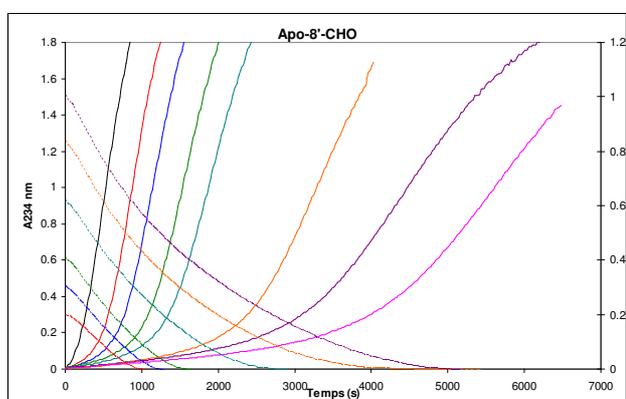
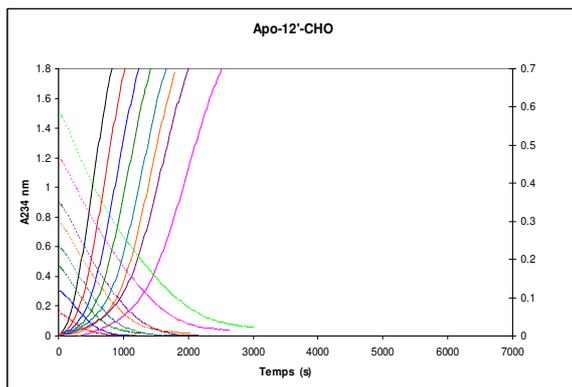


<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/SFbioch/POLY.Chp.3.2.html>

Structure de l'hème

Annexe 7 : schémas structuraux de la myoglobine et de son site l'hémunique





Annexe 8 : cinétique des apo-lycopénoïdes pour le calcul du PAO

```

// Model complexation reversible 1:1
IndVars: V
DepVars: I,LT,C,L,P
Params: K,F0,F1
LT=1E-3*V/(2000+V)
C=3.75E-6*2000/(2000+V)
I=(F0+F1*K*L)*P*exp(-E*0.65*LT)
L=LT-K*P*L
P=C/(1+K*L)
0<L<LT
0<P<C
E=6630+19570
K>0
// Parameter values:
K=3E5
F0=1E7
F1=1E6

```

V: volume (en microL) de la solution 1 mM de ligand ajouté

I: intensité de fluorescence

LT: concentration totale de ligand

L: concentration de ligand libre (non lié à HSA)

C: concentration totale de HSA

P: concentration de HSA libre

F0: fluorescence molaire de HSA

F1: fluorescence molaire du complexe

E = somme des coefficients d'absorption molaires du ligand à 295 nm et 340 nm

Facteur 0.65: distance moyenne (en cm) de détection de la lumière émise perpendiculairement au faisceau incident

Annexe 9 : programme de calcul des constantes d'affinités (Scientist, MicroMath)

Fin

Résumé

Les études épidémiologiques ont montré qu'une consommation régulière en tomate et ses produits dérivés de tomate permet de lutter contre diverses pathologies dégénératives associées notamment au stress oxydant (maladies cardiovasculaires, cancers etc..). Les effets bénéfiques pourraient être dus au lycopène pigment rouge de la tomate et/ou à ses métabolites qui interviendraient dans ce processus soit de part leurs capacités antioxydantes, soit au travers de la régulation de l'expression de gènes. Dans ce contexte, quatre familles de molécules dérivées du lycopène, pouvant être des métabolites potentiels, ont été ciblées pour la synthèse organique : les apo-11-lycopénoïdes, les apo-14'-lycopénoïdes, les apo-12'-lycopénoïdes et les apo-10'-lycopénoïdes. Chacune des familles a été synthétisée, via des réactions de couplages tels que *Wittig* et *Horner-Wadsworth-Emmons*, avec quatre fonctions chimiques terminales : ester, acide carboxylique, alcool et aldéhyde. Par la suite deux types de propriétés physico-chimiques des composés synthétisés ont été étudiés : mesure du pouvoir antioxydant dans des conditions expérimentales mimant un stress oxydant dans le compartiment gastro-intestinal (inhibition de la peroxydation lipidique initiée par la metmyoglobine en milieu micellaire) et une étude d'interaction avec l'albumine de sérum humain, protéine impliquée dans le transport des acides gras dans le plasma.

Mots-clés : métabolite, apo-lycopénoïde, couplage *Wittig*, antioxydant, peroxydation lipidique, albumine

Abstract

Epidemiological studies have shown that regular consumption of tomatoes and its derived products participate to the prevention of degenerative pathologies associated with oxidative stress (cardiovascular disease, cancers). The beneficial effects could come from lycopene and/or its metabolites. In this context four families of lycopene derived compounds, mimicking possible metabolites, were targeted to be synthesized: the apo-11- lycopeneoids, the apo-14'- lycopeneoids, the apo-12'- lycopeneoids and the apo-10'-lycopeneoids. For each family, *Wittig* and *Horner-Wadsworth-Emmons* coupling reaction were used and four different ending functions were obtained: ester, carboxylic acid, alcohol and aldehyde. Then two physico-chemical properties were studied: antioxidant effect mimicking oxidative stress in the gastro-intestinal tract (inhibition of lipidic peroxidation initiated by metmyoglobin protein in micellar medium) and study of the interaction with human serum albumin, a protein involved in the transport of fatty acid in the plasma.

Keywords: metabolite, apo-lycopeneoid, *Wittig* coupling, antioxidant, lipidic peroxidation, albumin.