

NOUVEAUX INDUCTEURS COVALENTS DE LA VOIE DE SIGNALISATION KEAP1/NRF2/ARE

par

Ludovic Deny

Thèse présentée au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Décembre 2016

Le 23 décembre 2016

*le jury a accepté la thèse de Monsieur Ludovic Deny
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Guillaume Bélanger

Directeur de recherche

Département de chimie

Professeur Eric Marsault

Codirecteur de recherche

Département de pharmacologie

Professeur Pat Forgione

Évaluateur externe

Université Concordia

Professeur Claude Legault

Évaluateur interne

Département de chimie

Professeur Brigitte Guérin

Évaluateur interne

Département de médecine nucléaire et radiologie

Professeur Patrick Ayotte

Président-rapporteur

Département de chimie

SOMMAIRE

Cette thèse fait état de la découverte de nouveaux inducteurs covalents de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE. Cette voie est un mécanisme essentiel de défense cellulaire face au stress oxydant. La modulation de cette voie représente donc un potentiel pour le traitement de maladies et de conditions reliées à l'exposition au stress oxydant.

Le premier chapitre introduit le couple Keap1/Nrf2 qui est la pièce maîtresse qui régule la protection offerte par ce mécanisme. Son fonctionnement est détaillé à l'état basal. Les deux grandes stratégies pour activer ce mécanisme sont également abordées, soit par des inhibiteurs de l'interaction protéine-protéine non covalents, soit par des inducteurs covalents qui tirent avantage des nombreux résidus cystéine présents sur Keap1.

Le deuxième chapitre relate notre analyse de la littérature récente sur les recherches publiées dans ce domaine et comment cette analyse nous a amenés à imaginer une nouvelle classe d'inducteurs de la voie Keap1/Nrf2/ARE. On y trouve aussi la description des tests biologiques utilisés dans cette thèse.

Les chapitres trois à six couvrent la synthèse de toutes les molécules, leurs résultats biologiques et l'analyse. Le travail est décrit en partant d'une hypothèse qui donne lieu à une première série de composés pour la vérifier. Les résultats biologiques sur cette série sont ensuite présentés, et les conclusions amènent à raffiner ou redéfinir l'hypothèse initiale menant à imaginer une deuxième série de molécules, et ainsi de suite.

Le septième et dernier chapitre fait la compilation de toutes les données biologiques avec un essai biologique différent et supplémentaire qui nous a servi à consolider nos conclusions. La discussion est alimentée par des expériences d'arrimage moléculaire qui tentent d'apporter un début de réponse aux nouvelles questions naissant de cette étude et font la transition vers notre vision dans la continuité de ce projet qui est présenté dans un dernier chapitre.

Mots-clés : Keap1, Nrf2, stress oxydant, inducteurs covalents, accepteurs de Nazarov.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie mes directeurs de recherche, les Prs Guillaume Bélanger et Éric Marsault. Ce projet est vraiment passionnant et a été une source de motivation inépuisable pour moi. Merci de m'avoir fait confiance, de votre implication, de votre disponibilité, de vos encouragements et de votre appui. J'ai eu la liberté de m'approprier ce projet et de devenir le chercheur que je suis aujourd'hui. Ces quatre années ont été encore plus formatrices que je l'aurais espéré.

Merci à Hussein Traboulsi qui a réalisé tous les essais biologiques et apporté son expertise. Merci également aux Prs Martin Richter et André Cantin pour leur participation active dans les réflexions clés du projet et au Pr Klaus Klarskov pour sa collaboration. Merci au Dr Pierre-Luc Boudreault pour son aide en modélisation. L'aspect pluridisciplinaire qui me tenait très à cœur et rajoute un poids important à ce projet s'est fait grâce à ces collaborations.

Merci à mes collègues du groupe Bélanger, Jonathan Boudreault et Nicolas Dalmaso qui m'ont accueilli et montré les rouages. J'étais le premier arrivé d'un trio d'immigrés en 2012, merci à Clémence Hauduc et Patrick Boissarie pour avoir partagé cette aventure avec moi. Et, merci à Shawn Gallagher-Duval et Johanne Outin qui nous ont rejoints un peu plus tard. Vous faites vivre ce groupe et donnez une ambiance de travail stimulante et joyeuse.

Merci aux étudiants des autres groupes de recherche qui m'ont permis d'oublier par moment la pression de la recherche. Un merci particulier à Yoann Schneider qui est le meilleur ami qu'on puisse espérer trouver.

Merci aux membres du groupe Marsault pour leur accueil extraordinaire à chaque occasion. En particulier Christine Mona et Éloïc Colombo, vous êtes des amis chers.

Je voudrais remercier l'ensemble des professeurs du département. Plus spécialement les organiciens : les professeurs Jean Lessard, Claude Spino, Claude Legault et Yves Dory. Merci de pousser les étudiants à hausser leurs exigences et atteindre leur plein potentiel.

Merci au Dr Jean-Marc Chapuzet pour sa présence auprès des étudiants, à Luc Tremblay (RMN), René Gagnon et Philippe Venne (MS), Maurice Luc et François Richard (magasin), Philippe Richter et Solange Thériault pour nous donner le meilleur support possible dans nos recherches.

Un merci sans égal à mes parents et à ma sœur qui m'ont toujours poussé et supporté dans toute mes décisions. Vous êtes la meilleure famille qu'on peut avoir et je chéris chaque moment partagé ensemble.

Merci à Alexia Terrier de partager ma vie, de m'encourager et de faire de chaque jour une histoire à raconter. Merci à ta famille qui m'a adopté et à tes enfants qui m'ont transformé et appris à profiter de tous ces petits plaisirs simples de la vie.

Pour finir, je remercie les membres du jury : Pr Pat Forgione, Pr Claude Legault et Pr Brigitte Guérin. Je suis très reconnaissant pour votre travail. Derniers remerciements aux organismes qui ont supporté financièrement mes études doctorales : l'Université de Sherbrooke, le Département de chimie et l'Institut de pharmacologie qui m'a octroyé la bourse Pierre Deslongchamps.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	VII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SCHEMAS	XV
INTRODUCTION	1
I.1 Le stress oxydant (OS)	2
I.2 Intérêt thérapeutique de la voie de signalisation de Keap1/Nrf2/ARE	4
CHAPITRE 1 : LE COUPLE KEAP1-NRF2	7
1.1 Introduction	7
1.2. Inducteurs non-covalents de Nrf2	10
1.2.1. Inhibiteurs d'interaction protéine-protéine	10
1.2.2. L'interface Keap1-Nrf2	11
1.2.3. Les familles d'inhibiteurs de l'interaction Keap1-Nrf2	13
1.3. Inducteurs covalents de Nrf2	15
1.3.1. Les résidus cystéines de Keap1 agissent en tant que senseurs redox	15
1.3.2. Les électrophiles ciblant le domaine BTB	20
1.3.3. La région IVR en tant que site sensoriel d'électrophiles	24
1.3.4. Perspectives	27
CHAPITRE 2 : DESIGN ET ESSAIS BIOLOGIQUES	29
2.1. Design	29
2.2. Description des tests biologiques	31
2.2.1. Introduction	31
2.2.2. Mesure de l'induction de Nrf2 par l'essai luciférase	32
2.2.3. Mesure de l'induction de NQO1 par qPCR	34
2.2.4. Mesure de la cytotoxicité dans l'essai LDH	34
CHAPITRE 3 : LA SERIE DIOXOLANE	35

3.1. Synthèse	35
3.1.1. Monoélectrophiles	35
3.1.2. Bis-électrophiles	39
3.2. Résultats biologiques et interprétation.....	40
CHAPITRE 4 : RAFFINEMENT D'UN ELECTROPHILE D'INTERET	44
4.1. Migration vers la série diméthyle	44
4.1.1. Série méthylène	44
4.1.2. Série cyclopropyle.....	45
4.2. Série diméthyle	47
4.3. Résultats biologiques et interprétation.....	52
4.3.1. Importance de la lipophilie.....	52
4.3.2. Substitutions du motif 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-èncarboxylate de méthyle en γ par des chaînes alkyles	55
4.3.3. Substitutions du motif 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-èncarboxylate de méthyle en γ par des chaînes fonctionnalisées.....	57
CHAPITRE 5 : ÉLECTROPHILES DERIVES DU MOTIF 3,3-DIMETHYL-6-OXOCYCLOHEX-1-ENECARBOXYLATE DE METHYLE.....	60
5.1. Synthèse	60
5.1.1. Modification de l'ester méthylique	60
5.1.2. Modification de la cétone	63
5.1.3. Déplacement du centre électrophile	64
5.1.4. Modification de la taille du cycle.....	66
5.1.5. La variante époxyde	67
5.1.6. Série des dérivés de la tétralone	68
5.2. Résultats biologiques et analyse	75
5.2.1. Remplacement de l'ester méthylique par d'autres groupes électroattracteurs.....	75
5.2.2. Suppression d'un des deux groupes électroattracteurs.....	77
5.2.3. Importance de la conjugaison du dicarbone.....	79
5.2.4. Modification de la taille du cycle.....	85
CHAPITRE 6 : LES BIS-ELECTROPHILES	88
6.1. Synthèse	88
6.2. Résultats biologiques et analyse	91

6.2.1. Les chaînes complètement saturées.....	91
6.2.2. Les chaînes insaturées	93
CHAPITRE 7 : DISCUSSION ET ARRIMAGE MOLECULAIRE.....	96
7.1. Résultats de la mesure de NQO1	96
7.2. Arrimage moléculaire dans le domaine BTB	99
7.3. La région IVR, une cible méconnue	106
7.3.1. Et si la région IVR était notre cible ?	106
7.3.2. Spécificité de la région IVR.....	107
CHAPITRE 8 : PROJETS FUTURS	109
8.1. Synthèse de nouveaux électrophiles	109
8.2. Synthèse de nouveaux bis-électrophiles	111
CONCLUSION GENERALE.....	116
REFERENCES ET NOTES	118
ANNEXE 1 : DONNEES BIOLOGIQUES SUPPLEMENTAIRES	129
ANNEXE 2 : PROTOCOLES DES ESSAIS BIOLOGIQUES.....	132
Essai luciférase	133
Mesure de NQO1 par qPCR	133
Essai LDH.....	133
ANNEXE 3 : PARTIE EXPÉRIMENTALE	134
Remarques générales	135
Modes opératoires.....	136
ANNEXE 4 : SPECTRES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES PROTONS ET DES CARBONES.....	213

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-HNE	4-hydroxynonéal
9-OA-NO ₂	acide (<i>E</i>)-10-nitrooctadéc-9-énoïque
15Δ-PGJ ₂	15-désoxy-Δ ^{12,14} -prostaglandine J ₂
ABT	Albert Pharma Inc.
Ac	acétate
Acac	acétylacétonate anion
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
AhR	récepteur d'aryl d'hydrocarbure
All	allyle
AMP	adénosine monophosphate
ARE	élément de réponse antioxydant
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	adénosine triphosphate
BAK	Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large
BET	Bromodomain and Extra-Terminal
Bn	benzyle
boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BTB	Broad complex, Tamtrack, Bric-a-Brac
C/EBP	CCAAT enhancer binding proteins
CD	concentration à laquelle l'induction de NQO1 double
CDDO	2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl
CNC	Cap'n'Collar
CTR	région C-terminale
Cul3	Keap1-dependent cullin E3-ubiquitin ligase
dba	dibenzylidèneacétone
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
Dex-Mes	dexaméthasone 21-mésylate

DGR	domaine Kelch répété
DIPA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	sulfoxyde de diméthyle
EpRE	élément de réponse électrophile
Et	éthyle
FDA	food and drug association
GP	groupe partant
GSH	glutathion
HEK	Human embryonic kidney
Hepa	hepatoma
Hex	hexyle
HMDS	hexaméthylsilazane
HO-1	heme oxygenase (decycling) 1
IC	constante d'inhibition
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
iPP	interaction protéine-protéine
IVR	région intermédiaire
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
KLHL	Kelch-like
LDA	diisopropylamidure de lithium
LDH	lactate déshydrogénase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
MafG	musculoaponeurotic fibrosarcoma homolog G
MCF	Michigan cancer foundation
MDM2	Mouse double minute 2
Me	méthyle
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1
MLPCN	Molecular Libraries Probe Production Centers Network
MRC	maladie rénale chronique
MS	sclérose en plaques

N / A	non applicable
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Neh	Nrf2-ECH homology
NIH	National Institutes of Health
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NTR	région N-terminale
OS	stress oxydant
PAINS	pan assay interference compounds
PDB	Protein Data Bank
PE	papilloma cells
PGA ₂	prostaglandine A ₂
Ph	phényle
pH	potentiel hydrogène
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPRE	élément de réponse de PPAR
PPi	anion pyrophosphate
PTGR1	prostaglandin reductase 1
qPCR	réaction en chaîne par polymérase quantitative
quant.	quantitative
RG	Roche Group
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNS	espèces azotées réactives
ROS	espèces oxygénées réactives
RTA	Reata Pharmaceuticals
RXR α	retinoid X receptor alpha
SAR	SARcode Bioscience
SEM	erreur standard de la moyenne
SFN	sulforaphane
SNAP	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acétylpénicillamine
t.a.	température ambiante
TBE	tricyclic bis(cyanoenone)

<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyle
<i>t</i> BHQ	<i>tert</i> -butylhydroquinone
THF	tétrahydrofurane
TM	trademark
Ts	toluènesulfonyle
TXN	thiorédoxine
USD	dollars américains
WT	wild type
XRE	élément de réponse xénobiotique

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Synthèse des analogues du schéma 4.5.	48
Tableau 2. Synthèse des analogues du schéma 6.1.	89
Tableau 3. Induction de NQO1 par 10 μ M de 7-1 dans trois types cellulaires.	96
Tableau 4. Induction de NQO1 mesurée par qPCR.	98
Tableau 5. Conditions réactionnelles du schéma 7.4.	113
Tableau G.1 : Valeurs numériques (activité relative \pm SEM) de la figure 50 A.	130
Tableau G.2 : Valeurs numériques (activité relative \pm SEM) de la figure 52 A.	130

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Régulation du système Keap1-Nrf2. ⁶	2
Figure 2. Maladies et conditions pathologiques liées au stress oxydant.	3
Figure 3. Candidats cliniques pour l'induction de Nrf2.	5
Figure 4. Structure du brusatol.	6
Figure 5. La voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE. ³⁷	7
Figure 6. Architecture de Nrf2 et alignement des domaines Neh2 de différentes espèces (h : humain, m : souris, c : poulet, z : poisson zèbre). ³	8
Figure 7. Le complexe Keap1-Nrf2. ³	9
Figure 8. Modèle cyclique de changements de conformation. ⁴²	9
Figure 9. Inhibiteurs d'interactions protéine-protéine en développement clinique. ⁴⁵	11
Figure 10. Surface de liaison de l'interface Keap1-Nrf2 (code PDB : 1X2R). ⁴⁸	12
Figure 11. (A) structure du motif ETGE. (B) Ponts hydrogènes entre le motif ETGE et le domaine DGR. ⁴⁹	12
Figure 12. (A) structure de la tétrahydroisoquinoline 1-1 . (B) Co-cristal de la tétrahydroisoquinoline 1-1 avec le domaine DGR (code PDB : 4N1B). ⁵⁷	14
Figure 13. (A) structure du bis-sulfonamide 1-2 . (B) Arrimage moléculaire du bis-sulfonamide 1-2 avec le domaine DGR (code PDB : 4IQK). ⁵⁹	15
Figure 14. Répartition des 25 résidus cystéines dans Keap1 de la souris. ⁶³	16
Figure 15. Les 19 substitutions d'acides aminés possibles pour Cys ²⁷³ (A) et Cys ²⁸⁸ (B) sur Keap1. Les cellules HEK293T ont été cotransfectées avec 15 ng de NRF2-degronLacZ (NRF2NT-LacZ) et les mutants de Keap1 (5, 15, or 45ng). Après 48 h d'incubation, l'activité relative de β -galactosidase est mesurée. (C) Les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec un vecteur ARE-luciférase, un vecteur exprimant Nrf2 et Keap1 ^{WT} ou les mutants de Keap1 (8 ou 40 ng). Après 24 h de transfection, l'activité relative de luciférase a été mesurée. ⁶³	17
Figure 16. Superposition du cristal de Keap1 BTB (carbones blancs, code PDB : 4CXI) et du cristal de Keap1 ^{C151W} (atomes de carbone en rouge, code PDB : 4CXJ). ³⁹	18
Figure 17. Protéomie.	19
Figure 18. Environnement du résidu Cys ¹⁵¹ dans l'état apo (code PDB : 4CXI). ³⁹	20
Figure 19. Inducteurs électrophiles qui ciblent le résidu Cys ¹⁵¹	21

Figure 20. (A) Interactions entre CDDO et le domaine BTB. (B) Co-cristal de CDDO dans le domaine BTB (code PDB : 4CXT). ³⁹	22
Figure 21. (A) Structure de TX64014. (B) Co-cristal de TX64014 avec le domaine BTB (code PDB : 5DAD). (C) Structure de TX64063. (D) Co-cristal de TX64063 avec le domaine BTB (code PDB : 5DAF). ²⁸	23
Figure 22. Inducteurs covalents ciblant la région IVR.....	25
Figure 23. Superposition des modèles d'homologie de la région IVR basé sur les structures 4PA2 (gris) et 3HVE (rouge).....	26
Figure 24. Électrophiles qui ciblent à la fois le domaine BTB et la région IVR.	28
Figure 25 Design des inducteurs électrophiles.....	29
Figure 26. Relations entre Nrf2 et plusieurs facteurs de transcriptions. ⁶	31
Figure 27. Cellules transfectées pour l'essai luciférase (bleu : cytoplasme, vert : noyau).....	33
Figure 28. Production de luciférase au sein de la cellule (bleu : cytoplasme, vert : noyau).	33
Figure 29. Formation du dianion de cétoesters	36
Figure 30. Série dioxolane. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	42
Figure 31 Influence du dioxolane en α du carbone électrophile.....	44
Figure 32. Comparaison région sud. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	54
Figure 33. Accepteurs de Nazarov avec chaînes alkyles.....	55
Figure 34. Composés 4-17a-g . (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	56
Figure 35. Accepteurs de Nazarov avec chaînes fonctionnalisées.	57
Figure 36. Composés 4-17h-m . (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	58
Figure 37. Modifications envisagées du motif électrophile.	60
Figure 38. Modification du deuxième groupe électroattracteur X	75
Figure 39. Accepteurs de Michael. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	76
Figure 40. Accepteurs de Michael.....	77
Figure 41. Composés 5-4 , 5-5 , 5-6 et 5-14 (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	78
Figure 42. Comparaison cétoesters / cétonitriles.....	80
Figure 43. Comparaison cétoesters / cétonitriles. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	81
Figure 44. Analogues de type tétralone.....	82

Figure 45. Série tétralone (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	83
Figure 46. Déplacements chimiques en ppm des carbones électrophiles mesurées par RMN (haut : cétones énolisables et actives ; bas : cétones non-énolisables et peu ou pas actives).	85
Figure 47. Contraction et expansion du cycle.	85
Figure 48. Tests sur la taille du cycle (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	86
Figure 49. Bis-électrophiles avec des chaînes saturées.	91
Figure 50. Bis-électrophiles avec chaînes saturées. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	92
Figure 51. Bis-électrophiles avec une chaîne insaturée.	94
Figure 52. Bis-électrophiles avec des chaînes insaturées. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).	95
Figure 53. CD d'inducteurs électrophiles de Nrf2 mesurées dans les cellules Hepa 1c1c7.	97
Figure 54. Cavités en contact avec le domaine BTB générées avec NRGsuite. En magenta : la structure <i>apo</i> (PDB code : 4CXI). En vert : structure <i>holo</i> (avec CDDO, PDB code : 4CXT).	100
Figure 55. Arrimage moléculaire de 6-2a . A) Structure du ligand arrimé. B, C) Résultats choisis.	101
Figure 56. Arrimage moléculaire de 6-2b . A) Structure du ligand arrimé. B, C) Résultats choisis.	102
Figure 57. Arrimage moléculaire de 6-2i . A) Structure du ligand arrimé. B, C, D) Résultats choisis.	103
Figure 58. Nouvelles chaînes latérales.	104
Figure 59. Désymétrisation des bis-électrophiles.	105
Figure 60. Mode de liaison possible selon le domaine ciblé. ¹²	107
Figure 61. Déclinaison d'une série époxyde.	108
Figure 62. Déclinaison de nouveaux électrophiles.	110
Figure 63. Choix de deuxième électrophile.	111
Figure 64. Déclinaison de nouveaux bis-électrophiles.	112
Figure 65. Chaînes latérales à construire.	115

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma I.1. ²⁵	5
Schéma 2.1.	34
Schéma 3.1.	35
Schéma 3.2.	36
Schéma 3.3.	37
Schéma 3.4.	38
Schéma 3.5.	38
Schéma 3.6.	39
Schéma 3.7.	40
Schéma 3.8.	41
Schéma 3.9.	43
Schéma 4.1.	45
Schéma 4.2.	46
Schéma 4.3.	46
Schéma 4.4.	47
Schéma 4.5.	48
Schéma 4.6.	51
Schéma 4.7.	52
Schéma 4.8.	53
Schéma 5.1.	61
Schéma 5.2.	62
Schéma 5.3.	62
Schéma 5.4.	63
Schéma 5.5.	64
Schéma 5.6.	64
Schéma 5.7.	65
Schéma 5.8.	65
Schéma 5.9.	66
Schéma 5.10.	67
Schéma 5.11.	68

Schéma 5.12.....	68
Schéma 5.13.....	69
Schéma 5.14.....	69
Schéma 5.15.....	70
Schéma 5.16.....	71
Schéma 5.17.....	71
Schéma 5.18.....	72
Schéma 5.19.....	73
Schéma 5.20.....	73
Schéma 5.21.....	74
Schéma 5.22.....	74
Schéma 6.1.....	88
Schéma 6.2.....	90
Schéma 6.3.....	91
Schéma 7.1.....	104
Schéma 8.1 ⁸³	109
Schéma 8.2.....	112
Schéma 8.3.....	113
Schéma 8.4.....	114
Schéma 8.5.....	114
Schéma 8.6.....	115

INTRODUCTION

Le stress électrophile et oxydant est un souci grandissant pour la santé avec l'évolution de nos modes de vie. Certains xénobiotiques (substances étrangères à notre corps) sont des électrophiles ou peuvent être métabolisés en tant que tels ; de nombreuses maladies chroniques comme le diabète de type II mènent à un état inflammatoire sous-jacent qui génère un stress oxydant ; l'exposition aux ultraviolets, à la pollution, aux substances carcinogènes, à la fumée de cigarette et la pratique intensive d'activités sportives sont autant de causes de stress oxydant pour l'organisme.^{1,2} La cellule possède des mécanismes de défenses complexes contre ce phénomène, et l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE/EpRE) en est un des composants principaux.³ ARE et EpRE sont communément utilisés séparément ou ensemble pour désigner le même promoteur. Il agit sous le contrôle du *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) isolé en 1994.^{4,5} Nrf2 contrôle entre autres l'expression d'enzymes de métabolisme de phase I (cf. PTGR1, NQO1) et de phase II (cf. MGST1), d'enzymes impliquées dans le cycle d'oxydoréduction du glutathion (GSH), la molécule antioxydante la plus abondante dans la cellule, et de la thiorédoxine (TXN), ainsi que d'enzymes nécessaires au métabolisme des carbohydrates, des lipides, des hèmes et du fer (cf. HO-1), à la régénération du NADPH, de facteurs de transcriptions (cf. Nrf2, PPAR γ , RXR α), de protéines MafG et de la *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1).⁶ Nrf2 régule plus de 200 gènes qui protègent la cellule et l'aident à se détoxifier. TXN, par exemple, est une protéine de défense très importante sensible aux changements redox induits par le stress oxydant.⁷

La transcription de Nrf2 est un mécanisme hautement régulé (figure 1). Nrf2 s'auto-transcrit pour soutenir son niveau d'activité. Il active aussi la synthèse de Keap1, une protéine chaperonne identifiée en 1999 qui régule l'activité de Nrf2 et qui est sensible aux électrophiles et aux oxydants.⁸ Ce système est au cœur d'un réseau complexe et la transcription dépend de la stabilité du facteur de transcription Nrf2,⁶ mais aussi de nombreux autres éléments qui influencent soit Keap1 ou Nrf2. Ces facteurs peuvent même venir des gènes transcrits ; par exemple, TXN exerce une rétroaction négative sur Nrf2 en réduisant le degré d'oxydation de Keap1.⁹ À l'état basal, l'activité de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE est maintenue à un niveau faible.

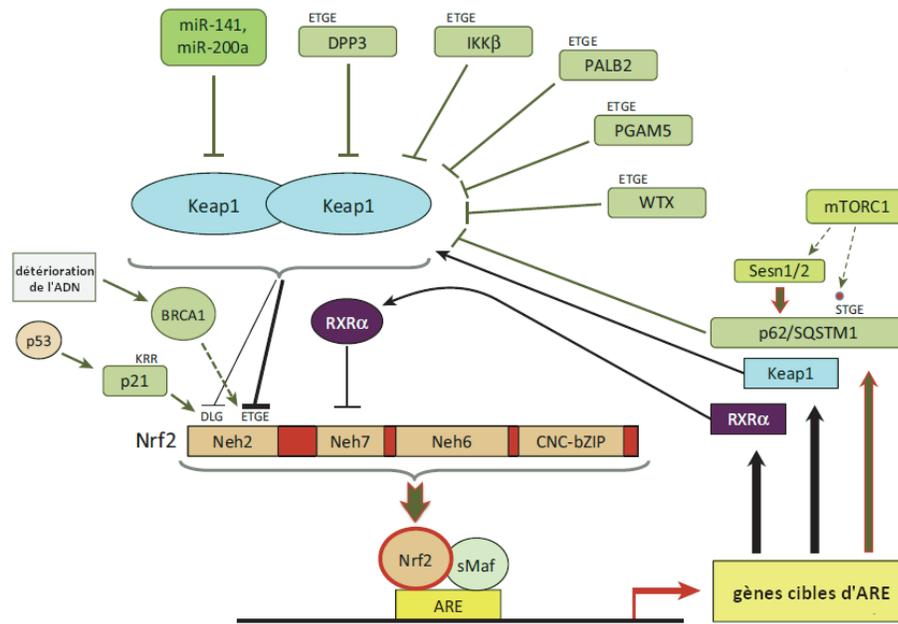


Figure 1. Régulation du système Keap1-Nrf2.⁶

I.1 Le stress oxydant (OS)

Le concept de « stress oxydant » est utilisé pour décrire le déséquilibre entre les facteurs prooxydants et antioxydants introduit en 1985.¹⁰ PubMed répertorie plus de 138 000 entrées pour ce terme aujourd'hui.¹¹ Il n'existe pas encore de moyen de le quantifier, mais OS est utilisé pour mesurer la probabilité de souffrir de dégâts oxydatifs. Ces dommages sont associés à plusieurs maladies et conditions pathologiques telles que cancers, diabètes, infections pulmonaires et maladies neurodégénératives (figure 2).^{12,13}



Figure 2. Maladies et conditions pathologiques liées au stress oxydant.

Lors de la conversion de nourriture en énergie par le métabolisme aérobie, l'oxydation incomplète du dioxygène cause la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS) comme le radical anion peroxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}).¹⁴ On retrouve aussi des espèces azotées réactives (RNS) telles que l'ion peroxydinitrite ($ONOO^-$), le dioxyde d'azote (NO_2) et le trioxyde de diazote (N_2O_3). Elles sont formées à partir de la réaction de $O_2^{\cdot-}$ avec le monoxyde d'azote ($^{\cdot}NO$).¹⁵ Ces espèces existent généralement à des concentrations faibles et sont essentielles à la signalisation cellulaire. Certaines enzymes libèrent des ROS de manière très contrôlée (NADPH oxydases).¹⁴ Ces radicaux libres interviennent dans l'activation d'enzymes, la détoxification et sont importantes dans la transformation d'aliments en énergie.¹⁶

La fonction thiol située sur la chaîne latérale des résidus cystéine est sensible à l'oxydation par les ROS. Ces transformations créent des ponts disulfures et forment des acides sulféniques (RSOH), sulfiniques (RSO_2H) et sulfoniques (RSO_3H) qui jouent un rôle dans la fonction et l'activité des protéines.¹⁴ En accord avec la *Free Radical theory of aging* d'Harman (théorie du vieillissement par exposition aux radicaux libres), les concentrations excessives de ROS et RNS sont vouées à causer des dommages.¹⁷ Les

radicaux libres sont des espèces chimiques très réactives ; elles peuvent réagir de manière non-contrôlée avec les lipides, les carbohydrates, les protéines et l'ADN. Ces dégâts au niveau cellulaire perturbent l'homéostasie finement régulée de la cellule et déclenchent des pathologies variées.² Il y a donc un intérêt thérapeutique à contrôler la concentration des électrophiles, ROS et RNS.

I.2 Intérêt thérapeutique de la voie de signalisation de Keap1/Nrf2/ARE

Le potentiel thérapeutique de la voie de signalisation de Keap1/Nrf2/ARE est largement reconnu.¹³ L'invalidation génétique de Nrf2 chez les souris n'empêche pas leur bon développement.¹⁸ Par contre, elles sont beaucoup plus susceptibles que les animaux de type sauvage de développer des tumeurs et du diabète. Elles sont aussi sensibles aux problèmes pulmonaires, aux inflammations, et aux attaques cardiaques suite à une exposition à des conditions de stress oxydant que le type sauvage.^{12,18-20} L'efficacité de l'activation de Nrf2 dans la prévention de pathologies reliées au stress oxydant est bien démontré mais son rôle dans la guérison une fois la maladie installée fait encore débat.¹⁸ Les électrophiles de source naturelle ou synthétique sont connus pour activer cette voie de signalisation.²¹ Mais, administrer une dose efficace et non-toxique de ces inducteurs est un défi. Les essais cliniques sur la consommation de pousses de brocolis en Chine ont montré des différences importantes dans la capacité des patients à métaboliser les glucosinolates vers l'isothiocyanate, l'espèce électrophile active nécessaire (schéma I.1).²² La consommation de crucifères est associée à une diminution du risque de cancer.²³ Le sulforaphane (SFN, Figure 3) est le plus intéressant des isothiocyanates trouvés dans ces légumes, il protège les cellules contre une variété d'agents cytotoxiques et cancérigènes.²⁴ Il cible une cystéine d'intérêt de Keap1 et forme un lien covalent grâce à sa portion électrophile.

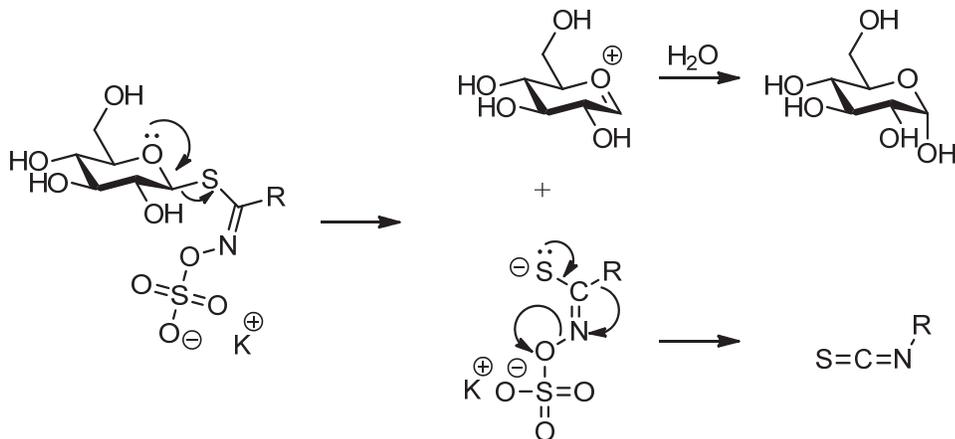
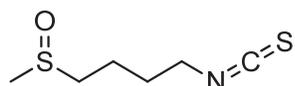
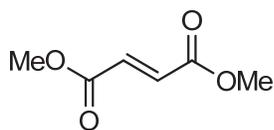


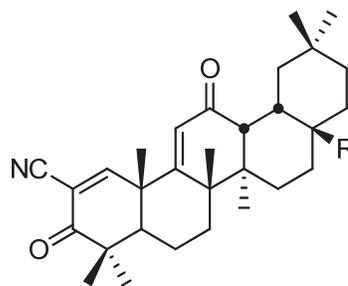
Schéma I.1.²⁵



sulforaphane
(SFN)



fumarate de diméthyle
(Tecfidera™)



Bardoxolone méthyle (R = CO₂Me)

Omaveloxolone (R = NHC(O)CF₂Me)

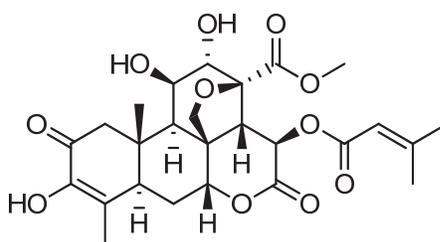
Figure 3. Candidats cliniques pour l'induction de Nrf2.

La bardoxolone méthyle (CDDO-Me ou RTA 402) est un triterpénoïde synthétique développé par Reata Pharmaceuticals qui fait partie des inducteurs de Nrf2 les plus puissants (figure 3).²⁶ RTA 402 est entré en clinique pour le traitement de tumeurs solides, de lymphomes et de la maladie rénale chronique (MRC) avec des résultats très encourageants.²⁷ Cependant, les études de phase III ont été prématurément arrêtées en 2012. Une proportion de 8.8% du groupe CDDO-Me a été victime d'accidents cardiovasculaires contre 5.0% dans le groupe placebo.¹² Des analyses supplémentaires ont révélé plus tard que ces événements étaient supérieurs chez les patients traités avec RTA 402 qui avaient déjà des antécédents ; avec ces restrictions supplémentaires, les tests cliniques ont été autorisés à être continués aux États-Unis et au Japon.²⁸ La bardoxolone méthyle est maintenant aussi évaluée pour l'hypertension pulmonaire ainsi que pour les patients atteints de MRC et de diabète de type 2.²⁸ Omaveloxolone, un analogue de CDDO-Me,

est également en phase clinique pour l'ataxie de Friedreich, les myopathies mitochondriales ou le mélanome.²⁸

En 2013, le fumarate de diméthyle a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement de la sclérose en plaques (MS).²⁹ Il est disponible oralement et est commercialisé sous le nom TecfideraTM. Il a rapporté déjà 2 909 et 3 638 millions de dollars (USD) en revenu à Biogen en 2014 et en 2015 respectivement. Cet inducteur de Nrf2 se montre aussi efficace dans la protection contre la maladie d'Huntington dans des modèles précliniques.³⁰

Tous ces exemples montrent que l'activation de Nrf2 a un grand potentiel thérapeutique. Les souris dont Keap1 a été invalidé génétiquement possèdent un niveau de transcription constamment haut qui les protège efficacement.³¹ Cependant, elles sont aussi susceptibles de développer des tumeurs.¹⁹ Certaines formes de cancer ont montré la capacité à utiliser Nrf2 pour leur propre protection, notamment contre la chimiothérapie.¹² Plusieurs mutations de Keap1 ont été trouvées dans des cellules de cancers des poumons qui stoppent son action.³² Dans les cancers du cerveau et de la prostate, on a trouvé que la région du promoteur de Keap1 était hyperméthylée, ceci prévenant sa transcription.¹⁸ La protection du système Keap1-Nrf2 est cependant une épée à double tranchant. La recherche d'inhibiteurs de ce mécanisme serait donc aussi d'un grand intérêt ; des premiers résultats encourageants ont été obtenus avec le brusatol (figure 4).¹⁸



Brusatol

Figure 4. Structure du brusatol.

Néanmoins, l'activation de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE possède un potentiel thérapeutique tellement large qu'elle reste une cible de choix pour le développement de médicaments. Beaucoup de progrès restent à faire pour la connaître. C'est ce qui fait que ce projet est aussi pertinent et a été aussi stimulant et formateur.

CHAPITRE 1 : LE COUPLE KEAP1-NRF2

1.1 Introduction

Le récepteur *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) appartient à la famille de facteurs de transcription *Cap'n'Collar* (CNC).³ Il induit la transcription de gènes cytoprotecteurs sous la forme de défenses antioxydantes cellulaires, en complexant le promoteur de la séquence régulatrice de l'élément de réponse antioxydant (ARE, présent sur l'ADN dans le noyau) sous la forme d'un hétérodimère avec les petites protéines de la musculoaponeurotic fibrosarcoma (Maf) (figure 5).³³ A l'état basal, il est séquestré dans le cytoplasme par un dimère de la protéine *Kelch like ECH Associated Protein 1* (Keap1).³⁴ Cette protéine chaperonne fait partie de la superfamille de protéines Kelch répétées (KLHL).³⁵ Keap1 promeut la dégradation de Nrf2 par le protéasome en liant la *Keap1-dependent cullin E3-ubiquitin ligase* (Cul3) qui assure son ubiquitynilation.³⁶ La demi-vie de Nrf2 est estimée à moins de 20 min à l'état basal.²⁴

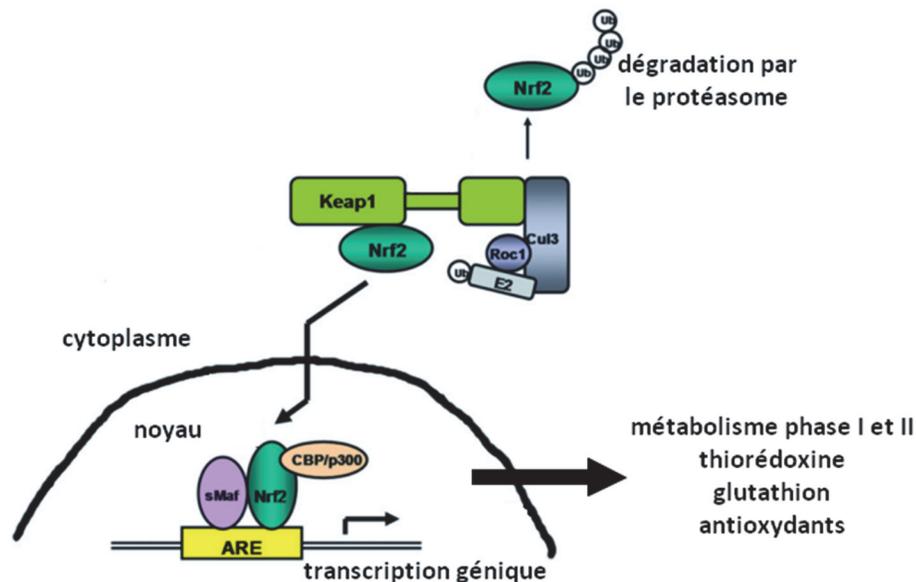


Figure 5. La voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE.³⁷

L'activation de cette voie de signalisation se fait par Keap1. La protéine chaperonne est sensible aux oxydants et aux électrophiles caractéristique d'une situation de stress oxydant.³⁸ Keap1 est composée de

cinq domaines : la région N-terminale (NTR, acides aminés 1 – 60), le domaine *Broad complex*, *Tamtrack*, *Bric-a-Brac* (BTB, acides aminés 61 – 179), la région intermédiaire (IVR, acides aminés 180 – 314), le domaine Kelch répété (DGR, acides aminés 315 – 598, 6 motifs Kelch) et la région C-terminale (CTR, acides aminés 599 – 624). Le domaine BTB est celui par lequel Keap1 dimérise et, avec la région IVR, ils offrent l'interface de liaison à Cul3.^{39,40} La comparaison des séquences de Nrf2 entre l'humain et le poulet a fait ressortir six régions très homologues (Neh1-6, figure 6).^{3,8} Le domaine Neh2 de Nrf2 se lie au dimère de Keap1 par les deux domaines DGR.³ Cette portion du facteur de transcription possède deux motifs différents capables de se lier dans la même poche, chez l'humain :

ETGE (Asp⁷⁷ à Glu⁸²)

DLG (Leu²³ à Gly³²)

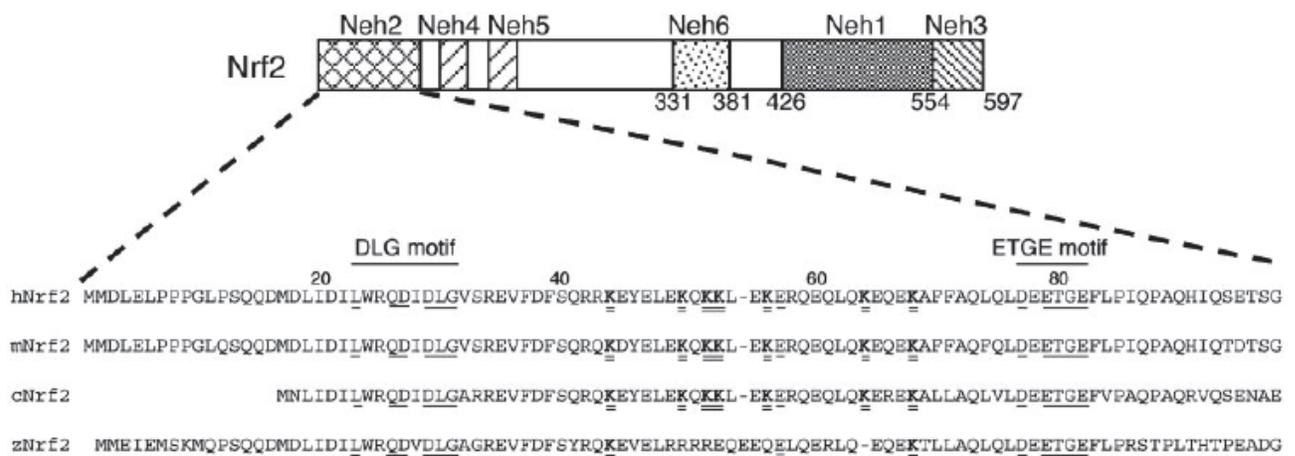


Figure 6. Architecture de Nrf2 et alignement des domaines Neh2 de différentes espèces (h :humain, m : souris, c : poulet, z : poisson zèbre).³

ETGE est le motif qui a la meilleure affinité, cent fois supérieure à celle du motif DLG.^{3,24} Lorsque les deux séquences sont liées, la région centrale riche en résidus leucine est positionné pour l'ubiquitinylation (figure 7).³

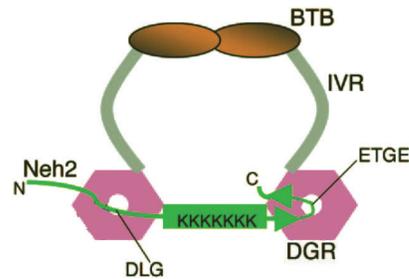


Figure 7. Le complexe Keap1-Nrf2.³

La différence d'affinité entre les deux motifs a donné naissance au modèle *hinge and latch* où le domaine ETGE est la charnière (*hinge*) et DLG est le loquet (*latch*).⁴¹ Selon cette hypothèse, la modification de Keap1 par des électrophiles ou des oxydants rompt l'interaction avec DLG, critique pour bloquer l'ubiquitinylation. Un autre mécanisme acceptable est la dissociation ou la modification de l'interaction Keap1-Cul3.²⁴ Baird *et al.* proposent un modèle cyclique de changements de conformation (figure 8).⁴² À l'état basal, le dimère de Keap1 fixe de manière séquentielle le motif ETGE pour donner la forme ouverte (étape 1) et ensuite le motif DLG pour obtenir la forme fermée (étape 2). Ce complexe est ciblé par Cul3 (étape 3) et le dimère de Keap1 est libéré (étape 4) pour pouvoir complexer un autre facteur de transcription nouvellement synthétisé. À l'état induit, on obtient la conformation fermée comme précédemment (étape 1). Ce complexe est ciblé par un inducteur qui induit un changement de conformation (étape 2) qui ne permet plus l'ubiquitinylation. Keap1 libre n'est pas régénéré (étape 3). Les copies de Nrf2 nouvellement synthétisées s'accumulent au sein de la cellule et migrent vers le noyau pour induire la transcription d'ARE.

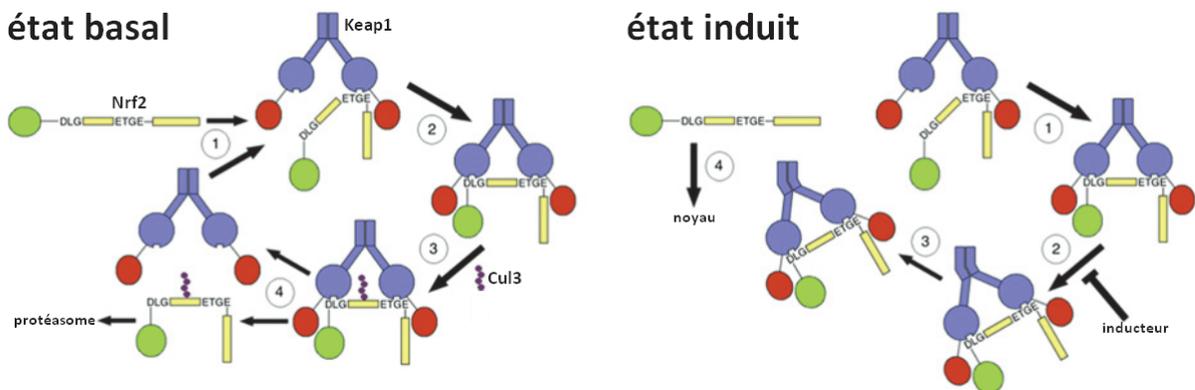


Figure 8. Modèle cyclique de changements de conformation.⁴²

La littérature rapporte plusieurs stratégies pour activer la transcription des gènes contrôlés par l'élément de réponse ARE via l'inhibition de l'interaction Keap1:Nrf2. D'un côté, les inhibiteurs d'interactions protéine-protéine (iPP), des inducteurs non-covalents de Nrf2, ciblent le domaine DGR de Keap1 où Nrf2 se lie à la protéine. De l'autre côté, plusieurs familles d'électrophiles sont reconnues comme inducteurs covalents de ce système. Ils tirent avantage de la réactivité des nombreux résidus cystéines présents sur la protéine Keap1, qui agissent comme biosenseurs d'électrophiles, et dont la réaction avec un électrophile va moduler la conformation de Keap1 et par conséquent son interaction avec Nrf2, permettant à ce dernier de transloquer au noyau au lieu de suivre Keap1 sur la voie de la dégradation.³⁸ La phosphorylation de Nrf2 est une autre stratégie attrayante pour induire ce mécanisme de défense.⁴³ Huang *et al.* ont démontré que la phosphorylation du résidu Ser⁴⁰ de Nrf2 diminue son affinité pour Keap1.⁴⁴

1.2. Inducteurs non-covalents de Nrf2

1.2.1. Inhibiteurs d'interaction protéine-protéine

Lors des dernières décennies, les interactions protéine-protéine ont émergé comme une nouvelle classe de cibles thérapeutiques.⁴⁵ Elles offrent des défis différents qui poussent à l'ingéniosité et l'optimisation. Au contraire des sites de liaison de substrats d'enzymes ou de ligands de récepteurs, qui ont habituellement une topologie en forme de cavité de petit volume, l'interface des iPP où se lient les partenaires est souvent très large, plutôt plate et exposée au solvant.⁴⁶ Un composé capable d'occuper cette zone aurait un haut poids moléculaire et devrait faire de nombreuses interactions de faible intensité. De telles molécules posent beaucoup de problèmes au niveau de leur profil pharmacocinétique. Néanmoins, d'énormes progrès ont été réalisés dans la découverte et le développement de petites molécules inhibitrices d'interactions protéine-protéine. La découverte de « points chauds » (*hot spots*) responsables pour la majorité de l'énergie libre de liaison entre les protéines a été une des raisons critiques de cette avancée. La surface à occuper est significativement plus petite et représentée par quelques résidus clé. Elle peut donc être ciblée par de petites molécules.⁴⁷ La « druggabilité » (terme désignant la capacité à identifier de nouveaux médicaments sur une cible donnée) de ces inhibiteurs d'interactions protéine-protéine a été validé par l'avancement prometteur de plusieurs candidats clinique (figure 9).⁴⁵

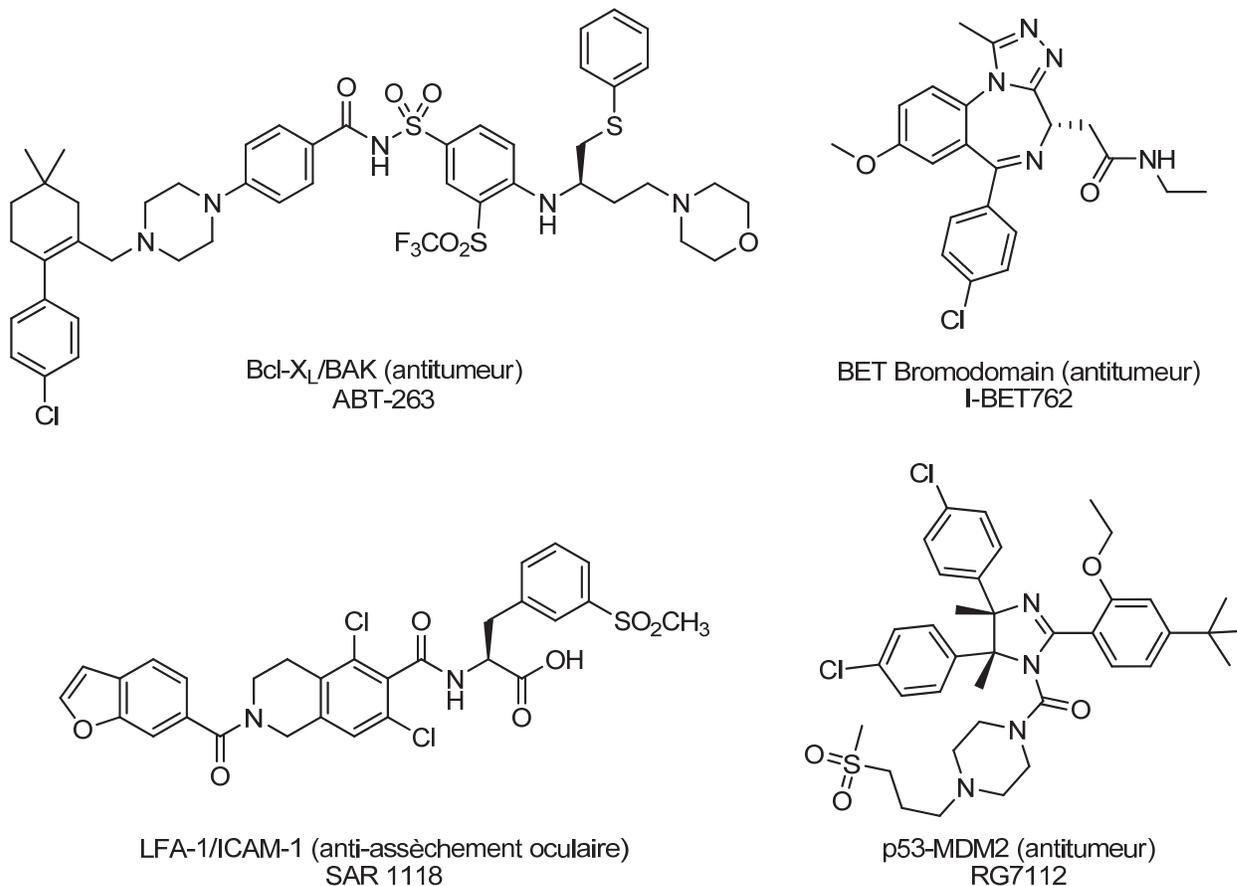


Figure 9. Inhibiteurs d'interactions protéine-protéine en développement clinique.⁴⁵

1.2.2. L'interface Keap1-Nrf2

Le domaine Neh2 de Nrf2 se lie au dimère de Keap1 par les deux domaines DGR. Cette portion du facteur de transcription possède deux motifs différents capables de se lier dans la même poche. ETGE est le motif qui a la meilleure affinité, cent fois supérieure à celle du motif DGE.³ Cinq poches de liaison ont été identifiées (figure 10). P1, formée par Ser⁵⁰⁸, Phe⁴⁷⁸, Ile⁴⁶¹, Arg⁴⁸³, Arg⁴¹⁵ et Gly⁴⁶², et P2, formée par Ser³⁶³, Arg³⁸⁰, Asn³⁸² et Asn⁴¹⁴, sont les « points chauds », elles sont chargées très positivement.⁴⁸ On y trouve les interactions clés qui contribuent majoritairement à l'énergie libre de liaison.⁴⁵ P3, au centre, est composée de Gly⁵⁰⁹, Ala⁵⁵⁶, Ser⁵⁵⁵, Ser⁶⁰², Gly⁶⁰³ et Gly⁵⁷¹. Plus petite, cette poche est sensible à l'encombrement stérique. P4 et P5 sont hydrophobes.⁴⁸

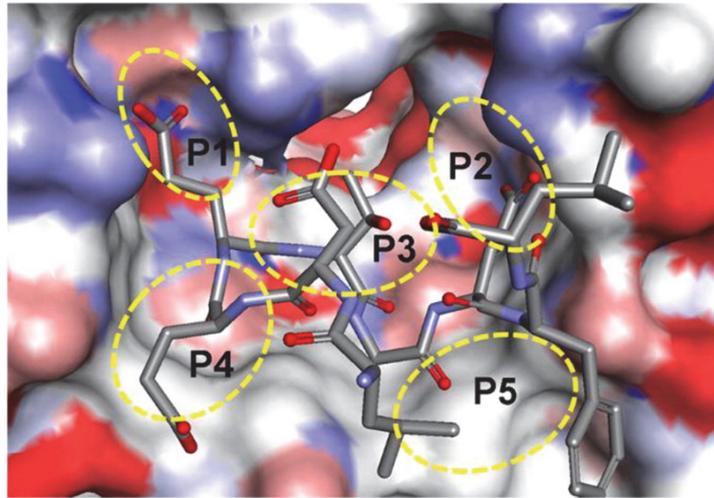


Figure 10. Surface de liaison de l'interface Keap1-Nrf2 (code PDB : 1X2R).⁴⁸

Le motif ETGE forme un tournant β , stabilisé par un pont hydrogène entre le squelette peptidique et les chaînes latérales des résidus Asp⁷⁷ et Thr⁸⁰ (figure 11 A).⁴⁹ ETGE fait de nombreuses liaisons hydrogène avec les résidus du domaine DGR (figure 11 B).

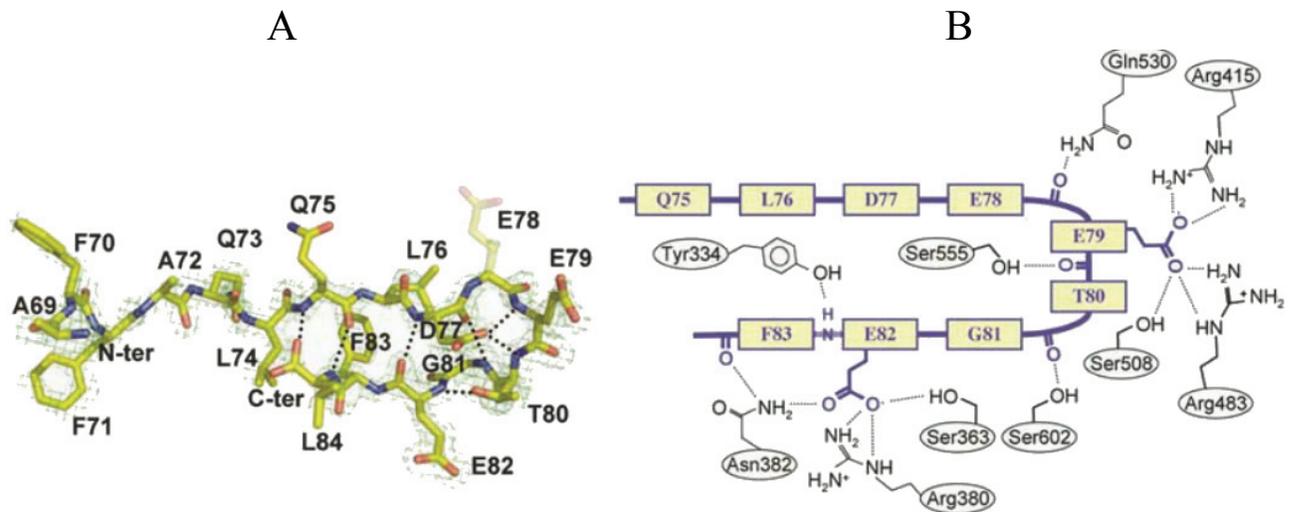


Figure 11. (A) structure du motif ETGE. (B) Ponts hydrogènes entre le motif ETGE et le domaine DGR.⁴⁹

En particulier, les résidus Ser⁵⁰⁸, Arg⁴⁸³ et Arg⁴¹⁵ qui forment P1 interagissent avec la chaîne latérale de l'acide glutamique Glu⁷⁹. Aussi, les résidus Asn³⁸², Arg³⁸⁰ et Ser³⁶³ qui forment la poche P2 interagissent avec la chaîne latérale de l'acide glutamique Glu⁸².⁴⁹ Ces deux résidus (Glu⁷⁹ et Glu⁸²) sont

les seuls à se lier par leur chaîne latérale et participent le plus à l'interaction protéine-protéine. Nrf2 fait également cinq liaisons hydrogènes supplémentaires avec son squelette peptidique. Les chaînes latérales de Leu⁷⁶, Glu⁷⁸ et Phe⁸³ couvrent les deux poches hydrophobes P4 et P5.⁴⁸

1.2.3. Les familles d'inhibiteurs de l'interaction Keap1-Nrf2

Grâce aux différentes structures cristallines disponibles du domaine DGR de Keap1 et de son interaction avec Nrf2, beaucoup de progrès ont été faits en assez peu de temps sur le développement d'inhibiteurs de l'iPP Keap1-Nrf2.^{3,32,49-54} Les premiers succès ont été obtenus avec l'optimisation de la séquence ETGE.⁵⁵ Le peptide optimisé possède un IC₅₀ de 22 nM mesuré dans un essai de polarisation par fluorescence. Mais depuis, la communauté scientifique s'est davantage focalisée sur la découverte et l'optimisation de petites molécules que sur une approche peptidique.

On distingue trois familles de petites molécules inhibitrices de l'interaction Keap1-Nrf2. D'abord, les tétrahydroisoquinolines ont été découvertes par criblage de la librairie des instituts américains de la santé (NIH MLPCN).⁵⁶ Après optimisation, la tétrahydroisoquinoline **1-1** a été identifiée comme l'analogue le plus puissant à ce jour dans cette série (figure 12 A), avec un IC₅₀ de 1.1 µM dans le même essai de polarisation par fluorescence.⁵⁷ Comme très souvent avec le domaine DGR, on est capable de co-cristalliser les inhibiteurs d'iPP avec Keap1. La tétrahydroisoquinoline **1-1** occupe les poches P2 et P5 (figure 12 B). L'isoxindole est aligné pour faire des interactions de type empilement- π avec la fonction phénol du résidu Tyr⁵⁷² pendant que son groupement carbonyle fait une liaison hydrogène avec la fonction alcool du résidu Ser⁶⁰². De l'autre côté, on trouve un pont hydrogène entre l'acide carboxylique de la molécule **1-1** et la chaîne latérale guanidinium du résidu Arg³⁸⁰.

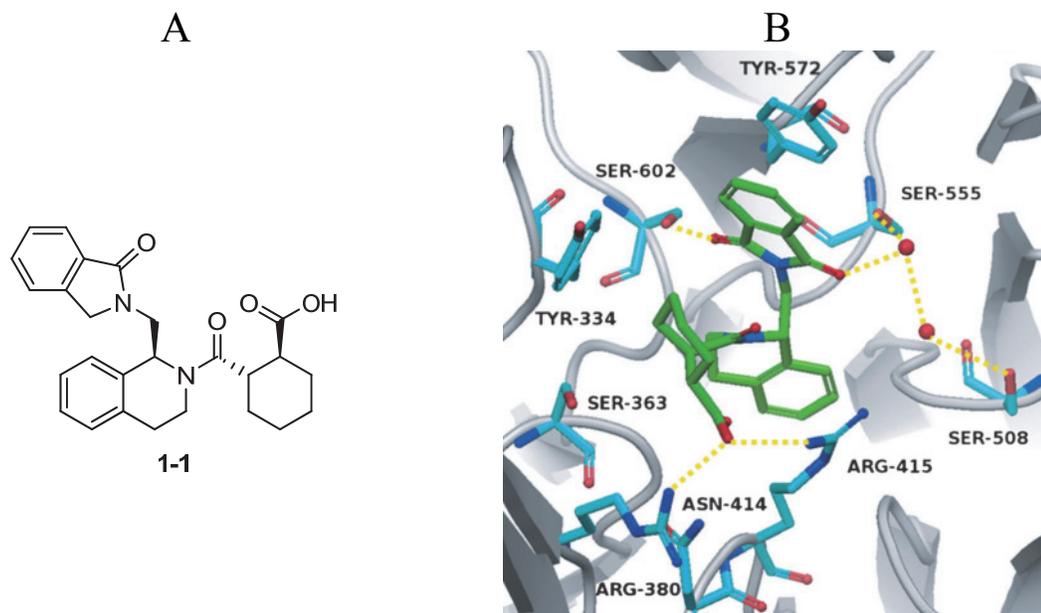


Figure 12. (A) structure de la tétrahydroisoquinoline **1-1**. (B) Co-cristal de la tétrahydroisoquinoline **1-1** avec le domaine DGR (code PDB : 4N1B).⁵⁷

Les *N*-phénylbenzènesulfonamides et benzènesulfonylpyrimidones ont été découverts également par criblage à haut débit de la librairie MLPCN dans la même année que la série précédente par Marcotte *et al.*⁵⁸ Les IC_{50} des meilleurs composés de ces séries étaient respectivement de 2.7 μ M et 118 μ M. L'étude plus approfondie des bis-*N*-phénylbenzènesulfonamides par arrimage moléculaire (*docking*) a mené à la synthèse de la molécule **1-2** (figure 13 A).^{48,59} Le composé actif (*hit*) de départ ne possédait pas les deux acides carboxyliques et ne remplissait que les poches P3, P4 et P5 d'après son co-cristal avec le domaine DGR (code PDB : 4IQK).⁵⁸ Le bis-sulfonamide **1-2** possède un IC_{50} de 28.6 nM dans le même essai de polarisation par fluorescence. C'est le plus puissant inhibiteur de l'interaction Keap1-Nrf2 à ce jour. Grâce à ses deux fonctions acides, il vient occuper les poches de liaison P1 et P2 d'après son arrimage dans le domaine DGR (figure 13 B).

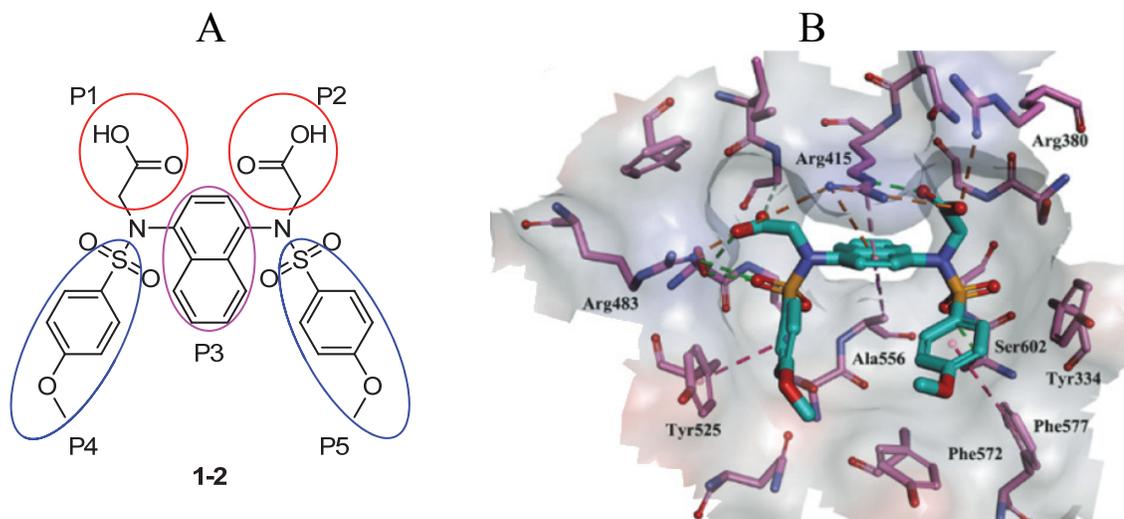


Figure 13. (A) structure du bis-sulfonamide **1-2**. (B) Arrimage moléculaire du bis-sulfonamide **1-2** avec le domaine DGR (code PDB : 4IQK).⁵⁹

L'optimisation de ces dérivés a aussi permis de mettre en évidence de nouvelles familles d'inhibiteurs de l'interaction Keap1-Nrf2.^{60,61} La recherche d'inhibiteurs de l'iPP entre Keap1 et Nrf2 a eu beaucoup de succès en assez peu de temps. De nouvelles classes de molécules et des composés de plus en plus puissants vont assurément être développés très rapidement.

1.3. Inducteurs covalents de Nrf2

1.3.1. Les résidus cystéines de Keap1 agissent en tant que senseurs redox

Keap1 est une protéine riche en résidus cystéines, 27 au total chez l'homme, répartis inégalement dans ses différents domaines dont 25 sont conservés de l'humain à la souris.⁶² On en trouve deux dans la région N-terminale, trois dans le domaine BTB, huit dans la région IVR, neuf dans le domaine DGR et trois dans la région C-terminale (figure 14).³⁸ Ces fonctions thiols sont les senseurs redox qui déterminent la régulation exercée par Keap1 sur Nrf2. Dinkova-Kostova *et al.* ont démontré que tous ces résidus pouvaient être modifiés *in vitro* avec un dipyridyldisulfure qui fait des additions irréversibles.³⁸ Les fonctions thiols sont piégées selon un ordre croissant de réactivité, les plus sensibles se trouvant dans la région IVR. Il s'agit des résidus Cys²⁵⁷, Cys²⁷³, Cys²⁸⁸ et Cys²⁹⁷. Systématiquement, les résidus cystéines

les plus nucléophiles possèdent des acides aminés basiques dans leur environnement proche. En s'additionnant sur certains thiols de la chaperonne Keap1, les inducteurs covalents stoppent la dégradation de Nrf2 et permettent l'augmentation de la transcription des gènes qu'il contrôle.

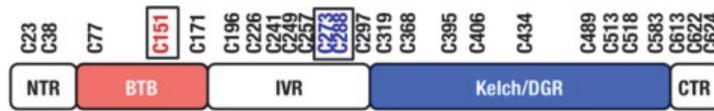


Figure 14. Répartition des 25 résidus cystéines dans Keap1 de la souris.⁶³

La chaperonne Keap1 n'est pas capable de retenir son partenaire Nrf2 dans le cytoplasme sans sa région IVR puisque le mutant (Keap1^{ΔIVR}) est toujours capable de lier Nrf2 mais est localisé dans le noyau au lieu du cytoplasme.⁴³ Plus précisément, les résidus Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸ sont critiques dans le processus d'ubiquitinylation, puisque les mutants Keap1^{C273A}, Keap1^{C288A} et Keap1^{C273A/C288A} dans lesquels on a remplacé les résidus cystéines en alanines sont inactifs ; ils sont toujours capables de lier Nrf2, cependant sont incompetents à promouvoir sa dégradation.⁶² C'est le cas général pour les différentes mutations sur ces deux résidus. Néanmoins, Saito *et al.* ont trouvé que les mutants Keap1^{C273M}, Keap1^{C273W}, Keap1^{C288E}, Keap1^{C288N} et Keap1^{C288R} ont le même comportement que la protéine de type sauvage (Keap1^{WT}) (figure 15 A et B).⁶³ La double substitution C273W et C288E conserve également les propriétés de régulation de Nrf2 (figure 15 C).⁶³

Les résidus Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸ de Keap1 sont bien conservés chez les mammifères. Par contre, on ne les retrouve pas parmi les autres protéines de la famille KLHL.⁶³ Ces résidus se trouvent dans la région IVR proche du domaine DGR où se lie Nrf2. On peut supposer que leur modification perturbe l'interaction Keap1-Nrf2 et stoppent l'ubiquitinylation.⁶³ La liaison Keap1-Cul3 se fait en partie par la région IVR. Les modifications dans cette région ont également le potentiel de gêner ce processus.^{43,63}

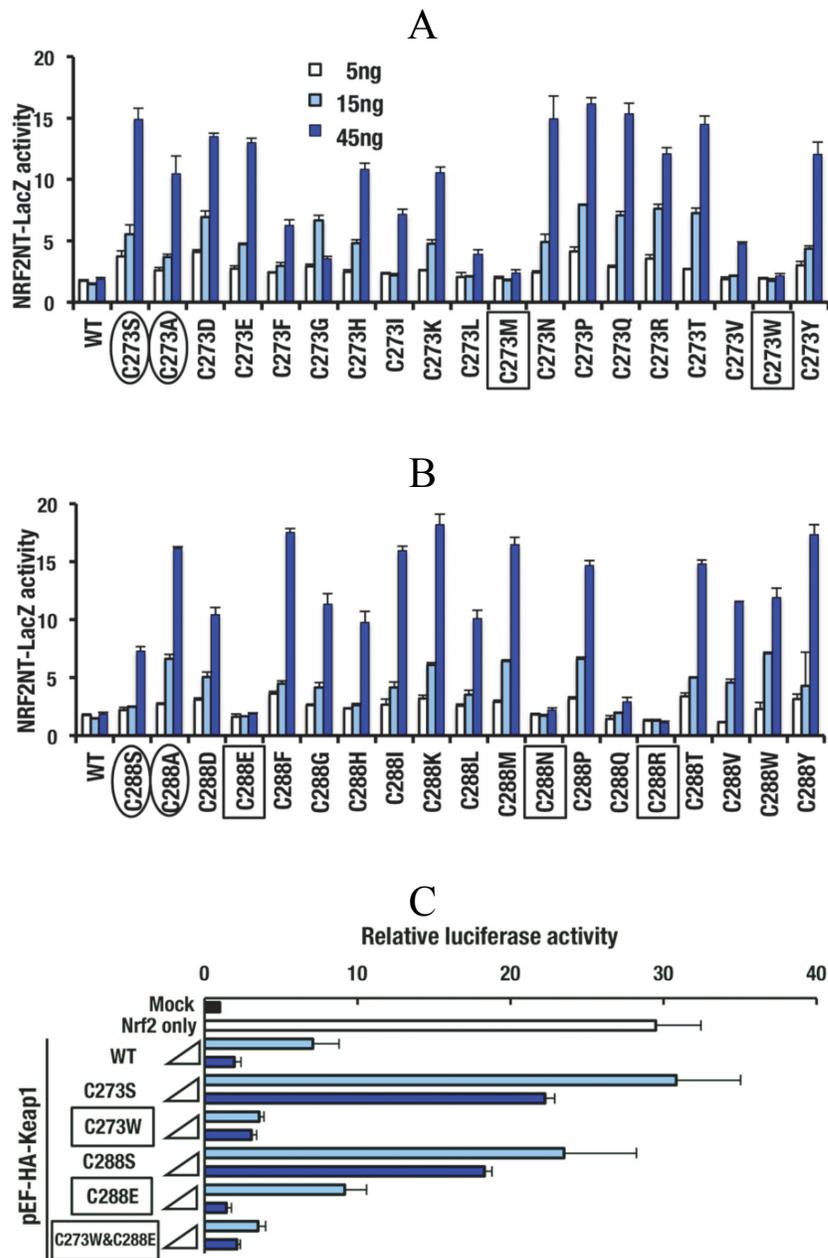


Figure 15. Les 19 substitutions d'acides aminés possibles pour Cys²⁷³ (A) et Cys²⁸⁸ (B) sur Keap1. Les cellules HEK293T ont été cotransfectées avec 15 ng de NRF2-degronLacZ (NRF2NT-LacZ) et les mutants de Keap1 (5, 15, or 45ng). Après 48 h d'incubation, l'activité relative de β -galactosidase est mesurée. (C) Les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec un vecteur ARE-luciférase, un vecteur exprimant Nrf2 et Keap1^{WT} ou les mutants de Keap1 (8 ou 40 ng). Après 24 h de transfection, l'activité relative de luciférase a été mesurée.⁶³

Même sans son domaine BTB, Keap1^{ΔBTB} est capable de se lier à Nrf2 et moduler son activité.⁴³ Les mutations de Cys¹⁵¹ ont été étudiées en particulier ; Keap1 est le seul membre de sa famille à avoir un résidu cystéine à cette position.³⁹ Keap1^{C151S} conserve ses capacités à contrôler Nrf2 alors que la substitution Cys151Trp donne un mutant qui n'en est plus capable.^{39,43,63,64} Sérine et cystéine sont de taille comparable alors que le tryptophane est bien plus volumineux. Keap1^{C151W} mime une conformation inactive de la protéine par un inducteur covalent qui cible le résidu Cys¹⁵¹. La superposition des cristaux du domaine BTB et de son mutant montrent peu de différences à l'exception du résidu Arg¹³⁵ qui est tourné dans le sens inverse (figure 16).³⁹ Cette région se situe près d'une hélice α jouant un rôle important dans l'interaction BTB-Cul3. Les modifications subies par le résidu Cys¹⁵¹ perturbent supposément le processus d'ubiquitinylation pour cette raison.^{39,64}

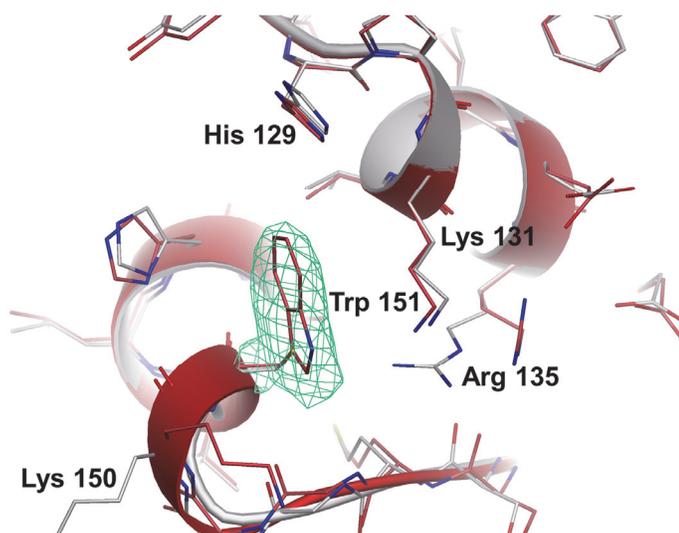


Figure 16. Superposition du cristal de Keap1 BTB (carbones blancs, code PDB : 4CXI) et du cristal de Keap1^{C151W} (atomes de carbone en rouge, code PDB : 4CXJ).³⁹

L'ensemble de ces études a permis de valider l'importance du réseau de résidus cystéines de Keap1 pour répondre aux différents oxydants et électrophiles grâce à leur nucléophilie et leurs propriétés redox. Le système Keap1-Nrf2 possède différents sites sensoriels qui sont ciblés par des composés différents. Trois résidus cystéines ont été identifiés comme les cibles préférentielles pour la grande majorité des électrophiles qui induisent la transcription de Nrf2. Dans le domaine BTB, on trouve le résidu Cys¹⁵¹. Et, dans la région IVR, on trouve les résidus Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸. D'autres composés chimiques sont capables d'activer cette voie de signalisation, indépendamment des acides aminés cités précédemment. Par exemple, les résidus Cys²²⁶ et Cys⁶¹³ sont nécessaires à l'activation de Nrf2 par les métaux lourds.⁶⁵ Par

souci de clarté et pour simplifier la discussion, nous classerons les molécules qui ciblent les résidus cystéines de Keap1 en quatre familles :

- a) Les inducteurs qui ciblent le domaine BTB
- b) Les inducteurs qui ciblent la région IVR
- c) Les inducteurs capables de cibler à la fois le domaine BTB et la région IVR
- d) Les inducteurs qui ont un mode d'action différent^{12,63,66}

Pour déterminer si un résidu cystéine est essentiel à l'activation de Nrf2 par une certaine molécule, il y a deux stratégies envisageables. La première est d'utiliser un mutant de Keap1 où le résidu cystéine d'intérêt est modifié et qui est toujours capable de réguler la transcription des gènes. Si, après incubation de l'inducteur étudié avec le mutant, on a une réponse significativement plus faible qu'avec la protéine de type sauvage, l'acide aminé muté est donc important dans le mode d'action de ce composé. La deuxième stratégie fait appel à la protéomique (figure 17). La molécule d'intérêt est incubée avec Keap1 à une certaine concentration pendant un temps suffisant. Puis, on récupère la protéine qui est par la suite digérée pour obtenir un mélange de fragments peptidiques plus petits. Ce mélange est analysé par spectrométrie de masse, puis on compare le spectrogramme à celui de la digestion de Keap1 seul. Si on observe une nouvelle masse avec une augmentation qui correspond à la masse de la molécule testée, on peut revenir à la séquence du peptide qui a été modifié et trouver le résidu cystéine cible. Cette deuxième méthode permet de confirmer la formation d'un lien covalent mais ne dit pas si le composé est actif vis-à-vis de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE.

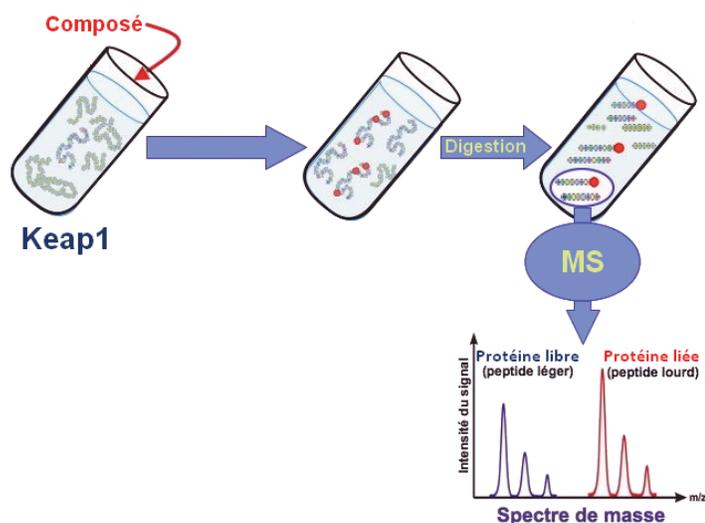


Figure 17. Protéomique.

1.3.2. Les électrophiles ciblant le domaine BTB

Étrangement, le domaine BTB est une région très sensible aux électrophiles alors qu'il ne contient que trois résidus cystéines (figure 14). C'est relativement peu comparé à la région IVR et le domaine DGR. D'après Kobayashi *et al.*, le résidu Cys¹⁵¹ est le seul qui a un impact sur la transcription médiée par Nrf2.⁶⁴ La structure cristalline du domaine BTB dans son état *apo* montre que ce résidu cystéine est entourée par des résidus basiques tels que His¹⁵⁴, Lys¹³¹ et Arg¹³⁵ (figure 18).³⁹ Cet environnement fait en sorte que la fonction thiol du résidu Cys¹⁵¹ est plus nucléophile.

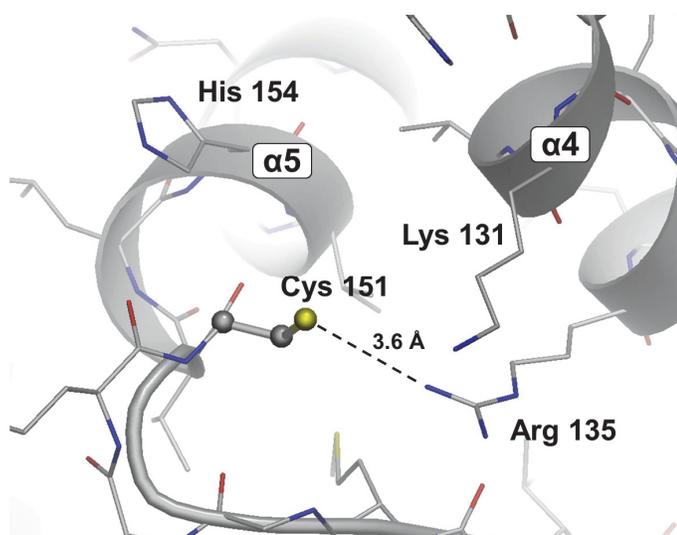


Figure 18. Environnement du résidu Cys¹⁵¹ dans l'état apo (code PDB : 4CXI).³⁹

Kobayashi *et al.* ont utilisé les poissons zèbres pour étudier le comportement de la protéine Keap1.⁶⁴ Ces poissons ont la particularité de posséder deux protéines zKeap1a et zKeap1b. Tous les résidus cystéines du domaine BTB sont conservés dans ces deux protéines et les séquences peuvent être alignées sur Keap1 de la souris (mKeap1). De ce fait, Cys¹⁵¹(mKeap1) correspond à Cys¹²⁷(zKeap1a) et Cys¹²⁵(zKeap1b) respectivement. Une différence intervient au niveau des résidus adjacents, Cys¹⁵¹(mKeap1) et Cys¹²⁵(zKeap1b) sont précédés d'un résidu lysine, un acide aminé basique alors que Cys¹²⁷(zKeap1a) suit un résidu thréonine, un acide aminé polaire non chargé. Les auteurs ont remarqué que seul Cys¹²⁵(zKeap1b) était capable d'induire la transcription de Nrf2 par l'induction de certains électrophiles. Cette découverte appuie le fait que le résidu Cys¹⁵¹ est un senseur de Keap1 pour les électrophiles car il se situe dans une poche chargée négativement. Les molécules qui ciblent le résidu Cys¹⁵¹ du domaine

BTB ont des structures très variées : hyperforme, nature de l'électrophile, interactions secondaires (figure 19).

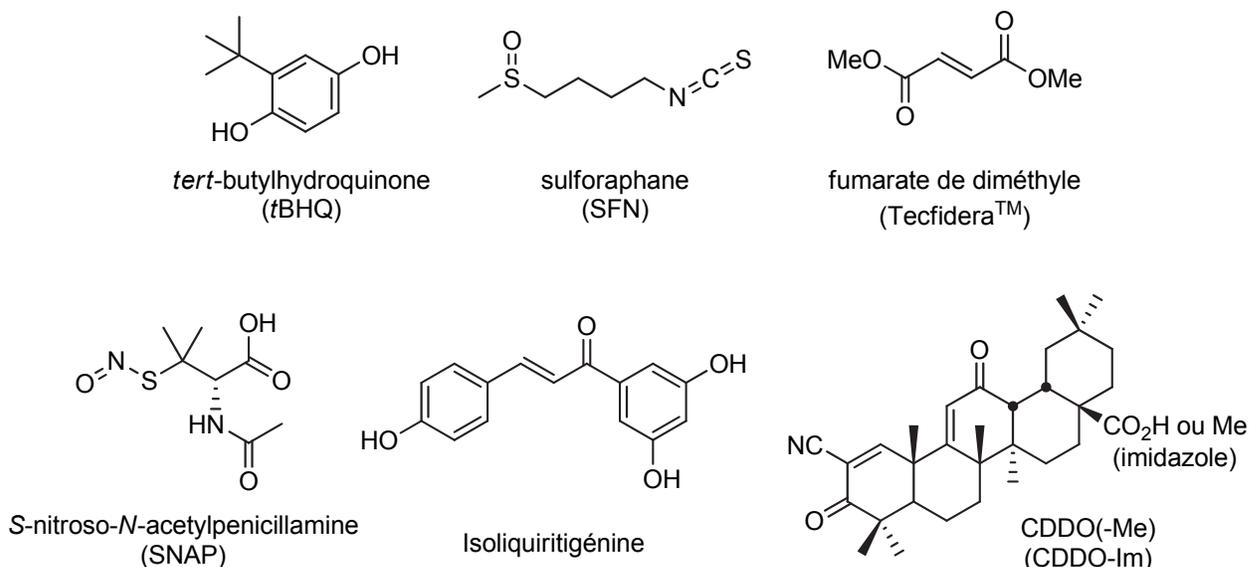


Figure 19. Inducteurs électrophiles qui ciblent le résidu Cys¹⁵¹.

Keap1^{C151S} est un mutant de choix pour déterminer si le mode d'action d'un composé est dépendant du résidu Cys¹⁵¹. Le sulforaphane, le *t*BHQ, le CDDO-Im, le SNAP et le fumarate de diméthyle n'activent pas ce mutant, ou leur activité est significativement plus faible par rapport à celle sur Keap1^{WT}.^{43,64,67} Par protéomique, il a été démontré que l'isoliquiritigénine réagit avec les résidus Cys¹⁵¹ et Cys²²⁶.⁶⁸ Pour les autres, il est difficile d'observer les adduits covalents de ces molécules par spectrométrie de masse ou cela n'a pas été rapporté.⁶⁹

Les analogues de la figure 19 représentent les grandes familles d'inducteurs électrophiles qui ciblent le résidu Cys¹⁵¹. Ils possèdent tous un électrophile et soit un donneur de liaison hydrogène ou une fonction acide (cf. isoliquiritigénine, Tecfidera™, SNAP et CDDOs) soit un accepteur de liaison hydrogène (cf. *t*BHQ, SFN). Il est important de savoir que le Tecfidera™ est rapidement hydrolysé en fumarate de monométhyle, le métabolite actif, après administration orale.²⁹ Les hydroquinones telles que le *t*BHQ sont oxydées en quinone active en condition de stress oxydant.⁷⁰ Les méta-hydroquinones ne pouvant pas être oxydées ne sont pas actives. CDDO est un des composés les plus puissants pour activer la transcription des gènes d'ARE.⁷¹ Il représente la famille des cyanoénones non-énolisables, un pharmacophore reconnu pour l'étude de ce site actif.^{27,28,71-75} Presque deux ans après le début de ce projet,

le co-cristal de CDDO lié avec le résidu Cys¹⁵¹ dans le domaine BTB a été publié par GlaxoSmithKline.³⁹ Le design de molécules qui ciblent ce site actif a considérablement été influencé par ce papier.²⁸

Le résidu Cys¹⁵¹ additionne préférentiellement sur la face *si* de l'accepteur de Nazarov, la longueur du lien carbone-soufre est de 1.8 Å avec CDDO.^{28,39} Après l'addition nucléophile, la forme énol est stabilisée par un pont hydrogène entre les fonctions alcool et amide du résidu Gly¹⁴⁸, la partie *gem*-diméthyle fait des interactions hydrophobes avec Val¹⁵⁵ et Met¹⁴⁷ et la fonction acide crée une interaction électrostatique avec le résidu His¹²⁹ (figure 20 A).³⁹

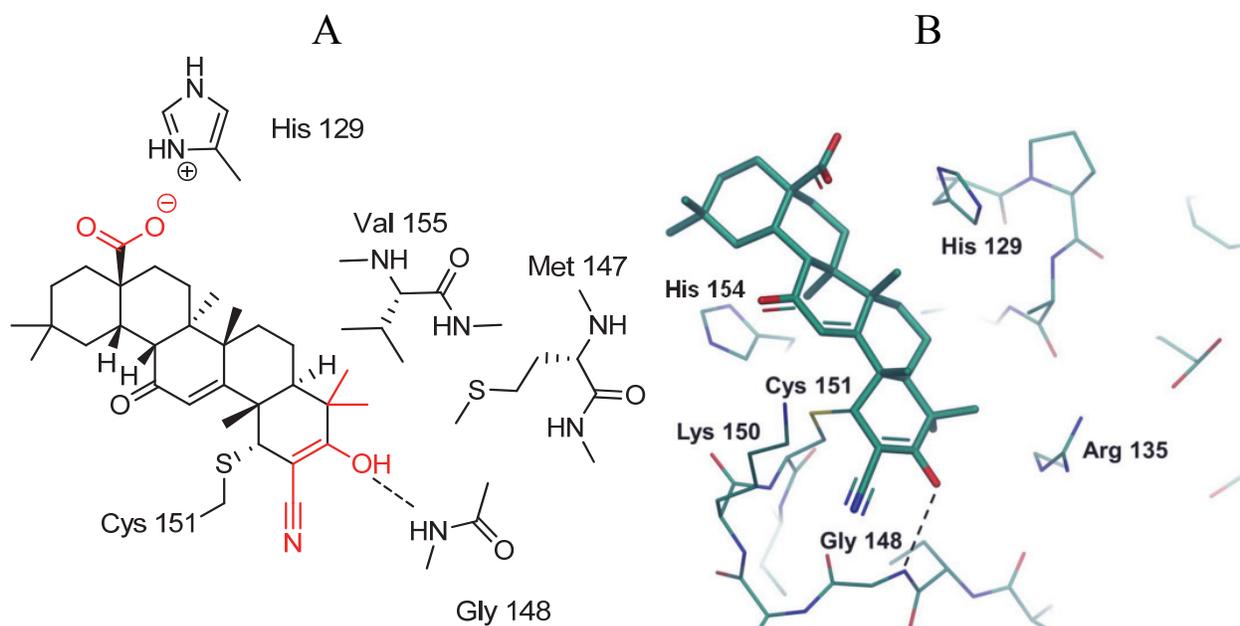


Figure 20. (A) Interactions entre CDDO et le domaine BTB. (B) Co-cristal de CDDO dans le domaine BTB (code PDB : 4CXT).³⁹

Par contre, les auteurs ne mentionnent aucune interaction avec la fonction énone du cycle C du triterpénoïde CDDO, qui est pourtant connue pour contribuer à la liaison de ces analogues avec Keap1 sans pour autant agir en tant que piège à résidu cystéine.²⁷ Lorsqu'on observe la structure cristalline, on remarque que ce cycle est orienté parallèlement au résidu His¹⁵⁴ (figure 20 B). Cette conformation nous force à nous demander s'il y a une interaction mettant en jeu les systèmes π des deux partenaires. Cette hypothèse a été explorée par la compagnie Reata Pharmaceuticals, qui a transformé le cycle C en pyrimidine ou en pyrazole.²⁸ Ceci a mené à la synthèse de TX64014 dans la série pyrimidine et TX64063

dans la série pyrazole, qui sont respectivement quatre et trois fois plus puissants que le CDDO-Me (figure 21 A et C).

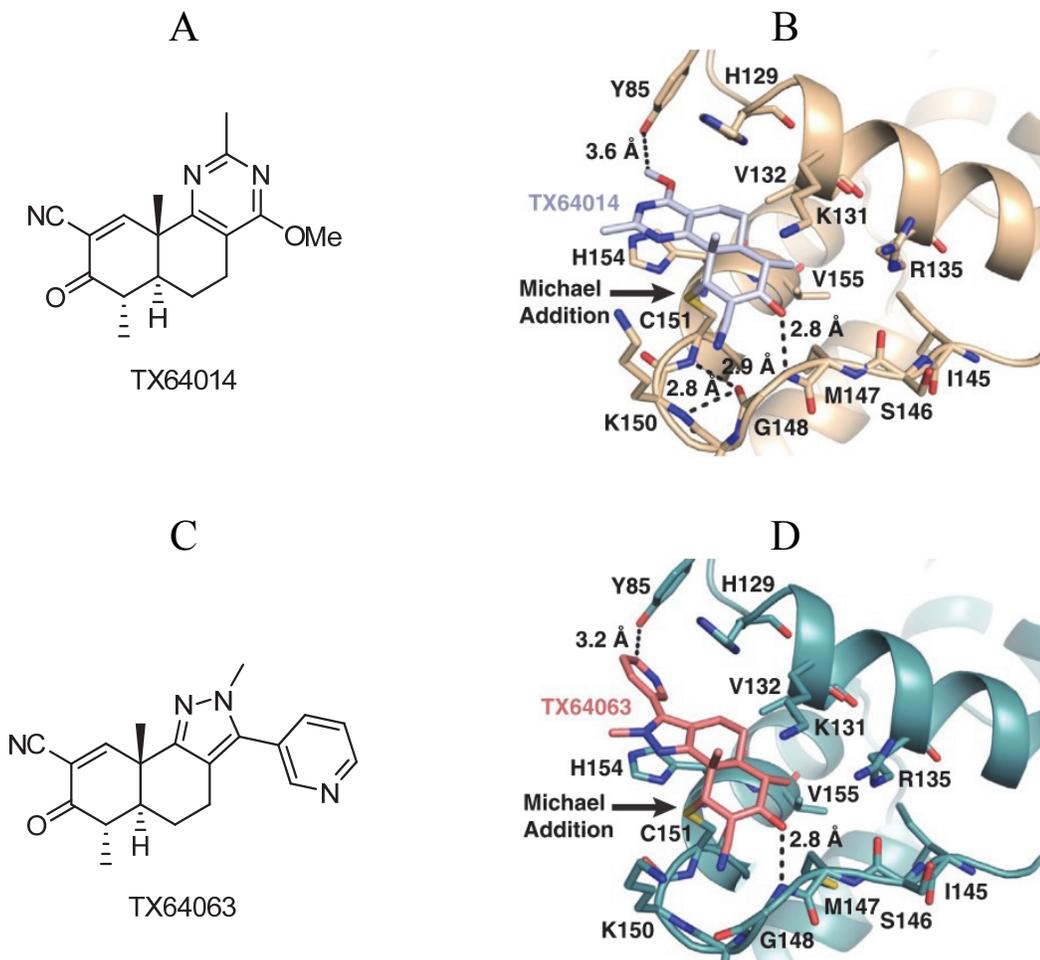


Figure 21. (A) Structure de TX64014. (B) Co-cristal de TX64014 avec le domaine BTB (code PDB : 5DAD). (C) Structure de TX64063. (D) Co-cristal de TX64063 avec le domaine BTB (code PDB : 5DAF).²⁸

Les deux composés portent une fonction énol qui fait une liaison hydrogène avec le résidu Gly¹⁴⁸, et les cycles A et B couvrent la surface hydrophobe formée par les résidus Val¹³², Ile¹⁴⁵, Met¹⁴⁷ et Val¹⁵⁵ comme pour le CDDO (figure 21 B et D). Des différences interviennent avec le cycle pyrimidine ou pyrazole. Tx64014 forme des interactions de type empilement- π entre sa fonction pyrimidine et les deux résidus His¹²⁹ et His¹⁵⁴, alors que le groupement méthoxy maintient des interactions de type van der Waals avec le résidu Tyr⁸⁵. TX64063 utilise ses fonctions pyrazole et pyridine pour faire des interactions de type

empilement- π avec les résidus His¹⁵⁴ et His¹²⁹ respectivement. L'atome de carbone en position *para* permet d'avoir également les interactions de type van der Waals avec le résidu Tyr⁸⁵.

Lorsqu'on les compare, ces modes de liaisons montrent que le site actif autour du résidu Cys¹⁵¹ est adaptable. Mais, on trouve aussi des interactions secondaires pouvant offrir de la spécificité. Très régulièrement, on trouvera la présence d'une fonction hydrophile distincte de l'électrophile sur les analogues qui ciblent le domaine BTB. L'attaque nucléophile est généralement réversible pour les inducteurs de cette famille.

1.3.3. La région IVR en tant que site sensoriel d'électrophiles

Les résidus cystéines les plus sensibles aux électrophiles se situent dans la région IVR (acides aminés 180 à 314), il s'agit de Cys²⁵⁷, Cys²⁷³, Cys²⁸⁸ et Cys²⁹⁷.³⁸ Les inducteurs qui ciblent ce domaine vont en général être capables de modifier plusieurs d'entre eux de manière covalente. Les mutations des résidus Cys²⁵⁷ et Cys²⁹⁷ par des résidus sérines n'affectent pas la régulation de Nrf2 par Keap1.⁷⁶ Mais, il y a trop peu de données sur ces deux résidus à notre avis pour déterminer clairement leur importance dans le processus d'ubiquitinylation et leur intérêt thérapeutique. Nous considérons que les résidus Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸ sont les senseurs principaux de la région IVR.^{43,62,63} Dû à la difficulté d'obtenir des mutations de ces deux cystéines qui conservent les propriétés de régulation de Nrf2, les électrophiles qui ciblent ces thiols sont le plus souvent identifiés par protéomique en utilisant mKeap1.⁶³ De plus, à notre connaissance, les inducteurs de cette famille sont majoritairement irréversibles (figure 22).

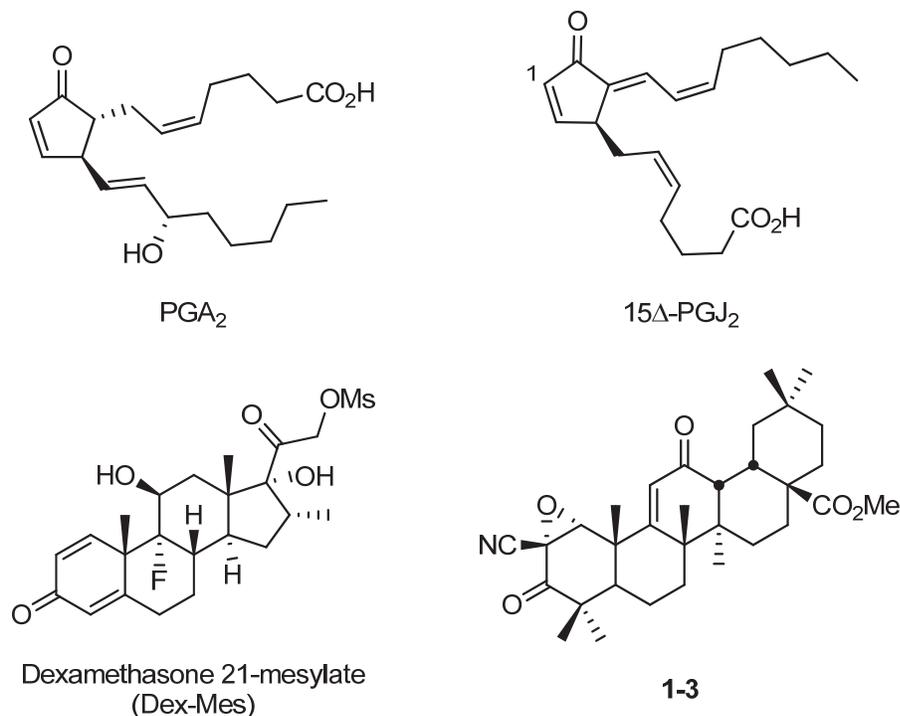


Figure 22. Inducteurs covalents ciblant la région IVR.

Selon les résultats rapportés dans la littérature, PGA₂ modifie les résidus Cys²⁷³, Cys²⁹⁷ et Cys⁴⁸⁹ alors que 15Δ-PGJ₂ cible les résidus Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸ seulement, malgré la similitude structurale de ces deux analogues.⁶⁴ Dex-Mes forme des liens covalents avec les résidus Cys²⁵⁷, Cys²⁷³, Cys²⁹⁹, Cys²⁹⁷ et Cys⁶¹³ par déplacement du groupe mésylate.³⁸ Dans l'optimisation d'analogues dérivés du CDDO inspirée par le métabolisme de phase I, une série d'époxydes a été étudiée.^{27,77} Ces composés offrent un bien meilleur profil toxicologique que CDDO tout en restant aussi puissant, mais ils n'ont peut-être pas le même mode d'action. Le triterpénoïde **1-3** forme des liens covalents avec les résidus Cys²⁵⁷, Cys²⁷³, Cys²⁸⁸, Cys⁴³⁴, Cys⁴⁸⁹ et Cys⁶¹³.²⁷ Saito *et al.* ont trouvé que les mutants Keap1^{C273W}, Keap1^{C288E}, Keap1^{C273W&C288E}, Keap1^{C151S&C273W&C288E} sont toujours capables de réguler Nrf2.⁶³ On peut donc les utiliser pour montrer l'importance de chaque résidu cystéine dans le mode d'action des inducteurs de la figure 22. PGA₂ et Dex-Mes induisent autant la transcription de Nrf2 avec Keap1^{C151S/C273W/C288E} qu'avec Keap1^{WT}.⁶³ Leur mode d'action semble indépendant de ces trois résidus. 15Δ-PGJ₂ n'a aucune action sur Keap1^{C288E} ou Keap1^{C273W/C288E} mais active le mutant Keap1^{C273W}. Son mode d'action serait dépendant du résidu Cys²⁸⁸.⁶³ Kim *et al.* ont récemment publié leur étude des relations structure-activité autour de 15Δ-PGJ₂.⁷⁷ Ils ont démontré que le rôle de l'alcène intracyclique est crucial mais que la présence des deux sites électrophiles est importante. La réduction-1,6 de la fonction alcène (Z) sur la chaîne latérale donne un

analogue plus puissant. L'ajout d'un atome de chlore en position 1 comme deuxième groupement électroattracteur sur le squelette cyclopenténone multiplie l'activité par un facteur trois, probablement à cause d'une augmentation de l'électrophilie. Enfin, l'énantiomère (*S*) est favorisé. L'hypothèse est que cette configuration facilite la sélectivité faciale de l'attaque nucléophile par Keap1.

À ce jour, il n'existe aucun cristal de la région IVR de Keap1. Trois groupes ont construit indépendamment des modèles d'homologie différents.^{27,76,77} Malheureusement, le pourcentage d'identité entre la région IVR et les modèles utilisés est au maximum de 34% (modèle basé sur 1E2X) ou de 25% (modèles basés sur 3HVE ou 4AP2).⁷⁸⁻⁸⁰ Même si la similitude des séquences est faible, nous avons reconstruit et superposé les deux derniers modèles avec l'aide du Dr Pierre-Luc Boudreault, en suivant les informations laissées par les auteurs (figure 23).



Figure 23. Superposition des modèles d'homologie de la région IVR basé sur les structures 4PA2 (gris) et 3HVE (rouge).

Dans la moitié gauche de l'image, la superposition est assez bonne et présente beaucoup de parties ordonnées. Les résidus Cys²⁵⁷, Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸ se trouvent dans la moitié droite de l'image (le résidu Cys²⁹⁷ est absent des modèles) et varient énormément d'une structure à l'autre. De plus, les résidus cystéines d'intérêt se trouvent à des positions bien différentes sur chaque modèle (image non fournie). Les résidus Cys²⁷³ font partie d'une hélice α alors que les autres sont sur des chaînes flexibles. Ces résidus

sont également trop éloignés les uns des autres dans ces conformations pour soutenir l'hypothèse qu'une seule molécule avec deux sites électrophiles soit en mesure de piéger deux d'entre elles simultanément.

La région IVR de Keap1 est très singulière, son fonctionnement ne ressemble à aucun autre de la famille KLHL (voir 1.3.1). Il sera sûrement très difficile de construire un modèle d'homologie de bonne qualité. À la vue des données présentes dans la littérature, notre analyse est que les résidus cystéines de cette région sont modifiables par des inducteurs covalents irréversibles. Dex-Mes et **1-3** sont structurellement similaires au CDDO et devraient cibler le résidu Cys¹⁵¹. Cependant, les résidus cystéines de la région IVR sont les plus nucléophiles, donc ces composés se retrouvent coincés dans cette partie de la protéine. CDDO est un inducteur covalent réversible, il est donc capable de se déplacer entre le domaine BTB et la région IVR. Ultiment, il va piéger le résidu Cys¹⁵¹ et les interactions secondaires non-covalentes vont le stabiliser dans ce site actif. Nous ne connaissons pas d'interaction secondaire potentielle pouvant être utilisée pour générer une molécule qui ciblera spécifiquement la région IVR. De plus, le rôle des autres résidus cystéines de cette région reste à élucider.

1.3.4. Perspectives

La voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE peut être activée de plusieurs façons différentes et complémentaires. Tous les inducteurs n'ont pas le même impact thérapeutique. Aujourd'hui, les inhibiteurs d'interactions protéine-protéine sont les plus étudiés. Nous voyons plusieurs raisons à cela. Les électrophiles sont souvent regardés comme des toxicophores.²⁴ On s'inquiète de leur toxicité par la formation de liens covalents de manière non-spécifique. Cibler l'iPP est donc une solution plus sûre. De plus, on arrive presque systématiquement à obtenir le co-cristal de ces molécules dans le domaine DGR. Ceci facilite l'optimisation du design par arrimage moléculaire. C'est un domaine qui est devenu très concurrentiel en peu de temps.

À ce jour, les inducteurs covalents restent de loin les plus puissants et leur potentiel thérapeutique est validé par le succès du TecfideraTM. De plus, le concept d'inhibition covalente a connu un regain d'intérêt dans les dernières années.⁸¹ Nous reconnaissons que cette stratégie est peut-être un défi bien plus gros et comporte plus de risques. Il est encore difficile de rationaliser comment on peut cibler de manière sélective le domaine BTB ou la région IVR. Les différences entre les composés qui ciblent spécifiquement

ces deux sites actifs sont subtiles. Les molécules 4-HNE et 9-OA-NO₂ ne sont pas spécifiques et ciblent à la fois les résidus Cys¹⁵¹, Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸ (figure 24).⁶³

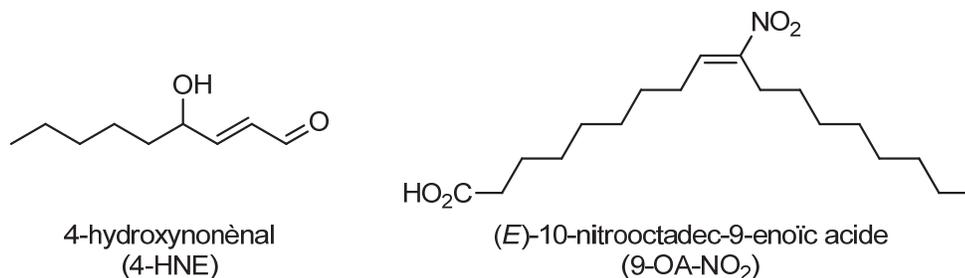


Figure 24. Électrophiles qui ciblent à la fois le domaine BTB et la région IVR.

Déterminer quel est le résidu cystéine cible sans ambiguïté reste un défi car les technologies nécessaires (protéomique ou utilisation de mutants) ne sont pas toujours disponibles, et parfois les résultats se contredisent (e.g. ebselen).^{64,67} L'absence de cristal de la région IVR fait également que le design de molécules ciblant spécifiquement cette partie ne bénéficie pas de cette contribution structurale. L'étude plus spécifique de cette région est un défi important. Cependant, les résultats ont le potentiel d'être d'autant plus important dans l'avancement de notre compréhension du fonctionnement du complexe Keap1-Nrf2. Pour nous, tous ces éléments font que ce projet est d'autant plus excitant.

La stratégie de départ était de synthétiser des molécules capables de piéger plus d'un résidu cystéine pour tirer avantage du grand nombre d'entre eux présents sur Keap1. À ce moment-là, les structures cristallines du domaine BTB n'avaient pas encore été publiées.³⁹ Dans un premier volet, plusieurs électrophiles simples ont été synthétisés dans le but de tester les préférences de la cible et offrir un peu plus de flexibilité et de facilité dans le design. Dans le deuxième volet, des bis-électrophiles ont été obtenus pour valider l'hypothèse de départ. Cette nouvelle particularité a apporté une hausse significative de l'activité vis à vis de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE. Au fur et à mesure de l'avancement du projet, nous avons cherché une explication à ce résultat en continuant à adapter le design de nouvelles molécules et en insérant les nouvelles informations de la littérature. Nous apportons des éléments de réponses mais l'absence d'une preuve directe laisse encore place au débat pour déterminer le site d'action de cette nouvelle classe d'inducteurs covalents de la transcription de Nrf2.

CHAPITRE 2 : DESIGN ET ESSAIS BIOLOGIQUES

2.1. Design

D'après notre analyse du chapitre 1, pour être un bon inducteur covalent de la voie de signalisation de Keap1/Nrf2/ARE, une molécule doit posséder un électrophile assez fort pour être capable de piéger la fonction thiol d'un résidu cystéine nucléophile. Dû à la présence de nombreux résidus cystéine sur Keap1, la réversibilité est importante pour s'assurer que l'analogue puisse aller dans le bon site actif. La spécificité doit provenir de l'hyperforme et/ou d'interactions secondaires potentielles.

Notre design (figure 25) est fortement inspiré du CDDO et, de façon plus générale, des travaux sur les cyanoénones.^{71,72} Les accepteurs de Nazarov (β -dicarbonyles- α,β' -insaturés) ressortent comme des électrophiles de choix pour cette cible : ils sont puissants et assurent la réversibilité de la formation de lien covalent contrairement aux accepteurs de Michael simples.^{81,82} Le mécanisme d'élimination de la réaction inverse est facilité par l'acidité accrue du proton entre les deux groupes électroattracteurs.

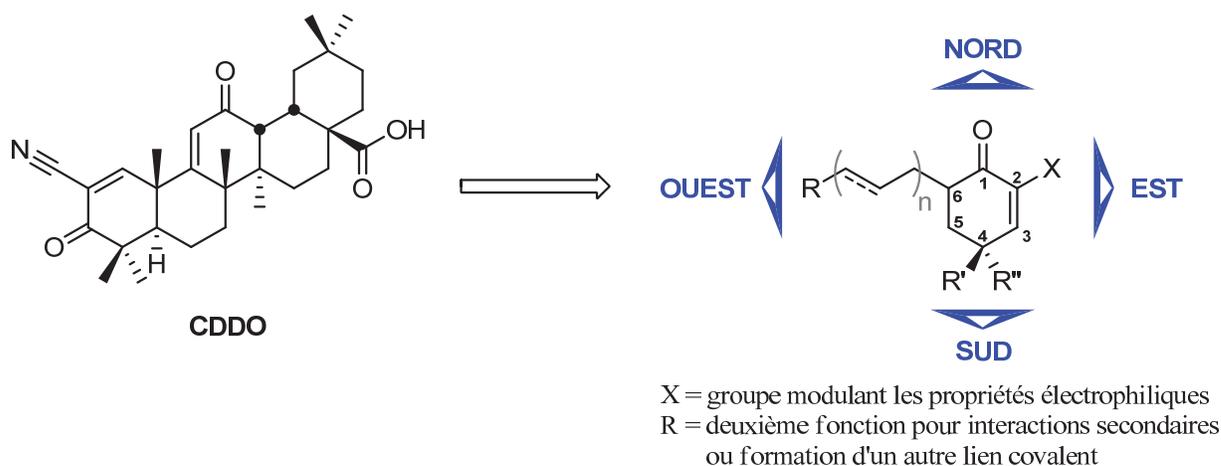


Figure 25 Design des inducteurs électrophiles

Le premier volet de notre projet est l'optimisation du motif électrophile pour tester la polyvalence de Keap1. Avoir une librairie d'électrophiles disponibles serait un pas en avant vers la compréhension de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE. Nous avons donc choisi de garder l'accepteur de Nazarov avec

la possibilité de modifier le deuxième groupe électroattracteur **X** dans la région est. **R'** et **R''** au sud ont permis d'encombrer la position C3 et de moduler sa réactivité vis-à-vis des nucléophiles. La réactivité des électrophiles devait tout de même être modérée pour avoir des composés stables et isolables qui ne réagiront pas avec n'importe quel nucléophile en milieu biologique. De plus, ce site de substitution en position C4 pourrait servir à sonder des interactions supplémentaires dans la continuité de ce projet. La région ouest a été choisie pour installer la fonction **R** pour son accessibilité synthétique. Elle permettra de sonder des interactions non-covalentes potentielles.

Le deuxième volet de ce projet est la synthèse et l'évaluation de bis-électrophiles. En parcourant la littérature, nous avons remarqué que très souvent, les inducteurs les plus puissants vis à vis de la cible possèdent deux électrophiles capables de réagir chacun avec un nucléophile soufré.^{77,83,84} Par contre, à notre connaissance, il n'a pas été démontré que ces molécules sont capables de piéger simultanément deux cystéines sur Keap1 et qu'un tel mode d'action induit la transcription des gènes sous le contrôle de Nrf2. Pour comparer des analogues avec un ou plusieurs centres électrophiles, nous avons besoin d'attacher ces fonctions assez facilement sur un même composé. Le deuxième électrophile sera placé à la position R. Les régions est et ouest sont séparées par une chaîne carbonée dont la longueur et la rigidité pourront être modifiées afin d'obtenir des molécules aux propriétés différentes. De plus, l'utilisation de bis-électrophiles, en reconnaissant deux cystéines, permet d'envisager une meilleure spécificité découlant de la distance entre les deux fonctions électrophiles.

Stratégiquement, nous avons voulu suivre le plus possible une règle simple basée sur la génération de diversité : « plus on a d'analogues, plus on a d'information ». C'est-à-dire qu'assez rarement, nous nous sommes lancés dans des optimisations approfondies pour la synthèse d'une molécule en particulier. Nous avons voulu faire le maximum de composés le plus rapidement possible pour interroger la cible et apprendre à la connaître, ce qui au final est une façon de faire classique en chimie médicinale.

Plusieurs échecs n'ont été l'objet que d'une tentative et donc, une optimisation est envisageable. Les rendements sont moyens dans certains cas ; les conditions de réactions étaient améliorées au fur et à mesure des synthèses et des analogues, expliquant parfois les rendements plus faibles en début qu'en fin de série. Très souvent, nous avons mené plusieurs approches en parallèles, les moins prometteuses ont été abandonnées délibérément pour mettre l'accent sur les plus encourageantes. Les approches que nous avons développées sont très divergentes, robustes et modulables.

2.2. Description des tests biologiques

2.2.1. Introduction

L'induction de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE peut être mesurée de plusieurs façons. Très souvent, on va tester les molécules dans deux essais différents et indépendants, d'autant plus que les électrophiles de type Michael ou Nazarov sont classés parmi les *pan assay interference compounds* (PAINS), composés connus pour interférer de façon non spécifique dans les tests biologiques.⁸⁵ Ce contrôle est nécessaire pour confirmer que l'induction de Nrf2 ne se fait pas par un mécanisme secondaire. Nrf2 est au cœur d'un réseau complexe qui régule l'homéostasie cellulaire et influence le métabolisme intermédiaire, tel que représenté à la figure 26.⁶

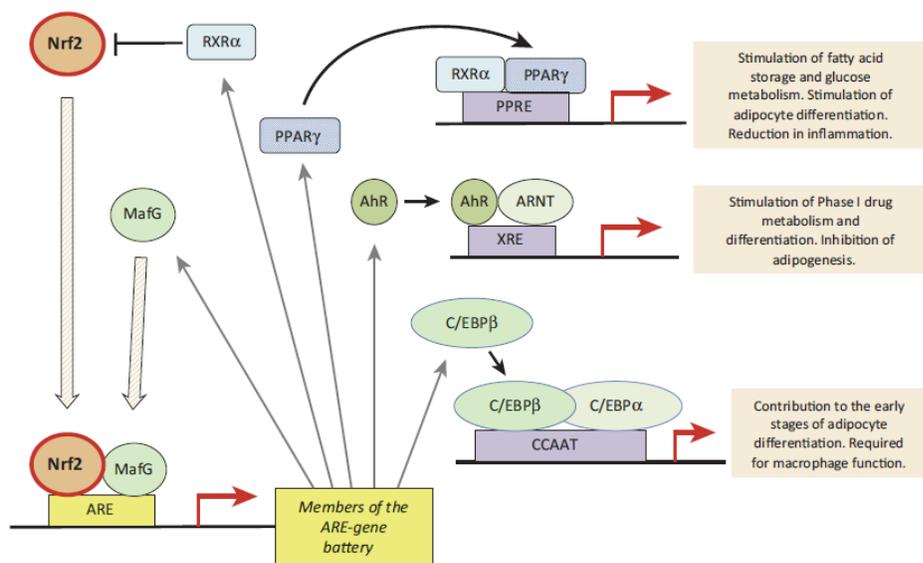


Figure 26. Relations entre Nrf2 et plusieurs facteurs de transcriptions.⁶

L'essai luciférase (détaillé ci-après) a été utilisé pour l'évaluation systématique de l'induction de Nrf2. En guise de deuxième test de contrôle, nous avons mesuré l'induction de NQO1 (également détaillé ci-après). Ce sont deux des quatre essais couramment utilisés pour mesurer l'activité des inducteurs d'ARE. Le troisième est la mesure de l'induction de HO-1 qui est très similaire à celle de NQO1,^{59,60,77,86-88} et le quatrième est l'évaluation de la capacité des composés à réduire une quantité de monoxyde de carbone

générée dans l'essai.⁷¹⁻⁷³ Ces méthodes sont à la fois utilisables pour les inducteurs covalents et non-covalents.

Pour les électrophiles, on observe très souvent une bonne corrélation entre leur réactivité vis-à-vis de nucléophiles de type thiol et leur capacité à induire la transcription de Nrf2. Certains groupes de recherche ont systématiquement évalué l'électrophilie ainsi que l'équilibre et/ou la vitesse de la réaction entre ces électrophiles et différents thiols.^{72,73,83} Les inhibiteurs non-covalents de l'interaction Keap1-Nrf2 ont un mode d'action différent. Leur activité peut être évalué par compétition avec un peptide marqué qui correspond au motif ETGE de Nrf2.^{57,59,60}

La cytotoxicité de toutes les molécules a par ailleurs été évaluée par mesure du relargage de lactate déshydrogénase (LDH) en duplicata. Nous avons considéré qu'au-delà de 5%, la toxicité d'un composé pouvait avoir une influence sur l'activité mesurée. Dans notre analyse, les valeurs de cLogP prédites avec le logiciel ChemDraw 12.0 ont été utilisées pour comparer les molécules selon leur lipophilie qui peut indiquer un problème de sélectivité vers d'autres nucléophiles présents dans le milieu cellulaire. Les résultats obtenus sont exprimés dans le format suivant : moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne). Tous ces contrôles permettent de confirmer que la réponse que nous mesurons est bien dépendante de Nrf2. Les analyses (essai luciférase, qPCR et toxicité) ont été menées au laboratoire du professeur Martin Richter par Hussein Traboulsi, alors étudiant au doctorat. Les protocoles détaillés sont disponibles dans les annexes.

2.2.2. Mesure de l'induction de Nrf2 par l'essai luciférase

Tous nos analogues ont été testés dans cet essai à des concentrations de 0.1 à 100 μ M selon les cas. C'est une mesure largement utilisée pour la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE.^{28,58,59,74,76,86,87,89} Les cellules HEK293T ont été transfectées de façon stable avec un plasmide contenant l'élément de réponse ARE suivi d'un gène codant pour la luciférase (figure 27). Le complexe Keap1-Nrf2 se trouve dans le cytosol délimité en bleu, le plasmide se trouve dans le noyau, en vert, qui contient aussi l'ADN.

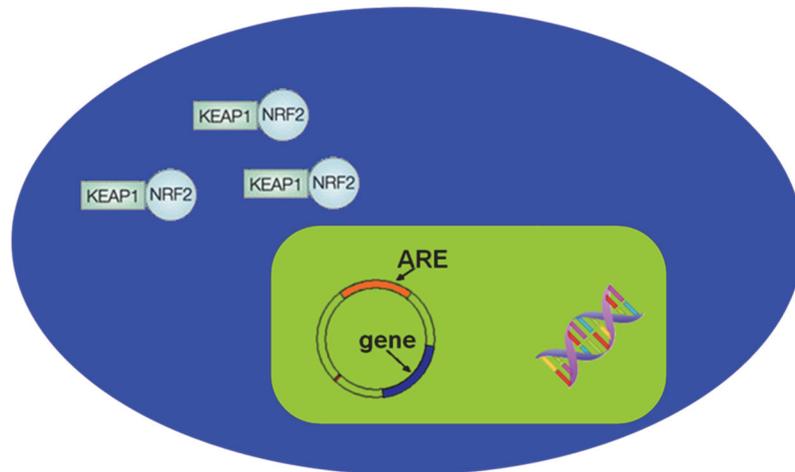


Figure 27. Cellules transfectées pour l'essai luciférase (bleu : cytoplasme, vert : noyau).

Ces cellules sont traitées pendant 24 h avec les composés d'intérêt à plusieurs concentrations dans le DMSO (< 1%). Après activation, une quantité de Nrf2 libre migre vers le noyau et se lie à l'élément de réponse ARE soit sur le plasmide soit sur l'ADN. La répartition devrait toujours être la même. De par la liaison sur le plasmide, une quantité de luciférase est produite au sein de la cellule (figure 28).

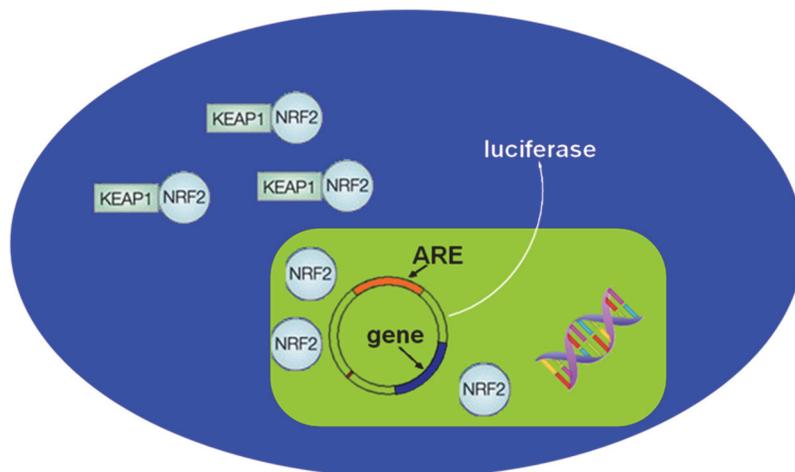


Figure 28. Production de luciférase au sein de la cellule (bleu : cytoplasme, vert : noyau).

Après les 24 h de traitement, les cellules sont récoltées et lysées. On ajoute la D-luciférine qui est transformée en oxyluciférine par la luciférase (schéma 2.1). On mesure l'intensité lumineuse qui est libérée lors de cette transformation. Elle est directement fonction de l'activité relative des composés aux différentes concentrations. Le sulforaphane, à 10 μM dans le DMSO, est utilisé comme contrôle positif.

Pour le contrôle négatif, on utilise seulement le même volume de DMSO, sans composé ; cette valeur est fixée à 1 et sert de référence. Les valeurs reportées sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

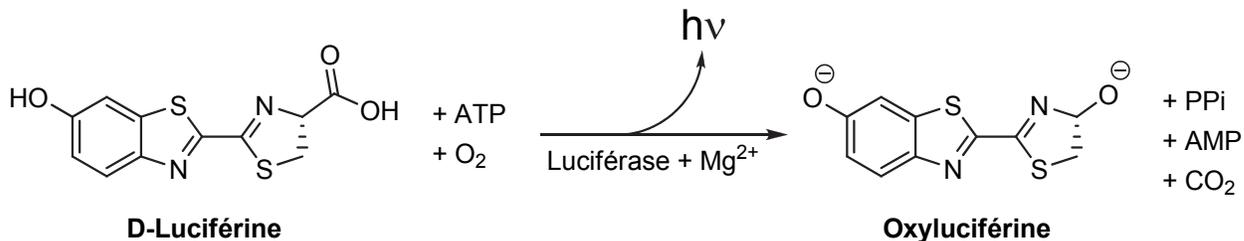


Schéma 2.1.

2.2.3. Mesure de l'induction de NQO1 par qPCR

Dans le deuxième test, la mesure l'induction de NQO1, un des gènes cible de Nrf2, a été choisie. L'induction de NQO1 n'est pas observée dans les cellules déficientes en Nrf2.⁹⁰ Pour cette raison, cette mesure est largement utilisée dans l'étude de cette cible.^{28,55,58-60,71-75,83,87,89,91} Nous avons décidé de ne tester qu'une partie des composés pour confirmer nos hypothèses et que le mode d'action est bien dépendant de Nrf2. La mesure de l'induction de NQO1 a été faite avec la méthode quantitative de réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR, voir 4.4). Le sulforaphane et le DMSO ont été une nouvelle fois utilisés comme contrôle positif et négatif respectivement. Le contrôle négatif sert de référence, fixé à 1. Les valeurs reportées sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

2.2.4. Mesure de la cytotoxicité dans l'essai LDH

Dans cet essai, les cellules ont été traitées avec les molécules ou triton 1% (contrôle positif) pendant 24 h. Le surnageant a été récupéré et les cellules ont été lysées. Les contenus ont été remélangés et l'activité LDH a été mesurée par absorbance. Les valeurs reportées sont la moyenne de deux expériences indépendantes et ne sont pas normalisées par rapport à une référence.

CHAPITRE 3 : LA SÉRIE DIOXOLANE

3.1. Synthèse

Dans la première série, la région sud a été occupée par un acétal à cause de la cétone choisie comme composé de départ arbitrairement (figure 25). En premier, le deuxième groupe électroattracteur a été installé en utilisant la cétone comme nucléophile. Puis, avec la chimie des β -dicarboxyles, la région ouest a pu être fonctionnalisée. Pour finir, l'oxydation du β -dicarboxyle a donné les accepteurs de Nazarov désirés.

3.1.1. Monoélectrophiles

L'acétal de la monoéthylèncyclohexane-1,4-dione **3-3** a été choisi comme point de départ car il permettait les fonctionnalisations souhaitées et était disponible commercialement à un prix raisonnable (schéma 3.1). Dans la volonté d'en faire tout de même la synthèse, la stratégie la plus simple aurait été la monoprotection de la cyclohexane-1,4-dione (**3-1**) mais l'unique exemple de la littérature rapporte un faible rendement de 35%.⁹² Une stratégie attrayante était la transacétalisation entre la dicétone **3-1** et son analogue entièrement protégé **3-2** décrite par Geneste.⁹³ La purification par recristallisation du mélange obtenu a donné trop peu de produit pour conserver cette approche. La meilleure méthode a été la monodéprotection du dicétal **3-2** décrite par Nicolaou,⁹⁴ qui a mené à un mélange à 60% en faveur de la cétone **3-3** avec le produit de départ. Néanmoins, son isolation était encore trop difficile pour générer une quantité de produit acceptable et rendre cette solution viable. La double protection de la dicétone **3-1**, quant à elle, fonctionne très bien dans des conditions standards.

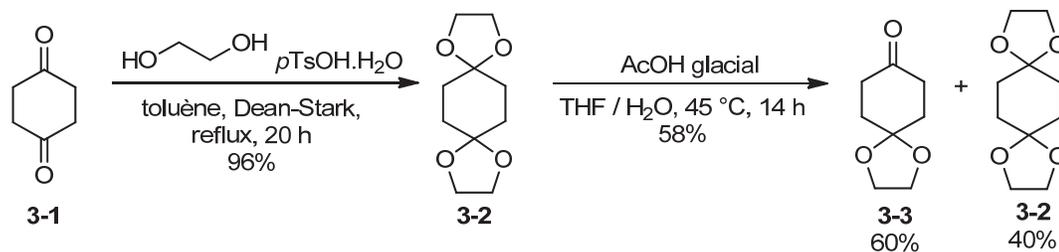


Schéma 3.1

À partir du produit commercial, l'addition de l'énolate de la cétone **3-3** sur le carbonate de diméthyle a donné le cétoester **3-4** (schéma 3.2).⁹⁵ Il est l'intermédiaire commun nécessaire à la dérivation dans cette série.

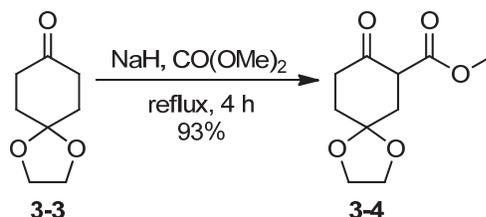


Schéma 3.2.

Les premiers monoélectrophiles ont été obtenus en trois étapes à partir du cétoester **3-4**. Larry Weiler a développé une méthode efficace pour alkyler la position γ d'un cétoester (figure 29).⁹⁶ Une première déprotonation avec NaH à basse température forme le monoanion, puis on y ajoute *n*-BuLi pour faire la deuxième déprotonation.⁹⁷⁻¹⁰⁰

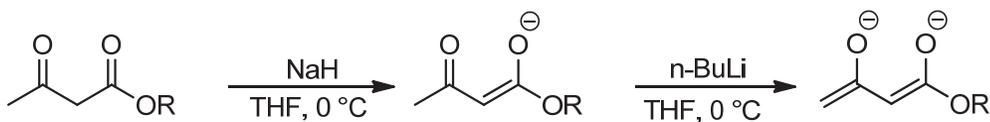


Figure 29. Formation du dianion de cétoesters

Ce dianion peut être utilisé en tant que nucléophile, la position γ étant la plus réactive. Néanmoins, l'utilisation de cette méthode a donné des mélanges complexes desquels aucun produit ne pouvait être isolé. La formation du dianion n'était possiblement pas complète et propre dans notre cas. L'utilisation de deux équivalents de diisopropylamidure de lithium (LDA), l'autre méthode communément utilisée pour générer ces espèces en solution a été préférée.¹⁰¹⁻¹⁰⁵

L'alkylation du dianion du cétoester **3-4** avec l'iodure d'hexyle ou de méthyle a donné les deux produits désirés (schéma 3.3). La tautomérie rend le mélange de diastéréoisomères très complexe. L'isolation par chromatographie sur colonne est approximative et leur caractérisation impossible. Toutefois, chaque mélange isolé a été analysé par spectrométrie de masse pour confirmer la présence du bon produit. Les

accepteurs de Nazarov **3-6** et **3-8** ont été synthétisés en deux étapes supplémentaires avec la méthode de Liotta.¹⁰⁶ PhSeBr et PhSeCl sont autant efficaces pour l'addition de phénylsélényle en position α du dicarbone. La facilité de cette réaction est directement liée à la proportion d'énol en solution. Elle est minoritaire dans nos cas, d'où les rendements moyens pour les composés **3-5** et **3-7**. La dernière étape d'oxydation / élimination a donné d'excellents rendements. Les deux étapes se font habituellement sans purification de l'intermédiaire. Cependant, les accepteurs de Nazarov **3-6** et **3-8** dégradent sur silice et ne peuvent donc pas être purifiés par chromatographie classique. Ce problème a été contourné en isolant et en purifiant plutôt les intermédiaires **3-5** et **3-7**. L'oxydation / élimination finale est très propre et permet d'obtenir les produits **3-6** et **3-8** purs après traitement.

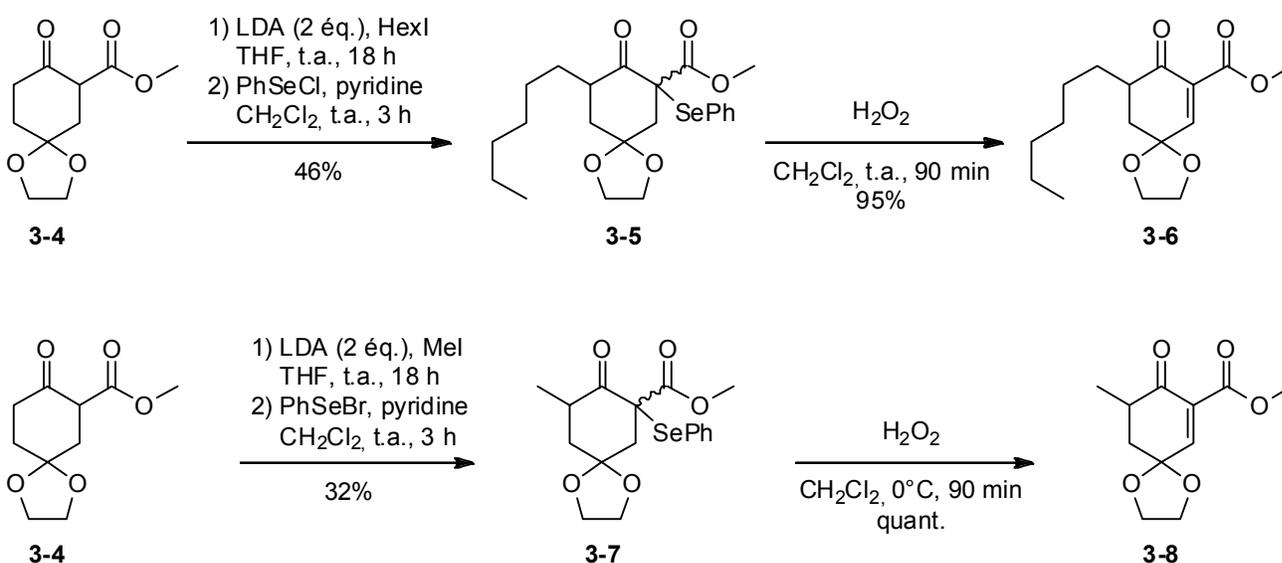


Schéma 3.3

Pour sonder la région est et obtenir des électrophiles aux propriétés électroniques différentes, l'ester de l'accepteur de Nazarov a été remplacé par d'autres fonctions à la position X (figure 25). Le cétoaldéhyde **3-9** a été obtenu par addition de l'énolate de la cétone **3-3** sur le formiate d'éthyle (schéma 3.4).¹⁰⁷ Il existe exclusivement sous cette forme énol en solution. L'accepteur de Michael le plus simple **3-11** a été synthétisé par oxydation de Saegusa de l'éther d'énol **3-10** tel que déjà décrit.¹⁰⁸

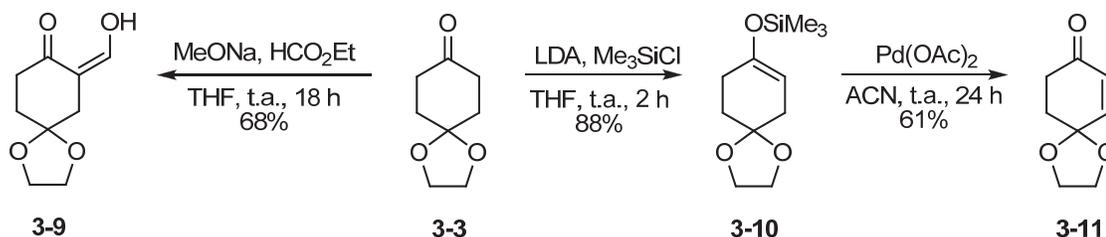


Schéma 3.4

Les cétoaldéhydes sont également de bons précurseurs pour l'alkylation en position γ par formation du dianion (schéma 3.5).¹⁰⁹ Puisque ces molécules existent exclusivement sous leur forme énol, l'isolation avec certitude les produits d'alkylation **3-12** et **3-14** est difficile. L'accepteur de Nazarov **3-13** a été obtenu de la même manière que les cétoesters avec la méthode de Liotta.¹⁰⁶ L'addition de PhSeBr est beaucoup plus facile car le produit de départ est déjà dans sa forme énol. L'intermédiaire devait encore être purifié avant l'oxydation / élimination. Le composé **3-15** n'a pas pu être obtenu car la première étape d'addition du phénylsélényle a donné des produits secondaires, vraisemblablement à cause d'interférence de l'alcène terminal, qui sont difficilement séparables. D'autres méthodes d'oxydation permettraient le passage direct du cétoaldéhyde **3-14** à l'accepteur de Nazarov **3-15** mais ce dernier s'est dégradé sur silice et n'a pas pu être purifié. À la lueur des résultats biologiques et de la difficulté à isoler ces analogues, poursuite avec les cétoaldéhydes n'était pas stratégiquement viable.

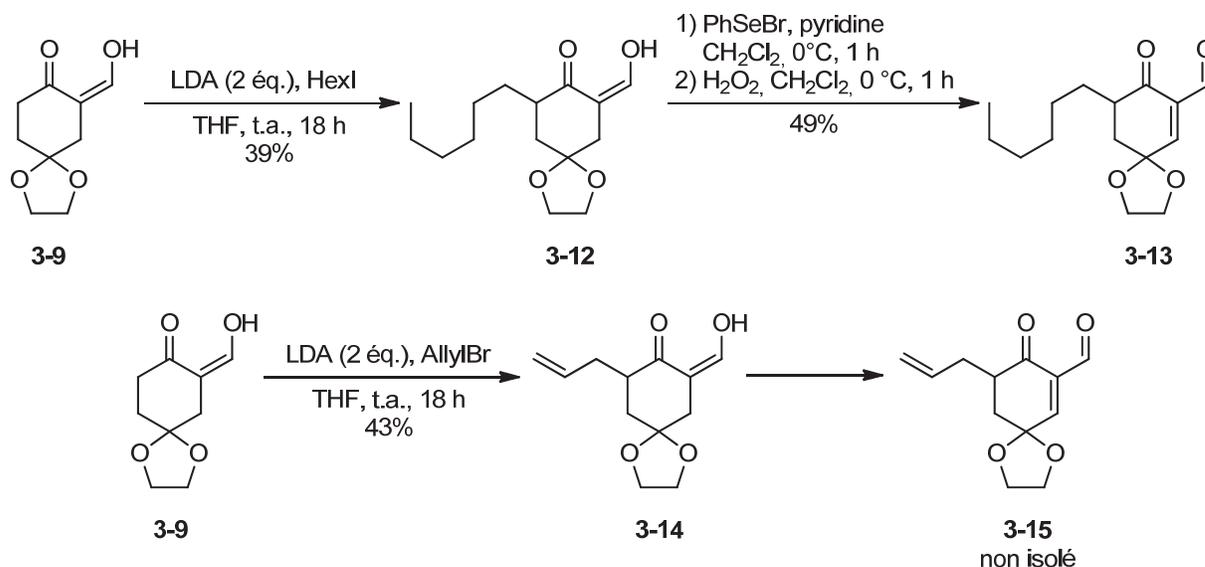


Schéma 3.5

Le centre électrophile a été installé du côté ouest pour préparer des analogues de type accepteur de Michael (schéma 3.6). La position α a été méthylée pour bloquer sa réactivité et les cétoesters **3-16**, **3-19** et **3-21** ont été obtenus.¹¹⁰ L'accepteur de Michael **3-17** a été préparé par addition de l'énolate de la cétone **3-16**, généré avec LDA, sur PhSeBr et l'oxydation / élimination subséquente.¹¹¹⁻¹¹³ Dans ce cas, le produit final **3-17** a été purifié au lieu de l'intermédiaire. Par contre, cette réaction n'a pas fonctionné avec les cétones **3-19** et **3-21**. Les interactions stériques sont trop importantes lors de l'addition de phénylsélényle, les énones **3-20** et **3-22** n'ont pas été obtenus.

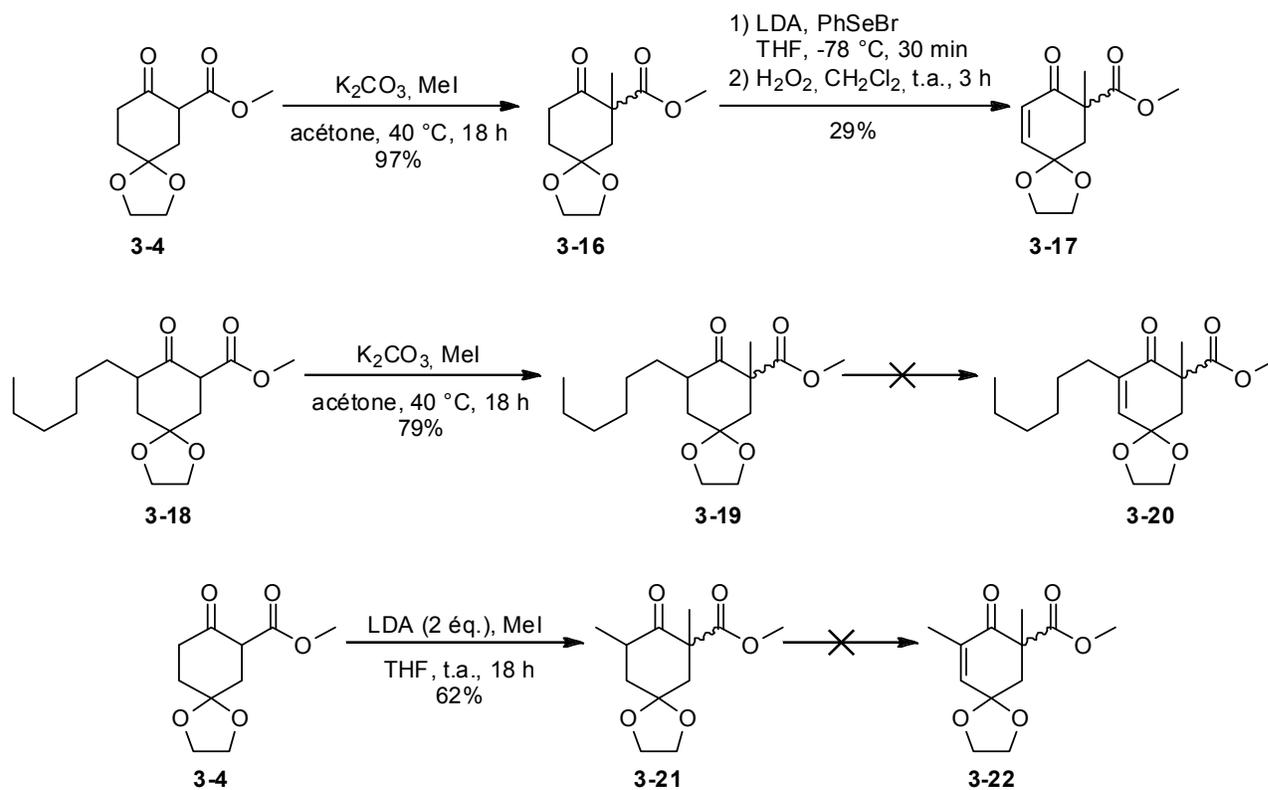


Schéma 3.6

3.1.2. Bis-électrophiles

Pour cette étude, et tel qu'argumenté dans la section design (2.1) du chapitre 2, un autre accepteur de Nazarov doit être placé dans la région ouest. La même voie synthétique a été utilisée (schéma 3.7). L'addition du dianion de la cétone **3-4** sur une chaîne diiodée a permis d'obtenir le produit de double addition. Aucun produits secondaires de cyclisation tels que ceux décrit par Langer n'ont été observés.¹¹⁴

La double sélénation a fonctionné pour donner les composés **3-23** et **3-25**. Une fois encore, ces intermédiaires sont purifiés avant l'étape d'oxydation / élimination pour fournir les bis-électrophiles **3-24** et **3-26**.

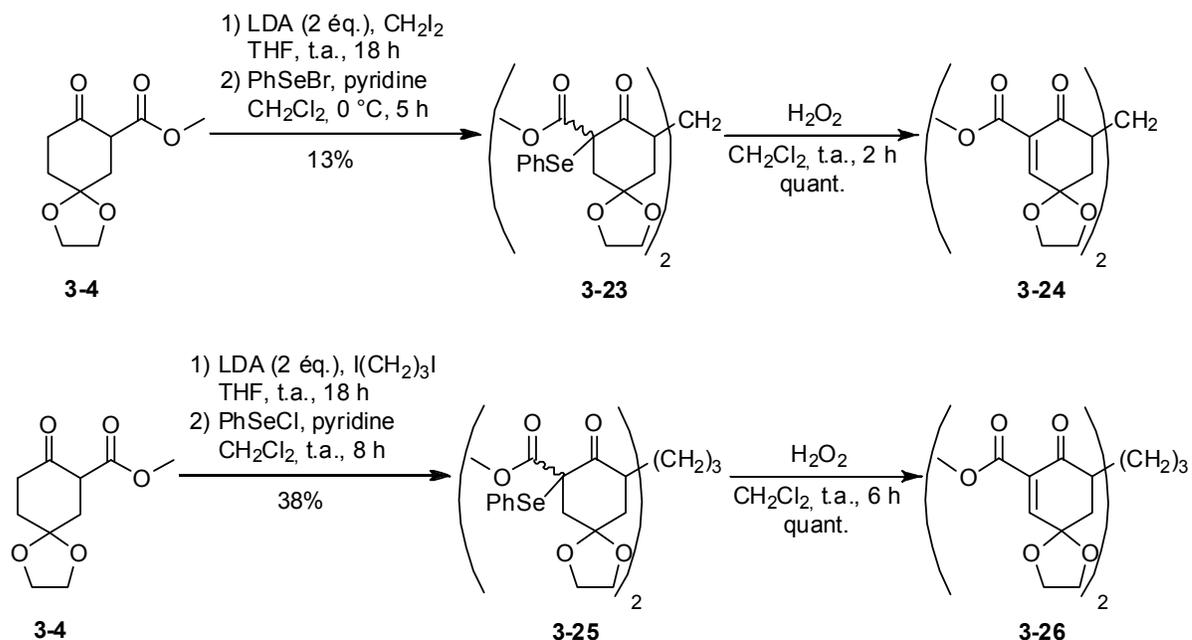


Schéma 3.7.

3.2. Résultats biologiques et interprétation

Cette première série contient six analogues (schéma 3.8). Trois accepteurs de Nazarov simples avec une substitution en γ ont été obtenus. Les deux premiers ont un ester méthylique (cf. **3-6** et **3-8**) en tant que deuxième groupement électroattracteur alors que le troisième a un aldéhyde (cf. **3-13**). Le quatrième analogue est un accepteur de Michael (cf. **3-17**) pour lequel le motif cétoester a été conservé mais la conjugaison a été bloquée par un substituant méthyle. Enfin, deux molécules **3-25** et **3-27** possèdent deux accepteurs de Nazarov. Les deux cycles sont séparés par un méthylène ou un propylène substitué sur la position γ .

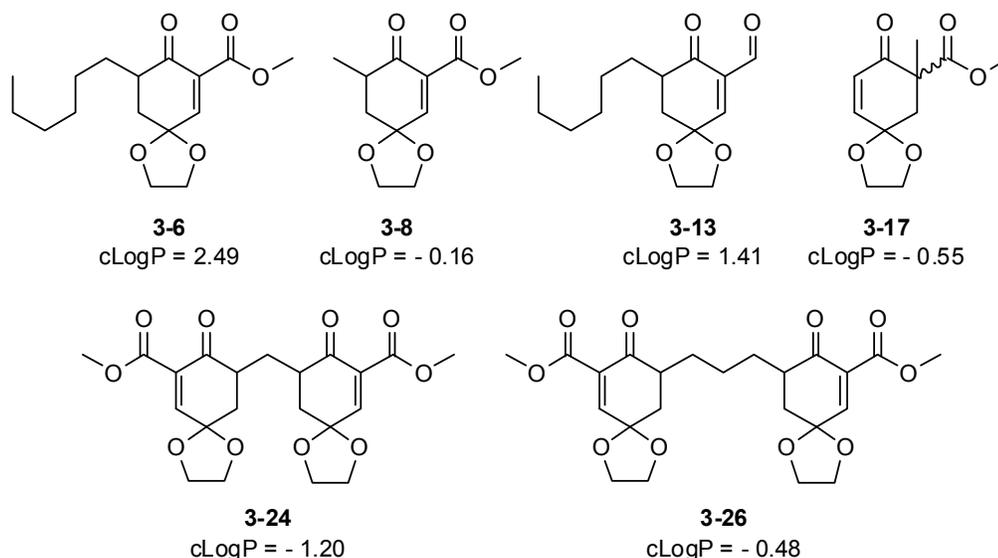


Schéma 3.8.

L'activité des composés a été mesurée dans l'essai luciférase et est rapportée de façon relative à l'induction du DMSO fixée comme étant 1 (sans unité). L'activité des composés de cette série est assez modérée, que ce soit pour les électrophiles simples (**3-6**, **3-8**, **3-13** et **3-17**) ou pour les bis-électrophiles (**3-25** et **3-27**, figure 30 A). Des valeurs intéressantes, qui traduisent un effet sur la cible, ont été observées seulement à haute concentration, soit à 50 et à 100 μM . L'énone **3-17** est aussi active que les accepteurs de Nazarov **3-6** et **3-8** qui sont pourtant bien plus électrophiles. De plus, l'ajout d'un deuxième électrophile (**3-24** et **3-26**) n'a qu'un effet modéré sur l'augmentation de l'activité dans cette série.

À l'exception du composé **3-6**, la toxicité excède assez largement les 5% à ces concentrations (figure 30 B). La toxicité des inducteurs covalents en milieu biologique est souvent attribuée à un manque de spécificité.¹¹⁵ C'est ce que nous pensons qu'il se passe avec cette série. Il y a d'autres nucléophiles présents en milieu cellulaire qui peuvent consommer ces électrophiles.^{72,73,90} Le premier auquel on pense est le glutathion (GSH, schéma 3.9). Ce tripeptide se retrouve à une concentration de l'ordre du millimolaire dans la cellule et a pour rôle de détoxifier aussi la cellule contre les espèces électrophiles et oxydantes. On va trouver des nucléophiles plus faibles comme les anions phosphate et chlorure mais leurs concentrations sont assez grandes pour qu'ils puissent aussi consommer une partie de l'électrophile.

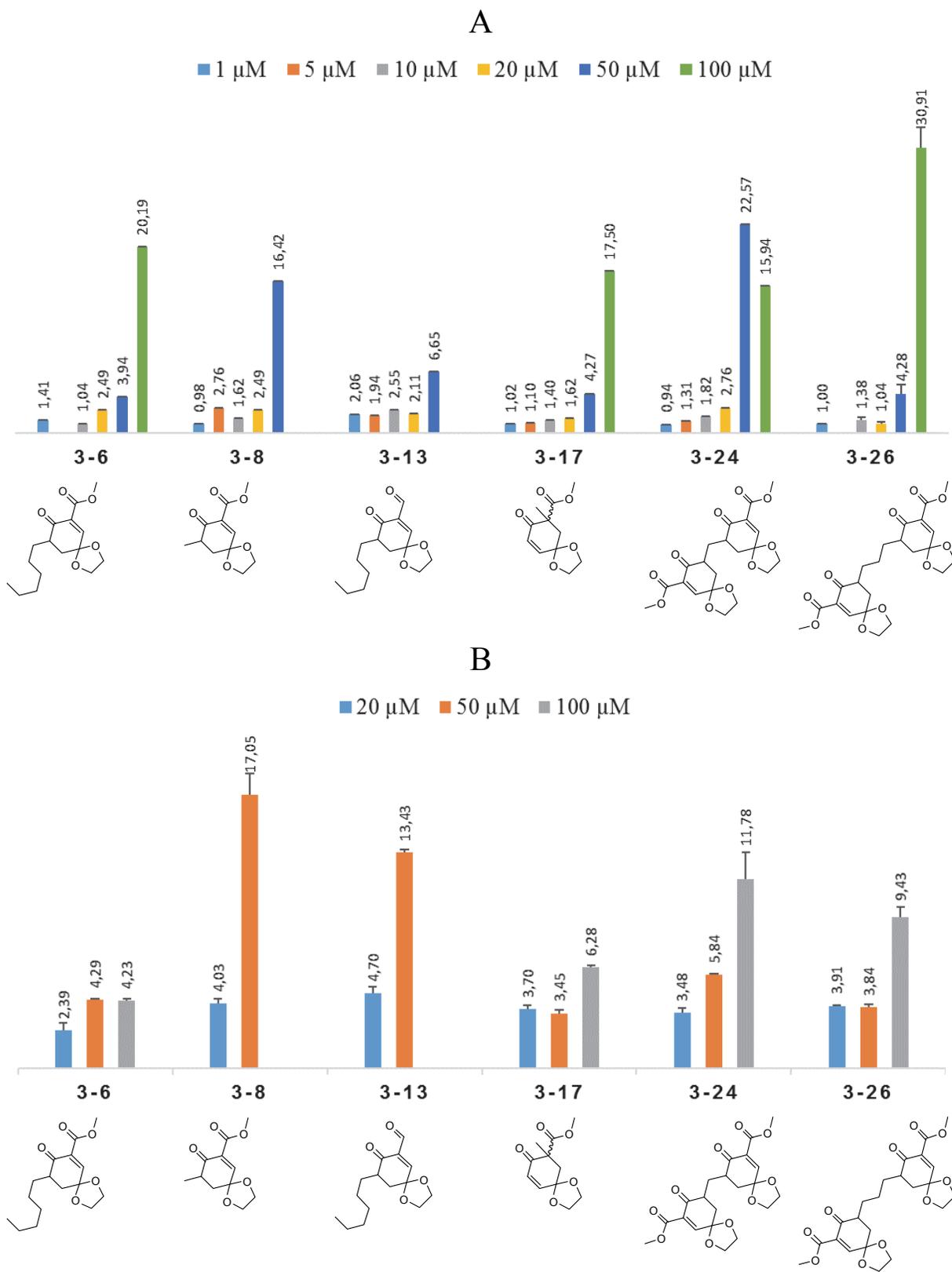
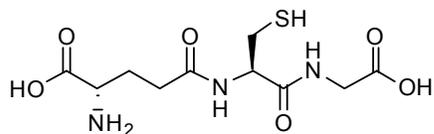


Figure 30. Série dioxolane. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).



GSH : Glu - Cys - Gly

Schéma 3.9.

Keap1 est une grosse protéine le microenvironnement autour de Cys¹⁵¹ est considéré comme hydrophobe.⁷⁰ Au contraire, la cystéine du glutathion est entourée de deux acides aminés hydrophiles.⁷⁰ La partie dioxolane présente sur chaque composé de cette série fait qu'ils sont davantage hydrophiles (voir les valeurs de cLogP, figure 3.8) et supposément plus enclins à réagir avec le glutathion qu'avec Keap1.

La concentration en glutathion est très importante pour l'homéostasie de la cellule et la transcription de Nrf2 est une voie importante dans la synthèse du glutathion. La consommation de ce tripeptide rend la cellule plus vulnérable. Les analogues de la série dioxolane réagiraient préférentiellement avec le glutathion à cause de leur nature hydrophile. La toxicité observée serait donc causée par la diminution en glutathion qui affaiblit les défenses de la cellule. Ce phénomène pourrait également être responsable de l'activité observée dans l'essai luciférase pour deux raisons. D'une part, la cellule va vouloir rétablir son homéostasie en synthétisant du glutathion et va utiliser la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE, ce qui conduirait à un faux positif. D'autre part, si le glutathion est consommé, sa concentration diminue et, à haute concentration, nos analogues pourraient finalement réagir avec Keap1.⁷⁰

Ainsi, pour diminuer la toxicité de nos analogues, il faudrait en diminuer l'hydrophilie en remplaçant le dioxolane par une unité plus lipophile, tout en conservant le même degré de substitution au carbone en γ de l'accepteur de Nazarov. Cette étude fera l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE 4 : RAFFINEMENT D'UN ÉLECTROPHILE D'INTÉRÊT

4.1. Migration vers la série diméthyle

4.1.1. Série méthylène

La série dioxolane a permis de commencer à développer les réactions nécessaires à la synthèse de ces analogues, notamment l'accepteur de Nazarov. Cependant, la synthèse de ces analogues s'est accompagnée de son lot de contraintes. De plus, leurs propriétés biologiques étaient peu encourageantes. La présence des oxygènes à proximité du centre électrophile augmente grandement sa réactivité par induction ou encore par pont hydrogène (figure 31). Ce serait la raison pour laquelle l'isolation des produits finaux était si difficile. Certaines séquences ont été refaites plusieurs fois car la pureté du produit final n'était pas jugée suffisante.

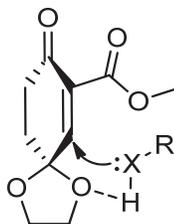


Figure 31 Influence du dioxolane en α du carbone électrophile.

La solution la plus simple a été de garder simplement le méthylène non substitué à la place du dioxolane (schéma 4.1). Ainsi, le cétoester **4-2** a été obtenu par l'addition de l'énolate de la cyclohexanone (**4-1**) sur le carbonate de diméthyle avec une procédure modifiée par Deslongchamps.¹¹⁶ L'hydrure de potassium a été utilisé en quantité catalytique pour générer un énolate de potassium in situ, plus réactif que l'énolate de sodium, par échange sodium-potassium. La formation du dianion et l'alkylation en γ se sont très bien passées. Le mélange de diastéréoisomères et des formes cétone et énol du produit **4-3** est une nouvelle fois complexe à isoler avec certitude et à caractériser. La présence du produit d'alkylation est tout de même confirmée par spectrométrie de masse. Pour éviter des réactions secondaires comme dans la série dioxolane, l'addition de PhSeBr n'est pas possible en présence de l'alcène sur le composé

4-5. Les produits finaux d'oxydation **4-4** et **4-6** ont été observés par RMN ^1H mais dégradent dans le temps. Ils n'ont pas pu être isolés et conserver pour l'analyse biologique.

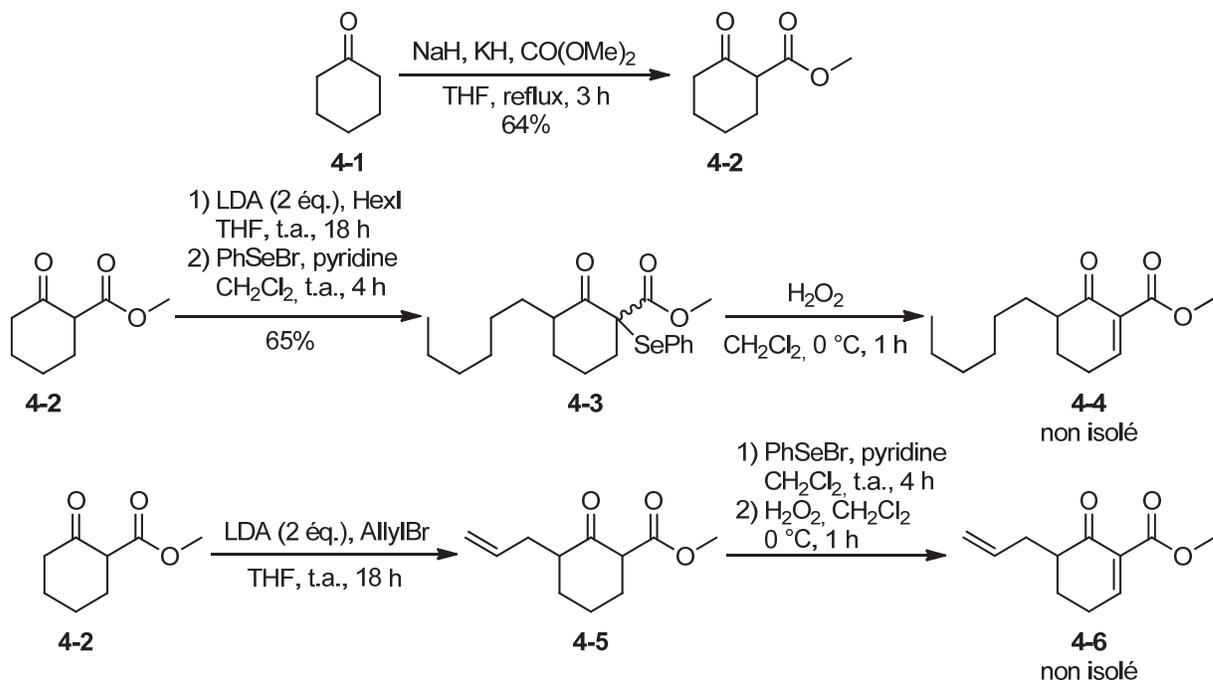


Schéma 4.1.

Un des critères de notre design était la conservation de l'encombrement au carbone en position 4 pour atténuer la réactivité de l'accepteur de Nazarov. Ceci est maintenant pleinement justifié, à la vue des difficultés rencontrées dans l'isolation des analogues de cette série méthylène.

4.1.2. Série cyclopropyle

La synthèse de la cétone **4-8** portant un groupement cyclopropyle était décrite à partir de la cétone **3-3** (schéma 4.2).^{117,118} L'oléfination de Wittig a donné l'alcène **4-7**. La cyclopropanation de Simmons-Smith, suivie de la déprotection du carbonyle par l'acide trifluoroacétique, a fourni la cétone désirée **4-8**.

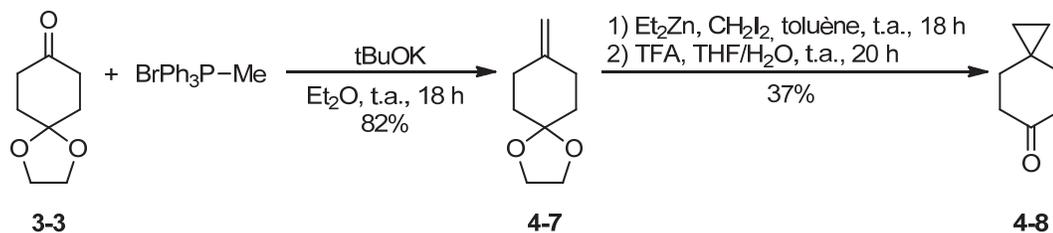


Schéma 4.2.

Toujours avec la même séquence réactionnelle, le cétoester **4-9** a été obtenu par la procédure de Deslongchamps (schéma 4.3).¹¹⁶ La formation du dianion et addition sur l'iodure d'hexyle ont donné le produit désiré (confirmé par spectrométrie de masse) sous la forme d'un mélange complexe de diastéréoisomères et de formes cétone et énol. La synthèse de l'accepteur de Nazarov dans les conditions de Liotta a fourni le composé **4-10**.¹⁰⁶ Il est à noter que, dans ce cas, la purification sur colonne de silice de l'électrophile final a été possible. Le produit réactionnel brut de l'étape d'addition du phénylsélényle a directement été utilisé pour l'oxydation / élimination. Les problèmes de purification rencontrés avec la première série proviendraient donc bien du dioxolane. Le produit désiré **4-11** a été observé après l'oxydation / élimination de l'adduit sélénié du cétoester **4-9** mais n'a pas pu être isolé lors de cette unique tentative. La formation de produits secondaires minoritaires formés à cause du cyclopropyle en serait la cause.¹¹⁹ Une oxydation directe pour former l'accepteur de Nazarov **4-11** à partir du cétoester **4-9** serait plus appropriée.

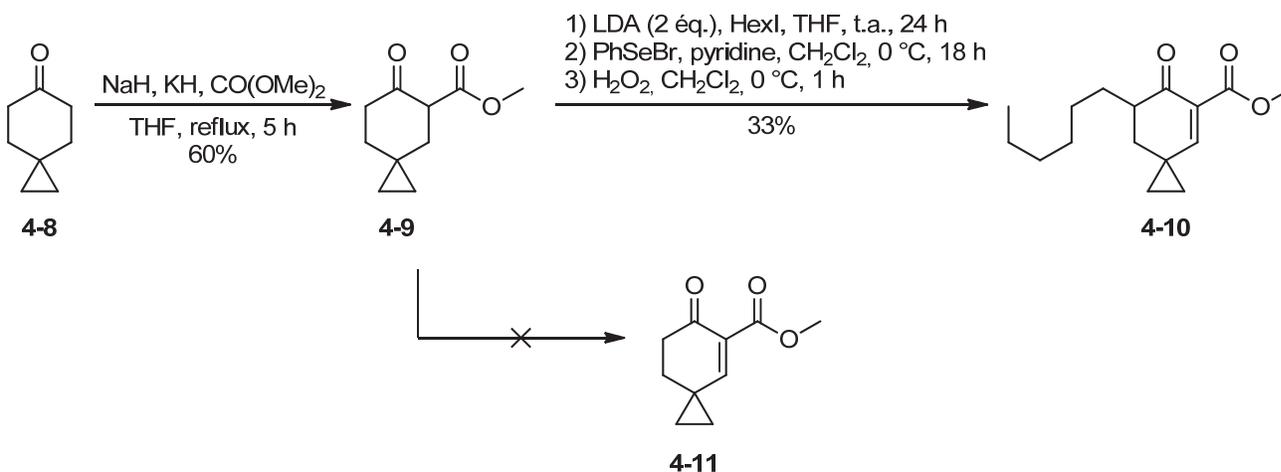


Schéma 4.3.

Soulignons que la synthèse de la cétone **4-8**, point de départ à ces analogues, reste difficile ; elle nécessite trois étapes et donne des rendements moyens. Dès le début, la série diméthyle s'est montrée beaucoup plus prometteuse, autant au niveau de la synthèse que des résultats biologiques. Nous avons donc concentré nos efforts sur cette série. C'est une stratégie qui s'est avérée payante.

4.2. Série diméthyle

Finalement, la série la plus étudiée est la série diméthyle. La cétone **4-14** a été synthétisée en trois étapes telles que décrites dans la littérature avec un rendement global de 60% (schéma 4.4).^{120,121} L'isobutyraldéhyde et la pyrrolidine ont été chauffés dans un appareil de Dean-Stark pour fournir l'énamine **4-12**. Cette dernière a été additionnée à la méthylvinylcétone et, après condensation aldolique en milieu acide, a mené à l'énone **4-13**. La cétone **4-14** a alors été obtenue par hydrogénation. Ce procédé utilise des réactifs bons marchés, les étapes sont simples, robustes et reproductibles. Jusqu'à 11 g de cétone **4-14** par lot ont été synthétisés avec cette séquence.

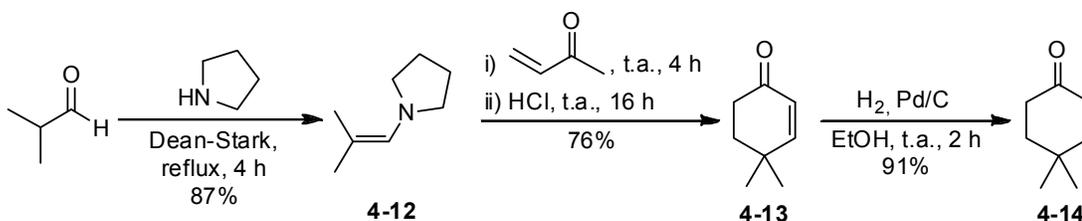


Schéma 4.4.

La série diméthyle a permis d'optimiser vraiment nos réactions au niveau des protocoles (schéma 4.5 et tableau 1). Le cétoester **4-15** est obtenu à 72% avec les conditions de Deslongchamps jusqu'à 10 g par lot.¹¹⁶ La formation du dianion se fait dans les conditions classiques (deux équivalents de LDA) ; l'alkylation fonctionne très bien pour les dérivés iodés (tableau 4.1, entrées 2, 3, 14, 15) ou bromures activés (entrées 4-6, 12, 13) en général. Cependant, comme le dianion est aussi basique, des conversions incomplètes et des chutes de rendement étaient observées dans les cas où il y a une compétition possible entre alkylation et déprotonation (entrées 7-10, 16). Dans le cas de l'acrylate, on forme l'énolate de l'ester, qui peut polymériser (entrée 11). L'échelle de la réaction a été augmentée pour obtenir assez des produits d'alkylation **4-16i-j** et pouvoir les transformer en accepteurs de Nazarov **4-17i-j**. Cependant, certains produits d'alkylation n'ont jamais été observés (entrées 16-20). Le bon fonctionnement de cette étape est

limité par la présence de protons acides sur l'électrophile et / ou la labilité du groupe partant. Puisque la synthèse du cétoester **4-15** est facile et rapide, nous avons préféré garder cette approche et sacrifier notre produit de départ pour atteindre notre objectif : avoir assez de composé final pour les tests biologiques.

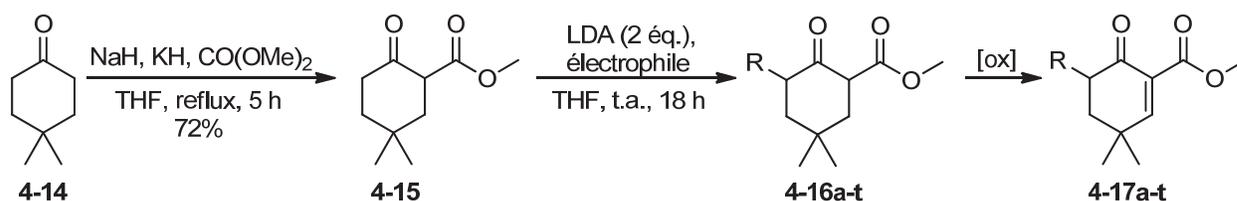
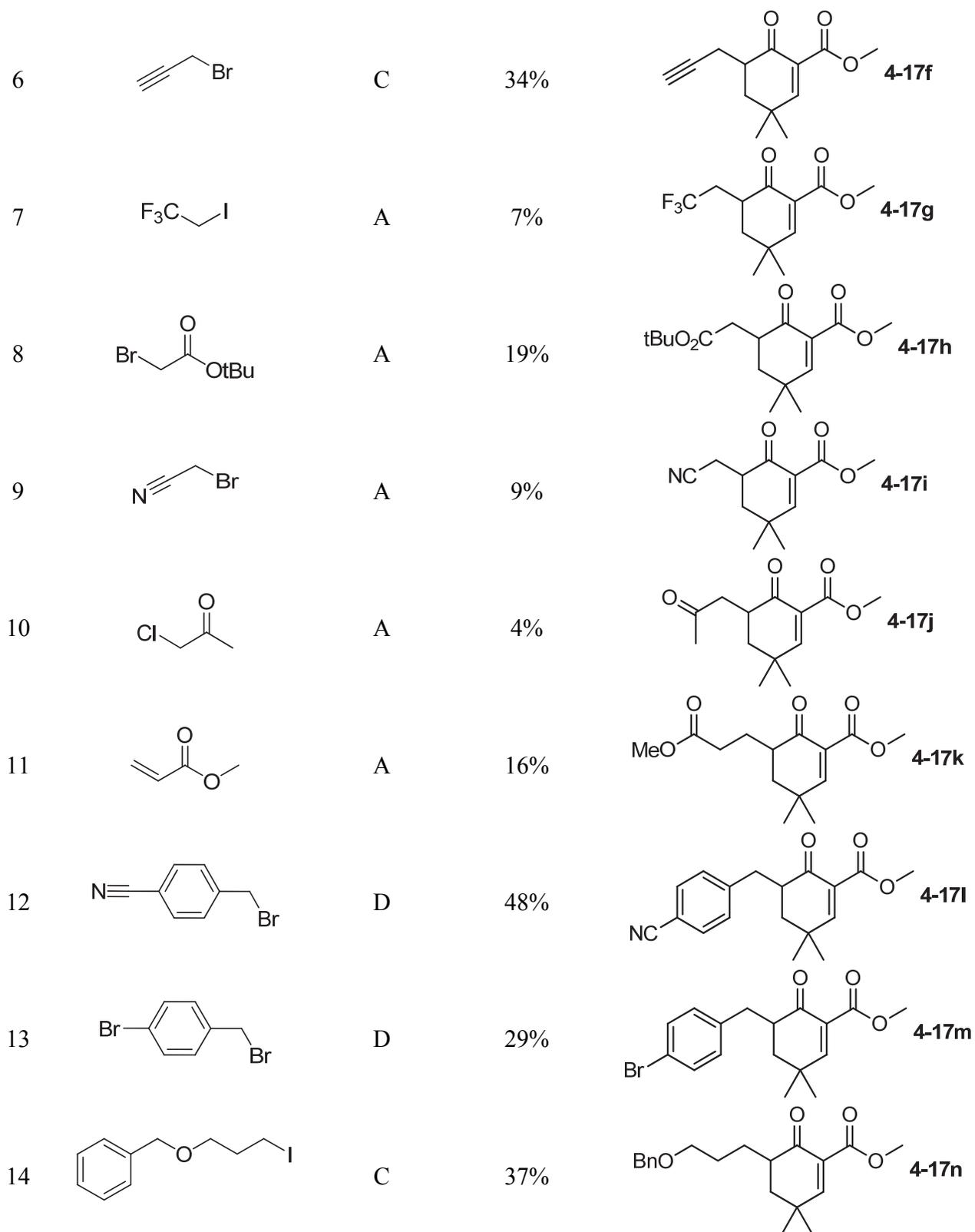
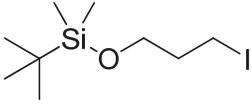
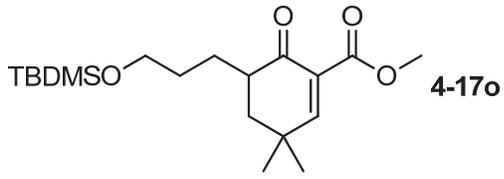
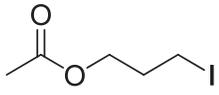
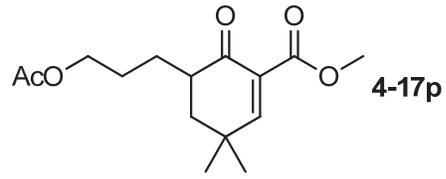
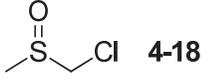
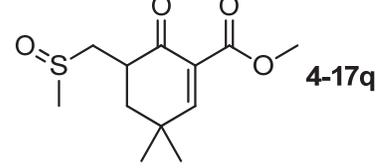
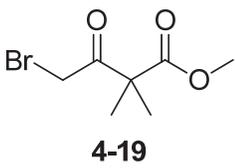
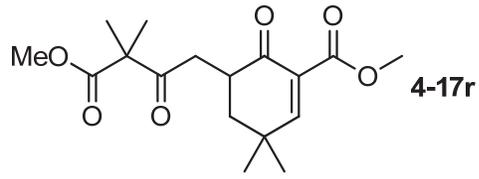
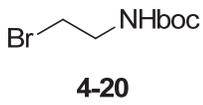
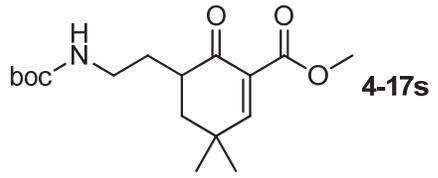
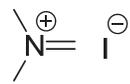
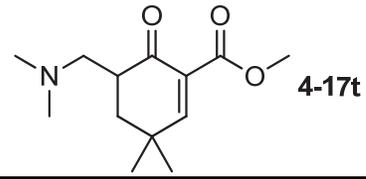


Schéma 4.5.

Tableau 1. Synthèse des analogues du schéma 4.5.

Entrée	Électrophile	Méthode d'oxydation ^a	Rendement ^b	Composé
1	Pas d'étape d'alkylation	A	57%	4-17a
2		B	34%	4-17b
3	MeI	A	39%	4-17c
4		B ^c	39%	4-17d
5		B	40%	4-17e



15		C	50%	
16		--- d	N / A	
17		--- d	N / A	
18		--- d	N / A	
19		--- d	N / A	
20		--- d	N / A	

a) Méthode A : 1) PhSeBr, pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C ; 2) H₂O₂, CH₂Cl₂, 0 °C. Méthode B : DDQ, THF. Méthode C : DDQ, K₂CO₃, 1,4-dioxane, reflux. Méthode D : 1) LDA, PhSeBr, THF, t.a. ; 2) H₂O₂, CH₂Cl₂, 0 °C. Les détails (temps de réaction et autres) sont rapportés en annexe. b) de **4-15** à **4-17a-t**. c) Du K₂CO₃ a été ajouté. d) Aucun produit d'alkylation **4-16** n'a été récupéré.

Le cas du bromure **4-19** est un peu particulier (tableau 1, entrée 18). Après la première étape, un produit d'alkylation dont la masse correspond au dimère **4-22** a été observé (schéma 4.6). Après addition de PhSeBr et oxydation / élimination, un produit dont la masse correspond à la perte de quatre hydrogènes a été isolé. De plus, le spectre RMN ¹H est en accord avec la molécule **4.23**. Notre meilleure hypothèse est que le dianion du cétoester **4-15** fait une substitution sur le brome, moins encombré que le carbone

adjacent, de l'électrophile **4-19** pour donner l'intermédiaire **4-21**. Puis, un deuxième équivalent de dianion vient faire la substitution.

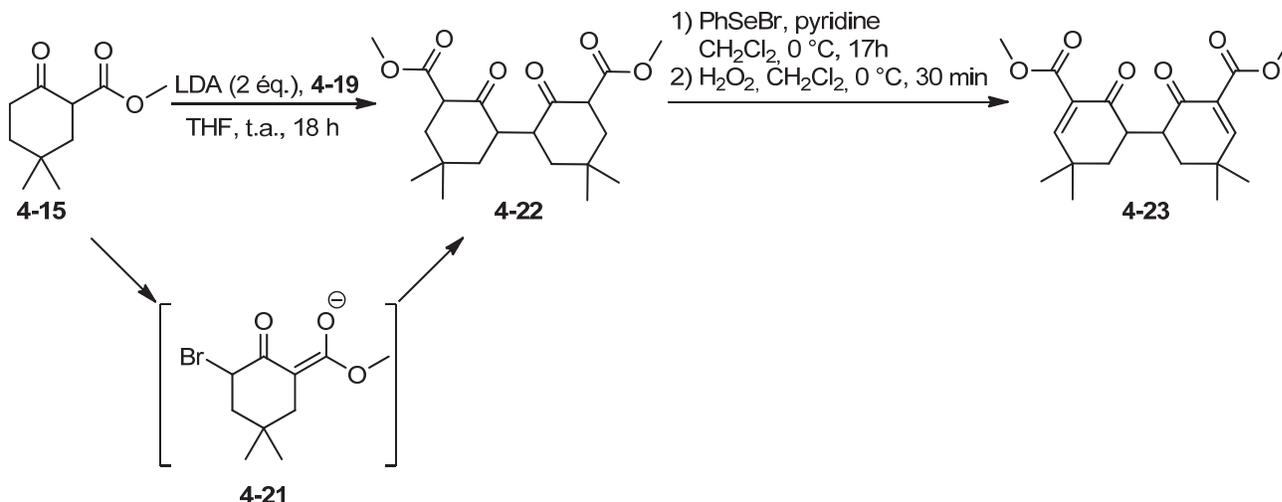


Schéma 4.6.

Pour l'étape d'oxydation, plusieurs méthodes ont été optimisées pour pouvoir installer la variété des chaînes désirées (tableau 1). Les analogues **4-17a-o** ont tous été purifiés par chromatographie sur colonne de silice. Notre méthode préférentielle est celle décrite par Liotta car, même si elle requiert le plus de manipulations, le produit est plus facile à isoler du produit brut réactionnel. Il vaut mieux mélanger PhSeBr au préalable avec la pyridine à 0 °C pendant 30 min pour former l'espèce réactive avant d'ajouter le dicarbone.¹⁰⁶ Pour avoir une conversion complète, le milieu réactionnel était agité dans le réfrigérateur toute une nuit pour la maintenir à 0 °C. Cette précaution est nécessaire d'après Liotta, qui postule que l'espèce formée à partir du mélange [PhSeBr + pyridine] se décompose à la température ambiante. L'intermédiaire formé après séléation n'avait pas besoin d'être purifié comme pour la série dioxolane (voir 3.1) et le produit brut a été directement utilisé dans l'étape suivante. Pour éviter les réactions secondaires potentielles avec cette transformation (voir 3.1.1), la déprotonation complète du dicarbone avec le diisopropylamide de lithium peut être faite avant l'addition de PhSeBr dans certains cas (tableau 1, entrée 12, 13).

Le passage direct du cétoester à l'accepteur de Nazarov par oxydation à la DDQ est aussi très utile pour éviter les réactions secondaires (entrées 2, 4 – 6, 14, 15). Plusieurs conditions similaires sont décrites dans la littérature.^{95,122–124} Nous avons utilisé le 1,4-dioxane (entrée 2, 4, 5) qui permet de chauffer à plus haute température et ainsi de diminuer davantage le temps de réaction comparé à l'utilisation du

tétrahydrofurane. Pour éviter une dégradation des composés finaux, il était préférable de ne pas les soumettre à ces températures pendant une période prolongée. L'utilisation de carbonate de potassium aide à la formation de la forme énol nécessaire à l'avancement de la réaction. Puisque les molécules **4-17a-o** sont isolables par chromatographie sur colonne de silice, cette oxydation à la DDQ était viable lorsque l'utilisation de PhSeBr ne l'était pas.

Du fait de la stabilité moyenne de ces molécules et la faible quantité de matière finale obtenue, peu de transformations subséquentes ont été essayées (schéma 4.7). Il y a eu néanmoins quelques essais intéressants. La tentative de désilylation de l'éther silylé **4-17o** a donné un mélange de l'alcool **4-24** et du produit de départ.¹²⁵ Il n'a pas pu être séparé convenablement à cause du trop peu de matériel converti. La tentative de synthèse du tétrazole **4-25** à partir du nitrile **4-17i** n'a donné que des produits de dégradation.¹²⁶ L'accepteur de Nazarov est une fonction chimique sensible et n'est généralement pas compatible avec de nombreuses conditions réactionnelles.

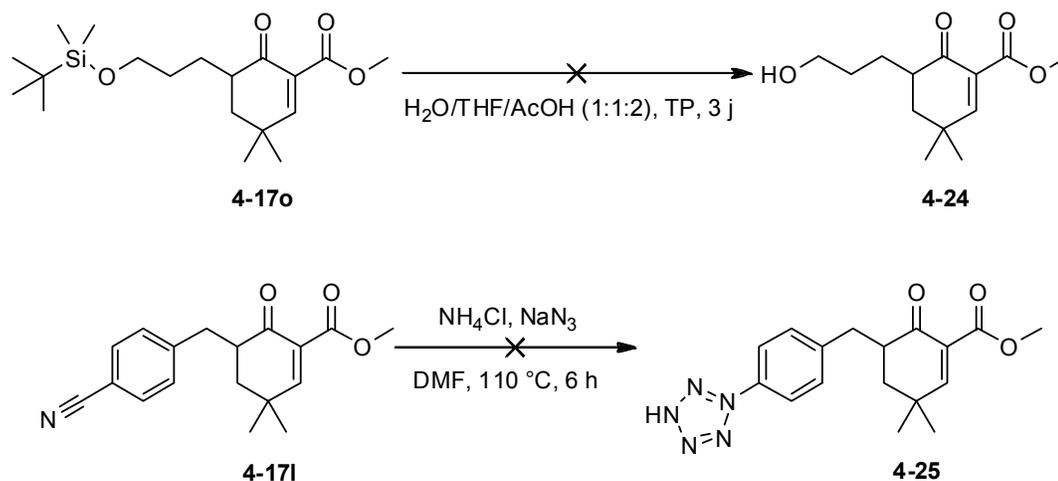


Schéma 4.7.

4.3. Résultats biologiques et interprétation

4.3.1. Importance de la lipophilie

Pour vérifier notre hypothèse que la toxicité est apportée par la partie dioxolane, notre design a été adapté en remplaçant cette fonction par un cyclopropyle ou deux méthyles (Schéma 4.8). On remarque déjà que

les valeurs de cLogP augmentent de manière significative. Les dérivés avec la chaîne hexyle **3-6**, **4-10** et **4-17b** ont été comparés pour n'avoir qu'un seul paramètre qui les différencie, la substitution sur le carbone 4.

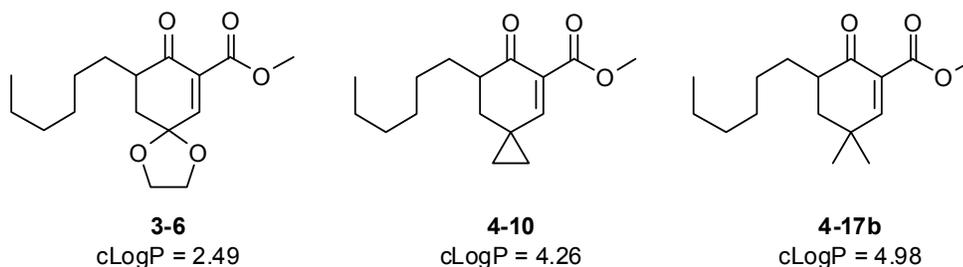


Schéma 4.8.

L'analogue **4-10** avec le cyclopropyle n'est pas actif (figure 32 A). Puisque c'est l'unique composé de ce genre, nous ne sommes pas en mesure de savoir si cette tendance est réellement due au cyclopropyle. Les composés **3-6** et **4-17b** sont actifs à la concentration maximale mais celui avec les deux méthyles est trois fois plus puissant. Le plus intéressant dans cette comparaison, c'est la toxicité (figure 32 B). L'accepteur de Nazarov **3-6** avec le dioxolane est au moins deux fois plus toxique que les deux autres. Pour le dérivé **4-10**, ni activité, ni toxicité ne sont observées. Dans le cas du composé **4-17b**, même à 100 μM , la toxicité est bien en-dessous des 5%.

Cette comparaison, sans apporter de conclusions solides, va dans le sens de notre hypothèse (voir 3.2). L'activité observée pour un composé est peut-être en partie due à sa toxicité plus qu'à sa capacité à cibler Keap1 directement. La présence d'oxygènes près du carbone électrophile favoriserait l'attaque par le glutathion. Dans la suite du projet, nous avons regardé systématiquement les valeurs de cLogP. Enfin, les résultats biologiques avec la molécule **4-17b** montre qu'il est possible d'avoir une bonne induction et une toxicité acceptable. Cette tendance se confirme avec les autres membres de cette série. Ainsi, le 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-èncarboxylate de méthyle est devenu notre motif électrophile d'intérêt pour la suite du projet.

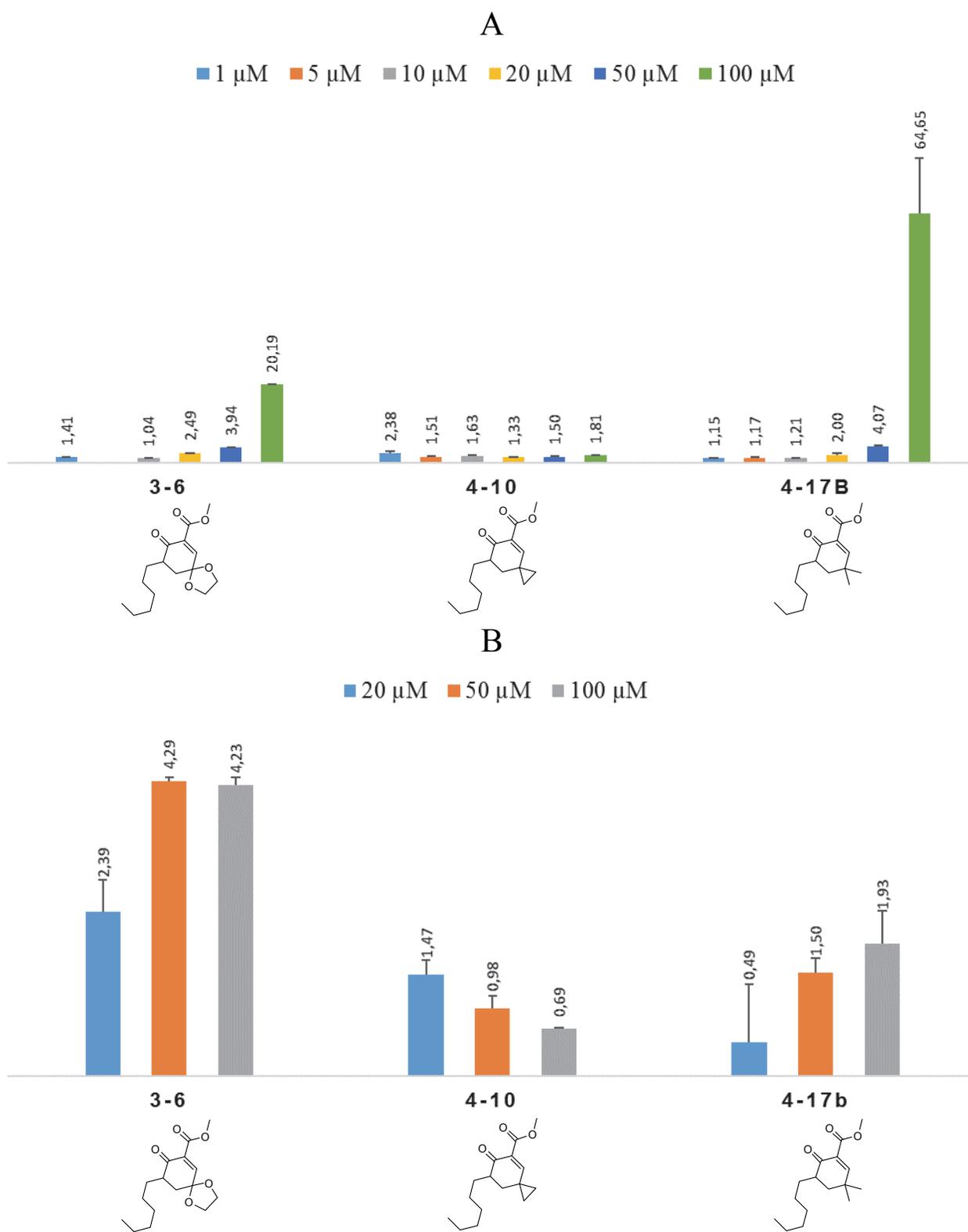


Figure 32. Comparaison région sud. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

4.3.2. Substitutions du motif 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-èncarboxylate de méthyle en γ par des chaînes alkyles

Le cétoester **4-15** est facilement accessible synthétiquement et le changement de l'acétal pour deux méthyles semble prévenir les problèmes de toxicité. Nous nous sommes donc lancés naturellement dans l'exploration de cette série. Plusieurs accepteurs de Nazarov avec différentes chaînes alkyles ont été synthétisés et sont rappelés ci-dessous (figure 33). Les valeurs de logP calculées (cLogP) sont données.

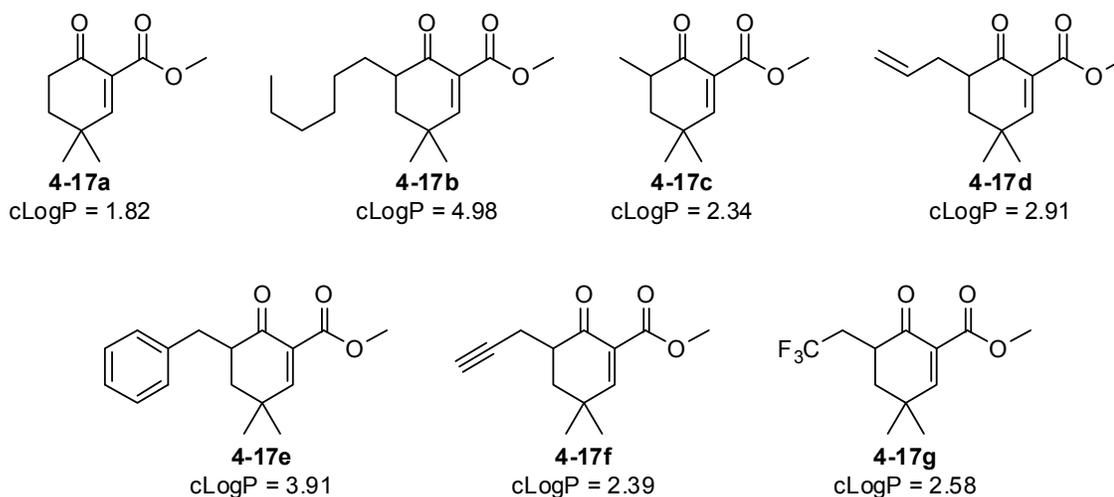


Figure 33. Accepteurs de Nazarov avec chaînes alkyles.

Les analogues **4-17a-g** ont un profil similaire. Nous avons observé une activité intéressante à 100 μM sauf pour le composé **4-17c** qui ne montre aucune activité (figure 34 A). Cette exception est très surprenante et nous n'avons pas d'explication ; nous pensons pour le moment que c'est peut-être le résultat d'une anomalie lors du test ou que le produit s'est dégradé. Au niveau de la relation structure-activité, on peut en retirer qu'il y a une zone plutôt hydrophobe occupée par la partie ouest de ces molécules. Un système π sur la chaîne latérale est peut-être moyennement toléré par la cible (cf. **4-17d-f**).

Les premiers composés **4-17a-e** ont le profil toxicologique que nous attendions et vont dans le sens de notre hypothèse (voir 3.2) (figure 34 B). Par contre, les molécules **4-17f** et **4-17g** sont moyennement toxique à hautes concentrations. Pourtant elles sont assez similaires aux autres en termes de structure et de propriétés. Il est difficile pour l'instant d'expliquer la différence de toxicité.

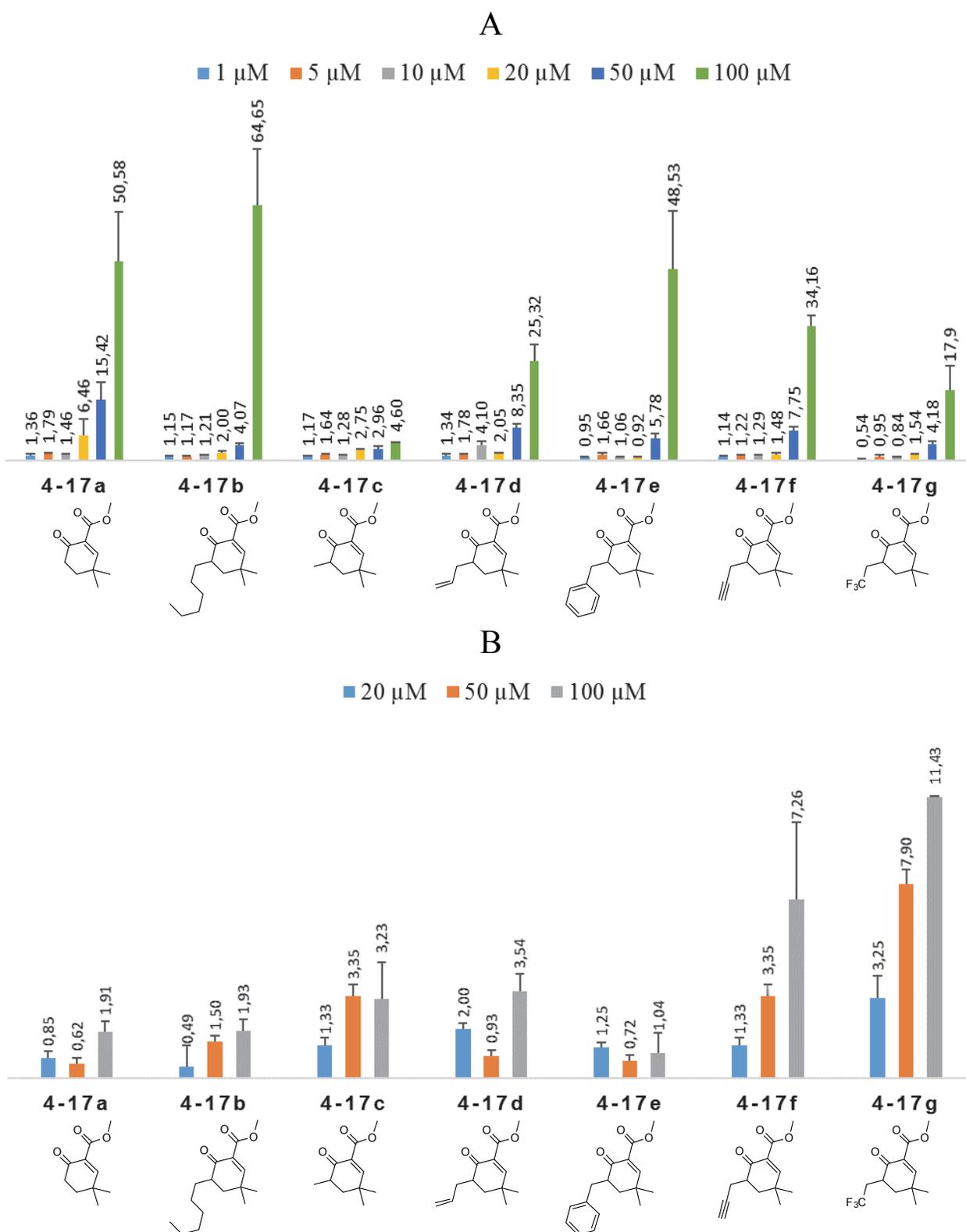


Figure 34. Composés 4-17a-g. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

4.3.3. Substitutions du motif 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-ènedicarboxylate de méthyle en γ par des chaînes fonctionnalisées

Par la suite, nous avons ajouté de la fonctionnalité sur la chaîne latérale et les molécules synthétisées sont résumées à la figure 35. Cette stratégie a été influencée par la publication du cristal de CDDO lié au résidu Cys¹⁵¹ dans le domaine BTB.³⁹ Il montre qu'il y a plusieurs acides aminés capables d'interagir avec des accepteurs de liaisons hydrogène à courtes, moyennes et longues distances tels que les résidus Lys¹³¹, Lys¹⁵⁰, His¹²⁹, His¹⁵⁴ et Tyr⁸⁵.

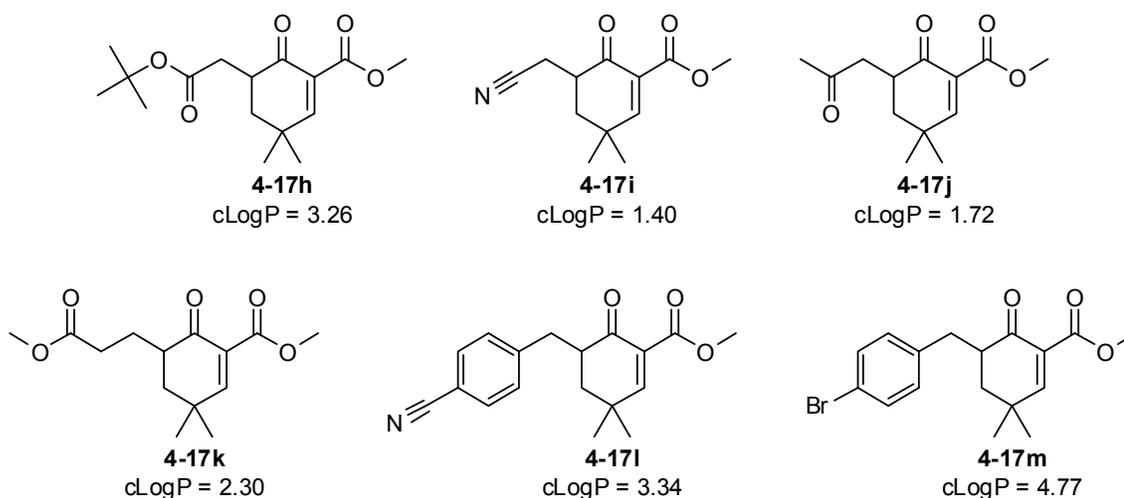


Figure 35. Accepteurs de Nazarov avec chaînes fonctionnalisées.

Nous avons été surpris d'observer la perte quasi-totale de toute activité pour ces analogues (figure 36 A). Les deux composés qui contiennent un nitrile (**4-17i** et **4-17l**) conservent un peu d'activité, toujours aux concentrations les plus élevées. Ensuite, suivent la cétone **4-17j** et l'ester méthylique **4-17k**. L'ester *tert*-butylique **4-17h**, quant à lui, ne montre aucune activité. Un point positif est que ces molécules gardent une toxicité très faible donc on peut éliminer l'hypothèse que l'électrophile est consommé par un autre nucléophile et déränge l'homéostasie de la cellule. Les données obtenues pour le bromure **4-17m** font que son analyse est difficile. Son profil ne ressemble à aucun autre : jusqu'à 20 μM , l'activité mesurée par luciférase augmente progressivement mais s'effondre à plus haute concentration. À 50 et 100 μM , cette molécule est très toxique et ceci peut expliquer la non-activité observée. Ce surprenant résultat est possiblement encore dû à la dégradation du produit ou d'un problème au moment du test.

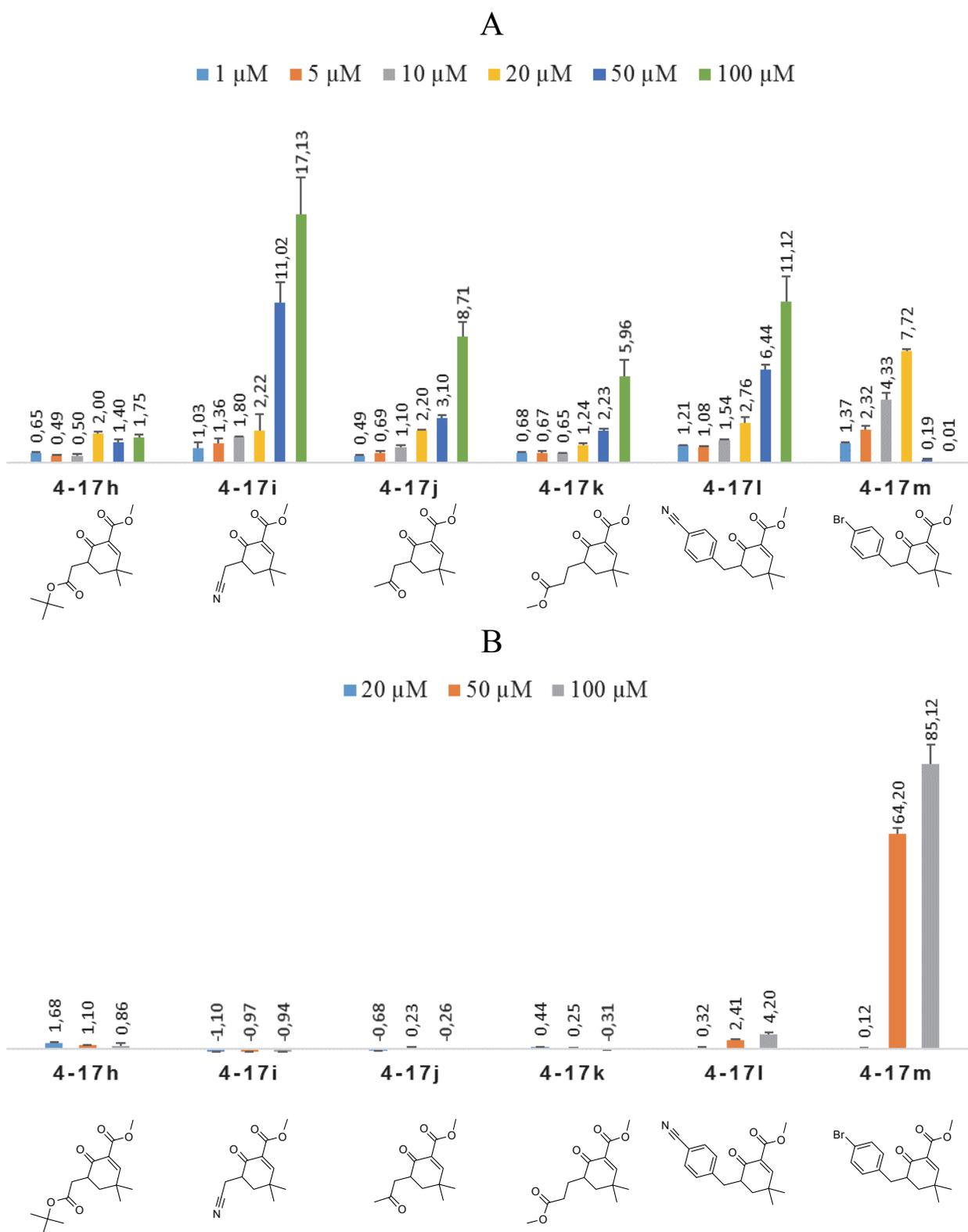


Figure 36. Composés 4-17h-m. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

Ces six molécules couvrent surtout les interactions possibles à courte distance et un peu à moyenne distance. De par les réactions choisies, leurs synthèses ont été un défi à cause des rendements très faibles obtenus (voir tableau 4.1). Nous n'avons pas réussi non plus à obtenir tous les analogues désirés. Nous supposons que la présence d'accepteur de liaisons hydrogène à courte distance dans la région ouest se fait au détriment de l'activité. D'ailleurs, dans la série présentée juste avant (voir 4.2.2), les chaînes qui possédaient un système π ou un trifluorométhyle étaient un peu moins actives. Ces fonctions sont aussi des accepteurs de liaisons hydrogène mais beaucoup plus faibles. L'électrophile ne peut pas aller piéger de cystéine sur Keap1 à cause d'interactions secondaires défavorables. Pour autant, il ne va pas réagir avec d'autres nucléophiles présents et perturber l'état de la cellule ce qui confirme le 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-ènedicarboxylate de méthyle comme un bon motif pour l'étude de la voie de signalisation de Keap1/Nrf2/ARE.

Un autre point intéressant de cette partie est que les nitriles **2-44i** et **2-44l** conservent une activité moyenne à 100 μM . Wong *et al.* ont déjà démontré l'importance de cette fonction même sans être conjuguée à un alcène.²⁷ Bien moins électrophiles qu'un accepteur de type Michael, les nitriles sont connus pour être capable de piéger des cystéines en milieu biologique.¹²⁷ Il est donc possible que les activités mesurées correspondent à ce mode de réaction.

Les deux derniers analogues **4-17n** et **4-17o** n'ont pas encore été testés. Ils font partie du dernier lot de molécules qui a été envoyé pour les tests biologiques. Ils permettront de lancer l'exploration d'interactions non-covalentes potentielles plus loin dans la région ouest. La présence de l'atome d'oxygène est particulièrement intéressante.

CHAPITRE 5 : ÉLECTROPHILES DÉRIVÉS DU MOTIF 3,3-DIMÉTHYL-6-OXOCYCLOHEX-1-ÈNECARBOXYLATE DE MÉTHYLE

5.1. Synthèse

Dans l'optimisation du motif électrophile d'intérêt, plusieurs facteurs ont été étudiés (figure 37). Les deux groupes électroattracteurs ont subi des modifications, le carbone électrophile a été placé du côté ouest et/ou est. La taille du cycle électrophile a été modifiée et un cycle aromatique a été ajouté dans la région ouest.

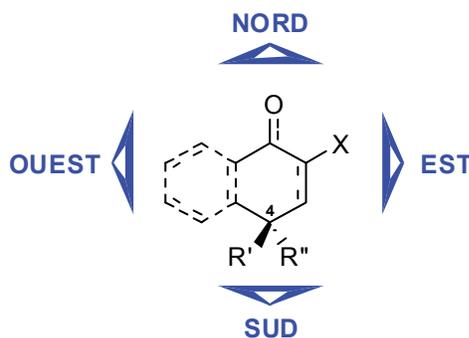


Figure 37. Modifications envisagées du motif électrophile.

5.1.1. Modification de l'ester méthylique

Comme au sous-chapitre 3.1.1, nous avons voulu sonder la région est et modifier **X**, mais cette fois-ci sur la série d'électrophiles portant un *gem*-diméthyle en position 4 de la cyclohexénone. Le plus simple en premier lieu était de changer le méthyle de l'ester (schéma 5.1). La transestérification du cétoester **4-15** avec l'alcool allylique a donné un mélange inséparable de l'ester désiré et du produit de départ (8 : 1, respectivement).¹²⁸ L'oxydation du mélange a donné les deux accepteurs de Nazarov duquel le composé **5-1** a pu être séparé.

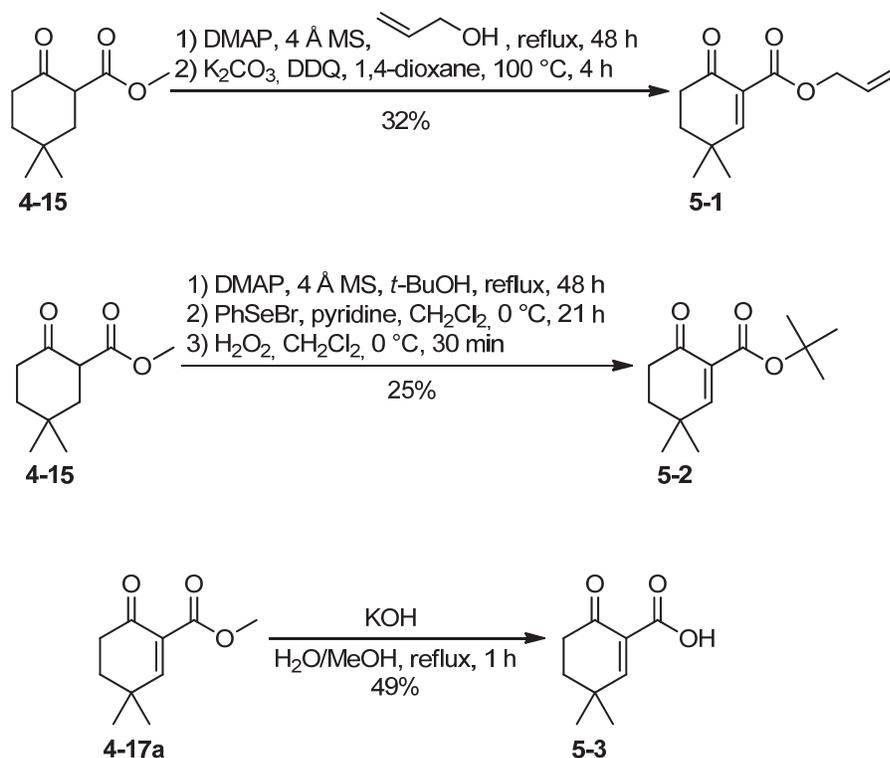


Schéma 5.1.

L'ester *tert*-butylique **5-2** a été obtenu exactement de la même façon. Le plus faible rendement est attribuable à l'obtention d'un mélange équimolaire après la transestérification à cause de la plus faible réactivité du *tert*-butanol due à sa gêne stérique. L'acide **5-3** a été obtenu après l'hydrolyse du β -cétoester α,β' -insaturé **4-17a** avec l'hydroxyde de potassium.⁷¹

La molécule **5-4** a été obtenue par réaction de Baylis-Hillman entre l'énone **4-13** et le paraformaldéhyde (schéma 5.2).¹²⁹ La transestérification du cétoester **4-15** avec cet alcool a donné un nouvel ester **5-5** et l'oxydation avec la DDQ a permis d'avoir l'accepteur de Nazarov **5-6**.¹³⁰ Avec cette dernière molécule, l'ester contient un deuxième électrophile, dans la région est. C'est une structure complémentaire aux autres bis-électrophiles (voir section 6.1). De plus, les analogues **5-4** et **5-5** portent un groupement moins électrophile que l'accepteur de Nazarov habituel.

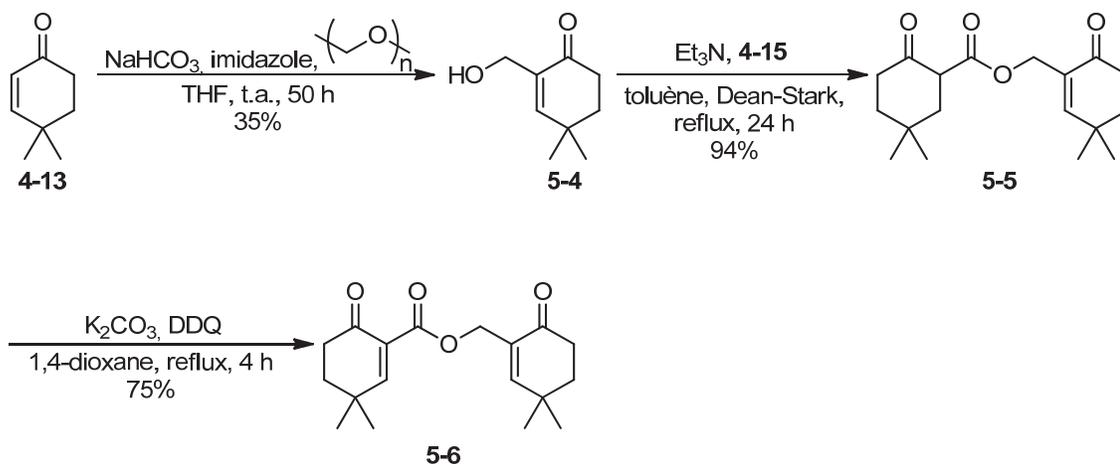


Schéma 5.2.

Outre la modification de la partie alcoolate de l'ester, d'autres groupements électroattracteurs ont été explorés. En premier, le cétoaldéhyde **5-7** a été obtenu par addition de l'énolate de la cétone **4-14** sur le formiate d'éthyle (schéma 5.3).^{107,131} Le produit **5-7** dégrade sur silice et doit être conservé au congélateur. Il est préférable d'utiliser le produit brut directement pour des transformations subséquentes. Les cétoaldéhydes sont plus réactifs que les cétoesters : la formation du dianion et la réaction de $\gamma + \alpha$ -alkylation a donné des produits secondaires de dialkylation $\gamma + \alpha$. Les tentatives d'oxydation ont donné les produits attendus **5-8** et **5-9** mais ils dégradent rapidement et sont difficiles à purifier.

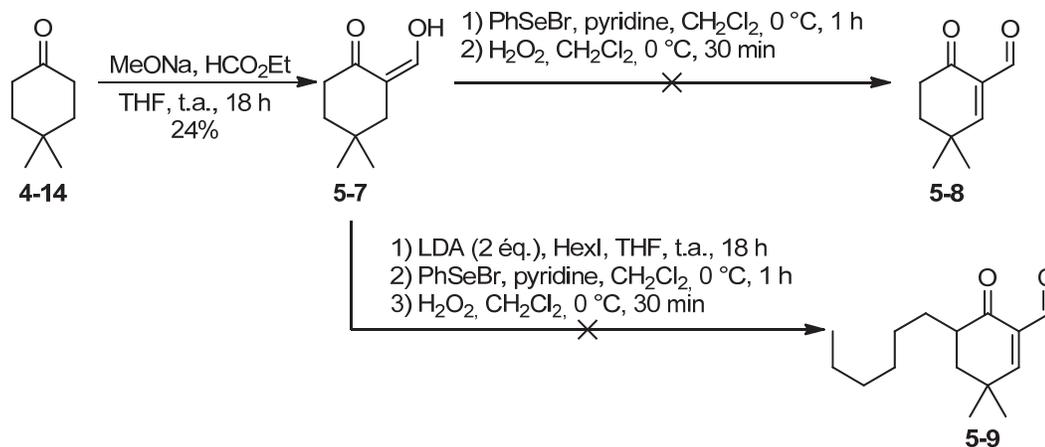


Schéma 5.3.

Nous avons aussi pensé aux halogènes en tant qu'autres groupes électroattracteurs (schéma 5.4). Les analogues chloré **5-10** et iodé **5-11** ont été synthétisés à partir de l'énone **4-13** avec des procédures connues.^{132,133} La tentative de fluoration inspirée de la chloration a donné un mélange de produits duquel le fluorure **5-12** était probablement présent mais n'a pas pu être isolé.

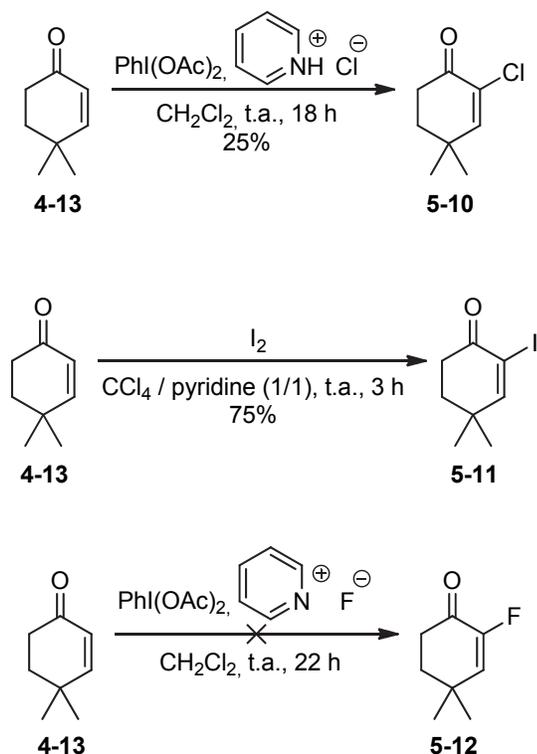


Schéma 5.4.

5.1.2. Modification de la cétone

La portion cétone de l'accepteur de Nazarov a aussi été modifiée. Le remplacement par une fonction aux propriétés similaires, soit une thiocétone, a été tentée en vain (schéma 5.5).^{134,135} L'utilisation de P₂S₅ dans la pyridine à reflux a donné essentiellement de la dégradation alors qu'avec le réactif de Lawesson, aucune conversion n'a été observée.

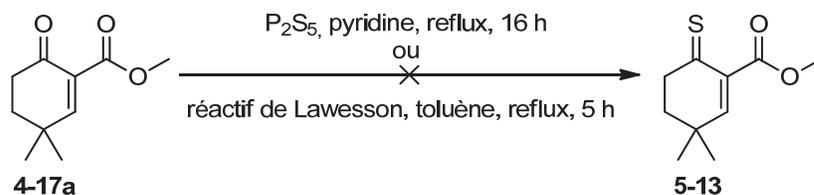


Schéma 5.5.

Ensuite, nous avons voulu retirer le caractère électroattracteur de la cétone (schéma 5.6). La réduction dans les conditions de Luche a donné l'alcool **5-14**.¹³⁶ Ce composé permet de conserver le caractère accepteur de liaisons hydrogène. La tentative d'oléfination de Wittig de la cétone **4-17a** a très probablement donné l'alcène désiré **5-15**, mais ce dernier n'a pas pu être séparé de l'oxyde de triphénylphosphine.

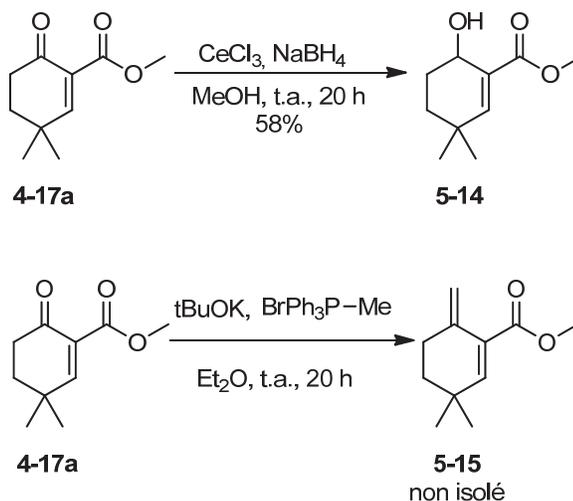


Schéma 5.6.

5.1.3. Déplacement du centre électrophile

Dans le souci de bien comprendre comment se positionne le motif 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-èncarboxylate de méthyle dans le site actif de Keap1, la position du carbone électrophile a été changée (schéma 5.7). L'addition de l'énolate de l'énone **4-13** sur le carbonate de diméthyle a donné le cétoester **5-16**.¹³⁷ Puis le dicarbonyl a été méthylé afin de fournir le cétoester **5-17** ou a été oxydé avec le dioxyde de sélénium pour générer le composé **5-18**.^{110,137}

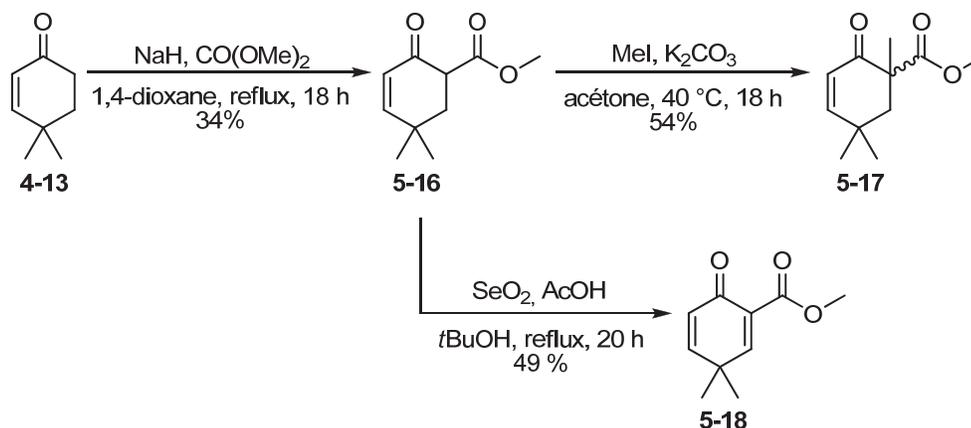


Schéma 5.7.

Les mêmes analogues ont été synthétisés aussi dans le cas des cétonitriles (schéma 5.8). L'énolate de l'énone **4-13** a été additionné sur le cyanure de *para*-toluènesulfonyle pour donner le cétonitrile **5-19**.¹³⁸ Lors de la méthylation, les produits de C- et O-alkylation **5-20** et **5-21** respectivement ont été obtenus. L'oxydation avec la DDQ et le carbonate de potassium a fourni le diène **5-22**.

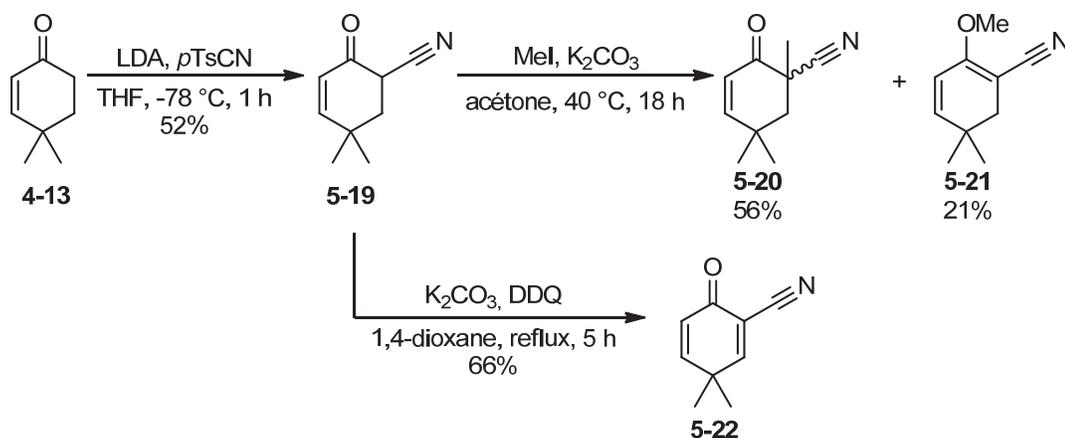


Schéma 5.8.

Le carbone électrophile aurait pu se trouver en-dehors du cycle, sous forme d'exométhylène par l'addition du dianion du cétoester **4-15** sur le sel d'Eschenmoser puis élimination, mais cette première étape a échoué (tableau 4.1, entrée 20).

5.1.4. Modification de la taille du cycle

Dans le but une nouvelle fois d'étudier l'importance du positionnement de l'électrophile dans le site actif, la taille du cycle a été modifiée. En partant de la cycloheptanone (**5-23**), l'addition de son énolate sur le carbonate de diméthyle a donné le cétoester **5-24** (schéma 5.9). Avec la méthode de Liotta, un premier accepteur de Nazarov avec un cycle à sept membres **5-25** a été obtenu. Par formation du dianion et addition sur l'iodohexane, le dicarbonyl **5-24** a été alkylé en γ . L'accepteur de Nazarov **5-26** a été obtenu une fois encore par la procédure de Liotta.¹⁰⁶ Ces analogues sont stables et isolables par chromatographie sur colonne de silice bien que le site électrophile ne soit pas plus encombré.

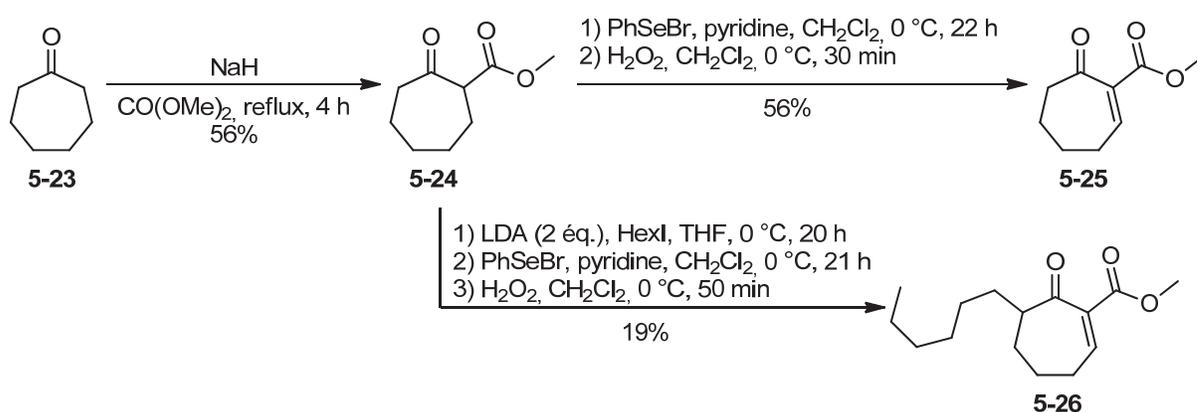


Schéma 5.9.

L'accepteur de Nazarov **5-29**, portant un cycle à cinq membres, a été obtenu à partir du cétoester correspondant **5-28** par la procédure de Liotta (schéma 5.10).¹⁰⁶ Ce dernier a lui-même été synthétisé à partir de la cétone **4-14** en trois étapes d'après la littérature, avec un rendement global de 33%.¹³⁹ L'oxydation au permanganate de potassium de la cétone **4-14** a donné le diacide qui a été traité dans les conditions de Fisher avec le méthanol pour fournir le diester **5-27**. Ce dernier a subi une condensation de Dieckmann pour donner le cétoester **5-28**, l'énolate étant généré sur la position la moins encombrée. Son alkylation en γ avec l'iodohexane en passant par le dianion fonctionne bien également. Par contre, l'oxydation du produit obtenu **5-30** n'a pas permis d'isoler l'accepteur de Nazarov **5-31** attendu.

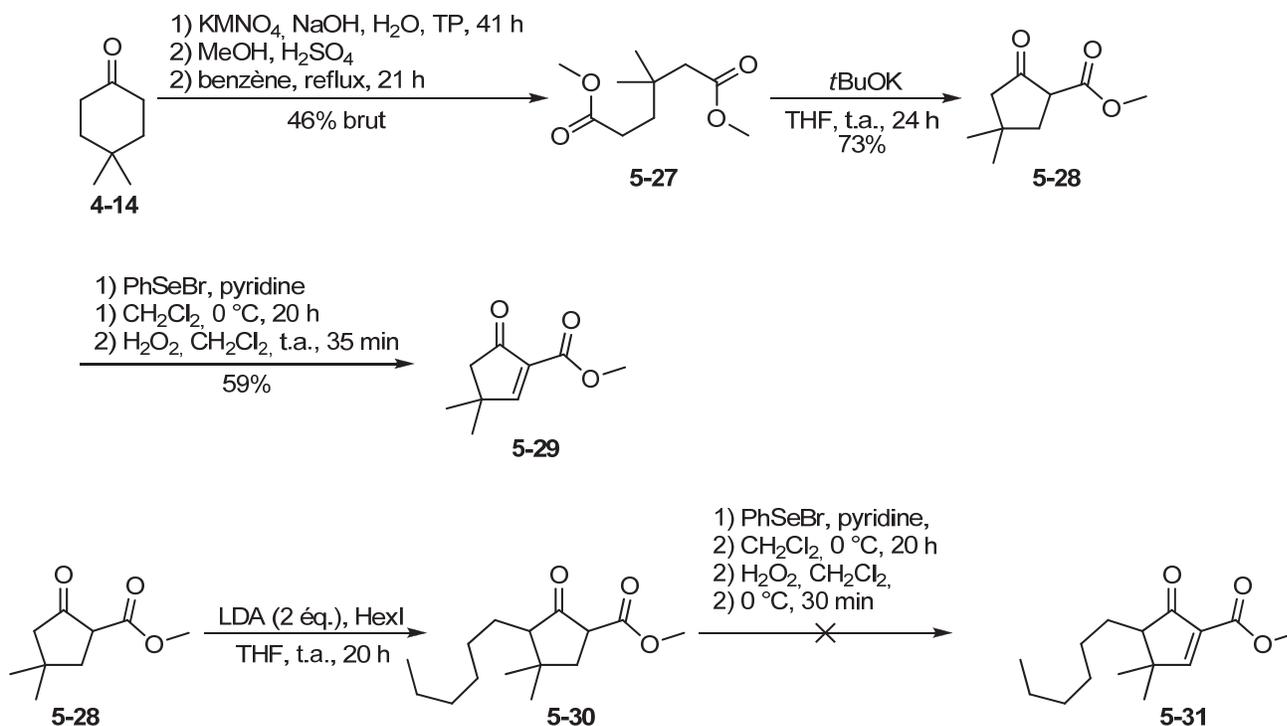


Schéma 5.10.

5.1.5. La variante époxyde

O'Neill a rapporté des analogues de la Bardoxolone portant un époxyde qui sont très intéressants.²⁷ Nous avons voulu tester ce type de groupement fonctionnel sur nos substrats également (schéma 5.11). L'époxydation par l'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque en milieu basique des accepteurs de Nazarov **4-17a** et **4-17f** a donné respectivement les époxydes **5-32** et **5-33** dans de très bons rendements.¹⁴⁰ Ces composés ont été synthétisés récemment et font partie du dernier lot de molécules prêtes à être testées, mais les résultats ne sont pas encore disponibles.

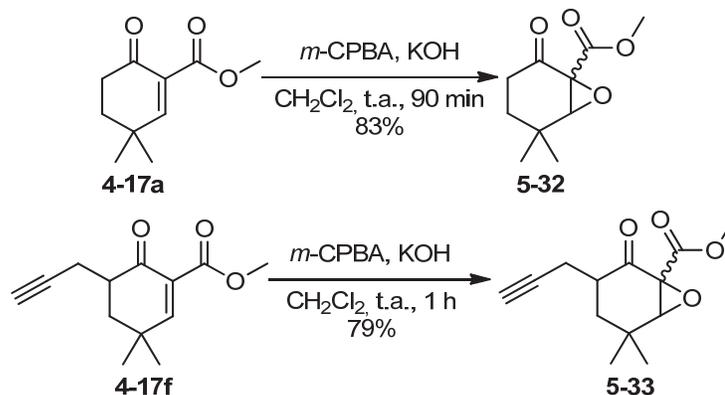


Schéma 5.11.

5.1.6. Série des dérivés de la tétralone

Suite à la publication de la structure cristalline du domaine BTB lié au CDDO, une librairie de dérivés de type tétralone au sens large, soit avec un aryle (tétralone), soit avec un cycle hétéroaromatique (e.g. furyle) a été pensée.³⁹ L'idée était d'ajouter un cycle aromatique conjugué avec le dicarbone pour favoriser l'équilibre en faveur de la forme énol après l'addition d'une cystéine. Le cristal montre que cet énol est en fait impliqué dans un pont hydrogène (voir 1.3.2).

Les énolates des cétones **5-34** et **5-36** ont été additionnés sur le carbonate de diméthyle tel que déjà décrit pour fournir les cétoesters correspondants (schéma 5.12).^{141,142} Puis, par condensation de Knoevenagel avec le pivalaldéhyde, les accepteurs de Nazarov **5-35** et **5-37** ont été préparés.¹⁴³ Le groupement *tert*-butyle a été choisi pour produire uniquement l'alcène *cis* et ne pas avoir à gérer de mélanges.

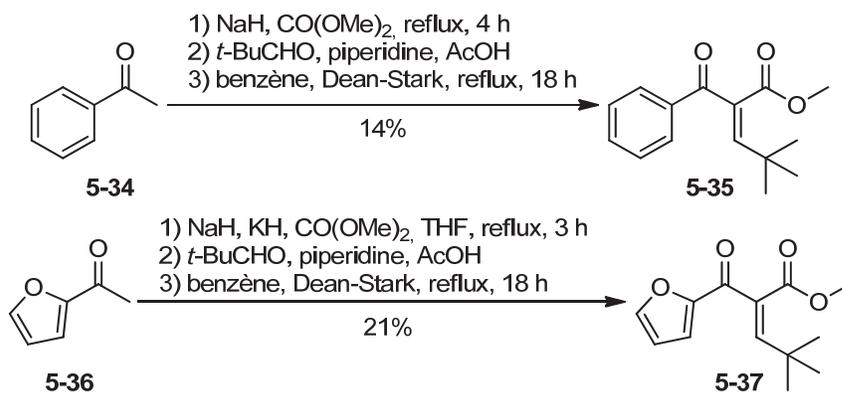


Schéma 5.12.

Suite à l'étude des travaux d'Alison Frontier, sa méthodologie de cyclisation de Nazarov pour accéder aux analogues cycliques semblait prometteuse.¹⁴⁴ Mais, la reproduction de ses résultats s'est avérée difficile (schéma 5.13). Dans le meilleur des cas, trop peu de produit **5-39** a été formé et n'a pas pu être isolé.

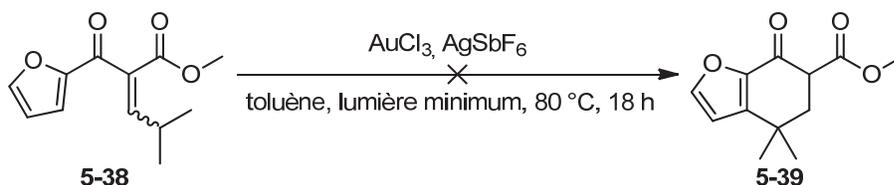


Schéma 5.13.

Pour préparer les composés cycliques, les tétralones ont été utilisées directement en commençant par la β -tétralone (schéma 5.14). Dans un premier temps, la position 2, plus réactive, a été diméthylée pour permettre la fonctionnalisation de l'autre côté.¹⁴⁵ À partir de la cétone **5-41**, la formation de l'énolate et l'addition sur le carbonate de diméthyle a donné le cétoester **5-42**.¹¹⁶ L'accepteur de Nazarov **5-43** a été synthétisé par la méthode de Liotta (schéma 5.14).¹⁰⁶

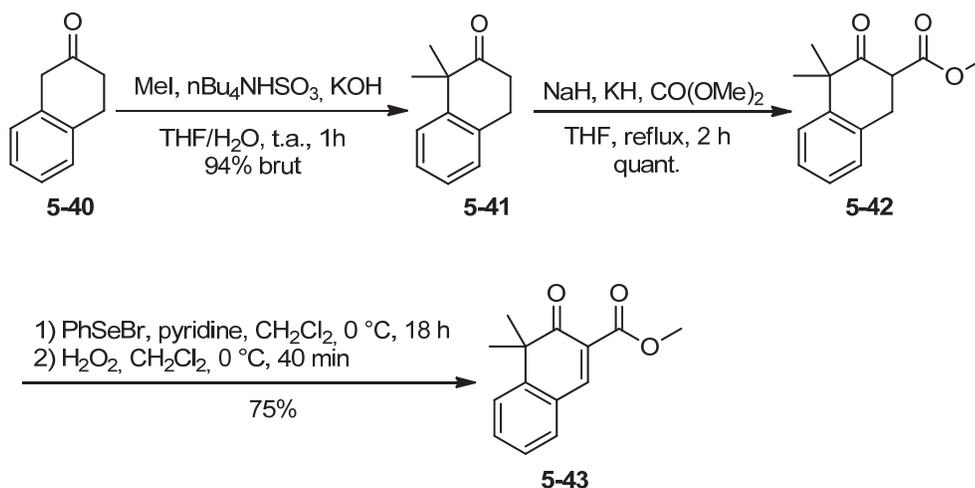


Schéma 5.14.

Pour accéder au cétonitrile **5-46** correspondant (schéma 5.15), l'énolate de **5-41** a été formé et additionné sur le formiate d'éthyle.¹⁰⁷ L'oxydation du cétoaldéhyde **5-44** par la procédure de Liotta a été tentée directement sur le produit brut, l'accepteur de Nazarov correspondant n'a pas pu être isolé.¹⁰⁶

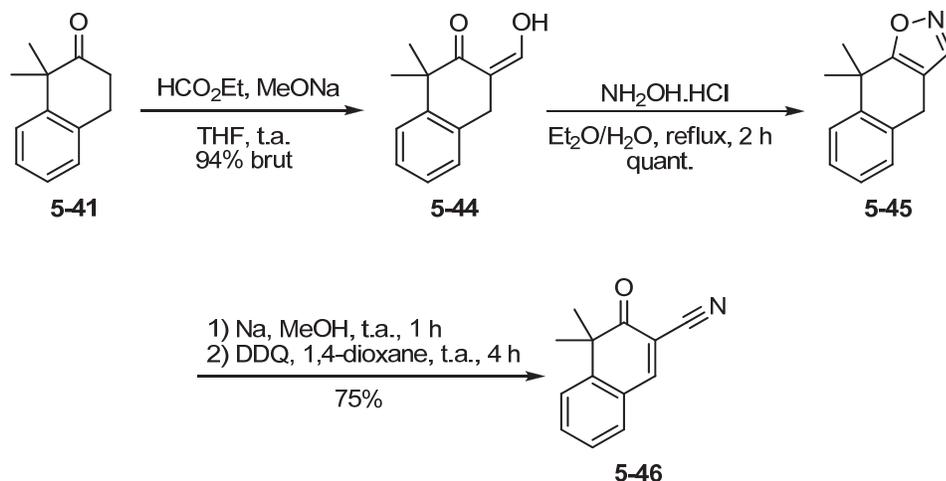


Schéma 5.15.

Par contre, le cétoaldéhyde est un très bon précurseur pour obtenir le cétonitrile par une méthode alternative à l'utilisation de *p*-TsCN.¹⁴⁶ D'abord, l'isoxazole **5-45** a été formé par condensation initiale de l'amine de l'hydroxylamine sur l'aldéhyde suivie d'une cyclodéshydratation. L'autre isomère isoxazole, issu d'une condensation de l'amine sur la cétone, est très minoritaire puisque limité par l'encombrement de la fonction *gem*-diméthyle en alpha de la cétone. L'élimination de Kemp de l'isoxazole **5-45** par le sodium dans le méthanol a donné le cétonitrile qui a été directement oxydé avec la DDQ pour fournir l'accepteur de Nazarov **5-46**. Cette oxydation est facilitée par la présence du cycle aromatique (liaison C-H benzylique affaiblie).

L' α -tétralone **5-51** est commercialement disponible mais, pour des raisons de disponibilité et de coûts, nous l'avons fabriquée (schéma 5.16). À partir de l'acide **5-47**, jusqu'à 5 g par lot de produit final en quatre étapes ont été préparés avec un rendement global de 87%. D'abord, l'estérification dans le méthanol a donné l'ester méthylique **5-48**.¹⁴⁷ Puis, avec l'addition de deux équivalents d'iodure de méthylmagnésium, l'alcool tertiaire **5-49** a été obtenu. Il réaction de Friedel-Crafts intramolécule a donné l'alcane **5-50**.¹⁴⁸ Enfin, l'oxydation de la seule position benzylique disponible avec le trioxyde de chrome a permis d'obtenir la cétone **5-51**.¹⁴⁹

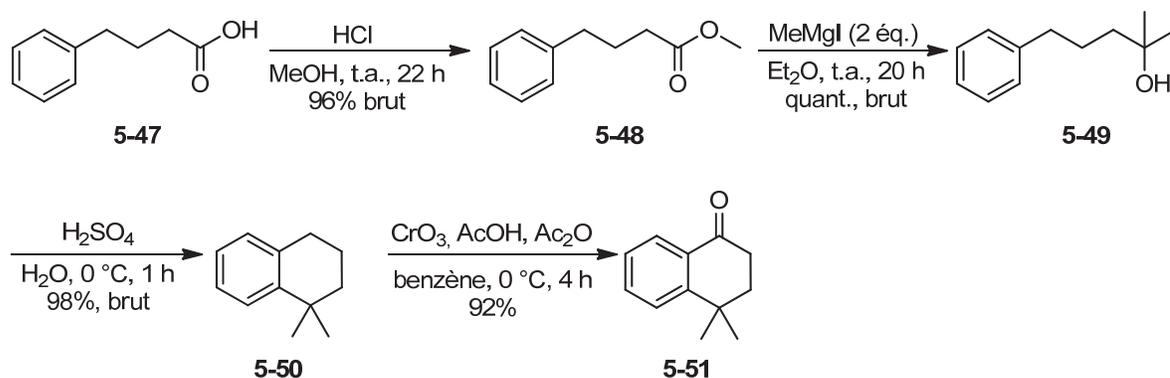


Schéma 5.16.

Une fois la tétralone **5-51** en main, elle a été dérivée de la même manière que précédemment. La formation de l'énolate et son addition sur le carbonate de diméthyle a donné le cétoester **5-52** (schéma 5.17). Ce dernier est facilement oxydable avec la DDQ pour former l'accepteur de Nazarov **5-53**. La réaction de bromation de la tétralone **5-51** avec le trichlorure d'aluminium et le brome a fonctionné telle que décrite dans la littérature lors du premier essai mais s'est montrée très peu reproductible.¹⁴⁹ La majorité des essais a plutôt donné un mélange du composé voulu **5-54** (rarement majoritaire) et d'un autre produit de bromation très difficilement séparable. Le bromure **5-54** a subi les mêmes transformations pour fournir l'accepteur de Nazarov **5-55**.

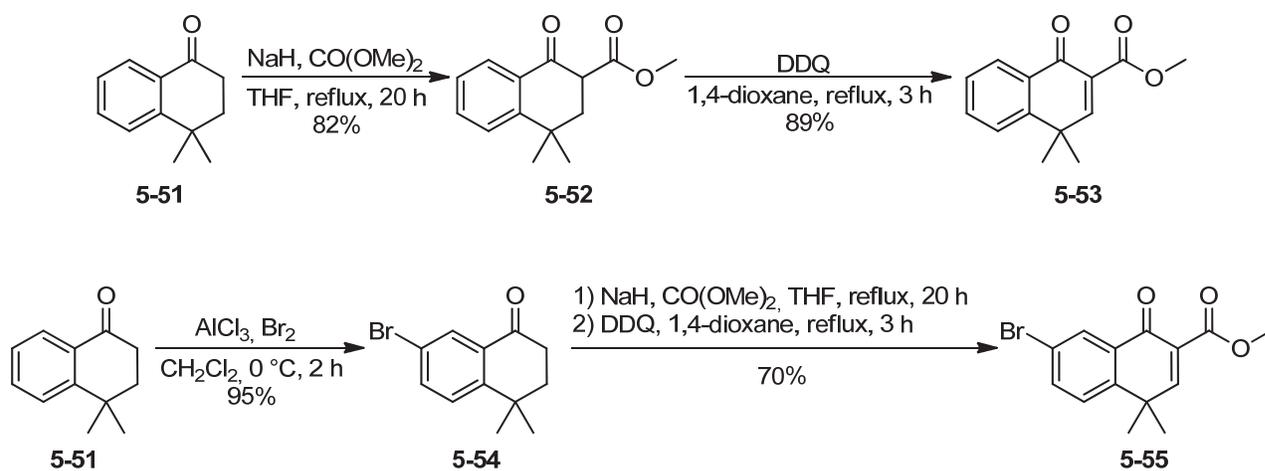


Schéma 5.17.

Le bromure **5-54** devait être utilisé pour l'incorporation d'une chaîne latérale par couplage de Sonogashira (schéma 5.18). En effet, ce couplage et la déprotection de l'alcyne ont fonctionné tels que décrits dans la littérature pour générer les alcynes **5-56** et **5-57**.^{149,150}

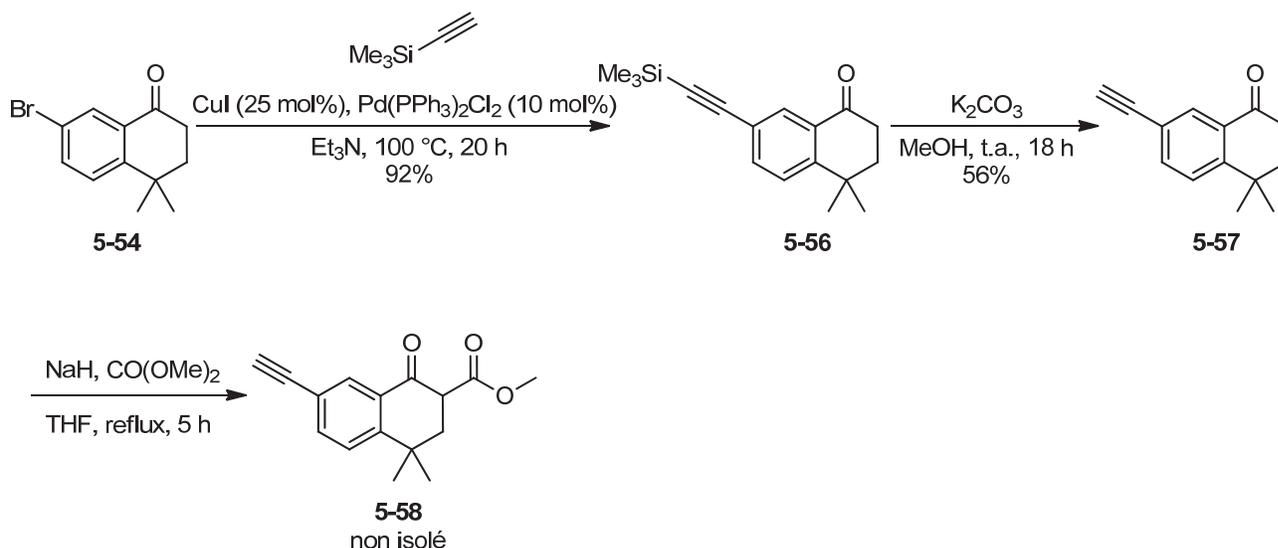


Schéma 5.18.

Par contre, l'addition sur le carbonate de diméthyle dans les conditions habituelles n'a pas eu le résultat escompté. Beaucoup de matériel a été perdu ; un peu du produit désiré **5-58** a été observé (< 10%) en plus d'un produit contenant deux esters méthyliques (< 10%). Le deuxième ester se trouve supposément sur la position terminale de l'alcyne (le proton alcyinique est tout de même assez acide pour subir une déprotonation par le NaH). L'alcyne devait être utilisé dans des réactions click et des couplages au palladium pour avoir une nouvelle librairie de composés pour sonder plus profondément la région ouest. Cependant, les résultats biologiques des premiers analogues n'ont pas donné de raison d'investir plus d'efforts dans cette série pour le moment (voir 5.2.3).

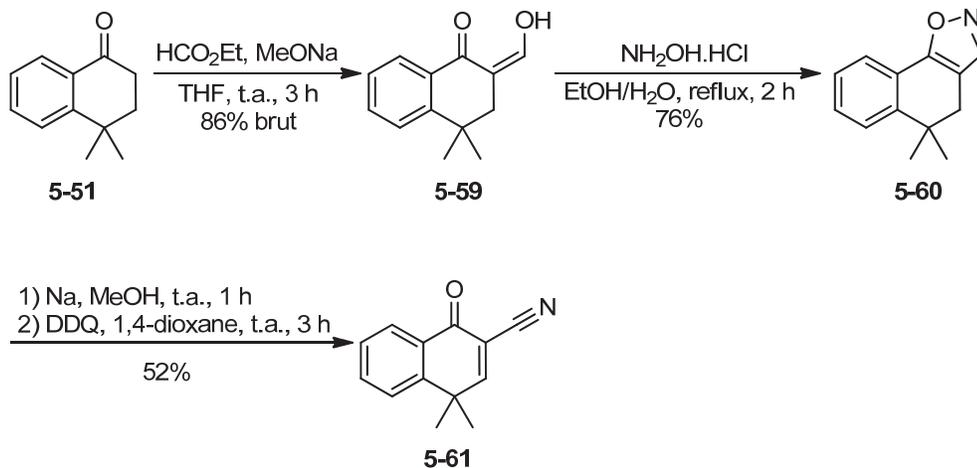


Schéma 5.19.

L'analogue portant la fonction nitrile **5-61** a aussi été synthétisé en utilisant la même séquence que celle développée pour la β -tétralone **5-46** (schéma 5.19).¹⁴⁶ L'isoxazole désiré **5-60** était majoritaire par rapport à son isomère.

Afin de varier encore plus l'électrophilie de l'accepteur de Nazarov, nous avons vu l'opportunité d'installer un atome de fluor en α de l'énone comme deuxième groupement électroattracteur (schéma 5.20). L'utilisation de SelectfluorTM avec l' α -tétralone **5-51** a permis d'obtenir le composé **5-62**.¹⁵¹ L'oxydation a été un plus grand défi. Les méthodes qui utilisent la DDQ ou le PhSeBr n'ont rien donné, le produit de départ a été récupéré intact. L'utilisation d'une base plus forte pour former l'énolate et additionner le phénylsélényle était nécessaire.¹⁵² L'oxydation / élimination s'est faite dans les mêmes conditions que précédemment. Par contre, lors de cette unique tentative, l'énone **5-63** a été obtenue mélangée avec le produit de départ **5-62** et ils n'ont pas pu être séparés. Il faudrait purifier l'intermédiaire après la sélénation.

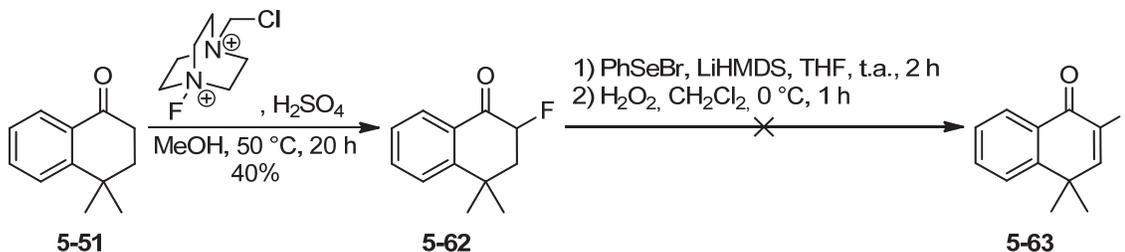


Schéma 5.20.

La tétralone **5-51** est un bon substrat pour des réactions d'arylation par couplage au palladium (schéma 5.21).^{153,154} Le bromobenzène et le 4-bromoanisole ont été connectés avec succès. Cependant, quelques limitations ont été observées : l'utilisation d'aryles pauvres en électrons ou encombrés en position *mé*ta donne peu ou pas de produit de couplage. Quelques succès avec le couplage d'anilines protégées avec un groupement *tert*-butoxycarbonyle ont été obtenus mais ces réactions doivent être encore optimisées pour arriver jusqu'aux cibles désirées.

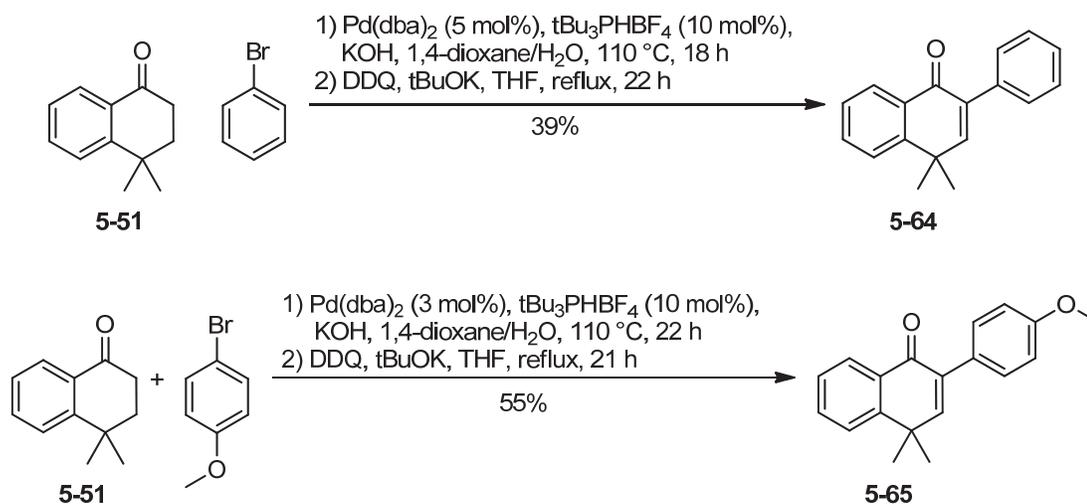


Schéma 5.21.

Les produits de couplage n'ont pas pu être oxydés seulement avec la DDQ et en présence de K₂CO₃, comme pour les autres substrats. Le *tert*-butanoate de potassium, une base compatible plus forte, a été utilisé pour former l'énolate qui a pu ainsi être oxydé avec la DDQ. Cette modification a permis d'obtenir les énones **5-64** et **5-65** (schéma 5.21).

En parallèle à la série tétralone, une série de dérivés de la 1-indanone (**5-66**) a aussi été imaginée (schéma 5.22). Le cétoester **5-67** a été synthétisé tel que déjà décrit,¹⁵⁵ mais le produit d'oxydation **5-68** était trop instable pour être isolé.¹⁵⁶

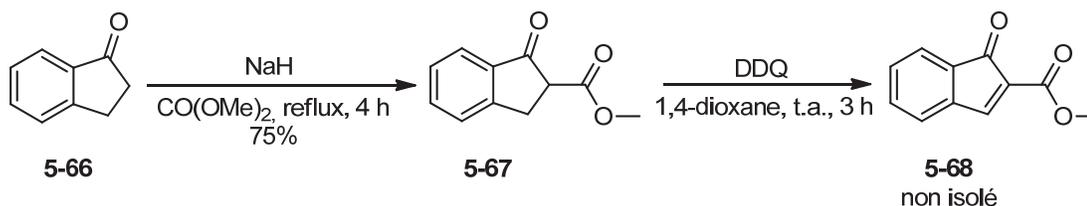


Schéma 5.22.

5.2. Résultats biologiques et analyse

5.2.1. Remplacement de l'ester méthylique par d'autres groupes électroattracteurs

Avec un électrophile intéressant pour l'étude de Keap1/Nrf2 en main, nous avons été tentés de l'optimiser en commençant par modifier le second groupe électroattracteur (figure 38). Le méthyle de l'ester a été changé pour un groupe allyle ou *tert*-butyle (cf. **5-1** et **5-2**). L'hydrolyse a fourni l'acide **5-3** et l'ester a été remplacé par des halogènes (cf. **5-10** et **5-11**).

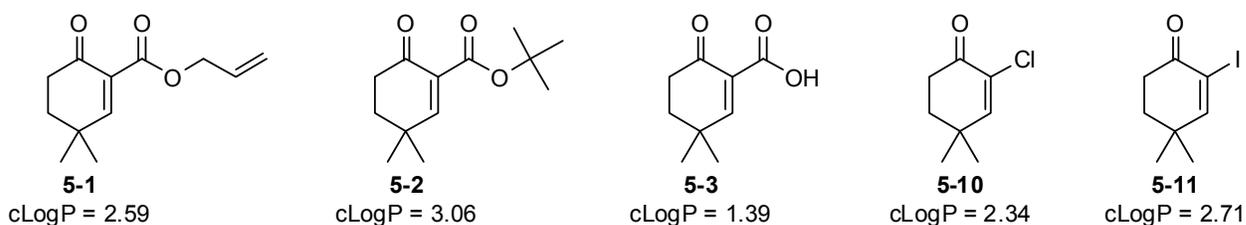


Figure 38. Modification du deuxième groupe électroattracteur X.

Les deux nouveaux esters **5-1** et **5-2** ont une activité environ deux fois plus élevée à 100 μ M accrue que l'ester méthylique **4-17a** (figure 39 A). Mais, leur toxicité a également augmenté (figure 39 B). Ces composés ont peut-être une moins bonne sélectivité : un pourcentage de l'activité supérieure observée serait dû à un mode d'action indépendant d'induction de Nrf2. L'acide **5-3** garde le même profil que l'électrophile modèle mais perd un peu d'activité. Il est assez petit pour être sélectif et ne pas induire de toxicité *a priori*. À pH physiologique, il est sous la forme carboxylate qui le rend moins électrophile, donc moins actif et aussi moins toxique. Pour les dérivés halogénés, on n'observe aucune toxicité. Le chlore est plus électronégatif et donc le composé **5-10**, plus électrophile, est le plus actif. Il a un profil similaire aux analogues **4-17** et est presque aussi actif à 100 μ M.

Ce petit échantillon de dérivés montre qu'il y a peu de place pour optimiser le méthyle de l'ester dans la région est. Le site de liaison du motif électrophile n'offre pas beaucoup d'espace dans cette direction. Le dérivé chloré **5-10** donne un électrophile intéressant supplémentaire.

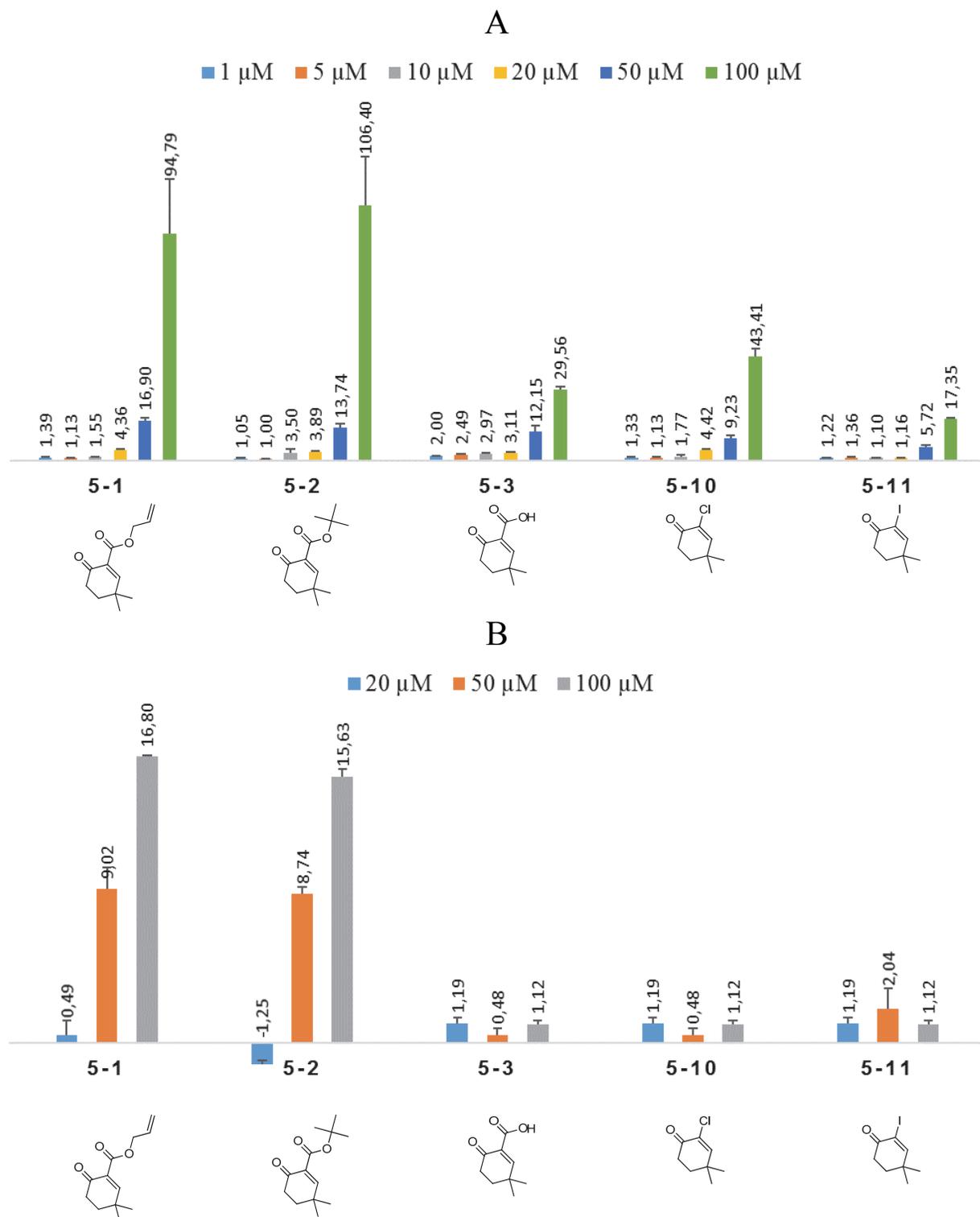


Figure 39. Accepteurs de Michael. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

5.2.2. Suppression d'un des deux groupes électroattracteurs

Pour pousser un peu plus loin, un des deux groupes électroattracteurs a été retiré pour obtenir des accepteurs de Michael (figure 40) : soit l'ester avec les composés **5-4** et **5-5** ou la cétone avec l'alcool **5-14**. Ces molécules ont des réactivités très différentes de l'accepteur de Nazarov modèle **4-17a**. En particulier, ils sont considérés comme des inducteurs covalents plutôt irréversibles.^{81,82} Le bis-électrophile **5-6** est singulier car il possède à la fois un accepteur de Michael et un accepteur de Nazarov.

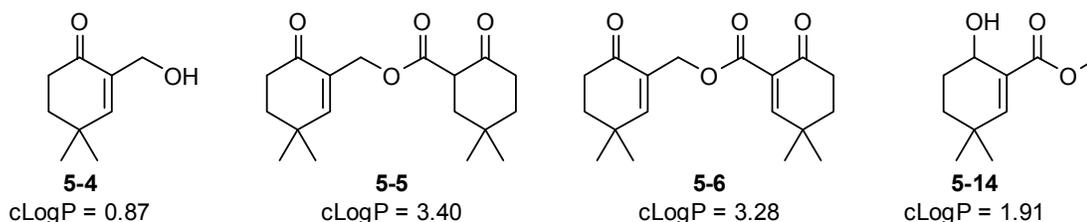


Figure 40. Accepteurs de Michael.

Une perte très importante d'activité a été observée pour les accepteurs de Michael **5-4** et **5-5** (figure 41 A) mais leur toxicité reste dans la limite acceptable (figure 41 B). Les analogues **5-4** et **5-14** sont particulièrement inactifs à toutes les concentrations testées et l'induction du cétoester **5-5** ne monte que jusqu'à sept. Cette perte d'activité associée à la diminution de l'électrophilie était attendue mais pas de l'ampleur observée. Un accepteur de Michael devrait être suffisant pour piéger une cystéine de Keap1 et être actif (voir 1.3). De plus, les interactions secondaires avec les fonctions alcool (cf. **5-4** et **5-14**) auraient pu jouer un rôle critique dans la capacité de l'inducteur à se rendre à la bonne cible, une cystéine dont la modification va induire la transcription des gènes associés à Nrf2, mais ce n'est pas le cas. Le bis-électrophile **5-6** a le même profil que les esters **5-1** et **5-2** vus au sous-chapitre précédent. Il est considéré comme un accepteur de Nazarov où la région est a été modifiée. L'activité est plus forte mais s'accompagne aussi d'une augmentation de la toxicité. Le rôle que joue peut-être l'accepteur de Michael est difficile à clarifier.

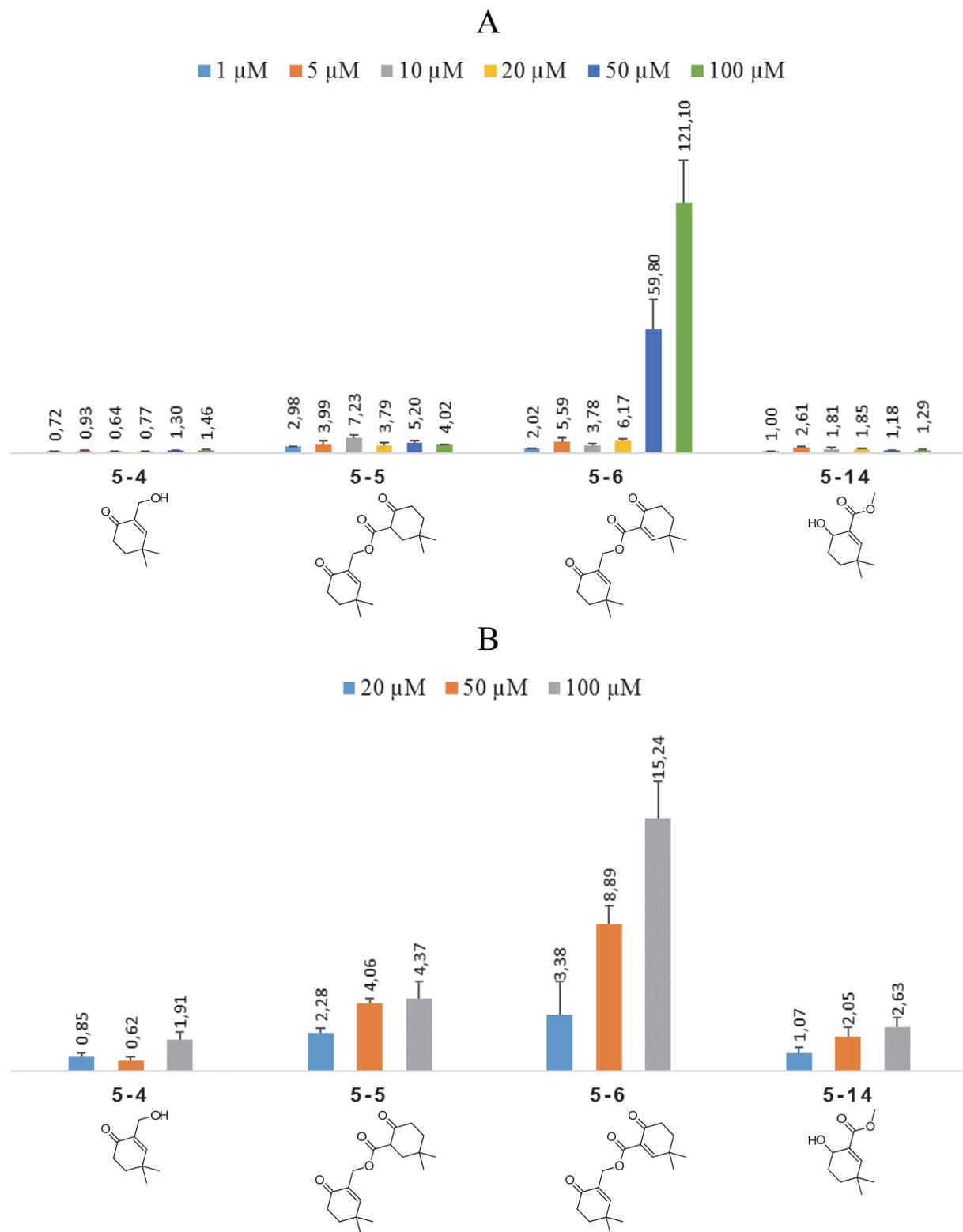


Figure 41. Composés 5-4, 5-5, 5-6 et 5-14 (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

D'après notre analyse des cystéines ciblées sur Keap1 (voir 1.3.1), ces accepteurs de Michael réagissent avec la région IVR. Les composés **5-4** et **5-14** cibleraient des cystéines autres que Cys273 et Cys288 et qui n'ont pas d'impact sur le complexe Keap1-Nrf2-Cul3. On peut tenter d'expliquer leur inactivité de cette manière. Dans la partie 5.2.1, nous avons dit que les esters plus volumineux que le méthyle apportent un gain au niveau de l'induction mais aussi de la toxicité, comme l'accepteur de Nazarov **5-6**. Donc, si le cétoester **5-5** ciblait la même cystéine avec la même orientation, il aurait eu le même profil. Cette comparaison amène une fois de plus à penser que ces électrophiles ne ciblent pas le même domaine. Le dicarbone conjugué offre de nouvelles interactions secondaires potentielles qui amènent plutôt cette molécule à cibler une des cystéines d'intérêt de la région IVR.

La réversibilité de l'électrophile ressort comme un paramètre critique qui est assurée par la présence de deux groupes électroattracteurs.⁸² Nous pensons que c'est primordial tant que les interactions secondaires nécessaires pour apporter de la spécificité vers un résidu cystéine d'intérêt biologique sont inconnues.

5.2.3. Importance de la conjugaison du dicarbone

Après l'étude de l'électrophilie du motif accepteur de Nazarov, nous avons cherché à comprendre comment l'accepteur s'oriente pour piéger la cystéine dans le site actif. La présence de deux groupes électroattracteurs est importante pour la réversibilité (voir 5.2.2.), mais leur rôle dans d'autres interactions reste une question sans réponse. Le cristal du CDDO dans le domaine BTB dit déjà que la forme énol du cétonitrile fait un pont hydrogène avec le résidu Gly148 (voir 1.3.2.).³⁹

Les analogues suivants ont été synthétisés pour répondre à ces questions et comparer cétoesters et cétonitriles (figure 42). Le carbone électrophile a été déplacé avec les composés **5-16** et **5-19**. La conjugaison dans le dicarbone a été bloquée (cf. **5-17** et **5-20**) ou forcée (cf. **5-21**) par méthylation. Le dérivé **5-22** est un inducteur covalent bien connu de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE.⁷²

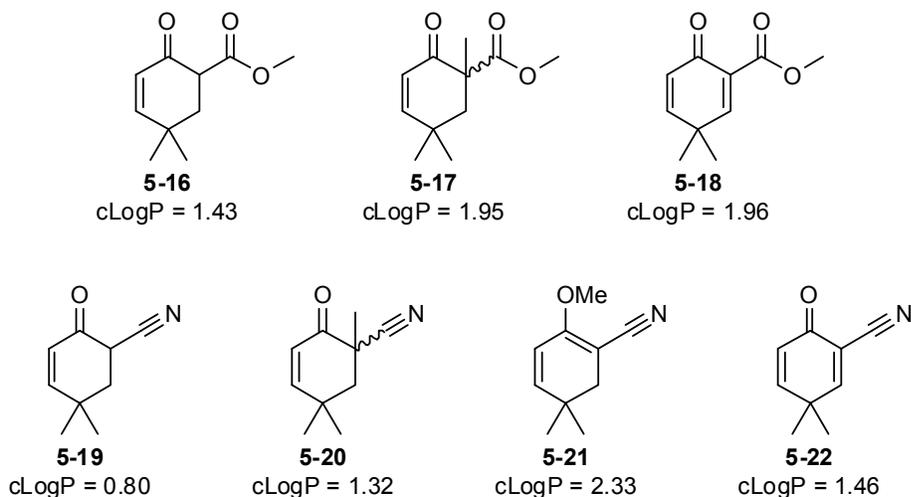


Figure 42. Comparaison cétoesters / cétonitriles.

Pour les trois esters, le premier dérivé **5-16** est de loin le plus puissant (figure 43 A). Son profil est une copie quasi-parfaite de celui de notre électrophile de référence **4-17a**. Par contre, lorsqu'on bloque la conjugaison (cf. **5-17**), on perd toute activité. Et, avec les deux carbones électrophiles du composé **5-18**, on ne récupère qu'une petite partie de l'activité. Tous ces analogues gardent une toxicité très acceptable (figure 43 B). En prenant les résultats de l'accepteur de Nazarov **4-17a** en considération, cette comparaison pointe l'importance de la forme énol avant même l'addition nucléophile.

Les cétonitriles sont des composés généralement plus puissants que les cétoesters mais aussi plus toxiques (figure 43 A et B). La fonction nitrile fait partie intégrante du motif électrophile et abaisse systématiquement le cLogP. Sur de si petites molécules, son caractère plus hydrophile causerait une perte de spécificité pour Keap1 (voir 3.2). Néanmoins, la comparaison des cétonitriles n'infirme pas la tendance observée pour les cétoesters. L'accès à la forme énol a un impact certain sur la puissance du composé. L'analogue **5-21** avec l'éther d'énol est particulièrement dépourvu d'activité et de toxicité. Cela laisse supposer que la propriété essentielle de l'énol et la présence du proton sur l'oxygène plus que sa géométrie.

Ce résultat est surprenant. Nous nous attendions à une perte d'activité basée sur la diminution de l'électrophilie pour les composés **5-16**, **5-17**, **5-19** et **5-20**. L'irréversibilité de l'addition d'un résidu cystéine sur l'énone est aussi à prendre en considération ici pour ne pas tirer de conclusions hâtives.

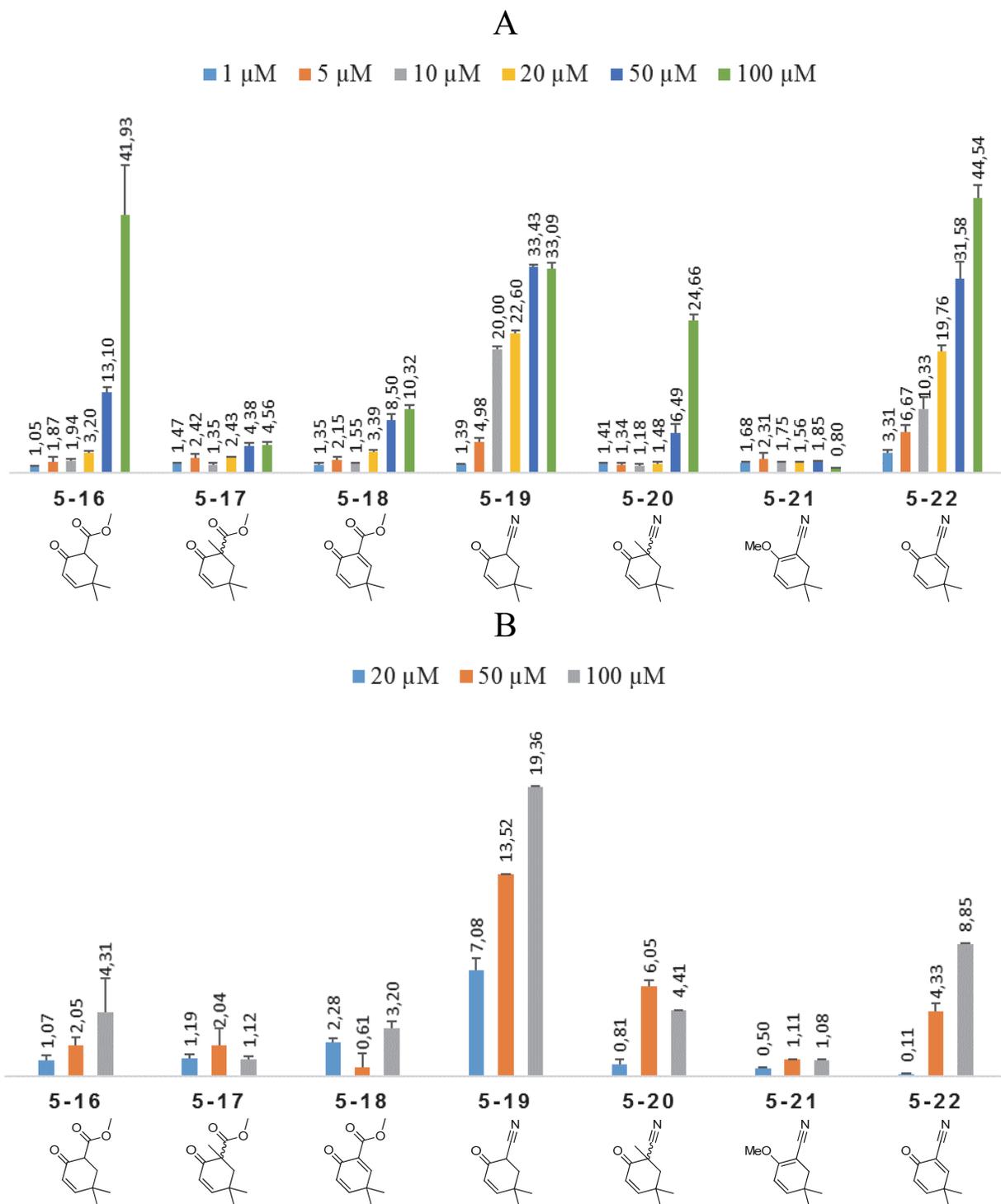


Figure 43. Comparaison cétoesters / cétonitriles. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

Parallèlement, notre série de dérivés de type tétralone avait été entreprise avec cette idée simple d'ajouter un cycle aromatique dans la région ouest pour favoriser la forme énol par conjugaison après l'addition nucléophile (figure 44). Les accepteurs de Nazarov acycliques (cf. **5-35** et **5-37**) ou cycliques (cf. **5-53**, **5-55** et **5-61**) ont été synthétisés. Les deux dérivés de type β -tétralone **5-43** et **5-46** offrent une diminution de l'encombrement stérique près du carbone électrophile.

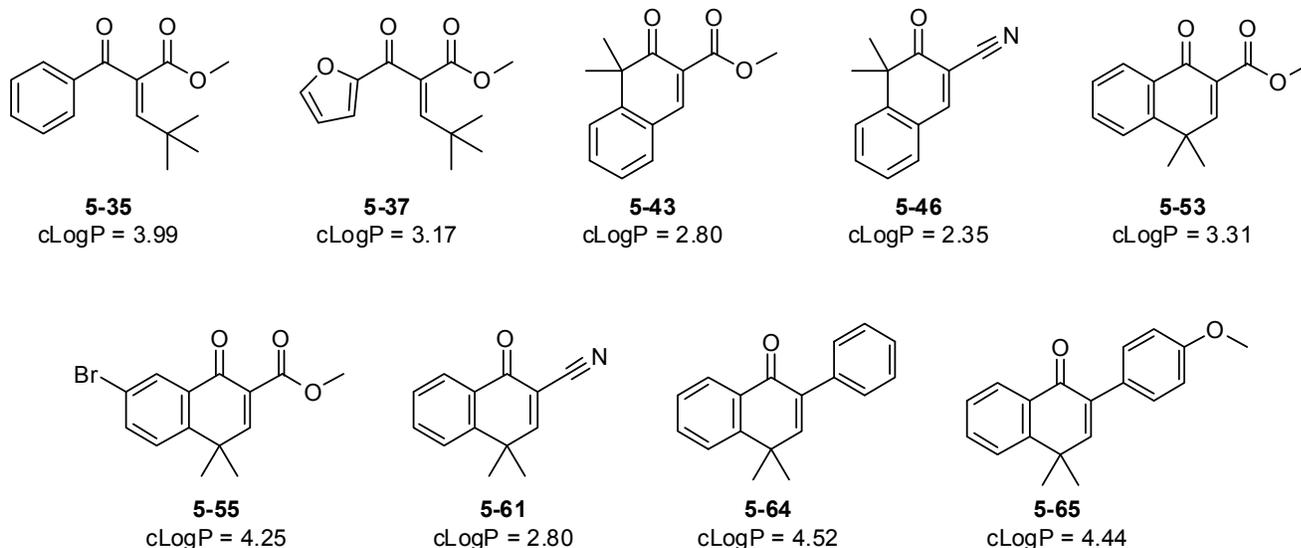


Figure 44. Analogues de type tétralone.

Globalement, ces composés sont très peu actifs et non-toxiques (figure 45 A et B). Le composé le plus actif **5-37** est le seul à avoir une toxicité aigüe. Le furane, par son oxygène, offre un électrophile qui ressemble à ceux de la série dioxolane, d'où la toxicité d'après notre hypothèse sur la présence d'hétéroatomes près du site électrophile (voir 3.2). La formation de l'énol avant l'addition nucléophile n'est possible pour aucun de ces analogues. Les faibles valeurs obtenues ne permettent pas de comparer le cycle ouvert ou fermé qui influence la direction de l'attaque nucléophile.

Les tétralones de type α (cf. **5-53** et **5-55**) sont meilleures. La forme tétralone β fait que la double liaison est conjuguée dans le cycle aromatique (cf. **5-43**) et l'électrophilie est considérablement diminuée et peut-être plus suffisante pour piéger une cystéine. Contrairement à ce qui était observé d'habitude, la présence du nitrile ne s'accompagne pas par une augmentation de l'activité dans cette série.

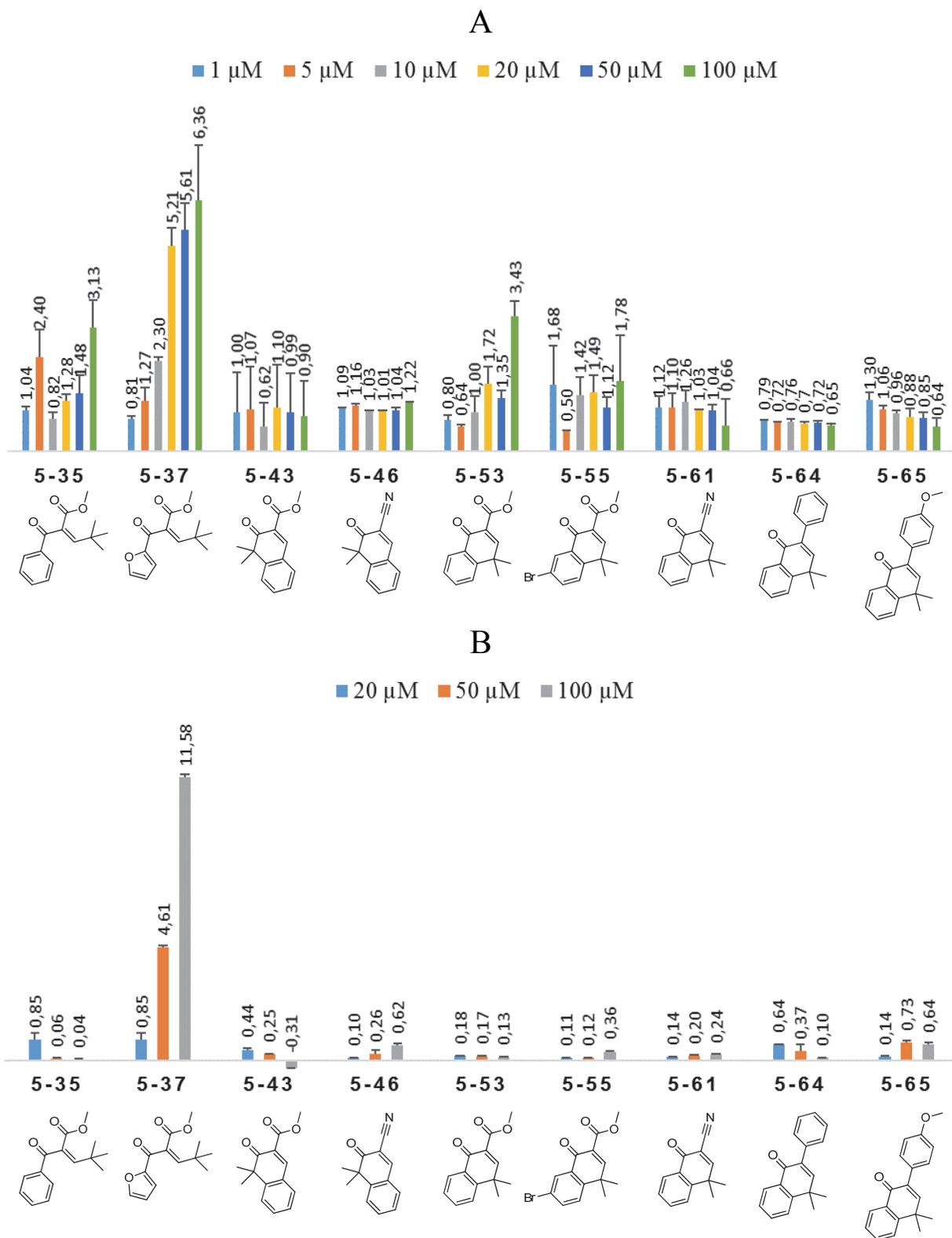


Figure 45. Série tétralone (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

Les composés ayant le cycle aromatique directement connecté à la cétone du côté ouest (cf. **5-35**, **5-37**, **5-53**, **5-55** et **5-61**) ne permettent plus à l'accepteur de Nazarov d'activer efficacement Nrf2. Néanmoins, l'absence claire de toxicité montre que cet électrophile est bien toléré en milieu cellulaire. Comme attendu, ni activité ni toxicité pour les énones **5-64** et **5-65** n'ont été observées. Nous voulons tout de même continuer cette série en utilisant le motif tétralone dans la région ouest pour sonder d'autres interactions potentielles ou en tant que second électrophile. Ces deux dernières molécules ont été synthétisées dans cette optique.

Nous avons voulu identifier les facteurs qui font qu'un monoélectrophile active la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE. Nous pensons qu'il doit être assez réactif pour pouvoir piéger une cystéine. Les déplacements chimiques des carbones peuvent être utilisés comme échelle pour mesurer l'électrophilie de nos molécules (figure 46).¹⁵⁷ L'énone **4-13** a été utilisée pour quantifier les valeurs en terme d'électrophilie même si cette molécule jugée trop petite et simple n'a jamais été testée. Plus le déplacement chimique est élevé, plus le carbone est électrophile. Une augmentation d'environ 5 ppm a été observée entre le déplacement chimique du carbone électrophile d'une énone (accepteur de Michael) et celui d'un β cétoester α,β insaturé (accepteur de Nazarov) correspondant, ce qui est consistant avec l'augmentation de l'électrophilie.

Les molécules les plus actives sont celles qui ont une cétone énolisable (figure 46, ligne du haut). D'après le chlorure **5-10**, une valeur de 155 ppm pour le déplacement chimique du carbone électrophile est la plus basse possible pour une molécule qui a un bon profil. Donc, l'énone **5-17**, la diénone **5-18** et la tétralone **5-53** devraient être assez réactives. Cependant, il leur manque l'interaction secondaire présumée avec une forme énol pour aller se loger dans le site actif avant l'addition nucléophile. L'autre tétralone **5-43** a un déplacement chimique de 150 ppm, qui pourrait indiquer une électrophilie insuffisante pour piéger une cystéine.

En résumé, nous faisons l'hypothèse que les petits électrophiles piègent Keap1 avec leur forme cétone et que la forme énol génère des interactions secondaires qui amène la molécule au bon site avant de réagir. La réversibilité est importante pour permettre l'association et la dissociation entre Keap1 et l'inducteur jusqu'à ce qu'il se stabilise dans son site actif.

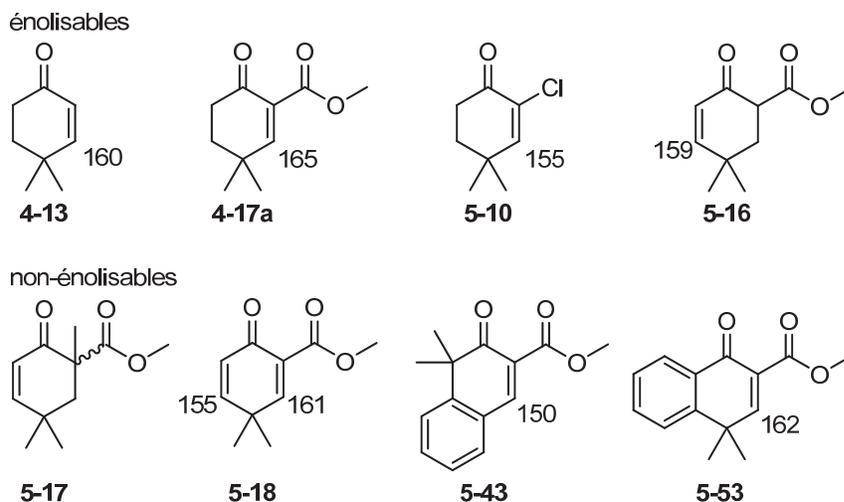


Figure 46. Déplacements chimiques en ppm des carbones électrophiles mesurées par RMN (haut : cétones énolisables et actives ; bas : cétones non-énolisables et peu ou pas actives).

5.2.4. Modification de la taille du cycle

Une série de composés monoélectrophiles de taille de cycle différente a aussi été synthétisée (figure 47). L'accepteur de Nazarov sur le cycle à sept membres est assez stable et donc il n'a pas besoin d'être méthylé sur le carbone en α (cf. **5-25** et **5-26**). Cela apparaissait trop risqué avec le cycle à cinq membres (cf. **5-29**) : sans les deux méthyles, la molécule serait trop simple et son poids moléculaire serait trop faible.

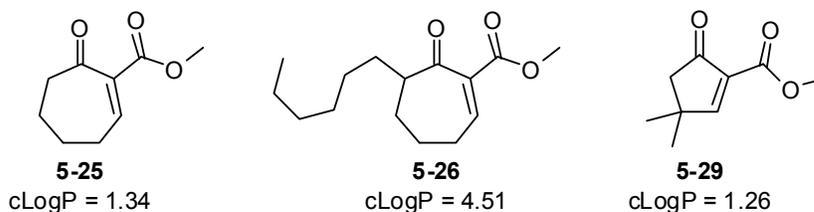


Figure 47. Contraction et expansion du cycle.

Le seul composé modérément actif de ce trio est l'accepteur de Nazarov **5-25** (figure 48 A). Mais, il a aussi une toxicité loin d'être négligeable (figure 48 B). Une fois de plus, les deux sont supposément liés dans ce cas, c'est un électrophile trop simple qui n'a peut-être pas de spécificité.

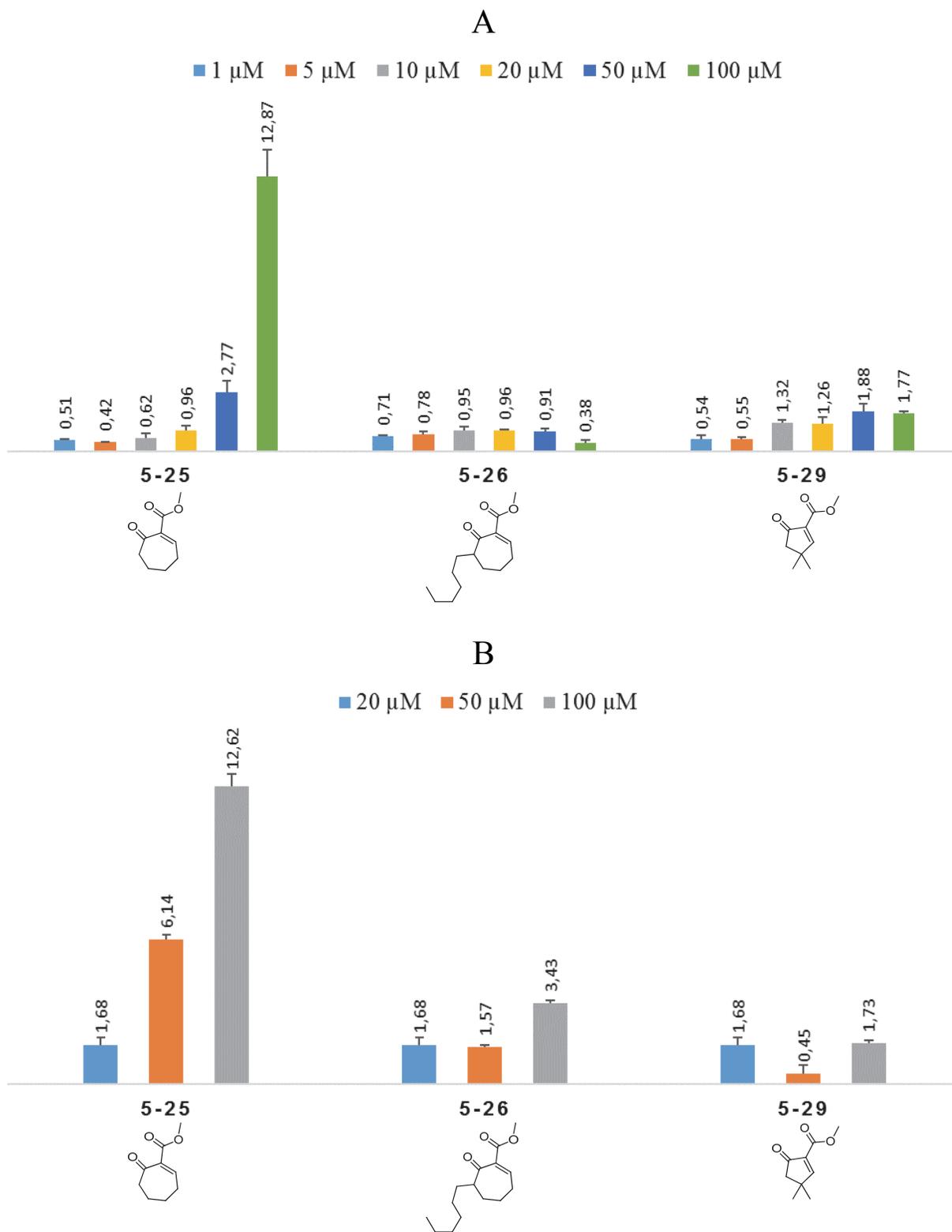


Figure 48. Tests sur la taille du cycle (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).

La chaîne hexyle en position γ augmente la lipophilie, empêchant supposément l'électrophile de réagir de façon non spécifique (cf. **5-26**). Nous n'observons plus de toxicité mais pas d'activité non plus. Le déplacement chimique du carbone en β des deux électrophiles **5-25** et **5-26** est de 137 ppm, donc probablement trop faible.

La contraction du cycle n'a pas apporté plus de succès (cf. **5-29**), le carbone électrophile a un déplacement chimique de 134 ppm. Les changements dans la taille du cycle devraient modifier les angles et les positions entre les chaînes latérales, les carbonyles et le carbone électrophile. Mais, à première vue, la différence à l'aire de se faire déjà au niveau de l'électrophilie.

CHAPITRE 6 : LES BIS-ÉLECTROPHILES

6.1. Synthèse

Avec une bonne librairie de composés monoélectrophiles déjà en main, ce chapitre se concentre plutôt sur les composés bis-électrophiles. Cette série a servi à valider la stratégie de départ d'utiliser des composés capables de piéger plus d'un résidu cystéine pour hausser l'activité. Le design est fortement guidé par l'accessibilité synthétique ici, le même électrophile est présent deux fois sur chaque analogue. Plus de diversité devra être ajoutée dans l'évolution future du projet (voir 7.4).

De façon générale, le dianion du cétoester **4-15** a été formé avec deux équivalents de diisopropylamide de lithium et additionné sur une chaîne alkyle qui possède deux groupements partants (schéma 6.1). Les produits de dialkylation **6-1a-o** ont été obtenus. L'oxydation double dans les conditions appropriées a donné les bis-électrophiles **6-2a-o**. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 2.

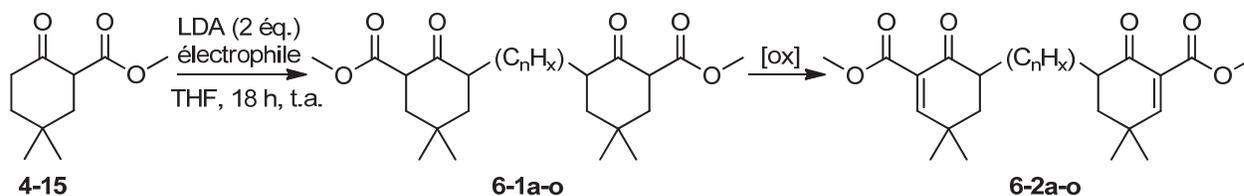
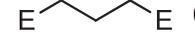
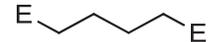
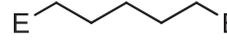
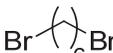
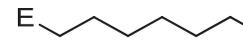
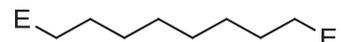
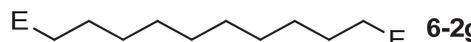
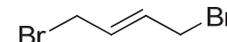
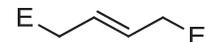
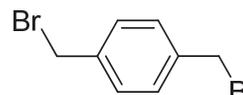
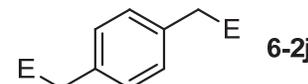
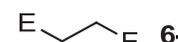
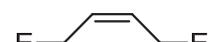
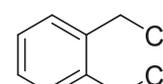
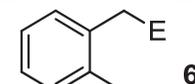
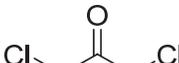
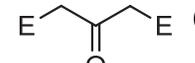
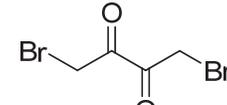
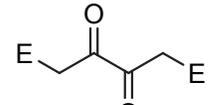


Schéma 6.1.

En général, l'alkylation en γ du dianion fonctionne très bien avec les dérivés iodés (entrées 1-4, 6 et 7). Les rendements chutent avec les composés bromés (entrée 5) même lorsqu'ils sont activés (entrées 8 et 10). Dans le cas du composé **6-1k** (entrée 11), un autre produit d'alkylation a été obtenu ; l'analyse par spectrométrie de masse n'a pas permis de déterminer sa nature. Dans le cas des dérivés chlorés, notre unique succès a été pour la chaîne alcyne (entrée 9). Les autres essais n'ont rien donné par manque de réactivité (entrées 12, 13). Nous n'avons pas obtenu le produit **6-1n** et **6-1o** (entrées 14 et 15 respectivement) probablement à cause de la compétition entre la déprotonation et l'alkylation. L'utilisation de la 1,3-dibromopropan-2-one pourrait être une solution; elle est obtenue directement par substitution des atomes de chlore de la 1,3-dichloropropan-2-one avec le bromure de lithium par exemple.¹⁵⁸

Tableau 2. Synthèse des analogues du schéma 6.1.

Entrée	Substrats	Méthode d'oxydation ^a	Rendement ^b	Composé
1		A	25%	 6-2a
2		A	50%	 6-2b
3		A	53%	 6-2c
4		A	48%	 6-2d
5		A	17%	 6-2e
6		A	41%	 6-2f
7		A	6%	 6-2g
8		B	13%	 6-2h
9		B	8%	 6-2i
10		C	14%	 6-2j
11		--- ^c	N / A	 6-2k
12		--- ^c	N / A	 6-2l
13		--- ^c	N / A	 6-2m
14		--- ^c	N / A	 6-2n
15		--- ^c	N / A	 6-2o

a) Méthode A : 1) PhSeBr, pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C ; 2) H₂O₂, CH₂Cl₂, 0 °C. Méthode B : DDQ, 1,4-dioxane. Méthode C : 1) LDA, PhSeBr, THF, t.a. ; 2) H₂O₂, CH₂Cl₂, 0 °C. Les détails (temps de réaction et autres) sont rapportés en annexe. b) de **4-15** à **6-2**. c) Aucun produit d'alkylation **6-1** n'a été récupéré. d) E = 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-èncarboxylate de méthyle.

L'oxydation jusqu'au double accepteur de Nazarov suit la même logique que précédemment. La procédure de Liotta avec le complexe PhSeBr-pyridine est utilisée préférentiellement pour les chaînes carbonées totalement saturées (entrées 1-7). Dans les autres cas, une base plus forte (LDA) dans l'étape de sélénation (entrée 10) ou la DDQ pour l'oxydation (entrées 8, 9) ont été utilisées comme alternatives avec succès.

Avec l'alcyne **4-17f**, nous avons vu l'opportunité de faire un couplage alcyne-alcyne (schéma 6.2). Afin de bloquer la position acide, la sélénation a été faite en premier (cf. **6-3**). La dimérisation¹⁵⁹ suivie de la double oxydation / élimination a permis d'obtenir le composé bis-électrophile **6-5**.

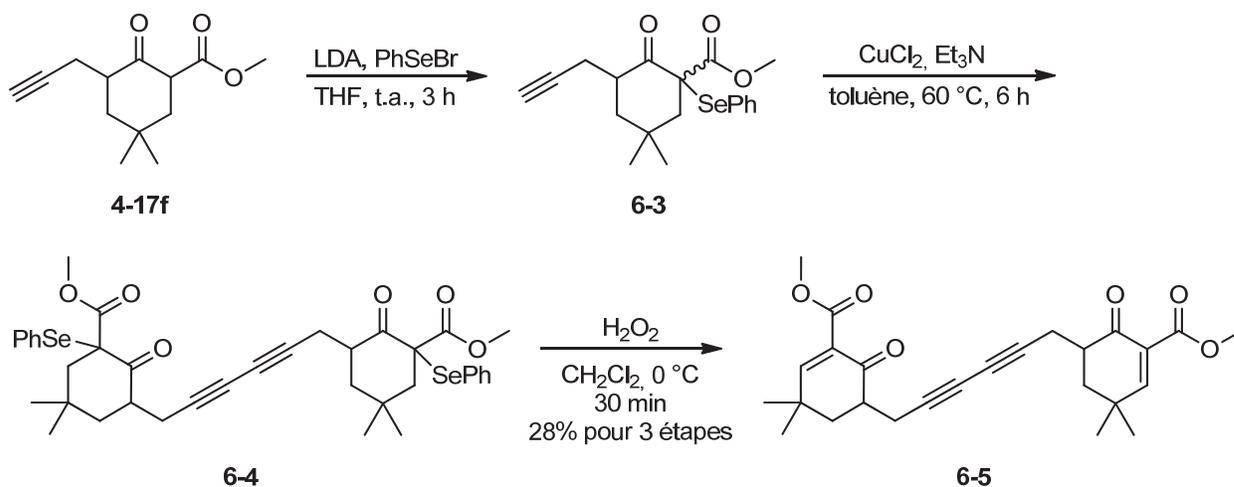


Schéma 6.2.

Jusque-là, les composés **6-2a-o** et **6-5** ont tous le même accepteur de Nazarov, en double. D'autres motifs de réactivités différentes étaient aussi désirés. Un deuxième électrophile avait déjà été connecté sur l'ester avec l'analogue **5-6** (voir 5.1.1). La synthèse du triène **6-8** s'est faite dans cette continuité (schéma 6.3). La transestérification du cétoester **5-16** avec l'alcool allylique **5-4** dans un appareil de Dean-Stark a donné la diénone **6-7**.¹³⁰ L'oxydation à la DDQ a permis d'obtenir le produit **6-8** (qui a trois carbones électrophiles) et de confirmer la structure du précurseur **6-7** dont l'équilibre cétoénolique rendait l'analyse par RMN plutôt approximative. Ils ont été synthétisés récemment et font partie du dernier lot de molécules prêtes à être testées, mais les résultats ne sont pas encore disponibles.

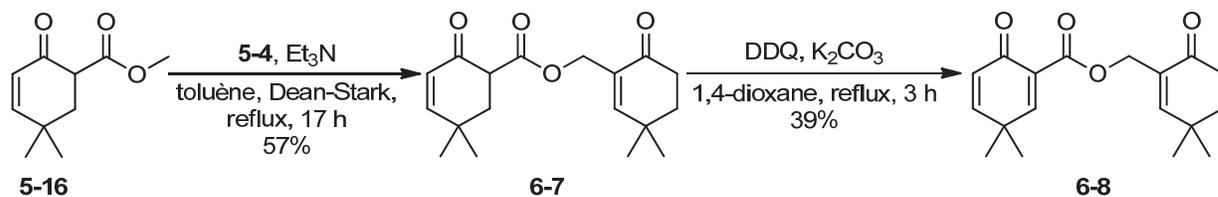


Schéma 6.3.

6.2. Résultats biologiques et analyse

6.2.1. Les chaînes complètement saturées

Pour notre étude de bis-électrophiles dans le deuxième volet de ce projet (voir 2.1), Les dimères d'accepteurs de Nazarov **6-2** séparés par des chaînes carbonées entièrement saturées de différentes longueurs ont été synthétisés (figure 49). Ces chaînes donnent le maximum de degrés de liberté possibles à ses dérivés pour qu'ils aient le plus de chance de trouver position dans le site actif.

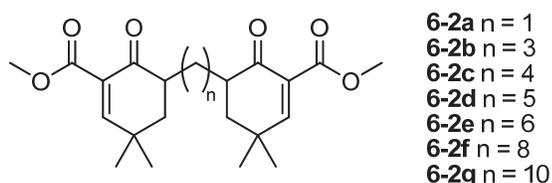


Figure 49. Bis-électrophiles avec des chaînes saturées.

Pour des problèmes de solubilité et de toxicité, ces molécules n'ont pas pu être testées à toutes les concentrations voulues (figure 50 A et B). Elles sont plus volumineuses que les électrophiles simples des chapitres précédents. Et, avec deux électrophiles, une augmentation de la toxicité était attendue.

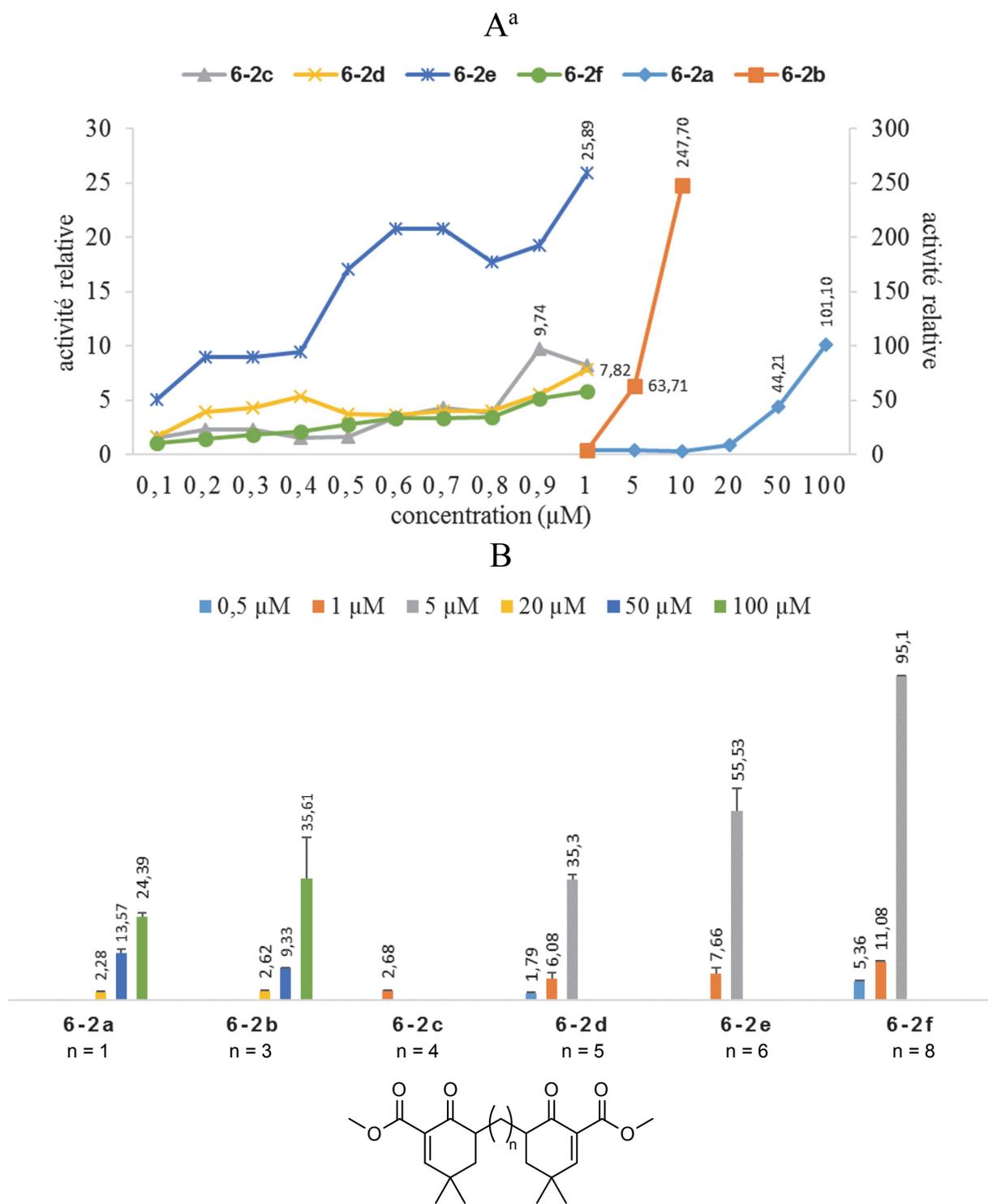


Figure 50. Bis-électrophiles avec chaînes saturées. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).
a) valeurs numériques en annexes.

Nous avons d'abord observé un profil déjà connu (cf. **5-1**, **5-2** et **5-6** du sous-chapitre 5.2.1) pour le bis-électrophile le plus court **6-2a**. L'activité devient intéressante à haute concentration mais la molécule devient également toxique. Un comportement proche des monoélectrophiles avec une chaîne latérale fonctionnalisée aurait pu être attendu mais ici la différence d'induction est tout de même significative. Avec l'allongement de la chaîne, la toxicité reste présente à haute concentration mais l'activité augmente de manière exponentielle à des concentrations plus faibles et tolérées par la cellule (cf. **6-2b** : 248 fois d'augmentation de l'activité à 10 μM). En continuant à augmenter la distance, les concentrations testées ont été limitées de 0.1 à 1 μM . L'activité augmente jusqu'au bis-électrophile **6-2e** avec la séparation à six carbones. Puis, en passant à huit carbones, l'activité diminue (cf. **6-2f**). La toxicité augmente beaucoup avec la longueur de la chaîne également.

L'ajout d'un deuxième électrophile sur la molécule augmente beaucoup l'activité. Ce qui est très intéressant avec cette comparaison, c'est qu'il semble y avoir une distance optimale qui se situe entre trois et sept carbones. La présence de deux électrophiles fait qu'on a aussi plus de toxicité. D'ailleurs, quand la distance est trop grande, la perte d'activité est importante et les toxicités observées sont de plus en plus élevées, jusqu'à 95%. Nous pensons que la molécule est trop grosse pour que les deux électrophiles puissent entrer dans le site actif et donc la molécule va réagir ailleurs avec les autres nucléophiles présents. Le coût entropique pour que la molécule se fixe dans la bonne conformation devient peut-être aussi trop grand. Le bis-électrophile **6-2g** a été synthétisé très récemment et devrait confirmer cette tendance mais il n'a pas encore été testé.

6.2.2. Les chaînes insaturées

Les chaînes saturées avaient été choisies pour donner le plus de flexibilité possible aux bis-électrophiles et augmenter leur chance de se positionner dans un site actif de Keap1. Après cette étude, nous pensons qu'une conformation optimale place les deux électrophiles au bon endroit. Pour tester cette hypothèse, la chaîne a été rigidifiée en y ajoutant une insaturation (figure 51). Le nombre de conformations possibles est alors limité et la distance entre les deux accepteurs de Nazarov est plus fixe. Parce que ces dérivés sont plus rigides, le coût entropique pour adopter la bonne conformation serait ainsi diminué.

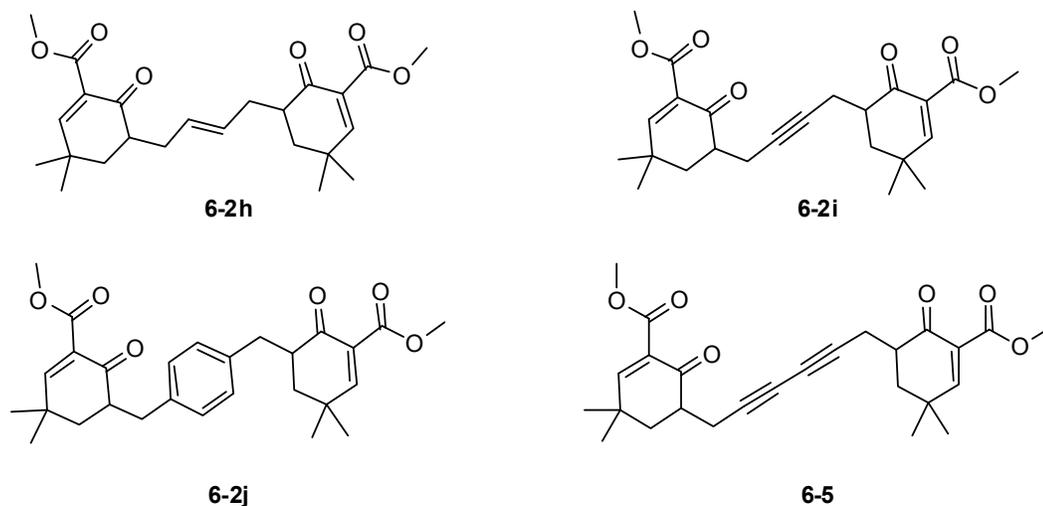


Figure 51. Bis-électrophiles avec une chaîne insaturée.

Les résultats biologiques sont en accord avec notre analyse des bis-électrophiles portant des chaînes saturées (figure 52 A et B). Les composés où les accepteurs de Nazarov sont le plus éloignés, sont les moins actifs et leur toxicité augmente assez rapidement (cf. **6-2j** et **6-5**). La chaîne possédant l'alcène *trans* est deux fois plus active que le dérivé **6-2c** qui a une chaîne saturée de quatre carbones. Et, le composé avec l'alcyne **6-2i** est de loin notre composé le plus puissant (induction de 52 à 1 μ M).

Nous pensons que les deux composés **6-2h** et **6-2i** présentent la distance optimale entre les deux accepteurs de Nazarov. Les insaturations donnent beaucoup de rigidité à ces molécules, les degrés de liberté restant sont ceux qui permettent la rotation du cycle pour un positionnement favorable à l'attaque nucléophile. Un gain important en coût entropique pour lier la molécule à Keap1 fait aussi partie des composantes de l'activité observée.

C'est le résultat obtenu le plus important qu'il faut confirmer et sur lequel le futur de ce projet est bâti.

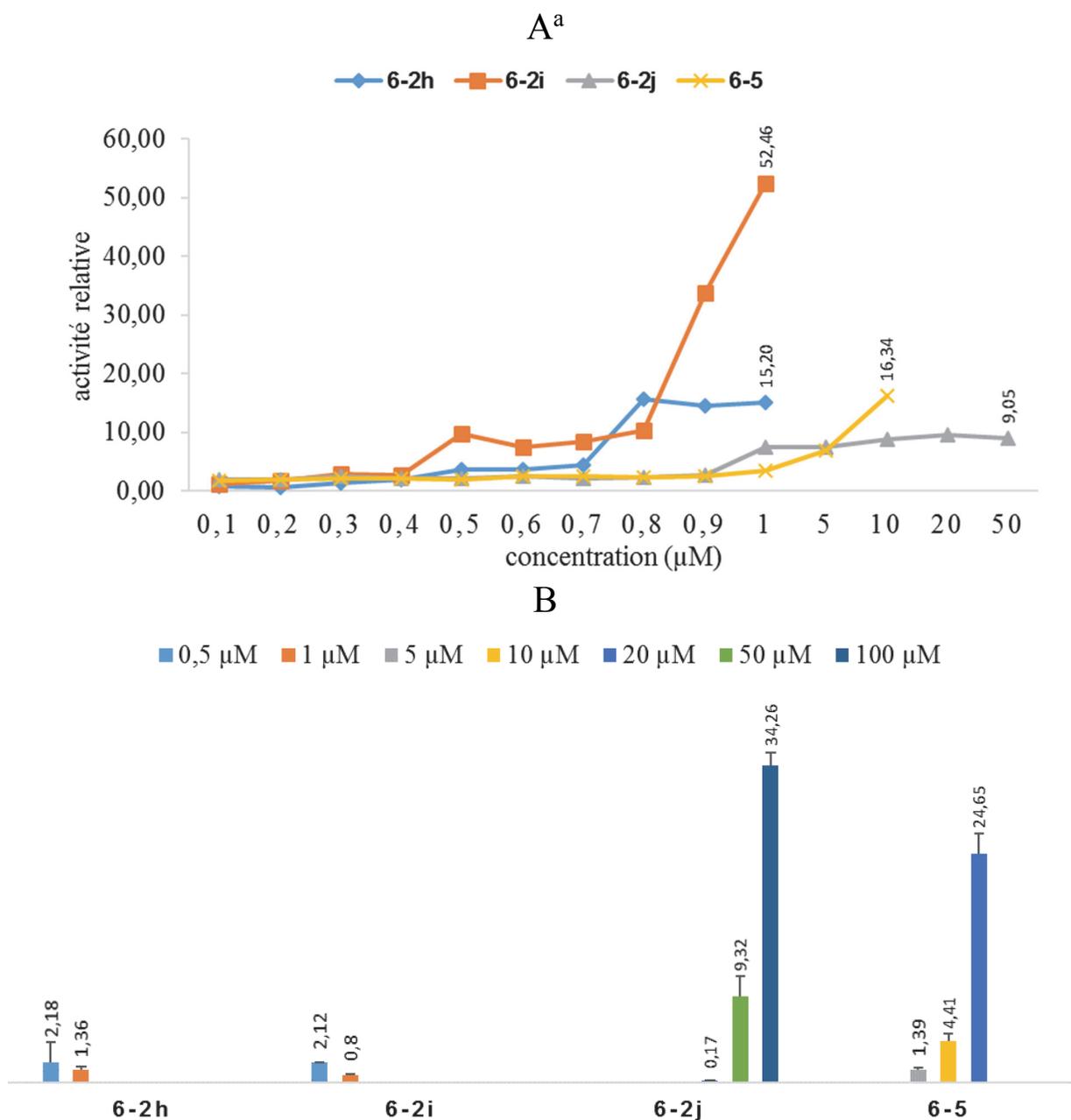


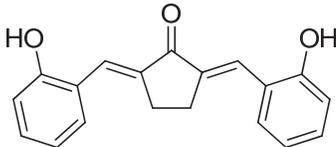
Figure 52. Bis-électrophiles avec des chaînes insaturées. (A) Activité relative rapportée de la luciférase. (B) Mortalité (%).
a) valeurs numériques en annexes.

CHAPITRE 7 : DISCUSSION ET ARRIMAGE MOLÉCULAIRE

7.1. Résultats de la mesure de NQO1

Nous avons utilisé la mesure de l'induction de NQO1 par réaction en chaîne par polymérase en temps réel quantitative (qPCR) comme second test biologique. Quatorze de nos molécules ont été choisies en plus du sulforaphane (contrôle positif et comparaison). La transcription de NQO1 est spécifique à Nrf2.⁹⁰ C'est donc un test de choix pour valider le mode d'action de nos analogues. D'après Dinkova *et al.*, plusieurs types de cellules peuvent être utilisées : ils ont observé le même profil d'induction avec la diénone **7-1** mais l'activité peut augmenter de façon plus ou moins importante (tableau 3).⁸³

Tableau 3. Induction de NQO1 par 10 μ M de **7-1** dans trois types cellulaires.

Entrée / composé / lignée cellulaire	Induction de NQO1 ^a		
	Contrôle	Traité	
1  7-1	Hepa 1c1c7 ^b	477	4 000
2	PE ^c	174	783
3 CD = 75 nM in Hepa 1c1c7	MCF 7 ^d	1 398	4 200

a) nmol/min par mg. b) Cellules murine hepatoma. c) Cellules murine papilloma. d) Cellules cancéreuses de seins humaines.

Les cellules Hepa 1c1c7 sont les plus utilisées pour cet essai biologique. Dans notre cas, les cellules macrophages de souris 264.7 ont été utilisées simplement car ce sont celles que nous avons de disponibles. Très couramment, on trouve la valeur CD qui correspond à la concentration à laquelle un composé multiplie par deux l'induction de NQO1 (figure 53).^{71-73,83,91}

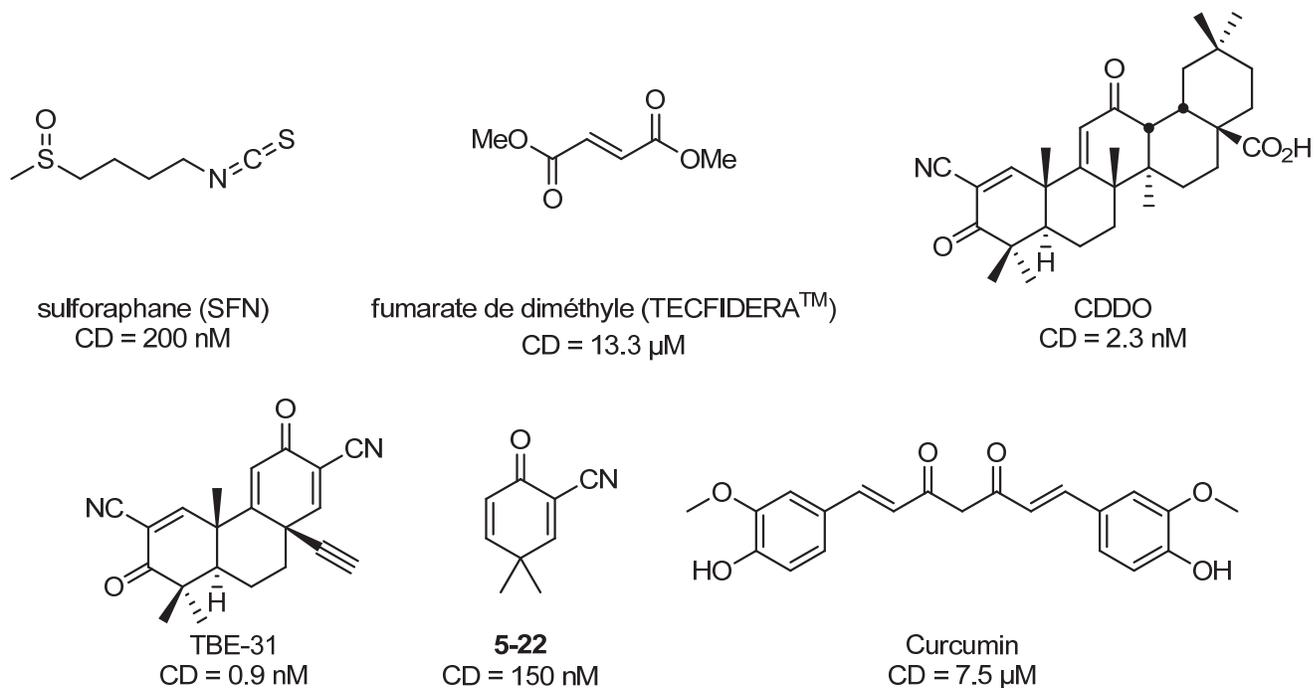


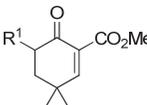
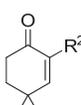
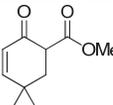
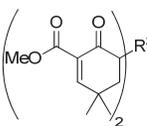
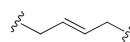
Figure 53. CD d'inducteurs électrophiles de Nrf2 mesurées dans les cellules Hepa 1c1c7.

La totalité des résultats obtenus est répertoriée dans le tableau 4. Ces données ont donné un bon moyen de comparaison avec les autres inducteurs électrophiles de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE répertoriés dans la littérature. Le type de cellules utilisées a un impact important sur les valeurs obtenues. Dans notre test, le sulforaphane multiplie l'induction de NQO1 par deux à 10 μM au lieu de 200 nM dans la littérature (entrée 1). La plupart de nos analogues sont bien plus puissants que cet isothiocyanate (entrées 3, 4, 7, 8, 10-15). Les valeurs laissent supposer que les bis-électrophiles **6-2h** et **6-2i** font partie des inducteurs électrophiles de la voie de signalisation de Keap1/Nrf2/ARE les plus puissants (entrées 14 et 15).

On peut également confirmer les relations structure-activités obtenues avec l'essai luciférase. Dans la série des monoélectrophiles, les chaînes latérales lipophiles (entrées 2-4) sont préférées aux chaînes fonctionnalisées (entrées 5, 6). Les autres cétoesters **5-1** et **5-2** (entrées 8 et 9) sont très actifs dans cet essai contrairement au chlorure **5-10** (entrée 9). Il y a peut-être plus d'exploration à faire dans la région est que les premiers tests ne laissaient penser. L'énone **5-16** est toujours aussi active que les accepteurs de Nazarov **4-17** (entrée 10). On retrouve aussi que les bis-électrophiles sont plus puissants que les monomères correspondants (entrées 11-15). Une séparation de quatre à six carbones donne les meilleurs résultats (entrées 11-13). Les composés possédant une insaturation **6-2h** et **6-2i** sont encore les plus

puissants (entrées 14, 15). On confirme que cette disposition représente la conformation optimale pour avoir les deux électrophiles en interactions avec Keap1 et que la rigidité diminue le coût entropique à payer pour lier la molécule dans son site actif. Ces résultats confirment les tendances observées dans l'essai luciférase et appuient davantage les hypothèses avancées. Néanmoins, à ce stade du projet, beaucoup de nouvelles questions sont soulevées.

Tableau 4. Induction de NQO1 mesurée par qPCR.

Entrée / composé	Induction de NQO1 ^{a,b,c}		
	2 μ M	5 μ M	10 μ M
1 Sulforaphane	0.81 \pm 0.08	1.38 \pm 0.15	2.02 \pm 0.08
2 4-17a R ¹ = H	2.02 \pm 0.15	2.25 \pm 0.20	4.29 \pm 0.20
3 4-17b R ¹ = Hex	1.62 \pm 0.45	5.92 \pm 1.38	10.99 \pm 2.82
4  4-17e R ¹ = Bn	1.96 \pm 0.72	3.41 \pm 0.37	5.99 \pm 0.75
5 4-17i R ¹ = CH ₂ CN	0.63 \pm 0.19	2.35 \pm 0.57	1.98 \pm 0.56
6 4-17k R ¹ = (CH ₂) ₂ CO ₂ Me	0.57 \pm 0.18	1.94 \pm 0.35	1.30 \pm 0.75
7  5-1 R ² = CO ₂ All	3.59 \pm 0.11	14.89 \pm 2.04	30.22 \pm 4.87
8 5-2 R ² = CO ₂ <i>t</i> -Bu	5.56 \pm 1.64	8.76 \pm 0.76	19.71 \pm 2.79
9 5-10 R ² = Cl	2.78 \pm 0.77	1.99 \pm 0.52	2.05 \pm 0.23
10  5-16	2.48 \pm 0.09	5.42 \pm 1.58	8.08 \pm 0.80
11 6-2a R ³ = CH ₂	5.97 \pm 0.73	10.17 \pm 1.03	22.41 \pm 3.04
12 6-2b R ³ = (CH ₂) ₃	3.18 \pm 0.17	8.96 \pm 0.65	18.63 \pm 5.98
13  6-2c R ³ = (CH ₂) ₄	8.38 \pm 0.62	12.92 \pm 1.45	13.96 \pm 1.47
14 6-2h R ³ = 	14.97 \pm 4.77	15.60 \pm 3.56	13.92 \pm 1.88
15 6-2i R ³ = 	14.38 \pm 2.12	19.47 \pm 2.64	25.62 \pm 1.62

a) Moyenne \pm SEM. b) Cellules RAW 264.7. c) Aucune toxicité n'avait été observée à ces concentrations.

L'ajout d'un deuxième accepteur de Nazarov augmente l'activité de manière significative. La position relative entre les deux carbones électrophiles est un paramètre critique pour moduler les propriétés de ces bis-électrophiles. Le premier accepteur de Nazarov piège sans aucun doute un résidu cystéine de Keap1

mais, nous ne savons pas lequel. Les résultats biologiques ne permettent pas non plus de savoir si le deuxième motif 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-ènedicarboxylate de méthyle piège un autre résidu cystéine ou intervient dans des interactions non-covalentes. Pour y arriver, il existe essentiellement deux stratégies. La première consiste à isoler la protéine de Keap1, l'exposer à la molécule à tester, puis lyser la protéine avec la trypsine et analyser les fragments par spectrométrie de masse. En comparant les fragments obtenus à ceux de Keap1 seul, il est possible de déterminer à quel fragment la molécule à tester s'est liée. Puisque la séquence primaire de Keap1 est connue, nous pourrions déduire le domaine (BTB ou IVR, ou autre) ciblé par nos molécules. Malheureusement, la reproduction des expériences de protéomique par le Pr Klaus Klarskov et le Dr Hussein Traboulsi n'a pas été possible à cause de problèmes lors de la digestion de la protéine. Cet essai reste toutefois très intéressant à réaliser afin d'identifier le site d'interaction des inhibiteurs.

La deuxième méthode consiste à utiliser des mutants de Keap1 pour lesquels un ou plusieurs résidus cystéines ont été remplacés par des acides aminés permettant de conserver l'activité basale de Keap1.⁶³ En testant nos molécules sur ces mutants, et en s'assurant au préalable que les mutants sont toujours fonctionnels, une modulation de l'activité en fonction des mutants utilisés pourrait donner des indications sur les cystéines visées par nos molécules, et donc pointer vers un domaine de Keap1 en particulier. Nous ne sommes pas en possession des différents mutants de Keap1 qui pourraient nous aider et n'avons pas non-plus la technologie pour les fabriquer. De nouvelles collaborations sont envisagées pour combler ce manque.

7.2. Arrimage moléculaire dans le domaine BTB

Grâce à Cleasby *et al.*, plusieurs cristaux du domaine BTB sont disponibles.³⁹ Pour obtenir des premiers éléments de réponse, des expériences d'arrimage moléculaire ont été faites avec les molécules **6-2a**, **6-2b** et **6-2i** en utilisant l'extension NRGsuite pour Pymol en supposant que ces inducteurs ciblent le résidu Cys¹⁵¹.¹⁶⁰ Les structures *apo* et *holo* (avec CDDO) ont été superposées dans Pymol (figure 54). NRGsuite permet de trouver les cavités en contact avec la protéine. Dans le cristal *apo*, les résidus Cys¹⁵¹ et Arg¹³⁵ sont proches (3.6 Å), ce qui augmente le caractère nucléophile de la fonction thiol par pont-H entre le SH du résidu Cys¹⁵¹ et le carboxylate du résidu Arg¹³⁵. Ce rapprochement fait aussi en sorte que la cavité est petite et le résidu cystéine difficilement accessible. Lors de la formation du lien carbone-soufre, les deux acides aminés s'éloignent (8.5 Å) et offrent une cavité beaucoup plus grande à occuper pour une molécule.

La majorité des acides aminés environnants se reculent un peu mais ne changent pas fondamentalement d'orientation. Les différences notables sont les chaînes latérales des résidus Lys¹³¹ et Lys¹⁵⁰ qui changent de direction grâce à leur grande flexibilité. Les résidus Arg¹³⁵ et Cys¹⁵¹ ne sont plus dirigés l'un vers l'autre non plus. Le domaine BTB ne contient que trois résidus cystéine (voir 1.3.1.). Dans l'environnement de l'acide aminé Cys¹⁵¹, on n'en trouve aucune autre. Il n'y a d'ailleurs aucun autre nucléophile pour faire un deuxième lien covalent. Déjà avec CDDO, aucune interaction n'est proposée entre l'énone du cycle C et Keap1. Avec ce prérequis, la présence de deux électrophiles sur une même molécule pour cibler le résidu Cys¹⁵¹ du domaine BTB n'a pas de sens.

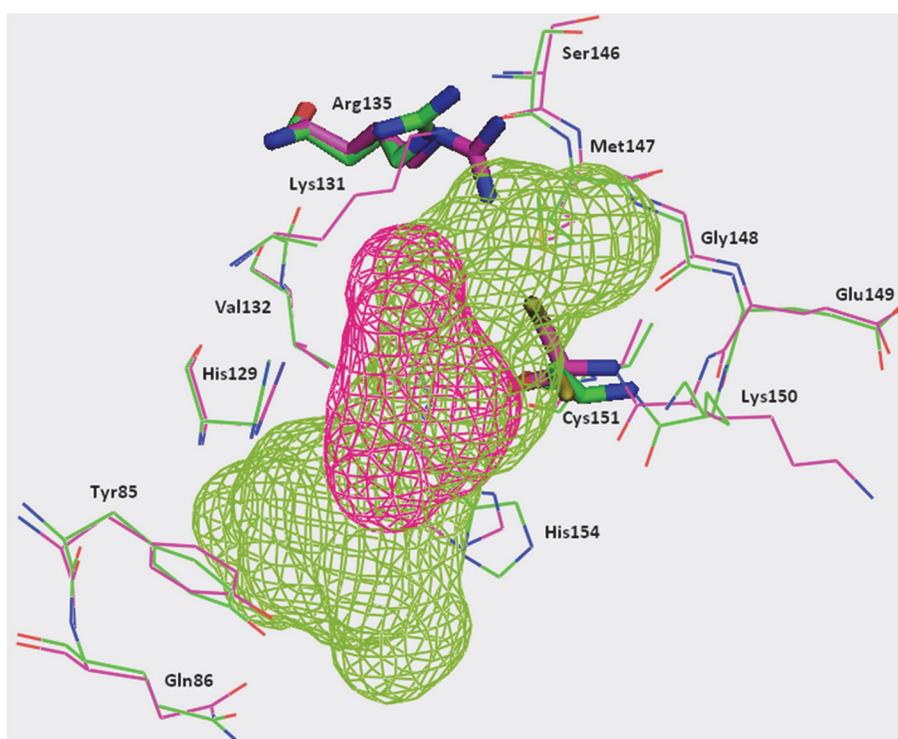


Figure 54. Cavités en contact avec le domaine BTB générées avec NRGsuite. En magenta : la structure *apo* (PDB code : 4CXI). En vert : structure *holo* (avec CDDO, PDB code : 4CXT).

Pour l'arrimage moléculaire, la forme énol a été choisie pour le premier électrophile et le lien covalent a été fixé à 1.8 Å comme pour CDDO. 1 500 conformations différentes ont été simulées mais tous les stéréoisomères n'ont pas pu être testés ; les résultats sont basés sur les liaisons hydrogène potentielles. Le maximum de degrés de liberté a été accordé dans chaque cas et la simulation ne prend pas en considération la différence de stabilité entre les conformations *s-trans* et *s-cis* de l'ester. Les structures de conformations

s-trans ont été éliminées (trop peu probables). Cet outil a été principalement utilisé pour déterminer les liaisons hydrogène potentielles entre le deuxième accepteur de Nazarov et le domaine BTB. Le deuxième accepteur de Nazarov du bis-électrophile **6-2a** est capable d'accepter des ponts hydrogène de plusieurs résidus du domaine BTB (figure 55, B) avec His¹²⁹, C) avec Arg¹³⁵ dans différentes régions du site actif. À chaque fois, le motif électrophile est stabilisé par une liaison hydrogène avec le résidu Gly¹⁴⁸. Par contre, cette interaction fait intervenir l'ester au lieu de l'énol comme pour le CDDO.³⁹ Cette simulation laisse penser qu'il y a des interactions disponibles pour un accepteur de liaison hydrogène à courte distance. Pourtant, aucun des analogues avec une chaîne fonctionnalisée n'a montré d'activité (voir 4.2.3).

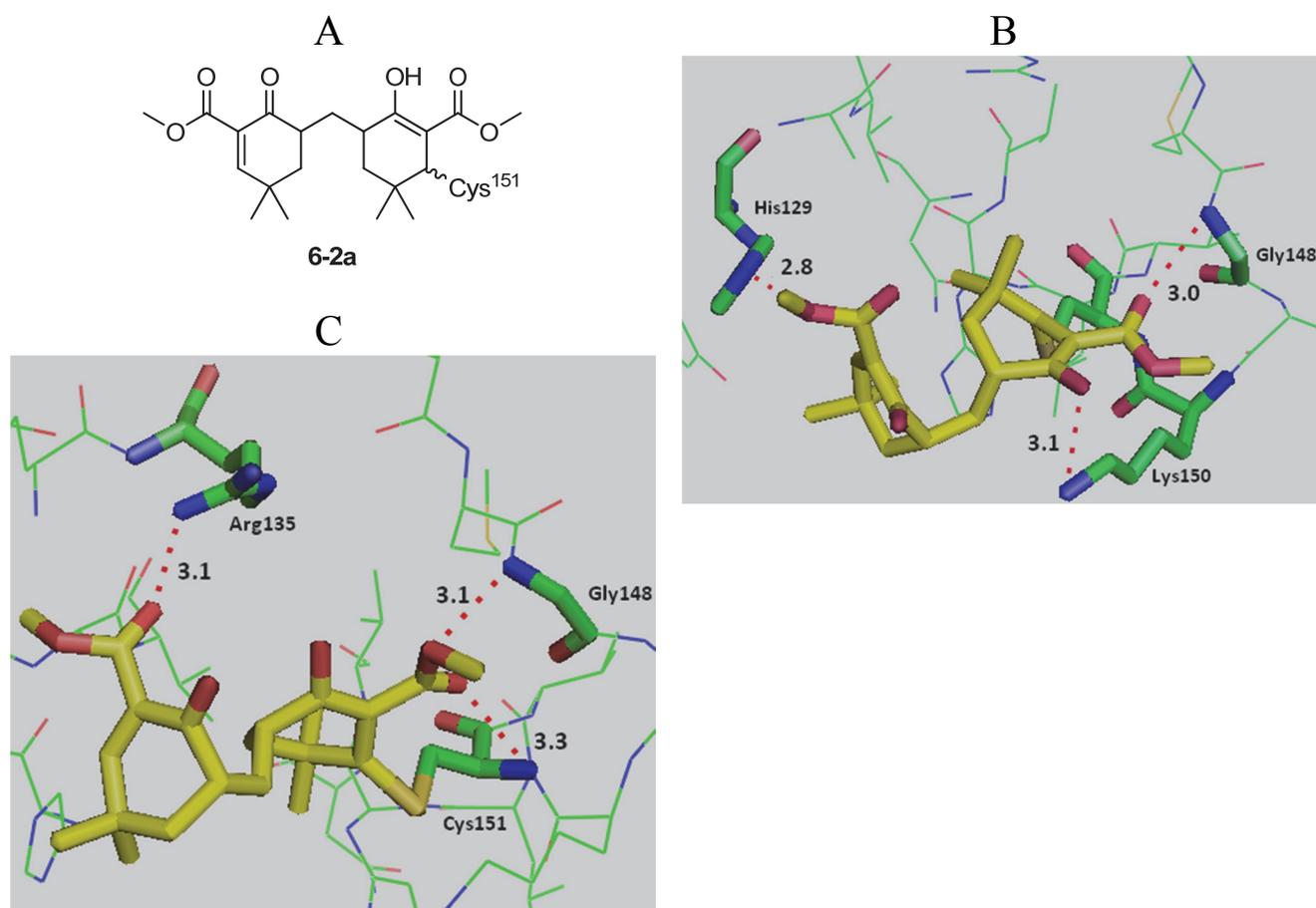


Figure 55. Arrimage moléculaire de **6-2a**. A) Structure du ligand arrimé. B, C) Résultats choisis.

L'arrimage moléculaire du bis-électrophile **6-2b** donne des résultats très différents (figure 56). Grâce à un « linker » plus long, il se retrouve plus profondément dans le site actif et a une surface de contact plus grande avec la protéine (figure 56). Le deuxième accepteur de Nazarov trouve de nouveaux partenaires

pour faire des liaisons hydrogène B) avec Lys¹³¹, C) avec His¹²⁹ et Arg¹³⁵. Par contre, dans ces conformations, le motif électrophile n'est pas toujours stabilisé par des ponts hydrogènes (figure 56 B). L'ester est plus facilement impliqué que l'énol formé après l'addition nucléophile comme précédemment ; la figure 56 C montre que le dicarbone peut aussi être stabilisé avec le résidu Lys¹⁵⁰ près du site de formation du lien covalent.

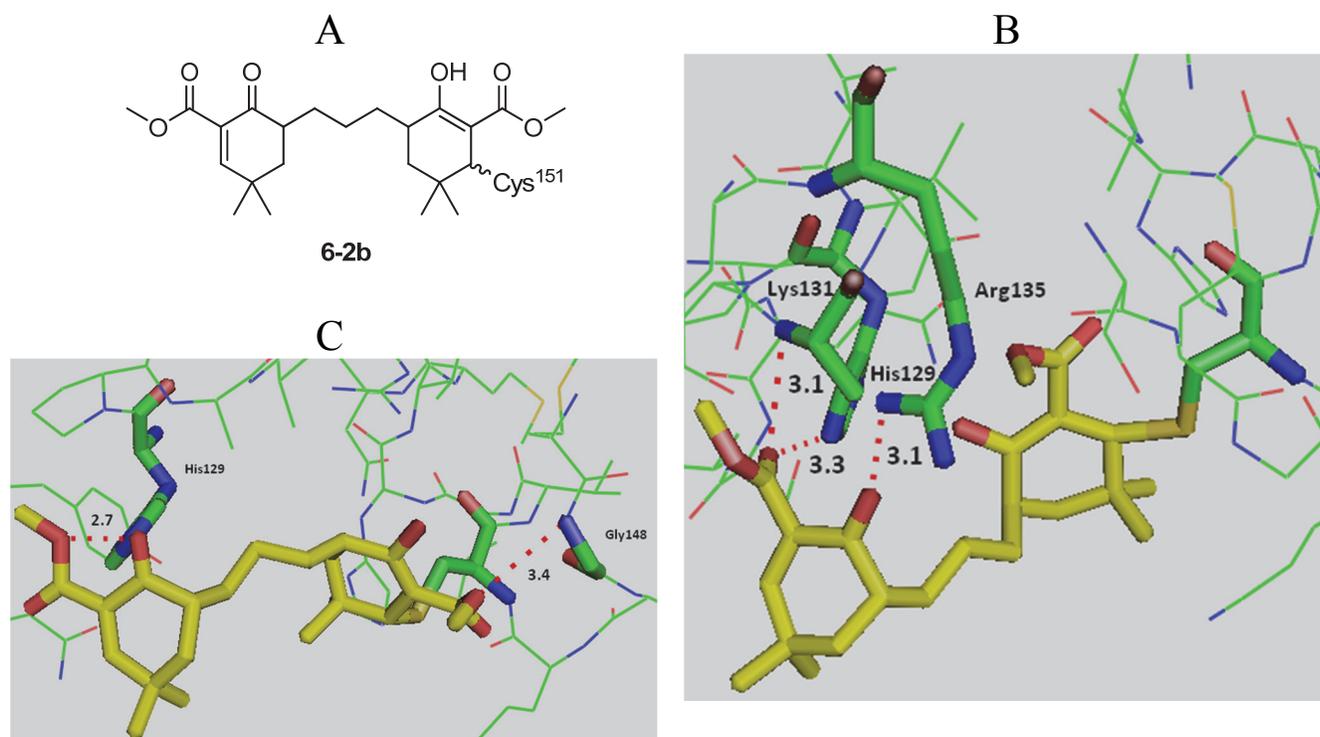


Figure 56. Arrimage moléculaire de **6-2b**. A) Structure du ligand arrimé. B, C) Résultats choisis.

Pour le bis-électrophile **6-2i**, notre meilleur composé, l'alcyne force la molécule à s'étendre dans le site actif (figure 57). On augmente donc encore un peu plus la surface de contact avec le domaine BTB. Le deuxième accepteur de Nazarov va trouver encore d'autres partenaires plus loin pour former des liaisons hydrogène (cf. B, D) avec Asn¹⁵⁷ et D) avec Tyr⁸⁵) ou déjà identifiés (cf. C) avec His¹²⁹). Ces conformations ne permettent pas toujours à l'électrophile de faire d'interactions spécifiques (figure 57 D). Dans la figure 57 C, le cétoester est stabilisé par le résidu Lys¹⁵⁰ de nouveau alors que dans la figure 57 D, c'est l'ester au bout du deuxième accepteur de Nazarov qui est bien positionné entre les résidus Asn¹⁵⁷ et Tyr⁸⁵.

A

B

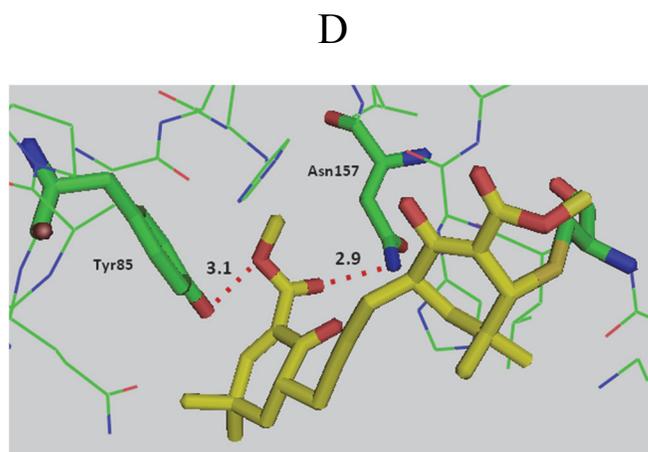
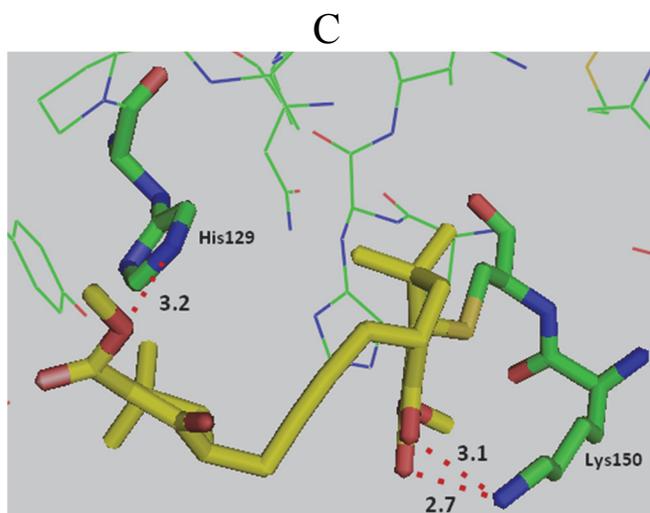
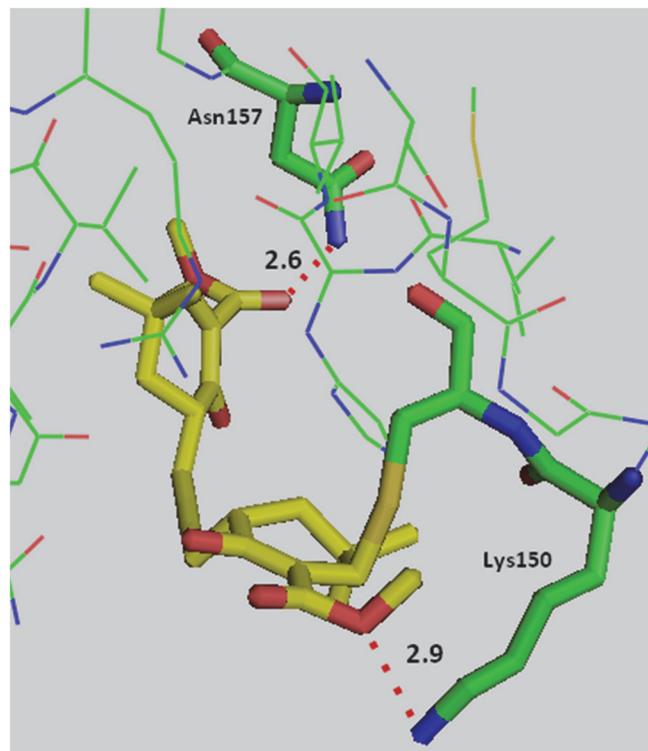
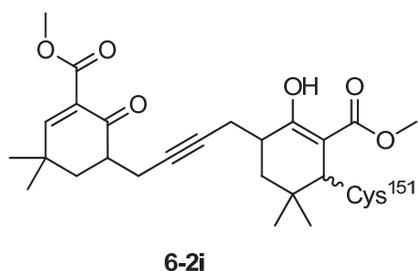


Figure 57. Arrimage moléculaire de **6-2i**. A) Structure du ligand arrimé. B, C, D) Résultats choisis.

Les résultats de l'arrimage moléculaire indiquent que si ces molécules ciblent le résidu Cys¹⁵¹ du domaine BTB, elles n'agiraient pas comme bis-électrophiles mais plutôt comme des monoélectrophiles portant un accepteur de liaison hydrogène, comme dans le cas du sulforaphane. Ce produit naturel, retrouvé en grande concentration dans les pousses de brocolis, cible ce domaine (voir 1.3.2). Il possède une fonction isothiocyanate qui sert d'électrophile et un sulfoxyde qui joue le rôle d'accepteur de pont hydrogène.

Mais, les analogues **4-17h-l** qui possèdent une chaîne latérale avec un accepteur de pont hydrogène ne sont pas actifs. S'il y a une interaction spécifique à faire dans ce site actif, elle est peut-être trop loin pour ces molécules. Il reste donc plusieurs chaînes latérales dans la région ouest à sonder (figure 58). R₁ pourra être un donneur ou accepteur de liaison hydrogène, ou encore un cycle aromatique pouvant former des interactions π . La synthèse des analogues **4-17n** et **4-17o** s'inscrit déjà dans cette optique.

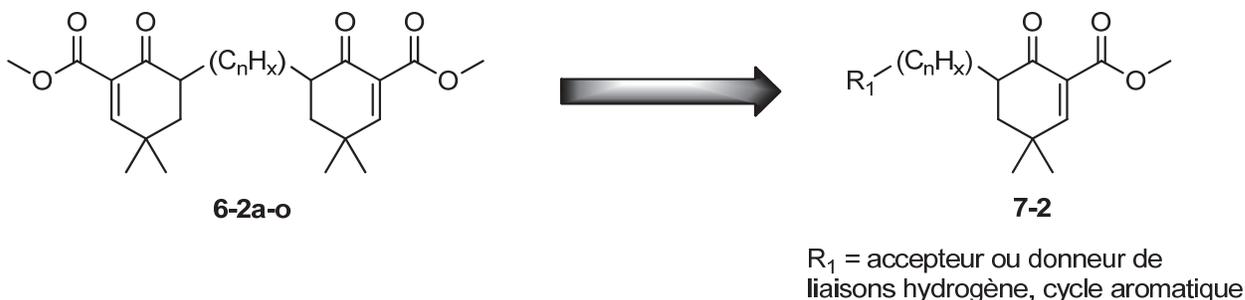


Figure 58. Nouvelles chaînes latérales.

Pour le motif électrophile, on a retrouvé la liaison hydrogène avec le résidu Gly¹⁴⁸ comme pour CDDO mais en utilisant l'ester au lieu de l'énol de la cétone issu de l'addition du résidu cystéine. Une autre interaction spécifique avec la chaîne latérale du résidu Lys¹⁵⁰ est ressortie souvent également. Ces différences changent peut-être l'orientation de l'électrophile et par conséquent les zones accessibles par l'autre partie de la molécule. De plus, le deuxième accepteur de Nazarov sur nos composés semble capable d'interagir avec le résidu His¹²⁹, comme le CDDO. Ce deuxième accepteur se trouve également à proximité d'autres résidus (cf. His¹⁵⁴, Tyr⁸⁵, Asn¹⁵⁷ et Gln⁸⁶) desquels on pourrait prendre avantage pour former des interactions spécifiques avec la cible. Cette stratégie a été validée par Huerta *et al.* qui utilise les système π des cycles aromatiques comme partenaires.²⁸ Le deuxième accepteur de Nazarov existe aussi sous sa forme diène (schéma 7.1). Ces deux tautomères pourraient participer à des interactions π dans notre cas.¹⁶¹

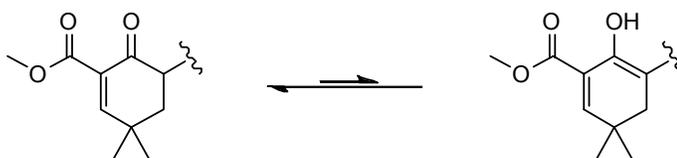


Schéma 7.1.

Bien qu'aucun résidu cystéine ne se trouve dans l'environnement du deuxième accepteur de Nazarov, la chaîne latérale du résidu Tyr⁸⁵ (phénol) pourrait jouer le rôle d'un deuxième nucléophile pour piéger cet accepteur de Nazarov. Cependant, les exemples d'électrophiles qui ciblent cet acide aminé de manière covalente en milieu biologique sont assez rares¹⁶² et le phénol doit normalement être activé grâce à un environnement propice. Dans le domaine BTB, le résidu Tyr⁸⁵ est à proximité de deux acides aminés basiques (cf. His¹²⁹ et His¹⁵⁴). Puisque la molécule est déjà attachée à la protéine par le résidu Cys¹⁵¹, les probabilités de rencontre entre l'électrophile et le nucléophile sont bien plus grandes, et il n'est pas farfelu de penser que ce résidu Tyr⁸⁵ piège le deuxième accepteur de Nazarov pour expliquer les augmentations d'activité observées. Les résidus tyrosine réactif peuvent être détectés par protéomie en utilisant des sondes de type sulfonyle fluoré.¹⁶³ Cette expérience pourrait éclaircir notre hypothèse.

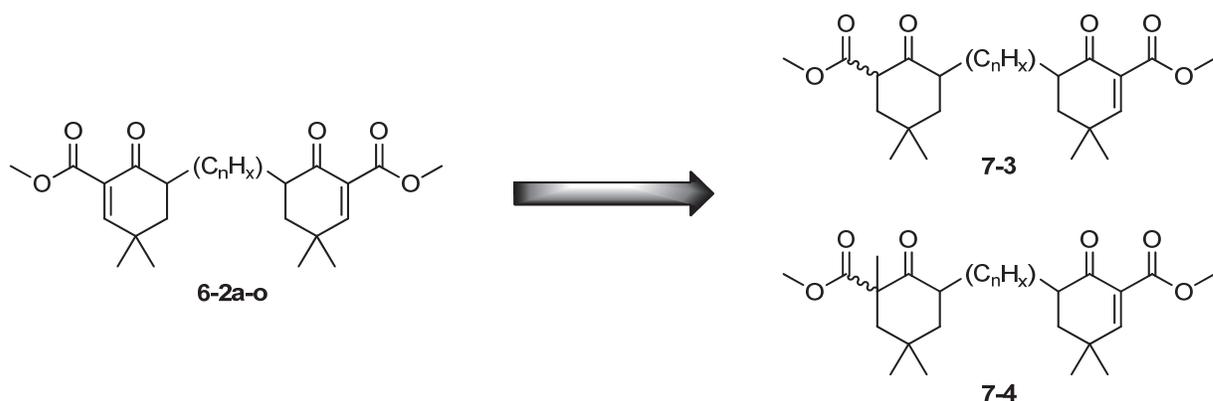


Figure 59. Désymétrisation des bis-électrophiles.

Remplacer le deuxième accepteur de Nazarov par le cétoester correspondant conjugué **7-3** ou méthylé **7-4** permettrait de connaître la nécessité d'avoir un électrophile (figure 59). Cette approche a été essayée pour l'analogue **6-2b** mais sans succès. Le contrôle de la mono-oxydation du dicétoester **6-1b** est difficile. Une autre approche synthétique devrait être envisagée.

7.3. La région IVR, une cible méconnue

7.3.1. Et si la région IVR était notre cible ?

La région IVR est l'autre domaine de Keap1 sensible aux électrophiles (voir 1.3.3). Donc, si un inducteur covalent de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE ne cible pas le résidu Cys¹⁵¹ du domaine BTB, il est vraisemblable qu'il cible la région IVR qui contient huit résidus cystéine parmi les plus réactifs de Keap1.^{38,63} En restant sur l'idée que nos composés bis-électrophiles peuvent piéger deux fonctions thiols, ce serait dans ce domaine. Kim *et al.* ont démontré que les deux électrophiles sont importants pour maintenir l'activité de 15Δ-PGJ₂ même s'il n'y a pas de preuve qu'ils agissent chacun en tant que tel.⁷⁷ La protéomique a montré que cette diénone fait des liens covalents avec les résidus Cys²⁷³ et Cys²⁸⁸ qui fixent chacun un équivalent de la molécule.⁶⁴ Mais, le piégeage d'un seul de ces acides aminés est nécessaire pour induire de l'activité, l'autre partenaire nucléophile pourrait être un autre des résidus cystéine présents. On a donc deux modes de liaison différents possibles selon le domaine ciblé (figure 60).

Toutes ces hypothèses sont intéressantes mais ne permettent pas de discriminer un domaine par rapport à un autre de manière certaine. La synthèse extensive de nouvelles molécules nous rapproche toujours un peu plus de la réponse mais demeure un processus qui procède par élimination (on écarte des hypothèses) sans réellement prouver une hypothèse en particulier, surtout tant qu'on n'a pas accès à plus d'informations structurales sur la région IVR. Or, la protéomique et les tests sur des mutants disponibles de Keap1 sont les méthodes de choix pour arriver à fournir les preuves convoitées. De nouvelles collaborations sont recherchées pour combler notre manque d'expertise dans ce domaine.

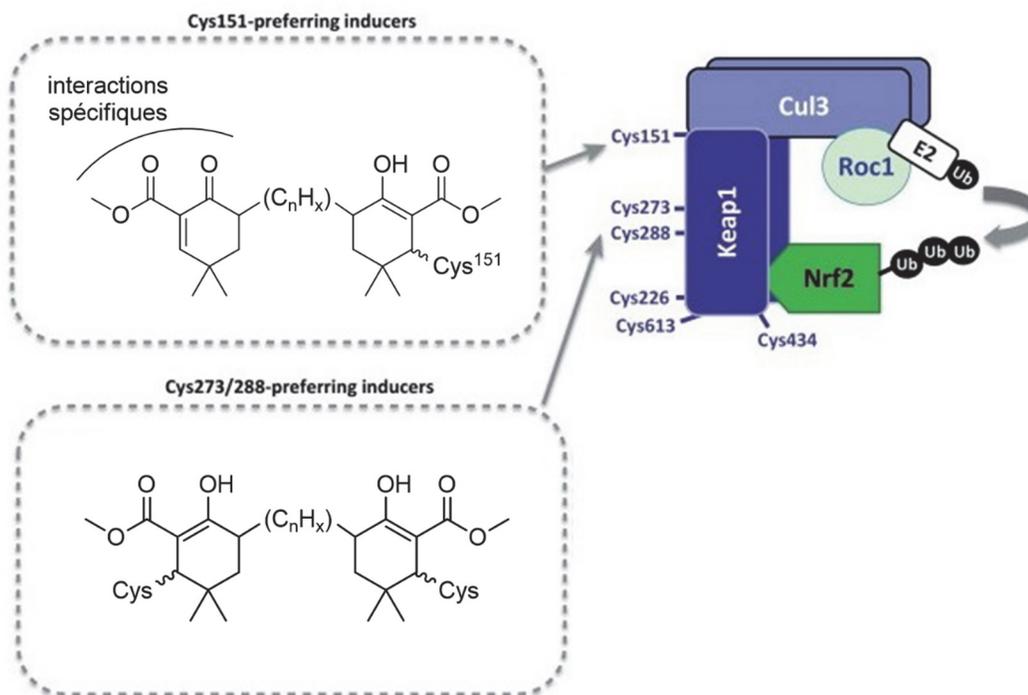
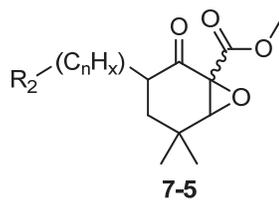


Figure 60. Mode de liaison possible selon le domaine ciblé.¹²

7.3.2. Spécificité de la région IVR

La région IVR possède la particularité d'avoir les résidus cystéine les plus réactifs de Keap1. D'après notre analyse au chapitre 1, si un inducteur ne peut pas former les interactions spécifiques non-covalentes au domaine BTB, il réagira d'abord avec la région IVR. La réversibilité de l'addition d'un résidu cystéine sur l'électrophile permettra éventuellement à ce dernier de rejoindre le domaine BTB. Donc, l'utilisation d'un motif électrophile irréversible devrait augmenter la spécificité vis-à-vis de la région IVR.

L'époxydation de l'accepteur de Nazarov est une stratégie qui va dans ce sens (voir 1.3.3).²⁷ Les composés **5-32** et **5-33** ont déjà été synthétisés et attendent d'être testés (voir 5.1.5). La région IVR pourrait être étudiée plus spécifiquement avec une série de composés de type époxyde portant un deuxième électrophile (R_2) très faiblement réversible ou irréversible (schéma 7.9). L'idée de l'isothiocyanate et l' α -méthyloxycétone est inspirée du sulforaphane et du Dex-Mes respectivement (voir 1.3.3), alors que l'acrylamide est un électrophile fréquemment utilisé pour piéger des résidus cystéine en milieu biologique.¹¹⁵ La comparaison des résultats biologiques de cette série avec ceux des accepteurs de Nazarov correspondants éclaircirait l'identification du site actif ciblé par ces derniers.



$R_2 = \text{électrophile}$

$R_2 = \text{accepteur ou donneur de ponts hydrogènes}$

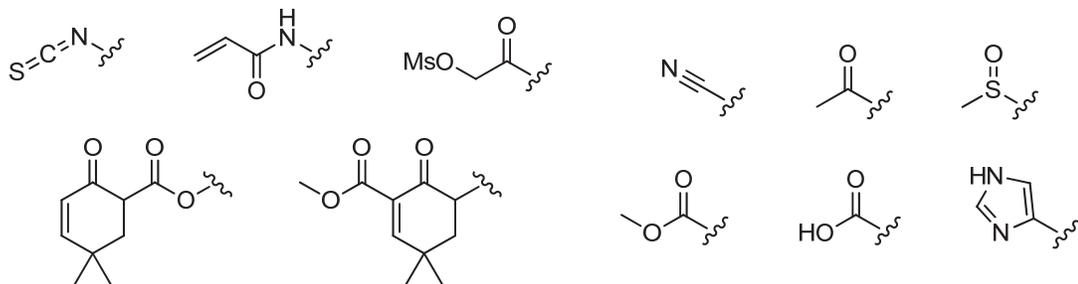


Figure 61. Déclinaison d'une série époxyde.

CHAPITRE 8 : PROJETS FUTURS

Nous pensons avoir en majeure partie répondu à nos hypothèses de départ. Une grande portion des résultats présentés dans les chapitres 3 à 7 a été publiée.¹⁶⁴ Mais, ils ont aussi soulevé beaucoup d'autres questions qui font encore avancer ce projet.

8.1. Synthèse de nouveaux électrophiles

Le premier volet de ce projet est la synthèse d'électrophiles pour tester la réponse de Keap1-Nrf2 vis-à-vis de stimuli différents. Les inducteurs covalents ont le choix entre deux domaines distincts où se lier. Par le design et l'optimisation de différents électrophiles, nous pensons pouvoir apporter de la spécificité et augmenter l'activité. Le motif 3,3-diméthyl-6-oxocyclohex-1-ènecarboxylate de méthyle est bon pour l'étude d'interactions secondaires non-covalentes. Par contre, peu de succès dans nos optimisations ont été obtenus pour le moment (voir chapitre 5).

Le nitrile, en remplacement de l'ester sur l'accepteur de Nazarov, a un effet qui nous échappe encore (voir 4.2.3 et 5.2.3). Le dioxolane dans la région sud est accusé d'apporter un manque de spécificité (voir 3.2). Pourtant, la présence des atomes d'oxygène aurait pu s'avérer bénéfique. Plusieurs publications suggèrent que la présence d'amine basique en position β par rapport au carbone électrophile accélère l'addition d'un résidu cystéine.¹¹⁵ À titre d'exemple, dans l'étude de bis(benzylidène)acétones et de curcuminoïdes en tant qu'inducteurs covalents de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE, Dinkova *et al.* ont trouvé que la présence d'un hydroxyle en position *ortho* augmentait l'activité de façon importante par activation (par pont-H ou par déprotonation) du thiol (schéma 8.1).⁸³

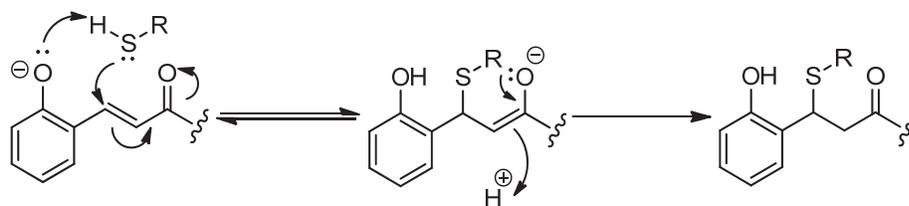


Schéma 8.1⁸³

L'application de cette stratégie est intéressante (figure 62). L'hétéroatome serait installé dans la région est sous la forme d'un amide **8-1**, d'un hydroxylamide **8-2**, d'un sulfonamide **8-3** ou d'un hétérocycle. Ce dernier serait soit attaché à un carbonyle (cf. **8-4** et **8-5**) pour garder un deuxième groupe électroattracteur, soit branché à la position α de l'énone (cf. **8-6** et **8-7**). Les groupements R sur l'azote seraient des protons ou des méthyles dans une première vague. L'atome d'azote pourra être déplacé (dans le cas de **8-5** et **8-7**, si la pyridine déprotone d'abord le thiol) ou changé pour un oxygène ou un soufre. Les cycles pourront être aromatiques et contenir plusieurs hétéroatomes. Les possibilités sont nombreuses. Dans la région sud, l'atome de carbone 4 pourrait également être remplacé par un atome d'azote (cf. **8-8**). La nature du groupement R sur cet azote permettrait de moduler les propriétés basiques de l'hétéroatome, l'encombrer du site électrophile et l'électrophilie de l'accepteur de Nazarov (qui est en fait un amide vinylogue sur cette molécule).

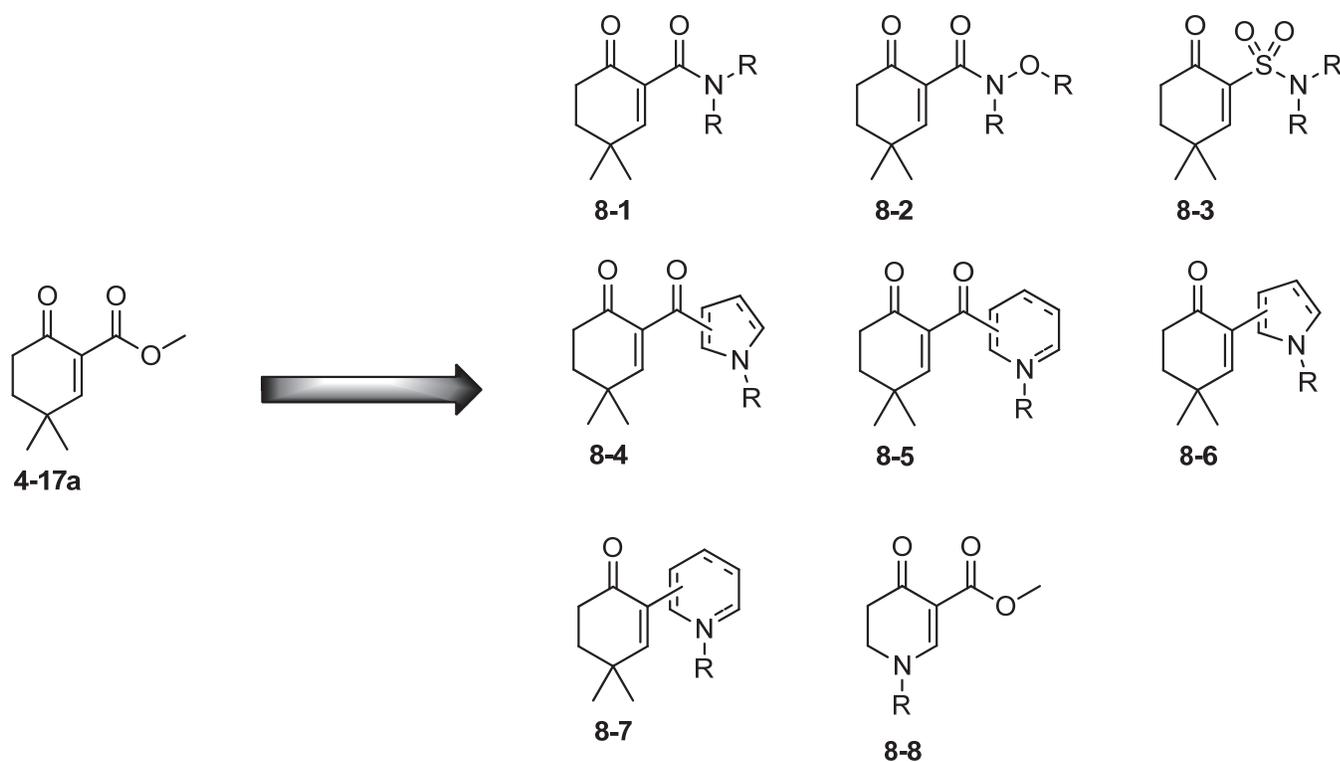


Figure 62. Déclinaison de nouveaux électrophiles.

8.2. Synthèse de nouveaux bis-électrophiles

Le deuxième volet de notre projet est la synthèse de bis-électrophiles. C'est la partie qui a apporté le plus de succès. Le rôle du deuxième accepteur de Nazarov est une grande interrogation, nous pensons avoir mis le doigt sur quelque chose et cherchons maintenant à en comprendre toutes les facettes. Dans ce but, plus de données seront nécessaires et donc de nouveaux bis-électrophiles. L'analogie avec la chaîne contenant l'alcène *cis* qui relierait les deux accepteurs de Nazarov manque cruellement dans notre collection. De plus, nous voulons associer des électrophiles différents (figure 63) sur la même molécule (figure 64). Un mélange d'acrylamide, de petits électrophiles déjà connus pour la cible (cf. thioisocyanate, α -cétomésylate) et de motifs chers au projet (cf. 5,5-diméthyl-2-oxocyclohex-3-ènedicarboxylate, α -tétralone) serait le plus cohérent.

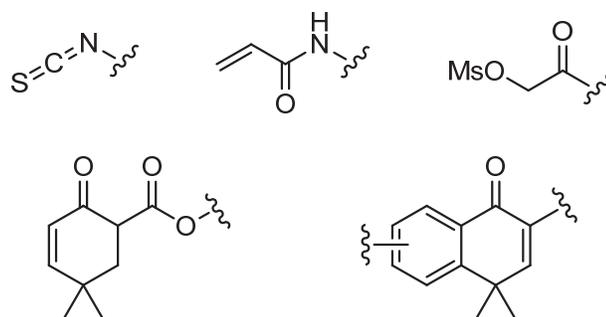


Figure 63. Choix de deuxième électrophile.

R₁₋₄ représentent les deuxièmes électrophiles choisis. Les molécules **6-7** et **6-8** ont déjà été synthétisées et seront bientôt testées. Elles devraient apporter des réponses sur l'orientation que prend le premier électrophile dans le site actif et déterminer si une série illustrée par la forme **8-9** est à envisager. Le tétrazole **8-10** a été imaginé pour tirer profit de l'accepteur de Nazarov **4-17f** avec une chaîne nitrile. L'utilisation de la chimie « click » devrait permettre la synthèse rapide de ces analogues. Puisque les bis-électrophiles **6-2h** et **6-2i** (chaînes avec alcène et alcyne) sont les meilleurs actuellement, les séries illustrées par les formes **8-11** et **8-12** tombent sous le sens. Elles devraient positionner R₃ et R₄ dans les zones à sonder avec ces nouveaux pièges à résidu cystéine. La comparaison des résultats sera aussi plus directe.

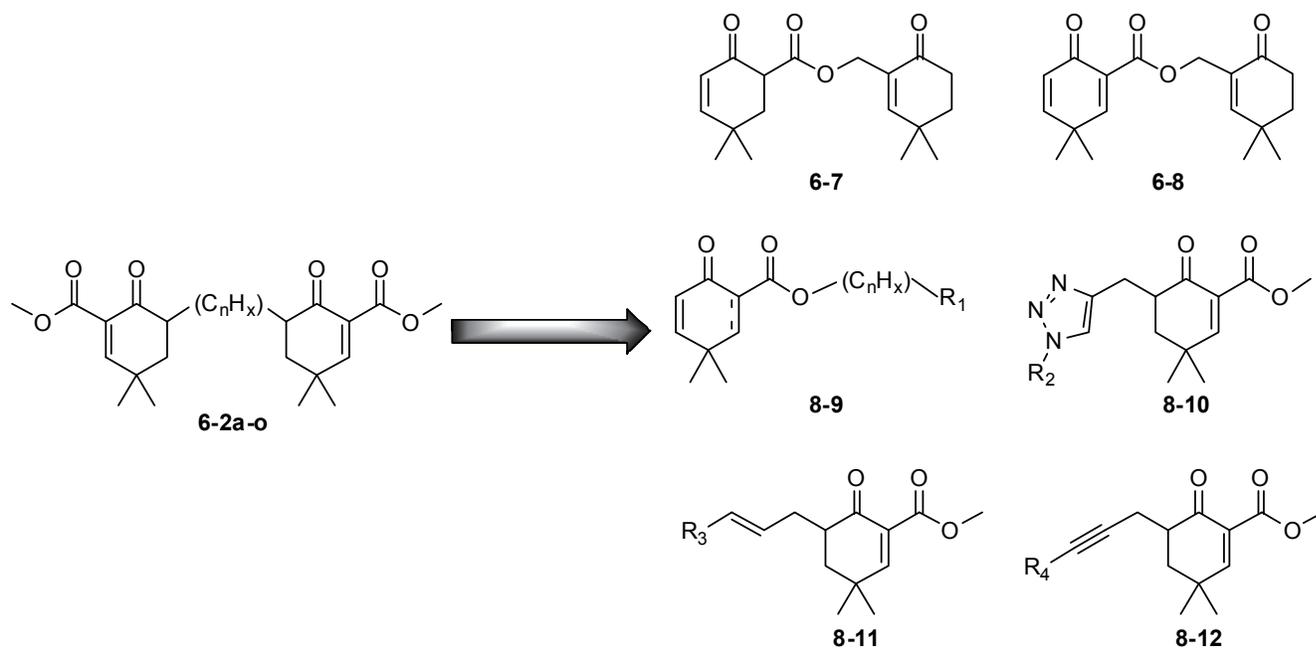


Figure 64. Déclinaison de nouveaux bis-électrophiles.

Cette stratégie nécessite de développer des nouvelles procédures de synthèse et quelques efforts ont déjà été réalisés dans ce sens. La formation du triazole et alkylation de l'azote peuvent être réalisées *one-pot*.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ En partant du dicarbonylé **6-3** ne contenant ni électrophile ni proton acide, un mélange complexe contenant le produit **8-13** (confirmé par spectrométrie de masse) a été obtenu après oxydation (schéma 8.2).

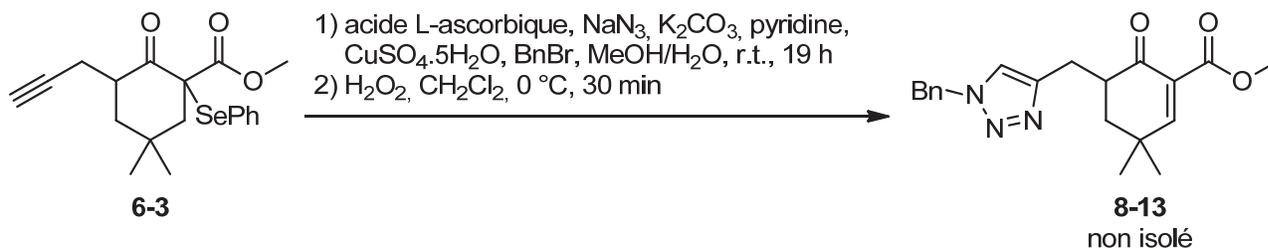


Schéma 8.2

En parcourant la littérature à nouveau, nous avons trouvé des exemples avec un accepteur de Nazarov.^{168,169} À partir de l'analogue **4-17f**, quelques conditions ont été testées (schéma 7.4 et tableau 5). Avec la première procédure (entrée 1), aucune conversion n'a été observé et le produit de départ a été

recupéré intact. Nous avons changé l'acide L-ascorbique pour l'ascorbate de sodium et la réagir plus longtemps, mais en vain (entrée 2). Finalement, le système de solvant a été changé pour *t*-BuOH/H₂O et la température a été augmentée à 65 °C pour obtenir un rendement de 5%. À cause de l'instabilité de l'accepteur de Nazarov, les réactions longues à haute température sont généralement à éviter. Dans cette réaction test, la conversion était incomplète. De plus, la masse obtenue après traitement traduisait une perte de matière, probablement par dégradation ou dans la phase aqueuse. Il y a sûrement de la place pour optimiser. Par contre, la synthèse du composé de départ **4-17f** n'est pas optimale pour générer une quantité de substrat nécessaire à une série de plusieurs analogues (voir 4.2) et devra être revue (par exemple, utiliser une version silylée de l'alcyne pour éviter les problèmes de déprotonation rencontrés).¹⁶⁵

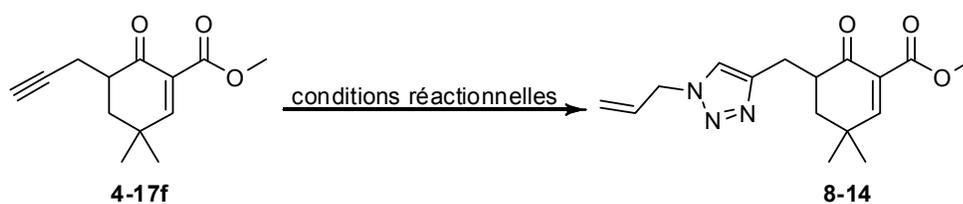


Schéma 8.3

Tableau 5. Conditions réactionnelles du schéma 7.4.

Entrées	Conditions réactionnelles	Résultats
1	4-17f , bromure d'allyle, NaN ₃ , acide L-ascorbique, CuSO ₄ ·5H ₂ O DMF, 50 °C, 6 h	100% de produit de départ 4-17f récupéré
2	4-17f , bromure d'allyle, NaN ₃ , Na-ascorbate, CuSO ₄ ·5H ₂ O DMF, 50 °C, 22 h	100% de produit de départ 4-17f récupéré
3	4-17f , bromure d'allyle, NaN ₃ , Na-ascorbate, CuSO ₄ ·5H ₂ O <i>t</i> -BuOH/H ₂ O, 65 °C, 21 h	Rendement 5%

Les bis-électrophiles de la forme **8-11** ont été pensés pour être accessibles par couplage au palladium (schéma 8.4). L'hydroboration et le couplage peuvent être réalisés dans le même pot réactionnel.¹⁷⁰ Mais, dans le cas de l'accepteur de Nazarov **4-17f**, les conditions d'hydroboration testées ont mené à majoritairement à la réduction de l'alcène. L'utilisation d'un borane plus pauvre en électron (HBBR₂), qui devrait être moins réactif vis-à-vis l'alcène appauvri de l'accepteur de Nazarov, a lui aussi mené à la réduction de l'alcène.¹⁷¹

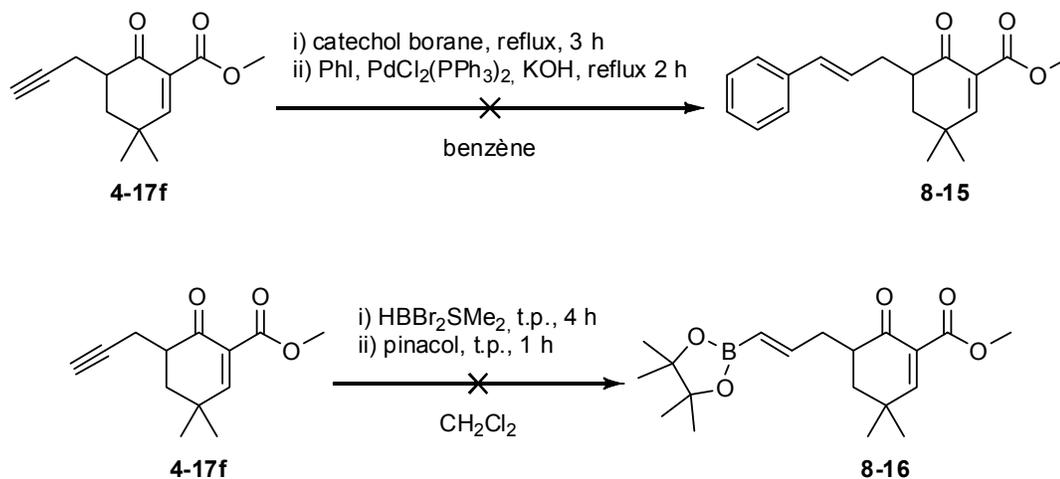


Schéma 8.4

Nous avons imaginé que l'accepteur de Nazarov pouvait être protégé via son époxyde (schéma 8.5). L'alcène **4-17a** pourrait être recouvert par désoxygénation de l'époxyde **5-32**.¹⁷² Malheureusement, l'hydroboration sur l'alcyne **5-33** n'a toujours pas donné le vinyl-borane **8-17** désiré. L'époxyde également a été réduit. Peut-être faut-il attaquer ce problème différemment en alkylant la cétone avec une chaîne portant déjà le vinylborane pour mener à **8-16** directement.¹⁷³

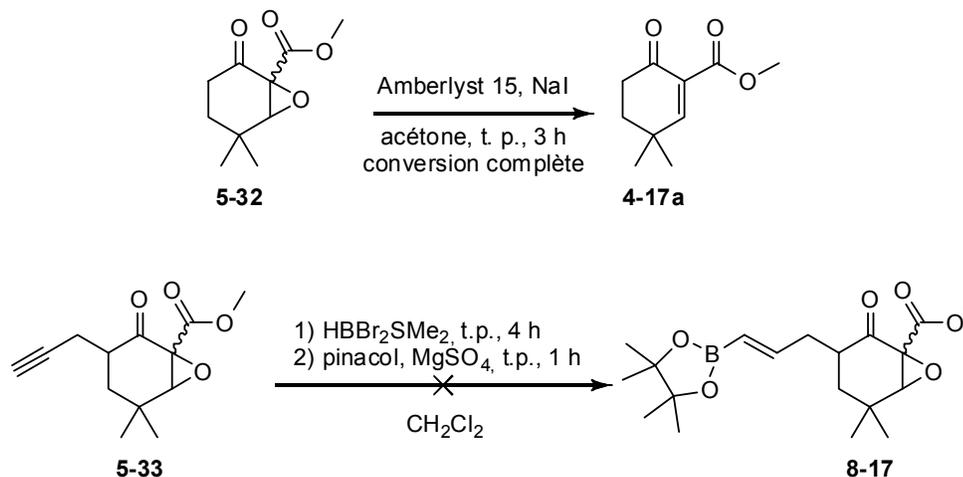
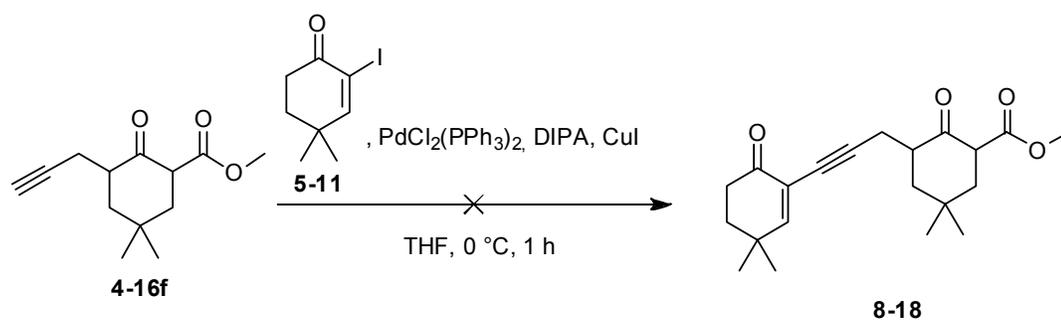


Schéma 8.5

Pour accéder aux composés de la forme **8-12**, un couplage de Sonogashira serait l'approche la plus directe. Les tentatives de couplage de l'iodure **5-11** à l'alcyne **4-16h** ont été sans succès (schéma 8.6).¹⁷⁴

La masse du produit désiré **8-18** a bien été observée mais le cétoester rend la purification trop approximative (voir 3.1.1). Le produit brut a été oxydé avec la DDQ mais rien d'exploitable n'a été retrouvé. Cette transformation est assurément un défi : le dicarbonyle présent sur **4-16f** peut se coordonner au complexe métallique (comme le ligand acac par exemple) et réduire son efficacité. Ceci reste un essai isolé et le couplage serait à investiguer davantage, probablement avec des substrats dont la portion dicarbonyle est non énolisable (cf. **4-17f** et **5-33**).



Cette stratégie de couplage pour obtenir les composés des formes **8-17** et **8-18** est attrayante pour son côté direct mais la recherche des meilleures conditions s'annonce ardue. De plus, il est difficile de savoir si elles seront assez polyvalentes pour nous donner accès aux analogues nécessaires. Une approche plus sûre, mais qui ajoutera des étapes, serait de construire séparément les chaînes latérales avec les fonctions désirées R₃ et R₄ en conservant un groupe partant (GP) (figure 65). Les composés **8-19** et **8-20** serviraient d'électrophile pour l'alkylation du dianion du cétoester **4-15** comme dans l'approche habituelle. Un choix stratégique sera à faire en gardant à l'esprit qu'à la fin, notre objectif est d'avoir le maximum d'analogues à tester.

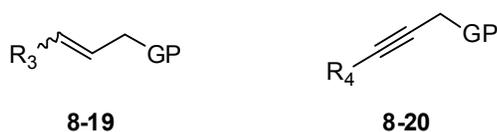


Figure 65. Chaînes latérales à construire.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet a commencé dans les laboratoires des professeurs André Cantin et Martin V. Richter à la faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke. Ils ont démontré que la consommation de pousses de brocolis, particulièrement riche en sulforaphane, augmente nettement le glutathion des lymphocytes. De plus, 15Δ -PGJ₂, une prostaglandine agoniste de PPAR γ , prévient la mortalité dans un modèle murin d'influenza.¹⁷⁵ Ces deux composés sont des inducteurs connus de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE. Un intérêt dans l'étude de la protection offerte par ce mécanisme dans leurs projets respectifs est né. Par conséquent, le projet Nouveaux inducteurs de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE a démarré.

Dans une étude préliminaire, des dérivés s'apparentant aux prostaglandines ont été synthétisés (*rappports de stage* de Talbot A. et St-Pierre G., Université de Sherbrooke, **2010**). Cependant, les composés comportant ce squelette demeuraient limitant en termes d'efficacité de synthèse. Aucune molécule capable de piéger deux cystéines n'avait été synthétisée non plus.

Nous sommes donc partis avec cet objectif de mettre en évidence un électrophile qui nous permettrait de faire une librairie de composés la plus large possible avec aussi la possibilité d'accrocher un électrophile supplémentaire sur le même dérivé (chapitre 2). La cétone **3-3** a été choisie comme point de départ mais a rapidement montré ses limites à cause du profil toxicologique des analogues de la série dioxolane (chapitre 3). Nous avons vite réagi pour aller vers la série diméthyle qui a résolu ce problème (chapitre 4). L'accepteur de Nazarov **4-17a** s'est révélé être un électrophile de choix pour l'étude de notre cible ; notre premier objectif a donc été rempli. Il a permis d'étudier la région ouest en ajoutant des chaînes entièrement carbonée ou différentes fonctions à courte distance. Dans le chapitre 5, le motif électrophile a été étudié en détails. Les groupements électroattracteurs ont été changés ou retirés, la position de l'atome électrophile a été déplacée et la taille du cycle a été modifiée. Peu de succès ont été obtenus dans cette optimisation. Néanmoins beaucoup d'informations en sont ressorties sur la sensibilité de la cible vis-à-vis des paramètres étudiés.

L'accepteur de Nazarov **4-17a** a permis de synthétiser efficacement des bis-électrophiles et remplir notre deuxième objectif (chapitre 6). Les plus intéressants de nos analogues se retrouvent dans cette série.

L'ajout d'un deuxième électrophile augmente significativement l'activité et la position relative des deux accepteurs de Nazarov est un facteur important pour moduler l'activité. Les résultats biologiques dans l'essai luciférase sont confirmés par le deuxième test (induction de NQO1) dans le chapitre 7. Ils amènent aussi beaucoup de questions sur le rôle joué par le deuxième accepteur de Nazarov. Nous avons tenté d'apporter un premier élément de réponse par arrimage moléculaire dans le domaine BTB. Pour se rapprocher de la solution, nous nous tournons vers la synthèse de nouveaux motifs électrophiles, de nouvelles hyperformes pour connecter deux pièges à résidu cystéine et de nouvelles collaborations pour réaliser les expériences en protéomique et utilisant les mutants de Keap1.

Un chemin important a été parcouru depuis le début de ce projet qui a culminé par la publication de notre premier article sur cette cible.¹⁶⁴ Il nous permet de nous positionner dans un domaine concurrentiel. Notre vision et notre approche de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE se démarque de manière importante par l'étude systématique de molécules avec plus d'un électrophile. Nous sommes confiants dans la continuation prospère de ce projet.

RÉFÉRENCES ET NOTES

- (1) Rendic, S.; Peter Guengerich, F. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 787–814.
- (2) Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 118.
- (3) Tong, K. I.; Katoh, Y.; Kusunoki, H.; Itoh, K.; Tanaka, T.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 2887–2900.
- (4) Moi, P.; Chan, K.; Asunis, I.; Cao, A.; Kan, Y. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 9926–9930.
- (5) Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; Yamamoto, M.; Nabeshima, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 313–322.
- (6) Hayes, J. D.; Dinkova-Kostova, A. T. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 199–218.
- (7) Nakamura, H.; Hoshino, Y.; Okuyama, H.; Matsuo, Y.; Yodoi, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 303–309.
- (8) Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 76–86.
- (9) Schmidt, E. E. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 632–638.
- (10) Sies, H. In *Oxidative Stress*; Elsevier, 1985; pp 1–8.
- (11) Sies, H. *Redox Biol.* **2015**, *4*, 180–183.
- (12) Suzuki, T.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 340–346.
- (13) O’Connell, M. A.; Hayes, J. D. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 687–689.
- (14) Tebay, L. E.; Robertson, H.; Durant, S. T.; Vitale, S. R.; Penning, T. M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Hayes, J. D. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *88*, 108–146.
- (15) Novo, E.; Parola, M. *Fibrogenesis Tissue Repair* **2008**, *1*, 5.
- (16) Ristow, M.; Schmeisser, S. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 327–336.
- (17) Harman, D. *J. Gerontol.* **1956**, *11*, 298–300.
- (18) Harder, B.; Jiang, T.; Wu, T.; Tao, S.; de la Vega, M. R.; Tian, W.; Chapman, E.; Zhang, D. D. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 680–686.
- (19) Hayes, J. D.; McMahan, M. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 732–734.
- (20) Steel, R.; Cowan, J.; Payerne, E.; O’Connell, M. A.; Searcey, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 407–410.
- (21) Magesh, S.; Chen, Y.; Hu, L. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 687–726.

- (22) Kensler, T. W.; Chen, J.-G.; Egner, P. A.; Fahey, J. W.; Jacobson, L. P.; Stephenson, K. K.; Ye, L.; Coady, J. L.; Wang, J.-B.; Wu, Y.; Sun, Y.; Zhang, Q.-N.; Zhang, B.-C.; Zhu, Y.-R.; Qian, G.-S.; Carmella, S. G.; Hecht, S. S.; Benning, L.; Gange, S. J.; Groopman, J. D.; Talalay, P. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14*, 2605–2613.
- (23) Brigelius-Flohé, R.; Banning, A. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 775–787.
- (24) Wilson, A. J.; Kerns, J. K.; Callahan, J. F.; Moody, C. J. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7463–7476.
- (25) Burow, M.; Bergner, A.; Gershenzon, J.; Wittstock, U. *Plant Mol. Biol.* **2007**, *63*, 49–61.
- (26) Dinkova-Kostova, A. T.; Liby, K. T.; Stephenson, K. K.; Holtzclaw, W. D.; Gao, X.; Suh, N.; Williams, C.; Risingsong, R.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Sporn, M. B.; Talalay, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 4584–4589.
- (27) Wong, M. H. L.; Bryan, H. K.; Copple, I. M.; Jenkins, R. E.; Chiu, P. H.; Bibby, J.; Berry, N. G.; Kitteringham, N. R.; Goldring, C. E.; O'Neill, P. M.; Park, B. K. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2396–2409.
- (28) Huerta, C.; Jiang, X.; Trevino, I.; Bender, C. F.; Ferguson, D. A.; Probst, B.; Swinger, K. K.; Stoll, V. S.; Thomas, P. J.; Dulubova, I.; Visnick, M.; Wigley, W. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**.
- (29) Venci, J. V.; Gandhi, M. A. *Ann. Pharmacother.* **2013**, *47*, 1697–1702.
- (30) Ellrichmann, G.; Petrasch-Parwez, E.; Lee, D.-H.; Reick, C.; Arning, L.; Saft, C.; Gold, R.; Linker, R. A. *PLoS One* **2011**, *6*, e16172.
- (31) Okawa, H.; Motohashi, H.; Kobayashi, A.; Aburatani, H.; Kensler, T. W.; Yamamoto, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *339*, 79–88.
- (32) Padmanabhan, B.; Tong, K. I.; Ohta, T.; Nakamura, Y.; Scharlock, M.; Ohtsuji, M.; Kang, M.-I.; Kobayashi, A.; Yokoyama, S.; Yamamoto, M. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 689–700.
- (33) Motohashi, H.; Katsuoka, F.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 6379–6384.
- (34) Sun, Z.; Zhang, S.; Chan, J. Y.; Zhang, D. D. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 6334–6349.
- (35) Adams, J.; Kelso, R.; Cooley, L. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 17–24.
- (36) Kobayashi, A.; Kang, M.-I.; Okawa, H.; Ohtsuji, M.; Zenke, Y.; Chiba, T.; Igarashi, K.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 7130–7139.
- (37) Osburn, W.; Kensler, T. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2008**, *659*, 31–39.
- (38) Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Cole, R. N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M.; Talalay, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11908–11913.

- (39) Cleasby, A.; Yon, J.; Day, P. J.; Richardson, C.; Tickle, I. J.; Williams, P. a.; Callahan, J. F.; Carr, R.; Concha, N.; Kerns, J. K.; Qi, H.; Sweitzer, T.; Ward, P.; Davies, T. G. *PLoS One* **2014**, *9*, e98896.
- (40) Zipper, L. M.; Mulcahy, R. T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36544–36552.
- (41) Tong, K. I.; Padmanabhan, B.; Kobayashi, A.; Shang, C.; Hirotsu, Y.; Yokoyama, S.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 7511–7521.
- (42) Baird, L.; Llères, D.; Swift, S.; Dinkova-Kostova, A. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 15259–15264.
- (43) Zhang, D. D.; Hannink, M. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 8137–8151.
- (44) Huang, H.-C.; Nguyen, T.; Pickett, C. B. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 42769–42774.
- (45) Sheng, C.; Dong, G.; Miao, Z.; Zhang, W.; Wang, W. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8238–8259.
- (46) Blundell, T. L.; Burke, D. F.; Chirgadze, D.; Dhanaraj, V.; Hyvönen, M.; Innis, C. A.; Parisini, E.; Pellegrini, L.; Sayed, M.; Sibanda, B. L. *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 955–959.
- (47) Moreira, I. S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Proteins* **2007**, *68*, 803–812.
- (48) Jiang, Z.; Lu, M.; Xu, L.; Yang, T.; Xi, M.; Xu, X.; Guo, X.; Zhang, X.; You, Q.; Sun, H. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2736–2745.
- (49) Lo, S.-C.; Li, X.; Henzl, M. T.; Beamer, L. J.; Hannink, M. *EMBO J.* **2006**, *25*, 3605–3617.
- (50) Hörer, S.; Reinert, D.; Ostmann, K.; Hoevens, Y.; Nar, H. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2013**, *69*, 592–596.
- (51) Fukutomi, T.; Takagi, K.; Mizushima, T.; Ohuchi, N.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 832–846.
- (52) Li, X.; Zhang, D.; Hannink, M.; Beamer, L. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 54750–54758.
- (53) Beamer, L. J.; Li, X.; Bottoms, C. A.; Hannink, M. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 1335–1342.
- (54) Tong, K. I.; Padmanabhan, B.; Kobayashi, A.; Shang, C.; Hirotsu, Y.; Yokoyama, S.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 7511–7521.
- (55) Hancock, R.; Schaap, M.; Pfister, H.; Wells, G. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3553–3557.
- (56) Hu, L.; Magesh, S.; Chen, L.; Wang, L.; Lewis, T. A.; Chen, Y.; Khodier, C.; Inoyama, D.; Beamer, L. J.; Emge, T. J.; Shen, J.; Kerrigan, J. E.; Kong, A.-N. T.; Dandapani, S.; Palmer, M.; Schreiber, S. L.; Munoz, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3039–3043.
- (57) Jnoff, E.; Albrecht, C.; Barker, J. J.; Barker, O.; Beaumont, E.; Bromidge, S.; Brookfield, F.;

- Brooks, M.; Bubert, C.; Ceska, T.; Corden, V.; Dawson, G.; Duclos, S.; Fryatt, T.; Genicot, C.; Jigorel, E.; Kwong, J.; Maghames, R.; Mushi, I.; Pike, R.; Sands, Z. a; Smith, M. a; Stimson, C. C.; Courade, J.-P. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 699–705.
- (58) Marcotte, D.; Zeng, W.; Hus, J. C.; McKenzie, A.; Hession, C.; Jin, P.; Bergeron, C.; Lugovskoy, A.; Enyedy, I.; Cuervo, H.; Wang, D.; Atmanene, C.; Roecklin, D.; Vecchi, M.; Vivat, V.; Kraemer, J.; Winkler, D.; Hong, V.; Chao, J.; Lukashev, M.; Silvian, L. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 4011–4019.
- (59) Jiang, Z.-Y.; Xu, L.; Lu, M.-C.; Chen, Z.-Y.; Yuan, Z.-W.; Xu, X.-L.; Guo, X.-K.; Zhang, X.-J.; Sun, H.-P.; You, Q.-D. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6410–6421.
- (60) Zhuang, C.; Narayanapillai, S.; Zhang, W.; Sham, Y. Y.; Xing, C. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1121–1126.
- (61) Arafa, R.; Ghorab, M.; Alsaïd, M.; Higgins, M.; Dinkova-Kostova, A.; Shahat, A.; Elghazawy, N. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *Volume 10*, 2515–2524.
- (62) Kobayashi, A.; Kang, M.-I.; Watai, Y.; Tong, K. I.; Shibata, T.; Uchida, K.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 221–229.
- (63) Saito, R.; Suzuki, T.; Hiramoto, K.; Asami, S.; Naganuma, E.; Suda, H.; Iso, T.; Yamamoto, H.; Morita, M.; Furusawa, Y.; Negishi, T.; Ichinose, M.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *36*, 271–284.
- (64) Kobayashi, M.; Li, L.; Iwamoto, N.; Nakajima-Takagi, Y.; Kaneko, H.; Nakayama, Y.; Eguchi, M.; Wada, Y.; Kumagai, Y.; Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 493–502.
- (65) McMahon, M.; Lamont, D. J.; Beattie, K. A.; Hayes, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 18838–18843.
- (66) Shinkai, Y.; Abiko, Y.; Ida, T.; Miura, T.; Kakehashi, H.; Ishii, I.; Nishida, M.; Sawa, T.; Akaike, T.; Kumagai, Y. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 838–847.
- (67) Takaya, K.; Suzuki, T.; Motohashi, H.; Onodera, K.; Satomi, S.; Kensler, T. W.; Yamamoto, M. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 817–827.
- (68) Luo, Y.; Eggler, A. L.; Liu, D.; Liu, G.; Mesecar, A. D.; Breemen, R. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 2226–2232.
- (69) Eggler, A. L.; Liu, G.; Pezzuto, J. M.; van Breemen, R. B.; Mesecar, A. D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 10070–10075.
- (70) Satoh, T.; McKercher, S. R.; Lipton, S. A. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *66*, 45–57.

- (71) Honda, T.; Yoshizawa, H.; Sundararajan, C.; David, E.; Lajoie, M. J.; Favaloro, F. G.; Janosik, T.; Su, X.; Honda, Y.; Roebuck, B. D.; Gribble, G. W. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1762–1778.
- (72) Zheng, S.; Santosh Laxmi, Y. R.; David, E.; Dinkova-Kostova, A. T.; Shiavoni, K. H.; Ren, Y.; Zheng, Y.; Trevino, I.; Bumeister, R.; Ojima, I.; Wigley, W. C.; Bliska, J. B.; Mierke, D. F.; Honda, T. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4837–4846.
- (73) Li, W.; Zheng, S.; Higgins, M.; Morra, R. P.; Mendis, A. T.; Chien, C.-W.; Ojima, I.; Mierke, D. F.; Dinkova-Kostova, A. T.; Honda, T. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4738–4748.
- (74) Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P.; Sharkey, J.; Zhang, Y.; Holtzclaw, W. D.; Wang, X. J.; David, E.; Schiavoni, K. H.; Finlayson, S.; Mierke, D. F.; Honda, T. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 33747–33755.
- (75) Saito, A.; Higgins, M.; Zheng, S.; Li, W.; Ojima, I.; Dinkova-Kostova, A. T.; Honda, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5540–5543.
- (76) Wu, J. H.; Miao, W.; Hu, L. G.; Batist, G. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75*, 475–480.
- (77) Kim, K.; Park, J.-M.; Kim, N.-J.; Kim, S.; Moon, H.; An, H.; Lee, J.; Park, H.; Surh, Y.; Suh, Y.-G. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1900–1904.
- (78) van Aalten, D. M. .; DiRusso, C. C.; Knudsen, J.; Wierenga, R. K. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5167–5177.
- (79) Zhuang, M.; Calabrese, M. F.; Liu, J.; Waddell, M. B.; Nourse, A.; Hammel, M.; Miller, D. J.; Walden, H.; Duda, D. M.; Seyedin, S. N.; Hoggard, T.; Harper, J. W.; White, K. P.; Schulman, B. A. *Mol. Cell* **2009**, *36*, 39–50.
- (80) Canning, P.; Cooper, C. D. O.; Krojer, T.; Murray, J. W.; Pike, A. C. W.; Chaikuad, A.; Keates, T.; Thangaratnarajah, C.; Hojzan, V.; Marsden, B. D.; Gileadi, O.; Knapp, S.; von Delft, F.; Bullock, A. N. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 7803–7814.
- (81) Bauer, R. A. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1061–1073.
- (82) Serafimova, I. M.; Pufall, M. a; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frödin, M.; Taunton, J. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 471–476.
- (83) Dinkova-Kostova, a T.; Massiah, M. a; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 3404–3409.
- (84) Turpaev, K.; Ermolenko, M.; Cresteil, T.; Drapier, J. C. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 535–547.
- (85) Baell, J. B.; Holloway, G. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740.
- (86) Heiss, E. H.; Tran, T. V. A.; Zimmermann, K.; Schwaiger, S.; Vouk, C.; Mayerhofer, B.; Malainer, C.; Atanasov, A. G.; Stuppner, H.; Dirsch, V. M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 503–508.

- (87) Xi, M. Y.; Sun, Z. Y.; Sun, H. P.; Jia, J. M.; Jiang, Z. Y.; Tao, L.; Ye, M.; Yang, X.; Wang, Y. J.; Xue, X.; Huang, J. J.; Gao, Y.; Guo, X. K.; Zhang, S. L.; Yang, Y. R.; Guo, Q. L.; Hu, R.; You, Q. D. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 364–371.
- (88) Lounsbury, N.; Mateo, G.; Jones, B.; Papaiahgari, S.; Thimmulappa, R. K.; Teijaro, C.; Gordon, J.; Korzekwa, K.; Ye, M.; Allaway, G.; Abou-Gharbia, M.; Biswal, S.; Childers, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5352–5359.
- (89) Wu, K. C.; McDonald, P. R.; Liu, J.; Klaassen, C. D. *Planta Med.* **2014**, *80*, 97–104.
- (90) Bensasson, R. V.; Dinkova-Kostova, A. T.; Zheng, S.; Saito, A.; Li, W.; Zoete, V.; Honda, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4345–4349.
- (91) Nakagami, Y.; Masuda, K.; Hatano, E.; Inoue, T.; Matsuyama, T.; Iizuka, M.; Ono, Y.; Ohnuki, T.; Murakami, Y.; Iwasaki, M.; Yoshida, K.; Kasuya, Y.; Komoriya, S. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 1237–1249.
- (92) Fischer, D.; Theodorakis, E. A. *European J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 4193–4196.
- (93) Kamenka, J.-M.; Geneste, P.; El Harfi, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1983**, *3*, 87–88.
- (94) Nicolaou, K. C.; Magolda, R. L.; Claremon, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1404–1409.
- (95) Hsieh, M.; Chou, H.; Liu, H.; Wu, H.-M.; Ly, T. W.; Wu, Y. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1673–1675.
- (96) Weiler, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6702–6704.
- (97) Bélanger, G.; Deslongchamps, P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7070–7074.
- (98) Murphy, G. K.; West, F. G. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4359–4361.
- (99) Winkler, J. D.; Hong, B. C.; Hey, J. P.; Williard, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8839–8846.
- (100) Barker, D.; Brimble, M. a; McLeod, M.; Savage, G. P.; Wong, D. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, *2*, 924–931.
- (101) Funk, R. L.; Olmstead, T. A.; Parvez, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3298–3300.
- (102) Taber, D. F.; Neubert, T. D.; Rheingold, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12416–12417.
- (103) Xue, F.; Seto, C. T. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8309–8321.
- (104) Yang, Z.-K.; Chen, Q.-H.; Wang, F.-P. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4192–4195.
- (105) Barker, D.; Brimble, M. A.; McLeod, M. D.; Savage, G. P. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1659.
- (106) Liotta, D.; Barnum, C.; Puleo, R.; Zima, G.; Bayer, C.; Kezar, H. S. *J. Org. Chem.* **1981**, *14*, 2920–2923.
- (107) Josef, K. A.; Dandu, R.; Tao, M.; Hudkins, R. L. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 719–722.
- (108) Kerr, W. J.; McLaughlin, M.; Morrison, A. J.; Pauson, P. L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2945–2948.

- (109) Jiricek, J.; Blechert, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3534–3538.
- (110) Anxionnat, B.; Robert, B.; George, P.; Ricci, G.; Perrin, M.-A.; Gomez Pardo, D.; Cossy, J. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6087–6099.
- (111) Gilbert, J. C.; Kelly, T. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4193–4196.
- (112) Jauch, J.; Wallner, C.; Herdtweck, E. *European J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 3060–3064.
- (113) Smith, A. B.; Basu, K.; Bosanac, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14872–14874.
- (114) Bellur, E.; Langer, P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10013–10029.
- (115) Flanagan, M. E.; Abramite, J. A.; Anderson, D. P.; Aulabaugh, A.; Dahal, U. P.; Gilbert, A. M.; Li, C.; Montgomery, J.; Oppenheimer, S. R.; Ryder, T.; Schuff, B. P.; Uccello, D. P.; Walker, G. S.; Wu, Y.; Brown, M. F.; Chen, J. M.; Hayward, M. M.; Noe, M. C.; Obach, R. S.; Philippe, L.; Shanmugasundaram, V.; Shapiro, M. J.; Starr, J.; Stroh, J.; Che, Y. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10072–10079.
- (116) Lavallée, J.-F.; Spino, C.; Ruel, R.; Hogan, K. T.; Deslongchamps, P. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 1406–1426.
- (117) Kapat, A.; Nyfeler, E.; Giuffredi, G. T.; Renaud, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17746–17747.
- (118) Bolli, M.; Lehmann, D.; Mathys, B.; Mueller, C.; Nayler, O.; Velker, J.; Weller, T. Hydrogenated Benzo (C) Thiophene Derivatives as Immunomodulators. WO2006/100631, 2006.
- (119) Reissig, H.-U.; Reichelt, I. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5879–5880.
- (120) Chan, Yihlin; Epstein, W. W. *Org. Synth.* **1973**, *53*, 48.
- (121) Schultz, A. G.; Sundararaman, P. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2455–2462.
- (122) Chou, H.-H.; Wu, H.-M.; Wu, J.-D.; Ly, T. W.; Jan, N.-W.; Shia, K.-S.; Liu, H.-J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 121–123.
- (123) Liu, H.-J.; Tran, D. D.-P. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3827–3830.
- (124) Liu, Z.-G.; Cheng, H.; Ge, M.-J.; Xu, L.; Wang, F.-P. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5431–5437.
- (125) Spino, C.; Rezaei, H.; Dupont-Gaudet, K.; Bélanger, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9926–9927.
- (126) Bhatt, A.; Gurukumar, K. R.; Basu, A.; Patel, M. R.; Kaushik-Basu, N.; Talele, T. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5138–5145.
- (127) Altmann, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Missbach, M. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5833–5836.
- (128) Boddaert, T.; Coquerel, Y.; Rodriguez, J. *European J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 5061–5070.
- (129) Williams, D. R.; Reeves, J. T.; Nag, P. P.; Pitcock, W. H.; Baik, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12339–12348.

- (130) Mhasni, O.; Rezgui, F. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6322–6326.
- (131) Rouillard, A.; Bonin, M.-A.; Deslongchamps, P. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3730–3739.
- (132) Ngatimin, M.; Gartshore, C. J.; Kindler, J. P.; Naidu, S.; Lupton, D. W. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6008–6011.
- (133) Pandey, G.; Balakrishnan, M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8128–8131.
- (134) El Bakali, J.; Muccioli, G. G.; Renault, N.; Pradal, D.; Body-Malapel, M.; Djouina, M.; Hamtiaux, L.; Andrzejak, V.; Desreumaux, P.; Chavatte, P.; Lambert, D. M.; Millet, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7918–7931.
- (135) Obrecht, D.; Zumbunn, C.; Müller, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6182–6189.
- (136) Magee, D. I.; Ratshonka, S.; Mcconaghy, J.; Hood, M. *Can. J. Chem.* **2012**, *90*, 450–463.
- (137) Liu, H.-J.; Browne, E. N. C. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 601–608.
- (138) Honda, T.; Yoshizawa, H.; Sundararajan, C.; Gribble, G. W. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3314–3316.
- (139) Peelen, T. J.; Chi, Y.; English, E. P.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4411–4414.
- (140) García Ruano, J. L.; Fajardo, C.; Fraile, A.; Martín, M. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4300–4306.
- (141) Balamurugan, R.; Manojveer, S. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11143–11145.
- (142) Sugimura, T.; Haruna, N.; E. Acosta, D.; Nakagawa, S.; Yamaguchi, K.; Tai, A.; Okuyama, T. *Heterocycles* **2004**, *62*, 375–386.
- (143) Vaidya, T.; Manbeck, G. F.; Chen, S.; Frontier, A. J.; Eisenberg, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3300–3303.
- (144) Vaidya, T.; Cheng, R.; Carlsen, P. N.; Frontier, A. J.; Eisenberg, R. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 800–803.
- (145) Soni, R.; Collinson, J.-M.; Clarkson, G. C.; Wills, M. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4304–4307.
- (146) Caron, P.-Y.; Deslongchamps, P. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 508–511.
- (147) Benati, L.; Leardini, R.; Minozzi, M.; Nanni, D.; Spagnolo, P.; Strazzari, S.; Zanardi, G. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3079–3081.
- (148) Cui, L.-Q.; Liu, K.; Zhang, C. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2258–2265.
- (149) Klein, E. S.; Johnson, A. T.; Gillett, S. J.; Duong, T. T.; Beard, R. L.; Standeven, A. M.; Nagpal, S.; Teng, M.; Chandraratna, R. A.; Vuligonda, V. Synthesis and use of Retinoid Compounds Having Negative Hormone and/or Antagonist Activities. US5958954 A1, 1999.
- (150) Starrett, Jr., J. E.; Mansuri, M. M.; Reczek, P. R.; Tortolani, D. R.; Kuo-Long, Y. Retinoid-like compounds. US5618839 A1, 1997.
- (151) Liu, J.; Chan, J.; Bryant, C. M.; Duspara, P. A.; Lee, E. E.; Powell, D.; Yang, H.; Liu, Z.; Walpole,

- C.; Roberts, E.; Batey, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2971–2975.
- (152) Jung, M. E.; Dwight, T. A.; Vigant, F.; Østergaard, M. E.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 9893–9897.
- (153) Fernandes, T. D. A.; Domingos, J. L. O.; da Rocha, L. I. A.; de Medeiros, S.; Nájera, C.; Costa, P. R. R. *European J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 1314–1320.
- (154) Culkin, D. A.; Hartwig, J. F. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 234–245.
- (155) Fernández González, D.; Brand, J. P.; Waser, J. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16*, 9457–9461.
- (156) Bernardi, A.; Karamfilova, K.; Sanguinetti, S.; Scolastico, C. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13009–13026.
- (157) Cusack, K. P.; Arnold, L. D.; Barberis, C. E.; Chen, H.; Ericsson, A. M.; Gaza-Bulseco, G. S.; Gordon, T. D.; Grinnell, C. M.; Harsch, A.; Pellegrini, M.; Tarcsa, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5503–5507.
- (158) Menger, F. M.; Persichetti, R. A. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3451–3452.
- (159) Wang, D.; Li, J.; Li, N.; Gao, T.; Hou, S.; Chen, B. *Green Chem.* **2010**, *12*, 45–48.
- (160) Gaudreault, F.; Morency, L.-P.; Najmanovich, R. J. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3856–3858.
- (161) Corne, V.; Sarotti, A. M.; Ramirez de Arellano, C.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1616–1623.
- (162) Vavricka, C. J.; Liu, Y.; Kiyota, H.; Sriwilaijaroen, N.; Qi, J.; Tanaka, K.; Wu, Y.; Li, Q.; Li, Y.; Yan, J.; Suzuki, Y.; Gao, G. F. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1491.
- (163) Gu, C.; Shannon, D. A.; Colby, T.; Wang, Z.; Shabab, M.; Kumari, S.; Villamor, J. G.; McLaughlin, C. J.; Weerapana, E.; Kaiser, M.; Cravatt, B. F.; van der Hoorn, R. A. L. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 541–548.
- (164) Deny, L. J.; Traboulsi, H.; Cantin, A. M.; Marsault, É.; Richter, M. V.; Bélanger, G. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9431–9442.
- (165) Ladouceur, S.; Soliman, A.; Zysman-Colman, E. *Synthesis.* **2011**, *2011*, 3604–3611.
- (166) Kumar, D.; Reddy, V. B.; Kumar, A.; Mandal, D.; Tiwari, R.; Parang, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 449–452.
- (167) Rivara, M.; Patel, M. K.; Amori, L.; Zuliani, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6401–6404.
- (168) Boechat, F. da C. S.; Sacramento, C. Q.; Cunha, A. C.; Sagrillo, F. S.; Nogueira, C. M.; Fintelman-Rodrigues, N.; Santos-Filho, O.; Riscado, C. S.; Forezi, L. da S. M.; Faro, L. V.; Brozeguini, L.; Marques, I. P.; Ferreira, V. F.; Souza, T. M. L.; de Souza, M. C. B. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 7777–7784.

- (169) Karoli, T.; Mamidyala, S. K.; Zuegg, J.; Fry, S. R.; Tee, E. H. L.; Bradford, T. A.; Madala, P. K.; Huang, J. X.; Ramu, S.; Butler, M. S.; Cooper, M. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2428–2433.
- (170) Oonishi, Y.; Mori, M.; Sato, Y. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, *2007*, 2323–2336.
- (171) Kobayashi, Y.; Muruges, M. G.; Nakano, M.; Takahisa, E.; Usmani, S. B.; Ainai, T. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7110–7123.
- (172) Righi, G.; Bovicelli, P.; Sperandio, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1733–1737.
- (173) Pergament, I.; Reich, R.; Srebnik, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1215–1218.
- (174) Pouwer, R. H.; Schill, H.; Williams, C. M.; Bernhardt, P. V. *European J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 4699–4705.
- (175) Cloutier, A.; Marois, I.; Cloutier, D.; Verreault, C.; Cantin, A. M.; Richter, M. V. *J. Infect. Dis.* **2012**, *205*, 621–630.
- (176) Kozikowski, A. P.; Campiani, G.; Sun, L.-Q.; Wang, S.; Saxena, A.; Doctor, B. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11357–11362.
- (177) Li, J.-H.; Zhu, Q.-M.; Liang, Y.; Yang, D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5347–5349.
- (178) Wuesthoff, M. T.; Rickborn, B. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 1311–1312.
- (179) Romanski, S.; Kraus, B.; Guttentag, M.; Schlundt, W.; Rücker, H.; Adler, A.; Neudörfl, J.-M.; Alberto, R.; Amslinger, S.; Schmalz, H.-G. *Dalt. Trans.* **2012**, *41*, 13862–13875.
- (180) Liu, H.-J.; Browne, E. N. C.; Chew, S. Y. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 2345–2347.
- (181) Madder, A.; De Clercq, P. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2548–2559.
- (182) Tsuchihashi, G.; Ogura, K. The alpha-Chlorination of Sulfoxides with N-Chlorosuccinimide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1971, *44*, 1726.
- (183) Bathich, Y.; Syed Monudeen Khan, S.; Hamzah, A. *Synlett* **2011**, *2011*, 1154–1156.
- (184) Meyer, W. L.; Brannon, M. J.; Burgos, C. D. G.; Goodwin, T. E.; Howard, R. W. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 438–447.
- (185) Altmeyer, I.; Margaretha, P. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 874–881.
- (186) Soorukram, D.; Knochel, P. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2409–2411.
- (187) Margaretha, P. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 929–933.
- (188) Ikeda, S.; Shibuya, M.; Kanoh, N.; Iwabuchi, Y. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1833–1836.
- (189) Cooper, K.; Pattenden, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 799–809.
- (190) Liu, H.-J.; Ulíbarri, G.; Browne, E. N. C. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 1545–1554.

- (191) Hullaert, J.; Laplace, D. R.; Winne, J. M. *European J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 3097–3100.
- (192) Satoh, T.; Unno, H.; Mizu, Y.; Hayashi, Y. *Tetrahedron* **1997**, 53, 7843–7854.
- (193) Kropp, P. J.; Breton, G. W.; Craig, S. L.; Crawford, S. D.; Durland, W. F.; Jones, J. E.; Raleigh, J. S. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4146–4152.
- (194) Zhang, F.; Das, S.; Walkinshaw, A. J.; Casitas, A.; Taylor, M.; Suero, M. G.; Gaunt, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 8851–8854.

ANNEXE 1 : DONNÉES BIOLOGIQUES SUPPLÉMENTAIRES

Tableau G.1 : Valeurs numériques (activité relative \pm SEM) de la figure 50 A.

[]	6-2a	6-2b	6-2c	6-2d	6-2e	6-2f
0.1 μ M	---	---	1.56 \pm 0.83	1.66 \pm 0.03	5.10 \pm 0.21	1.09 \pm 0.09
0.2 μ M	---	---	2.35 \pm 0.19	3.95 \pm 0.35	8.97 \pm 0.66	1.48 \pm 0.14
0.3 μ M	---	---	2.28 \pm 0.91	4.28 \pm 0.26	8.96 \pm 0.75	1.89 \pm 0.15
0.4 μ M	---	---	1.59 \pm 0.29	5.34 \pm 0.15	9.50 \pm 0.74	2.18 \pm 0.14
0.5 μ M	---	---	1.64 \pm 0.18	3.76 \pm 0.16	17.06 \pm 0.95	2.85 \pm 0.13
0.6 μ M	---	---	3.44 \pm 0.82	3.62 \pm 0.01	20.80 \pm 1.17	3.35 \pm 0.44
0.7 μ M	---	---	4.31 \pm 0.42	4.07 \pm 0.39	20.82 \pm 0.40	3.41 \pm 0.22
0.8 μ M	---	---	3.82 \pm 0.28	4.01 \pm 0.32	17.75 \pm 0.19	3.43 \pm 0.52
0.9 μ M	---	---	9.74 \pm 1.87	5.57 \pm 0.22	19.31 \pm 0.52	5.18 \pm 0.31
1 μ M	4.49 \pm 0.43	4.71 \pm 1.11	8.23 \pm 0.38	7.82 \pm 0.31	25.89 \pm 1.33	5.81 \pm 0.51
5 μ M	4.39 \pm 1.26	63.71 \pm 20.85	---	---	---	---
10 μ M	3.60 \pm 0.48	247.70 \pm 17.80	---	---	---	---
20 μ M	8.61 \pm 0.63	---	---	---	---	---
50 μ M	44.21 \pm 8.76	---	---	---	---	---
100 μ M	101.10 \pm 15.76	---	---	---	---	---

Tableau G.2 : Valeurs numériques (activité relative \pm SEM) de la figure 52 A.

[]	6-2h	6-2i	6-2j	6-5
0.1 μ M	0.81 \pm 0.30	1.23 \pm 0.16	2.00 \pm 0.10	1.87 \pm 0.14
0.2 μ M	0.70 \pm 0.06	1.85 \pm 0.00	2.08 \pm 0.03	1.94 \pm 0.15
0.3 μ M	1.40 \pm 0.39	2.93 \pm 0.53	2.64 \pm 0.44	2.15 \pm 0.14
0.4 μ M	2.08 \pm 0.29	2.81 \pm 0.65	2.22 \pm 0.03	2.22 \pm 0.05
0.5 μ M	3.76 \pm 0.34	9.76 \pm 0.94	2.25 \pm 0.03	1.94 \pm 0.08
0.6 μ M	3.75 \pm 1.10	7.54 \pm 1.45	2.50 \pm 0.10	2.49 \pm 0.10
0.7 μ M	4.50 \pm 0.60	8.46 \pm 0.31	2.21 \pm 0.06	2.55 \pm 0.31
0.8 μ M	15.60 \pm 1.80	10.32 \pm 0.01	2.33 \pm 0.14	2.37 \pm 0.13
0.9 μ M	14.59 \pm 5.34	33.73 \pm 0.74	2.68 \pm 0.31	2.50 \pm 0.10

1 μ M	15.20 ± 0.79	52.46 ± 3.01	7.56 ± 0.34	3.45 ± 0.32
5 μ M	---	---	7.60 ± 0.29	6.97 ± 1.65
10 μ M	---	---	8.84 ± 0.26	16.34 ± 1.02
20 μ M	---	---	9.58 ± 0.55	---
50 μ M	---	---	9.05 ± 2.47	---

ANNEXE 2 : PROTOCOLES DES ESSAIS BIOLOGIQUES

Essai luciférase

The day before transfection, Human Embryonic Kidney HEK 293T cells (1×10^5) were plated in 24-well tissue culture-treated plates. Cells were transiently transfected with 0.1 μg of ARE-luc (Nrf2 response element) plasmid using FuGENE6 transfection reagent (Promega, Madison, WI; E2691). The day after transfection, cells were treated with Keap1 ligands at different concentrations or sulforaphane at 10 μM . After 24 h, cell lysates were then assayed for luciferase activity using the luciferase assay system from Promega (E1500).

Mesure de NQO1 par qPCR

RAW 264.7 cells were treated with 2, 5 and 10 μM of different compounds or sulforaphane for 5 hours. Total RNA was then extracted using Ribozol reagent according to the manufacturer's protocol. A total of 500 ng of the resulting RNA was then reverse transcribed using iScript reverse transcription supermix for the reverse transcriptase quantitative PCR (RTqPCR) kit (Bio-Rad). Real-time PCRs were performed with the iQ SYBR green supermix (Bio-Rad). Amplification plots were generated using the Rotorgene 6000 Application software version 1.7 (Corbett Research), and fold induction was calculated using the threshold cycle ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$) method and using 18S expression for normalization. Primer sequences are:

Human/Mouse 18S:

FW: 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3'

RV: 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'

Mouse NQO1:

FW: 5'-TCACAGGTGAGCTGAAGGAC-3'

RV: 5'-CTTCCAGCTTCTTGTGTTTCG -3'

Essai LDH

Briefly, HEK 293T cells were treated with increasing concentrations of Keap1 ligands. After 24 hours, supernatants were collected and cells were lysed in triton 1%. To measure lactate dehydrogenase (LDH) activity, buffer containing L-(+)-Lactic acid and Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (Sigma-Aldrich; L-1750 and N7004 respectively) was added to the supernatant and the cells lysate, followed by measurement of absorbance at 340 nm.

ANNEXE 3 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Remarques générales

All reactions requiring anhydrous conditions were conducted in flame-dried glassware under a dry nitrogen or argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from Na and benzophenone under nitrogen immediately prior to use. 1,4-dioxane was distilled from Na and benzophenone under argon and kept on 4 Å molecular sieves with minimum of light. Dichloromethane, methanol, toluene, diisopropylamine, triethylamine and pyridine were distilled from CaH₂ under nitrogen at atmospheric pressure immediately prior to use. Lithium diisopropylamide (LDA) was prepared by the addition of commercially available *n*BuLi (2.5 M in hexanes) to diisopropylamine at -78 °C. All reference to “water” correspond to deionized water. All references to “brine” refer to a saturated aqueous sodium chloride solution. All references to “DDQ” refer to 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone. Melting points were determined on a Thomas Hoover capillary melting point apparatus and are uncorrected. All NMR spectra were recorded on an AV300 Bruker 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C or an AS400 Variant 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. The chemical shifts are reported using δ 7.26 signal of CHCl₃ (¹H NMR) and the δ 77.16 signal of CDCl₃ (¹³C NMR) as internal standards for deuterated chloroform and the δ 5.30 signal of CH₂Cl₂ (¹H NMR) and the δ 53.52 signal of CD₂Cl₂ (¹³C NMR) as internal standards for deuterated methylene chloride. Coupling constants are reported in hertz (Hz) and the apparent multiplicity is described as s = singlet, m = multiplet, d = doublet, t = triplet, and q = quartet. High resolution mass spectrometry data were obtained by the ESI-Q-ToF (maXis). Thin layer chromatography (TLC) was conducted with pre-coated 60 Å 250 μm silica gel plates with F-254 indicator and visualized using a combination of UV and potassium permanganate staining. Flash column chromatography was performed using silica gel (230–400 mesh). IR spectra were recorded with a FTIR instrument by applying substrates neat.

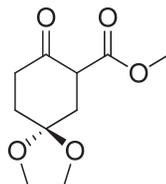
Modes opératoires

1,4-cyclohexanedione diethylene acetal (**3-2**)



1,4-cyclohexanedione (**3-1**) (9.8 g, 88 mmol), ethylene glycol (25 mL, 447 mmol), *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (2.5 g, 13 mmol) and toluene (50 mL) were added in a round bottom flask. The mixture was stirred and heated in a Dean-Stark apparatus for 20 h. Once it has cooled to room temperature, the mixture was poured into saturated aqueous NaHCO₃ (40 mL) and extracted with EtOAc (5 × 120 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give 1,4-cyclohexanedione diethylene acetal (**3-2**) as a light brown solid (17 g, 96%). The spectral data were consistent with that previously reported.⁹³ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 3.94 (s, 8H), 1.78 (s, 8H).

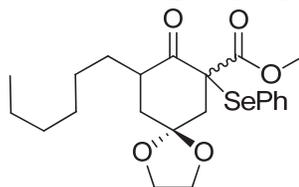
Methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**)



In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 1.54 g, 38.4 mmol) was suspended in dimethyl carbonate (10 mL) at room temperature under argon. The mixture was stirred and 1,4-cyclohexanedione monoethylene acetal (**3-3**) (3.0 g, 19.2 mmol) was added as a solution in dimethyl carbonate (20 mL) via an addition funnel. The reaction was heated at reflux for 4 h, then cooled to 0 °C. Saturated aqueous NH₄Cl (30 mL) was added and the mélange was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 50 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford a brown liquid. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5-15% EtOAc in hexanes) gave methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**) as a pale yellow oil (3.81 g, 93%). The spectral data were consistent with that previously reported.¹¹⁶ Enol (major tautomer) ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 12.13 (s, 1H), 3.97 – 3.95 (m, 4H), 3.72 (s, 3H), 2.48 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 2.44 (s, 2H), 1.81 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 172.48,

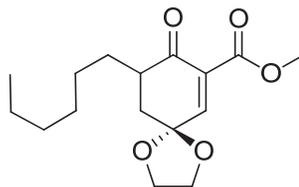
171.21, 107.20, 95.22, 64.61, 51.54, 32.67, 30.34, 27.93. Ketone (minor tautomer) ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 204.75, 169.81, 106.62, 64.87, 64.81, 53.92, 52.29, 38.18, 36.56, 34.41.

Methyl 9-hexyl-8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (3-5)



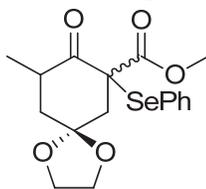
In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.86 mmol) was prepared under argon at $-78\text{ }^\circ\text{C}$ in THF (1.0 mL). Methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**) (201.3 mg, 0.94 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to $0\text{ }^\circ\text{C}$ and stirring was continued for 1 h. Then, 1-iodohexane (0.69 mL, 4.68 mmol) was added; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred overnight. The reaction was quenched with water (15 mL) and extracted with EtOAc (4×5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (saturated with Et_3N , 0 to 5% EtOAc in hexanes) gave methyl 9-hexyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-18**) as a yellow oil (158.7 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeCl (269.9 mg, 1.41 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.0 mL) and the brown solution was stirred under argon at room temperature. Separately, a solution of methyl 9-hexyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-18**) and pyridine (0.12 mL, 1.48 mmol) in CH_2Cl_2 (2.0 mL) was prepared and slowly added to the previous one. Stirring was continued for 3 h; 1 N aqueous HCl (10 mL) was added and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3×3 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to afford an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% Et_2O in hexanes) gave methyl 9-hexyl-8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-5**) as a yellow oil (197.3 mg, 46% over 2 steps). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 7.57 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.40 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.30 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 3.92 – 3.73 (m, 4H), 3.65 (s, 3H), 2.96 – 2.90 (m, 1H), 2.50 (dd, 1H, $J = 3.6, 13.7$ Hz), 2.17 (d, 1H, $J = 13.7$ Hz), 2.04 – 2.00 (m, 1H), 1.87 – 1.83 (m, 1H), 1.79 (t, 1H, $J = 13.5$ Hz), 1.28 (br s, 9H), 0.87 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 204.72, 170.07, 138.76, 129.68, 128.77, 126.38, 106.88, 64.93, 64.23, 59.69, 52.74, 46.61, 43.54, 41.75, 31.43, 29.41, 29.20, 26.80, 22.72, 14.22. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{SeNa}$: 477.1152, found: 477.1152. IR (neat) ν 2952, 2926, 2856, 1713, 1436 cm^{-1} .

Methyl 9-hexyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate (3-6)



In a round bottom flask, methyl 9-hexyl-8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-5**) (196.1 mg, 0.43 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (3.0 mL). The solution was stirred under argon at room temperature; then, 30 wt. % aqueous H₂O₂ (1.0 mL) was added and the resulting mixture was vigorously stirred for 90 min. water (1 mL) and CH₂Cl₂ (3 mL) were added and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 6 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 6 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford methyl 9-hexyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate (**3-6**) as a pale yellow oil (122.8 mg, 95%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.06 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 4.16 – 3.97 (m, 4H), 3.81 (s, 3H), 2.75 – 2.68 (m, 1H), 2.22 (ddd, 1H, *J* = 13.5, 4.6, 2.1 Hz), 2.05 (dd, 1H, *J* = 12.3, 13.2 Hz), 1.93 – 1.81 (m, 1H), 1.27 (br s, 9H), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 196.20, 164.59, 147.61, 132.55, 103.63, 65.31, 64.92, 52.31, 45.48, 38.37, 31.54, 29.14, 28.91, 26.39, 22.46, 13.96. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₆H₂₄O₅Na+MeOH: 351.1778, found: 351.1785. IR (neat) ν 2926, 1746, 1436, 1256, 1083 cm⁻¹.

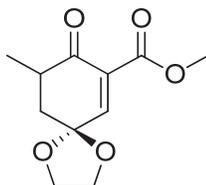
Methyl 9-methyl-8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (3-7)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (4.99 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (2.0 mL). Methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**) (503.7 mg, 2.35 mmol) was added via cannula as a solution in THF (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, iodomethane (0.16 mL, 2.57 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred overnight. At 0 °C, the reaction was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (15 mL) and water (2 mL) and extracted with EtOAc (4 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 6 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) gave methyl 9-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-

carboxylate as a pale yellow oil (278.5 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (319.4 mg, 1.35 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.0 mL) and the brown solution was stirred under argon at 0 °C. Separately, a solution of methyl 9-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (104.2 mg, 0.46 mmol) and pyridine (0.11 mL, 1.36 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) was prepared and slowly added via cannula to the previous one. The mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 3 h; 1 N aqueous HCl (10 mL) was added and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 4 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) gave methyl 9-methyl-8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-7**) as a colorless oil (109.2 mg, 32% over 2 steps). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7.58 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.39 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.30 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 3.91 – 3.77 (m, 4H), 3.64 (s, 3H), 3.09 – 3.03 (m, 1H), 2.50 (dd, 1H, *J* = 3.8, 13.7 Hz), 2.15 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz), 2.02 – 1.97 (m, 1H), 1.83 (t, 1H, *J* = 13.4 Hz), 1.13 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 170.17, 138.79, 129.71, 128.79, 126.46, 106.79, 64.97, 64.30, 59.43, 52.78, 43.69, 43.51, 40.75, 14.86. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₇H₂₀O₅SeNa: 407.0369, found: 407.0371. IR (neat) ν 2896, 1736, 1709, 1219 cm⁻¹.

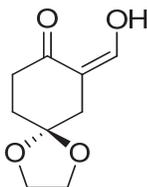
Methyl 9-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate (**3-8**)



In a round bottom flask, methyl 9-methyl-8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-7**) (44.4 mg, 0.12 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.0 mL). The solution was stirred opened to air at 0 °C; then, 50 wt. % aqueous H₂O₂ (0.1 mL, 1.73 mmol) was added and the resulting mixture was vigorously stirred for 90 min. water (4 mL) and CH₂Cl₂ (10 mL) were added and the layers were separated. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 4 mL), brine (3 × 6 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford methyl 9-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate (**3-8**) as a pale yellow oil (27.1 mg, quant.). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7.07 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 4.13 – 3.95 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 2.91 – 2.82 (m, 1H), 2.17 (ddd, 1H, *J* = 2.2, 4.8, 13.5 Hz), 2.07 (t, 1H, *J* = 13.5 Hz), 1.16 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 196.62, 164.77, 148.17, 132.62, 103.71, 65.52, 65.16, 52.58, 41.27, 40.83, 14.81.

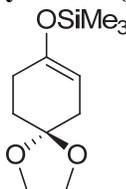
HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₁H₁₄O₅Na: 249.0733, found: 249.0740. IR (neat) ν 2955, 2934, 2891, 1744, 1690, 1435, 1251 cm⁻¹.

(Z)-7-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (3-9)



In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 1.6 g, 41 mmol) was suspended in THF (40.0 mL) under argon at 0 °C and stirred when methanol (4.0 mL, 99 mmol) was added dropwise. After 15 min of additional stirring, ethyl formate (4.7 mL, 58 mmol) was added dropwise. Then, 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-3**) (3.0 g, 19 mmol) was added as a solution in THF (17.0 mL + 3.0 mL for rinsing) over 90 min. The resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir overnight. Et₂O (30 mL) was added and extracted with aqueous 1 N NaOH (5 × 25 mL). The combined aqueous layers were acidified with aqueous 6 N HCl till pH = 4 and extracted with CH₂Cl₂ (4 × 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a dark oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (30% EtOAc in hexanes) afforded (Z)-7-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one as an orange oil (**3-9**) (2.4 g, 68%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁰⁷ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 14.14 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 4.01 (s, 4H), 2.58 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 2.55 (s, 2H), 1.86 (t, 2H).

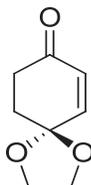
(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yloxy)trimethylsilane (3-10)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (1.55 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (2.0 mL). 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-3**) (203.8 mg, 1.31 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). After 1 h of additional stirring, chlorotrimethylsilane (0.30 mL, 2.36 mmol) was added dropwise. The mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 2 h. The volatiles were removed under vacuum; the resulting white solid was taken into dried pentane, filtered and concentrated to give a pale yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) afforded (1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yloxy)trimethylsilane (**3-10**) as a

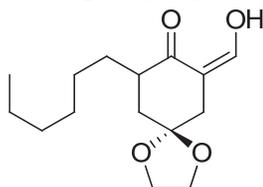
colorless oil (264.2 mg, 88%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁰⁸ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 4.72 (s, 1H), 3.96 (s, 4H), 2.26 (s, 2H), 2.21 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 1.80 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 0.18 (s, 9H).

1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-en-8-one (3-11)



(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yloxy)trimethylsilane (**3-10**) (102.4 mg, 0.45 mmol) was dissolved in acetonitrile (7.0 mL), under argon at room temperature in a round bottom flask. The solution was stirred when Pd(OAc)₂ (110.8 mg, 0.49 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred for 24 h and the solvent was removed under vacuum. The resulting residue was taken into CH₂Cl₂ and filtered on celite. The filtrate was washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 \times 10 mL), brine (2 \times 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (30% EtOAc in hexanes) afforded 1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-en-8-one (**3-11**) as a yellow oil (42.2 mg, 61%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁰⁸ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 6.61 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz), 6.00 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 4.04 (s, 4H), 2.63 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 2.20 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz).

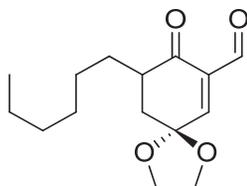
(Z)-7-hexyl-9-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (3-12)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.33 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (2.0 mL). (Z)-7-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-9**) (201.8 mg, 1.10 mmol) was added via cannula as a solution in THF (1.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1-iodohexane (0.48 mL, 3.25 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred overnight. At 0 °C, the reaction was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (15 mL) and extracted with Et₂O (5 \times 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10%

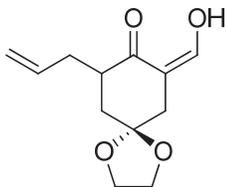
EtOAc in hexanes) gave (Z)-7-hexyl-9-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-12**) as a light brown oil (116.0 mg, 39%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 14.69 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 4.07 – 3.88 (m, 4H), 2.69 – 2.60 (m, 1H), 2.56 (d, 1H, *J* = 14.9 Hz), 2.45 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz), 1.95 – 1.87 (m, 1H), 1.86 – 1.79 (m, 1H), 1.63 (t, 1H, *J* = 12.3 Hz), 1.54 – 1.43 (m, 1H), 1.25 (br s, 8H), 0.90 – 0.80 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 189.34, 184.32, 107.39, 106.42, 64.68, 64.60, 40.66, 35.90, 33.64, 31.76, 30.57, 29.36, 26.51, 22.66, 14.14. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₅H₂₄O₄Na + MeOH: 323.1829, found: 323.1845. IR (neat) ν 2925, 2857, 1638, 1584, 1087 cm⁻¹.

9-hexyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carbaldehyde (**3-13**)



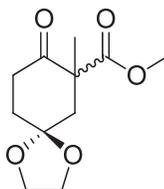
PhSeBr (54.0 mg, 0.23 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (4.0 mL) in a round bottom flask under argon. The brown solution was stirred at 0 °C when pyridine (20 μL, 0.25 mmol) was added. After 30 min of additional stirring, (Z)-7-hexyl-9-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-12**) (54.8 mg, 0.20 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). Stirring was continued for 1 h. Then, at room temperature, it was washed with aqueous 1 N HCl (2 × 10 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 6 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) afforded 9-hexyl-8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carbaldehyde as a white solid (62.0 mg, 73%, diastereomeric mixture). It was dissolved in CH₂Cl₂ (2.0 mL), the solution was stirred at 0 °C opened to air when 50 wt. % aqueous H₂O₂ (0.1 mL, 1.73 mmol) was added dropwise. After 1 h of additional stirring, H₂O (4 mL) and CH₂Cl₂ (10 mL) were added and the mixture was allowed to warm up till room temperature. The layers were separated; the organic one was washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 4 mL), brine (2 × 4 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 9-hexyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carbaldehyde (**3-13**) as a yellow oil (24.9 mg, 67%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 10.08 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 4.19 – 3.95 (m, 4H), 2.80 – 2.70 (m, 1H), 2.27 – 2.20 (m, 1H), 2.06 (t, 1H, *J* = 12.8 Hz), 1.94 – 1.84 (m, 1H), 1.48 – 1.39 (m, 1H), 1.28 (br s, 8H), 0.91 – 0.82 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 199.51, 190.04, 147.93, 133.09, 103.91, 65.60, 65.24, 45.37, 38.29, 31.79, 29.38, 28.86, 26.65, 22.71, 14.21. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₅H₂₂O₄Na + MeOH: 321.1672, found: 321.1674. IR (neat) ν 2925, 2857, 1685, 1617, 946 cm⁻¹.

(Z)-7-allyl-9-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (3-14)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (4.66 mmol) was prepared under argon at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in THF (4.0 mL). (Z)-7-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-9**) (403.0 mg, 2.19 mmol) was added via cannula as a solution in THF (3.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stirring was continued for 1 h. Then, allyl bromide (0.28 mL, 3.24 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred overnight. Et₂O (10 mL) was added and extracted with aqueous 1 N NaOH (5×10 mL). The combined aqueous layers were acidified with aqueous 6 N HCl till pH = 3 and extracted with CH₂Cl₂ (5×20 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded (Z)-7-allyl-9-(hydroxymethylene)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-14**) as a yellow oil (209.0 mg, 43%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 14.65 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 5.79 – 5.66 (m, 1H), 5.12 – 5.03 (m, 2H), 4.08 – 3.89 (m, 4H), 2.80 – 2.71 (m, 1H), 2.63 – 2.54 (m, 1H), 2.53 (AB quartet, 2H, $J = 14.9$ Hz), 2.40 – 2.30 (m, 1H), 1.88 (dd, 1H, $J = 12.8, 5.4$ Hz), 1.69 (t, 1H, $J = 12.2$ Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 188.10, 184.57, 135.33, 117.76, 107.36, 106.70, 64.75, 64.65, 40.35, 35.41, 34.97, 33.76. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₂H₁₆O₄Na: 247.0941, found: 247.0945. IR (neat) ν 2884, 1641, 1582, 1361, 1086 cm⁻¹.

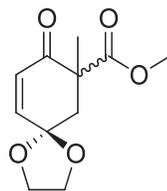
Methyl 7-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (3-16)



In a round bottom flask, methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**) (530.1 mg, 2.48 mmol) and iodomethane (0.23 mL, 3.70 mmol) were dissolved in acetone (25 mL). The solution was stirred under argon at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ when potassium carbonate (1.11 g, 8.03 mmol) was added in one portion. The resulting mixture was stirred overnight at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, the solvents were removed under vacuum and the residue was taken into aqueous 1 N HCl (6 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3×20

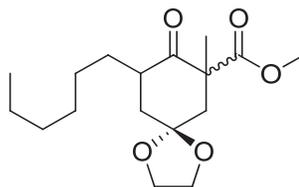
mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography afforded methyl 7-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-16**) as a pale yellow oil (549.6 mg, 97%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁷⁶ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 4.09 – 3.90 (m, 4H), 3.71 (s, 3H), 3.10 – 2.94 (m, 1H), 2.67 (d, 1H, *J* = 13.8 Hz), 2.50 (dt, 1H, *J* = 14.7, 3.9 Hz), 2.05 – 1.96 (m, 2H), 1.71 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz), 1.28 (s, 3H).

Methyl 7-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-9-ene-7-carboxylate (**3-17**)



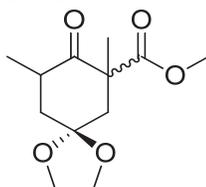
In a flame-dried round bottom flask, LDA (1.05 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (5.0 mL). Methyl 7-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-16**) (204.3 mg, 0.90 mmol) was added dropwise as a solution in THF (3.0 mL + 2.0 mL for rinsing). After 30 min of additional stirring, PhSeBr (377.3 mg, 1.58 mmol) was also added dropwise as a solution in THF (4.0 mL + 1.0 mL for rinsing). After 30 min of additional stirring, the reaction was quenched with aqueous saturated NH₄Cl (10 mL) and allow to warm up to room temperature. The mixture was extracted with Et₂O (2 × 30 mL). The combined organic layers were treated with 50 wt. % aqueous H₂O₂ (2.0 mL, 34.6 mmol) for 3 h at room temperature opened to air. At 0 °C, aqueous saturated Na₂S₂O₃ (20 mL) was added and the layers were separated. The aqueous one was extracted with Et₂O (2 × 60 mL). The combined organic layers were washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 25 mL), brine (2 × 25 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 7-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-9-ene-7-carboxylate (**3-17**) as a colorless oil (59.6 mg, 29%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 6.54 (dd, 1H, *J* = 10.2, 1.7 Hz), 6.07 (d, 1H, *J* = 10.2 Hz), 4.08 – 3.88 (m, 4H), 3.68 (s, 3H), 2.66 (dd, 1H, *J* = 13.9, 1.7 Hz), 2.10 (d, 1H, *J* = 13.9 Hz), 3.17 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 196.74, 173.44, 145.15, 130.20, 102.91, 65.35, 64.98, 52.91, 52.70, 43.35, 21.62. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₁H₁₄O₅Na: 249.0733, found: 249.0741. IR (neat) ν 2954, 2891, 1732, 1686, 1258, 1208, 1151, 1071 cm⁻¹.

Methyl 9-hexyl-7-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-19**)



In a round bottom flask, methyl 9-hexyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-18**) (109.4 mg, 0.37 mmol) and iodomethane (32 μ L, 0.51 mmol) were dissolved in acetone (4.0 mL). The solution was stirred under argon at 0 $^{\circ}$ C when potassium carbonate (146.6 mg, 1.06 mmol) was added in one portion. The resulting mixture was stirred overnight at 40 $^{\circ}$ C. Then, the solvents were removed under vacuum and the residue was taken into aqueous 1 N HCl (3 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography afforded methyl 9-hexyl-7-methyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-19**) as a colorless oil (91.3 mg, 79%, diastereomeric mixture). Major diastereoisomer ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 4.04 – 3.87 (m, 4H), 3.68 (s, 3H), 2.78 – 2.62 (m, 1H), 2.67 (d, 1H, J = 14.2 Hz), 2.05 (ddd, 1H, J = 13.5, 5.2, 3.2 Hz), 1.88 (dd, 1H, J = 14.2, 2.9 Hz), 1.78 (t, 1H, J = 13.5 Hz), 1.49 (s, 3H), 1.22 (br s, 10H), 0.83 (t, 3H, J = 6.4 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 210.13, 173.02, 107.01, 64.70, 64.25, 56.82, 52.46, 43.52, 42.83, 39.99, 31.74, 29.38, 29.24, 26.86, 22.63, 21.95, 14.12. Minor diastereoisomer ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 208.32, 174.18, 106.55, 64.84, 64.28, 54.51, 52.38, 45.37, 44.12, 42.10, 31.78, 29.43, 29.32, 29.05, 22.66, 21.86, 14.15. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$: 335.1829, found: 335.1830. IR (neat) ν 2928, 2857, 1739, 1712, 1456, 1250 cm^{-1} .

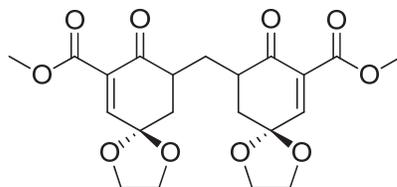
Methyl 7,9-dimethyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-21**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (5.02 mmol) was prepared under argon at -78 $^{\circ}$ C in THF (2.0 mL). Methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**) (502.3 mg, 2.35 mmol) was added dropwise as a solution in THF (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 $^{\circ}$ C and stirring was continued for 1 h. Then, iodomethane (0.72 mL, 11.57 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred overnight. At 0 $^{\circ}$ C, the

reaction was quenched with saturated aqueous NH_4Cl (15 mL) and extracted with EtOAc (4×5 mL). The combined organic layers were washed with brine (2×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% to 15% EtOAc in hexanes) gave methyl 7,9-dimethyl-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-21**) as a pale yellow oil (350.5 mg, 62%, diastereomeric mixture). Major diastereoisomer ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 3.91 – 3.75 (m, 4H), 3.55 (s, 3H), 2.83 – 2.71 (m, 1H), 2.53 (d, 1H, $J = 14.2$ Hz), 1.90 (ddd, 1H, $J = 13.5, 5.3, 3.3$ Hz), 1.78 (dd, 1H, $J = 14.2, 3.1$ Hz), 1.69 (t, 1H, $J = 13.6$ Hz), 1.37 (s, 3H), 0.89 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 210.08, 172.75, 106.48, 64.47, 63.92, 56.48, 52.11, 42.61, 41.99, 38.06, 21.64, 14.41. Minor diastereoisomer ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 3.91 – 3.75 (m, 4H), 3.55 (s, 3H), 3.05 – 2.94 (m, 1H), 2.53 (d, 1H, $J = 14.2$ Hz), 1.87 – 1.81 (m, 1H), 1.58 (t, 1H, $J = 13.5$ Hz), 1.51 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz), 1.09 (s, 3H), 0.90 (d, 3H, $J = 5.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 208.12, 173.85, 106.05, 64.54, 64.04, 54.03, 52.06, 43.83, 43.64, 40.05, 21.53, 14.30. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{Na}$: 265.1046, found: 265.1053. IR (neat) ν 2937, 2888, 1737, 1712, 1546, 1249, 1079 cm^{-1} .

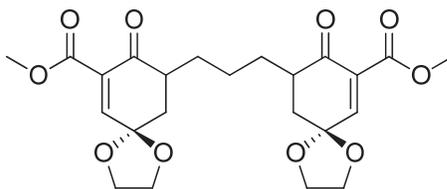
Bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate) methylene (**3-24**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (1.93 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**) (196.7 mg, 0.92 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 2 h. Then, dibromomethane (32 μL , 0.46 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and refluxed overnight. At 0 °C, the reaction was quenched with 1 N aqueous HCl (3 mL) and water (2 mL) and extracted with Et₂O (3×15 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×15 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (30% EtOAc in hexanes) gave bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) methylene as a pale yellow oil which crystallized upon standing (52.6 mg confirmed by mass spectrometry, mp = 148 - 150 °C). PhSeBr (107.6 mg, 0.46 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3.0 mL) and the brown solution was stirred under argon at 0 °C; pyridine (50 μL , 0.62 mmol) was added. Then, a solution of bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) methylene (47.5 mg, 0.11 mmol)

in CH₂Cl₂ (1.5 mL + 0.5 mL for rinsing) was prepared and added over 90 min to the previous one. After 4 h of additional stirring at 0 °C, CH₂Cl₂ (1 mL) and 1 N aqueous HCl (3 mL) were added and the layers were separated. The organic layer was washed with 1 N aqueous HCl (2 × 3 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford an orange residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20 to 40% EtOAc in hexanes) gave bis(methyl 8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) methylene (**3-23**) as a white solid (37.7 mg confirmed by mass spectrometry, 13% over 2 steps). In a flat bottom vial, bis(methyl 8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) methylene (**3-23**) (23.1 mg, 0.03 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL). The solution was stirred opened to air at 0 °C; then, 50 wt. % aqueous H₂O₂ (0.05 mL) was added and the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature. After 2 h of additional stirring, water (1 mL) and CH₂Cl₂ (3 mL) were added and the layers were separated. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 1 mL), brine (2 × 1 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate) methylene (**3-24**) as a brown solid (15.0 mg, quant., mp = 196 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.07 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz), 4.14 – 3.99 (m, 8H), 3.80 (s, 6H), 3.09 – 2.99 (m, 2H), 2.26 (ddd, 2H, *J* = 13.4, 4.6, 2.0 Hz), 2.12 (d, 1H, *J* = 29.2 Hz), 2.07 (d, 1H, *J* = 25.8 Hz), 1.81 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 196.72, 164.62, 148.48, 132.53, 103.69, 65.64, 65.23, 52.62, 44.22, 39.81, 30.39. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₂₁H₂₄O₁₀Na: 459.1262, found: 459.1269. IR (neat) ν 2956, 1742, 1717, 1690, 1257, 1219 cm⁻¹.

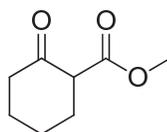
Bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate) propylene (**3-26**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (1.0 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate (**3-4**) (101.7 mg, 0.48 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1,3-diiodopropane (34 μL, 0.29 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 27 h. At 0 °C, the reaction was quenched with 1 N aqueous HCl (3 mL) and water (2 mL) and extracted with EtOAc (4 × 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in

hexanes) gave bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) propylene as a colorless oil (63.7 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeCl (106.9 mg, 0.56 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) and the brown solution was stirred under nitrogen at room temperature. Separately, a solution of bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) propylene (54.5 mg, 0.12 mmol) and pyridine (39 μL, 0.48 mmol) in CH₂Cl₂ (1.0 mL) was prepared and slowly added to the previous one. After 8 h of additional stirring, CH₂Cl₂ (4 mL), water (1 mL) and 1 N aqueous HCl (1 mL) were added and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 6 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (0 to 20% EtOAc in hexanes) gave bis(methyl 8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) propylene (**3-25**) as a pale yellow solid (62.7 mg confirmed by mass spectrometry, 38% over 2 steps). In a round bottom flask, bis(methyl 8-oxo-7-(phenylselanyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylate) propylene (**3-25**) (60.5 mg, 0.08 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL). The solution was stirred opened to air at room temperature; then, 30 wt. % aqueous H₂O₂ (0.04 mL) was added and the resulting mixture was vigorously stirred for 6 h. Water (1 mL) was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 4 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 4 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford bis(methyl 8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-ene-7-carboxylate) propylene (**3-26**) as a white solid (37.1 mg, quant., mp = 138-140 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.06 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz), 4.18 – 3.95 (m, 8H), 3.81 (s, 6H), 2.83 – 2.66 (m, 1H), 2.22 (ddd, 2H, *J* = 13.5, 4.7, 2.0 Hz), 2.13 – 1.99 (m, 2H), 1.97 – 1.77 (m, 2H), 1.49 – 1.32 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 196.21, 164.79, 148.05, 132.80, 103.88, 65.60, 65.20, 52.59, 45.60, 38.67, 29.22, 23.84. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₂₃H₂₈O₁₀Na: 487.1575, found: 487.1582. IR (neat) ν 2952, 2891, 1741, 1683, 1436, 1260 cm⁻¹.

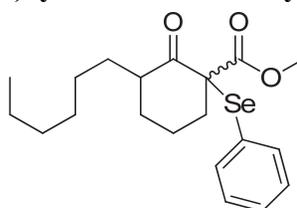
Methyl 2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-2**)



In a flame-dried 2-neck round bottom flask, NaH (60% in oil, 10.0 g, 250 mmol) was suspended in THF (50 mL) under argon at room temperature. Dimethyl carbonate (17.0 mL, 202 mmol) was added and the melange was stirred at reflux. Cyclohexanone (**4-1**) (8.5 mL, 82 mmol) was added dropwise as a solution in THF (20 mL) over 90 min. After the first drops, KH (30% in oil, catalytic amount) was added in one portion. The reaction was continued stirring at reflux for one additional hour. At 0 °C, it was quenched

with the cautious addition of aqueous 3 M AcOH (75 mL); the mixture was allowed to warm up till room temperature and was poured into brine (100 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 150 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by distillation (< 1 Torr, 55 °C) afforded methyl 2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-2**) as a colorless oil (8.2 g, 64%, enol:ketone = 5:1). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁷⁷ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 12.12 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.26 – 2.13 (m, 4H), 1.69 – 1.51 (m, 4H).

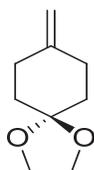
Methyl 3-hexyl-2-oxo-1-(phenylselanyl)cyclohexanecarboxylate (**4-3**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (5.71 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (2.0 mL). Methyl 2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-2**) (409.1 mg, 2.62 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1-iodohexane (0.57 mL, 3.86 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir overnight. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (15 mL) and extracted with EtOAc (5 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-hexyl-2-oxocyclohexanecarboxylate as a yellow oil (477.7 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (298.8 mg, 1.27 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (110 μL, 1.36 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 3-hexyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (105.4 mg, 0.44 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was allowed to warm up till room temperature and stirred for 4 h. Aqueous 1 N HCl (10 mL) was added and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown solid. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-hexyl-2-oxo-1-(phenylselanyl)cyclohexanecarboxylate (**4-3**) as an orange oil (148.0 mg, 65% over two steps). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7.54 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz), 7.30 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz),

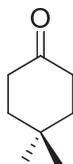
3.70 (s, 3H), 2.46 – 2.31 (m, 2H), 2.11 – 2.02 (m, 1H), 1.99 – 1.81 (m, 2H), 1.73 (d, 1H, J = 13.9 Hz), 1.60 – 1.48 (m, 1H), 1.27 (br s, 10H), 0.88 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 205.37, 169.64, 138.47, 129.52, 128.79, 125.96, 63.38, 52.72, 50.44, 39.18, 34.42, 31.80, 29.50, 29.39, 26.98, 24.26, 22.72, 14.19. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₂₀H₂₈O₃SeNa: 419.1097, found: 419.1090. IR (neat) ν 2928, 2857, 1710, 1437, 1224 cm⁻¹.

8-methylene-1,4-dioxaspiro[4.5]decane (4-7)



In a 3-neck round bottom flask, methyltriphenylphosphonium bromide (34.8 g, 97.4 mmol) was dissolved in Et₂O (150 mL) at room temperature under argon. Then, *t*BuOK (12.2 g, 109 mmol) was added to the stirring mixture, it turned yellow. After 1 h of additional stirring, 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**3-3**) (7.6 g, 48.8 mmol) as added as a solution in Et₂O (150 mL). The mixture was stirred overnight. H₂O (100 mL) was added and the layers were separated. The aqueous one was extracted with Et₂O (2 × 300 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown solid. Purification of the crude material by silica gel chromatography afforded 8-methylene-1,4-dioxaspiro[4.5]decane (**4-7**) as a colorless oil (6.2 g, 82%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹¹⁷ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 4.67 (s, 2H), 3.97 (s, 4H), 2.31 – 2.25 (m, 4H), 1.73 – 1.67 (m, 4H).

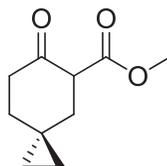
Spiro[2.5]octan-6-one (4-8)



A round bottom flask was charged with 8-methylene-1,4-dioxaspiro[4.5]decane (**4-7**) (1.5 g, 10 mmol) and toluene (2.5 mL) under argon. The solution was stirred between –20 °C and –40 °C when Et₂Zn (1.0 M in hexanes, 21.0 mL, 21 mmol) was added dropwise. After 20 min of additional stirring, diiodomethane (3.4 mL, 42 mmol) was added over 20 min. The mixture was allowed to warm up till room temperature and stir overnight. It was poured into ice-cold aqueous saturated NH₄Cl (50 mL) and extracted with Et₂O (4 × 20 mL). The combined organic layers were washed with aqueous saturated Na₂S₂O₃ (3 × 20 mL), H₂O (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give 7,10-dioxa-dispiro

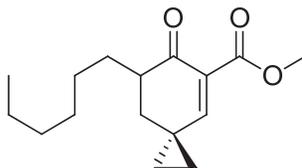
[2.2.4.2] dodecane as a yellow oil (2.1 g). Under argon, 7,10-dioxa-dispiro [2.2.4.2] dodecane (2.1 g, 10 mmol) was dissolved in THF (12.5 mL) and water (10.0 mL) at room temperature. Trifluoroacetic acid (5.0 mL, 65 mmol) was added to the stirring solution. After 20 h of additional stirring, the mixture was quenched with aqueous saturated NaHCO₃ (20 mL) and aqueous 2 N NaOH (30 mL). The mixture was extracted with Et₂O (4 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 15 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by distillation (0 mmHg, 30 °C) afforded spiro[2.5]octan-6-one (**4-8**) as a colorless oil (459.2 mg, 37% over two steps). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁷⁸ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 2.41 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz), 1.67 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz), 0.48 (s, 4H).

Methyl 6-oxospiro[2.5]octane-5-carboxylate (**4-9**)



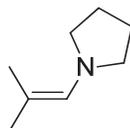
In a flame-dried 2-neck round bottom flask, NaH (60% in oil, 391.6 mg, 9.79 mmol) was suspended in THF (2.0 mL) under argon at room temperature. Dimethyl carbonate (0.70 mL, 8.32 mmol) was added and the melange was stirred at reflux. spiro[2.5]octan-6-one (**4-8**) (390.2 mg, 3.14 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.5 mL + 0.5 mL for rinsing). After the first drops, KH (30% in oil, catalytic amount) was added in one portion. The reaction was continued stirring at reflux for five additional hours. At 0 °C, it was quenched with the cautious addition of aqueous 3 M AcOH (5 mL); the mixture was allowed to warm up till room temperature and was poured into brine (5 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 6-oxospiro[2.5]octane-5-carboxylate (**4-9**) as a yellow oil (345.7 mg, 60%). Enol (major tautomer) ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 12.15 (s, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.33 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz), 2.04 (s, 2H), 1.44 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 0.32 (d, 4H, *J* = 6.1 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 172.86, 172.59, 97.70, 51.39, 32.20, 30.33, 28.93, 16.06, 12.19. Ketone (minor tautomer) ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 206.40, 170.48, 56.51, 52.14, 40.62, 38.02, 35.32, 17.07, 12.03, 11.75. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₀H₁₄O₃Na – 2H: 203.0679, found: 203.0679. IR (neat) ν 2995, 2933, 2854, 1746, 1716, 1653, 1613, 1440, 1280, 1230, 1197 cm⁻¹.

Methyl 7-hexyl-6-oxospiro[2.5]oct-4-ene-5-carboxylate (**4-10**)



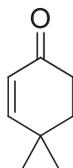
In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.48 mmol) was prepared under argon at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in THF (1.0 mL). Methyl 6-oxospiro[2.5]octane-5-carboxylate (**4-9**) (206.1 mg, 1.13 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stirring was continued for 1 h. Then, 1-iodohexane (0.25 mL, 1.69 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 24 h. At $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5×5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 7-hexyl-6-oxospiro[2.5]octane-5-carboxylate as a yellow oil (212.1 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (270.5 mg, 1.15 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ when pyridine (100 μL , 1.23 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 7-hexyl-6-oxospiro[2.5]octane-5-carboxylate (99.9 mg, 0.38 mmol) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight and diluted with more CH_2Cl_2 (2.5 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (10 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2×5 mL). All the combined organic layers were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a brown solid. It was dissolved in CH_2Cl_2 (2.0 mL); the yellow solution was stirred at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ opened to air when aqueous H_2O_2 (50% wt., 0.12 mL, 2.1 mmol) was added dropwise. After 1 h of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (5 mL). The organic layer was washed with H_2O (5 mL), aqueous saturated NaHCO_3 (2×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 7-hexyl-6-oxospiro[2.5]oct-4-ene-5-carboxylate (**4-10**) as a white solid (47.7 mg, 33% over three steps). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 7.02 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.57 – 2.45 (m, 1H), 1.85 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 1.41 – 1.34 (m, 1H), 1.28 (br s, 9H), 1.17 – 1.02 (m, 4H), 0.93 – 0.82 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 197.28, 165.50, 164.74, 129.54, 52.31, 36.21, 31.90, 29.53, 29.50, 27.17, 22.83, 20.47, 18.34, 16.92, 14.30. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$: 287.1618, found: 287.1611. IR (neat) ν 2926, 2847, 1698, 1600, 1437, 1255, 1233 cm^{-1} .

1-(2-Methylprop-1-en-1-yl)pyrrolidine (**4-12**)



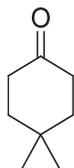
A 3-neck round bottom flask was filled with isobutyraldehyde (27.5 mL, 300 mmol) under argon at room temperature. Pyrrolidine (25.0 mL, 300 mmol) was added slowly via an addition funnel. The resulting mélange was refluxed with a Dean-Stark trap until the collection of water ceased (about 4 h). The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and distilled (room temperature, < 1 Torr) to afford 1-(2-methylprop-1-en-1-yl)pyrrolidine (**4-12**) as a colorless oil (32.9 g, 87%). The spectral data was consistent with that previously reported.¹²⁰ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 5.61 (s, 1H), 2.93 (t, 4H, $J = 6.1$ Hz), 1.81 – 1.74 (m, 4H), 1.69 (s, 3H), 1.62 (s, 3H).

4,4-Dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**)



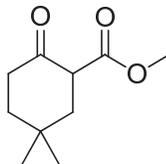
In a flame-dried round bottom flask, 1-(2-methylprop-1-en-1-yl)pyrrolidine (**4-12**) (32.9 g, 262 mmol) was added and stirred at 0 °C under argon. Then, freshly distilled methyl vinyl ketone (25.5 mL, 314 mmol) was slowly added via an addition funnel. Stirring was continued for 15 min at 0 °C and the mélange was allowed to warm up till room temperature. After 4 h of additional stirring, the reaction mixture was cooled again to 0 °C and aqueous 8 M HCl (130 mL) was added dropwise via an addition funnel. Stirring was continued for 10 min; the mélange was allowed to warm up till room temperature and stir for 16 h. The obtained brown mixture was extracted with Et₂O (2 × 160 mL). The aqueous layer was neutralized by the cautious addition of solid NaHCO₃ (80 g) and extracted with Et₂O (3 × 200 mL). All the combined ethereal layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a red oil. Purification of the crude material by distillation (< 1 mmHg, 31 °C) afforded 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**) as a colorless oil (24.9 g, 76 %). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁷⁹ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 6.65 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz), 5.82 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz), 2.44 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.85 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.15 (s, 6H).

4,4-Dimethylcyclohexanone (4-14)



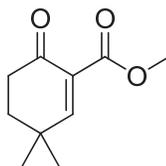
In a 2-neck round bottom flask, 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**) (11.6 g, 93.4 mmol) was solubilized in ethanol (60 mL) and stirred under argon at room temperature. A suspension of Pd/C (5% wt., 729 mg, 0.4 mol%) in ethanol (20 mL) was prepared and added to the previous solution. The melange was cooled to 0 °C and degassed three times with argon. Then, the atmosphere was switched for hydrogen (1 atm) and the reaction was allowed to warm up till room temperature and stir for 2 h. Complete conversion was assured by ¹H NMR. The resulting mixture was filtered on celite using CH₂Cl₂. The solvent was removed under vacuum to afford 4,4-dimethylcyclohexanone (**4-14**) as a white solid (10.7 g, 91%). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁸⁰ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 2.33 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 1.66 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 1.08 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 212.77, 39.22, 38.13, 30.00, 27.61.

Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (4-15)



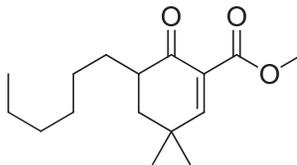
In a flame-dried 2-neck round bottom flask, NaH (60% in oil, 12.2 g, 305 mmol) was suspended in THF (50 mL) under argon at room temperature. Dimethyl carbonate (16.0 mL, 190 mmol) was added and the melange was stirred at reflux. 4,4-dimethylcyclohexanone (**4-14**) (9.6 g, 76 mmol) was added dropwise as a solution in THF (20 mL + 2 × 5 mL for rinsing) over 3 h. After the first drops, KH (30% in oil, catalytic amount) was added in one portion. The reaction was continued stirring at reflux for two additional hours. At 0 °C, it was quenched with the cautious addition of aqueous 3 M AcOH (120 mL); the mixture was allowed to warm up till room temperature and was poured into brine (100 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (5 × 100 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by distillation (< 1 Torr, 74 - 76 °C) afforded methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) as a colorless oil (10.1 g, 72%). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁸¹ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 12.14 (s, 1H), 2.29 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 2.02 (s, 2H), 1.44 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 0.95 (s, 6H).

Methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17a**)



In a round bottom flask, PhSeBr (163.5 mg, 0.69 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.5 mL) under argon. The brown solution was stirred at 0 °C when pyridine (60 μL, 0.74 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, a solution of methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (102.6 mg, 0.56 mmol) in CH₂Cl₂ (0.3 mL + 0.2 mL for rinsing) was added dropwise. The reaction was stirred at 0 °C for 5 h and diluted with more CH₂Cl₂ (4 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 6 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (4.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt., 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 1 h of additional stirring, the resulting mixture was successively washed with water (10 mL), aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 10 mL), brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a pale yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17a**) as a yellow oil (58.2 mg, 57%). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁸⁰ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7.35 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.53 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 1.89 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 1.22 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 194.59, 165.44, 164.77, 130.04, 52.38, 35.53, 35.35, 33.66, 27.48.

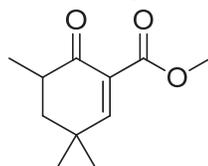
Methyl 5-hexyl-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17b**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.40 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (204.1 mg, 1.11 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1-iodohexane (0.25 mL, 1.69 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5%

EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-hexyl-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16b**) as a yellow oil (256.8 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, DDQ (57.2 mg, 0.25 mmol) was dissolved in THF (0.5 mL). The solution was stirred at room temperature under argon when methyl 3-hexyl-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16b**) (49.7 mg, 0.19 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.3 mL + 0.2 mL for rinsing). Stirring was continued for 24 h; the reaction was quenched with water (2 mL) and extracted with EtOAc (5 × 6 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a red-brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5-hexyl-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17b**) as a yellow oil (19.8 mg, 34% over two steps). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7.25 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 3.79 (s, 3H), 2.49 – 2.44 (m, 1H), 1.93 – 1.86 (m, 2H), 1.65 (t, 1H, *J* = 13.7 Hz), 1.38 – 1.26 (m, 9H), 1.24 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 197.09, 165.79, 163.13, 130.24, 52.35, 43.59, 41.83, 33.91, 31.87, 30.36, 29.53, 29.03, 26.88, 25.40, 22.77, 14.24. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₆H₂₆O₃Na: 289.1774, found: 289.1784. IR (neat) ν 2955, 2925, 2857, 1745, 1719, 1686 cm⁻¹.

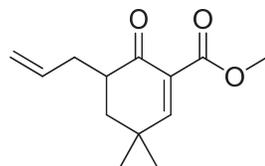
Methyl 3,3,5-trimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17c**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.34 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (215.8 mg, 1.17 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, iodomethane (80 μL, 1.29 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir overnight. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3,5,5-trimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16c**) as a yellow oil (150.0 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (140.1 mg, 0.59 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (50 μL, 0.62 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 3,5,5-trimethyl-2-

oxocyclohexanecarboxylate (**4-16c**) (100.0 mg, 0.50 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 4 h and diluted with more CH₂Cl₂ (3 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt., 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 1 h of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a pale yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3,3,5-trimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17c**) as a yellow oil (58.4 mg, 39% over two steps). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.25 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.69 – 2.56 (m, 1H), 1.83 (ddd, 1H, *J* = 2.3, 4.9, 13.5 Hz), 1.69 (t, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.12 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 197.31, 165.72, 163.38, 129.98, 52.30, 44.61, 38.67, 33.97, 30.28, 25.43, 14.87. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₁H₁₆O₃: 219.992, found: 219.1000. IR (neat) ν 2962, 1743, 1718, 1686, 1285, 1258 cm⁻¹.

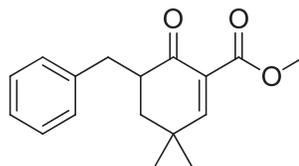
Methyl 5-allyl-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17d**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.40 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (203.0 mg, 1.10 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, allyl bromide (0.15 mL, 1.73 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-allyl-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16d**) as a yellow oil (210.7 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, potassium

carbonate (76.5 mg, 0.55 mmol), DDQ (57.2 mg, 0.25 mmol) and THF (2.0 mL) were added. The mixture was stirred at room temperature under argon when methyl 3-allyl-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16d**) (101.5 mg, 0.45 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). Stirring was continued for 6 h; the reaction was quenched with water (4 mL) and extracted with EtOAc (7 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5-allyl-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17d**) as a yellow oil (45.9 mg, 39% over two steps). The spectral data were consistent with that previously reported.¹²² ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7.28 (s, 1H), 5.82 – 5.72 (m, 1H), 5.06 (d, 1H), 5.05 (d, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.74 – 2.65 (m, 1H), 2.61 – 2.53 (m, 1H), 2.12 – 2.05 (m, 1H), 1.89 (dm, 1H, *J* = 13.5 Hz), 1.63 (t, 1H, *J* = 13.9 Hz), 1.24 (s, 3H), 1.20 (s, 3H).

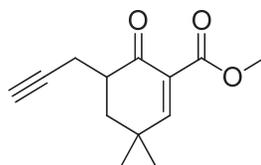
Methyl 5-benzyl-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-175e**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.40 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (203.9 mg, 1.11 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, benzyl bromide (0.20 mL, 1.68 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-benzyl-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16e**) as a yellow oil (303.4 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, DDQ (97.8 mg, 0.43 mmol) was dissolved in THF (0.5 mL). The mixture was stirred at room temperature under argon when methyl 3-benzyl-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16e**) (102.6 mg, 0.37 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). Stirring was continued overnight; hexanes were added and the suspension was filtered. The liquid layer was concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 10% EtOAc in hexanes) afforded

methyl 5-benzyl-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17e**) as a pale brown oil (40.5 mg, 40% over two steps). ^1H NMR (CD_2Cl_2 , 400 MHz) δ (ppm) 7.28 – 7.15 (m, 6H), 3.73 (s, 3H), 3.35 (dd, 1H, $J = 4.0, 14.0$ Hz), 2.81 – 2.75 (m, 1H), 2.43 (dd, 1H, $J = 9.0, 14.0$ Hz), 1.75 – 1.68 (m, 1H), 1.59 (t, 1H, $J = 13.7$ Hz), 1.12 (s, 3H), 1.11 (s, 3H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 100 MHz) δ (ppm) 196.17, 165.32, 163.32, 140.22, 130.23, 129.46, 128.86, 126.37, 52.27, 45.45, 41.36, 35.35, 33.99, 30.17, 25.02. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_3$: 295.1305, found: 295.1314. IR (neat) ν 2958, 1742, 1717, 1690, 1271, 1258 cm^{-1} .

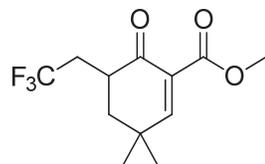
Methyl 3,3-dimethyl-6-oxo-5-(prop-2-yn-1-yl)cyclohex-1-enecarboxylate (**4-17f**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.41 mmol) was prepared under argon at -78 $^\circ\text{C}$ in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (199.3 mg, 1.08 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 $^\circ\text{C}$ and stirring was continued for 1 h. Then, propargyl bromide (80% wt in toluene, 185 μL , 1.66 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 21 h. At 0 $^\circ\text{C}$, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5×5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-3-(prop-2-yn-1-yl)cyclohexanecarboxylate (**4-16f**) as a yellow oil (176.8 mg confirmed by mass spectrometry). In a 2-neck flame-dried round bottom flask, methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-3-(prop-2-yn-1-yl)cyclohexanecarboxylate (**4-16f**) (98.0 mg, 0.44 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (2.0 mL). The solution was stirred under argon at room temperature when potassium carbonate (165.7 mg, 1.20 mmol) and DDQ (159.7 mg, 0.70 mmol) were added and the reaction was refluxed for 4 h. The mixture was allowed to cool down to room temperature. Water (10 mL) was added and extracted with EtOAc (4×20 mL). The combined organic layers were washed brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to afford a brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) gave methyl 3,3-dimethyl-6-oxo-5-(prop-2-yn-1-yl)cyclohex-1-enecarboxylate (**4-17f**) as a white solid (44.7 mg, 34% over two steps). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 7.34 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 3.80 (s, 3H), 2.81 (ddd, 1H, $J = 2.7, 4.0, 17.0$ Hz), 2.76 – 2.68 (m, 1H), 2.30 (ddd, 1H, $J = 2.6, 8.7, 17.0$ Hz), 2.17 (ddd, 1H, $J =$

2.3, 4.6, 13.4 Hz), 1.98 (t, 1H, $J = 2.7$ Hz), 1.78 (t, 1H, $J = 13.8$ Hz), 1.29 (s, 3H), 1.24 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 194.59, 165.30, 164.37, 129.58, 81.98, 70.11, 52.43, 42.82, 41.09, 34.03, 30.27, 25.31, 18.86. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$: 243.0992, found: 243.0995. IR (neat) ν 3262, 2967, 1716, 1684, 1259 cm^{-1} .

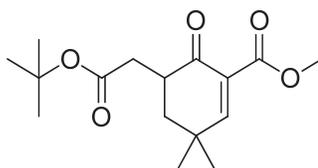
Methyl 3,3-dimethyl-6-oxo-5-(2,2,2-trifluoroethyl)cyclohex-1-enecarboxylate (**4-17g**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.42 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (0.5 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (203.8 mg, 1.11 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1,1,1-trifluoro-2-iodoethane (130 μL , 1.33 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (4×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded a yellow oil (136.3 mg). PhSeBr (138.1 mg, 0.59 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (50 μL , 0.62 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, the yellow oil (136.3 mg) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The resulting mixture was stirred for 23 h at 0 °C under argon and diluted with CH_2Cl_2 (5.0 mL). The organic layer was successively washed with aqueous 1 N HCl (3×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to afford an orange oil. It was taken in CH_2Cl_2 (3.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when H_2O_2 (50% wt., 0.5 mL, 8.65 mmol). After 40 min of vigorous stirring, CH_2Cl_2 (5 mL) was added; the organic layer was successively washed with aqueous saturated NaHCO_3 (3×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3,3-dimethyl-6-oxo-5-(2,2,2-trifluoroethyl)cyclohex-1-enecarboxylate (**4-17g**) as a yellow oil (20.1 mg, 7% over two steps). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.35 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 3.81 (s, 3H), 3.18 – 3.0 (m, 1H), 2.93 – 2.83 (m, 1H), 2.14 (ddd, 1H, $J = 13.0, 4.2, 1.7$ Hz), 2.05 – 1.84 (m, 1H), 1.76 (t, 1H, $J = 13.9$ Hz), 1.30 (s, 3H), 1.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 193.23,

164.99, 164.10, 129.22, 125.40, 52.51, 41.93, 38.76 (q, $J = 2.2$ Hz), 33.97, 32.74 (q, $J = 28.9$ Hz), 30.18, 24.99. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{12}H_{15}F_3O_3$: 287.0866, found: 287.0870. IR (neat) ν 2957, 1745, 1717, 1690, 1252 cm^{-1} .

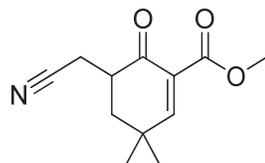
Methyl 5-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (4-17h)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.47 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (210.4 mg, 1.14 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, *tert*-butyl bromoacetate (250 μ L, 1.69 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16h**) as a yellow oil (164.0 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (175.4 mg, 0.74 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (61 μ L, 0.75 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 3-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16h**) (93.5 mg) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The resulting mixture was stirred for 22 h at 0 °C under argon and diluted with CH_2Cl_2 (8.0 mL). The organic layer was successively washed with aqueous 1 N HCl (3 \times 5 mL), brine (3 \times 5 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to afford a yellow oil. It was taken in CH_2Cl_2 (4.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when H_2O_2 (50% wt., 0.5 mL, 8.65 mmol). After 30 min of vigorous stirring, CH_2Cl_2 (6 mL) and water (5 mL) were added; the layers were separated. The organic layer was successively washed with aqueous saturated $NaHCO_3$ (2 \times 5 mL), brine (2 \times 5 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17h**) as a white solid (36.0 mg, 19% over two steps, mp = 47 – 49 °C). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm) 7.30 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 3.79 (s, 3H), 3.10 – 2.97 (m,

1H), 2.86 (dd, 1H, $J = 16.6, 5.2$ Hz), 2.15 (dd, 1H, $J = 16.6, 7.4$ Hz), 1.90 (ddd, 1H, $J = 13.3, 4.8, 2.2$ Hz), 1.76 (t, 1H, $J = 13.6$ Hz), 1.46 (s, 9H), 1.29 (s, 3H), 1.21 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 195.07, 171.62, 165.37, 163.92, 129.56, 80.82, 52.41, 41.93, 40.84, 35.52, 34.08, 30.26, 28.25, 25.16. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Na}$: 319.1516, found: 319.1525. IR (neat) ν 2976, 1724, 1364, 1147, 1125 cm^{-1} .

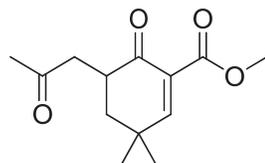
Methyl 5-(cyanomethyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (4-17i)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (9.88 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (4.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (828.8 mg, 4.50 mmol) was added dropwise as a solution in THF (2.0 mL + 2×1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, bromoacetonitrile (0.63 mL, 9.04 mmol) was quickly added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 21 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (30 mL) and extracted with EtOAc (5×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×15 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(cyanomethyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16i**) as an orange oil (145.2 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (588.4 mg, 2.49 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (0.29 mL, 3.13 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 3-(cyanomethyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16i**) (139.0 mg) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The resulting mixture was stirred for 20 h at 0 °C under argon and diluted with CH_2Cl_2 (12.0 mL). The organic layer was successively washed with aqueous 1 N HCl (3×5 mL), brine (3×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to afford a brown oil. It was taken in CH_2Cl_2 (5.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when H_2O_2 (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol). After 30 min of vigorous stirring, CH_2Cl_2 (10 mL) and water (5 mL) were added; the layers were separated. The organic layer was successively washed with aqueous saturated NaHCO_3 (2×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20 to 30% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5-(cyanomethyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17i**) as a yellow oil

(84.8 mg, 9% over two steps). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.40 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 3.80 (s, 3H), 2.95 – 2.86 (m, 2H), 2.49 (dd, 1H, $J = 18.1, 9.5$ Hz), 2.15 (ddd, 1H, $J = 13.4, 4.4, 2.2$ Hz), 1.86 (t, 1H, $J = 13.6$ Hz), 1.33 (s, 3H), 1.26 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 192.61, 164.93, 164.62, 128.92, 118.22, 52.56, 41.21, 40.67, 34.19, 30.12, 25.25, 17.96. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Na}$: 244.0944, found: 244.0950. IR (neat) ν 2959, 2249, 1737, 1684, 1275, 1256, 1218 cm^{-1} .

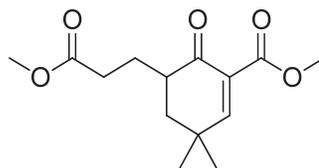
Methyl 3,3-dimethyl-6-oxo-5-(2-oxopropyl)cyclohex-1-enecarboxylate (**4-17j**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (9.62 mmol) was prepared under argon at -78 $^{\circ}\text{C}$ in THF (3.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (801.1 mg, 4.35 mmol) was added dropwise as a solution in THF (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 $^{\circ}\text{C}$ and stirring was continued for 1 h. Then, chloroacetone (0.69 mL, 8.67 mmol) was quickly added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 21 h. At 0 $^{\circ}\text{C}$, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (30 mL) and extracted with EtOAc (5×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×15 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-3-(2-oxopropyl)cyclohexanecarboxylate (**4-16j**) as an orange oil (215.4 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (680.1 mg, 2.88 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 $^{\circ}\text{C}$ when pyridine (0.33 mL, 3.56 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-3-(2-oxopropyl)cyclohexanecarboxylate (**4-16j**) (171.7 mg) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The resulting mixture was stirred for 18 h at 0 $^{\circ}\text{C}$ under argon and diluted with CH_2Cl_2 (11 mL). The organic layer was successively washed with aqueous 1 N HCl (3×5 mL), brine (3×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to afford a brown oil. It was taken in CH_2Cl_2 (5.0 mL); the solution was stirred at 0 $^{\circ}\text{C}$ opened to air when H_2O_2 (50% wt., 0.5 mL, 8.65 mmol). After 100 min of vigorous stirring, CH_2Cl_2 (10 mL) and water (5 mL) were added; the layers were separated. The organic layer was successively washed with aqueous saturated NaHCO_3 (2×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by two silica gel chromatographies (20 to 30% EtOAc in hexanes and then 5% acetonitrile in toluene) afforded methyl 3,3-dimethyl-6-oxo-5-(2-

oxopropyl)cyclohex-1-enecarboxylate (**4-17j**) as a white solid (37.8 mg, 4% over two steps, mp = 53 – 55 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.29 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 3.80 (s, 3H), 2.69 (dd, 1H, *J* = 14.6, 4.5 Hz), 2.64 (d, 1H, 4.4 Hz), 2.55 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz), 1.89 (ddd, 1H, *J* = 13.5, 4.5, 2.3 Hz), 1.57 (t, 1H, 14.0 Hz), 1.47 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.22 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 194.21, 165.23, 163.69, 130.12, 55.98, 52.41, 50.94, 49.20, 37.46, 33.92, 30.33, 25.04, 21.87. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₃H₁₈O₄Na: 261.1097, found: 261.1113. IR (neat) ν 2944, 1709, 1682, 1265, 1226 cm⁻¹.

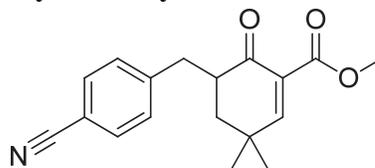
Methyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (4-17k)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (3.50 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (201.3 mg, 1.09 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, methyl acrylate (0.15 mL, 1.67 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(3-methoxy-3-oxopropyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16k**) as an orange oil (162.6 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (400.1 mg, 1.70 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (0.17 mL, 1.84 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 3-(3-methoxy-3-oxopropyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16k**) (143.3 mg) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The resulting mixture was stirred for 23 h at 0 °C under argon and diluted with CH₂Cl₂ (10 mL). The organic layer was successively washed with aqueous 1 N HCl (3 × 5 mL), brine (3 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. It was taken in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol). After 20 min of vigorous stirring, CH₂Cl₂ (5 mL) and water (5 mL) were added; the layers were separated. The organic layer was successively washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 5 mL), brine (2 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the

crude material by silica gel chromatography (5% to 30% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17k**) as a colorless oil (40.7 mg, 16% over two steps). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ (ppm) 7.20 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 2.58 – 2.51 (m, 1H), 2.43 – 2.36 (m, 2H), 2.17 – 2.07 (m, 1H), 1.87 – 1.81 (m, 1H), 1.68 (d, 1H, *J* = 13.8 Hz), 1.61 – 1.50 (m, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.17 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 196.29, 173.71, 165.19, 162.79, 130.00, 51.97, 51.46, 42.63, 41.88, 33.82, 31.45, 29.94, 24.91, 24.70. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₄H₂₀O₅Na: 291.1203, found: 291.1211. IR (neat) ν 2954, 1733, 1685, 1267, 1218, 1168 cm⁻¹.

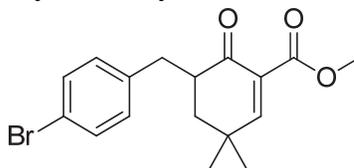
Methyl 5-(4-cyanobenzyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17l**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.59 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (199.5 mg, 1.08 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 4-(bromomethyl)benzonitrile (325.6 mg, 1.66 mmol) was added in one portion; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 18 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (1% to 10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(4-cyanobenzyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16l**) as a colorless oil (262.1 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, LDA (0.20 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (0.5 mL). Methyl 3-(4-cyanobenzyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16l**) (96.3 mg, 0.32 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.2 mL for rinsing). After 15 min of additional stirring, PhSeBr (105.3 mg, 0.45 mmol) was also added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.3 mL for rinsing); the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 90 min. At 0 °C, the reaction was quenched with brine (5 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. It was taken in CH₂Cl₂ (3.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when H₂O₂ (50% wt, 0.3 mL, 5.19 mmol) was added dropwise. After 30 min of vigorous stirring, CH₂Cl₂ (10 mL) was added. The

organic layer was successively washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 5 mL), brine (2 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a colorless oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% to 30% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5-(4-cyanobenzyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17i**) as a white solid (56.4 mg, 48% over two steps, mp = 93 – 96 °C). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ (ppm) 7.58 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 7.30 (d; 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.23 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 3.73 (s, 3H), 3.37 (dd, 1H, *J* = 14.0, 4.8 Hz), 2.90 – 2.74 (m, 1H), 2.57 (dd, 1H, *J* = 14.0, 8.2 Hz), 1.73 – 1.56 (m, 2H), 1.13 (s, 6H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz) δ (ppm) 195.19, 165.05, 163.18, 145.87, 132.25, 130.11, 129.84, 118.99, 110.18, 52.03, 44.93, 41.29, 35.42, 33.81, 29.89, 24.79. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₈H₁₉O₃NNa: 320.1257, found: 320.1258. IR (neat) ν 2953 □ 2226, 1729, 1683, 1377, 1280, 1256, 1052, 866 cm⁻¹.

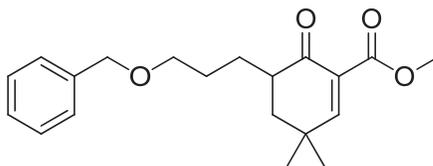
Methyl 5-(4-bromobenzyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17m**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (5.02 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (2.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (402.6 mg, 2.19 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 4-bromobenzyl bromide (609.8 mg, 2.44 mmol) was added in one portion; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 20 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (1% to 3% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(4-bromobenzyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16m**) as a yellow oil (615.0 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, LDA (0.31 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (0.5 mL). Methyl 3-(4-bromobenzyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16m**) (98.0 mg, 0.28 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). After 30 min of additional stirring, PhSeBr (106.0 mg, 0.45 mmol) was also added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing); the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 90 min. At 0 °C, the reaction was quenched with brine (5 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. It was

taken in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 30 min of vigorous stirring, CH₂Cl₂ (5 mL) was added. The organic layer was successively washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 5 mL), brine (2 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a pale yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5-(4-bromobenzyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17m**) as a white solid (35.6 mg, 29% over two steps, mp = 53 – 55 °C). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ (ppm) 7.42 – 7.36 (m, 2H), 7.21 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.10 – 7.03 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.28 (dd, 1H, *J* = 14.4, 4.5 Hz), 2.81 – 2.67 (m, 1H), 2.45 (dd, 1H, *J* = 14.4, 8.5 Hz), 1.70 (ddd, 1H, *J* = 13.4, 4.9, 2.2 Hz), 1.58 (t, 1H, *J* = 13.7 Hz), 1.12 (s, 6H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂, 75 MHz) δ (ppm) 195.56, 165.17, 163.11, 139.10, 131.43, 131.12, 129.92, 119.83, 52.01, 45.05, 41.08, 34.56, 33.75, 29.90, 24.77. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₇H₁₉O₃BrNa: 373.0409, found: 373.0420. IR (neat) ν 2952, 1716, 1701, 1488, 1432, 1265, 988 cm⁻¹.

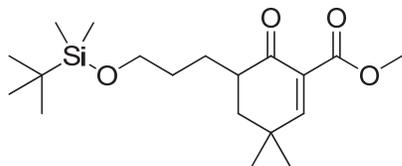
Methyl 5-(3-(benzyloxy)propyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17n**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.53 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (200.2 mg, 1.09 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, ((3-iodopropoxy)methyl)benzene (455.0 mg, 1.65 mmol) was added as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing); the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 21 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (3 mL) and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% to 5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(3-(benzyloxy)propyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16n**) as a pale yellow oil (281.4 mg confirmed by mass spectrometry). In flame-dried round bottom flask, methyl 3-(3-(benzyloxy)propyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16n**) (202.8 mg, 0.61 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (4.0 mL). The solution was stirred under argon at room temperature when potassium carbonate (251.4 mg, 1.82 mmol) and DDQ (209.5 mg, 0.92 mmol) were added and the reaction was refluxed for 3 h. The mixture was allowed to cool down to room temperature. Water (3 mL) was added and extracted with

EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed water (2 × 10 mL), brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) gave methyl 5-(3-(benzyloxy)propyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17n**) as a pale red oil (93.8 mg, 37% over two steps). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.35 – 7.32 (m, 4H), 7.31 – 7.27 (m, 1H), 7.25 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 4.50 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.50 (td, 2H, *J* = 6.4, 1.8 Hz), 2.57 – 2.46 (m, 1H), 2.05 – 1.93 (m, 1H), 1.88 (ddd, 1H, *J* = 13.4, 4.7, 2.2 Hz), 1.74 – 1.61 (m, 3H), 1.46 – 1.33 (m, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.19 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 196.83, 165.67, 163.15, 138.72, 130.17, 128.49, 127.81, 127.65, 73.06, 70.55, 52.33, 43.44, 41.97, 33.95, 30.34, 27.23, 26.02, 25.34. IR (neat) ν 2958, 1743, 1717, 1685, 1454, 1434, 1363, 1264, 1099 cm⁻¹.

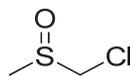
Methyl 5-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (4-17o)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.53 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (199.5 mg, 1.08 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, *tert*-butyl(3-iodopropoxy)dimethylsilane (495.8 mg, 1.65 mmol) was added as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing); the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 21 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (3 mL) and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (1% to 3% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16o**) as a pale yellow oil (291.6 mg confirmed by mass spectrometry). In flame-dried round bottom flask, methyl 3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)-5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-16o**) (190.2 mg, 0.61 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (4.0 mL). The solution was stirred under argon at room temperature when potassium carbonate (245.4 mg, 1.78 mmol) and DDQ (191.8 mg, 0.84 mmol) were added and the reaction was refluxed for 3 h. The mixture was allowed to cool down to room temperature. Water (5 mL) was added and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed water (2 ×

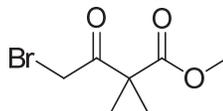
10 mL), brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) gave methyl 5-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)-3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17o**) as a pale red oil (123.1 mg, 50% over two steps). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.25 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 3.79 (s, 3H), 3.62 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 2.56 – 2.44 (m, 1H), 2.01 – 1.84 (m, 2H), 1.67 (t, 1H, *J* = 14.2 Hz), 1.57 (dd, 2H, *J* = 8.9, 6.8 Hz), 1.40 – 1.28 (m, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 0.89 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 196.81, 165.71, 163.09, 130.21, 63.40, 52.32, 43.45, 42.02, 33.94, 30.36, 30.24, 26.13, 25.62, 25.42, 18.51, - 5.14. IR (neat) ν 2955, 1746, 1721, 1689, 1257, 1095 cm⁻¹.

Chloro(methylsulfinyl)methane (**4-18**)



Dimethyl sulfoxide (1.0 mL, 14 mmol) and CH₂Cl₂ (10 mL) were stirred in a round bottom flask at room temperature opened to air. *N*-chlorosuccinimide (2.0 g, 15 mmol) and potassium carbonate (500 mg, 3.6 mmol) were added; the mixture was stirred for 30 min, filtrated and concentrated to give a colorless oil. Purification of the crude material by distillation (< 1 Torr, 55 - 67 °C) afforded chloro(methylsulfinyl)methane (**4-18**) as a colorless oil (1.2 g, 76%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸² ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 4.38 (s, 2H), 2.70 (s, 3H).

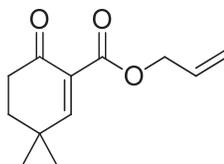
Methyl 4-bromo-2,2-dimethyl-3-oxobutanoate (**4-19**)



In a flame-dried sealing tube, methyl 3-oxobutanoate (2.2 mL, 20.4 mmol) was dissolved in acetone under argon. The solution was stirred at 0 °C when iodomethane (3.7 mL, 59.4 mmol) and then potassium carbonate (13.8 g, 99.8 mmol) were added. The tube was sealed and the mixture was reflux for 21 h. It was allowed to cool down to room temperature, filtered and concentrated. The residue was taken in water (30 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (5 × 15 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford methyl 2,2-dimethyl-3-oxobutanoate as a colorless oil (2.5 g, 84%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸³ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 3.73 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.37 (s, 6H). CuBr₂ (5.6 g, 25.1 mmol) was stirred at reflux in EtOAc (9.0 mL) in a round bottom flask under argon. Methyl 2,2-dimethyl-3-oxobutanoate (1.4 g, 9.7 mmol) was added dropwise as a solution in EtOAc (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). Reflux was continued for 20 h and the mixture was allowed to cool down to room temperature, filtrated and concentrated to give a

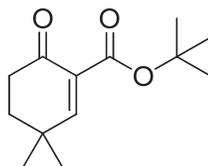
pale green oil. Purification of the crude material by distillation (< 1 Torr, 69 °C) afforded methyl 4-bromo-2,2-dimethyl-3-oxobutanoate (**4-19**) as a pale yellow oil (752.7 mg, 35%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸³ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 4.12 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 1.46 (s, 6H).

Allyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**5-1**)



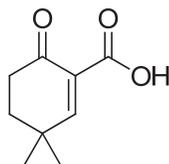
In a flame-dried round bottom flask, a solution of Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (219.2 mg, 1.19 mmol) in allyl alcohol (5.0 mL) was stirred under argon at room temperature. 4-(dimethylamino)pyridine (213.3 mg, 1.75 mmol) and 4 Å molecular sieves (500.8 mg) were added, the tube was sealed and heated at reflux for 48 h. The mixture was allowed to cool down to room temperature, aqueous 1 N HCl (10 mL) was added and the melange was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% EtOAc in hexanes) gave a mixture of methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (0.09 mmol) and allyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (0.68 mmol) as a pale yellow oil (158.1 mg). In a flame-dried round bottom flask, the previous melange (158.1 mg, 0.77 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (2.0 mL). The solution was stirred under argon at room temperature when potassium carbonate (169.9 mg, 1.23 mmol) and DDQ (233.1 mg, 1.02 mmol) were added and the reaction was heated at 100 °C for 4 h. Conversion appeared complete by TLC (SiO₂, 10% EtOAc in hexanes), the mixture was allowed to cool down to room temperature. Water (10 mL) was added and extracted with EtOAc (4 × 20 mL). The combined organic layers were washed brine (4 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 10% EtOAc in hexanes) gave allyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**5-1**) as an orange oil (78.8 mg, 32% over two steps). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.34 (s, 1H), 6.03 – 5.90 (m, 1H), 5.38 (ddd, 1H, *J* = 1.5, 3.0, 17.2 Hz), 5.26 (ddd, 1H, *J* = 1.3, 2.6, 10.4 Hz), 4.70 (dt, 2H, *J* = 1.4, 5.7 Hz), 2.53 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 1.89 (t, 2H, *J* = 6.78 Hz), 1.23 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 194.40, 164.58, 164.36, 131.99, 130.24, 118.76, 65.88, 35.59, 35.35, 33.64, 27.51. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₂H₁₆O₃Na: 231.992, found: 231.1003. IR (neat) ν 2962, 1740, 1714, 1686, 1267, 1224 cm⁻¹.

***tert*-Butyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (5-2)**



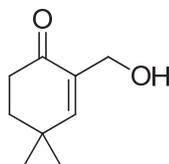
In a sealed tube, a solution of methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (204.7 mg, 1.11 mmol) in *tert*-butanol (5.0 mL) was stirred under argon at room temperature. 4-(dimethylamino)pyridine (200.7 mg, 1.64 mmol) and 4 Å molecular sieves (365.8 mg) were added, the tube was sealed and heated at reflux for 48 h. The mixture was allowed to cool down to room temperature, aqueous 1 N HCl (10 mL) was added and the melange was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (saturated with Et₃N, 100% hexanes) gave a mixture of methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (0.36 mmol) and *tert*-butyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (0.40 mmol) as a colorless oil (156.1 mg). PhSeBr (375.4 mg, 1.59 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (155 μL, 1.67 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, the previous melange (156.1 mg, 0.76 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 21 h and diluted with more CH₂Cl₂ (8 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 10 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) afforded *tert*-butyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**5-2**) as a white solid (61.7 mg, 25% over two steps, mp = 28 – 30 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.17 (s, 1H), 2.50 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 1.86 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 1.50 (s, 9H), 1.21 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 194.73, 164.23, 162.53, 131.73, 81.83, 35.69, 35.41, 33.43, 28.23, 27.59. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₃H₂₀O₃Na: 247.1305, found: 247.1311. IR (neat) ν 2957, 1725, 1673, 1367, 1290, 1237 cm⁻¹.

3,3-Dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylic acid (**5-3**)



In a round bottom flask, a solution of methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17a**) (54.0 mg, 0.30 mmol) in MeOH (5.0 mL) was stirred at room temperature. Potassium hydroxide (85%, 894.0 mg, 15.9 mmol) was dissolved in water (1.5 mL) and the solution was added to the first one. The resulting mixture was refluxed for 1 h. When the reaction had cooled down to room temperature, EtOAc (30 mL) and aqueous 3 N HCl (10 mL) were added and the layers were separated. The aqueous one was extracted with EtOAc (2 × 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (30% EtOAc in hexanes) gave 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylic acid (**5-3**) as a white solid (24.8 mg, 49%, mp = 68 - 70 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 12.47 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 2.68 – 2.64 (m, 2H), 1.97 – 1.92 (m, 2H), 1.27 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 202.86, 173.76, 164.08, 124.53, 35.05, 34.61, 34.35, 27.01. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₉H₁₂O₃Na: 191.0679, found 191.0677. IR (neat) ν 2960, 2761, 1742, 1637, 1607, 1439, 1223, 1156 cm⁻¹.

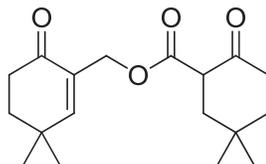
2-(Hydroxymethyl)-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**5-4**)



Paraformaldehyde (194.6 mg, 6.4 mmol), imidazole (441.6 mg, 6.5 mmol), aqueous 1 N NaHCO₃ (25.6 mL) and THF (2.4 mL) were added in a round bottom flask. The mixture was stirred under argon at room temperature when 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**) (1.6 g, 12.9 mmol) was added as a solution in THF (2.0 mL + 2.0 mL for rinsing). After 50 h of additional stirring, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (25 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (5 × 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford a pale blue liquid. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 30% EtOAc in hexanes) gave 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (548.2 mg, 4.4 mmol) and 2-(hydroxymethyl)-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**5-4**) as a colorless oil (453.8 mg, 35% corrected). The spectral data was consistent with that previously reported.¹²⁹ ¹H NMR

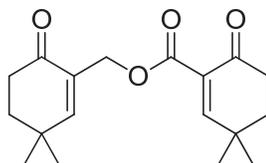
(CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 6.59 (s, 1H), 4.21 (s, 2H), 2.48 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.86 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.17 (s, 6H).

(3,3-Dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (5-5)



In a round bottom flask, methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (300.4 mg, 1.63 mmol) was dissolved in toluene (5.0 mL). The solution was stirred under argon at room temperature when 2-(hydroxymethyl)-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**5-4**) (129.5 mg, 0.84 mmol) was added dropwise as a solution in toluene (2.0 mL + 2 \times 1.0 mL for rinsing). Then, triethylamine (0.23 mL, 1.65 mmol) was also added and the resulting mixture was refluxed in a Dean-Stark apparatus for 24 h. The reaction was allowed to cool down to room temperature and was washed with brine (3 \times 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2 to 5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (120.8 mg) and (3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**5-5**) as a colorless oil (241.1 mg, 94% corrected). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 12.12 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.78 (d, 2H, $J = 0.9$ Hz), 2.52 – 2.47 (m, 2H), 2.29 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 2.03 (s, 2H), 1.87 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.44 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 1.18 (s, 6H), 0.95 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 198.08, 197.86, 172.44, 171.72, 169.96, 157.95, 156.99, 131.57, 131.07, 96.49, 61.90, 61.01, 53.82, 42.06, 39.40, 38.08, 36.13, 36.00, 34.60, 34.49, 33.15, 33.10, 30.92, 30.22, 29.11, 27.99, 27.92, 27.85, 27.81, 26.79, 24.73. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₈H₂₆O₄Na: 329.1723, found: 329.1732. IR (neat) ν 2969, 1669, 1634, 1606, 1230, 1200, 1174 cm⁻¹.

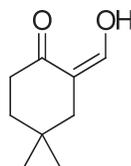
(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (5-6)



In a 2-neck flame-dried round bottom flask, (3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**5-5**) (97.2 mg, 0.32 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (2.0 mL). The solution was stirred under argon at room temperature when potassium carbonate (110.0 mg, 0.80 mmol) and DDQ (103.5 mg, 0.46 mmol) were added. The resulting mixture was refluxed for 4 h and

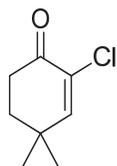
allowed to cool down to room temperature again. Water (10 mL) was added and the melange was extracted with EtOAc (4 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford a brown oil (105.7 mg). Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) gave (3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**5-6**) (72.9 mg, 75%, mp = 40 – 42 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.32 (app. s, 1H), 6.84 (app. s, 1H), 4.85 (d, 2H, *J* = 1.3 Hz), 2.55 – 2.47 (m, 4H), 1.91 – 1.84 (m, 4H), 1.22 (s, 6H), 1.19 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 198.07, 194.52, 164.79, 164.57, 157.47, 131.45, 130.30, 62.12, 36.04, 35.59, 35.36, 34.64, 33.67, 33.15, 27.90, 27.50. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₈H₂₄O₄Na: 327.1567, found: 327.1575. IR (neat) ν 2956, 1710, 1667, 1269, 1227, 1177, 1160 cm⁻¹.

(Z)-2-(hydroxymethylene)-4,4-dimethylcyclohexanone (5-7)



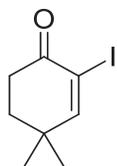
In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 359.7 mg, 9.0 mmol) was suspended in THF (8.0 mL) under argon at 0 °C and stirred when methanol (0.81 mL, 20.0 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, ethyl formate (0.97 mL, 12.1 mmol) was added dropwise. Then, 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-14**) (512.5 g, 4.1 mmol) was added as a solution in THF (3.0 mL + 1.0 mL for rinsing) over 2 h. The resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir overnight. Et₂O (5 mL) was added and extracted with aqueous 1 N NaOH (3 × 15 mL). The combined aqueous layers were acidified with aqueous 6 N HCl till pH = 3 and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 15 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded (Z)-2-(hydroxymethylene)-4,4-dimethylcyclohexanone (**5-7**) as an orange oil (151.0 mg, 24%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸⁴ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 14.41 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 2.37 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz), 2.11 (s, 2H), 1.47 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 0.98 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 187.67, 184.69, 107.89, 37.11, 33.92, 29.57, 28.91, 27.67.

2-Chloro-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**5-10**)



In a flame-dried round bottom flask, 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**) (100.1 mg, 0.81 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (4.0 mL). The colorless solution was stirred under argon at room temperature when (diacetoxyiodo)benzene (320.0 mg, 0.99 mmol) and then pyridine hydrochloride (238.9 mg, 2.07 mmol) were added. After 6 h of additional stirring, more (diacetoxyiodo)benzene (334.0 mg, 1.04 mmol) and pyridine hydrochloride (233.6 mg, 2.02 mmol) were added; the reaction was continued overnight. CH₂Cl₂ (5 mL) was added and the organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 10 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded 2-chloro-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-10**) as a yellow oil (32.7 mg, 25%). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁸⁵ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 6.85 (s, 1H), 2.65 – 2.61 (m, 2H), 1.93 – 1.88 (m, 2H), 1.22 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 191.29, 155.49, 130.26, 35.96, 35.58, 34.92, 27.84.

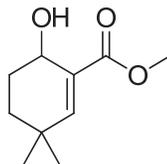
2-Iodo-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**5-11**)



In a flame-dried round bottom flask, a solution of 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**) (233.7 mg, 1.88 mmol) in CCl₄ (3.0 mL) and pyridine (3.0 mL) was stirred under argon at 0 °C. Separately, a solution of iodine (868.1 mg, 3.42 mmol) in CCl₄ (3.0 mL) and pyridine (3.0 mL) was prepared and added dropwise to the previous one. The resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred for 3 h. EtOAc (30 mL) was added; the organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 10 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). All the combined organic layers were washed with aqueous saturated NaHCO₃ (30 mL), aqueous saturated Na₂S₂O₃ (30 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded 2-iodo-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**5-11**)

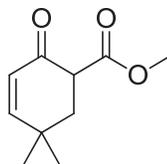
as a yellow oil (351.6 mg, 75%). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁸⁶ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.46 (s, 1H), 2.70 – 2.66 (m, 2H), 1.95 – 1.90 (m, 2H), 1.19 (s, 6H).

Methyl 6-hydroxy-3,3-dimethylcyclohex-1-enecarboxylate (**5-14**)



In a flame dried round bottom flask, methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17a**) (91.8 mg, 0.50 mmol) was dissolved in MeOH (2.0 mL) under argon at room temperature and the solution was stirred. CeCl₃·7H₂O (189.3 mg, 0.51 mmol) and then NaBH₄ (20.6 mg, 0.54 mmol) were added, a vigorous gas evolution occurred. The mixture was stirred for 20 h and quenched by adding aqueous 1 N HCl (2 mL) dropwise. Water (3 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a solid. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) gave methyl 6-hydroxy-3,3-dimethylcyclohex-1-enecarboxylate (**5-14**) as a pale yellow oil (53.2 mg, 58%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 6.76 (s, 1H), 4.48 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz), 3.77 (s, 3H), 3.71 (s, 1H), 1.93 – 1.75 (m, 2H), 1.64 (ddd, 1H, *J* = 13.5, 9.9, 3.6 Hz), 1.46 – 1.38 (m, 1H), 1.11 (s, 3H), 1.03 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 176.21, 168.22, 151.90, 129.89, 71.59, 63.87, 51.96, 51.92, 47.48, 40.75, 37.24, 33.22, 32.25, 32.21, 30.46, 29.72, 28.85, 27.74, 27.25, 24.31. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₀H₁₆O₃Na: 207.0992, found 207.0993. IR (neat) ν 3445, 2949, 2865, 1702, 1361, 1281, 1251 cm⁻¹.

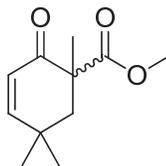
Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**5-16**)



In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 505.5 mg, 12.6 mmol) was suspended in 1,4-dioxane (3.0 mL) under argon at room temperature. To the stirring mixture, dimethyl carbonate (1.7 mL, 20.2 mmol) was added and the melange was heated till reflux. 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**) (534.0 mg, 4.30 mmol) was added as a solution in 1,4-dioxane (2.5 mL + 0.5 mL for rinsing) over 1 h; reflux was continued overnight. The reaction mixture was cooled down to 0 °C, water (2 mL) and aqueous 3 M AcOH (2 mL) were added and the layer was extracted with Et₂O (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to

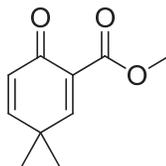
afford an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) gave methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**5-16**) as a yellow oil (265.9 mg, 34%). The spectral data was consistent with that previously reported.¹³⁷ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) enol, 11.88 (s, 1H), 6.06 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz), 5.85 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz), 3.78 (s, 3H), 2.35 (s, 2H), 1.21 (s, 6H); keto, 6.69 (dd, 1H, $J = 1.8, 10.1$ Hz), 5.89 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz), 3.78 (s, 3H), 3.57 (dd, 1H, $J = 4.7, 13.7$ Hz), 2.31 (t, 1H, $J = 13.7$ Hz), 2.00 – 1.96 (m, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.06 (s, 3H).

Methyl 1,5,5-trimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**5-17**)



Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**5-16**) (54.5 mg, 0.30 mmol) was dissolved in acetone (3.0 mL) in a round bottom flask. The solution was stirred at 0 °C under argon when iodomethane (30 μ L, 0.48 mmol) was added dropwise and then potassium carbonate (115.0 mg, 0.83 mmol) in one portion. The resulting mixture was heated at 40 °C and stirred overnight. Then, the reaction was allowed to cool down to room temperature and the solvent was removed under vacuum to give a white solid. It was taken into aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 1,5,5-trimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**5-17**) as a yellow oil (31.7 mg, 54%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 6.59 (dd, 1H, $J = 1.9, 10.2$ Hz), 5.95 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 3.68 (s, 3H), 2.43 (dd, 1H, $J = 1.9, 14.2$ Hz), 1.81 (d, 1H, $J = 14.2$ Hz), 1.38 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.07 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 197.16, 174.89, 157.96, 126.31, 52.61, 51.24, 47.37, 33.40, 31.47, 26.84, 23.07. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₁H₁₆O₃Na: 219.992, found: 219.0993. IR (neat) ν 2958, 1731, 1682, 1249, 1228 cm⁻¹.

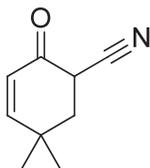
Methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohexa-1,4-dienecarboxylate (**5-18**)



In a round bottom flask, methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**5-16**) (104.0 mg, 0.57 mmol) was dissolved in *tert*-butanol (5% wt. AcOH, 10.0 mL). The solution was stirred at 30 °C under

argon when selenium dioxide (193.8 mg, 1.75 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at reflux for 20 h and allowed to cool down to room temperature. It was diluted with Et₂O (10 mL) and washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with Et₂O (3 × 5 mL). All the ethereal layers were combined, washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford a dark brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 50% EtOAc in hexanes) gave the product contaminated with red selenium. This material was vaporized under vacuum with a heat gun and the vapor was collected in another flask and cooled to have pure methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohexa-1,4-dienecarboxylate (**5-18**) as a yellow oil (50.0 mg, 49%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹³⁷ ¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz) δ (ppm) 7.45 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 6.80 (dd, 1H, *J* = 2.8, 10.0 Hz), 6.15 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz), 3.77 (s, 3H), 1.28 (s, 6H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz) δ (ppm) 181.41, 165.48, 161.25, 155.37, 130.65, 128.07, 52.35, 38.38, 26.57.

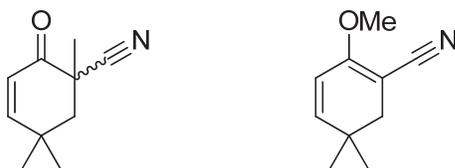
5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarbonitrile (**5-19**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.23 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). 4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**4-13**) (200.5 mg, 1.61 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). After 30 min of additional stirring, a cloudy solution of *p*-toluenesulfonyl cyanide (588.7 mg, 3.25 mmol) in THF (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing) was added via cannula. The mixture was stirred for 50 min and aqueous saturated NH₄OH (3.0 mL) was added; the mixture was allowed to warm up till room temperature. Aqueous 1 N HCl (10 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The aqueous layer was acidified with aqueous 6 N HCl and extracted with EtOAc (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 10 mL), brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 30% EtOAc in hexanes) gave 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarbonitrile (**5-19**) as a white solid (124.3 mg, 52%, mp = 66 - 68 °C). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸⁷ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 6.73 (dd, 1H, *J* = 10.2, 1.3 Hz), 5.94 (d, 1H, *J* = 10.2 Hz), 3.70 (dd, 1H, *J* = 11.0, 7.5 Hz), 2.28 - 2.25 (m, 1H), 2.24 (s, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.23 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 188.34,

160.26, 125.02, 116.95, 40.01, 37.21, 33.45, 29.75, 25.33. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₉H₁₁ONNa: 172.0733, found: 172.0740.

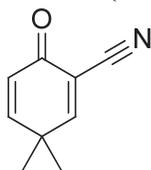
1,5,5-trimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarbonitrile (5-20) / 2-methoxy-5,5-dimethylcyclohexa-1,3-dienecarbonitrile (5-21)



In a round bottom flask, 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarbonitrile (**5-19**) (52.1 mg, 0.35 mmol) was dissolved in acetone (3.0 mL). The colorless solution was stirred at 0 °C under argon when iodomethane (45 μL, 0.72 mmol) was added dropwise. Then, potassium carbonate (165.2 mg, 1.20 mmol) was added in one portion; the mixture was allowed to warm up till room temperature and was heated at 40 °C overnight. Once it has cooled to room temperature, solvents were removed under vacuum. The residue was taken into aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with EtOAc (4 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2 to 5% EtOAc in hexanes) afforded 1,5,5-trimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarbonitrile (**5-20**) as a pale yellow solid (31.9 mg, 56%, mp = 28 - 30 °C) and 2-methoxy-5,5-dimethylcyclohexa-1,3-dienecarbonitrile (**5-21**) as a white solid (11.9 mg, 21%) separately. The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸⁷ 1,5,5-trimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarbonitrile (**5-20**): ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 6.76 (dd, 1H, *J* = 10.2, 1.9 Hz), 5.97 (d, 1H, *J* = 10.2 Hz), 2.31 (dd, 1H, *J* = 14.3, 1.9 Hz), 1.88 (d, 1H, *J* = 14.3 Hz), 1.55 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.19 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 190.91, 160.37, 124.26, 121.22, 46.40, 39.33, 33.65, 31.41, 26.76, 23.43. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₀H₁₃ONNa: 186.0889, found: 186.0894. IR (neat) ν 2957, 2232, 1690, 1451, 1225 cm⁻¹.

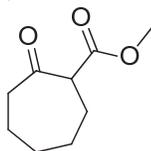
2-methoxy-5,5-dimethylcyclohexa-1,3-dienecarbonitrile (**5-21**): ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 6.00 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz), 5.86 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz), 3.93 (s, 3H), 2.31 (s, 2H), 1.06 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 162.58, 148.04, 119.77, 118.33, 78.75, 57.39, 38.56, 31.76, 27.04. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₀H₁₃ONNa: 186.0889, found: 186.0893.

3,3-dimethyl-6-oxocyclohexa-1,4-dienecarbonitrile (**5-22**)



In a flame dried round bottom flask, 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarbonitrile (**5-19**) (51.0 mg, 0.34 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (2.0 mL). The solution was stirred at room temperature under argon when potassium carbonate (154.8 mg, 1.12 mmol) and DDQ (129.5 mg, 0.57 mmol) were added. The mixture was refluxed for 5 h and allowed to cool down to room temperature. H₂O (5 mL) was added; the mixture was extracted with EtOAc (4 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown solid. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) afforded 3,3-dimethyl-6-oxocyclohexa-1,4-dienecarbonitrile (**5-22**) as a white solid (32.9 mg, 66%, mp = 89 - 91 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.54 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 6.90 (dd, 1H, *J* = 10.2, 3.0 Hz), 6.29 (d, 1H, *J* = 10.2 Hz), 1.36 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 178.94, 166.62, 156.52, 126.37, 116.23, 114.12, 39.15, 26.44. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₉H₉NNa: 170.0576, found: 170.0577. IR (neat) ν 3036, 2979, 2235, 1661, 1385 cm⁻¹.

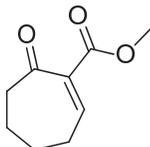
Methyl 2-oxocycloheptanecarboxylate (**5-24**)



In a round bottom flask, NaH (60% in oil, 1.04 g, 25.9 mmol) was suspended in dimethylcarbonate (2.0 mL) at room temperature under argon. Cycloheptanone (**5-23**) (1.0 mL, 8.5 mmol) was added dropwise as a solution in dimethylcarbonate (4.0 mL + 2.0 mL for rinsing). The resulting mixture was stirred at reflux for 4 h and allowed to cool down to room temperature. At 0 °C, H₂O (60 mL) was added; the melange was extracted with EtOAc (4 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a pale yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 2-oxocycloheptanecarboxylate (**5-24**) as a colorless oil (806.5 mg, 56%, keto:enol = 3:1). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸⁸ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 12.66 (s, 0.2H), 3.75 (s, 0.8H), 3.72 (s, 2.2H), 3.56 (dd, 0.8H, *J* = 10.4, 3.9 Hz), 2.64 – 2.56 (m, 1.4H), 2.48 – 2.35 (m,

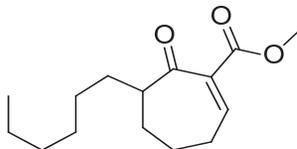
1.0H), 2.16 – 2.04 (m, 0.8H), 2.00 – 1.78 (m, 3.2H), 1.78 – 1.67 (m, 0.6H), 1.67 – 1.58 (m, 1.0H), 1.53 – 1.36 (m, 2.0H).

Methyl 7-oxocyclohept-1-enecarboxylate (5-25)



PhSeBr (614.3 mg, 2.60 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (250 μL, 2.70 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 2-oxocycloheptanecarboxylate (**5-24**) (201.3 mg, 1.18 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 22 h and diluted with more CH₂Cl₂ (8 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL). The organic layer was washed with water (5 mL), aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 5 mL), brine (2 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a colorless oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 7-oxocyclohept-1-enecarboxylate (**5-25**) as a colorless oil (110.4 mg, 56%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁸⁸ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.41 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz), 3.77 (s, 3H), 2.71 – 2.65 (m, 2H), 2.50 (dd, 2H, *J* = 11.8, 5.8 Hz), 1.91 – 1.72 (m, 4H).

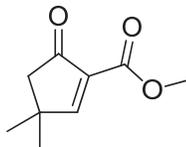
Methyl 6-hexyl-7-oxocyclohept-1-enecarboxylate (5-26)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.53 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 2-oxocycloheptanecarboxylate (**5-24**) (202.2 mg, 1.19 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1-iodohexane (0.26 mL, 1.76 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 20 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (5 × 5 mL). The combined organic layers were

washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-hexyl-2-oxocycloheptanecarboxylate as a brown oil (205.8 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (424.8 mg, 1.80 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0°C when pyridine (170 μL , 1.84 mmol) was added dropwise. After 40 min of additional stirring, methyl 3-hexyl-2-oxocycloheptanecarboxylate (205.8 mg, 0.81 mmol) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0°C for 21 h and diluted with more CH_2Cl_2 (8 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3×5 mL), brine (3×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. It was dissolved in CH_2Cl_2 (5.0 mL); the yellow solution was stirred at 0°C opened to air when aqueous H_2O_2 (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 50 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (10 mL). The organic layer was washed with water (5 mL), aqueous saturated NaHCO_3 (2×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a colorless oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 6-hexyl-7-oxocyclohept-1-enecarboxylate (**5-26**) as a pale yellow oil (56.0 mg, 19% over three steps). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.36 (dd, 1H, $J = 5.9, 4.3$ Hz), 3.75 (s, 3H), 2.82 – 2.67 (m, 1H), 2.56 – 2.40 (m, 2H), 2.00 – 1.85 (m, 1H), 1.83 – 1.62 (m, 3H), 1.54 – 1.36 (m, 2H), 1.25 (br s, 8H), 0.87 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 205.24, 165.64, 148.28, 136.54, 54.18, 52.35, 31.85, 31.74, 31.01, 30.28, 29.45, 27.38, 23.94, 22.74, 14.21. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$: 275.1618, found: 275.1627. IR (neat) ν 2930, 1723, 1365, 1261 cm^{-1} .

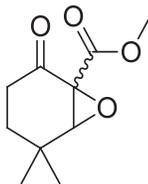
Methyl 3,3-dimethyl-5-oxocyclopent-1-enecarboxylate (**5-29**)



Potassium permanganate (2.6 g, 16.5 mmol), 4,4-dimethylcyclohexanone (**4-14**) (1.1 g, 8.5 mmol) and water (48 mL) were added in a round bottom flask at room temperature under air. The mixture was stirred when sodium hydroxide (187.4 mg, 4.7 mmol) was added as a solution in water (2 mL). After 41 h of additional stirring, aqueous 10% NaHSO_3 was added until the purple color disappeared. The mixture was filtrated on celite; the filtrate was acidified with aqueous 6 N HCl till pH = 1 and extracted with Et_2O (4×100 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated

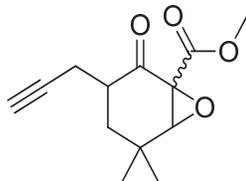
to give 3,3-dimethylhexanedioic acid as a white solid (910.6 mg, ^1H NMR was comparable with that reported previously).¹³⁹ It was stirred with benzene (8.0 mL) in a round bottom flask under argon at room temperature when methanol (1.5 mL) and concentrated H_2SO_4 (0.5 mL). The mixture was heated at reflux for 21 h and allowed to cool down to room temperature. The volatiles were removed under vacuum; the brown residue was taken into EtOAc (30 mL), washed with aqueous saturated NaHCO_3 (3×10 mL), brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give dimethyl 3,3-dimethylhexanedioate (**5-27**) as a brown oil (786.0 mg, ^1H NMR was comparable with that reported previously).¹³⁹ In a flame-dried round bottom flask, potassium *tert*-butoxide (642.8 mg, 5.7 mmol) was suspended and stirred in THF (15 mL) under argon at 0 °C. Dimethyl 3,3-dimethylhexanedioate (**5-27**) (786.0 mg, 3.8 mmol) was added dropwise as a solution in THF (3.0 mL + 2.0 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 24 h. Glacial acetic acid (0.7 mL) was added, resulting in a white precipitate. The addition of aqueous 1 M Na_2HPO_4 (10 mL) caused the suspension to become homogeneous. It was extracted with CH_2Cl_2 (3×25 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×25 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 4,4-dimethyl-2-oxocyclopentanecarboxylate (**5-28**) as a colorless oil (474.4 mg, 33% over three steps, ^1H NMR was comparable with that reported previously).¹⁸⁹ PhSeBr (462.1 mg, 1.96 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (190 μL , 2.05 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 4,4-dimethyl-2-oxocyclopentanecarboxylate (**5-28**) (150.3 mg, 0.88 mmol) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 20 h and diluted with more CH_2Cl_2 (8 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3×5 mL), brine (3×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. It was dissolved in CH_2Cl_2 (5.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H_2O_2 (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 35 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (10 mL). The organic layer was washed with water (5 mL), aqueous saturated NaHCO_3 (2×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a pale yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3,3-dimethyl-5-oxocyclopent-1-enecarboxylate (**5-29**) as a white solid (87.0 mg, 59%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁹⁰ ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 8.14 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.43 (s, 2H), 1.28 (s, 6H).

Methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-1-carboxylate (5-32)



In a 2-neck round bottom flask, KOH (120.6 mg, 1.83 mmol) and CH₂Cl₂ (6.0 mL) were added under argon at room temperature. 3-chloroperbenzoic acid (217.8 mg, 1.26 mmol) was added and the mixture was stirred for 1 h. Then, methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate (**4-17a**) (117.5 mg, 0.64 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The reaction was continued for 1.5 h and filtered on a pad of celite with CH₂Cl₂. The volatiles were removed under vacuum to give a colorless oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-1-carboxylate (**5-32**) as a white solid (105.1 mg, 83%, mp = 56 - 58 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 3.82 (s, 3H), 3.27 (s, 1H), 2.45 (ddd, 1H, *J* = 18.0, 5.2, 3.4 Hz), 2.36 – 2.22 (m, 1H), 1.86 – 1.73 (m, 1H), 1.47 – 1.37 (m, 1H), 1.23 (s, 3H), 1.16 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 199.43, 166.50, 68.18, 59.68, 52.95, 34.16, 30.71, 30.01, 27.27, 22.84. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₀H₁₄O₄Na: 221.0784, found: 221.0788. IR (neat) ν 2955, 1754, 1708, 1285, 1239, 1223, 1041 cm⁻¹.

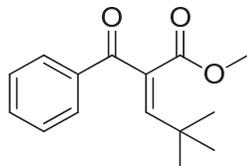
Methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-3-(prop-2-yn-1-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-1-carboxylate (5-33)



In a 2-neck round bottom flask, KOH (40.0 mg, 0.61 mmol) and CH₂Cl₂ (1.0 mL) were added under argon at room temperature. 3-chloroperbenzoic acid (72.8 mg, 0.42 mmol) was added and the mixture was stirred for 1 h. Then, methyl 3,3-dimethyl-6-oxo-5-(prop-2-yn-1-yl)cyclohex-1-enecarboxylate (**4-17f**) (43.1 mg, 0.20 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was continued for 2 h and filtered on a pad of celite with CH₂Cl₂. The volatiles were removed under vacuum to give a colorless oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% to 10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-3-(prop-2-yn-1-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-1-carboxylate (**5-33**) as a white solid (37.5 mg, 79%, mp = 68 - 71 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 3.81 (s, 3H), 3.26 (d, 1H, *J* = 1.0 Hz), 2.79 - 2.70 (m, 1H), 2.48 – 2.37 (m, 1H), 2.26 (ddd, 1H, *J* = 16.9, 8.6, 2.6 Hz), 1.98 (t, 1H, *J* = 2.7 Hz), 1.74 (ddd, 1H, *J* = 13.6, 5.6, 1.1

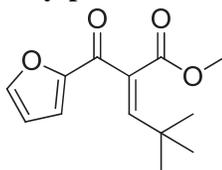
Hz), 1.61 (t, 1H, $J = 13.3$ Hz), 1.24 (s, 3H), 1.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 198.52, 166.61, 81.19, 70.40, 67.66, 67.66, 58.86, 53.02, 43.09, 34.69, 31.25, 27.51, 23.03, 18.72. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$: 259.0941, found: 259.0943. IR (neat) ν 3265, 2963, 1752, 1715, 1443, 1272 cm^{-1} .

(Z)-methyl 2-benzoyl-4,4-dimethylpent-2-enoate (5-35)



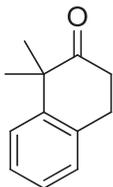
In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 699.6 mg, 17.5 mmol), acetophenone (**5-34**) (1.0 mL, 8.6 mmol) and dimethylcarbonate (9.0 mL) were added under argon at room temperature. The mixture was stirred at reflux for 4 h and allowed to cool down to room temperature. At 0 °C, aqueous 3 M AcOH (20 mL) was added and extracted with EtOAc (4 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 15 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-oxo-3-phenylpropanoate as a yellow oil (1.5 g, 98%, keto:enol = 5:1). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁴¹ ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 12.50 (s, 0.15H), 7.98 – 7.92 (m, 1.6H), 7.80 – 7.76 (m, 0.4H), 7.64 – 7.57 (m, 0.9H), 7.53 – 7.48 (m, 1.4H), 7.48 – 7.41 (m, 0.8H), 5.68 (s, 0.15H), 4.02 (s, 1.6H), 3.81 (s, 0.5H), 3.76 (s, 2.5H). Methyl 3-oxo-3-phenylpropanoate (108.0 mg, 0.61 mmol) was dissolved in benzene (6.0 mL) under argon at room temperature in a round bottom flask. Successively, trimethylacetaldehyde (80 μL , 0.74 mmol), piperidine (60 μL , 0.61 mmol) and acetic acid (16 μL , 0.28 mmol) were added dropwise. The resulting mixture was stirred and refluxed in a Dean-Stark apparatus for 18 h. At room temperature, H_2O (5 mL) was added and the melange was extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous 1 N HCl (2 \times 10 mL), aqueous saturated NaHCO_3 (2 \times 10 mL), brine (2 \times 10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (saturated with Et_3N , 2% EtOAc in hexanes) afforded (Z)-methyl 2-benzoyl-4,4-dimethylpent-2-enoate (**5-35**) as a white solid (21.2 mg, 14%, mp = 63 – 64 °C). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.96 – 7.89 (m, 2H), 7.59 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.48 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.13 (s, 1H), 3.66 (s, 3H), 1.05 (s, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 195.59, 166.02, 156.50, 137.46, 133.74, 129.65, 129.28, 128.85, 52.55, 34.75, 29.58. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$: 269.1149, found: 269.1160. IR (neat) ν 2964, 1722, 1667, 1453, 1431, 1229 cm^{-1} .

(Z)-methyl 2-(furan-2-carbonyl)-4,4-dimethylpent-2-enoate (5-37)



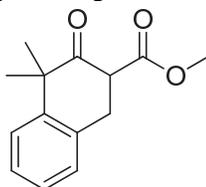
In a flame-dried 2-neck round bottom flask, NaH (60% in oil, 552.9 mg, 13.8 mmol) was suspended in THF (3.0 mL) under argon at room temperature. Dimethylcarbonate (0.95 mL, 11.3 mmol) was added dropwise; the mixture was stirred at reflux. 1-(furan-2-yl)ethanone (**5-36**) (500.0 mg, 4.54 mmol) was added dropwise as a solution in THF (2.0 mL) over 30 min. After the first drops, KH (30% in oil, catalytic amount) was added in one portion. The reaction was continued stirring at reflux for two additional hours. At 0 °C, aqueous 3 M AcOH (5 mL) was added; the melange was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 15 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 3-(furan-2-yl)-3-oxopropanoate as a yellow oil (691.8 mg, 91%, keto:enol = 9:1). The spectral data were consistent with that previously reported.¹⁹¹ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 12.07 (s, 0.1H), 7.61 (d, 0.9H, *J* = 0.9 Hz), 7.50 (d, 0.1H, *J* = 0.9 Hz), 7.28 (dd, 0.9H, *J* = 3.6, 0.4 Hz), 6.94 (d, 0.1H, *J* = 3.3 Hz), 6.57 (dd, 0.9H, *J* = 3.6, 1.7 Hz), 6.51 (dd, 0.1H, *J* = 3.4, 1.7 Hz), 5.62 (s, 0.1H), 3.87 (s, 1.8H), 3.79 (s, 0.3H), 3.75 (s, 2.7H). Methyl 3-(furan-2-yl)-3-oxopropanoate (104.8 mg, 0.62 mmol) was dissolved in benzene (6.0 mL) under argon at room temperature in a round bottom flask. Successively, trimethylacetaldehyde (205 μL, 1.89 mmol), piperidine (65 μL, 0.66 mmol) and acetic acid (20 μL, 0.35 mmol) were added dropwise. The resulting mixture was stirred and refluxed in a Dean-Stark apparatus for 18 h. At room temperature, H₂O (5 mL) was added and the melange was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous 1 N HCl (2 × 10 mL), aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 10 mL), brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2 to 5% EtOAc in hexanes) afforded (Z)-methyl 2-(furan-2-carbonyl)-4,4-dimethylpent-2-enoate (**5-37**) as a pale yellow oil (33.8 mg, 23%, ratio of isomers = 20:1). Spectral data were consistent with that reported previously.¹⁴³ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.63 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz), 7.14 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz), 7.09 (s, 1H), 6.56 (dd, 1H, *J* = 3.5, 1.7 Hz), 3.70 (s, 3H), 1.08 (s, 9H).

1,1-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-2(1H)-one (5-41)



Tetrabutylammonium bisulfate (247.5 mg, 0.73 mmol), α -tetralone (**5-40**) (0.5 mL, 3.63 mmol) and THF (2.0 mL) were added in a round bottom flask at room temperature under argon. Iodomethane (0.71 mL, 11.40 mmol) was added to the stirring mixture. Then, KOH (50% wt in water, 3.8 mL) was added quickly. Stirring was continued for 1 h. H₂O (10 mL) was added and extracted with EtOAc (4 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous saturated NH₄Cl (5 \times 10 mL), brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give 1,1-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-2(1H)-one (**5-41**) as a pale orange oil (593.3 mg, 94%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁴⁵ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.38 – 7.35 (m, 1H), 7.26 (ddd, 1H, J = 8.8, 6.2, 1.9 Hz), 7.21 – 7.16 (m, 2H), 3.14 – 3.07 (m, 2H), 2.71 – 2.66 (m, 2H), 1.44 (s, 3H).

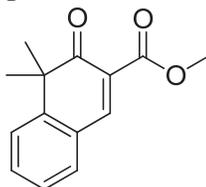
Methyl 4,4-dimethyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate (5-42)



In a flame-dried 2-neck round bottom flask, NaH (60% in oil, 272.8 mg, 6.82 mmol) was suspended in THF (1.5 mL) under argon at room temperature. Dimethylcarbonate (0.38 mL, 4.52 mmol) was added dropwise; the mixture was stirred at reflux. 1,1-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-2(1H)-one (**5-41**) (316.3 mg, 1.82 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing) over 30 min. After the first drops, KH (30% in oil, catalytic amount) was added in one portion. The reaction was continued stirring at reflux for two additional hours. At 0 °C, aqueous 3 M AcOH (3 mL) was added; the melange was extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a light brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 4,4-dimethyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate (**5-42**) as a light brown oil (481.0 mg, quant., keto:enol = 1:7). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 12.62 (s, 1H), 7.36 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.19 – 7.16 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 1.54 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 175.68, 172.96, 142.00, 132.12, 128.22, 126.59, 126.16, 125.80, 93.67, 51.85, 39.90, 28.14, 27.85.

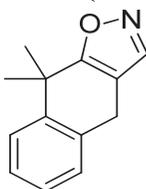
HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₄H₁₆O₃Na-2H: 253.0835, found: 253.0845. IR (neat) ν 2972, 1665, 1631, 1435, 1371, 1292, 1237, 1029 cm⁻¹.

Methyl 4,4-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxylate (5-43)



PhSeBr (405.9 mg, 1.72 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (190 μ L, 2.05 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, methyl 4,4-dimethyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate (**5-42**) (197.9 mg, 0.85 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 18 h and diluted with more CH₂Cl₂ (10 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 \times 5 mL), brine (3 \times 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 40 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL). The organic layer was washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 \times 5 mL), brine (3 \times 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 4,4-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxylate (**5-43**) as a white solid (147.0 mg, 75%, mp = 79 – 80 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 8.18 (s, 1H), 7.53 – 7.44 (m, 3H), 7.34 (ddd, 1H, *J* = 7.6, 6.7, 1.8 Hz), 3.89 (s, 3H), 1.51 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 199.80, 165.69, 149.89, 149.15, 132.27, 131.64, 127.46, 127.28, 126.27, 125.43, 52.51, 49.34, 27.31. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₄H₁₄O₃Na: 253.0835, found: 253.0846. IR (neat) ν 2968, 1702, 1671, 1617, 1567, 1446, 1432, 1294, 1215 cm⁻¹.

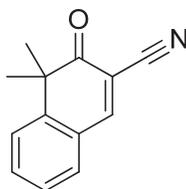
9,9-dimethyl-4,9-dihydronaphtho[2,3-d]isoxazole (5-45)



In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 591.5 mg, 14.8 mmol) was suspended in THF (7.0 mL) at 0 °C under argon. MeOH (0.82 mL, 20.2 mmol) was added dropwise to the stirring mixture. After

30 min of additional stirring, ethyl formate (0.93 mL, 11.5 mmol) was added. Then, 1,1-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-2(1H)-one (**5-41**) (587.0 mg, 3.4 mmol) was added dropwise as a solution in THF (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 18 h. Et₂O (20 mL) was added and extracted with aqueous 1 N NaOH (3 × 10 mL). The combined aqueous layers were acidified with aqueous 6 N HCl till pH = 1 and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). The combined halogenated layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give (Z)-3-(hydroxymethylene)-1,1-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-2(1H)-one (**5-44**) as a red solid (642.8 mg, 94%). At room temperature and opened to air, (Z)-3-(hydroxymethylene)-1,1-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-2(1H)-one (**5-44**) (419.6 mg, 2.1 mmol) was dissolved in ethanol (20 mL) and stirred. Hydroxylamine hydrochloride (1.4 g, 20.1 mmol) was dissolved in the minimum amount of water and added to the first solution. The mixture was refluxed for 2 h and allowed to cool down to room temperature. The solvents were removed under vacuum; the residue was taken into EtOAc (30 mL), washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 10 mL), brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (4% EtOAc in hexanes) afforded 9,9-dimethyl-4,9-dihydronaphtho[2,3-d]isoxazole (**5-45**) as yellow oil (415.5 mg, quant.). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.19 (s, 1H), 7.50 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.35 – 7.27 (m, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 2H), 3.90 (s, 2H), 1.68 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 171.96, 148.99, 142.57, 131.67, 129.45, 127.26, 126.63, 107.71, 36.48, 29.82, 25.62. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₃H₁₃ONNa: 222.0889, found: 222.0884. IR (neat) ν 2973, 1486, 1299, 759, 723 cm⁻¹.

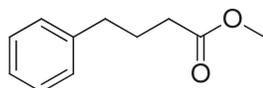
4,4-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2-carbonitrile (**5-46**)



In a two-neck round bottom flask, sodium (704.4 mg, 30.6 mmol) was added to methanol (15.0 mL) at 0 °C under argon. Once the gas evolution has ceased, 9,9-dimethyl-4,9-dihydronaphtho[2,3-d]isoxazole (**5-45**) (198.0 mg, 0.99 mmol) was added dropwise as a solution in methanol (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up to room temperature and stir for 1 h. EtOAc (30 mL) was added; the organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 10 mL), brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a white solid. It was dissolved in 1,4-dioxane (1.0 mL) and added dropwise to a suspension of DDQ (236.6 mg, 1.04 mmol) in 1,4-dioxane (3.0 mL) at room

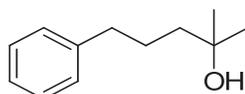
temperature under argon. After 4 h of additional stirring, the mixture was filtrated with CH₂Cl₂ and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% to 15% EtOAc in hexanes) afforded 4,4-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2-carbonitrile as a white solid (**5-46**) (114.5 mg, 59%, mp = 109 - 111 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.04 (s, 1H), 7.62 – 7.54 (m, 1H), 7.53 – 7.49 (m, 1H), 7.46 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.5 Hz), 7.42 – 7.35 (m, 1H), 1.53 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 197.90, 153.93, 148.62, 133.49, 131.61, 127.66, 126.87, 126.50, 115.07, 110.53, 48.42, 27.99. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₃H₁₁ONNa: 220.0733, found: 220.0738. IR (neat) ν 2970, 2224, 1664, 1613, 1564, 1445, 1366, 1265 cm⁻¹.

Methyl 4-phenylbutanoate (**5-48**)



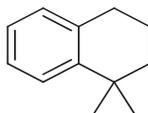
4-phenylbutanoic acid (**5-47**) (10.0 g, 61 mmol) was dissolved in methanol (100 mL) in a round bottom flask. The solution was stirred at room temperature opened to air when concentrated HCl (2.0 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 22 h and H₂O (100 mL) was added. The melange was extracted with Et₂O (4 × 80 mL). The combined organic layers were washed with aqueous saturated NaHCO₃ (4 × 80 mL), brine (4 × 80 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford methyl 4-phenylbutanoate (**5-48**) as a yellow oil (10.4 g, 96%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁹² ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.33 – 7.25 (m, 2H), 7.23 – 7.14 (m, 3H), 3.67 (s, 3H), 2.66 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 2.34 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 1.97 (quintet, 2H, *J* = 7.5 Hz).

2-methyl-5-phenylpentan-2-ol (**5-49**)



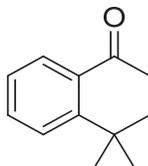
Methyl 4-phenylbutanoate (**5-48**) (10.4 g, 58 mmol) was dissolved in Et₂O (60 mL) in a round bottom flask. The solution was stirred at 0 °C under argon when methylmagnesium iodide (3 M in Et₂O, 60 mL, 180 mmol) was added dropwise via an addition funnel. The mixture was allowed to warm up and stir for 20 h. At 0 °C, aqueous saturated NH₄Cl (150 mL) was added very carefully and the layers were separated. The aqueous one was extracted with Et₂O (5 × 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford 2-methyl-5-phenylpentan-2-ol (**5-49**) as an orange oil (10.4 g, quant.). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁹³ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.32 – 7.26 (m, 2H), 7.22 – 7.15 (m, 3H), 2.63 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 1.77 – 1.64 (m, 2H), 1.58 – 1.47 (m, 2H), 1.21 (s, 6H).

1,1-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**5-50**)



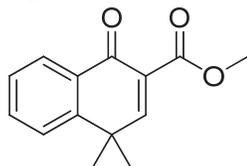
2-methyl-5-phenylpentan-2-ol (**5-49**) (10.4 g, 58 mmol) and H₂O (10 mL) were mixed together in a round bottom flask. The mixture was stirred at 0 °C opened to air when concentrated sulfuric acid (90 mL) was added dropwise via an addition funnel over 50 min. After 1 h of additional stirring, hexanes (100 mL) were added and the mixture was allowed to warm up till room temperature. The layers were separated; the aqueous one was extracted with hexanes (2 × 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford 1,1-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**5-50**) as red oil (9.2 g, 98%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁴⁸ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.34 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.19 – 7.09 (m, 1H), 7.06 (dd, 2H, *J* = 6.3, 1.3 Hz), 2.78 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 1.87 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.30 (s, 6H).

4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**)



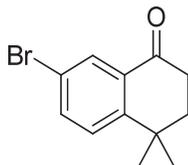
Glacial acetic acid (80.0 mL) and acetic anhydride (40.0 mL) were mixed together in a round bottom flask at 0 °C opened to air. CrO₃ (6.1 g, 61 mmol) was added portionwise and the suspension was stirred for 30 min. Then, benzene (25.0 mL) and 1,1-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**5-50**) (4.7 g, 29 mmol) as a solution in benzene (15.0 mL) were added. The mixture was stirred for 4 h; H₂O (200 mL) was added and the mixture was allowed to warm up till room temperature. It was extracted with Et₂O (6 × 60 mL). The combined organic layers were washed with aqueous saturated Na₂CO₃ (4 × 100 mL), brine (3 × 100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% EtOAc in hexanes) afforded 4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**) as a colorless oil (4.7 g, 92%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁴⁸ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.02 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.53 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 7.2, 1.5 Hz), 7.42 (dd, 1H, *J* = 7.9, 0.9 Hz), 7.29 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 7.2, 1.3 Hz), 2.73 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 2.03 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz).

Methyl 4,4-dimethyl-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-carboxylate (**5-53**)



In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 52.8 mg, 1.32 mmol) was suspended in THF (1.5 mL) at room temperature under argon. Dimethyl carbonate (0.11 mL, 1.31 mmol) was added to the stirring mixture and it was heated at reflux. Then, 4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**) (99.9 mg, 0.57 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.8 mL + 0.6 mL for rinsing). Reflux was continued for 20 h and the mixture was allowed to cool down to room temperature. Aqueous 3 M AcOH (3.0 mL) was added dropwise and extracted with Et₂O (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2 to 4% EtOAc in hexanes) afforded methyl 4,4-dimethyl-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate (**5-52**) as a yellow oil (108.2 mg, 82%, ketone and enol mixture). In a flame-dried round bottom flask, DDQ (103.8 mg, 0.46 mmol) was suspended in 1,4-dioxane (1.0 mL) at room temperature under argon. Methyl 4,4-dimethyl-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate (**5-52**) (108.2 mg, 0.47 mmol) was added dropwise as a solution in 1,4-dioxane (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing) to the stirring mixture. It was heated at reflux for 3 h and allowed to cool down to room temperature. The volatiles were removed under vacuum to give a light brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 4,4-dimethyl-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-carboxylate (**5-53**) as an orange oil (96.2 mg, 89%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.22 (dd, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.62 (s, 1H), 7.61 – 7.57 (m, 1H), 7.52 (dd, 1H, *J* = 7.9, 0.9 Hz), 7.44 – 7.38 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 1.55 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 180.90, 165.80, 162.20, 148.34, 133.15, 130.82, 129.56, 127.66, 127.28, 126.10, 52.58, 37.69, 29.50. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₄H₁₄O₃Na: 253.0835, found: 253.0841. IR (neat) ν 2980, 1733, 1660, 1602, 1372, 1281, 1258, 1227, 989 cm⁻¹.

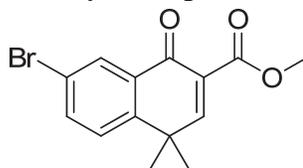
7-bromo-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-54**)



In a 2-neck round bottom flask with a condenser, AlCl₃ (1.1 g, 8.25 mmol) was added under argon. CH₂Cl₂ (0.5 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature. 4,4-dimethyl-3,4-

dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**) (475.5 mg, 2.73 mmol) was added dropwise very carefully (exothermic reaction) as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). Then, bromine (210 μ L, 4.10 mmol) was added dropwise very carefully also. The resulting mixture was stirred for 2 h. At 0 °C, Et₂O (30 mL) and aqueous 2 N HCl (15 mL) were added carefully. The melange was allowed to warm up till room temperature; the layers were separated. The aqueous one was extracted with Et₂O (2 \times 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a dark brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% EtOAc in hexanes) afforded 7-bromo-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-54**) as a brown oil (654.4 mg, 95%, keto:enol = 3:1) The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁹⁴ ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 8.13 (d, 1H, J = 2.3 Hz), 7.62 (dd, 1H, J = 8.4, 2.3 Hz), 7.31 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 2.73 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 2.01 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 1.37 (s, 6H).

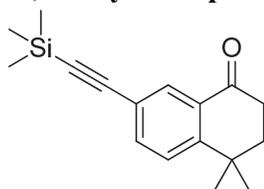
Methyl 7-bromo-4,4-dimethyl-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-carboxylate (**5-55**)



In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 77.1 mg, 1.93 mmol) was suspended in THF (2.5 mL) at room temperature under argon. Dimethyl carbonate (0.16 mL, 1.90 mmol) was added to the stirring mixture and it was heated at reflux. Then, 7-bromo-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-54**) (211.5 mg, 0.84 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). Reflux was continued for 20 h and the mixture was allowed to cool down to room temperature. Aqueous 3 M AcOH (5.0 mL) was added dropwise and extracted with Et₂O (3 \times 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2 to 5% EtOAc in hexanes) afforded methyl 7-bromo-4,4-dimethyl-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate as a brown oil (202.6 mg, 78%, ketone and enol mixture). In a flame-dried round bottom flask, DDQ (78.6 mg, 0.35 mmol) was suspended in 1,4-dioxane (1.0 mL) at room temperature under argon. Methyl 7-bromo-4,4-dimethyl-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate (103.1 mg, 0.33 mmol) was added dropwise as a solution in 1,4-dioxane (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing) to the stirring mixture. It was heated at reflux for 3 h and allowed to cool down to room temperature. The volatiles were removed under vacuum to give a brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5 to 20% EtOAc in hexanes) afforded methyl 7-bromo-4,4-dimethyl-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-

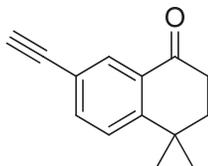
carboxylate (**5-55**) as a white solid (91.4 mg, 90%, mp = 82 – 85 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.33 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.70 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.3 Hz), 7.63 (s, 1H), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.90 (s, 3H), 1.53 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 179.55, 165.38, 162.32, 147.04, 136.10, 132.44, 130.43, 129.34, 128.09, 121.63, 52.67, 37.66, 29.35. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₁₄H₁₃O₃BrNa: 330.9940, found: 330.9932. IR (neat) ν 2979, 1741, 1660, 1590, 1363, 1263, 1091 cm⁻¹.

4,4-dimethyl-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-56**)



A sealed tube was charged with CuI (21.0 mg, 0.11 mmol) and Pd(PPh₃)₂Cl₂ (21.2 mg, 0.03 mmol) under argon at room temperature. 7-bromo-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-54**) (100.4 mg, 0.40 mmol) was added dropwise as a solution in triethylamine (1.5 mL + 0.5 mL for rinsing). Then, ethynyltrimethylsilane (75 μL, 0.53 mmol) was also added dropwise; the tube was sealed, the mixture was stirred at 100 °C for 20 h and allow to cool down to room temperature before being filtrated on celite with Et₂O. The solvents were removed under vacuum to afford 4,4-dimethyl-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-56**) as a brown residue (99.7 mg, 92%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁵⁰ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.11 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8.2, 1.9 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 2.72 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 2.01 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 1.37 (s, 6H), 0.24 (s, 9H).

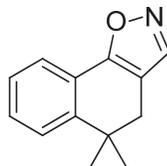
7-ethynyl-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-57**)



4,4-dimethyl-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-56**) (190.5 mg, 0.70 mmol) was dissolved in methanol (3.0 mL) and stirred under argon at room temperature in a round bottom flask. Potassium carbonate (201.1 mg, 1.46 mmol) was added in one portion; stirring was continued for 18 h and the solvent was removed under vacuum. The residue was taken in aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown residue. Purification of the crude material by silica gel

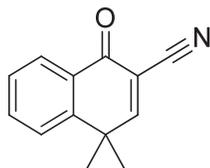
chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded 7-ethynyl-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-57**) as a white solid (110.1 mg, 56%). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁵⁰ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.14 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 7.61 (dd, 1H, J = 8.2, 1.9 Hz), 7.39 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 3.06 (s, 1H), 2.73 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 2.02 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 1.39 (s, 6H).

5,5-dimethyl-4,5-dihydronaphtho[2,1-d]isoxazole (**5-60**)



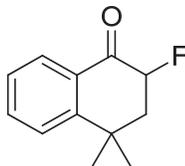
In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 161.5 mg, 4.04 mmol) was suspended in THF (2.0 mL) at 0 °C under argon. MeOH (0.28 mL, 6.91 mmol) was added dropwise to the stirring mixture. After 30 min of additional stirring, ethyl formate (0.32 mL, 3.96 mmol) was added. Then, 4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**) (202.4 mg, 1.16 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 3 h. Et₂O (11 mL) was added and extracted with aqueous 1 N NaOH (3 \times 10 mL). The combined aqueous layers were acidified with aqueous 6 N HCl till pH = 1 and extracted with CH₂Cl₂ (4 \times 10 mL). The combined halogenated layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give (Z)-2-(hydroxymethylene)-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-59**) as a brown oil (202.5 mg, 86%). At room temperature and opened to air, (Z)-2-(hydroxymethylene)-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-59**) (192.7 mg, 0.95 mmol) was dissolved in ethanol (10 mL) and stirred. Hydroxylamine hydrochloride (693.0 mg, 9.97 mmol) was dissolved in the minimum amount of water and added to the first solution. The mixture was refluxed for 2 h and allowed to cool down to room temperature. The solvents were removed under vacuum; the residue was taken into EtOAc (15 mL), washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 \times 5 mL), water (2 \times 5 mL), brine (2 \times 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a pale orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% to 4% EtOAc in hexanes) afforded 5,5-dimethyl-4,5-dihydronaphtho[2,1-d]isoxazole (**5-60**) as yellow oil (144.8 mg, 76%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.17 (s, 1H), 7.74 – 7.70 (m, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.32 (ddd, 1H, J = 8.8, 5.9, 1.8 Hz), 2.68 (s, 2H), 1.33 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 164.48, 149.63, 145.30, 130.33, 126.88, 125.27, 123.63, 122.54, 111.03, 36.35, 33.88, 29.31. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₃H₁₃ONNa: 222.0889, found: 222.0886. IR (neat) ν 2961, 1467, 1438 cm⁻¹.

4,4-dimethyl-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-carbonitrile (**5-61**)



In a two-neck round bottom flask, sodium (506.5 mg, 22.0 mmol) was added to methanol (12.0 mL) at 0 °C under argon. Once the gas evolution has ceased, 5,5-dimethyl-4,5-dihydronaphtho[2,1-d]isoxazole (**5-60**) (144.8 mg, 0.73 mmol) was added dropwise as a solution in methanol (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up to room temperature and stir for 1 h. EtOAc (30 mL) was added; the organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 10 mL), brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a pale yellow oil. It was dissolved in 1,4-dioxane (1.0 mL) and added dropwise to a suspension of DDQ (176.8 mg, 0.78 mmol) in 1,4-dioxane (3.0 mL) at room temperature under argon. After 3 h of additional stirring at reflux, the mixture was filtrated with CH₂Cl₂ and concentrated to give a brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% to 20% EtOAc in hexanes) gave a light brown solid. Trituration in Et₂O afforded 4,4-dimethyl-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-carbonitrile (**5-61**) as a light cream solid (74.5 mg, 52%, mp = 127 - 129 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.22 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.2 Hz), 7.70 – 7.63 (m, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 1H), 7.49 – 7.41 (m, 1H), 1.58 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 178.83, 167.42, 148.27, 134.21, 128.84, 127.76, 127.67, 126.44, 115.28, 114.43, 38.82, 29.37. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₃H₁₁ONNa: 220.0733, found: 220.0738. IR (neat) ν 2973, 2233, 1667, 1604, 1366, 1264 cm⁻¹.

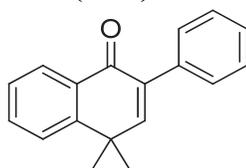
2-fluoro-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-62**)



4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**) (202.1 mg, 1.16 mmol) was dissolved in methanol (2.0 mL) at room temperature under argon in a round bottom flask. The solution was stirred; Selectfluor[®] (503.0 mg, 1.42 mmol) was added in one portion and then concentrated sulfuric acid (5 drops) was added dropwise. The mixture was heated at 50 °C for 20 h, filtrated at room temperature and concentrated. The residue was taken into Et₂O (15 mL), washed with water (2 × 5 mL), brine (3 × 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a colorless oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% to 5% EtOAc in hexanes) afforded 2-fluoro-4,4-dimethyl-3,4-

dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-62**) as a white solid (88.3 mg, 40%, mp = 38 – 40 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.04 (dd, 1H, *J* = 7.8, 0.9 Hz), 7.62 – 7.55 (m, 1H), 7.43 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.35 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 5.34 (ddd, 1H, *J* = 48.0, 12.8, 6.3 Hz), 2.43 – 2.24 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 193.86 (d, *J* = 14.2 Hz), 151.25 (d, *J* = 1.6 Hz), 134.76, 129.81 (d, *J* = 1.0 Hz), 128.00 (d, *J* = 2.4 Hz), 127.23, 126.29, 88.84 (d, *J* = 186.5 Hz), 43.68 (d, *J* = 16.2 Hz), 35.66 (d, *J* = 11.3 Hz), 31.46, 30.48. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₁H₁₃O₁FNa: 215.0842, found: 215.0847. IR (neat) ν 2973, 2876, 1693, 1600, 1244, 1073 cm⁻¹.

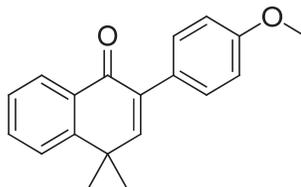
4,4-dimethyl-2-phenylnaphthalen-1(4H)-one (**5-64**)



A sealed tube was charged with Pd(dba)₂ (27 mg, 0.05 mmol) and tBu₃PHBF₄ (33.3 mg, 0.11 mmol) and 1,4-dioxane (4.0 mL) under argon at room temperature. A solution of 4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**) (200 mg, 1.15 mmol) and bromobenzene (0.15 mL, 1.38 mmol) in 1,4-dioxane (2.0 mL + 2.0 mL for rinsing) was added dropwise. Then, a solution of potassium hydroxide (161 mg, 2.44 mmol) in H₂O (2.0 mL) was also added. The tube was sealed and heated at 110 °C overnight. The mixture was filtered on celite with EtOAc. The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (2 × 10 mL), brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (3% EtOAc in hexanes) afforded 4,4-dimethyl-2-phenyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one as a pale yellow oil (236.0 mg, 82%). Potassium *tert*-butoxide (222.9 mg, 1.99 mmol) was suspended in THF (1.0 mL) at 0 °C under argon in a round bottom flask. 4,4-dimethyl-2-phenyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (220.6 mg, 0.88 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred for 30 min. DDQ (241.2 mg, 1.06 mmol) was added in one portion and the mixture was refluxed for 22 h. At 0 °C, aqueous 1 N HCl (5 mL) was added and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown solid. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded 4,4-dimethyl-2-phenylnaphthalen-1(4H)-one (**5-64**) as a white solid (84.8 mg, 39%, mp = 104 – 106 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.30 – 8.26 (m, 1H), 7.64 – 7.55 (m, 2H), 7.52 – 7.47 (m, 2H), 7.46 – 7.35 (m, 4H), 7.00 (s, 1H), 1.58 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 183.83, 155.42, 149.38, 136.86, 136.54, 132.63, 131.08,

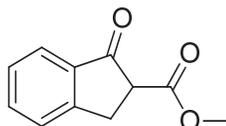
129.11, 128.22, 127.95, 127.68, 126.99, 126.22, 37.53, 30.09. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₈H₁₇O: 249.1274, found: 249.1277. IR (neat) ν 2983, 1649, 1601, 1367, 1251 cm⁻¹.

2-(4-methoxyphenyl)-4,4-dimethylnaphthalen-1(4H)-one (5-65)



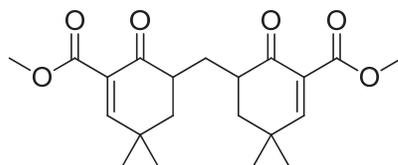
A sealed tube was charged with Pd(dba)₂ (16.3 mg, 0.018 mmol) and tBu₃PHBF₄ (20.3 mg, 0.07 mmol) and 1,4-dioxane (2.0 mL) under argon at room temperature. A solution of 4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (**5-51**) (200 mg, 1.15 mmol) and 4-bromoanisole (90 μ L, 0.72 mmol) in 1,4-dioxane (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing) was added dropwise. Then, a solution of potassium hydroxide (109.3 mg, 1.95 mmol) in H₂O (1.0 mL) was also added. The tube was sealed and heated at 110 °C for 22 h. The mixture was filtered on celite with EtOAc. The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (2 \times 10 mL), brine (2 \times 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (3 to 5% EtOAc in hexanes) afforded 2-(4-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one as a colorless oil (154.1 mg, 90%). Potassium *tert*-butoxide (160.2 mg, 1.43 mmol) was suspended in THF (1.5 mL) at 0 °C under argon in a round bottom flask. 2-(4-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (154.1 mg, 0.55 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred for 30 min. DDQ (164.0 mg, 0.70 mmol) was added in one portion and the mixture was refluxed for 21 h. At 0 °C, aqueous 1 N HCl (5 mL) was added and extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (3 to 5% EtOAc in hexanes) afforded 2-(4-methoxyphenyl)-4,4-dimethylnaphthalen-1(4H)-one (**5-65**) as a white solid (83.8 mg, 55%, mp = 76 – 77 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.31 – 8.24 (m, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 2H), 7.49 – 7.38 (m, 3H), 6.99 – 6.91 (m, 3H), 3.85 (s, 3H), 1.57 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 184.08, 159.52, 154.51, 149.43, 132.55, 131.14, 130.25, 128.94, 127.67, 126.94, 126.20, 113.71, 55.49, 37.49, 30.15. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₁₉H₁₈O₂Na: 301.1199, found: 301.1201. IR (neat) ν 2979, 1650, 1602, 1511, 1243, 1176, 1037 cm⁻¹.

Methyl 1-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-2-carboxylate (**5-67**)



In a flame-dried round bottom flask, NaH (60% in oil, 483.0 mg, 12.1 mmol) was suspended in dimethyl carbonate (1.0 mL) at room temperature under argon and stirred. 2,3-dihydro-1H-inden-1-one (**5-66**) (509.0 mg, 3.9 mmol) was added dropwise as a solution in dimethyl carbonate (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The resulting mixture was heated at 80 °C for 4 h and allowed to cool down to room temperature. Water (30 mL) was added slowly and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a black oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded methyl 1-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-2-carboxylate (**5-67**) as a brown solid (548.6 mg, 75%, ketone:enol = 5.5:1). The spectral data were consistent with that reported previously.¹⁵⁵ ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) ketone 7.78 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.64 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.51 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 3.80 (s, 3H), 3.75 (dd, 1H, *J* = 8.3, 4.0 Hz), 3.58 (dd, 1H, *J* = 17.3, 4.0 Hz), 3.38 (dd, 1H, *J* = 17.3, 8.3 Hz) enol 10.37 (br s, 1H), 7.64 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.51 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.48 – 7.44 (m, 1H), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 3.86 (s, 3H), 3.52 (s, 2H).

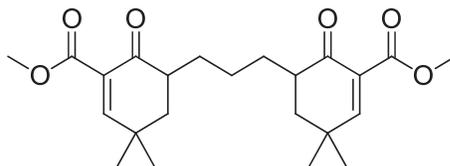
Dimethyl 5,5'-methylenebis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2a**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (4.80 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (2.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (400.5 mg, 2.17 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, diiodomethane (105 μL, 1.30 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 27 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (20 mL) and extracted with EtOAc (5 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-methylenebis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1a**) as an orange oil (374.8 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (192.9 mg, 0.82 mmol) was

dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (70 μL, 0.87 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, dimethyl 3,3'-methylenebis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1a**) (102.3 mg, 0.27 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 2 × 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 5 h and diluted with more CH₂Cl₂ (7 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 1 h of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20 to 25% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 5,5'-methylenebis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2a**) as a yellowish solid (28.9 mg, 25% over two steps, mp = 132 - 134 °C). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz) δ (ppm) 7.19 (br s, 2H), 3.71 (s, 6H), 2.82 – 2.75 (m, 2H), 1.89 – 1.86 (m, 2H), 1.69 – 1.63 (m, 4H), 1.26 (s, 6H), 1.17 (s, 6H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz) δ (ppm) 197.69, 165.48, 163.03, 130.25, 52.22, 43.18, 42.13, 34.20, 30.68, 30.18, 25.27. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₂₁H₂₈O₆Na: 399.1778, found: 399.1785. IR (neat) ν 2967, 1709, 1692, 1259, 1235 cm⁻¹

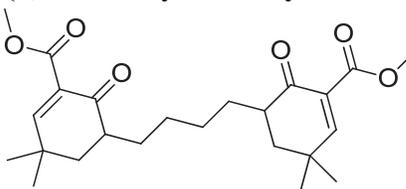
Dimethyl 5,5'-(propane-1,3-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2b**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (4.80 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (2.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (404.1 mg, 2.19 mmol) was added dropwise as a solution in THF (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1,3-diiodopropane (150 μL, 1.31 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 27 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (20 mL) and extracted with EtOAc (5 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5%

EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(propane-1,3-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1b**) as a yellow oil (355.8 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (237.2 mg, 1.01 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (90 μL, 1.11 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, dimethyl 3,3'-(propane-1,3-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1b**) (100.8 mg, 0.25 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 2 × 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C overnight and diluted with more CH₂Cl₂ (5 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 1 h of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20 to 25% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 5,5'-(propane-1,3-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2b**) as a yellow oil (63.0 mg, 50% over two steps). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.27 (s, 2H), 3.79 (s, 6H), 2.55 – 2.46 (m, 2H), 1.89 (ddd, 4H, *J* = 2.2, 4.7, 13.4 Hz), 1.67 (t, 2H, *J* = 18.3 Hz), 1.46 – 1.33 (m, 4H), 1.25 (s, 6H), 1.21 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 197.01, 196.97, 165.67, 163.30, 163.27, 130.16, 52.33, 52.30, 43.46, 43.43, 42.02, 41.97, 33.98, 30.33, 29.44, 29.30, 25.38, 24.30, 24.23. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₂₃H₃₂O₆Na: 427.2091, found: 427.2109. IR (neat) ν 2955, 1742, 1717, 1682, 1270, 1215 cm⁻¹

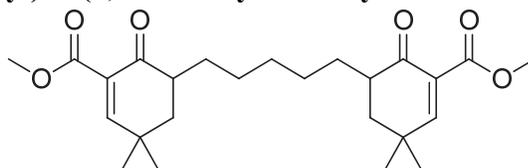
Dimethyl 5,5'-(butane-1,4-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2c**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.50 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (201.3 mg, 1.09 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1,4-diiodobutane (87 μL, 0.66 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 27 h. At 0 °C, the reaction

was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (4 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(butane-1,4-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1c**) as a white gum (199.5 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (233.8 mg, 0.99 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (90 μL, 1.11 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, dimethyl 3,3'-(butane-1,4-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1c**) (106.7 mg, 0.25 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 2 × 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 21 h and diluted with more CH₂Cl₂ (5 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (10.0 mL); the yellow solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 1.0 mL, 17.3 mmol) was added dropwise. After 40 min of additional stirring, the resulting mixture was washed with aqueous saturated NaHCO₃ (3 × 5 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). All the combined organic layers were washed with brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (30% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 5,5'-(butane-1,4-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2c**) as a white solid (64.3 mg, 53% over two steps, mp = 84 - 86 °C). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.25 (d, 2H, *J* = 2.1 Hz), 3.79 (s, 6H), 2.53 – 2.44 (m, 2H), 1.94 – 1.84 (m, 4H), 1.65 (td, 2H, *J* = 0.9, 13.9 Hz), 1.38 – 1.32 (m, 6H), 1.25 (s, 6H), 1.20 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 196.97, 165.74, 163.19, 130.22, 52.34, 43.58, 41.90, 33.92, 30.35, 29.05, 29.03, 27.17, 27.14, 25.40. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₂₄H₃₄O₆Na: 441.2248, found: 441.2251. IR (neat) ν 2936, 1717, 1675, 1259, 1237 cm⁻¹

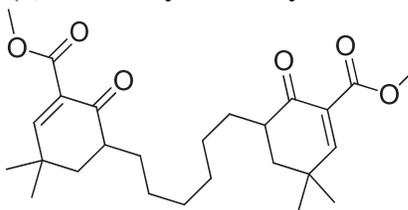
Dimethyl 5,5'-(pentane-1,5-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (6-2d)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.59 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (209.0 mg, 1.13 mmol) was added

dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1,5-diiodopentane (100 µL, 0.67 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (1 to 5% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(pentane-1,5-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1d**) as a viscous colorless oil (223.2 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (380.0 mg, 1.61 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (0.20 mL, 2.47 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, dimethyl 3,3'-(pentane-1,5-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1d**) (168.1 mg, 0.39 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 21 h and diluted with more CH₂Cl₂ (10 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 × 5 mL), brine (3 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 15% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(pentane-1,5-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxo-1-(phenylselanyl)cyclohexanecarboxylate) as a pale yellow oil (192.8 mg confirmed by mass spectrometry). It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 5 mL), brine (2 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give dimethyl 5,5'-(pentane-1,5-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2d**) as a white solid (90.5 mg, 48% over three steps, mp = 80 - 82 °C). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ (ppm) 7.18 (d, 2H, *J* = 2.2 Hz), 3.72 (s, 6H), 2.51 – 2.39 (m, 2H), 1.87 (ddd, 4H, *J* = 13.4, 4.7, 2.2 Hz), 1.62 (t, 2H, *J* = 13.7 Hz), 1.32 (br. s, 8H), 1.21 (s, 3H), 1.17 (s, 6H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz) δ (ppm) 196.77, 165.47, 162.47, 130.31, 51.93, 43.46, 43.44, 41.78, 41.76, 33.70, 30.02, 29.95, 29.91, 28.97, 28.93, 26.75, 26.69, 25.05. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for C₂₅H₃₆O₆Na: 455.2404, found: 455.2419. IR (neat) ν 2941, 1729, 1672, 1436, 1363, 1275, 1248 cm⁻¹.

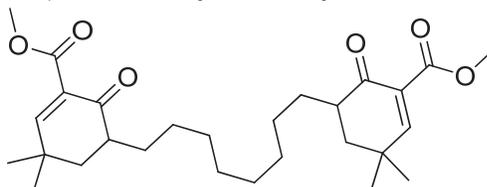
Dimethyl 5,5'-(hexane-1,6-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (6-2e)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (4.66 mmol) was prepared under argon at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in THF (2.5 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (405.2 mg, 2.20 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.7 mL + 0.8 mL for rinsing). The temperature was increased to $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stirring was continued for 1 h. Then, 1,6-dibromohexane (200 μL , 1.30 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 25 h. At $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (20 mL) and extracted with EtOAc ($5 \times 10\text{ mL}$). The combined organic layers were washed with brine ($3 \times 10\text{ mL}$), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(hexane-1,6-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1e**) as a yellow oil (334.0 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (654.3 mg, 2.77 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (4.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ when pyridine (0.25 mL, 3.09 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, dimethyl 3,3'-(hexane-1,6-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1e**) (311.0 mg, 0.69 mmol) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The reaction was stirred at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 h and diluted with more CH_2Cl_2 (10 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl ($3 \times 5\text{ mL}$), brine ($3 \times 5\text{ mL}$), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give an orange oil. It was dissolved in CH_2Cl_2 (5.0 mL); the yellow solution was stirred at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ opened to air when aqueous H_2O_2 (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 40 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (10 mL) and washed with water (5 mL), aqueous saturated NaHCO_3 ($2 \times 5\text{ mL}$), brine ($2 \times 5\text{ mL}$), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (15 to 30% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 5,5'-(hexane-1,6-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2e**) as a white solid (76.5 mg, 17% over two steps, mp = $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $100\text{ }^{\circ}\text{C}$). ^1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ (ppm) 7.17 (d, 2H, $J = 2.2\text{ Hz}$), 3.72 (s, 6H), 2.50 – 2.39 (m, 2H), 1.87 (ddd, 4H, $J = 13.4, 4.7, 2.2\text{ Hz}$), 1.61 (t, 2H, $J = 13.7\text{ Hz}$), 1.31 (br s, 10H), 1.21 (s, 6H), 1.17 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 197.02, 165.76, 163.09, 130.27, 52.32, 43.59, 41.91, 33.92, 30.36, 29.78,

29.12, 26.90, 25.42. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₂₆H₃₈O₆Na: 469.2561, found: 469.2571. IR (neat) ν 2935, 2859, 1732, 1610, 1261, 1226 cm⁻¹.

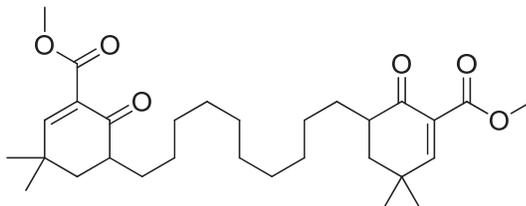
Dimethyl 5,5'-(octane-1,8-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (6-2f)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.50 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (214.0 mg, 1.16 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1,8-diiodooctane (130 μ L, 0.65 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 20 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (1% to 5% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(octane-1,8-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1f**) as a yellow oil (238.1 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (470.0 mg, 1.99 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (3.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (0.20 mL, 2.47 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, dimethyl 3,3'-(octane-1,8-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1f**) (236.3 mg, 0.49 mmol) was added dropwise as a solution in CH₂Cl₂ (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 20 h and diluted with more CH₂Cl₂ (10 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3 \times 5 mL), brine (3 \times 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. It was dissolved in CH₂Cl₂ (5.0 mL); the brown solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H₂O₂ (50% wt, 1.0 mL, 17.3 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL) and washed with aqueous saturated NaHCO₃ (5 mL), brine (2 \times 10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10 to 30% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 5,5'-(octane-1,8-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2f**) as a white solid (112.2 mg, 41% over two steps, mp = 70 – 73 °C). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ (ppm) 7.17 (d, 2H, J = 2.2 Hz), 3.72 (s, 6H), 2.51 – 2.36 (m, 2H), 1.87 (ddd, 4H, J = 13.4, 4.7, 2.2 Hz), 1.61 (t, 2H, J = 13.7 Hz), 1.28 (br s, 14 H), 1.21 (s, 6H), 1.17 (s, 6H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂, 75 MHz)

δ (ppm) 196.81, 165.49, 162.45, 130.31, 51.92, 43.45, 41.75, 33.69, 30.02, 29.83, 29.60, 28.99, 26.84, 25.04. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{28}H_{42}O_6Na$: 497.2874, found: 497.2864. IR (neat) ν 2932, 1716, 1693, 1679, 1439, 1263, 1222 cm^{-1} .

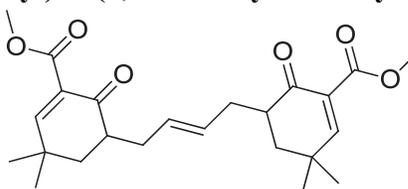
Dimethyl 5,5'-(decane-1,10-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (6-2g)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.39 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (207.5 mg, 1.13 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, 1,10-diiododecane (260.3 mg, 0.66 mmol) was added in one portion; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 19 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with EtOAc (3×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a light brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (1% to 3% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(decane-1,10-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1g**) as a pale yellow oil (185.5 mg confirmed by mass spectrometry). PhSeBr (357.4 mg, 1.51 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.0 mL) in a round bottom flask. The brown solution was stirred under argon at 0 °C when pyridine (0.15 mL, 1.85 mmol) was added dropwise. After 30 min of additional stirring, 3,3'-(decane-1,10-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1g**) (185.5 mg, 0.37 mmol) was added dropwise as a solution in CH_2Cl_2 (1.0 mL + 1.0 mL for rinsing). The reaction was stirred at 0 °C for 21 h and diluted with more CH_2Cl_2 (5 mL). The organic layer was washed with aqueous 1 N HCl (3×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to give a brown oil. It was dissolved in CH_2Cl_2 (5.0 mL); the brown solution was stirred at 0 °C opened to air when aqueous H_2O_2 (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 40 min of additional stirring, the resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (10 mL) and washed with aqueous saturated $NaHCO_3$ (3×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to give a light brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% to 20% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 5,5'-(decane-1,10-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2g**) as a yellow gum (16.8 mg, 6% over two steps). 1H NMR (CD_2Cl_2 , 400 MHz)

δ (ppm) 7.18 (d, 2H, $J = 1.5$ Hz), 3.72 (s, 6H), 2.50 – 2.38 (m, 2H), 1.91 – 1.82 (m, 4H), 1.61 (t, 2H, $J = 13.7$ Hz), 1.27 (br s, 18H), 1.21 (s, 6H), 1.17 (s, 6H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 100 MHz) δ (ppm) 196.80, 165.50, 162.43, 130.33, 51.92, 43.46, 41.76, 33.69, 30.03, 29.86, 29.71, 29.66, 29.00, 26.86, 25.05. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6\text{Na}$: 525.3187, found: 525.3184. IR (neat) ν 2944, 1723, 1683, 1435, 1365, 1262 cm^{-1} .

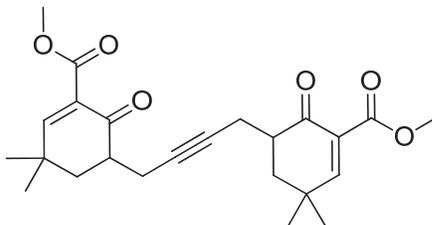
(*E*)-Dimethyl 5,5'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (6-2h)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.50 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (201.3 mg, 1.09 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C and stirring was continued for 1 h. Then, (2*E*)-1,4-dibromobut-2-ene (146.7 mg, 0.69 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing); the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 24 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 \times 10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) afforded (*E*)-dimethyl 3,3'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1h**) as a yellow oil (201.9 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, DDQ (106.5 mg, 0.47 mmol) was suspended in 1,4-dioxane (0.5 mL) at room temperature under argon. To the stirring mixture, (*E*)-dimethyl 3,3'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1h**) (89.9 mg, 0.21 mmol) was added dropwise as a solution in 1,4-dioxane (1.0 mL + 0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at room temperature for 1 h and then at reflux for 2 h. The mixture was allowed to cool down to room temperature; saturated aqueous Na_2CO_3 (10 mL) was added, everything was poured into brine (10 mL) and extracted with EtOAc (5 \times 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to afford a brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% to 30% EtOAc in hexanes) gave a yellow solid. It was triturated in Et_2O to obtain (*E*)-dimethyl 5,5'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2h**) as a white solid (12.9 mg, 13% over two steps, mp = 126 – 128 °C). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.27 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz), 5.44 – 5.41 (m, 2H), 3.79 (s, 6H), 2.64 – 2.46 (m, 4H), 2.13 – 2.00 (m, 2H), 1.87 – 1.81 (m, 2H), 1.61

(td, 2H, $J = 3.7, 13.6$ Hz), 1.23 (s, 6H), 1.19 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 196.19, 196.16, 165.61, 163.55, 130.08, 130.05, 129.95, 52.35, 43.53, 43.51, 41.39, 41.37, 33.96, 33.95, 32.33, 32.31, 30.33, 25.34. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{Na}$: 439.2091, found: 439.2094. IR (neat) ν 2963, 1717, 1674, 1273, 1252 cm^{-1} .

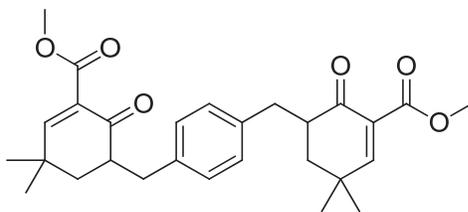
Dimethyl 5,5'-(but-2-yne-1,4-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (6-2i)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.64 mmol) was prepared under argon at -78 °C in THF (0.5 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (214.7 mg, 1.17 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to 0 °C, distilled HMPA (200 μL , 1.15 mmol) was added dropwise and stirring was continued for 1 h. Then, 1,4-dichloro-2-butyne (64 μL , 0.65 mmol) was added dropwise; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 22 h. At 0 °C, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (5% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(but-2-yne-1,4-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1i**) as a yellow oil (127.4 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, DDQ (150.1 mg, 0.66 mmol) was suspended in 1,4-dioxane (1.0 mL) at room temperature under argon. To the stirring mixture, dimethyl 3,3'-(but-2-yne-1,4-diyl)bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1i**) (121.4 mg, 0.29 mmol) was added dropwise as a solution in 1,4-dioxane (1.0 mL + 2×0.5 mL for rinsing). The reaction was stirred at reflux for 20 h. The mixture was allowed to cool down to room temperature; saturated aqueous Na_2CO_3 (10 mL) was added and extracted with EtOAc (5×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (5×15 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to afford a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20% to 40% EtOAc in hexanes) gave a brown residue. It was triturated in Et_2O to obtain dimethyl 5,5'-(but-2-yne-1,4-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2i**) as a light brown solid (17.5 mg, 8% over two steps, mp = $132 - 134$ °C). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.31 (d, 2H, $J = 2.1$ Hz), 3.78 (s, 6H), 2.76 – 2.61 (m, 4H), 2.30 – 2.25 (m, 2H), 2.13 – 2.08 (m, 2H), 1.75 (t, 2H, $J = 13.7$ Hz), 1.26 (s, 6H), 1.23 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz)

δ (ppm) 194.89, 194.87, 165.36, 165.34, 164.22, 164.15, 129.71, 129.67, 79.25, 79.24, 52.35, 43.19, 43.17, 41.21, 41.19, 33.97, 30.27, 25.33, 19.16. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{24}H_{30}O_6Na$: 437.1935, found: 437.1938. IR (neat) ν 2956, 1731, 1670, 1281, 1255 cm^{-1} .

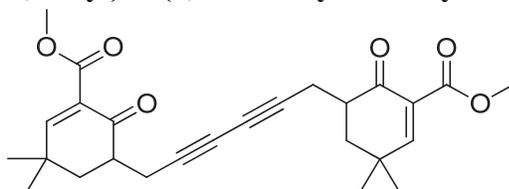
Dimethyl 5,5'-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (6-2j)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (2.50 mmol) was prepared under argon at $-78\text{ }^{\circ}C$ in THF (1.0 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate (**4-15**) (204.8 mg, 1.11 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The temperature was increased to $0\text{ }^{\circ}C$ and stirring was continued for 1 h. Then, α,α' -dibromo-*p*-xylene (175.3 mg, 0.66 mmol) was added in one portion; the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 24 h. At $0\text{ }^{\circ}C$, the reaction was quenched with aqueous 1 N HCl (5 mL) and extracted with EtOAc (3×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give an orange oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (1% to 3% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl 3,3'-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1j**) as a yellowish solid (91.2 mg confirmed by mass spectrometry). In a flame-dried round bottom flask, LDA (0.42 mmol) was prepared under argon at $-78\text{ }^{\circ}C$ in THF (0.5 mL). Dimethyl 3,3'-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(5,5-dimethyl-2-oxocyclohexanecarboxylate) (**6-1j**) (91.2 mg, 0.19 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). After 30 min of additional stirring, PhSeBr (140.0 mg, 0.59 mmol) was also added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing); the resulting mixture was allowed to warm up till room temperature and stir for 3 h. At $0\text{ }^{\circ}C$, the reaction was quenched with brine (5 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3×10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to afford a yellow oil. It was taken in CH_2Cl_2 (5.0 mL); the solution was stirred at $0\text{ }^{\circ}C$ opened to air when H_2O_2 (50% wt, 0.5 mL, 8.65 mmol) was added dropwise. After 30 min of vigorous stirring, CH_2Cl_2 (5 mL) was added. The organic layer was successively washed with aqueous saturated $NaHCO_3$ (2×5 mL), brine (2×5 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated to give a pale yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (10% to 40% EtOAc in hexanes) afforded dimethyl

5,5'-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-2j**) as a white solid (35.6 mg, 14% over two steps, mp = 132 – 136 °C). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ (ppm) 7.20 (d, 2H, *J* = 2.1 Hz), 7.08 (s, 4H), 3.73 (s, 6H), 3.31 (dd, 2H, *J* = 14.1, 4.4 Hz), 2.84 – 2.70 (m, 2H), 2.42 (dd, 2H, *J* = 13.9, 8.6 Hz), 1.73 (ddd, 2H, *J* = 13.4, 4.7, 1.9 Hz), 1.59 (t, 2H, *J* = 13.7 Hz), 1.12 (s, 6H), 1.11 (s, 6H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz) δ (ppm) 195.97, 165.31, 162.96, 137.65, 130.08, 129.20, 51.99, 45.24, 41.26, 41.24, 34.72, 34.70, 33.76, 29.95, 24.83. HRMS (ESI-Q-ToF) calcd for C₂₈H₃₄O₆Na: 489.2248, found: 489.2263. IR (neat) ν 2958, 1713, 1693, 1682, 1435, 1258 cm⁻¹.

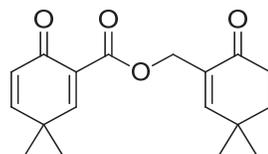
Dimethyl 5,5'-(hexa-2,4-diyne-1,6-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-5**)



In a flame-dried round bottom flask, LDA (0.63 mmol) was prepared under argon at –78 °C in THF (0.5 mL). Methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-3-(prop-2-yn-1-yl)cyclohexanecarboxylate (**4-16f**) (107.4 mg, 0.48 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). After 30 min of additional stirring, PhSeBr (127.4 mg, 0.54 mmol) was added dropwise as a solution in THF (0.5 mL + 0.5 mL for rinsing). The mixture was allowed to warm up till room temperature and stirred for 3 h. At 0 °C, aqueous 1 N HCl (5 mL) was added and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% to 4% EtOAc in hexanes) afforded methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-1-(phenylselanyl)-3-(prop-2-yn-1-yl)cyclohexanecarboxylate (**6-3**) (94.9 mg) as a yellow oil. In a round bottom flask, methyl 5,5-dimethyl-2-oxo-1-(phenylselanyl)-3-(prop-2-yn-1-yl)cyclohexanecarboxylate (**6-3**) (94.9 mg, 0.25 mmol) was dissolved in toluene and stirred at room temperature opened to air. Then, triethylamine (2 drops) and CuCl₂ (catalytic amount) were added; the mixture was heated at 60 °C for 6 h and allowed to cool down to room temperature. It was taken into EtOAc, filtered and concentrated to give a yellow oil. It was taken in CH₂Cl₂ (2.0 mL); the solution was stirred at 0 °C opened to air when H₂O₂ (50% wt, 0.2 mL, 3.46 mmol) was added dropwise. After 30 min of vigorous stirring, CH₂Cl₂ (8 mL) was added. The organic layer was successively washed with aqueous saturated NaHCO₃ (2 × 5 mL), brine (2 × 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow solid. Purification of the crude material by trituration in Et₂O afforded dimethyl 5,5'-(hexa-2,4-diyne-1,6-diyl)bis(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate) (**6-5**) as a white solid (29.4 mg, 28% over three steps, *t*_{dec.} = 165 °C). ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ (ppm) 7.27 (d, 2H, *J* = 2.2 Hz),

3.73 (s, 6H), 2.80 – 2.64 (m, 4H), 2.48 – 2.32 (m, 2H), 2.06 (ddd, 2H, $J = 13.4, 4.4, 2.3$ Hz), 1.77 (t, 2H, $J = 13.8$ Hz), 1.25 (s, 6H), 1.21 (s, 6H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 100 MHz) δ (ppm) 194.09, 164.94, 163.89, 129.55, 75.26, 66.47, 52.04, 42.66, 41.20, 33.88, 29.90, 24.99, 19.60. HRMS (ESI-Q-Tof) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Na}$: 461.1935, found: 461.1944. IR (neat) ν 2958, 1735, 1617, 1436, 1377, 1251, 1050 cm^{-1} .

(3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohexa-1,4-dienecarboxylate (6-8)



Methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**5-16**) (252.6 mg, 1.34 mmol) was dissolved in toluene (5.0 mL) and the solution was stirred under argon at room temperature in a round bottom flask. 2-(hydroxymethyl)-4,4-dimethylcyclohex-2-enone (**5-4**) (102.2 mg, 0.66 mmol) was added dropwise as a solution in toluene (2.0 mL + 1.0 mL for rinsing). Then, triethylamine (0.19 mL, 1.36 mmol) was also added dropwise; the mixture was heated in a Dean-Stark apparatus for 17 h and allowed to cool down to room temperature. It was washed with brine (3×3 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown oil. Purification of the crude material by silica gel chromatography (2% to 10% EtOAc in hexanes) afforded (3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**6-7**) as an orange oil (114.7 mg, mixture of the ketone and the enol forms, confirmed by mass spectrometry, 57%). In a flame-dried round bottom flask, (3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 5,5-dimethyl-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate (**6-7**) (75.0 mg, 0.25 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (2.0 mL) under argon at room temperature. To the stirring mixture, DDQ (75.6 mg, 0.33 mmol) and potassium carbonate (100.1 mg, 0.72 mmol) were added in one portion each other. It was heated at reflux for 3 h; at room temperature, H_2O (5 mL) was added and extracted with EtOAc (3×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a brown residue. Purification of the crude material by silica gel chromatography (20% to 30% EtOAc in hexanes) afforded (3,3-dimethyl-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)methyl 3,3-dimethyl-6-oxocyclohexa-1,4-dienecarboxylate (**6-8**) as an orange oil (29.5 mg, 39%). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.48 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz), 6.90 (s, 1H), 6.79 (dd, 1H, $J = 10.0, 3.0$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 4.90 (d, 2H, $J = 1.1$ Hz), 2.50 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.87 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.32 (s, 3H), 1.20 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 198.09, 181.44, 164.80, 161.21, 157.57, 155.03, 131.12, 130.63, 128.15, 62.28, 38.32, 36.08, 34.67, 33.18, 27.92, 26.69. HRMS (ESI-Q-

Tof) calcd for C₁₈H₂₂O₄Na: 325.1410, found: 325.1425. IR (neat) v 2956, 1737, 1665, 1268, 1217, 1172 cm⁻¹.