



HAL
open science

Le Gossypol et ses nouveaux dérivés: Synthèse et étude d'Activités Biologiques

Vi Thuy Dao

► **To cite this version:**

Vi Thuy Dao. Le Gossypol et ses nouveaux dérivés: Synthèse et étude d'Activités Biologiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2002. Français. NNT: . tel-00004168

HAL Id: tel-00004168

<https://theses.hal.science/tel-00004168>

Submitted on 14 Jan 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD
U.F.R SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

THÈSE

présentée
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI, ORSAY**
Discipline : Chimie Organique

par

Vi Thuy DAO

Soutenue le 11 décembre 2002

***LE GOSSYPOL ET SES NOUVEAUX DÉRIVÉS :
SYNTHÈSE ET ÉTUDE D'ACTIVITÉS BIOLOGIQUES***

JURY

Professeur Yves LANGLOIS.....Président
Dr. Didier DESMAËLE.....Rapporteur
Dr. Paul-Henri DUCROT.....Rapporteur
Dr. Robert MICHELOT.....Directeur de thèse

A mon Père et à ma Mère

A "anh Hai"

A ma famille, source de mes espérances

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à Gif-sur-Yvette, à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, dirigé par Monsieur le Professeur Jean-Yves LALLEMAND. Je tiens à remercier son prédécesseur, Monsieur le Professeur Pierre POTIER, membre de l'Académie des Sciences, pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire.

Je remercie vivement les membres du jury:

Monsieur Yves LANGLOIS, Professeur à l'Université de Paris XI-Orsay, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Docteur Didier DESMAËLE, Directeur de Recherche au CNRS, Université Paris-Sud - Faculté de Pharmacie – Châtenay, qui a tout particulièrement veillé à la présentation et à l'exactitude de mon travail et qui fut mon rapporteur.

Docteur Paul-Henri DUCROT, Directeur de Recherche à l'INRA, Unité de Phytopharmacie et Médiateurs chimiques – Versailles qui a accepté d'être mon rapporteur et m'a donné de précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Robert MICHELOT, Directeur de Recherche au CNRS, de m'avoir fait confiance tout au long de la préparation de cette thèse. Il m'a beaucoup appris durant mon séjour dans son équipe, et j'ai bénéficié de sa compétence, de ses conseils. J'ai pu apprécier sa générosité et son humour, que très peu de gens connaissent. C'est un privilège d'être son élève et j'en suis très fière.

Je tiens à remercier Dr Michael K DOWD de l'U.S.D.A., New Orleans pour l'intérêt qu'il porte à nos recherches sur le gossypol et pour sa collaboration efficace et critique.

Je tiens à remercier le Dr Johannes Christianus VAN GROENINGHEN et le Dr Oliver MUELLER, Institut Max Planck de Physiologie Moléculaire, Dortmund, Allemagne, qui s'intéressent particulièrement aux activités anticancéreuses des dérivés du gossypol et m'ont soutenue par leurs encouragements.

Je remercie le Dr Daniel DIVE de l'Institut Pasteur de Lille pour ses études de l'activité antipaludique de nos produits.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur Michel MAYER, Ingénieur à l'ICSN (CNRS), pour sa gentillesse, son encouragement et son soutien durant mon séjour au laboratoire. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma sympathie.

Mes remerciements vont également à

Madame Christiane GASPARD, qui m'a encouragée et qui a réalisé les tests de cytotoxicité pour ma thèse, avec beaucoup d'efficacité et de gentillesse. Je voudrais remercier Monsieur Georges WERNER pour ses précieux conseils.

Madame Marie-Thérèse MARTIN, qui m'a beaucoup aidée et donné les meilleurs conseils pour déterminer les structures de molécules par RMN.

Julie HEMEZ, qui a réalisé les expériences de LC/MS avec beaucoup d'humour, de gentillesse et de disponibilité dans tous les moments. Je tiens à remercier Monsieur Olivier LAPRÉVOTE qui m'a offert généreusement ses compétences, qui m'ont beaucoup aidée pour mes recherches.

Je voudrais remercier Madame Elise TRAN HUU DAU pour ses conseils pour l'étude de la modélisation moléculaire.

Je remercie très amicalement tous les personnels du service de RMN, de spectrométrie de Masse de l'ICSN pour le travail qu'ils ont réalisé et pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Je voudrais aussi remercier tous les personnels de l'ICSN, sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur Christophe DE MIL pour sa gentillesse et sa générosité. J'ai appris grâce à lui une grande leçon de noblesse.

Un très grand remerciement à mes amis TL2-MINHKHAI qui sont un peu partout maintenant dans le monde. Je n'oublierai jamais les trois années que nous avons passées ensemble avec beaucoup de bêtises et de fous rires avant mon départ du Vietnam. Je vous remercie pour vos encouragements, vos messages pleins d'humour qui m'ont accompagnée tout au long de mes années de thèse. Que des bons souvenirs !... et une pensée particulière pour Nguyet Anh, Chan, Hang, Kha, Khiem et Tuong.

Je voudrais remercier tendrement mes deux meilleures copines, Ái et Thu pour tout ce qu'elles ont fait pour moi et pour notre merveilleuse complicité. Vous étiez toujours présentes pour moi en chaque circonstance. Cette thèse est en partie le fruit de notre amitié. À triangle TAT.

De même, je remercie particulièrement Anh, " ma copine en retard" ; je suis très heureuse de te connaître même si tu es un peu en retard.

Quelques lignes pour mes deux jeunes amis, Khánh et Tàì, que je regrette de ne pas avoir rencontré plutôt. J'espère que nous garderons toujours de bons souvenirs de notre séjour à Gif-sur-Yvette.

Je voudrais remercier Hua pour les moments agréables que nous avons passé ensemble, c'est grâce à mon apparence chinoise que nous avons fait connaissance.

Enfin, je voudrais rappeler ma sympathie pour toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à l'Institut et avec lesquelles j'ai pu échanger un sourire.

Title :

Gossypol and new derivatives, synthesis and biological activities

Abstract:

New Schiff bases of racemic gossypol and gossypolone and of (+)- or (-)-gossypol enantiomers are described. Schiff bases obtained from gossypol enantiomers are optically stable at room temperature whereas gossypolone Schiff bases racemize quickly and may be observed only at lower temperatures. Their cytotoxic activities on KB human cancer cells were determined : the methylimine and ethylimine derivatives of racemic gossypolone were the most active compounds, and the cytotoxicity of racemic gossypol and gossypolone was increased when the tests were performed in the absence of serum and decreased when catalase as well as mannitol were added to the culture medium. (-)-gossypol and (-)-gossypol derivatives displayed higher toxicities on KB and MCF7 cells than the corresponding (+) isomers.

New dithiane or dithiolane derivatives of gossypol and gossypolone were synthesized with dithioethane or dithiolpropane in the presence of $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$. Under the same conditions, tetramethyl or hexamethyl ethers of gossypol led to cyclic thioderivatives. These thioderivatives exhibited low toxicity on KB cells. Dithiane or dithiolane derivatives react easily with electrophiles, nitrosonium tetrafluoroborate or nitric oxide plus ferric ion, in aprotic solvents to regenerate gossypolone or to form dehydrogossypoldithianes, which display higher toxicity on KB cells. Since, the low toxicity of gossypol thioderivatives is reversed by nitric oxide donors in physiological media, it is suggested that gossypol and gossypolone dithianes and dithiolanes can be used as prodrugs that target tumor cells surrounded by high concentrations of nitric oxide.

Keywords: gossypol/ gossypolone/ Schiff base/ enantiomer/ dithiane/ dithiolane/ cytotoxicity/ KB cell/ nitric oxide/ NO / prodrug /

Ce travail a fait l'objet de publications et d'un brevet :

Synthesis and cytotoxicity of gossypol related compounds

Dao VT, Gaspard C, Mayer M, Werner GH, Nguyen SN, Michelot RJ, *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2000), **35**(9), 805-813

New Thioderivatives of Gossypol and Gossypolone, as pro-drugs of cytotoxic agents

Dao VT, Dowd MK, Gaspard C, Martin MT, Hémez J, Laprévote O, Mayer M, Michelot RJ, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, (2003), **11**, 2001-2006.

Dérivés dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone, prodrogues anticancéreuses

Dao VT, Gaspard C, Michelot RJ, (2002), brevet français déposé sous le n° 02/10407

Sommaire

ABRÉVATIONS	p.11
INTRODUCTION GÉNÉRALE	p.13
Chapitre I - RAPPELS SUR LE GOSSYPOL ET SUR SES DÉRIVÉS	
<i>I. Chimie du Gossypol</i>	p.16
1. Découverte du Gossypol	p.16
2. Structure de la molécule de Gossypol	p.17
3. Chimie du Gossypol et principaux dérivés	p.18
<i>3.1. Dérivés obtenus à partir du gossypol (hemisynthèses)</i>	p.19
a/ Imino-gossypols (bases de Schiff)	p.19
b/ Esters du gossypol	p.23
c/ Ethers du gossypol	p.23
d/ Anhydrogossypol	p.25
e/ Apogossypol et Desapogossypol	p.26
f/ Oxydation du gossypol et de ses dérivés	p.27
g/ Réduction du gossypol et de ses dérivés	p.28
h/ Autres dérivés du gossypol	p.29
<i>3.2. Synthèse totale du gossypol et de dérivés</i>	p.32
a/ Synthèse totale du gossypol	p.32
b/ Dérivés du gossypol obtenus par synthèse totale	p.36
<i>II. Principales activités biologiques du Gossypol et de ses dérivés</i>	
1. Activité contraceptive	p.39
2. Activité antivirale : antiherpétique et anti-HIV	p.41
3. Activité antifongique	p.47
4. Activité antiparasitaire	p.47
5. Activité antitumorale	p.50

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre II - PROCÉDÉS D'EXTRACTION ET PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DU GOSSYPOL

<i>I. Procédés d'extraction du Gossypol</i>	p.54
<i>II. Caractéristiques physico-chimiques du gossypol</i>	p.57
<i>III. Travaux réalisés</i>	p.59

Chapitre III - BASES DE SCHIFF DU GOSSYPOL ET DE LA GOSSYPOLONE

<i>I. Introduction</i>	p.61
1. Obtention et structure moléculaire	p.61
2. Activités antitumorales des bases de Schiff du Gossypol	p.65
<i>II. Travaux réalisés</i>	
1. CHIMIE	p.66
1.1. Protection des groupements phénoliques et réduction du gossypol	p.67
1.2. Bases de Schiff du gossypol	p.69
a/ Synthèse des bases de Schiff du gossypol	p.69
b/ Synthèse et Etude de la stabilité des bases de Schiff des énantiomères du gossypol	p.71
1.3. Bases de Schiff de la gossypolone	p.73
a/ Oxydation du gossypol	p.73
b/ Synthèse des bases de Schiff de la gossypolone	p.73
c/ Synthèse et Etude de la stabilité des bases de Schiff des énantiomères de la gossypolone	p.76
2. BIOLOGIE	p.81

2.1. Etude de la cytotoxicité sur une lignée de cellules KB	p.81
a/ Influence du métabolisme oxydatif de la cellule	p.87
b/ Etude de la cytotoxicité des énantiomères du gossypol et de ses bases de Schiff	p.89
2.2. Activité antipaludique des Bases de Schiff du Gossypol et de la Gossypolone	p.90
CONCLUSION DU CHAPITRE III	p.94

Chapitre IV - 1,3-DITHIOLANE ET 1,3-DITHIANE DU GOSSYPOL ET DE LA GOSSYPOLONE – ET THIODÉRIVÉS DES ÉTHERS MÉTHYLIQUES DU GOSSYPOL

<i>I. Introduction</i>	p.97
1. Objectif	p.97
2. Dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone	p.99
a/ Nouveaux synthons	p.99
b/ Dithianes et dithiolanes : agents cytotoxiques masqués	p.102
<i>II. Travaux réalisés</i>	
<i>1. CHIMIE</i>	p.103
1.1. Réaction du gossypol avec les dithiols	p.103
1.2. Réaction du gossypol avec les monothiols	p.105
1.3. Réaction des dérivés éthers méthyliques du gossypol avec les dithiols	p.109
1.4. Réaction de la gossypolone avec les dithiols	p.112
1.5. Réaction de la gossypolone avec les monothiols	p.113
1.6. Stabilité des cycles dithiane et dithiolane du gossypol et de la gossypolone	
a/ Etude de la déprotection chimique par NO^+BF_4^-	p.114
b/ Etude de la déprotection chimique par NO gaz et NO gaz + FeCl_3	p.115

2. BIOLOGIE	p.115
2.1. Cytotoxicité sur KB des divers dérivés soufrés isolés	p.115
2.2. Quelques rappels sur l'oxyde nitrique	p.117
a/ Oxyde nitrique et cancer	p.117
b/ Les donneurs de NO	p.118
2.3. Cytotoxicité du 1,3-dithiane du gossypol en présence d'un donneur d'oxyde nitrique :le DPTA-NONOate	p.122
a/ Essais réalisés	p.123
CONCLUSION DU CHAPITRE IV	p.124
CONCLUSION GÉNÉRALE	p.126
PARTIE EXPÉRIMENTALE	p.129
I . Appareillage	p.129
II. Extraction et Purification du Gossypol	p.132
III. Protection du Gossypol par méthylation des groupes phénoliques	p.136
IV. Réduction du Gossypol : synthèse du Gossypolol (alcool gossylique)	p.139
V. Oxydation du Gossypol : synthèse de la Gossypolone	p.141
VI. Bases de Schiff du Gossypol et de la Gossypolone	p.144
VII. Dérivés 1,3-Dithiane , 1,3-Dithiolane du Gossypol et de la Gossypolone - Dérivés thioéthers des dérivés éthers méthyliques du Gossypol	p.170
VIII. Partie expérimentale biologique	p.185
BIBLIOGRAPHIE	p.187

Abréviation

ν	Fréquence d'absorption
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
$^{\circ}\text{K}$	Degré Kelvin
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique)
ACN	Acétonitrile
AZT	3'-azido-3'-deoxythymidine
cm^{-1}	Nombre d'onde (IR)
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO- d_6	Diméthylsulfoxyde deutérié
DPTA NONOate	Dipropylènetriamine NONOate
éq.	Nombres équivalents
ESI	Ionisation par électrospray
EVL-HMPA	Ethoxy Vinyl Lithium - Hexa Methyl Phosphoric TriAmide
FAB	Fast Atom Bombardment
g, mg	Gramme, milligramme
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse
h.	heure
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
Hz, MHz	Hertz, mégaHertz
IC	Ionisation chimique
IC ₅₀	Concentration d'inhibiteur qui inhibe de 50% l'activité
IE	Impact électronique
IR	Infrarouge
k'	Coefficient de capacité (HPLC)
m/z	Unité de masse par charge élémentaire
min.	Minute
mL, μL	Millilitre, microlitre
mm, μm	Millimètre, micromètre
mol, mmol	Mole, millimole
MW	Poids moléculaire
nm	Nanomètre
ppm	Partie par million
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TA	A température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Tétraméthylsilane
UV	Ultra violet



Le cotonnier

Introduction générale

Introduction générale

Depuis quelques décennies, les substances naturelles sont la source de médicaments utilisés couramment en chimiothérapie bien que la plupart d'entre elles soient très toxiques. La question demeure de découvrir des substances pouvant conduire à des médicaments efficaces et moins désastreux par leurs effets secondaires sur les patients.

Partant de ce principe, nous avons choisi d'étudier le gossypol, un pigment jaune, qui se trouve dans les graines du cotonnier et auquel furent attribuées de nombreuses vertus thérapeutiques. Le gossypol n'est pas très toxique puisque la graine du cotonnier est donnée comme aliment au bétail, et que l'huile de cette même graine est comestible. La farine de la graine du cotonnier, très riche en protéines (35%), pourrait même être une ressource alimentaire d'un grand intérêt, elle fait partie de l'alimentation humaine dans certains pays. En Afrique, elle entre dans la composition des sauces pour la cuisine traditionnelle. En Amérique centrale, elle est mélangée au maïs ou au sorgho pour obtenir une farine alimentaire appelée inca-harina.

Le gossypol a été découvert dès 1886, quand on a voulu éliminer le principe colorant de l'huile de la graine du cotonnier et diminuer la toxicité des produits alimentaires qui en provenaient. Le gossypol est devenu un objet d'études pour la première fois quand la Chine a publié vers les années soixante son activité contraceptive.

En fait, le gossypol possède des activités biologiques très diverses : antivirale, antipaludique, et antitumorale.

Il faut noter qu'il existe assez peu de dérivés du gossypol. La chimie du gossypol, molécule de structure attirante, a été entreprise depuis très longtemps, et à première vue, tout semble avoir déjà été fait en ce qui concerne les dérivés.

Ces derniers temps le gossypol, abandonné pendant de nombreuses années, a suscité un nouvel intérêt en rapport avec son activité antitumorale et sa très faible toxicité à faibles doses. Bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore éclairci, le gossypol pourrait être considéré comme une tête de liste pour découvrir de nouvelles molécules anticancéreuses et l'objectif prioritaire de la recherche sur le gossypol pourrait être la détermination du mécanisme de sa cytotoxicité.

Partant de ces constatations, nous avons choisi d'évaluer les potentialités thérapeutiques des dérivés du gossypol et de rechercher s'il était possible d'ouvrir des voies d'accès à de nouveaux dérivés obtenus par hémisynthèse, à partir du gossypol racémique. Notre objectif, à plus long terme est de séparer les isomères correspondant aux deux énantiomères du gossypol si leur activité biologique se révèle suffisante.

Notre travail de synthèse a été guidé par les quelques lignes directrices suivantes :

a/ mettre en œuvre des réactions qui peuvent se dérouler sans avoir besoin de protéger les groupements phénoliques indispensables pour l'activité biologique.

b/ tenir compte de la compétition des groupements phénoliques en position 1,1' avec les réactifs nucléophiles susceptibles de réagir avec les groupements aldéhydes en position 8,8'.

Enfin, le gossypol étant un polyphénol, il peut s'oxyder facilement dans milieu biologique; on s'attend à ce que les activités biologiques observées avec les dérivés du gossypol correspondent à celles des produits issus du métabolisme oxydatif. Nous avons donc synthétisé plusieurs molécules à partir de formes oxydées ou réduites du gossypol; ces molécules peuvent être considérées comme des modèles de métabolites hypothétiques.

Ce mémoire est constitué de quatre parties :

Chapitre I : Rappels sur la chimie et la biologie du gossypol et de ses dérivés

Chapitre II : Procédés d'extraction et propriétés physicochimiques du gossypol

Chapitre III : Bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone, synthèses et étude de leur toxicité

Les bases de Schiff du gossypol ont été citées pour leur activité antitumorale, nous sommes proposés de synthétiser des bases de Schiff du gossypol et d'étudier les caractéristiques structurales responsables de l'activité.

Comme le gossypol est un promoteur de la formation des radicaux libres, une partie de sa toxicité pourrait être attribuée à sa transformation en gossypolone. Cette bis-naphtoquinone est le principal métabolite du gossypol in vivo. Pour évaluer cette hypothèse, nous allons synthétiser des bases de Schiff de la gossypolone et comparer leurs activités sur cellules KB avec celles du gossypol, des bases de Schiff du gossypol, de la gossypolone et du gossypol réduit.

Chapitre IV : Dérivés dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone

Nous allons poursuivre notre étude en bloquant les fonctions aldéhydes du gossypol et de la gossypolone sous la forme de dithianes ou de dithiolanes. Par la suite, ces dérivés peuvent être des synthons utilisables dans la synthèse de nouveaux dérivés du gossypol.

Partant de l'idée que ces dérivés peuvent être déprotégés par les agents électrophiles, nous avons envisagé qu'ils pouvaient être décomposés par l'oxyde nitrique dans le milieu biologique.

Cette démarche pouvait nous conduire à formuler l'hypothèse que dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone pouvaient être des modèles de prodrogues ciblées sur les cellules riches en oxyde nitrique comme, par exemple, certaines tumeurs.



La fleur

Chapitre I - Rappels sur le Gossypol et sur ses dérivés

CHAPITRE I

RAPPELS SUR LE GOSSYPOL ET SUR SES DÉRIVÉS

I. CHIMIE DU GOSSYPOL

1/ Découverte du Gossypol

Le gossypol est généralement extrait des graines de cotonnier du genre *Gossypium* (famille des malvacées). La teneur varie de 0.1 à 0.64% selon la variété du *Gossypium*. Le nom « gossypol » a été créé par Marchlewski, qui l'a choisi à partir de « **gossyp**(ium phen)ol » pour indiquer son origine et sa nature chimique (*Marchlewski L, 1899*).

Les sources du gossypol sont essentiellement les graines de plusieurs variétés de cotonniers mais on l'obtient aussi à partir de l'écorce du *Thephesia populnea*, arbuste faisant partie de la famille des malvacées comme le cotonnier et que l'on trouve en Afrique, en Asie, et dans les îles du pacifique (*King TJ & De Silva LB, 1968*).

Le Cotonnier est cultivé sous les climats tièdes et arides et sa production est principalement assurée par la Chine, les Etats-Unis, la Russie, le Pakistan, la Turquie et l'Egypte. La plante contient 35% de fibres et 60% de graines. L'industrie des graines du cotonnier est assez importante car elles contiennent de 15 à 25% d'huile et de 15 à 35% de protéine. L'huile des graines du cotonnier a été utilisée exclusivement pour l'alimentation humaine, bien avant que ne fut découvert le gossypol, un pigment coloré, problème majeur pour la fabrication de l'huile à cause de sa toxicité. La recherche sur ce pigment a été encouragée par son abondance. En effet, l'industrie du coton produit annuellement près de 16 millions de tonnes de graines qui contiennent environ, au total, 50 mille tonnes de gossypol (*Koltun SP et al., 1959*).

La première extraction du gossypol fut réalisée grossièrement par Kuhlmann en 1861, il appela la substance « bleu des grains de coton ». En 1866, Longmore constata que l'huile des graines du coton contient un composé coloré, isolé sous forme d'un solide brun et qui est indiscutablement du gossypol impur. Ce n'est qu'en 1899 que Marchlewski obtint la forme cristalline pure, extraite des graines de coton, qu'il appela gossypol (*Adams RC et al., 1960*).

S'inspirant des travaux de leurs prédécesseurs, Withers et Carruth, en 1915, améliorèrent d'une manière significative l'extraction du gossypol et leur méthode reste encore de nos jours un des meilleurs procédés utilisés (*Adams RC et al., 1960*).

2/ Structure de la molécule de Gossypol

La molécule du gossypol se présente sous forme de deux sous-unités naphthaléniques symétriques, qui sont substituées par trois fonctions phénoliques et une fonction aldéhyde.

Elle existe sous trois formes tautomères représentées par les formules suivantes : formes aldéhydique, hémiacétalique et quinone-méthinique (*figure 1*).

Sa masse molaire est de : 518.5 ($C_{30}H_{30}O_8$).

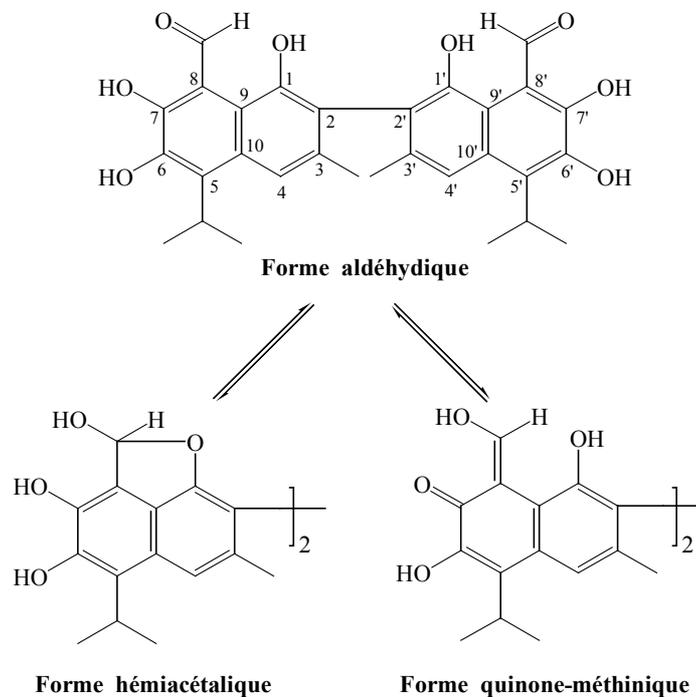


Figure 1: formes tautomères du gossypol

La conformation stable dans le cristal est celle où les deux sous-unités planes forment entre elles un angle de 70° (*Wood AB & Robin FB, 1969*) (*figure 2*).

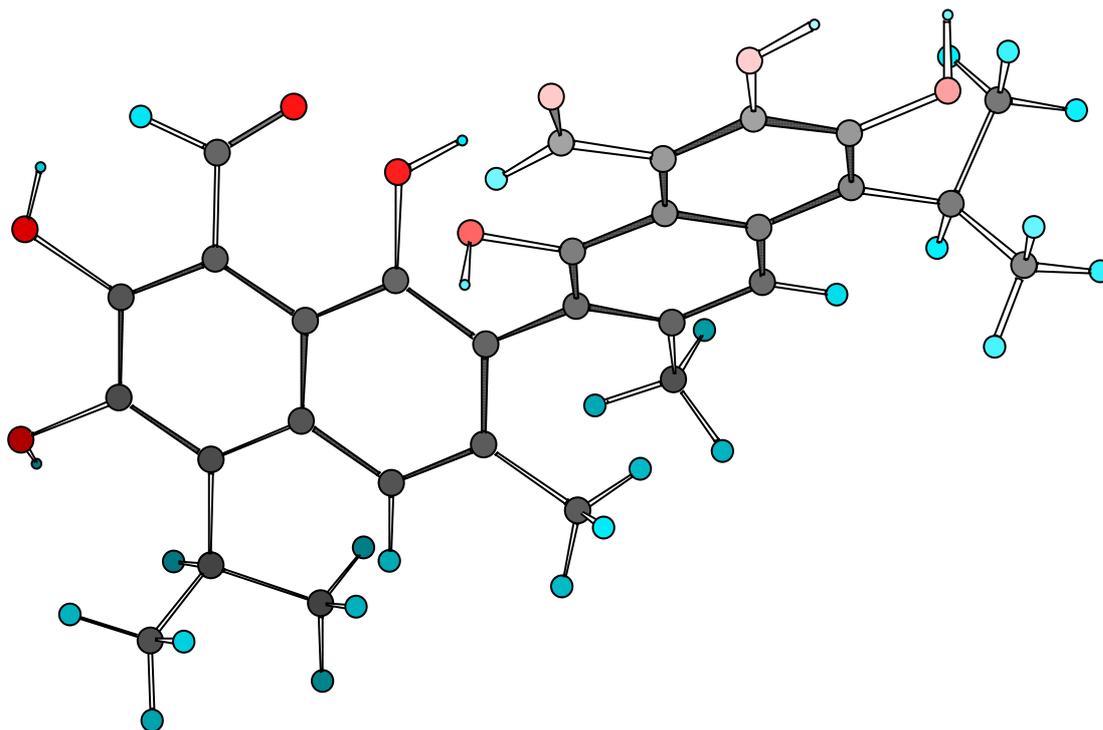


Figure 2 : Structure 3D du gossypol

L'analyse du pouvoir rotatoire du gossypol, a révélé la présence de deux isomères. Le (+) gossypol est principalement abondant dans l'écorce du *Thephesia populnea* et certaines variétés de cotonniers (*Gossypium hirsutum*), tandis que l'isomère lévogyre (le (-)-gossypol) est prépondérant dans d'autres variétés de cotonniers telles que le *Gossypium barbadense* (Zhou RH & Lin XD, 1988; Cass QB et al., 1991).

La méthode utilisée pour la mesure de l'excès énantiomérique dans les graines des différents cotonniers est celle que Matlin et Zhou ont appliquée à partir de bases de Schiff chirales du (+) ou (-)-gossypol en effectuant leur séparation par HPLC puis leur hydrolyse (Zhou RH & Lin XD, 1988; Matlin SA et al., 1984; Fish RG et al., 1995).

3/ Chimie du Gossypol et principaux dérivés

Comme le gossypol est une molécule relativement fragile, la détermination de sa structure a été réalisée à partir de dérivés qui sont beaucoup moins sensibles à l'oxydation (Adams RC et al., 1960).

La plupart des molécules obtenues résultent de combinaisons classiques avec les groupements phénoliques et/ou aldéhydes particulièrement réactifs du gossypol.

Ainsi, les éthers et esters de gossypol sont formés à partir des groupements phénoliques (Adams R et al., 1938, 1939 et 1941; Campbell KN et al., 1937; Clark EP, 1928^(b);

Miller RF et al., 1937^(a) (b); Morris RC et al., 1937; Seshadri TR & Sharma NN, 1975^(a) (b); Royer RE et al., 1986 ; 1995).

D'autre part, le gossypol réagit quasi instantanément avec les amines primaires. Il se lie facilement avec l'aniline pour donner le dianilino gossypol (*Clark EP, 1928^(a); Adams R et al., 1938^(a)*). Il se lie aussi facilement, aux acides aminés, comme la lysine, présente dans les protéines pour donner des dérivés beaucoup moins toxiques (*Pons WA, 1977; Clark EP, 1928^(a)*). Cette réactivité particulière a été mise à profit pour la fabrication de produits agro-alimentaires, afin de diminuer la présence du gossypol libre.

La chimie du gossypol a été développée de façon extensive vers les années 30 et elle peut être résumée ainsi : dans cette molécule, les groupements phénoliques s'oxydent facilement et empêchent la purification ; ceux en position *peri* (1, 1') interviennent toujours dans la chimie de la fonction aldéhyde en position 8, 8'. En outre, le gossypol est constitué de deux énantiomères lévogyre(-) et dextrogyre(+) (ce sont des atropoisomères), et chaque énantiomère existe sous trois formes tautomères : aldéhyde, hémiacétalique, et quinone-méthinique. Comme le gossypol possède plusieurs activités biologiques très intéressantes, les chimistes se sont investis ces dernières années dans sa synthèse totale pour obtenir de nouveaux dérivés en évitant les difficultés attachées à l'hémisynthèse.

Dans ce mémoire, nous rappellerons en deux parties certains travaux essentiels sur la chimie du gossypol :

- Hémisynthèses à partir du gossypol
- Synthèse totale du gossypol et de ses dérivés

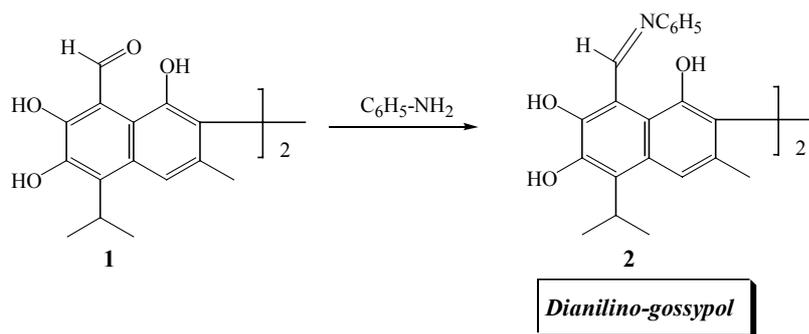
3.1/ Dérivés obtenus à partir du gossypol (hémisynthèses)

a/ Imino gossypols (Bases de Schiff)

a.1/ Dianilino-gossypol

Le gossypol **1** réagit rapidement avec deux molécules d'aniline pour former le dianilino-gossypol **2** (*Carruth FE, 1918; Clark EP, 1928^(a)*), ce produit est purifié facilement, et Clark a utilisé cette réaction pour extraire le gossypol des graines de cotonnier. On obtient le gossypol par hydrolyse avec l'acide sulfurique concentré (*figure 3*).

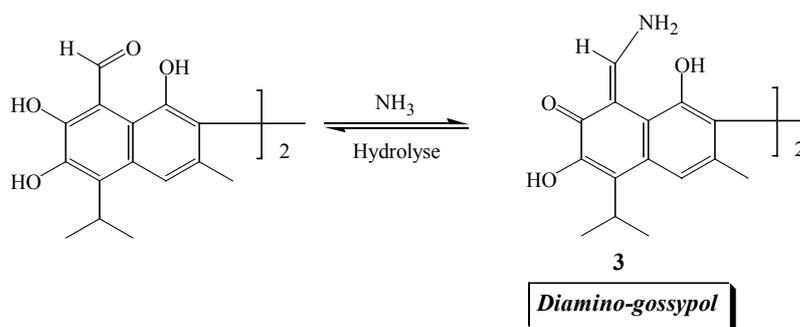
Figure 3



a.2/ Diamino-gossypol

Le gossypol peut réagir sur l'ammoniaque à température ambiante pour former le diamino-gossypol **3** (Miller RF & Adams R, 1937 ^(a)) (comme dans le cas de l'aniline cette méthode est aussi utilisée pour extraire le gossypol des graines de cotonnier) (figure 4).

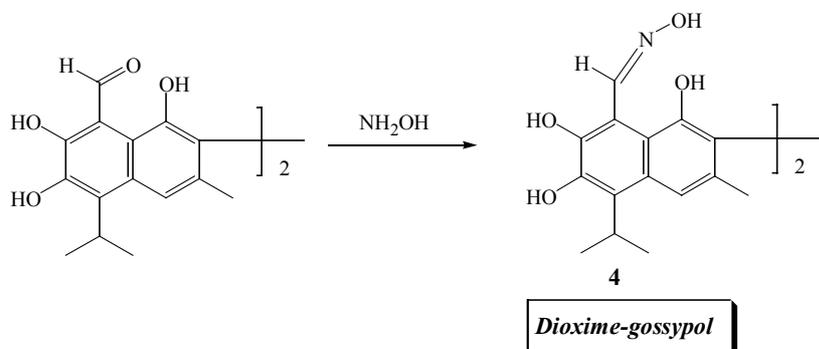
Figure 4



a.3/ Dioxime du gossypol et éther tetraméthylique de la dilactone du gossypol

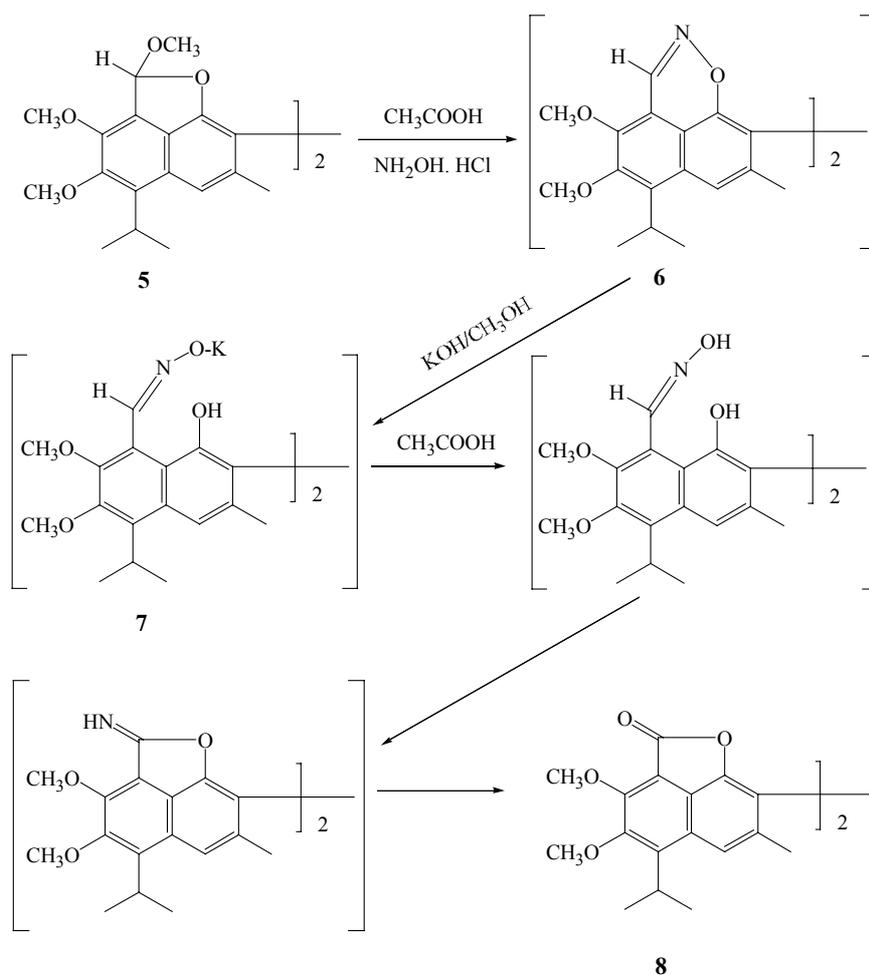
Par action de l'hydroxylamine, le gossypol est transformé en la dioxime du gossypol **4** (Clark EP, 1927) (figure 5)

Figure 5



L'anhydro-oxime **6** est obtenu par le traitement de l'éther hexaméthyle du gossypol **5** avec le chlorhydrate d'hydroxylamine dans l'acide acétique. Ce composé est ensuite dissous dans une solution de potasse méthanolique pour former le sel de potassium de la dioxime **7**. Par chauffage dans l'acide acétique dilué, cette dioxime est facilement transformée en dilactone **8** (Adams R et al., 1938^(c)) (schéma 1)

Schéma 1



a.4/ Acéthydrazone du gossypol (avec le réactif T de Girard)

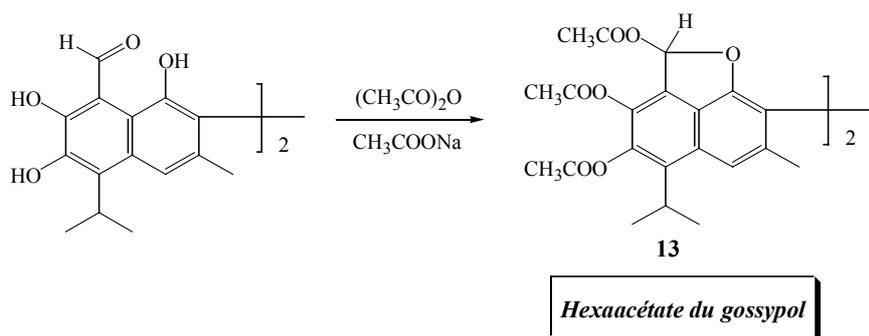
Dans la condensation du gossypol avec le chlorure d'acéthydrazide-triméthylammonium, on obtient l'acéthydrazone du gossypol **9**. Les auteurs ont utilisé le réactif de Girard mis au point, à l'origine, pour préparer des dérivés hydrosolubles de cétones stéroïdiques. Le composé obtenu est conforme à la formule attendue et s'avère soluble dans l'eau à l'inverse du gossypol (Kunesch N et al., 1990) (figure 6)

b/ Esters du gossypol

Le gossypol est acétylé en employant la méthode classique qui fait réagir l'anhydride acétique et l'acétate de sodium dans des conditions très douces.

La réaction donne un mélange de deux dérivés, ce sont l'hexaacétate blanc et l'hexaacétate jaune. Le dernier peut être obtenu en chauffant l'hexaacétate blanc avec l'anhydride acétique. L'hexaacétate jaune n'a pas été isolé à l'état pur et la formule de l'hexaacétate blanc **13** est la suivante (Miller et al., 1937^(b)) (figure 7)

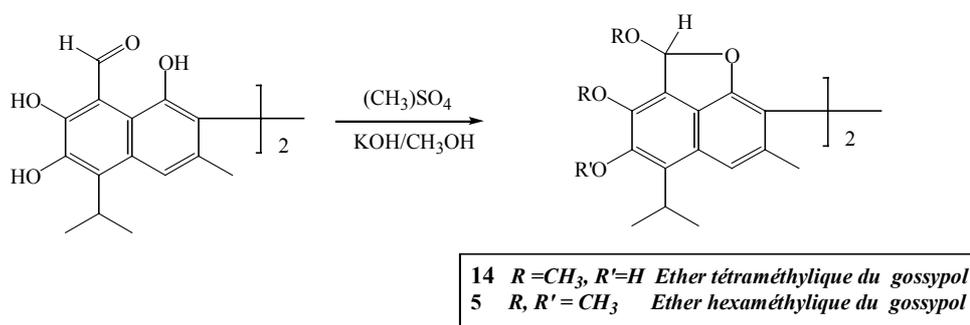
Figure 7



c/ Ethers du gossypol

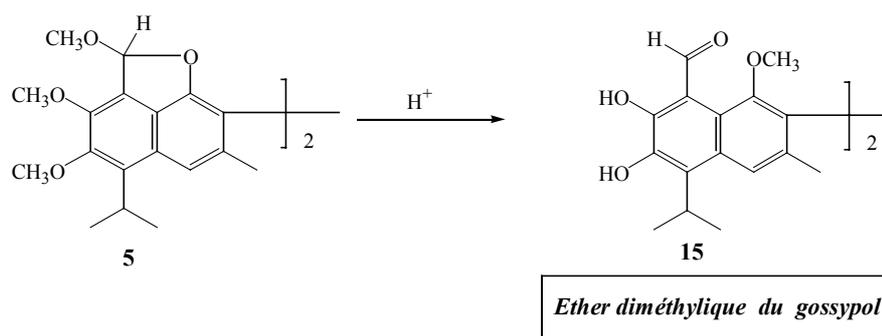
L'éther tétraméthyle du gossypol **14** est obtenu par réaction du diméthyle sulfate sur du gossypol dissous dans un mélange potasse méthanolique/méthanol. En poursuivant la méthylation dans les mêmes conditions on obtient l'éther hexaméthyle du gossypol **5** sous forme de paillettes blanches (Morris RC & Adams R, 1937) (figure 8)

Figure 8



L'éther diméthyle du gossypol **15** est obtenu par hydrolyse de l'éther hexaméthyle du gossypol **5** (Morris RC & Adams R, 1937) (figure 9)

Figure 9

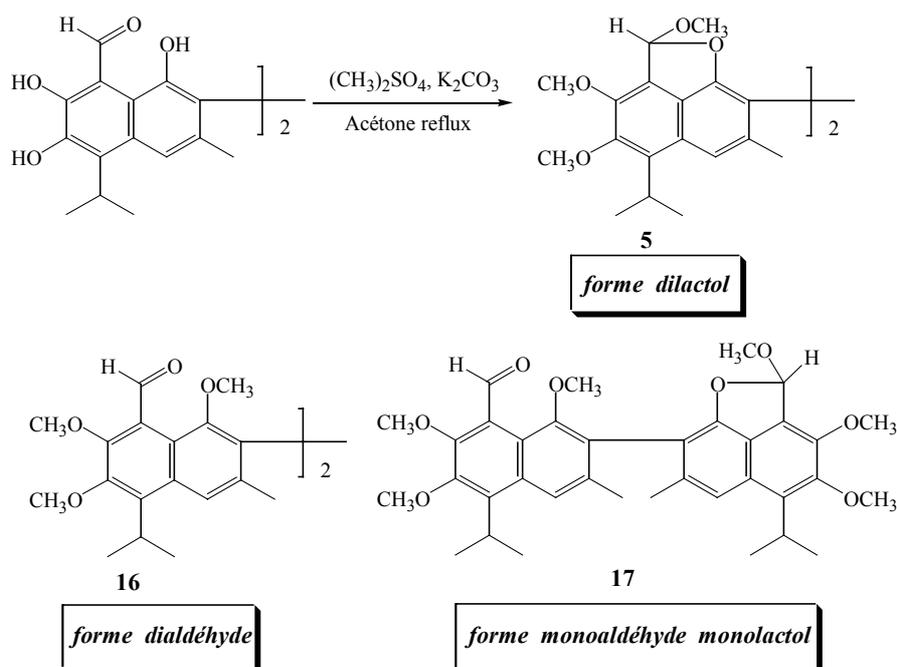


L'éther tétraméthylque **14** et l'éther hexaméthylque du gossypol **5** sont relativement difficiles à oxyder et sont stables dans des solutions alcalines ou neutres.

L'éther tétraméthylque **14** et l'éther hexaméthylque du gossypol **5** ne réagissent pas avec les réactifs de la fonction aldéhyde dans des solvants neutres, mais en présence d'acide acétique, ils peuvent réagir facilement. Par contre, l'éther diméthylque du gossypol **15** réagit facilement.

En 1975, Seshadri et al. ont mis au point une réaction de méthylation du gossypol en utilisant le diméthyle sulfate et le carbonate de potassium dans l'acétone à reflux. Ils ont obtenu un mélange de trois formes de l'éther hexaméthylque du gossypol : forme dilactol **5** ; forme dialdéhyde **16** et forme monoaldéhyde-monolactol **17** (Seshadri TR & Sharma NN, 1975^(a)) (figure 10)

Figure 10

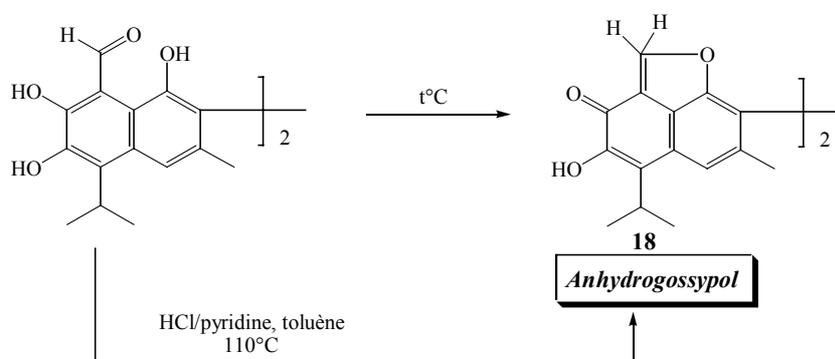


L'obtention du gossypol à partir de ces composés se fait par clivage acide en présence d'acide sulfurique ou d'acide acétique glacial, ou encore mieux par clivage à l'aide de BBr_3 (Royer RE^(a) et al., 1995)

d/ Anhydrogossypol

L'anhydrogossypol **18** est formé en éliminant deux molécules d'eau, selon Carruth (Carruth FE, 1918) ou Clark (Clark EP, 1927) par chauffage du gossypol au dessus de son point de fusion, ou selon Miller et Adams en chauffant le gossypol dans une solution de chlorhydrate de pyridine dans le toluène (Miller RF & Adams R, 1937^(a)) (figure 11)

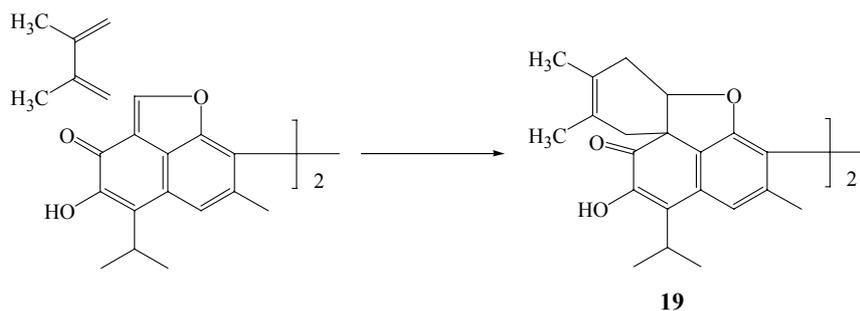
Figure 11



L'anhydrogossypol n'est pas stable, il s'hydrolyse facilement pour redonner le gossypol. Il réagit rapidement avec l'anhydride acétique pour former l'hexaacétate de gossypol. En fait, il donne presque les mêmes réactions que le gossypol. Dans le cas de l'anhydrogossypol, les réactions sont toujours de simples additions. Avec le gossypol, les mêmes dérivés sont obtenus en éliminant de l'eau, de l'acide acétique ou une molécule analogue mais jamais par une simple addition.

L'anhydrogossypol réagit avec le butadiène et le diméthylbutadiène pour donner des dérivés **19** résistant à l'hydrolyse (Adams R et al., 1938^(a)) (figure 12)

Figure 12

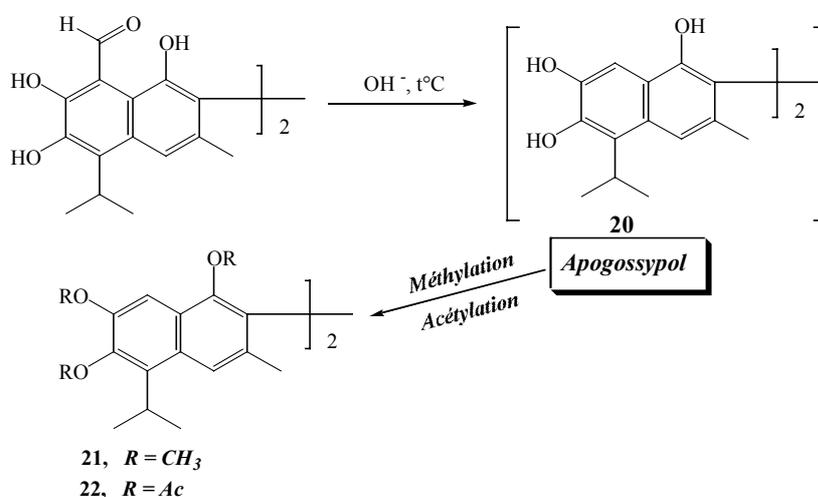


e/ Apogossypol et désapogossypol

e.1/ Apogossypol

L'action d'une solution alcaline chaude sur le gossypol donne un composé instable : l'apogossypol **20**. La méthylation ou l'acétylation de ce composé donne cependant des dérivés : l'éther hexaméthylique de l'apogossypol **21** ou l'hexaacétate de l'apogossypol **22** plus stables (Carruth et al., 1918; Clark EP, 1928 ^(b); Adams & Butterbaugh DJ, 1938 ⁽ⁱ⁾) (schéma 3)

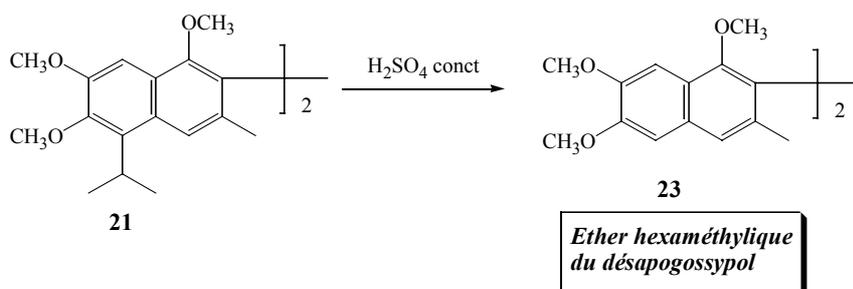
Schéma 3



e.2/ Ether hexaméthylique du désapogossypol

On obtient l'éther hexaméthylique du désapogossypol **23** par action de l'acide sulfurique concentré à température ambiante sur l'éther hexaméthylique de l'apogossypol **21** (Adams & Butterbaugh DJ, 1938 ⁽ⁱ⁾) (figure 13)

Figure 13

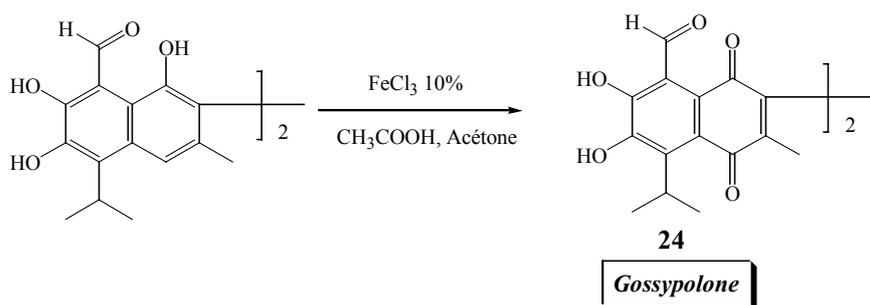


f/ Oxydation du gossypol et de ses dérivés

f.1/ Gossypolone

L'oxydation du gossypol a été rapportée par plusieurs auteurs, et la méthode de l'oxydation du gossypol par le chlorure ferrique proposé par Hass RH et al pour former la gossypolone **23** est la plus simple et la plus efficace (Hass RH & Shirley DA, 1965) (figure 14)

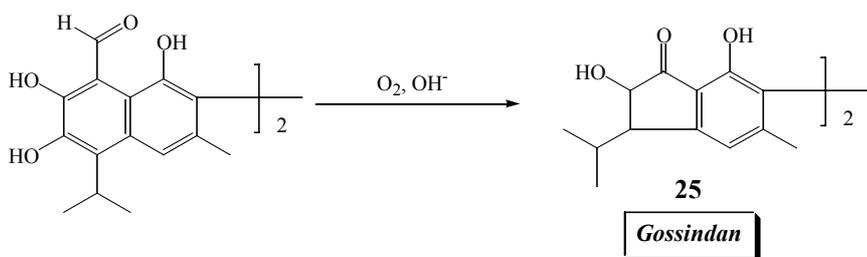
Figure 14



f.2/ Gossindan

Le gossindan **25** est obtenu par oxydation du gossypol par O_2 en milieu alcalin (Ismailov AI et al., 1994) (figure 15)

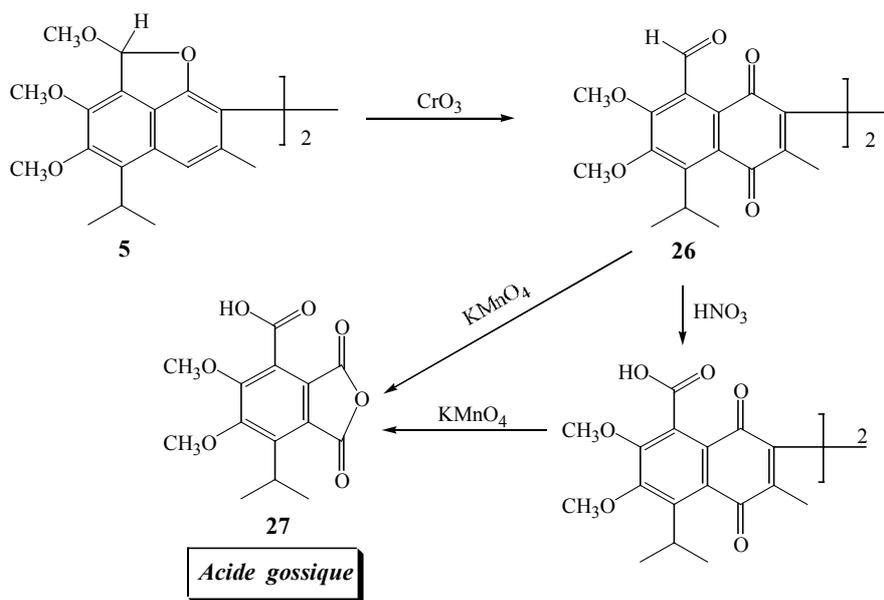
Figure 15



f.3/ Oxydation des dérivés du gossypol

L'éther hexaméthyle du gossypol **5** est oxydé par l'acide chromique pour former l'éther tetraméthyle de la gossypolone **26** qui est ensuite oxydé directement en acide gossique **27** par $KMnO_4$ ou indirectement par l'acide nitrique suivi de $KMnO_4$ (Adams R et al., 1938^(h)) (schéma 4)

Schéma 4

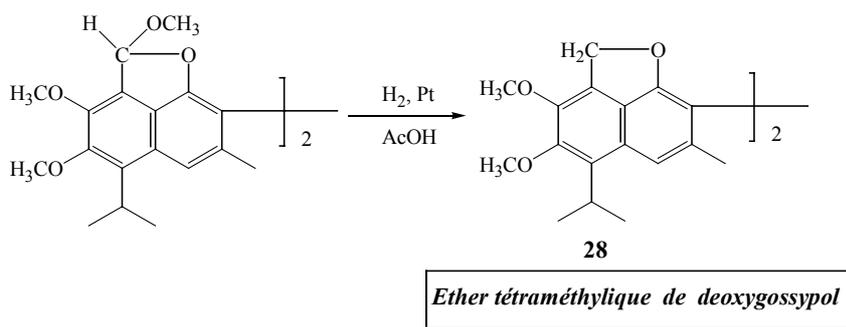


g/ Réduction du gossypol et de ses dérivés

Différentes méthodes ont été proposées.

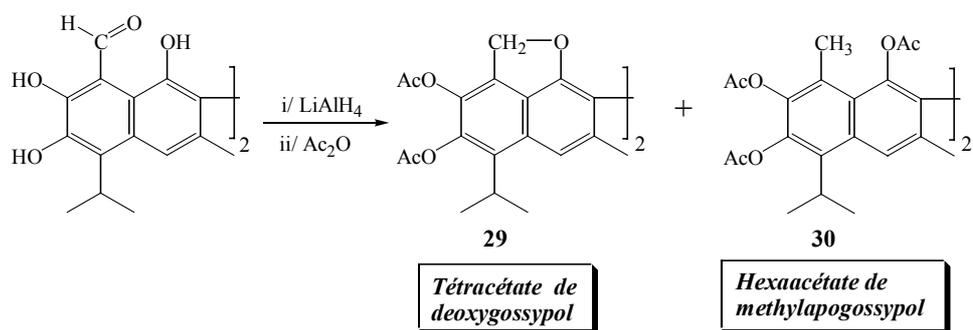
La réduction de l'éther hexaméthyle du gossypol par l'hydrogène en présence de platine, dans l'acide acétique a été faite pour la première fois par Adams et al. ; ils ont obtenu l'éther tétraméthyle du deoxygossypol **28** (Adams R & Dial WR, 1939^(b)) (figure 16)

Figure 16



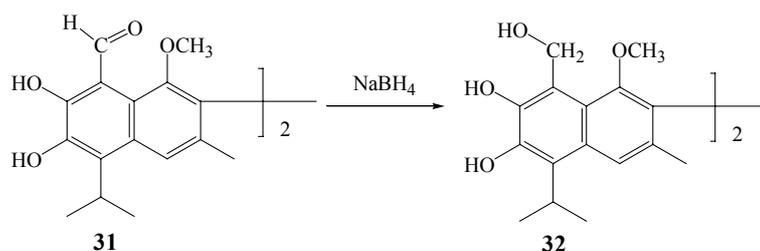
La réduction directe du gossypol par LiAlH_4 suivie par l'acétylation du mélange réactionnel conduit au tétraacétate de deoxygossypol **29** et à l'hexaacétate de méthylapogossypol **30** (Shirley DA et Sheehan WC, 1955) (figure 17)

Figure 17



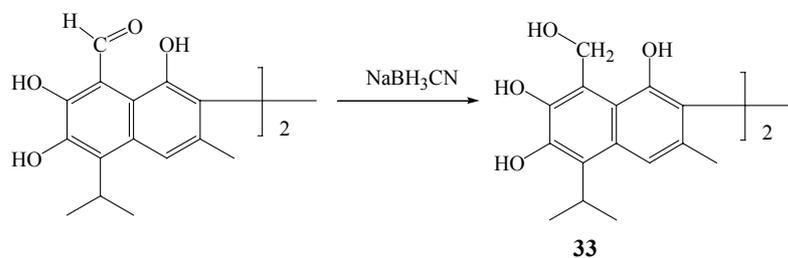
Plus récemment, Deck et al. ont réduit l'éther 1,1'-diméthylrique du gossypol **31** par NaBH_4 , et ils ont obtenu l'alcool correspondant **32** (Deck LM et al., 1991) (figure 18)

Figure 18



En utilisant NaBH_3CN , nous avons réussi à réduire sélectivement la fonction aldéhyde pour obtenir directement l'alcool **33** à partir du gossypol lui-même (Dao VT et al., 2000) (figure 19)

Figure 19

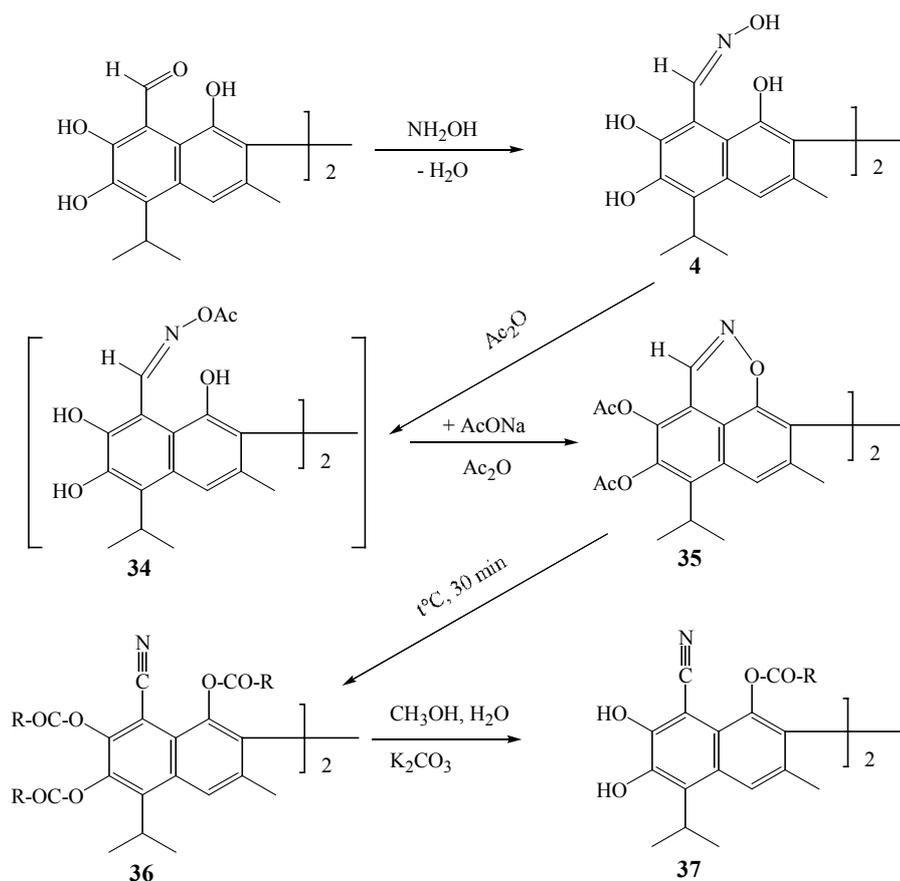


h/ Autres dérivés du gossypol

h.1/ Nitrile gossylique

Le nitrile gossylique a été synthétisé par Royer et al. à partir de dioxime gossypol. La suspension de la dioxime gossypol **4** dans l'anhydride acétique forme un intermédiaire jaune **34** qui n'est pas stable et qui peut être isolé par filtration. Le spectre RMN de ce produit montre que les groupements phénoliques ne sont pas acétylés dans ces conditions, seul le groupement hydroxy de l'oxime est acétylé. Pour synthétiser le nitrile gossylique, l'intermédiaire **34** n'est pas isolé, on ajoute de l'acétate de sodium et le mélange réactionnel est chauffé au bain-marie pour former le bis(anhydro oxime) **35**. Le bis(anhydro-oxime) est maintenu dans le mélange réactionnel, qui est portée à l'ébullition pendant 30 min pour obtenir le nitrile gossylique hexaacétate **36(a)**. Ensuite, les quatre groupements acétyles ortho-hydroxy sont enlevés par reflux dans une solution méthanolique aqueuse de carbonate de potassium. On obtient alors le nitrile gossylique 1,1'-diacétate **37(a)**. Les nitriles gossyliques 1,1'-dipropionate **37(b)**, dibutyrate **37(c)**, et divalérate **37(d)** sont synthétisés par la même méthode en remplaçant l'anhydride acétique et l'acétate de sodium par les anhydrides et les sels correspondants (Royer *RE et al.*, 1986) (schéma 5)

Schéma 5

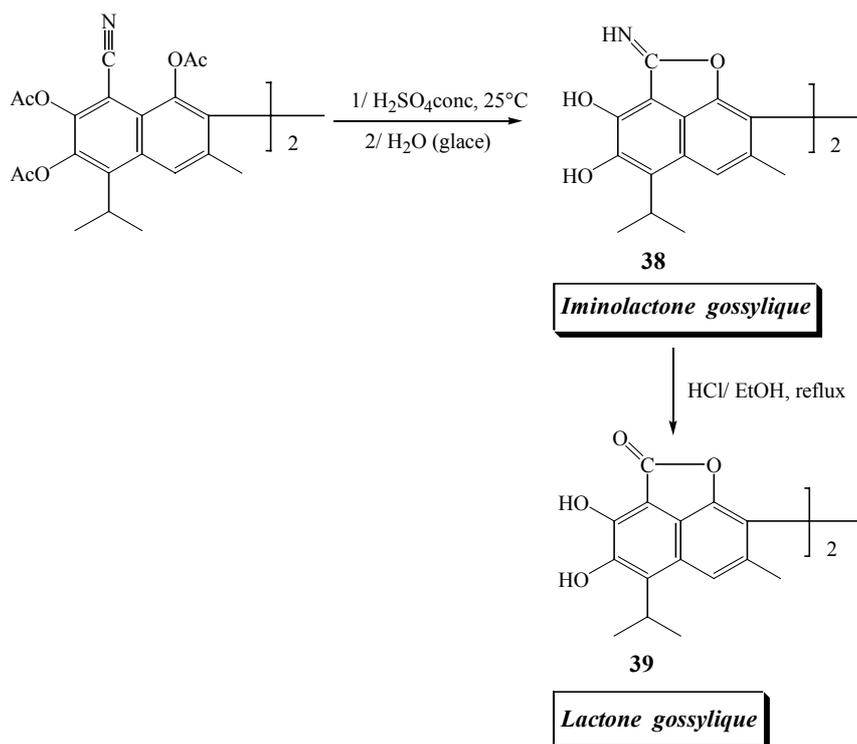


- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| (a) $R = CH_3$, | Nitrile gossylique 1,1'-diacétate |
| (b) $R = C_3H_7$, | Nitrile gossylique 1,1'-dipropionate |
| (c) $R = C_4H_9$, | Nitrile gossylique 1,1'-dibutyrate |
| (d) $R = C_5H_{11}$, | Nitrile gossylique 1,1'-divalérate |

h.2/ Lactone gossylique

L'iminolactone gossylique **38** a été obtenue par hydrolyse du nitrile gossylique acétyle dans l'acide sulfurique concentré. L'iminolactone gossylique est hydrolysée dans l'acide chlorhydrique dilué pour former la lactone gossylique **39** (Deck LM et al., 1991) (schéma 6)

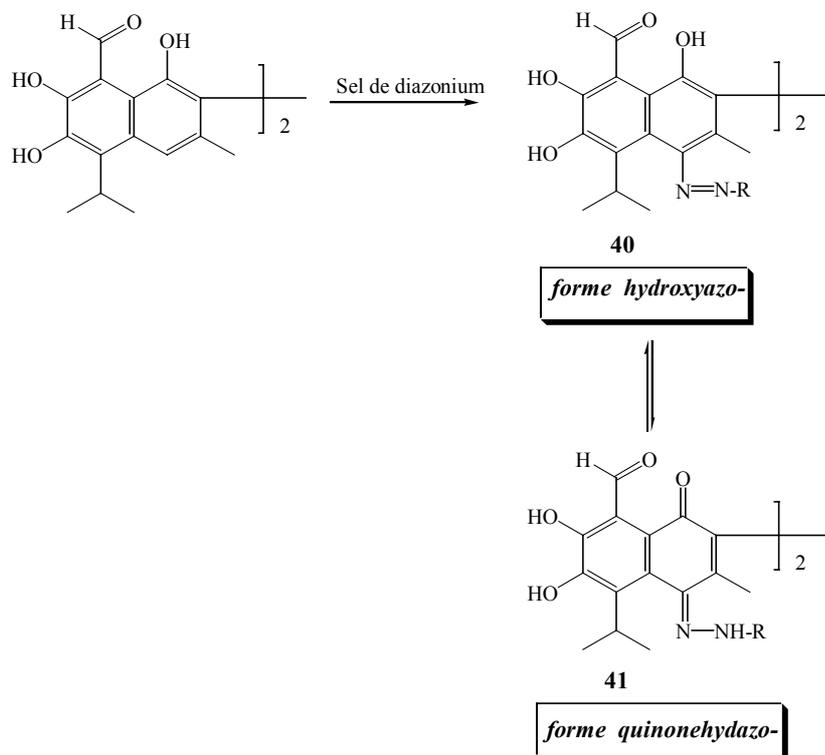
Schéma 6



h.3/ Dérivés Azo du gossypol

Les dérivés azo du gossypol sont obtenus par condensation des sels de diazonium avec le gossypol. Les spectres UV et IR indiquent que les dérivés azo du gossypol existent en équilibre sous deux formes tautomères : hydroxyazo- **40** et quinonehydrazo- **41** en solution et sous forme quinonhydrazo- à l'état solide. Ces dérivés sont très hydrophiles d'où la difficulté de l'étude par RMN (Baram NI et al., 2000^{(a)(b)}) (schéma 7)

Schéma 7



4.2/ Synthèse totale du gossypol et de dérivés

a/ Synthèse totale du gossypol

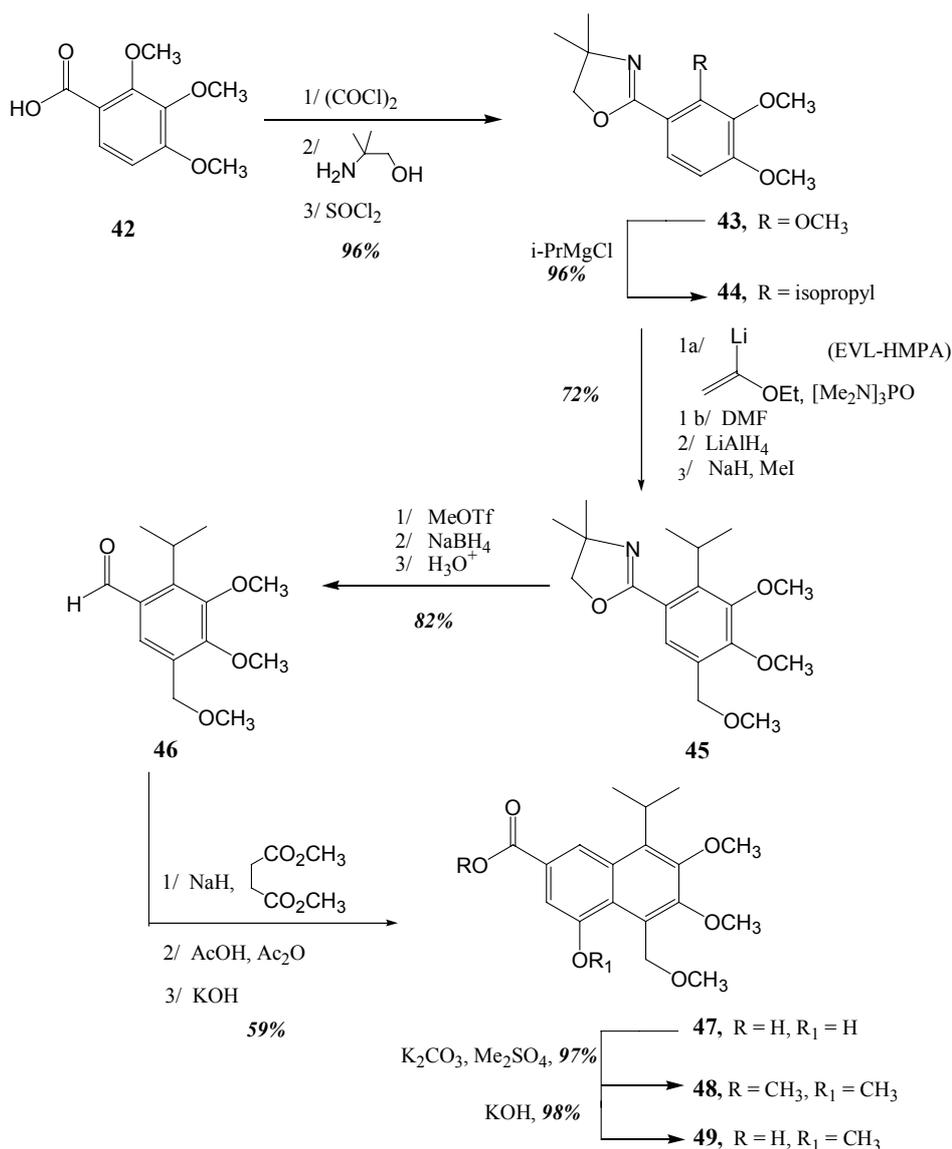
Divers procédés ont été mis en œuvre pour réaliser la synthèse totale du gossypol racémique (*Edwards JD Jrs & Cashaw JL, 1957; Edwards JD Jrs, 1958; Leeson P, 1979; Venuti MC, 1981*).

Ils ont présenté un grand intérêt pour l'authentification de la structure de la molécule mais ils sont peu rentables pour obtenir ce produit.

Cependant, la synthèse totale a été remise en valeur pour l'obtention des énantiomères. Ces deux énantiomères du gossypol ont des activités biologiques assez différentes et par exemple, le [R]-(-)-gossypol est 10 fois plus toxique que [S]-(+)-gossypol sur certaines lignées de cellules cancéreuses (*Joseph EAE et al., 1986*).

Stimulés par cette observation, Meyers et al ont proposé, dès 1997, la synthèse totale des deux énantiomères du gossypol (*Meyers AI & Willemsen JJ, 1997 et 1998*) (schéma 8a, 8b).

Schéma 8a



L'acide 2,3,4-triméthoxybenzoïque **42** donne avec le chlorure d'oxalyle le chlorure d'acide correspondant qui réagit avec le 2-amino-2-méthyl-1-propanol dans les conditions de Schotten-Baumann (*Schotten C, 1884; Baumann E, 1886*) pour fournir l'alcool amide. La cyclisation avec le chlorure de thionyle, suivie d'un traitement au milieu basique conduit à l'oxazoline **43**.

En remplaçant le groupe ortho-méthoxy de la triméthoxyoxazoline **43** par le groupe isopropyl au moyen du chlorure d'isopropylmagnésium, on obtient l'isopropylate oxazoline **44**.

Un groupe formyle est introduit dans l'oxazoline **44** par une déprotonation sélective avec EVL-HMPA (EthoxyVinylLithium - HexaMethylPhosphoric TriAmide) suivie d'un traitement avec la N,N-Diméthylformamide. La formyloxazoline intermédiaire est

convertie en oxazoline **45** par une réduction par LiAlH_4 , et une méthylation par NaH et l'iodure de méthyle.

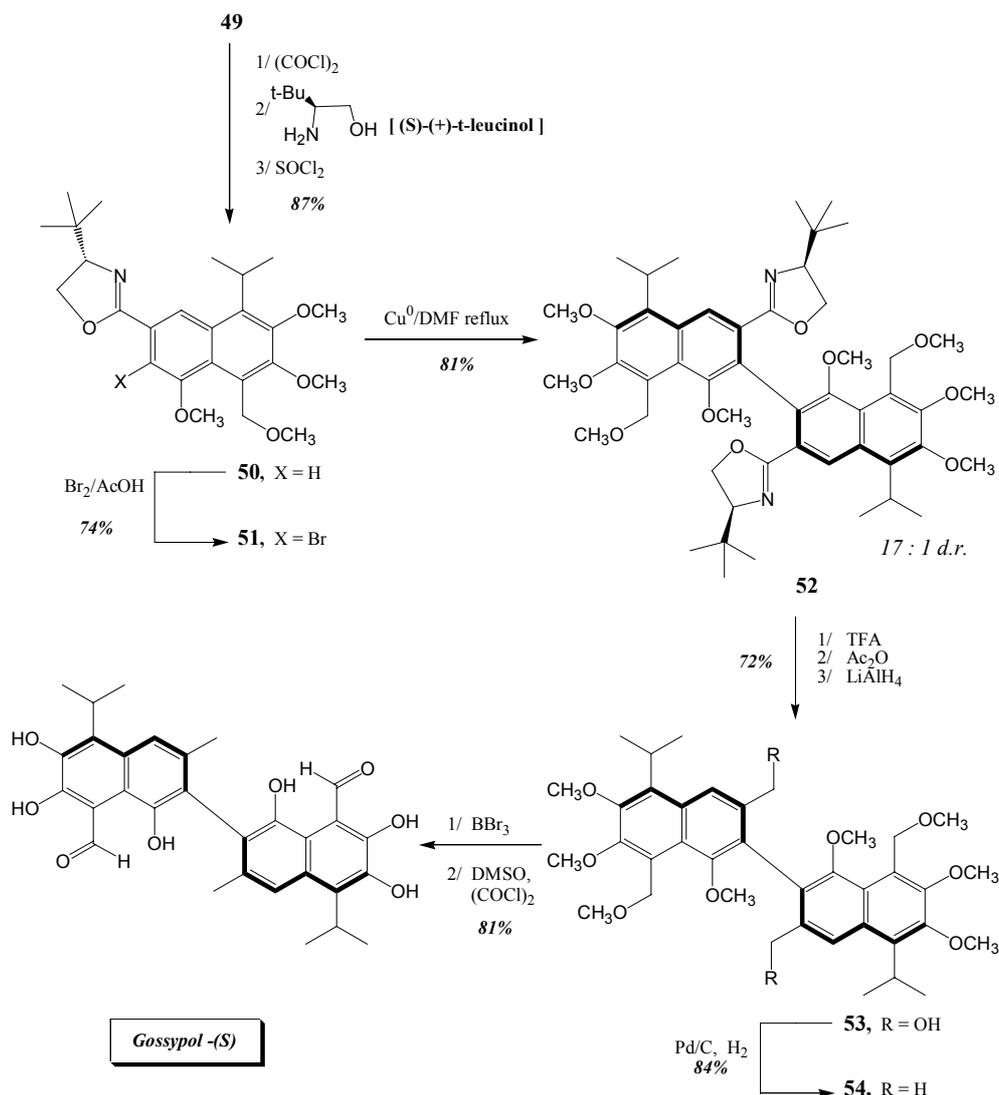
L'isopropylate oxazoline **45** réagit avec le méthyle trifluoromethanesulfonate pour donner le sel de N-méthyle triflate oxazoline qui est réduit par NaBH_4 et hydrolysé avec l'acide oxalique pour fournir le 2-isopropyl-3,4-dimethoxybenzaldehyde **46**.

L'aldéhyde **46** est alkylé par une condensation suivant Stobbe (Johnson WS & Daub GH, 1951) en utilisant NaH et le diméthyle succinate, puis cyclisé efficacement en suivant la procédure de Mollov (Oguyanov VI et al., 1989), la saponification donne l'acide 4-hydroxy-8-isopropyl-6,7-dimethoxy-2-napthoïque **47**.

L'acide **47** est ensuite traité avec le diméthyl sulfate et K_2CO_3 pour former l'ester méthylique **48**.

L'ester méthylique **48** est converti en l'acide **49** par une solution de potasse méthanolique.

Schéma 8b



L'acide naphthoïque **49** est traité avec le chlorure d'oxalyle pour donner le chlorure d'acide correspondant qui est alors condensé avec le [S]-(+)-t-leucinol et le chlorure de thionyl pour fournir l'oxazoline (**S**)-**50**.

La conversion de l'oxazoline (**S**)-**50** en bromooxazoline (**S**)-**51** est faite en utilisant le brome dans l'acide acétique. Le couplage crucial entre les deux sous-unités a été réalisé par traitement de (**S**)-**51** avec Cu⁰ dans DMF à reflux pour obtenir le bis-naphthyl oxazoline (**S**)-**52**.

La copule chirale est alors éliminée par traitement du bis-naphthyl oxazoline (**S**)-**52** par l'acide trifluoroacétique et Na₂SO₄.10H₂O pour former le bis-amino-ester qui est ensuite acétylé par l'anhydride acétique dans la pyridine. L'ester amide acétylé est réduit par LiAlH₄ et donne le bis-carbinol (**S**)-**53**.

La réduction du bis-carbinol (**S**)-**53** pour former le (**S**)-**54** est faite par 10% Pd/C, H₂ et l'acide chlorhydrique au quantième catalytique.

La déméthylation du (**S**)-**54** est effectuée par BBr₃ et est suivie par l'oxydation de Swern (Omura K & Swern D, 1978; Marx M & Tidwell TT, 1984) pour former le [**S**]-(+)-**Gossypol**

On peut synthétiser le [**R**]-(-)-gossypol par le même procédé en remplaçant le [**S**]-(+)-t-leucinol par [**R**]-(-)-t-leucinol.

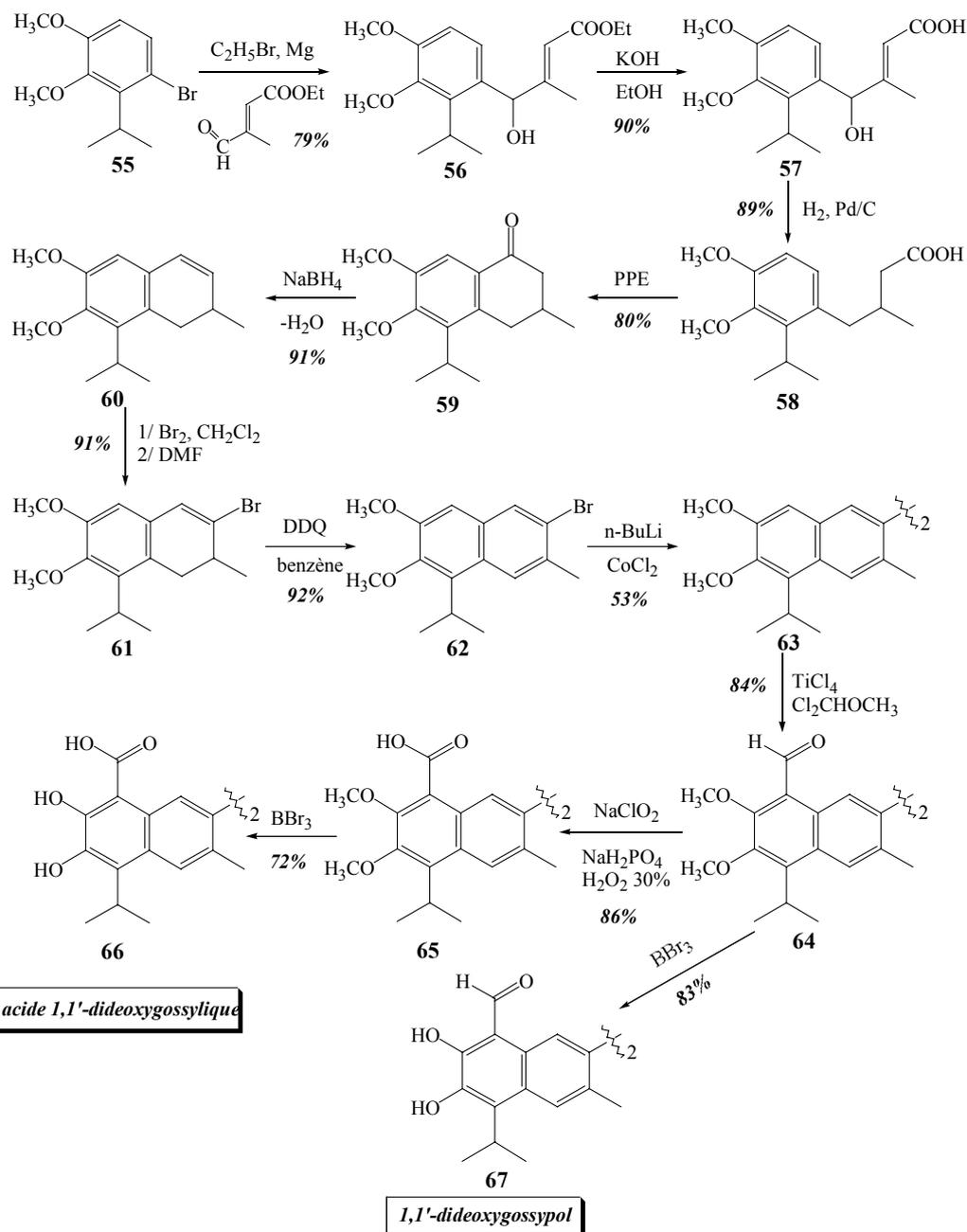
b/ Dérivés du gossypol obtenus par synthèse totale

b.1/ 1,1' - dideoxygossypol et 8-deoxyhemigossypol

Royer et collaborateurs se sont intéressés particulièrement aux dérivés de l'imino lactone du gossypol pour ses activités anti-HIV. Ils en ont conclu que les groupes aldéhydes ne sont pas nécessaires pour l'activité anti-HIV, peut être pas plus que les groupes phénoliques en position peri (1,1').

Les dérivés 1,1'-dideoxygossypol, l'acide 1,1'-dideoxygossylique, 8-deoxyhemigossypol et l'acide 8-deoxyhemigossylique ont été synthétisés (Royer et al., 1995^(a)) (schéma 9).

Schéma 9



56 est obtenu par action du réactif de Grignard du 1-bromo-2-isopropyl-3,4-diméthoxybenzène **55** avec l'éthyle-3-méthyl-4-oxobut-2-énoate.

La double liaison de l'ester **56** est difficile à réduire avec un rendement élevé, la conversion de l'ester **56** en l'acide carboxylique **57** a été réalisée en premier lieu.

Ensuite, l'acide **57** est réduit par l'hydrogène en présence de platine pour former **58**.

L'acide **58** est cyclisé avec l'ester polyphosphorique pour donner **59**.

La cétone **59** est réduite par NaBH_4 et l'alcool intermédiaire est déshydraté pour former **60**.

60 est traité avec 1eqv de brome dans le dichlorométhane, on obtient d'abord l'intermédiaire dibromé, qui n'est pas caractérisé, et ensuite se transforme en bromure vinylique **61** dans le DMF tiède.

Le bromure vinylique est aromatisé par action de la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) dans le benzène pour former le bromo-naphtalène **62**.

Le couplage entre deux molécules **62** est fait par $n\text{-BuLi}$ en présence de CoCl_2 comme catalyseur. On obtient le dérivé binaphtalénique **63**.

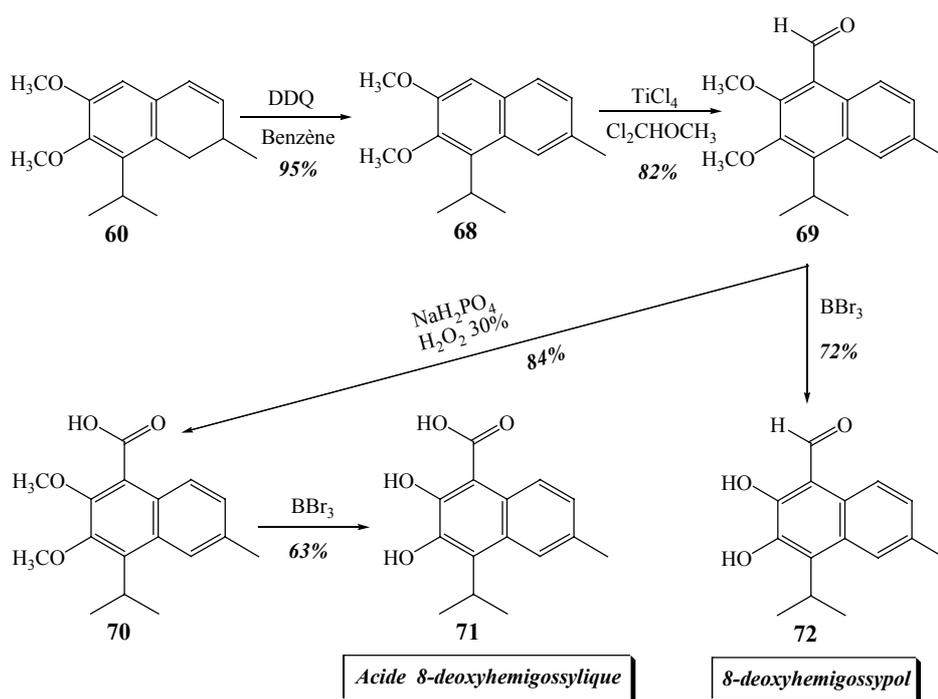
Le groupe carbonyle de **64** est introduit par la formylation de **63** par TiCl_4 et le dichlorométhyle méthyle éther.

Le groupe aldéhyde de **64** est converti en l'acide **65** par une oxydation douce avec l'hypochlorite de sodium.

Les groupements éthers méthyliques de **64** et **65** sont enlevés par BBr_3 pour former l'acide 1,1'-dideoxygossylique **66** et le 1,1'-dideoxygossypol **67**.

La synthèse de l'acide 8-deoxyhemigossylique **71** et du 8-deoxyhemigossypol **72** est faite à partir de l'intermédiaire **60** (schéma 10) et la méthode utilisée est identique à celle décrite dans le (schéma 9)

Schéma 10



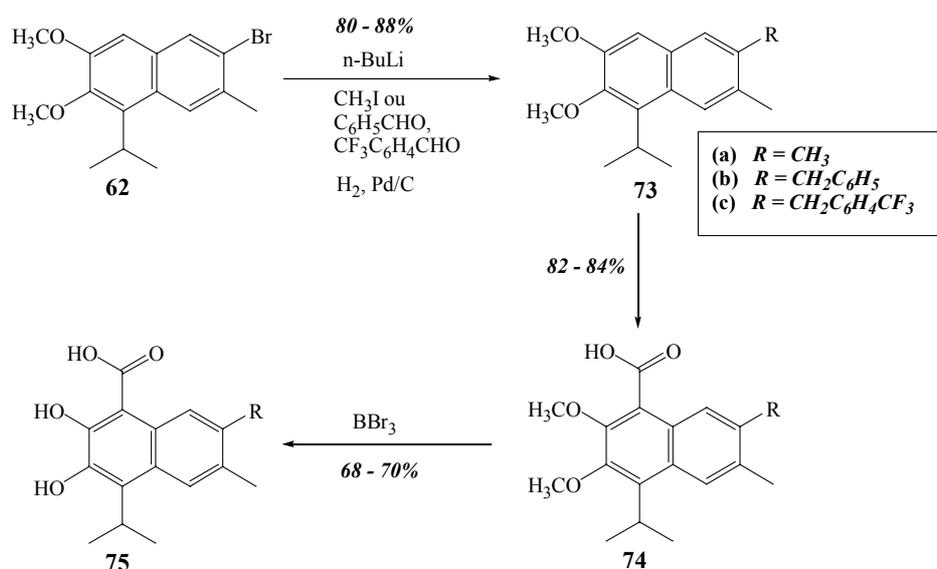
b.2/ Dérivés du 8-deoxyhemigossypol

La synthèse de ces dérivés a été faite par Deck et al., qui ont utilisé l'intermédiaire bromonaphtalène **62** décrit par Royer pour cette synthèse. (schéma 11) (Deck LM et al., 1998).

L'étape clé de cette synthèse est l'alkylation du bromonaphtalène en position 7 par n-BuLi et l'iodure de méthyle ou le benzaldéhyde, le para-(trifluorométhyle)-benzaldéhyde pour obtenir des dérivés **73(a)**, **73(b)**, **73(c)** correspondants, puis les alcools obtenus sont déshydratés et hydrogénés.

L'introduction du groupement acide a été faite par la même méthode de synthèse que précédemment.

Schéma 11



II. PRINCIPALES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DU GOSSYPOL ET DE SES DÉRIVÉS

1/ Activité contraceptive

Le gossypol est utilisé en Chine depuis très longtemps comme remède naturel pour le traitement de la bronchite et comme abortif (Vander Jagt DL et al., 2000).

C'est en effet, dans les régions de production du coton que les Chinois remarquèrent pour la première fois une diminution significative de la natalité. Cette observation fut associée avec les habitudes alimentaires des populations autochtones qui utilisaient

l'huile des graines de cotonnier dans leur préparations culinaires. On a ignoré longtemps les causes de cette dénatalité jusqu'à ce que Liu et al. aient mis en évidence dès 1929 (*Liu BS, 1957*), le rapport entre la contraception et la consommation dans la province de Jiangxi, de l'huile de graines de cotonnier, extraite par pression à froid. La coloration jaune de cette huile est due au gossypol, pigment qui a été reconnu depuis comme l'agent responsable de la dénatalité observée. A noter que la publication de Liu mentionnait que le gossypol avait un effet modulateur global de la fertilité, sans préciser si cet effet s'exerçait sur l'homme ou sur la femme. Cette question restait posée.

Vers les années 60, une épidémie appelée « fièvre de Hanchuan » (province de Hubei) s'est propagée dans certaines régions de la campagne chinoise. Le syndrome de cette fièvre est caractérisé par une sensation de brûlure sur les mains et le visage. Là encore, les malades consommaient de l'huile extraite des graines de cotonnier par pression à froid et l'arrêt de l'utilisation de cette huile conduisait à la rémission des symptômes. Chez les malades atteints de cette fièvre, on avait, de plus, constaté chez certains hommes une baisse de la densité du sperme tandis que certaines femmes malades étaient atteintes d'aménorrhée.

Des études cliniques plus approfondies, publiées en 1978, indiquèrent que c'était bien le gossypol qui était l'agent biologique actif, responsable des effets observés. Ces dernières hypothèses ont alors attiré l'attention des scientifiques du monde entier.

La Chine a décidé de développer le gossypol comme agent contraceptif pour l'homme et des études ont été réalisées sur 18 provinces avec la participation de milliers de médecins et de scientifiques et ceci pendant 19 ans. Les résultats préliminaires furent très encourageants, et il fut établi que la dose moyenne de 20mg/jour pendant 2 mois conduisait à la stérilité masculine.

Malgré tout, cette recherche a dû prendre fin en 1986 à cause de deux effets secondaires majeurs qui apparaissaient pendant le traitement. Ce sont :

L'hypokaliémie : 0,75% de patients développaient une hypokaliémie pouvant conduire à une arythmie cardiaque (*Report Contraception, 1985*).

L'irréversibilité de la stérilité : 9,9% de patients étaient restés stériles même après avoir arrêté le traitement depuis plusieurs années. Cet effet pourrait provenir du blocage irréversible de la spermatogenèse par le gossypol (*Report Contraception, 1985*).

Des études furent reprises récemment pour déterminer la cause exacte des effets secondaires du gossypol (*Yu ZH & Chan HC, 1998*). Il apparut que les effets observés étaient très variables selon les régions, les conditions de vie, les saisons etc. Quant à l'hypokaliémie elle-même, elle peut être observée simplement dans certaines régions de la Chine où les habitants consomment du thé vert quotidiennement. Cette remise en question de la toxicité du gossypol plaça à nouveau le gossypol au rang des contraceptifs masculins potentiels.

A l'appui de cette proposition, Gu et al. ont prouvé dernièrement qu'en utilisant de plus faibles doses de gossypol (de 10 à 12.5 mg/jour au lieu de 20mg/jour comme avant), l'effet contraceptif apparaît sans entraîner ni hypokaliémie ni irréversibilité (Gu ZP et al., 2000).

Peu de publications traitent de l'activité contraceptive de dérivés du gossypol. Notons cependant que Matlin et al., ayant réussi à séparer le (+)-gossypol et le (-)-gossypol, ont montré, sur des modèles animaux que seul le (-)-gossypol est contraceptif, tandis que la toxicité est comparable pour les deux énantiomères (Matlin SA et al., 1985).

Une étude structurale sur l'activité contraceptive du gossypol a été entreprise par Wichmann et al., qui ont remarqué que les dérivés éther méthylique lactol du gossypol (l'éther tetraméthylique du gossypol et l'éther hexaméthylique du gossypol) sont moins actifs que le gossypol lui même. Ceci a suggéré que l'activité contraceptive du gossypol est liée à la présence de la fonction aldéhyde, elle même responsable de la toxicité du gossypol (Wichmann K et al., 1986).

Enfin, même si la recherche sur le gossypol comme contraceptif masculin est officiellement presque arrêtée en Chine, signalons qu'elle est poursuivie au Brésil où le gossypol est le premier médicament commercialisé pour la contraception masculine sous la marque Nofertile.

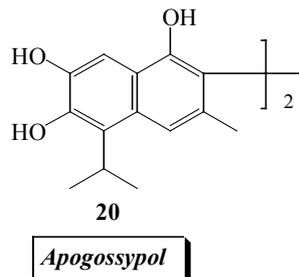
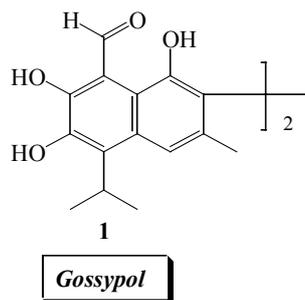
2/ Activité antivirale

Le Gossypol possède une activité antivirale *in vitro* contre de nombreux virus enveloppés comme : le virus de l'herpès simplex type 2, le virus de l'influenza, le parainfluenza-virus, et le virus HIV-1.

a. Activité antiherpétique

Les propriétés antivirales du gossypol ont été constatées principalement sur le virus de l'herpès.

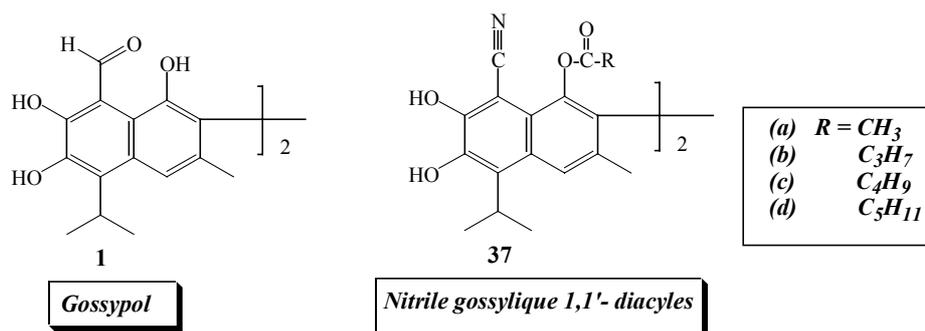
En 1975, Dorsett et ses collègues ont mesuré l'activité antivirale du gossypol **1** et de l'apogossypol **20** sur l'herpes simplex dans une culture des cellules HEp-2 (Dorsett PH & Kerstine EE, 1975).



Le gossypol, à 5 μ M inhibe à 90% la croissance du virus et n'est pas toxique pour les cellules Hep-2. Dans les mêmes conditions, l'apogossypol, formé en éliminant les deux fonctions aldéhydes, présente une activité antivirale complète à 28 μ M, tout en étant 10 fois moins toxique que le gossypol. Le gossypol et l'apogossypol inhibent l'infection par le virus de l'herpès simplex, celui de l'influenza et le parainfluenza-virus. Par contre, ils n'ont aucun effet sur les poliovirus, virus non-enveloppés.

Le mécanisme de l'activité antivirale de ces dérivés a été expliqué par le fait que ces dérivés se lient à l'enveloppe et détruisent son intégrité. Si la membrane est le site de l'inactivation du virus, la toxicité sélective pour le virion pourrait provenir des différences structurales entre sa membrane enveloppe et celle de la cellule hôte. En effet les cellules hôtes peuvent réparer leur membranes endommagées ou inactiver le gossypol et l'apogossypol, tandis que les particules virales qui sont métaboliquement à l'état dormant, ne le peuvent pas.

Par la suite, en 1986, Radloff et son équipe ont repris les études ; ils ont voulu comparer l'activité antivirale du gossypol et des dérivés nitriles gossyliques sur l'herpes simplex type II (HSV-II) dans des cultures de cellules Vero (Radloff RJ et al. , 1986).



Ils ont constaté que le gossypol **1** montre une forte toxicité sur cellules Vero à 5 μ M. Par contre, les nitriles gossyliques 1,1'-diacyles **37(a)-(d)** ne sont toxiques qu'à partir d'une concentration de 50 μ M.

Pour mesurer l'activité antivirale de ces composés, les auteurs ont fait deux expériences différentes. La première expérience a été réalisée pour tester l'effet de ces composés sur le développement de l'infection virale par HSV-II tandis que, la deuxième a été mise au point pour examiner l'activité antivirale de ces composés sur les cellules Vero préalablement infectées par l'HSV-II.

Dans la première expérience, il a été montré que le gossypol et les dérivés du nitrile gossylique 1,1'-diacyles sont actifs contre l'HSV-II : le gossypol est actif dès <0.5 μ M, les dérivés du nitrile gossylique 1,1'- diacyles à 2 μ M.

La deuxième expérience sur les cellules Vero infectées montre que le gossypol à 2 μ M n'empêche pas la multiplication virale. A concentration plus élevée, le gossypol est suffisamment toxique pour les cellules Vero et l'activité antivirale est complètement

masquée. Par contre, le nitrile gossylique 1,1'-divalérate **37(d)** est actif à 10 μ M et n'est pas toxique pour les cellules Vero à cette concentration.

Les auteurs en ont conclu que la modification de la fonction aldéhyde du gossypol n'a pas réduit son activité antivirale. Les dérivés du nitrile gossylique 1,1'- diacyles présentent une activité plus prometteuse que le gossypol lui-même sur l'inhibition de la multiplication virale dans des cellules infectées car ils sont moins toxiques que le gossypol

b. Activité anti-HIV

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1 ou HIV-1) a été identifié comme l'agent étiologique du SIDA (AIDS). De très nombreux produits ont été synthétisés pour inhiber HIV, mais pour soigner le SIDA (avant la « trithérapie »), le seul approuvé par la FDA fut longtemps l'AZT (AZT[zidovudine]:3'-azido-3'-deoxythymidine).

Comme les produit naturels représentent une source potentielle d'agents antiviraux, plusieurs études ont été réalisées dans l'espoir de trouver des substances pour inhiber spécifiquement HIV.

En 1989, Polsky et al ont étudié l'effet inactivant du gossypol sur HIV-1 dans un milieu acellulaire. Des pré-incubations avec le gossypol à des concentrations à partir de 100 μ M peuvent détruire complètement le virus (*Polsky B et al., 1989*).

Lin et collaborateurs se sont intéressés aux différences d'activité entre les deux énantiomères du gossypol. En 1989, ils ont mesuré leurs activités anti-HIV dans des cultures de cellules PBM (Peripheral Blood Monocytes - monocytes du sang périphérique) (*Lin TS et al., 1989*) (tableau 1)

Tableau 1

Composé	EC (μ M) sur HIV-1		Toxicité sur PBM
	50%	90%	IC ₅₀ (μ M)
(-)-Gossypol	5.2	7.1	>100
(+)-Gossypol	50.7	69.1	52

Ils ont observé une inhibition sélective de la réplication de HIV-1 par le (-)-gossypol mais pas par le (+)-gossypol. Le (-)-gossypol inhibe complètement la réplication du virus HIV-1 à 10 μ M, et la prolifération des cellules PBM n'est inhibée à 50 % qu'à des concentrations supérieures à 100 μ M par le (-)-gossypol. Tandis que l'activité anti-HIV du (+)-gossypol est parallèle à sa cytotoxicité sur PBM.

L'activité anti-HIV du (-)-gossypol se remarque donc à une concentration qui est 20 fois plus faible que celle qui entraîne une cytotoxicité dans les cellules PBM d'où un index thérapeutique appréciable. Bien qu'il soit moins actif que l'AZT, le (-)-gossypol mériterait d'être considéré comme un médicament potentiel car sa toxicité aux doses actives est relativement faible comparée à celle de l'AZT dont on connaît l'activité immunosuppressive à doses élevées.

Partant de ces résultats très encourageants, ce même groupe a décidé d'élargir les études à des dérivés du gossypol en espérant trouver de nouvelles molécules actives et moins toxiques. Ils ont mesuré l'activité anti-HIV de nombreux dérivés du gossypol, toujours dans des cultures de cellules PBM, tout en mesurant leurs toxicités sur cellules Vero (Lin TS et al., 1993) (tableau 2)

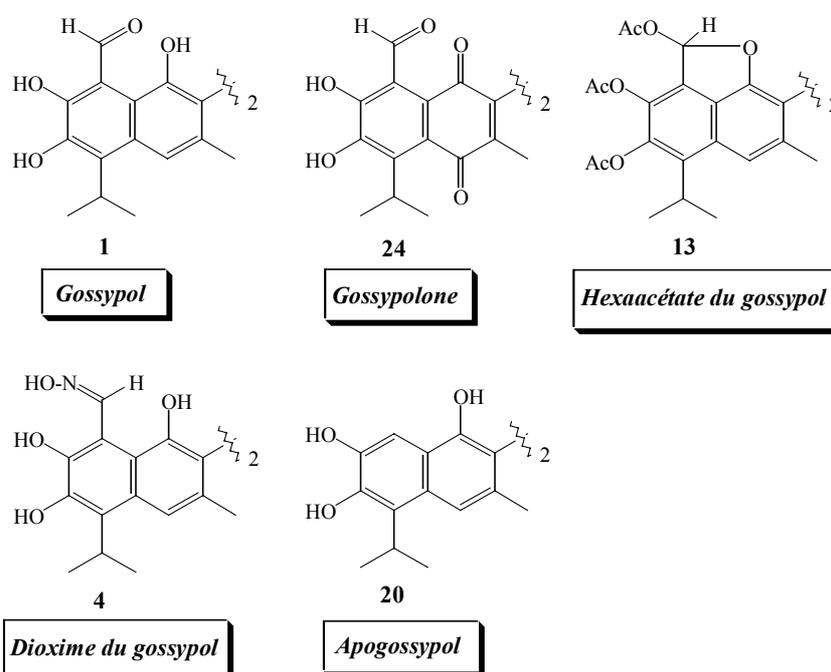


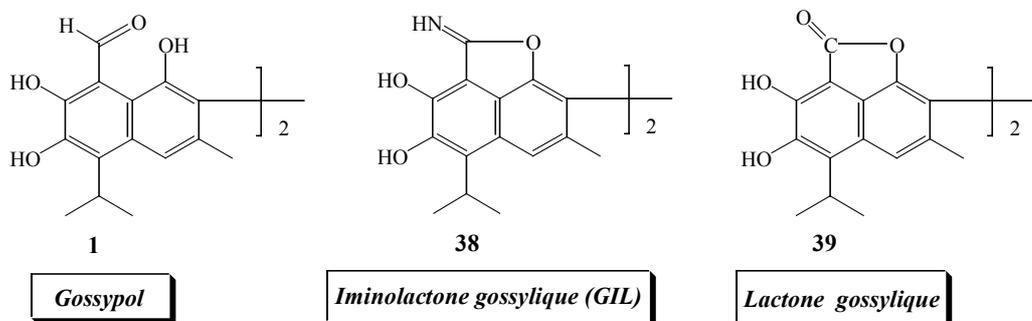
Tableau 2

	Inhibition de HIV / PBM EC ₅₀ (μM)	Toxicité / PBM IC ₅₀ (μM)	Toxicité / Vero IC ₅₀ (μM)
1	1.7	>100	5.2
24	0.86	>100	0.87
13	0.93	>100	4.1
4	0.41	>100	7.5
20	0.82	>100	77.4

Ils ont constaté que, les composés **24**, **13**, **4**, **20** sont légèrement plus actifs que le (-)-gossypol **1**, et que ces dérivés ont la même toxicité que le (-)-gossypol. Bien qu'ils ne

soient pas très toxiques pour les cellules PBM, les composés **24**, **13**, **4** sont significativement toxiques sur les cellules Vero.

Parallèlement, Deck et al avaient réussi à synthétiser quelques nouveaux dérivés du gossypol : l'iminolactone gossylique **38**, la lactone gossylique **39** (Deck LM et al., 1991).



L'activité de ces produits a été examinée sur LAV-A et HTLV-IIIB/H9 (virus HIV-1) dans les cellules MT4 et les cellules HT46c, respectivement (Royer RE et al., 1991). Les résultats sont les suivants (tableau 3):

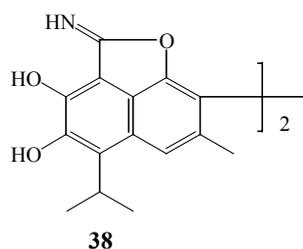
Tableau 3

Composé	LAV-A/ MT4		HTLV-IIIB/ H9 / HT46c	
	EC ₅₀ (μM)	CT* (μM)	EC ₅₀ (μM)	CT* (μM)
Gossypol	1.0	50	0.6	25
Iminolactone gossylique 38	0.25	>50	0.27	50
Lactone gossylique 39	63	250	7.2	100

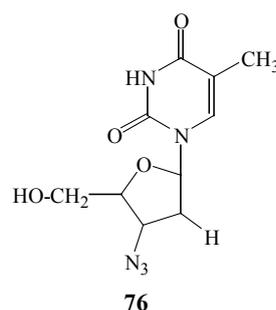
CT* : concentration toxique pour les cellules hôtes

Ils ont montré que l'imine lactone du gossypol est **4** fois plus active que le gossypol sur LAV-A dans les cellules MT4 et 2 fois plus active sur HTLV-IIIB/H9 dans les cellules HT46c.

En 1995, Royer et ses collègues ont comparé l'activité antivirale de l'iminolactone gossylique (GIL) et de l'AZT sur un virus HIV-1 isolé des patients ayant suivi un traitement avec l'AZT pour savoir si l'iminolactone gossylique et l'AZT avaient une cible différente (Royer RE et al., 1995^(b)). Pour l'AZT, l'IC₅₀ est de l'ordre de 0.015μM à 6.7μM, et pour GIL, l'IC₅₀ est de l'ordre de 0.4μM à 6.6μM. Il n'y a pas de corrélation entre l'IC₅₀ de GIL et l'IC₅₀ de l'AZT. Ces résultats ont permis de conclure que les sites de l'inactivation du virus HIV-1 de l'AZT sont différents de ceux du GIL et que GIL n'exerce pas son activité anti-HIV en inhibant la transcriptase inverse ce qui est en accord avec les conclusions d'une étude précédente (Lin TS et al., 1989). Cependant, ces études n'excluent pas que GIL soit métabolisé pour former un produit capable d'inhiber la transcriptase inverse, comme dans le cas de l'AZT.



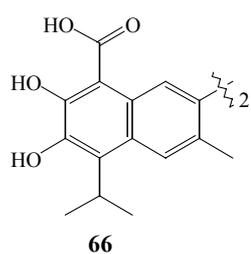
Iminolactone gossylique (GIL)



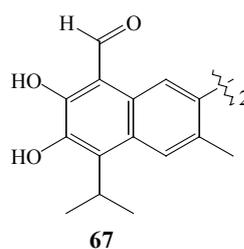
AZT

Les dérivés comme GIL peuvent ainsi ouvrir une perspective pour étudier des cibles autres que la transcriptase inverse pour le développement thérapeutique anti-HIV.

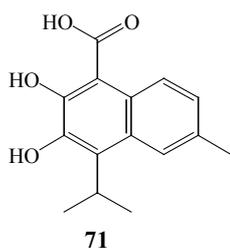
A noter que Royer et al. ont poursuivi cette étude et ont réalisé une synthèse totale de nouveaux dérivés sur le modèle du gossypol (Royer RE et al., 1995^(a)):



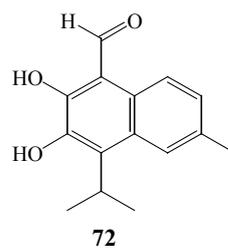
Acide 1,1'-dideoxygossylique (DDGA)



1,1'-dideoxygossypol (DDG)



Acide 8-deoxyhemigossylique (DHGA)



8-deoxyhemigossypol (DHG)

L'activité anti-HIV de ces composés a été évaluée dans des cultures de cellules HeLaT⁴⁺ (tableau 4)

Tableau 4

Composé	EC ₅₀ (μM)	Concentration toxique pour les cellules hôtes (μM)
38 GIL	0.4	>20
67 DDG	Masqué par la toxicité	>1
66 DDGA	0.7	>5
72 DHG	20	>1
71 DHGA	Pas actif	>20

L'acide 1,1'-dideoxygossylique 66 (DDGA) a une activité à peu près égale à celle de l'imino lactone du gossypol 38 (GIL), ce qui signifie que les groupements phénoliques en position 1,1' peuvent être supprimés totalement. Le 1,1'-dideoxygossypol 67 est plus toxique que le gossypol lui même, on peut suggérer que la toxicité du groupe aldéhyde du gossypol est diminuée par la formation de la forme lactone avec les groupes phénoliques en position 1,1'. Enfin, l'inactivité de l'acide 1,1'-dideoxyhemigossylique 71 sur le virus HIV-1 a permis de conclure que l'hemigossypol n'est pas la structure responsable de l'activité anti-HIV.

Ces travaux ont permis à ces auteurs d'énoncer des règles pour la recherche de nouveaux dérivés du gossypol plus actifs et moins toxiques :

- Les fonction aldéhydes du gossypol ne sont pas nécessaires pour l'activité anti-HIV, de plus elles sont la cause de la toxicité de cette molécule.
- Les groupement phénolique en position peri 1,1', qui interviennent toujours dans la chimie de la fonction aldéhyde, ne participe pas aux activités biologiques y compris l'activité anti-HIV.
- Le gossypol étant constitué de deux noyaux naphthaléniques symétriques, il existe une assez bonne probabilité pour que ses activités biologiques, outre de l'activité anti-HIV, soient retrouvées dans une molécule ne contenant qu'un seul noyau naphthalénique .

3/ Activité antifongique

Aspergillus flavus. : Ce champignon, parasite des plantes est responsable de la biosynthèse des aflatoxines qui se forment sur les amandes et graines. La formation de ces poisons des aliments est bloquée par le gossypol (Mellon JE, 1992).

4/ Activité antiparasitaire

Le gossypol présente une activité contre de nombreux parasites qui sont parfois la cause de maladies sévères et répandues. La plupart des études ont été faites in vitro sur l'inhibition de la croissance du parasite par le gossypol.

Citons, pour mémoire (Vander Jagt D et al., 2000):

a. *Entamoeba histolytica*: L'amibiase est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. *Entamoeba histolytica*, qui envahit les intestins et le foie, est un agent pathogène majeur pour l'Homme. Les trophozoïtes de *E. histolytica* sont très sensibles au gossypol, $ED_{50}=15nM$ (Gonzalez-Garz MT & Said-Fernandez S, 1988).

b. *Trypanosoma cruzi*: Le flagellé protozoaire *T. cruzi* est responsable de la maladie de Chaga appelée aussi trypanosomiase sud-américaine contre laquelle on ne connaît pas encore de médicament vraiment efficace. Or les epimastigotes de *T. cruzi*, en culture, sont sensibles au gossypol qui, à $25 \mu M$, bloque totalement la croissance du parasite et retarde considérablement cette croissance dès $0.01 \mu M$ (Montamat EE et al., 1982).

c. *Trypanosoma brucei brucei*: infecte les bovins en Afrique. Mis en culture, sa croissance est bloquée complètement par le gossypol à $20 \mu M$ par inhibition du processus oxydatif du glucose (Eid JE et al., 1988).

d. *Taenia taeniaformis*: Parasite de l'homme et des animaux. Le développement de ses larves à partir de l'ingestion des œufs peut être bloquée chez le Rat par le Gossypol (Rikihisa Y & Lin YC, 1986).

e. *Plasmodium falciparum*: C'est l'une des quatre espèces de parasites responsable de la malaria. *P. falciparum* est inhibé en culture, par le gossypol $ED_{50} 7.0 \mu M$. Le seuil d'activité se situe au dessous de $0.1 \mu M$ ce qui a encouragé la recherche de nombreux dérivés du gossypol (Heidrich JE et al., 1983). En effet, le parasite est devenu résistant aux médicaments conventionnels tels que la chloroquine (Peters W, 1987; Kell AJ, 1991) et ceci a stimulé la recherche de nouveaux composés antipaludéens ainsi que de nouvelles cibles.

En 1986, Royer et al ont étudié l'activité antipaludique du gossypol et des dérivés de nitrile gossylique peri-diacyles sur deux souches de *P. falciparum*: l'une chloroquino sensible (CDC/I/HB-3) et l'autre chloroquino résistante (FCB/NC-1) (Royer RE et al., 1986). (tableau 5)

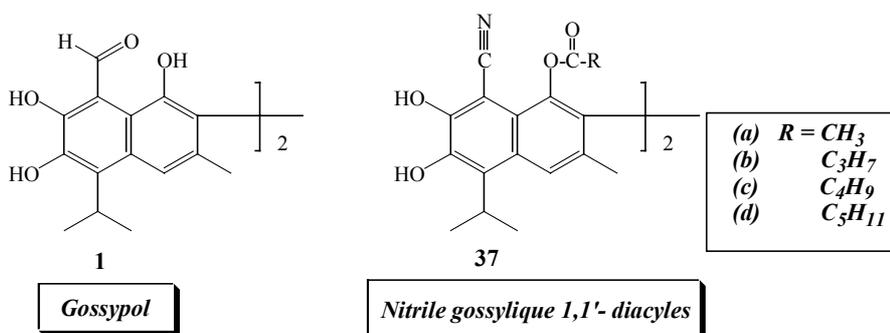


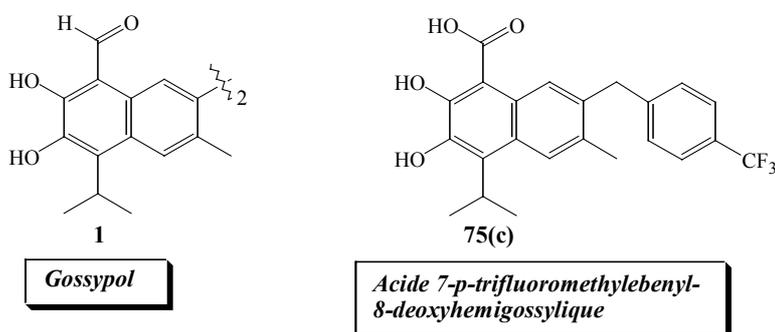
Tableau 5

Composé	IC ₅₀ (μM)	
	Chloroquine sensible (CDC/I/HB-3)	Chloroquine résistante (FCB/NC-1)
1 Gossypol	7	13
37(a) Nitrile gossylique 1,1'-diacétate	36	76
37(b) Nitrile gossylique 1,1'-dipropionate	46	69
37(c) Nitrile gossylique 1,1'-dibutyrate	21	26
37(d) Nitrile gossylique 1,1'-divalérate	12	16

Ils ont constaté que l'activité inhibitrice sur la croissance du parasite des dérivés de nitrile gossylique peri-diacyles, est augmentée en fonction de la longueur de la chaîne substituée en position peri. Le nitrile gossylique 1,1'-divalérate **37(d)** a, comme le gossypol, une activité comparable sur les deux souches.

La lactate déhydrogénase (LDH) est parmi les enzymes les plus actives exprimées par *P. falciparum* (Vander Jagt D et al., 1981, 1990). Cette enzyme qui est indispensable au cycle vital anaérobie du *P. falciparum*, est une cible thérapeutique de choix sur laquelle agit vraisemblablement le gossypol (Royer ER et al., 1986 ; Read JA et al., 1999).

Le gossypol s'est révélé un inhibiteur compétitif de la liaison de la nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH) à la LDH. Or la LDH parasitaire possède une structure proche mais suffisamment différente de la LDH humaine. Les différences structurales entre ces deux enzymes ont été mises à profit par Vander Jagt et son groupe pour synthétiser, à partir de la structure originelle du gossypol, et par synthèse totale, de nouveaux antipaludiques très prometteurs en raison de leur faible toxicité pour l'Homme et de leur grande affinité pour la lactate déhydrogénase parasitaire (Gomez MS et al., 1997).



Le dérivé de l'acide 8-dideoxyhémigossylique : l'acide 7-p-trifluorométhylebenzyl-8-dideoxyhémigossylique **75(c)**, inhibe sélectivement la LDH du parasite (Deck LM et al., 1998). (tableau 6)

Tableau 6

Composé	Parasite	Homme	
	pLDH Ki (μM)	LDH-M Ki(μM)	LDH-H Ki(μM)
1	0.7	1.9	1.4
75(c)	0.2	13	81

5/ Activité antitumorale

a. Activité antitumorale du gossypol

Le gossypol, étudié depuis très longtemps pour son activité contraceptive, a retrouvé un regain d'intérêt en raison de ses activités antitumorales.

En 1974, le gossypol a été étudié dans le programme de criblage primaire à l'US National Cancer Institute mais ses activités modestes n'ont pas été prises en considération à cette époque.

Par la suite, plusieurs effets du gossypol vis-à-vis de cultures de cellules cancéreuses ont pu être observés :

- un découplage de la phosphorylation oxydative a été observé *ex vivo* dans des ascites de Ehrlich, en 1983 (Floridi A et al., 1983).
- en 1984, Haspel et al ont montré que le gossypol est toxique pour des cellules erythroleucémiques de souris en culture (Haspel HC et al., 1984).
- en 1984 encore, le gossypol, administré à des souris implantées avec des tumeurs (ascites d'Ehrlich) prolonge leur durée de vie (Tso WW, 1984).

Le mécanisme d'action proposé pour expliquer l'activité cytotoxique du gossypol sur les tumeurs invoquait une modification du métabolisme oxydatif.

C'est aussi pendant les années 80 que la sélectivité du gossypol sur différentes lignées cancéreuses a été évaluée :

- sur huit lignées cancéreuses et une lignée de fibroblastes normale, les plus sensibles au gossypol étant les mélanomes et les cellules cancéreuses de colon. La cible proposée pour les lignées sensibles est la LDH et celle-ci se trouve sous une forme d'oxydation différente dans les cellules résistantes à l'action du gossypol (Tuszynski GP & Cossu G, 1984)
- Administré *in vivo*, à des souris portant des tumeurs, le gossypol prolonge la survie dans le cas d'adénocarcinomes mammaires mais pas de leucémies (Rao PN et al., 1985).
- D'autres études menées dans les années 80 montrèrent que le gossypol est plus actif contre des cellules de carcinomes humains que contre des cancers de la moelle osseuse, la sensibilité des cellules de carcinomes allant de pair avec le niveau de LDH dans ces cellules (Benz C et al., 1988).

Une étude *in vitro* sur 14 lignées de cellules cancéreuses humaines ne montra pas de sélectivité sur les cellules cancéreuses comparées à des fibroblastes ou des lymphocytes stimulés mais révéla que le gossypol (-) était plusieurs fois plus cytotoxique que l'énantiomère (+) (Band V et al., 1989). D'autres travaux plus anciens sur le mécanisme d'action ont montré que le gossypol arrête le cycle cellulaire (Wang YC & Rao PN, 1984), inhibe la DNA polymérase (Rosenberg LJ et al., 1986), inhibe la topoisomérase II (Adlakha RC et al., 1989) et augmente la microviscosité des membranes intracellulaires (Wu YW et al., 1989).

D'autres études sur des lignées cellulaires cancéreuses ont montré une activité sur le carcinome adénocortical humain (Wu YW et al., 1989), le gliome humain (Coyle T et al., 1994) les cancers du sein humains (Gilbert NE et al., 1995 ; Ligueros M et al., 1997), les mélanomes humains (Blackstaffe L et al., 1997), et les cancers de la prostate (Shidaifat F et al., 1996). Certaines de ces études ont aussi tenté d'identifier le mécanisme de la cytotoxicité. Une étude sur cinq gliomes a montré que la sensibilité de la lignée pouvait être corrélée avec la fraction de LDH. Deux études sur la même lignée de cellule cancéreuse (MCF-7 et MCF-7-Adr) ont montré que le gossypol restait actif sur la lignée présentant le caractère de résistance multiple (Gilbert NE et al., 1995 ; Jaroszewski JW et al., 1990).

Une approche différente pour expliquer le mécanisme d'action a été développée par Benz et ses collègues. Ils ont montré sur des rats implantés avec des tumeurs pancréatiques, que le gossypol, particulièrement l'énantiomère (-), détruisait les cellules endothéliales en réduisant le flot sanguin. Le gossypol augmentait aussi la protéine de choc thermique de 27-kDa phosphorylée des cellules endothéliales en culture. Ils postulèrent une attaque oxyradicalaire des cellules endothéliales par le gossypol semblable à celle observable dans l'ischémie-reperfusion (Benz CC et al., 1991).

Les études à la fois sur des cancers de la prostate et des cancers du sein, ont montré un arrêt de la croissance cellulaire dans la phase G0/G1 et un blocage à la phase S (Ligueros M et al., 1997 ; Shidaifat F et al., 1996). Une étude sur les cellules MCF-7 a montré aussi une inhibition de l'expression de la cycline D1 et de la protéine du gène du rétinoblastome Rb (Ligueros M et al., 1997).

Essais cliniques

Concernant l'adénocarcinome humain, en plus des études *in vitro*, ce cancer a été implanté chez des souris « nude » qui ont révélé un plus faible développement des tumeurs et une plus faible mortalité à 12 semaines (8.3 % contre 41.6 %) (Wu YW et al., 1989). Partant de ces résultats, des recherches cliniques ont été développées au NIH et au centre médical de Cornell Hospital de New York chez des malades présentant des métastases dans les surrénales (Flack MR et al., 1993, Bushunow P et al., 1998, 1999). L'hypokaliémie associée parfois à la prise de gossypol a pu être corrigée et les résultats se sont révélés très encourageants.

Mécanismes d'action proposés

Les propriétés antitumorales du gossypol ont été attribuées à une activité antimitochondriale, et à l'inhibition du métabolisme énergétique de la cellule (Benz CC et al., 1990; Coyle T et al., 1994, Benz CC et al., 1987). Les effets du gossypol sur la distribution des cycles cellulaires ont été aussi rapportés (Liqueros M et al., 1997). De nombreuses études biochimiques sur les effets du gossypol incluent la chélation de l'ion fer (Rands RD, 1966), l'inhibition d'enzymes nucléaires comme la ADN-polymérase-alpha, la topoisomérase II (Rosenberg LJ et al., 1986), et le blocage de la synthèse de l'ADN (Wang YC & Rao PN, 1984). Par contre, les propriétés antimitotiques du gossypol, mesurées par l'inhibition de la polymérisation de la tubuline semblent modestes (Medrano FJ & Andreu JM, 1986).

Il n'est pas exclu que le gossypol se complexe à l'ADN (Zaidi R & Hadi SM, 1992^{(a)-(c)}). Ses effets cytotoxiques stéréospécifiques sont dus à sa structure hélicoïdale, l'un de ses deux énantiomères étant bien plus actif que l'autre (Shelley M.D. et al., 1999 ; 2000). Très récemment, Wang et al. ont prouvé que le gossypol induit la mort des cellules d'un carcinome de colon par un mécanisme d'apoptose (Wang X et al., 2000). A doses relativement élevées, le gossypol exerce une activité cytotoxique peu spécifique en touchant de nombreuses cibles thérapeutiques. Par contre, comme le montrent des études récentes, il est vraisemblable que le gossypol à faible dose agisse sur l'expression d'un gène spécifique, conduisant à la mort cellulaire (Qiu J et al., 1999). Cette dernière hypothèse est actuellement à l'étude (Reidenberg MM, 1999).

b. Activité antitumorale des dérivés du gossypol

Parmi les métabolites hypothétiques du gossypol se trouvent la gossypolone, qui est le métabolite le plus connu du gossypol et, éventuellement des bases de Schiff qui sont susceptibles de se former très facilement dans le milieu biologique, en particulier avec la lysine des protéines.

Certaines de ces imines du gossypol racémique ont été étudiées par Liang et al en comparaison avec la gossypolone, le gossypol racémique et ses énantiomères sur MCF-7, MCF-7/Adr et cellules mammaires immortalisées HBL-100. Les activités sont de l'ordre du micromolaire. Les auteurs proposent cette classe de molécules comme des modèles pour la recherche de nouveaux anticancéreux et soulignent la plus grande toxicité du gossypol (-) (Liang XS et al., 1995).



Le fruit

Chapitre II - Procédés d'extraction et propriétés physicochimiques du Gossypol

CHAPITRE II

PROCÉDÉS D'EXTRACTION ET PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DU GOSSYPOL

I. PROCÉDÉS D'EXTRACTION DU GOSSYPOL

Notre travail de thèse a commencé par l'extraction du gossypol, molécule très réactive et très sensible à l'oxydation. Comme ce produit est assez coûteux, son prix aurait beaucoup limité l'obtention de ses dérivés par hémisynthèse. Nous avons donc choisi de l'extraire nous-même bien que son extraction ne soit pas facile, en essayant d'améliorer le rendement des méthodes d'extractions connues.

Il existe, en effet, de nombreux procédés d'extraction (*Clark EP, 1928^{(a)(b)}; Campbell KN et al., 1937; Pons WA, 1977*). Tous tiennent compte plus ou moins des paramètres suivants : humidité, nature du solvant, durée du chauffage, température, type de broyage, afin d'extraire le maximum de gossypol libre et de limiter sa dénaturation et sa liaison avec les protéines présentes dans la plante.

1/ Extraction par le mélange eau - acétone :

Le procédé consiste à broyer les graines de coton, en présence de solvant (eau/acétone : 30/70) (*Pons WA, 1977*). Le mélange (100g de graines broyées pour 400g de solvants) est ensuite filtré sur buchner et rincé à l'acétone puis concentré au Rotavapor. Le concentrat est repris par un mélange (H₂O/CH₂Cl₂ : 1/1) La phase organique est récupérée et séchée sur sulfate de sodium. Après séchage, on évapore à sec. On obtient un produit (1,3g) dont les caractéristiques chimiques (RMN) ne semblent pas être celles d'un produit pur, néanmoins les pics aromatiques et aldéhydiques du gossypol sont visibles (*Barbier MP, 1983, mémoire DEA Pharmacochimie*).

Une purification par passage sur colonne de silice a été essayée par les auteurs sans résultat satisfaisant. En effet, le gossypol reste probablement lié à la silice, d'où le faible rendement obtenu (0.05%) (*Barbier MP, 1983, mémoire DEA Pharmacochimie*).

2/ Extraction par l'éther de pétrole puis par l'éther - "gossypol-acétique"- méthode de Carruth :

Les graines brutes (graines + bourre) sont broyées, puis tamisées pour séparer la bourre des graines, chacune des deux parties (graines broyées et bourre) est traitée par la même méthode (*Carruth FE, 1918*).

On commence d'abord à déshuiler les graines par extraction au soxhlet avec de l'éther de pétrole (environ 2 litres pour 500g de graines) à moyenne ébullition et pendant 7 heures.

On extrait le gossypol au soxhlet avec de l'éther éthylique (2 litres) à partir des graines déshuilées. Les graines sont d'abord humectées d'éther et on maintient de nouveau une ébullition moyenne pendant 7 heures.

L'extrait éthéré contenant le gossypol est filtré, mis à l'abri de la lumière puis concentré au maximum au Rotavapor. Au concentrat sirupeux, on ajoute 30ml d'acide acétique glacial et 100ml d'éther éthylique anhydre. L'ensemble est maintenu au bain-marie (50 °C) pendant 1 heure puis est laissé de nouveau au repos à l'abri de la lumière. Un précipité de couleur ocre jaune, de gossypol acétique se forme au bout de 2 jours.

Le gossypol acétique obtenu est un mélange équimoléculaire de gossypol et d'acide acétique liés entre eux par des liaisons hydrogène, formant ainsi un complexe. La structure cristalline de ce complexe a pu être définie à l'aide de rayons X (*Chang Fu X et al., 1982*).

3/ Méthode dite "à l'ammoniaque" :

Les graines de coton broyées (350g) sont déshuilées à l'éther de pétrole. Elles sont ensuite placées dans un cristalliseur et on les laisse macérer avec de l'ammoniaque (400ml), pendant 24 heures.

L'ensemble est repris au soxhlet pour être extrait à l'éther éthylique dans lequel on a ajouté de l'acide tartrique (2,5g) (*Dorsett PH et al., 1975*), on évapore pour concentrer l'extrait éthéré.

Cette méthode présente quelques inconvénients, on a constaté que le siphonage au niveau du soxhlet ne se fait pas, le macérat d'aspect pâteux colmate l'appareil, d'où des résultats inexploitablement purifiés (*Barbier MP, 1983, mémoire DEA Pharmacochimie*).

Finalement, le diaminogossypol obtenu est hydrolysé par le même procédé que le dianilinogossypol pour obtenir le gossypol acétique ou le gossypol (*Clark EP, 1928^(a), (b)*; *Carruth FE, 1918*).

Malgré les difficultés rencontrées cette méthode n'est pas dénuée d'intérêt : il serait peut être intéressant de revoir les conditions opératoires.

4/ Méthode dite "à l'aniline" :

Des graines broyées et déshuilées par la méthode de Carruth, sont chauffées pendant un quart d'heure à 110°C en présence d'aniline fraîchement distillée (100g de graines pour 200ml d'aniline) (*Clark EP, 1928^(a), (b)*; *Carruth FE, 1918*).

Après chauffage, le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 12 heures, puis l'ensemble est filtré sur verre fritté et est rincé avec 500ml d'éther. Le filtrat est concentré au tiers de son volume initial, puis laissé au repos, à l'abri de la lumière. Un précipité jaune d'or se formera au bout de 48 heures. Son analyse en CCM montre une tache de Rf supérieur à celui du gossypol.

Le produit est insoluble dans la plupart des solvants classiques. son point de fusion est de 302-303°C et le rendement est de 0.27% (*Barbier MP, 1983, mémoire DEA Pharmacochimie*).

On transforme le dianilinogossypol en gossypol acétique par simple hydrolyse acide. Dans un ballon de 500 ml, propre et sec on introduit 2,5g de produit (dianilinogossypol) et 40 ml d'acide sulfurique concentré, le mélange est chauffé, sous agitation, au bain marie à 90°C pendant 2 minutes. On laisse la solution (aspect rouge) au repos pendant 30 minutes, ensuite on lui ajoute lentement 350ml d'eau glacée, il se forme alors un précipité que l'on extrait par l'éther éthylique (100 ml). L'extrait étheré est séché sur sulfate de sodium anhydre, filtré et concentré à 40ml, s'il y a apparition de produit insoluble on filtre de nouveau et on concentre jusqu'à 15ml. On ajoute au concentrat obtenu un égal volume (15ml) d'acide acétique glacial. On laisse quelques heures au repos, il se forme alors un précipité de gossypol acétique que l'on filtre et que l'on sèche au dessiccateur sous vide et sous P₂O₅ (*Clark EP, 1928^{(a)(b)}*).

5/ Méthode dite "au borate de sodium" :

En ajoutant une solution de borate de sodium ou du borax à 1% dans un extrait huileux de graines de coton dans l'éther de pétrole et sous agitation, le gossypol du milieu huileux forme un complexe gossypol-borate (*Zhou RH et al., 1988*), (*Chander K et al., 1959*).

Cette méthode n'a malheureusement pas été développée dans le domaine industriel, nous la citons ici pour mémoire.

Méthode permettant de transformer le gossypol acétique en gossypol :

Le gossypol acétique (5g) est dissout dans 200ml d'éther éthylique, on ajoute 80ml d'eau distillée, le mélange est maintenu sous agitation pour faire passer l'acide acétique dans l'eau et rompre le complexe initialement formé.

Ensuite on évapore l'éther à basse température (30-40°C), il se forme alors des cristaux grossiers de gossypol à la surface de l'eau. Ce procédé sera renouvelé trois fois pour améliorer la purification. Le produit obtenu, débarrassé de l'acide acétique, est repris par l'éther éthylique (100ml). On sépare par décantation la phase organique de la phase aqueuse. La phase étherée (organique) est séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée.

Au filtrat obtenu, on ajoute 100ml d'éther de pétrole et on effectue de nouveau une évaporation pour chasser l'excès d'éther éthylique, le gossypol étant insoluble dans l'éther de pétrole il se forme alors des cristaux de couleur ocre jaune; on filtre le produit obtenu et on le sèche au dessiccateur sous vide en présence de P₂O₅. On termine ainsi la purification du gossypol. Sur 13kg de graines + bourre traitées on obtient un rendement de 0,65 % de produit brut et un rendement de 0,4% en gossypol purifié (Barbier MP, 1983, mémoire DEA Pharmacochimie).

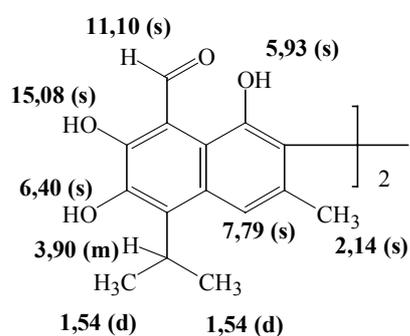
II. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

Les caractéristiques physico-chimiques permettant l'identification du gossypol sont les suivantes (Smith FH, 1967):

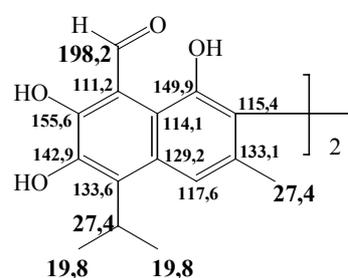
<p>Points de fusion (Campbell KN et al., 1937)</p>	<p>184°C (éter) 199°C (chloroforme) 214°C (ligroïne)</p>
<p>Spectre U.V. (Stipanovic RD et al., 1975)</p>	<p>(EtOH) λ (max) = 236 nm, ϵ = 76100; 289 nm, ϵ = 28800; 376 nm, ϵ = 15500) 283 (sh) (EtONa) λ (max) 240 nm, ϵ = 65400 273 nm (sh), 340 nm (ϵ = 7000) 386 nm (ϵ = 15000)</p>
<p>Spectre I.R. (Stipanovic RD et al., 1975)</p>	<p>ν max = 1625 cm⁻¹ (CHO); 3350 cm⁻¹ (OH conj.); 3530 cm⁻¹ (OH intramol.)</p>

<p>Spectre de masse (Stipanovic RD et al., 1975)</p>	<p>m/z (abondance %) (en IE)</p> <p>518 (M+, 12); 510 (4) ; 502(6) 501 (24) ; 500 (M+ -H₂O, 85) 486 (4) ; 485 (M+ - H₂O - Me, 17) 484 (11); 483 (38) ; 482 (M+ - 2H₂O, 100) ; 468 (16) ; 467 (M+ -2H₂O - Me, 51) ; 438 (10).</p>
---	--

Analyse RMN:



¹H (90 MHz, CDCl₃/TMS)
(Stipanovic RD et al., 1975;
King TJ et al., 1968)



¹³C (200 MHz, CDCl₃/TMS)
(Lacombe L et al., 1987)

Solubilité (Campell KW et al., 1937)

Acétate d'éthyle	+++
Acétone	+++
Butanol	+++
Chloroforme	+++
Cyclohexane	++
Diéthylène glycol	+++
Diméthylformamide	+++
Dioxane	+++
Eau	+
Éthanol	+++
Éther éthylique	+++
Éther de pétrole (bp 60 - 110 °C)	++
Éther de pétrole (bp 30 - 60 °C)	+
Isopropanol	+++
Méthanol	+++

Pyridine	+++
Tétrachlorure de carbone	+++

+++ (très soluble) ++ (peu soluble) + (insoluble)

III. TRAVAUX RÉALISÉS

Nous avons nous-mêmes extrait le gossypol des graines de cotonnier par plusieurs méthodes et la meilleure est venue d'une modification de la méthode de Carruth. Cette opération, assez laborieuse permet, dans les meilleurs des cas d'extraire le gossypol avec des rendements de 0.6% par rapport au poids des graines.

Nous avons caractérisé le gossypol obtenu par différentes méthodes comme IR ; UV ; RMN ; point de fusion. Les résultats sont compatibles avec les données de la littérature.



***Chapitre III -
Bases de Schiff du gossypol et de la
gossypolone***

CHAPITRE III

BASES DE SCHIFF DU GOSSYPOL ET DE LA GOSSYPOLONE

I. INTRODUCTION

1/ Obtention et structure moléculaire

Rappelons que les bases de Schiff du gossypol sont obtenues par simple réaction du gossypol avec une amine. Elles furent parmi les premiers dérivés connus de cette molécule et leur formation, suivie de leur hydrolyse a même été utilisée pour l'extraction ou la purification du gossypol (*Carruth FE, 1918*).

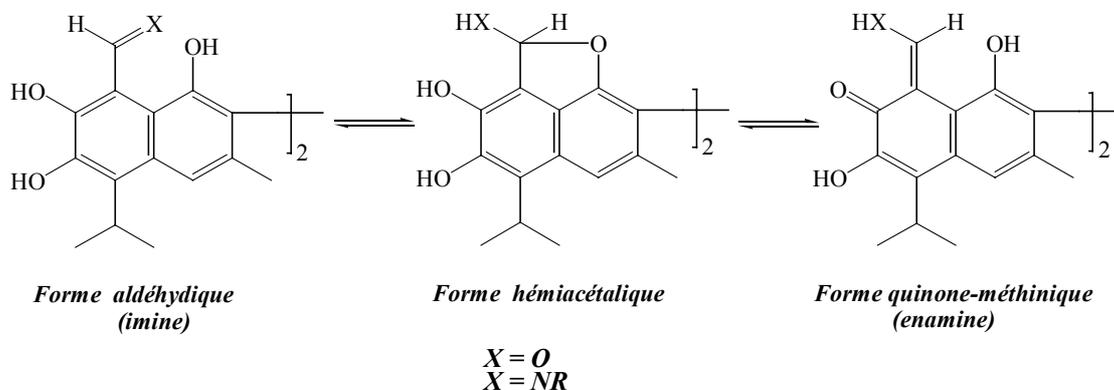
Dans le milieu biologique, la formation de bases de Schiff est aussi très facile si l'on considère la très grande réactivité des groupements aldéhydes et la multitude de fonctions aminées disponibles. Ces réactions qui diminuent la concentration du gossypol libre ont été largement mises à profit. Ainsi, la toxicité des graines de cotonnier, souvent utilisées pour nourrir le bétail, est considérablement réduite par un chauffage modéré de ces graines (*Clark EP^a, 1928*) et pour les mêmes raisons, l'huile extraite par pression à chaud est beaucoup moins toxique que celle obtenue à froid.

Les bases de Schiff du gossypol représentent un moyen facile pour séparer les énantiomères du gossypol. Elles sont séparables sur une colonne HPLC chirale (*Matlin SA et Zhou RH, 1984*) et par HPLC non-chirale (*Matlin SA et al., 1987*). Dans ce dernier cas, le gossypol est couplé avec des amines présentant un centre d'asymétrie au voisinage de l'atome d'azote. Plus ce centre est rapproché et plus facile est la séparation. Les bases de Schiff optiquement pures, séparées par HPLC, peuvent être hydrolysées et libérer quantitativement le gossypol lévogyre et le gossypol dextrogyre. C'est grâce à ces séparations que le (-)-gossypol a été reconnu pour ses activités biologiques plus importantes : contraceptive (*Matlin SA et al., 1985; Lindberg MC et al., 1987*), antitumorale (*Joseph AEA et al., 1986; Band V et al., 1989; Benz CC et al., 1990*), et anti-HIV (*Lin TS et al., 1989*).

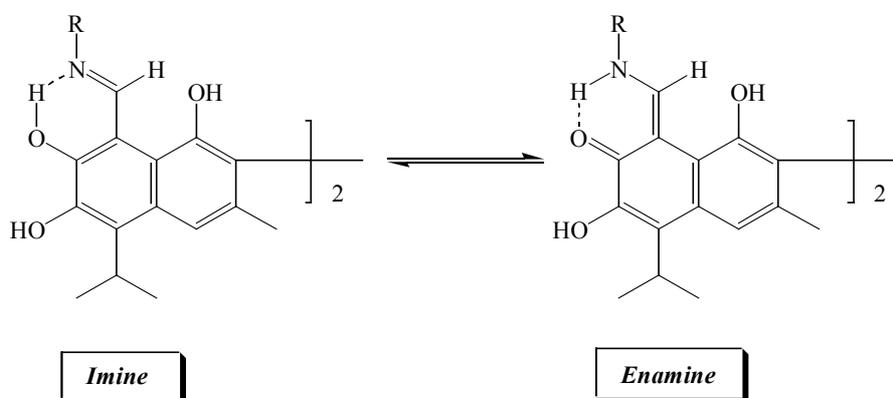
Les bases de Schiff représentent une contribution importante dans la chimie du gossypol et le problème de leur structure est à chaque fois une question particulière. En effet, elles pourraient théoriquement exister sous des formes tautomères différentes. En principe, la base de Schiff, comme le gossypol lui-même, existe sous trois formes tautomères : formes aldéhydique, hémiacétalique et quinone-méthinique (*schéma 1*), et il convient d'ajouter que la forme quinone-méthinique peut se trouver sous forme de deux

isomères géométriques autour de la double liaison, de plus, la forme hémiacétalique peut avoir les configuration R ou S au centre chiral acétal.

Schéma 1



Ces formes tautomères ne sont pas également stables et, dans le cas du dianilino-gossypol (formé par réaction avec l'aniline), les études RMN montrent qu'il n'existe en fait que deux formes : imine (aldéhydique) et énamine (quinone-méthinique), la forme hémiacétalique n'est pas observable. La structure moléculaire d'une base de Schiff dépend donc surtout de l'équilibre entre la forme imine et la forme énamine (Matlin SA et al., 1990).

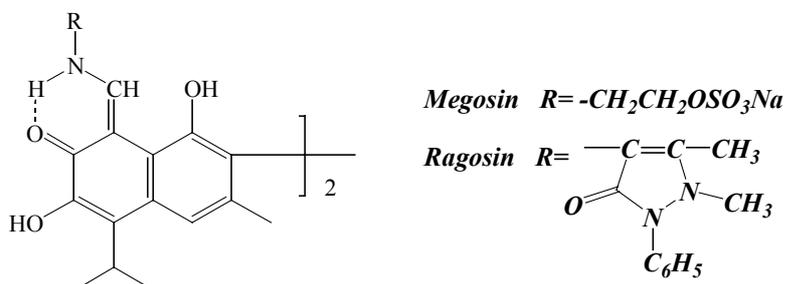


Matlin et al. ont calculé les différences d'énergie entre les deux tautomères par la méthode AM1 dans trois conditions de solvation différentes. Ils ont trouvé que la forme énamine est plus stable que la forme imine. Dans des solvants de polarité décroissantes, la différence d'énergie entre les deux formes décroît, elle décroît aussi dans la série des substituants de l'azote $H > Me > Ph$. Par RMN, le proton de l'énamine a été utilisé comme référence pour mesurer cet équilibre.

Malheureusement, les études RMN du gossypol ont souvent été faites dans des solvants aprotiques et la position de l'équilibre observé ne représente pas ce qui existerait dans le milieu physiologique (Brzezinski B et al., 1990). Ces études RMN ne peuvent pas être corrélées avec des activités biologiques. Ainsi, la structure des premières bases de

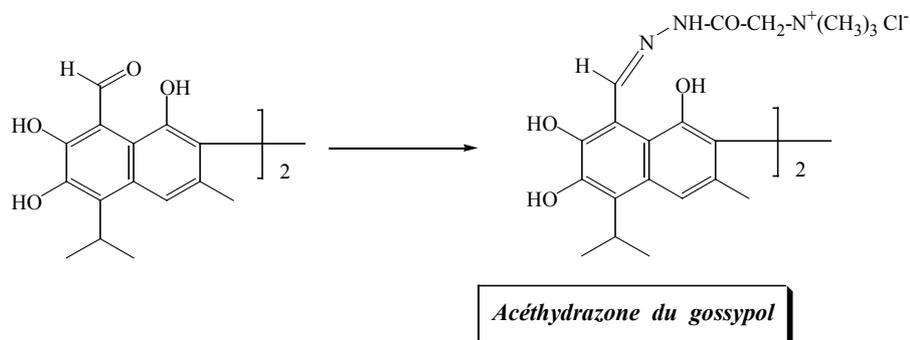
Schiff publiées pour leurs activités antitumorales ne reflète-elle pas la position de l'équilibre imine-énamine observé dans des solvants aprotiques (Liang X S et al., 1995).

Diverses bases de Schiff ont été synthétisées dans un but de recherche thérapeutique. Par exemple, en Ouzbekistan à partir de plusieurs amines aliphatiques, aromatiques, heterocycliques ou d'hydrazines (Ziyaev Kh.I et al., 1997). Par $^1\text{H-RMN}$, les auteurs ont remarqué que les bases de Schiff obtenues par condensation du gossypol avec les amines existent sous forme énamine tandis que celles, qui viennent des hydrazines, existent plutôt sous forme imine, et que le groupement OH en position ortho vis-à-vis de la liaison azométhine forme une liaison hydrogène intramolécule susceptible de stabiliser la forme énamine.



Le Megosin, est un médicament antiherpétique, et le Ragosin, un inducteur de l'interféron, proposé comme médicament pour traiter l'hépatite virale et l'influenza. Leur stabilité vis à vis de l'hydrolyse a été bien étudiée à différents pH. Le Ragosin est plus stable que le Megosin en milieu acide et s'hydrolyse plus rapidement en milieu alcalin (Baram N.I et al., 1999).

Dans un objectif de pharmacocinétique, et pour diminuer la toxicité du gossypol, Kunesch et al. ont couplé le gossypol à des amines plus solubles dans l'eau (Kunesch N et al., 1990). Avec le chlorure d'acéthydrasid-triméthylammonium, un réactif préconisé par Girard pour préparer des dérivés hydrosolubles de cétones stéroïdiques, la solubilité dans l'eau est considérable.

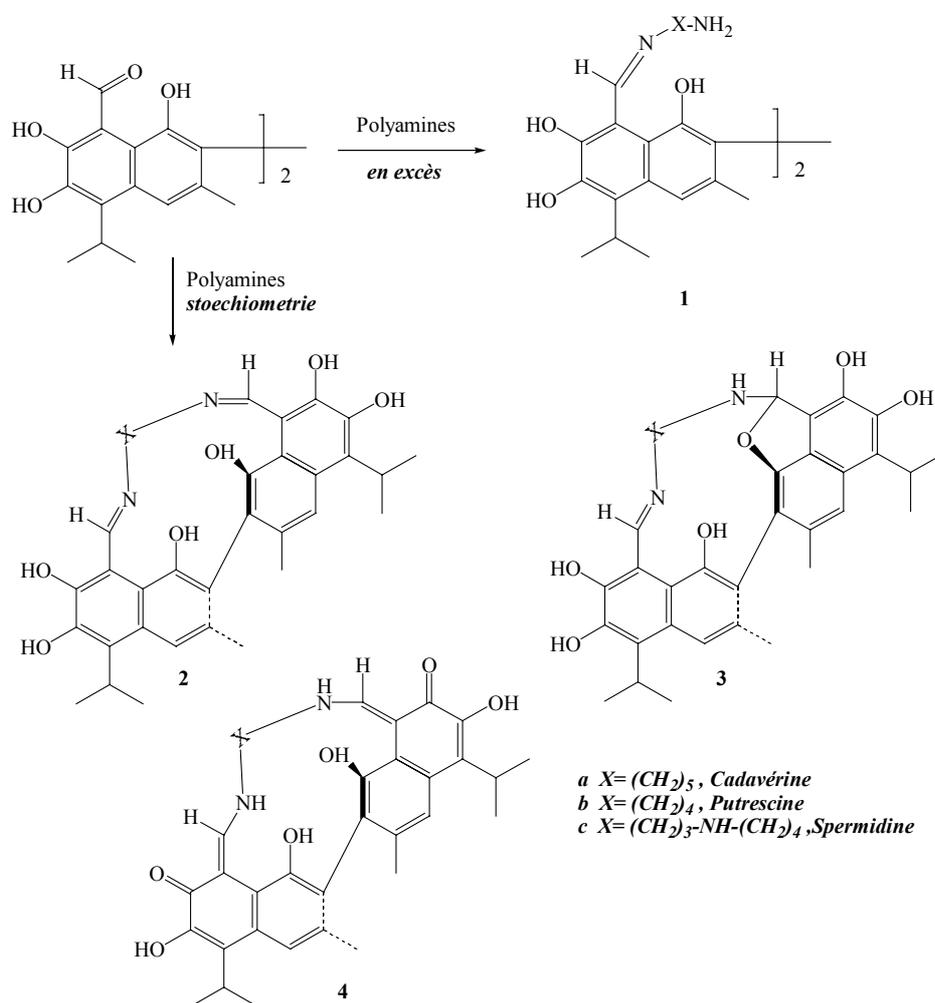


Ces auteurs ont de plus, étudié la réactivité du gossypol avec des polyamines comme la cadavérine, la putrescine et la spermidine, dont le rôle biologique est important et qui, étant présentes dans le liquide spermatique, pourraient bien expliquer l'activité

contraceptive du gossypol. Ce choix était aussi guidé par la possibilité de réaliser un pontage entre les deux fonctions aldéhydes du gossypol car le double ancrage des polyamines sur le gossypol ouvre également la voie à des produits à structure de cage ayant une affinité pour des cations. En effet, la structure macrocyclique de ces dérivés, incluant des groupes azotés et oxygénés, constituerait un site possible de complexation pour des cations tels que Ca^{2+} .

Avec la cadavérine, soit en excès, soit stoechiométriquement, on obtient soit un produit disubstitué peu stable **1** soit deux produits de pontage également instables et de structures très voisines d'après leurs spectres RMN. L'un de ceux-ci doit correspondre à la forme **2a** avec une seule cadavérine pontant les deux fonctions aldéhydes du gossypol. Ce type de structure se retrouve pour le produit majeur de cette même réaction avec la putrescine **2b** et avec la spermidine **2c**. Les produits minoritaires **4b** et **3c** représentent la forme hémiaminal correspondante, à l'instar de ce qu'on observe avec la forme hémiacétalique du gossypol. Toutefois, les formes quinoïdes **4b** et **4c**, tautomères respectifs de **2b** et **2c**, ne peuvent être exclues car elles rendent mieux compte d'un spectre de masse présentant une élimination facile de la partie amine. L'examen des modèles montre que le nombre minimal d'atomes (de carbones et d'azotes) pour effectuer ce pontage est de six, ce qui correspond à la putrescine (schéma 2).

Schéma 2



Le gossypol peut donc donner des combinaisons définies avec les polyamines et ce résultat apporte une contribution à l'étude de son mécanisme d'action biologique au niveau moléculaire. D'autre part, l'obtention d'un hydrazide hydrosoluble est précieuse pour des essais biologiques dans la mesure où l'activité spécifique du gossypol est conservée. C'est en particulier le cas pour la diminution de la mobilité des spermatozoïdes sur laquelle le produit se montrerait même plus actif que le gossypol (*Kunesch N et al., 1990*).

2/ Activités antitumorales des bases de Schiff du Gossypol

Le gossypol est étudié depuis quelque temps en clinique, comme agent antitumoral, mais de façon assez limitée à cause de la crainte d'une certaine genotoxicité et de ses effets secondaires comme l'hypokaliémie. Les recherches, dirigées vers une plus grande activité antitumorale et/ou une moindre toxicité ont donné le jour à une nouvelle génération de dérivés du gossypol en vue d'études cliniques et afin de mieux comprendre le mécanisme d'action.

Comparativement à celles gossypol, les activités biologiques des bases de Schiff ont été très peu étudiées.

Les études sur l'activité anti HIV suggèrent que la modification de la fonction aldéhyde du gossypol peut réduire la cytotoxicité en gardant les effets thérapeutiques (*Royer RE et al., 1991; Lin TS et al., 1993*).

A partir de cette idée, Liang et al ont synthétisé plusieurs bases de Schiff du gossypol et étudié comparativement l'inhibition par ces dérivés de trois lignées cancéreuses : MCF7, MCF7/Adr (résistante à l'adriamycine) et HBL-100 (*Liang XS et al., 1995*).

Parmi divers produits qu'ils ne décrivent pas, les auteurs ont sélectionné quatre bases de Schiff formées à partir du gossypol racémique avec l'ethyl-, la propyl-, l'isobutyl- et la butylamine. Les auteurs ont remarqué que l'isopropylamine du gossypol est particulièrement plus active que les autres bases de Schiff qui contiennent différents substituants aminés. Ils ont suggéré que le radical isopropyle serait le meilleur vecteur pour que le produit pénètre plus facilement dans la membrane permettant ainsi une augmentation de la concentration intracellulaire.

L'inhibition de la croissance cellulaire observée avec cette base de Schiff a été comparée à celle provoquée par le gossypol, la gossypolone, et chacun des énantiomères du gossypol et ceux, supposés, de la gossypolone. Voici leurs résultats :

Composé	MCF-7			MCF7/adr			HBL-100		
	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₉₀
(-)-gossypol	1.1	2.3	4.6	1.9	6.5	13.0	ND	ND	ND
AR3	0.54	0.9	3.7	>25	>25	>25	0.2	1.3	>10
(+/-) gossypolone	5.2	8.4	21.0	8.5	17.0	>25	2.2	8.0	17.0
(+)-gossypolone*	2.7	4.6	17.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(-)-gossypolone*	3.3	14	22.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND

AR3 : isopropylimine du gossypol racémique

ND : non déterminé

* : non caractérisé chimiquement

Le dérivé AR3 (l'isopropylimine du gossypol), plus actif sur MCF-7 que le (-)-gossypol, est beaucoup moins toxique sur la lignée MCF7/adr multi-résistante qui est connue pour surexprimer *mdr-1* et présenter des activités plus importantes en glutathion S transférase (*GST*) et en protéine kinase C (*PKC*). Ces observations indiquent que le couplage avec l'isopropylimine peut augmenter l'activité antitumorale du gossypol sur certaines lignées tumorales (ex : MCF-7, HBL-100), mais le mécanisme de cette augmentation de l'activité pourrait dépendre fortement au niveau intracellulaire des enzymes comme *GST* ou *PKC*. Comme ce phénomène de résistance semble beaucoup moins marqué pour la gossypolone, les auteurs en ont conclu que des dérivés de la gossypolone pouvaient être le point de départ de nouveaux médicaments.

II. TRAVAUX RÉALISÉS

Une partie de ce travail a déjà été publiée (Dao VT et al., 2000)

1. CHIMIE

Tout d'abord, nous avons voulu vérifier que l'activité du gossypol dépendait de la présence des groupements phénoliques et de groupements électrophiles comme les groupements aldéhydes.

Ceci nous a amenés à synthétiser des éthers méthoxylés des groupements phénols et aussi à réduire les groupements aldéhydes en alcools.

Puis nous avons cherché à approfondir les études entreprises par Liang et ses collègues (Liang XS et al., 1995) sur l'activité antitumorale des bases de Schiff du gossypol. Cette étude a été étendue aux bases de Schiff de la gossypolone, qui sont aussi de nouveaux dérivés du gossypol.

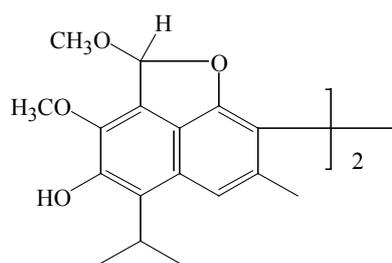
1.1/ Protection des groupements phénoliques et réduction du gossypol :

La toxicité du gossypol est associée à la présence des fonctions aldéhydes qui se lient facilement avec les nucléophiles (Adams RC et al., 1960) et, en particulier avec la chaîne latérale de la lysine dans les protéines pouvant ainsi inhiber certaines enzymes (Strom-Hansen T et al., 1989).

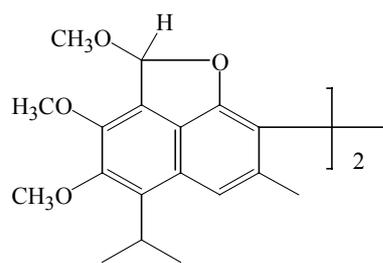
Wichmann et al. ont montré que les éthers méthyliques du gossypol (éthers tétraméthyle et hexaméthyle) et des analogues naphthaldéhydes de l'hémigossypol, sont moins inhibiteurs du métabolisme cellulaire que le gossypol lui même. Ceci a suggéré que l'activité contraceptive du gossypol serait liée à la présence de la fonction aldéhyde et, plus particulièrement à la structure dialdéhydique du gossypol (Wichmann K et al., 1986).

En premier lieu, nous avons réalisé des synthèses de produits racémiques, à partir du gossypol racémique que nous avons extrait des graines de cotonnier. La toxicité cellulaire a été évaluée sur cellules KB en culture dans le Service de Biologie Cellulaire dirigé par Madame Christiane Gaspard à l'ICSN. Ce test préliminaire, très fiable, est utilisé en routine pour cribler les activités cytotoxiques des divers produits et extraits naturels fournis par la communauté scientifique.

Nous avons synthétisé les dérivés éthers méthyliques du gossypol pour évaluer l'importance des groupement phénoliques. Nous avons constaté que les éthers tétraméthyle ou hexaméthyle du gossypol ne sont pas toxiques pour les cellules KB ($IC_{50} > 25 \mu M$) (Dao VT et al., 2000). Dans la mesure où l'activité biologique recherchée est en rapport avec la toxicité cellulaire, nous avons observé que la présence des groupements phénoliques est nécessaire à l'activité.



2
Ether tétraméthyle du gossypol
($IC_{50} > 25 \mu M$)

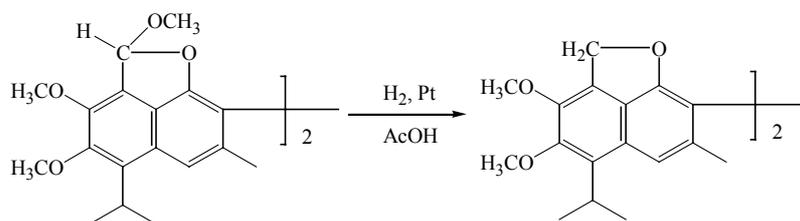


3
Ether hexaméthyle du gossypol
($IC_{50} > 25 \mu M$)

Pour évaluer la contribution des fonctions aldéhydes à la toxicité, nous avons synthétisé le dérivé du gossypol, où les groupements aldéhydes sont réduits à l'état d'alcools.

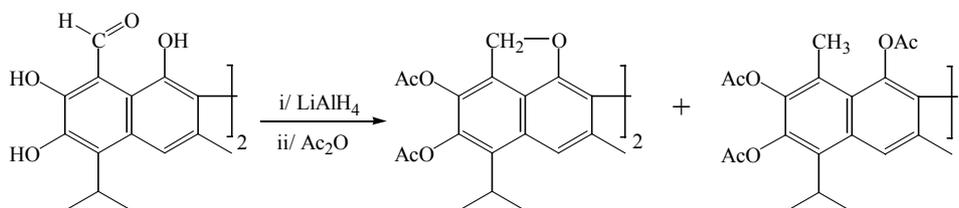
Pour la réduction des dérivés gossypol, plusieurs méthodes avaient déjà été proposées :

- En 1930, la réduction de l'éther hexaméthyle du gossypol par l'hydrogène et le platine dans l'acide acétique a été faite par Adams et al (*Adams R^(b) & Dial WR, 1939*).



Ether tétraméthyle de deoxygossypol

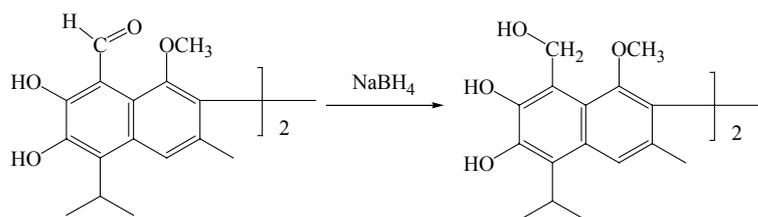
- Ensuite, en 1955, Shirley et son équipe ont effectué une réduction du gossypol avec LiAlH_4 , suivi par l'acétylation du mélange réactionnel (*Shirley DA & Sheehan WC, 1955*).



Tétracétate de deoxygossypol

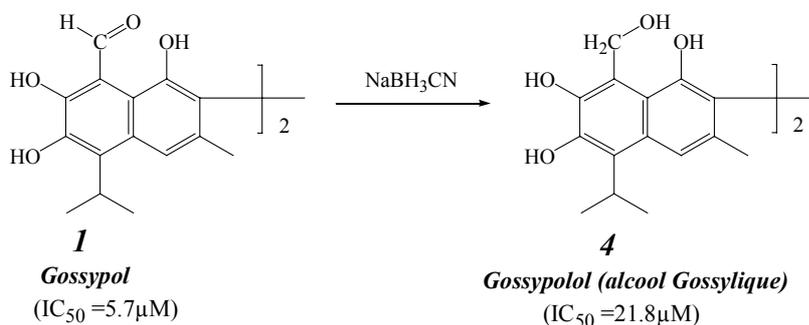
Hexaacétate de methylapogossypol

- Plus récemment, en 1991, Deck et ses collègues ont réduit l'éther 1,1'-diméthyle du gossypol avec NaBH_4 et dans ces conditions, l'alcool attendu a été obtenu (*Deck LM et al., 1991*).



Partant du fait que NaBH_3CN est connu pour réduire sélectivement les groupes aldéhydes, nous avons réussi à obtenir l'alcool du gossypol à partir du gossypol. Le produit de la réduction du gossypol, l'alcool gossylique que nous avons appelé gossypolol, n'est pas toxique sur cellule KB ($\text{IC}_{50} = 21,8\mu\text{M}$). La mise en œuvre de cette réaction est délicate. Il n'est pas facile d'obtenir l'alcool gossylique car les groupes phénoliques et alcool benzylique ont tendance à s'oxyder facilement. Le gossypol, lui même, est difficile à obtenir pur et pour le purifier, on le cristallise en le complexant par l'acide acétique. Cette technique n'a pas pu être utilisée avec l'alcool gossylique. La forme réduite du

gossypol n'est pas suffisamment stable pour envisager, à partir de ce produit, de nouvelles synthèses pour l'étude structure-activité.



Ces premiers résultats nous ont néanmoins permis de vérifier que les fonctions phénols et les fonctions aldéhydes sont également responsables de la cytotoxicité sur KB.

1.2/ Bases de Schiff du gossypol

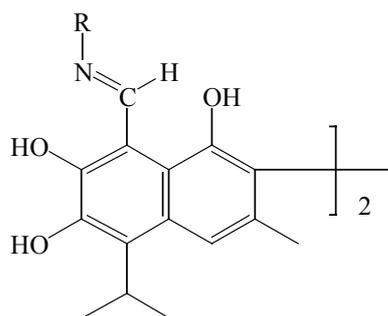
a/ Synthèse des bases de Schiff du gossypol

Paradoxalement, dans les bases de Schiff les fonctions aldéhydes du gossypol sont bloquées mais certaines bases de Schiff sont toxiques. Ces bases de Schiff du gossypol sont assez stables dans l'eau, comme nous l'avons vérifié expérimentalement, et les expériences réalisées *in vitro* par Liang et al sur l'activité antitumorale ne permettent pas d'attribuer les différences de toxicité observées à des différences dans les vitesses d'hydrolyse.

Quand nous avons commencé cette tâche, il existait très peu de publications sur les relations structure-activité pour ces dérivés.

Nous avons donc repris les études publiées par Liang et al., en nous proposant d'examiner, sur une même souche de cellules, quelle est l'importance de la nature du substituant aminé sur la toxicité.

Les bases de Schiff du gossypol racémique ou de chacun des énantiomères ont été obtenues par action des amines primaire dans un mélange d'isopropanol/éther sur le gossypol, à température assez douce (25-45°C). Après 5 à 30 min, les produits de la réaction précipitent et sont purifiés par précipitations successives, sauf pour la méthylimine du gossypol qui ne se dissout pas dans la plupart des solvants. Les rendements sont excellents (60 à 90 %) (tableau 1)



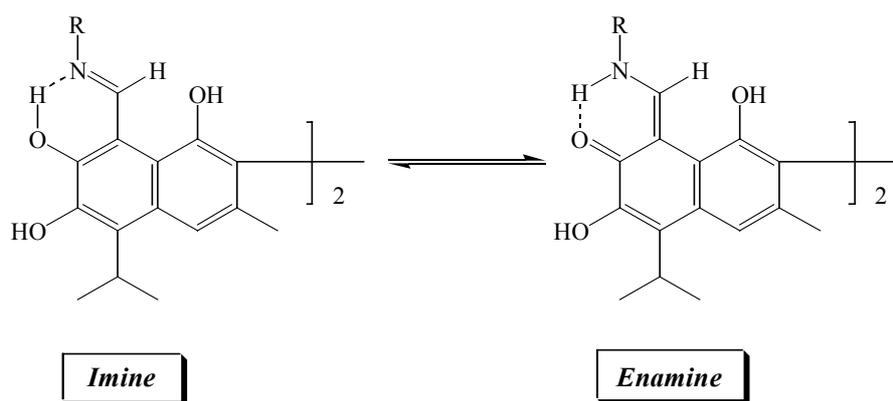
Bases de Schiff du Gossypol

Tableau 1

R	Composé	Rendement (%)
CH ₃	6	95
CH ₂ CH ₃	7	96
n-C ₃ H ₇	8	92
CH(CH ₃) ₂	9	96
n-C ₄ H ₉	10	90
CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	11	90
C(CH ₃) ₃	12	87
n-C ₅ H ₁₁	13	83
n-C ₆ H ₁₃	14	86
n-C ₇ H ₁₅	15	71
n-C ₁₂ H ₂₅	16	91
CH ₂ -CH(CH ₃)C ₆ H ₅	17	92
CH(COOCH ₃)CH ₂ C ₆ H ₅	18*	84
CH(CH ₂ OH)CH ₂ C ₆ H ₅	19	69
CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	20	70
CH ₂ CH ₃ [(+)-Gossypol]	21	95
CH ₂ CH ₃ [(-)-Gossypol]	22	92

* produit déjà décrit dans la littérature

La RMN met en évidence la présence d'un équilibre entre la forme imine et la forme énamine :



b/ Synthèse et Etude de la stabilité des bases de Schiff des énantiomères du gossypol

La synthèse des bases de Schiff du gossypol chiral (+) ou (-) a été réalisée pour mesurer l'activité des bases de Schiff les plus toxiques sur KB et aussi pour étudier la stabilité de chaque isomère vis à vis de la racémisation.

Les deux atropoisomères du gossypol peuvent être préparés par les méthodes suivantes :

- Formation de bases de Schiff chirales par action d'amines chirales, séparation par HPLC avec des colonnes non-chirales, puis hydrolyse (*Matlin SA et al., 1987*).
- Séparation directe des énantiomères du gossypol par HPLC sur une colonne chirale (*Cass QB et al., 1999*).

Ces méthodes sont laborieuses et conduisent à de faibles rendements. Elles demandent un équipement spécial et coûteux. Nous avons bénéficié pour cette partie de notre étude de la collaboration du Dr Michael K. DOWD (Southern Regional Research Center, ARS, USDA, New Orleans, LA) qui nous a généreusement fourni des échantillons d'énantiomères du gossypol. Il a, pour séparer ces énantiomères, utilisé une nouvelle méthode qu'il doit publier et/ou breveter prochainement.

La stabilité des bases de Schiff chirales des énantiomères a été mesurée par HPLC, car elles se séparent très bien lorsque l'amine couplée est chirale. Par contre, si l'amine n'est pas chirale, une colonne HPLC classique ne permet pas la séparation.

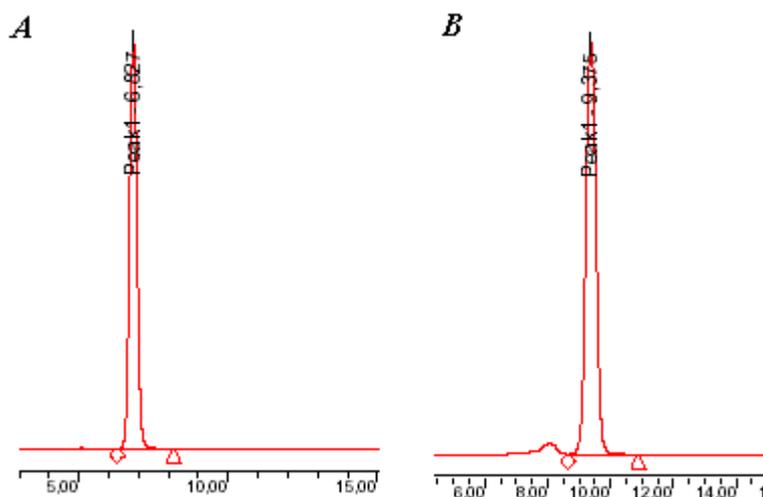
Il faut alors avoir recours à une méthode indirecte que nous avons mise au point et qui est illustrée dans le schéma suivant :

- Amine non-chirale + gossypol (+)ou (-) → Bases de Schiff A (non séparable par HPLC)

- intermédiaires
- Amine chirale en excès + Base de Schiff A \rightarrow intermédiaires \rightarrow Bases de Schiff B, possédant deux centres chiraux séparable par HPLC (diastéréoisomères)

En effet, les deux énantiomères (bases de Schiff A) ont toujours le même temps de rétention sur une colonne non-chirale. Nous avons choisi une amine chirale qui a servi de référence : la D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol, car les deux diastéréoisomères obtenus sont mieux séparés avec des temps de rétention moins longs que pour les diastéréoisomères obtenus avec le méthylester de la phenylalanine qui était utilisé auparavant (Matlin SA et al., 1987).

Nous avons greffé cette amine sur les deux énantiomères du gossypol et les chromatogrammes sont reportés ci-dessous :



HPLC de l'Imine du (+)-gossypol avec D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol _ (A)
et de l'Imine du (-)-gossypol avec D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol _ (B)

[Colonne Alltima C8 5U(250mm x 4.6mm)

Débit : 1ml/mn; solvant : A/B = 20/80 - A : 95% H₂O + 5%CH₃CN + 0.1%TFA;

B : 100%CH₃CN + 0.1%TFA]

Dans les conditions de nos expériences, cette détermination indirecte ne s'accompagne pas d'isomérisation. L'étude cinétique est décrite dans la partie expérimentale.

D'autre part, nous avons vérifié que les bases de Schiff diastéréoisomères sont assez stables à température ambiante dans un solvant organique (pas de décomposition observable après 24h). Par chauffage à 50°C, il nous a été possible d'observer la racémisation dans le cas de l'éthylimine du (+)-gossypol :

Après avoir chauffé 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 3 heures et 5 heures, l'éthylimine du (+)-gossypol dissoute dans un mélange de chloroforme et toluène (1 :1), un aliquot est ajouté à un grand excès (30-40 fois) de D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol. Au bout de

10 minutes, à température ambiante, le mélange réactionnel est séparé par HPLC. Dans ces conditions,

- L'éthylimine du (+)-gossypol a disparu complètement, on peut observer la formation d'un produit intermédiaire qui se transforme lentement à température ambiante dans le diastéréoisomère attendu (base de Schiff de D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol)
- Par contre, la transformation du produit intermédiaire, après 48 heures, est suffisante pour conclure que le chauffage à 50°C pendant 3 heures de la base de Schiff de l'éthylimine du (+)-gossypol a conduit à une racémisation presque complète.

Il était nécessaire de vérifier la stabilité des bases de Schiff du gossypol dans un milieu d'incubation cellulaire, celui qui sera utilisé pour mesurer la toxicité des dérivés sur cellules KB. L'éthylimine du (+)-gossypol a été incubée dans le milieu de culture, puis des échantillons ont été prélevés après 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures, 6 heures, 7 heures et demi, 24 heures et la mesure indirecte de la racémisation a été effectuée avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol.

- Il n'y a pas de racémisation pendant l'incubation dans le milieu de culture
- Après 24 heures d'incubation, l'éthylimine du (+)-gossypol ne s'est pas hydrolysée (*voir la partie expérimentale*)

1.3/ Bases de Schiff de la gossypolone

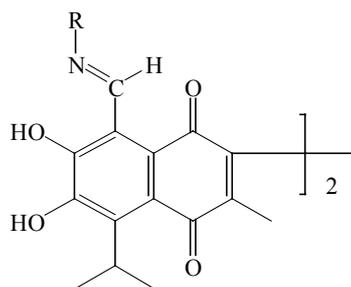
a/ Oxydation du gossypol

Nous avons utilisé la méthode de Haas (oxydation par chlorure ferrique) (*Hass RH & Shirley DA, 1965*). Nous avons amélioré le rendement (85%)

b/ Synthèse des bases de Schiff de la gossypolone

La gossypolone étant le principal catabolite du gossypol formé in vivo (*Abou-Donia MB & Drekert JW, 1975, Blackstaffe L et al., 1997*), nous avons pensé que l'activité des bases de Schiff du gossypol devait être comparée à celle des bases de Schiff de la gossypolone susceptibles se former in situ.

La synthèse des bases de Schiff de la gossypolone se déroule dans des conditions comparables à celles de la synthèse des bases de Schiff du gossypol. Il faut noter cependant, que la réaction de la méthylamine sur la gossypolone conduit à la méthylimine, produit soluble et facilement caractérisé par RMN tandis que le gossypol réagit bien avec la méthylamine mais que le produit reste insoluble dans la plupart des solvants. Les résultats sont illustrés dans tableau 2



Bases de Schiff de la Gossypolone

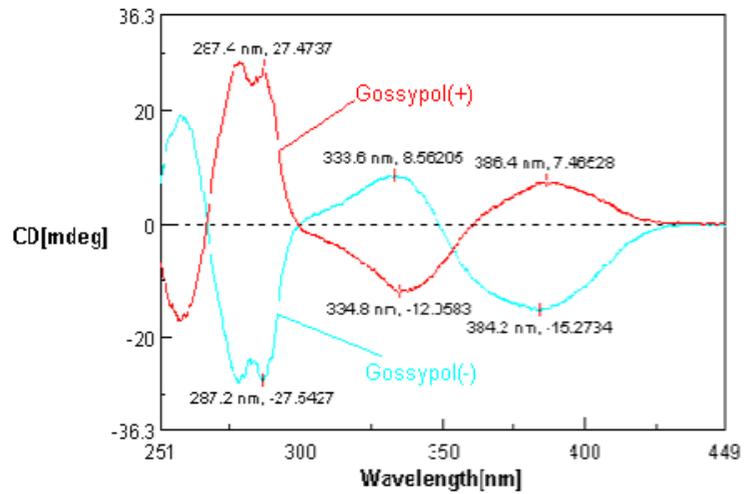
Tableau 2

R	Bases de Schiff de la Gossypolone	
	Composé	Rendement (%)
CH ₃	23	64
CH ₂ CH ₃	24	82
n-C ₃ H ₇	25	71
n-C ₄ H ₉	26	67
C(CH ₃) ₃	27	83
n-C ₅ H ₁₁	28	70
n-C ₆ H ₁₃	29	67
n-C ₇ H ₁₅	30	69
CH ₂ -CH(CH ₃)C ₆ H ₅	31	76
CH(CH ₂ OH)CH ₂ C ₆ H ₅	32	63
CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	33	73

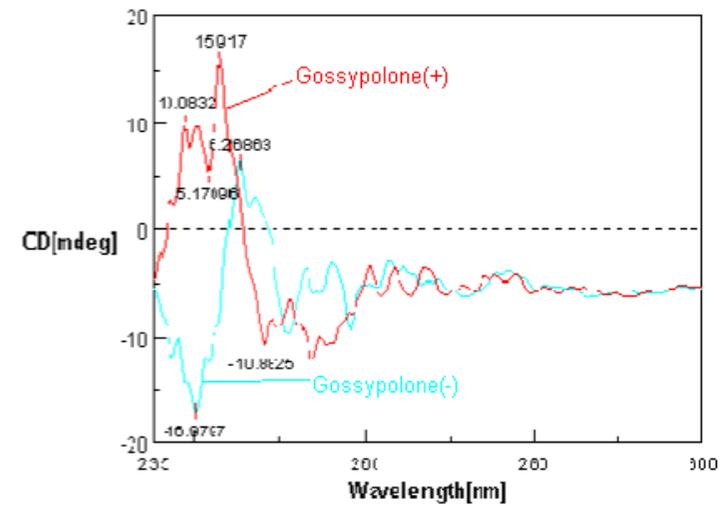
Nous avons voulu ensuite examiner si les deux énantiomères de la gossypolone peuvent exister comme c'est le cas pour le gossypol.

On peut, en effet, trouver dans la littérature quelques exemples d'étude des prétendus énantiomères de la gossypolone. Ainsi, Liang et al., en 1995, ont décrit la toxicité de ces deux énantiomères sur des cellules cancéreuses, sans préciser les caractéristiques physicochimique (Liang X5 et al., 1995). Plus récemment, Lee et al. ont fait l'hypothèse de l'existence de deux énantiomères pour la gossypolone (Lee KJ & Dabrowski K, 2002).

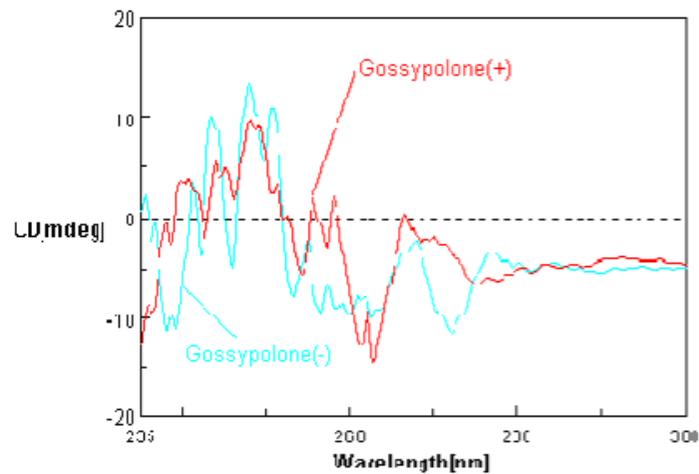
Dans ce but, nous avons essayé de synthétiser les deux énantiomères de la gossypolone à partir des énantiomères du gossypol par la méthode classique de Hass (à 60°C), et aussi à température ambiante. Nous avons mesuré le dichroïsme circulaire de ces produits isolés rapidement du mélange réactionnel. Le produit est très pur en HPLC, mais le dichroïsme circulaire a montré que les énantiomères de la gossypolone obtenus ne sont pas stables. Ils se racémisent très facilement dans des conditions réactionnelles (75°C). Les énantiomères obtenus à température ambiante se racémisent moins vite mais ils se racémisent rapidement quand on les chauffe à 60°C pendant une heure. Ces résultats sont illustrés dans les figures suivantes :



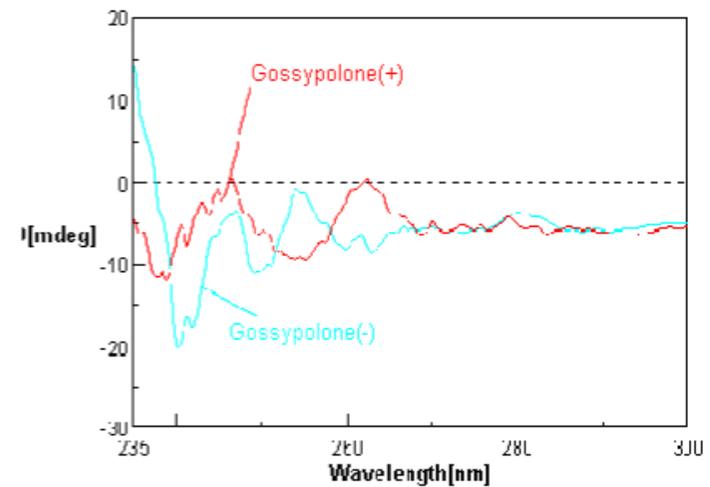
Gossypol (+) et Gossypol(-)



Gossypolone (+) et Gossypolone (-), synthèse à température ambiante (TA)



Gossypolone (+) et Gossypolone(-), synthèse à 75°C

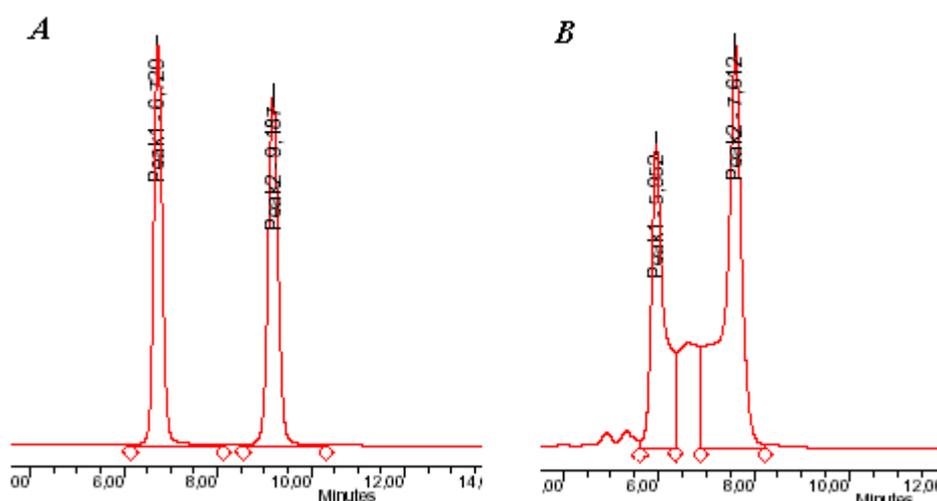


Gossypolone (+) et Gossypolone (-) synthèse à TA puis chauffage à 60°C

C/ Synthèse et Etude de la stabilité des bases de Schiff des énantiomères de la gossypolone

Comme nous n'avons pas pu obtenir séparément les deux énantiomères de la gossypolone directement par oxydation des énantiomères du gossypol, nous avons tenté de séparer les deux énantiomères de la gossypolone en passant par la séparation intermédiaire des bases de Schiff chirales de la gossypolone racémique.

En couplant la même amine chirale, la D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol, avec la gossypolone racémique. Nous avons obtenu, comme dans le cas du gossypol, un mélange de deux produits séparables par HPLC.



**HPLC de l'Imine du gossypol avec D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol _ A
et de l'Imine de la gossypolone avec D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol _ B**

[Colonne Alltima C8 5U(250mm x 4.6mm)

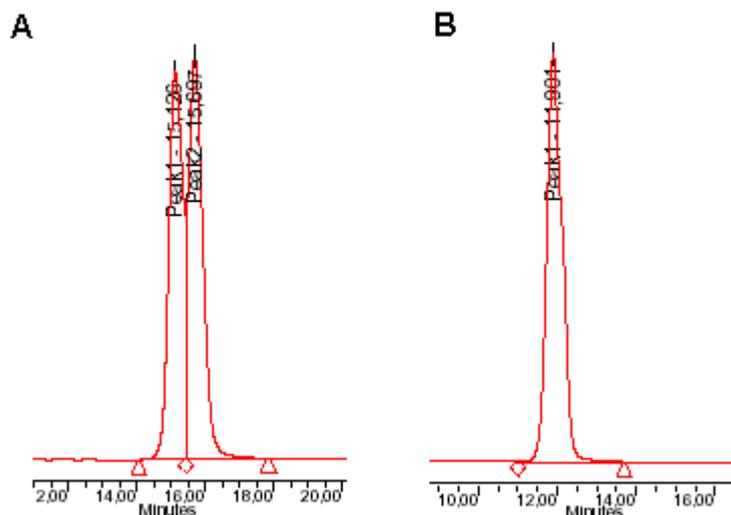
Débit : 1ml/mn; solvant : A/B = 20/80 - A : 95% H₂O + 5%CH₃CN + 0.1%TFA;

B : 100% CH₃CN + 0.1%TFA]

Après les avoir séparés par HPLC, nous avons remarqué que les deux produits de la gossypolone peuvent se transformer facilement l'un dans l'autre.

L'amine chirale utilisée pour cette étude étant un aminoalcool, le groupement alcool pouvait intervenir au cours de la déshydratation nécessaire pour former la bases de Schiff. Pour éliminer ce facteur, nous avons essayé une autre amine chirale

Nous avons choisi une amine chirale aliphatique et sans fonction supplémentaire, le S(+)-2-aminobutane. Nous avons fait réagir le S(+)-2aminobutane sur le gossypol et la gossypolone racémiques, nous avons obtenu un mélange de deux diastéréoisomères pour chacun. Par HPLC, dans le cas de gossypol, les deux diastéréoisomères se séparent un peu, mais ceux de la gossypolone ne séparent pas.



**HPLC de l'Imine du gossypol avec *S(+)*-2-Amino-Butane _ A
et de l'Imine de la gossypolone avec *S(+)*-2-Amino-Butane _ B**

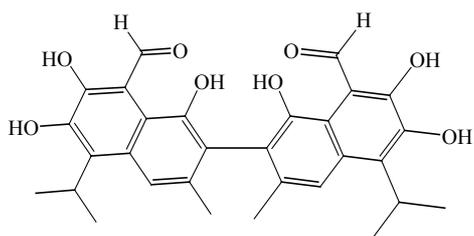
[Colonne Alltima C8 5U(250mm x 4.6mm)]

Débit : 1ml/mn; solvant : A/B = 20/80 - A : 95% H₂O + 5%CH₃CN + 0.1%TFA;

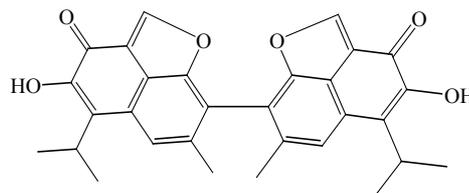
B : 100% CH₃CN + 0.1%TFA]

Ces résultats de l'HPLC nous ont suggéré que :

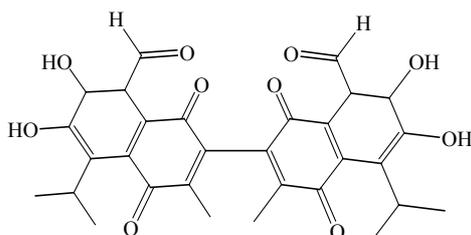
- Les deux énantiomères de la gossypolone ne se comportent pas comme ceux du gossypol, et qu'ils se racémisent à température ambiante.
- En effet, une étude de Jarosewski et ses collègues, en 1992 a montré que les énantiomères de l'anhydrogossypol se racémisent plus rapidement que ceux du gossypol à température élevée (à 190°C, il faut 2h pour racémiser le gossypol, et 30min pour l'anhydrogossypol). Selon eux, les deux noyaux naphthalènes symétriques peuvent tourner autour de la liaison C-C entre les deux noyaux naphthalénique, mais ce mouvement est bloqué par quatre groupes substituants *ortho* (deux groupes méthyle et deux groupes phénoliques), ce qui conduit à la formation de deux énantiomères, atropoisomères du gossypol. Dans le cas de l'anhydrogossypol, les atomes d'oxygène en 1 et 1' sont attirés vers les carbones 8, 8' pour former des cycles furanniques très tendus, en conséquence, les deux noyaux naphthaléniques peuvent alors tourner plus facilement, ce qui conduit à une racémisation plus facile (Jaroszewski JW et al.,1992).



Gossypol



Anhydrogossypol



Gossypolone

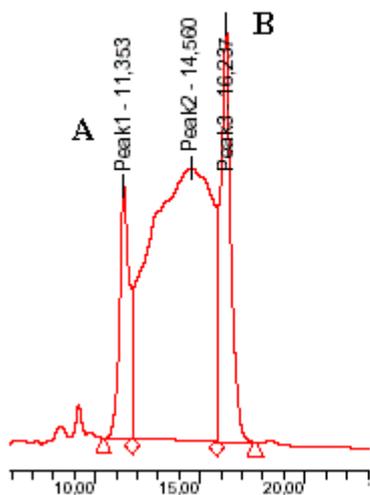
Nous pouvons alors supposer que les deux énantiomères de la gossypolone, où il n'y a plus de groupements OH en position 1,1', peuvent tourner facilement comme dans le cas de l'anhydrogossypol. Comme la vitesse de rotation dépend de la température, nous pouvons espérer séparer (ou au moins observer) ces deux énantiomères en refroidissant la solution.

En fait, en calculant le nombre de plateaux théoriques dans la tentative de séparation HPLC pour les bases de Schiff de la gossypolone, nous nous sommes aperçus qu'il est anormalement faible et que l'élargissement des pics indiquait probablement un début de séparation.

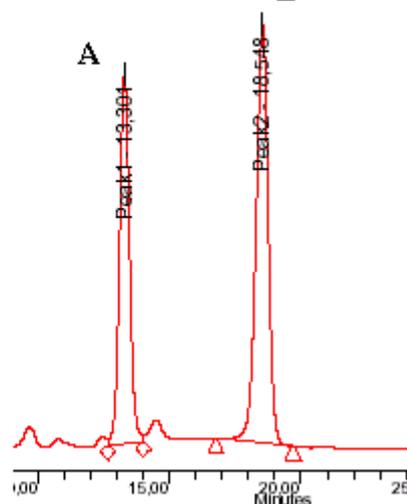
Nous avons donc réalisé l'HPLC des bases de Schiff de la gossypolone en plongeant la colonne, munie d'une boucle de refroidissement, dans un bain de glace. Dans ces conditions, les imines de la gossypolone avec le S(+)-2-Amino-Butane et le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol sont effectivement séparées.

Par HPLC, nous avons constaté que le (+)-gossypol avait un temps de rétention moins long que celui du (-)-gossypol et nous supposons que cette règle s'applique aussi pour les énantiomères de la gossypolone, mais ce dernier point reste à vérifier. Les chromatogrammes de l'imine de la gossypolone avec le S(+)-2-Amino-Butane et le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol sont reportés ci-dessous :

température ambiante



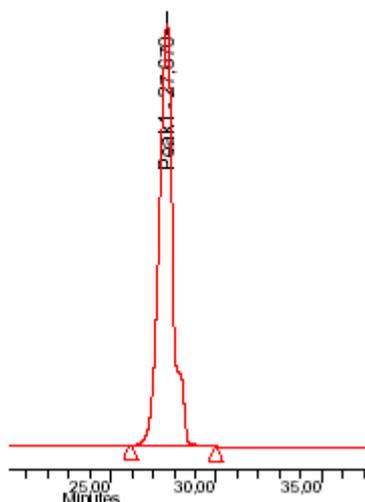
0°C



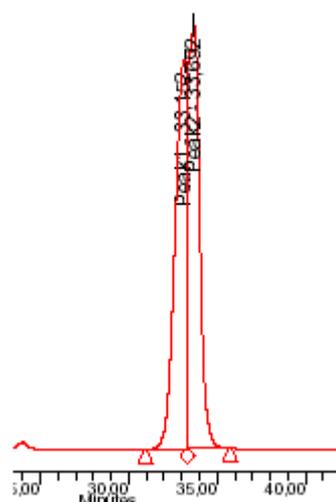
A : imine de la (+)-gossypolone avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol
B : imine de la (-)-gossypolone avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol

HPLC de l'Imine de la gossypolone avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol à TA et à 0°C

température ambiante



0°C



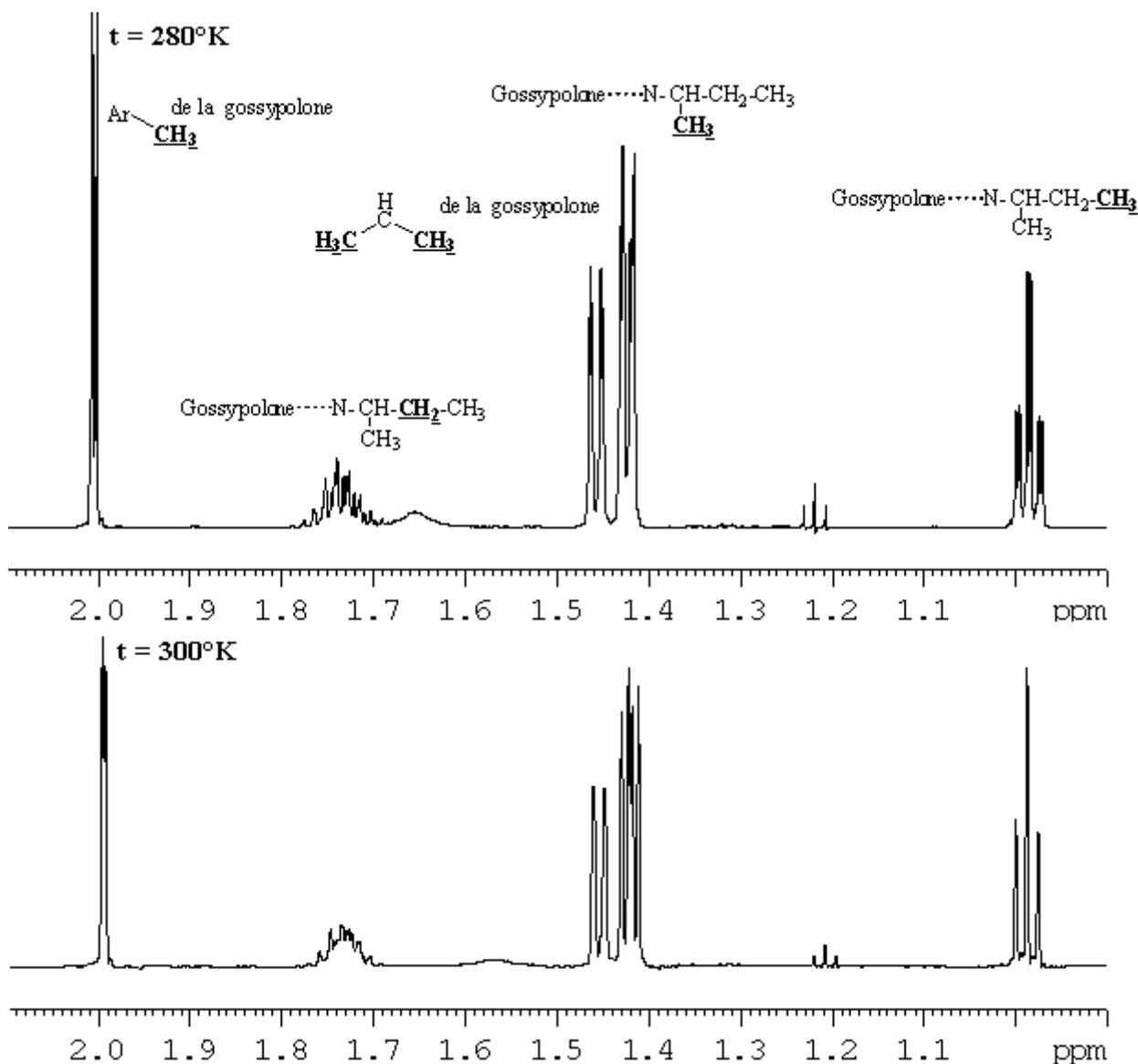
HPLC de l'Imine de la gossypolone avec S(+)-2-Amino-Butane à TA et à 0°C

[Colonne Alltima C8 5U(250mm x 4.6mm)

Débit : 1ml/mn; solvant : A/B = 30/70 - A : 95% H₂O + 5%CH₃CN + 0.1% TFA;

B : 100% CH₃CN + 0.1% TFA]

Ces résultats qualitatifs ont été ensuite vérifiés par la RMN. Nous avons réalisé cette étude en collaboration avec Madame Marie-Thérèse MARTIN à l'ICSN sur un appareil RMN de 600MHz à deux température 280°K et 300°K, nous avons choisi pour cette étude l'imine résultant du couplage du S(+)-2-Amino-Butane à la gossypolone racémique.



A 300°K , on ne peut pas observer le dédoublement de deux diastéréoisomères de bases de Schiff de la gossypolone. Par contre, à 280°K , les deux diastéréoisomères se dédoublent très nettement. Cette étude RMN permet de conclure que les deux diastéréoisomères de la gossypolone se forment bien et peuvent être observés à base température.

En ce qui concerne la gossypolone, et contrairement à ce qui a été publié précédemment, l'existence de deux énantiomères est peu probable à température ambiante. A cette température, la racémisation est rapide.

Conclusion

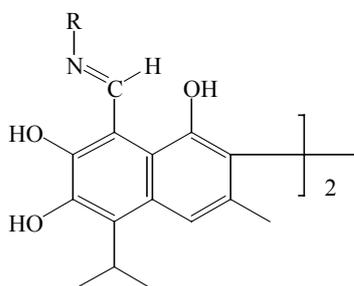
- Nous avons synthétisé de nouveaux dérivés du gossypol :
 - alcool gossylique, dérivé du gossypol

- 14 nouvelles bases de Schiff du gossypol,
 - 4 bases de Schiff des énantiomères du gossypol
 - 11 nouvelles bases de Schiff de la gossypolone.
- Les énantiomères du gossypol et leurs bases de Schiff sont stables à température ambiante et dans les conditions d'incubation d'un milieu de culture, mais les bases de Schiff des énantiomères du gossypol se racémisent notablement à partir de 3 heures à 50°C.
 - Les énantiomères de la gossypolone et les bases de Schiff des énantiomères de la gossypolone ne sont pas stables à température ambiante, la vitesse de la racémisation diminue avec la température. Il est possible de les observer vers 0°C.

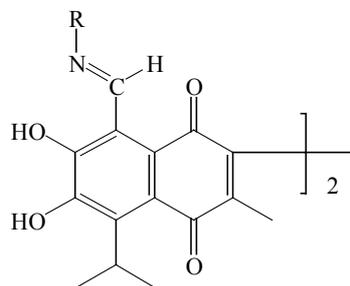
2. BIOLOGIE

2.1/ Etude de cytotoxicité sur une lignée de cellules KB

Les toxicités des bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone sur les cellules KB sont données dans le tableau suivant (*tableau 3*):



Bases de Schiff du Gossypol



Bases de Schiff de la Gossypolone

Tableau 3

<i>R</i>	B.S du Gossypol		B.S de la Gossypolone	
	Composé	IC ₅₀ (μM)	Composé	IC ₅₀ (μM)
CH ₃	6*	10.4	23	0.8
CH ₂ CH ₃	7	5.6	24	1.2
n-C ₃ H ₇	8	6.5	25	5.0
CH(CH ₃) ₂	9	6.6	-	ND
n-C ₄ H ₉	10	12.4	26	12
CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	11	6.7	-	ND
C(CH ₃) ₃	12	13.5	27	>20
n-C ₅ H ₁₁	13	>20	28	>20
n-C ₆ H ₁₃	14	>20	29	>20
n-C ₇ H ₁₅	15	>20	30	>20
n-C ₁₂ H ₂₅	16	>20	-	ND
CH ₂ -CH(CH ₃)C ₆ H ₅	17	>20	31	>20
CH(COOCH ₃)CH ₂ C ₆ H ₅	18	>20	-	ND

* : produit peu soluble, résultat incertain

ND : non déterminé ; (-) : pas synthétisé

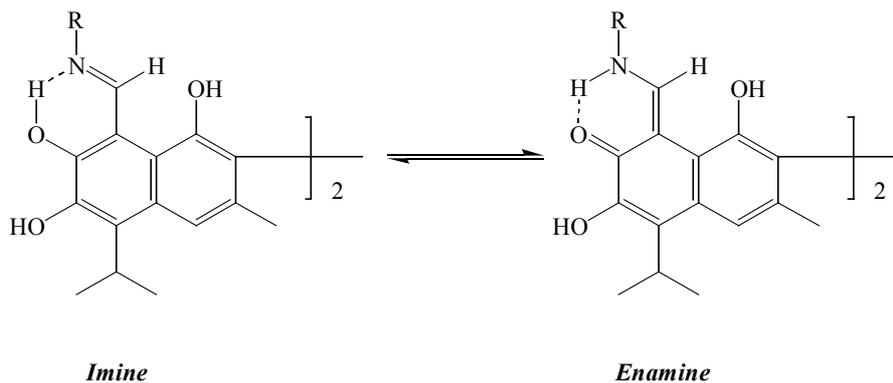
Dans la série des bases de Schiff du gossypol, nous avons observé que l'éthylimine du gossypol (IC₅₀=5.6μM) **7** est la plus toxique parmi les bases de Schiff du gossypol synthétisées, ensuite c'est la propylimine **8**, l'isopropylimine **9** et la sec-butyylimine **11** du gossypol (IC₅₀= 6.5 ; 6.6 ; 6.7μM, respectivement). Nous avons constaté que la toxicité de ces dérivés dépend étroitement de la structure de l'amine substituant le gossypol. La butylimine **10** et la tert-butyylimine du gossypol **12** ont une très légère toxicité et, à partir du radical pentyle, l'imine n'est pratiquement plus toxique.

Nos résultats confirment les observations de Liang et al. et ils indiquent que cette toxicité décroît assez rapidement avec la longueur ou l'encombrement stérique de la chaîne substituant l'atome d'azote de l'imine.

Il faut remarquer que certaines bases de Schiff, l'éthylimine **7**, la propylimine **8**, l'isopropylimine **9** et la sec-butyylimine du gossypol **11**, ont à peu près la même toxicité que celle du gossypol bien que la fonction aldéhyde ne soit plus libre.

Discussion

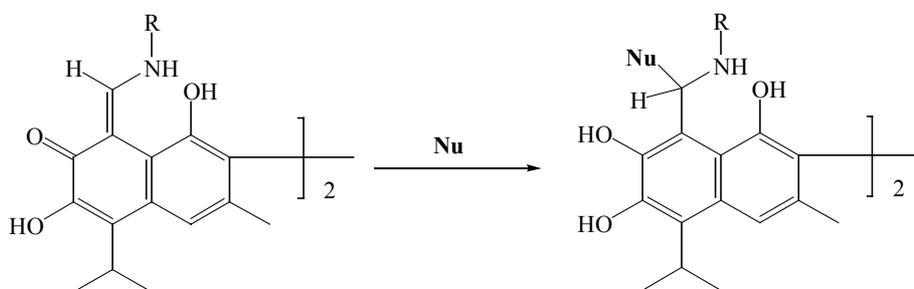
- La toxicité des bases de Schiff du gossypol doit être comparée, en premier lieu, à celle du gossypol lui-même. Tandis que le gossypol peut réagir avec des nucléophiles directement par sa fonction aldéhyde, les bases de Schiff du gossypol peuvent additionner aussi des nucléophiles quand elles se trouvent sous la forme énaminocétone.



La position de cet équilibre, en faveur de la forme énamine est facilement observable en RMN.

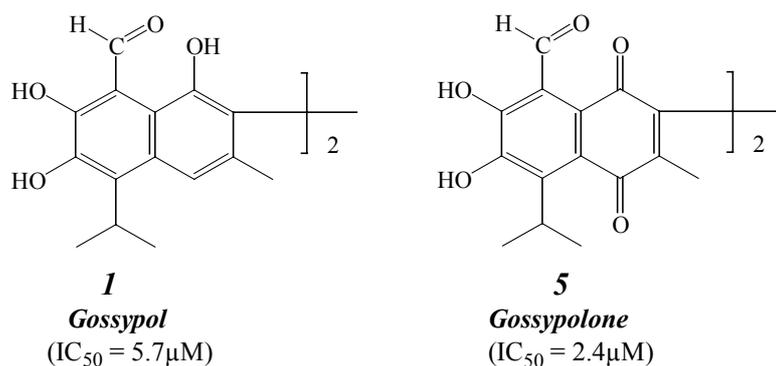
Dans le chloroforme deutérié prédomine la forme énamine pour les substances comme l'éthylimine **7**, la butylimine **10**, la tert-butylimine **12**, la β -methylphenthylimine **17** et l'ester méthylique de phenyalanilimine du gossypol **18**.

Ces formes énamines des bases de Schiff du gossypol (quinone-méthides ou énamino cétones) peuvent être considérées comme des *agents alkylants potentiels* mais le milieu des cultures cellulaires utilisé pour les études de toxicité est très différent d'un solvant aprotique tel que le chloroforme. Il est donc difficile de prévoir l'influence de la solvataion sur la position de l'équilibre imine - énamine.



Enamine = Quinone-méthide

- La toxicité de la gossypolone ($IC_{50} = 2.4\mu M$) est deux fois plus grande que celle du gossypol ($IC_{50} = 5.7\mu M$), et si nous comparons les toxicités des bases de Schiff du gossypol aux bases de Schiff de la gossypolone, nous remarquons généralement une augmentation de la toxicité pour les dérivés de la gossypolone.



Pour expliquer la toxicité du gossypol et de ses dérivés, certains auteurs ont aussi invoqué, outre le pouvoir alkylant, la possibilité de former des radicaux libres dans le milieu biologique (*Abou-Donia MB & Drekert JW, 1975; Blackstaffe L et al., 1997*)

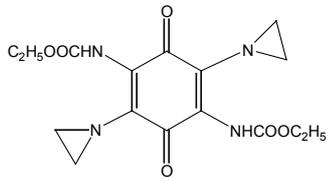
Cette idée suggère que le gossypol doit aussi sa toxicité aux possibilités d'oxydation du milieu biologique. La gossypolone est, en effet un dérivé d'oxydation du gossypol.

Les bases de Schiff du gossypol pourraient aussi être oxydées dans le milieu cellulaire pour donner des dérivés de la gossypolone. Cette hypothèse est raisonnable dans la mesure où la gossypolone s'obtient au laboratoire à partir de l'oxydation du gossypol par le Fe(III). Dans cette réaction, l'aldéhyde n'est pas oxydé et le naphthol est transformé en quinone.

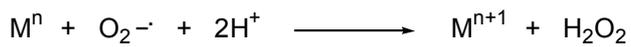
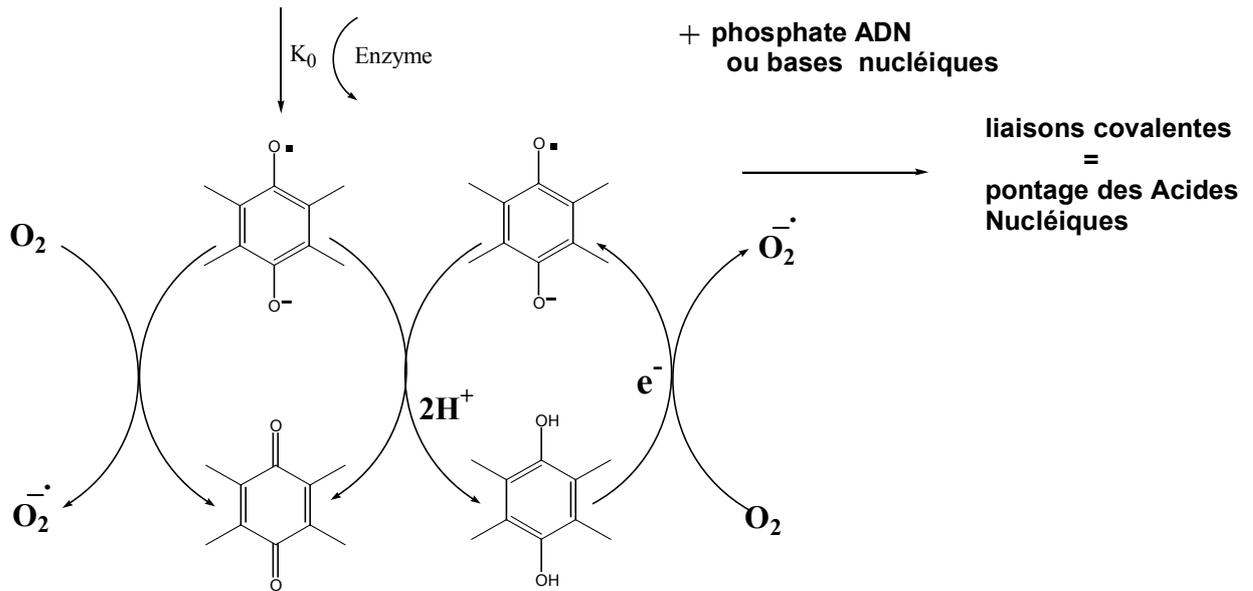
Dans le milieu biologique, les cytochromes utilisent aussi les changements de valence des atomes de fer de l'hème pour l'oxydation.

Cet accroissement de la toxicité entre les dérivés du gossypol et ceux de la gossypolone peut s'expliquer par le fait que ces dérivés de la gossypolone possèdent à la fois les propriétés alkylantes potentielles du gossypol mais en plus, la structure quinonique, bien connue pour son aptitude à générer des radicaux libres.

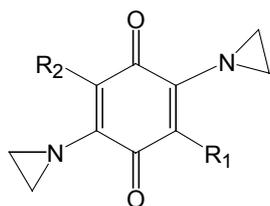
Et dans ces conditions, la toxicité des dérivés de la gossypolone peut être rapprochée de celle des agents alkylants bioréductibles qui forment une classe de substances très étudiées et dont certaines d'entre elles sont actuellement utilisées comme médicaments antitumoraux.



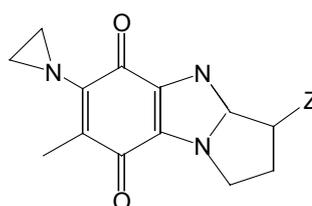
AZQ (Diazoquinone)



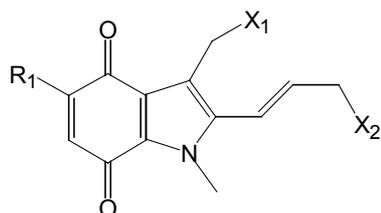
Voici, quelques exemples d'agents alkylants quinoniques parmi les plus connus



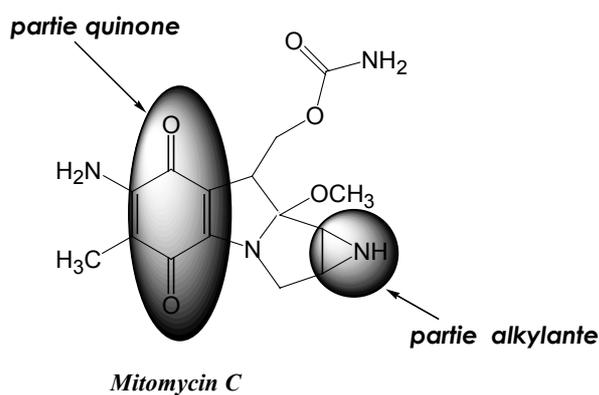
Diaziridinylquinone



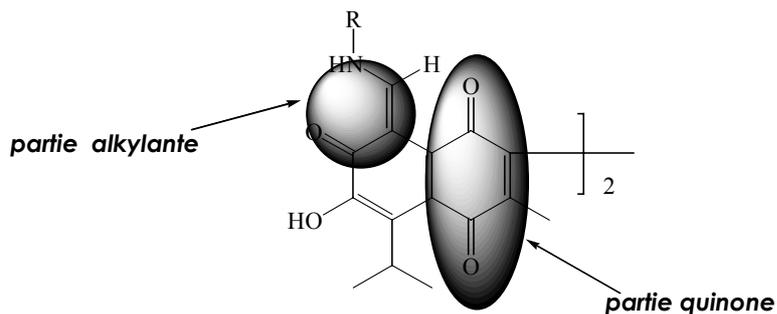
Pyrrolo (1,2) alpha benzimidazolequinone



Indoloquinone EO

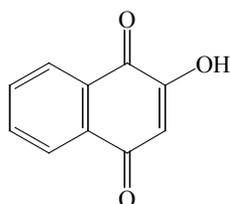


Mitomycin C

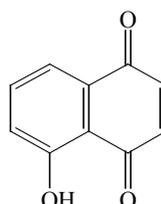


Bases de Schiff de la gossypolone

- A titre de comparaison, nous avons examiné dans quelle mesure la structure bis-naphtoquinone de la gossypolone et de ses dérivés était responsable de la toxicité sur KB en mesurant la toxicité, dans les mêmes conditions de la 2-hydroxy et de la 5-hydroxy du 1,4-naphtoquinone (tableau 4).



2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone



5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone

Tableau 4

Produit	IC ₅₀ (µM)
Gossypol	5.7
Gossypolone	2.4
2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (<i>lawsone</i> ou <i>hydrolapachol</i>)	100
5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (<i>juglone</i>)	(0.5-0.8)

La juglone se révèle particulièrement plus toxique que la gossypolone ou la lawsone. Ces molécules sont toutes des naphthoquinones mais on peut imaginer que leur toxicité dépend en grande partie de leur plus ou moins rapide élimination par la cellule par des mécanismes d'oxydation, de conjugaison ou de reconnaissance assez complexes. Ce dernier point nous a incités à évaluer le métabolisme oxydatif de la cellule qui pouvait jouer un rôle important dans la toxicité que nous avons observée sur KB.

a/ Influence du métabolisme oxydatif de la cellule

Les bases de Schiff de la gossypolone, pourraient, bien que nous n'ayons pas cherché à les mettre en évidence, se former dans le milieu biologique par oxydation des bases de Schiff du gossypol.

Certaines tumeurs possèdent des taux très faibles de catalase et de superoxyde dismutase (*Fardella G et al., 1999*). Nous nous sommes demandés si la sensibilité particulière des cellules KB aux dérivés de la gossypolone ne provenait pas d'une déficience en enzymes destructrices des radicaux libres. Si tel était le cas, la co-incubation avec le gossypol de pièges à radicaux libres devait diminuer sa toxicité.

Cette dernière hypothèse nous a conduits à examiner l'influence, sur la toxicité du gossypol et de la gossypolone, de divers oxydants et pièges à radicaux libres.

Pour réaliser ces expériences, il fut nécessaire d'éliminer les substances qui, dans le milieu de culture, peuvent se lier au gossypol ou le protéger de l'oxydation, il s'agit principalement du sérum ajouté au milieu nutritif (*Royer RE & Vander Jagt DL, 1983*).

Nous avons donc mesuré la toxicité du gossypol et de la gossypolone dans des cultures de cellules KB, contenant ou non 10% de sérum fœtal de veau (*tableau 5*):

Tableau 5

	IC₅₀ (μM)	
	<i>Milieu de culture cellulaire avec 10% FCS</i>	<i>Milieu de culture cellulaire sans FCS</i>
Gossypol	5.7	<0.5
Gossypolone	1.2	<0.5

L'absence de sérum se traduit essentiellement par une diminution de la croissance cellulaire et par une plus grande toxicité mesurable du gossypol et de la gossypolone. (5 à 10 fois). De plus, la cytotoxicité du gossypol est plus affectée par la présence du sérum que celle de la gossypolone.

Par la suite, nous avons examiné le rôle des pièges de radicaux libres sur la toxicité du gossypol et de la gossypolone. Nous avons ajouté dans des cultures de cellules KB la catalase, le mannitol et le glutathion comme pièges de radicaux libres à des concentrations non toxiques pour les cellules en même temps que le gossypol ou la gossypolone. Après 48 heures d'incubation, nous avons constaté que la toxicité du gossypol ou de la gossypolone a diminué de 50% en présence de la catalase et du mannitol, tandis que le glutathion n'a aucun effet (*tableau 6*).

Tableau 6

Traitement	Cellules mortes après 48h d'incubation (%)
Gossypol 0.5μM	63
Gossypol 0.5μM + catalase (150μg/mL)	31
Gossypol 0.5μM + mannitol (25mM)	37
Gossypol 0.5μM + glutathion (5mM)	57
Gossypolone 0.5μM	49
Gossypolone 0.5μM + catalase (150μg/mL)	27
Gossypolone 0.5μM + mannitol (25mM)	20
Gossypolone 0.5μM + glutathion (5mM)	72

Ces expériences, bien que préliminaires, montrent que la toxicité du gossypol fait bien intervenir le métabolisme oxydatif de la cellule KB. Au delà de cette constatation, nous nous sommes demandés si la déficience de certaines cellules tumorales en catalase ou superoxyde dismutase, ne pouvait pas être mise à profit pour découvrir de nouveaux produits anticancéreux et ce sujet sera abordé dans le chapitre suivant.

b/ Etude de la cytotoxicité des énantiomères du gossypol et de ses bases de Schiff

Différents groupes ont montré que les deux énantiomères du gossypol ne possèdent pas la même activité biologique :

- En 1986, Joseph et ses collègues ont étudié la toxicité des deux énantiomères du gossypol sur différents types de cellules : hépatome, adénocarcinome pancréatique, carcinome ovarien, BCL-D1, fibroblastes humains de la peau, lymphomes de cellules B, lymphomes de cellules T. Ils ont trouvé que la concentration du (-)-gossypol nécessaire pour exprimer une cytotoxicité est 10% celle du (+)-gossypol donnant le même effet (*Joseph EAE et al., 1986*).
- Shelley et al. ont mesuré la cytotoxicité de deux énantiomères du gossypol sur six lignées de cellules tumorales : poumon (H69), cervix (Sihas), mélanome (SK-mel-19), mélanome (SK-mel-28), leucémie (K562) et tumeur mammaire (Walker). Ils ont constaté que le (-)-gossypol est plus toxique que le (+)-gossypol sur ces lignées, et la lignée de cellules mammaires (Walker) est la plus sensible au (-)-gossypol, la moins sensible étant la Cervix (Sihas) (*Shelley MD et al., 1999*).

Nous nous sommes demandés quelle pouvaient être les toxicités respectives des bases de Schiff du (+) et du (-) gossypol.

Nous avons choisi la base de Schiff du gossypol racémique la plus toxique : l'éthylimine du gossypol.

La même étude n'a pas pu être poursuivie sur les bases de Schiff de la gossypolone car nous avons montré qu'elles se racémisent dès la température ambiante.

Nous avons mesuré la toxicité de ces produits sur les cellules cancéreuses de la lignée KB et sur la lignée MCF-7. Les résultats sont les suivants (*tableau 7*):

Tableau 7

Produit	IC ₅₀ (µM)	
	<i>lignée KB</i>	<i>lignée MCF-7</i>
Gossypol racémique	6.5	7
(+)-Gossypol	25	26
(-)-Gossypol	4	4
Ethylimine du Gossypol racémique	4.5	9
Ethylimine du (+)-Gossypol	6.5	30
Ethylimine du (-)-Gossypol	1.2	6

- Pour le gossypol et l'éthylimine du gossypol, l'énantiomère (-) est plus toxique que l'énantiomère (+) sur les deux lignées étudiées, le produit racémique présentant, évidemment, une toxicité intermédiaire.
- Les résultats sont comparables sur les deux lignées mais il n'est pas certain que l'éthylimine du (-)-gossypol soit le dérivé base de Schiff le plus toxique dans la série que nous avons synthétisée.
- L'éthylimine du (-)-gossypol est plus toxique que la gossypolone racémique sur KB

Ces toxicités différenciées en fonction de l'atropoisomérisation des dérivés du gossypol encouragent donc la recherche d'un *site récepteur chiral* sur une protéine ou sur un acide nucléique.

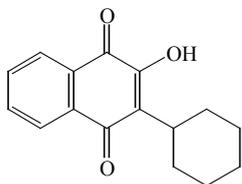
2.2/ Activité antipaludique des Bases de Schiff du Gossypol et de la Gossypolone

Le gossypol est un antiseptique dont les propriétés antiparasitaires sont bien connues. Comme certains dérivés du gossypol (nitrile gossylique 1,1'-diacyls) ont déjà été étudiés pour leurs activités antipaludiques (voir partie générale biologie), il nous a paru valable d'examiner d'éventuelles activités antipaludiques pour les bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone.

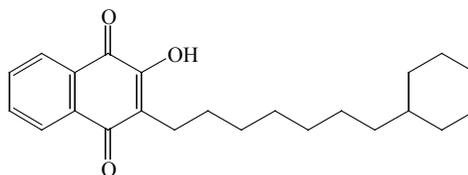
Cette approche a été stimulée par le fait que la gossypolone peut être considérée comme une bis-naphtoquinone particulière et que les naphtoquinones représentent une classe de produits antiparasitaires actifs contre *Leishmania*, *Trypanosoma* et *Plasmodium* (revues : *Phillipson JD & Wright CW, 1991 ; Sepuvela-Boza S & Cassels BK, 1996 ; Fournet A et al., 1992 ; Akendengue B et al., 1999*).

Plus précisément, l'hydrolapachol (2-hydroxy-1,4-naphtoquinone) s'est révélé actif contre *Plasmodium falciparum* (*Hooker SC et al., 1936 ; Hudson AT, 1984*) et cette observation est à l'origine de la synthèse de centaines de 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphtoquinones. L'une d'elles, la lapinone, fut utilisée en 1951 pour soigner des patients infectés par *P. vivax*. Puis, des produits moins toxiques tels la menoctone, furent synthétisés dans les années 60. De 1970 à 1980, les laboratoires *Wellcome, UK* se lancèrent dans la synthèse des hydroxynaphtoquinones (HNQs). Certains de ces produits sont toxiques pour *Eimeria*, *Toxoplasma* et *Plasmodium* (*Hudson AT et al., 1985*). Ces travaux ont mené à la parvaquone et à la buparvaquone pour le traitement de la theileriose des bovins et à l'atovaquone pour le traitement de la malaria (en association avec le proguanil) et le traitement de la pneumonie due à *Pneumocystis carinii* (*Hudson AT 1993*). La plumbagine et ses dérivés sont actifs contre *Leishmania* spp. (*Fournet A et al, 1992*)

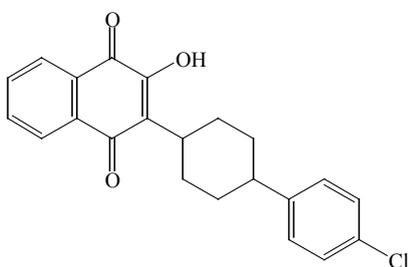
Plus récemment, une naphtoquinone dimère, la diospyrine, a été isolée de *Diospyros montana*, (*Ebenacée*) et elle est active contre *L. donovani* (Ray S et al., 1998). Cette naphtoquinone est supposée inhiber sélectivement la DNA-topoisomérase I du parasite.



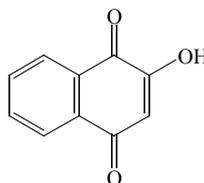
Parvaquone
(3-cyclohexyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)



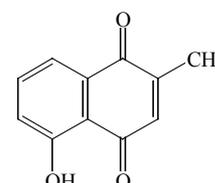
Menoactone
(2-(8-cyclohexyl)octyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)



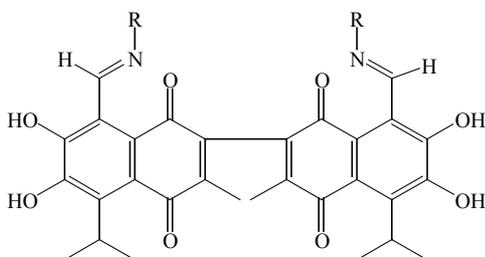
Atovaquone
2-[4-(4-Chloro-phenyl)-cyclohexyl]-3-hydroxy-[1,4]naphthoquinone



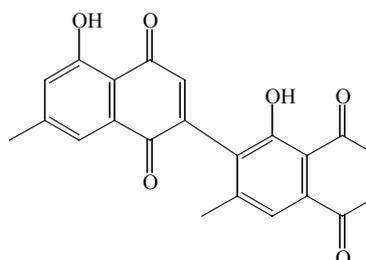
Hydrolapachol
(2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)



Plumbagine
(5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone)



Bases de Schiff de la gossypolone
(Bis-Hydroxynaphthoquinone)

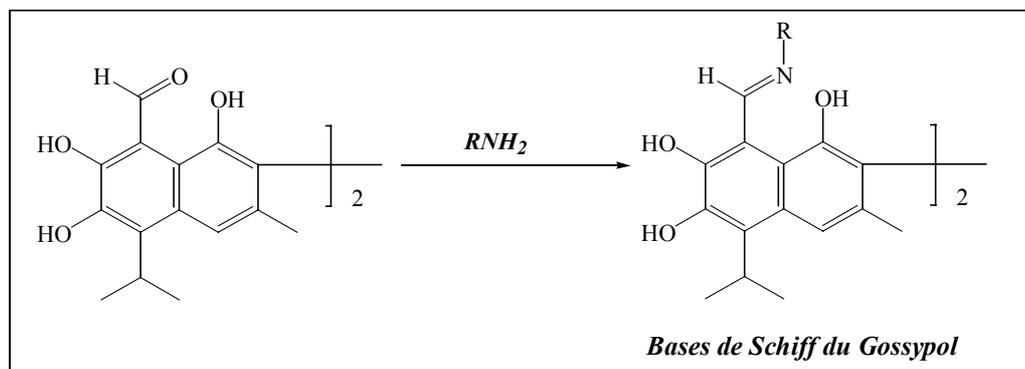


Diospyrin
5,1'-Dihydroxy-7,3'-dimethyl-[2,2']binaphthalenyl-1,4,5',8'-tetraone

Nous nous attendions donc à ce que les bases de Schiff que nous avons synthétisées à partir du gossypolone, qui sont des hydroxynaphthoquinones, aient des activités antiparasitaires, en particulier contre *Plasmodium falciparum*.

Les activités inhibitrices sur la croissance de *Plasmodium falciparum* ont été évaluées à l'Institut Pasteur de Lille par le Dr Daniel DIVE et son équipe. Ils ont utilisé la méthode décrite par Desjardins et al. qui consiste à incorporer de l'hypoxanthine tritiée dans des parasites cultivés dans des hématies, en présence des molécules dont on souhaite

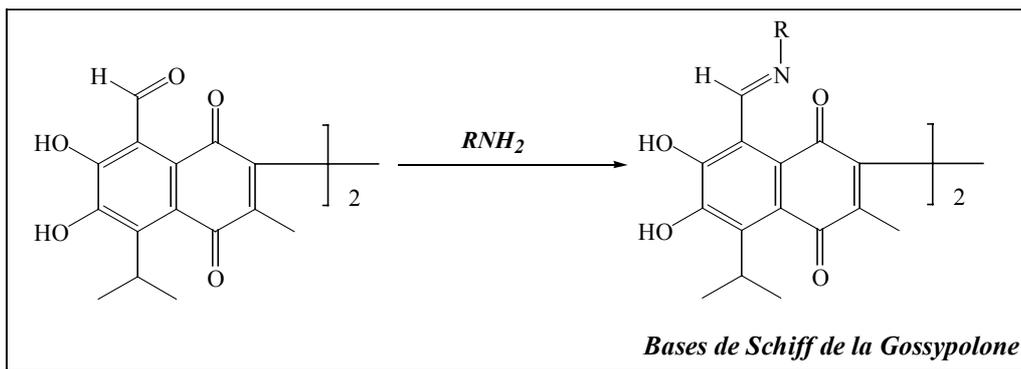
mesurer le pouvoir inhibiteur (Desjardins RE et al., 1979). Les résultats de leur étude sont regroupés dans les tableaux suivants (tableaux 8 & 9). Nous avons reporté dans ces mêmes tableaux, la toxicité sur KB et les valeurs IC_{50} sur Plasmodium Falciparum pour chaque dérivé.



Magnitude/QC	IC_{50} (μM)/PF (a)	IC_{50} (μM) /KB (b)	Structure de la molécule
			R
-3.1	31.6	5.7	Gossypol
-2.6	11.6	5.6	Ethyl
-2.6	10.4	6.5	Propyl
-2.8	21.0	6.6	iso-Propyl
-3.1	>50	12.4	n-Butyl
-3.2	>50	6.7	sec-Butyl
-3.2	45.8	13.5	tert-Butyl
-3.2	>50	>20	Pentyl
-3.3	>50	>20	Hexyl
-3.3	>50	>20	Heptyl
-2.5	10.4	>20	<i>β-mephenethyl</i>
-3.2	41.0	>20	Phényalaninémethyl ester
-3.2	>50	>20	Dodecyl

Tableau 8: Activités antipaludiques du gossypol et de quelques bases de Schiff du gossypol

(Magnitude = $\log(IC_{50} \text{ chloroquine}/IC_{50} \text{ produit})$ permet de prendre en compte les variations de sensibilité à la chloroquine d'une souche et de comparer les effets du produit sur une souche de référence sensible et une souche de référence résistante)



Magnitude/QC	IC ₅₀ (nM)/PF	IC ₅₀ (microM) /KB	Structure de la molécule
			R
-3.2	>50	2.4	Gossypolone
-3.1	36.6	0.8	Methyl
-3.3	>50	1.2	Ethyl
-3.1	34.0	5.0	Propyl
-3.1	36.7	12	Butyl
-3.1	>50	>20	tert-Butyl
-3.1	>50	>20	Pentyl
-3.1	>50	>20	Hexyl
-3.1	>50	>20	Heptyl
-3.1	35.3	>20	β-mephenethyl

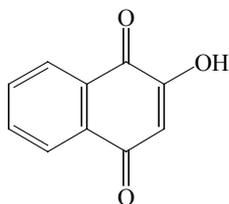
Tableau 9 : Activités antipaludiques de la gossypolone et de quelques bases de Schiff de la gossypolone

(Magnitude = $\log(\text{IC}_{50} \text{ chloroquine} / \text{IC}_{50} \text{ produit})$ permet de prendre en compte les variations de sensibilité à la chloroquine d'une souche et de comparer les effets du produit sur une souche de référence sensible et une souche de référence résistante)

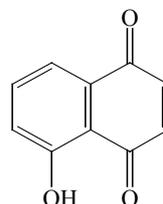
Les principales conclusions qui ont résulté de cette étude furent que les bases de Schiff de la gossypolone ont une activité antiparasitaire à des concentrations qui sont habituellement toxiques sur KB. Dans de telles conditions, les bases de Schiff de la gossypolone ne peuvent pas être considérés comme un nouveau modèle pour l'activité antipaludique. Leur activité antipaludique se manifeste à des concentrations trop toxiques pour la cellule hôte.

Les bases de Schiff de la gossypolone sont plus hydrophiles que celles du gossypol et sans doute mieux reconnues par le système de défense du parasite. Leur activité antipaludique serait accrue par des substituants hydrophobes les rapprochant des structures de la menoctone, de l'atovaquone et de la parvaquone.

D'autre part, nous avons vu plus haut à quel point la toxicité de deux isomères hydroxynaphtoquinone pouvait changer en fonction de la position du groupement hydroxyle dans la structure naphtoquinonique, les résultats des substitutions de la gossypolone sont donc difficilement prévisibles.



2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone
 $IC_{50} (KB) = 100\mu M$



5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone
 $IC_{50} (KB) = 0.5-0.8\mu M$

Si les résultats sur l'activité antipaludique des bases de Schiff de la gossypolone restent décevants, il n'en est pas de même pour les bases de Schiff du gossypol. En effet, nous avons remarqué que la β -mephenethylimine du gossypol a une activité antipaludique à une concentration beaucoup moins élevée que celle où s'exprime sa toxicité.

Ces résultats suggèrent que les bases de Schiff du gossypol ou de la gossypolone pourraient être utilisées comme modèle pour l'activité antipaludique après avoir modifié certaines parties de la molécule comme :

- les radicaux de l'amine
- les substituants sur le noyau naphthalénique

Enfin, cette étude mériterait sans doute d'être poursuivie en partant des énantiomères du gossypol qui risquent de conduire à des résultats assez différents. Par exemple, la faible toxicité de l'énantiomère (+)-gossypol serait un facteur très favorable si ses bases de Schiff sont plus toxiques pour le parasite.

Conclusion du chapitre III

Cette première partie de notre travail nous a permis

- de synthétiser de nouvelles molécules dérivées du gossypol .
- de confirmer la stabilité des énantiomères du gossypol et de leurs bases de Schiff. Les énantiomères de la gossypolone se racémisent à température ambiante, mais ils peuvent être observés à basse température.

et d'observer :

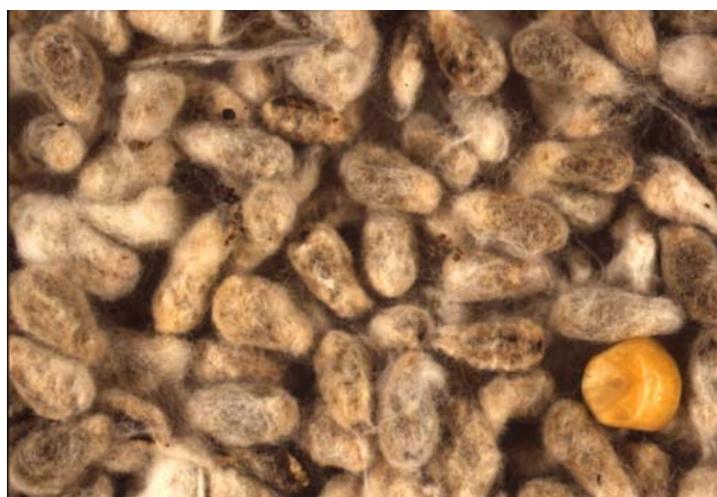
- que l'énantiomère (-)-gossypol est plus toxique que le (+)-gossypol, cette règle est valable aussi pour les bases de Schiff des énantiomères du gossypol.

- que les bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone sont toxiques sur une lignée KB
- que cette toxicité dépend de la structure de la molécule considérée et de ses possibilités d'oxydation dans le milieu biologique.

Pour expliquer la toxicité cellulaire, nous avons formulé les hypothèses suivantes :

- La toxicité du gossypol et des dérivés cités pourrait être attribuée au pouvoir alkylant de ces molécules
- La plus grande toxicité des dérivés de la gossypolone pourrait provenir de la présence du groupement quinone, agent bio-alkylant réductible potentiel.

La gossypolone serait donc le premier terme d'une classe nouvelle de bis-naphtoquinones, molécules peu étudiées bien que certaines d'entre elles soient déjà utilisées comme médicament. Ce dernier point sera développé dans le chapitre suivant. De plus, la facile racémisation à température ambiante des énantiomères de la gossypolone, témoin de leur flexibilité, nous ouvre une nouvelle voie pour une étude d'affinité entre ses dérivés avec les site actifs (enzymes ou ADN).



Les graines ou amandes

***Chapitre IV -
1,3-Dithiolane et 1,3-Dithiane du gossypol et
de la gossypolone – et thiodérivés des éthers
méthyliques du gossypol***

CHAPITRE IV

1,3-DITHIOLANE ET 1,3-DITHIANE DU GOSSYPOL ET DE LA GOSSYPOLONE – ET THIODÉRIVÉS DES ÉTHERS MÉTHYLIQUES DU GOSSYPOL

I. INTRODUCTION

1/ Objectifs

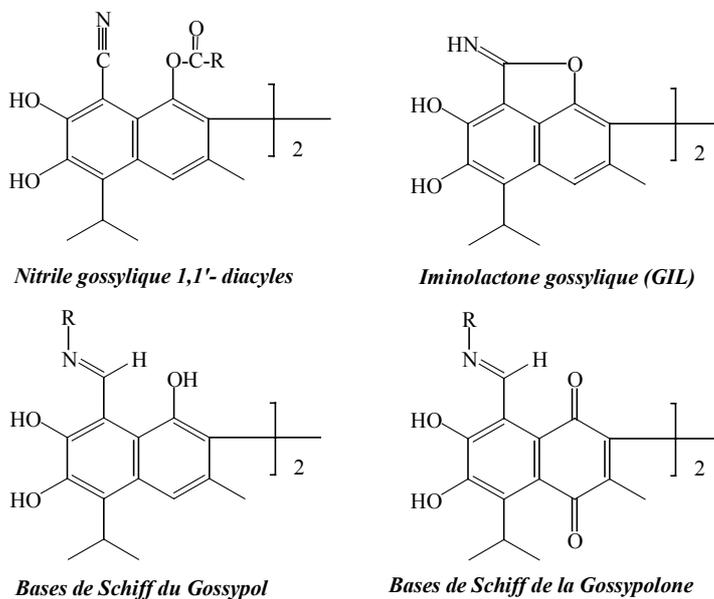
Le gossypol possède de nombreuses activités biologiques. S'il fut d'abord étudié principalement pour ses propriétés contraceptives ce sont actuellement ses activités antitumorales qui intéressent les médecins. Comme sa toxicité à doses élevées n'est pas négligeable et entraîne de multiples effets secondaires chez l'Homme, la recherche s'est orientée vers des dérivés plus sélectifs et plus toxiques pour les cellules cancéreuses. La mesure de la toxicité des dérivés du gossypol sur des lignées de cellules cancéreuses représente donc une approche préliminaire et nous avons considéré dans notre travail comme plus actifs les dérivés du gossypol qui sont les plus toxiques *in vitro* sur une lignée de cellules KB. Après avoir mis en évidence cette toxicité, il restera évidemment à valider l'utilité de ces dérivés par leur index thérapeutique, mesuré dans des expériences *in vivo*. Il faut noter que cette recherche de cytotoxicité « primaire » n'exclut pas d'autres démarches plus compatibles avec la recherche actuelle en cancérologie qui s'intéresse de plus en plus à des substances peu toxiques mais capables de modifier le cycle cellulaire (inhibiteurs de kinases, par exemple). Cette approche reste sérieusement à considérer pour le gossypol et ses dérivés.

Les nombreuses données bibliographiques sur les activités des dérivés du gossypol indiquent que l'activité est liée à la présence sur le système binaphtalénique des groupements phénoliques libres en 6,6' et 7,7'. En effet, le blocage de ces fonctions phénol, dans les dérivés éthers méthyliques, abolit toute toxicité. La toxicité du gossypol est aussi associée aux fonctions aldéhydes ou à la présence d'une fonction électrophile comme une énamine dans la même position. On imagine facilement que ce centre électrophile peut se lier avec nombre d'entités nucléophiles jouant un rôle important dans le milieu biologique. Par exemple, les groupements amino de la lysine des protéines ou des peptides se couplent facilement avec le gossypol.

La même explication sur la toxicité pourrait être avancée pour quelques dérivés où la fonction aldéhyde est aussi remplacée par un groupement électrophile. Ces dérivés possèdent d'autres activités biologiques et sont parfois moins toxiques que le gossypol lui-même. Peuvent être cités : les nitriles gossyliques 1,1'-diacyles, actifs sur *Plasmodium*

falciparum (Royer RE et al., 1986), l'iminolactone gossylique, inhibitrice de l'aldose réductase (Deck LM et al., 1991) et les bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone en équilibre avec les énamines correspondantes et dont nous avons étudié les toxicités au chapitre précédent (Dao VT et al., 2000). (schéma 1)

Schéma 1



Quand nous avons commencé notre étude, la synthèse de dérivés nouveaux à partir du gossypol semblait assez limitée, tant par la fragilité de la molécule de départ que par l'ancienneté de la chimie du gossypol où tout semblait avoir été déjà fait.

Nous avons recherché des méthodes susceptibles de conduire à des rendements élevés et pour lesquelles les étapes de purifications étaient réduites au minimum.

Pour accéder à de nouvelles molécules dérivées du gossypol, nous nous sommes donc proposés de mettre au point une nouvelle méthode de blocage des fonctions aldéhyde du gossypol qui n'exige pas la protection préalable des groupements phénoliques. En effet, la protection la plus courante des phénols par formation d'éthers méthyliques conduit à des produits très stables en milieu acide ou basique mais les rendements de la déprotection (par BBr_3 par exemple) sont généralement catastrophiques.

La protection des groupements aldéhydes par formation de dithianes ou de dithiolanes nous a paru particulièrement avantageuse car elle peut être réalisée en milieu acide où les thiols restent de bons agents nucléophiles contrairement à la plupart des autres réactifs nucléophiles qui sont désactivés par protonation. En milieu acide, les groupements phénols ne sont plus nucléophiles et ne demandent pas de protection particulière.

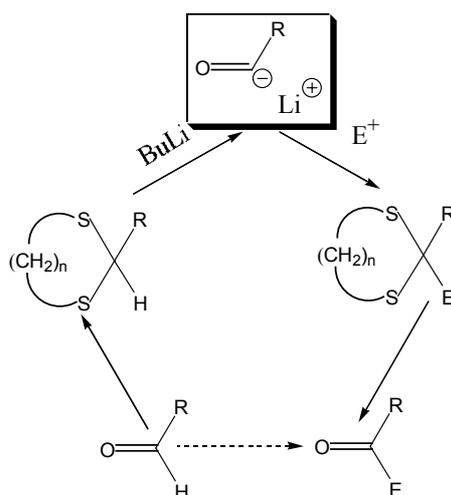
2/ Dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone

a/ Nouveaux synthons

Ce projet ouvre de nouvelles perspectives dans la synthèse des dérivés du gossypol/gossypolone car les dérivés 1,3-dithiolanes (1,3-dithianes) sont souvent utilisés en synthèse pour protéger les groupements carbonyles et modifier leur réactivité. Les réactions possibles de ces synthons sont illustrées dans les schémas suivants :

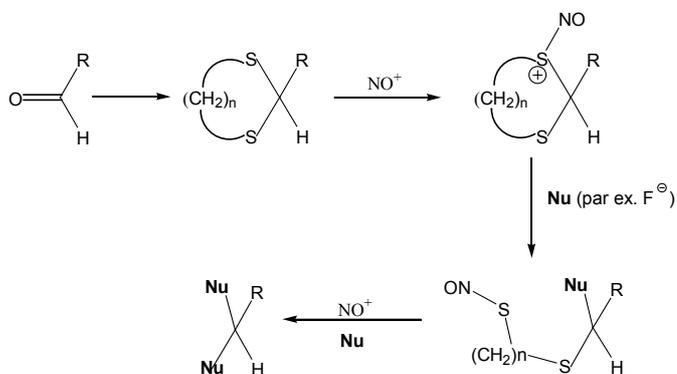
- a/ Les dithianes /dithiolanes (dithioacétals) peuvent conduire, en présence d'une base forte (BuLi), à la formation d'un carbanion. Ceci revient à transformer l'atome de carbone du carbonyle de départ en un pôle nucléophile. Cette inversion de polarité (umpolung) a été très utilisée en synthèse (Seebach D & Corey EJ, 1975) (schéma 2).

Schéma 2



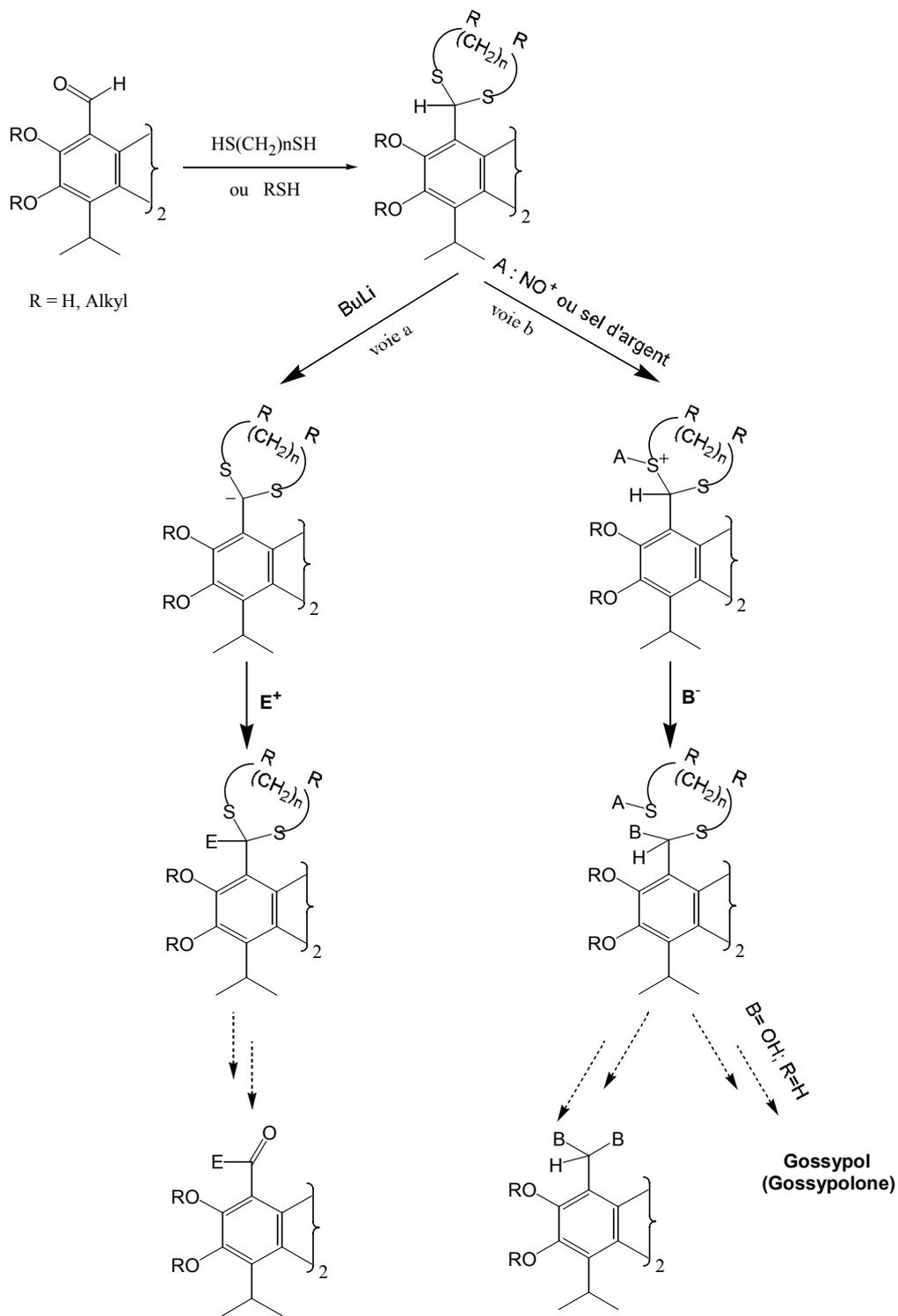
- b/ La protection des fonctions carbonyles par les dithianes ou dithiolanes peut facilement être enlevée par l'action d'un réactif électrophile sélectif du soufre, par exemple les ions Ag^+ , Hg^+ (Satchell DPN & Satchell RS, 1990), $Et_3O^+.BF_4^-$ (Oishi T et al, 1972) ou NO^+ (York C et al., 1996). La présence d'une charge positive sur l'atome de soufre rend le carbone protégé électrophile (schéma 3).

Schéma 3



Pour le gossypol et la gossypolone, ces possibilités réactionnelles peuvent être représentées dans le schéma suivant (*schéma 4*):

Schéma 4



Synthons dithianes et dithiolanes

b/ Dithianes et dithiolanes: agents cytotoxiques masqués

Dans la mesure où la toxicité du gossypol et de la gossypolone vient de la présence des groupements aldéhydes, on pouvait s'attendre à ce que les dithianes et dithiolanes soient beaucoup moins toxiques et à ce que l'introduction de deux ou de quatre atomes de soufre par molécule augmente considérablement la lipophilie.

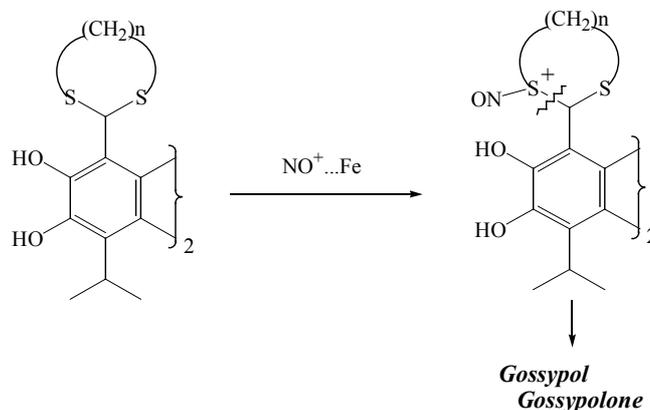
Mais pour que ces dérivés du gossypol/gossypolone peu toxiques puissent développer leur toxicité dans le milieu biologique, il fallait qu'il existe dans ce même milieu des conditions particulièrement favorables à leur déprotection. Par exemple, l'oxyde nitrique NO libre ou bien complexé pouvait posséder des propriétés électrophiles suffisantes pour se lier aux atomes de soufre des dithianes ou dithiolanes et jouer aussi le rôle des ions argent ou mercure utilisés en chimie pour la déprotection de la fonction aldéhyde.

En effet, si les ions nitrosoniums NO^+ n'existent probablement pas libres en milieu aqueux, ils se trouvent potentiellement dans les complexes où NO est lié à l'hème du cytochrome. Les thiols sont supposés déplacer NO de ce type de complexe pour former des nitrosothiols (Vanin AF, 1998), et nous espérons le même type de réaction avec les dithianes/dithiolanes



Nous avons confronté cette hypothèse au fait que NO est produit en grande concentrations dans l'inflammation des tissus tumoraux par activation de la NO synthase inductible. Par ailleurs, dans les cellules tumorales, les réactions d'oxydation sont favorisées du fait de l'absence d'enzymes réductrices (la catalase en particulier) (Fardella G et al., 1999). L'oxydation des atomes de soufre en sulfoxydes par H_2O_2 intracellulaire augmente aussi l'électrophilie du carbone protégé et favorise l'ouverture du cycle par hydrolyse. Ces réactions sont susceptibles de libérer le gossypol ou la gossypolone de départ (schéma 5).

Schéma 5



Nous nous sommes proposés d'étudier la validité des hypothèses exposées plus haut et les résultats positifs que nous avons obtenus récemment nous ont conduit à déposer une demande préliminaire de brevet français (n° 02/10407), puis à publier ces résultats (Dao *et al.*, 2003, *sous press*).

II. TRAVAUX RÉALISÉS

1. CHIMIE

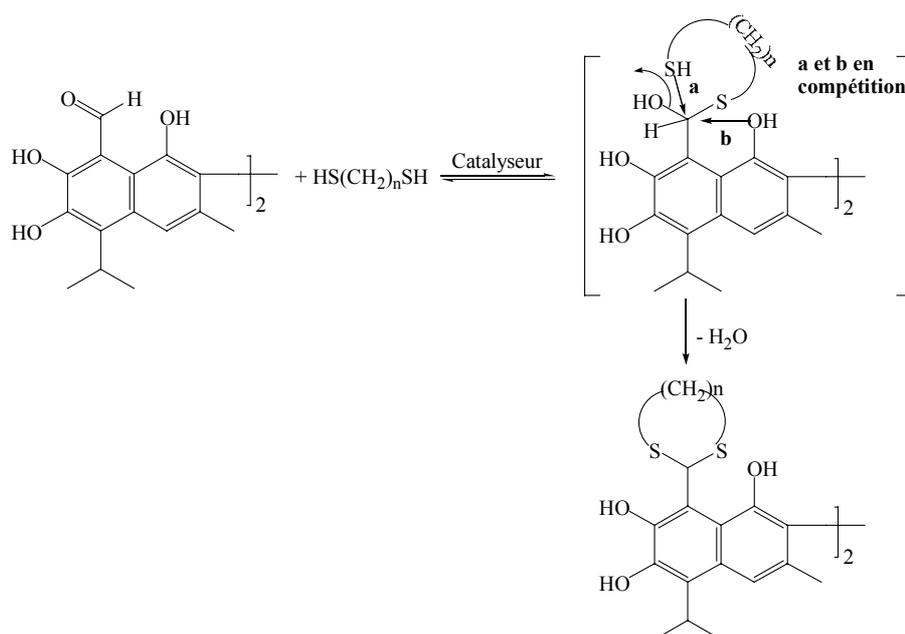
Nous avons examiné la réactivité du gossypol, de l'anhydrogossypol, de la gossypolone et des dérivés éthers méthyliques du gossypol avec les thiols et les dithiols.

1.1/ Réaction du gossypol avec les dithiols

Nous sommes partis du gossypol racémique pour faire une première évaluation de ces réactions.

En principe, la réaction entre un aldéhyde et un thiol conduit facilement au produit intermédiaire, un thioalcool, qui n'est pas stable et qui se déshydrate pour donner le produit final. Mais dans le cas du gossypol, on s'attend à ce que cette étape de déshydratation soit plus difficile à cause des groupements phénoliques en position *peri* (1,1') qui pourraient entrer en compétition avec le deuxième groupe thiol du dithiol. On peut ainsi supposer que cette seconde étape, la déshydratation, est l'étape essentielle de la réaction (*schéma 6*)

Schéma 6



Ce type de réaction s'effectue généralement en présence d'un catalyseur acide ou d'un acide de Lewis : HCl concentré, ZnCl₂ ou BF₃.OEt₂ (Loewenthal HJE, 1973 ; Greene TW, 1981), AlCl₃ (Ong BS, 1980), TiCl₄ (Kumar V & Dev S, 1983), SiCl₄ (Ku B & Oh DY, 1989).

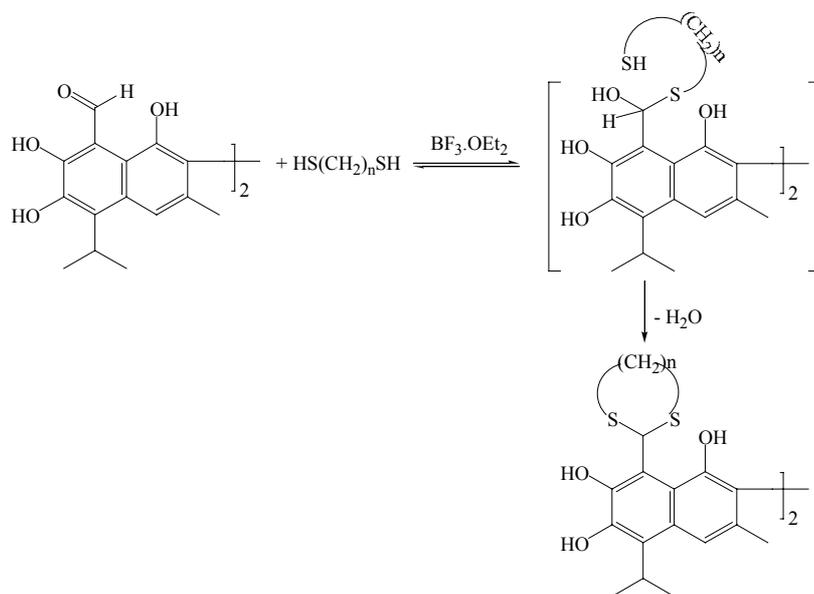
Nous avons étudié la réactivité de deux dithiols, le dithioethane et le dithiopropane, en présence de plusieurs catalyseurs différents tels HCl concentré, ZnI₂/dioxane, TiCl₄, SnCl₄, SiCl₄ et BF₃.OEt₂. Nous avons constaté que la condensation du dithiol avec le gossypol dépend beaucoup du catalyseur utilisé (tableau 1).

Tableau 1

Réaction	Catalyseur	Résultat
Gossypol + 1,3-dithiopropane	HCl concentré	Pas de réaction
	ZnI ₂ /Dioxane	Pas de réaction
	TiCl ₄	Gossypol se complexe avec le catalyseur
	SnCl ₄	Gossypol se complexe avec le catalyseur
	SiCl ₄	Gossypol se complexe avec le catalyseur
	BF₃.OEt₂	Réagit

Le gossypol ne réagit pas avec le dithiol en présence de HCl concentré et de ZnI₂/dioxane. Avec TiCl₄, SnCl₄, SiCl₄, il se forme des goudrons résultant probablement de la complexation des groupements phénoliques du gossypol et de polymérisations. Seul BF₃.OEt₂ s'est révélé un catalyseur efficace pour cette réaction car BF₃.OEt₂ n'est pas seulement un acide de Lewis, mais aussi un agent déshydratant très fort et comme nous l'avons indiqué plus haut, l'étape de déshydratation est une étape essentielle pour cette réaction. Nous avons ainsi obtenu les dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane du gossypol sous forme de précipités jaunes. Il faut remarquer ici que la plupart des dérivés du gossypol connus ont été obtenus et purifiés sous forme de précipités, le gossypol et ses dérivés sont difficiles à purifier par chromatographie. Les dérivés dithiolane et dithiane du gossypol sont de nouveaux dérivés du gossypol qui n'ont pas été décrits malgré les nombreux travaux sur le gossypol depuis les années 30. Les structures proposées pour le 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane du gossypol ont été confirmées par spectrométrie de masse et RMN (schéma 7)

Schéma 7



34, $n = 2$, 1,3-dithiolane du gossypol
35, $n = 3$, 1,3-dithiane du gossypol

Utilisation des dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane du gossypol comme synthons

Nous n'avons pas pu utiliser ces dérivés comme synthons pour les raisons suivantes :

- La solubilité de ces dérivés dans des solvants organiques est limitée, ils ne se dissolvent bien que dans le DMSO et le DMF. Or le meilleur solvant pour la réaction avec BuLi est tétrahydrofurane (THF) (schéma 4, voie a)
- Les dithianes ou dithiolanes du gossypol possèdent des groupements phénoliques libres et la formation d'un carbanion s'accommode mal de leur présence. Le gossypol est trop fragile dans des conditions réactionnelles utilisées pour la formation d'un carbanion car les groupements phénoliques s'oxydent très facilement.
- Pour le gossypol, les groupements phénoliques en position peri (1,1') interviennent toujours dans la réaction du carbone C_8 .

Ces difficultés nous ont amenés à envisager la synthèse de dithioacétals du gossypol en espérant augmenter la solubilité, condition essentielle pour pouvoir les utiliser comme synthons.

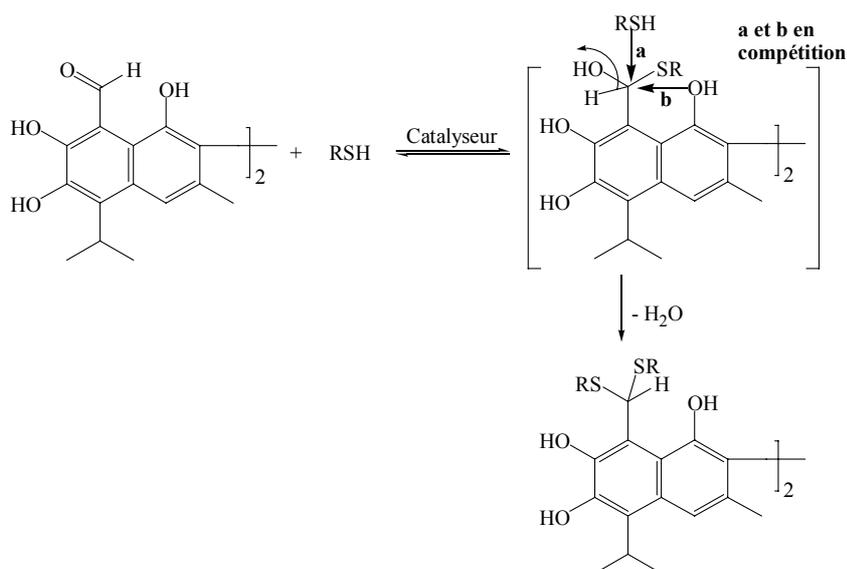
1.2/ Réaction du gossypol avec les monothiols

L'idée était d'obtenir des disulfures non cycliques et plus solubles.

Nous avons fait réagir le gossypol avec un monothiol (le propanethiol, le butanethiol ou le thiophénol) toujours en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir de précipité comme dans le cas du dithiane ou du dithiolane, nous avons toujours obtenu, quel que soit l'excès de thiol réactif, un mélange de plusieurs produits qui sont probablement les dérivés mono- et di-substitués. Comme nous l'avons indiqué plus haut, les dérivés du gossypol ayant les groupements phénoliques libres sont difficiles à purifier et nous n'avons pas réussi à séparer des quantités appréciables de produit pour proposer cette méthode pour la synthèse.

Nous pensons que l'étape de déshydratation de la réaction entre gossypol et le thiol est une étape essentielle. Le mélange des produits obtenus dans le cas de monothiol a encore une fois confirmé la compétition entre le groupement phénolique en position peri (1,1') avec une autre molécule monothiol dans l'étape de déshydratation. Les résultats n'ont pas été meilleurs en présence d'un large excès de monothiol, ce qui indique que le soufre, malgré sa grande nucléophilie ne peut pas concurrencer complètement l'attaque par l'atome d'oxygène peri qui est en position plus favorable (*schéma 8*).

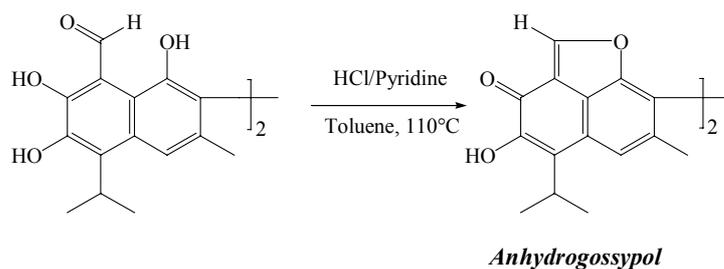
Schéma 8



Pour résoudre ce problème, nous avons pensé éviter la réaction de déshydratation du thioalcool qui conduit au dithioacétal en partant d'une molécule préalablement déshydratée.

Nous avons donc synthétisé l'anhydrogossypol par déshydratation du gossypol dans le toluène à reflux en présence de HCl /pyridine (*Miller RF^(a) & Adams R, 1937*) (*schéma 9*)

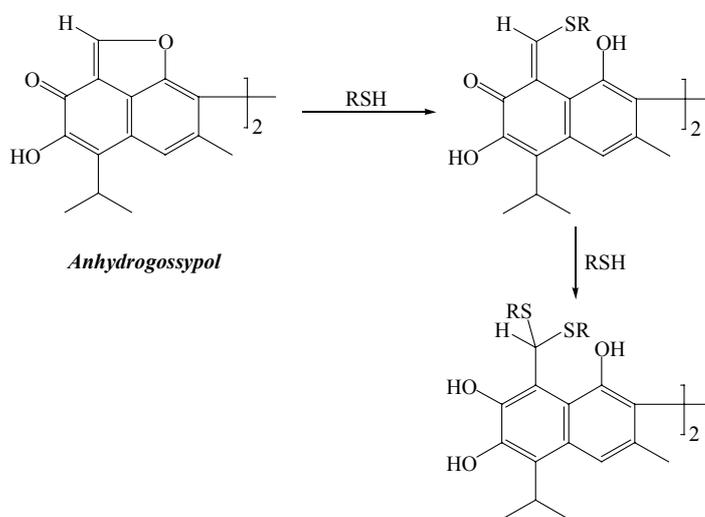
Schéma 9



Nous savons que l'anhydrogossypol n'est pas stable, il s'hydrolyse facilement pour redonner le gossypol. Avec l'anhydrogossypol, les réactions sont toujours de simples additions contrairement au gossypol pour lequel les mêmes dérivés peuvent être obtenus à condition d'éliminer de l'eau, de l'acide acétique ou une molécule analogue dans la phase ultime de la réaction.

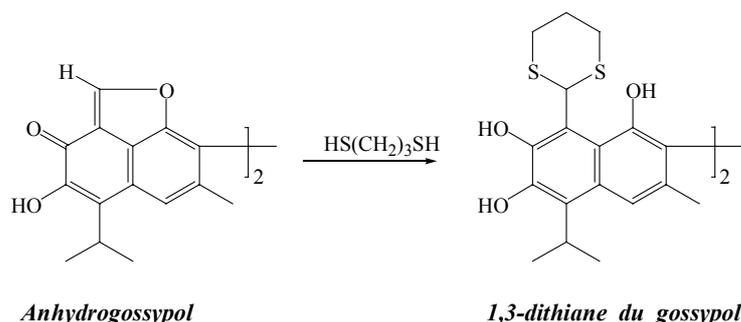
Nous espérons obtenir des dérivés dithioacétals du gossypol par une condensation de thiol avec l'anhydrogossypol comme dans le schéma suivant (*schéma 10*):

Schéma 10



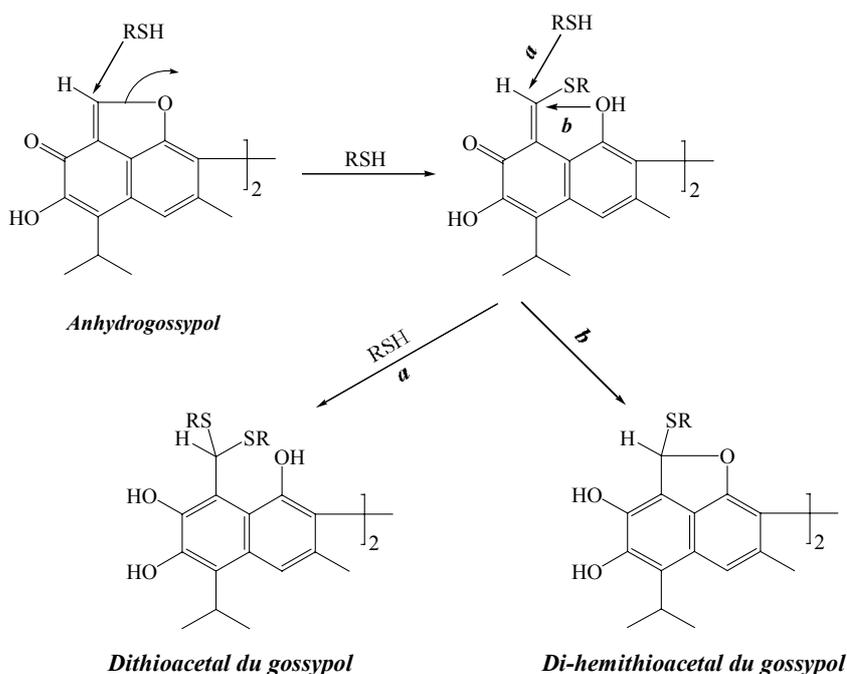
En premier lieu, nous avons, pour vérifier notre hypothèse de travail, fait réagir l'anhydrogossypol avec le dithiopropane sans $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, et nous avons effectivement obtenu le dérivé 1,3-dithiane du gossypol comme dans la réaction du gossypol avec le même dithiol (*schéma 11*).

Schéma 11



La même réaction faite avec des monothiols (le propanethiol, le butanethiol, le thiophénol) conduit encore à des mélanges complexes. Ceci peut être interprété par le schéma suivant (*schéma 12*):

Schéma 12



Comme le cycle furannique de l'anhydrogossypol est très tendu, l'attaque d'un thiol va ouvrir le cycle puis un autre thiol va attaquer pour former le dithioacétal du gossypol, mais malheureusement, les groupements phénoliques en position peri (1,1') vont intervenir pour former le di-hemithioacétal du gossypol en compétition. Nous avons obtenu un mélange de produits que nous n'avons pas cherché à purifier.

Nous n'avons pas réussi à synthétiser de dérivés dithioacétals à partir du gossypol non protégé. Les dérivés dithianes et dithiolanes sont assez peu solubles. Nous avons espéré que la protection des fonctions phénoliques devrait augmenter la solubilité des dérivés

soufrés dans les solvants organiques, condition nécessaire pour continuer les synthèses et les purifications.

Cette voie de synthèse pouvait éventuellement être poursuivie à condition de protéger préalablement les groupements phénoliques et de réussir à les déprotéger avec un rendement convenable.

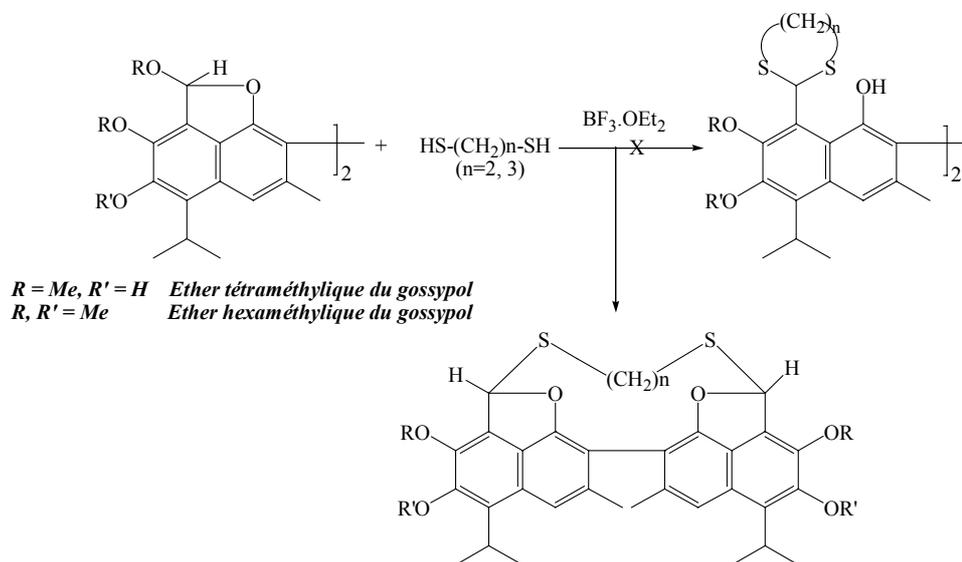
Comme la protection des groupements phénoliques libres du 1,3-dithiolane ou du 1,3-dithiane du gossypol par alkylation ou acylation est peu envisageable à cause de la nucléophilie du soufre qui se transformerait facilement en sulfonium, nous avons essayé la réaction avec la cyclohexanone (Schill G & Logemann E, 1973). Les acétals obtenus ainsi résistent en effet à l'action des bases fortes utilisées (BuLi) dans la formations du carbanion (l'umpolung) (schéma 4, voie a).

Nous n'avons pas réussi à protéger les groupements phénol de cette façon, et ceci nous a conduits à étudier l'action du dithiol sur les dérivés du gossypol préalablement protégés par méthylation (l'éther tétraméthyle et l'éther hexaméthyle du gossypol), dans l'espoir de former les dithianes ou dithiolanes des éthers méthyliques du gossypol.

1.3/ Réaction des dérivés éthers méthyliques du gossypol avec les dithiols

Ces éthers méthyliques du gossypol sont des acétals et, en principe, la condensation d'un dithiol et d'un acétal conduit à la formation d'un dithiane. Ces dérivés ne contiennent plus les groupements phénoliques libres qui s'oxydent dans le milieu réactionnel ou qui nous posent des problèmes pour l'étape de purification. Les réactions ont été faites toujours en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Les analyses RMN 1D et 2D ont montré que les produits ne sont pas des dérivés dithiolane (dithiane) comme prévu, mais que le thiol, au lieu de former le cycle dithiolane (dithiane), forme un pont entre C_8, C_8 des deux noyaux naphthaléniques. Il faut donc imaginer que le thiol a simplement joué le rôle de nucléophile dans une réaction de substitution (schéma 13).

Schéma 13



Nous avons constaté que l'éther tétraméthyle du gossypol peut réagir facilement avec les dithiols (l'éthanedithiol, le propanedithiol) pour conduire à des produits pontés qui précipitent dans les conditions réactionnelles utilisées. Par contre, l'éther hexaméthyle du gossypol donne plutôt un mélange de deux produits dont le produit ponté en majorité (65%) que nous avons séparé par HPLC préparative. La différence apparente de réactivité entre les éthers tétraméthyle et hexaméthyle provient probablement du fait que l'éther tétraméthyle existe sous la forme de deux énantiomères tandis que l'éther hexaméthyle est formé d'un mélange d'isomères plus complexe.

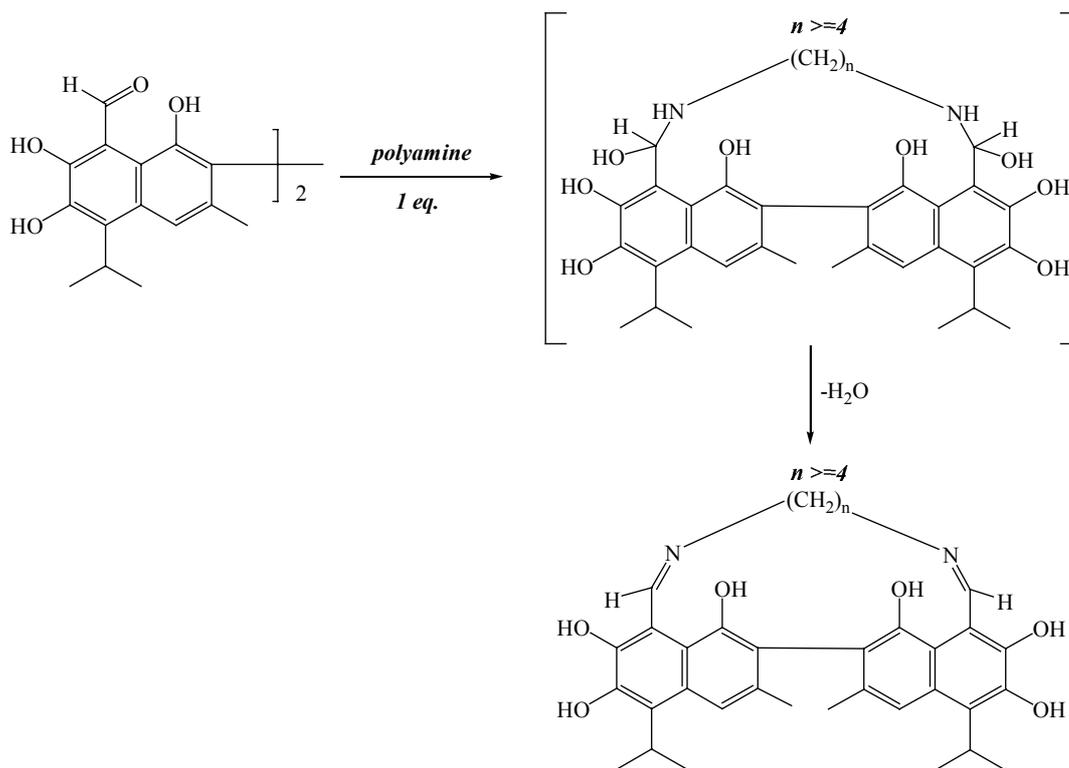
En effet, dans l'analyse RMN, l'éther hexaméthyle du gossypol donne un spectre très complexe, ce qui peut s'interpréter par le fait que l'éther hexaméthyle du gossypol existe sous plusieurs formes isomères. Après réaction avec le dithiol, nous avons obtenu un produit qui donne un spectre très simple, qui prouve que le produit final existe sous une seule forme isomère (ou sous la forme d'énantiomères). Nous pensons qu'en formant un pont entre deux noyaux naphthalénique, le dithiol arrive par le côté le moins encombré, c'est une réaction stéréo sélective ou bien le contrôle est thermodynamique et les produits formés sont les plus stables.

Nous avons aussi observé que la longueur de la chaîne aliphatique du dithiols joue un rôle important dans cette réaction :

- Le 1,4-dithiobutane n'a pas pu former le pont entre les deux carbones C_8 , C_8 . Ce résultat doit être comparé aux résultats de Kunesch et ses collègues (*Kunesch N et al. , 1990*), qui ont constaté que les polyamines ne peuvent former un pont entre les deux fonctions aldéhydes du gossypol qu'à partir d'une chaîne carbonée de 4 carbones. Cette différence pourrait s'expliquer ainsi :

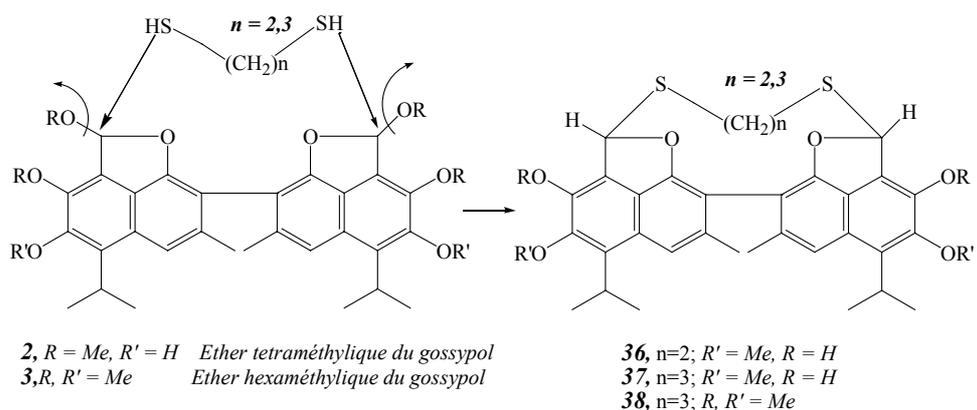
- La formation des di-imines (bases de Schiff) est une addition suivie d'une déshydratation (*schéma 14*)

Schéma 14



- tandis que la réaction d'un dithiol avec les éthers méthyliques du gossypol est une simple réaction de substitution nucléophile, c'est à dire une réaction stéréosélective, ou bien équilibrée, aboutissant au conformère le plus stable (schéma 15).

Schéma 15



- Les dérivés éthers méthyliques du gossypol sont sous la forme d'éthers méthyliques de lactol, et par la modélisation nous avons observé que ces cycles lactols rendent ces molécules plus rigides, et qu'ils ont tendance à tirer les deux

noyaux naphthaléniques l'un vers l'autre ce qui permet de raccourcir la distance entre les deux carbones C_8, C_8 . En effet, la distance entre les deux carbones C_8, C_8 est de $6,8\text{\AA}$ dans les dérivés éthers méthyliques du gossypol et de $8,3\text{\AA}$ dans le gossypol. Ce rapprochement des deux noyaux naphthaléniques empêche le dithiol de former un pont entre les deux éthers de lactol lorsque la longueur de la chaîne carbonée du dithiol est trop longue. En effet, la liaison C-S est plus longue que les liaisons C-N ou C=N. On comprend donc pourquoi le pont dithiol est très difficile à former à partir des dithiols contenant des chaînes de 4 carbones (1,4-dithiobutane), tandis que le pontage est possible avec des diamines sur le gossypol à partir de chaînes contenant 4 atomes de carbone.

- La modélisation moléculaire sur les produits pontés par un dithiol a montré que la distance entre deux carbones C_8, C_8 de deux noyaux naphthaléniques est plus courte que celle des dérivés éthers méthyliques du gossypol, et que l'angle entre les deux noyaux naphthaléniques est aussi moins grand (*voir figure en annexe 1*). Ainsi, la formation d'un pont dithio pourrait être utilisée pour stabiliser les énantiomères du gossypol et cette approche serait valorisée par les grandes différences d'activités entre ces énantiomères.

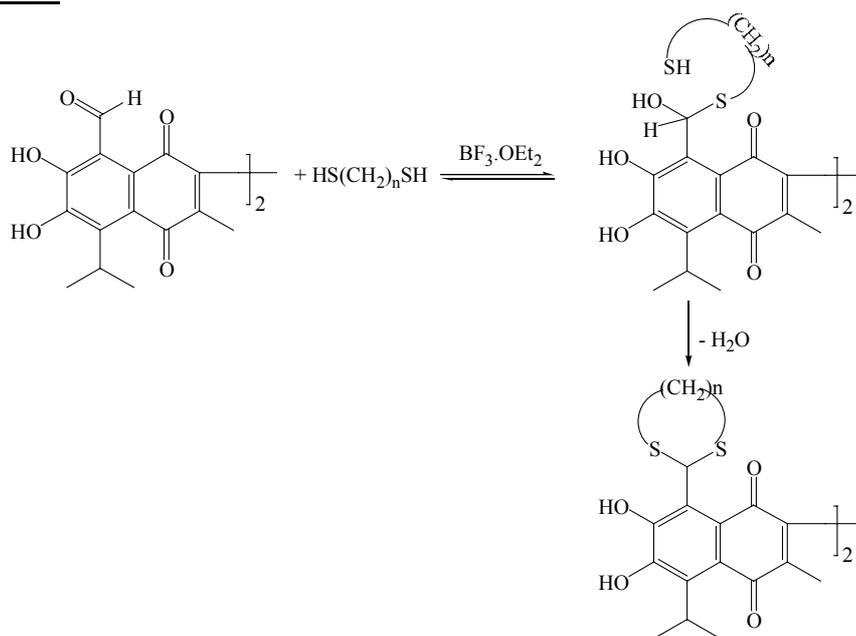
1.4/ Réaction de la gossypolone avec les dithiols

Ces premiers résultats obtenus avec le gossypol et les dérivés éthers méthyliques du gossypol nous ont encouragés à synthétiser des dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane de la gossypolone. En effet, nous espérons aussi :

- Eviter les complications qui viennent de groupements phénoliques en position peri (1,1').
- Comparer la cytotoxicité des dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane du gossypol avec ceux de la gossypolone qui, d'après les travaux exposés au chapitre précédent, devraient être plus toxiques car ils contiennent la forme quinone
- De plus, la gossypolone est le principal métabolite du gossypol, la forme oxydée du gossypol stable dans des conditions biologiques.
- Comme les bases de Schiff de la gossypolone sont plus polaires que celles du gossypol, nous espérons améliorer la solubilité des dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane de la gossypolone dans des solvants organiques qui sont utilisés plus souvent dans la synthèse organique, comme le chloroforme, l'éther.

Nous avons synthétisé les dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane de la gossypolone à partir de la gossypolone avec le dithioéthane (ou le dithiopropane) en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, nous avons obtenu ces dérivés purs par précipitation dans l'hexane (*schéma 16*).

Schéma 16



39; $n = 2$, 1,3-dithiolane de la gossypolone
40; $n = 3$, 1,3-dithiane de la gossypolone

Nous avons pu confirmer la structure de ces dérivés par RMN et masse. Contrairement aux dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane du gossypol, ceux de la gossypolone sont solubles dans la plupart des solvants organiques comme le chloroforme, l'éther, le dichlorométhane.

1.5/ Réaction de la gossypolone avec les monothiols

L'action des thiols sur la gossypolone conduit à des mélanges difficiles à séparer. Malgré l'emploi de forts excès de thiols et la présence d'un catalyseur ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) qui est en même temps un déshydratant.

Avec la gossypolone, il n'y a plus de groupement phénolique pouvant entrer en compétition avec une seconde molécule de thiol comme dans le cas du gossypol.

Il semble que l'étape de déshydratation n'est réalisable, dans les conditions utilisées, que lorsque l'entropie est favorable comme avec un dithiol où la proximité du second atome de soufre permet à la réaction de se poursuivre.

1.6/ Stabilité des cycles dithiane et dithiolane du gossypol et de la gossypolone

Nous avons souhaité, en premier lieu, examiner la facilité de déprotection de nos dérivés par les méthodes classiques de la chimie organique, puis nous avons imaginé un

modèle expérimental *in vitro* sur cellules KB. Nous espérons retrouver dans le milieu d'incubation, le gossypol ou la gossypolone de départ qui sont connus pour leur activité antitumorale. Cette démarche revenait à envisager les dérivés 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane du gossypol et de la gossypolone comme une forme de prodrogues.

a/ Etude de la déprotection chimique par NO^+BF_4^-

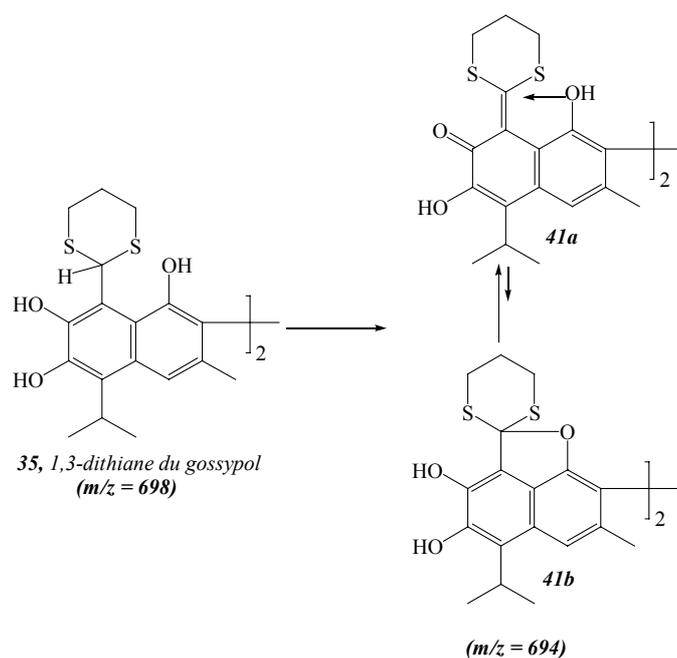
Les groupements dithiane/dithiolane s'ouvrent facilement sous l'action d'un réactif électrophile. Dans l'eau, en présence d'un sel d'argent ou de mercure, Il y a d'abord formation d'un ion sulfonium puis la molécule est hydrolysée.

Nous nous sommes intéressés, en premier lieu, au tétrafluoroborate de nitrosonium (NO^+BF_4^-) dans un solvant organique car l'ion nitrosonium existe à l'état potentiel dans le milieu biologique lorsque l'oxyde nitrique est complexé à l'hème du cytochrome P450. Dans un solvant organique, la réaction était plus facile à suivre et nous espérons mettre en évidence d'éventuels intermédiaires réactionnels.

Dans ce but, nous avons évalué la réactivité des dérivés 1,3-dithiane du gossypol et de la gossypolone

L'évolution de la réaction a été suivie par HPLC en phase inverse, notons que cette manipulation revient à analyser le mélange réactionnel après extraction en présence d'eau. Dans ces conditions, nous avons observé que le 1,3-dithiane de la gossypolone se transforme intégralement en gossypolone (*voie b, schéma 4*). Par contre, le 1,3-dithiane du gossypol conduit à un nouveau produit. Le couplage HPLC-masse sur un appareil Navigator-Thermoquest et avec la collaboration de Madame Julie HEMEZ du service de spectrométrie de Masse de l'ICSN, a indiqué un rapport de masse $m/z = 694$ tandis que celle du 1,3-dithiane du gossypol de départ était de $m/z = 698$.

Ce résultat montre que le 1,3-dithiane du gossypol a perdu quatre atomes d'hydrogène pour former un produit nouveau, dehydrogossypoldithiane, dont la structure pourrait être représentée par les deux formes suivantes :



Le 1,3-dithiane du gossypol ne conduit donc pas, après action du trifluoroborate de nitrososonium puis hydrolyse, au gossypol de départ. La différence de réactivité, comparée à celle de la gossypolone protégée, pourrait s'expliquer par le fait que les groupements phénols en position (1,1') stabilisent la forme dithiane-ylidène (**41a**) d'un dehydrogossypoldithiane. Nous pensons que la structure est plus proche de (**41a**) que de (**41b**) car par ^{13}C -RMN, nous avons un signal à 187.8 ppm qui indique la présence d'un carbonyle (C=O).

Dans le cas du 1,3-dithiane de la gossypolone, il n'y a pas de stabilisation possible et les carbones (8,8') sont le siège d'une hydrolyse qui régénère la gossypolone.

b/ Etude de la déprotection chimique par NO gaz et NO gaz + FeCl₃

Pour corroborer l'hypothèse selon laquelle les dithiane et dithiolanes peuvent être décomposés par NO en présence d'ions ferriques, nous avons examiné l'action de NO gaz dissous dans le DMF en présence ou en absence de chlorure ferrique. Nous avons constaté que NO en solution ne décompose pas le 1,3-dithiane du gossypol. Par contre, en présence d'une trace de chlorure ferrique, la décomposition est rapide et conduit aussi, entre autres produits observables par HPLC, au dehydrogossypoldithiane (**41a**)

2. BIOLOGIE

2.1/ CYTOTOXICITE SUR KB DES DIVERS DERIVES SOUFRES ISOLES

Nous avons synthétisé les dérivés 1,3-dithiane et 1,3-dithiolane dans le but de masquer la fonction aldéhyde qui est responsable de la toxicité du gossypol, et qui empêche d'utiliser cette molécule comme agent thérapeutique à dose élevée.

Une étude de la toxicité de ces dérivés sur les cellules KB, permet de constater que la protection des groupements aldéhydes du gossypol ou de la gossypolone par le dithiane ou le dithiolane aboutit à une grande diminution de la toxicité : en moyenne de 100 fois pour le gossypol et de 10 fois pour la gossypolone. Dans le cas des dérivés éthers méthyliques du gossypol, on perd complètement la toxicité (tableau 3).

Tableau 3

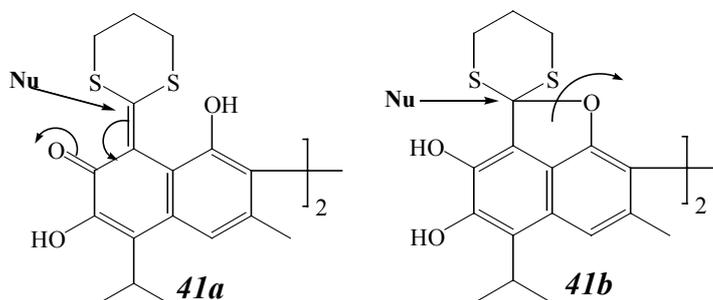
COMPOSE	NOM	IC ₅₀
1	<i>Gossypol</i>	$5,7.10^{-6} M$
34	1,3 - dithiolane du gossypol	$4,5.10^{-4} M$
35	1,3 - dithiane du gossypol	$1,2.10^{-4} M$
5	<i>Gossypolone</i>	$2,4.10^{-6} M$
39	1,3 - dithiolane de la gossypolone	$2,0.10^{-5} M$
40	1,3 - dithiane de la gossypolone	$3,5.10^{-5} M$
2	<i>Éther tétraméthyle du gossypol</i>	$> 25.10^{-6} M$
36	Éther dithioethane cyclique de l'éther tétraméthyle du gossypol	atoxique
37	Éther dithiopropane cyclique de l'éther tétraméthyle du gossypol	atoxique
3	<i>Éther hexaméthyle du gossypol</i>	$> 25.10^{-6} M$
38	Éther dithiopropane cyclique de l'éther hexaméthyle du gossypol	atoxique
41A	Dehydrogossypoldithiane	$5,5.10^{-6} M$

Nous avons constaté que le dehydrogossypoldithiane, obtenu par l'action du nitrosonium et isolé par HPLC, est presque 100 fois plus toxique que le 1,3-dithiane du gossypol de départ.

Nous pouvons donc, dans ce modèle, considérer les dérivés 1,3-dithiane du gossypol et de la gossypolone comme des prodrogues, et ces dérivés pourraient cibler les cellules cancéreuses où la concentration d'oxyde nitrique est assez élevée.

En présence de tétrafluoroborate de nitrosonium, le 1,3-dithiane du gossypol **35** ne conduit pas au gossypol comme prévu, par contre, nous avons obtenu un produit qui a la même toxicité que le gossypol mais ne possède plus de groupement aldéhyde. Sa toxicité

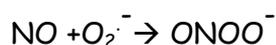
pourrait s'expliquer par le fait que sous ses deux formes (**41a**) ou (**41b**) cette molécule est potentiellement un agent électrophile.



2.2/ Quelques rappels sur l'oxyde nitrique

a/ Oxyde nitrique et cancer

Ces dernières années, il est apparu clairement que l'oxyde nitrique NO, ses dérivés et des radicaux libres, jouaient un rôle clé dans la carcinogénèse. Les infections virales ou bactériennes génèrent des radicaux libres. Par exemple, l'infection par le virus de l'Influenza chez la souris élève considérablement le niveau de la xanthine oxydase XO dans les sites infectés. Parallèlement, cette augmentation de XO provoque l'induction de la NO synthase (iNOS) et du peroxydite est formé :



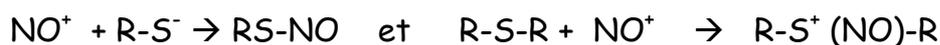
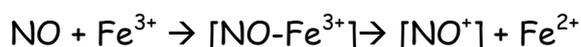
Ce peroxydite est responsable de dommages importants au niveau de la structure de l'ADN, de la nitration des protéines ou des bases nucléiques. De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* ont aussi montré que des substances cancérigènes telles que le tétrachlorure de carbone ou les bases hétérocycliques forment aussi ces ions superoxydes (Maeda H & Hakaïke T, 1998).

D'autre part, de nombreuses tumeurs solides expérimentales ont un niveau élevé de iNOS. Par exemple, dans les cancers du sein (Thomsen LL et al., 1995), dans les tumeurs cervicales (Thomsen LL et al., 1994), les tumeurs du système nerveux central (Cobbs CS et al., 1995), les cancers du colon (Jenkins DC et al., 1995) et les cancers tête et cou (Rosbe KW et al., 1995). Dans ces tumeurs, la biosynthèse élevée de NO facilite une perméabilité vasculaire qui entretient le développement rapide de la tumeur (Maeda H & Hakaïke T, 1998).

Mais NO présente des effets contradictoires dans la biologie du cancer. Il induit à la fois des effets cytotoxiques, cytostatiques et antimétastatiques tandis qu'il favorise l'angiogénèse, qu'il déprime le système immunitaire et empêche l'infiltration des leucocytes.

Malgré ces réserves, NO ou des agents donneurs de NO ont déjà été utilisés avec succès en radiothérapie anticancéreuse comme sensibilisateurs. Ces molécules augmentent l'efficacité de la destruction de l'ADN pendant la radiothérapie et leur activité sensibilisatrice est même observable en présence d'agents alkylants anticancéreux tels que le cisplatine et le mephalan. L'hypothèse proposée est que NO inhiberait la DNA ligase ou d'autres protéines chargées de la réparation de l'ADN (*Wink DA et al, 1998*).

Les cellules tumorales croissent dans un milieu capable de produire de grandes quantités d'oxyde nitrique provenant notamment des nombreux macrophages participant au processus inflammatoire. Dans ce milieu, NO se lie facilement aux thiols pour former des nitrosothiols, ou à l'hème des cytochromes (*Vanin AF, 1998*). Ces complexes de NO peuvent être considérés comme des transporteurs mais il faut faire une différence avec les complexes du fer car le changement possible de valence $Fe(III) \rightarrow Fe(II)$ peut transformer le complexe nitroso en donneur de nitrosonium NO^+ .



Notre projet était d'examiner la toxicité du 1,3-dithiane du gossypol dans une culture de cellules KB en présence de NO généré *in situ*. Pour cela, nous avons choisi un donneur de NO parmi les donneurs NO connus ci-dessous :

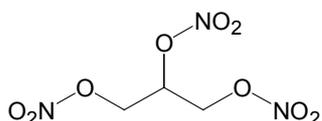
b/ Les donneurs de NO

Le monoxyde d'azote (NO) est impliqué dans de nombreux processus biologiques. Cependant, NO est un gaz de structure radicalaire qui réagit rapidement avec l'oxygène de l'air et il est peu soluble dans l'eau. Ces caractéristiques le rendent donc très difficile à manipuler aussi bien dans des expériences *in vitro* qu'*in vivo*. Il en découle la nécessité de disposer de molécules de synthèse, organiques ou inorganiques, qui servent de transporteurs de NO, capables de libérer NO dans des conditions physicochimiques contrôlées et à des vitesses bien établies.

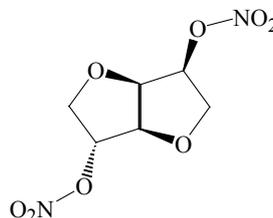
De nombreux donneurs de NO ont été essayés pour leur pouvoir synergique dans l'inhibition de la croissance des tumeurs ou comme médicaments dans les maladies cardiovasculaires (*Megson IM, 2000*). Il existe différentes classes de molécules donneurs de NO.

- Les nitrates organiques

Les nitrates organiques constituent une famille de composés qui comportent la fonction O-NO₂ et qui possèdent des propriétés comparables. Le plus connu est la trinitroglycérine (TNG), qui était utilisée pour le traitement de l'angine de poitrine il y a déjà un siècle, bien avant la découverte de NO comme neuromédiateur (Murrell W, 1876)



Trinitroglycérine (TNG)

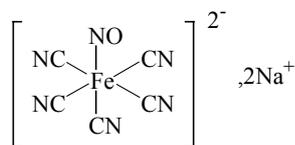


DinitroIsosorbid (DNIS)

La libération de NO à partir des nitrates organiques nécessite soit la présence de réducteurs comme la cystéine ou la N-acétylcystéine, soit une dégradation enzymatique. Deux systèmes enzymatiques sont capables de dégrader les nitrates organiques : les glutathion-S-transférase solubles qui hydrolysent ces substances en nitrite et les cytochromes P-450 membranaires qui les réduisent en principe vasoactif, NO (Delaforge M et al, 1993).

- Les métaux de transition nitrosylés

Le monoxyde d'azote se lie aux métaux de transition d'un grand nombre de complexes, via l'atome d'azote. Le plus étudié des complexes fer-nitrosyle est le nitroprussiate de sodium (ou pentacyanonitrosylferrate (II) de sodium, SNP). Ce composé est utilisé cliniquement pour réduire la pression artérielle dans des cas d'hypertension (Page IH et al., 1955) et lors de problèmes cardiovasculaires (Katsuki S et al., 1977)

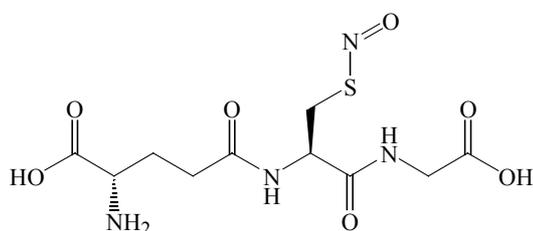


Nitroprussate de Sodium (SNP)

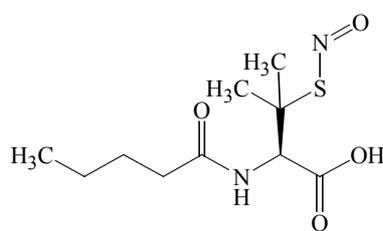
Le SNP ne libère pas NO spontanément, il nécessite soit une irradiation (Butler AR & Glidewell C, 1987), soit une réduction à un électron réalisée par un thiol, l'hémoglobine ou l'acide ascorbique et conduisant alors à la formation respective de disulfure, méthémoglobine ou d'acide déhydroascorbique (Kruszyna H et al., 1993 ; Rao DNR et al., 1991)

- Les S-nitrosothiols ou thionitrites

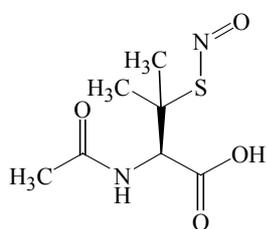
Le S-nitrosoglutathion et la S-nitrosoalbumine ont été détectés dans les fluides biologiques comme une conséquence du métabolisme de NO endogène et après administration exogène de NO (Gaston B et al., 1993; Stamler JS, 1994). Les S-nitrosothiols sont impliqués dans le transport, le stockage et le métabolisme de NO *in vivo*.



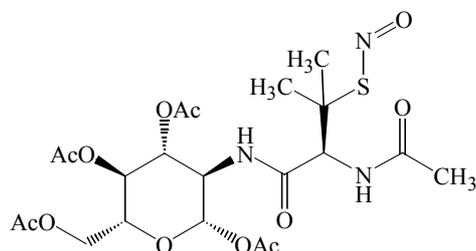
S-Nitrosoglutathion
(GSNO)



S-Nitroso-*N*-valerylpenicillamine
(SNVP)



S-Nitroso-*N*-acetylpenicillamine
(SNAP)



N-(*S*-Nitroso-*N*-acetylpenicillamine)-2-amino-2-deoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-*D*-glucopyranose
(RIG-200)

Certains S-nitrosothiols, comme le S-nitrosoglutathion, sont stables à l'obscurité et en solution dépourvue de métaux de transition. En effet, la libération de NO à partir de ces composés, est catalysée par les sels cuivreux ou cuivriques en présence de thiols permettant la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ (Dicks AP & Williams DLH, 1996). D'autres nitrosothiols sont susceptibles de réaliser des réactions de S-transnitrosation en présence de thiols structurellement proches (Tsikas D et al., 1999). Les thionitrites sont photosensibles ; leurs décomposition et la libération de NO sont augmentées sous illumination par une lampe à rayonnement ultra-violet (Zhelyaskov VR et al., 1998)

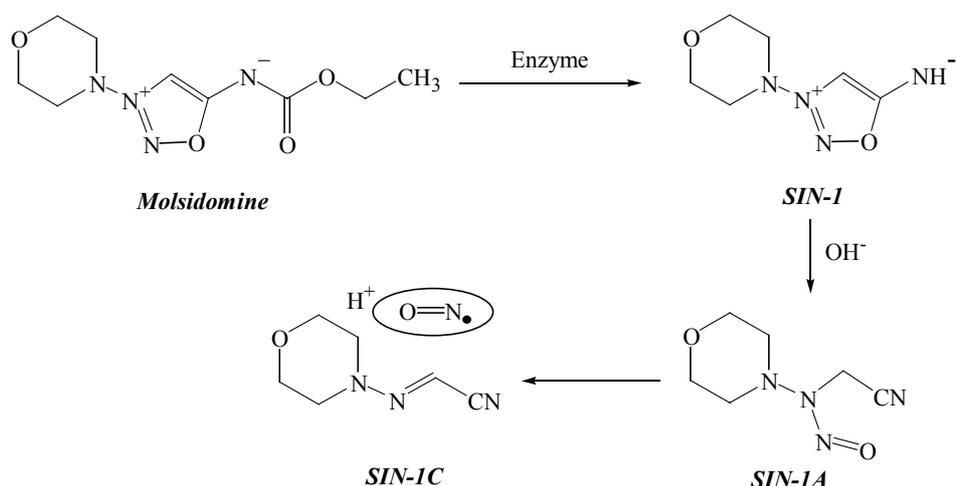
- Les sydnominines

La plus étudiée est la molsidomine (N-éthoxycarbonyl-3-morpholinosydnominine) qui est utilisée cliniquement comme produit anti-anginal et lors de maladies cardiaques coronaires (Rudolph W & Dirschinger J, 1985)

La molsidomine est une pro-drogue N-acétylée qui est convertie par les estérases du foie en un métabolite actif, le SIN-1 ou 3-morpholinosydnominine. Alors que la molsidomine est une substance peu vasoactive *in vitro*, le SIN-1 est vasorelaxant et est

un agent anti-plaquettaire. Ces activités sont médiées par une libération intermédiaire de NO.

Le SIN-1 est un composé photosensible; en présence de lumière ultra-violette, le SIN-1 se décompose et libère NO (Ullrich T et al., 1997). Le mécanisme de décomposition du SIN-1 est suivant :



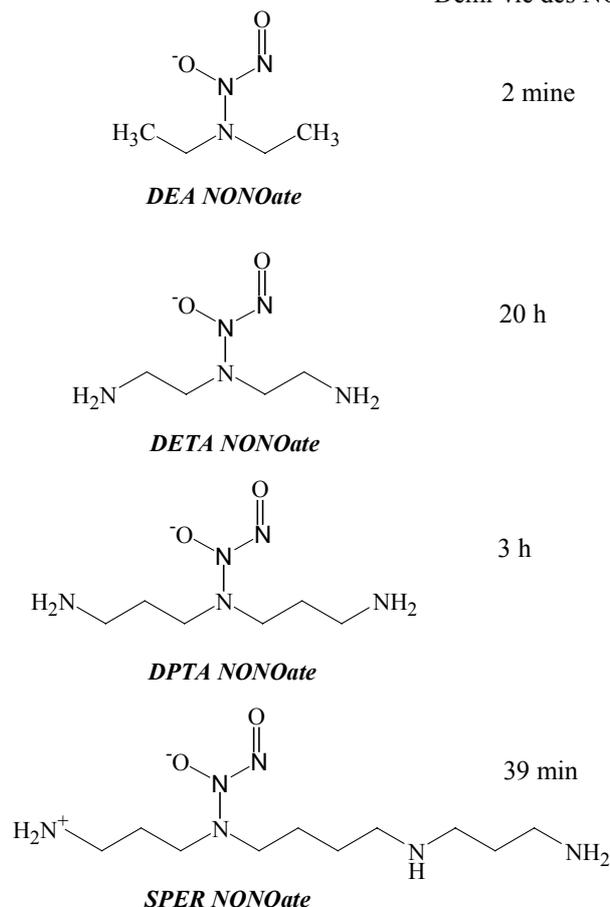
Le SIN-1 peut théoriquement produire O_2^- et NO, simultanément. NO réagit alors avec l'anion superoxyde pour conduire à la formation de peroxyntirite. Pour ces raisons, le SIN-1 a été plutôt utilisé comme donneur de peroxyntirite dans des systèmes biologiques (Hogg N et al., 1992). Cependant, des oxydants autres que l'oxygène moléculaire, peuvent réaliser l'étape oxydative aboutissant à la libération de NO. En effet, l'oxydation du SIN-1 peut s'effectuer par l'action du cytochrome C en conditions anaérobies, par le tétraacétate de plomb ou l'hexacyanoferrate de potassium (Böhn H & Schonafinger K, 1989).

La plupart des études réalisées avec le SIN-1 sont effectuées en milieu aérobie et en présence d'oxydants biologiques ; il est alors difficile de connaître les taux de NO et d'anion superoxyde formés et donc de discriminer entre l'action de NO ou du peroxyntirite (Singh RJ et al., 1999)

- **Les diazéniumdiolates ou NONOates**

Les NONOates sont des composés synthétiques présentant deux moles de NO liées à une amine primaire ou secondaire, par mole de composé. Les structures chimiques de certains NONOates et leur demi-vie sont reportées ci-dessous :

Demi-vie des NONOates dans solution aqueuse pH 7



Contrairement aux autres donneurs de NO connus, les NONOates, dès qu'ils sont en solution, libèrent NO spontanément sans intervention de réactifs biologiques ou de processus d'oxydo-réduction. Cependant, la décomposition des NONOates est dépendante de la température et du pH ; elle est ralentie à pH basique (pH>9) et accélérée à pH acide (pH<5), suggérant l'intervention d'un intermédiaire protoné X-[N(O)NO]H, nécessaire à la libération de NO. Cette réaction de décomposition des NONOates suit une cinétique de premier ordre, aboutissant à la libération de 2 moles de NO par mole de composé. Les temps de demi-vie de ces produits varient en fonction de la structure du nucléophile utilisé ; pour la diéthylamine/NO, le temps de demi-vie est de 2 minutes alors que pour la SPER/NO le temps de demi-vie est de 39 minutes dans la mêmes conditions.

Les NONOates sont donc des outils pratiques pour mimer les effets de NO car leurs taux de décomposition sont prévisibles et ne varient pas avec les constituants biologiques.

2.3/ Cytotoxicité du 1,3-dithiane du gossypol en présence d'un donneur d'oxyde nitrique: le DPTA-NONOate.

a/ Essais réalisés

Nous avons essayé de simuler ce que pourrait être l'action de NO sur la toxicité d'un dithiane du gossypol en ajoutant simultanément ces substances à des cultures KB. NO a été libéré dans la culture cellulaire par le dipropylènetriamine NONOate (DPTA NONOate) dont la demi-vie à pH 7 et 22°C est de 5 heures.

Dans cette expérience, nous avons effectivement pu constater un accroissement de l'inhibition de la croissance cellulaire par le 1,3 dithiane du gossypol en présence de ce donneur de NO, après avoir vérifié que les concentrations utilisées pour le NONOate et le dithiane n'étaient pas toxiques pour la culture cellulaire.

Concentration du gossypol 1.3 dithiane (35)	Sans DPTA NONOate	avec DPTA NONOate		
		10 ⁻⁴ M	5 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M
5 10 ⁻⁵ M	29%	59%	22%	11%
10 ⁻⁵ M	0%	41%	11%	0%

Tableau 4 : Cytotoxicité du 1,3 dithiane de gossypol en présence de DPTA NONOate

Plusieurs donneurs de NO ont été essayés : Molsidomine, DETA NONOate, SPER NONOate mais les résultats sont moins clairs, sans doute parce que la concentration active de NO libérée par ces produits était trop faible, du fait de leur trop lente décomposition.

Nous n'avons pas observé d'augmentation de la toxicité en présence de molsidomine et ce n'est pas surprenant puisque ce médicament se transforme en SIN-1, donneur de NO, principalement dans le foie, dans les expériences sur l'animal. En première hypothèse, il semblerait donc que le nonoate libère NO et que NO formé transforme le gossypol dithiane en un produit plus toxique qui pourrait être le dithiane-ylidene du gossypol. Diverses conditions expérimentales ont été essayées mais nous n'avons pas assez approfondi cette recherche pour pouvoir tirer des conclusions définitives.

Conclusion sur le rôle de NO dans la toxicité des dithianes et dithiolanes

Le DPTA NONOate a bien un effet positif sur la toxicité du gossypol dithiane. Cette toxicité pourrait être attribuée à la formation d'un dérivé dithiane-ylidene du gossypol. Nous n'avons pas poursuivi cette étude qui reste préliminaire mais qui renforce cependant notre hypothèse. Nous pensons cependant que les idées qui ont conduit cette expérience mériteraient d'être approfondies et même essayées avec d'autres dérivés cytotoxiques.

On peut aussi s'interroger sur le rôle que pourrait jouer l'oxydation intracellulaire dans la toxicité des dithianes du gossypol. En effet, nous savons que les cellules cancéreuses (comme KB) sont déficientes en catalase, peroxydase et superoxyde dismutase. Elles sont donc plus sensibles que les cellules normales à l'oxydation par H_2O_2 et par les radicaux oxygénés (Fardella G et al., 1999). Dans ces conditions, l'oxydation particulièrement importante dans la cellule tumorale pourrait être mise à profit pour libérer *in situ* des agents cytotoxiques. Comme nous l'avons indiqué plus haut (schéma 5), l'atome de soufre peut être oxydé pour donner un sulfoxyde. Ce sulfoxyde cyclique peut aussi s'ouvrir plus facilement et favoriser l'hydrolyse qui régénérera le gossypol.

Conclusion du chapitre IV

CHIMIE

- Nous avons réussi, par action de dithiols, à synthétiser de nouveaux dérivés, dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone. Ces réactions, catalysées par l'éthérate de trifluoroborate conduisent avec les monothiols à des mélanges complexes.
- Si les groupements phénols du gossypol ou de la gossypolone sont protégés par méthylation, l'action du propanedithiol ou de l'ethanedithiol ne conduit pas aux dithianes ou dithiolanes protégés attendus mais à de nouveaux dérivés cycliques.
- L'étude de l'utilisation de dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone comme synthons doit être poursuivie pour aboutir.

BIOLOGIE

- Les dithianes, dithiolanes et les dérivés thiocycliques du gossypol et de la gossypolone sont peu toxiques.
- Sous l'action de NO en milieu biologique ou d'un sel de nitrosonium, ces dérivés se transforment aisément en dérivés électrophiles plus toxiques dans le cas du gossypol ou régénèrent la molécule de départ dans le cas de la gossypolone.
- Du fait de leur sensibilité à l'action de NO, et de la présence de NO en grande concentration dans les tissus tumoraux, nous formulons l'hypothèse que ces dérivés soufrés pourraient présenter un intérêt dans la recherche d'agents anticancéreux

Le fait de masquer la toxicité d'une molécule en formant un dithiane ou un dithiolane et de révéler cette toxicité par l'action de l'oxyde nitrique, représente à notre connaissance, le premier exemple d'une méthodologie prometteuse pour cibler des médicaments.

La récolte



Conclusion générale

Conclusion générale

Depuis longtemps, l'objectif prioritaire de la recherche sur le gossypol a été l'étude du mécanisme de sa cytotoxicité. Nous avons donc choisi d'évaluer les potentialités thérapeutiques du gossypol et de nouveaux dérivés obtenus par hémisynthèse. La plus grande partie du travail a été réalisée à partir du gossypol racémique et de la gossypolone qui est le principal métabolite du gossypol in vivo.

Dans la première partie de la thèse, nous avons développé l'étude des bases de Schiff du gossypol. Nous avons

- synthétisé de nouvelles molécules dérivées du gossypol et de la gossypolone (alcool gossylique, 14 nouvelles bases de Schiff du gossypol, 11 nouvelles bases de Schiff de la gossypolone)
- montré que les énantiomères du gossypol et de leurs bases de Schiff sont optiquement plus stables que ceux de la gossypolone, et que les énantiomères de la gossypolone ne sont pas stables à température ambiante, mais qu'il est possible de les observer vers 0°C.

D'autre part, nous avons observé :

- que les bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone sont toxiques sur une lignée KB
- que cette toxicité dépend de la structure de la molécule considérée et de ses possibilités d'oxydation dans le milieu biologique.
- que l'énantiomère (-)-gossypol est plus toxique que le (+)-gossypol, cette règle étant valable aussi pour les bases de Schiff des énantiomères du gossypol.
- que les bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone ne peuvent pas être proposées pour leurs activités antipaludiques sans avoir modifié préalablement la structure de la molécule.

Pour expliquer la toxicité cellulaire, nous avons formulé les hypothèses suivantes :

- La toxicité du gossypol et des dérivés cités pourrait être attribuée au pouvoir alkylant de ces molécules
- La plus grande toxicité des dérivés de la gossypolone pourrait aussi provenir de la présence du groupement quinone, agent bio-alkylant réductible potentiel.

Nous pensons que la gossypolone serait donc le premier terme d'une classe nouvelle de bisnaphthoquinones, molécules peu étudiées bien que certaines d'entre elles soient déjà utilisées comme médicament. De plus, la facile racémisation à température ambiante des énantiomères de la gossypolone élargit le domaine d'applications de ces dérivés.

Dans la deuxième partie de thèse, nous avons développé une nouvelle série de dérivés du gossypol et de la gossypolone.

Nous avons réussi, par action de dithiols, à synthétiser de nouveaux dérivés, dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone, mais ces réactions, catalysées par l'éthérate de trifluoroborate conduisent avec les monothiols à des mélanges complexes.

Nous avons remarqué que lorsque les groupements phénols du gossypol sont protégés par méthylation, l'action du propanedithiol ou de l'ethanedithiol ne conduit pas aux dithianes ou dithiolanes protégés attendus mais à de nouveaux dérivés cycliques.

L'utilisation de dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone comme synthons semble difficile sur les molécules où les groupements phénoliques ne sont pas protégés.

La toxicité de ces nouveaux thio-dérivés sur les cellules KB est assez modeste. Par contre, sous l'action de NO ou d'un sel de nitrosonium, ces dérivés se transforment aisément en dérivés électrophiles plus toxiques dans le cas du gossypol ou régénèrent la molécule de départ dans le cas de la gossypolone.

Du fait de leur sensibilité à l'action de NO, et de la présence de NO en grande concentration dans les tissus tumoraux, nous formulons l'hypothèse que ces dérivés soufrés pourraient présenter un intérêt dans la recherche d'agents anticancéreux

Le fait de masquer la toxicité d'une molécule en formant un dithiane ou un dithiolane et de révéler cette toxicité par l'action de l'oxyde nitrique, représente à notre connaissance, le premier exemple d'une méthodologie prometteuse pour cibler des médicaments.

Champ de cotonniers



Partie expérimentale & Annexe

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Appareillage

1. Chromatographie Liquide à Haute Performance analytique (HPLC analytique)

Les analyses HPLC ont été réalisées sur une chaîne constituée d'une pompe SpectraSYSTEM™ P1000XR, d'un injecteur-vanne Rheodyne, d'un détecteur à barette de diodes Waters® 996 PDA et en phase inverse sur des colonnes Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm) et Alltima C8, 5 μ m, (4,6mm x 250mm) suivant les conditions isocratiques suivantes :

- (I) : A/B = 7/93, débit : 1mL/mn
(II) : A/B = 10/90, débit : 1mL/mn
(III) : A/B = 20/80, débit : 1mL/mn
(IV) : A/B = 30/70, débit : 1mL/mn
Avec A = 5% ACN + 95% H₂O + 0.1% TFA
B = 100% ACN + 0.1% TFA

Le coefficient de capacité k' des produits synthétisés est indiqué. Il correspond au rapport $T_r - T_o / T_o$ (T_r et T_o étant les temps de rétention du produit et le temps de rétention nul, respectivement)

2. Chromatographie Liquide à Haute Performance préparative (HPLC préparative)

L' HPLC préparative a été réalisée avec le système suivant : pompe HPLC Waters 515, détecteur UV Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, 263 nm, colonnes PrepPak® Cartridge C18 en phase inverse 10 μ m 125Å (25 mm i.d. x 100 mm), élution isocratique par 20%A', 80%B', 5mL/mn (A' = CH₃CN; B' = H₂O), injections de 100 microlitres de soluté à 150 mg/mL par une vanne manuelle Rheodyne®.

3. Spectrométrie de Masse

Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés sur les spectromètres suivants :

- AEI MS-50 pour l'impact électronique (IE)
- AE MS-9 pour l'ionisation chimique (IC)
- KRATOS MS-80 RF pour la technique de Fast Atom Bombardment (FAB)
- Navigator-Thermoquest pour l'ionisation par électrospray (ESI)
- HPLC couplée à la masse (LC-MS) :

LC : Type de colonne C18 - 4,6 mm d.i
Volume injecté : 20 μ l

Débit : 1 mL/min

Solvants : A/B = 20/80 avec A = 5% ACN + 95% H₂O + 0.1% TFA

B = 100% ACN + 0.1% TFA

UV : $\lambda = 263$ nm

ESI-MS : Débit : 300 μ l/min

Cône : 20 V

Capillaire : 3,5 kV

Temp. : 180°C

Pression N₂ : 6 bar

Les masses sont exprimées en unité de masse par charge élémentaire (m/z)

4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN du proton (RMN ¹H) ont été réalisés en solution dans des solvants deutériés et enregistrés sur des appareils de type Brüker AM-200 à 200 MHz, AM-250 à 250 MHz, AM-300 à 300 MHz, AM-400 à 400 MHz, AM-600 à 600 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz (Hz). Les caractérisations sont rapportées de la façon suivante : δ : déplacement chimique en ppm (multiplicité, nombre de protons, attribution). Les abréviations s, sl, sd, d, dd, t, q, m signifient respectivement : singulet, singulet large, doublet de singulet, doublet, doublet de doublet, triplet, quadruplet et multiplet.

Les spectres de RMN du carbone (RMN ¹³C) ont été réalisés en solution dans des solvants deutériés et enregistrés sur des appareils de type Brüker AM-200 à 50,2 MHz, AM-250 à 62,5 MHz, AM-300 à 75 MHz, AM-400 à 100 MHz, AM-600 à 150,91 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm en prenant le pic central du solvant deutérié comme référence. Une corrélation a été effectuée sur de nombreux produits afin de permettre l'attribution de signaux.

Les solvants utilisés sont le chloroforme (CDCl₃), le méthanol (CD₃OD) ou le DMSO (DMSO d₆) deutériés.

5. Spectroscopie Infra-rouge (IR)

Les spectres en infra-rouge ont été enregistrés à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer Spectrum BX FT-IR, sur des produits qui se dissolvent dans le chloroforme ou en dispersion dans des pastilles de KBr.

6. Pouvoir rotatoire [α]_D

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés au moyen d'un polarimètre électronique JASCO P-1010, à température ambiante, pour la raie D du sodium (589nm). Les échantillons ont été mis en solution dans le chloroforme dans une cuve de 10 cm de longueur, les concentrations sont exprimées en mg/mL.

7. Dichroïsme circulaire

Les dichroïsme circulaire ont été mesurés sur un spectropolarimètre JASCO J-810, à température ambiante. Les échantillons ont été mis en solution dans le chloroforme dans une cuve de 1 mL, les concentrations sont exprimées en mg/mL.

8. Points de fusion (F)

Les points de fusion ont été mesurés sur des échantillons placés dans des capillaires avec un appareil BÜCHI B-540, et ne sont pas corrigés. Certains produits sont de couleur très foncée (violette ou brune) et la détermination de leurs points de fusion est trop imprécise pour pouvoir être rapportée avec exactitude. D'autre part, comme il s'agit de mélanges racémiques, la cristallisation des produits est très difficile et nous avons observé une décomposition dans la plupart des cas. Seuls les points de fusion nets ont donc été décrits.

Nomenclature : le nom des molécules est conforme à la nomenclature IUPAC, en anglais, selon le logiciel Autonom 1.1 (Beilstein Institut).

II. Extraction et Purification du Gossypol

Les méthodes d'extraction du gossypol sont décrites dans l'annexe 1, nous avons choisi la méthode de Carruth (1918) que nous avons améliorée.

a/ Méthode d'extraction du Gossypol de Carruth modifiée

Le concassage des graines de coton + bourre a été effectué avec un broyeur muni d'une grosse grille, le diamètre des trous de la grille est de 2.5 cm; longueur des couteaux : 19 cm. La séparation des graines concassées de la bourre a été faite à l'aide d'un tamis; diamètre des mailles : 0,5 cm.

Le broyage a été réalisé sur un broyeur à couteaux muni d'une petite grille diamètre des trous de la grille 3 mm, longueur des couteaux 4 cm.

L'extraction a été faite à l'aide d'un Soxhlet dont le tube peut contenir 1 kg de poudre de graines de coton, muni d'un ballon tricol de 4 litres et d'un bouilleur électrique (bain-marie) réglé vers 40-60°C.

On commence par concasser les graines avec le gros broyeur puis on sépare par tamisage la bourre des graines concassées.

On renouvelle cette opération trois fois afin de récupérer le maximum de graines.

Les graines sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur à petite grille. On effectue un déshuilage par extraction au Soxhlet avec de l'éther de pétrole : 1Kg de graines broyées est introduit dans le tube du Soxhlet et 2,5 litres d'éther de pétrole dans le ballon. Le déshuilage se fait à douce ébullition (40°C), pendant 16 heures. A la fin de cette étape, la poudre, essorée, sortie du Soxhlet et séchée à l'air ambiant.

L'extraction du gossypol à partir des graines broyées déshuilées et séchées se fait dans les mêmes conditions avec de l'éther éthylique. On introduit dans le ballon du Soxhlet 2,5 litres d'éther éthylique, et une ébullition moyenne (40°C) est maintenue pendant 16 heures environ et est arrêtée dès que l'extrait de la cartouche apparaît clair dans le siphon.

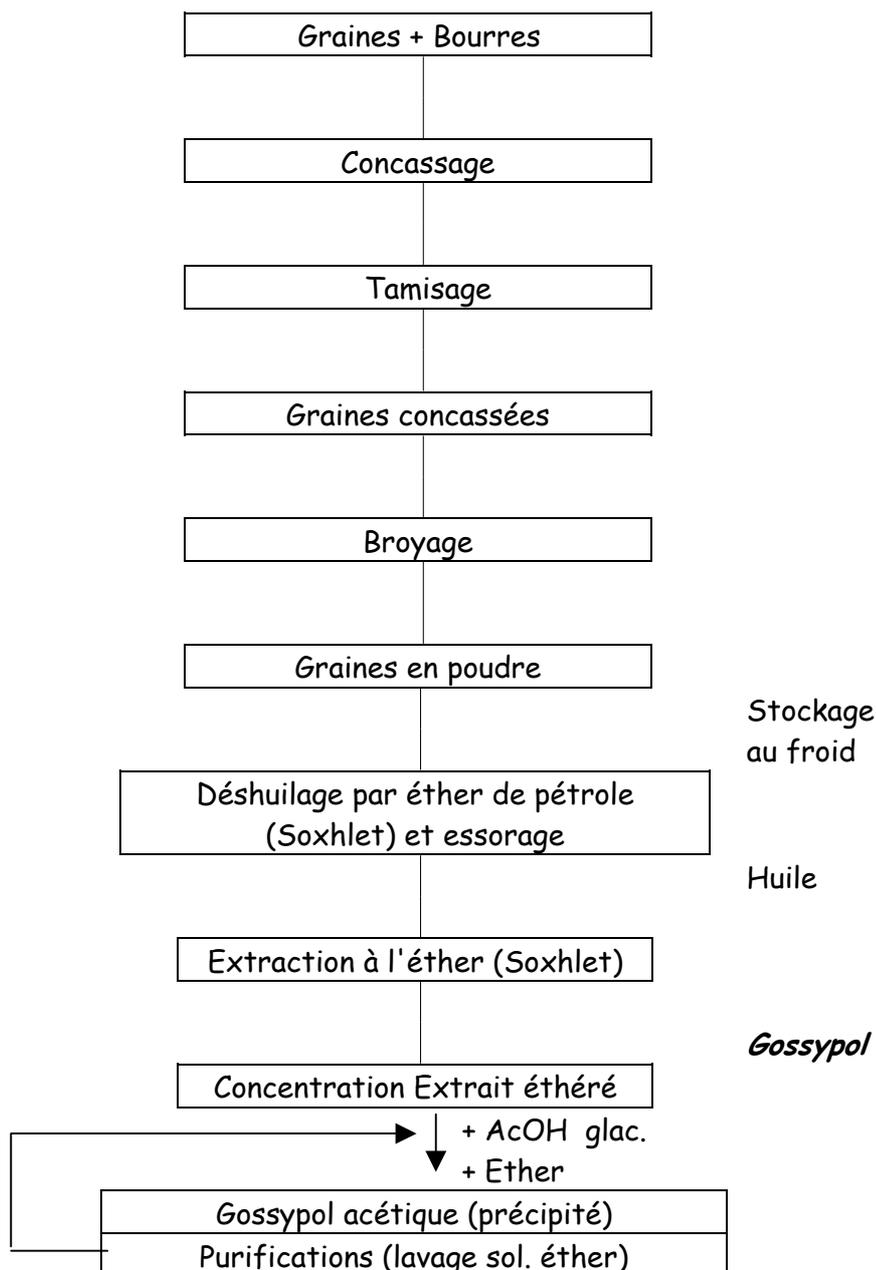
L'extrait éthéré est ensuite filtré. Le filtrat est concentré au maximum au rotavapor à température ambiante. On ajoute ensuite au concentrat 20 mL d'acide acétique glacial et 100 mL d'éther éthylique anhydre, aussitôt un dépôt de gossypol acétique commence à se former, on bouche bien le ballon pour éviter toute oxydation et on le protège avec une feuille d'aluminium des effets de la lumière. On laisse en chambre froide et on filtre après 24h.

Le précipité obtenu est lavé à l'éther de pétrole et est séché au dessiccateur sur P_2O_5 et sous vide.

On ajoute 10 mL d'heptane au filtrat et on évapore à nouveau pour entraîner l'excès d'acide acétique par évaporation et on le traite par le même protocole que ci-dessus. Cette méthode d'extraction est illustrée dans le schéma suivant :

Schéma 1

Extraction par la méthode de Carruth modifiée

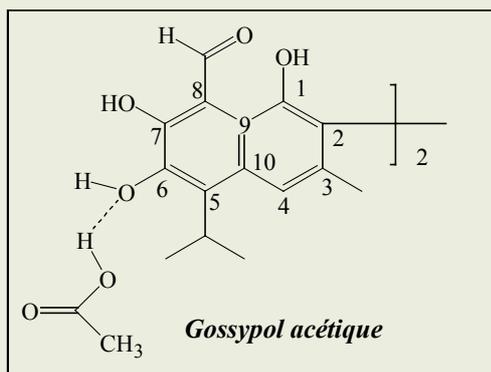


Au commencement de notre travail, nous avons obtenu une moyenne de 2.1 g de gossypol acétique extrait par kg d'amandes de coton d'origine camerounaise. Par la suite, nous avons amélioré les conditions de l'extraction (1 à 2 supplémentaires) et de la précipitation du gossypol acétique (à l'obscurité en chambre froide, évaporation à l'abri

de la lumière) pour obtenir des rendements plus proches de 5.1 g de gossypol acétique par kg d'amandes. L'analyse HPLC de même que la RMN, confirment la pureté du produit obtenu.

Composé 1

1,6,7,1',6',7' - Hexahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - Diméthyl - [2,2']-binaphthalenyl - 8,8' - Dicarbaldehyde (Gossypol)



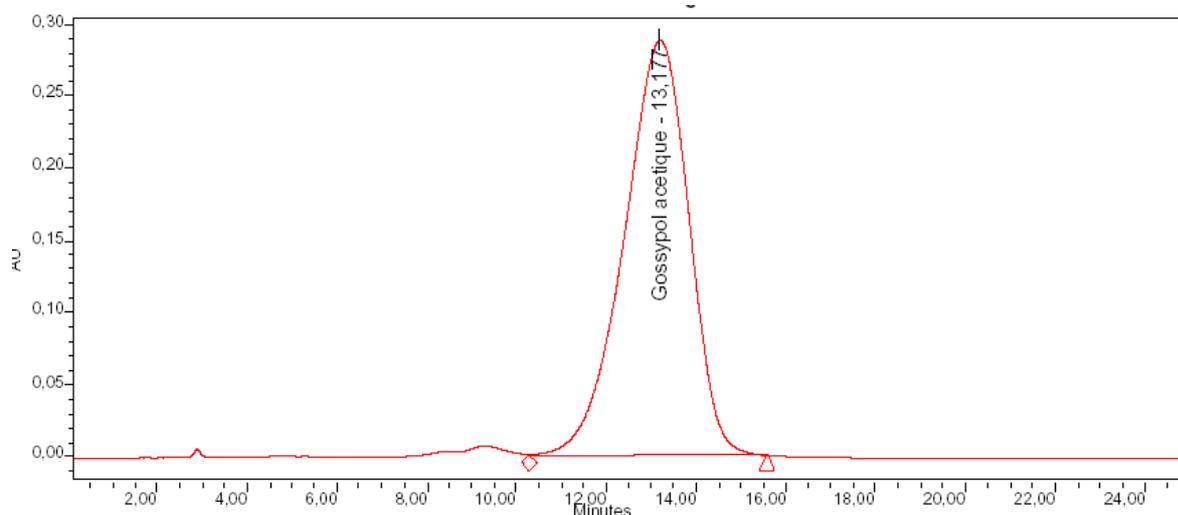
$C_{30}H_{30}O_8$

MW = 518,5 (gossypol acétique MW = 578,6)

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (III) : A/B= 20/80, avec A = 5%ACN + 95%H₂O + 0.1%TFA ; B = 100% ACN + 0.1%TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 2140 psi.
- k'(III) = 4,38.



HPLC du Gossypol acétique

F : 183-184°C

$[\alpha]_D = -19,4^\circ$ (c = 0,25 ; CDCl_3)

IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 3504 (OH), 2875 - 3022 (CH), 1712 (CHO), 1623 (OH.....O=C).

SM (FAB) m/z : 525 (M+Li) ; 501 (MH-H₂O).

RMN ¹H (300MHz, CDCl_3) : 1.54 (dd, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 2.08 (s, 3H, CH₃COOH) 2.14 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.90 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 5.93 (s, 2H, 2 OH en positions 1,1'), 6.51 (s, 2H, 2 OH en positions 6,6'), 7.80 (s, 2H, 2 Ar-H), 11.12 (s, 2H, 2 CHO), 15.13 (s, 2H, 2 OH en positions 7,7').

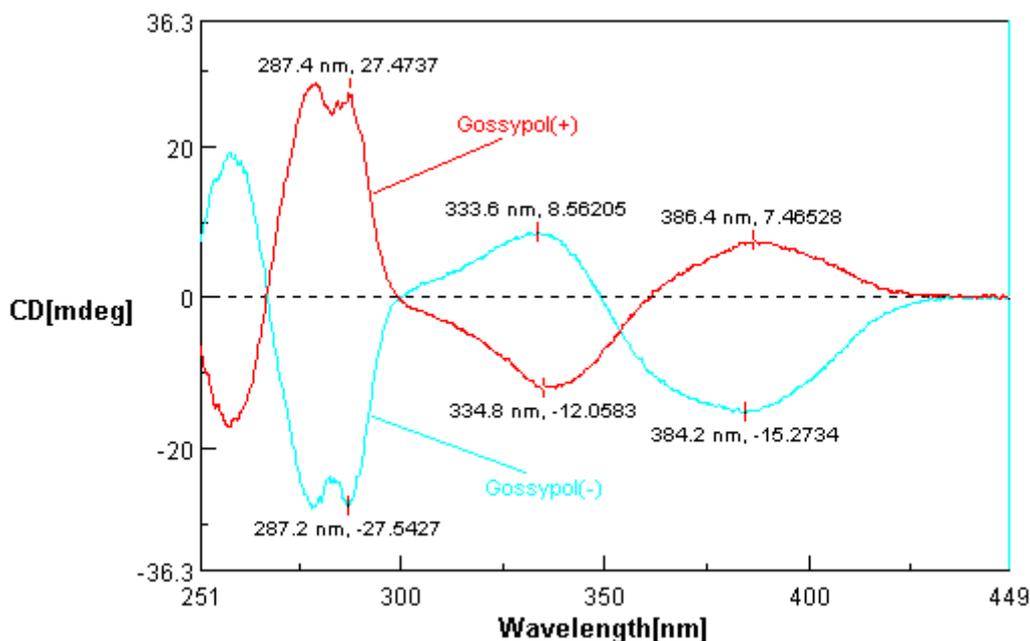
RMN ¹³C (75MHz, CDCl_3) : 20.3 (HC-(CH₃)₂ ; Ar-CH₃), 27.9 (HC-(CH₃)₂), 114.7 ; 115.8 ; 118.2 ; 119.7 ; 129.8 ; 133.7 ; 134.2 ; 143.5 ; 150.5 ; 156.2 (carbones du noyau naphthalénique), 199.4 (CHO).

b/ Enantiomères du gossypol :

Le (+)-gossypol et le (-)-gossypol nous ont été fournis par Dr Michael K. DOWD.

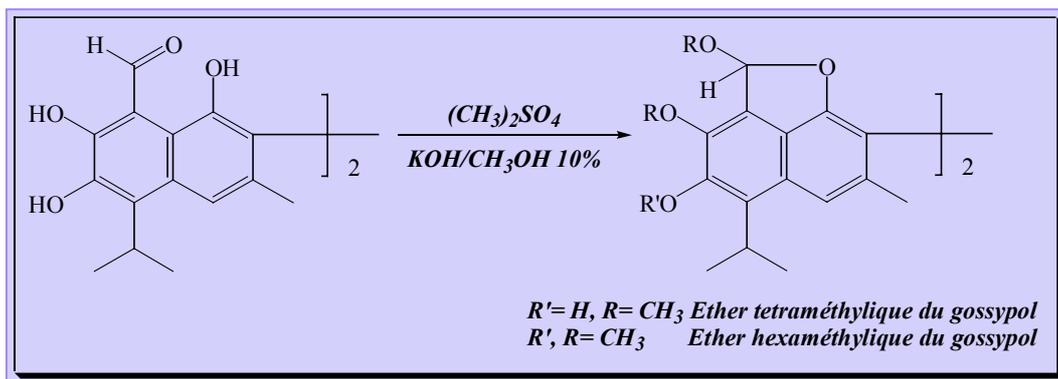
Gossypol (-) $[\alpha]_D = -417^\circ$ (c = 0,27 ; CDCl_3)

Gossypol (+) $[\alpha]_D = +396^\circ$ (c = 0,27 ; CDCl_3)



Courbe de Dichroïsme Circulaire de (+)-gossypol et de (-)-gossypol (0.027mg /mL de CHCl_3)

III. Protection du Gossypol par méthylation des groupes phénoliques

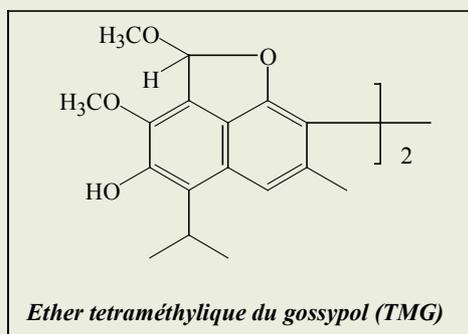


1/ Synthèse de l'éther tétraméthyle du Gossypol

Mode opératoire : (par le sulfate de méthyle en présence de potasse méthanolique dans le méthanol (Morris et al, 1937). On dissout 1g (1,73 mmole) de gossypol acétique dans 5mL de méthanol et 5 mL de sulfate de méthyle, on chauffe très légèrement au bain marie puis, lorsque tout est dissous, on ajoute 7 mL de potasse méthanolique à 10 % goutte à goutte. Il faut éviter que le mélange réactionnel ne soit trop basique . L'adjonction de potasse (0,5 mL/5 minutes) est une phase critique dont dépendra la pureté du produit . On laisse la réaction se poursuivre pendant la nuit, le couleur du mélange réactionnel devient brun foncé et un précipité de sulfate de potassium est formé. Au matin, on détruit le sulfate de méthyle en excès par une solution aqueuse de soude à 10%. Un précipité est formé, on le sépare par filtration puis le lave avec du méthanol froid. L'analyse HPLC indique la présence d'un seul produit.

Composé 2

5,5' - diisopropyl - 2,4,2',4' - tetramethoxy - 7,7' - dimethyl - 2H,2'H - [8,8']bi[naphtho [1,8-bc]furan] - 3,3' - diol



$C_{34}H_{38}O_8$

MW = 574,7

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (II) : A/B = 10/90, avec A = 5%ACN + 95%H₂O + 0.1%TFA ; B = 100% ACN + 0.1% TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 1500psi.
- k'(II) = 2,82

Rendement : 85% (0,85g).

SM (FAB) m/z : 575 (MH⁺).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.52 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 2.29 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.83 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 3.28 (s, 6H, 2 O-HC-OCH₃), 4.19 (s, 6H, 2 OCH₃ en positions 7,7'), 6.28 (s, 2H, 2 OH 6,6' en positions), 7.1 (s, 2H, 2 O-HC-O-OCH₃), 7.42 (s, 2H, 2 Ar-H).

RMN ¹³C (300MHz, CDCl₃) : 20.6 (HC-(CH₃)₂), 21.0 (Ar-CH₃), 26.8 (HC-(CH₃)₂), 51.7 (O-HC-OCH₃), 58.2 (OCH₃ 7,7' en positions), 107.5 (O-HC-O-OCH₃), 109.0; 113.3; 114.1; 121.0; 125.3; 126.6; 136.9; 141.7; 145.7; 155.3 (carbones du noyau naphthalénique).

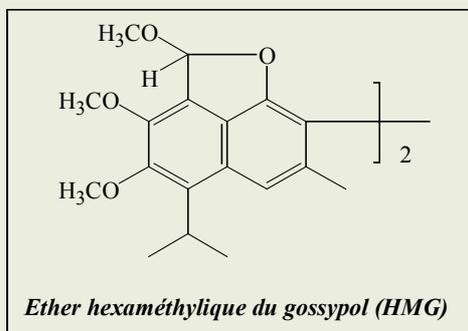
2. Synthèse de l'éther hexaméthylique du Gossypol

Mode opératoire : On dissout 2g (3,46mmole) de gossypol acétique dans 20 mL de méthanol et 20 mL de sulfate de méthyle, on chauffe au bain-marie puis, lorsque tout est dissous, on ajoute 32 mL de potasse méthanolique à 10 % goutte à goutte. Le mélange réactionnel devient basique puis rapidement très acide après chaque ajout de potasse méthanolique. L'apparition de l'acidité est de moins en moins rapide. Finalement, le mélange réactionnel est soumis à une agitation magnétique sous argon, pendant 48h à température ambiante. Ensuite, le sulfate de méthyle en excès est décomposé par une solution aqueuse de soude à 10%, un précipité blanc est formé, on l'isole par filtration puis le lave avec du méthanol froid.

L'analyse HPLC indique la présence de 2 produits, l'un d'eux étant majoritaire (72,5%). Un essai de séparation sur gel de silice L= 50 cm; d = 2,1 cm; toluène éther 9/1) a permis de séparer deux fractions de même masse (MH⁺ = 603). Ce résultat est à rapprocher de ceux de Seshradi et al. qui a observé plusieurs isomères de l'éther hexaméthylique du gossypol (*Seshadri TR & Sharma NN, 1975^(a)*)

Composé 3

5,5' - diisopropyl - 2,3,4,2',3',4' - hexamethoxy - 7,7' - dimethyl - 2H,2'H - [8,8']bi [naphtho[1,8-bc]furanyl]



$C_{36}H_{42}O_8$

MW = 602,7

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (II) : A/B = 10/90, avec A = 5%ACN + 95%H₂O + 0.1%TFA ; B = 100% ACN + 0.1% TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 1500 psi.
- k'(II) = 6,14 (83%) ; 6,53 (17%)

Rendement : 77% (1,6g)

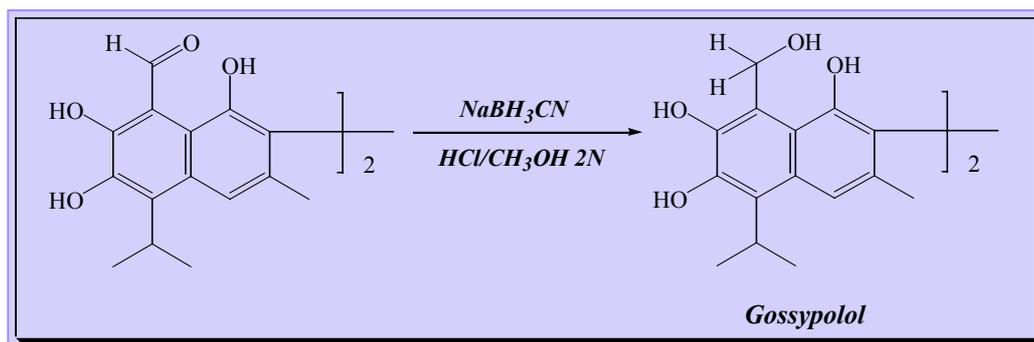
IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹ : 2875 - 3022 (CH; OCH₃).

SM (FAB) m/z : 603 (MH⁺).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.54 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 2.32 (m, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.31 - 3.46 (m, 6H, 2 O-HC-OCH₃), 3.83 - 4.19 (m, 14H, 2 HC-(CH₃)₂), 4 OCH₃ en positions 6,7,6',7'), 6.95 - 7.06 (m, 2H, 2 O-HC-O- OCH₃), 7.48 (m, 2H, 2 Ar-H).

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃) : 21.1 (Ar-CH₃), 22.1 (HC-(CH₃)₂), 27.1 (HC-(CH₃)₂), 52.4 & 52.7 (O-HC-OCH₃); 54.0 & 54.4 (OCH₃ en positions 7,7'), 58.2 & 58.5 (OCH₃ en positions 6,6'), 61.4 (O-HC-O-OCH₃), 108.5 & 108.7; 110.4 ; 115.0 & 115.2 ; 116.5 ; 123.7 ; 124.9 & 125.1 ; 136.6, 136.7 & 137.0 ; 147.6 ; 150.0 ; 154.9 (carbones du noyau naphthalénique).

IV. Réduction du Gossypol : synthèse du Gossypolol (alcool gossylique)

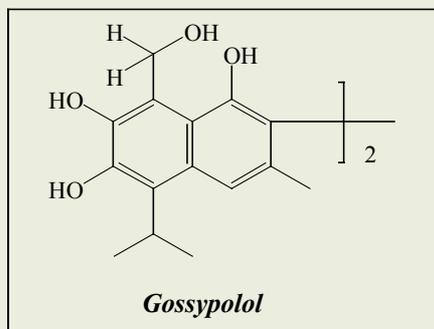


Mode opératoire (suivant la méthode générale de réduction décrite par Borch et al. (Borch RF et al., 1971) : A une solution de 1g (1,73 mmole) du gossypol acétique dissous dans 20mL de méthanol a été ajouté 108mg (1,73 mmole) de NaBH_3CN . Ensuite, une solution d'acide chlorhydrique 2N dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte dans le mélange réactionnel pour maintenir son pH vers 3 à 4. Ce mélange est soumis à une agitation magnétique, en l'absence de lumière et sous argon, pendant 5h à température ambiante. Ensuite, le méthanol est évaporé sous pression réduite, et le résidu est repris dans 10mL d'eau, est saturé avec du chlorure de sodium et la phase aqueuse est extraite par l'éther (3x15mL). Les phases organiques réunies, séchées sur sulfate de sodium, sont filtrées et évaporées sous pression réduite pour donner un résidu (1g). La réaction n'est pas complète, nous avons observé par HPLC la présence de gossypol dans le produit brut.

Pour éliminer le gossypol, nous avons utilisé le réactif T de Girard : 500mg de produit et 100mg du réactif T de Girard sont dissous dans 50mL d'alcool contenant 10% d'acide acétique. Le mélange réactionnel est chauffé au bain-marie (60°C) pendant 30 minutes. Puis, le mélange réactionnel est laissé refroidir à température ambiante, 50mL d'eau sont alors ajoutés et la phase aqueuse est extraite par l'éther (3x15mL). Les phases organiques sont réunies, lavées, séchées sur le sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par une précipitation dans toluène/hexane, on obtient 75mg (Rdt = 15%).

Composé 4

8,8' - bis - hydroxymethyl - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']-binaphthalenyl - 1,6,7,1',6',7' - hexaol (Gossypolol ou alcool gossylique)



$C_{30}H_{34}O_8$

MW = 522,6

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Condition de l'HPLC analytique :

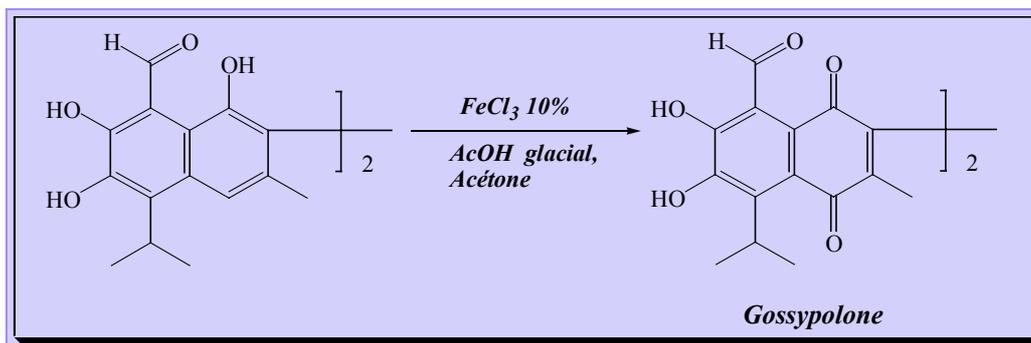
- Colonne : Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- **(III)** : A/B = 20/80, avec A = 5%ACN + 95%H₂O + 0.1%TFA ; B = 100% ACN + 0.1%TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 2140 psi.
- $k'(\text{III}) = 2,58$

IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹ : 3517, 2962 (OH).

SM (FAB) m/z : 543 (M+Na).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : ce produit est très fragile, il décompose facilement (explication voir chapitre II) 1.5 (HC-(CH₃)₂), 2.2 (Ar-CH₃), 3.9 (HC-(CH₃)₂), 5.6 (CH₂OH).

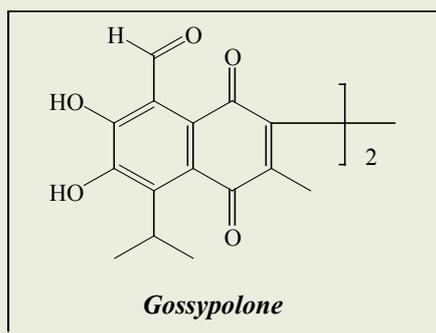
V. Oxydation du Gossypol : synthèse de la Gossypolone



Mode opératoire : la réaction a été effectuée par la méthode décrite par Haas et al. (Haas RH & Shirley DA, 1965). 1.5g (2.59 mmole) du gossypol acétique sont dissous dans un mélange de 75mL d'acétone et de 150mL d'acide acétique glacial. Le mélange réactionnel est chauffé au bain-marie (60-70°C) en ajoutant 112.5mL (42 mmole) de la solution aqueuse 10% de chlorure de fer, pendant 15 minutes. Ensuite, le mélange réactionnel est laissé refroidir à température ambiante, 200mL d'eau sont alors ajoutés pour former un précipité noir qui contient le sel de fer et qui est séparé par la filtration. Le résidu obtenu est traité avec l'acide sulfurique 20%, la phase aqueuse est extraite par l'éther, les phases organiques sont réunies, lavées, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par une précipitation dans chloroforme/hexane.

Composé 5

6,7,6',7' - Tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 1,4,1',4' - tetraoxo - 1,4,1',4' - tetrahydro - [2,2']binaphthalenyl - 8,8' - dicarbaldehyde (Gossypolone)



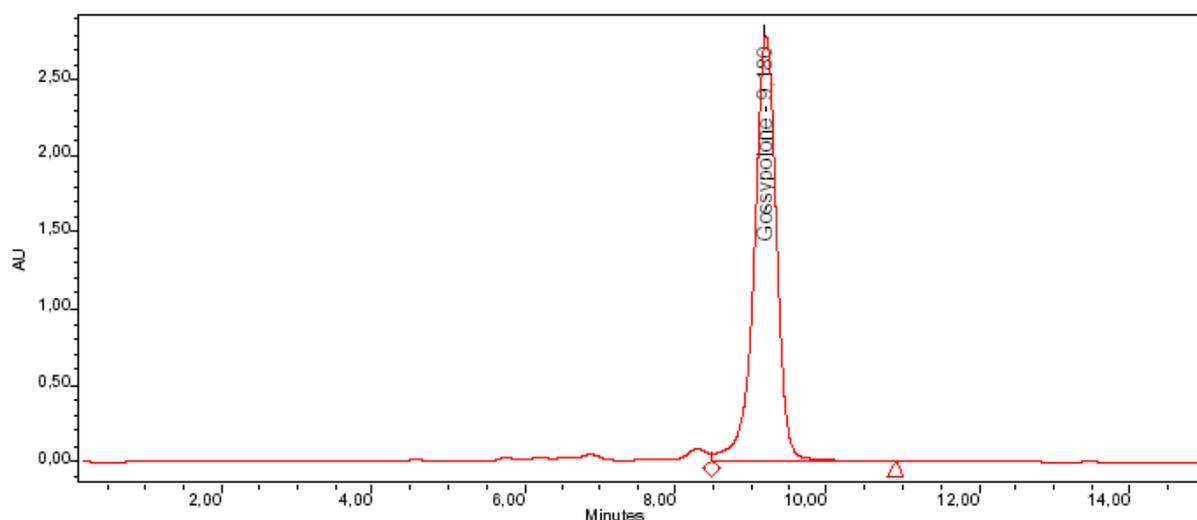
$C_{30}H_{26}O_8$

MW = 546,5

Forme du produit : solide amorphe vert foncé

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (III) : A/B = 20/80, avec A = 5%ACN + 95%H₂O + 0.1%TFA ; B = 100% ACN + 0.1%TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 2140 psi.
- k' (III) = 2,75



HPLC de la Gossypolone

Rendement : 85% (1.2g)

$[\alpha]_D^{25} = -90,4^\circ$ (c = 0,25 ; CDCl₃)

IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹ : 3514 (OH), 2876 - 3021 (CH), 1640 (OH.....C=O).

SM (FAB) m/z : 553 (M+Li).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.46 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(**CH**₃)₂), 2.14 (s, 6H, 2 Ar-**CH**₃), 4.11 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 **HC**-(CH₃)₂), 6.61 (s, 2H, 2 **OH** en positions 6,6'), 11.62 (s, 2H, 2 **CHO**), 13.13 (s, 2H, 2 **OH** en positions 7,7')

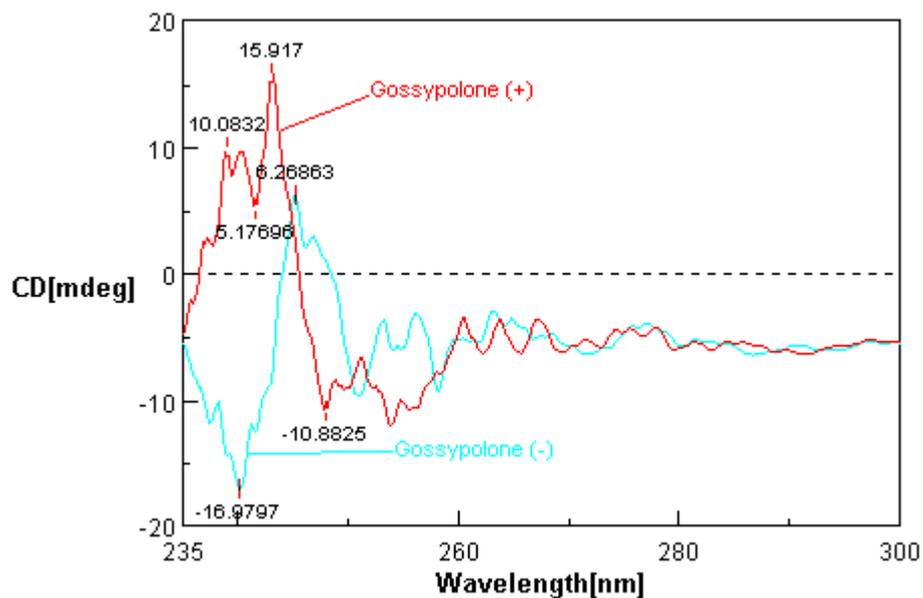
RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃) : 19.8 (Ar-**CH**₃) 19.9 (HC-(**CH**₃)₂), 28.8 (**HC**-(CH₃)₂), 116.1 ; 127.2 ; 127.8 ; 138.3 ; 141.7 ; 147.4 ; 149.5 ; 152.6 (carbones du noyau naphthalénique), 184.6 ; 186.7 (C=O du groupement quinonique), 198.6 (**CHO**).

Enantiomères de la gossypolone : (essais de synthèse)

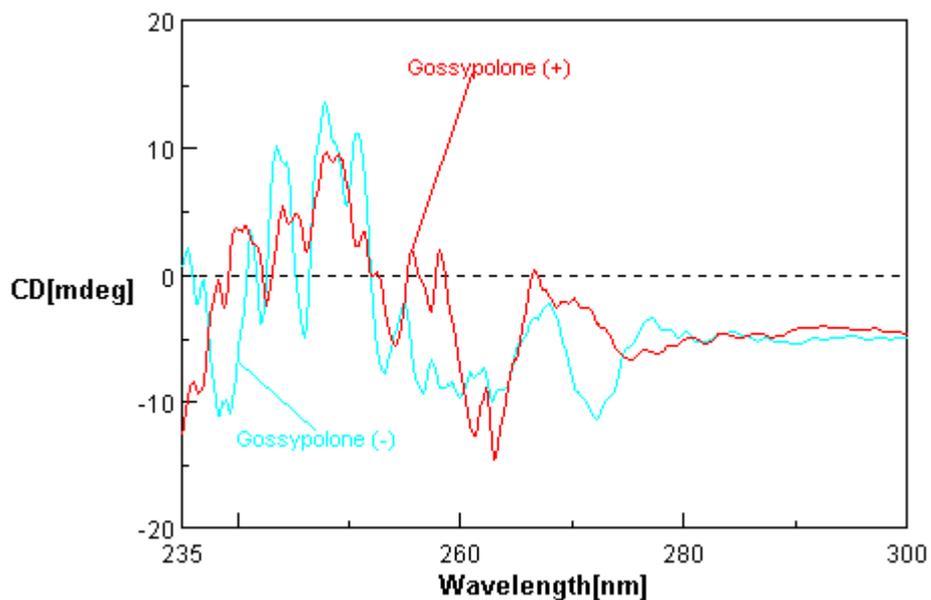
Nous avons synthétisé les énantiomères de la gossypolone à partir des énantiomères du gossypol par la méthode générale décrite ci-dessus mais à des températures différentes (75°C et température ambiante).

Les courbes de Dichroïsme Circulaire des énantiomères de la gossypolone synthétisées à des température différentes sont les suivantes

Synthèse à température ambiante



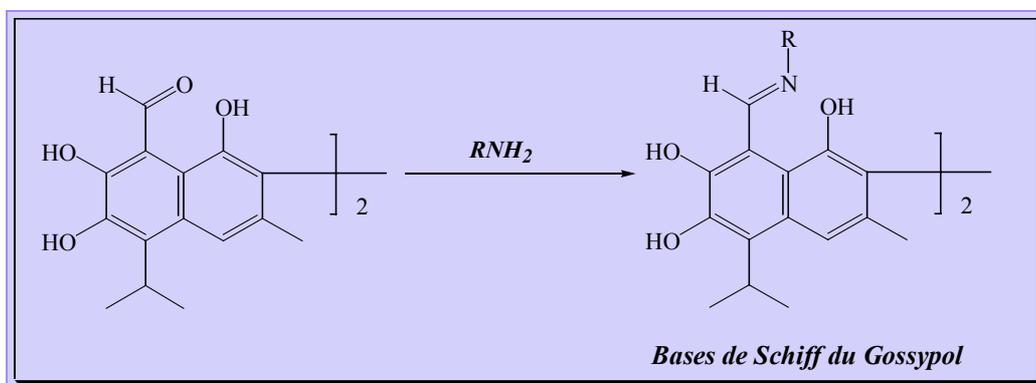
Synthèse à 75°C



Courbe de Dichroïsme Circulaire de (+)-gossypolone et de (-)-gossypolone (0.1mg/mL CHCl₃)

VI. Bases de Schiff du Gossypol et de la Gossypolone

1. Bases de Schiff du Gossypol



Mode opératoire : 200 mg de gossypol acétique (0,35 mmole) sont dissous dans un mélange de 5mL d'éther et 3mL d'isopropanol sous argon. L'amine est ajoutée (8 fois la quantité molaire du gossypol acétique). Le mélange est chauffé dans un bain-marie à 45°C pendant 5 minutes, puis, gardé sous argon pendant 2h à température ambiante. Le précipité formé est séparé par filtration puis est dissous dans le chloroforme et est lavé à l'eau. Le produit est finalement recristallisé dans l'acétate d'éthyle (ou reprécipité de sa solution dans le chloroforme par l'hexane, dans les cas difficiles: heptylamine et dodécylamine). A noter que la base de Schiff obtenue par action de la méthylamine (solution à 10 % dans l'éthanol) est insoluble dans tous les solvants que nous avons essayés: éther, acétate d'éthyle, chloroforme, dichlorométhane, diméthylfomamide.

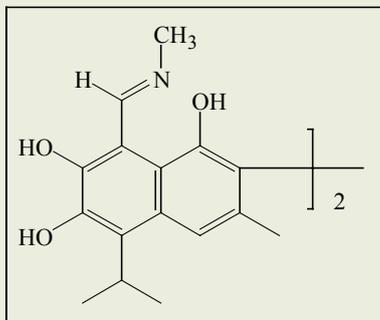
La pureté de ces produits est évaluée par HPLC analytique dans les conditions suivantes :

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (II) : A/B = 10/90, avec A = 5%ACN + 95%H₂O + 0.1%TFA ; B = 100% ACN + 0.1% TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 1174 psi.

Composé 6

5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 8,8' - bis - methyliminomethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol



$C_{32}H_{36}O_6N_2$

MW = 544,6

Forme du produit : solide amorphe jaune.

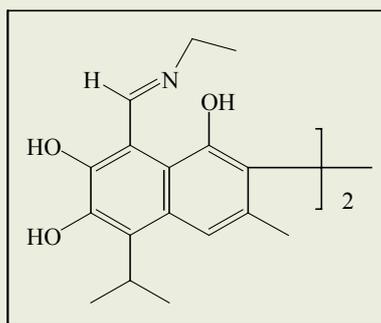
Rendement : 95% (180mg)

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3436 (OH), 2867 - 2959 (CH), 1631 (C=N).

Comme nous avons indiqué ci-dessus, la méthylimine du gossypol ne se dissout pas dans la plupart des solvants organiques. La faible solubilité de ce dérivé ne nous permet pas de faire des analyses RMN ou la masse.

Composé 7

8,8' - Bis - ethyliminomethyl - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol



$C_{34}H_{40}O_6N_2$

MW = 572,7

Forme du produit : solide amorphe jaune .

Rendement : 96% (190mg)

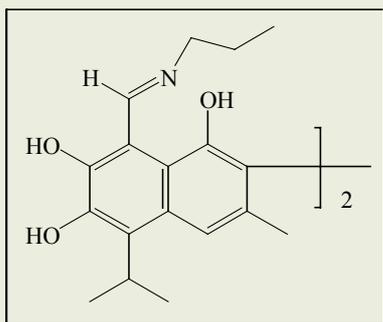
HPLC : $k'(II)$ = 0,60

SM (FAB) m/z : 573 (MH⁺).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.37 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 HC=N-CH₂-CH₃), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 2.12 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.52 (q, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₃), 3.74 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 7.59 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.69 (d, 2H, 2 HC=N- CH₂-CH₃) ; 13.34 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7').

Composé 8

5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 8,8' - bis - propyliminomethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol



C₃₆H₄₄O₆N₂

MW = 600,7

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 92% (191 mg)

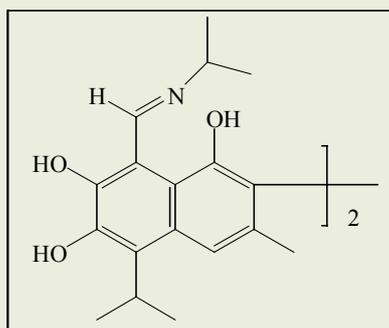
HPLC : k'(II) = 0,83

SM (FAB) m/z : 601 (MH⁺).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.02 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₃), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.73 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₃), 2.13 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.46 (t, 4H, J=6.9Hz, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₃), 3.74 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 7.60 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.65 (s, 2H, 2 HC=N- CH₂-CH₂-CH₃) ; 13.27 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7').

Composé 9

5,5'- diisopropyl - 8,8' - bis - (isopropylimino-methyl) - 3,3' - dimethyl - [2,2'] binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol



$C_{36}H_{44}O_6N_2$
MW = 600,7

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 96% (201 mg).

HPLC : $k'(\text{II}) = 0,80$

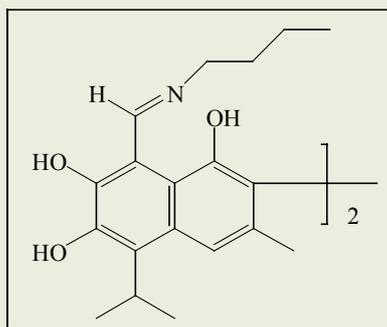
IR ($CHCl_3$) $\nu_{MAX} \text{ cm}^{-1}$: 3491 (OH), 2928 - 3000 (CH), 1616 (C=N).

SM (FAB) m/z : 601 (MH^+).

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1.39 ; 1.40 (d, 6H, $J=6.6\text{Hz}$, 2 $HC=N-CH-(CH_3)_2$), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 2.13 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.73 (m, 4H, 2 $HC=N-CH-(CH_3)_2$ and 2 $HC-(CH_3)_2$), 7.61 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.72 (s, 2H, 2 $HC=N-CH-(CH_3)_2$) ; 13.28 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7').

Composé 10

8,8'- Bis - butyliminomethyl - 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol



$C_{38}H_{48}O_6N_2$
MW = 628,8

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 90% (196 mg)

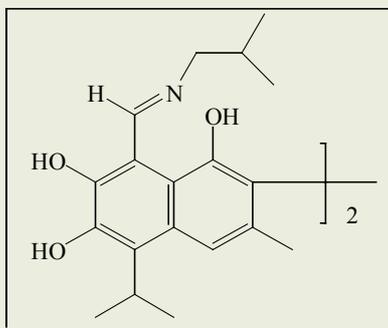
HPLC : $k'(\text{II}) = 1,11$

SM (FAB) m/z : 635($M+Li$), 629 (MH^+);

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 0.98 (t, 6H, $J=7.3\text{Hz}$, 2 $HC=N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 1.43 (m, 4H, 2 $HC=N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 1.72 (m, 4H, 2 $HC=N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 2.13 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.49 (t, 4H, $J=6.9\text{Hz}$, 2 $HC=N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 3.74 (m, 2H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 7.61 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.65 (s, 2H, 2 $HC=N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 13.35 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7').

Composé 11

*8,8'- Bis - (sec-butylimino-methyl) - 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']
binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol*



$C_{38}H_{48}O_6N_2$

MW = 628,8

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 90% (196 mg)

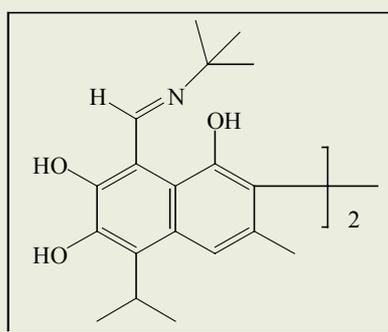
HPLC : $K'(\text{II}) = 1,10$

SM (FAB) m/z : 635(M+Li), 629 (MH⁺);

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.98 (t, 12H, J=7.3Hz, 2 CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.53 ; 1.54 (d, J=7.0Hz, 12H, 2 CH-(CH₃)₂), 1.67 (m, 4H, 2 CH₂-CH-(CH₃)₂), 2.12 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.44 (m, 2H, 2 CH₂-CH-(CH₃)₂), 3.76 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 CH-(CH₃)₂), 7.61 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.7 (d, 2H, 2 HC=N-CH₂-CH-(CH₃)₂), 13.3 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7'),

Composé 12

*8,8'- Bis - (tert-butylimino-methyl) - 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']
binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol*



$C_{38}H_{48}O_6N_2$

MW = 628,8

Forme du produit : solide amorphe jaune.

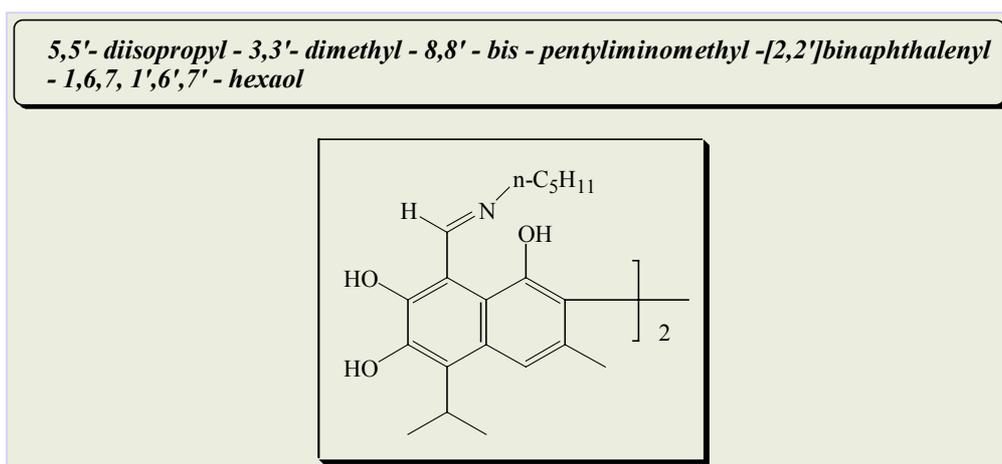
Rendement : 87% (190 mg)

HPLC : $K'(\text{II}) = 1,05$

SM (FAB) m/z : 635(M+ Li), 629 (MH⁺)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.27 (s, 18H, 2 C-(**CH**₃)₃), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 CH-(**CH**₃)₂), 2.13 (s, 6H, 2 Ar-**CH**₃), 3.74 (m, J=7.0Hz, 2 **CH**-(CH₃)₂), 7.62 (s, 2H, 2 Ar-**H**), 9.84 (d, 2H, 2 HC=N-C-(CH₃)₃) , 13.43 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7')

Composé 13



C₄₀H₅₂O₆N₂

MW = 656,8

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 83% (190 mg).

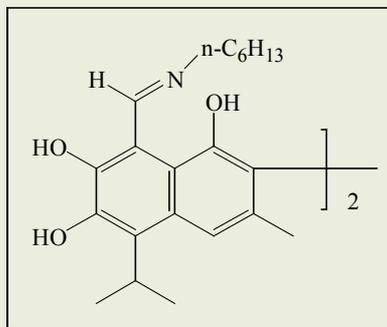
HPLC : k'(II) = 1,49

SM (FAB) m/z : 663(M+ Li), 657 (MH⁺);

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.91 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 HC=N-(CH₂)₄-**CH**₃), 1.34 (m, 8H, 2 HC=N-(CH₂)₃-**CH**₂-CH₃, 2 HC=N-(CH₂)₂-**CH**₂-CH₂-CH₃), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(**CH**₃)₂), 1.71 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-**CH**₂-(CH₂)₂-CH₃), 2.13 (s, 6H, 2 Ar-**CH**₃), 3.49 (t, 4H, J=6.9Hz, 2 HC=N-**CH**₂-(CH₂)₃-CH₃), 3.74 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 **HC**-(CH₃)₂), 7.61 (s, 2H, 2 Ar-**H**), 9.64 (s, 2H, 2 **HC**=N-(CH₂)₄-CH₃), 13.31 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7').

Composé 14

**8,8'- Bis - hexyliminomethyl - 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl -[2,2']binaphthalenyl
- 1,6,7, 1',6',7' - hexaol**



$C_{42}H_{56}O_6N_2$

MW = 684,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 86% (204 mg)

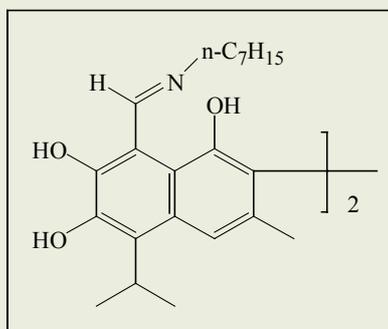
HPLC : $k'(II)$ = 2,04

SM (FAB) m/z : 691(M+Li)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 0.87 (t, 6H, $J=7.3Hz$, 2 $HC=N-(CH_2)_5-CH_3$), 1.28 (m, 12H, 2 $HC=N-(CH_2)_4-CH_2-CH_3$, 2 $HC=N-(CH_2)_3-CH_2-CH_2-CH_3$, 2 $HC=N-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-CH_3$), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, $J=7.0Hz$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 1.73 (m, 4H, 2 $HC=N-CH_2-CH_2-(CH_2)_3-CH_3$), 2.13 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.49 (t, 4H, $J=6.9Hz$, 2 $HC=N-CH_2-(CH_2)_4-CH_3$), 3.74 (m, 2H, $J=7.0Hz$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 7.61 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.64 (s, 2H, 2 $HC=N-(CH_2)_5-CH_3$), 13.31 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7')

Composé 15

**8,8'- Bis - heptyliminomethyl - 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl -[2,2']binaphthalenyl
- 1,6,7, 1',6',7' - hexaol**



$C_{44}H_{60}O_6N_2$

MW = 712,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 71% (176 mg)

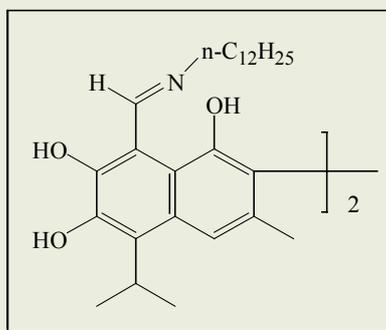
HPLC : k'(II) = 2,84

SM (FAB) m/z : 713 (MH⁺)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.88 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 HC=N-(CH₂)₆-CH₃), 1.31 (m, 16H, 2 HC=N-(CH₂)₅-CH₂-CH₃, 2 HC=N-(CH₂)₄-CH₂-CH₂-CH₃, 2 HC=N-(CH₂)₃-CH₂-(CH₂)₂-CH₃, 2 HC=N-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₃-CH₃), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.71 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-(CH₂)₄-CH₃), 2.13 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.49 (t, 4H, J=6.9Hz, 2 HC=N-CH₂-(CH₂)₅-CH₃), 3.74 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 7.61 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.65 (s, 2H, 2 HC=N-(CH₂)₆-CH₃), 13.34 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7').

Composé 16

8,8'- Bis - dodecyliminomethyl - 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl -[2,2']binaphthalenyl - 1,6,7, 1',6',7' - hexaol



C₅₄H₈₀O₆N₂

MW = 853,2

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 91% (270 mg)

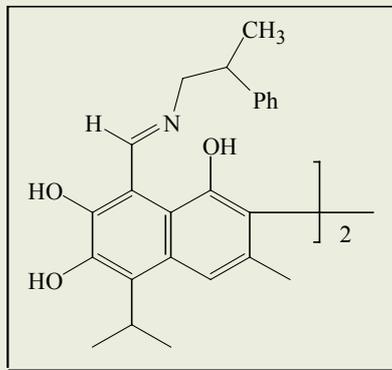
HPLC : k'(I) = 15,71

SM (FAB) m/z : 853 (M⁺)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.88 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 HC=N-(CH₂)₁₁-CH₃), 1.27 (m, 36H, 2 HC=N-(CH₂)₂-(CH₂)₉-CH₃), 1.53 ; 1.54 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.70 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₃), 2.13 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.48 (t, 4H, J=6.9Hz, 2 HC=N-CH₂-(CH₂)₁₀-CH₃), 3.74 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 7.61 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.65 (s, 2H, 2 HC=N-(CH₂)₁₁-CH₃), 13.34 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7').

Composé 17

5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 8,8'- bis [(2-phenyl-propylimino)-methyl] - [2,2'] binaphthalenyl - 1,6,7,1',6',7' - hexaol



$C_{48}H_{52}O_6N_2$

MW = 752,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 92% (241 mg)

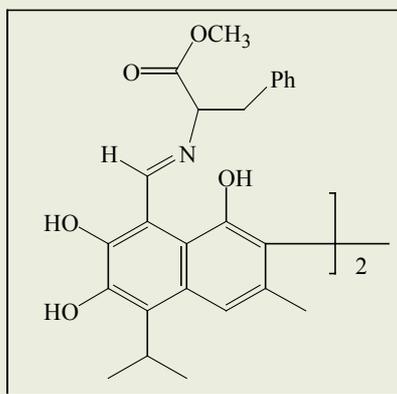
HPLC : $k'(I)$ = 1,18

SM (FAB) m/z : 753 (M^+)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1.41 ; 1.44 (d, 6H, $J=7.3Hz$, 2 $CH_2-CH(CH_3)-C_6H_5$), 1.53 (m, 12H, 2 $HC-(CH_3)_2$), 1.8 - 2.1 (m, 6H, 2 $Ar-CH_3$), 3.08 (m, 2H, 2 $CH_2-CH(CH_3)-C_6H_5$), 3.67 (m, 6H, 2 $CH_2-CH(CH_3)-C_6H_5$; 2 $HC-(CH_3)_2$), 7.31 (m, 10H, 2 $CH_2-CH(CH_3)-C_6H_5$), 7.59 (s, 2H, 2 $Ar-H$), 9.5 (d, 2H, 2 $HC=N-CH_2-CH(CH_3)-C_6H_5$), 13.32 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7')

Composé 18 (imine du gossypol avec l'ester méthylique de la L-phenylalanine)

2-({1,6,7,1',6',7' - hexahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 8'- [(1-methoxycarbonyl-2-phenyl-ethylimino) - methyl] - 3,3'- dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 8- ylmethylene} - amino) - 3 - phenyl - propionic acid methyl ester



$C_{50}H_{52}O_{10}N_2$
MW = 840,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 84% (220 mg).

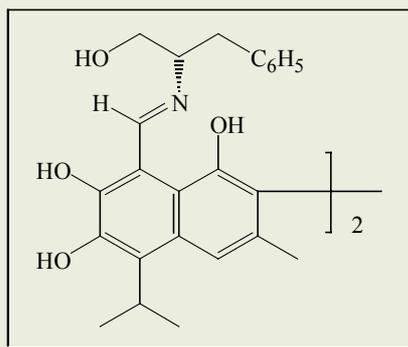
HPLC : $k'(I)$ = 0,62 ; 0,81 (deux diastéréoisomères)

SM (FAB) m/z : 863 (M+Na)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1.53 ; 1.54 (d, 12H, $J=7.0Hz$, 2 HC-(CH_3)₂), 2.07 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.17-3.32 (m, 4H, 2 CH(COOCH₃) CH_2 -C₆H₅), 3.72 (m, 2H, 2 HC-(CH₃)₂), 3.77 (s, 6H, 2 CH(COOCH₃)CH₂-C₆H₅), 4.3 (m, 2H, 2 CH(COOCH₃)CH₂-C₆H₅), 7.23 (m, 10H, 2 CH(COOCH₃)CH₂-C₆H₅), 7.55 (s, 2H, 2 Ar-H), 9.27-9.39 (dd, 2H, 2 HC=N-CH(COOCH₃)CH₂-C₆H₅), 13.36 (sl, 2H, 2 OH en positions 7,7')

Composé 19 (imine du gossypol avec le D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol)

8,8'- Bis [(1-hydroxymethyl-2-phenylethylimino)-methyl] 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl- [2,2']binaphthalenyl - 1,6,7,1',6',7' - hexaol

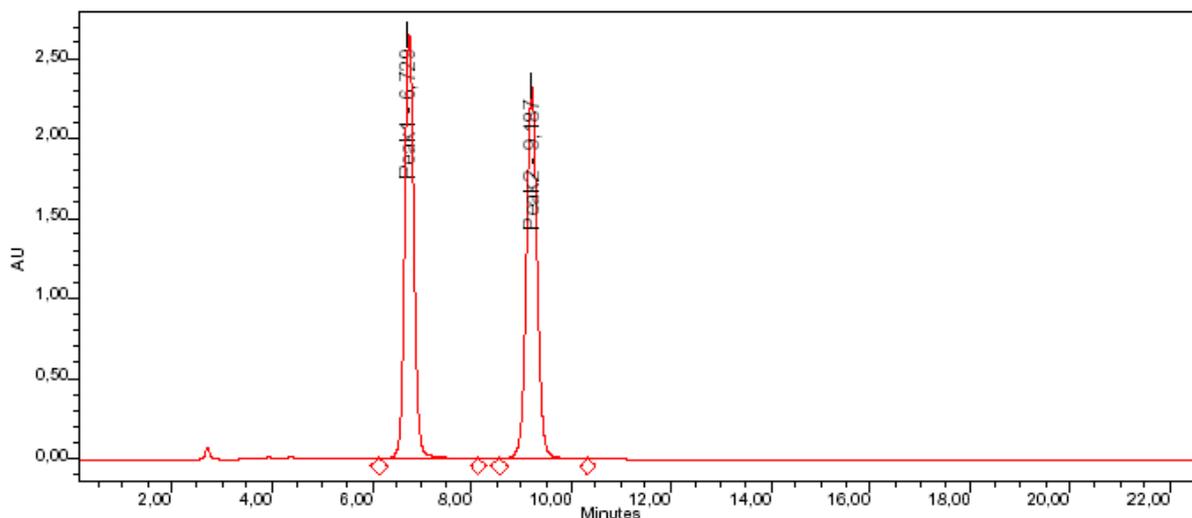


$C_{48}H_{52}O_8N_2$
MW = 784,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (III) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 1680 psi.



HPLC de l'imine du Gossypol racémique avec D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol

Rendement : 69%

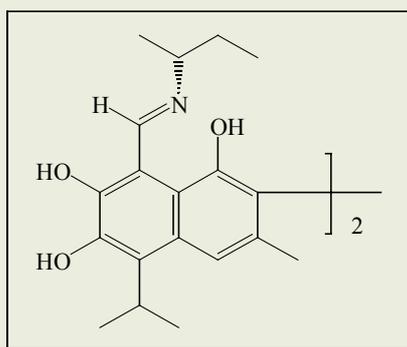
HPLC : k' (III) = 1,51 ; 2,43 (deux diastéréoisomères)

SM (ESI) m/z : 785 (MH^+)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1.51 ; 1.53 (d, 12H, $J=7.0Hz$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 2.07 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 2.96 (m, 4H, 2 N- $CH(CH_2OH)CH_2C_6H_5$), 3.74 (m, 8H, 2 $HC-(CH_3)_2$); 2 N- $CH(CH_2OH)CH_2C_6H_5$), 7.21 (m, 10H, 2 C_6H_5), 7.56 ; 7.97 (s, 4H, 4 **OH** en position 1,1', 6, 6'), 9.45 ; 9.54 (sd, 2H, 2 **HC-NH**), 13.4 (sl, 2H, 2 **HC-NH**).

Composé 20 (imine du gossypol avec le S(+)-2-aminobutane)

8,8'- Bis [(sec-butylimino)-methyl] 5,5'- diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2'] binaphthalenyl - 1,6,7,1',6',7' - hexaol



$C_{38}H_{48}O_6N_2$

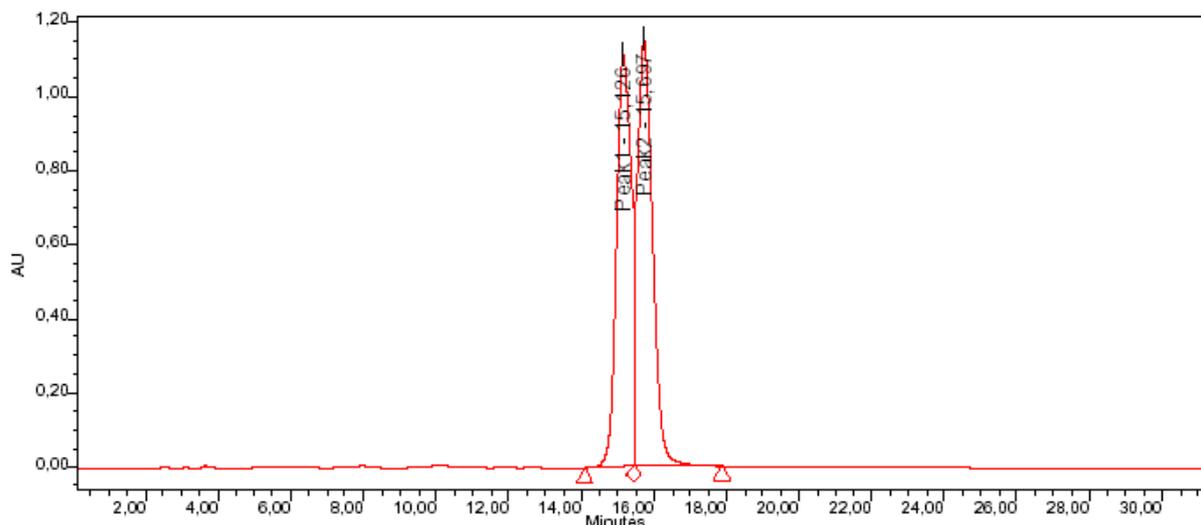
MW = 628,8

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, $5\mu m$, (4,6mm x 250mm)

- (III) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 1680 psi.



HPLC de l'imine du Gossypol racémique avec le S(+)-2-aminobutane

Rendement : 70%

HPLC : k' (III) = 4,64 ; 4,86

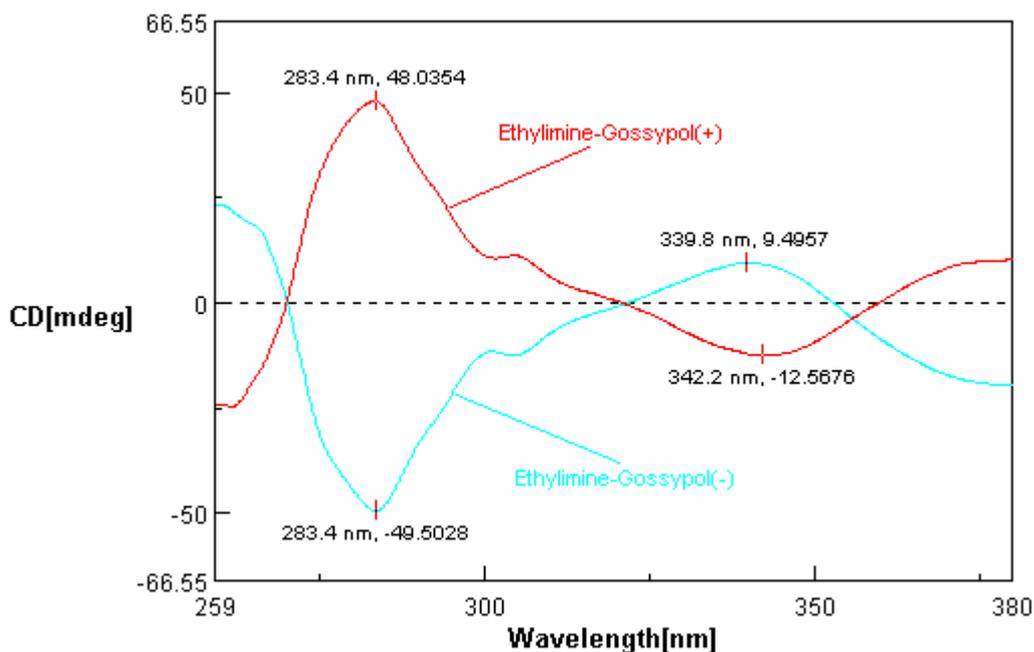
SM (ESI) m/z : 627 (M-H⁻)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.96 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.36 (d, 6H, J=6.6Hz, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.52 ; 1.53 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.69 (m, 4H, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 2.10 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.42 (m, 2H, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 3.74 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 5.56 ; 7.58 ; 8.01(s, 6H, OH en position 1, 6, 7, 1', 6',7'), 9.64 ; 9.68 (s, 2H, 2 HC-NH), 13.45 (sl, 2H, 2 HC-NH)

Composé 21 (l'éthylimine du (+)-gossypol) et 22 (l'éthylimine du (-)-gossypol)

Ethylimine du (-)-Gossypol **[α]_b = - 961° (c = 0,23 ; CDCl₃)**

Ethylimine du (+)-Gossypol **[α]_b = + 960° (c = 0,23 ; CDCl₃)**



Courbe de Dichroïsme Circulaire de l'éthylimine du (+)-gossypol et du (-)-gossypol (0.023mg/mL CHCl₃)

Etude de la stabilité de l'éthylimine du (+)-gossypol à 50°C et sa révélation par une amine chirale

Mode opératoire: Une solution de 1mg de l'éthylimine du (+)-gossypol dissous dans 200µL d'un mélange de chloroforme et toluène (1 :1) est laissée chauffer à 50°C. Après 15min, on reprend 30µL du mélange, ensuite, on ajoute 30µL d'une solution de 21mg de D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol dans 200µL de propanol-2. La réaction est laissée réagir à température ambiante pendant 10min, ensuite, on fait l'HPLC du mélange réactionnel.

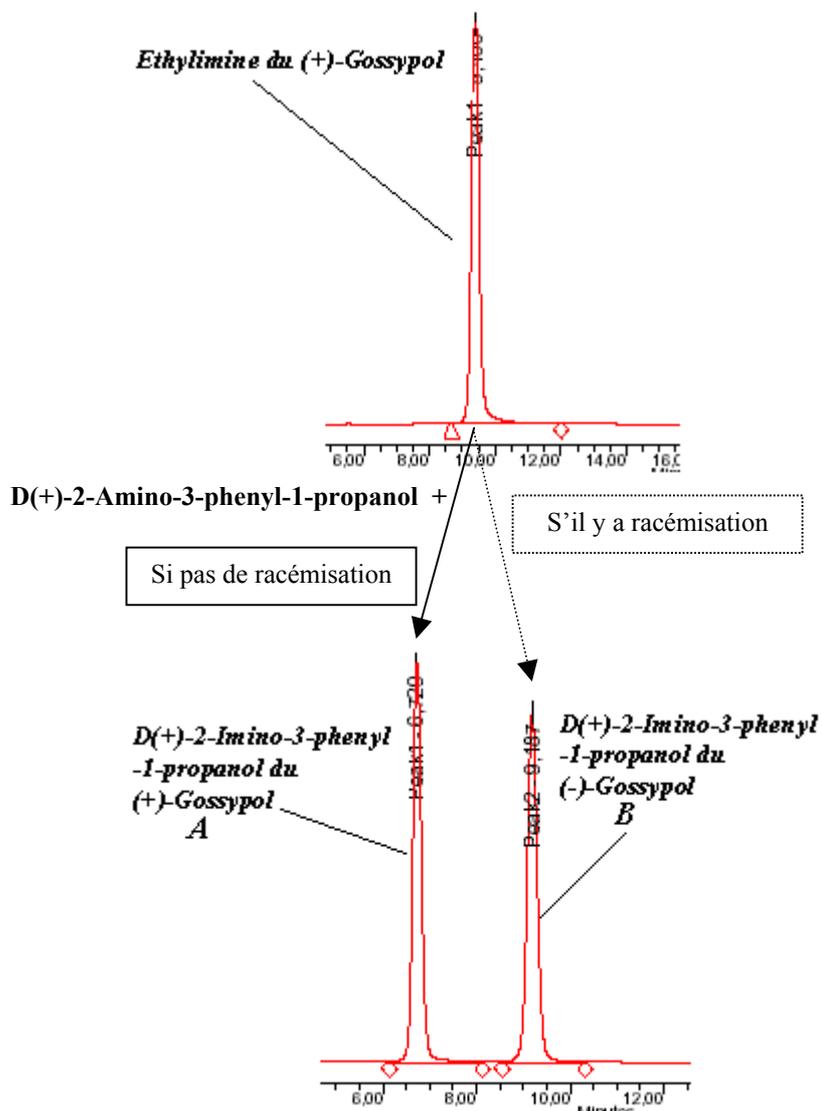
On chauffe l'éthylimine du (+)-gossypol pendant 30min, 1heure, 3 heures, 5 heures.

Les mélanges réactionnels sont laissés pendant 48 heures, et on analyse par HPLC ces mélanges.

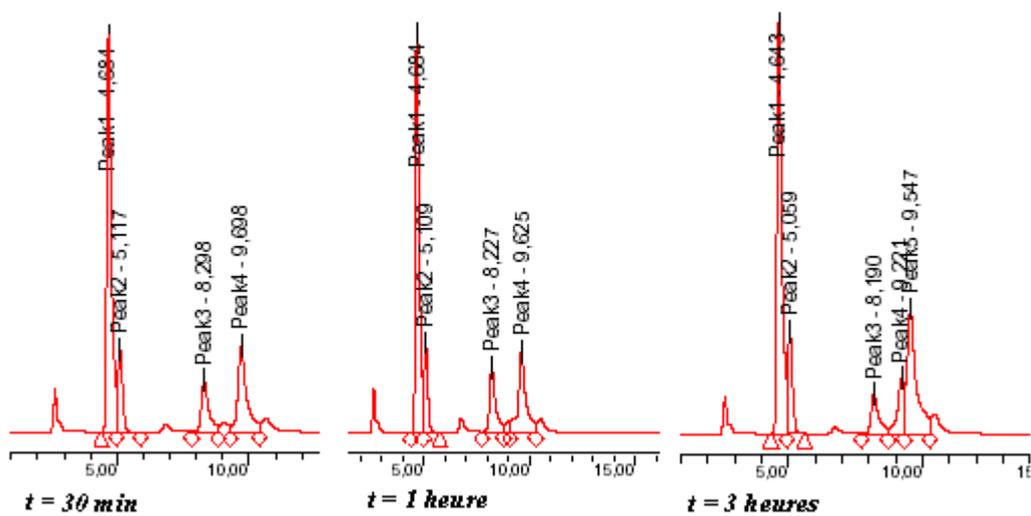
Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, 5µm, (4,6mm x 250mm)
- (III) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 1680 psi.

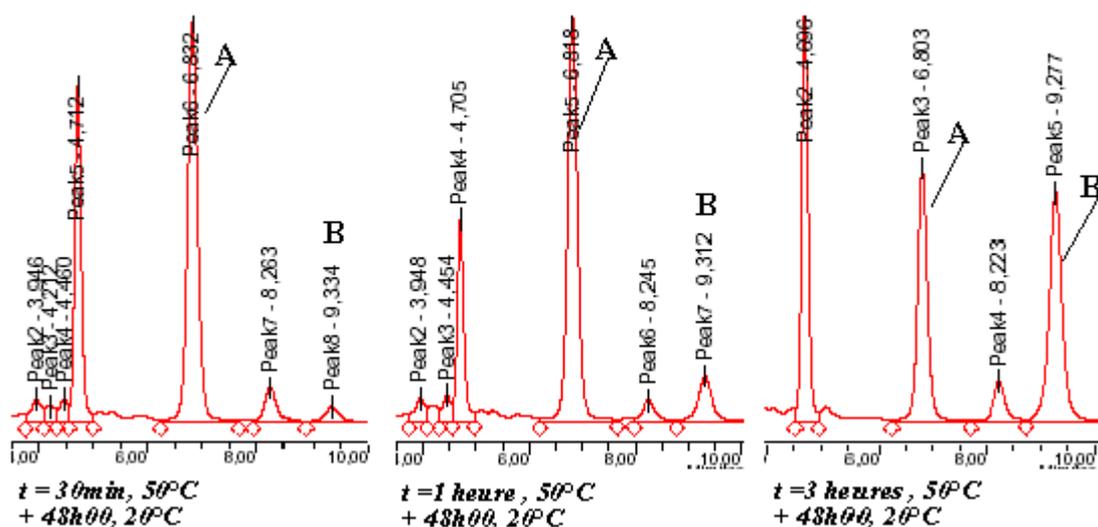
La stabilité de l'éthylimine du (+)-gossypol est évaluée par HPLC après transformation en diastéréoisomères imines par le D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol. L'influence du temps de chauffage à 50°C est décrite dans les chromatogrammes ci-dessous :



10 minutes après le chauffage à 50°C pendant le temps t



Après le chauffage à 50°C pendant le temps t, et la solution est examinée au bout de 48 heures à température ambiante



A : Imine du (+)-gossypol avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol
 B : Imine du (-)-gossypol avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol

Etude de la stabilité de l'éthylimine du (+)-gossypol dans le milieu de culture cellulaire

Mode opératoire : Une solution de 1mg de l'éthylimine du (+)-gossypol dissous dans un mélange de 100µL de dimethylsulfoxyde (DMSO) et 900µL de milieu de culture est laissée dans un étuve d'incubation à 37°C, en présence de 5% de CO₂, 95% de O₂. Après 15min, on reprend 100µL de ce mélange, ensuite, on ajoute 40µL d'une solution de 40mg de D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol dans 400µL de propanol-2. La réaction est laissée réagir à température ambiante pendant 10min, on fait ensuite l'HPLC du mélange réactionnel.

On a refait la même opération après des incubations de 30min, 1heure, 2 heures, 4 heures, 6 heures, 7heures30 et 24 heures.

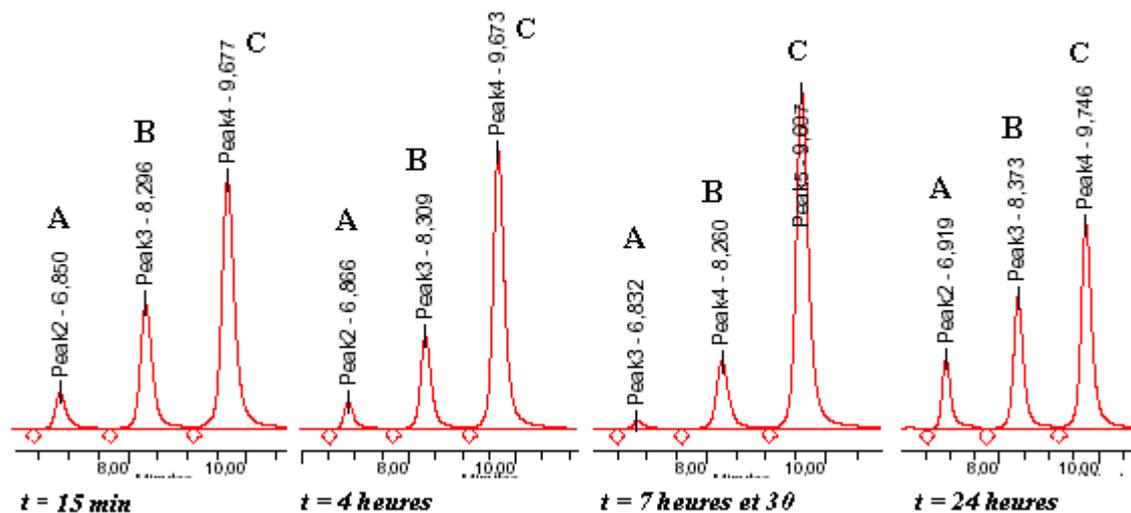
Les mélanges réactionnels sont laissés pendant 24heures, et on a fait l'HPLC de ces mélanges.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, 5µm, (4,6mm x 250mm)
- (III) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 1680 psi.

La stabilité de l'éthylimine du (+)-gossypol est évaluée par HPLC, l'évolution est la suivante :

10 minutes après l'incubation à 37°C pendant le temps t

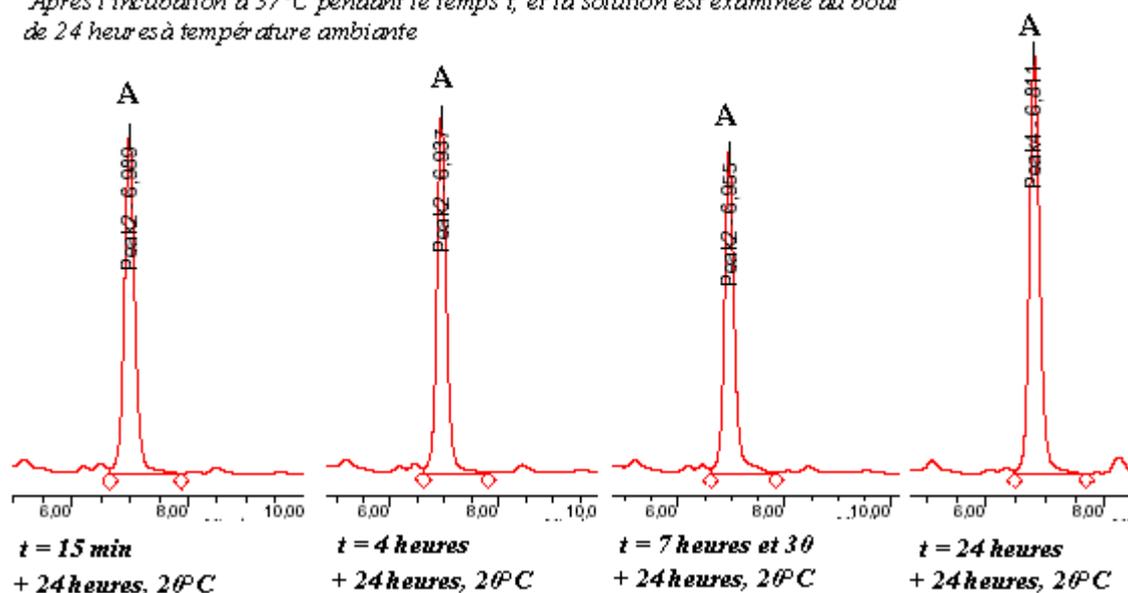


A : Imine du (+)-gossypol avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol

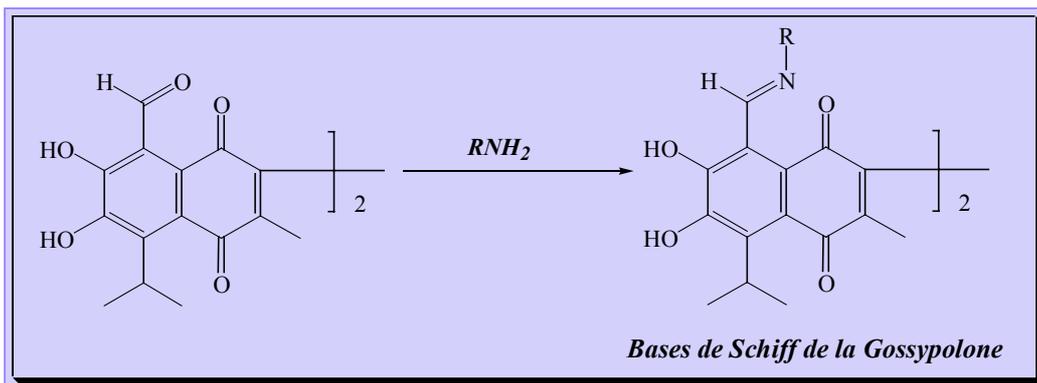
B : Intermédiaire

C : Ethylimine du (+)-gossypol

Après l'incubation à 37°C pendant le temps t, et la solution est examinée au bout de 24 heures à température ambiante



2. Bases de Schiff de la Gossypolone



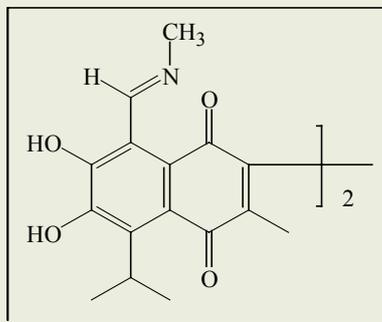
Mode opératoire : 200 mg de gossypolone (0,37 mmole) sont dissous dans un mélange de 5mL d'éther et 3mL d'isopropanol sous argon. L'amine est ajoutée (8 fois la quantité molaire de la gossypolone). Le mélange est chauffé dans un bain-marie à 45°C pendant 5 minutes, puis, gardé sous argon pendant 2h à température ambiante. Le précipité formé est séparé par filtration puis est dissous dans le chloroforme et est lavé à l'eau. Le produit est finalement reprecipité de sa solution dans le chloroforme par l'hexane. La pureté de ces produits est analysée par HPLC analytique dans les conditions suivantes :

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (I) : A/B = 7/93, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ; B = 100% ACN+ 0.1% TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 1620 psi.
- (II) : A/B = 10/90, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O + 0.1% TFA ; B = 100% ACN+ 0.1% TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 1520 psi.

Composé 23

6,7,6',7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 8,8' -bis-methyliminomethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



C₃₂H₃₂O₈N₂

MW = 572,6

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 64% (100 mg)

HPLC : $k'(\text{II}) = 1,53$

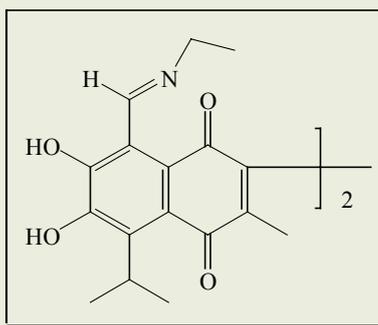
IR (CHCl_3) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3315 (OH), 2875 - 3027 (CH), 1639 (C=N).

SM (ESI) m/z : 571 (M-H)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) : 1.45 (dd, 12H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 HC-(CH_3)₂), 2.00 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.43 (s, 6H, 2 HC=N- CH_3), 3.86 (m, 2H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $\text{HC}-(\text{CH}_3)_2$), 9.62 (s, 2H, 2 $\text{HC}=\text{N-R}$).

Composé 24

8,8' - Bis-ethyliminomethyl - 6,7,6',7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{N}_2$

MW = 600,6

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 82% (164 mg)

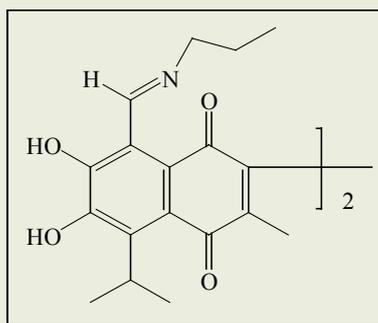
HPLC : $k'(\text{II}) = 2,15$

SM (FAB) m/z : 601 (MH^+)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) : 1.27 (t, 6H, $J=7.3\text{Hz}$, 2 HC=N- CH_2-CH_3), 1.45 (dd, 12H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 HC-(CH_3)₂), 2.00 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.69 (q, 4H, 2 HC=N- CH_2-CH_3), 3.85 (m, 2H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $\text{HC}-(\text{CH}_3)_2$), 9.64 (s, 2H, 2 $\text{HC}=\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

Composé 25

6,7,6',7' - Tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 8,8' - bis-propyliminomethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



$C_{36}H_{40}O_8N_2$
MW = 628,7

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 71% (123 mg)

HPLC : $k'(II)$ = 3,52

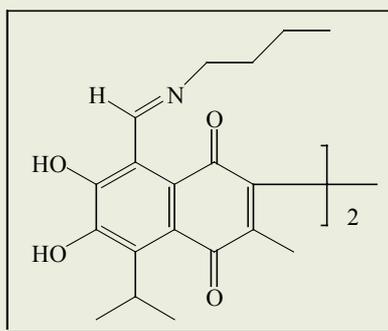
IR ($CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} : 3313 (OH), 2877 - 3028 (CH), 1636 (C=N).

SM (ESI) m/z : 627 (M-H)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1.02 (t, 6H, $J=7.3Hz$, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₃), 1.43 (dd, 12H, $J=7.0Hz$, 2 HC-(CH₃)₂), 1.79 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₃), 1.99 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.57 (t, 4H, $J=6.9Hz$, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₃), 3.85 (m, 2H, $J=7.0Hz$, 2 HC-(CH₃)₂), 9.59 (s, 2H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₃).

Composé 26

8,8' - Bis-butyyliminomethyl - 6,7,6',7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone.



$C_{38}H_{44}O_8N_2$
MW = 656,7

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 67% (120 mg)

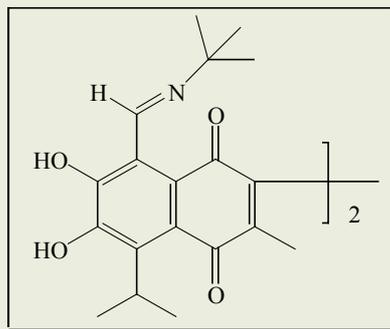
HPLC : $k'(II)$ = 5,52

SM (ESI) m/z : 655 (M-H)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 0.95 (t, 6H, $J=7.3Hz$, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.43 (m, 16H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃; 2 HC-(CH₃)₂), 1.73 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.98 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.60 (t, 4H, $J=6.9Hz$, 2 HC=N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 3.84 (m, 2H, $J=7.0Hz$, 2 HC-(CH₃)₂), 9.59 (s, 2H, 2 HC=N-R).

Composé 27

8,8' - Bis-(tert-butylimino-methyl) - 6,7,6',7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



$C_{38}H_{44}O_8N_2$

MW = 656,7

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 83% (150 mg)

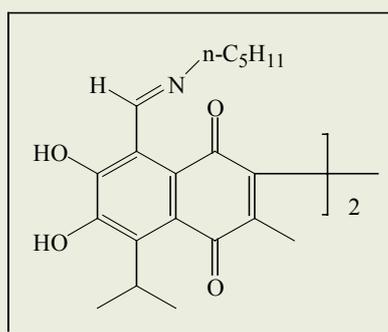
HPLC : $k'(\text{II}) = 4,61$

SM (ESI) m/z : 655 (M-H)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) : 1.47 (s, 9H, 2 C-(CH_3)₃), 1.44 (dd, 12H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 CH-(CH_3)₂), 1.96 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.84 (m, 2H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 9.68 (d, 2H, 2 $\text{HC}=\text{N}-\text{R}$).

Composé 28

6,7,6',7' - Tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 8,8' - bis-pentyliminomethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



$C_{40}H_{48}O_8N_2$

MW = 684,6

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 70% (176 mg)

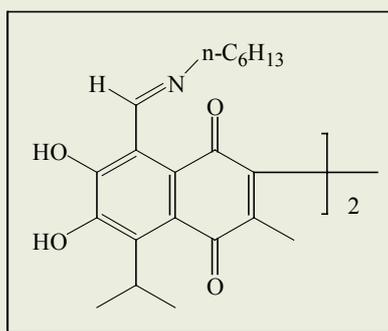
HPLC : $k'(\text{I}) = 5,24$

SM (FAB) m/z : 685 (MH^+)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.91 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 HC=N-(CH₂)₄-CH₃), 1.35 (m, 8H, 2 HC=N-(CH₂)₂-(CH₂)₂-CH₃), 1.46 (dd, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.75 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-(CH₂)₂-CH₃), 1.99 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.60 (t, 4H, J=6.9Hz, 2 HC=N-CH₂-(CH₂)₃-CH₃), 3.87 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 9.60 (s, 2H, 2 HC=N-(CH₂)₄-CH₃).

Composé 29

8,8' - Bis-hexyliminomethyl - 6,7,6',7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone.



C₄₂H₅₂O₈N₂

MW = 712,8

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 67% (132 mg)

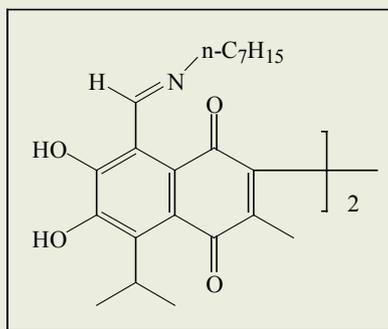
HPLC : k' (I) = 7,89

SM (ESI) m/z : 711 (M-H)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.85 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 HC=N-(CH₂)₅-CH₃), 1.28 (m, 12H, 2 HC=N-(CH₂)₄-CH₂-CH₃, 2 HC=N-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-CH₃, 2 HC=N-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-CH₃), 1.42 (dd, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.72 (m, 4H, 2 HC=N-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-CH₃), 1.97 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.58 (t, 4H, J=6.9Hz, 2 HC=N-CH₂-(CH₂)₄-CH₃), 3.85 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 9.58 (s, 2H, 2 HC=N-(CH₂)₅-CH₃)

Composé 30

8,8' - Bis-heptyliminomethyl - 6,7,6',7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



$C_{44}H_{56}O_8N_2$

MW = 740,6

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 69% (141 mg)

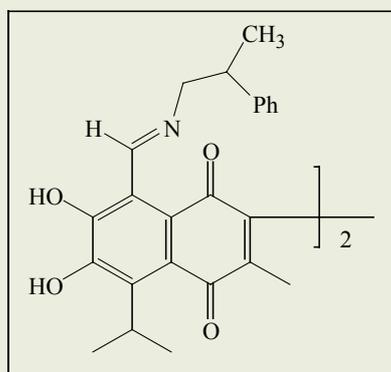
HPLC : $K' (I) = 15,15$

SM (ESI) m/z : 739 (M-H)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 0.86 (t, 6H, $J=7.3Hz$, 2 $HC=N-(CH_2)_6-CH_3$), 1.31 (m, 16H, 2 $HC=N-(CH_2)_5-CH_2-CH_3$, 2 $HC=N-(CH_2)_4-CH_2-CH_2-CH_3$, 2 $HC=N-(CH_2)_3-CH_2-(CH_2)_2-CH_3$, 2 $HC=N-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_3-CH_3$), 1.43 (dd, 12H, $J=7.0Hz$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 1.74 (m, 4H, 2 $HC=N-CH_2-CH_2-(CH_2)_4-CH_3$), 1.98 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 3.59 (t, 4H, $J=6.9Hz$, 2 $HC=N-CH_2-(CH_2)_5-CH_3$), 3.84 (m, 2H, $J=7.0Hz$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 9.60 (s, 2H, 2 $HC=N-(CH_2)_6-CH_3$).

Composé 31

6,7,6',7' - Tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - 8,8' - bis-[(2-phenylpropylimino)-methyl-[2,2']] binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



$C_{48}H_{48}O_8N_2$

MW = 780,9

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Rendement : 76% (163 mg)

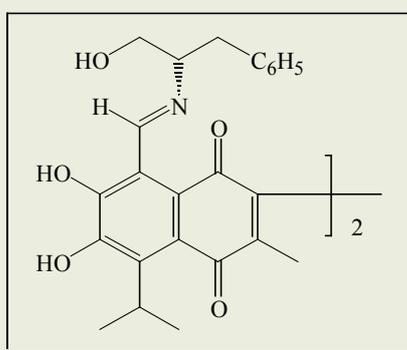
HPLC : k' (**II**) = 6,26

SM (ESI) m/z : 779 (M-H)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) : 1.36 (m, 6H, 2 $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_6\text{H}_5$), 1.43 (dd, 12H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $\text{HC}(\text{CH}_3)_2$), 1.94 (s, 6H, 2 Ar-CH_3), 3.12 (m, 2H, 2 $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_6\text{H}_5$), 3.67 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_6\text{H}_5$), 3.84 (m, 2H, $J=7.0\text{Hz}$, 2 $\text{HC}(\text{CH}_3)_2$), 7.31 (m, 10H, 2 $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_6\text{H}_5$), 9.45 (d, 2H, 2 $\text{HC=N-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_6\text{H}_5$)

Composé 32

6,7,6',7' - tetrahydroxy - 8,8'- Bis [(1-hydroxymethyl-2-phenylethylimino)-methyl] -5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



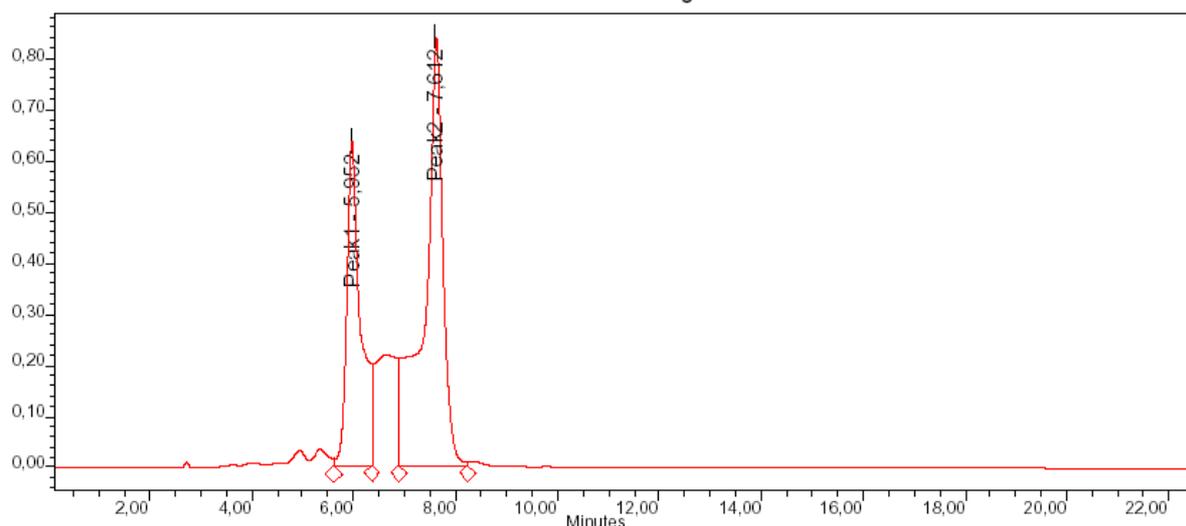
$\text{C}_{48}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{N}_2$

MW = 812,9

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, $5\mu\text{m}$, (4,6mm x 250mm)
- (**III**) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H_2O + 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 1680 psi.



HPLC de l'imine de la Gossypolone racémique avec le D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol

Rendement : 64%

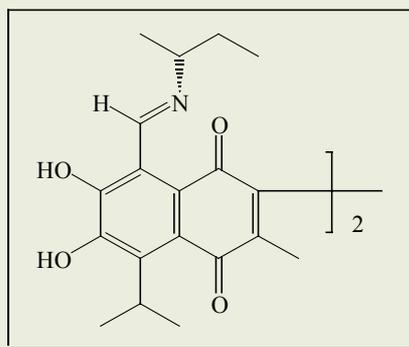
HPLC : k' (III) = 1,22 ; 1,84

SM (ESI) m/z : 811 (M-H⁻)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.43 (dd, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.95 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 2.97 (m, 4H, 2 N-CH(CH₂OH)CH₂C₆H₅), 3.83 (m, 8H, 2 HC-(CH₃)₂), 2 N-CH(CH₂OH)CH₂C₆H₅), 7.24 (m, 14H, 2 C₆H₅, OH en position 6,7, 6'7').

Composé 33

8,8'-Bis-(sec-butylimino-méthyl)- 6,7,6',7' - tetrahydroxy-5,5'- diisopropyl - 3,3' - diméthyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4'-tetraone



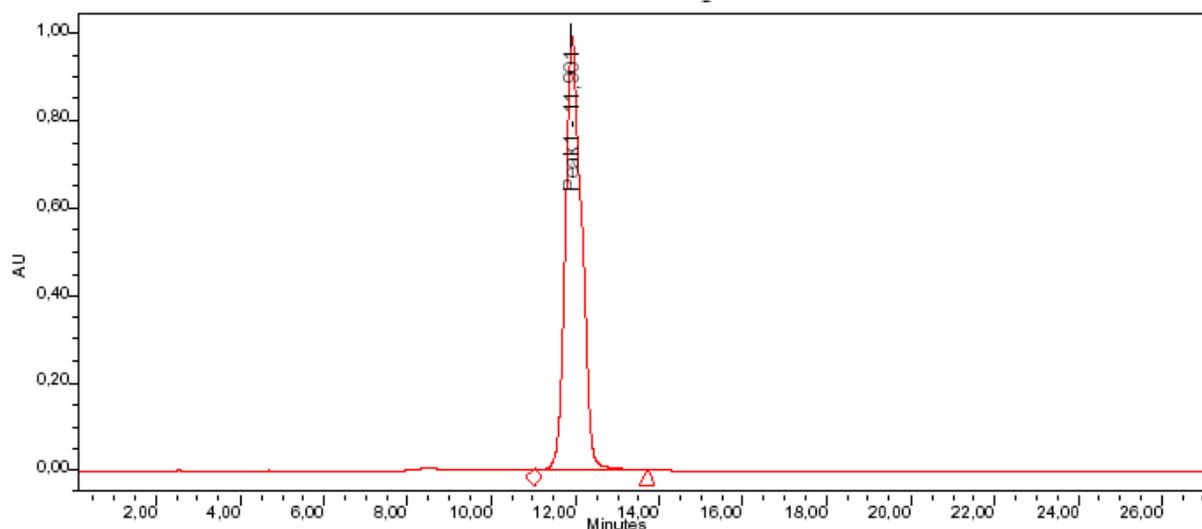
C₃₈H₄₄O₈N₂

MW = 656,7

Forme du produit : solide amorphe violet foncé.

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, 5μm, (4,6mm x 250mm)
- (III) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 1680 psi.



HPLC de l'imine de la Gossypolone racémique avec le S(+)-2-aminobutane

Rendement : 73%

HPLC : k' (III) = 3,44

SM (ESI) m/z : 627 (M-H⁻)

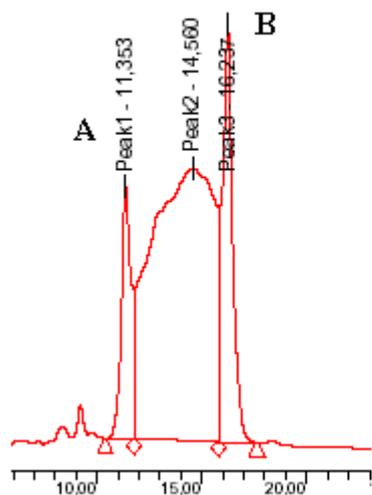
RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 0.97 (t, 6H, J=7.3Hz, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.39 ; 1.41 (d, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.45 (d, 6H, J=6.6Hz, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.71 (m, 4H, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 1.98 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.45 (m, 2H, 2 N-CH(CH₃)CH₂CH₃), 3.84 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 7.16 ; 8.08 (s, 4H, OH en position 6, 7, 6',7'), 9.64 ; 9.59 (sl, 2H, 2 HC-NH), 14.87 (sl, 2H, 2 HC-NH)

HPLC de l'imine de la Gossypolone racémique avec le D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol et le S(+)-2-aminobutane à température ambiante et à 0°C

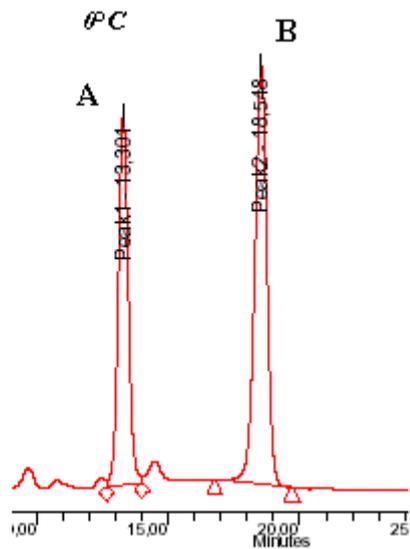
Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C8, 5 μ m, (4,6mm x 250mm) (à l'air libre ou bien plongée dans un bain de glace)
- (IV) A/B = 30/70, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ; B = 100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 2100 psi.

température ambiante

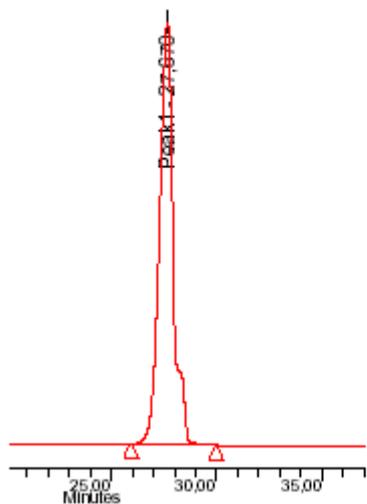


0°C

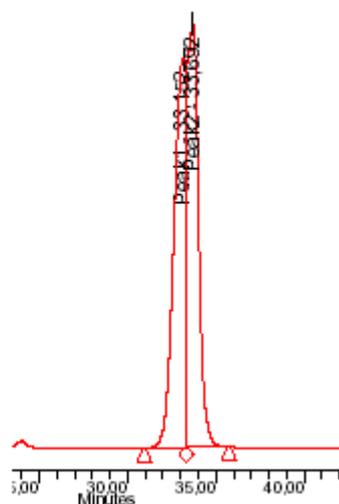


A : Imine de la (+)-gossypolone avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol
B : Imine de la (-)-gossypolone avec le D(+)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol

température ambiante



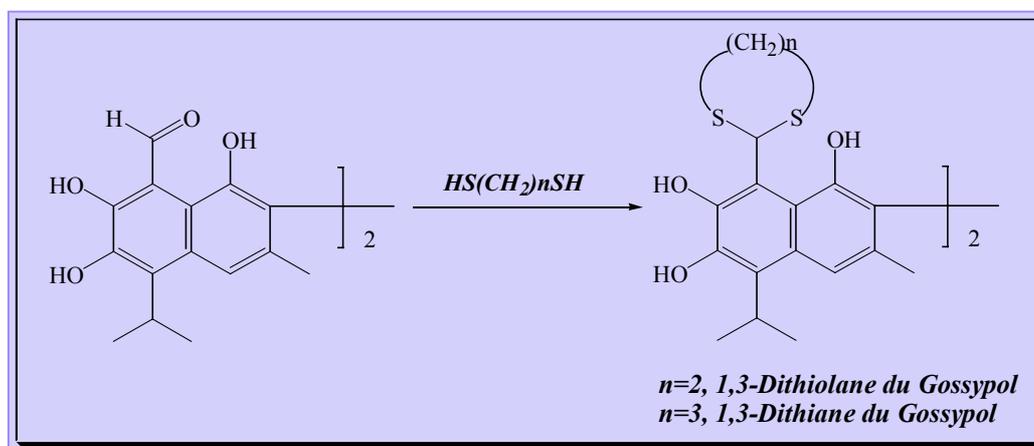
0°C



HPLC de l'imine de la Gossypolone racémique avec le D(+)-2-amino-3-phenyl-1-propanol et le S(+)-2-aminobutane à TA et à 0°C

VII. Dérivés 1,3-Dithiane , 1,3-Dithiolane du Gossypol et de la Gossypolone - Dérivés thioethers des dérivés éthers méthyliques du Gossypol

1. Dérivés 1,3-Dithiane et 1,3-Dithiolane du Gossypol



Mode opératoire : A une solution de 1g (1,73 mmole) de gossypol acétique dissous dans 40mL d'éther a été ajouté 3.éq de dithioethane (dithiopropane). Le mélange réactionnel est refroidi à -20°C , puis, on ajoute goutte à goutte 1.éq de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Ensuite, ce mélange est soumis à une agitation magnétique, en l'absence de lumière et sous argon, pendant 24h à température ambiante. Au matin, le précipité jaune formé est séparé par filtration, lavé avec de l'éther.

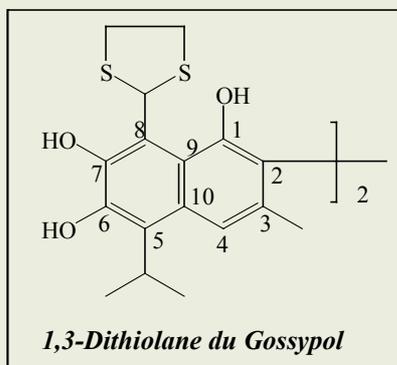
La pureté de ces produits est évaluée par HPLC analytique dans les conditions suivantes :

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, $5\mu\text{m}$, (4,6mm x 250mm)
- (III) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H_2O + 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 2140 psi.

Composé 34

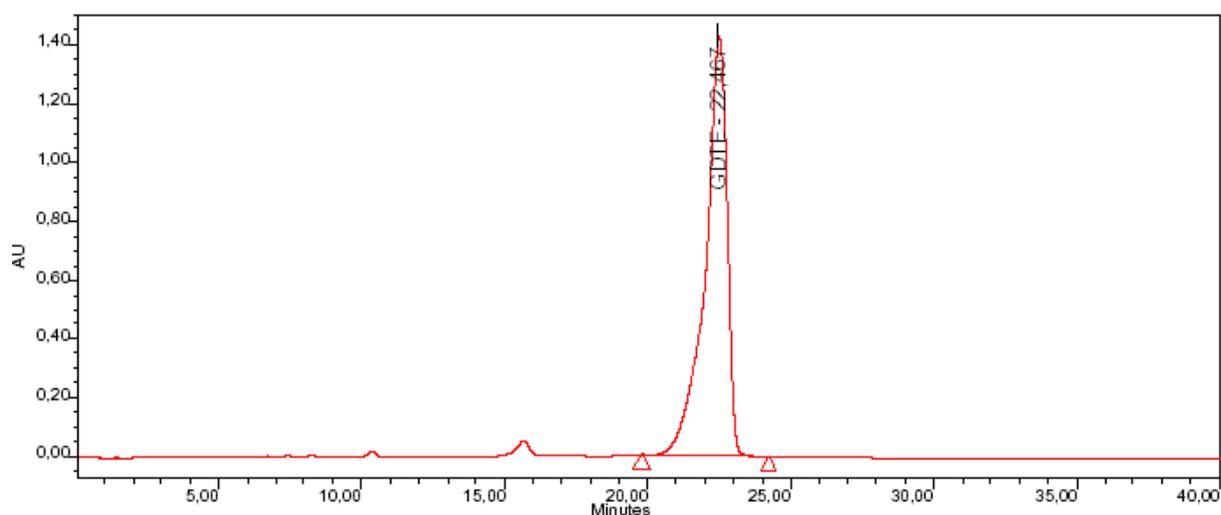
8,8' - Bis - [1,3]dithiolan - 2 - yl - 5,5' - Diisopropyl - 3,3' - dimethyl
- [2,2']binaphthalenyl - 1,6,7,1',6',7' - hexaol (GDTE)



$C_{34}H_{38}O_6S_4$

MW = 670,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.



HPLC du 1,3-Dithiolane du Gossypol

Rendement : 67% (778 mg)

HPLC : k' (III) = 9,17

F : 182-183°C

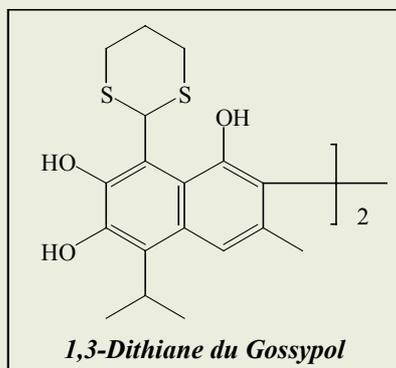
SM (ESI) m/z : 699 (M-H⁻)

RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) : 1.54 (d, 12H, 2 HC-(CH₃)₂), 2.00 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.31 ; 3.65 (dd, 8H, 2 C-S-CH₂-CH₂-S), 3.94 (m, 2H, 2 HC-(CH₃)₂), 7.51 (s, 2H, 2 Ar-H), 8.13 (s, 2H, 2 S-HC-S), 7.96, 8.29, 8.63 (sl, 6H, 6 OH en positions 1,1',6,6',7,7').

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) : 20.4 (Ar-CH₃), 20.6 (HC-(CH₃)₂), 26.2 (HC-(CH₃)₂), 39.7 (C-S-CH₂-CH₂-S); 50.6 (S-HC-S); 111.7 (C-8), 115.4 (C-4), 117.4 & 117.6 (C-2 & C-9), 125.7 (C-5), 129.2 (C-10), 132.3 (C-3), 143.9 (C-6), 146.0 (C-7), 150.7 (C-1).

Composé 35

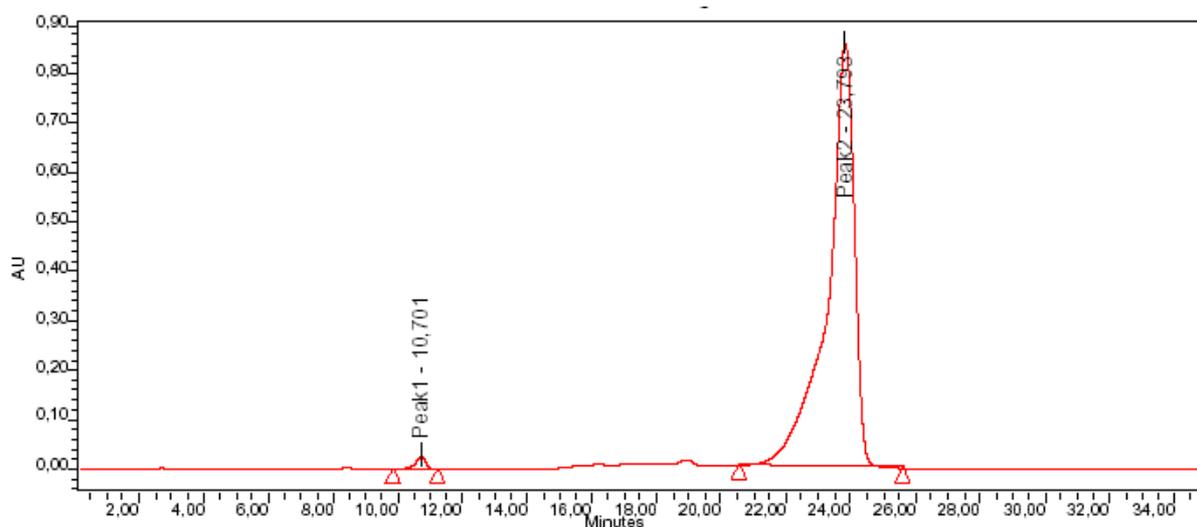
8,8' - Bis - [1,3]dithian - 2 - yl - 5,5' - Diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,6,7,1',6',7' - hexaol (GDTP)



$C_{36}H_{42}O_6S_4$

MW = 698,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.



HPLC du 1,3-Dithiane du Gossypol

Rendement : 93% (1,12g)

HPLC : k' (III) = 10,25

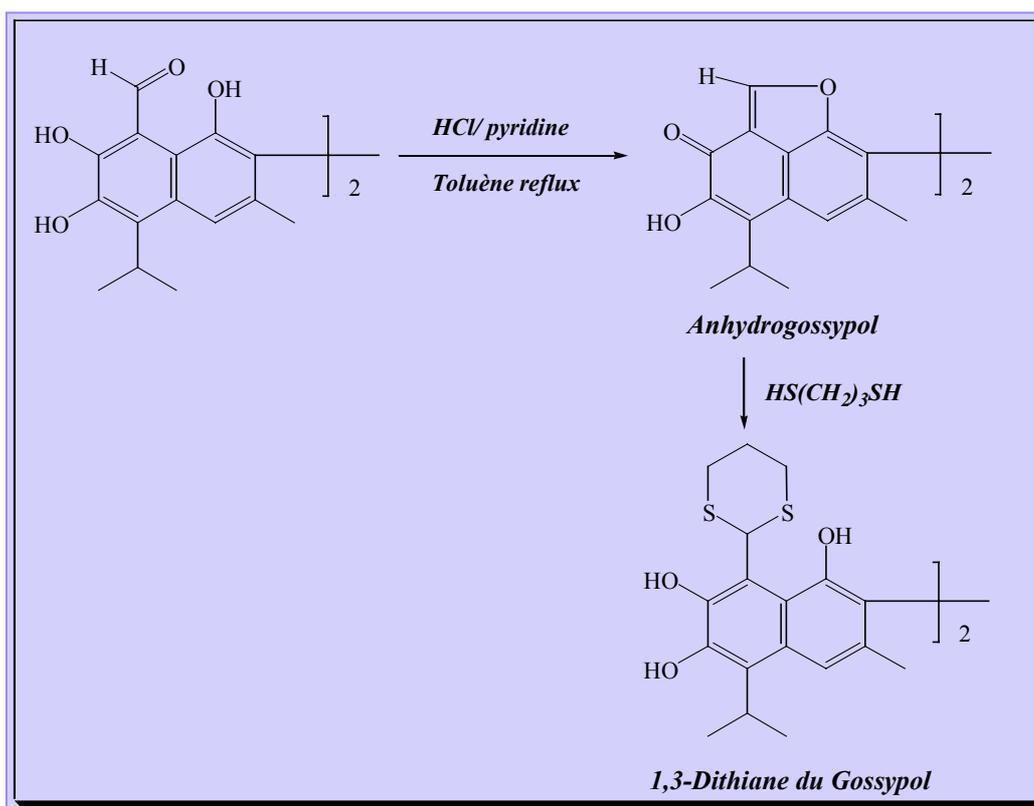
F : 221-222°C

SM (ESI) m/z : 721 (M+Na)

RMN 1H (400MHz, DMSO- d_6) : 1.47 (d, 12H, 2 HC-(CH_3) $_2$), 1.74; 2.15 (m, 4H, 2 C-S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 1.96 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 2.93 (m, 8H, 2 C-S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 3.87 (m, 2H, 2 HC-(CH_3) $_2$), 7.55 (s, 2H, 2 Ar-H), 7.83 (s, 2H, 2 S-HC-S); 7.77, 8.25, 8.63 (sl, 6H, 6 OH en positions 1,1',6,6', 7,7').

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) : 20.4 (Ar- CH_3), 20.5(HC-(CH_3) $_2$), 26.2 (HC-(CH_3) $_2$), 25.0 (C-S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 31.6 (C-S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 45.7 (S-HC-S), 111.4 (C-8), 115.6, 115.7 (C-4 & C-9), 117.9 (C-2), 125.6 (C-5), 129.4 (C-10), 132.4 (C-3), 143.7 (C-6), 146.7 (C-7), 150.7 (C-1).

2. Dérivés 1,3-Dithiane du Gossypol à partir de l'anhydrogossypol



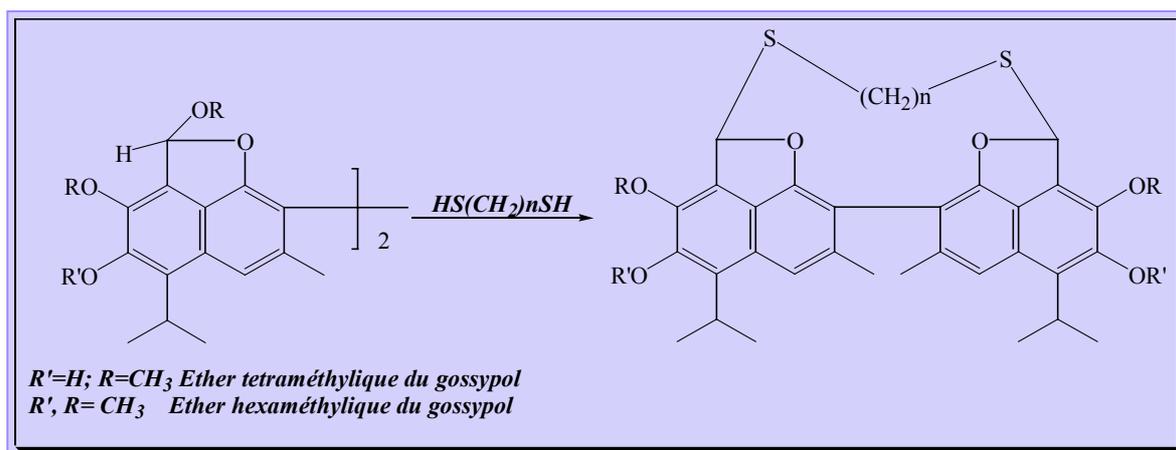
Réaction :

Synthèse de l'anhydrogossypol: Dans des conditions anhydres, HCl gaz est passé sur la surface d'une solution de 2,5g de pyridine anhydre dans 12,5g de toluène anhydre jusqu'à ce que le chlorure de pyridinium soit totalement précipité. Ensuite, on ajoute 500mg (0,87 mmole) de gossypol acétique dans 70mL de toluène, le mélange réactionnel est chauffé à 110°C, sous l'azote,. Après 3h de la réaction, on arrête la réaction. Par CCM, on constate qu'il n'y a plus de gossypol et un seul produit est formé.

Synthèse du 1,3-dithiane du gossypol: on suppose que le rendement de cette réaction est 100%, On ajoute 262µL (2,61 mmole) de dithiopropane dans ce mélange réactionnel d'anhydrogossypol. Ce mélange est laissé sous agitation magnétique pendant la nuit à température ambiante. Au matin, le précipité jaune formé est séparé par filtration, lavé avec de l'hexane.

Les analyses de RMN, masse et HPLC analytique prouvent que ce produit possède les mêmes caractéristiques que celles du 1,3-dithiane du gossypol.

3. Dérivés thioéthers des dérivés éthers méthyliques du Gossypol



Mode opératoire : A une solution de 0,1-1M de 1.éq de dérivés éthers méthyliques du gossypol dans chloroforme a été ajouté 3.éq de dithioethane (dithiopropane). Le mélange réactionnel est refroidi à -20°C , puis, on ajoute goutte à goutte 1.éq de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Ensuite, ce mélange est soumis à une agitation magnétique, en l'absence de lumière et sous argon, pendant 24 à température ambiante. Au matin, le précipité formé est séparé par filtration, lavé avec de l'hexane. Ce précipité peut être purifié par une précipitation dans un mélange de chloroforme et hexane

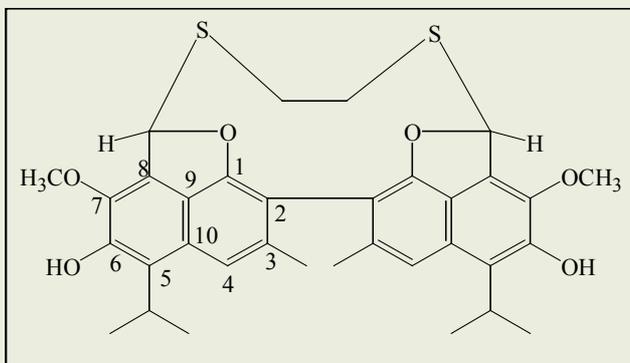
La pureté de ces produits est contrôlée par HPLC analytique dans les conditions suivantes :

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, $5\mu\text{m}$, (4,6mm x 250mm)
- (II) A/B = 10/90, avec A = 5%ACN+ 95% H_2O + 0.1% TFA ; B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 1500 psi.

Composé 36

5,5'- diisopropyl - 2,2' - dithioethane - 4,4' - dimethoxy - 7,7' - dimethyl - 2H,2'H - [8,8'] binaphtho [1,8 - bc]furanyl - 3,3' - diol



$C_{34}H_{36}O_6S_2$

MW = 604,7

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Rendement : 24.2%

HPLC : k' (II) = 3,82

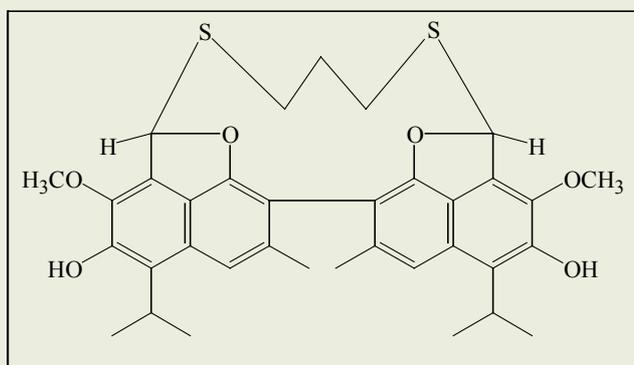
SM (EI) m/z : 605 (MH^+)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1.41 (d, 12H, $J=7.0Hz$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 2.30 (s, 6H, 2 $Ar-CH_3$), 2.61, 2.95 (d, 4H, $J=10.3Hz$, $C-S-CH_2-CH_2-S$), 3.66 (m, 2H, $J=7.0Hz$, 2 $HC-(CH_3)_2$), 4.10 (s, 6H, 2 OCH_3 en positions 7,7'), 6.18 (s, 2H, 2 OH en positions 6,6'), 6.98 (s, 2H, 2 $O-HC-S$), 7.30 (s, 2H, 2 $Ar-H$).

RMN ^{13}C (75MHz, $CDCl_3$) : 20.7 ($HC-(CH_3)_2$; $Ar-CH_3$), 26.9 ($HC-(CH_3)_2$), 30.7 ($C-S-CH_2-CH_2-S$), 59.3 (OCH_3 en positions 7,7'), 90.2 ($O-HC-S$), 109.4 (C-2), 114.2 (C-4), 118.2 (C-8), 121.2 (C-9), 125.8, 126.1 (C-5, C-10), 137.2 (C-3), 139.8 (C-7), 146.4 (C-6), 156.5 (C-1).

Composé 37

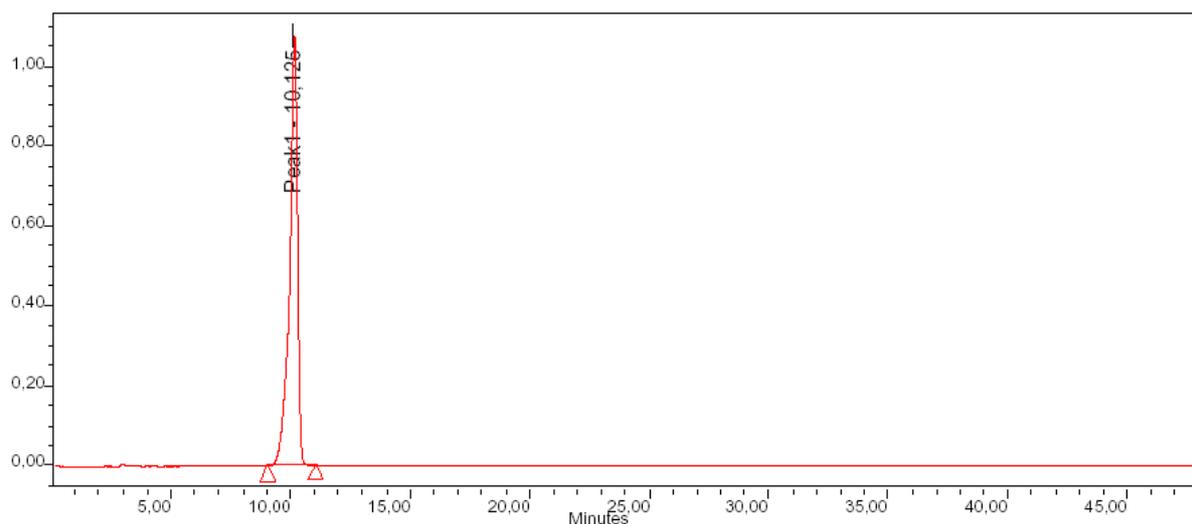
5,5'- diisopropyl - 2,2' - dithiopropane - 4,4' - dimethoxy - 7,7' - dimethyl - 2H,2'H - [8,8'] bi[naphtho [1,8 - bc]furan] - 3,3' - diol



$C_{35}H_{38}O_6S_2$

MW = 618,8

Forme du produit : solide amorphe blanc.



HPLC de Dithiopropane éther de l'éther tetraméthyle du gossypol

Rendement : 60.3%.

HPLC : k' (II) = 4,09

F : 234-235°C

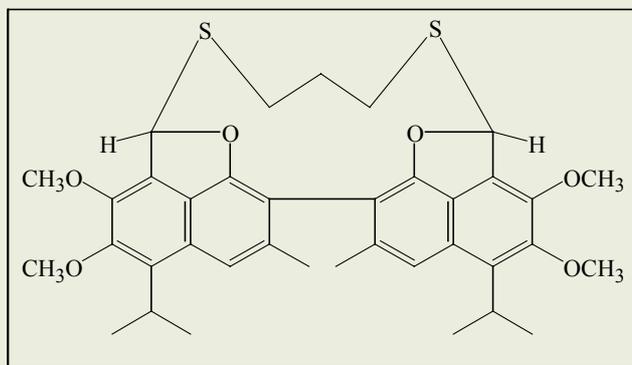
SM (ESI) m/z : 619 (MH)

RMN 1H (300MHz, DMSO- d_6) : 1.43 (d, 12H, 2 HC-(CH_3) $_2$), 1.67 (m, 4H, S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 2.14 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 2.98 & 3.02 (m, 4H, S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 3.72 (m, 2H, 2 HC-(CH_3) $_2$), 4.09 (s, 6H, 2 O CH_3 en positions 7,7'), 7.31 (s, 2H, 2 Ar-H), 7.39 (s, 2H, 2 O-HC-S), 8.60 (s, 2H, 2 OH en positions 6,6').

RMN ^{13}C (75MHz, $CDCl_3$) : 20.3 (Ar- CH_3), 20.5 (HC-(CH_3) $_2$), 25.9 (HC-(CH_3) $_2$), 27.0 (S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 27.6 (S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 58.2 (O CH_3 en positions 7,7'), 88.6 (O-HC-S), 108.9 (C-2), 113.4 (C-4), 118.1 (C-8), 120.6 (C-9), 125.1, 125.2 (C-5, C-10), 136.2 (C-3), 140.5 (C-7), 147.1 (C-6), 155.1 (C-1).

Composé 38

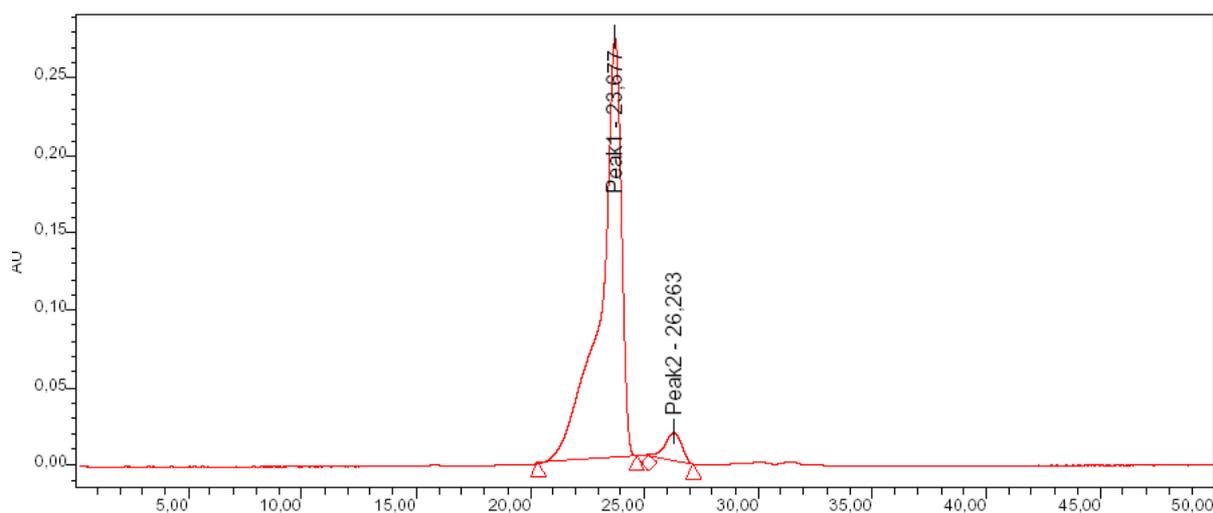
5,5'- diisopropyl - 2,2' - dithiopropane - 3,3',4,4' - tetramethoxy - 7,7' - dimethyl - 2H,2'H - [8,8'] bi[naphtho [1,8 - bc]furanyl]



$C_{37}H_{42}O_6S_2$

MW = 646,8

Forme du produit : solide amorphe blanc.



HPLC de Dithiopropane éther de l'éther hexaméthyle du gossypol

Rendement : 27.3%.

HPLC : k' (II) = 10,71

F : 211-212°C

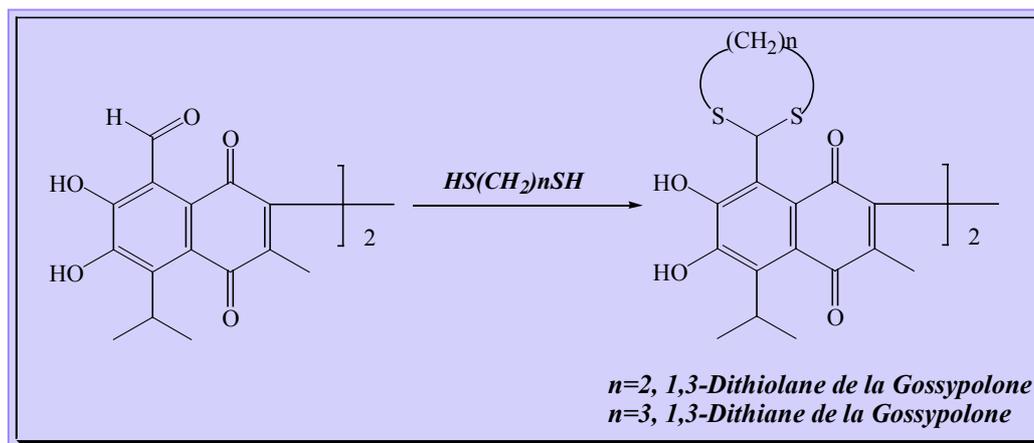
IR ($CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} : 2934 - 3028 (CH ; OCH_3).

SM (ESI) m/z : 647 (MH^+)

RMN 1H (400MHz, $CDCl_3$) : 1.51 (d, 12H, 2 HC-(CH_3)₂), 2.24 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 1.76 (m, 2H, C-S- CH_2 - CH_2 -S), 3.04 ; 3.34 (m, 4H, C-S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 3.82 (m, 2H, 2 HC-(CH_3)₂), 3.87 (s, 6H, 2 OCH_3 en positions 6,6'), 4.13 (s, 6H, 2 OCH_3 en positions 7,7'), 7.12 (s, 2H, 2 O-HC-S), 7.44 (s, 2H, 2 Ar-H).

RMN ^{13}C (300MHz, $CDCl_3$) : 20.9 (Ar- CH_3), 22.0 (HC-(CH_3)₂), 27.1 (HC-(CH_3)₂, C-S- CH_2 - CH_2 -S), 27.5 (C-S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S), 59.2 (OCH_3 en positions 7,7'), 61.4 (OCH_3 en positions 6,6'), 89.5 (O-HC-S), 111.0 (C-2), 115.7 (C-4), 121.4 (C-8), 124.0 (C-9), 125.9 (C-10), 136.0 (C-5), 137.1 (C-3), 145.2 (C-7), 151.0 (C-6), 155.5 (C-1).

4. Dérivés 1,3-Dithiane et 1,3-Dithiolane de la Gossypolone



Mode opératoire : A une solution de 1g (1,83 mmole) de gossypolone dissoute dans 50mL de chloroforme a été ajouté 3.éq de dithioethane (dithiopropane). Le mélange réactionnel est refroidi à -20°C , puis, on ajoute goutte à goutte 1.éq de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Ensuite, ce mélange est soumis à une agitation magnétique, en l'absence de lumière et sous argon, pendant 24h à température ambiante. On vérifie que la réaction est terminée, l'HPLC du mélange réactionnel donne un seul pic, et le pic de la gossypolone de départ a disparu. Le mélange réactionnel est lavé avec NaHCO_3 5% (3X20mL), à l'eau (3 fois) et est séché sur sulfate de sodium, filtré et évaporé sous pression réduite pour donner un résidu vert. Le résidu est repris dans l'éther et reprecipité dans l'hexane.

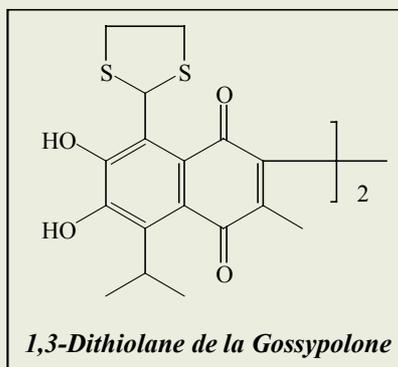
La pureté de ces produits est analysée par HPLC analytique dans les conditions suivantes :

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, $5\mu\text{m}$, (4,6mm x 250mm)
- (III) : A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H_2O + 0.1% TFA ;B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit = 1mL/mn, Pression = 2140 psi.

Composé 39

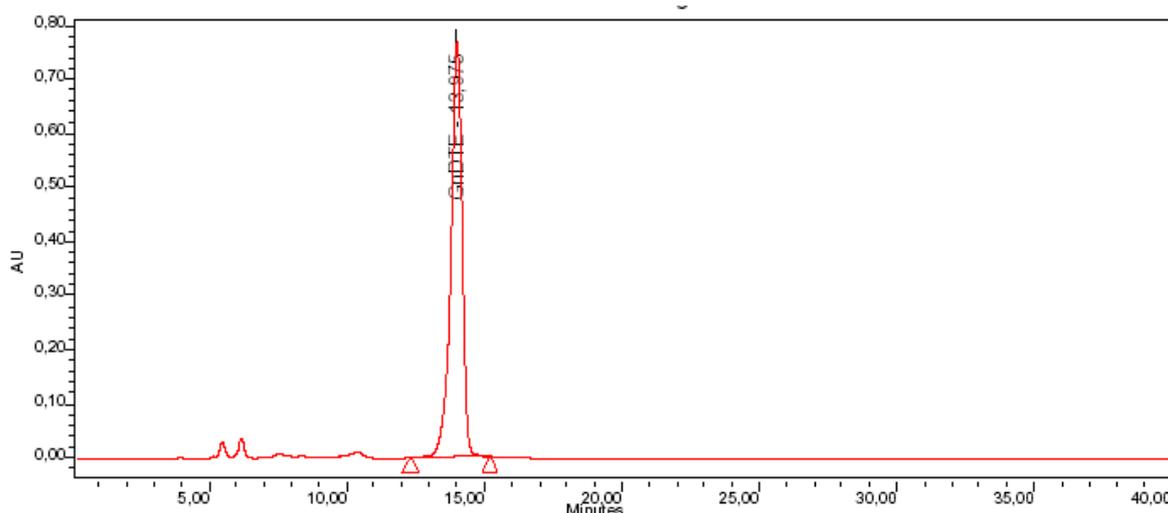
8,8' - Bis - [1,3]dithiolan - 2 - yl - 6,7, 6', 7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4' - tetraone (GnDTE)



$C_{34}H_{34}O_8S_4$

MW = 698,8

Forme du produit : solide amorphe vert clair



HPLC du 1,3-Dithiolane de la Gossypolone

Rendement : 65% (830mg)

HPLC : k' (III) = 4,70

F : 191-193°C

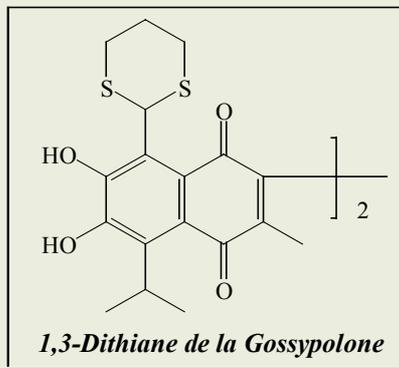
SM (ESI) m/z : 697 (M-H⁻)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : 1.43 (dd, 12H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 1.99 (s, 6H, 2 Ar-CH₃), 3.40, 3.58 (m, 8H, 2 C-S-CH₂-CH₂-S), 4.03 (m, 2H, J=7.0Hz, 2 HC-(CH₃)₂), 7.15 (s, 2H, 2 S-HC-S), 6.63, 8.89 (sl, 4H, 4 OH en positions 6,6',7,7').

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃) : 14.4 (Ar-CH₃), 19.4 & 19.6 (HC-(CH₃)₂), 28.2 (HC-(CH₃)₂), 39.8 ; 40.0 (C-S-CH₂-CH₂-S), 50.1 (S-HC-S), 119.9 (C-8), 125.5 (C-9), 128.8 (C-10), 136.8 (C-5), 139.4 (C-2), 145.8 (C-3), 147.2 (C-7), 149.7 (C-6), 185.4 (C-1), 187.6 (C-4).

Composé 40

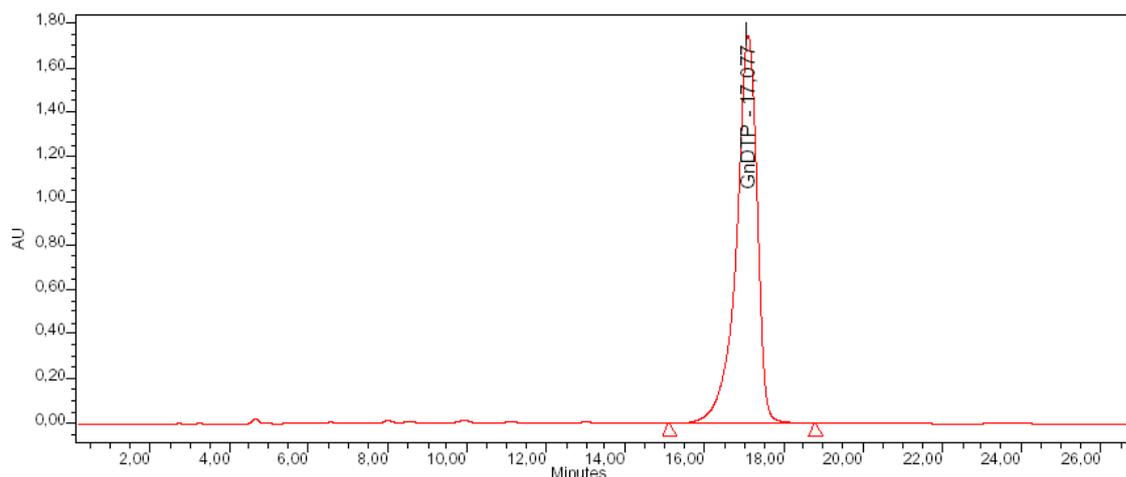
8,8' - Bis - [1,3]dithian - 2 - yl - 6,7, 6', 7' - tetrahydroxy - 5,5' - diisopropyl - 3,3' - dimethyl - [2,2']binaphthalenyl - 1,4,1',4' - tetraone



$C_{36}H_{38}O_8S_4$

MW = 726,9

Forme du produit : solide amorphe vert clair.



HPLC du 1,3-Dithiane de la Gossypolone

Rendement : 89% (1,18g)

HPLC : k' (III) = 5,97

F : 214-216°C

IR ($CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} : 3515 (OH), 2875 - 3030 (CH), 1654 (C=O).

SM (ESI) m/z : 749 (M+Na).

RMN 1H (400MHz, $CDCl_3$) : 1.43 (dd, 12H, $J=7.0Hz$, 2 HC-(CH_3)₂), 1.99 (s, 6H, 2 Ar- CH_3), 1.87; 2.15 (m, 4H, 2 C-S- CH_2 - CH_2 -S), 2.85 ; 3.10 (m, 8H, 2 C-S- CH_2 - CH_2 -S), 4.02 (m, 2H, $J=7.0Hz$, 2 HC-(CH_3)₂), 7.23 (s, 2H, 2 S-HC-S), 6.57 ; 8.18 (sl, 4H, 4 OH en positions 6,6',7,7').

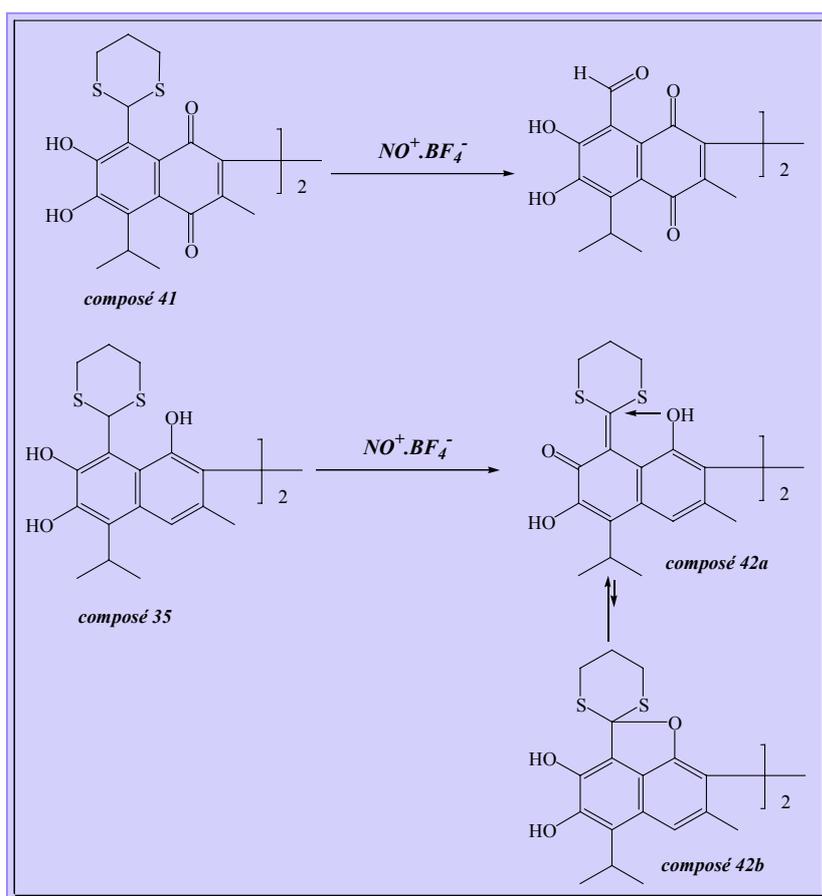
RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) : 14.5 (Ar- CH_3), 19.9 & 20.0 (HC-(CH_3)₂), 28.2 (HC-(CH_3)₂), 24.8 (C-S- CH_2 - CH_2 -S), 31.2 (C-S- CH_2 - CH_2 -S), 43.1 (S-HC-S), 121.5 (C-8), 123.4 (C-9), 128.8 (C-10), 136.8 (C-5), 139.4 (C-2), 145.9 (C-3), 147.0 (C-7), 149.5 (C-6), 185.3 (C-1), 187.8 (C-4).

Action de tétrafluoroborate de nitrosonium (NO^+BF_4^-) sur le composé 35 (GDTP) et le composé 41 (GnDTP)

Mode opératoire : A une solution de 150mg de composé **35** ou **41** dissous dans 15mL de diméthylformamide (DMF) a été ajouté 150 μL d'une solution de 20mg NO^+BF_4^- 400 μL de CH_2Cl_2 et de 50 μL de DMF . Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante et contrôlé par l'HPLC. Après 24h, le composé **35** donne un produit majoritaire (68%). Par contre, le composé **41** donne plutôt un mélange de produits, et la formation de la gossypolone est observée après 4 jours (40%).

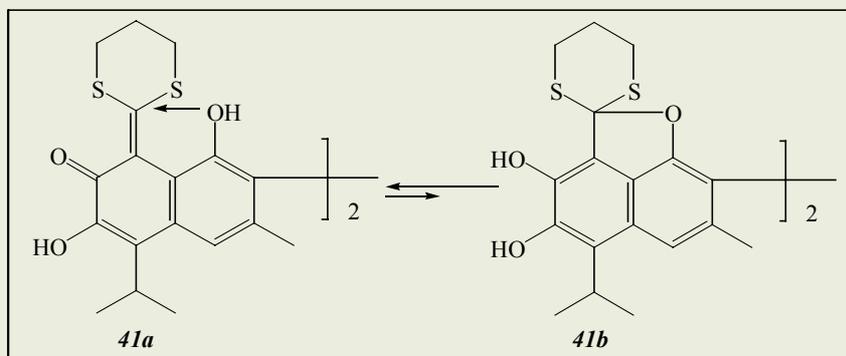
On a isolé le produit formé à partir du composé **35** par HPLC préparative dans les conditions suivantes :

- Colonne : PrepPak® Cartridge C18, 10 μm 125Å (25 mm i.d. x 100 mm)
- Solvants : A'/B' = 20/80, avec A' = CH_3CN ; B' = H_2O
- Débit : 5mL/mn, Pression = 50 bar.



Composé 41a

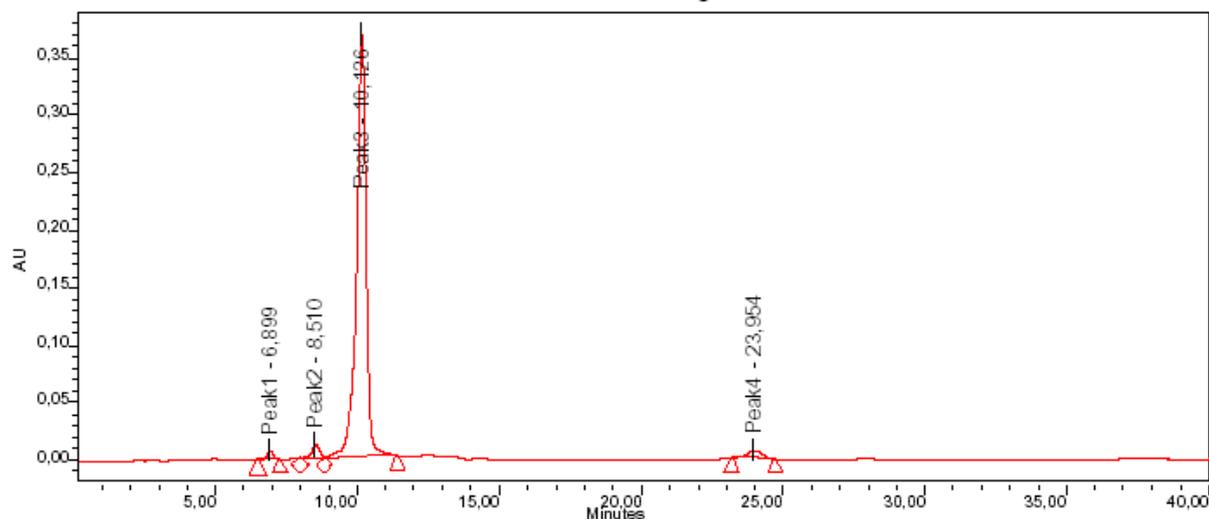
8'-Dimercaptomethylene-8-[1,3]dithian-2-ylidene-1,6,1',6'-tetrahydroxy-5,5'-diisopropyl-3,3'-dimethyl-8H,8'H)-[2,2']binaphthalenyl-7,7'-dione (41a)



$C_{36}H_{38}O_6S_4$
MW = 694,9

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5 μ m, (4,6mm x 250mm)
- (III) A/B = 20/80, avec A = 5%ACN+ 95% H₂O+ 0.1% TFA ; B =100% ACN+ 0.1% TFA, débit : 1mL/mn, Pression = 2140 psi.



Rendement : 14 %

HPLC : K' (III) = 3,19

SM (ESI) m/z : 694 (M)

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ 1.53 (d, 12H, 2 HC-(CH₃)₂), 1.99 (s, 6H, 2 Ar-CH₃)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 20.3-20.7 (Ar-CH₃), 21.3-21.4 (HC-(CH₃)₂), 28.1-28.2 (HC-(CH₃)₂), 27.0 (C-S-CH₂-CH₂-CH₂-S), 29.6-30.0 (C-S-CH₂-CH₂-CH₂-S), 41.9, 65.1 (S-HC-S), 107.9-149.9, 173.0 & 187.8 (carbones du noyau naphthalénique)

Action de NO gaz et NO gaz+FeCl₃ sur le composé 35 (GDTP)

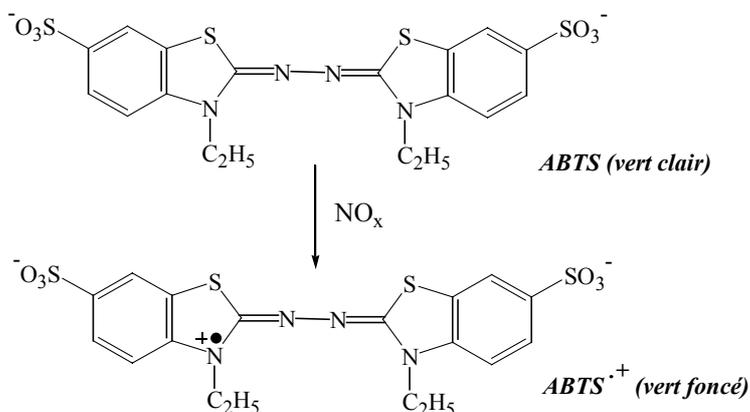
- Préparation d'une solution saturée de NO (dans le DMF) :

Etant donné que le monoxyde d'azote réagit, en phase aqueuse, avec le dioxygène dissout, les solutions de NO sont préparées en anaérobiose. Pour chasser le dioxygène dissous, il suffit de faire passer un flux d'argon (Ar, qualité U, Air liquide) dans la solution de 10mL de DMF contenue dans un ballons de 25mL, pendant une heure environ. L'étanchéité au dioxygène du ballon est assurée par un bouchon à jupe en caoutchouc. Ensuite, le gaz NO, avant de buller dans la solution de DMF déaérée, passe dans une fiole de garde vide puis barbotte dans une solution de soude 10N pour piéger les espèces oxydées de NO, comme les gaz polluants NO₂. Après obtention de la solution saturée de NO, le circuit est purgé avec de l'argon.

- Dosages de NO

Il existe plusieurs techniques de dosages de NO, nous avons choisi la technique de dosage de NO par l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique).

Lors de l'oxydation spontanée de NO en nitrite dans l'eau, il se forme des intermédiaires réactifs symbolisés par NO_x, qui sont capables de réagir avec l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (ABTS), pour former un radical cation stable ABTS^{•+}, absorbant à 660nm et 750 nm

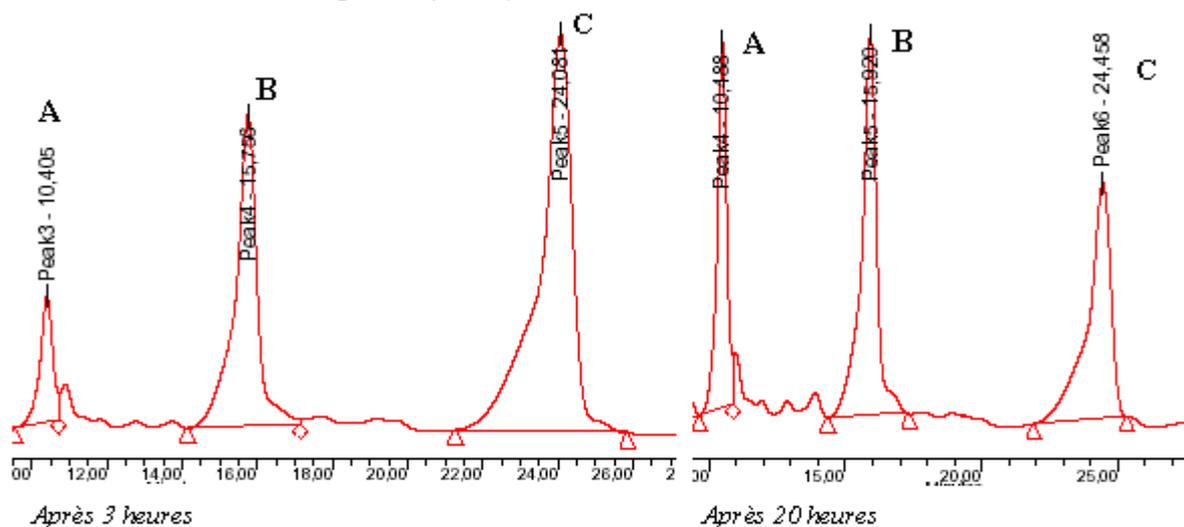


Des volumes croissants de la solution de NO (10, 50 et 100μL) sont ajoutés à une solution d'ABTS 5mM (990, 950 et 900μL, respectivement). La concentration de NO est déterminée par spectrophotométrie visible, en notant les changement d'absorbance d'une solution d'ABTS en ABTS^{•+} à 660nm ($\epsilon=12000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et à 750nm ($\epsilon=15000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

- La concentration de la solution de NO dans DMF utilisée pour notre étude est 0.53mM

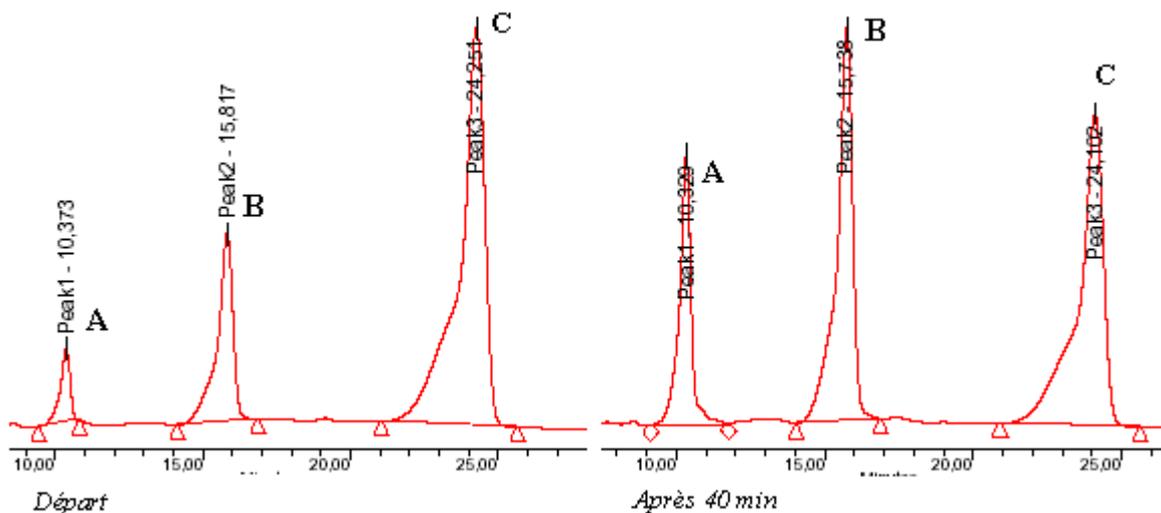
Mode opératoire: A une solution de 1mg de composé **35** dissous dans 50 μ L de diméthylformamide (DMF) a été ajouté 10 μ L d'une solution de NO/DMF 0.53mM. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante, l'évolution de la réaction est surveillée par HPLC. Après 20min, nous avons fait l'HPLC du mélange réactionnel, le composé **35** n'a pas réagi. Puis, nous avons ajouté 10 μ L de la solution de NO et 5 μ L d'une solution de chlorure ferrique 0.1%. Par l'HPLC, Nous avons observé la formation de deux produits comme dans le cas de la réaction avec NO⁺,BF₄⁻.

Action NO⁺BF₄⁻ sur le composé 35 (GDTP)



- A: composé 41a
- B: intermédiaire
- C: composé 35 (GDTP)

Action NO gaz et FeCl₃ 0.1% sur le composé 35 (GDTP)



VIII. Partie expérimentale biologique

Les activités cytotoxiques *in vitro* de tous les dérivés du gossypol ont été mesurées sur des cellules KB (carcinome de l'épiderme buccal humain) en provenance de l' American Type Culture Collection.

La lignée de cellules KB a été cultivée dans MEM (minimal essential medium, with Earle's salt solution) acheté chez Seromed, contenant 10% serum fœtal bovin, 2 mM de L-glutamine, 60 µg/mL de penicilline G et streptomycine sulfate et 40 µg/mL de gentamycine. Pour les essais, les cellules KB ont été cultivées à l'état de monocouches dans des microplaques plastiques Nunc à 24 puits (25,000 cellulesensemencées par puits dans 1 mL de milieu de culture).

Les produits ont été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), et des dilutions en cascades ont été faites dans ce solvant puis ajoutées dans les cultures à raison de 10µL par puits, immédiatement après avoir rincé les cellules et ajouté un nouveau milieu de culture (concentration finale du DMSO < 1%). Des cultures de contrôle ont reçu une dilution équivalente de DMSO.

Toutes les cultures ont été incubées à 37°C sous une atmosphère 95% air-5% CO₂ dans un incubateur humide. Après 3 jours d'incubation la viabilité des cellules en monocouche a été évaluée en ajoutant dans chaque puits 100µL d'une solution à 0.02% dans le milieu de culture de rouge neutre vital et après une nouvelle incubation de 8 à 16 h. Après lavage par du tampon phosphate et lyse des cellules avec une solution à 1% de sodium lauryl-dodecyl sulfate, une mesure photométrique du colorant extrait a été réalisée à 540nm avec un lecteur de microplaques Uniskam-II (Labosystems, Life Sciences International).

Pour la plupart des dérivés étudiés, les concentrations finales mesurées étaient dans l'intervalle 0,5µM à 10µM et les mesures ont été faites en duplicates dans chaque microplaque. Les IC₅₀ ont été calculés par interpolation entre les pourcentages de cellules tuées en fonction de la concentration du dérivé étudié.

Cytotoxicité des thiodérivés du gossypol en présence de donneur NO

Pour étudier l'effet du dipropylènetriamine nonoate (DPTA NONOate) sur la toxicité de dithiane du gossypol (GDTP) **35**, les cellules KB ont été cultivées comme décrit ci-dessus, en présence de sérum fœtal bovin. Après 24 h d'incubation à 37°C, **35** et le DPTA NONOate ont été ajoutés simultanément aux cultures. Des échantillons standard et de contrôle ont été incorporés dans chaque microplaque pour déterminer la viabilité des cultures avec le DPTA NONOate, avec **35**, ou sans aucun produit ajouté. Le pourcentage de destruction des cellules a été déterminé comme précédemment après une incubation de 48 h à 37°C.



...dans toute sa beauté

Bibliographie

Bibliographie

Abou-Donia MB & Drekert JW, *Metabolic fate of gossypol: the metabolism of [14-C]gossypol in swine*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (1975), 31(1), 32-46

Adams R^(a), Friedman BS, Price CC, Morris RC, Kirkpatrick EC, *Structure of gossypol. VI. Addition products with butadienes*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2160-2162

Adams R^(b) & Geissman TA, *Structure of gossypol. VII. Gossypol dimethyl ether*, *J. Am. Chem. Soc.* (1938), 60, 2163-2166

Adams R^(c) & Geissman TA, *Structure of gossypol. VIII. Derivatives of the ether gossypol*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2166-2170

Adams R^(d), Geissman TA, Morris RC, *Structure of gossypol. XVI. Reduction products of gossypolone tetramethyl ether and gossypolic acid tetramethyl ether*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2967-2970

Adams R^(e), Geissman TA, Morris RC, *Structure of gossypol. XVII. Nitration products of gossypol hexamethylether, gossypolone tetramethyl ether and gossypolonic acid tetramethyl ether*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2970-2972

Adams R^(f), Hunt M, Morris RC, *Structure of gossypol. XVIII Synthesis of 1,2 dimethoxy-3-isopropyl-5-aminobenzene, a degradation product of gossypol*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2972-2974

Adams R^(g), Morris RC, Kirkpatrick EC, *Structure of gossypol. V. Anilino derivatives*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2158 -2160

Adams R^(h), Morris RC, Kirkpatrick EC, *Structure of gossypol. IX. Oxidation and degradation of gossypol hexamethyl ether; gossic acid*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2170-2174

Adams RC⁽ⁱ⁾ & Butterbaugh DJ, *Structure of gossypol. X. Apogossypol and its degradation products*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2174-2180

Adams RC^(j) & Geissman TA, *Structure of gossypol. XII. Gossylic acid lactone tetramethyl ether*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2184-2188

Adams RC^(k) & Kirkpatrick EC, *Structure of gossypol. XI. Absorption spectra of gossypol, its derivatives and of certain dinaphthalene compounds*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2180-2184

Adams RC^(l) & Morris RC, *Structure of gossypol. XIII. Conversion of gossic acid to apogossypolic acid*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 2188-2190

Adams RC^(m), Morris RC, Geissman TA, Butterbaugh DJ & Kirkpatrick EC, *Structure of gossypol. XIV. Apogossypol acid*, J. Am. Chem. Soc., (1938), 60, 2191-2193

Adams RC⁽ⁿ⁾, Morris RC, Geissman TA, Butterbaugh DJ & Kirkpatrick EC, *Structure of gossypol. XV. An interpretation of its reactions*, J. Am. Chem. Soc., (1938), 60, 2193-2204

Adams R^(a) & Baker BR, *Structure of gossypol. XXI Synthesis of 1,2 dimethoxy-3-isopropyl-4-benzoic acid and apogossypolic acid*, J. Am. Chem. Soc., (1939), 61, 1138-1142

Adams R^(b) & Dial WR, *Structure of gossypol. XXII. Gossypol ether and their reduction products*, J. Am. Chem. Soc., (1939), 61, 2077-2082

Adams R^(c) & Geissman TA, *Structure of gossypol. XXIII. Attempts to prepare desapogossypolone. Condensation of hexadiene 2.4 with dibenzoyl ethylene*, J. Am. Chem. Soc., (1939), 61, 2083-2089

Adams R^(d) & Hunt M, *Structure of gossypol. XIX Synthesis of 1,2 dihydroxy-3-isopropyl-6-benzoic acid*, J. Am. Chem. Soc., (1939), 61, 1132-1133

Adams R^(e), Hunt M, Baker BR, *Structure of gossypol. XX Synthesis of 1,2 dihydroxy-3-isopropyl-5-benzoic acid*, J. Am. Chem. Soc., (1939), 61, 1134-1136

Adams R^(a) & Baker BR, *Structure of gossypol. XXV. Synthesis of desapogossypolone tetramethyl ether*, J. Am. Chem. Soc., (1941), 63, 535-537

Adams R^(b), Geissman TA, Baker BR, Teeter HM, *Structure of gossypol. XXIV. Attempts to prepare desapogossypolone tetramethyl ether*, J. Am. Chem. Soc., (1941), 63, 528-534

Adams R^(c), Geissman TA, Dial WR, Fitzpatrick JT, *Structure of gossypol. XXVI. Gossypolic acid*, J. Am. Chem. Soc., (1941), 63, 2439-2441

Adams RC, Geissman TA, Edwards E, *Gossypol, a pigment of cottonseed*, Chem. Rev., (1960), 60, 555-574

Adlakha RC, Ashorn CL, Chan D, Zwelling LA, *Modulation of 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide-induced Topoisomerase II-mediated DNA cleavage by gossypol*, Cancer Research, (1989), 49, 2052-2058

Akendengue B, Ngou-Milama E, Laurens A, Hocquemiller R, *Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products*, Parasite, (1999), 6(1), 3-8

Band V, Hoffer AP, Band H, Rhinehardt AE, Knapp RC, Matlin SA, Anderson DJ, *Antiproliferative effect of gossypol and its optical isomers on human reproductive cancer cell lines*, Gynecologic Oncology, (1989), 32, 273-277

Baram N.I, Ziyaev Kh.L, Khodzhanizayov B, Ismailov A.I, *A study of the hydrolysis of amino derivatives of gossypol at various pH values*, *Chemistry of Natural compounds*, (1999), **35** (1), 29-32

Baram NI^(a), Ziyaev KL, Ismailov AI, Ziyamov D, Mangutova YS, *New Azoderivatives of gossypol*, *Chemistry of Natural compounds*, (2000), **36** (2), 185-188

Baram NI^(b), Ziyaev KhL, Ismailov AI, Ziyamov D, Mangutova YS, *New Azoderivatives of gossypol*, *Chemistry of Natural compounds*, (2000), **36** (5), 541-542

Barbier MP, (1983), mémoire DEA Pharmacochimie, Centre d'études pharmaceutiques de Chatenay Malabry

Baumann E, *Chem. Ber.*, (1886), **19**, 3218

Benz CC, Hollander C, Keniry MA, Keniry M, James TL, Mitchell M, *Lactic dehydrogenase isozymes, ³¹P magnetic resonance spectroscopy, and in vitro antimitochondrial tumor toxicity with gossypol and rhodamine-123*, *Journal of Clinical Investigation*, (1987), **79**(2), 517-523

Benz C, Keniry M, Goldberg H, *Selective toxicity of gossypol against epithelial tumors and its detection by magnetic resonance spectroscopy*, *Contraception*, (1988), **37**, 221-228

Benz CC, Keniry MA, Ford JM, Townsend AJ, Cox FW, Palayoor S, Matlin SA, Hait WN, Cowan KH, *Biochemical correlates of the antitumor and antimitochondrial properties of gossypol enantiomers*, *Molecular Pharmacology*, (1990), **37**, 840-847

Benz CC, Iyer SB, Asgari HS et al. , *Gossypol effects on endothelial cells and tumor blood flow*, (1991), *Life Science*, **49**, PL67-72

Blackstaffe L, Shelley MD, Fish RG, *Cytotoxicity of gossypol enantiomers and its quinone metabolite gossypolone in melanoma cell lines*, *Melanoma Research*, (1997), **7**, 364-372

Böhn H & Schonafinger K, *Oxygen and oxidation promote the release of NO from sydnonimines (III)*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, (1989), **14**, S6-S12

Borch RF, Bernstein MD, Durst HD, *The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1971), **93**, 2897-2904

Brzezinski B, Olejnik J, Paszyc S, Aripov TF, *¹H NMR studies of gossypol and its complexes with some organic compounds*, *Journal of molecular Structure*, (1990), **220**, 261-268

Bushunow P, Reidenberg MM, Wasenko J et al. , *Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, (1998), **358** (suppl.2), R533

Bushunow P, Reidenberg MM, Wasenko J, Winfield J, Lorenzo B, Lemke S, Himpler B, Corona R, Coyle T, *Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas*, *Journal of Neuro-Oncology*, (1999), **43**(1), 79-86

Butler AR & Glidewell C, *Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action*, *Chem. Soc. Rev.*, (1987), **16**, 361-380

Campbell KN, Morris RC, Adams R, *The structure of gossypol I*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1937), **59**, 1723-1728

Carruth FE, *Contribution to the chemistry of gossypol, the toxic principle of cottonseed*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1918), **40**, 647-663

Cass QB, Tiritan E, Matlin SA & Freire EC, *Gossypol enantiomer ratios in cotton seeds*, *Phytochemistry*, (1991), **30** (8), 2655-2657

Cass QB, Bassi AL, Matlin SA, *First direct resolution of gossypol enantiomers on a chiral high-performance liquid chromatography phase*, *Chirality*, (1999), Vol **11**, Iss 1, 46-49

Chander K, Seshadri TR, *Refining of cotton seed oil*, *Current Science*, (1959), **1**, 6-7

Changfu X, Cunheng H, Guanghong B, Shantian M, *Crystal structure of gossypol acetic acid*, *Sci. Sin. Ser. B*, (1982), **25** (11), 1194-1200

Clark EP, *Studies on gossypol. I. The preparation, purification, and some of the properties of gossypol, the toxic principle of cottonseed*, *J. Biol. Chem.*, (1927), **75**, 725-739

Clark EP^(a), *Studies on gossypol. II. Concerning the nature of Carruth's D gossypol*, *J. Biol. Chem.*, (1928), **76**, 229-235

Clark EP^(b), *Studies on gossypol. IV. Apogossypol*, *J. Biol. Chem.*, (1928), **78**, 159-166

Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA, *Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumor*, *Cancer Res.*, (1995) **55**(4), 727-730

Coyle T, Levante S, Shetler M, Winfield J, *In vitro and in vivo cytotoxicity of gossypol against central nervous system tumor cell lines*, *Journal of Neuro-Oncology*, (1994), **19**, 25-35

Dao VT, Gaspard C, Mayer M, Werner GH, Nguyen SN, Michelot RJ, *Synthesis and cytotoxicity of gossypol related compounds*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2000), **35**(9), 805-813

Deck LM, Vander Jagt DL & Royer RE, *Gossypol and derivatives: A new class of aldose reductase inhibitors*, *J. Med. Chem.*, (1991), **34**, 3301-3305

Deck LM, Royer RE, Chamblee BB, Hernandez VM, Malone RR, Torres JE, Hunsaker LA, Piper RC, Makler MT, Vander Jagt DL, *Selective inhibitors of human lactate dehydrogenases and lactate dehydrogenase from the malarial parasite plasmodium falciparum*, J. Med. Chem., (1998), Vol 41, Iss 20, 3879-3887

Delaforge M, Servent D, Wirsta P, Ducrocq C, Mansuy D, Lenfant M, *Particular ability of cytochrom P-450 CYP3A to reduce glyceryl trinitrate in rat liver microsomes: subsequent formation of nitric oxide*, Chem. Biol. Interact., (1993), 86, 103-117

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD, *Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (1979), 16(6), 710-718

Dicks AP & Williams DLH, *Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein bound Cu²⁺ sources*, Chem. Biol. , (1996), 3, 655-659

Dorsett PH & Kerstine EE, *Antiviral activity of gossypol and apogossypol*, J. Pharm. Sci., (1975), 64 (6), 1073-1075

Edwards JD Jrs & Cashaw JL, *Studies in the naphthalene series III Synthesis of apogossypol hexamethyl ether*, J. Am. Chem. Soc., (1957), 79, 2283-2284

Edwards JD Jr, *Total synthesis of gossypol*, J. Am. Chem. Soc., (1958), 80, 3798-3799

Eid JE, Ueno H, Wang CC, Donelson J, *Research brief - gossypol-induced death of african trypanosomes*, Exp. Parasitol., (1988), 66, 140-142

Fardella G, Barbetti P, Grandolini G, Chiappini I, Ambrogi V, Scarcia V, Candiani AF, *Phenylthio-derivatives of α -methylene- γ -lactones as pro-drugs of cytotoxic agents*, Eur. J. Med. Chem, (1999), 34, 515-523

Fish RG, Groundwater PW, Morgan JJG, *The photo-epimerisation of gossypol Schiff's base*, Tetrahedron asymmetry, (1995), 6 (4), 873-876

Flack MR, Pyle RG, Mullen NM, Lorenzo B, Wu YW, Knazek RA, Nisula BC, Reidenberg MM, *Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer*, J. Endocrinol. Metab., (1993), 76 (4), 1019-1024

Floridi A, D'Atri S, Menichini R, Marcante ML, Nista A, Silvestrini B, Caputo A, De Martino C. , *The effect of the association of gossypol and Lonidamine on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells*, Exp. Mol. Pathol., (1983), 38, 322-335

Fournet A, Barrios AA, Munoz V, Hoquemiller R, Cave A, *Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with Leishmania amazonensis and L. venezuelensis*, Trop. Med. Parasitol., (1992), 43, 219-222

Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnelle D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, *Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1993), **90**, 10957-10961

Gilbert NE, O'Reilly JE, Chang CJG, Lin YC, Brueggemeier RW, *Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells*, *Life Sciences*, (1995), **57**(1), 61-67

Gomez MS, Piper RC, Hunsaker LA, Royer RE, Deck LM, Makler MT, Vander Jagt DL, *Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite P. falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, (1997), **90**, 235-246

Gonzalez-Garz MT, Said-Fernandez S, *Research brief - Entamoeba histolytica: potent in vitro antiamebic effect of gossypol*, *Exp. Parasitol.*, (1988), **66**, 253-255

Greene TW, in *Protecting Groups in Organic Synthesis*, New York, John Wiley, (1981), 129-133

Gu ZP, Mao BY, Wang YX, Zhang RA, Tan YZ, Chen ZX, Cao L, You GD, Segal SJ, *Low dose gossypol for male contraception*, *Asian Journal of Andrology*, (2000), **2**(4), 283-287

Haspel HC, Ren YF, Watanabe KA, Sonenberg M, Corin RE, *Cytocidal effect of gossypol on cultured murine erythroleukemia cells is prevented by serum protein*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1984), **229** (1), 218-225

Hass RH, Shirley DA, *The oxidation of gossypol. II. Formation of gossypolone with ferric chloride*, *J. Org. Chem.*, (1965), **30**, 4111-4113

Heidrich JE, Hunsaker LA, Vander Jagt DL, *Gossypol, an antifertility agent, exhibits antimalarial activity in vitro*, *IRCS Med.Sci.*, (1983), **11**, 304

Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S, *Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide*, *Biochem. J.*, (1992), **281**, 419-424

Hooker SC, Shepard HW, Walsh JG, Connitt GH, *Constitution of lapachol and its derivatives. V. The structure of Paterno's « isolapachone »*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1936), **58**, 1190-1197

Hudson AT, In: *Antimalarial Drugs* (Eds. Peters W, Richards WHG), Springer-Verlag, Berlin, (1984), volume II, 434, *Lapinone, menoctone, hydroxyquinolinequinones and similar structures*

Hudson AT, Randall AW, Fry M, Ginger CD, Hill B, Latter VS, McHardy N, Williams RB, *Novel antimalarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum antiprotozoal activity*, *Parasitology*, (1985), **90**, 45-55

Hudson AT, *Atovaquone - a novel broad-spectrum anti-infective drug*, *Parasit. Today*, (1993), **9**, 66-68

Ismailov AI, Shukurov Z, Talipov SA, Kamaev FG, Mardanov RG, Ibragimov BT, *Study of gossypol oxidation products. Structure of gossidan*, *Khim. Prir. Soedin*, (1994), **1**, 50-58

Jaroszewski JW, Ofer K, Cohen JS, *Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cells : ³¹P nuclear magnetic resonance and toxicity studies*, *Cancer Research*, (1990), **50**, 6936-6943

Jaroszewski JW, Strom-Hansen T, Hansen LL, *Optical stability of gossypol*, *Chirality*, (1992), **4**, 216-221

Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC and Moncada S, *Roles of nitric oxide in tumor growth*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1995), **92**, 4392-4396

Johnson WS & Daub GH, *The Stobbe condensation.*, *Organic Reactions*, (1951), John Wiley and Sons, Vol. 6, 1

Joseph AEA, Matlin SA, Knox P, *Cytotoxicity of enantiomers of gossypol*, *Br I Cancer*, (1986), **54**, 511-513

Katsuki S, Arnold WP, Mittal CK, Murad F, *Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin, and nitric oxide in various tissue preparation and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine*, *J. Cyclic Nucleotide Res.*, (1977), **3**, 23-35

Kell AJ, *Malaria*. Oxford University, Oxford(1991),

King TJ & De Silva LB, *Optically active gossypol from thespesia populnea.*, *Tetrahedron Letters*, (1968), **3**, 261-263

Koltun SP, Decossas KM, Pominski J, Pons WA, Patton EL, *Production of gossypol from cottonseed gums. Preliminary cost study*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, (1959), **36**, 349-352

Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Wilcox DE, *Effects of temperature, oxygen, hemelignands and sulfhydryl alkylation on the reaction of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin*, *Biochem. Pharmacol.*, (1993), **46**, 95-102

Ku B & Oh DY, *Tetrachlorosilane catalyzed dithioacetalization*, *Synthetic communications*, (1989), **19**(3&4), 433-438

Kumar V & Dev S, *Titanium tetrachloride, an efficient and convenient reagent for thioacetalization*, *Tetrahedron Letters*, (1983), **24**(12), 1289-1292

Kunesch N, Barbier MP, Dalkafouki A, Poisson JE, *Préparation de dérivés de la fonction aldéhyde du gossypol*, *Ann. Pharmaceutiques Francaises*, (1990), **48**(1), 1-6

Lacombe L, Dalkafouki A, Kunesch N, *Attribution complete des signaux du spectre de RMN ¹³C du gossypol à l'aide des techniques a deux dimensions*, *Journal of Natural Products*, (1987), **50**(2), 277-280

- Lee KJ & Dabrowski K, *Gossypol and gossypolone enantiomers in tissues of Rainbow trout fed low and high levels of dietary cottonseed meal*, *J. Agric. Food Chem.*, (2002), **50**, 3056-3061
- Leeson P, *Gossypol-male contraception*, *Drug of Future*, (1979), **5** (5), 338-341
- Liang XS, Rogers AJ, Webber C, Ormsby TJ, Tritan ME, Matlin SA & Benz CC, *Developing gossypol derivatives with enhanced antitumor activity*, *Invest. New drugs*, (1995), **13**, 181-186
- Ligueros M, Jeoung D, Tang B, Hochhauser D, Reidenberg MM, Sonenberg M, *Gossypol inhibition of mitosis, cyclin D1 and Rb protein in human mammary cancer cells and cyclin-D1 transfected human fibrosarcoma cells*, *British Journal of Cancer*, (1997), **76**(1), 21-28
- Lin TS, Schinazi R, Griffith BP, August EM, Eriksson BFH, Zheng DK, Huang L, Prusoff WH, *Selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by the (-) but not the (+) enantiomer of gossypol*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, (1989), **33** (12), 2149-2151
- Lin TS, Schinazi RF, Zhu J, Birks E, Carbone R, Si Y, Wu K, Huang L & Prusoff WH, *Anti-HIV-1 activity and cellular pharmacology of various analogs of gossypol*, *Biochemical Pharmacology*, (1993), **46**, 251-255
- Lindberg MC, Naqvi RH, Matlin SA, Zhou RH, Bialy G, Blye RP, *Comparative anti-fertility effects of Gossypol enantiomers in male hamsters*, *Int. J. Andrology*, (1987), **10**, 619-623
- Liu BS, *A modest proposal for the use of crude cottonseed oil for antifertility*, *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*, (1957), **6**, 43
- Loewenthal HJE, in *Protecting Groups in Organic Chemistry*, New York Plenum Press (Edited by JFW McOmie), (1973), p.334
- Maeda H & Hakaike T, *Nitric Oxide and Oxygen Radicals in Infection, Inflammation, and Cancer*, *Biochemistry (Moscow)*, (1998), **63** (7), 1007-1019
- Marchlewski L, *J. Prakt. Chem.*, (1899), **60**, 84.
- Marx M & Tidwell TT, *Reactivity-selectivity in the Swern oxidation of alcohols using dimethyl sulfoxide-oxalyl chloride*, *J. Org. Chem.*, (1984), **49**, 788-793
- Matlin SA & Zhou RH, *Resolution of gossypol: Analytical and preparative HPLC*, *Journal Of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication*, (1984), **7**, 629-631
- Matlin SA, Zhou RH, Games DE, Jones A & Ramsey ED, *HPLC, Mass spectrometry, and LC/MS of gossypol and its derivatives*, *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication*, (1984), **7**, 196-202
- Matlin SA, Zhou R, Bialy G, Blye RP, Naqvi RH, Lindberg MC, *(-)-Gossypol: an active male antifertility agent*, *Contraception*, (1985), **31**(2), 141-149

Matlin SA, Belenguer A, Tyson RG, Brookes AN, **Resolution of gossypol: Analytical and large-scale preparative HPLC on non-chiral phases**, *Journal Of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication*, (1987), **10**, 86-93

Matlin SA, Roshdy S, Cass QB, Freitas LCG, Longo RL, Malvestiti I, **Structural investigations of gossypol Schiff's bases**, *J. Braz. Chem. Soc.*, (1990), **1**(3),128-133

Medrano FJ, Andreu JM, **Binding of gossypol to purified tubulin and inhibition of its assembly into microtubules**, *Eur. J. Biochem.*, (1986), **158**, 63-69

Megson I L, **Nitric Oxide donor drugs**, *Drugs of the Future*, (2000), **25**(7), 701-715

Mellon JE, **Inhibition of aflatoxin production in aspergillus flavus by cotton ovule extracts**, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, (1992), **69** (9), 945-947

Meyers AI & Willemsen JJ, **The synthesis of (S)-(+)-gossypol via an asymmetric Ullmann coupling**, *Chem. Commun.*, (1997), 1573-1574

Meyers AI & Willemsen JJ, **An oxazoline based approach to (S)-gossypol**, *Tetrahedron*, (1998), **54**(35), 10493-10511

Miller RF^(a) & Adams R, **Structure of gossypol. IV. Anhydrogossypol and its derivatives**, *J Am Chem Soc.*, (1937), **59**, 1736-1738

Miller RF^(b), Butterbaugh DJ, Adams R, **Structure of gossypol II. Acylation**, *J. Am. Chem. Soc.*, (1937), **59**, 1729-1731

Montamat EE, Burgos C, Gerez de Burgos NM, Rovai LE, Blanco A, Segura EL, **Inhibitory action of gossypol on enzymes and growth of trypanosoma cruzi**, *Science*, (1982), **218**, 288-289

Morris RC & Adams R, **The structure of gossypol III. Gossypol ethers**, *J. Am. Chem. Soc.*, (1937), **59**, 1731-1735

Murrell W, (1876), *Lancet* **1**, 80-81, 113-115, 151-152 et 225-227

National Coordinating Team on the clinical study of gossypol as Male antifertility drug. The clinical study of gossypol in 8806 men. Report *Contraception* 1985, **5**(4), 5-11. [in Chinese]

Oguyanov VI, Petrov OS, Tiholov EP, Mollov NM, **Synthesis of gossypol analogues**, *Helv. Chi. Acta*, (1989), **72**, 353 - 360

Oishi T, Kamemoto K, Ban Y, **A novel cleavage of thioketals through the alkylation by Et₃O⁺.BF₄⁻**, *Tetrahedron Letters*, (1972), **11**, 1085-1088

Omura K & Swern D, **Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. A preparative, steric and mechanistic study**, *Tetrahedron*, (1978), **34**, 1651- 1660

- Ong BS, *A simple and efficient method of thioacetal- and ketalization*, *Tetrahedron Letters*, (1980), 21, 4225-4228
- Page IH, Corcoran AC, Dustan HP, Koppannyi T, *Cardiovascular actions of sodium nitroprusside in animals and hypertensive patients*, *Circulation*, (1955), 11, 188-198
- Peters W, *Chemotherapy and drug resistance in malaria*, 2nd edn, vol 2. Academic Press, London, (1987), 543-568
- Phillipson JD & Wright CW, *Antiprotozoal agents from plant sources*, *Planta Med.*, (1991), 57(7), 553-59
- Polsky B, Segal SJ, Baron PA, Gold JW, Ueno H, Armstrong D, *Inactivation of human immunodeficiency virus in vitro by gossypol*, *Contraception*, (1989), 39 (6), 579-587
- Pons WA, *Gossypol analysis: Past and Present*, *J. Ass. Off. Agr. Chem.*, (1977), 60 (2), 252-259
- Qiu, J., Reidenberg, M.M., Levin, L.R., Buck, J. , *The search for gene(s) conferring sensitivity to cell killing by gossypol* , *FASEB J*, (1999), 13, A151
- Radloff RJ, Deck LM, Royer RE, *Antiviral activities of gossypol and its derivatives against herpes simplex virus type II*, *Pharmacology Res. Comm.*, (1986), 18, 1063-1073
- Rands RD, *Proceeding of the conference on inactivation of gossypol with mineral salts*, In : *Memphis TN, edito. National cottonseed products association*, New York, (1966), 54-58
- Rao PN, Wang YC, Lotzova E, Khan AA, Rao SP, Stephens LC. , *Antitumor effects of gossypol on murine tumors*, *Cancer Chemother Pharmacol*, (1985), 15, 20-25
- Rao DNR, Elguindi S, O'brien PJ, *Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes*, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1991), 286, 30-37
- Ray S, Hazra B, Mittra B, Das A, Majumder HK, *Diospyrin, a bisnaphthoquinone : a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of Leishmania donovani*, *Mol. Pharm.*, (1998), 54, 994-999
- Read JA, Wilkinson KW, Tranter R, Session RB, Brady RL, *Chloroquine binds in the cofactor binding site of Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase*, *J Biol. Chem.*, (1999), 274, 10213-10218
- Reidenberg MM, *Studies of gossypol in the treatment of cancer*, *Reproductive medicine : A Millennium review*, (1999), 305-308
- Rikiyama Y & Lin YC, *Taenia taeniaeformis : inhibition of metacestode development in the rat by gossypol*, *Exp.Parasitol.*, (1986), 61, 127-133

Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weisler MC, *Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck*, *Otolaryngol. Head and Neck Surg.*, (1995), **113**, 541-549

Rosenberg LJ, Adlakha RC, Desai DM, Rao PN, *Inhibition of DNA polymerase α by gossypol*, *Biochemica et Biophysica Acta*, (1986), **866**, 258-267

Royer RE & Van der Jagt DL, *Gossypol binds to a high-affinity binding site on human serum albumin*, *FEBS Lett.*, (1983), **157**(1), 28-30

Royer RE, Deck LM, Campos NM, Hunsaker LA & Van der Jagt DL, *Biologically active derivatives of gossypol: Synthesis and antimalarial activities of peri-acylated gossylic nitriles*, *J. Med. Chem.*, (1986), **29**, 1799-1801

Royer RE, Mills RG, Deck LM, Mertz GJ, Vander Jagt DL, *Inhibition of human immunodeficiency virus type I replication by derivatives of gossypol*, *Pharmacological Research*, (1991), **24** (4), 407-412

Royer RE^(a), Deck LM, Vander Jagt TG, Martinez FJ, Mills RG, Young SA, Vander Jagt DL, *Synthesis and anti-HIV activity of 1,1'-dideoxygossypol and related compounds*, *J. Med. Chem.*, (1995), **38**, 2427-2432

Royer RE^(b), Mills RG, Young SA, Vander Jagt DL, *Comparison of the antiviral activities of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) and gossylic iminolactone (GIL) against clinical isolates of HIV-1*, *Pharmacological Research*, (1995), **31** (1), 49-52

Rudolph W & Dirschinger J, *Effectiveness of molsidomine in the long term treatment of angina pectoris and congestive heart failure*, *Am. Heart J.*, (1985), **109**, 670-674

Satchell DPN & Satchell RS, *Mechanisms of hydrolysis of Thioacetals*, *Chem. Soc. Rev.*, (1990), **19**, 55-81

Schill G & Logemann E, *Alkylation of polyphenol derivatives. II. 4,6-di-n-alkylpyrogallol trimethyl ethers, Model investigations toward the directed syntheses of Catenanes*, *Chem. Ber.*, (1973), **106**, 2910-2917

Schotten C, *Chem. Ber.*, (1884), **17**, 2544

Seebach D & Corey EJ, *Generation and synthetic application of 2-Lithio-1,3-dithianes*, *J. Org. Chem.*, (1975), **40**(2), 231-237

Sepuvela-Boza S, Cassels BK, *Plant metabolites active against Trypanosoma cruzi.*, *Planta Med.*, (1996), **62**, 98-105

Seshadri TR^(a) & Sharma NN, *Isolation of hexamethyl ether of the dilactol from of (\pm)-gossypol*, *Indian J. Chem.*, (1975), **13**, 865-866

- Seshadri TR^(b) & Sharma NN, *Futher study of the three forms of (+)-gossypol hexamethyl ether*, *Indian J. Chem.*, (1975), 13, 866-868
- Shelley MD, Hartley L, Fish RG, Groundwater P, Morgan JJG, Mort D, Mason M, Evans A, *Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines*, *Cancer Letters*, (1999), 135, 171-180
- Shelley MD, Hartley L, Groundwater P, Fish RG, *Structure-activity studies on gossypol in tumor cell lines*, *Anti-Cancer Drugs*, (2000), 11(3), 209-216
- Shidaifat F, Canatan H, Kulp SK, Sugimoto Y, Chang WY, Zhang Y, Brueggemeier RW, Somers William J, Lin Young C, *Inhibition of human prostate cancer cell growth by gossypol is associated with stimulation of transforming growth factor- β* , *Cancer Letters*, (1996), 107 (1), 37-44
- Shirley DA, Sheehan WC, *The reduction of gossypol with lithium aluminum hydride*, *J. Am. Chem. Soc.*, (1955), 77, 4606-4608
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Konorev E, Kalyanaraman B, *The peroxy nitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors*, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1999), 361, 331-339
- Smith FH, *Determination of gossypol in leaves and flower buds of Gossypium*, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, (1967), 44, 267-269
- Stamler JS, *Redox signaling : Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide*, *Cell*, (1994), 78, 931-936
- Stipanovic RD, Bell AA, Mace ME, Howell CR, *Antimicrobial terpenoids of gossypium: 6-methoxygossypol and 6,6'-dimethoxygossypol*, *Phytochemistry*, (1975), 14, 1077-1081
- Strom-Hansen T, Cornett C, Jaroszewski JW, *Interaction of gossypol with amino acids and peptides as a model of enzyme inhibition*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, (1989), 34, 306-310
- Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V, Moncada S, *Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer*, *Cancer Res.*, (1994) 84, 1352-1354
- Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S, *Nitric oxide synthase activity in human breast cancer*, *Br. J. Cancer*, (1995), 72, 41-44
- Tsikis D, Sandmann J, Rossa S, Gutzki FM, Frölich JC, *Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry*, *Anal. Biochem.*, (1999), 270, 231-241
- Tso WW, *Gossypol inhibits Ehrlich ascites tumor cell proliferation.*, *Cancer Letter*, (1984), 24, 257-261

- Tuszynski GP & Cossu G, *Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines*, *Cancer Res.*, (1984), **44**, 768-771
- Ullrich T, Oberle S, Abate A, Schröder H, *Photoactivation of the nitric oxide donor SIN-1*, *FEBS Lett.*, (1997), **406**, 66-68
- Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Heidrich JE, *Partial purification and characterization of lactate dehydrogenase from Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol*, (1981), **4** (5-6), 255-264
- Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Campos NM, Baack BR, *D-Lactate production in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol*, (1990), **42**, 277-284
- Vanin AF, *Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilisation and transport of nitric oxide in biological systems*, *Biochemistry (Moscow)*, (1998), **63**(7), 924-938
- Vander Jagt DL, Deck LM, Royer RE, *Gossypol: Prototype in inhibitors targeted to dinucleotide folds*, *Current Medicinal Chemistry*, (2000), **7** (4), 479-498
- Venuti MC, *Efficient synthesis of the gossypol binaphthyl backbone*, *J. Org. Chem.*, (1981), **46**, 3124-3127
- Wang X, Wang J, Wong SCH, Chow LSN, Nicholls JM, Wong YC, Liu Y, Kwong DLW, Sham JST, Tsao SW, *Cytotoxicity effect of gossypol on colon carcinoma cells*, *Life Sciences*, (2000), **67**(22), 2663-2671
- Wang YC & Rao PN, *Effect of gossypol on DNA synthesis and cell cycle progression of mammalian cells in vitro*, *Cancer Res.*, (1984), **44**, 35-38
- Wichmann K, Krusius L, Sinervirta R, Puranen J, Jaene J, *Studies on structure- activity relationship of gossypol, gossypol ethers and three naphthaldehydes in inhibition of spermatozoal metabolism*, *Contraception*, (1986), **33**, 519-528
- Wink D A, Vodovotz Y, Cook J A, Krishna MC, Kim S., Coffin D, DeGraaf W, Deluca AM, Liebman J, Mitchell JB, *The Role of Nitric Oxide Chemistry in Cancer Treatment*, *Biochemistry (Moscow)*, (1998), **63**(7), 948-957
- Wood AB & Robin FB, *Conformation and hydrogen bonding of gossypol*, *Chemistry & Industry*, (1969), **48**, 1738-1739
- Wu Y W, Chik CL, Knazek RA, *An in vitro and in vivo study of antitumor effects of gossypol on human SW-13 adrenocortical carcinoma*, *Cancer Res.*, (1989), **49** (14), 3754-3758
- York C, Surya Prakash GK, Olah GA, *Desulfurative fluorination using Nitrosonium tetrafluoroborate and pyridinium poly(hydrogen fluoride)*, *Tetrahedron*, (1996), **52**(1), 9-14

Yu ZH & Chan HC, *Gossypol as a male antifertility agent-why studies should have been continued*, *International Journal of Andrology*, (1998), **21**(1), 2-7

Zaidi R^(a) & Hadi SM, *Strand scission in DNA by gossypol and Cu(II) : role of Cu(I) and oxygen-free radicals*, *J. Biochem. Toxicology*, (1992), **7**(4), 213 - 217

Zaidi R^(b) & Hadi SM, *Complexes involving gossypol, DNA and Cu(II)*, *Biochemistry International*, (1992), **28**(6), 1135 - 1143

Zaidi R^(c) & Hadi SM, *Interaction of gossypol with DNA*, *Toxic. In Vitro*, (1992), **6**(1), 71 - 76

Zhelyaskov VR, Gee KR, Godwin DW, *Control of NO concentration in solutions of nitrosothiol compounds by light*, *Photochem. Photobiol.*, (1998), **67**, 282-288

Zhou RH & Lin XD, *Isolation of (-)-gossypol from natural plant*, *Contraception*, (1988), **37** (3), 239-245

Ziyaev KI, Kamaev FG, Baram NI, Biktimirov L, Ismailov AI, *New gossypol imines*, *Chemistry of Natural compounds*, (1997), **33** (5), 545-547

Sujet : *Le Gossypol et ses nouveaux dérivés : synthèse et étude d'activités biologiques*

Résumé : Plusieurs molécules nouvelles ont été obtenues à partir du Gossypol, extrait des graines de cotonnier. Dans la première partie, de nouvelles bases de Schiff du gossypol et de la gossypolone ont été synthétisées, les énantiomères du gossypol et leurs bases de Schiff sont optiquement stables, tandis que, les énantiomères de la gossypolone ne sont pas stables à température ambiante, mais il est possible de les observer vers 0°C. La cytotoxicité de ces bases de Schiff a été évaluée principalement sur des cellules KB, la méthylimine et l'éthylimine de la gossypolone sont les plus toxiques (IC₅₀= 0.8 et 1.2 μM). La toxicité du gossypol et de la gossypolone augmente quand les tests sont effectués en absence de sérum et elle diminue en présence de catalase ou de mannitol dans le milieu de culture. L'énantiomère (-)-gossypol est plus toxique que le (+)-gossypol, ceci est aussi valable pour les bases de Schiff des énantiomères du gossypol. Dans la deuxième partie, une nouvelle classe de dérivés du gossypol et de la gossypolone, les dithianes et les dithiolanes, a été développée. Les dithianes/dithiolanes du gossypol et de la gossypolone ont été synthétisés par action de dithiols en présence d'éthérate de trifluoroborate. La même réaction effectuée avec les monothiols, conduit à des mélanges complexes. L'action du propanedithiol ou de l'ethanedithiol sur le tetraméthyle ou l'hexaméthyle éthers du gossypol ne conduit pas aux dithianes ou dithiolanes attendus mais à de nouveaux dérivés cycliques. La toxicité de ces nouveaux thio-dérivés sur les cellules KB est assez modeste, mais sous l'action de NO ou d'un sel de nitrosonium, ces dérivés se transforment en dérivés plus toxiques dans le cas du gossypol ou régénèrent la molécule de départ dans le cas de la gossypolone. Nous formulons l'hypothèse que dithianes et dithiolanes du gossypol et de la gossypolone pourraient être des modèles de prodrogues ciblées sur les cellules exprimant de fortes concentrations d'oxyde nitrique.

Mots Clés : gossypol/ gossypolone/ base de Schiff/ énantiomère/ dithiane/ dithiolane/ cytotoxicité/ cellule KB/ oxyde nitrique/ NO/ prodrogue

Title : *Gossypol and new derivatives, synthesis and biological activities*

Abstract : New Schiff bases of racemic gossypol and gossypolone and of (+)- or (-)-gossypol enantiomers are described. Schiff bases obtained from gossypol enantiomers are optically stable at room temperature whereas gossypolone Schiff bases racemize quickly and may be observed only at lower temperatures. Their cytotoxic activities on KB human cancer cells were determined : the methylimine and ethylimine derivatives of racemic gossypolone were the most active compounds, and the cytotoxicity of racemic gossypol and gossypolone was increased when the tests were performed in the absence of serum and decreased when catalase as well as mannitol were added to the culture medium. (-)-gossypol and (-)-gossypol derivatives displayed higher toxicities on KB and MCF7 cells than the corresponding (+) isomers.

New dithiane or dithiolane derivatives of gossypol and gossypolone were synthesized with dithioethane or dithiolpropane in the presence of BF₃/Et₂O. Under the same conditions, tetramethyl or hexamethyl ethers of gossypol led to cyclic thioderivatives. These thioderivatives exhibited low toxicity on KB cells. Dithiane or dithiolane derivatives react easily with electrophiles, nitrosonium tetrafluoroborate or nitric oxide plus ferric ion, in aprotic solvents to regenerate gossypolone or to form dehydrogossypoldithiane, which display higher toxicity on KB cells. Since, the low toxicity of gossypol thioderivatives is reversed by nitric oxide donors in physiological media, it is suggested that gossypol and gossypolone dithianes and dithiolanes can be used as prodrugs that target tumor cells surrounded by high concentrations of nitric oxide.

Keywords: gossypol/ gossypolone/ Schiff base/ enantiomer/ dithiane/ dithiolane/ cytotoxicity/ KB cell/ nitric oxide/ NO / prodrug /