UNIVERSITÉ PARIS-SUD

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ÉCOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ
PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ANNÉE 2011 - 2012 SÉRIE DOCTORAT N° 1162

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS-SUD

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

par
Monsieur Zakaria CHEIKH ALI

Titre de la thèse :

Études chimiques et biologiques d'*Aframomum sceptrum* (Zingiberaceae) et de la curcumine

soutenue le 11 Avril 2012

JURY :

Madame le Docteur Corine Girard-Thernier (Université de Franche-Comté)	*Rapporteur*
Monsieur le Professeur Janos Sapi (Université de Reims Champagne-Ardenne)	*Rapporteur*
Monsieur le Professeur Jean-Daniel Brion (Université Paris-Sud)	*Examinateur*
Madame le Docteur Émilie Brulé (École nationale supérieure de chimie de Paris)	*Examinateur*
Monsieur le Docteur Pierre Champy (Université Paris-Sud)	*Co-directeur*
Monsieur le Professeur Erwan Poupon (Université Paris-Sud)	*Directeur de thèse*

Acknowledgements

My appreciation goes to Prof. Dr. Jean-Daniel Brion, Pr. Dr. Janos Sapi, Dr. Corine Girard, and Dr. Émilie Brulé for participating in the examination committee.

I wish to express my gratitude to my supervisor, Prof. Dr. Erwan Poupon and Dr. Pierre Champy for their support in all professional matters, and for the sincere support they gave in all phases of my project.

Special thanks to Dr. Bruno Figadère, for welcoming me in his laboratory.

I would like to thank all – present and past – members of Laboratory of Pharmacognosy, for the fantastic atmosphere within the group. The times in- and outside the lab, for their friendship and help over the years I spent in the laboratory, especially Blandine, Dr. Gerardo, Kadiria, Nicolas, Faustin, Abha, Johan, Dr. Zahra, Dr. Lok-Hang, Dr. Flore, Gael, Natacha, Asmaa and Dr. Rim.

Many specific tasks involved in this study were performed in cooperation with other research groups. For this work thanks go to:

Prof. Dr. Philipe Loiseau, Dr. Christian Bories and Dr. Sandrine Cojean, Antiparasitic Chemotherapy Group, for evaluating the antiprotozoal activity.

Dr. Sandrine Ongeri, Dr. Julia Kaffy, for evaluating the inhibition amyloid β-peptide aggregation.

Dr. Bernard Pipy, Paul Sabatier University Toulouse, for evaluating the anti inflammatory activity.

Dr. Alexandre Maciuk and Karine Leblanc for performing LC-MS, Chiral chromatography measurements, for help in their interpretation and for many scientific discussions.

Dr. François Roblot, Jean-Christophe Jullian for performing special NMR experiments and for help in analyses of NMR spectra.

Dr. Didier Desmaële and Dr. Joachim Caron (Pr. Jojo), for preparing curcumin nanoparticles.

Dr. Laurent Evanno and Dr. Laurent Ferrié, for their great help especially in Chapitre 4.

Thanks to Matthieu Cardao and Thomas Leprêtre for their outstanding friendship and very special kind of support and for constantly reminding me what the really important things in life are.

Thanks to my neighbors in floor Pr. Guy Lewin, Patrick, Dr. François and Landry for their very special kind of support.

I would like to thank Alexa, for proofreading, enormous encouragement, help and support, for being friend and partner and for always believing in me even when I doubted.

At the end I would like to thank my parents, my family, for being totally supportive of me throughout all of my studies.

«L'amour ne disparaît jamais,
La mort n'est rien,
Je suis seulement passé dans la pièce à côté.
Je suis moi, vous êtes vous.
Ce que nous étions les uns pour les autres,
Nous le sommes toujours.
Donnez –moi le petit nom
Que vous m'avez toujours donné,
Parlez–moi comme vous l'avez toujours fait,
N'employez pas un ton différent,
Continuez à rire de ce qui nous faisait rire ensemble.
Priez, souriez, pensez à moi, priez pour moi.
Que mon nom soit prononcé
À la maison comme il l'a toujours été.
La vie signifie ce qu'elle a toujours signifié.
Elle est ce qu'elle a toujours été. Le fil n'est pas coupé.
Pourquoi serai-je hors de votre pensée,
Simplement parce que je suis hors de votre vue?
Je suis juste de l'autre côté du chemin.
Vous voyez, tout est bien»

Henry Scott Holland

Introduction générale *p.11*

Chapitre 1 *p.13*

Étude phytochimique et biologique des rhizomes d'*Aframomum sceptrum* (Zingiberaceae) *p.13*

I. Introduction sur le genre *Aframomum* *p.15*

II. *Aframomum sceptrum* : *p.18*

A- Aspects botaniques *p.18*
1) Description *p.18*
2) Écologie et distribution *p.19*
3) Utilisation traditionnelle *p.19*

B- Composition chimique *p.20*
1) Diterpènes *p.20*
2) Triterpènes *p.21*
3) Flavonoïdes *p.21*
4) Autres composés *p.21*

C- Activités biologiques *p.22*

III. Travaux personnels : isolement de nouveaux labdanes à partir des rhizomes d'*A. sceptrum* *p.22*

A- Extraction et isolement *p.22*
B- Détermination structurale des nouveaux composés *p.25*
C- Evaluation biologique *p.29*

IV. Travaux personnels : étude chimique et biologique de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum* *p.29*

A- Extraction et caractérisation de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum* *p.29*

B- Evaluation biologique *p.33*
1) Activité antibactérienne *p.33*
2) Activité antifongique *p.34*
3) Activité antiprotozoaire *p.34*
4) Activité antioxydante *p.34*

V. Conclusion de la partie phytochimie *p.36*

Chapitre 2 *p.43*

Introduction sur le *curcuma* et de la curcumine *p.43*

I. Introduction au genre *Curcuma* *p.45*

II. Introduction à la curcumine *p.48*

A- Biosynthèse des curcuminoïdes *p.48*
B- Extraction des curcuminoïdes *p.50*
C- Propriétés physicochimiques de la curcumine *p.50*
1) Solubilité de la curcumine *p.51*
2) Données RMN de la curcumine *p.51*
3) Spectre d'absorption de la curcumine *p.52*
4) Stabilité de la curcumine *p.52*

D- Propriétés pharmacocinétiques de la curcumine *p.54*
1) Par voie orale *p.54*
a. Absorption *p.54*
b. Distribution *p.55*
c. Métabolisation *p.55*
d. Elimination *p.56*
2) Par voie intraveineuse ou intrapéritonéale *p.57*

E- Activités biologiques de la curcumine *p.57*

F- Formulations améliorant la biodisponibilité de la curcumine biodisponible *p.59*
1) Co-administration avec un adjuvant : la pipérine *p.59*
2) Complexes liposomaux, micellaires et phospholipidiques *p.60*
3) Nanoparticules *p.62*
4) SMEDDS (*Self Micro Emulsifying Drug Delivery System*) *p.63*
5) Analogues structuraux de la curcumine *p.64*
a). Activité cytotoxique *p.65*
b). Activité antiparasitaire *p.71*
c). Activité anti-Alzheimer *p.71*

III. Conclusion *p.73*

Chapitre 3 *p.77*

Conception et hémisynthèse de curcuminoïdes prénylés *p.77*

I. La prénylation des substances naturelles *p.79*
A- Rappels de biosynthèse *p.79*

B- Les méthodes de prénylation des molécules en synthèse organique *p.82*
1) Prénylation directe *p.82*
2) Prénylation indirecte *via* le réarrangement de Claisen *p.85*

II. Synthèse du noyau diméthylbenzopyrane *p.88*

A- Les méthodes de synthèse organique des diméthylbenzopyranes *p.89*
1) Accès direct aux diméthylbenzopyranes *p.89*
2) Synthèse des diméthylbenzopyranes de façon indirecte *via* Claisen *p.91*

III. Travaux personnels *p.93*

A- Les différentes stratégies pour synthétiser les curcuminoïdes phénylés *p.93*
1) Première approche : la synthèse en mode direct *p.93*
2) Deuxième approche : Synthèse *via* Claisen *p.94*

B- La synthèse des diméthylepyrano-curcuminoïdes *p.97*

IV. Activités biologiques *p.100*

A- Activité antiparasitaire *p.100*
B- Activité antibactérienne *p.101*
C- Activité antifungique *p.101*
D- Cytotoxicité *p.101*
E- Activités antioxydante et anti-inflammatoire *p.102*
F- Effet anti-agrégant de fibrilles amyloïdes *p.105*

V. Conclusion *p.107*

Chapitre 4 *p.109*

Étude de conditions oxydantes sur les curcuminoïdes (désaromatisation oxydante et couplage oxydatif) *p.109*

I. La désaromatisation oxydante *p.111*

A- Introduction *p.111*

B- La désaromatisation oxydante de phénols. *p.114*

1) Désaromatisation oxydante de phénols *via* une activation électrophilique avec formation de liaison C–O et C–N. *p.115*
2) Désaromatisation oxydante et alkylante de phénols avec formation de liaison C–C. *p.118*
3) Désaromatisation oxydante de phénols déclenchant cycloaddition de Diels-Alder. *p.120*

4) Couplage oxydatif. *p.121*

II. Travaux personnels. *p.124*

A- Conditions de couplages oxydatifs. *p.124*

B- Désaromatisation oxydante. *p.128*

1) Réduction des doubles liaisons. *p.129*
   a. Hydrogénation catalytique. *p.129*
   b. La réaction de Birch. *p.129*

2) Désaromatisation oxydante des dérivés curcuminoïdes. *p.130*
   a. Désaromatisation oxydante du composé **341**. *p.130*
   b. Désaromatisation oxydante du composé **342**. *p.133*
   c. Désaromatisation oxydante du composé **343**. *p.135*

III. Conclusion. *p.138*

Chapitre 5 *p.141*

Squalénisation de la curcumine

I. Introduction sur la squalénisation *p.143*

II. Travaux personnels : *p.143*

A. Synthèse de curcumines squalénisées et préparation des "nanocurcumine". *p.143*

B. Évaluations biologiques. *p.145*
   1) Activités antiparasitaires. *p.145*
   2) Autres activités. *p.146*

C. Étude de la stabilité enzymatique des curcumines squalénisées. *p.147*

III. Conclusion *p.148*

Conclusion générale de la partie chimie *p.151*

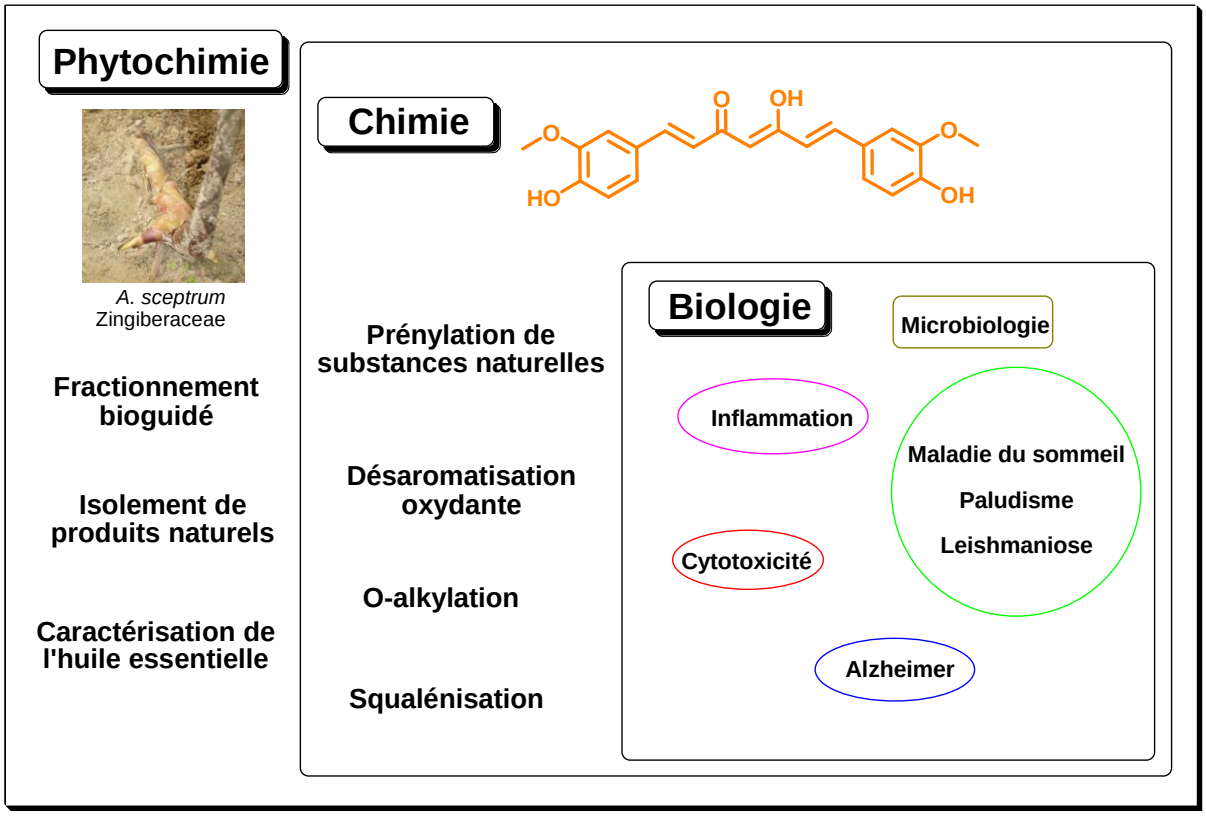
Partie expérimentale *p.154*

Abréviations et acronymes

Ce manuscrit de thèse comporte deux parties indépendantes.

Dans la première d'entre elles, nous allons exposer, à travers le 1er chapitre, les études phytochimique et biologique d'*Aframomum sceptrum* que nous avons réalisées.

La deuxième partie sera consacrée à l'hémisynthèse d'analogues de la curcumine et l'évaluation de leurs propriétés pharmacologiques (chapitres 2 à 6).
Les axes suivis sont présentés dans la figure ci-dessous.



Introduction générale

Plusieurs genres de Zingiberaceae, famille tropicale et sub-tropicale, sont utilisés depuis des siècles dans la cuisine, comme colorant, en dermocosmétique, et en médecine traditionnelle en tant que remèdes. Plusieurs ont été intégrés dans les pharmacopées occidentales. Le genre *Curcuma* est le plus étudié. Des préparations à base de plantes et des molécules extraites de *Curcuma* se sont avérées posséder une large variété de propriétés pharmacologiques contre des phénomènes cancéreux, des troubles hormonaux, l'inflammation ou des parasitoses, entre autres. La présente étude évalue une plante du genre *Aframomum* et un composé bioactif, la curcumine, en se concentrant particulièrement sur des tests examinant l'activité parasiticide, contre les parasites tropicaux *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, et plus généralement, contre d'autres parasites cosmopolites ou agents infectieux divers.

La valorisation des plantes traditionnellement utilisées par les populations locales est une démarche classique en pharmacognosie. Dans le cadre de notre travail de thèse, *Aframomum sceptrum* a été sélectionnée en se basant sur une étude ethnopharmacologique menée en Côte d'Ivoire et qui a révélé l'utilisation traditionnelle de cette espèce contre la maladie du sommeil.
Un des objectifs de cette thèse est donc étudier les rhizomes d'*A. sceptrum* d'un point de vue phytochimique et biologique.

La curcumine, molécule chef de file de la famille des diarylheptanoïdes, est le principe actif de plusieurs curcumas, d'autres Zingiberaceae. La curcumine présente un grand nombre de propriétés pharmacologiques remarquables. Elle est très bien tolérée. Faisant l'objet d'une attention particulière de la communauté scientifique internationale, la curcumine donne lieu à des travaux de pharmacomodulation et de formulation, visant à améliorer son efficacité et sa biodisponibilité. Il s'agissait donc ici d'étudier la curcumine d'un point de vue chimique (réactivité et synthèse d'analogues) et biologique.

Chapitre 1

Étude phytochimique et biologique des rhizomes d'*Aframomum sceptrum* (Zingiberaceae)

I. Introduction sur le genre *Aframomum*

II. *Aframomum sceptrum* : aspects botaniques, composition chimique et activités biologiques

A- Aspects botaniques

1) Description
2) Écologie et distribution
3) Utilisation traditionnelle

B- Composition chimique

1) Diterpènes
2) Triterpènes
3) Flavonoïdes
4) Autres composés

C- Activités biologiques

III. Travaux personnels : isolement de nouveaux labdanes à partir des rhizomes d'*A. sceptrum*

A- Extraction et isolement
B- Détermination structurale des nouveaux composés
C- Evaluation biologique

IV. Travaux personnels : étude chimique et biologique de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum*

A- Extraction et caractérisation de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum*

B- Evaluation biologique

1) Activité antibactérienne
2) Activité antifongique
3) Activité antiprotozoaire
4) Activité antioxydante

V. Conclusion de la partie phytochimie

Le rhizome d'*Aframomum sceptrum* K. Schum, espèce africaine, a été sélectionné *via* un criblage antiparasitaire au laboratoire suite à une enquête ethnopharmacologique focalisée sur les plantes employées en médecine traditionnelle ivoirienne dans le traitement de la maladie du sommeil (thèse de recherche de Timothée OKPEKON).[1] Des lots de cette plante, récoltés ultérieurement, ont fait l'objet d'une étude phytochimique et biologique présentée ici.

I. Introduction sur le genre *Aframomum*

Les *Aframomum* sont endémiques des flores tropicales de l'Afrique sub-saharienne et de Madagascar. C'est l'un des genres les plus importants, numériquement, de la famille des Zingiberaceae avec environ 70 espèces. Elles font partie des Angiospermes, classe des Monocots, sous-classe des Zingiberidea, ordre des Zingiberales ou Scitaminales. Les Zingiberaceae constituent la famille la plus importante de l'ordre des Zingiberales avec 53 genres et plus de 1200 espèces.
Dans la nouvelle classification de Kress (**Schéma 1-1**),[2] le genre *Aframomum* se place dans la sous-famille des Alpinioideae, tribu des Alpinieae. Les *Aframomum* sont des herbes pérennes de grande taille, rhizomateuses et aromatiques.

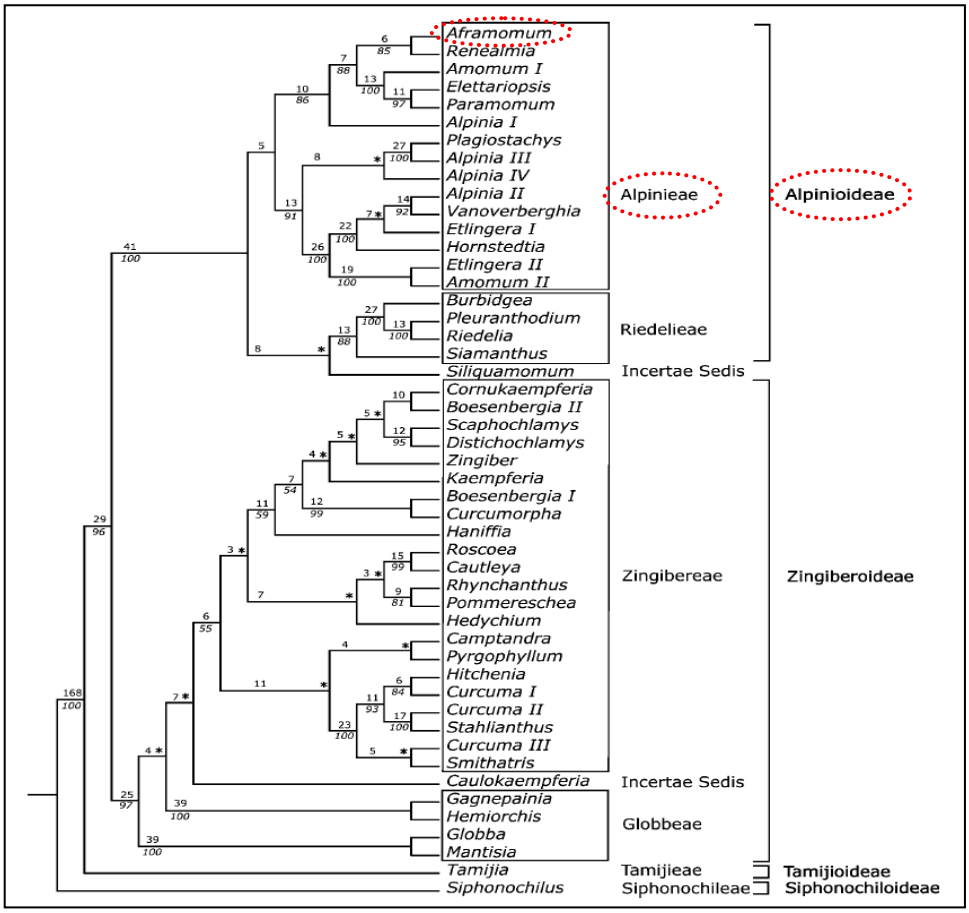


Schéma 1-1. Classification phylogénétique de la famille des Zingiberaceae selon Kress *et al*., **2002**.

Les diterpènes de type labdane sont les diterpènes les plus fréquemment rencontrés chez les Zingiberaceae, la série *ent*- et les autres séries diterpéniques classiques n'étant pas

[1] Okpekon T., thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud. **2007**.
[2] Kress W. J., Prince L. M., Williams K. J., *Am. J. Botany* **2002**, 89, 1682–1696.

décrites dans la famille, à notre connaissance. Les représentants de cette classe isolés chez les *Aframomum* sont décrits ci-dessous.

La galanolactone **1**, l'aframodial **6** ainsi que les galanals A **4** et B **5** ont été extraits des fruits d'*A. latifolium* (extrait à l'acétate d'éthyle) par Duker-Eshun *et al*.,[3]

Dans une étude chimique systématique des graines d'*A. zambesiacum*, cinq nouveaux labdanes (**2, 3, 7, 8, 9**) ont été obtenus ainsi que six autres de structure connue, l'aframodial **6**, la galanolactone **1**, le galanal A **4** et les aulacocarpines A **10** et B **11**.[4] (**Figure 1-1**). Des molécules proches sont rencontrées dans l'espèce ayant fait l'objet de ce travail, et sont présentées plus loin.

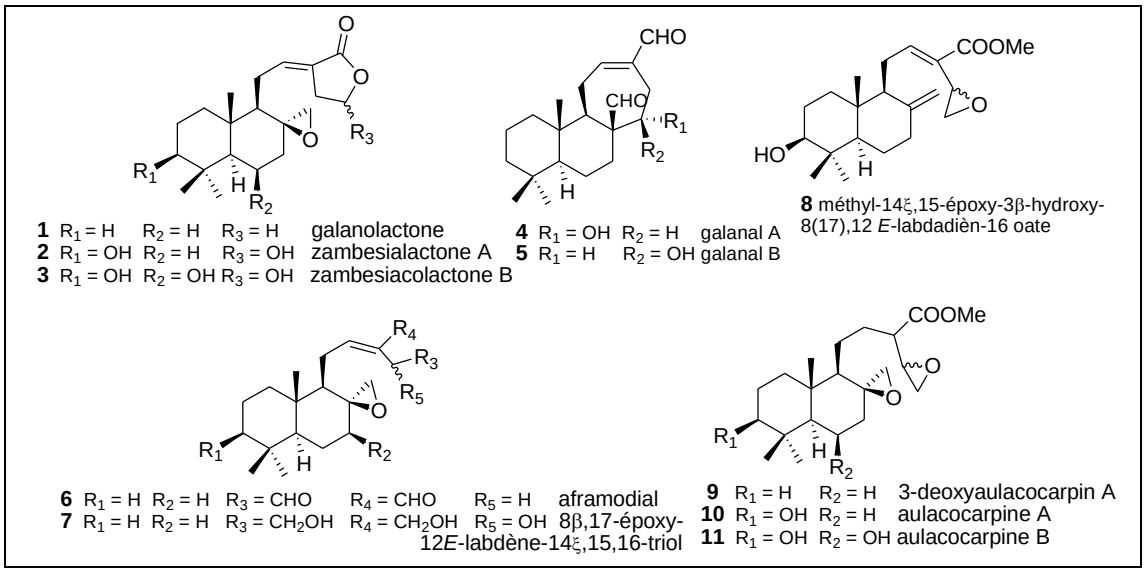


Figure 1-1. Diterpènes d'*Aframomum* spp.

Les arylalcanones et les diarylheptanoïdes sont, quant à eux, des métabolites secondaires parfois rencontrés chez les espèces du genre *Aframomum*, et constituent des marqueurs chimiotaxonomiques forts et quasi-exclusifs de la famille tout entière. On remarquera cependant que des diarylheptanoïdes se retrouvent exceptionnellement dans quelques familles de plantes bien définies : Aceraceae, Betulaceae, Burseraceae, Casuarinaceae, Fabaceae, Juglandaceae, Moraceae, Myricaceae, Pinaceae, Rhoipteleaceae, Taccaceae, Viscaceae.[5]

Les aryl-alcanones et les diarylheptanoïdes, sont potentiellement porteurs d'activités biologiques revendiquées traditionnellement. Les plus connus sont les curcuminoïdes et les gingérols. Ils constituent les substances colorantes des curcumas (*Curcuma* spp.) et les principes piquants du gingembre (*Zingiber officinalis*).

Parmi ceux-ci, la curcumine est le métabolite secondaire le plus célèbre, dont les propriétés pharmacologiques ont été largement décrites dans la littérature.[6] Elles seront présentées dans le chapitre 2.

Les arylalcanones et les diarylheptanoïdes, ont déjà été isolés à partir du genre *Aframomum*.[7,8] Ceux des graines d'*A. melegueta* (**12**–**15**) inhibent la prolifération des termites *Reticulitermes*

[3] Duker-Eshun G., Jaroszewski J. W., Asomaning W. A., Oppong-Boachie F., Olsen C. E., Brøgger Christensen S., *Planta Med*. **2002**, 68, 642–644.

[4] Kenmogne K., Prost E., Harakat D., Jacquier M.-J., Frédérich M., Sondengam L. B., Zèches M., Waffo-Téguo P., *Phytochemistry*, **2006**, 67, 433–438.

[5] Zhu J., Islas-Gonzalez G., Bois-Choussy M., *Org. Prep. Proc. Int*. **2000**, 32, 505–546.

[6] Radha K. M., Anoop K. S., Jaya G., Rikhab C. S., *Life Sciences,* **2006,** 78, 2081–2087.

[7] Escoubas P., Lajide L., Mizutani., *Phytochemistry*, **1995**, 40, 1097–1099.

speratus. Les diarylheptanoïdes (**16**–**19**) isolés des graines d'*A. letestuianum* récoltées au Cameroun ont été décrits comme possédant des propriétés trypanocides (**Figure 1-2**).

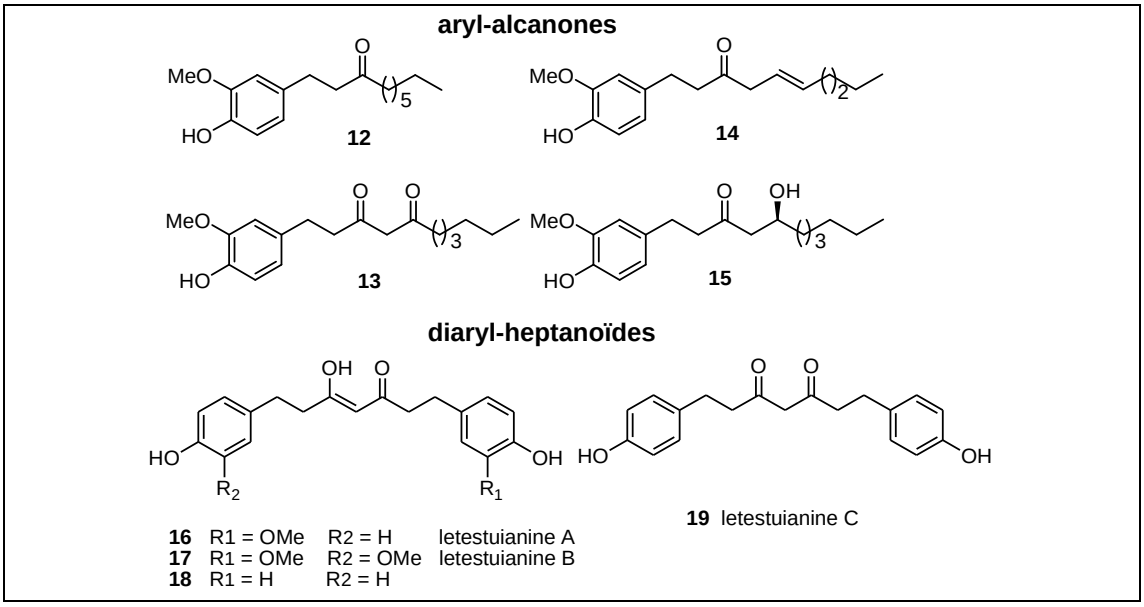


Figure 1-2. Arylalcanones et diarylheptanoïdes d'*Aframomum* spp.

Comme nous l'avons précisé précédemment, les Zingiberaceae sont aromatiques. Leurs huiles essentielles sont composées de dérivés mono et ditérpéniques souvent oxygénés, rarement à caractère aromatique.

Très peu des huiles essentielles de rhizomes d'*Aframomum* spp. ont été étudiées à ce jour. Des ressemblances des composants majoritaires et minoritaires des huiles essentielles obtenues à partir de divers organes d'*Aframomum* spp. sont notables. Par exemple : le β-pinène est abondant (10 à 50 %) dans l'huile essentielle des graines d'*A. angustifolium*,[9] les gousses d'*A. corrorima* [10,11] les fruits, les feuilles et les graines d'*A. danielli*,[12,13,14] les graines et les feuilles d'*A. giganteum*, [15,16,17] les feuilles d'*A. hanbury*, [18] les feuilles et les graines d'*A. latifolium* [11] et les graines d'*A. sanguineum.*[19] Par contre le β-pinène n'a pas été détecté dans l'huile essentielle des graines d'*A. melegueta.*[20]

Les α- et le β-pinènes représentent 7,3 et 58,5 %, respectivement dans l'huile essentielle d' *A. biauriculatum*.[20]

[8] Kamnaing P., Tsopmo A., Tanifum E. A., Marguerite H. K., Tchuendem M. H. K., Tane P., Ayafor J. F., Sterner O., Donna Rattendi D., Iwu M. M., Schuster B., Bacchi C., *J. Nat. Prod*. **2003**, 66, 364–367.
[9] Baser K. H. C., Kurkcuoglu M., *J. Essent. Oil Res*. **2001**, 13, 208–209.
[10] Eyob S., Appelgren M., Rohloff J., Tsegaye A., Messele G., *J. Essent. Oil Res*. **2007**, 19, 372–375.
[11] Hymete A., Rohloff J., Iversen T. H., *Flavour Fragr. J*. **2006**, 21, 642–644.
[12] Dongmo P. M., Jazet M., Boyom F. F., Sameza M. L., Dongmo B. N., Kwasou N. L., Amvan Zollo P. H., Menut C., *Int. J. Ess. Oil Therap*. **2008**, 2, 149–155.
[13] Martins A. P., Salgueiro L., Gonçalves M. J., Poença da Cunha A., Vila R., Canigueral S., Mazzoni V., Tomi F., Casanova J., *Planta Med*. **2001**, 67, 580–584.
[14] Adegoke G. O., Rao L. J. M., Shankaracharya N. B., *Flavour Fragr. J*. **1998**, 13, 349 –352.
[15] Ouamba J. M., thèse de l'Université de Montpellier-2, France. **1991**.
[16] Abondo. R., thèse de l'Université de Yaoundé, Cameroun. **1993**. Citée par : Agnaniet *et al*., **2004**.[17]
[17] Agnaniet H., Menut C., Bessière J. M., *Flavour Fragr. J*. **2004**, 19, 205–209.
[18] Amvan Zollo P. H., Abondo R., Biyiti L., Menut C., Bessière J. M., *J. Essent. Oil Res*. **2002**, 14, 95–98.
[19] Hari L., Bukuru J., De Pooter H. L., *J. Essent. Oil Res*. **1994**, 6, 395–398.
[20] Ajaiyeoba E. O., Ekundayo O., *Flavour Fragr. J*. **1999**, 14, 109–111.

Le γ-terpinène et le β-pinène sont les principaux constituants des huiles essentielles des rhizomes d'*A. corrorima* (21,8 et 17,6 % respectivement).[21]
D'autre part, le cypérène, est habituellement un composant minoritaire des huiles essentielles d'*Aframomum* spp.
Le 1,8-cinéole représente 25 à 85 % de l'huile essentielle des cosses d'*A. corrorima* [10] et des graines,[9] des fruits, des feuilles et des graines d'*A. danielli*,[11,12,13] des fruits, feuilles, graines et tiges d'*A. exscapum*,[22] des graines d'*A. giganteum* [14] et des graines d'*A. sanguineum*.[22]
Dans tous les échantillons analysés, la prédominance des sesquiterpènes (*A. alboviolaceum*,[23] *A. latifolium*)[24] est signalée.
Le β-caryophyllène et ses oxydes se sont avérés être en d'abondance particulièrement élevée chez *A. biauriculatum*. ils sont également abondants (10-60 %) dans l'huile essentielle des graines d'*A. angustifolium*,[8] des feuilles d'*A. auriculatum* [25] et des feuilles d'*A. corrorima.*[8,9,10] Il n'y a pas de détection de ces derniers composés, ni du 1,8-cinéole ou du cypérène dans *A. giganteum*.[14]
Ces divergences entre les espèces et parties des plantes ne permettent pas d'établir un profil chimiotaxonomique typique. Cependant, il y a une certaine similitude entre le profil des huiles essentielles d'*Aframomum* spp. avec une quasi-absence de monoterpènes aromatiques et des composés sesquiterpéniques en abondance.

II. *Aframomum sceptrum* : aspect botanique, composition chimique et activités biologiques

A- Aspect botanique

Aframomum sceptrum K. Schum. est une plante commune d'Afrique de l'Ouest.

1) Description

Aframomum sceptrum est une herbe rhizomateuse dont la tige feuillée atteint parfois deux mètres de haut. Les feuilles de 12 à 25 cm de long et 6 cm de large (**Figure 1-3**), sont acuminées, cunées ou arrondies à la base avec un faux pétiole plus ou moins distinct ; ce pétiole peut atteindre jusqu'à 8 mm de long. Le limbe est étroitement lancéolé, caudé-acuminé au sommet, atténué à la base et glabre. La ligule, membraneuse et bifide, mesure 2 cm de long.



Figure 1-3. *Aframomum sceptrum*, rhizome et feuilles.

[21] Eyob S., Appelgren M., Rohloff J., Tsegaye A., Messele G., *South Afric. J. Bota*. **2008**, 74, 181–185.
[22] Couppé M. A., Joseph H., Bercion S., Menut C., *Flavour Fragr. J*. **2006**, 21, 902–905.
[23] Abreu P. M., Noronha M. G., *Flavour Fragr. J*. **1997**, 12, 79–83.
[24] Ngassoum M. B., Yonkeu S., Jirovetz L., Buchbauer G., Fleishhacker W., *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **1999**, 2, 35–45.
[25] Chiwosa E. H., Hall D. R., Farman D. I., *J. Essent. Oil Res*. **1998**, 10, 447–449.

Les inflorescences sont en épis de 3 à 4 fleurs. Ces épis sont portés sur des pédoncules de longueur variable atteignant parfois une trentaine de centimètres et couverts de bractées à peine imbriquées, étroites (dimension 2-4 × 0,7-1 cm), arrondies, émarginées au sommet et mucronées. Ces bractées vertes tachées de macules pourpres sont beaucoup plus larges au niveau des fleurs.



Aframomum sceptrum K. Schum.
Dessin de B. Smith

Les fleurs, de couleur mauve pâle, ont un calice obliquement tronqué de même longueur environ que le tube de la corolle (2 cm) ; cette corolle est constituée par des lobes de 3,5 cm de long avec des latéraux linéaires aigus de 0,7 cm de large à la base et un lobe supérieur mesurant 1,5 à 2 cm de large.
Le labelle des fleurs mesure 6 cm de long et est oboval et émarginé au sommet. Il a une couleur mauve avec le fond de la gorge jaune.
Les fruits sont rouges et mesurent 6,5 à 7,5 cm de long. Ils contiennent de nombreuses graines. Ces graines sont lisses et brillantes, de couleur brune.

2) Écologie et distribution

Les Zingiberaceae poussent en zone tropicale. Les *Aframomum* constituent un genre d'origine africaine mais maintenant disséminé sur d'autres continents (**Figure 1-4**). *Aframomum sceptrum* pousse dans les sous-bois forestiers de l'Angola et de la Sierra Leone jusqu'au Cameroun, et est très fréquent dans les formations forestières secondaires, généralement sur leurs lisières.
En Côte d'Ivoire, c'est une plante cicatricielle qui se rencontre le plus souvent aux abords des pistes et des routes. Sa multiplication se fait par dissémination des fragments de son rhizome.

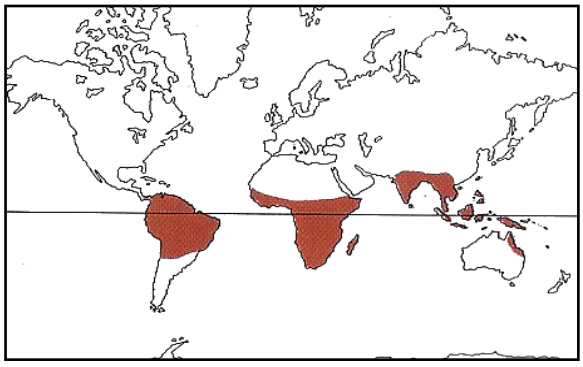


Figure 1-4. Répartition mondiale des plantes de la famille des Zingiberaceae selon Heywood, **1996**.

3) Utilisation traditionnelle

Avec la maniguette (*Aframomum melegueta* L.) comme représentant principal cultivé et commercialisé, les espèces du genre *Aframomum* sont souvent utilisées sans distinction en Afrique. Leurs fruits sont comestibles. En plus de leur utilisation en général comme condiments (graines, rhizomes), la plupart de ces plantes appartiennent aux pharmacopées locales. Elles sont utilisées dans des indications convergentes. Elles révèlent parfois un caractère magique, comme d'autres espèces de la famille (*Costus* spp.).

Au Bénin, les feuilles et les tiges feuillées d'*Aframomum sceptrum* sont employées dans les stérilités féminines et les candidoses bucco-anales et digestives.[26] En médecine traditionnelle ivoirienne, la plante est particulièrement utilisée dans les cas de dysenteries et d'helminthes intestinaux [27] et pour lutter contre la trypanosomiase humaine africaine.

B- Composition chimique

Très peu de travaux publiés concernent *Aframomum sceptrum*. Ces études qui ont été réalisées à partir des feuilles, des fruits ou des graines ont permis l'isolement de flavonoïdes et de terpénoïdes.

1) Diterpènes

Les composés terpéniques de type labdane sont les principaux métabolites secondaires obtenus d'*A. sceptrum*. À partir de l'extrait acétonique de graines récoltées au Cameroun, trois labdanes de structure originale ont été isolés (**20–22**) ainsi qu'un sesquiterpène linéaire, le nérolidol (**26**).[28] Dans une autre étude, guidée par l'activité antiplasmodiale de l'extrait éthanolique des feuilles et des fruits, collectés au Ghana, les labdanes (**23–25**) ont été obtenus [4] Le nérolidol a été également isolé. (**Figure 1-5**).

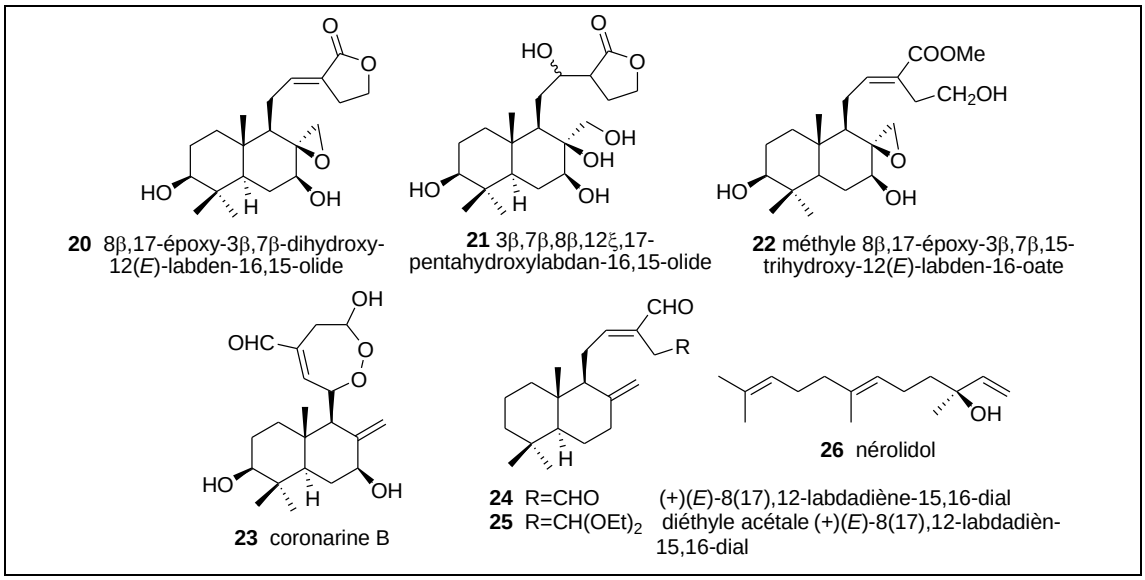


Figure 1-5. Labdanes et sesquiterpènes isolés des rhizomes d'*A. sceptrum.*

[26] Adjanohoun E. J., Adjakidje V., Ahyi M. R. A., Aké Assi L. Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. ACCT, Paris **1989**, 671 p.
[27] Okpekon T., Yolou S., Gleye C., Roblot F., Loiseau P., Bories C., Grellier P., Frappier F., Laurens A., Hocquemiller R. *J. Ethnopharmacol*. **2004**, 90, 91–97.
[28] Tomla C., Kamnaing P., Ayimele G. A., Tanifum E. A., Tsopmo A., Tane P., Ayafor J. F., Connolly J. D. *Phytochemistry* **2002**, 60, 197–200.

2) Triterpènes

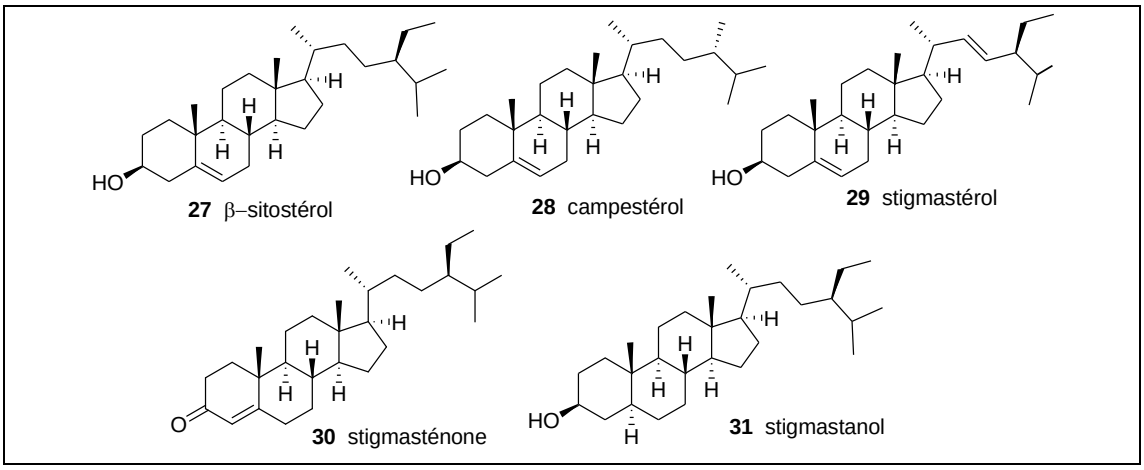


Figure 1-6. Stérols isolés des rhizomes d'*A. sceptrum*.

Des stérols (β-sitostérol **27**, campestérol **28** et stigmastérol **29**) la stigmasténone **30** et le stigmastanol **31**, ont été isolés à partir des rhizomes d'*A. sceptrum* (**Figure 1-6**).[1]

3) Flavonoïdes

En **2002** Tomla a isolé deux flavones : la 3-acétoxy-4',5,7-trihydroxyflavanone **32** et la 3,4',5,7-tétrahydroxyflavanone **33** à partir de graines d'*A. sceptrum*. Ce sont les seuls flavonoïdes rapportés à ce jour d'*A. sceptrum* (**Figure 1-7**). La 3-acétoxy-4',5,7-trihydroxyflavanone avait déjà été extraite à partir d'*Aframomum pruinosum.* [29] La teneur en flavonoïdes serait de 9 % par rapport à la drogue sèche.[1]

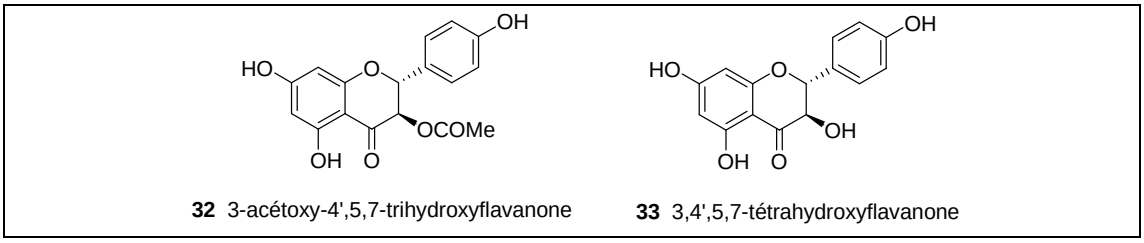


Figure 1-7. Flavones isolées des graines d'*A.sceptrum*.

4) Autres composés

Des auteurs ont proposé un criblage phytochimique des graines d'*A. sceptrum,*[30] indiquant la présence d'hétérosides cardiotoniques, de tanins, d'alcaloïdes et des saponosides. Ces observations sont douteuses, les hetérosides cardiotoniques n'étant pas décrits chez d'autres monocots que les Liliaceae (*sensu lato*) : les auteurs ont certainement révélé la présence de diterpènes lactoniques. De même, l'observation d'alcaloïdes est certainement le fruit d'une révélation de Dragendorff faussement positive.

[29] Ayafor J. F., Connolly J. D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1981**, 2563–2565.
[30] Erukainure O. L., Oke O. V., Owolabi F. O., Adenekan O. S. *Trends. Appl. Sci. Res*. **2011**, 6, 190–197.

C- Activités biologiques

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fruits *d'A. sceptrum* ont montré, *in vitro*, une activité antiplasmodiale intéressante (*P. falciparum*, souche 3D7 chloroquino-sensible). La purification bioguidée de ces extraits a permis d'isoler quatre labdanes dont les plus actifs sont la coronarine B **23** et le diéthoxyacétal **25** (concentration inhibitrice 50 % ; CI_{50} respectives de 24 et 26 µM). Le composé **24** moins actif, a une CI_{50} de 48 µM.[3]
On notera que la littérature concernant le genre a montré une homogénéité au point de vue biologique : en effet, l'évaluation de l'activité antiplasmodiale des labdanes isolés des graines d'*A. zambesiacum* sur des souches de *P. falciparum* FcB1 a permis de montrer que le composé **9** est le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre de 4,97 µM. Les autres composés avaient une activité modérée. Les plus intéressants sont l'aulacocarpine A **10** (CI_{50} de 13,68 µM), la zambesiacolactone B **3** (CI_{50} de 15,51 µM), la zambesialactone A **2** (CI_{50} de 17,20 µM) et l'aulacocarpine B **11** (CI_{50} de 21,10 µM).

III. Travaux personnels : isolement de nouveaux labdanes à partir des rhizomes d'*A. sceptrum*

A- Extraction et isolement

Les travaux ont été effectués sur des rhizomes séchés d'*A. sceptrum* récoltés en Côte d'Ivoire en 2007. Un fractionnement bioguidé par les activités antiparasitaires *in vitro* a été mené.
Nous avons réalisé une extraction des rhizomes séchés et broyés (2,7 kg) par le méthanol dans un appareil de type Soxhlet pendant 96 h : 207 g (ρ = 7,7 %) d'un extrait méthanolique brun-noir, à odeur piquante ont été obtenus. Le choix du méthanol était justifié par son large potentiel extractif, et par le criblage biologique réalisé par T.Okpekon lors de sa thèse.[1]
Afin de simplifier son profil chromatographique, cet extrait méthanolique a ensuite subi une partition liquide/liquide dans un système MeOH/H_2O/solvant organique 15:40:45. Plusieurs solvants organiques ont été testés.
Cette partition nous a permis à la fois de simplifier l'extrait méthanolique très complexe, et d'augmenter les activités antiparasitaires par rapport à l'extrait total (**Tableau 1-1**).
Le **tableau 1-1** montre que le contre-extrait cyclohexanique est quatre fois plus actif que l'extrait total contre *T. brucei brucei* (trypomastigote) et deux fois plus actif contre *L. donovani* (promastigote) par rapport à l'extrait total.

	T. brucei brucei	***L. donovani***
	CL_{100} µg/mL	CI_{50} µg/mL
extrait total	100	> 100
contre-extrait cyclohexanique	25	52
contre-extrait MeOH/H_2O	100	> 100
contre-extrait toluène	-	25
contre-extrait CH_2Cl_2	-	50
contre-extrait AcOEt	-	50
isethionate de pentamidine	7,4	1,5 ± 0,1

Tableau 1-1. Activités antiparasitaires *in vitro* de l'extrait méthanolique et des contre-extraits.

Une contre extraction cyclohexanique a donc été employée à une échelle préparative. Le schéma de fractionnement figure ci-dessus (**Schéma 1-2**).
Ce contre-extrait a un intérêt spécial car il ne contient que les composés relativement apolaires de l'extrait total avec de surcroît une augmentation de l'activité biologique.

C'est pourquoi, nous avons décidé de continuer d'étudier le contre-extrait cyclohexanique, **5,8** g de ce contre-extrait ont été chromatographiés par une chromatographie sur colonne (CC) de silice flash, avec le gradient : C_6H_{12} → CH_2Cl_2 → AcOEt → AcOEt/MeOH 9:1. Après rassemblement, huit fractions ont été obtenues. Un schéma d'extraction est présenté dans le **Schéma 1-2**.

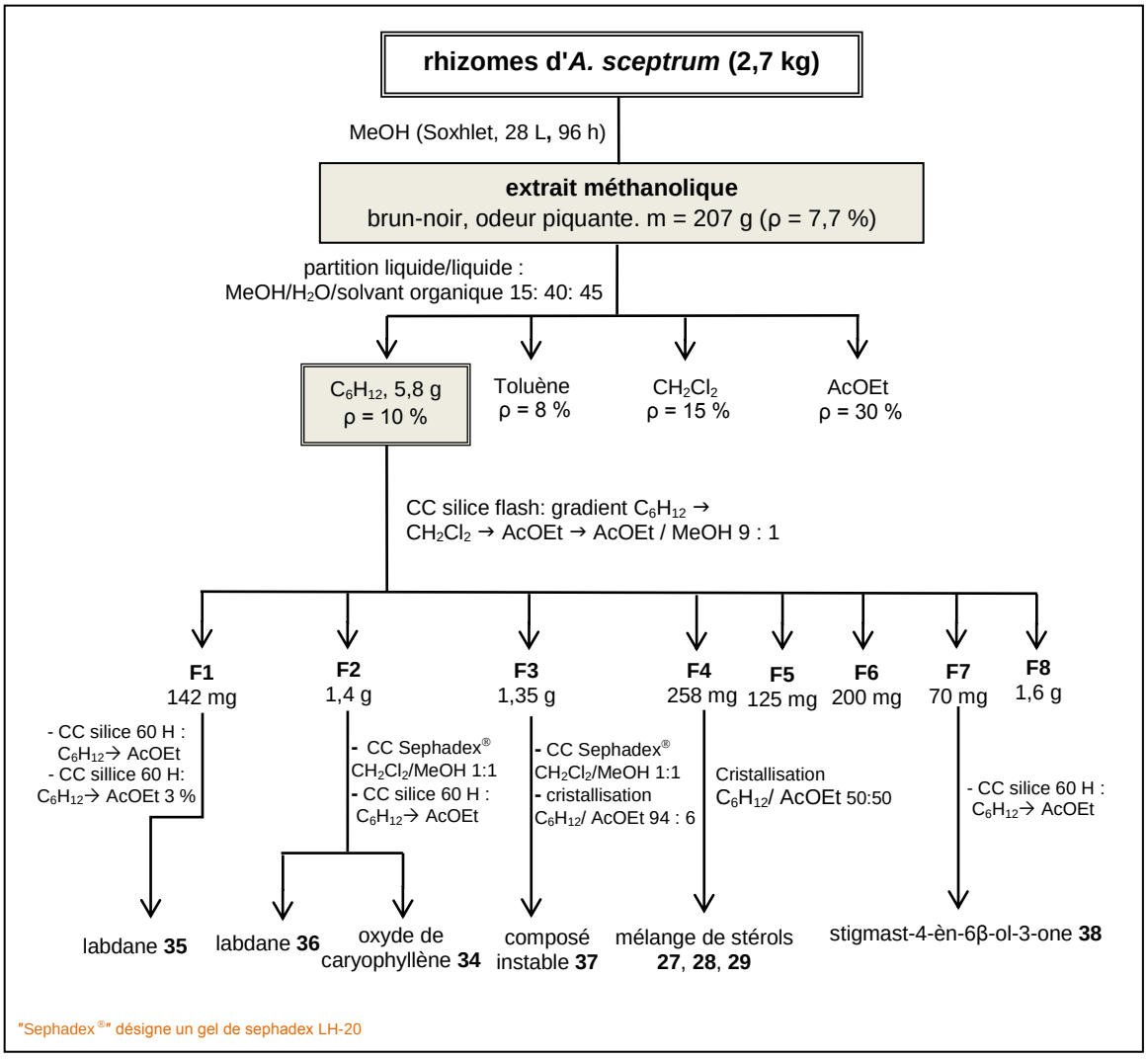


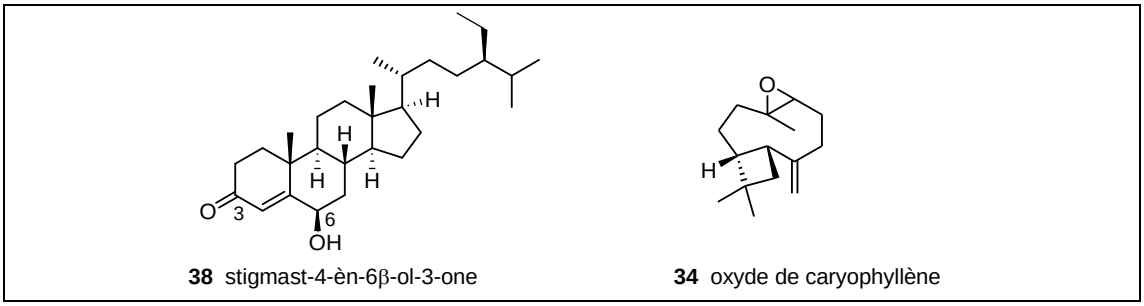
Schéma 1-2. Schéma d'extraction et de purification.

Les activités antiparasitaires de huit fractions ont été également évaluées *in vitro* (**tableau 1-2**). Les huit fractions ont montré une activité intéressante contre *T. b. brucei* avec une CL_{100} ~ 15 µg/mL et contre *L. donovani* avec une CI_{50} ~ 25 µg/mL. Nous pouvons observer que la majorité des fractions obtenues sont deux fois plus actives que le contre-extrait cyclohexanique.

	T. brucei brucei	*L. donovani*
	CL_{100} µg/mL	CI_{50} µg/mL
fraction 1	12,5	< 25
fraction 2	12,5	< 25
fraction 3	12,5	< 25
fraction 4	25	25
fraction 5	12,5	25
fraction 6	12,5	< 25
fraction 7	25	< 25
fraction 8	50	50
isethionate de pentamidine	7,4	1,5 ± 0,1

Tableau 1-2. Activités antiparasitaires *in vitro* pour les huit fractions issues du contre extrait cyclohexanique.

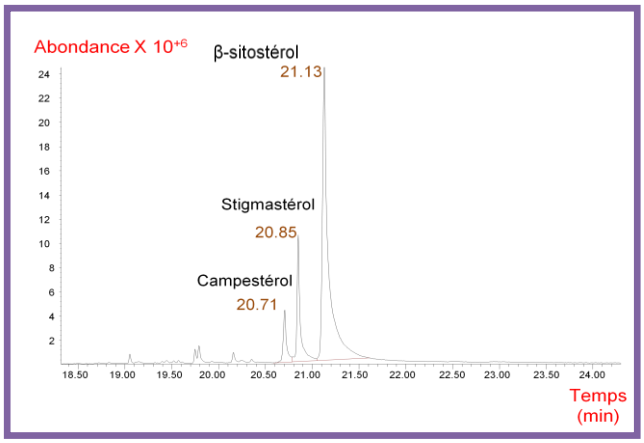
Une chromatographie de la fraction **F7** sur gel de silice flash a permis l'obtention du composé **38**, sous la forme d'un solide blanc pâle. Un pic est observé à *m/z* = 428 en SM-APCI ($[M+H]^+$, $C_{29}H_{48}O_2$). La molécule **38** a été rapidement identifiée comme étant la stigmast-4-èn-6β-ol-3-one **38** (**Figure 1-8**), sur la base de son spectre RMN 1D, hypothèse confirmée par RMN 2D. Ce composé fréquemment rencontré chez les végétaux (Gymnospermes : Taxaceae, comme Angiospermes), a déjà été isolé de plusieurs Zingiberaceae.[31,32]



38 stigmast-4-èn-6β-ol-3-one **34** oxyde de caryophyllène

Figure 1-8. Structures des composés **38** et **34**.

Au cours de la purification de **F4**, la cristallisation des composés majoritaires dans l'éluant C_6H_{12}/AcOEt 7:3 a été observée.



La RMN ^1H suggérant la présence d'un mélange de dérivés de type stérol, une analyse par GC-MS après dérivatisation par silylation a été réalisée. Cette analyse a révélé la présence d'un mélange de 3 composés majoritaires, de type stérol : β-sitostérol **27**, campestérol **28** et stigmastérol **29** (**Figure 1-9**).

Figure 1-9. Chromatogramme du mélange de stérols analysé par GC-MS après silylation.

[31] Ma J., Jin X., Yang Li., Liu Z-Li., *Phytochemistry*. **2004**, 65, 1137–1143.
[32] Tewtrakul S., Tansakul P., Daengrot C., Ponglimanont C., Karalai C., *Phytomed*. **2010**, 17, 851–855.

Après avoir chromatographié la troisième fraction **F3** sur une colonne de Sephadex® LH-20 (CH_2Cl_2/MeOH 1:1), une cristallisation a été observée dans le mélange C_6H_{12} / AcOEt 6 %. Le spectre RMN des cristaux obtenus (4 mg) indique un composé polyphénolique, mais malheureusement celui-ci n'est pas stable. Ce composé **37** n'a pas pu faire l'objet d'une détermination structurale.

La fraction **F2** a été chromatographiée sur une colonne de Sephadex® LH-20 (CH_2Cl_2/MeOH 1:1), pour donner **4** fractions. La troisième fraction a subi une CC flash sur gel de silice avec un gradient de C_6H_{12}→ AcOEt. Le produit majoritaire a pu être obtenu, l'analyse spectrale révélant une molécule terpénique avec une double liaison *exo*, en RMN ^1H (*s*, δ = 4,86 ; *s*, δ = 4,97 ppm), après une analyse approfondie des données RMN, nous avons trouvé que les spectres correspondaient à l'oxyde de caryophyllène **34** (**Figure 1-8**).
À partir de la fraction **F2** également, une autre molécule a été obtenue, par chromatographie sur une colonne de Sephadex® LH-20 suivie par une autre séparation sur silice flash. Ses données spectrales indiquent qu'il s'agit d'un nouveau labdane **36**.

La fraction **F1**, soumise à des chromatographies successives sur colonne de gel de silice a donné une autre labdane **35** proche de **36**.
L'élucidation de la structure de ces deux molécules est présentée ci-dessous.

B- Détermination structurale des nouveaux composés (35) et (36)

Le composé **35** a été obtenu sous la forme d'une huile jaune foncé. L'analyse HR-MALDI-TOF MS a montré un pic correspondant à l'addition de sodium $[M+Na]^+$ à *m/z* 353,2108, conformément à la formule moléculaire est $C_{21}H_{30}O_3$. HRMS-MALDI : *m/z* = 353,2108, $[M+Na]^+$ [*calculée pour* $C_{21}H_{30}O_3Na$: 353,2093 ; Δ = 4,25 ppm]. Le spectre IR montre une lactone insaturée (υ_{max} 1769 cm^{-1}), suggérée par une réaction positive Kedde. Un groupe méthoxy (δ 3,51 ppm) a également été observé.
Le composé **36** est obtenu sous la forme d'une huile incolore. Son spectre HR-MALDI-TOF MS a montré une adduit $[M+Na]^+$ à *m/z* 371,2198 , $[M+Na]^+$ [*calculée pour* $C_{21}H_{32}O_4Na$: 371,2205 ; Δ = 1,88 ppm] conforme à la formule moléculaire $C_{21}H_{32}O_4$. Comme dans le composé **35**, les bandes d'absorption d'une lactone α,β-insaturée (υ_{max} 1769 cm^{-1}) a été observée sur le spectre IR. Une bande supplémentaire correspondant à un groupe hydroxyle (3620 cm^{-1}) a été observée, en accord avec l'analyse MS (+18 uma) par-apport à **35**.
L'analyse spectrale de **35** et **36** permet d'affirmer qu'ils possèdent des structures très proches : sur leurs spectres RMN, les mêmes éléments structuraux sont présents. La seule différence est une saturation d'une double liaison et un groupe hydroxyle dans **36**.
La structure de chacun des deux produits peut être décomposée en deux sous-parties, dont l'une correspond à la structure générale des diterpènes. Une autre partie attachée porte un cycle lactonique, qui donne une réaction positive avec le réactif de Kedde (révélateur sélectif de lactone α,β insaturée).
En ce qui concerne la partie terpénique commune, sur le spectre RMN ^1H obtenu dans le $CDCl_3$, on observe un massif de pics entre δ 0,8 et 2,3 ppm correspond aux protons H-1, H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-9, avec trois groupements méthyle (δ 0,78 ; 0,81 et 0,83 ppm) pour le composé **35** et δ 0,68 ; 0,80 et 0,88 ppm pour **36**. Les trois groupements méthyles ont été également observés dans le spectre RMN ^{13}C (δ 15,1 ; 21,9 et 33,5 ppm) et (δ 14,6 ; 21,7 et 33,6 ppm). Le spectre IR montre un *exo*-méthylène (υ_{max} 3040, 1643, 892 cm^{-1}) pour le **35** et (υ_{max} 3040, 1643, 892 cm^{-1}) pour **36**. Le spectre RMN ^1H obtenu dans le $CDCl_3$ a confirmé la présence d'une *exo*-méthylène (δ 4,70 et δ 4,42 ppm) pour **35**, (δ 4,73 et δ 4,90 ppm) pour **36.** Deux carbones insaturés à 149,2

et 108,5 ppm sont en accord avec la double liaison *exo*- en C-8/C-17 pour le composé **35**, et à 148,1 et 107,3 pour le composé **36**.
L'expérience HSQC confirme les attributions. Les autres carbones aliphatiques ont été aussi observés avec des déplacements chimiques compatibles avec des diterpènes de type labdane (**Figure 1-10**).

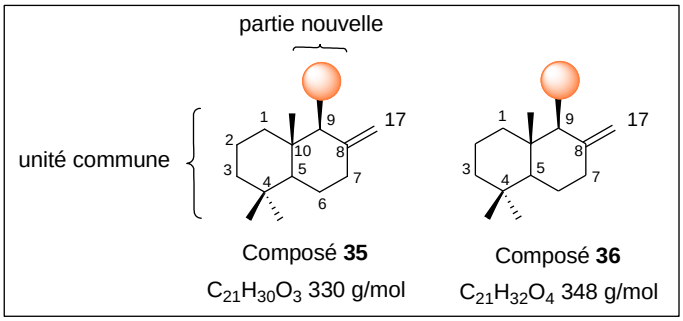


Figure 1-10. Sous-unité ditérpenique des composés **35** et **36**.

Les données obtenues dans $CDCl_3$ par NOESY ont permis la détermination de la configuration relative des composé **35**, **36** avec des caractéristiques typiques d'un diterpène de type labdane. Les corrélations clés sont présentés ci-dessus (**Figure 1-11**).
Pour le composé **35** la présence d'une double liaison a été observée (d, H-12 ; δ 6,03 ; et H-11 ; d/d, δ 6,91 ppm), avec une configuration *trans* (*E*), d'après la constante de couplage (*J* = 15,9 Hz). H-11 est aussi couplé avec un proton allylique H-9 (δ 2,31 ppm ; *J* = 10,2 Hz), comme le montre le spectre ^{1}H-^{1}H COSY.

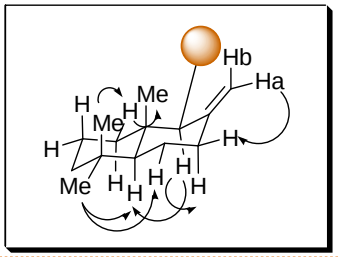


Figure 1-11. Corrélations NOESY observées pour la partie terpénique

Le spectre RMN ^{13}C de **35** obtenus dans le $CDCl_3$ montre la présence de 21 atomes de carbone. Un groupe carbonyle lactonique à δ 174,1 ppm (C-16), un méthoxy en δ 56,8/56,9 (C-21) et trois méthyles déjà cités. Deux doubles liaisons sont caractérisées par des signaux à δ 139,5 (C-11) et 120,3 ppm (C-12), et à δ 132,9 (C-13) et 139,2 ppm (C-14).
La présence de la lactone α-β insaturée a été confirmée par le spectre HMBC, avec une corrélation essentielle entre le carbonyle lactonique C-16 et les deux protons H-12 (δ 6,03 ppm) et H-14 (δ 6,72 ppm). D'autres corrélations entre H-12 et C-9 et H-7 et C-9. Le spectre COSY a aussi montré une corrélation entre H-14 et H-15. Ces observations donnent l'accès à la structure complète.
Dans le spectre RMN ^{1}H de **35** enregistré dans $CDCl_3$, le signal correspondant à H-11 est dédoublé, ce qui suggère la probable coexistence de deux rotamères dans un pourcentage environ 40-60 % (**Figure 1-12a**).
Afin de permettre la conversion rapide entre ces rotamères et l'observation d'une seule forme, l'échantillon a été chauffé à 40 °C pour l'acquisition de la RMN dans le $CDCl_3$, mais aucun changement n'a été observé.
Le $CDCl_3$ a été remplacé par le DMSO-*d6*. Le dédoublement du signal correspondant à H-11 n'était alors plus observé (**Figure 1-12b**). Des différences remarquables de déplacements chimiques ont été observées sur ce spectre enregistré dans le DMSO-*d6* : surtout pour H-14 et H-15 dont les δ sont respectivement de 6,72 et 5,70 ppm dans le $CDCl_3$, et à 7,33 et 6,00 ppm dans le DMSO-*d6*). Ces différences peuvent être expliquées par des effets anisotropes dus à l'interaction du DMSO avec le cycle lactonique. Aucun changement significatif n'a été observé dans le spectre RMN^{13}C pour les carbones correspondants (de δ 139,2 et 101,9 dans le $CDCl_3$ à 142,8 et 102,7 ppm dans le DMSO-*d6* pour C-14 et C-15, respectivement).

D'autres déplacements RMN^{13}C étaient également inchangés dans le DMSO-*d6* (δ 33,8 : C-18 ; 22,4 : C-19 ; 15,6 : C-20 ; 56,9 : C-21 ; 108,9 : C-17 ; 121,2 : C-12 ; 138,5 ppm : C-11).[33]
Le spectre NOESY obtenu dans le DMSO-*d6* a montré une corrélation entre H-11 et H-14, qui n'a pas été observée dans $CDCl_3$. (**Figure 1-14**).

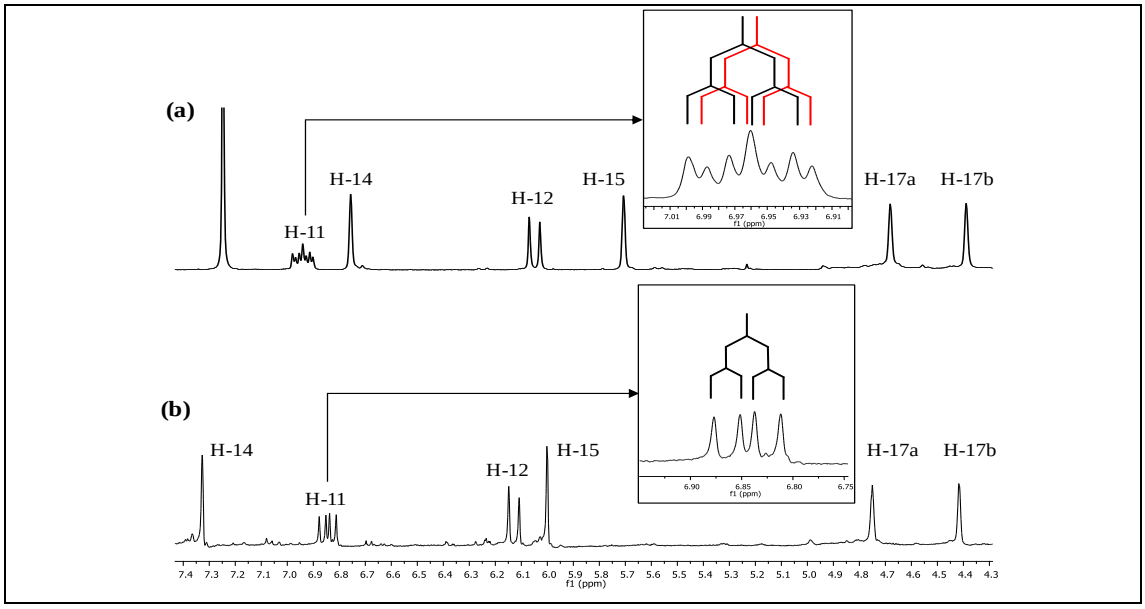


Figure 1-12. Spectres ^{1}H RMN (400 MHz) pour le composé **35** dans **(a)** $CDCl_3$ et le **(b)** DMSO-d_6.

La structure du composé **35** a été établie comme étant le 15ξ-méthoxy-(*E*)-labdan-8(17),11(*E*),13(14)-trièn-15-16-olide, **35** a été nommé **sceptrumlabdalactone A**.

Pour le composé **36**, l'analyse des spectres RMN a montré une structure similaire à celle du composé **35**, la seule différence étant l'hydratation de la double liaison C-11, C-12 avec une absence des signaux correspondant à la double liaison, et avec une apparition de nouveaux signaux (δ 1,48 ; 4,56 ppm) correspondant aux H-11, H-12 respectivement, et δ 30,4 : C-11 ; 65,8 ppm : C-12 (**Figure 1-13**).

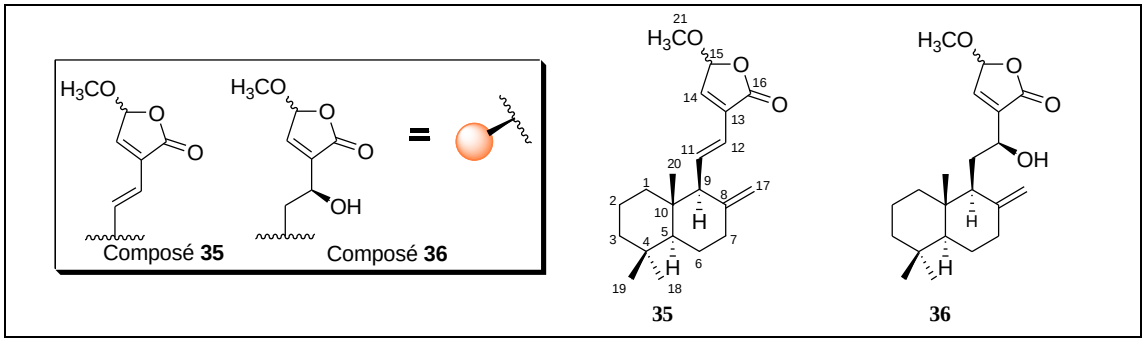


Figure 1-13. Structures des composés **35** et **36**.

La stéréochimie relative de **36** a été établie par l'expérience NOESY (**Figure 1-14**), toutefois il demeure une ambiguïté concernant le carbone C-12, en raison de la libre rotation du substituant ramifié (C-11 à C-16).

[33] Reichardt C., Solvents and solvent effects in organic chemistry, 3è ed. John Wiley & Sons. **2003**.

Bell *et al*.[34] ont réalisé la synthèse de dérivés hydroxylés d'épimères en série labdane et montré des différences dans les déplacements des protons H-17 en fonction de la configuration en C-12 (*R* : δ H-17a : 4,48, H-17b : 4,86 ; *S* : δ H-17a : 4,72, H-17b : 4,88 ppm). Les déplacements chimiques de H-17a à 4,73 et H-17b à 4,90 ppm suggèrent donc fortement une configuration *S* pour C-12.[35]
La structure du composé **36** a été établie comme étant le 12 (*S*)-hydroxy-15ξ-méthoxy-labdan-8(17),13(14)-dièn-15-16-olide, **36** a été nommé nommé **sceptrumlabdalactone B.**
Labdanes **35** et **36** sont étroitement liés à ceux obtenus par Tomla *et al*.[28]

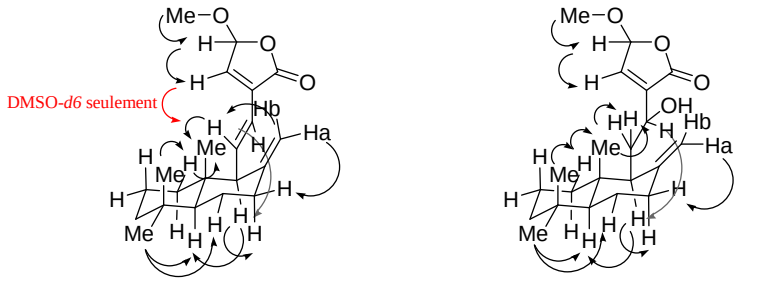


Figure 1-14. Corrélations NOESY observées pour les deux labdanes **35** et **36**.

Pour **35** et **36**, la configuration absolue en C-15 n'a pu être déterminée, mais la présence de deux épimères est soupçonnée, sur la base de paires de résonance pour C-18 [O-Me ; 56,8 ; 56,9 pour **35**, 57,1 ; 57,2 pour **36**].
Il est à noter que des composés similaires ont été isolés d'*Alpinia renealmia* (Zingiberaceae) sous forme d'un mélange épimèrique en C-15. [36]
Il est possible que **35** et **36** soient des artefacts liés à l'extraction par le MeOH avec un soxhlet. Cependant, des analogues acétaliques et hémi-acétaliques non épimériques ont déjà obtenus en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction (**Figure 1-15**).[37]

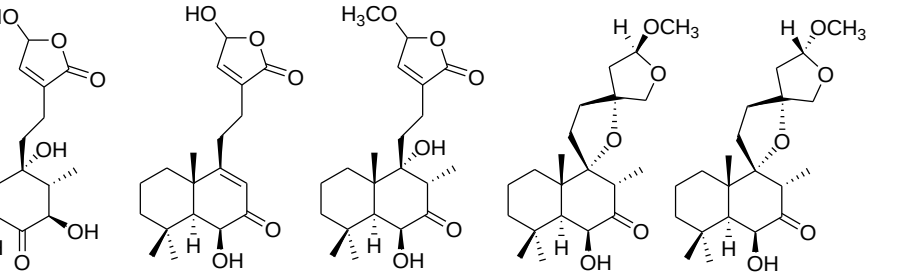


Figure 1-15. Labdanes isolés à partir de parties aériennes de *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae).

[34] Bell, R. A., Gravestock, M. B., Taguchi, V. Y., *Can. J. Chem*. **1972**, 50, 3749–3760.
[35] Waridel, P., Wolfender, J.-L., Lachavanne, J-B., *Phytochemistry* **2003**, 64, 1309–1317.
[36] Yang, S. W., Zhou, B. N., Malone, S., Werkhoven, M. C. M., Troon, F. V., Wisse, J. H., Kingston, D. G. I., *J. Nat. Prod*. **1999**, 62, 1173–1174.
[37] Boalino, D. M., McLean, S., Reynolds, W. F., Tinto, W. F., *J. Nat. Prod*. **2004**, 67, 714–717.

C- Évaluation biologique

Plusieurs labdanes ont montré une activité antiplasmodiale *in vitro*.[38] Une activité leishmanicide a également été observée dans cette série,[39] ainsi qu'une activité trypanocide modérée pour les labdanes d'*Aframomum aulacocarpos*.[40] Les composés **35** et **36** ont été testés contre les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei* (concentration minimale létale ; CML) à 24 h. Ils ont également été évalués contre la forme promastigotes de *Leishmania donovani* (CI_{50}) à 72 h (**table 1-3**).

	T. brucei brucei **CML**		*L. donovani* **CI_{50}**	
Molécules	**µg/mL**	**(µM)**	**µg/mL**	**(µM)**
mélange de stérols **27**, **28**, **29**	31,00	74,75*****	100,00	241,11*****
oxyde de caryophyllène -**34**	25,00	121,36		
sceptrumlabdalactone A -**35**	67,32	204,00	8,25 ± 0,23	25,0 ± 0,70
sceptrumlabdalactone B -**36**	12,42	35,70	1,98 ± 0,30	5,70 ± 0,86
miltéfosine (témoin)		/	1,20	3,00
isethionate de pentamidine (témoin)	7,40	12,50	1,48 ± 0,12	2,50 ± 0,20

* Calculé par rapport au β-sitostérol

Table 1-3. Activités antiparasitaires *in vitro* pour les composés purs.

Le composé **35** a montré une activité modérée contre *L. donovani*, et il n'était pas actif contre *T. b. brucei*. Le composé **36** est raisonnablement actif contre *T. b. brucei*, et fortement actif contre *L. donovani*, avec un CI_{50} proche de celle de la pentamidine.[41]
Ce travail a été publié par le journal *phytochemistry letters*.[41]

IV. Travaux personnels : étude chimique et biologique de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum*

De nombreuses Zingiberaceae sont riches en huiles essentielles et sont très utilisées comme condiments, ou à des fins médicinales.
Une forte odeur piquante au cours de l'extraction et du fractionnement nous a donné l'idée d'étudier l'huile essentielle afin de déterminer sa composition et ses activités biologiques, pouvant justifier des emplois médicinaux traditionnels.

A- Extraction et caractérisation de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum*

L'hydrodistillation des rhizomes d'*A. sceptrum** 0,17 % (rendement : volume/masse) offre une huile essentielle jaune claire **HE-As** (densité : 0,94).

[38] Christensen S. B., *Planta Med*. **2002**, 68, 642–644.
[39] Singh M., Pal M., Sharma R. P., *Planta Med*. **1999**, 65, 2–8.
[40] Sob S. V. T., Tane P., Ngadjui, B. T., Connolly, J. D., Mad, D.,*Tetrahedron* **2007**, 63, 8993–8998.
[41] Cheikh-Ali Z., Okpekon T., Roblot F., Bories C., Cardao M., Jullian J-C., Poupon E., Champy P., *Phytochem. Lett*. **2011**, 4, 240–244.
* Les travaux ont été effectués sur des rhizomes d'*A. sceptrum* récoltés en Côte d'Ivoire en **2008** séchés à température ambiante.

L'analyse de cette huile a été réalisée par GC-MS en utilisant deux méthodes chromatographiques. Deux colonnes de polarité relativement différentes ont été utilisées (colonne BPX5, colonne Rtx-65TG). Une solution standard de *n*-alcanes (C_9-C_{30}) a été utilisée pour calculer l'indice de rétention RI des composants de l'HE-As.

Les composants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs RI et des fragments de masse avec ceux de la base de données du NIST (National Institute of Standards and Technology).

La détermination quantitative des composés de l'huile essentielle est basée sur les mesures de l'aire des pics dans le chromatogramme obtenu par EI-SM, et est confirmée par l'analyse FID. Soixante quinze composés ont été identifiés (**Table 1-4**). Les principaux constituants ont été le β-pinène **44** (12,71 %), l'oxyde de caryophyllène **34** (10,03 %), le cypérène (5,99 %), le 3,4-diméthyl-3-cyclohexène-1-carboxaldéhyde (3,40 %), l'α-pinène (2,78 %), le β-caryophyllène (2,33 %), l'α-terpinéol (2,12 %), le D-limonène (1,89 %), le 1,8-cinéole (1,84 %) et l'α-caryophyllène (1,1 %). Les structures de β-pinène **44**, oxyde de caryophyllène **34** et des métabolites mineurs sont présentées ci-dessous (**Figure 1-16**). On peut comparer cette HE avec celle obtenue à partir d'autres *Aframomum*, les données essentielles de la littérature figurant dans la partie I de ce chapitre. Les molécules identifiées sont souvent présentes chez les *Aframomum*. Ici, on n'a pas de composé très majoritaire, alors que c'est souvent le cas dans ce genre botanique.

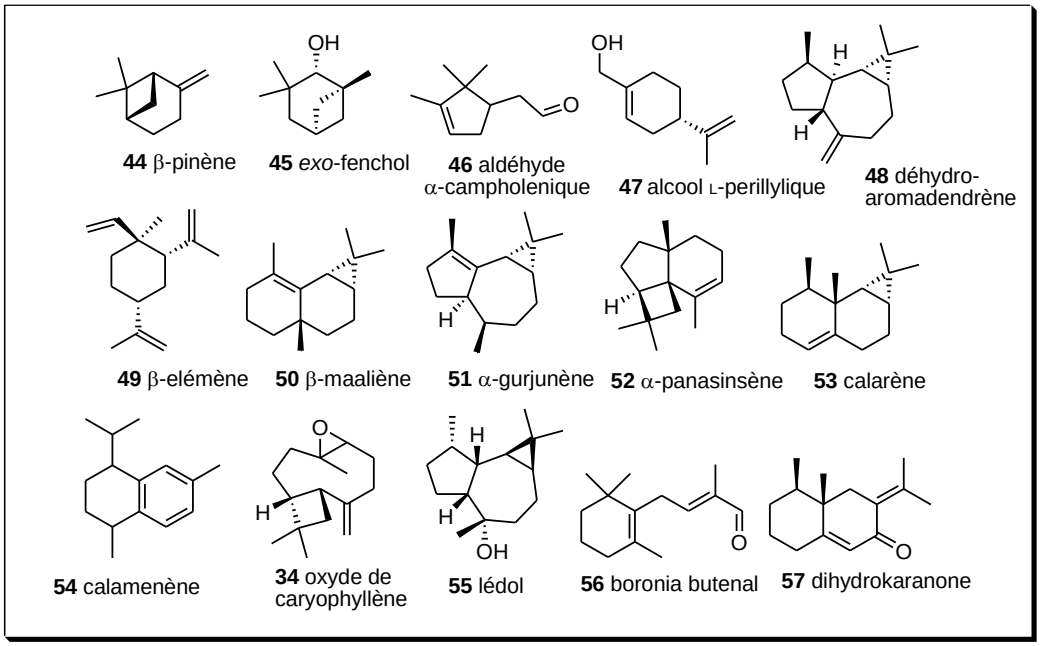


Figure 1-16. Structures des métabolites dans l'huile essentielle obtenue.

composé [a]	Composition (%)	IR[b]	IR[c]
α-thujène	0,25	944	862
α-pinène	2,78	953	891
camphène	0,33	970	916
sabinène	0,57	992	946
β-pinène **44**	12,71	1002	967
β-myrcène	0,21	1004	968
4-carène	t	1016	1007
α-phellandrène	0,80	1025	1010
α-terpinène	0,16	1035	1021
p-cymène	1,56	1046	1065
D-limonène	1,89	1049	1031
β-phellandrène	0,27	1052	1041
1,8-cinéole	1,84	1055	1061
α-ocimène	0,09	1061	1131
γ-terpinène	0,55	1076	1084
β-terpinéol	0,23	1091	1215
α-terpinolène	0,60	1101	1211
β-linalool	1,64	1117	1152
exo-fenchol **45**	0,11	1143	1163
trans-p-menth-2-èn-1-ol	t	1146	1263
aldéhyde α-campholenique **46**	0,13	1150	1180
trans-pinocarvéol	0,49	1166	1202
β-pinone	0,18	1169	1269
camphre	0,41	1175	1242
pinocarvone	0,48	1189	1274
L-bornéol	0,60	1198	1234
terpinène-4-ol	0,96	1203	1215
α-terpinéol	2,12	1219	1280
(*1R*)-(–)-myrtènol	0,22	1223	1285
(*1R*)-(–)-myrténal	0,69	1224	1321
acétate de L-bornyl	0,28	1298	1309
acétate d'isobornyl	0,25	1302	1362
thymol	0,19	1306	1363
carvacrol	0,25	1316	–
alcool L-perillylique **47**	t	1320	–
acétate de *trans*-(–)-pinocarvyl	0,16	1323	1430
acétate de myrtényl	0,96	1336	1340

acétate de 4-terpinyl	t	1356	1373
copaène	0,49	1384	1367
déhydro-aromadendrène **48**	0,09	1389	–
β-elémène **49**	0,12	1396	1422
cypérène	5,99	1420	1400
β-caryophyllène	2,33	1433	1437
γ-élémène	0,13	1436	1486
β-maaliène **50**	0,14	1454	1487
(–)-alloaromadendrène	0,27	1456	1492
α-caryophyllène	1,10	1467	–
α-gurjunène **51**	0,54	1481	1521
α-panasinsène **52**	0,32	1486	1498
2-isopropènyl-4a,8-diméthyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphtalène	0,52	1493	1531
γ-selinène	0,66	1500	1525
α-selinène	0,29	1505	1500
β-selinène	t	1508	1534
2H-cyclopropa[ɣ]benzofuran-4,5,5a,6,6a,6b-hexahydro-4,4,6b-triméthyl-2-(1-méthyléthényl)	0,16	1514	1567
δ-cadinène	0,22	1521	1584
calarène **53**	0,28	1524	1737
γ-gurjunène	1,47	1527	1572
calamenène **54**	1,41	1530	1641
spathulénol	0,65	1553	1727
α-élémol	1,13	1556	1666
époxide de *trans*-(*Z*)-α-bisabolène	0,20	1568	1737
α-farnésène	0,37	1580	1641
isoaromadendrène epoxide	0,58	1585	1773
oxyde de caryophyllène **34**	10,03	1600	1701
lédol **55**	0,26	1616	1818
3,4-diméthyl-3-cyclohexèn-1-carboxaldéhyde	3,40	1625	1803
γ-eudesmol	1,07	1640	1806
époxyde de *cis*-(*Z*)-α-bisabolène	0,71	1645	1711
boronia butenal **56**	2,86	1653	–
β-eudesmol	2,55	1667	1688
α-bisabolol	4,03	1681	1917
γ-caryophyllène	0,29	1680	1832
dihydrokaranone **57**	2,80	1716	1886
8-oxo-cycloisolongifolène	2,08	1768	1933

hydrocarbures monoterpèniques	**25,71**
monoterpènes oxygénés	**15,58**
hydrocarbures sesquiterpéniques	**17,02**
sesquiterpènes oxygénés	**25,69**
composés aromatiques	**0,90**

t : traces (≤0.08 %); **a)** les composés sont énumérés dans l'ordre d'élution sur la colonne BPX-5 ; **b)** indices de rétention pour la colonne BPX-5, par rapport aux *n*-alkanes C_9–C_{30} ; **c)** indices de rétention pour la colonne RTX-65TG, par rapport aux *n*-alkanes C_9–C_{30}.

Table 1-4. Composition de l'huile essentielle obtenue.

B. Évaluation biologique

La plupart des huiles essentielles sont antiseptiques, sans réelle spécificité. D'autres effets des huiles essentielles ont été décrits tels que : anti-inflammatoire, stimulant, sédatif, rubéfiant, diurétique, sudorifique, antispasmodique, calmant, emménagogue, et vulnéraire.[42] Les utilisations traditionnelles des espèces du genre *Aframomum* ont incité les auteurs à évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ou d'extraits.[43,44] De même, l'huile essentielle obtenue a été testée contre plusieurs souches bactériennes et fongiques. Ses deux principaux composants, le β-pinène **44** et l'oxyde de caryophyllène **34** ont servi de témoins, ainsi que l'huile essentielle des feuilles de *Melaleuca alternifolia* Cheel. (Myrtaceae). Celle-ci (HE-Ma) est l'une des principales huiles essentielles fortement antimicrobiennes utilisée en aromathérapie.[45]

1) Activité antibactérienne

Nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'HE-As et ses dilutions par la méthode de diffusion de disque (15 µL/disque). Les résultats indiquent une sensibilité particulière des bactéries à Gram-positif *B. subtilis*, *S. epidermidis* et *S. aureus* (**Table 1-5**). Ces activités ont été supérieures à celles du β-pinène et l'oxyde de caryophyllène, et légèrement inférieures à celle de l'HE-Ma. Les bactéries à Gram-négatif ont été moins sensibles à HE-As, avec peu ou pas de zones d'inhibition pour *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, en contraste avec HE-Ma. Il est à noter qu'une faible activité bactéricide contre *S. aureus* et *S. epidermidis* a été attribuée au principal composant, le β-pinène **44**,[46] tel que confirmé par nos résultats, ceci souligne l'importance des effets synergiques.[47,48] L'oxyde de caryophyllène **34** ne contribue pas fortement aux activités d'HE-As, contrairement à nos attentes.[49] Enfin, il convient de noter que l'huile essentielle de fruits d'*A. danielii*, qui a une composition relativement proche, montre le même spectre d'activité.[12]

[42] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., *Food Chem. Toxicol*. **2008**, 46, 446–75.
[43] K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A. J., *J. Ethnopharmacol*. **2002**, 79, 213–220.
[44] Konning G. H., Agyare C., Ennison B., *Fitoterapia* **2004**, 75, 65–67.
[45] Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V., *Clin. Microbiol. Rev*. **2006**, 19, 50–62.
[46] Santos P. O., Costa M. J. C., Alves J. A. B., Nascimento P. F. C., de Melo D .L. F. M., Barbosa A. M. Jr, Trindade R. C*., Quim. Nova* **2008**, 31, 1648–1652.
[47] Burt S., Int. *J. Food Microbiol*. **2004**, 94, 223–253.
[48] Dorman H. J. D., Deans S. G., *J. Applied Microbiol*. **2000**, 88, 308–316.
[49] Bougatsos C., Ngassapa O., Runyoro D. K. B., Chinou I. B., *Z. Naturforsch*. **2004**, 59c, 368–372.

2) Activité antifongique

L'activité antifongique de l'HE-As a également été évaluée (**Table 1-6**). Une remarquable activité contre la levure *Candida albicans* a été observée, et pourrait justifier l'usage traditionnel contre les candidoses. L'activité fongicide a été faible contre le champignon filamenteux *A. fumigatus*, malgré une intéressante CMI (concentration minimale inhibitrice). Ces deux activités ont été supérieures à celle de l'HE-Ma et semblent aussi s'appuyer sur une synergie.

3) Activité antiprotozoaire

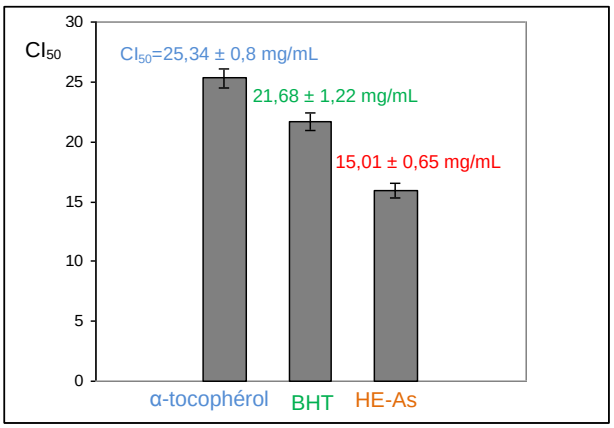
Des tests antiprotozoaires ont également été réalisés, en prenant en considération l'utilisation médicale traditionnelle des rhizomes *A. sceptrum* contre la trypanosomiase et des espèces du genre *Aframomum* contre les infections génitales.[50,51,52] Une forte activité trypanocide (*T. b. brucei*, trypomastigotes) a été observée. De bons résultats ont également été obtenus avec les principaux composants d'HE-As (**Tableau 1-7**), ainsi que le β-pinène **44**.[53] Toutefois, l'activité trypanocide des extraits totaux des rhizomes[27] peut aussi éventuellement être attribuée à la présence des labdanes **35** et **36** et d'analogues présumés des labdanes.
L'activité trichomonacide (*Trichomonas vaginalis*) de l'HE-As a également été forte (**Tableau 1-7**). Ces données sont remarquables par rapport à celles obtenues avec d'autres huiles essentielles.[54] Le β-pinène **44** et l'oxyde de caryophyllène **34** étaient actifs, soutenant l'effet observé pour l'ensemble de l'huile essentielle. Les résultats obtenus avec l'HE-As sont comparables à ceux de *M. alternifolia*, qui a affiché la plus basse CML (Concentration minimale létale) mais une CI_{50} (concentration inhibitrice à 50 %) supérieure à celle d'*A. sceptrum*.[55,56]
On notera que l''utilisation clinique de l'huile essentielle des feuilles de *M. alternifolia* contre les infections à *Trichomonas vaginalis* a été suggérée.

4) Activités anti-oxydante

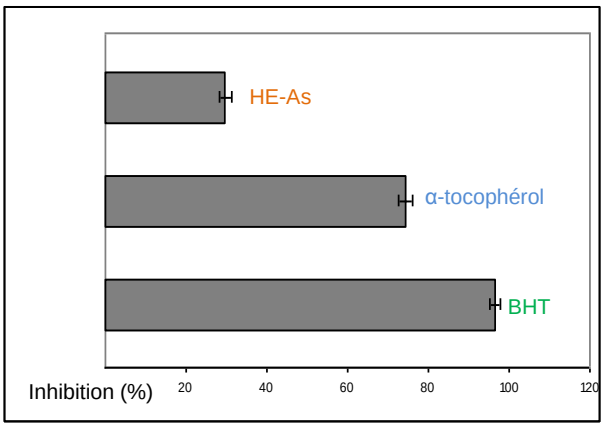
Un test préliminaire d'activité anti-oxydante sur CCM avec le DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) comme révélateur montre une capacité anti-oxydante de l'huile essentielle. Celle-ci a été soumise à l'examen de son activité anti-oxydante par deux tests complémentaires, nommément : le piégeage des radicaux libres[57] et le test de blanchissement du β-carotène.
Le DPPH, est mis en solution. Sa disparition est suivie par spectrométrie dans le visible.
La capacité de piégeage des radicaux libres de notre huile essentielle est considérablement élevée avec une CI_{50} = 15,97 ± 0,69 µL/mL (15,01 ± 0,65 mg/mL) en comparaison avec les antioxydants de référence : le BHT (butylhydroxytoluène) avec une CI_{50} = 21,68 ± 1,22 mg/mL, et l'α-tocophérol avec une CI_{50} = 25,34 ± 0,8 mg/mL (**Figure 1-17a**).

[50] La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, Ed. Vigot Frères., Paris. **1974**, p. 786–787.
[51] Tane P., Simplice D., Tatsimo S. D., Godfred A., Ayimele G. A., Connolly J. D., Bioactive metabolites from *Aframomum* species.11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings, Antananarivo, Madagascar. **2005**, p. 214–223.
[52] Focho D. A., Nkeng E. A. P., Lucha C. F., Ndam W.T., Afegenui A., *J. Med. Plants Res*. **2009**, 3, 301–314.
[53] Mikus J., Harkenthal M., Steverding D., Reichling J., *Planta Med*. **2000**, 66, 366–368.
[54] Desrivot J., Waikedre J., Cabalion P., Herrenknecht C., Bories C., Hocquemiller R., Fournet A., *J. Ethnopharmacol*. **2007**, 112, 7–12.
[55] Viollon C., Mandin D., Chaumont J. P., *Fitoterapia* **1996**, 67, 279–281.
[56] Vermani K., Garg S., *J. Ethnopharmacol*. **2002**, 80, 49–66.
[57] Sharififar F., Moshafi M. H., Mansouri S. H., Khodashenas M., Khoshnoodi M., *Food Control* **2007**, 18, 800–805.

La présence de composés phénoliques dans l'huile essentielle (16,9 %) ainsi que de β-pinène (principal composé d'HE-As) pourrait expliquer cette forte activité antioxydante.[58]
Dans le test de blanchissement du β-carotène, on utilise de l'acide linoléique, un acide gras poly-insaturé. On introduit du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β-carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Le caractère anti-oxydant du mélange testé engendre une neutralisation des radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, prévenant ainsi l'oxydation et donc le blanchissement du β-carotène. Ainsi, la capacité antioxydante de l'huile essentielle est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.[59]
HE-As n'est pas en mesure d'inhiber efficacement l'oxydation de l'acide linoléique. En effet, pour une concentration de 2 mg/ml, le pourcentage d'inhibition n'atteint que 29,68 ± 1,60 %. Cette inhibition est significativement inférieure à celle induite, à concentration égale, par les antioxydants de référence que sont le BHT et α-tocophérol (**Figure 1-17b**).



a. Activité d'inhibition du piégeage du radical DPPH.



b. Activité d'inhibition de la décoloration du β- carotène

Figure 1-17. Activité antioxydante de l'huile essentielle.

La description de HE-As et ses activités anti-infectieuses ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Chemistry & Biodiversity.*[60]

[58] Ruberto G., Baratta M. J., *Food Chem*. **2000**, 69, 167–174.
[59] Dapkevicius A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linssen, P. H., *J. Agric. Food Chem*. **1998**, 77, 140–146.

V. Conclusion de la partie phytochimie

Par fractionnement bioguidé des rhizomes d'*A. sceptrum* deux nouveaux composés, nommés **sceptrumlabdalactone A** (**35**) et **sceptrumlabdalactone B** (**36**) ont été isolés. D'autres composés terpéniques ont été également isolés, comme l'oxyde de caryophyllène (**34**). Un autre composé phénolique a été isolé ; malheureusement c'est un composé instable et nous n'avons pas pu déterminer la structure de cette molécule. L'activité antiparasitaire a été évaluée contre *T. b. brucei* et contre la forme promastigote de *L. donovani.* Le composé **36** est fortement actif contre *L. donovani*, avec une CI_{50} proche de celle de la pentamidine. La présence de ces composés justifie partiellement l'activité des extraits totaux. De nombreuses sous-fractions s'étant montrées actives contre *T. b. brucei* et *L. donovani*. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux.
Nous n'avons pas pu isoler et identifier de diarylheptanoïdes, ni d'aryl-alcanones, montrant qu'il aurait été nécessaire de réaliser une étude de déréplication LC/MS et LC/MS-MS, afin de pouvoir confirmer la présence de dérivés diarylheptanoïdes.

L'extraction de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum* a été réalisée par hydrodistillation. Une analyse par GC-MS, a montré la présence de mono- et sesquiterpènes faiblement oxygénés, avec une quasi-absence de monoterpènes aromatiques. L'évaluation des activités biologiques a été également réalisée : l'huile essentielle a montré une activité contre les bactéries à Gram positif supérieure à celle contre les bactéries à Gram négatif. Une forte activité trichomonacide a aussi été constatée.[60]
À notre connaissance, les composants identifiés dans l'HE-As ne posent pas de problèmes de sécurité sanitaire.[61] Par conséquent, ce résultat est d'un intérêt particulier. Il suggère une possible utilisation d'extraits volatils des rhizomes d'*A. sceptrum* pour le traitement topique de la trichomonase dans les régions où la plante est abondante, après une évaluation préclinique et clinique appropriée.

[60] Cheikh-Ali Z., Adiko M., Bouttier S., Bories C., Okpekon T., Poupon E., Champy P., *Chem. Biodiv.* **2011**, 8, 658–67.
[61] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., *Food Chem. Toxicol*. **2008**, 46, 446–475.

	diamètre de la zone d'inhibition (moyenne ± ET; mm) [a]					CMI [b,c]	CMB [b,d]
	HE-As [a] (15 µL) (14,4 mg)	β-pinène **44**[a] (15 mg)	oxyde de caryophyllène **34** [a] (15 mg)	HE-Ma (control) [a] (15 µL)	gentamicine [a] (15 µg)	HE-As [b] µL/mL (mg/mL)	HE-A.s [b] µL/mL (mg/mL)
S. aureus	16,0 ± 0,7	12,5 ± 1,5	11,5 ± 1,0	25,5 ± 1,5	20 ± 0,9	0,625 (0,587)	0.625 (0.587)
S. epidermidis	20,5 ± 2,1	11,0 ± 0,0	14,6 ± 1,4	23,3 ± 2,6	25 ± 0,0	0,078 (0,073)	0.078 (0.073)
B. subtillis	23,5 ± 2,1	12,5 ± 1,5	14,3 ± 1,7	28,0 ± 2,0	18 ± 0,0	0,039 (0,037)	0.078 (0.073)
P. aeruginosa	–	–	–	11,6 ± 1,3	18 ± 0,0	N.T	N.T.
P. vulgaris	13,0 ± 0,0	11,0 ± 1,5	–	39,0 ± 2,5	18 ± 0,0	5,00 (4,70)	5.00 (4.70)
E. coli	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	–	44,7 ± 1,3	12 ± 0,0	N.T	N.T.

[a]) Méthode de diffusion en disque; [b)] Méthode de dilution en bouillon ; [c)] Concentration minimale inhibitrice, soit la plus faible concentration inhibant la croissance des micro-organismes ; [d)] Concentration minimale bactéricide (plus faible concentration qui tue tous les micro-organismes) ; **ET** : écart-type ; **–** : pas d'activité ; **N.T** : non testé.

Tableau 1-5. Activités antibactériennes de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum.*

	HE-As		β-pinène **44**		oxyde de caryophyllène **34**		HE-Ma (contrôle)		amphotéricine B
	CMI [a] µL/mL (mg/mL)	MFC [b] µL/mL (mg/mL)	CMI mg/mL	MFC mg/mL	CMI mg/mL	MFC mg/mL	CMI µL/mL	MFC µL/mL	CMI (µg/mL)
C. albicans	0,625 (0,587)	0,625 (0.587)	3,0	3,0	6,0	> 6,0	10,0	10,0	0,064
A. fumigatus	0,625 (0,587)	5,00 (4,70)	0,625	6,0	6,0	6,0	5,0	10,0	0,500

[a)] concentration minimale inhibitrice, soit la plus faible concentration inhibant la croissance des champignons visibles; [b)] Concentration minimale fongicide, soit la plus faible concentration tuant tous les champignons.

Tableau 1-6. Activités antifongiques de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum.*

	HE-As	β-pinène **44**	oxyde de caryophyllène **34**	HE-Ma (contrôle)	référence
T. brucei brucei	CML [a] µL/mL (mg/mL)	CML µg/mL	CML µg/mL	CML µL/mL	pentamidine CML µg/mL
	1,51 (1,47)	> 100	100 [c]	6,25 [d]	7,4

										métronidazole	
T. vaginalis	MLC µL/mL (mg/mL)	CI_{50} [b] µL/mL (mg/mL)	CML mg/mL	CI_{50} mg/mL	CML mg/mL	CI_{50} mg/mL	CML µL/mL	CI_{50} µL/mL	CML (µg/mL)	CI_{50} µg/mL
	1,72 (1,67)	0,12 ± 0,02 (0,13 ± 0,02)	1,25	0,44 ± 0,04	0,625	0,16 ± 0,02	0,625	0,20 ± 0,02	1,0	0,50 ± 0,1

[a)] Concentration minimale létale, soit plus la faible concentration qui tue tous les parasites dans le milieu de culture ; [b)] Concentration inhibitrice 50 %, déterminée après 1 h d'incubation ; [c)] 25 µg/mL à 24 h ; [d)] 6,25 µg/mL à 24 h.

Tableau 1-7. Activités antiparasitaires de l'huile essentielle des rhizomes d'*A. sceptrum*

Notes et références bibliographiques du chapitre 1

[1] Okpekon T., Étude chimique et biologique de plantes ivoiriennes utilisées en médecine traditionnelle en tant qu'antiparasitaires, thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud. **2007**.
[2] Kress W. J., Prince L. M., Williams K. J., *Am. J. Botany* **2002**, 89, 1682–1696.
[3] Duker-Eshun G., Jaroszewski J. W., Asomaning W. A., Oppong-Boachie F., Olsen C. E., Brøgger Christensen S., *Planta Med*. **2002**, 68, 642–644.
[4] Kenmogne K., Prost E., Harakat D., Jacquier M.-J., Frédérich M., Sondengam L. B., Zèches M., Waffo-Téguo P., *Phytochemistry* **2006**, 67, 433–438.
[5] Zhu J., Islas-Gonzalez G., Bois-Choussy M., *Org. Prep. Proc. Int*. **2000**, 32, 505–546.
[6] Radha K. M., Anoop K. S., Jaya G., Rikhab C. S., *Life Sciences* **2006,** 78, 2081–2087.
[7] Escoubas P., Lajide L., Mizutani., *Phytochemistry* **1995**, 40, 1097–1099.
[8] Kamnaing P., Tsopmo A., Tanifum E. A., Marguerite H. K., Tchuendem M. H. K., Tane P., Ayafor J. F., Sterner O., Donna Rattendi D., Iwu M. M., Schuster B., Bacchi C., *J. Nat. Prod*. **2003**, 66, 364–367.
[9] Baser K. H. C., Kurkcuoglu M., *J. Essent. Oil Res*. **2001**, 13, 208–209.
[10] Eyob S., Appelgren M., Rohloff J., Tsegaye A., Messele G., *J. Essent. Oil Res*. **2007**, 19, 372–375.
[11] Hymete A., Rohloff J., Iversen T. H., *Flavour Fragr. J*. **2006**, 21, 642–644.
[12] Dongmo P. M., Jazet M., Boyom F. F., Sameza M. L., Dongmo B. N., Kwasou N. L., Amvan Zollo P. H., Menut C., *Int. J. Ess. Oil Therap*. **2008**, 2, 149–155.
[13] Martins A. P., Salgueiro L., Gonçalves M. J., Poença da Cunha A., Vila R., Canigueral S., Mazzoni V., Tomi F., Casanova J., *Planta Med*. **2001**, 67, 580–584.
[14] Adegoke G. O., Rao L. J. M., Shankaracharya N. B., *Flavour Fragr. J*. **1998**, 13, 349–352.
[15] Ouamba J. M., thèse de doctorat de l'Université de Monpellier 2, France. **1991**.
[16] Abondo R., thèse de l'Université de Yaoundé, Cameroun. **1993**. Cité par : (Agnaniet *et al*., **2004**).
[17] Agnaniet H., Menut C., Bessière J. M., *Flavour Fragr. J*. **2004**, 19, 205–209.
[18] Amvan Zollo P. H., Abondo R., Biyiti L., Menut C., Bessiere J. M., *J. Essent. Oil Res*. **2002**, 14, 95-98.
[19] Hari L., Bukuru J., De Pooter H. L., *J. Essent. Oil Res*. **1994**, 6, 395–398.
[20] Ajaiyeoba E. O., Ekundayo O., *Flavour Fragr. J*. **1999**, 14, 109–111.
[21] Chiwosa E. H., Hall D. R., Farman D. I., *J. Essent. Oil Res*. **1998**, 10, 447–449.
[22] Eyob S., Appelgren M., Rohloff J., Tsegaye A., Messele G., *South Afric. J. Bota*. **2008**, 74, 181–185.
[23] Couppé M. A., Joseph H., Bercion S., Menut C., *Flavour Fragr. J*. **2006**, 21, 902–905.
[24] Abreu P. M., Noronha M. G., *Flavour Fragr. J*. **1997**, 12, 79–83.
[25] Ngassoum M. B., Yonkeu S., Jirovetz L., Buchbauer G., Fleishhacker W., *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **1999**, 2, 35–45.
[26] Adjanohoun E. J., Adjakidje V., Ahyi M. R. A., Aké Assi L. Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. ACCT, Paris **1989**, 671 p.
[27] Okpekon T., Yolou S., Gleye C., Roblot F., Loiseau P., Bories C., Grellier P., Frappier F., Laurens A., Hocquemiller R. *J. Ethnopharmacol*. **2004**, 90, 91–97.
[28] Tomla C., Kamnaing P., Ayimele G. A., Tanifum E. A., Tsopmo A., Tane P., Ayafor J. F., Connolly J. D. *Phytochemistry* **2002**, 60, 197–200.
[29] Ayafor J. F., Connolly J. D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* **1981**. 2563–2565.
30 Erukainure O. L., Oke O. V., Owolabi F. O., Adenekan O. S. *Trends. Appl. Sci Res*. **2011**, 6, 190–197.
[31] Ma J., Jin X., Yang Li., Liu Z-Li., *Phytochemistry* **2004**, 65, 1137–1143.
[32] Tewtrakul S., Tansakul P., Daengrot C., Ponglimanont C., Karalai C., *Phytomed*. **2010**, 17, 851–855.
[33] Reichardt C., Solvents and solvent effects in organic chemistry, 3è ed. John Wiley & Sons, New York. **2003**.
[34] Bell R. A., Gravestock, M. B., Taguchi, V. Y., *Can. J. Chem*. **1972**, 50, 3749–3760.
[35] Waridel P., Wolfender, J.-L., Lachavanne, J-B., *Phytochemistry* **2003**, 64, 1309–1317.
[36] Yang S. W., Zhou, B. N., Malone, S., Werkhoven, M. C. M., Troon, F. V., Wisse, J. H., Kingston, D. G. I., *J. Nat. Prod*. **1999**, 62, 1173–1174.
[37] Boalino D. M., McLean, S., Reynolds, W. F., Tinto, W. F., *J. Nat. Prod*. **2004**, 67, 714–717.
[38] Christensen S. B., *Planta Med*. **2002**, 68, 642–644.
[39] Singh M., Pal, M., Sharma, R. P., *Planta Med*. **1999**, 65, 2–8.
[40] Sob S. V. T., Tane, P., Ngadjui, B. T., Connolly, J. D., Mad, D.,*Tetrahedron* **2007**, 63, 8993–8998.
[41] Cheikh-Ali Z., Okpekon T., Roblot F., Bories C., Cardao M., Jullian J-C., Poupon E., Champy P., *Phytochem. Lett*. **2011**, 4, 240–244.
[42] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., *Food. Chem Toxicol*. **2008**, 46, 446–475.

[43] Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A.J., *J. Ethnopharmacol*. **2002**, 79, 213–220.
[44] Konning G. H., Agyare C., Ennison B., *Fitoterapia* **2004**, 75, 65–67.
[45] Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V., *Clin. Microbiol. Rev*. **2006**, 19, 50–62.
[46] Santos P.O., Costa M. J. C., Alves J. A. B., Nascimento P. F. C., de Melo D. L. F. M., Barbosa A. M. Jr, Trindade R. C., *Quim. Nova* **2008**, 31, 1648–1652.
[47] Burt S., Int. *J. Food Microbiol*. **2004**, 94, 223–253.
[48] Dorman H. J. D., Deans S. G., *J. Applied Microbiol*. **2000**, 88, 308–316.
[49] Bougatsos C., Ngassapa O., Runyoro D. K. B., Chinou I. B., *Z. Naturforsch*. **2004**, 59c, 368–372.
[50] Kerharo J., La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, Ed. Vigot Frères., Paris. **1974**, p. 786–787.
[51] Tane P., Simplice D., Tatsimo S. D., Godfred A., Ayimele G. A., Connolly J. D., Bioactive metabolites from *Aframomum* species. 11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings, Antananarivo, Madagascar. **2005**, p. 214–223.
[52] Focho D. A., Nkeng E. A. P., Lucha C. F., Ndam W. T., Afegenui A., *J. Med. Plants Res*. **2009**, 3, 301–314.
[53] Mikus J., Harkenthal M., Steverding D., Reichling J., *Planta Med*. **2000**, 66, 366–368.
[54] Desrivot J., Waikedre J., Cabalion P., Herrenknecht C., Bories C., Hocquemiller R., Fournet A., *J. Ethnopharmacol*. **2007**, 112, 7–12.
[55] Viollon C., Mandin D., Chaumont J. P., *Fitoterapia* **1996**, 67, 279–281.
[56] Vermani K., Garg S., *J. Ethnopharmacol*. **2002**, 80, 49–66.
[57] Sharififar F., Moshafi M. H., Mansouri S. H., Khodashenas M., Khoshnoodi M., *Food. Control* **2007**, 18, 800–805.
[58] Ruberto G., Baratta M. J., *Food Chem*. **2000**, 69, 167–174.
[59] Dapkevicius A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., & Linssen, P. H., *J. Agric. Food Chem*. **1998**, 77, 140–146.
[60] Cheikh-Ali Z., Adiko M., Bouttier S., Bories C., Okpekon T., Poupon E., Champy P., *Chem. Biodiv.* **2011**, 8, 658–67.
[61] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., *Food Chem. Toxicol*. **2008**, 46, 446–475.

Chapitre 2

Introduction sur le *curcuma* et de la curcumine

I. Introduction au genre *Curcuma*

II. Introduction à la curcumine

A- Biosynthèse des curcuminoïdes
B- Extraction des curcuminoïdes
C- Propriétés physicochimiques de la curcumine
1) Solubilité de la curcumine
2) Données RMN de la curcumine
3) Spectre d'absorption de la curcumine
4) Stabilité de la curcumine

D- Propriétés pharmacocinétiques de la curcumine
1) Par voie orale
a. Absorption
b. Distribution
c. Métabolisation
d. Elimination
2) Par voie intraveineuse ou intrapéritonéale

E- Activités biologiques de la curcumine

F- Formulations améliorant la biodisponibilité de la curcumine biodisponible
1) Co-administration avec un adjuvant : la pipérine
2) Complexes liposomaux, micellaires et phospholipidiques
3) Nanoparticules
4) SMEDDS (*Self Micro Emulsifying Drug Delivery System*)
5) Analogues structuraux de la curcumine
a). Activité cytotoxique
b). Activité antiparasitaire
c). Activité anti-Alzheimer

III. Conclusion

I. Introduction au genre *Curcuma*

Le genre *Curcuma* L. comprend d'une quarantaine d'espèces à 110 selon les sources, originellement répandues dans les régions d'Asie tropicale et d'Australie septentrionale, aux précipitations très saisonnières. On observe la plus grande diversité dans le genre en Inde, en Birmanie et en Thaïlande, beaucoup moins en Chine, en Australie et dans le Pacifique Sud.[1] Sa distribution est exclusivement intertropicale.

Ces plantes herbacées rhizomateuses sont robustes et touffues. La plupart sont d'une hauteur comprise entre 50 cm et 1,50 m. Le rhizome peut être simplement ovoïde ou garni de ramifications plus ou moins longues et nombreuses. Les feuilles peuvent être sessiles ou pétiolées et sont de forme lancéolée, oblongue ou ovale, de couleur vert vif à vert profond sur le dessus, généralement plus pâle sur le dessous.

Ces feuilles dépérissent généralement pendant la saison sèche tropicale et laissent apparaitre les tiges florales au sommet desquelles les fleurs sont arrangées en un court épi, formé par les bractées fusionnées entre elles sur les côtés. Les bractées du bas de l'inflorescence sont fertiles, peu colorées, souvent vertes, et plus largement soudées entre elles, formant de petites poches abritant les fleurs.
Les bractées supérieures sont plus grandes et longues, et plus vivement colorées. Les fleurs sont petites, aux couleurs souvent éclatantes, ou jaune pâle. La plupart des espèces fleurissent au début de la saison pluvieuse, d'autres quelques semaines plus tard, et quelques unes a l'automne, dont *C. longa*.[1,2]

Les curcumas sont surtout connus pour les épices obtenues à partir du rhizome de quelques espèces du genre,[1] en particulier de celui de *Curcuma longa* L., les autres espèces produisent des épices plus amères.
Le curcuma est déjà décrit par Dioscoride dans son ouvrage *De Materia Medica* comme « une plante indienne proche du gingembre, au goût amer et qui donne une belle couleur jaune ».[*] Il écrit : « un autre genre de Cyperus originaire de l'Inde ressemble au gingembre : il possède, lorsqu'on le mâche, les propriétés du safran ».[3] Le rhizome était a priori très rare en occident à l'époque.
Il semble avoir été introduit en Europe au XIII^{e} siècle par des marchands arabes.[4] Le nom de genre « *Curcuma* ». Provient de la latinisation de l'arabe « al-kurkum » signifiant « jaune » et se référant à l'origine au safran. Ce terme est utilisé pour décrire le Curcuma.[1]
Curcuma longa L. est l'espèce la plus utilisée de nos jours, et donc la plus étudiée.

Le plus populaire des curcumas : *Curcuma longa* L.

Ce *Curcuma* fait partie des ingrédients de la poudre de curry, à laquelle il confère sa couleur caractéristique. Il était déjà très estimé des anciens Indo-Européens pour la teinture jaune dorée que l'on peut en tirer, mais il a acquis une importance particulière pour l'homme lorsqu'on a découvert que le rhizome réduit en poudre permettait de conserver la fraîcheur, la sapidité et la

[1] Ravindran P. N., Nirmal Babu K., Sivaraman K., Medicinal and Aromatic Plants–Industrial Profiles: Turmeric: The Genus Curcuma. *CRC Press,* Washintogton, **2007**, 484 p.
[2] Loap S., *Phytothérapie* **2008**, 6, 22–28.
[3] Vaquier A. R. L., **2010**, thèse de doctorat de l'Université Paris-Est Créteil.
[4] Aggarwal B. B., Sundaram C., Malani N., Ichikawa H., *Adv. Exp. Med. Biol*. **2007**, 595, 1–75.
***** Dioscoride, au 1er siècle après J.-C., dans son oeuvre *De Materia Medica* véritable précurseur des pharmacopées modernes, a décrit l'utilisation médicale de 1600 produits dont les 3/5^{è} sont des végétaux.

valeur nutritive des aliments auxquels il était ajouté, ceci bien avant l'époque des conservateurs synthétiques. Malgré son utilisation ancestrale en Inde et en Chine, on ne s'est intéressé aux effets thérapeutiques du curcuma que depuis quelques décennies, avec la vogue des aliments aux propriétés hypocholestérolémiantes et antioxydantes.
Vraisemblablement originaire d'Inde, *Curcuma longa* est aussi présent au Cambodge, en Chine, en Indonésie, au Laos, à Madagascar, en Malaisie, aux Philippines, au Vietnam et dans la plupart des régions tropicales, en Amérique Latine, dans les iles de l'océan Pacifique, et même en Afrique. Il est cultivé de façon extensive en Inde, puis au Bangladesh, en Chine, en Thaïlande, au Cambodge, en Malaisie, en Indonésie et aux Philippines. L'Inde est cependant à l'origine de 80 % de la production mondiale, et est le principal producteur, exportateur, mais aussi consommateur.
Les principaux pays importateurs sont le Japon, l'Iran, les Émirats Arabes Unis, le Bangladesh, Singapour, les Pays-Bas et le Sri Lanka.[5, 6]

Description botanique de la plante fraîche

Curcuma longa L. est une plante herbacée touffue, haute de moins d'un mètre (**Figure 2-1**).[7]

Rhizome

Le rhizome est écailleux, charnu, comportant un tubercule primaire ellipsoïde d'environ 5 cm × 2,5 cm, présentant à maturité de nombreux rhizomes latéraux digités d'un diamètre voisin du centimètre. La surface externe est gris-jaune, et porte la cicatrice des racines. La cassure est franche et finement granuleuse, non fibreuse, variant du jaune à l'orange sombre.

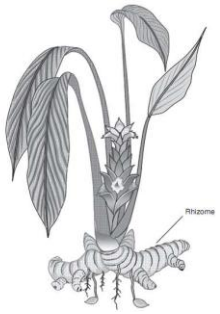


Figure 2-1. Aspect général de *C. longa* (Rivera-Espinoza Y. *et al*., **2009**).

Feuille

Les feuilles sont larges et naissent à partir du rhizome. Elles sont alternes et distiques, présentent un pétiole engainant, portant un limbe penninervé, oblong-lancéolé, long d'une cinquantaine de centimètres, glabre sur les deux faces.

Fleur

L'inflorescence est issue du rhizome et sort du sol à côté des hampes foliaires. Les fleurs sont regroupées en inflorescences coniques sous forme d'épis protégés par de grandes bractées, dressées au sommet de hampes florales, entre les feuilles. Les fleurs sont situées, par paires (une seule s'ouvrant a la fois) à l'aisselle de bractées poilues. Elles sont verdâtres ou blanches à sommet rose. Longues de 5 à 6 cm, tubulaires, zygomorphes, bisexuées, les fleurs sont composées de 3 sépales pétaloïdes, d'un pétale postérieur développé et de staminodes formant un labelle pétaloïde. L'androcée est réduit à une étamine fertile et aux staminodes. Le gynécée est tri-carpellé.
Le fruit du *curcuma* est une capsule globuleuse, mais il n'est pas produit chez l'espèce *Curcuma longa*, plante stérile disséminée par division de son rhizome.

[5] Le *Curcuma* ou le safran des Indes, *Plantes et Nature* n°15, **2005**, 16–17.
[6] Bruneton J., Pharmacognosie – Phytochimie, plantes médicinales, *4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc–Éditions médicales internationales*, Paris, 2009, 1288 p.
[7] Rivera-Espinoza Y., Muriel P., *Liver Int*. **2009**, 29, 1457–1466.

Phytochimie de *C. longa*

Le curcuma, encore appelé "safran des Indes", est décrit et utilisé depuis au moins 4000 ans dans le système médical populaire traditionnel indien où elle se nomme *Haridra* ou *Haldi* en ancien Sanskrit. Elle était, et est toujours, une des pièces centrales de la médecine ayurvédique, considérée comme symbole de prospérité et de bonne santé. La médecine ayurvédique utilise abondamment cette plante dans les cas d'arthrite et autres inflammations, de même que pour les problèmes de vision. Elle a aussi une longue tradition dans la médecine chinoise.
Le rhizome, séché puis réduit en poudre, était utilisé pour le traitement des voies respiratoires (asthme, allergie, hyperactivité bronchique, problèmes pulmonaires), pour des troubles hépatiques et de vésicule biliaire (jaunisse), pour ses propriétés carminatives, les douleurs abdominales, l'anorexie. Au cours des vingt dernières années l'efficacité du curcuma dans le traitement des troubles digestifs et hépatiques a été confirmée par les études scientifiques.

Les rhizomes de *C. longa* et plusieurs autres espèces du genre sont liés à la présence des huiles essentielles terpéniques abondantes, ainsi que de celle de molécules quasi-exclusivement spécifique des Zingiberaceae : les diarylheptanoïdes dont le chef de file est la curcumine **58**.
Les curcuminoïdes, qui sont les principes colorants de la drogue, sont aussi les composés les plus intéressants au niveau médicinal. Leur teneur varie beaucoup selon le cultivar (0,3 à 5,4 % en général) et peut atteindre 8 %.
Les autres curcuminoïdes pondéralement importants sont la déméthoxycurcumine **59** et la *bis*-déméthoxycurcumine **60**. La cyclocurcumine **61** a récemment été identifiée, uniquement chez *C. longa* (**Figure 2-2**).[6,8]

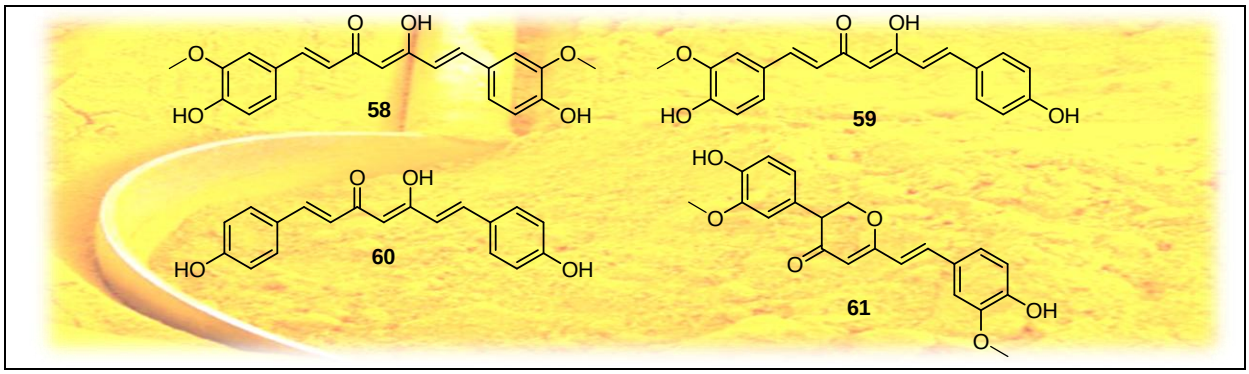


Figure 2-2. Structure de la curcumine et de ses principaux dérivés.

Autre sources de curcumine

Les curcuminoïdes ont également été isolés à partir d'autres espèces du genre *Curcuma* : *C. phaeocaulis* Val., *C. aromatica* Salisb., *C. mangga* Val. et *C. xanthorrhiza* Roxb. Elles contiennent une quantité assez importante de curcumine a priori alors qu'aucun des curcuminoïdes n'est retrouvé chez *C. wenyujin* Y. H. Chen., *C. kwangsiensis* S.G.Lee. et *C. zedoaria* Roxb. (**Figure 2-3**) (**Table 2-1**).[9] Selon d'autres sources, *C. zedoaria* Roxb. contiendrait une faible quantité de ces molécules.[4] Les curcuminoïdes ont aussi été isolés de plusieurs genres de Zingiberaceae n'appartenant pas au genre *Curcuma* : *Aframomum*, *Alpinia.*
C. longa et *C. xantorrhiza* sont des espèces médicinales en France et en Europe. Le rhizome des deux espèces est inscrit sur la liste des plantes médicinales de la Pharmacopée française, et des

[8] Goel A., Kunnumakkara A. B., Aggarwal B. B., *Biochem. Pharmacol*. **2008**, 75, 787–809.
[9] Tohda C., Nakayama N., Hatanaka F., Komatsu K., *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. **2006**, 3, 255–260.

monographies de contrôle existent également pour les deux espèces à la Pharmacopée européenne.

teneur dans l'extrait méthanolique (%, m/m)			
	curcumine **58**	déméthoxycurcumine **59**	bisdéméthoxycurcumine **60**
C. longa	12,3	3,62	4,86
C. wenyujin	ND	ND	ND
C. phaeocaulis	0,89	t	ND
C. kwangsiensis	ND	ND	ND
C. zedoaria	ND	ND	ND
C. aromatica	0,11	ND	ND

ND : non détecté, t : traces.

Table 2-1. Contenu en curcuminoïdes des extraits méthanoliques de six espèces de *Curcuma*.

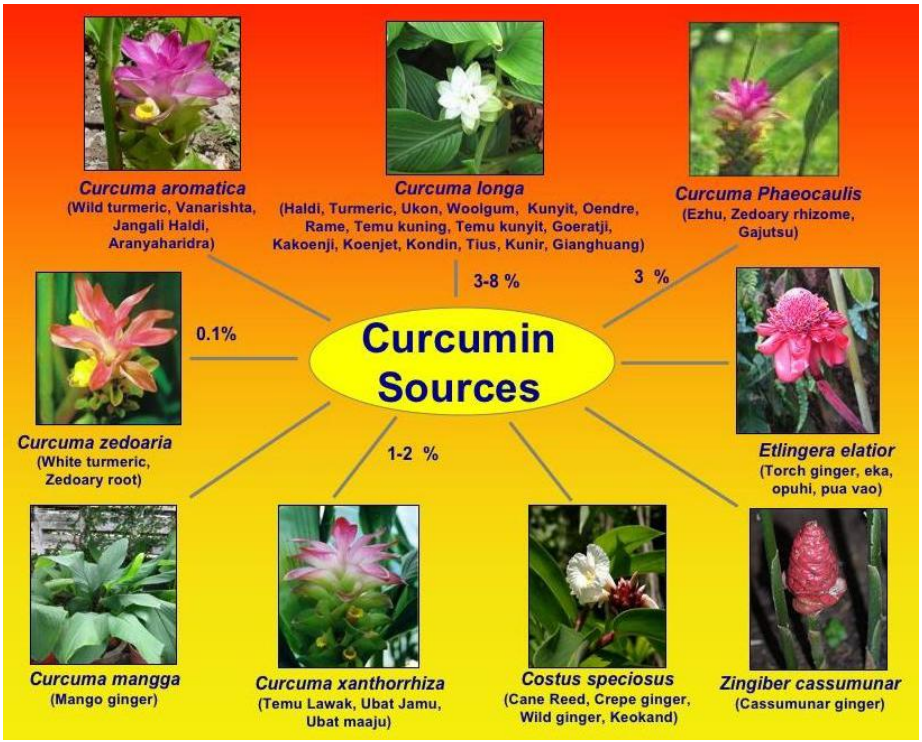


Figure 2-3. Sources de curcuminoïdes (Aggarwal *et al*., **2007**).[4]

II. La curcumine : généralités

A. Biosynthèse des curcuminoïdes

La biosynthèse de la curcumine est toujours à un stade spéculatif. Roughley et Whiting[10] ont proposé deux voies pour la formation du squelette curcuminoïde.

L'une des voies (**voie a**) implique une chaîne polyacétique de 10 atomes de carbone greffée sur une unité phénylpropénique ; la cyclisation de la partie polyacétique donnerait le second cycle aromatique. La substitution du second noyau oxygéné chez la curcumine et un grand nombre de ses analogues remet en cause cette hypothèse. L'autre (**voie b**) correspond à la condensation de deux unités phénylpropéniques et d'un carbone central fourni par une molécule d'acide malo-

[10] Roughley P. J., Whiting D. A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans*. *1* **1973**, 20, 2379–2388.

nique, probablement sous forme de thioester du coenzyme A (**Figure 2-4**). La validité de ces hypothèses n'a pas pu être déterminée expérimentalement.
De plus, l'ordre d'introduction des groupes fonctionnels sur les cycles aromatiques, avant ou après la formation du squelette curcuminoïde, n'est pas connu.
Schröder,[11] Kamo *et al.,*[12] et Brand *et al.,*[13] retiennent l'hypothèse de la **voie b** (**Figure 2-4**).
Celle-ci est fondée sur l'élucidation partielle de la biosynthèse de métabolites structurellement similaires, des dérivés d'extension du phénylpropane tels que le [6]-gingérol abondant chez les Zingiberaceae du genre *Zingiber* [14] ou encore des phénylphénalénones dans le genre *Anigozanthos*.[15]

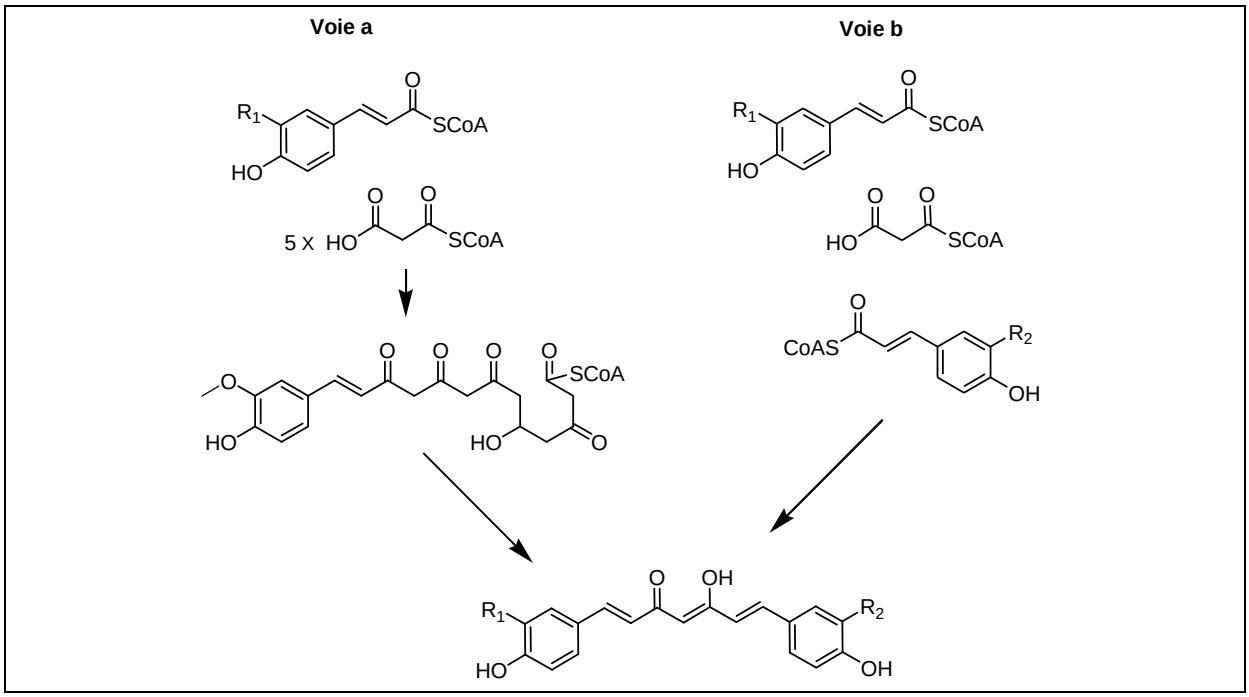


Figure 2-4. Voies de biosynthèse proposées des curcuminoïdes (Roughley *et al.,* **1973**)

Récemment, une étude de biosynthèse des curcuminoïdes par marquage au ^{14}C du malonyl-CoA et spectroscopie RMN a été effectuée par Katsuyama *et al*.,[16] qui ont proposé une voie de biosynthèse (**Figure 2-5**), impliquant 2 unités d'acide cinnamique et un atome de carbone central issu de l'acide malonique. C'est à partir du squelette complet C_6- C_7- C_6 que sont introduits les fonctionnalisations, (oxygénation et *O*-méthylation des noyaux aryles, oxygénation et déshydratation de la chaîne aliphatique).
Cependant, des précurseurs monophénoliques, catéchol ou méthoxylés peuvent faire éventuellement l'objet d'une élongation. Ces données confirment la **voie b**, proposé par Roughley et Whiting,[10] sauf pour l'ordre d'introduction des groupes fonctionnels.

[11] Schröder J., *Trends Plant. Sci*. **1997**, 2, 373–378.
[12] Kamo T., Hirai N., Tsuda M., Fujioka D., Ohigashi H., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2000**, 64, 2089–2098.
[13] Brand S., HÖlscher D., Schierhorn A., Svatos A., SchrÖder J., Schneider B., *Planta*. **2006**, 224, 413–428.
[14] Denniff P., Macleod I., Whiting D. A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1980**, 1, 2637–2644.
[15] Schmitt B., HÖlscher D., Schneider B., *Phytochemistry* **2000**, 53, 331–337.
[16] Katsuyama Y., Matsuzawa M., Funa N., Horinouchi S., *J. Biol.Chem*. **2007**, 282, 37702–37709.

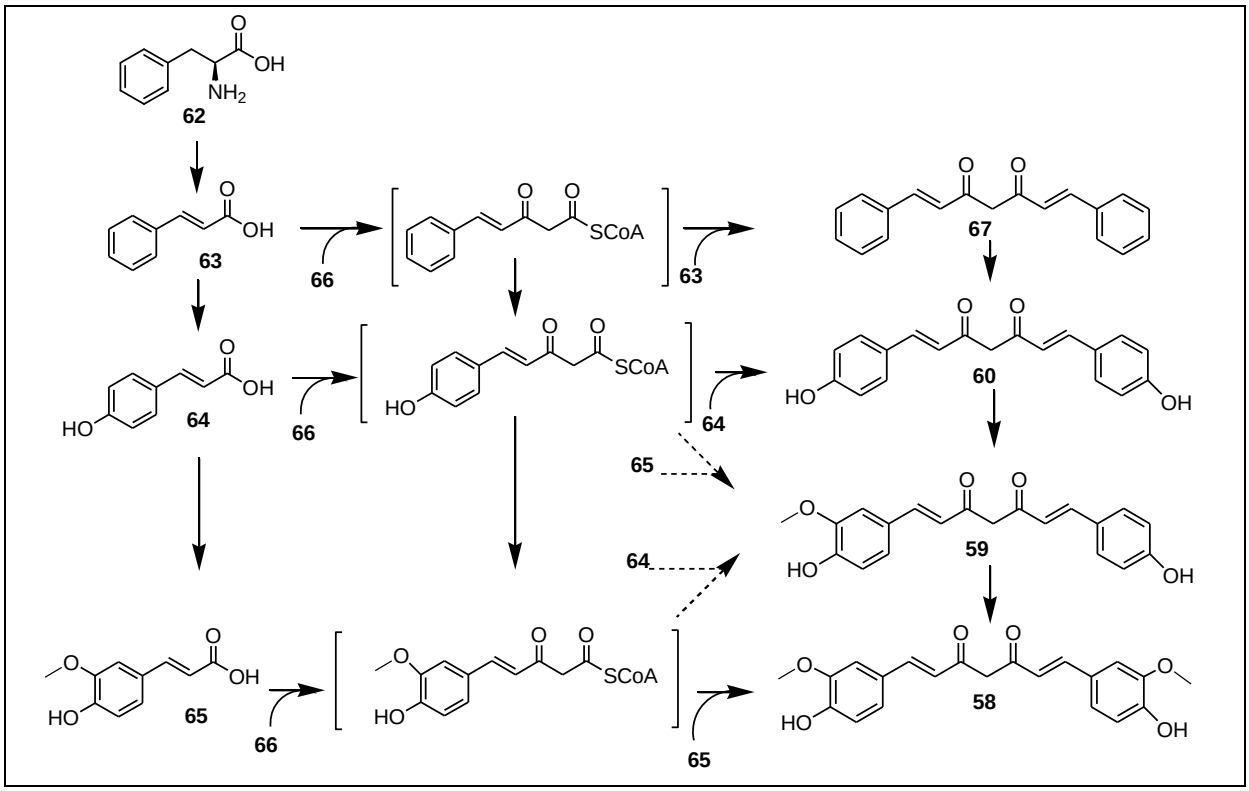


Figure 2-5. Les voies de biosynthèse de curcuminoïdes dans le curcuma, les voies principales (flèches épaisses) et mineures (flèches minces et en pointillés).
L-phénylalanine **(62)**, acide cinnamique **(63)**, acide *p*-coumarique **(64)**, acide férulique **(65)**, acide malonique **(66)**, intermédiaire hypothétique : *bis*-deshydroxy-*bis*-déméthoxycurcumine **(67)**, *bis*-déméthoxycurcumine **(60)**, déméthoxycurcumine **(59)**, curcumine **(58)**.

B. Extraction des curcuminoïdes

Les curcuminoïdes sont classiquement extraits par des solvants organiques à partir de la poudre de rhizome. Les spécifications du JECFA (J*oint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) listent l'acétone, le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol comme solvants utilisables.[17] La directive européenne 95/45/EC admet l'acétone, le dioxyde de carbone, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, le *n*-butanol, le méthanol, l'éthanol et l'hexane.

La curcumine est obtenue par cristallisation à partir de l'extrait. Certains laboratoires commercialisent des extraits concentrés de *curcuma* titrés en curcumine et choisissent de procéder par évaporation d'une solution hydro-alcoolique de titre faible.[3]

C. Propriétés physico-chimiques de la curcumine

La curcumine a été isolée pour la première fois en **1815** par Vogel et Pelletier, obtenue pure sous forme cristalline en **1870** par Daube, et finalement identifiée en tant que (*E*,*E*)-1,7-*bis* (4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione par Roughley et Whiting.[10] Elle a été synthétisée en **1918** par Milobedzka et Lampe.[18]

[17] FAO "Food and Agriculture Organization" **2001**, *Food and Nutrition Paper* 52 Add. 9.
[18] Strimpakos A. S., Sharma R. A., *Antioxid. Redox. Signal*. **2008**, 10, 511–545.

1) Solubilité de la curcumine

La curcumine est une poudre jaune-orange presque insoluble dans l'eau (0,6 μg/mL)[19] et l'éther, mais soluble dans l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acide acétique glacial (index Merck). La curcumine est jaune-orange pour un pH compris entre 2,5 et 7, et rouge à pH supérieur à 7.[8]
En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre une forme énolique et une forme dicétonique (**Figure 2-6**). Cette propriété de la curcumine peut être d'une importance cruciale dans la détermination de la sélectivité de sa liaison aux protéines, y compris à la protéine amyloïde β (1-42) dans les modèles de la maladie d'Alzheimer (voir chapitre 3).[20]

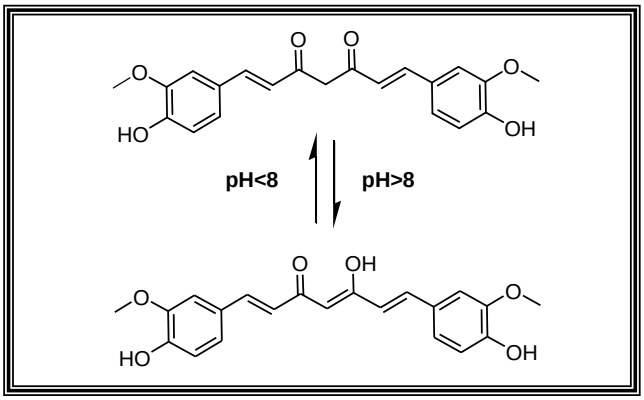


Figure 2-6. Tautomérie céto-énolique de la curcumine ; formes dicétone (en haut) et énol (en bas).

L'attribution des pKa est assez controversée. En fonction du solvant, la première déprotonation peut se localiser soit sur l'énol [21] soit sur une des fonctions phénol. [22]

solvant	phénol 1	phénol 2	énol	références
dioxane/eau 75 % (v/v)	10,82	11,60	13,44	Dietze *et al*., **1997**
éthanol/eau 50 % (v/v)	8,89	9,76	12,28	Dietze *et al*., **1997**
méthanol/eau 50 % (v/v)	9,30	10,69	8,54	Borsari *et al*., **2002**
tampon aqueux	8,55	9,05	7,80	Tonnesen *et al*., **1985**

Tableau 2-2 : Valeurs des pKa de la curcumine données dans la littérature.

2) Données RMN de la curcumine

L'analyse par spectroscopie RMN de la curcumine emploie généralement le DMSO-$_{d6}$ mais est aussi décrite dans d'autres systèmes de solvants, y compris un mélange D_2O/DMSO-$_{d6}$ (3:7), CD_3OD, CD_3COOD, et $CDCl_3$.
Dans toutes ces solutions, les spectres de la curcumine et de la déméthoxycurcumine indiquent la présence d'une conversion céto-énolique rapide. De petits changements dans les déplacements chimiques ^{13}C ont été observés lors du passage de solvants les plus polaires au

[19] Kurien B. T., Singh A., Matsumoto H., Scofield R. H., *Assay Drug. Dev. Technol*. **2007**, 5, 567–576.
[20] Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P., Kayed R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M., *J. Biol. Chem*. **2005**, 280, 5892–5901.
[21] Borsari, M., Ferrari, E., Grandi, R., Saladini, M., *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 328, 61–68.
[22] Dietze F., Arrieta A. F., Zimmer U., *Pharmazie* **1997**, 52, 302–306.

$CDCl_3$; cependant, ces changements ont eu lieu principalement dans les cycles aromatiques par rapport à la forme céto-énolique.[23]

3) Spectre d'absorption de la curcumine

Le maximum d'absorption de la curcumine au spectrophotomètre a lieu à 430 nm dans le méthanol et entre 415 et 420 nm dans l'acétone. Les spectres consistent en des bandes larges, spécifiques, comme dans l'acétonitrile et l'éthanol. Une solution de curcumine à 1 % a une absorbance de 1650 unités d'absorbance.[8]
Le spectre de fluorescence de la curcumine dans le toluène (λ_{max} = 460, 488 nm) disparait dans les solvants plus polaires et prend la forme d'une large bande dans l'acétonitrile (λ_{max} = 524 nm) et l'éthanol (λ_{max} = 549 nm) (**Figure 2-7**).[24]

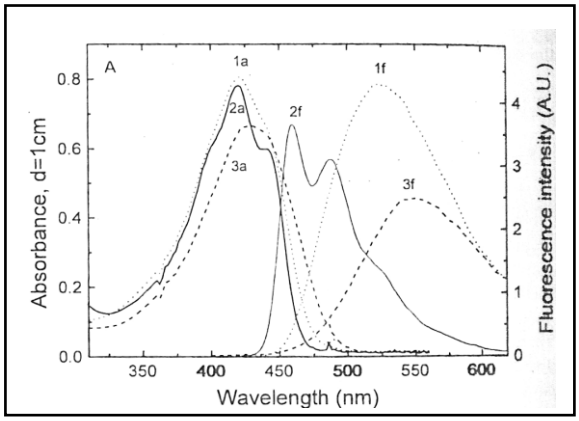


Figure 2-7. Spectres d'absorption et de fluorescence de la curcumine.

Spectres d'absorption dans l'acétonitrile, le toluène et l'éthanol : courbes **1a**, **2a** et **3a** respectivement. de la curcumine™, trajet optique : 1 cm.
Spectres de fluorescence corrigés et normalisés dans l'acétonitrile, le toluène et l'éthanol : courbes **1f**, **2f** et **3f** respectivement ; $\lambda_{excitation}$ = 375 nm.

4) Stabilité de la curcumine

La curcumine est stable à pH acide (estomac), mais pas à pH neutre ou alcalin. Dans des conditions physiologiques *in vitro* (tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,2), elle est dégradée à plus de 90 % en 30 minutes en féruloylméthane **68**, en acide férulique **65** et en vanilline **69** par des mécanismes qui ont été étudiés par Arrieta *et al*., (**1988**),[25] Tonnesen *et al*. (**1985**) [26] et Balasubramanian (**1991**),[27] et qui sont résumés dans la **Figure 2-8**.
À pH 10,8, la demi-vie de la curcumine est d'environ une minute.[1] La tétrahydrocurcumine, un des principaux métabolites de la curcumine, est à l'inverse de cette dernière, assez stable en milieu neutre ou alcalin et garde ses propriétés antioxydantes.[28]

[23] Payton F., Sandusky P., Alworth W. L., *J. Nat. Prod*. **2007**, 70, 143–146.
[24] Chignell C. F., Bilski P., Reszka K. J., Motten A. G., Sik R. H., Dahl T. A., *Photochem. Photobiol*. **1994**, 59, 295–302.
[25] Arrieta A., Dietze F., Mann G., Beyer L., Hartung J., *J. Prakt. Chem*. **1988**, 330, 111–118.
[26] Tonnesen H. H., Karlsen J., *Z. Lebensm. Unters. Forsch*. **1985**, 180, 402–404.
[27] Balasubramanian K., *Indian. J. Chem*. **1991**, 30 A, 61–65.
[28] Wang Y. J., Pan M. H., Cheng A. L., Lin LI., Ho Y. S., Hsieh C. Y., Lin J. K., *J. Pharm. Biomed. Anal*. **1997,** 15, 1867–1876.

Lorsque la curcumine est exposée à la lumière UV-visible, elle se décompose tant en solution qu'à l'état solide. La coloration des vêtements teints traditionnellement avec du curcuma s'atténue d'ailleurs au soleil.[1]

La photodégradation a été étudiée par Tonnesen *et al.*,[26] qui ont proposé que les mécanismes de formation des produits de dégradation impliquent une réaction entre des radicaux réactifs de l'oxygène et la curcumine.

Récemment, Sundaryono *et al*., **2003** [29] ont étudié la photochimie d'un curcuminoïde (*bis*-deshydroxy-*bis*-déméthoxycurcumine **67**), montrant que les voies de photodégradation n'impliquent pas les groupements phénoliques de la curcumine. Cette hypothèse a été confirmée par l'observation du comportement de photodégradation et la comparaison des rendements de disparition de la curcumine **58** et d'un curcuminoïde non-phénolique **67**. Sundaryono *et al.,* ont isolé puis analysé les photoproduits comme le montre la **Figure 2-9**.

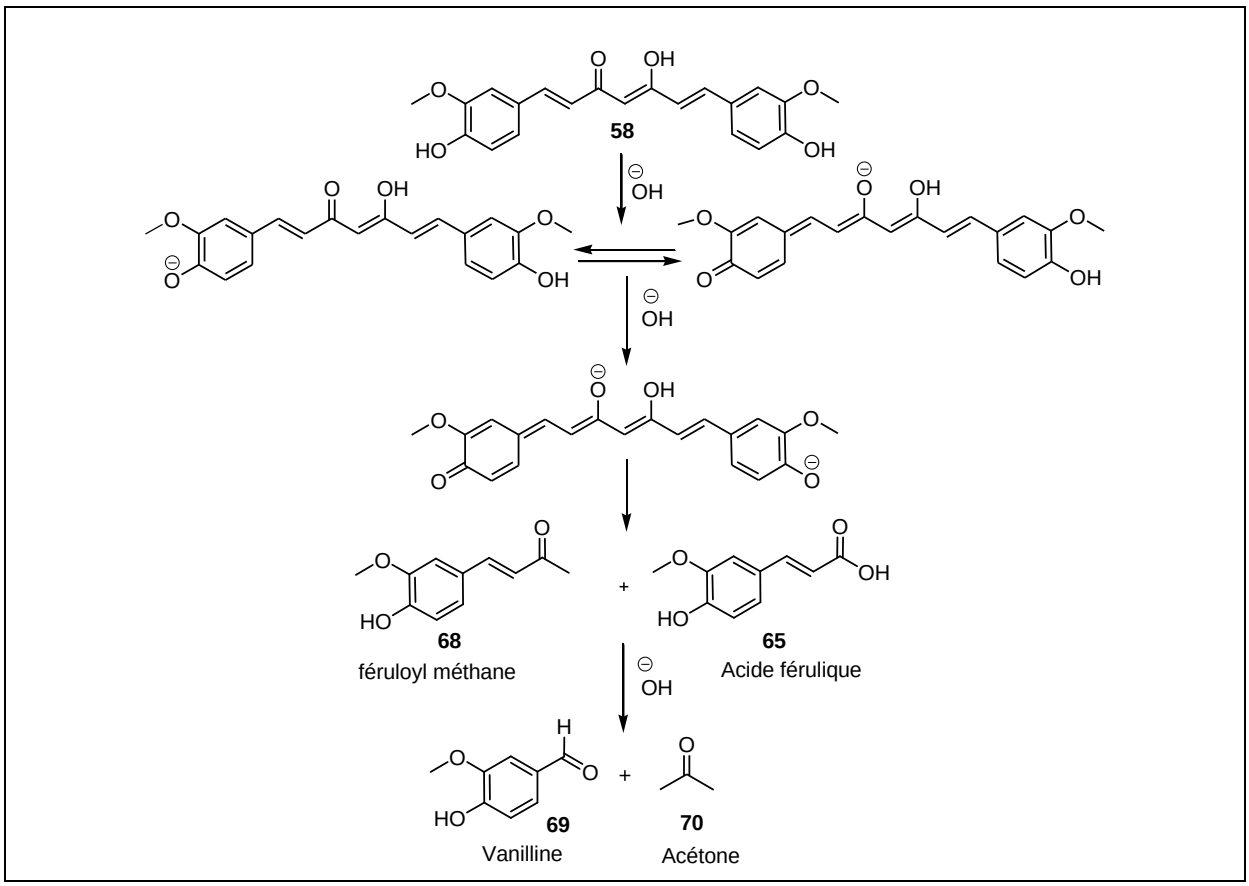


Figure 2-8. Dégradation de la curcumine en milieu alcalin (Tonnesen et *al.*, **1985**).

[29] Sundaryono A., Nourmamode A., Gardrat C., Grelier S., Bravic G., Chasseau D., Castellan A., *Photochem. Photobiol. Sci*. **2003**, 2, 914–920.

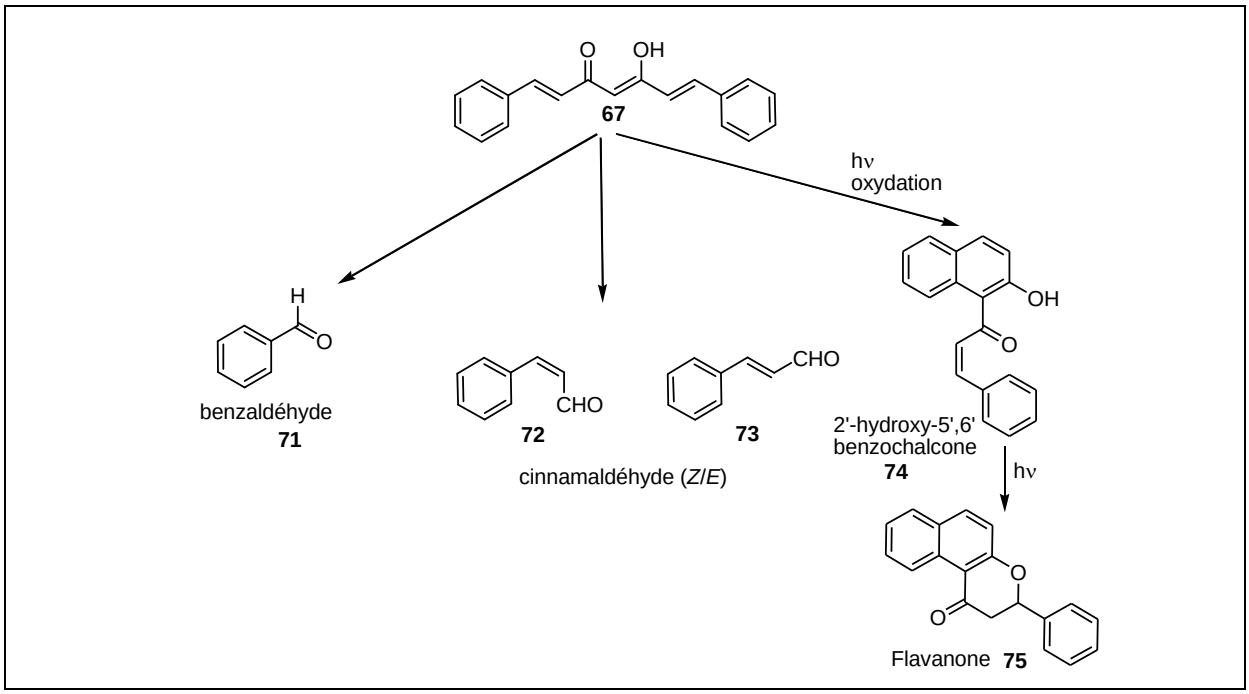


Figure 2-9. Dégradation photochimique de la 1,7-diphényl-1,6-heptadiène-3,5-dione (Sundaryono *et al*., **2003**).

D. Propriétés pharmacocinétiques de la curcumine

La curcumine, présente des effets pharmacologiques très variés, notamment anti-inflammatoire, antioxydant et antiprolifératif etc. Des essais cliniques de phase I montrent que la biodisponibilité de la curcumine est mauvaise. Même à des fortes doses (12 g / jour), la concentration plasmatique n'est que limitée chez les patients. Les principales raisons qui contribuent à la faible concentration plasmatique et au bas niveau de curcumine dans les tissus après administration par voie orale semblent être une mauvaise absorption, une métabolisation rapide, et une élimination rapide.[30]

Les paragraphes suivants résument les quatre processus pharmacocinétiques pour différentes voies d'administration.

1. <u>Par voie orale</u>

a) Absorption

Les études réalisées sur la curcumine ont montré que son administration orale aboutit à des concentrations sériques extrêmement réduites.

En effet, la biodisponibilité de la curcumine par voie orale est faible : elle est peu absorbée par le tractus digestif et une grande partie de la dose administrée (environ 40 à 75 %) est excrétée dans les fécès, 35 % environ sous forme inchangée, 65 % sous forme de métabolites, majoritairement inactifs.

De façon à comparer les concentrations sériques maximales obtenues, la curcumine a été administrée par voie orale à la dose de 2 g/kg chez le rat et de 2 g chez l'homme. Chez le rat, le pic est de 1,35±0,23 µg/mL et est atteint rapidement (50 min). Chez l'homme, la concentration sérique reste quasiment indétectable ou extrêmement faible (0,006±0,005 µg/mL à 1 h).[31] Les

[30] Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B., *Mol. Pharm.* **2007**, 4, 807–818.
[31] Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P. S., *Planta Med*. **1998**, 64, 353–6.

niveaux sériques obtenus chez l'homme et le rat ne sont pas directement comparables, mais dans les deux cas, l'administration de curcumine par voie orale ne permet pas d'obtenir des concentrations circulantes suffisantes pour une activité systémique.

b) Distribution

Les doses orales de curcumine requises pour obtenir des concentrations suffisantes à l'activité pharmacologique en dehors du tractus gastro-intestinal ne semblent pas atteignables chez l'homme avec l'administration de gélules de poudre. Pourtant, chez l'animal, des effets en dehors du tube digestif ont été mis en évidence à des doses de curcumine inferieures à celles permettant de la détecter dans les organes. On ignore encore si ces effets peuvent être dus à d'autres composés que la curcumine, à des métabolites actifs inconnus, à des composés de dégradation, à des facteurs de l'environnement local potentialisant l'effet de la curcumine.[32]

c) Métabolisation

La curcumine subit une transformation durant son absorption *via* l'intestin et probablement un cycle entéro-hépatique. Elle connait une réduction puis une conjugaison, la réduction métabolique se produisant en quelques minutes en suspension en présence d'hépatocytes humains isolés. Récemment une étude de la métabolisation *in vitro* de la curcumine par des microsomes humains et de rats, a montré que la curcumine subit une *O*-déméthylation, une réduction et une glucuronidation.[33] La métabolisation par premier passage hépatique et l'excrétion dans la bile sont très rapides.
Lors d'une étude sur sa métabolisation, la curcumine a été administrée oralement à des rats à la dose de 500 mg/kg. Dans de telles conditions, de petites quantités de curcumine, d'hexahydrocurcumine **77**, d'hexahydrocurcuminol **78**, et de glucurono-hexahydrocurcumine, ainsi que des quantités plus importantes de glucurono-curcumine **80** et de sulfo-curcumine **81** sont retrouvées dans le plasma (**Figure 2-10**) et (**Figure 2-11**).

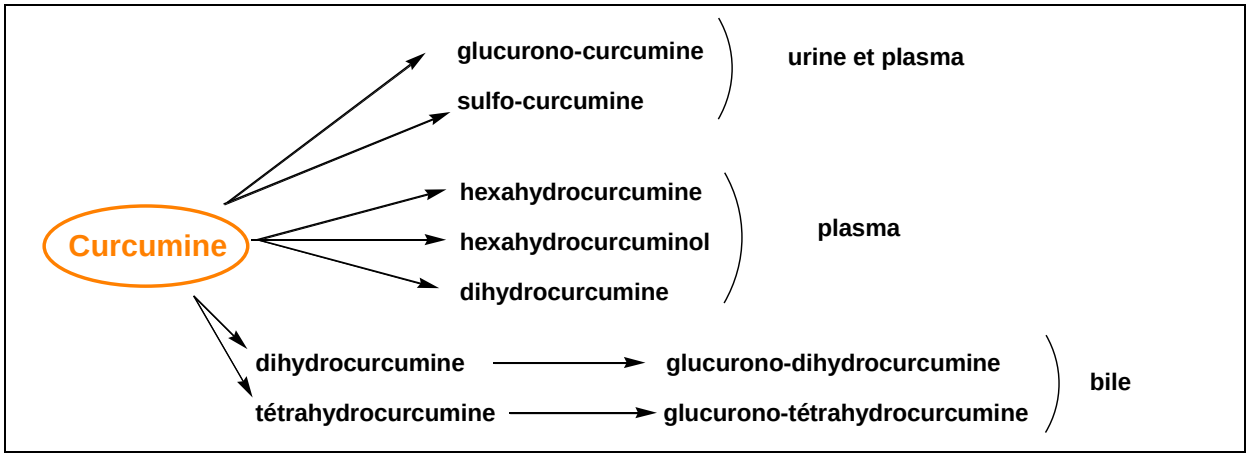


Figure 2-10. Métabolites de la curcumine, et compartiments de répartition.

[32] Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti F. M., Torti S. V., *Cell. Mol. Life. Sci*. **2008**, 65,1631–52.
[33] Tamvakopoulos C., Sofianos Z. D., Garbis S. D., Pantazis P., *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2007**, 32, 51–57.

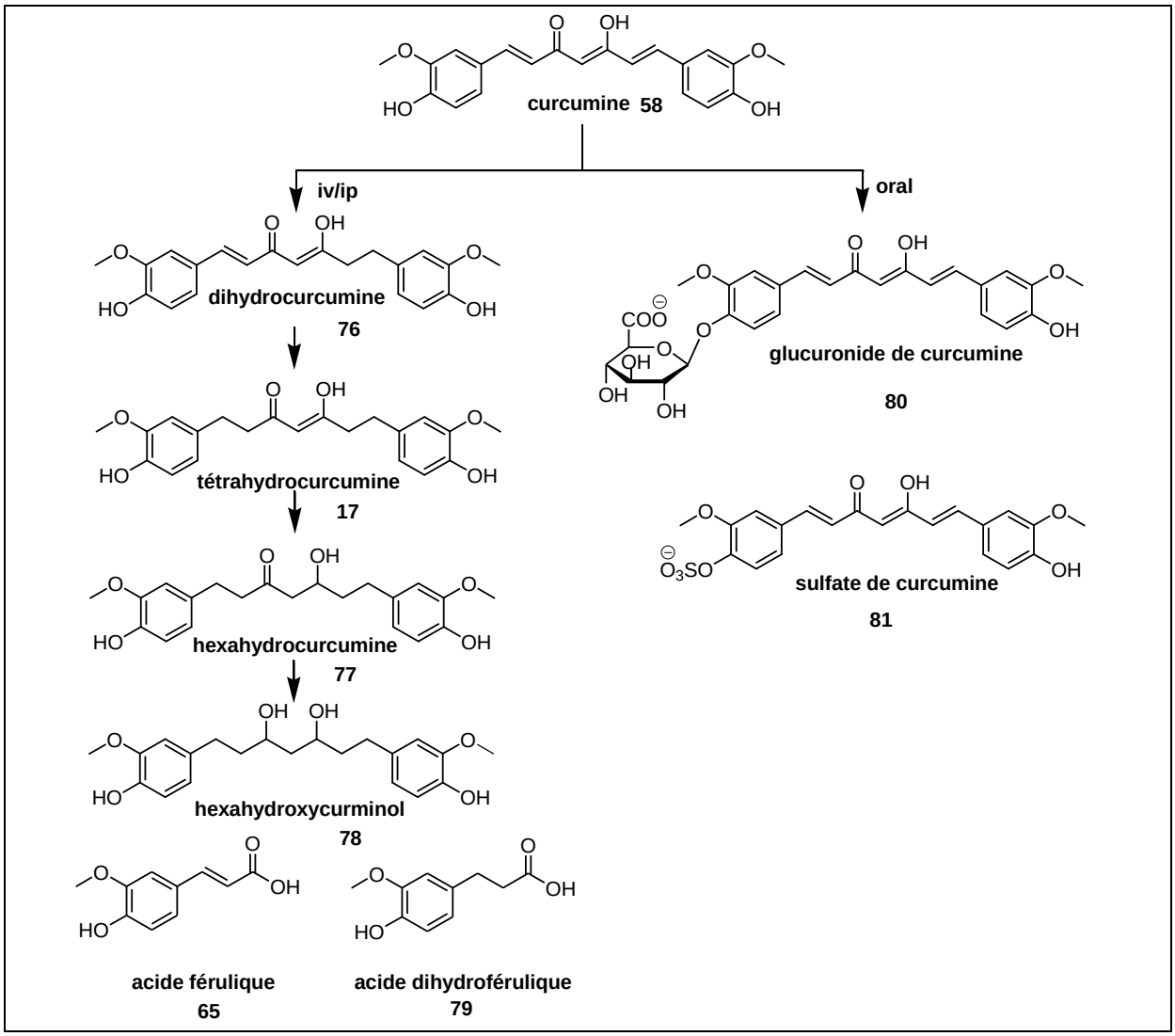


Figure 2-11. Structure de la curcumine et ses métabolites (Anand *et al.,* **2007**).

d) Élimination

De par sa faible absorption, la curcumine administrée par voie orale chez l'animal ou l'homme est majoritairement excrétée dans les fèces sous forme inchangée. L'excrétion urinaire a lieu sous forme de glucurono- et sulfo-conjugués.

Une étude a relevé des demi-vies d'absorption et d'élimination pour une dose de 2 g/kg administrée par voie orale chez le rat de 0,31±0,07 h et 1,7±0,5 h, respectivement. La demi-vie d'élimination n'est pas significativement différente pour des doses plus faibles, ce qui indique qu'elle est indépendante de la dose administrée. Ces demi-vies n'ont pu être calculées chez l'homme après administration d'une dose de 2 g à cause de concentrations sériques trop faibles. Une autre étude, postérieure, rapporte une demi-vie d'élimination plus longue après administration orale de 500 mg/kg de curcumine (44,5±7 h), mais la littérature existante n'est pas encore suffisante pour déterminer quels sont les facteurs contrôlant la demi-vie d'élimination *in vivo*.

1. Par voie intraveineuse ou intrapéritonéale

Quinze minutes après administration intrapéritonéale de 0,1 g/kg de curcumine à des souris, la concentration plasmatique relevée par Pan *et al*., **1999** [34] est de 2,25 µg/mL. Une heure après administration, la concentration atteint 177,04 µg/g dans l'intestin, 26,06 µg/g dans la rate, 26,90 µg/g dans le foie, 7,51 µg/g dans le rein, et seules des traces sont retrouvées dans le cerveau (0,41 µg/g). Les concentrations atteintes par voie intrapéritonéale ne sont pas sensiblement différentes de celles obtenues par voie orale.
Après administration intraveineuse et intrapéritonéale, de grandes quantités de curcumine et de ses métabolites sont excrétées dans la bile, principalement sous forme de glucuronides de tétrahydrocurcumine et d'hexahydrocurcumine. Suite à l'administration intrapéritonéale, la curcumine semble transformée tout d'abord en dihydrocurcumine et en tétrahydrocurcumine, ces composés étant ensuite convertis en monoglucurono-conjugués (**Figure 2-11**).

E. Activités biologiques de la curcumine

La curcumine possède une large gamme d'activités pharmacologiques y compris des activités anti-inflammatoires,[35, 36] anticancéreuses,[37] antioxydantes,[38] cicatrisantes,[39] des effets antimicrobiens[40] et antiparasitaires,[41,42,43] (objet principal de notre étude). Le mécanisme d'action est complexe et probablement multifactoriel. Nombre de ces effets biologiques de la curcumine sont illustrés dans la **Figure 2-12**. Les cibles moléculaires de la curcumine sont également présentées dans la **Figure 2-13**.
Beaucoup des études ne discutent que les activités de la curcumine dues à son forte activité antioxydante.
La curcumine est en effet un bon antioxydant (la curcumine est dix fois plus antioxydante que la vitamine E), et inhibe la peroxydation lipidique qui joue un rôle important dans l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et le cancer.
Aussi, la curcumine agit comme un piégeur de radicaux libres. Elle protège l'hémoglobine de l'oxydation *in vitro*, la curcumine peut inhiber significativement la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme les anions superoxyde, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. La curcumine peut aussi diminuer la production d'ERO *in vivo*.
Ses dérivés naturels, la déméthoxycurcumine et la bis-déméthoxycurcumine exercent aussi des effets anti-oxydants moins importants.[44]

Le mécanisme antioxydant de la curcumine est attribué à sa structure, incluant les phénols méthoxylés et la forme énol de la β dicétone. Le processus antioxydant non enzymatique se fait en deux étapes :

---

[34] Pan M. H., Huang T. M., Lin J. K., *Drug. Metab. Dispos*. **1999**, 27, 486–494.
[35] Nurfina A. N., Reksohadiprodjo M. S., Timmerman H., Jenie U. A., Sugiyanto D., der Goot H van., *Eur. J. Med. Chem.* **1997,** 32, 321–328.
[36] Satoskar, R. R., Shah, S. J., Shenoy, S. G., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol*. **1986**, 24, 651–654.
[37] Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., George, M.C., *Cancer Lett.* **1985**, 129, 197–202.
[38] Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takino, Y., *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 1725–1728.
[39] Sidhu, G. S., Singh, A. K., Thaloor, D., Banaudha, K. K., Patnaik, G. K., Srimal, R. C., Maheshwari, R. K., *Wound Repair Regen.* **1998,** 6, 167–177.
[40] Negi, P.S., Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L., Sakariah, K. K., *J. Agric. Food Chem*. **1999,** 47, 4297–4300.
[41] Nose M., Koide T., Ogihara Y., Yabu Y., Ohta N., *Biol. Pharm. Bull*. **1998,** 21, 643–645.
[42] Koide T., Nose M., Ogihara Y., Yabu Y., Ohta N., *Biol. Pharm. Bull*. **2002,** 25, 131–133.
[43] Reddy R. C., Vatsala P. G., Keshamouni V. G., Padmanaban G., Rangarajan P. N., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2005** 14, 472–474.
[44] Gupta S. C., Prasad S., Kim J. H., Patchva S., Webb L. J., Priyadarsini I. K., Aggarwal B. B., *Nat .Prod. Rep.* **2011**, 28, 1937–1955.

S-OO° + AH → SOOH + A°,
A• + X• → produit non radical,

Où S est la substance oxydée, AH l'antioxydant phénolique, A• le radical antioxydant et X• un autre radical. A• et X• se dimérisent pour former un produit non radical.[45]
Les effets chimioprotecteurs et sur la maladie d'Alzheimer sont les plus étudiés.[46,47,48] La curcumine a démontré *in vivo* et *in vitro* une capacité d'inhiber la carcinogenèse à trois stades : la promotion des tumeurs, l'angiogenèse et la croissance tumorale.[49]
L'autre caractéristique saillante de la curcumine est que, malgré sa consommation quotidienne depuis des siècles en Asie, elle n'a montré aucune toxicité.[50]

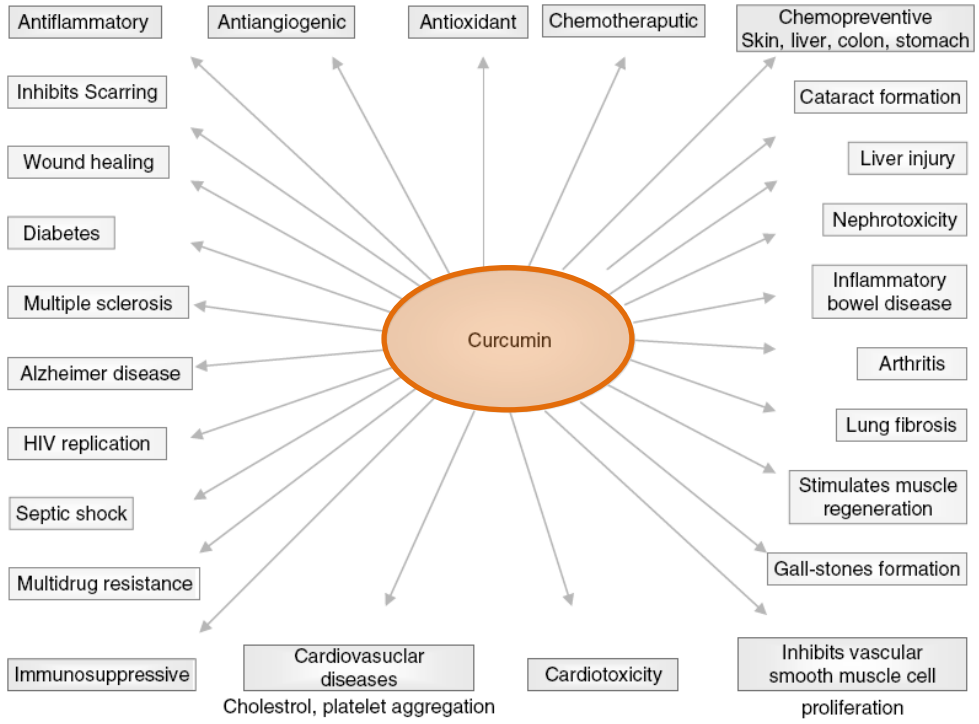


Figure 2-12. Effets potentiels de la curcumine sur de nombreuses affections (Aggarwal *et al*., **2007**).

[45] Chattopadhyay I., Biswas K., Bandyopadhyay U., Banerjee R. K., *Curr. Sci*. **2004**, 87, 44–53.
[46] Ahmed T., Enam S. A., Gilani A. H., *Neuroscience* **2010,** 169, 1296–306.
[47] Ishrat T., Hoda M. N., Khan M. B., Yousuf S., Ahmad M., Khan M. M., Ahmad A., Islam F., *Eur. Neuropsychopharmacol*. **2009,** 19, 636–647.
[48] Hamaguchi T., Ono K., Yamada M., *CNS. Neurosci. Ther*. **2010,** 16, 285–297.
[49] Maheshwari R. K., Singh A. K., Gaddipati J., Srimal R. C., *Life Sci*. **2006**, 78, 2081–2087.
[50] Ammon H. P., Wahl M. A., *Planta Med.* **1991**, 57, 1–7.

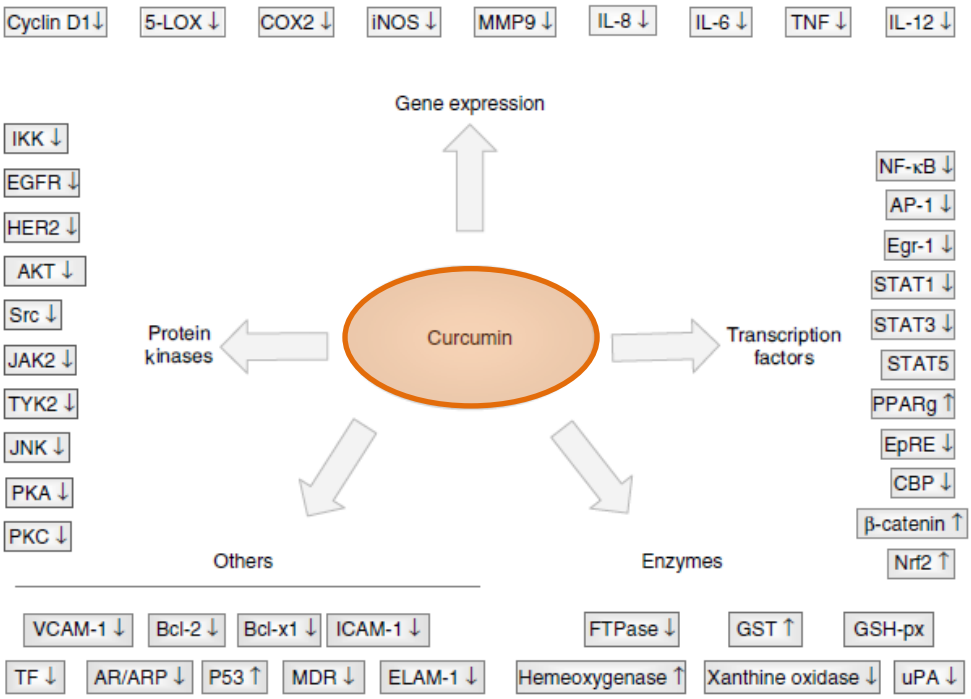
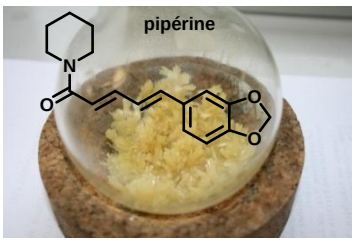


Figure 2-13. Les cibles moléculaires de la curcumine (Aggarwal *et al*., **2007**).

F. Formulations de curcumine biodisponible

Des essais cliniques de phase I ont montré que la curcumine n'est pas toxique, même à fortes doses (12 g / jour) chez l'homme. Dans la perspective d'emploi thérapeutique de la molécule, le grand défi est l'amélioration de la biodisponibilité de la curcumine.
Afin d'améliorer cette biodisponibilité de la curcumine, de nombreuses approches ont été entreprises. Ces approches font appel :
- en premier lieu, à l'utilisation d'un adjuvant, comme la pipérine qui interfère avec la glucuronidation.
- la deuxième, à l'utilisation de la curcumine liposomale.
- la troisième approche correspond à la préparation des nanoparticules de curcumine.
- quatrièmement, à l'utilisation des complexes de phospholipides curcumine.
- cinquièmement, au développement d'analogues structuraux de la curcumine.

1. Co-administration avec un adjuvant : la pipérine



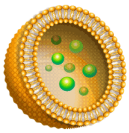
La pipérine est un alcaloïde présent dans certaines plantes de la famille des Piperaceae, dont le poivre noir (*Piper nigrum* L.) et le poivre long (*Piper longum* L.). Son administration par voie orale en même temps que la curcumine semble accroitre la concentration sérique de cette dernière chez les rongeurs et l'homme. Shoba *et al.*[51] ont évalué cet effet chez le Rat et l'Homme. Chez le rat, la pipérine à la dose de 20 mg/kg a permis d'augmenter la biodisponibilité de la curcumine administrée à 2 g/kg de 154 %. Chez l'homme, l'addition de 20 mg de pipérine à 2 g de curcumine s'est montrée encore plus efficace et en augmente la biodisponibilité de 2000 %. L'effet obtenu est cependant de courte durée. L'absorption de la curcumine est meilleure mais n'est pas plus étalée dans le temps.

[51] Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P. S., *Planta Med*. **1998**, 64, 353–356.

Le mécanisme n'est pas encore connu avec certitude mais cet effet est probablement dû à l'absorption accrue de la curcumine et d'une réduction de sa métabolisation par l'inhibition d'enzymes hépatiques et intestinales par la pipérine. Une étude menée par Suresh *et al.*[52] montre que la pipérine a une influence exceptionnelle sur des systèmes enzymatiques de la métabolisation hépatique. La pipérine et la combinaison de curcumine ont diminué l'activité de l'UDP-glucuronyl transférase, et la pipérine a diminué significativement l'activité de la NADPH-cytochrome *c* réductase.
La combinaison dans certaines proportions des curcuminoïdes avec l'huile essentielle de *curcuma*, contenant des turmérones, augmente leur biodisponibilité et permet des concentrations sanguines plus élevées, ainsi qu'une rétention prolongée. Un produit de ce type appelé Biocurcumax® ou BCM-95. Des essais cliniques montrent une activité augmentée de 700 % et une biodisponibilité 7 à 8 fois supérieure pour la curcumine.[30] Suresh *et al.*[53] ont réalisé une étude comparative d'absorption *in vitro* entre la curcumine, la pipérine et la capsaïcine, et ils ont montré que l'absorption de curcumine est relativement plus élevée quand elle est adminstrée sous forme de micelles, ce qui nous amène à la deuxième approche pour augmenter la biodisponibilité.

2. Complexes liposomaux, micellaires et phospholipidiques

❖ Liposomes

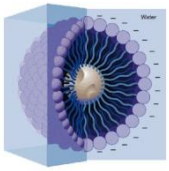


Un liposome est une vésicule artificielle formée par des bicouches lipidiques concentriques. Celles-ci emprisonnent un compartiment aqueux. Les liposomes sont obtenus à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles, dont les plus couramment utilisés sont des phospholipides. Les liposomes sont de plus en plus développés dans la recherche pharmaceutique comme vecteurs de médicaments (Amphotéricine B). Les liposomes peuvent retenir plusieurs types de composés qu'ils soient hydrosolubles ou liposolubles. L'encapsulation permet la protection des substances contenues dans les liposomes vis-à-vis d'une dégradation enzymatique ou bien d'une élimination. L'encapsulation permet aussi de limiter l'action toxique des substances vis-à-vis du patient. En ce qui concerne la curcumine plusieurs études ont été réalisées sur sa forme liposomale, afin de pouvoir dépasser le problème lié à sa faible biodisponibilité, et améliorer ses activités surtout *in vivo*.
Li *et al.*[54] ont encapsulé la curcumine dans un système liposomal qui permettrait une administration intraveineuse et ont également étudié l'activité antitumorale de la curcumine liposomale *in vitro* et *in vivo* dans un modèle du carcinome du pancréas humain. Les auteurs ont montré que la curcumine liposomale inhibe *in vivo* la croissance tumorale, de manière plus puissante que la curcumine. Ruby *et al*.[55] ont testé les activités antitumorale et antioxydante de curcuminoïdes liposomaux *in vivo* chez les souris. D'autres études précliniques ont également montré une augmentation de la biodisponibilité de la curcumine liposomale par apport à la curcumine.
Les paramètres pharmacocinétiques après administration orale de la curcumine liposomale chez les Rats ont été comparés à ceux de la curcumine non mise en forme. Une augmentation de biodisponibilité de la curcumine a été observée dans le cas de la curcumine liposomale, le taux d'absorption était plus élevé que celui de la curcumine seule : la C_{max} était plus élevée et le T_{max} plus court ; une grande valeur de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques a été observée. Ces résultats indiquent que l'absorption gastro-intestinale de la curcumine est améliorée par l'encapsulation dans des liposomes.[56] Récemment, Mourtas *et al*. ont préparé des

[52] Suresh D., Srinivasan K., *Can. J. Physiol. Pharmacol*. **2006**, 84, 1259–1265.
[53] Suresh D., Srinivasan K., *Food Chem. Toxicol*. **2007**, 1437–1442.
[54] Li L., Braiteh F. S., Kurzrock R., *Cancer.* 2005, 104, 1322–1331.
[55] Ruby A. J., Kuttan G., Babu K. D., Rajasekharan K. N., Kuttan R., *Cancer Lett*. **1995**, 94, 79–83.
[56] Takahashi M., Uechi S., Takara K., Asikin Y., Wada K., *J. Agric. Food Chem*. **2009**, 57, 9141–9146.

nouveaux liposomes par la chimie ″clic″, avec une grande affinité pour les fibrilles bêta-amyloïdes (Aβ-42). Ces liposomes peuvent-être exploités en tant que vecteurs pour l'administration ciblée de nouvelles molécules thérapeutiques et diagnostiques pour la maladie d'Alzheimer.[57]

❖ Complexe micellaires



Une micelle est un agrégat sphérique de molécules possédant une tête polaire hydrophile dirigée vers le solvant et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur. Elle peut améliorer la biodisponibilité par augmentation de l'absorption digestive et la diminution de l'élimination rénale. Une augmentation de l'absorption intestinale *in vitro* de la curcumine de 47 % à 56 % a été observé dans micelles.[53] Ma *et al*. ont démontré qu'une curcumine micellaire donne une demi-vie 60 fois plus élevée chez le rat par rapport à la curcumine solubilisée dans un mélange de DMA (diméthylacétamide), PEG (polyéthylène glycol 400) et dextrose.[58]

Des nouvelles micelles copolymères de la curcumine (PLGA-PEG-PLGA) [PLGA : poly(acide lactique co-glycolide)] ont été synthétisées et caractérisées.[59] L'étude de biodistribution chez les Souris a montré que les micelles diminuent la séquestration par le foie et la rate et améliorent la distribution dans les poumons et le cerveau. Ces résultats suggèrent que les micelles PLGA-PEG-PLGA seraient un vecteur potentiel pour la curcumine. Pour améliorer l'applicabilité de la curcumine dans le traitement du cancer, une encapsulation de la curcumine dans le (PLGA) (polymère biodégradable), en présence d'alcool vinylique et de poly (*L*-lysine) stabilisateurs, en utilisant une technique de nanoprécipitation. *,[60] Ces micelles ont montré une séquestration supérieure à celle de la curcumine pure dans les cellules cancéreuses A2780CP et MDA-MB-231 [cellules cancéreuses de l'ovaire et du sein, respectivement] *in vitro*.

❖ Complexation avec des phospholipides

Un complexe préparé avec de la curcumine et de la phosphatidylcholine de soja hydrogénée forme une vésicule de phospholipides entre lesquelles s'intercale la curcumine. Au microscope, on observe une vésicule jaune (**Figure 2-14**).[61]

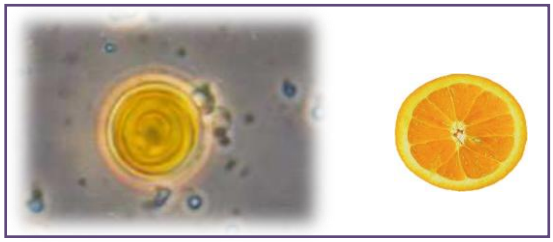


Figure 2-14. Vue microscopique du complexe curcumine-phospholipide grossi 400 fois.

[57] Mourtas S., Canovi M., Zona C., Aurilia D., Niarakis A., La Ferla B., Salmona M., Nicotra F, Gobbi M., Antimisiaris S. G., *Biomaterial,* **2011**, 32, 1635–1645.
[58] Ma Z., Shayeganpour A., Brocks D. R., Lavasanifar, A., Samuel J., *Biomed. Chromatogr*. **2007**, 21, 546–552.
[59] Songa Z., Feng R., Suna M., Guoa C, Gaoa Y., Lia L., Zhai G., *J. Colloid. Interf. Sci*. **2011**, 354,116–123.
[60] Yallapu M. M., Gupta B. K., Jaggi M., Chauhan S C., *J. Colloid. Interf. Sci*. **2010**, 351,19–29.
***** La technique de nanoprécipitation permet de produire des nanosphères. Elle consiste à dissoudre un principe actif dans une solution organique de polymère. Le solvant choisit est généralement un solvant assez polaire tel que l'acétone ou l'éthanol qui doit être miscible à l'eau. Cette solution est injectée, sous agitation modérée, dans une phase aqueuse comprenant éventuellement un surfactant hydrophile, dans laquelle le polymère, et le principe actif ne sont pas solubles. Les nanoparticules se forment alors instantanément sous l'effet de la diffusion du solvant vers la phase aqueuse. Le polymère, insoluble dans le mélange eau/solvant précipite sous forme de nanosphères piégeant le principe actif. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite.
[61] Maiti K., Mukherjee K., Gantait A., Saha B. P., Mukherjee P. K., *Int. J. Pharm*. **2007**, 330,155–163.

Cette méthode de complexation augmente la solubilité dans l'eau et dans le *n*-octanol à 25 °C par rapport à la curcumine pure ou au simple mélange curcumine et phospholipide. L'activité antioxydante et l'effet hépatoprotecteur du complexe ont été mesurés chez le Rat pour juger son efficacité et ils se sont révélés significativement plus élevés que ceux de la curcumine pure, vraisemblablement grâce à une absorption et une biodisponibilité meilleures.[62]
L'absorption relative d'un mélange de curcuminoïdes standardisé et sa formulation avec de la lécithine (Meriva®) a été étudiée dans une étude randomisée, en double aveugle, les taux plasmatiques des trois principaux curcuminoïdes [curcumine **58**, déméthoxycurcumine **59**, et *bis*-déméthoxycurcumine **60**] ont été évalués. L'absorption de ces curcuminoïde était environ 29 fois plus élevée pour la formulation que pour le simple mélange de curcuminoïdes correspondant.[63]

3. Nanoparticules

Les systèmes de délivrance à partir de nanoparticules conviennent particulièrement aux agents hydrophobes tels que la curcumine. Ils sont souvent de taille inférieure aux formulations liposomale et moins hétérogènes.
La synthèse, la caractérisation physicochimique d'un polymère d'une taille inférieure à 100 nm, baptisé ″nanocurcumine″, ont été décrites par Bisht *et al.,* **2007**. La nanocurcumine devient complètement soluble dans l'eau. L'absence d'effets secondaires liés à la nano-encapsulation a été constatée sur des souris. Cependant, l'effet et la biodistribution *in vivo* n'a pas été déterminé.[30]
Anand *et al*.,[64] ont préparé la curcumine en nanoparticules biodégradables à base de poly(lactide-coglycolide) stabilisées par du PEG-5000. Cette formulation permet *in vitro* une meilleure capture cellulaire, induit une plus forte apoptose chez les cellules tumorales testées.
Ces nanoparticules sont également plus actives dans la suppression de l'activation de NF-κB et dans la suppression de l'expression de la cycline D1, de la MMP-9 (*matrix metalloproteinase*-9) et du VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) régulée par le TNF-α (le facteur de nécrose tumorale, *tumor necrosis factor alpha*).
Ces résultats suggèrent que la curcumine nanoparticulaire pourrait être un meilleur agent antitumoral, anti-invasif et anti-angiogénique que la curcumine.

La curcumine et d'autres composés naturels polyphénoliques, ont été encapsulés dans la gélatine sous forme de nanoparticules (200 nm) avec ou sans encerclement, par une coque de polyélectrolytes (polystyrène sulfonate de chlorhydrate polyallylamine/acide glutamique/poly-L-lysine, sulfate de dextran sulfate de protamine/carboxyméthylcellulose/gélatine). Les caractéristiques de chargement en polyphénols et les facteurs affectant leur sortie des nanocapsules ont été étudiés.[65]

[62] Kumar M., Ahuja M., Sharma S. K., *Sci. Pharm*. **2008**, 76, 761–774.
[63] Cuomo J., Appendino G, Dern A .S., Schneider E., McKinnon T. P., Brown M. J., Togni S., Dixon B. M., *J. Nat. Prod*. **2011**, 74, 664–669.
[64] Anand P., Nair H. B., Sung B., Kunnumakkara A. B., Yadav V. R., Tekmal R. R., Aggarwal B. B., *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79, 330–338.
[65] Shutava T. G., Balkundi S. S., Vangala P., Steffan J. J., Bigelow R. L., Cardelli J. A., O'Neal D. P., Lvov Y. M., *ACS Nano*. **2009**, 3, 1877–1885.

Récemment, des nanoparticules de la curcumine ont été préparées par formulation en milieu liquide, sans ajouter de tensio-actif, par dispersion libre dans l'eau avec un co-solvant, puis évaporation. Des nanoparticules de curcumine se forment, avec une distribution granulométrique étroite de l'ordre de 2 à 40 nm. (**Figure 2-15**). Les activités antibactériennes et antifongiques de cette nano-curcumine ont été évaluées *in vitro* montrant une amélioration par rapport la curcumine.

Les résultats ont démontré aussi que la solubilité dans l'eau et l'activité antimicrobienne de la curcumine sont nettement améliorées par la réduction de la taille des nanoparticules.

L'étude par microscopie électronique en transmission (MET) a révélé que ces particules pénètrent à l'intérieur de la cellule bactérienne, et dégrade la paroi cellulaire (**Figure 2-16**).[66]



Figure 2-15. Solubilité de la nanocurcumine (à gauche) et de la curcumine (à droite) dans l'eau (Bhawana *et al*., **2011**).

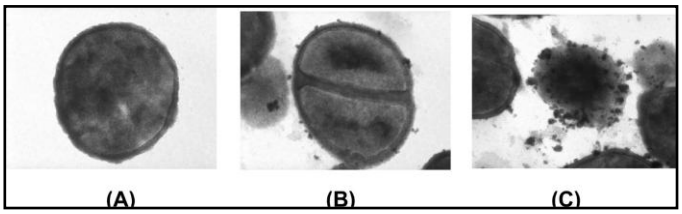


Figure 2-16. Images de MET **(A)** cellules de *S. aureus* (contrôle, non traité) **(B)** *S. aureus* traité avec des nanoparticules de curcumine, avec l'ancrage de la curcumine nanoparticulaire à la paroi cellulaire, **(C)** attaque des nanoparticules curcumine, perturbation de la paroi cellulaire (couche de peptidoglycane), et pénétration des nanocurcumines à l'intérieur de la cellule (Bhawana *et al*., **2011**).

4. SMEDDS (*Self Micro Emulsifying Drug Delivery System*)

Un SMEDDS est un mélange homogène d'huile, de surfactant, de co-surfactant et de la substance à solubiliser, qui peut former une micro-émulsion ″huile dans eau″ dans les conditions gastro-intestinales après administration orale. Cette technique aide à l'absorption des substances peu solubles dans l'eau, *via* l'apport de lipides.

Cui *et al*., ont comparé la dissolution d'un SMEDDS contenant 20 mg de curcumine et de 20 mg de curcumine pure dans 500 mL d'un milieu aqueux à 37 °C. Alors que l'on ne parvient à dissoudre que moins de 2 % de curcumine pure dans des solutions tampon à pH 1,2 ou 6,8, la curcumine sous forme de SMEDDS est dissoute dans le milieu a plus de 96 % dès 20 minutes, indépendamment du pH. La solubilité de la curcumine sous forme de SMEDDS telle que formulée dans cette étude atteint 21 mg/g. D'après une expérience sur intestin de rat, l'absorption de la curcumine sous forme de SMEDDS est concentration-indépendante et semble avoir lieu par diffusion passive à travers les membranes lipidiques.[67]

Concernant l'absorption par voie orale chez la souris, le pourcentage de curcumine formulée sous forme SMEDDS absorbée par le tube digestif est supérieur à celui obtenu avec une simple suspension, quel que soit le temps après l'administration. Au bout de 24 h, 93,8 % de la curcumine en SMEDDS sont absorbés, soit 3,86 fois plus que de la curcumine en suspension.

[66] Bhawana., Basniwal R. K., Buttar H. S., Jain V. K., Jain N., *J. Agric. Food Chem*. **2011**, 59, 2056–2061.
[67] Cui J., Yu B., Zhao Y., Zhu W., Li H., Lou H., Zhai G., *Int. J. Pharm*. **2009**, 371, 148–155.

5. Analogues structuraux de la curcumine

La structure chimique de la curcumine joue un rôle essentiel dans son activité biologique et sa biodisponibilité. Par exemple, la tautomérie céto-énolique a une influence sur l'activité antioxydante de la molécule.[68] Ainsi, les chercheurs espèrent parvenir à de meilleures activités biologiques et biodisponibilité de la curcumine par des modifications structurales. De nombreuses études visent à une activité biologique accrue de dérivés de la curcumine et/ou d'analogues.
La plupart des publications de travaux de pharmacomodulation de la curcumine ne traite pas le problème de biodisponibilité de la curcumine car les chercheurs s'intéressent en général en premier lieu à l'amélioration de l'activité *in vitro*.
Au cours de cette présentation des stratégies de modification structurale, nous allons nous focaliser sur les activités biologiques connexes ou équivalents à ceux réalisées au cours de notre travail de thèse, en essayant de montrer les résultats essentiels des tests biologiques *in vitro* de la littérature dans les domaines des activités cytotoxiques et/ou antitumorales, anti-Alzheimer, et antiparasitaires.
Avant de détailler les modifications structuralles de la curcumine, il est nécessaire de discuter la synthèse totale de la curcumine. La "curcumine" vendue sur le marché est un mélange des trois curcuminoïdes naturels. Cependant, la curcumine peut être obtenue pure par synthèse. La première synthèse historique a été effectuée par Lampe. **1918**.[69] Puis des Italiens l'ont réalisée par chauffage d'un mélange de vanilline, d'acétylacétone et d'anhydride borique. Pavollini *et al*., **1950**.[70] Ce procédé a été considérablement amélioré ultérieurement par Pabon., en **1964** [71] (**Schéma 2-1**), puis plus récemment par Krackov et Bellis., **1997**.[72]

Trois étapes principales caractérisent cette synthèse (Pabon *et al*., **1964**) :

(1) Protection du groupe méthylène par réaction entre l'acétylacétone **82** et l'anhydride borique conduisant à un complexe acétylacétone/bore.
(2) Réaction du groupe méthyle terminal sur le carbonyle de la vanilline **83** pour donner un complexe curcumine/bore.
(3) Décomposition du complexe précédent par hydrolyse acide conduisant à la curcumine.

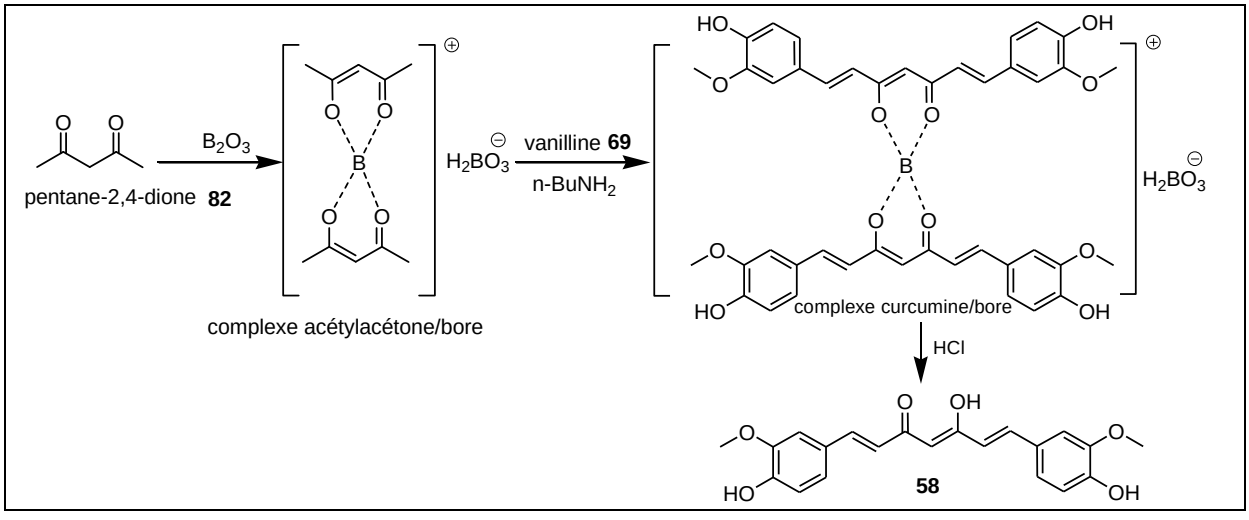


Schéma 2-1. Synthèse de la curcumine (décrite par Pabon., **1964**).

[68] Shen L., Ji H. F., *Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. **2007**, 67, 619–623.
[69] Lampe V., *Ber .dtsch .chem .Ges.* **1918**, 51, 1347–1355.
[70] Pavollini T., Gambarin F., Grinzato A. M., *Ann. Chim.* (Rome).**1950**, 40, 280–291.
[71] Pabon H. J. J., *Rec. Trav. Chim*. Pays-Bas **1964**, 83, 379–383.
[72] Krackov M. K., Bellis H., Brevet PCT WO 97/16403 (1997). *Chemical Abstracts* **1997**, 127, 17480.

Krackov *et al*. ont observé que l'emploi d'acide était préférable à celui d'une base étant donnée l'instabilité de la curcumine en milieu basique. La synthèse des curcuminoïdes symétriques est identique à celle décrite précédemment pour la curcumine, mais la vanilline **83** est remplacée par l'aldéhyde correspondant Ar-CHO.
La méthode générale de synthèse des curcuminoïdes dissymétriques (Krackov *et al*., **1997**) est décrite dans la (**Schéma 2-2**). La réaction est réalisée en 2 étapes :

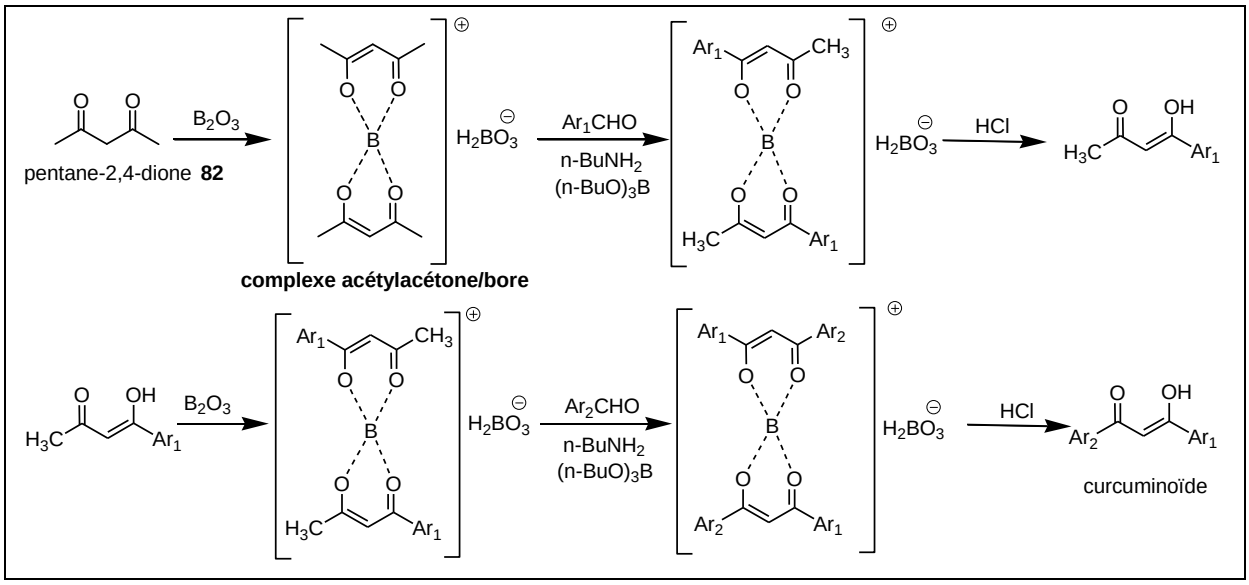


Schéma 2-2. Synthèse générale des curcuminoïdes dissymétriques (Krackov *et al*., **1997**).

- Dans un solvant polaire et aprotique, B_2O_3 réagit avec la pentane-2,4-dione afin d'obtenir le complexe énolique. L'aldéhyde aromatique Ar_1CHO est condensé dans un rapport stoechiométrique 1/1, en présence d'un catalyseur (amine primaire ou secondaire) de façon à réaliser une condensation aldolique de l'aldéhyde avec un seul des carbones terminaux en alpha de l'énol de la dicétone complexée (réaction de Knoevenagel). L'hydrolyse acide permet d'isoler la dicétone intermédiaire.
- Dans une seconde étape, l'aldéhyde Ar_2CHO est condensé au complexe borique de la dicétone précédente. L'hydrolyse acide permet de récupérer le curcuminoïde dissymétrique attendu.

Nous allons maintenant discuter des modifications structurales pour quelques activités biologiques en montrant les résultats essentiels sur des tests biologiques *in vitro* relevés dans la littérature.

a) Activité cytotoxique :

L'activité cytotoxique ou antitumorale de la curcumine est la plus étudiée. En **2002** Shim *et al*.[73] ont synthétisé des dérivés de la curcumine, de type hydrazinocurcumine (hydrazinocurcumine **84** et hydrazinobenzoylcurcumine **85**) (**Figure 2-17**). Le composé **84** inhibe fortement la prolifération des cellules endothéliales aortiques bovines (CEAB) à une concentration nanomolaire (CI_{50} = 520 nM), pour la curcumine (CI_{50} = 15000 nM), sans cytotoxicité. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'hydrazinocurcumine **84** peut aussi être considérée comme un nouveau candidat pour son activité anti-angiogénique.

[73] Shim J. S., Kim D. H., Jung H. J., Kim J. H., Lim D., Seok-Ki L., Kyu-Won K., Ahn J. W., Jong-Shin Y., Jung-Rae R., Shin J., Kwon H. J., *Bioorg. Med. Chem*. **2002**, 10, 2987–2992.

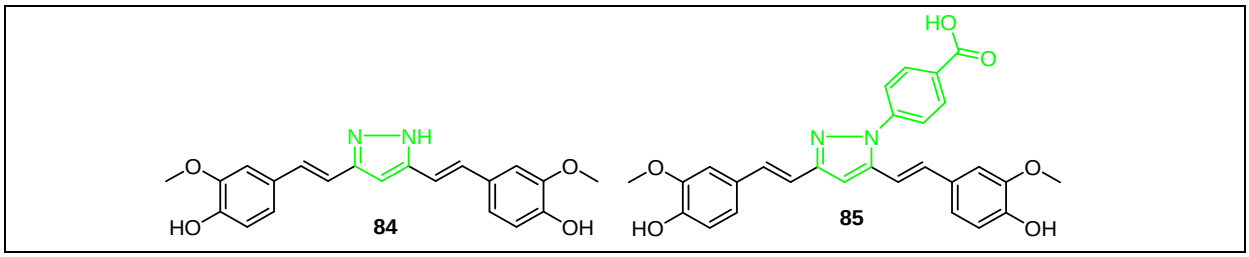
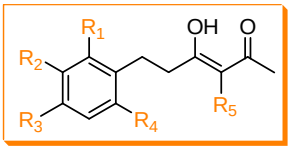


Figure 2-17. Dérivés de la curcumine synthétisés par shim *et al*., **2002**.

Dans un travail consacré à l'obtention de dérivés d'intérêt dans le cadre de cancer prostatique androgéno- et non androgénodépendants, 40 nouveaux analogues classés en quatre séries ont été synthétisés : des analogues monophényl (**série A**), des analogues hétérocycliques (**série B**), des analogues portant divers substituants sur les noyaux phényle (**série C**) et des analogues avec des *"linkers"* différents (**série D**) (**Figure 3-18**). La cytotoxicité contre deux lignées de cellules cancéreuses prostatiques humaines, LNCaP androgénodépendants et PC-3 androgéno-indépendant. L'activité anti-androgène a également été évaluée sur des cellules LNCaP et PC-3 transfectées avec le récepteur des androgènes. Des dérivés obtenus sont actifs sur les deux lignées (LNCaP, PC-3), avec plus ou moins de selectivité comme le montre la **Figure 2-18**.[74]

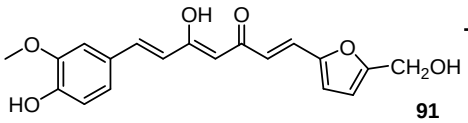
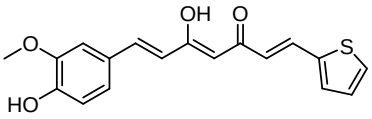
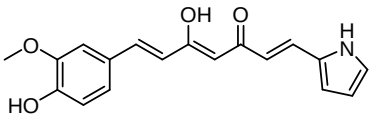
[74] Lin L., Shi Q., Nyarko A. K., Bastow K. F., Wu C.-C., Su C.-Y., Shih C. C.-Y., Lee K.-H., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3963–3972.

A

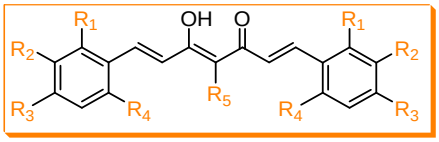


Composé	R1	R2	R3	R4	R5	Cytotoxicité CI_{50} (µM) PC-3	LNCaP
86	H	OMe	OH	H	H	8,0	6,2
87	H	OMe	OMe	H	H	7,0	6,6
88	H	OH	OMe	H	H	6,1	5,3
89	OMe	OMe	OMe	H	H	7,8	5,8
90	H	OMe	OH	H	$(CH_2)_2COOEt$	43,7	51,5

B

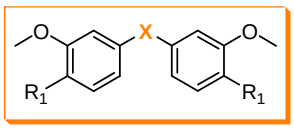
	Cytotoxicité CI_{50} (µM) PC-3	LNCaP
 **91**	7,3	9,0
 **92**	6,3	7,7
 **93**	13,6	15,4

C



Composé	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Cytotoxicité CI_{50} (µM) PC-3	LNCaP
Cur 58	H	OMe	OH	H	H	7,7	3,8
94	H	OMe	OH	H	CH_2CH_2COOEt	5,1	1,5
95	H	OMe	OMe	OMe	H	2,4	2,9

D



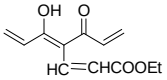
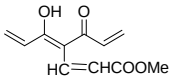
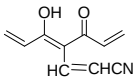
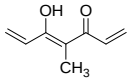
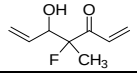
Composé	R1	X	Cytotoxicité CI_{50} (µM) PC-3	LNCaP
96	OH		2,4	1,4
97	OMe		1,0	0,2
98	OMe		0,2	0,4
99	OMe		0,7	0,2
100	OMe		3,5	5,8
101	OMe		4,6	6,4

Figure 2-18. Exemples de dérivés de curcumine synthétisés par Lin *et al*., **2006**, série **A**, **B**, **C**, **D**.

Des analogues de curcumine ont été synthétisés par condensation de Knoevenagel générant des dérivés de la curcumine non-énolisables.

Des bases de Schiff ont été également préparées en utilisant un pharmacophore bioactif de thiosemicarbazide, la cytotoxicité de la curcumine et ses analogues a été déterminée contre les cellules leucémiques humaines KBM-5, et d'autres lignées de cellules tumorales telles que H1299 (cellules cancéreuses pulmonaires), et MM1 (lignée cellulaire myélomateuse).
Le composé **105** a été jugé le plus efficace sur la prolifération de différents types de cellules tumorales, et plus actif que la curcumine (**Figure 2-19**).[75]

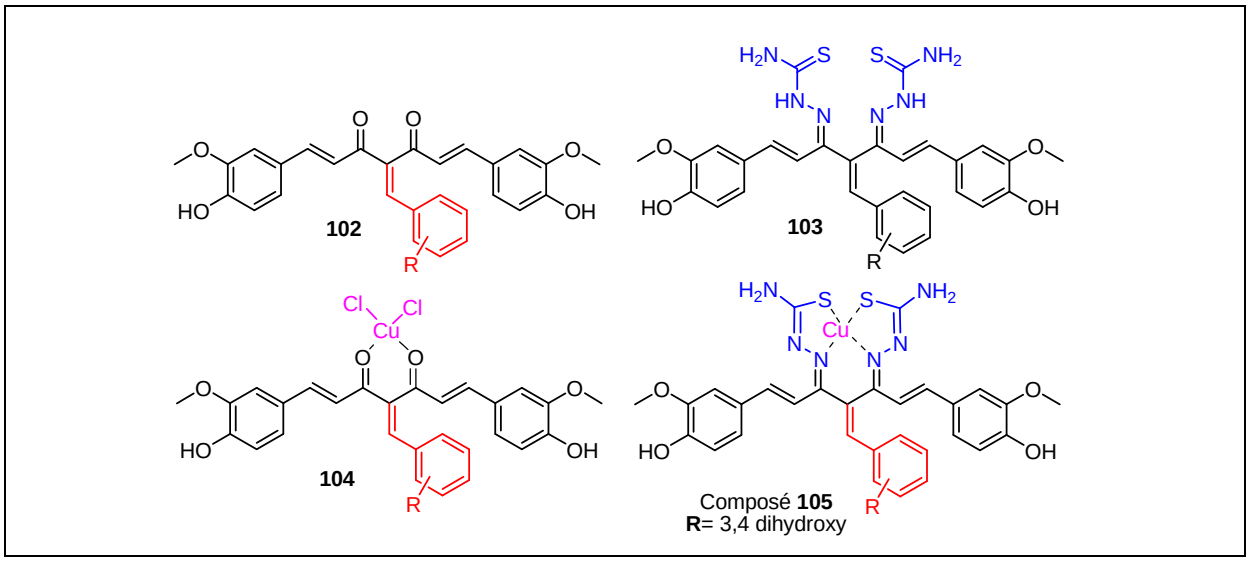


Figure 2-19. Dérivés de la curcumine (Zambre *et al*., **2006**).

Des analogues polyfluorés de curcumine, de leurs bases de Schiff et des complexes avec le cuivre (**Figure 2-20**) ont été synthétisés.[76] Les activités inhibitrices du protéasome et inductrice d'apoptose dans des cellules cancéreuses ont été évaluées pour ces composés.

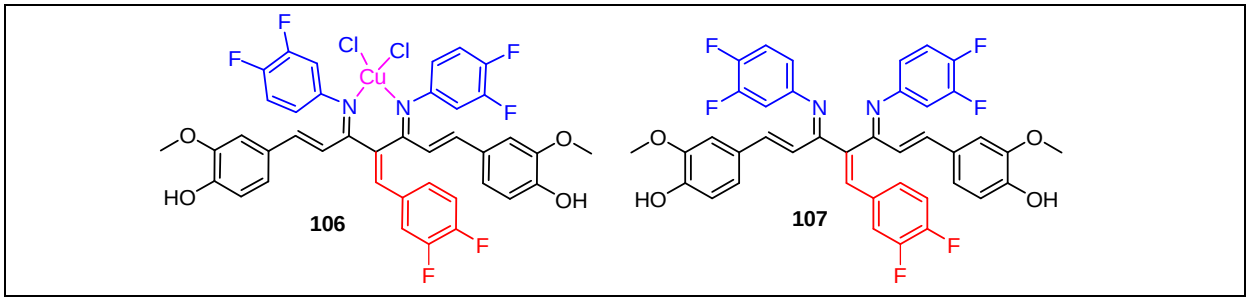


Figure 2-20. Analogues fluorés de la curcumine (Padhye *et al*., **2009**).

Plus récemment, une autre équipe a synthétisé une série d'analogues de la curcumine, y compris de nouveaux analogues de 4-arylidène curcumine (4-arylidèn-1,7-bisarylhepta-1,6-diène-3,5-diones). L'évaluation *in vitro* a révélé que la plupart des analogues de curcumine de type

[75] Zambre A. P., Kullkarni V.M., Padhye S., Sandur S. K., Aggarwal B. B., *Bioorg. Med. Chem*. **2006**, 14, 7196–7204.
[76] Padhye S., Yang H., Jamadar A., Cui Q. C., Chavan D., Dominiak K., McKinney J., Banerjee S., Dou Q. P., Sarkar F. H., *Pharm. Res.* **2009**, 26, 1874–1880.

4-arylidène peuvent diminuer efficacement la croissance de plusieurs lignées cellulaires de cancer du poumon à des concentrations de l'ordre du micromolaire.[77]

En **2007**, Chandru H *et al*.[78] ont synthétisé des analogues diénone cyclopropoxy de la curcumine par réaction de substitution nucléophile avec du bromure de cyclopropyle (**Figure 2-21**).
L'inhibition de la tumeur et les effets anti-angiogéniques des composés synthétiques ont été étudiés sur la tumeur d'ascite d'Ehrlich *in vivo* chez la souris. Les composés augmentent la survie de souris porteuses avec une réduction significative du volume tumoral et le nombre de cellules et de corps apoptotiques induites dans les cellules.

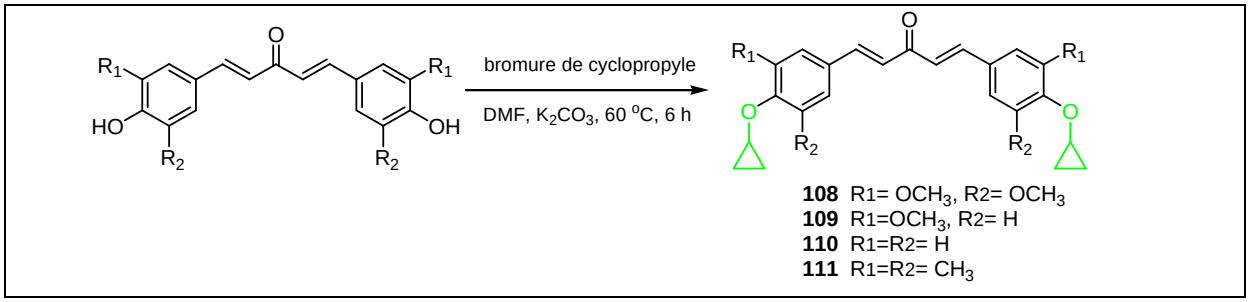


Figure 2-21. Analogues cyclopropoxy diénoniques de la curcumine (Chandru *et al*., **2007**).

Des analogues de curcumine portant différents substituants en position 4 du groupement phényle ont été synthétisés (**Figure 2-22**). Leur activité cytotoxique contre six lignées de cellules tumorales a été testée par le test MTT standard *in vitro*. Les résultats indiquent que les analogues (**112**, **113**, **114**) ont une cytotoxicité sélective contre les lignées cellulaires HepG2, HeLa et CT26. Les analogues **112** et **113** ont une cytotoxicité plus puissante que le curcumine contre CT26.[79]
Cette étude a montré que l'introduction de substituants en 4-position du groupement phényle peut-être une option intéressante pour la modification structurale de la curcumine.

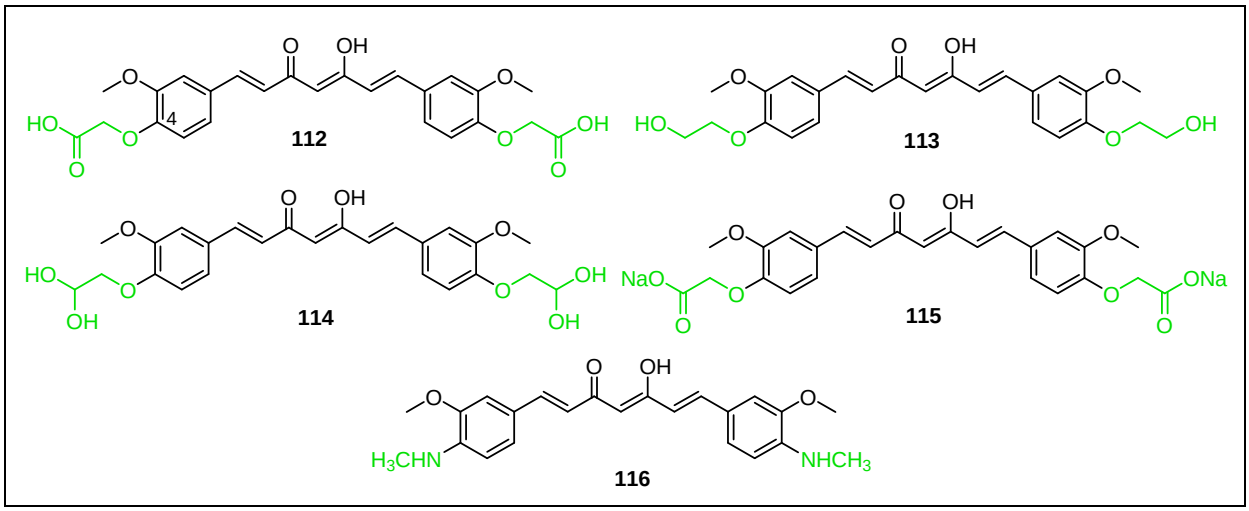


Figure 2-22. Analogues de curcumine avec différents substituants en position 4 (Zhang Q *et al*., **2008**).

[77] Qiu X., Du Y., Lou B., Zuo Y., Shao W., Huo Y., Huang J., Yu Y., Zhou B., Du J., Fu H., Bu X., *J. Med. Chem*. **2010**, 53, 8260–8273.
[78] Chandru H., Sharada A. C., Bettadaiah B. K., Ananda Kumar C. S., Rangappa K. S., Sunila., Jayashree K., *Bioorg. Med. Chem*. **2007**, 15, 7696–7703.
[79] Zhang Q., Fu Y., Wang H. W., Gong T., Qin Y., Zhang Z.-R., *Chin. Chem. Lett*. **2008**, 19, 281–285.

Une série d'analogues de curcumine avec des substituants différents en position 4 du noyau phényle a été synthétisée et testée pour sa cytotoxicité *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines cancéreuses (**Figure 2-23**). Plusieurs analogues, notamment **120** et **125**, présentent une activité cytotoxique sélective et puissante contre le carcinome épidermoïde humain A-431 (CI_{50} = 7,2 ; 9,4 µM pour **120** et **125** respectivement) et la lignée de cellules de glioblastome U-251 (CI_{50} = 7,1 ; 7,7 µM pour **120** et **125** respectivement).[80]

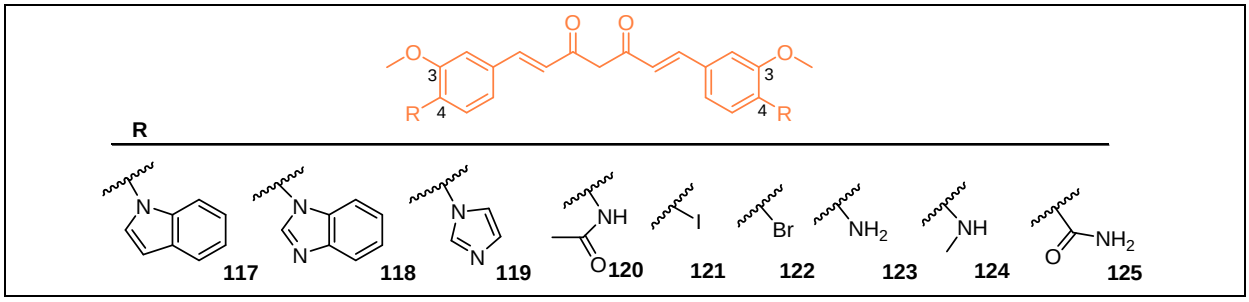


Figure 2-23. Composés synthétisés analogues de la curcumine (Zhang Q *et al*., **2011**)

Les analogues de réduction des doubles liaisons au niveau du *"linker"* ont été également synthétisés et leur activité cytotoxique a été évaluée.[81]
Toujours dans le but d'améliorer l'activité cytotoxique de la curcumine, des ferrocényl curcuminoïdes ont été synthétisés par ancrage covalent de trois différents ligands ferrocényle (**Figure 2-24**).

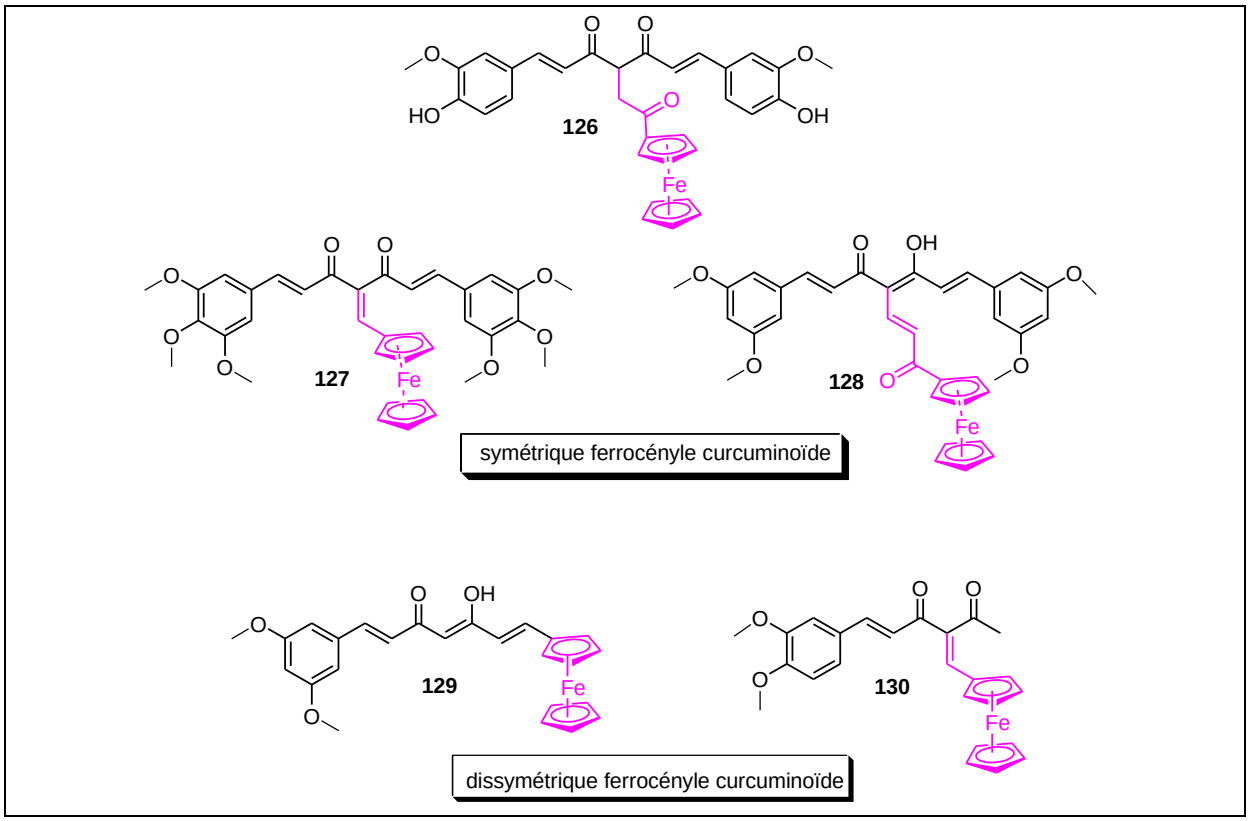


Figure 2-24. Dérivés ferrocényle-curcuminoïdes (Arezki *et al*., **2011**).

[80] Zhang Q., Zhong Y., Yan L.-N., Sun X., Gong T., Zhang Z.-R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 1010–1014.
[81] Narasimhulu M., Srikanth Reddy T., Chinni Mahesh K., Sai Krishna A., Venkateswara Rao J., Venkateswarlu Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3125–3127.

La présence d'une chaîne latérale ferrocényle a clairement montré une amélioration de l'activité biologique de la plupart d'analogues synthétisés.[82]

b) Activité antiparasitaire :

La curcumine possède une activité antiparasitaire intéressante (objet de notre travail), Reddy R. C. *et al*., (**2005**) ont conclu que la curcumine peut représenter un nouveau traitement pour l'infection paludique, car elle inhibe la croissance de *Plasmodium falciparum* résistant à la chloroquine d'une manière dose dépendante avec une CI_{50} ~ 5 µM.
L'administration orale de la curcumine aux souris infectées par un parasite responsable du paludisme (*Plasmodium berghei*) réduit la parasitémie de 80-90 % et améliore significativement leur survie.[42]
Quelques années plus tard, afin d'accroître leur potentiel en tant qu'antipaludiques, une série de dérivés curcumine a été synthétisés et l'activité d'inhibition de la croissance de *P. falciparum* a été également évaluée *in vitro*. Plusieurs composés étaient plus puissants que la curcumine comme **131**, **132**, et **133** avec des CI_{50} de 0,48±0,04 ; 0,87±0,07 ; 0,92 ± 0,09 µM contre *P. falciparum* chloroquine-sensible, sachant que la CI_{50} de la curcumine est 3,25±0,6 µM (**Figure 2-25**).[83]

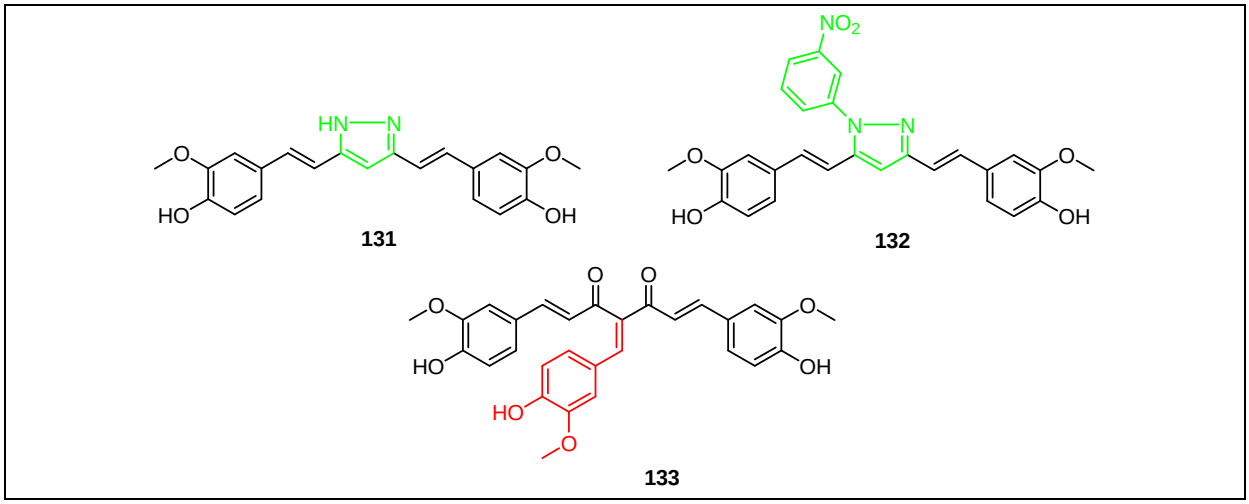


Figure 2-25. Dérivés de la curcumine synthétisés par Mishra *et al*., **2008**.

Les activités trypanocide et leishmanicide de la curcumine ont également été évaluées *in vitro*. En ce qui concerne l'activité trypanocide, la CI_{50} de la curcumine pour la forme sanguine est de 4,77±0,91 et de 46,52±4,94 µM pour la forme polycyclique.[38] Pour l'activité leishmanicide, la curcumine a une CI_{50} = 37,6±3,5 µM.[39]
Récemment, une cinquantaine d'analogues de la curcumine a été synthétisée, avec une évaluation de l'activité trypanocide et leishmanicide *in vitro*.[84]

c) Activité anti-Alzheimer :

Au cours des dernières années, les chercheurs ont commencé à s'intéresser à l'application de la curcumine dans la maladie d'Alzheimer. Pour comprendre les mécanismes

[82] Arezki A., Chabot G. G., Quentin L., Scherman D., Jaouen G., Brulé E., *Med. Chem. Commun*. **2011**, 2, 190–195.
[83] Mishra S., Karmodiya K., Surolia N., Surolia A., *Bioorg. Med. Chem*. **2008**, 16, 2894–2902.
[84] Changtam C., de Koning H. P., Ibrahim H., Sajid M. S., Gould M. K., Suksamrarn A., *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 941–956.

d'action potentiels de la curcumine dans cette maladie, un rappel sur la maladie d'Alzheimer est nécessaire.
La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par la détérioration des fonctions cognitives et des changements de comportement. La présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires, associée à une perte neuronale étendue sont la marque histologique principale observée dans les cerveaux de (MA).
La physiopathologie dépend de l'implication de deux protéines : la protéine β-amyloïde (Aβ) et la protéine tau. Aβ est le principal constituant des plaques séniles et la protéine tau est la principale composante des enchevêtrements neurofibrillaires.

Des niveaux élevés de Aβ fibrillaire se déposent dans le cerveau. Ces dépôts sont associés à la perte de synapses, de neurones et à la déficience des fonctions neuronales. Aβ est constitué de deux sous-types, Aβ-40 et Aβ-42, qui diffèrent par leur extrémité *C*-terminale (40 ou 42 acides aminés, respectivement). Dans le cerveau des patients MA, Aβ-42 est l'espèce prédominante dans le parenchyme cérébral. En revanche, Aβ-40 semble être l'espèce dominante dans le système vasculaire cérébral.[85]
Les études *in vitro* ont montrées que la curcumine inhibe l'agrégation de Aβ, en particulier Aβ42 : c'est une des principales stratégies pour le développement de thérapies pour la MA. De plus la curcumine inhibe d'autres enzymes qui jouent des rôles indispensables dans la MA, comme les β-secrétases qui catalysent une des étapes clés dans la production d'Aβ par clivage de l'APP (précurseur de la protéine β-amyloïde). L'inhibition de l'acétylcholinestérase est la principale classe de médicaments sur le marché pour le traitement symptomatique de MA (la curcumine inhibe l'acétylcholinestérase *in vitro*, avec une CI_{50} de 67,69 µM). L'effet antioxydant de la curcumine est également important dans ce cadre car l'Aβ peut générer efficacement de l'oxygène réactif en présence de métaux de transition (cuivre et fer).[86]
In vivo, chez les souris Tg2576 (modèle de MA)*, de faibles doses (160 ppm [0,43 µmol/g]) de curcumine administrées par voie orale pendant 6 mois diminuent les niveaux de Aβ solubles et insolubles dans de nombreuses régions du cerveau touchées.[86]
L'étude de relations structure-activité pour la MA révèle que les dérivés pyrazole et isoxazole de la curcumine ont les meilleures activités sur l'agrégation de la protéine tau et Aβ-42.[87]
La présence du groupement céto-énolique au sein de la molécule de curcumine en fait un excellent ligand de chélation. Cette propriété peut être un mode d'action supplémentaire d'autres activités de la curcumine.[88] Cette notion sera évoquée à nouveau dans le chapitre suivant.

Enfin, plusieurs chélates métalliques de la curcumine ont montré certaines activités biologiques supérieures à celles de la curcumine libre, par exemple des complexes du cuivre pour une action antitumorale, du bore pour une activité antiprotéase du VIH-1 et 2, [89] ou du vanadium pour des propriétés antirhumatismales.[30] Les deux composés **134** et **135** ont montré une meilleure activité antiprotéase par apport à la curcumine (**Figure 2-26**). Le composé **134** inhibe les VIH-1 et 2 avec CI_{50} de 32 ; 70 µM respectivement, pour le composé **135**. Les CI_{50} sont de 6 ; 5,5 µM

[85] Jakob-Roetne R., Jacobsen H., *Angew. Chem. Int. Ed* **2009**, 48, 3030–3059.
[86] Hamaguchi T., Ono K., Yamada M., *CNS Neurosci. Ther*. **2010**, 16, 285–297.
[87] Narlawar R., Pickhardt M., Leuchtenberger S., Baumann K., Krause S., Dyrks T., Weggen S., Mandelkow E., Schmidt B., *ChemMedChem* **2008**, 3, 165–172.
[88] Jiao Y., Wilkinson J 4th., Pietsch E. C., Buss J. L., Wang W., Planalp R., Torti F. M., Torti S. V., *Free Radic. Biol. Med*. **2006**, 40, 1152–1160.
[89] Sui Z., Salto R., Li J., Craik C., Ortiz de Montellano P. R., *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, 1, 415–422.

* La souris transgénique **Tg2576** exprime la protéine précurseur amyloïde mutante (APPs). Elle présente une augmentation du taux de cette protéine dès 6 mois et des plaques séniles dans le cerveau dès 10 mois. Elle présente un dysfonctionnement cholinergique et des troubles de la mémoire.

respectivement contre VIH-1 et 2, sachant que la curcumine n'a montré qu'une activité modérée CI_{50} de 100 ; 250 µM pour VIH-1 et 2 respectivement.

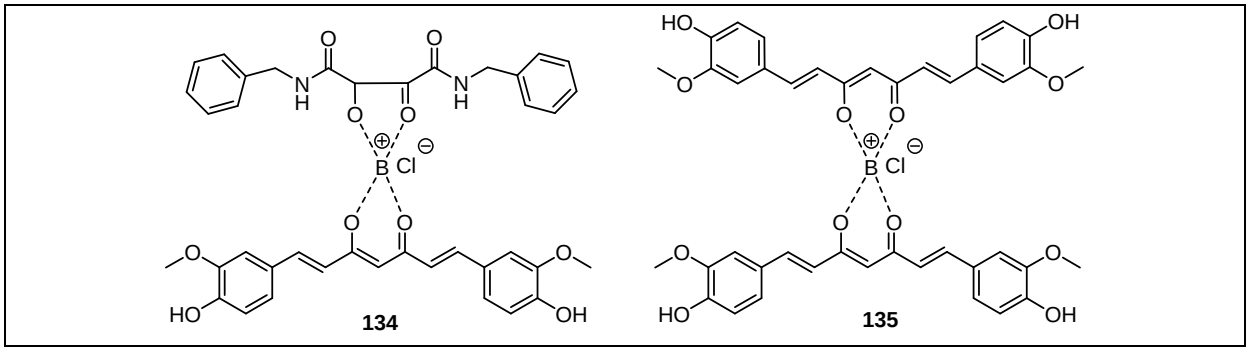


Figure 2-26. Complexes de la curcumine et du bore préparés par Sui Z *et al*., **1993**.

III. Conclusion

La curcumine semble être le principe actif le plus intéressant du curcuma, et de la famille des Zingiberaceae toute entière. Cependant, la faible biodisponibilité de la curcumine reste un problème de taille à surmonter, et les expérimentations sont lancées dans différentes directions, par la pharmacomodulation ou la formulation.

Force est de constater que les stratégies les plus efficaces pour aboutir à une meilleure biodisponibilité de la curcumine ne sont pas les plus simples à mettre en œuvre et les moins coûteuses.

Les bons résultats obtenus jusqu'alors se limitent principalement à des modèles *in vitro* ou *in vivo* chez le rongeur. Ils sont encourageants mais doivent être complètés par des études pharmacocinétiques de ces nouvelles formes de curcumine.

Notes et références bibliographiques du chapitre 2.

[1] Ravindran P. N., Nirmal Babu K., Sivaraman K., Medicinal and Aromatic Plants–Industrial Profiles: Turmeric: The Genus *Curcuma*. *CRC Press,* Washintogton, **2007**, 484 p.
[2] Loap S., *Phytothérapie* **2008**, 6, 22–28.
[3] Vaquier A. R. L., **2010**, thèse de doctorat de l'Université Paris-Est Créteil.
[4] Aggarwal B. B., Sundaram C., Malani N., Ichikawa H., *Adv. Exp. Med. Biol*. **2007**, 595, 1–75.
[5] Le *Curcuma* ou le safran des Indes, *Plantes et Nature* n°15, **2005**, 16–17.
[6] Bruneton J., Pharmacognosie – Phytochimie, plantes médicinales, *4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc – Éditions médicales internationales*, Paris, **2009**, 1288 p.
[7] Rivera-Espinoza Y., Muriel P., *Liver Int*. **2009**, 29, 1457–1466.
[8] Goel A., Kunnumakkara A. B., Aggarwal B. B., *Biochem. Pharmacol*. **2008**, 75, 787–809.
[9] Tohda C., Nakayama N., Hatanaka F., Komatsu K., *Evid Based. Complement. Alternat. Med*. **2006**, 3, 255–260.
[10] Roughley P. J., Whiting D. A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans*. 1, **1973**, 20, 2379–2388.
[11] Schröder J., *Trends Plant Sci*. **1997**, 2, 373–378.
[12] Kamo T., Hirai N., Tsuda M., Fujioka D., Ohigashi H., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2000**, 64, 2089–2098.
[13] Brand S., Hölscher D., Schierhorn A., Svatos A., Schröder J., Schneider B., *Planta*. **2006**, 224, 413–428.
[14] Denniff P., Macleod I., Whiting D. A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1980**, 1, 2637–2644.
[15] Schmitt B., Hölscher D., Schneider B., *Phytochemistry*. **2000**, 53, 331–337.
[16] Katsuyama Y., Matsuzawa M., Funa N., Horinouchi S., *J. Biol. Chem*. **2007**, 282, 37702–37709.
[17] FAO "Food and Agriculture Organization" **2001**, *Food and Nutrition Paper* 52 Add. 9.
[18] Strimpakos A. S., Sharma R. A., *Antioxid Redox Signal*. **2008**, 10, 511–545.
[19] Kurien B. T., Singh A., Matsumoto H., Scofield R. H., *Assay Drug. Dev. Technol*. **2007**, 5, 567–576.
[20] Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P., Kayed R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M., *J. Biol. Chem*. **2005**, 280, 5892–5901.
[21] Borsari, M., Ferrari, E., Grandi, R. Saladini, M., *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 328, 61–68.
[22] Dietze F., Arrieta A. F., Zimmer U., *Pharmazie* **1997**, 52, 302–306.
[23] Payton F., Sandusky P., Alworth W. L., *J. Nat. Prod*. **2007**, 70, 143–146.
[24] Chignell C. F., Bilski P., Reszka K. J., Motten A. G., Sik R. H., Dahl T. A., *Photochem. Photobiol*. **1994**, 59(3), 295–302.
[25] Arrieta A., Dietze F., Mann G., Beyer L., Hartung J., *J. Prakt Chem*. **1988**, 330, 111–118.
[26] Tonnesen H. H., Karlsen J., *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, **1985**, 180, 402–404.
[27] Balasubramanian K., *Indian. J. Chem*. **1991**, 30A, 61–65.
[28] Wang Y. J., Pan M. H., Cheng A. L., Lin L. I., Ho Y. S., Hsieh C. Y., Lin J. K., *J. Pharm. Biomed Anal*. **1997,** 15, 1867–1876.
[29] Sundaryono A., Nourmamode A., Gardrat C., Grelier S., Bravic G., Chasseau D., Castellan A., *Photochem. Photobiol. Sci*. **2003**, 2, 914–920.
[30] Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B., *Mol pharm.* **2007**, 4, 807–818.
[31] Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P. S., *Planta Med*. **1998**, 64, 353–356.
[32] Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti F. M., Torti S. V., *Cell Mol Life Sci*. **2008**, 65,1631–1652.
[33] Tamvakopoulos C., Sofianos Z. D., Garbis S. D., Pantazis P., *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2007**, 32, 51–57.
[34] Pan M. H., Huang T. M., Lin J. K., *Drug. Metab. Dispos*. **1999**, 27, 486–494.
[35] Nurfina A. N., Reksohadiprodjo M. S., Timmerman H., Jenie U. A., Sugiyanto D., der Goot H van., *Eur. J. Med. Chem.* **1997,** 32, 321–328
[36] Satoskar, R. R., Shah, S. J., Shenoy, S. G., *Int J Clin Pharmacol. Ther. Toxicol*. **1986**, 24, 651–654.
[37] Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., George, M. C., *Cancer Lett.* **1985**, 129, 197–202.
[38] Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takino, Y., *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 1725–1728.

[39] Sidhu, G. S., Singh, A. K., Thaloor, D., Banaudha, K. K., Patnaik, G. K., Srimal, R. C., Maheshwari, R.K., *Wound. Repair. Regen.* **1998,** 6, 167–177.
[40] Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L., Sakariah, K. K., *J. Agric. Food. Chem*. **1999,** 47, 4297–4300.
[41] Nose M., Koide T., Ogihara Y., Yabu Y., Ohta N., *Biol. Pharm. Bull*. **1998,** 21, 643–645.
[42] Koide T., Nose M., Ogihara Y., Yabu Y., Ohta N., *Biol. Pharm. Bull*. **2002,** 25, 131–133.
[43] Reddy R. C., Vatsala P. G., Keshamouni V. G., Padmanaban G., Rangarajan P. N., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2005** 14; 326, 472–474.
[44] Gupta S. C., Prasad S., Kim J. H., Patchva S., Webb L. J., Priyadarsini I. K., Aggarwal B. B., *Nat .Prod. Rep.* **2011**, 28, 1937–1955.
[45] Chattopadhyay I., Biswas K., Bandyopadhyay U., Banerjee R. K., *Curr. Sci*. 87, **2004**, 44–53.
[46] Ahmed T., Enam S. A., Gilani A. H., *Neuroscience* **2010**, 169, 1296–306.
[47]Ishrat T., Hoda M. N., Khan M. B., Yousuf S., Ahmad M., Khan M. M., Ahmad A., Islam F., *Eur. Neuropsychopharmacol*. **2009,** 19, 636–647.
[48] Hamaguchi T., Ono K., Yamada M., *CNS Neurosci Ther*. **2010**, 16, 285–297.
[49] Maheshwari R. K., Singh A. K., Gaddipati J., Srimal R. C., *Life Sci*. **2006**, 78, 2081–2087.
[50] Ammon H.P., Wahl M.A., *Planta Med.* **1991**, 57, 1–7.
[51] Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P. S., *Planta Med*. **1998**, 64, 353–356.
[52] Suresh D., Srinivasan K., *Can. J. Physiol. Pharmacol*. **2006**, 84, 1259–1265.
[53] Suresh D., Srinivasan K., *Food Chem Toxicol*. **2007**, 1437–1442.
[54] Li L.; Braiteh F. S., Kurzrock R., *Cancer.* **2005**, 104, 1322–1331.
[55] Ruby A. J., Kuttan G., Babu K. D., Rajasekharan K. N., Kuttan R., *Cancer. Lett*. **1995**, 94, 79–83.
[56] Takahashi M., Uechi S., Takara K., Asikin Y., Wada K., *J. Agric. Food Chem*. **2009**, 57, 9141–9146.
[57] Mourtas S., Canovi M., Zona C., Aurilia D., Niarakis A., La Ferla B., Salmona M., Nicotra F, Gobbi M., Antimisiaris S. G., *Biomaterial,* **2011**, 32, 1635–1645.
[58] Ma Z., Shayeganpour A., Brocks D. R., Lavasanifar, A., Samuel J., *Biomed. Chromatogr*. **2007**, 21, 546–552.
[59] Songa Z., Feng R., Suna M., Guoa C, Gaoa Y., Lia L., Zhai G., *J. Colloid. Interf. Sci*. **2011**, 354,116–123.
[60] Yallapu M. M., Gupta B. K., Jaggi M., Chauhan S. C., *J. Colloid. Interf. Sci*. **2010**, 351, 19–29.
[61] Maiti K., Mukherjee K., Gantait A., Saha B. P., Mukherjee P. K., *Int. J. Pharm*. **2007**, 330,155–163.
[62] Kumar M., Ahuja M., Sharma S. K., *Sci. Pharm*. **2008**, 76, 761–774.
[63] Cuomo J., Appendino G, Dern A .S., Schneider E., McKinnon T. P., Brown M. J., Togni S., Dixon B. M., *J. Nat. Prod*. **2011**, 74, 664–669.
[64] Anand P., Nair H. B., Sung B., Kunnumakkara A. B., Yadav V. R., Tekmal R. R., Aggarwal B. B., *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79, 330–338.
[65] Shutava T. G., Balkundi S. S., Vangala P., Steffan J. J., Bigelow R. L., Cardelli J. A., O'Neal D. P., Lvov Y M., *ACS Nano*. **2009**, 3, 1877–1885.
[66] Bhawana., Basniwal R. K., Buttar H. S., Jain V. K., Jain N., *J. Agric. Food. Chem*. **2011**, 59, 2056–2061.
[67] Cui J., Yu B., Zhao Y., Zhu W., Li H., Lou H., Zhai G., *Int. J. Pharm*. **2009**, 371, 148–155.
[68] Shen L., Ji H. F., *Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. **2007**, 67, 619–623.
[69] Lampe V., *Ber .dtsch .chem .Ges.* **1918**, 51, 1347–1355.
[70] Pavollini T., Gambarin F., Grinzato A. M., *Ann. Chim.* (Rome). **1950**, 40, 280–291.
[71] Pabon H. J. J., *Rec. Trav. Chim*. Pays-Bas **1964**, 83, 379–383.
[72] Krackov M. K., Bellis H., Brevet PCT WO 97/16403 (1997). *Chemical Abstracts* **1997**, 127, 17480.
[73] Shim J. S., Kim D. H., Jung H. J., Kim J. H., Lim D., Seok-Ki L., Kyu-Won K., Ahn J. W., Jong-Shin Y., Jung-Rae R., Shin J., Kwon H. J., *Bioorg. Med. Chem*. **2002**, 10, 2987–2992.
[74] Lin L., Shi Q., Nyarko A. K., Bastow K. F., Wu C.-C., Su C.-Y., Shih C. C.-Y., Lee K.-H., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3963–3972.
[75] Zambre A. P., Kullkarni V.M., Padhye S., Sandur S. K., Aggarwal B. B., *Bioorg. Med. Chem*. **2006**, 14, 7196–7204.
[76] Padhye S., Yang H., Jamadar A., Cui Q. C., Chavan D., Dominiak K., McKinney J., Banerjee S., Dou Q. P., Sarkar F. H., *Pharm. Res.* **2009**, 26, 1874–1880.
[77] Qiu X., Du Y., Lou B., Zuo Y., Shao W., Huo Y., Huang J., Yu Y., Zhou B., Du J., Fu H., Bu X., *J. Med. Chem*. **2010**, 53, 8260–8273.
[78] Chandru H., Sharada A. C., Bettadaiah B. K., Ananda Kumar C. S., Rangappa K. S., Sunila., Jayashree K., *Bioorg. Med. Chem*. **2007**, 15, 7696–7703.
[79] Zhang Q., Fu Y., Wang H. W., Gong T., Qin Y., Zhang Z-R., *Chin. Chem. Lett*. **2008**, 19, 281–285.

[80] Zhang Q., Zhong Y., Yan L.-N., Sun X., Gong T., Zhang Z.-R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 1010–1014.
[81] Narasimhulu M., Srikanth Reddy T., Chinni Mahesh K., Sai Krishna A., Venkateswara Rao J., Venkateswarlu Y*., Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3125–3127.
[82] Arezki A., Chabot G. G., Quentin L., Scherman D., Jaouen G., Brulé E., *Med. Chem. Commun*. **2011**, 2, 190–195.
[83] Mishra S., Karmodiya K., Surolia N., Surolia A., *Bioorg. Med. Chem*. **2008**, 16, 2894–2902.
[84] Changtam C., de Koning H. P., Ibrahim H., Sajid M. S., Gould M. K., Suksamrarn A., *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 941–956.
[85] Jakob-Roetne R., Jacobsen H., *Angew. Chem. Int*. **2009**, 48, 3030–3059.
[86] Hamaguchi T., Ono K., Yamada M., *CNS. Neurosci. Ther*. **2010**, 16, 285–297.
[87] Narlawar R., Pickhardt M., Leuchtenberger S., Baumann K., Krause S., Dyrks T., Weggen S., Mandelkow E., Schmidt B., *ChemMedChem* **2008**, 3, 165–172.
[88] Jiao Y., Wilkinson J. 4th., Pietsch E. C., Buss J. L., Wang W., Planalp R., Torti F. M., Torti S. V., *Free. Radic. Biol. Med*. **2006**, 40, 1152–1160.
[89] Sui Z., Salto R., Li J., Craik C., Ortiz de Montellano P. R., *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, 1, 415–422.

Chapitre 3

Conception et hémisynthèse de curcuminoïdes prénylés

I. La prénylation des substances naturelles

A- Rappels de biosynthèse

B- Les méthodes de prénylation des molécules en synthèse organique

1) Prénylation directe
2) Prénylation indirecte *via* le réarrangement de Claisen

II. Synthèse du noyau diméthylbenzopyrane

A- Les méthodes de synthèse organique des diméthylbenzopyranes

1) Accès direct aux diméthylbenzopyranes
2) Synthèse des diméthylbenzopyranes de façon indirecte *via* Claisen

III. Travaux personnels

A- Les différentes stratégies pour synthétiser les curcuminoïdes phénylés

1) Première approche : la synthèse en mode direct
2) Deuxième approche : Synthèse *via* Claisen

B- La synthèse des diméthylepyrano-curcuminoïdes

IV. Activités biologiques

A- Activité antiparasitaire
B- Activité antibactérienne
C- Activité antifungique
D- Cytotoxicité
E- Activités antioxydante et anti-inflammatoire
F- Effet anti-agrégant de fibrilles amyloïdes

V. Conclusion

I. La prénylation des substances naturelles

La prénylation joue un rôle majeur dans la diversification des produits naturels aromatiques, tels que les phénylpropanoïdes, flavonoïdes et coumarines.
La prénylation contribue en particulier à la diversification des flavonoïdes, en raison :
i. de différences de position sur les cycles aromatiques prénylés.
ii. de différentes longueurs des chaînes prényle.
iii. des autres modifications du prényle, comme par exemple, une cyclisation ou une hydroxylation. Beaucoup de flavonoïdes prénylés ont été identifiés comme composants actifs dans des plantes médicinales avec des activités biologiques, variées et intéressantes : antibactériennes,[1] antitumorales,[2] antivirales,[3] antileishmaniennes, et la production d'oxyde anti-oxydants.[4]

A- Rappels de biosynthèse

La biosynthèse des composés prénylés représente la convergence des voies shikimate ou polyacétate fournissant un substrat aromatique et la voie des isoprénoïdes dérivée du mévalonate ou de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), qui fournit les prényles de la chaîne. Dans ce rappel, nous n'allons discuter que les deux voies de la partie isoprène.[5] Les unités prényle **136** sont constituées de cinq carbones (C_5) (**Figure 3-1**). Elles sont introduites sur les substrats par des formes dites « activées » de l'isoprène à savoir le diméthylallyldiphosphate ou DMAPP **137** et l'isopentènyldiphosphate ou IPP **138**.

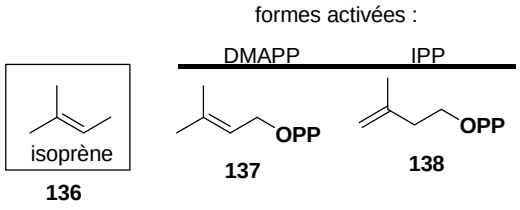


Figure 3-1. Unités prényle.

Comme nous l'avons évoqué, l'origine de l'unité isoprène n'est pas unique, nous pouvons distinguer deux voies de formation constituant un phénomène de convergence évolutive intéressant :

- La première voie de formation de cette unité est la voie dite « du mévalonate (MVA) ». Dans cette voie, l'acétoacétylcoenzyme A **140** se condense avec une molécule d'acétylcoenzyme A **139** pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutarylcoenzyme A **141**. Celui-ci est ensuite converti en IPP **138** obtenu en équilibre avec le DMAPP **137**. Cette dernière réaction est catalysée par l'IPP isomérase (*via* une protonation-déprotonation) (**Schéma 3-1**). [6,7]

[1] Appendino G., Gibbons S., Giana A., Pagani A., Grassi G., Stavri M., Smith E., Rahman M., *J. Nat. Prod*. **2008**, 71, 1427–1430.
[2] Lee J. C., Kundu J. K., Hwang D. M., Na H. K., Surh Y. J., *Carcinogenesis* **2007**, 28, 1491–1498.
[3] Lee J., Oh W.K., Ahn J. S., Kim Y. H., Mbafor J. T., Wandji J., Fomum Z. T., *Planta. Med*. **2009**, 75, 268–270.
[4] Lee M. H. Kim J. Y., Ryu J. H., *Pharm. Bull*. **2005**, 28, 2253–2257.
[5] Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y., *Phytochemistry* **2009**, 70, 1739_45.
[6] Rohmer M., *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 565–574.
[7] Dewick, P. M., *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 181–222.

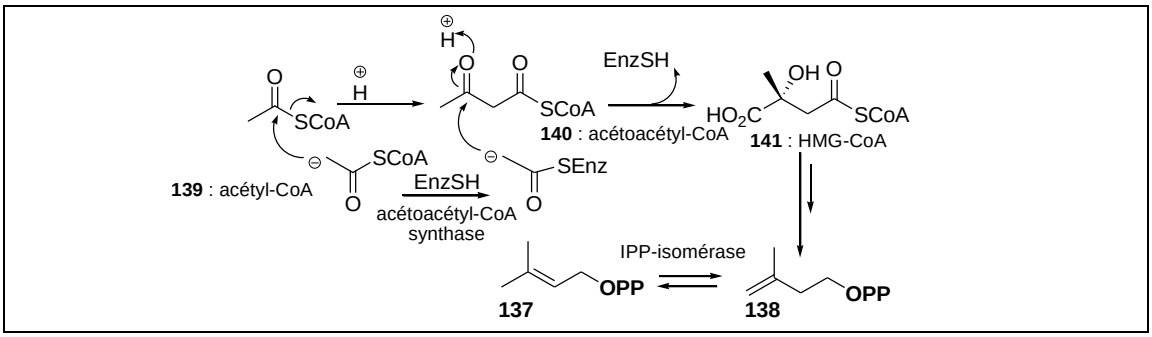


Schéma 3-1. Voie du **MVA** pour la synthèse du **DMAPP 137** et de l'**IPP 138**.

L'étude chez certaines bactéries, de la biosynthèse d'hopanoïdes a démontré l'existence d'une autre voie de biogenèse indépendante de la voie du mévalonate, dite « voie du méthylérythritol phosphate (MEP) ». Cette deuxième voie implique la condensation du pyruvate **142** avec le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) **143** pour conduire au 1-déoxyxylulose-5-phosphate **144**. Celui-ci est ensuite transformé en 2-méthyl-D-érythritol-4-phosphate **145** qui se cyclise en un composé 2,4-cyclodiphosphate *via* l'alcool allylique **146** conduisant à l'IPP **138** et au DMAPP **137** (**Schéma 3-2**) [6,8]

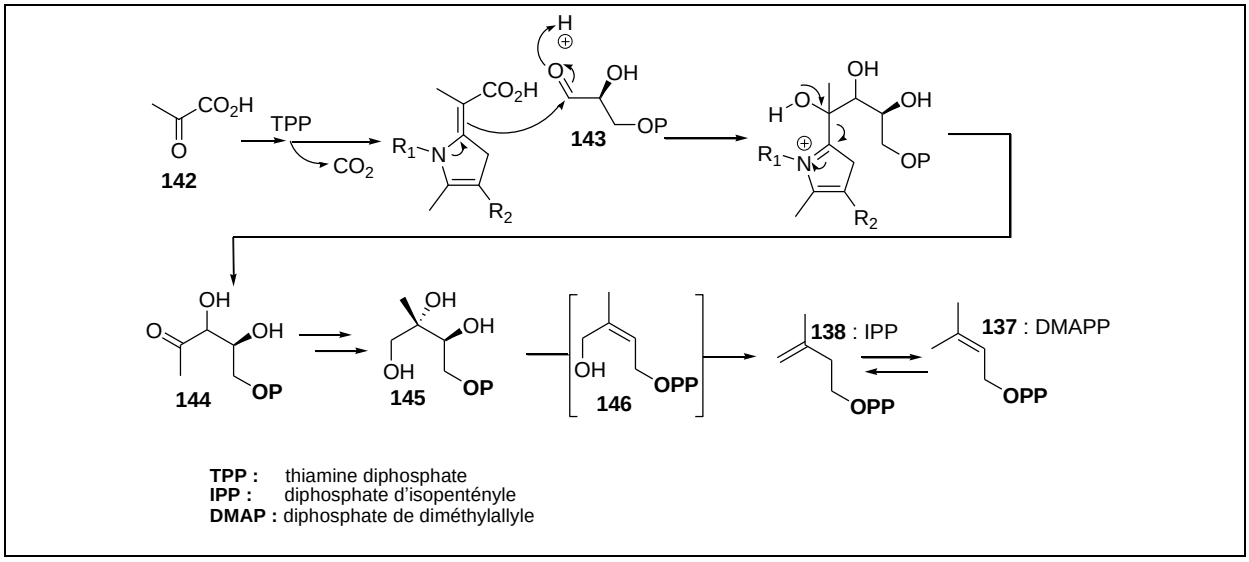


Schéma 3-2. Voie du **MEP** pour la synthèse du **DMAPP** et **IPP**.

L'étape de réaction enzymatique catalysée par les polyphénols prényltransférases (PTases) constitue la réaction de couplage dénommée prénylation **(Figure 3-3)**.

[8] Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H., *Biochem. J.* **1993**, 295, 517–524.

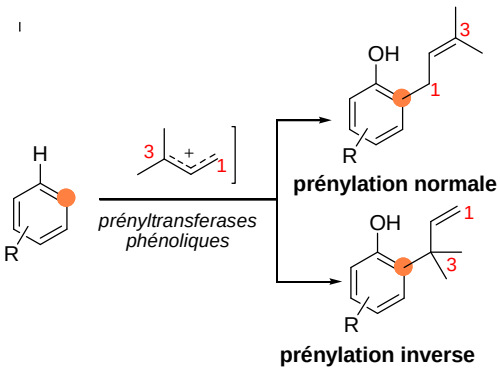
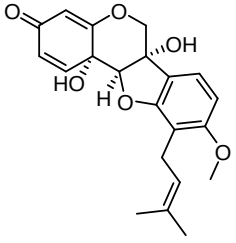


Figure 3-2. La prénylation normale et inverse

Les polyphénols prényltransférases (PTases) sont donc les enzymes qui catalysent la fixation d'unités prényle sur un accepteur aromatique en formant des liaisons carbone-carbone entre le C-1 (prénylation « normale ») ou C-3 (prénylation « inverse ») du substrat isoprénique et un des carbones aromatiques de l'accepteur. (**Figure 3-2**). Ce transfert s'apparente à une réaction de la chimie organique bien connue : la réaction de Friedel-Crafts. Les prényltransférases (PTases) ont été étudiées de manière intensive dans le monde entier, notamment en Allemagne, et aux États-Unis depuis plus de trois décennies.

Les glycéollines, par exemple, sont largement connues comme des phytoalexines produites par le soja, leurs enzymes de biosynthèse ont été étudiées en particulier des années 1970 aux années 1990.[9] Ce sont des dérivés de ptérocarpane auquel un résidu diméthylallyle est introduit sur un noyau aromatique.

L'activité des prényltransférases impliquées a été signalée en 1979 par Zahringer *et al*. Une autre activité de prényltransférases impliquées dans la prénylation de la coumarine a également été étudiée, chez *ammi majus* de la famille Rutaceae à un niveau biochimique.[10]



hydroxycristacarpone **147**

Les deux enzymes ont été signalées comme liées aux membranes des chloroplastes de la plante. Dans un autre exemple, la fraction terpénique d'un antibactérien prénylflavonoïde, le glabrol, de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) a été prouvé comme étant issu de la voie MEP, suggérant que les prényltransférases impliquées sont également localisées dans les chloroplastes.[11]

Récemment, le premier gène de prényltransférase, la SfN8DT-1 de *Sophora flavescens*, a été identifié par l'équipe de K Yazaki,[5] ce gène est responsable de la prénylation de la naringénine **139** (un flavonoïde) sur la position 8 (**Figure 3-4**). Elle est spécifique de flavanones et exploite le DMAPP comme substrat. L'analyse phylogénétique a montré que SfN8DT-1 a la même origine évolutive que les prényltransférases de la vitamine E et de la plastoquinone.

[9] Ebel J., Grisebach H.,*Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 23–27.
[10] Hamerski D., Schmitt D., Matern U., *Phytochemistry* **1990**, 29, 1131–1135.
[11] Asada Y., Li W., Yoshikawa T., *Phytochemistry* **2000**, 55, 323–326.

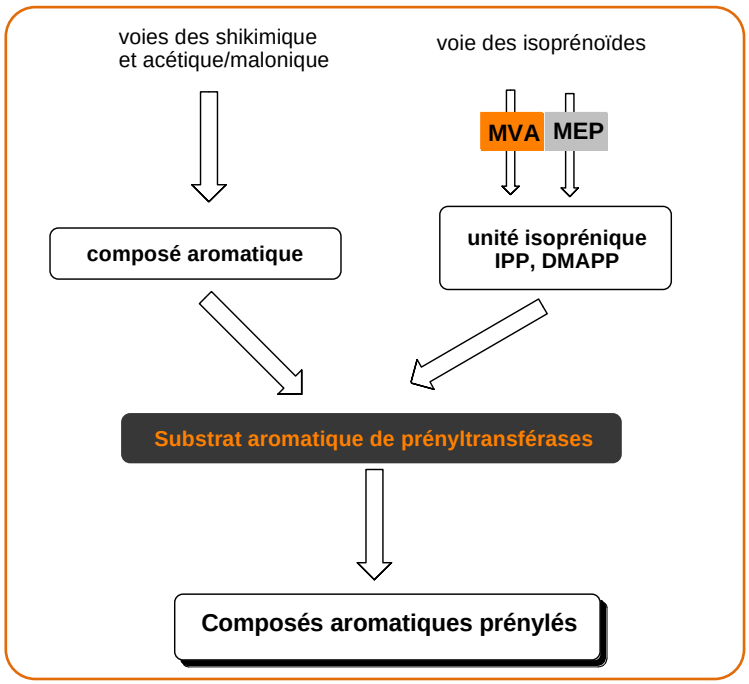


Figure 3-3. Résumé de la biosynthèse de composés prénylés aromatiques représentant le processus de couplage de la voie shikimique et/ou de polyacétique et la voie des terpènes dérivés du mévalonate ou de la voie méthylérythritol phosphate (MEP).[5]

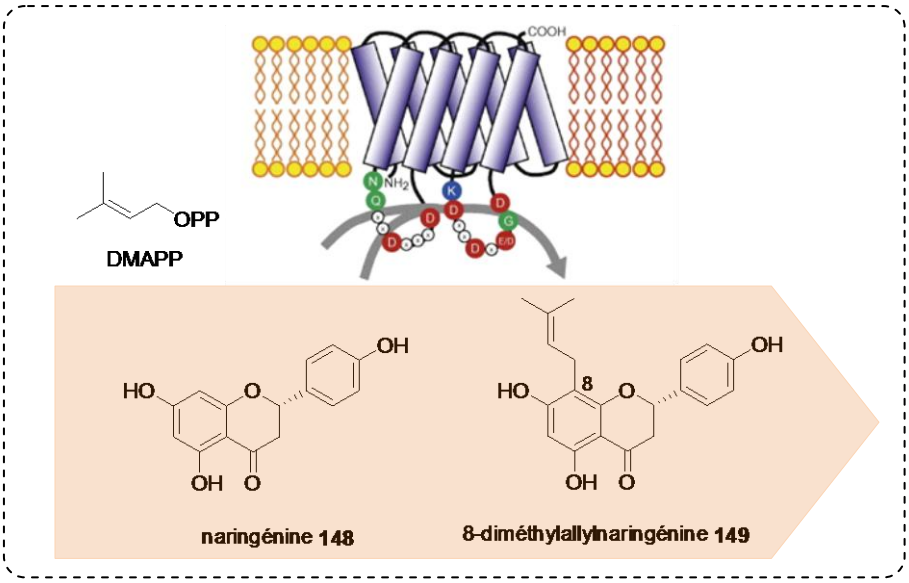


Figure 3-4. Résumé de la réaction de prénylation et topologie putative de la prényltransférase SfN8DT-1 liée à la membrane.[5]

B- Les méthodes de prénylation des molécules en synthèse organique

1) Prénylation directe

Le **Schéma 3-3** nous montre l'idée générale de la prénylation directe. Le groupement prényle se fixe aux carbones aromatiques activés sans avoir aucun contact avec l'hydroxyle aromatique. Les paires d'électrons non partagées de l'oxygène se délocalisent par résonance et

donnent une augmentation de la densité électronique, en particulier dans les positions *ortho* et *para*.

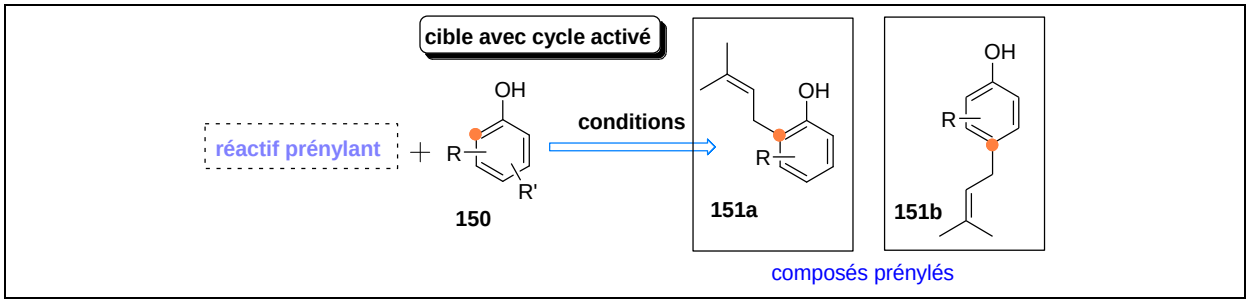


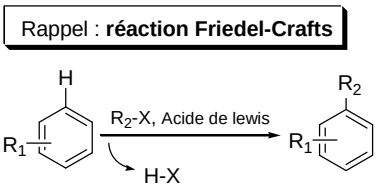
Schéma 3-3. Schéma général de réaction de prénylation.

La prénylation directe passe par plusieurs mécanismes, dans la partie suivante nous allons présenter quelques exemples de ces mécanismes de la prénylation directe.

❖ **<u>Prénylation directe par réaction apparentée à la réaction de Friedel-Crafts.</u>**

Avant commencer, nous allons faire un petit rappel sur la réaction de Friedel-Crafts. Celle-ci a été développée en 1877 par le chimiste français Charles Friedel et son partenaire américain James Crafts.

La réaction de Friedel-Crafts est une réaction chimique de type substitution électrophile aromatique au cours de laquelles un cycle benzénique est alkylé (substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement alkyle) ou acylé (substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement acyle). Nous allons présenter le travail réalisé par plusieurs équipes dans le cadre de la synthèse de composés prénylés par prénylation directe. Nous pouvons trouver des exemples dans les travaux de l'équipe de Marazano de l'ICSN à Gif-sur-Yvette[12] et les travaux du groupe de Puri *et al*.[13]



La prénylation par ce protocole a lieu en milieu acide (BF_3) par une réaction de type SEAr entre un composé phénolique **152** et un carbocation prénylique **153** pour former le composé phénolique prénylé **154** (**Schéma 3-7-a**).

Puri *et al*. ont aussi synthétisé des dérivés prénylés en utilisant comme réactif le 1-bromo-3-méthyl-but-2-ène **155**. La prénylation par ce protocole a lieu en milieu basique (NaH) par une réaction entre un composé phénolique et un bromure de prényle (**Schéma 3-4-b**).

En prenant comme exemple un dérivé schématique du phénol avec seulement une position en *ortho* activée, nous pouvons illustrer les mécanismes respectifs de ces prénylations directes, en remarquant leur ressemblance avec la réaction de Friedel-Crafts **Schéma 3-4-(a-b)**.

[12] Raikar S. B., Nuhant P., Delpech B., Marazano C., *Eur. J. Org. Chem*. **2008**, 8, 1358–1369.
[13] Narender T., Reddy K. P., Shweta, Srivastava K., Mishra D. K., Puri S. K., *Org. Lett*. **2007**, 9, 5369–5372.

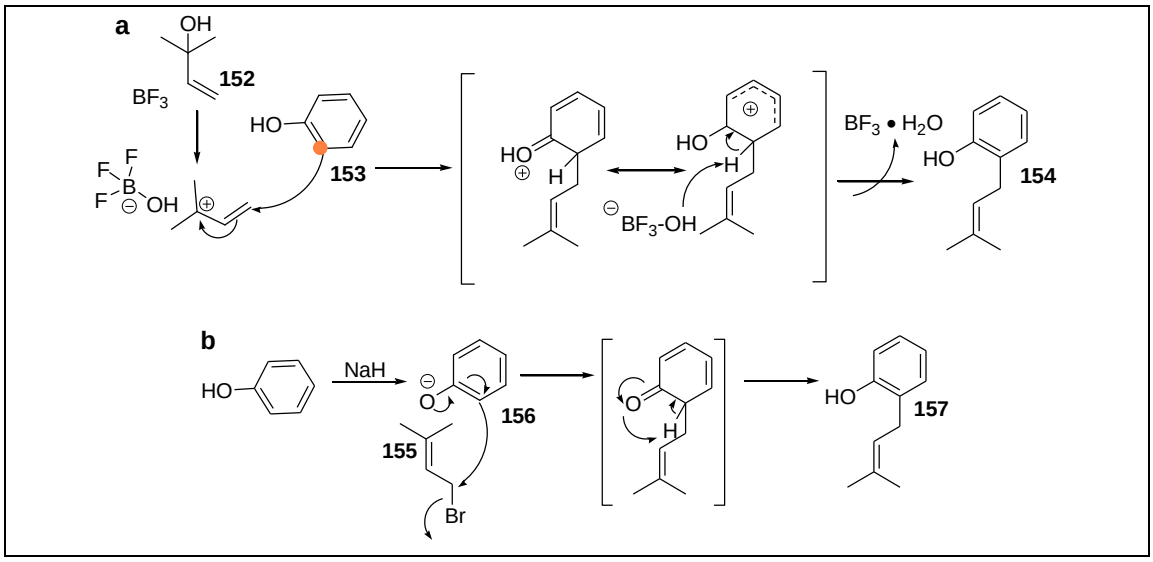


Schéma 3-4-(a-b). Le mécanisme de prénylation directe.

❖ **Prénylation directe *via* des réactions organométalliques**

La particularité des organométalliques est leur grande réactivité. Cette réactivité est due à la polarisation importante de la liaison carbone-métal. En effet, les métaux possèdent une électronégativité faible devant celle du carbone. Dans la liaison C-M, le carbone est donc polarisé négativement, ce qui en fait soit un agent nucléophile, soit une base, soit les deux auquel cas il faut adapter les conditions expérimentales.

Dans le cas de prénylation directe, des chercheurs ont réussi à prényler plusieurs composés, par exemple, Iikubo K *et al.*,[14] ont synthétisé un produit prénylé directement en une seule étape en utilisant le bromure de prényle **155** et *n*BuLi, au cours de la réalisation d'une synthèse totale de l'α-mangostine **160**, un composé naturel isolé de *Garcinia mangostana* (Clusiaceae) (**Schéma 3-5**). Cette méthode permet un accès rapide aux produits prénylés.

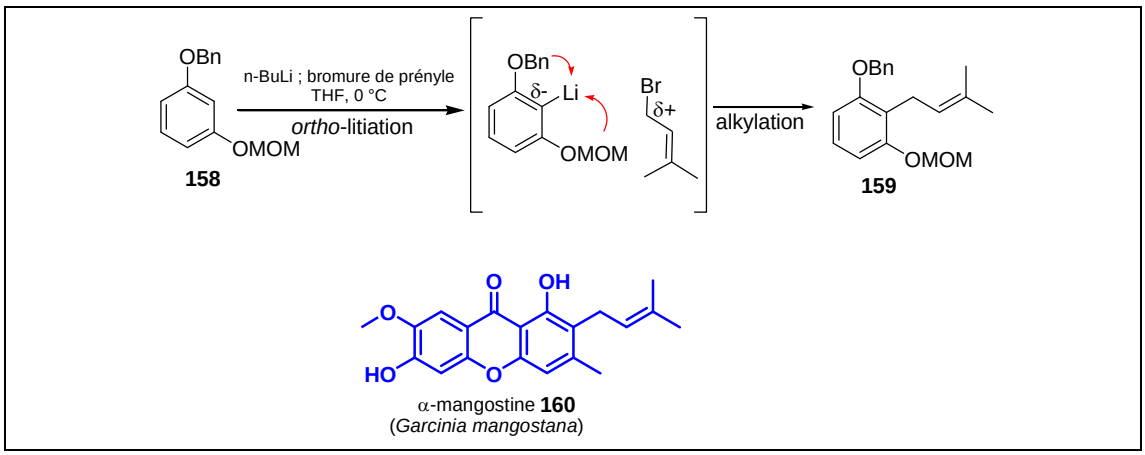


Schéma 3-5. Prénylation *via* réaction *ortho*-métalation.

Le deuxième exemple est la catalyse de la réaction de prénylation par les dérivés du palladium. Récemment, Dai *et al*.,[15] ont réussi à réaliser la prénylation en position 5 d'un indole par un

[14] Iikubo K., Ishikawa Y., Ando N., Umezawa K., Nishiyama S., *Tetrahedron Lett*. **2002**, 43, 291–293.
[15] Dai Q., Xie X., Xu S., Ma D., Tang S., She X., *Org. Lett*. **2011**, 13, 2302–2305.

couplage de Stille catalysé par $Pd(PPh_3)_4$, au cours de la synthèse totale de la tardioxopipérazine A **164**, un métabolite isolé d'une espèce d'*Aspergillus* par Zhu *et al.* 2007.[16]

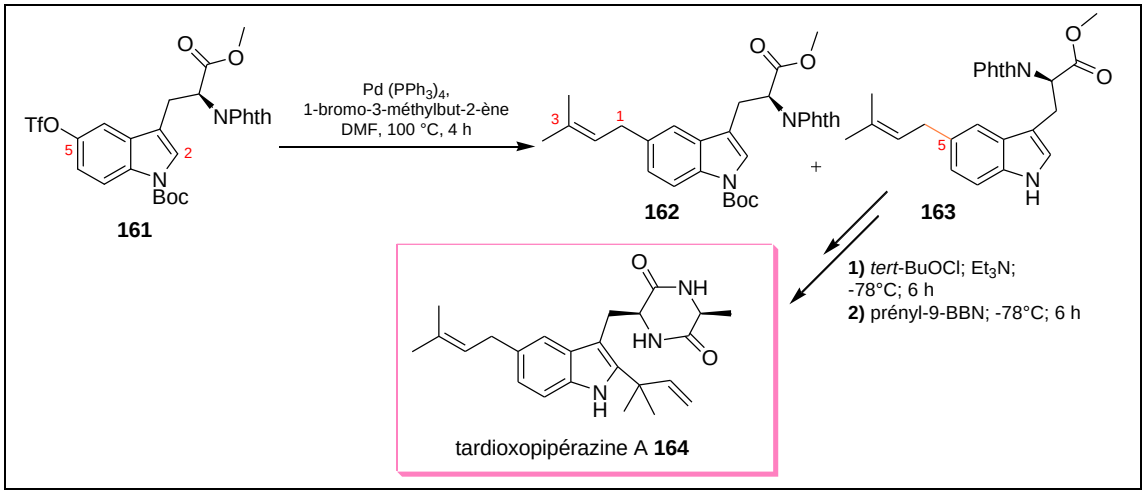


Schéma 3-6. Prénylation par couplage de Stille.

Nous pouvons trouver une autre application des réactions pallado-catalysées pour obtenir des dérivés prénylés dans le travail de Trost *et al.*,[17] Dans ce travail, ils ont étudié la régio et la stéréo-sélectivité de la prénylation et de la géranylation de 3-alkyloxindoles, avec la singularité de pouvoir prényler la position 3 d'un oxindole **165**.

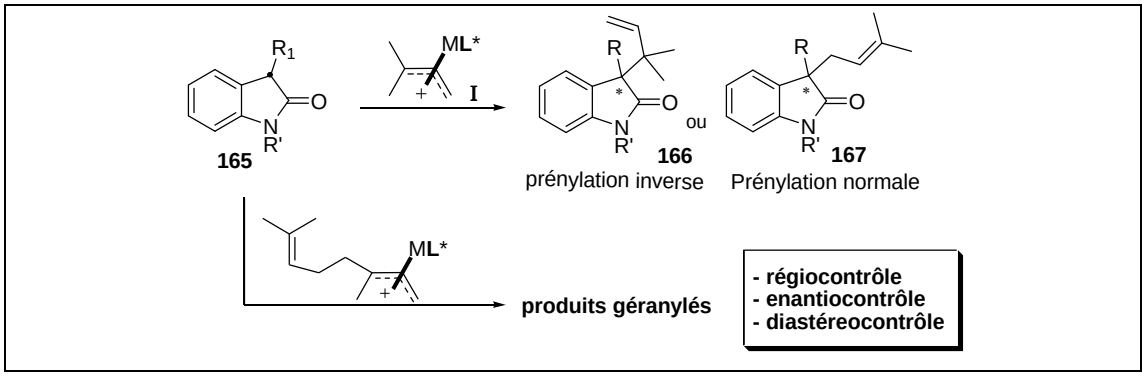
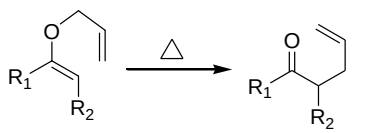


Schéma 3-7. Prénylation d'oxindole par Trost *et al*.

2) Prénylation indirecte *via* le réarrangement de Claisen

Le réarrangement de Claisen est une réaction chimique formant une liaison carbone carbone, découverte par Rainer Ludwig Claisen. Lorsqu'un un vinyl éther allylique est chauffé, une transposition sigmatropique [3,3] a lieu et donne un composé carbonylé γ,δ-insaturé.[18] La variante aromatique du réarrangement de Claisen est le réarrangement sigmatropique [3,3] d'un phényl éther allylique en un intermédiaire qui tautomérise rapidement pour donner un phénol substitué en *ortho* (**Schéma 3-8**).

Rappel : **réarrangement de Claisen**



[16] Wang W.-L., Lu Z.-Y., Tao H.-W., Zhu T.-J., Fang Y.-C., Gu Q.-Q., Zhu W-M., *J. Nat. Prod*. **2007**, 70, 1558–1564.
[17] Trost B. M., Malhotra S., Chan W. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 7328–7331.
[18] Hiersemann M., Abraham L., *Eur. J. Org. Chem*. **2002**, 9, 1461–1471.

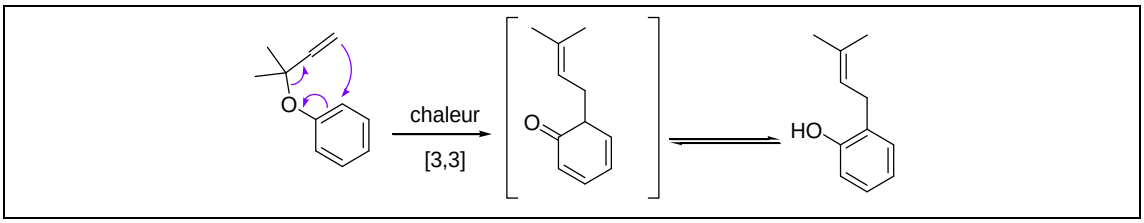


Schéma 3-8. Le réarrangement de Claisen.

Diverses approches peuvent être appliquées pour procéder à la prénylation *via* un réarrangement de Claisen. Dans les différentes synthèses décrites dans la littérature, nous allons nous focaliser sur la synthèse de xanthones, des composés naturels isolés du genre *Garcinia.*

Les xanthones sont des composés polyphénoliques. Plus de 200 xanthones ont été identifiées (**Figure 3-5**), plus particulièrement chez des Bonnetiaceae et Clusiaceae et se retrouvent dans certaines espèces de Podostemaceae.

Beaucoup de ces xanthones sont trouvées dans le péricarpe du mangoustan (*Garcinia mangostana*), un fruit de l'Asie du sud. Ces composés sont fréquemment prénylés ou polyprénylés.[19]

L'équipe de Theodorakis a beaucoup travaillé sur les xanthones dites ″en cages″ et a publié plusieurs articles au cours des cinq dernières années.

Au cours de son travail, l'équipe a développé des méthodes de prénylation indirecte *via* le réarrangement de Claisen, soit en préparant plusieurs réactif prénylant, soit en changeant les autres paramètres réactionnels.

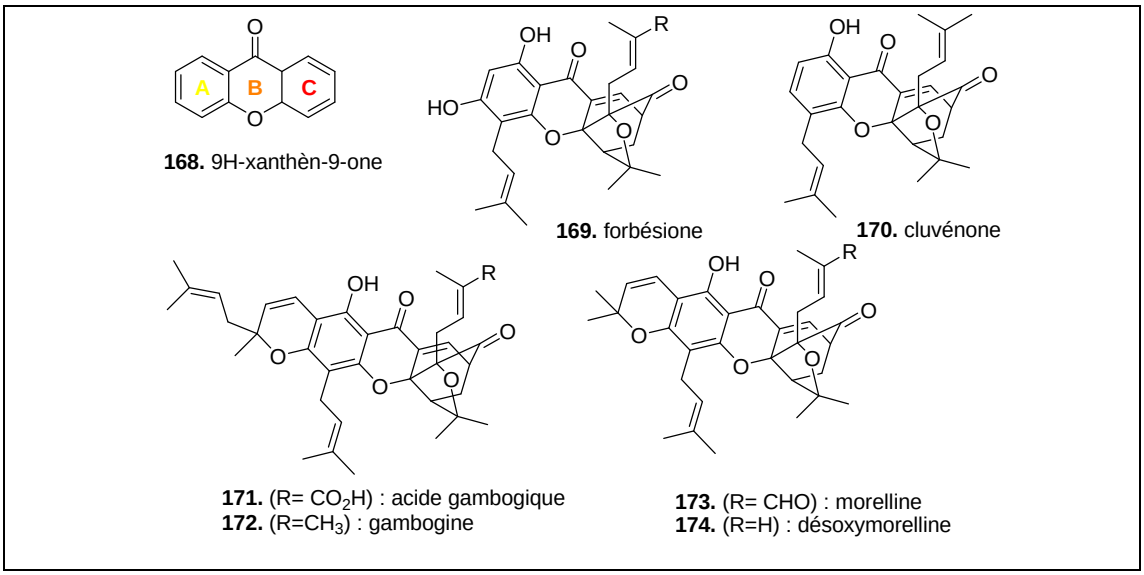


Figure 3-5. Exemples de xanthones en cage.

Nous allons présenter quelques exemples de synthèses réalisées par cette équipe. Dans le premier exemple, la prénylation a été réalisée par un dérivé de bromure de prényle **190**, ou par 3-chloro-3-méthyl-but-1-yne **189**, suivie par une réduction de triple liaison en double liaison après l'accrochage. Les trois produits **186**, **187**, **188** sont préparés en chauffant les composés **181**, **182** porteurs deux groupements prényle dans le DMF par un réarrangement.

[19] Obolskiy D., Pischel I., Siriwatanametanon N., Heinrich M., *Phytother. Res*. **2009**, 23, 1047–1065.

Cette séquence se compose de deux réarrangements : le premier est une réaction de Claisen avec réarrangement d'un seul groupement prényl. Le second réarrangement implique les deux groupements prényle. Le **schéma 3-9** présente ces travaux.[20]

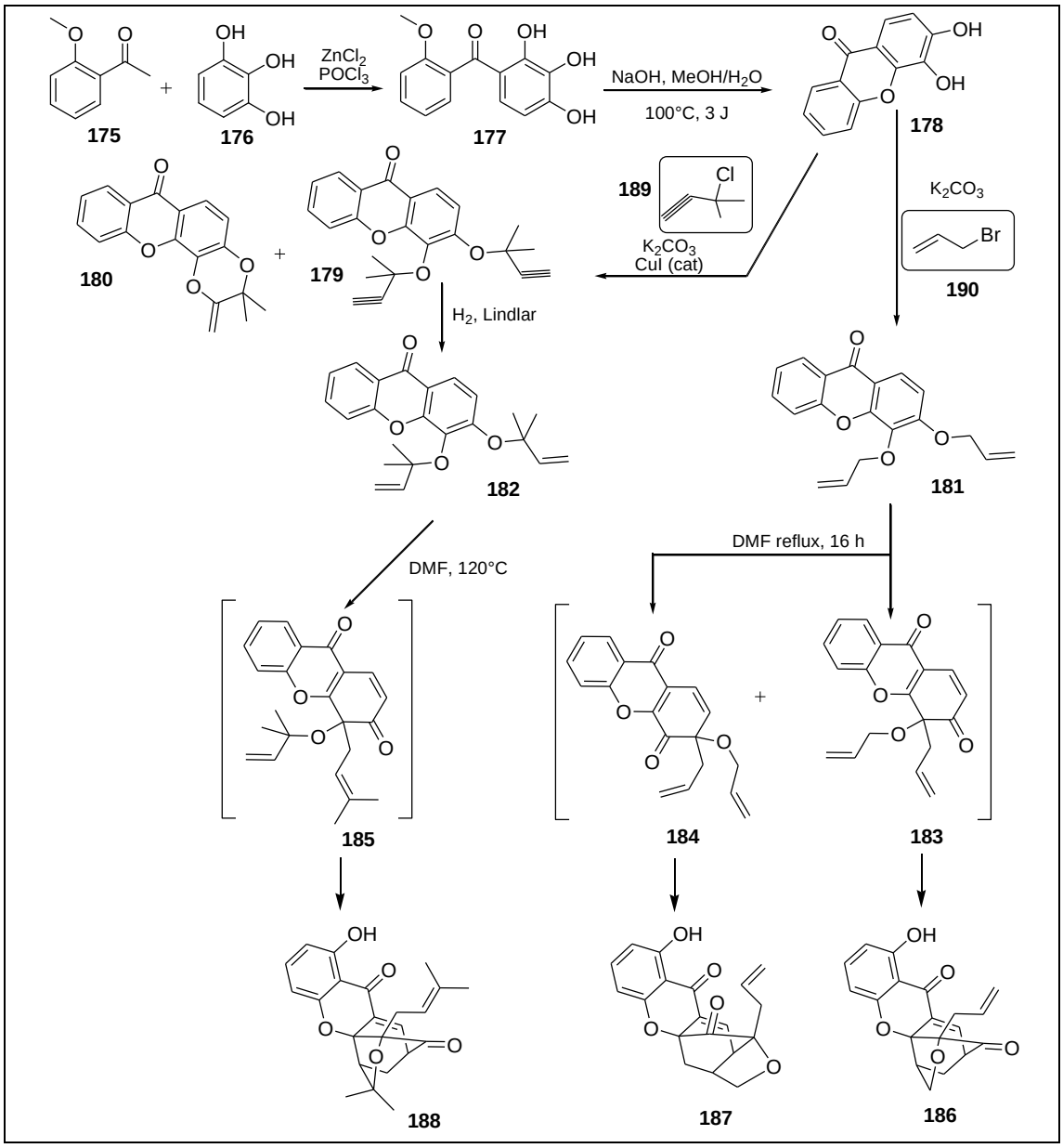


Schéma 3-9. Résumé de synthèse réalisée par Batova A *et al*. **2007**.

Toujours autour de la synthèse de xanthones, Chantarasriwong *et al*., ont présenté également une nouvelle méthode catalysée par Pd(0) pour la prénylation inverse de catéchols par plusieurs réactifs prénylants, en changeant le groupement partant porté par ces réactifs. Le **Schéma 3-10** résume la voie générale de prénylation avec les réactifs prénylants employés.[21]

En utilisant le carbonate de 1,1-diméthylpropényl isobutyle **194** comme réactif prénylant avec Pd(0) comme catalyseur, le composé **193** a été synthétisé avec un rendement 62-69 %. Pour

[20] Batova A., Lam T., Waschołowski V., Yu A. L., Giannis A., Theodorakis E. A., *Org Biomol Chem*. **2007**, 5, 494–500.
[21] Chantarasriwong O., Cho W. C., Batova A., Chavasiri W., Moore C., Rheingold A. L., Theodorakis E. A., *Org. Biomol. Chem*. **2009**, 7, 4886–4894.

améliorer le rendement d'autres réactifs ont été testés, avec le carbonate de 1,1-diméthylpropényl *t*-butyle **195**. Le rendement en composé **193** atteint 90-92 %.
Par contre, en utilisant le carbonate de *bis* (1,1-diméthylpropenyl) **196** comme réactif avec Rh(I), aucun composé prénylé n'est formé.

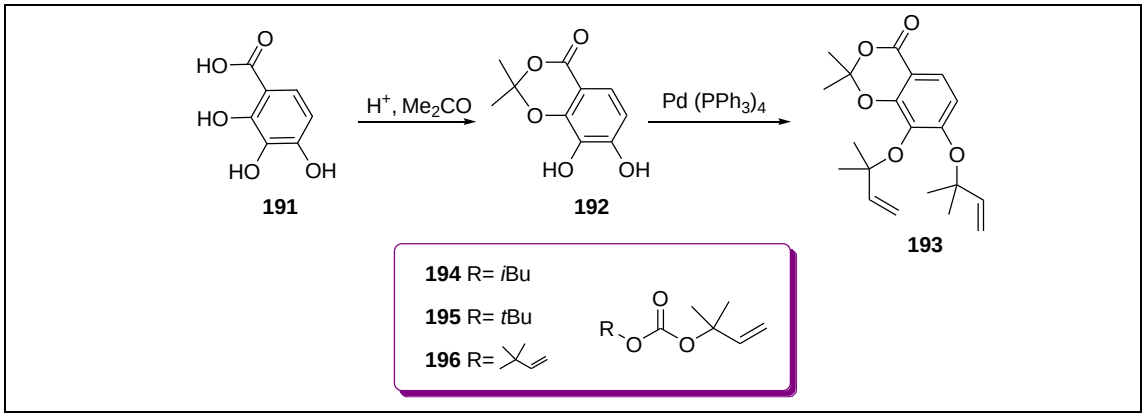


Schéma 3-10. Résumé de la synthèse réalisée par Chantarasriwong *et al.* **2009**

II. Synthèse du noyau diméthylbenzopyranes

Dans la voie de biosynthèse des diméthylbenzopyranes, une attaque nucléophile du phénol sur un époxyde intermédiaire **201** issu de **200** pourrait conduire à la formation d'un cycle à cinq (furane) ou un cycle à six (pyrane) couramment rencontrées dans les produits naturels (**Schéma 3-12**). Cette cyclisation est catalysée par une mono-oxygénase Cytochrome P450–dépendante, et nécessite du NADPH cofacteurs et l'oxygène moléculaire.

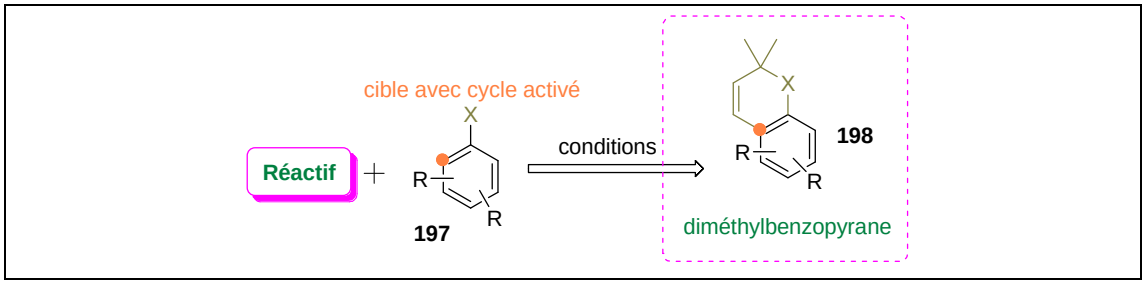


Schéma 3-11. Schéma général du motif synthèse diméthylbenzopyrane.

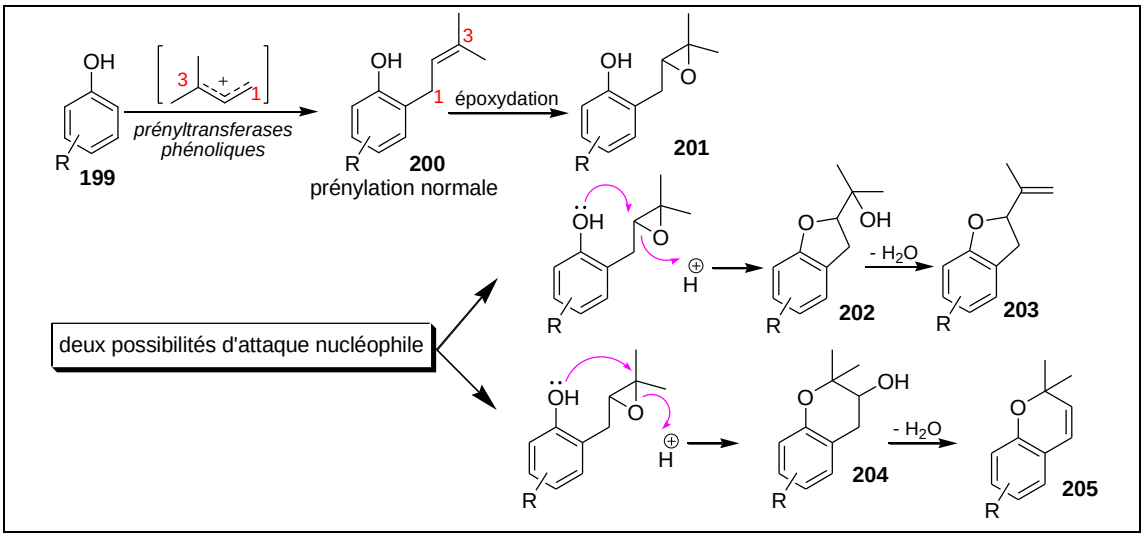


Schéma 3-12. Biosynthèse de diméthylbenzopyrane.

A- Les méthodes de synthèse organique des diméthylbenzopyranes.

1) Accès direct aux diméthylbenzopyranes

Nous pouvons trouver plusieurs méthodes pour la synthèse de diméthylbenzopyranes impliquant des réactifs différents appliqués sur des composés phénoliques. Parmi ces méthodes nous allons présenter les trois principales.

- **Formation du noyau dimétylbenzopyrane directe par réaction apparentée à la réaction de Friedel et Crafts**.

En **2003**, l'équipe de Theodorakis a publié la synthèse d'un noyau diméthylbenzopyrane en utilisant l'acide β,β–diméthylacrylique, par une réaction de Friedel-Crafts BF_3.Et_2O, suivie d'une réduction de la cétone, pour finir par une oxydation classique avec le DDQ (**Schéma 3-13**).[22] Un protocole très proche a également été publié en **2010** par Selepe M. A *et al*., pour la synthèse d'une isoflavone.[23]

- **Formation directe du noyau diméthylbenzopyrane par condensation de Knoevenagel et réaction électrocyclique.**

Une voie innovante a été développée par le groupe de Lee. Dans leur étude, ils ont travaillé avec le 3-méthyl-butèn-2-al et un accepteur phénolique possédant un carbone activé en *ortho*, pour donner une réaction tandem consistant en une condensation de Knoevenagel et une réaction électrocyclique, en employant l'éthylène-diamine-diacétate (EDDA) comme catalyseur.[24, 25]

[22] Tisdale E. J., Vong B. G., Li H., Kim S. H., Chowdhury C., Theodorakis E. A., *Tetrahedron*. **2003**, 59, 6873–6887.
[23] Selepe M. A., Drewes S. E., van Heerden F. R., *J. Nat. Prod*. **2010**, 73, 1680–1685.
[24] Lee Y. R., Kim Y. M., Kim S. H., *Tetrahedron* **2009**, 65, 101–108.
[25] Lee Y. R., Xia L., *Synthesis* **2007**, 3240–3246.

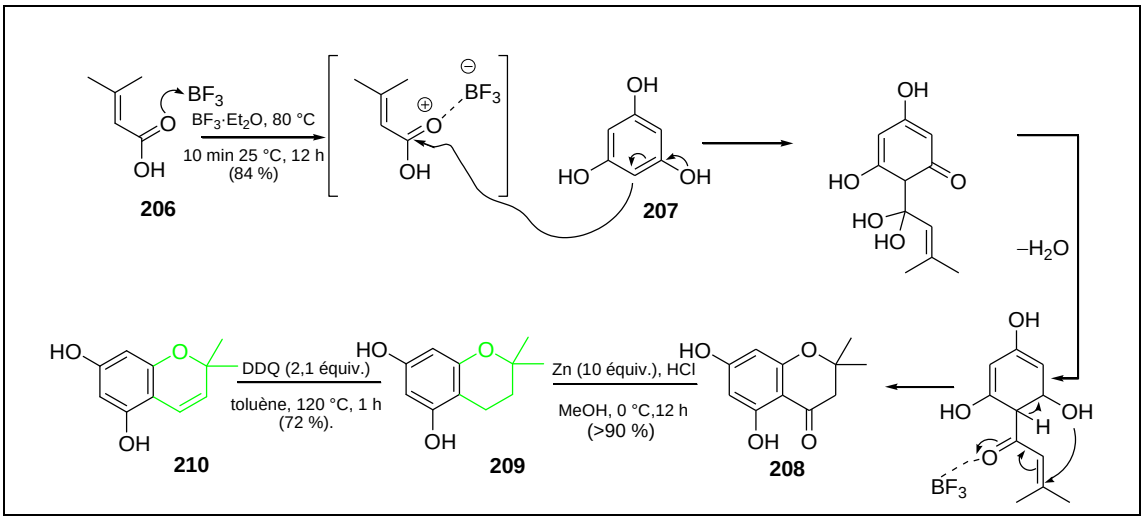


Schéma 3-13. Réaction de Friedel et Crafts décrite par Tisdale *et al.*, **2003**.

Le catalyseur est très important pour cette réaction organocatalysée, ce doit être une molécule aminée. Pour une amine tertiaire ou primaire/secondaire le mécanisme se déroulera d'une façon ou d'une autre (**Schéma 3-14**). Une étude méthodologique concernant les catalyseurs a été réalisée au cours de ce travail, cette étude a montré que le meilleur catalyseur pour cette réaction est un mélange EDDA/TEA.

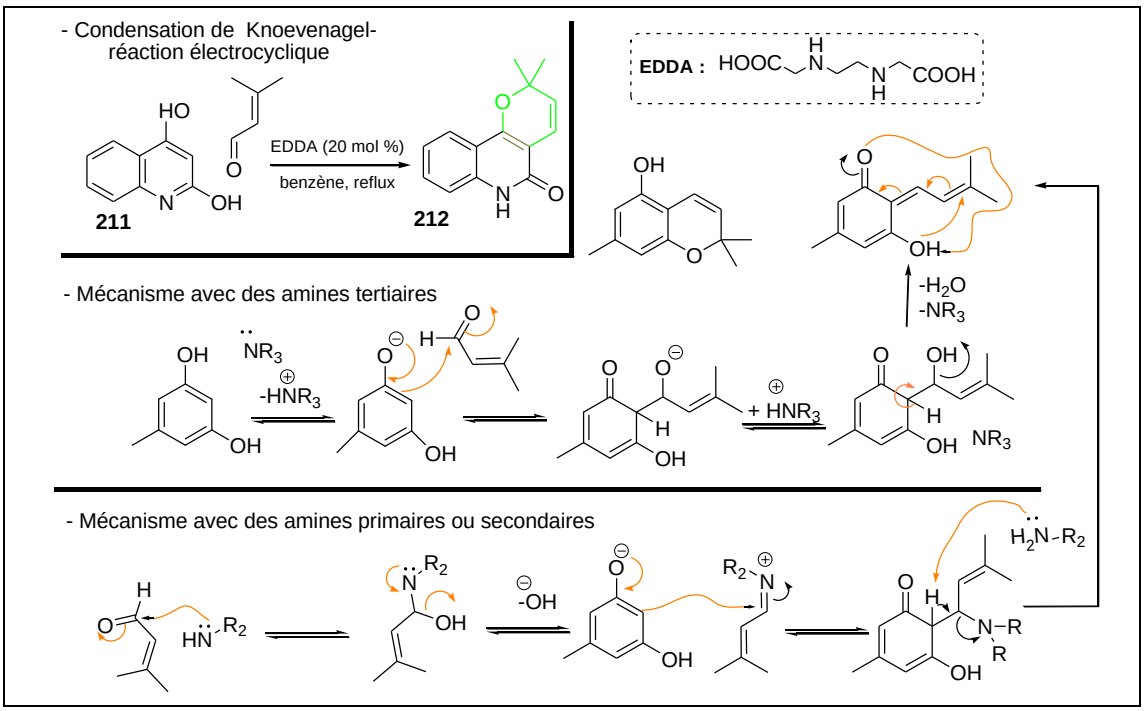


Schéma 3-14. Synthèse de benzopyrane développée par le groupe de Lee : une réaction tandem avec une condensation de Knoevenagel organocatalysée et une réaction électrocyclique.

Formation directe du noyau dimétylbenzopyrane par condensation aldolique.

Une dernière synthèse, a été développée par le groupe d'Erhardt (Ohio, USA).[26] Ce groupe a réalisé la synthèse de la (+)-glycéolline I **213**. La formation d'un noyau diméthylbenzo-

[26] Khupse R. S., Erhardt P. W., *Org. Lett*. **2008**, 10, 5007–5010.

pyrane est effectuée par une de condensation aldolique modifiée catalysée par la picoline, avec du 1,1-diéthoxy-3-méthyl-butène, et un composé phénolique comme accepteur (**Schéma 3-15**).

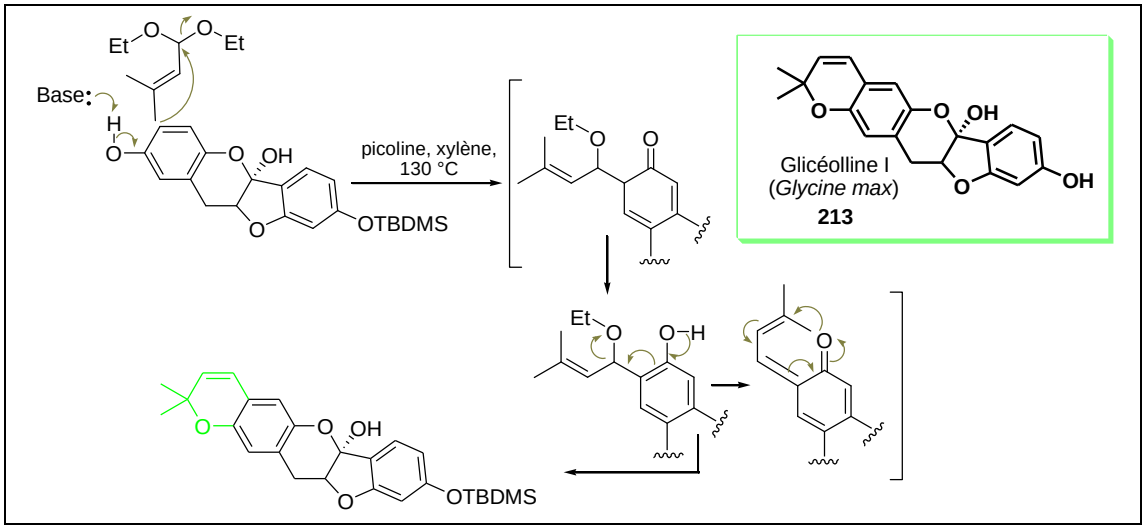


Schéma 3-15. Synthèse de diméthylbenzopyranes développée pour la synthèse de la glycéolline I **213** basée sur une condensation aldolique modifiée.

2) Synthèse des diméthylbenzopyranes de façon indirecte *via* une réaction de Claisen

Le réarrangement thermique sigmatropique [3,3] des éthers propargyliques, ou réarrangement de Claisen, appliqué aux éthers propargyliques, a lieu suivant un protocole réactionnel similaire à celui décrit avec les éthers d'allyle par un traitement thermique ou pour la présence d'un acide de Lewis.

Si nous regardons le mécanisme de la réaction, la formation des éthers des phénols **214** et leur transposition de Claisen ultérieure dans des conditions thermiques précises donnent lieu à un réarrangement qui est accompagné d'une désaromatisation que nous pouvons voir dans l'intermédiaire **215**, pour finir avec une réaromatisation qui a lieu par attaque de l'oxygène de l'accepteur sur le carbone 3 de l'unité propargylique, générant la fermeture du cycle diméthylbenzopyrane a lieu (**Schéma 3-16**).

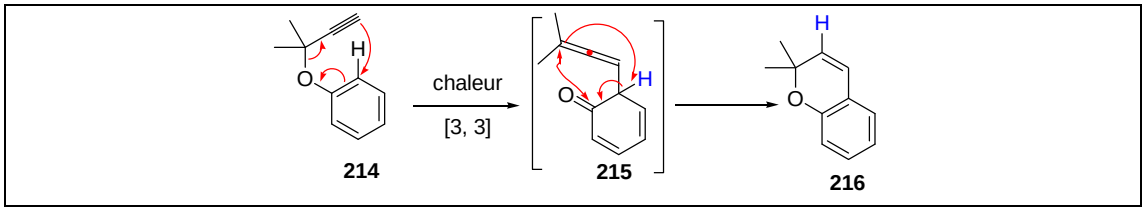


Schéma 3-16. Transposition de Claisen d'un éther de phényle pour donner un dérivé diméthylbenzopyrane **216**.

Dans la littérature nous pouvons trouver plusieurs exemples concernant la synthèse de cycles diméthylbenzopyranes *via* une transposition de Claisen. Par exemple, en 2007, dans le cadre de la synthèse de dérivés antimycobactériens, S. Prado *et al.*,[27] ont publié un protocole de synthèse d'un cycle benzopyrane. Dans cette synthèse, les réactifs employés sont le carbonate de 1,1-diméthyl-propyn-2-yl méthyle **217**, $CuCl_2$ et le DBU pour synthétiser une molécule

[27] Prado S., Janin Y. L., Saint-Joanis B., Brodin P., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Bost P. E., *Bioorg. Med. Chem*. **2007**, 15, 2177–2186.

intermédiaire **214**, (**Schéma 3-17**). Cette dernière subit finalement le traitement thermique qui rend possible le réarrangement de Claisen qui donne un composé avec un cycle pyrane **216**.

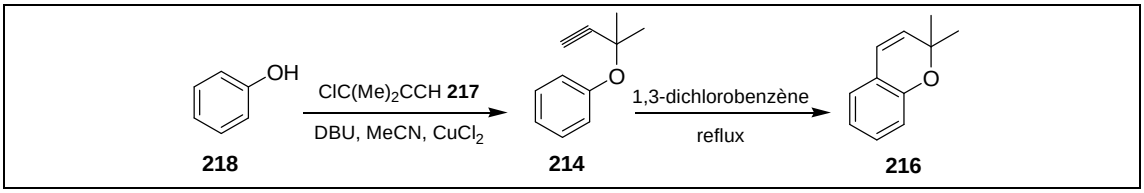


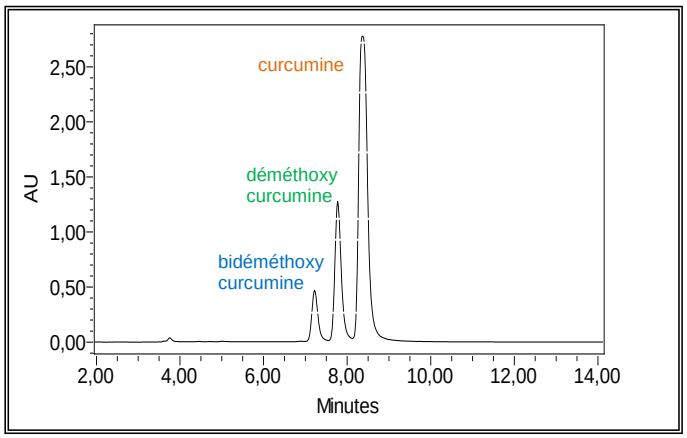
Schéma 3-17. Synthèse de cycle pyrane.

D'autres travaux ont été publiés en 2008 par la même équipe toujours autour de la synthèse de dérivés de 3,3-diméthyl benzofurobenzopyranes.[28]

[28] Alvey L., Prado S., Huteau V., Saint-Joanis B., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Janin Y. L., *Bioorg. Med. Chem*. **2008**, 16, 8264–72.

III. Travaux personnels

La curcumine **58** étudiée au cours de cette thèse est obtenue par une purification de curcumine commerciale (mélange des trois curcuminoïdes naturels), par une colonne de silice flash : phase mobile utilisée : Gradient CH_2Cl_2 → AcOEt 3%. Le **chromatogramme 3-1** montre les trois curcuminoïdes analysés par chromatographie à polarité de phase inverse.
La deuxième voie employée pour obtenir la curcumine est la synthèse à partir de la vanilline **83** et la pentandione **82** «déjà décrite au chapitre précédent».



Phase mobile : CH_3CN /H_2O, 50:50, débit 1 ml.min^{-1}, volume injecté : 10 µL, λ_{max} (Maxplot)
pression : 450 *psi*, température : 30 °C

Chromatogramme 3-1. Les trois curcuminoïdes analysés par **CHLP**.

A. Les différentes stratégies pour synthétiser les curcuminoïdes prénylés

L'idée générale de cette partie est de synthétiser des dérivés originaux de la curcumine **58** pour à la fois appréhender l'activité et pour accéder à une certaine diversité moléculaire non encore décrite.

1) Première approche : la synthèse en mode direct

Dans un premier temps, nous avons essayé de prényler la curcumine de façon directe, par le protocole déjà décrit par Raikar *et al*, et cité dans la partie bibliographique.
Malheureusement (**Schéma 3-18**), nous n'avons pas prénylé la curcumine **58** par ce protocole. Pourquoi la réaction n'a-t-elle pas marché ?
En regardant attentivement le mécanisme de cette réaction (**Schéma 3-4**), nous pouvons observer qu'il est indispensable d'avoir une position *ortho* du groupement phénolique assez électronégative pour assurer l'étape de substitution électrophile aromatique, liée à la résonance du groupement OH phénolique.

La curcumine a un double effet de résonance assuré par les groupements phénolique et méthoxy, les deux groupements en position *ortho* jouent un rôle négatif en distribuant la charge négative sur le cycle aromatique et en conséquence, cette distribution affaibli le caractère électronégatif en *ortho* du phénol. (**Schéma 3-19**).

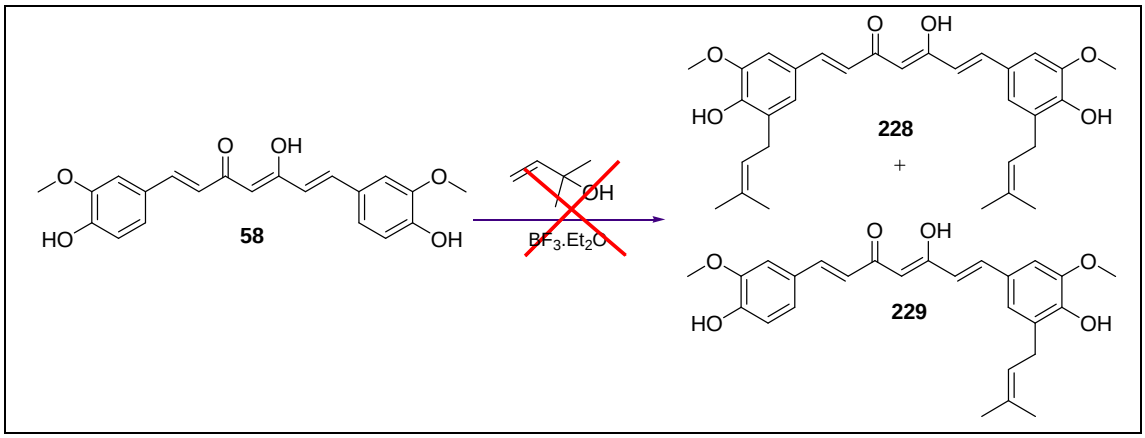


Schéma 3-18. Première tentative de synthèse de curcumines prénylées.

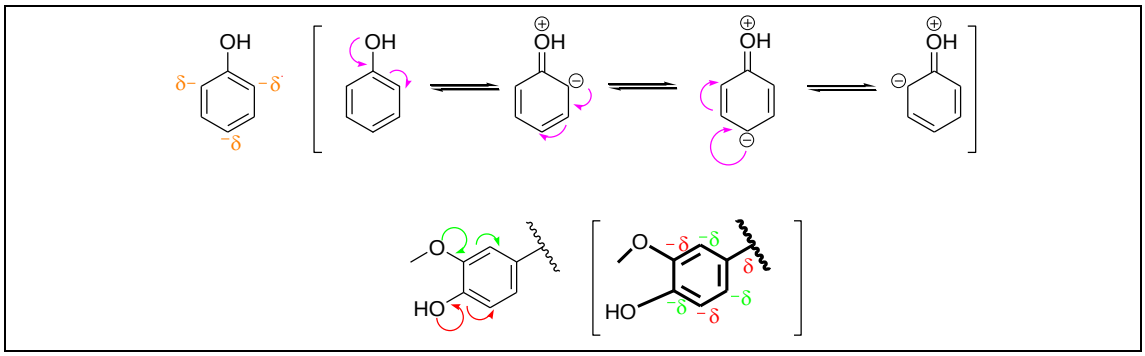


Schéma 3-19. Distribution de charge sur un phénol simple et sur la curcumine.

2) Deuxième approche : Synthèse *via* une transposition de Claisen

Comme la prénylation directe n'a pas été un succès, nous avons essayé de synthétiser les composé prénylés par une autre stratégie de synthèse indirecte, et pour cela deux nouveaux composés intermédiaires **226**, **227** ont été synthétisés en réduisant la triple liaison en double liaison sur les composés **219**, **220** par le réactif de Lindlar (palladium empoisonné) dans l'acétate d'éthyle sous atmosphère d'hydrogène (**Schéma 3-21**). Les deux composés **219**, **220** ont été synthétisés à partir de la curcumine **58** (**Schéma 3-20**). Cette stratégie a été abandonnée pour un problème de reproductibilité en deuxième étape de réduction.

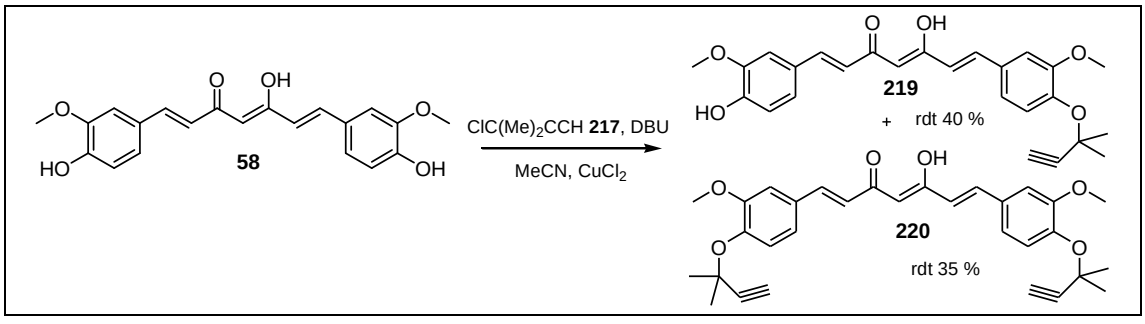


Schéma 3-20. Synthèse des composés **198**, **199**.

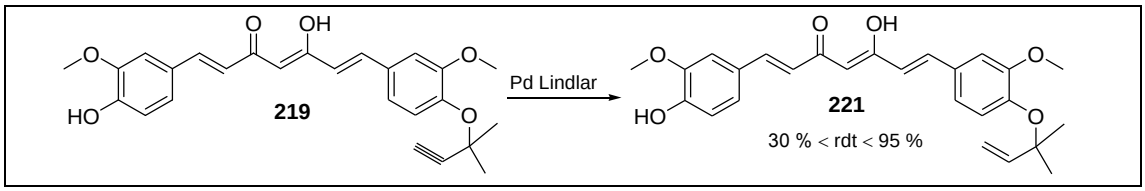


Schéma 3-21. Synthèse du composé **221**.

Au cours de notre travail, une molécule plus apolaire que les deux intermédiaires **219**, **220** a été récupérée, mais les donnés RMN ont été inexploitables et correspondent à un mélange de composés. La spectrométrie de masse indique un composé substitué avec trois groupements alcyne (MS-ESI) : *m/z* $[M+Na]^+$ 589. Une analyse par CLHP à polarité de phase inverse a montré la présence de deux composés (deux pics). De même masse molaire qui correspondent vraisemblablement à la curcumine tri-substituée ce qui signifie plusieurs possibilités d'accrochage du groupement alcyne : soit au niveau de l'hydroxyle du système céto-énolique, soit au niveau de carbone central du système (**Figure 3-6**).

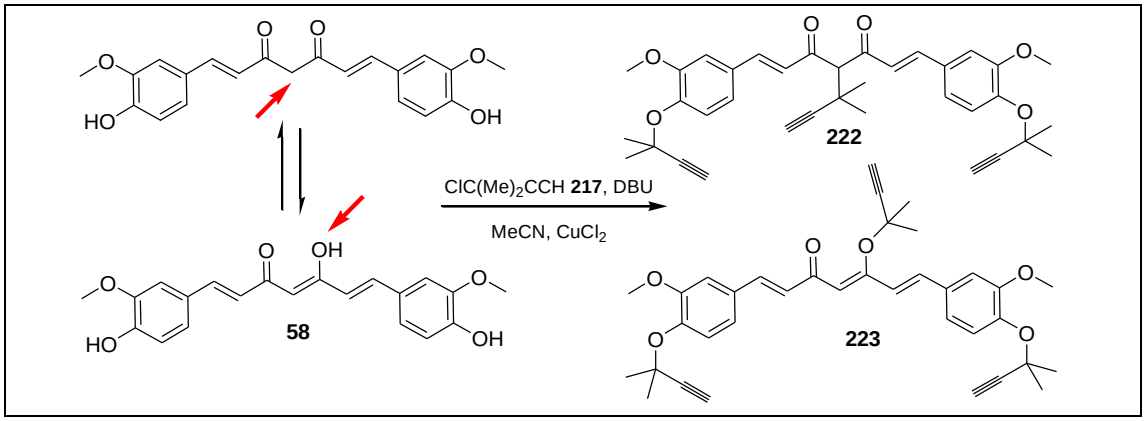


Figure 3-6. Dérivés tri-substitués prénylés.

Pour valider cette hypothèse, nous avons décidé de répéter cette expérience, mais cette fois ci en augmentant la quantité de réactifs utilisés et en allant jusqu'à 4 équivalents de chlorobutyne.
Comme cela a été précisé dans le chapitre précédant, la forme dicétonique de la curcumine prédomine en milieu acide ou neutre et en phase solide, et la forme énolique prédomine en milieu alcalin, sans oublier le rôle de solvants dans cette tautomérie.
Cette propriété de la curcumine peut expliquer la présence de ces composés **222**, **223** substitués en différentes positions, sachant que nous ne savons pas comment la curcumine se comporte dans l'acétonitrile, mais il est probable que les deux tautomères existent dans le milieu réactionnel.

En essayant de comprendre le comportement du système céto-énolique dans cette réaction, nous avons préparé une curcumine avec deux groupements phénoliques protégés (**224**), et après traitement avec un excès de chlorobutyne et de DBU, nous avons remarqué la formation d'un composé avec une masse de 585 $[M+H]^+$ correspondant à la molécule protégée porteuse cette fois de deux groupements alcyne **225**.

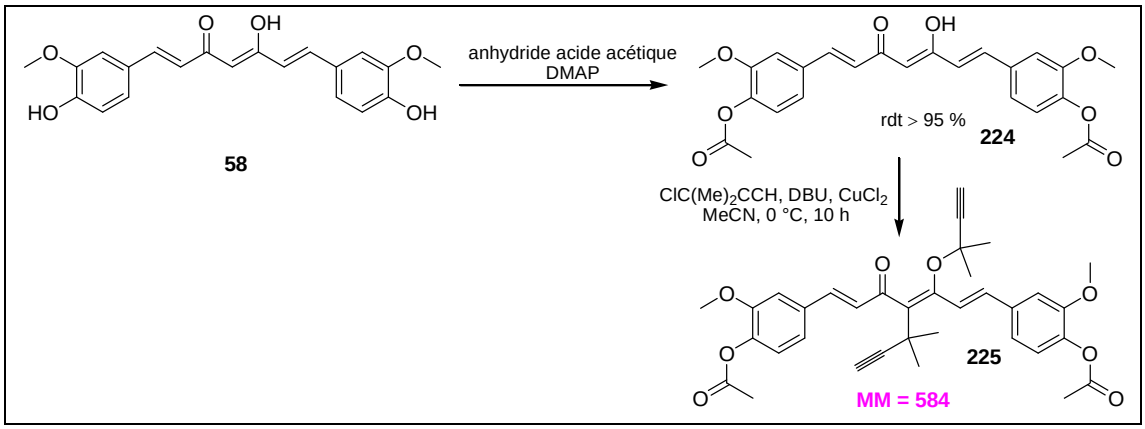


Schéma 3-22. Synthèse des composés.

Toujours pour la synthèse de curcuminoïdes prénylés, une autre voie de synthèse a été adaptée pour prényler l'hydroxyle. Cette voie repose sur une prénylation inverse avec Pd(0) et le carbonate de *tert*-butyle 2-méthyl-3-èn-2-yle comme réactif, pour pouvoir synthétiser les composés **226** et **227 (Schéma 3-23**).

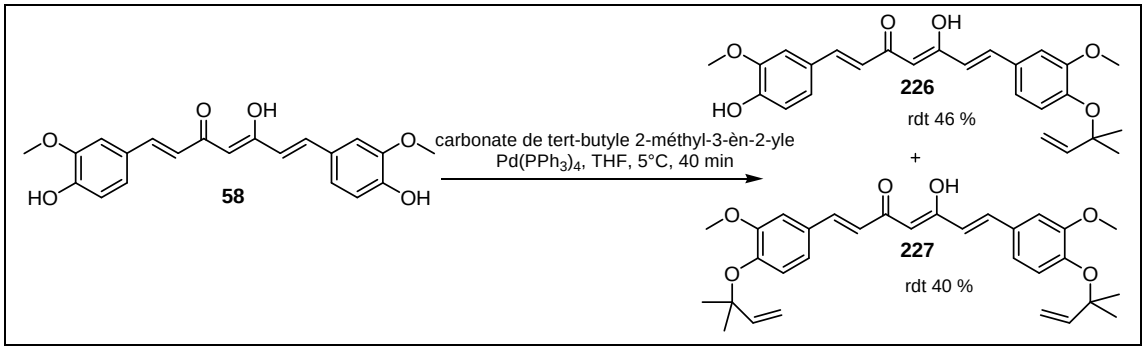
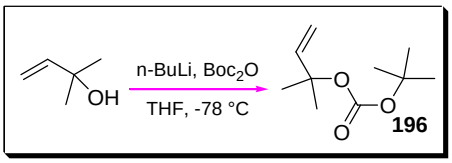


Schéma 3-23. Synthèse des composés **226**, **227**.



Le carbonate de *tert*-butyle 2-méthyl-3-èn-2-yle a été synthétisé selon le protocole décrit par Chantarasriwong *et al*., **2009**. Les composés prénylés mono et diprényle **228**, **229** ont été obtenus également par réarrangement de Claisen, après avoir chauffé les composés **226**, **227** dans le toluène pendant 24 h. **(Schéma 3-24**).

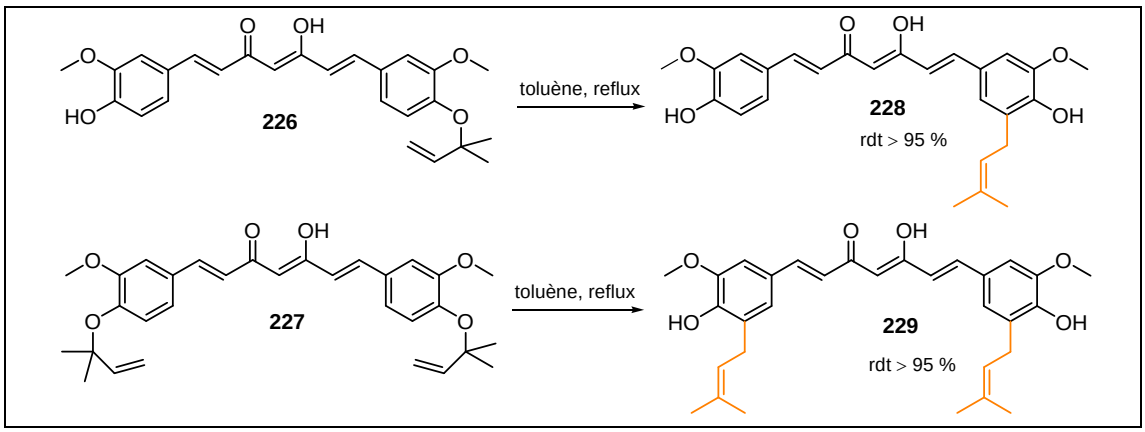


Schéma 3-24. Synthèse des composés **228**, **229**.

B- La synthèse des diméthylpyrano-curcuminoïdes

Les deux composés intermédiaires **219**, **220** qui ont été synthétisés à partir de la curcumine **58** sont les clés de cette synthèse : les composés pyrano-curcumine **230** et **231** ont été synthétisés par réarrangement de Claisen en chauffant les deux composés **219**, **220** (**schéma 3-25**). Le composé mono-diméthylpyranique **230** a été obtenu par réarrangement de Claisen en chauffant le composé **219** dans le 1,3-dichlorobenzène pendant 36 h. De même le composé **231** di-diméthylpyranique, il a également été préparé par chauffage du composé **220** dans le 1,3-dichlorobenzène.

De plus, nous avons essayé de synthétiser des dérivés dépourvus des deux méthyles. Pour cela, les deux composés intermédiaires **232** et **233** ont été synthétisés à partir de la curcumine avec le bromure de propargyle comme réactif dans l'acétone en basifiant légèrement le milieu par le carbonate de potassium (**Schéma 3-26**).

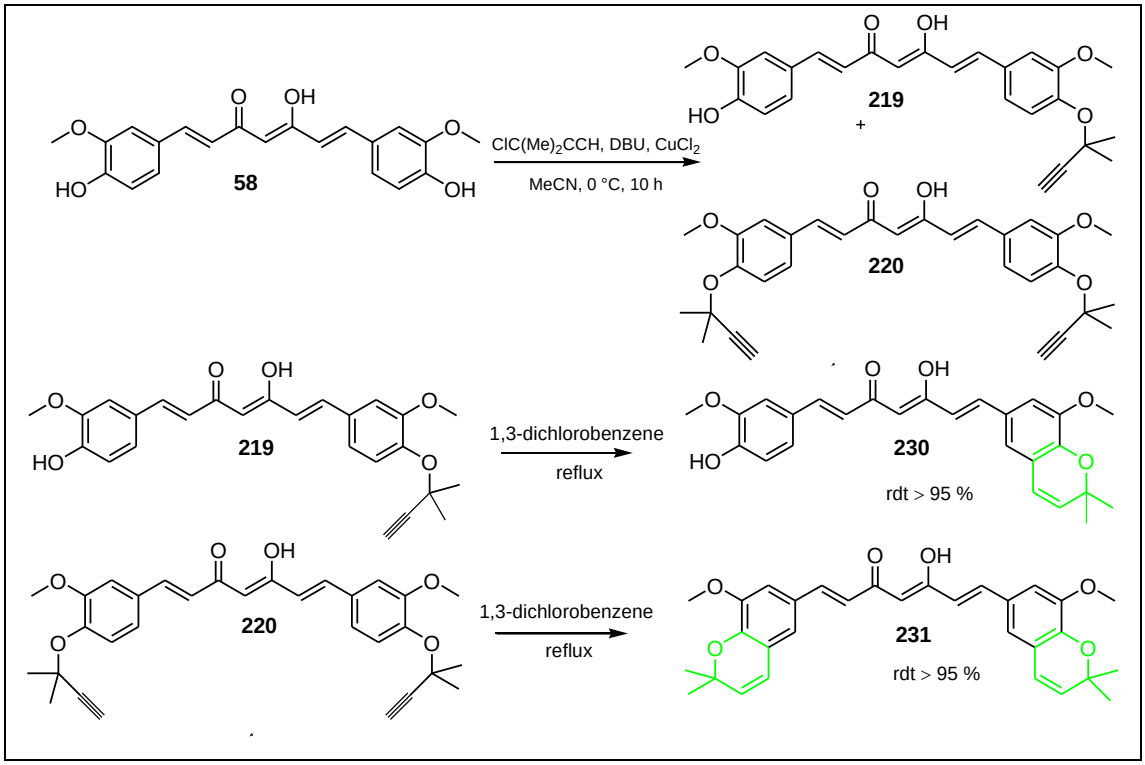


Schéma 3-25. Synthèse des composés **230**, **231**.

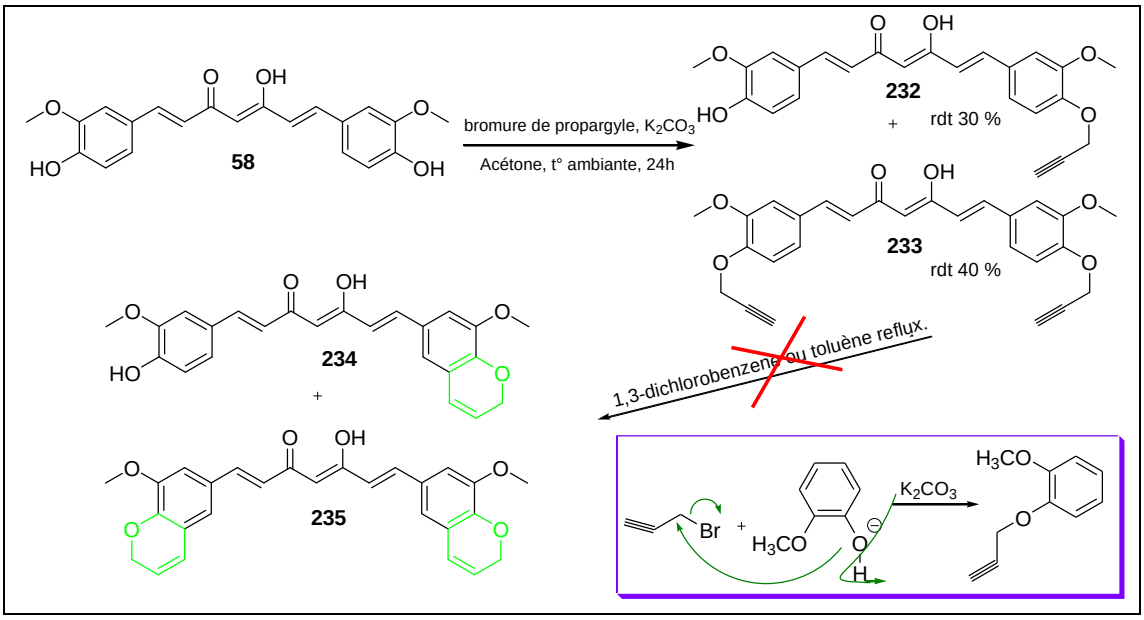


Schéma 3-26. Synthèse des composés **232**, **233**.

En essayant de cycliser les deux composés mono-disubstitués afin de synthétiser les deux composés pyraniques, nous avons chauffé les composés **232** et **233** dans le dichlorobenzène et le toluène pendant 96 h. mais nous n'avons pas observé la cyclisation attendue.
L'effet Thorpe-Ingold ou l'effet *gem*-diméthyle, peut expliquer que les composés **232** et **233** ne se soient pas cyclisés.
L'effet *gem*-dialkyle ou «Thorpe-Ingold» découvert et étudié en 1915 par R. M. Beesley, J. F. Thorpe et C.K. Ingold, se traduit par l'accélération d'une réaction de cyclisation due à la présence de deux groupes alkyles en position géminale. [29] L'explication donnée par ces auteurs, est basée sur le fait que cette accélération est liée à une diminution de l'angle Ø (C=O, C, O) qui rapproche les deux centres réagissants durant la cyclisation. La diminution ou compression de cet angle est induite par la présence des groupes alkyle (**Figure 3-7**).

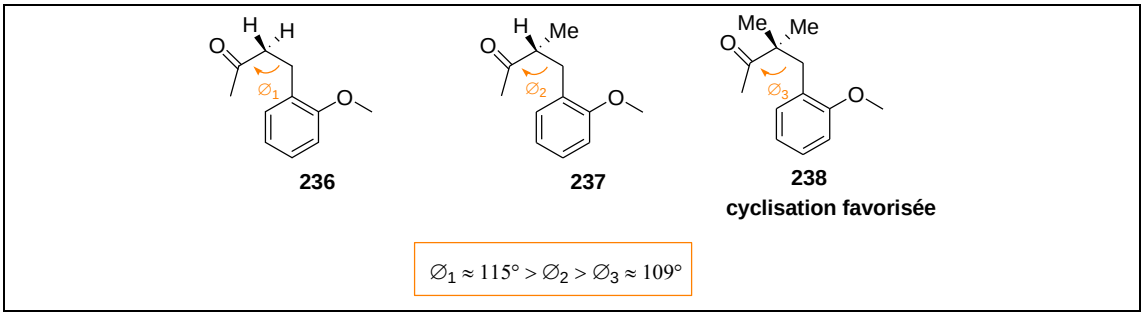


Figure 3-7. Effet Thorpe-Ingold.

L'effet a aussi une certaine contribution thermodynamique comme l'énergie de déformation diminue en allant du cyclobutane-1 au 1,1 méthylcyclobutane et diméthylcyclobutane d'une valeur comprise entre 8 kcal/mol et 1,5 kcal/mol. [30, 31]

[29] Beesley R. M., Ingold C. K., Thorpe J. F., *J. Chem. Soc*. **1915**, 107, 1080–1106.
[30] Ringer, A. L., Magers, DH., *J. Org. Chem*. **2007**, 72, 2533–2537.
[31] Bachrach, S. M., *J. Org. Chem*. **2008**, 73, 2466–2468.

Pour conclure, nous avons montré un exemple d'effet Thorpe-Ingold dans la cyclisation vers la synthèse des dérivés pyrane, car la présence de deux groupements méthyle portés par la chaîne propargylique est visiblement indispensable à la cyclisation.

Les dérivés pyrano-prényles **240** et **243**, ont été synthétisés en plusieurs étapes, en exploitant les deux voies synthétiques : la prénylation et la voie de synthèse des pyranes.
Le composé **240** a été synthétisé par la préparation de l'intermédiaire clé **239** de la curcumine (**schéma 3-27**).

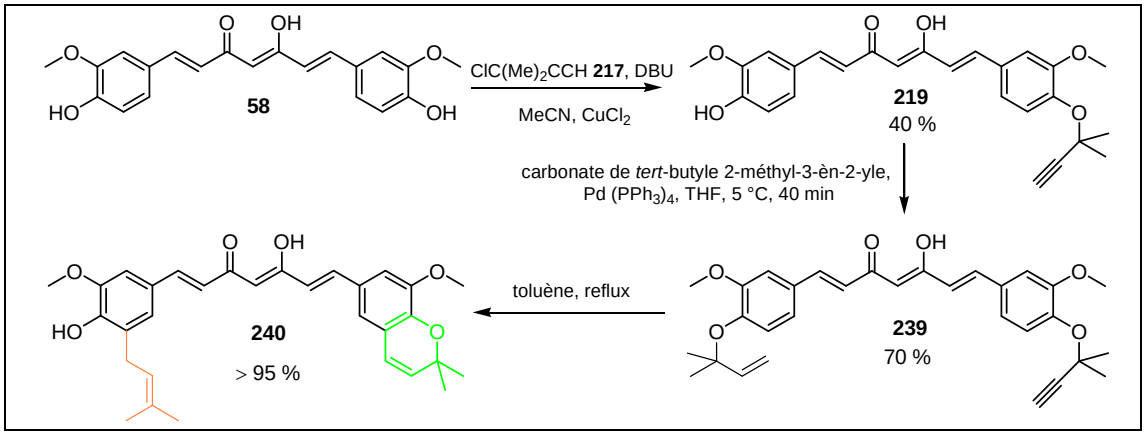


Schéma 3-27. Synthèse de composé **240**.

Concernant le produit **243**, il a été préparé par prénylation de la déméthoxycurcumine **59**, suivie d'une réaction de **242** avec le chlorobutyne comme indiqué dans le **schéma 3-28**.

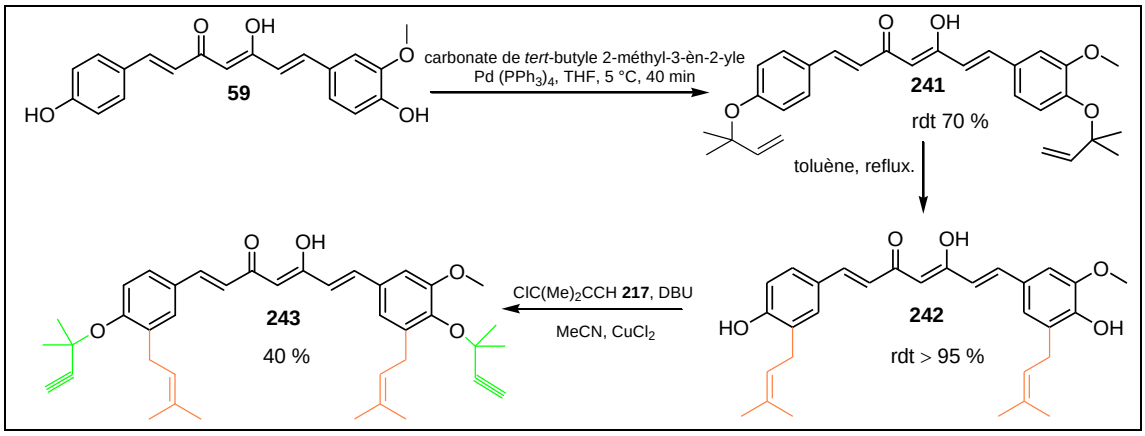


Schéma 3-28. Synthèse du composé **243**.

L'idée de cette synthèse était de synthétiser une molécule **244** porteuse des deux groupements pyrane et prényle sur le même cycle aromatique mais en chauffant dans le dichlorobenzène, la cyclisation pour obtenir le cycle pyrane ne se réalise pas. Nous pensons à une désactivation du cycle aromatique liée à la présence du groupement prényle. (**Schéma 3-29**).

Une étude préliminaire a été réalisée sur les analogues pour savoir s'ils se dégradent comme la curcumine **58** dans les mêmes conditions que celles déjà décrites par J. Wang *et al*. **1997** à 37 °C, (pH = 7,2). Notre étude a monrté que les analogues synthétisés de la curcumine se dégradent de la même façon que la curcumine.

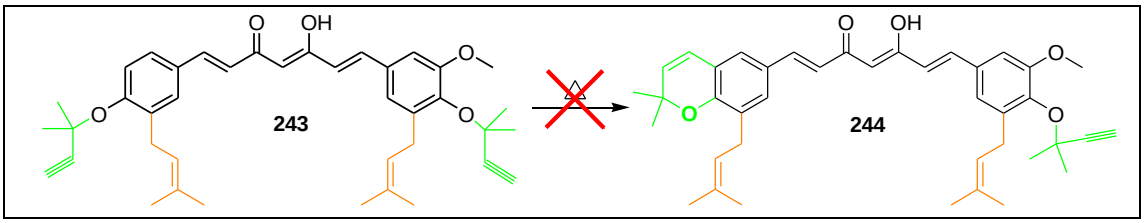


Schéma 3-29. Synthèse prévue de composé **244.**

IV. Activités biologiques

Au cours de notre travail, nous avons évalué l'activité des composés synthétisés dans plusieurs domaines.

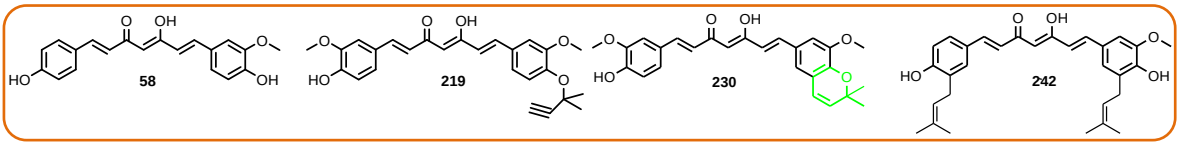
A- Activité antiparasitaire

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous nous somme intéressés aux activités anti-parasitaires, trypanocide, leishmanicide et anti-plasmodium des dérivés curcuminoïdes en comparaison à la curcumine. Le tableau 1-4 résume les résultats des activités antiparasitaires. La curcumine reste la molécule la plus active avec une concentration minimale létale de l'ordre 8,5 µM contre *T. b. brucei* et IC_{50}=12,5±1,0 µM contre *L. donovani*, par apport à la série de composés synthétisés.

composés	*T. b. brucei* CL_{100}% (µM)	*L. donovani* CI_{50} (µM)	*Plasmodium* CI_{50} (µM)
58	**8,5**	**17,5±1,0**	**>10**
59	18,5	18,5±3,0	>10
60	20,5	NT	>10
219	**25**	**12,0±0,1**	
220	57,5	39,0±4,0	
221	57,5	17,5±0,5	
227	50,0	40,0±1,0	
228	57,5	26,0±1,0	10
229	50,0	146±3,0	>10
230	**25,0**	**15,5±0,5**	**8**
231	28,5	68,0±1,0	>10
239	99,5	68,5±1,0	
240	25,0	93,0±2,0	>10
241	105,5	45,5±0,5	
242	**52,5**	**61,5±3,0**	**6,5**
243	41,5	24,5±3,0	
iséthionate de pentamidine	7,4	-	-
miltéfosine	-	1,2	-

NT : non testé

Tableau 3-1. Les résultats d'activités antiparasitaires des dérivés curcuminoïdes.



Une petite augmentation d'activité est obsérvée pour quelques composés, tel que le composé **219** qui présente une activité similaire à la curcumine contre *L.donovani* avec CI_{50} = 12,0±0,1 µM, et les deux composés **230**, **242** qui ont montré une activité supérieure à celle de la curcumine contre *plasmodium*, (CI_{50} = 8 et 6,5 µM pour **230**, **240** respectivement, et $CI_{50} > 10$ pour la curcumine **58**). En comparant l'activité de la curcumine avec les deux composés références la pentamidine iséthionate et la miltéfosine, nous pouvons remarquer que la curcumine a une activité contre *T. b. brucei* presqu'identique à l'activité de la molécule de référence utilisée (la pentamidine iséthionate), c'est pourquoi nous avons décidé d'aller plus loin en évaluant l'activité de la curcumine contre *T. b. brucei*, *in vivo*. Cette activité sera présentée dans le **chapitre 6**.
L'activité trichomonacide (*Trichomonas vaginalis*) de la curcumine et quelque dérivés synthétisés a également été évaluée *in vitro* (**Tableau 3-2**). Aucune amélioration de l'activité des dérivés synthétisés n'a été observée, et la curcumine **58** reste le composé le plus actif avec une CI_{50} =25 mg/mL.

composés	**58**	**229**	**231**
T. vaginalis CI_{50} (mg/mL)	25	>100	>100

Tableau 3-2. Les résultats d'activités trichomonacide des dérivés curcuminoïdes.

B- Activité antibactérienne

Nous avons évalué l'activité antibactérienne de la curcumine et ses dérivés synthétisés par la méthode de diffusion de disque contre plusieurs bactéries, *B.subtillis*, *S. epidermidis, S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, en suivant le protocole suivi dans la partie «huile essentielle» en déposant sur les disques (9 mm) 200 µg de chaque composé. Les composés synthétisés n'ont montré aucune activité antibactérienne.



C- Activité antifongique

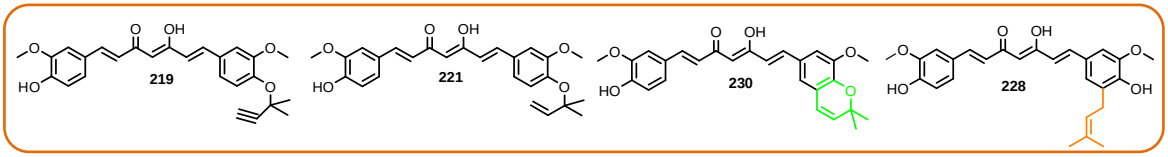
L'activité antifongique a également été évaluée *in vitro*, contre *C. albicans* et *A. fumigatus* en suivant le même protocole que celui décrit dans la partie «huile essentielle» (chapitre **1**).
La curcumine est la seule molécule qui présente une activité avec une CMI de 62,5 µg/mL pour *C. albicans* et *A. fumigatus*, sachant que la référence (l'amphotéricine B) a une CMI=0,064 µg/mL pour *C. albicans* et CMI = 0,50 µg/mL *A. fumigatus.*

D- Cytotoxicité

Des tests de cytotoxicité à 48 h sur cellules *KB* (carcinome buccal humain) ont été réalisés à l'ICSN (Gif-s/Yvette, Dr Thierry Cresteil). Les produits ont une cytotoxicité moyenne à 10 µg/mL ≈ 20 µM, (**Tableau 3-3**) sauf les quatre composés **219**, **221**, **228**, **230,** qui ont une activité supérieure à celle de la curcumine. Toutes ces molécules sont des molécules monosubstituées, apparemment la présence d'au mois un groupement phénolique libre est utile pour la cytotoxicité.
Malgré l'amélioration d'activité pour ces quatre molécules, ces résultats n'autorisent nullement la poursuite de travaux dans une optique anti-tumorale.

composés	concentration (µM)	% d'inhibition	concentration (µM)	% d'inhibition
58	**27,2**	**69±1**		
59	29,8	63±1		
60	32,5	62±1		
219	**22,0**	**86±1**	**2,2**	**14±7**
221	**22,9**	**76±1**	**2,3**	**7±7**
227	19,8	48±4		
228	**22,9**	**75±1**	**2,3**	**0±4**
229	19,8	48±3		
230	**22,0**	**80±1**	**2,2**	**14±3**
231	22,9	53±1		
239	19,9	56±3		
240	19,9	53±5		
241	21,2	48±5		
243	16,5	57±9		
docétaxel	10^{-4}	84		

Tableau 3-3. Activités cytotoxiques sur cellules *KB* des composés hémisynthétiques obtenues.



E. Activité anti-inflammatoire

Nous avons vu que le curcuma est traditionnellement employé comme anti-inflammatoire, et que la curcumine est responsable de cette activité, par action sur des cibles multiples. Il nous a semblé intéressant d'évaluer nos analogues originaux dans un modèle d'inflammation. Une collaboration avec le Dr. B. Pipy (Université Paul-Sabatier, Toulouse) a permis l'accès à un modèle pertinent. Des monocytes humains cultivés, sensibilisés par le zymosan non opsonisé et par le TPA (12-myristate 13-acétate de phorbol) ont été utilisés comme modèle *in vitro*. Ce traitement entraîne une forte réaction oxydative.

Dans une optique de criblage, l'activité anti-oxydante des molécules **228**, **229**, **230**, **231**, **240**, **242** et **243** a été testée, en comparaison avec la curcumine **58**. Les cellules ont été traitées à la concentration de 1 µM. À 24 h, les agents sensibilisants ont été ajoutés, et la production de radicaux libres oxygénés (espèces réactives de l'oxygène ou *Reactive Oxygen Species – ROS*) a été mesurée par chimioluminescence, sur une période de 100 min. Les produits sont inactifs dans le modèle "TPA" (**Figure 3-8**).

Dans le modèle "zymosan", les résultats obtenus sont hétérogènes. La curcumine **58** montre une activité significative par rapport au témoin "solvant", avec une diminution de l'ordre de 60 %. Le produit **230** a une activité similaire. Les produits **231** et **242** présentent une activité supérieure (~ 25 % et 50 % respectivement). Les quatre autres molécules ne présentent pas d'activité significative (**Figure 3-9**). Les résultats ne semblent pas liés à une activité anti-radicalaire directe.

En effet, les dérivés mono et diprénylés **228** et **229**, à phénols libres, sont moins efficaces que les dérivés pyraniques **230** et **231**.
On notera en particulier que **58** est un inhibiteur de la NO-synthase inductible (*i*-NOS),[32] protéine dont l'inhibition est probable dans le modèle employé.[33]

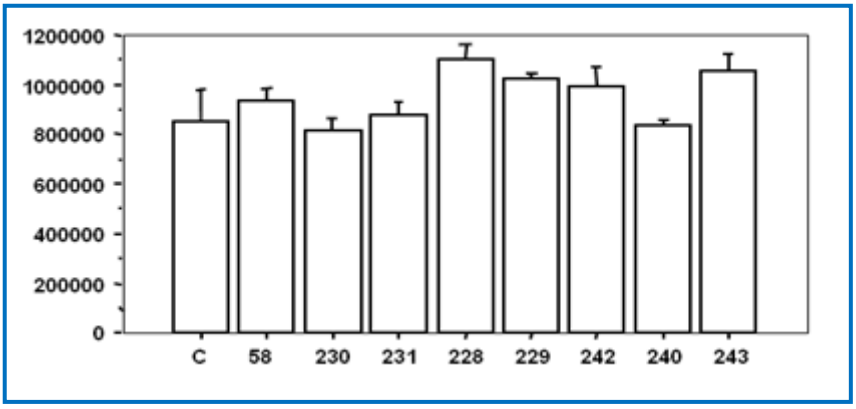


Figure 3-8. Prévention du stress oxydant induit par le TPA dans des monocytes humains
Mesure par chimioluminescence en présence de luminol (100 min) : moyenne ± SEM ; prétraitement des cultures : 24 h ; 1 µM ; n = 3 ; * : *p< 0,05*.

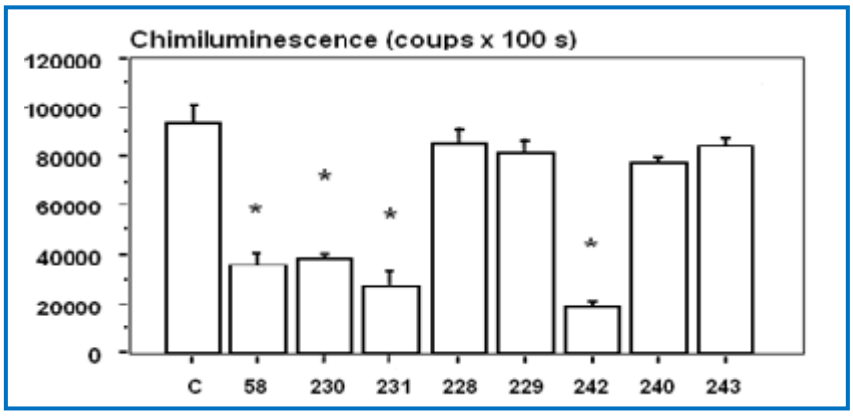


Figure 3-9. Prévention du stress oxydant induit par le zymosan non opsonisé dans des monocytes humains
Mesure par chimioluminescence du luminol (100 min) : moyenne ± SEM ; prétraitement des cultures : 24 h ; 1 µM ; n = 3 ; * : *p< 0,05*.

Si de nombreuses cibles protéiques en lien avec le stress oxydant et l'inflammation ont été mises en évidence pour la curcumine,[32] une action sur des facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation, notamment au niveau macrophagique ou monocytaire, a également été démontrée. Le *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ* (PPAR-γ) et le *Nuclear Factor-Erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor* (Nrf2) sont notamment activés par **58**.[34]
Plusieurs composés de notre série, sélectionnés sur la base de l'expérience précédente, ont subi une investigation dans ce sens : l'expression de plusieurs gènes sous contrôle de Nrf-2 a été analysée dans des monocytes humains, à 4 h de traitement avec les dérivés **242**, **228**, **229**. Les gènes considérés codent pour une enzyme antioxydante (hème oxygénase-1, HO-1) ; une enzyme pro-inflammatoire (cyclo-oxygénase 2, COX-2) ; une interleukine anti-inflammatoire (IL-

[32] Basnet P., Skalko-Basnet N., *Molecules* **2011**, *16*, 4567–4598.
[33] Laskin D. L. *Chem. Res. Toxicol.,* **2009**, 22, 1376–1385.
[34] Aggarwal B. B., Sung B., *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 30, 85–94.

10) ; un médiateur pro-inflammatoire *Tumor Necrosis Factor* α (TNF-α). Le composé **242** montre des activités particulièrement intéressantes, augmentant significativement l'expression de HO-1 et d'IL-10, et diminuant celle du gène du TNF-α par rapport au témoin solvant. Par contre, l'expression de COX-2 est augmentée. Les deux autres molécules, **228** et **229**, ne diminuent que de manière non significative le gène de TNF-α (**Figure 3-10**). Ces résultats, très préliminaires, peuvent être comparés aux données déjà connues pour la curcumine **58**, pour laquelle la répression du TNF-α, de plusieurs interleukines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12) et de chemokines diverses a été démontrée, les auteurs proposant une inactivation du *nuclear factor* (NF)-κB comme mécanisme potentiel.[35]

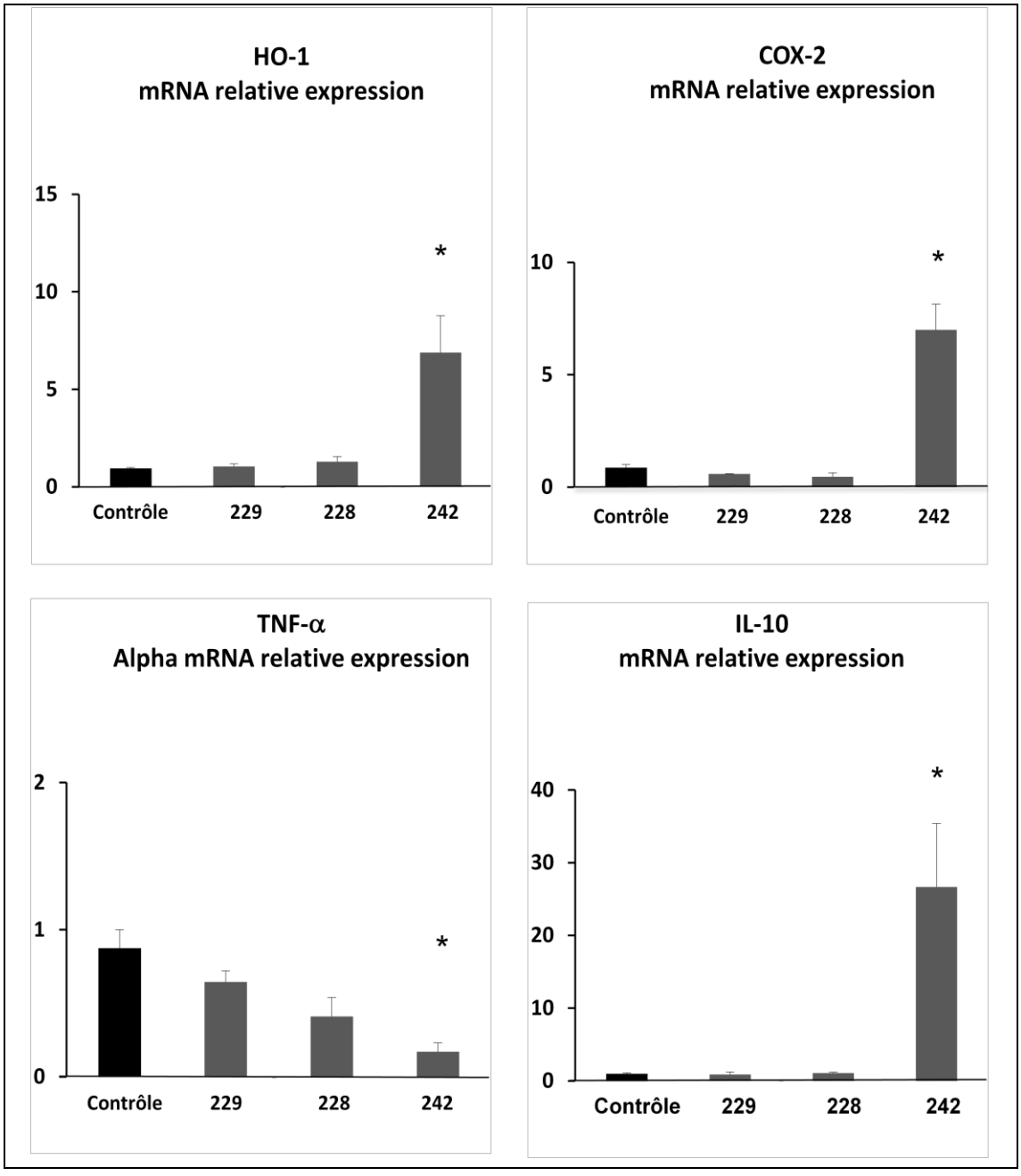


Figure 3-10. Expression de gènes sous contrôle de NRf2 dans des monocytes humains
Mesure d'expression relative, par rapport aux ARNm de la β-actine, à 4 h : moyenne ± SEM ; 1 µM ; n = 3 ; * : $p < 0,05$.

[35] Zhou H., Beevers C. S., Huang S., *Curr. Drug Targets* **2011**, 12, 332–347.

Il a également été montré que **58** exerce une action sur le complexe formé par NRf2 et sa protéine chaperon *Kelch-like ECH-associated protein* 1 (Keap1), de manière covalente, induisant ainsi une levée d'inhibition de NRf2.[36] Cette interaction s'effectue *via* une attaque nucléophile d'un résidu cystéine de Keap1. Un tel mécanisme n'est pas exclu pour les analogues de **58** testés – le lecteur se référera à la partie **2** du manuscrit qui décrit la synthèse de dérivés de **58** par une réaction de condensation de Knoevenagel. Ce mécanisme ne semble cependant pas suffisant pour expliquer les résultats de cette deuxième série d'expériences.
On remarquera que, de manière intéressante, des expériences de *docking* montrent clairement une interaction directe entre la curcumine et plusieurs des cibles protéiques citées ci-dessus : TNF-α et COX-2.[37] Ces dernières données suggèrent différents niveaux d'action possibles, ainsi qu'une implication éventuelle de produits de dégradation de **58**. Nous renvoyons ici aux expériences de dégradation de nos analogues prénylés, présentées précédemment.
Ces résultats illustrent également la diversité potentielle des cibles et la variété des effets pour notre petite chimiothèque de curcuminoïdes prénylés. Ces nouveaux dérivés conservent probablement plusieurs éléments clés de l'interaction de **58** avec le matériel cellulaire, une modulation d'activité semblant notable – et malheureusement de manière généralement défavorable dans le modèle employé. Dans le cadre de l'inflammation, les travaux sur la molécule **242** doivent être poursuivis. Des travaux d'inhibition enzymatique, complémentaires, seront également réalisés.

F. Effet anti-agrégant de fibrilles amyloïdes

Le développement par l'équipe de Sandrine Ongeri, dans notre UMR, d'un test d'inhibition d'agrégation de la protéine amyloïde, a permis une évaluation de nos analogues sur une cible importante dans le cadre de la recherche de neuroprotecteurs.
On rappellera brièvement que la maladie d'Alzheimer, pathologie neurodégénérative se traduisant par des troubles mnésiques et cognitifs, a une incidence galopante et une prévalence préoccupante.[38] Cette maladie du sujet âgé, pour laquelle seuls des traitements symptomatiques d'efficacité discutée existent, est qualifiée de dégénérescence neurofibrillaire, l'agrégation de plusieurs protéines – dont le rôle pathologique est encore incertain – étant une caractéristique anatomopathologique majeure. La maladie est notamment associée à l'accumulation extracellulaire de produits de clivages de la protéine amyloïde : les peptides β-amyloïdes 1-40 et 1-42 (Aβ), sous forme de plaques séniles. L'inhibition de l'agrégation de ces peptides sous forme de feuillets β, via une dimérisation, puis une oligomérisation, et enfin une polymérisation en fibrilles, constitue une piste thérapeutique sérieuse. Les oligomères et les fibrilles sont considérées comme neurotoxiques.[38]
On remarquera que la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer est très complexe. L'inflammation semble jouer un rôle, le facteur de transcription NRf2 étant cité par les auteurs.[39]
L'intérêt de la curcumine **58** comme neuroprotecteur dans la maladie a été étudié dans des modèles et sur des cibles très variées. Là encore, les effets antioxydant et de chélation de métaux de transition par la molécule – ou ses analogues [40] – semble importants, mais des activités plus subtiles et diverses pourraient être impliquées. Ces aspects ont fait l'objet de revues, auxquelles le lecteur pourra se référer.[41]

[36] Balogun E., Hoque M., Gong P., Killeen E., Green C. J., Foresti R., Alam J., Motterlini R., *Biochem. J.* **2003**, 371, 887–895.
[37] Gupta S. C., Prasad S., Kim J. H., Patchva S., Webb L. J., Priyadarsinic I. K., Aggarwal B. B., *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1937–1955.
[38] Jakob-Roetne R., Jacobsen H., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2009**, 48, 3030–3059.
[39] Van Muiswinkel F. L., Kuiperij H. B., *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, 4, 267–281.
[40] Chen S. Y., Chen Y., Li Y. P., Chen S. H., Tan J. H., Ou T. M., Gu L. Q., Huang Z. S., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5596–5604.
[41] Hamagushi T., Ono K., Yamada M., *CNS Neurosci. Therap.* **2010**, 16, 285–297.

Il semblait intéressant de bénéficier du modèle développé par nos collègues, qui permet d'évaluer une inhibition de l'agrégation spontanée de Aβ. Le peptide est mis en présence des molécules à tester. L'agrégation est mesurée par incorporation de thioflavine S, un marqueur fluorescent des plaques amyloïdes classiquement employé en histologie, sur une période de 42 heures (**Figure 3-11**). [42]

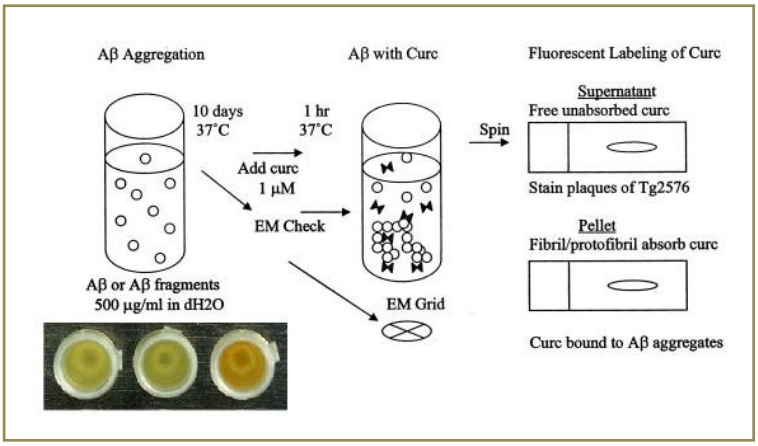


Figure 3-11. Le principe de test décrit par Yang *et al*. **2005**.[43]

Tous les composés sont en cours d'évaluation, en comparaison avec la curcumine **58** (**Figure 3-12a**), dont l'activité a déjà été démontrée par d'autres équipes.[44] Des résultats très encourageants ont été obtenus lors de l'étude préliminaire du composé diprénylé **229**, testé entre 1 et 100 µM (**Figure 3-12b**). Dans les figures, la courbe bleu foncé correspond au témoin solvant. On observe pour **229**, aux concentrations 1 et 10 µM (courbes jaune et bleue, respectivement), une inhibition d'agrégation inférieure d'environ 20 % à celle obtenue avec **58** aux mêmes concentrations. À 100 µM, l'inhibition est totale, comme pour **58**. L'extension du domaine plan des dérivés pyraniques, par rapport à **58**, pourrait éventuellement présenter un intérêt. La faible stabilité de la curcumine et de ses analogues en milieu aqueux ne semble pas diminuer l'activité sur la durée de déroulement du test. Les éléments connus de l'interaction entre A-β et la curcumine indiquent la faible probabilité d'une activité s'exerçant *via* des produits de dégradation.[45]

Frautschy S. A., Cole G. M., *Mol. Neurobiol.* **2010**, 41, 392-409.

[42] Dorgeret B., Khemtémourian L., Correia I., Soulier J. L., Lequin O., Ongeri S., *Eur. J. Med. Chem*. **2011**, 46, 5959–69.

[43] Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P. P., Kayed R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M., *J. Biol. Chem*. **2005**, 280, 5892–5901.

[44] Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *J. Neurosci. Res.* **2004**, 75, 742–750.
Necula M., Kayed R., Milton S., Glabe C. G., *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 10311–10324.

[45] Masuda Y., Fukuchi M., Yatagawa T., Tada M., Takeda K., Irie K., Akagi K., Monobe Y., Imazawa T., Takegoshi K., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5967–5974.

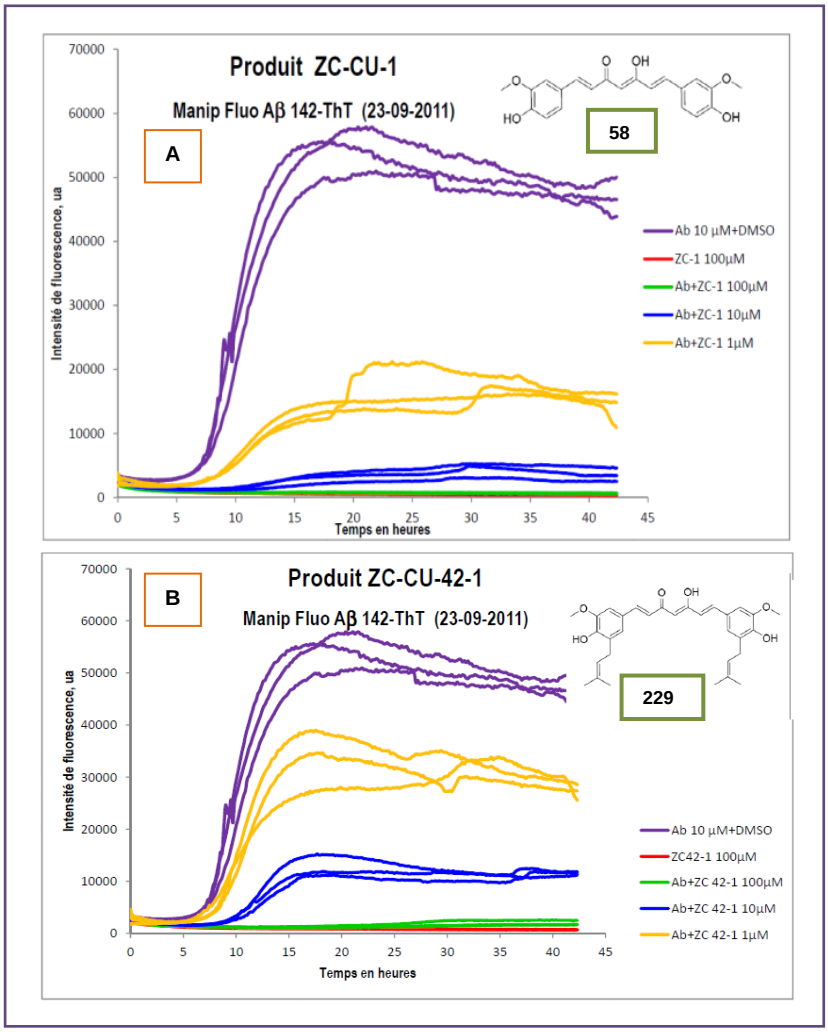


Figure 3-12. Inhibition de la polymérisation du peptide β-amyloïde 1-42
Mesure par fluorescence de l'incorporation de thioflavine S, après lavage ; n = 3.

V. Conclusion

Nous avons obtenu 15 dérivés très originaux, porteurs de décorations classiques chez les angiospermes, mais absentes en série diarylheptanoïde. Synthétisées à partir de la curcumine **58** et de son dérivé déméthylé **59**, ces molécules ont été testées dans des modèles très variés, conformément à la diversité des activités observées pour la curcumine **58**. Des résultats divers ont été obtenus, montrant généralement une diminution d'activité par rapport à **58**. Il apparait cependant que les dérivés hémisynthétiques ne sont que peu cytotoxiques. Une poursuite de ces travaux biologiques est envisagée, notamment dans le cadre de l'inflammation pour la molécule **242**. En complément, il serait souhaitable d'évaluer l'inhibition d'enzymes pro-inflammatoires pour les analogues obtenus. De plus, une évaluation du potentiel neuroprotecteur des molécules qui se révéleront les plus fortement inhibitrices de l'agrégation de Aβ dans un modèle cellulaire de la maladie d'Alzheimer sera à envisager.

Notes et références bibliographiques du chapitre 3.

[1] Appendino G., Gibbons S., Giana A., Pagani A., Grassi G., Stavri M., Smith E., Rahman M., *J. Nat. Prod*. **2008**, 71, 1427–1430.
[2] Lee J. C., Kundu J. K., Hwang D. M., Na H. K., Surh Y. J., *Carcinogenesis.* **2007**, 28, 1491–1498.
[3] Lee J., Oh W.K., Ahn J.S., Kim Y.H., Mbafor J.T., Wandji J., Fomum Z.T., *Planta Med*. **2009**, 75, 268–270.
[4] Lee M.H., Kim J.Y., Ryu J.H., *Biol. Pharm. Bull*. **2005**, 28, 2253–2257.
[5] Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y., *Phytochemistry*. **2009**, 70, 1739–1745.
[6] Rohmer M., *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 565–574.
[7] Dewick P. M., *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 181–222.
[8] Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H., *Biochem. J*. **1993**, 295, 517–524.
[9] Ebel J., Grisebach H.,*Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 23–27.
[10] Hamerski D., Schmitt D., Matern U., *Phytochemistry*. **1990**, 29, 1131–1135.
[11] Asada Y., Li W., Yoshikawa T., *Phytochemistry*. **2000**, 55, 323–326.
[12] Raikar S. B., Nuhant P., Delpech B., Marazano C., *Eur. J. Org. Chem*. **2008**, 8, 1358–1369.
[13] Narender T., Reddy K. P., Shweta, Srivastava K., Mishra D. K., Puri S. K., *Org Lett*. **2007**, 9, 5369–5372.
[14] Likubo K., Ishikawa Y., Ando N., Umezawa K., Nishiyama S., *Tetrahedron Lett*. **2002**, 43, 291–293.
[15] Dai Q., Xie X., Xu S., Ma D., Tang S., She X., *Org. Lett*. **2011**, 13, 2302–2305.
[16] Wang W.-L., Lu Z.-Y., Tao H.-W., Zhu T.-J., Fang Y.-C., Gu Q.-Q., Zhu W.-M, *J. Nat. Prod*. **2007**, 70, 1558–1564.
[17] Trost B. M., Malhotra S., Chan W. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 7328–7331.
[18] Hiersemann M., Abraham L., *Eur. J. Org. Chem*. **2002**, 9, 1461–1471.
[19] Obolskiy D., Pischel I., Siriwatanametanon N., Heinrich M., *Phytother. Res*. **2009**, 23, 1047–1065.
[20] Batova A., Lam T., Wascholowski V., Yu A. L., Giannis A., Theodorakis E. A., *Org Biomol Chem*. **2007**, 5, 494–500.
[21] Chantarasriwong O., Cho W. C., Batova A., Chavasiri W., Moore C., Rheingold A. L., Theodorakis E. A., *Org Biomol Chem*. **2009**, 7, 4886–4894.
[22] Tisdale E. J., Vong B. G., Li H., Kim S. H., Chowdhury C., Theodorakis E. A., *Tetrahedron*. **2003**, 59, 6873–6887.
[23] Selepe M. A., Drewes S. E., van Heerden F. R., *J. Nat. Prod*. **2010**, 73, 1680–1685.
[24] Lee Y. R., Kim Y. M., Kim S. H., *Tetrahedron* **2009**, 65, 101–108.
[25] Lee Y. R., Xia L., *Synthesis* **2007**, 3240–3246.
[26] Khupse R. S., Erhardt P. W., *Org Lett*. **2008**, 10, 5007–5010.
[27] Prado S., Janin YL., Saint-Joanis B., Brodin P., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Bost PE., *Bioorg. Med. Chem*. **2007**, 15, 2177–2186.
[28] Alvey L., Prado S., Huteau V., Saint-Joanis B., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Janin Y. L., *Bioorg. Med. Chem*. **2008**, 16, 8264–8272.
[29] Beesley R. M., Ingold C. K., Thorpe J. F., *J. Chem. Soc*. **1915**, 107, 1080–1106.
[30] Ringer, A. L., Magers, D. H., *J. Org. Chem*. **2007**, 72, 2533–37.
[31] Bachrach, S. M., *J. Org. Chem*. **2008**, 73, 2466–2468.
[32] Gossart S., Cambon C., Orfila C., Séguélas M. H., Lepert J. C., Rami J., Carré P., Pipy B., *J. Immunol.* **1996**, 156, 1540–48.
[33] Laskin D. L., *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 1376–1385.
[34] Aggarwal B. B., Sung B., *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 30, 85–94.
[35] Zhou H., Beevers C. S., Huang S., *Curr. Drug Targets.* **2011**, 12, 332–347.
[36] Balogun E., Hoque M., Gong P., Killeen E., Green C. J., Foresti R., Alam J., Motterlini R., *Biochem. J.* **2003**, 371, 887–895.
[37] Gupta S. C., Prasad S., Kim J. H., Patchva S., Webb L. J., Priyadarsinic I. K., Aggarwal B. B., *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1937–1955.
[38]Jakob-Roetne R., Jacobsen H., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2009**, 48, 3030–3059.
[39] van Muiswinkel F. L., Kuiperij H. B., *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, 4, 267–281.
[40] Chen S. Y., Chen Y., Li Y. P., Chen S. H., Tan J. H., Ou T. M., Gu L. Q., Huang Z. S., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5596–5604.
[41] Hamagushi T., Ono K., Yamada M., *CNS Neurosci. Therap.* **2010**, 16, 285–297.
[42] Dorgeret B., Khemtémourian L., Correia I., Soulier J. L., Lequin O., Ongeri S., *Eur. J. Med. Chem*. **2011**, 46, 5959–5969.
[43] Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P. P., Kayed R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M., *J. Biol. Chem*. **2005**, 280, 5892–5901.
[44] Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *J. Neurosci. Res.* **2004**, 75, 742–750.
[45] Masuda Y., Fukuchi M., Yatagawa T., Tada M., Takeda K., Irie K., Akagi K., Monobe Y., Imazawa T., Takegoshi K., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5967–5974.

Chapitre 4

Étude de conditions oxydantes sur les curcuminoïdes (désaromatisation oxydante et couplage oxydatif)

I. La désaromatisation oxydante

A- Introduction

B- La désaromatisation oxydante de phénols.

1) Désaromatisation oxydante de phénols *via* une activation électrophilique avec formation de liaison C–O et C–N.
2) Désaromatisation oxydante et alkylante de phénols avec formation de liaison C–C.
3) Désaromatisation oxydante de phénols déclenchant cycloaddition de Diels-Alder.

C- Couplage oxydatif.

II. Travaux personnels.

A- Conditions de couplages oxydatifs.

B- Désaromatisation oxydante.

1) Réduction des doubles liaisons.
    a. Hydrogénation catalytique.
    b. La réaction de Birch.

2) Désaromatisation oxydante des dérivés curcuminoïdes.
    a. Désaromatisation oxydante du composé **341**.
    b. Désaromatisation oxydante du composé **342**.
    c. Désaromatisation oxydante du composé **343**.

III. Conclusion.

I. La désaromatisation oxydante

A- Introduction

Bien que le cycle benzénique présente une haute énergie de résonance le stabilisant, un certain nombre d'exemples de désaromatisation par des microorganismes, soit par oxydation (oxygénases) ou soit par réduction (réductases), existent dans la nature.
Les produits issus de la désaromatisation dans des conditions oxydantes sont généralement des *ortho*-quinols pouvant facilement se dimériser. Les deux familles naturelles les plus importantes de cyclohexa-2,4-diènones non dimérisantes, sont les humulones issues du houblon (*Humulus lupulus* L.), et les wasabidiènones qui sont des métabolites fongiques (**Figure 4-1**).
Dans ces deux séries, des effets stériques des substituants en position C-3 et C-5 bloquent ou retardent le processus de dimérisation.

- Les humulones sont extraites des cônes femelles du houblon, plante bisexuée de la famille des *Cannabinaceae*. Ces molécules se sont avérées être d'une grande importance dans la fabrication de la bière pour leur apport d'amertume et leurs propriétés antifongiques et antibiotiques.[1]
- La deuxième famille d'*ortho*-quinols non dimérisés naturels est la famille des wasabidiénones. La molécule la plus connue dans cette famille est la (+)-aspersitine **250**, découverte par Büchi au cours de ses recherches sur la biogenèse des métabolites fongiques d'*Aspergillus parasiticus*. Elle possède des activités antibactériennes contre plusieurs souches (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*…)[2]

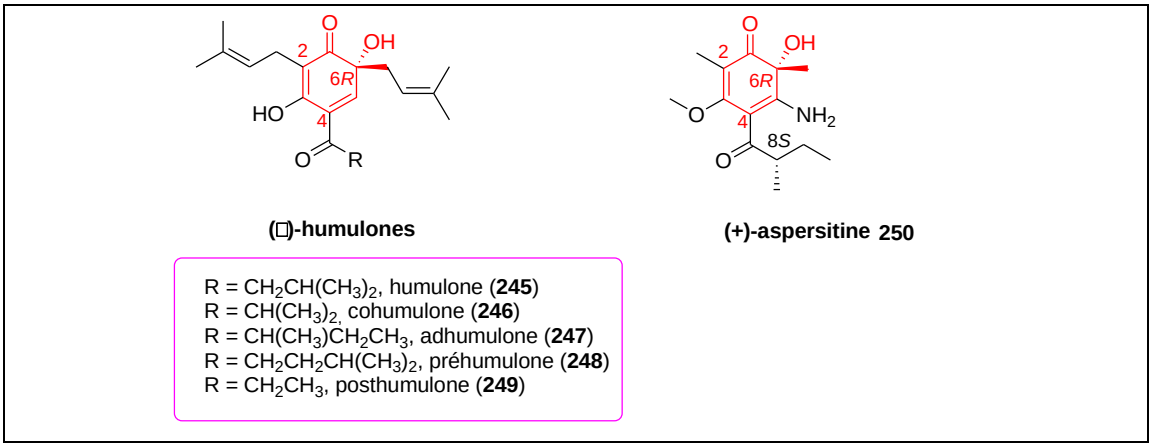


Figure 4-1. Structure de dérivés *ortho*-quinols naturels.

En synthèse totale, la désaromatisation a été exploitée pour produire des intermédiaires très réactifs facilitant la formation de liaisons carbone–carbone et carbone–hétéroatome, et des réactions de cycloadditions spontanées, ainsi que des réactions en cascade (**Figure 4-2**). Comme le montre le **Schéma 4-1**, un certain nombre de stratégies pour la désaromatisation ont été employées par les chimistes au cours de la synthèse totale de molécules naturelles possédant des structures complexes.[3]

[1] Mizobuchi S., Sato Y., *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 399–403.
[2] Büchi G., Francisco M. A., Murray W. V., *Tetrahedron Lett*. **1983**, 24, 2527–2530.
[3] Roche S. P., Porco J. A. Jr., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2011**, 50, 4068–4093.

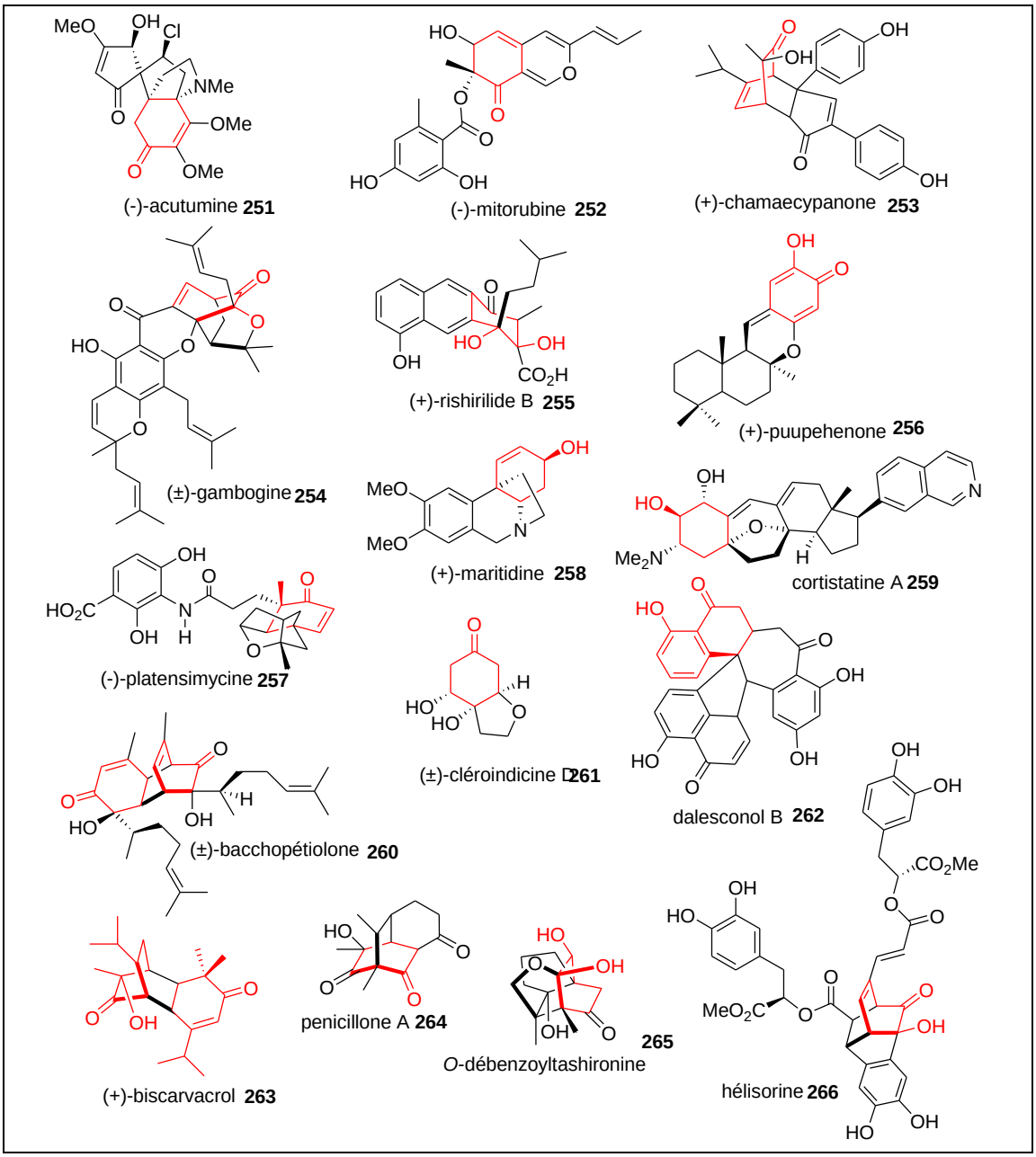


Figure 4-2. Travaux récents de synthèse de structures naturelles complexes utilisant des stratégies de désaromatisation (**2002-2010**).

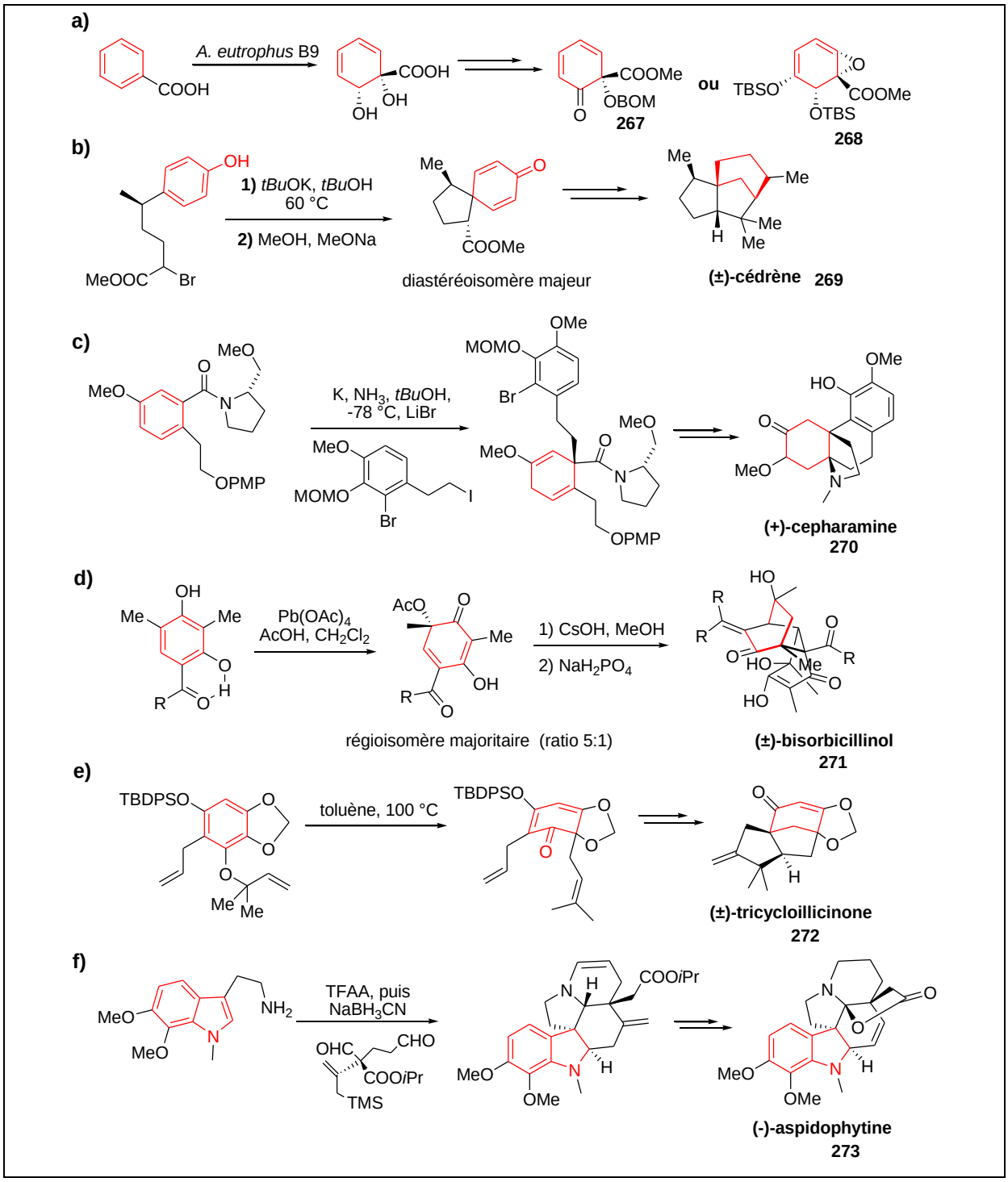


Schéma 4-1. Exemples classiques de désaromatisation en synthèse totale.[3]

Dans la littérature, des exemples de désaromatisation de plusieurs types de composés ont été décrits, nous allons dans ce chapitre nous focaliser sur la désaromatisation des phénols dans le cadre de synthèses totales de structures naturels.

B- La désaromatisation oxydante de phénols

La désaromatisation oxydante de phénols est un processus qui peut être assimilé à une étape d'oxydation suivie d'une attaque nucléophile.[4, 5] (**Schéma 4-2**) Plusieurs méthodes de désaromatisation oxydante sont rapportées dans la littérature.[6] Il est classique d'utiliser des réactifs à base de métaux tels que le plomb Pb(IV),[7] le thallium Tl(III),[8] le bismuth Bi(III), le manganèse Mn(IV), l'argent Ag(I), le fer Fe(III),[9] le cuivre [Cu(II) ou Cu(I)] ou le cérium Ce(IV), mais aussi des réactifs à base de métaux de transition comme le molybdène, le titane ou le zirconium.[10] Des oxydants organiques neutres tels que la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ)[11], des agents halogénés à base de brome comme le *N*-bromosuccinimide (NBS)[12] ou d'iode sont autant d'agents employés sur des substrats phénoliques pour former les cyclohexa-2,4-diènones **276** et/ou cyclohexa-2,5-diènones **275**. Ces intermédiaires cyclohexadiènones sont très réactifs et réagissent spontanément générant des polycycliques complexes, comme par exemple au cours de cascades de réaction faisant intervenir une désaromatisation oxydante plus une réaction de Diels-Alder.

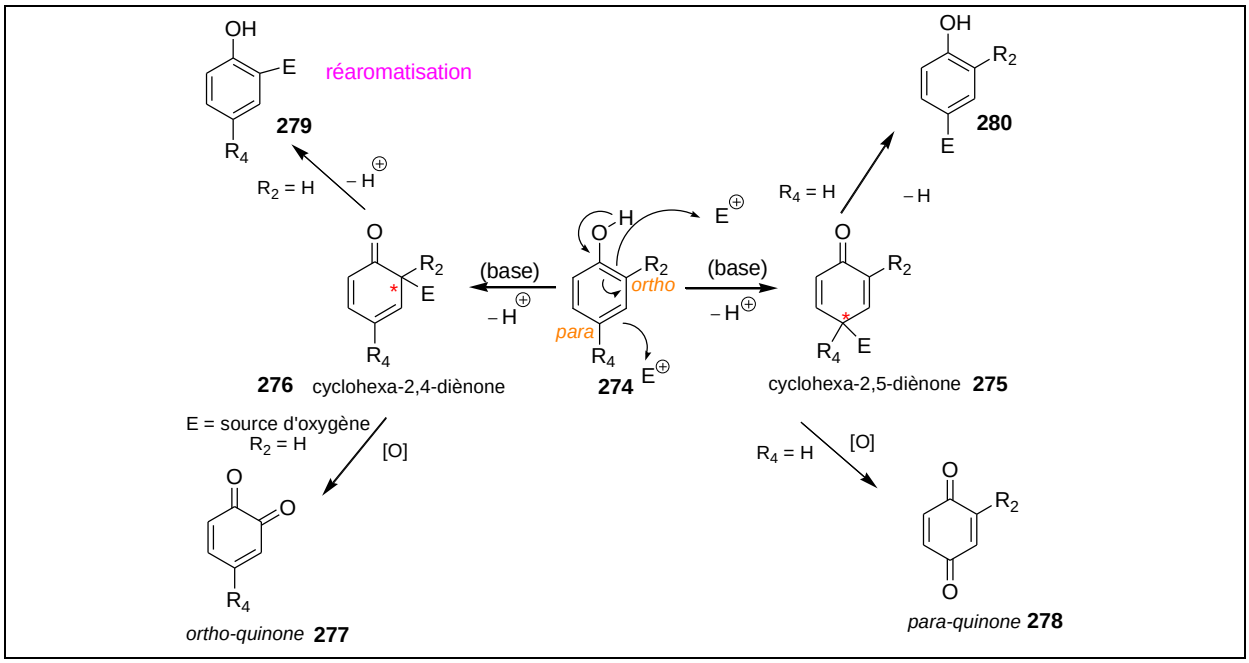


Schéma 4-2. Mécanisme général de désaromatisation oxydante.[13]

Une autre classe plus récente de réactifs a été employée pour la désaromatisation, il s'agit des réactifs à l'iode hypervalent. Connus depuis le XIX^{è} siècle, ces composés iodés hypervalents ont trouvé un grand nombre d'applications en synthèse organique au cours des dernières années. Les nombreux avantages qu'ils présentent ont favorisé leur développement. Ils sont faciles à

[4] Arzeno H., Barton D. H. R., Bergé-Lurion R.-M., Lusinchi X., Pinto B. M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1984**, 2069–2076.
[5] Barton D. H. R., Bergé-Lurion R.-M., Lusinchi X., Pinto B. M., *J. Chem. Soc*., *Perkin Trans*. 1 **1984**, 2077–2080.
[6] Quideau S., Pouységu L., *Org. Prep. Proc. Int*. **1999**, 31, 617–680.
[7] Green JC., Pettus TR., *J Am Chem Soc*. **2011**, 133, 1603–1608.
[8] McKillop A., Perry D. H., Edwards M., Antus S., Farkas L., Nogradi M., Taylor E. C., *J. Org. Chem*. **1976**, 41, 282–287.
[9] Becker H. D., *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 2027–2029.
[10] Krohn K., Brügmann K., Döring D., Jones P. G., *Chem. Ber*. **1992**, 125, 2439–2442.
[11] Dong S., Hamel E., Bai R., Covell D. G., Beutler J. A., Porco J. A. Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1494–1497.
[12] Honda T., *Pure Appl. Chem*. **2010**, 82, 1773–1783.
[13] Pouysegu L., Deffieux D., Quideau S., *Tetrahedron* **2010,** 66, 2235–2261.

manipuler, les conditions de réaction sont douces, la réactivité est variée et les rendements sont en général bons. En prenant en considération le fort potentiel de cette famille de réactifs, il nous semble important de la présenter un peu plus en détails. Quelques exemples parmi les réactifs iodés hypervalents les plus courants sont répertoriés dans le **tableau 4-1**.[14]

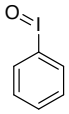
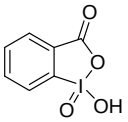
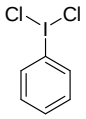
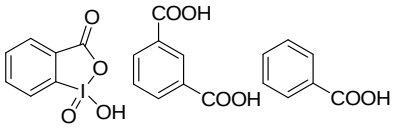
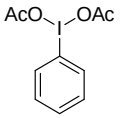
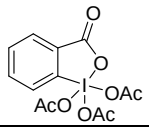
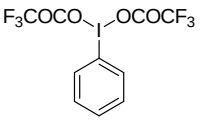
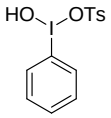
Iodanes-λ^3	Iodanes-λ^5
Iodosylbenzène (IOB) 	acide iodoxybenzoïque (IBX) 
dichloroiodobenzène 	acide iodoxybenzoïque stabilisé (SIBX)  **IBX** (49%) (29%) (22%)
diacétoxyiodobenzène (DIB ou PIDA) 	périodinane de Dess-Martin (PDM) 
bis(trifluoroacétoxy) iodobenzène (BTI ou PIFA) 	
hydroxy(tosyloxy)iodo benzène (réactif de Koser) 	

Tableau 4-1. Principaux iodanes-λ^3 et -λ^5**.**

Pour illustrer l'intérêt des réactifs à l'iode hypervalent en synthèse totale, quelques exemples de désaromatisation oxydante de composés phénoliques sont présentés dans la partie suivante.

1) Désaromatisation oxydante de phénols *via* une activation électrophile avec formation de liaison C–O et C–N.

En général, pour la désaromatisation de phénols, une activation par l'iode hypervalent ou d'autres oxydants résulte soit en une *ortho*-désaromatisation (*ortho*-quinol ou *ortho*-benzoquinone masqués) soit en *para*-désaromatisation (*para*-quinol ou *para*-benzoquinone). Barradas *et al.,* ont développé une méthode efficace pour la désaromatisation oxydante sélective de *para*-alkyl phénols pour accéder au *para*-peroxyquinols et *para*-quinols en utilisant l'oxone® comme source d'oxygène. La désaromatisation oxydante et les traitements consécutifs acide/base ont efficacement créés deux nouveaux cycles contigus avec quatre centres stéréogènes de manière diastéréosélective. Cette méthodologie a permis la synthèse de la (±)-cléroindicine D **287** (**Schéma 4-5**). En début de synthèse, la désaromatisation du *para*-(2-hydroxyéthyl)phénol 281 par l'oxone® a conduit au composé endoperoxyde cyclique **282**, ensuite, le cycle a été facilement ouvert pour donner le *para*-peroxyquinol **283** correspondant. Le composé prochiral *para*-peroxyquinol **283** a été traité séquentiellement avec *p*TsOH et du Triton-B® formant la peroxyènone cyclique intermédiaire lors de la première étape **284** qui a

[14] Silva L. F. Jr., Olofsson B., *Nat. Prod. Rep*. **2011**, 28, 1722–1754.

subit un réarrangement diastéréospécifique au cours de la seconde étape pour donner l'époxyde tricyclique désiré **286** *via* l'intermédiaire proposé **285** (**Schéma 4-3**).[15]

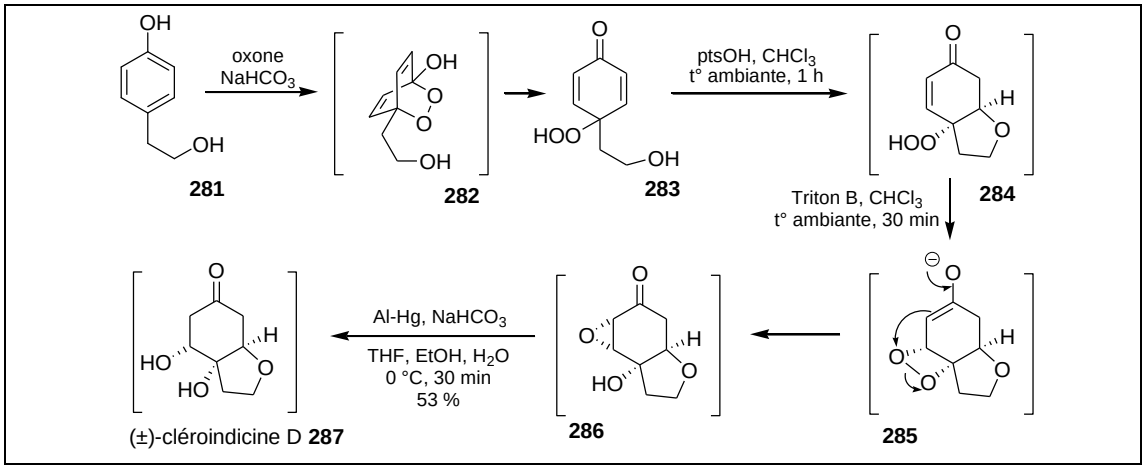


Schéma 4-3. Synthèse totale de la cléroindicine par désaromatisation oxydante avec l'oxone®.

Une autre synthèse a été réalisée *via* une désaromatisation oxydante avec formation de liaison C–O : la synthèse des aculéatines, une nouvelle famille de composés biologiquement actifs isolés du rhizome d'*Amomun aculeatum* par Heilmann *et al*.[16] Les aculéatines sont des composés de type 1,7-dioxadispiro[5.1.5.2]pentadécane qui ont des activités antibactériennes et antiprotozoaires.[17] Pour réaliser l'étape-clé de cette désaromatisation le PIFA a été employé comme réactif oxydant (**Figure 4-3**).

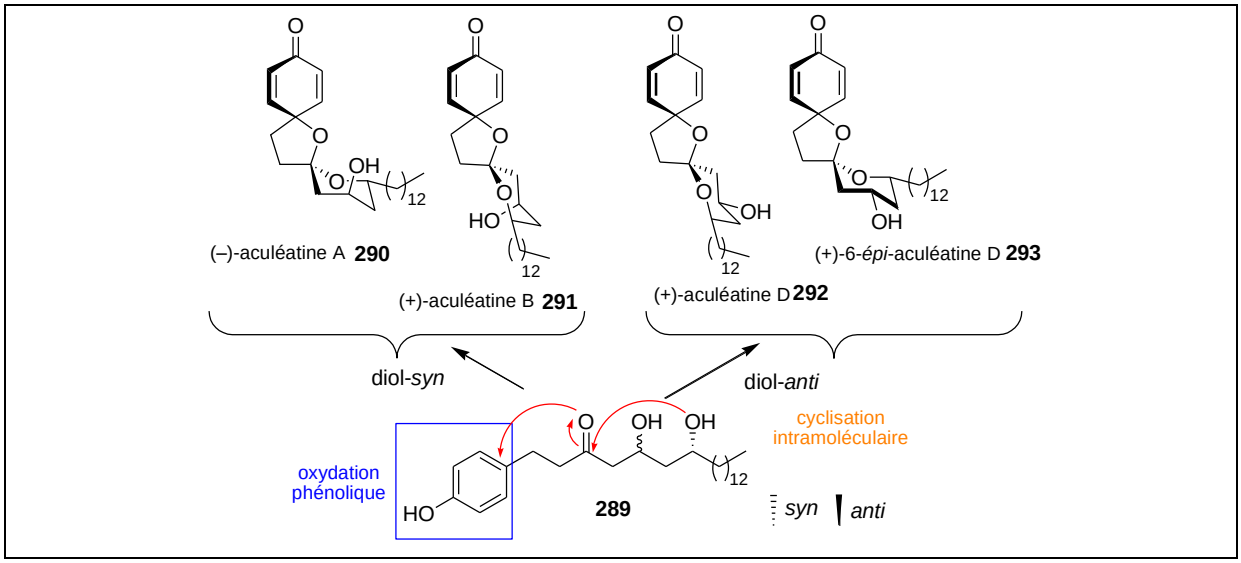


Figure 4-3. Synthèse des aculéatines.

Les aculéatines A et D ont été synthétisées respectivement par Falomir *et al*.,[18] et Baldwin *et al*.,[19] ils ont synthétisé **292** en mélange racémique. Pour cela le diol 1,3-*anti* **289c** a été traité avec **PIFA** dans un mélange acétone/eau (9:1) à température ambiante pour fournir (±)-**292** et

[15] Barradas S., Carreño M. C., Gonzalez-López M., Latorre A., Urbano A., *Org. Lett*. **2007**, 9, 5019–5022.
[16] Heilmann J., Mayr S., Brun R., Rali T., Sticher O., *Helv. Chim. Acta.* **2000**, 83, 2939–2945.
[17] Chin Y. W., Salim A. A., Su B. N., Mi Q., Chai H. B., Riswan S., Kardono L. B., Ruskandi A., Farnsworth N. R., Swanson S. M., Kinghorn A. D., *J. Nat. Prod*. **2008**, 71, 390–395.
[18] Falomir E., Alvarez-Bercedo P., Carda M., Marco J. A., *Tetrahedron Lett*. **2005**, 46, 8407–8410.
[19] Baldwin J. E., Adlington R. M., Sham V. W.-W., Marquez R., Bulger P. G., *Tetrahedron* **2005**, 61, 2353–2363.

son épimère en 6 non naturel, (±)-**293** avec 19 et 43 % de rendement, respectivement. Ils ont décrit la synthèse énantiosélective de la (–)-aculéatine A **290** et de la (+)-aculéatine B **291** en utilisant toujours le **PIFA** dans un mélange acétone/eau (9:1) à température ambiante pendant 24 h. Plus récemment, Peuchmaur *et al*.,[20] ont revisité leur synthèse et apporté des améliorations significatives menant à des synthèses concises et stéréocontrôlées des aculéatines (–)-A **290**, (+)-B **291** (+)-D **292** et (+)-6-*épi*-D **293**. Toutes les approches de synthèse sont résumées sur le **Schéma 4-4.**

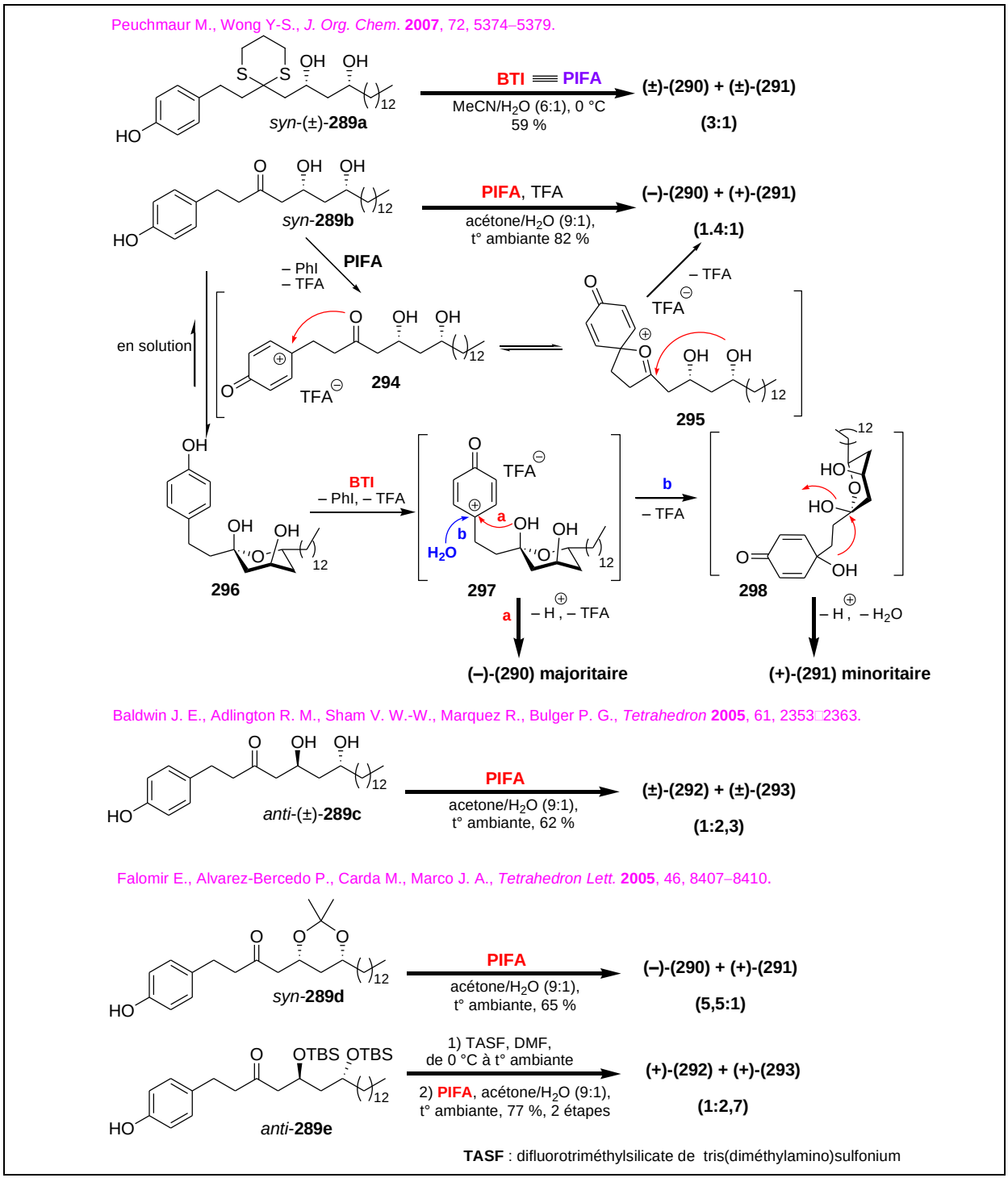


Schéma 4-4. Plusieurs approches synthétiques des aculéatines.

[20] Peuchmaur M., Wong Y.-S., *J. Org. Chem*. **2007**, 72, 5374–5379.

La désaromatisation oxydante de phénols *via* une activation électrophile peut aussi faire intervenir la formation de liaison C–N.

Dans le cadre de synthèse totale de le (–)-tubérostémonine **302** [21] (un alcaloïde polycyclique majeur de *Stemona*), l'équipe de Wipf a optimisé une *spiro*cyclisation oxydante de la carbobenzoxy L-tyrosine **299**. Le composé **299** a été désaromatisé en traitant par DIB dans le méthanol en présence de bicarbonate de sodium pour donner en une étape la *cis*-indolinone **300a** avec des rendements qui atteignent 54 %.


Stemona japonica

Le mécanisme a pu être rationalisé en répétant la réaction dans le nitrométhane en absence de base. La spirocyclohexa-2,5-diènone **301** a pu être isolée avec un rendement de 35 %. Puis ce spirocycle a subi un réarrangement en utilisant Na_2CO_3 dans le méthanol pour conduire à la *cis*-indolinone **300b** avec un rendement de 51 % (**Schéma 4-5**).

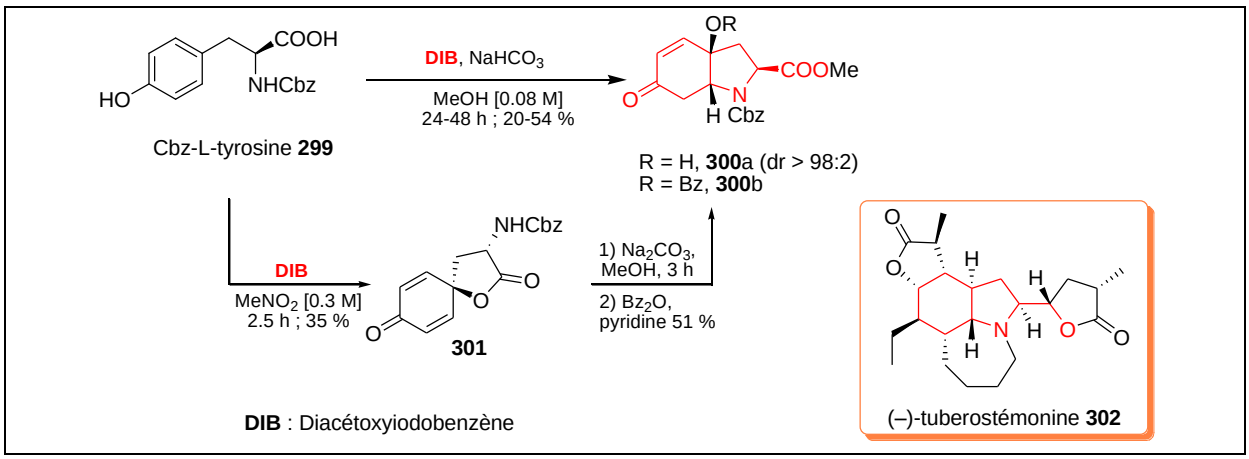


Schéma 4-5. Étapes dans la synthèse de la (−)-tubérostémonine.

2) Désaromatisation oxydante et alkylante de phénols avec formation de liaisons C– C.

Bien que les exemples de couplage soient peu nombreux dans la littérature, la formation de liaisons C–C au cours d'une désaromatisation a un intérêt important dans la synthèse de produits naturels. Nous avons choisi de décrire deux exemples pour illustrer le potentiel de ce type de réaction.

Nicolaou et son équipe ont publié plusieurs travaux de désaromatisation alkylante, l'exemple le plus important est la synthèse énantiosélective de la (–)-platensimycine **257**.

Dans ce travail, les auteurs ont utilisé une désaromatisation oxydante suivie d'une *para*-spiroannulation intramoléculaire en utilisant un réactif à l'iode hypervalent pour assembler les deux premiers cycles du produit naturel (**Schéma 4-6**).[22]

[21] Wipf P., Rector S. R., Takahashi H., *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, 124, 14848–49.
[22] Nicolaou K. C., Edmonds D. J., Li A., Tria G. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 119, 4016–4019.

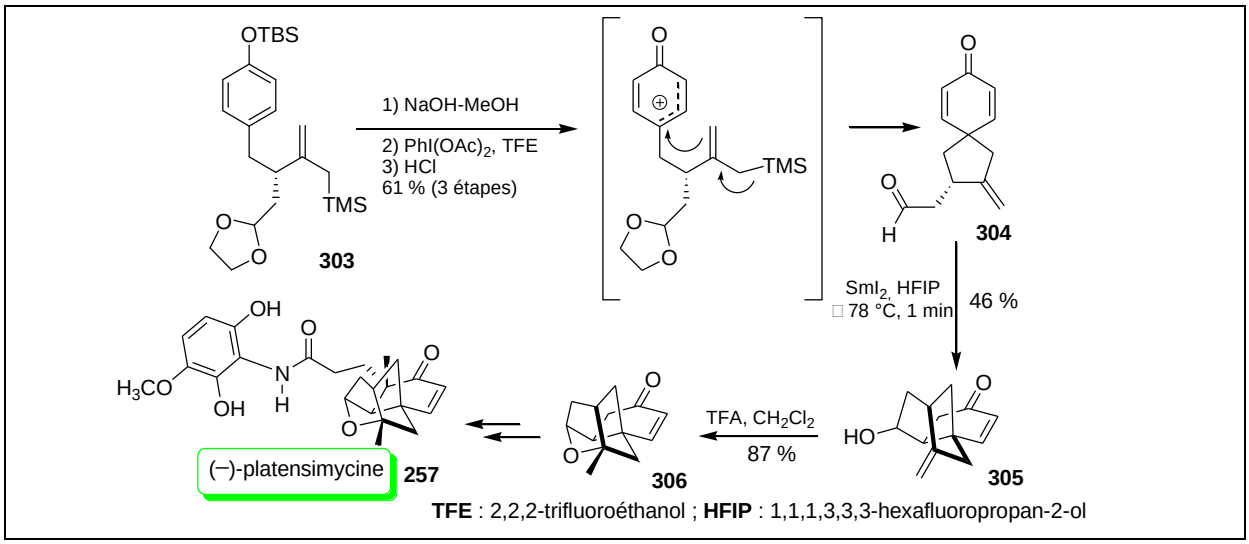


Schéma 4-6. Synthèse totale de la (–)-platensimycine *via* une stratégie d'oxydation et *para*-spiroannulation.

Les désaromatisations par réarrangement de Claisen ont été très peu utilisées en synthèse totale. L'exemple le plus intéressant est présenté sur le **Schéma 4-7**, dans lequel Theodorakis *et al*.,[23] ainsi que Nicolaou *et al*.,[24] ont démontré indépendamment une synthèse par réarrangement de Claisen/désaromatisation pour accéder au produit naturel (±)-gambogine **254**.

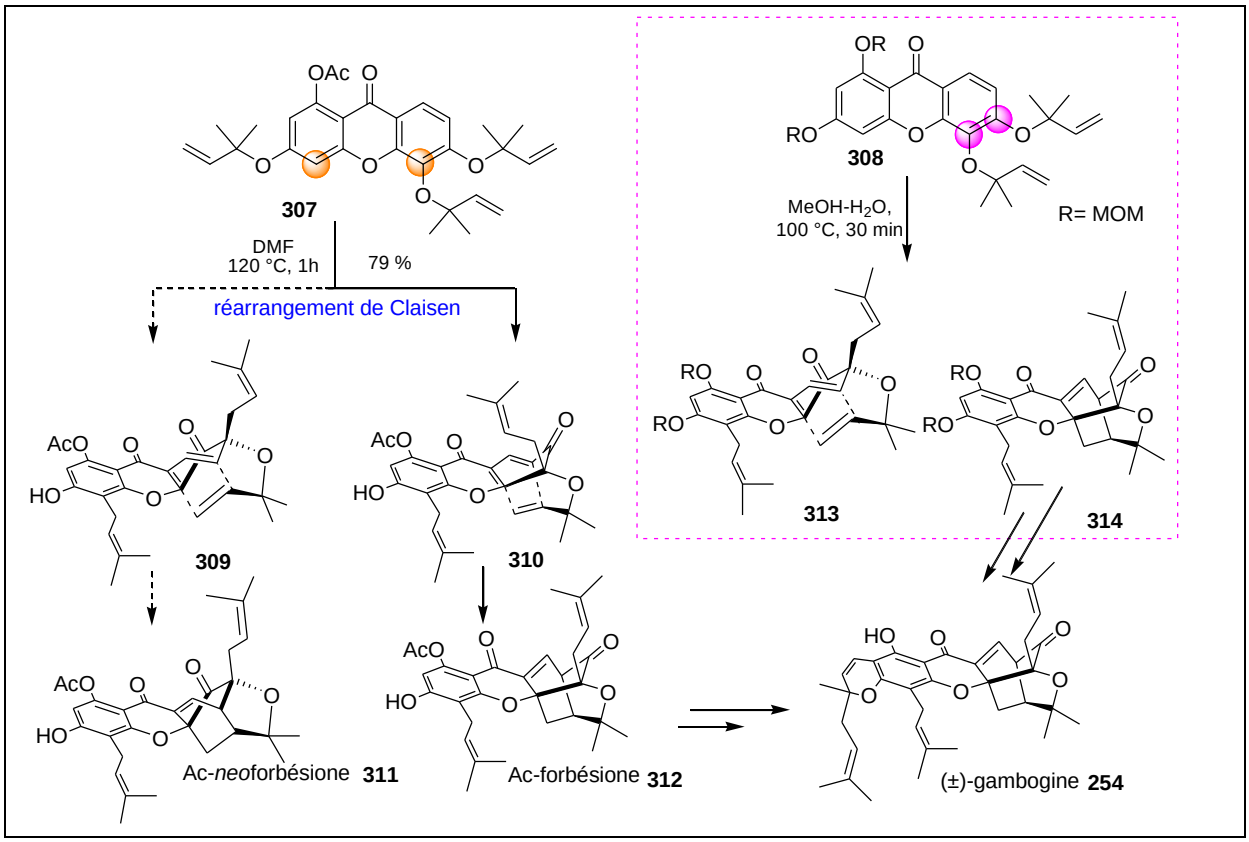


Schéma 4-7. Synthèse totale de la gambogine impliquant un réarrangement de Claisen/désaromatisation (Theodorakis *et al*.[13] Nicolaou *et al.*[14]).

[23] Tisdale E. J., Slobodov I., Theodorakis E. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **2004**, 101, 12030–12035.
[24] Nicolaou K. C., Hao X., Wartmann M., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2005**, 117, 766–771.

Dans la synthèse de Theodorakis, la xanthone acétylée **307** a conduit en conditions thermiques dans des solvants protiques polaires à une remarquable séquence de réaction de Claisen désaromatisation/Diels-Alder en cascade.
Dans cette étude, les auteurs ont évalué l'influence de différents groupements protecteurs de la xanthone sur la régiosélectivité du réarrangement de Claisen en se basant sur des facteurs électroniques. Par exemple, en utilisant un acétyle comme groupement protecteur, les auteurs ont réussi à synthétiser exclusivement un seul isomère : l'*O*-Ac-forbésione **312** (rendement de 79 %). Dans ce cas, l'autre isomère *O*-Ac-*neo*forbésione **311** n'a pas été observé.
Dans l'étude de Nicolaou *et al*., l'équipe a observé que la réaction dans des solvants protiques polaires (méthanol-eau) conduit à une accélération remarquable.
La xanthone **308** a donné deux isomères de structure pentacycliques **313** et **314** (ratio1:3) avec un rendement de 100 %.
Toujours autour des groupements protecteurs, l'utilisation de la xanthone MOM-protégée **308** révèle une mauvaise différenciation électronique entre les deux groupements prényle et donne un mélange des deux isomères **313** et **314**. La synthèse a pu être achevée à partir du composé **308** par la déprotection, la prénylation et la cyclisation conduisant à la (±)-gambogine **254**.

Une synthèse originale de la (+)-maritidine **258** *via* une désaromatisation alkylante a été décrite dans la littérature, l'originalité de cette synthèse réside dans l'utilisation d'un nouveau réactif iodé (III), c'est le (*bis*-acétoxy)iodoso(4-fluoro)benzène **316** [préparé à partir du 1-fluoro-4-iodobenzène et de l'urée-H_2O_2 avec l'anhydride trifluoroacétique (TFAA)].
En fait, la forte réactivité de l'iode (III) a été montrée en réagissant avec le substrat phénolique **315** pour produire l'intermédiaire carbocation **317** qui a sélectivement réagi avec le cycle aromatique activé par le groupement méthoxy pour donner l'amino-ester spirocyclique désiré **318**. Après une autre cyclisation la (+)-maritidine a été synthétisée.

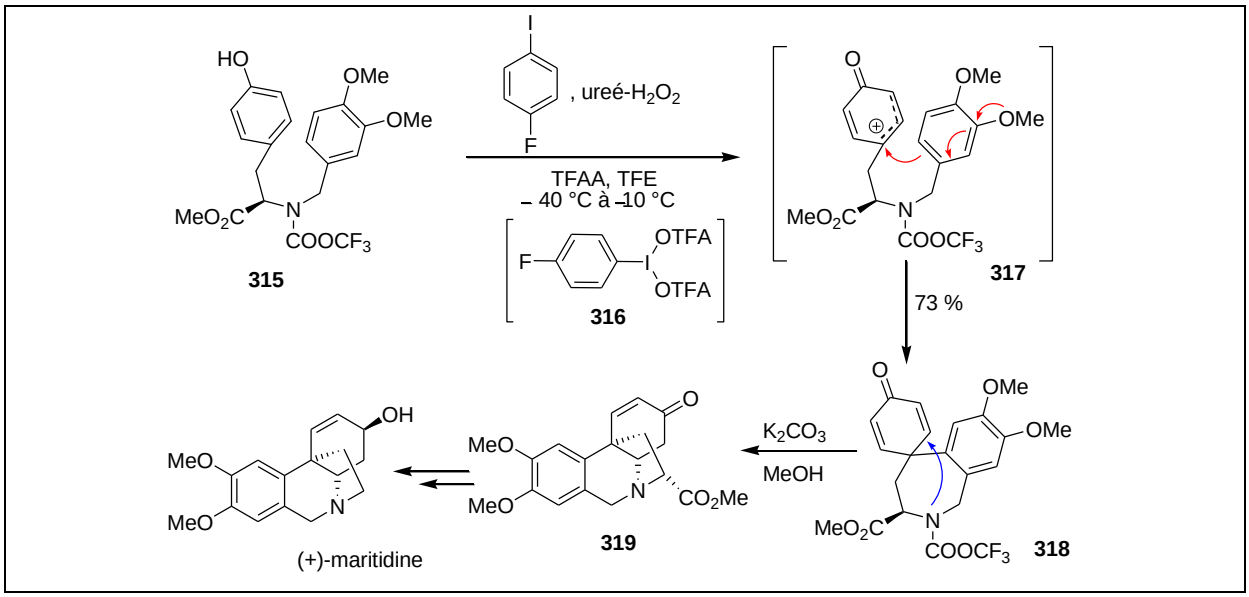


Schéma 4-8. Synthèse de la (+)-maritidine (Kita *et al*., **2008**).

3) Désaromatisation oxydante de phénols déclenchant une réaction de cycloaddition de Diels–Alder.

Pour ce type de réaction, l'exemple le plus intéressant dans la littérature est peut-être le travail de l'équipe de Shair[3] dans la synthèse biomimétique d'un composé naturel : la (–)-longithorone A **324**.

La (–)-longithorone A **324** est une *para*-benzoquinone à structure complexe extraite d'*Aplidium* spp. et d'autres tuniciers.

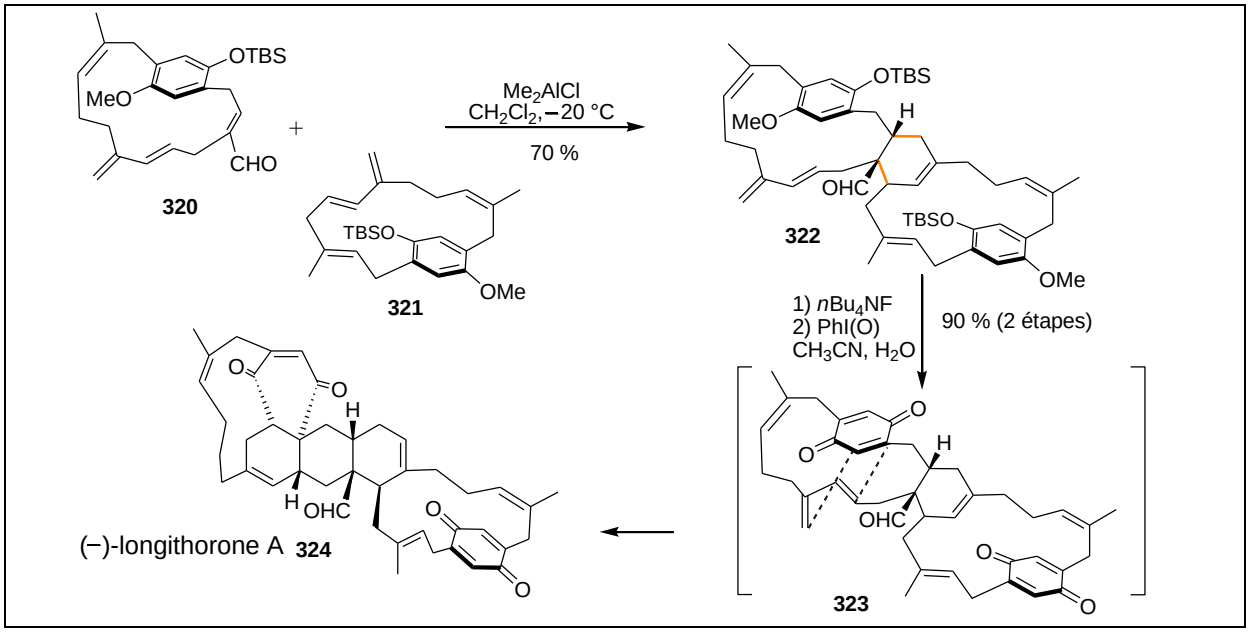


Schéma 4-9. Synthèse totale de la (–)-longithorone

Dans cette synthèse, une réaction de Diels–Alder générée par un acide de Lewis entre les deux *para*-cyclophanes **320** et **321**, a donné le dérivé cyclohexène **322** avec un rendement de 70 %. L'oxydation des deux hydroquinones de **322** a conduit à l'intermédiaire correspondant *bis*(*para*-benzoquinone) désaromatisé **323** qui subi spontanément une cycloaddition de Diels-Alder pour donner la (–)-longithorone A **324** (rendement de 90 %).
Cette synthèse met en scène deux transformations consécutives clés : la première est la construction du cycle cyclohexène par cycloaddition [4+2], puis un assemblage des trois derniers cycles par une cascade désaromatisation oxydante/Diels-Alder cycloaddition.

C- Couplage oxydatif

La plupart des polyphénols simples, tels que les flavonoïdes et certains composés phénoliques (diarylheptanoïdes, resvératrol etc), sont commercialement disponibles et sont généralement obtenus par extraction/purification de leurs sources naturelles, bien que les approches biotechnologiques pour la production de certains polyphénols, comme le resvératrol et les flavanones aient également été développées. Cependant, la synthèse chimique joue également un rôle important dans l'accès aux polyphénols. Des progrès significatifs ont été accomplis pour accéder à certains polyphénols avec des structures complexes par synthèse chimique.
Les progrès ont été surtout observés avec la synthèse biomimétique par couplages oxydatifs radicalaires : cela a ouvert la porte à une diversité structurale fascinante.

Parmi les synthèses les plus intéressantes, la synthèse des oligoflavanols proanthocyanidiques est un bon exemple. Les proanthocyanidines oligomériques sont une classe de flavonoïdes complexes. Plusieurs synthèses ont été publiées, le **schéma 4-10** montre une synthèse oxydante d'oligoflavanols proanthocyanidiques.[25, 26]

[25] Achilonu M. C., Bonnet S. L., van der Westhuizen J. H., *Org. Lett*. **2008**, 10, 3865–3868.

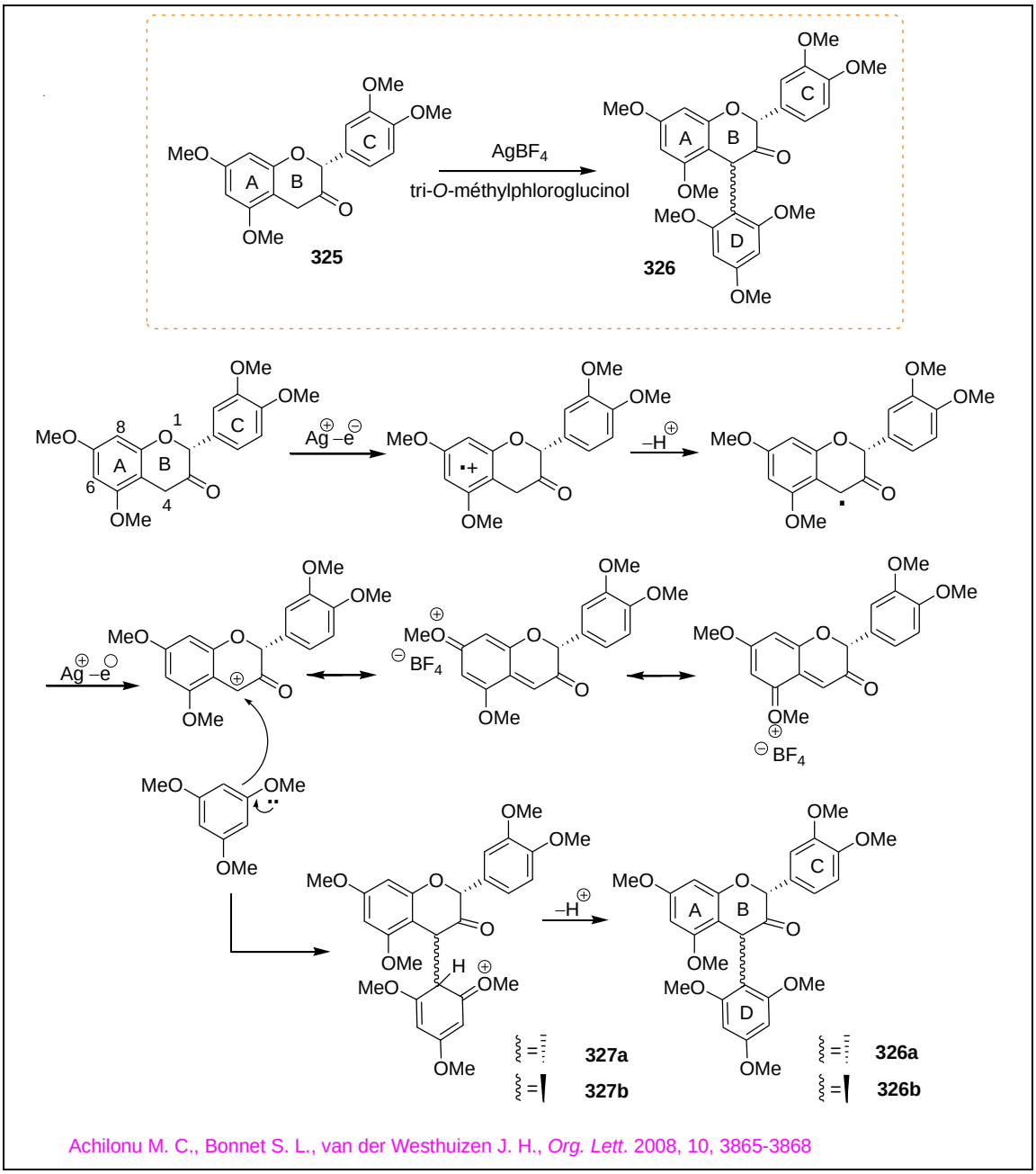


Schéma 4-10. Mécanisme proposé pour la formation oxydante de la liaison Interflavanyl.

D'autres synthèses biomimétiques intéressantes de composés naturels et non naturels par couplage oxydatif d'esters caféiques ont été publiées récemment en utilisant plusieurs agents de couplage oxydatif comme MnO_2, $Mn(OAc)_3$ et Ag_2O.[27] La **Figure 4-4** montre quelques exemples de ces composés synthétisés.

[26] Selenski C., Pettus T. R. R., *Tetrahedron* **2006**, 62, 5298–5307.
[27] Daquino C., Rescifina A., Spatafora C., Tringali C., *Eur. J. Org. Chem*. **2009**, 36, 6289–6300.

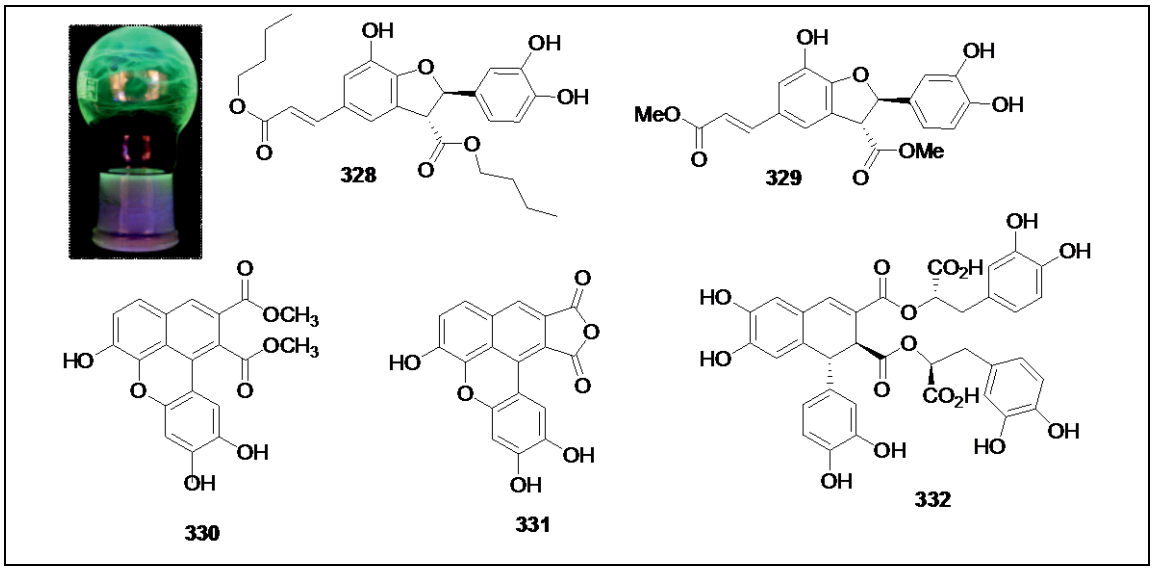


Figure 4-4. Composés obtenus par synthèse biomimétique.

Des études de couplage oxydatif homo-dimérique ont été réalisées sur la curcumine. Ces études ont montré la formation de plusieurs composés de couplage par mécanisme radicalaire.[28,29,30]
La **figure 4-5**, et le **schéma 4-11**, montrent des exemples de composés issus de couplage oxydatif homodimérique avec le mécanisme proposé pour la formation de composé **333**.

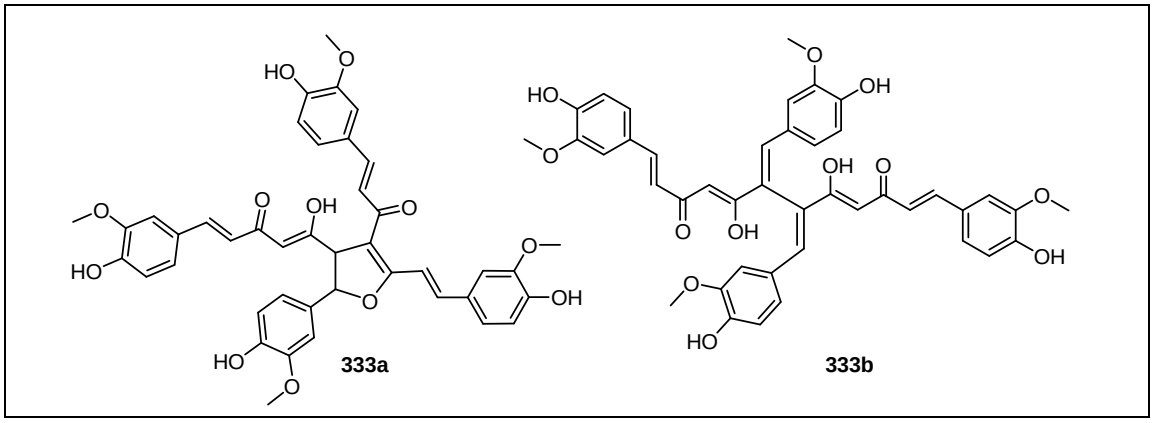


Figure 4-5. Exemple de composés obtenus par couplage oxydatif de la curcumine.

[28] Masuda T., Hidaka K., Shinohara A., Maekawa T., Takeda Y., Yamaguchi H., *J. Agric. Food. Chem*. **1999**, 47, 71–77.
[29] Masuda T., Maekawa T., Hidaka K., Bando H., Takeda Y., Yamaguchi H., *J. Agric. Food. Chem*. **2001**, 49, 2539–2547.
[30] Chauhan S. M., Kandadai A. S., Jain N., Kumar A., *Chem. Pharm. Bull*. **2003**, 51, 1345–1347.

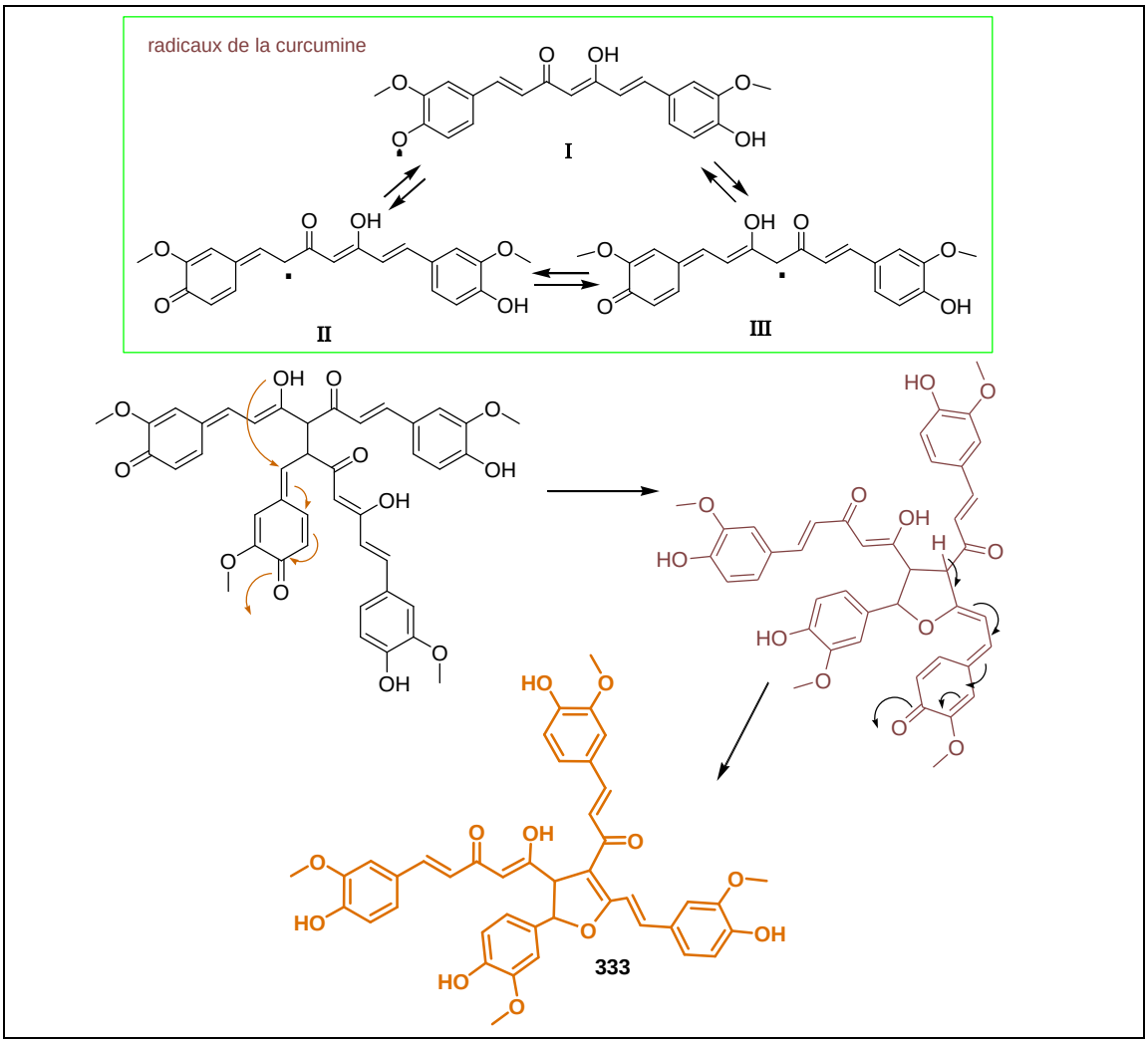


Schéma 4-11. Mécanisme radicalaire proposé pour la formation du produit **333**.

II. Travaux personnels

Dans l'objectif d'aboutir à une diversité moléculaire non encore décrite et peu évidente au départ de la curcumine, nous avons essayé de synthétiser des composés originaux dans des conditions de couplages radicalaires et de désaromatisation oxydante.

A- Conditions de couplages oxydatifs :

Nous avons essayé de réaliser des couplages oxydatifs homodimériques ou hétérodimériques entre la curcumine **58** et d'autres molécules phénoliques : quercétine **336**, 4-hydroxychalcone **334**, acide caféique **335** et resvératrol **337 (Figure 4-6)**.

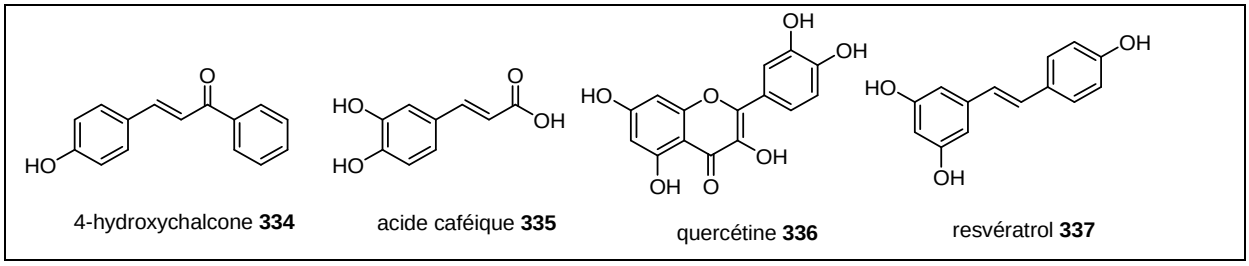
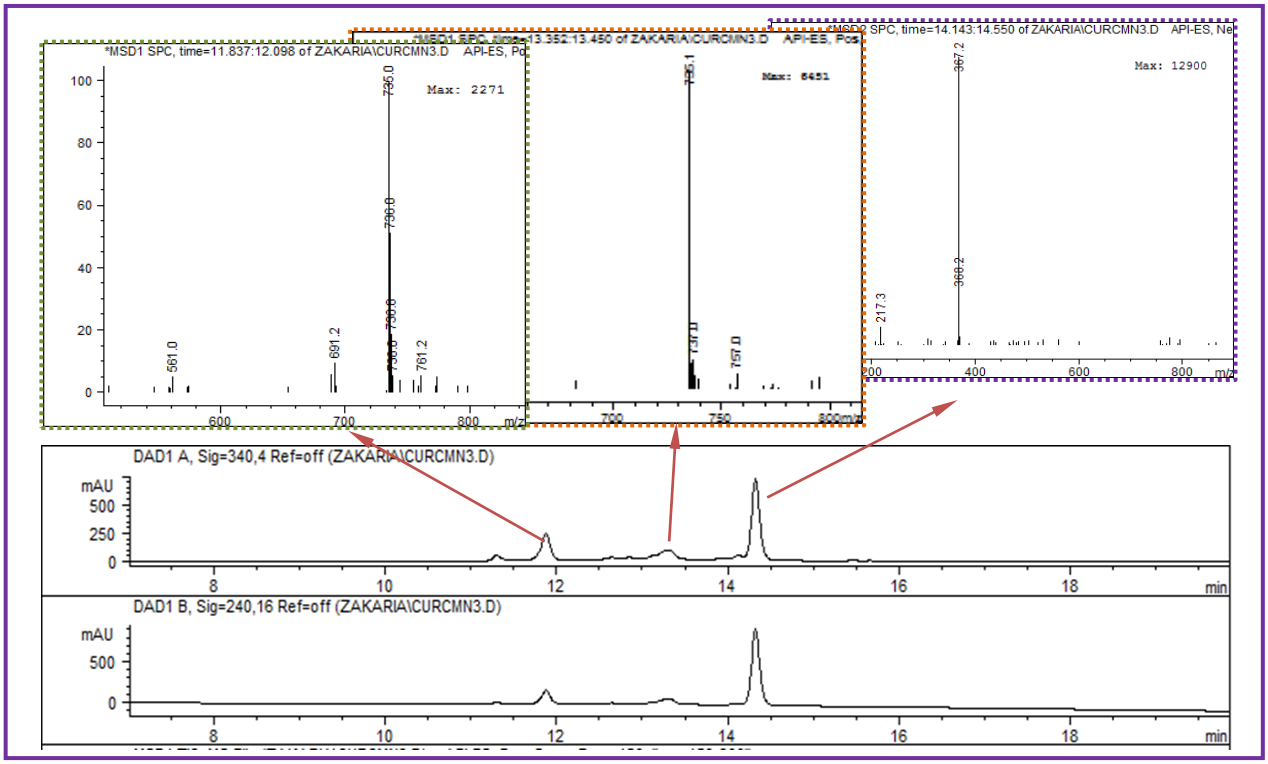


Figure 4-6. Les structures des composés polyphénoliques étudiés.

Les agents de couplage utilisés étaient l'oxyde d'argent (Ag_2O), l'azobisisobutyronitrile (AIBN), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le ferricyanure de potassium (K_3FeCN_6) et un mélange d'oxyde de manganèse et d'acétate de manganèse [MnO_2+$Mn(AcO)_3$].
L'avancement des couplages a été suivi par LC-MS en injectant 10 µL de milieu réactionnel une fois par jour pendant 3 jours.
Dans la suite les abréviations suivantes seront utilisées pour les différentes structures naturelles :

Cur : curcumine	Que : quercétine
AC : acide caféique	Res : resvératrol

Le couplage oxydatif homodimérique (Cur+Cur) est observé avec tous les agents de couplage sauf avec K_3FeCN_6.
Dans le cadre de couplages homodimériques, l'apparition de pics qui n'ont pas les mêmes temps de rétention (différentes polarités) mais qui correspondent aux mêmes masses molaires $[Cur+Cur–2H+H]^+$ peut-être expliquer par le fait que le couplage peut se produire en plusieurs sites potentiels dans la molécule (**figure 4-7**). Par exemple, si le couplage a lieu au niveau d'un groupement phénolique, une diminution de polarité est attendue par rapport à un dimère ayant conservé ses phénols (**Chromatogramme 4-1**).



Chromatogramme 4-1. Le Chromatogramme du couplage homodimérique en présence de MnO_2+$Mn(OAc)_3$.
Conditions : Une colonne Sunfire^{TM} C_{18} analytique (3,5 µm, 2,1 × 100 mm, Waters).
Phase mobile : (A) H_2O+0,1 % acide formique, (B) ACN : gradient de 90 % à 100 %.

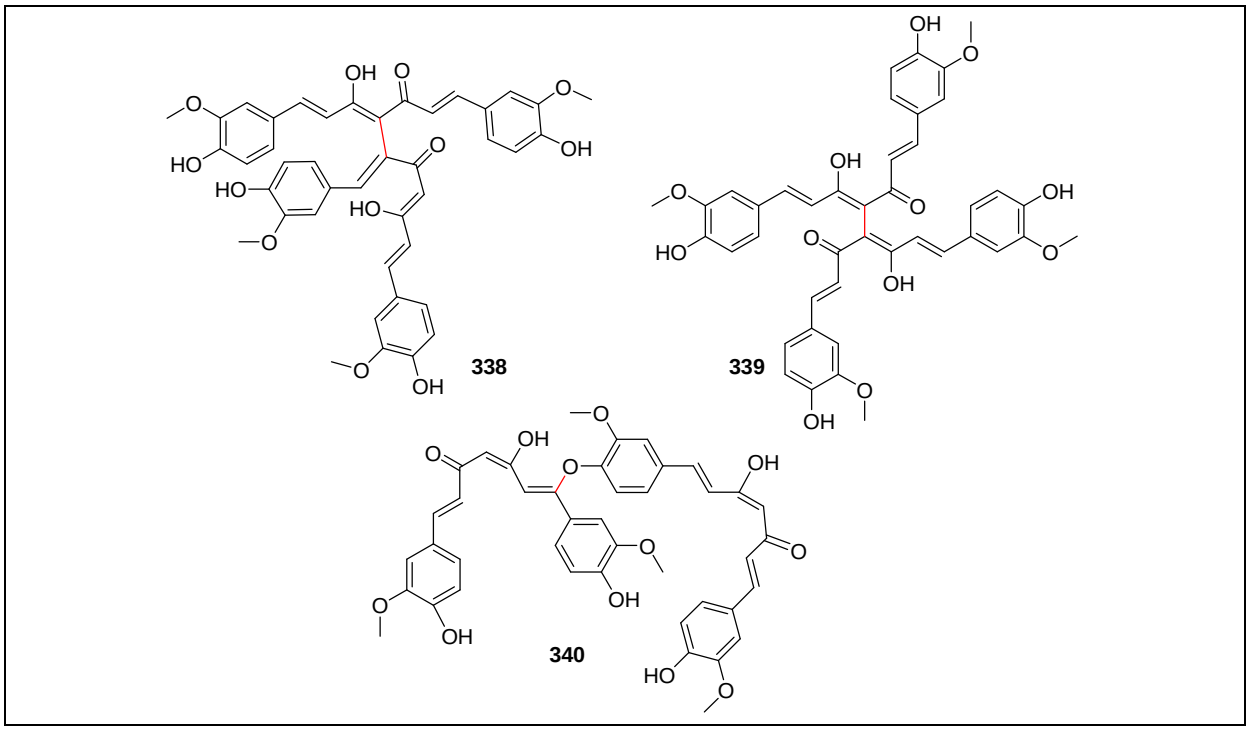


Figure 4-7. Quelques possibilités de couplages homodimériques de la curcumine.

Les résultats LC-MS en mode positif (ESI^+) en mode négatif (ESI^-) des couplages oxydatifs sont résumés dans le **tableau 4-2**. Avec H_2O_2 on observe le couplage de la curcumine avec la quercétine et aussi celui de deux molécules de curcumine.

Le deuxième agent plus intéressant est le mélange MnO_2+$Mn(OAc)_3$ qui a permis d' observer le couplage de la curcumine avec l'acide caféique, mais également de deux molécules de curcumine, et de deux molécules de quercétine entre elles. Avec K_3FeCN_6 un couplage intéressant entre la curcumine et l'acide caféique a été réalisé avec une masse molaire 547 déterminée par *electrospray* en mode positif, correspondant à $[Cur+AC–2H+H]^+$.

La tentative de couplage entre la curcumine et le resvératrol (MnO_2+$Mn(OAc)_3$) n'est pas indiquée dans le **tableau 4-2**. Cette manipulation a montré un pic en LC-MS (ESI^-) correspondant à *m/z* = 593 $[Cur+Res–2H–H]^-$.

Malheureusement, nous n'avons pas pu aller plus loin dans ces expériences car en réalisant quelques-unes des réactions sur de plus grandes quantités, nous n'avons pas pu isoler les composés issus du couplage oxydatif notamment à cause de problèmes de cinétique (les réactions n'arrivent pas à leur terme) et de séparation.

agent de couplage	curcumine + quercétine		curcumine + acide caféique		curcumine + 4-hydroxychalcone		curcumine + curcumine	
	ESI^-	ESI^+	ESI^-	ESI^+	ESI^-	ESI^+	ESI^-	ESI^+
Ag_2O	601 602	735 $[Cur+Cur-2H+H]^+$ t_R = 11,5 min	–	–	593	711 759 536	733 $[Cur+Cur–2H–H]^-$ t_R = 12,3 min	735 $[Cur+Cur–2H+H]^+$ t_R = 12,3 min 491
AIBN	601 603	–	733 545	735 $[Cur+Cur–2H+H]^+$ t_R = 12,1 min	–	–	–	735 $[Cur+Cur–2H+H]^+$ t_R = 12,3 min 759
H_2O_2	667 $[Cur+Que–2H–H]^-$ t_R = 11,2 min 601, 603, 634, 635, 667, 685	735 $[Cur+Cur–2H+H]^+$ t_R = 11,5 min 699		759	–	–	733 $[Cur+Cur–2H–H]^-$ t_R = 13,1 min 425	735 $[Cur+Cur–2H+H]^+$ t_R= 13,1 min
K_3FeCN_6	601 603 715	–		547 $[Cur+AC–2H+H]^+$ t_R = 11,1 min 759	593	–	–	–
MnO_2+ $Mn(OAc)_3$	601 $[Que+Que–2H–H]^-$ t_R = 11,3 min	–		547 $[Cur+AC–2H+H]^+$ t_R = 11,1 min	–	711 536	733 $[Cur+Cur–2H–H]^-$ t_R = 11,8 min	735 $[Cur+Cur–2H+H]^+$ t_R = 11,8 min

Tableau 4-2. Résumé des résultats des réactions radicalaires obtenus par LC–MS en mode positif (ESI^+) et mode négatif (ESI^-). Une colonne Sunfire™ C_{18} analytique (3,5 µm, 2,1 × 100 mm, Waters).

- Cur : curcumine **- Que :** quercétine **- AC :** acide caféique

B- Conditions de désaromatisation oxydante :

La présence de deux groupements phénoliques et deux groupements méthoxy en position *ortho* dans la structure de la curcumine rend cette structure intéressante pour réaliser des réactions de désaromatisation oxydante. Nous espérons par exemple que de telles réactions puissent générer des réactions Diels–Alder, la formation de liaisons C–O inter ou/et intramoléculaires.
Ce type de désaromatisation va ouvrir la porte à une nouvelle diversité moléculaire jamais décrite à ce jour au départ de la curcumine.
Dans premier temps, nous avons essayé de désaromatiser la curcumine. Pour cela plusieurs agents oxydants ont été employés. Le **tableau 4-3** résume les essais réalisés au cours de notre travail. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à désaromatiser la curcumine en suivant des protocoles décrits dans la littérature.

solvant	réactifs	température	références
THF	SIBX	t° ambiante	Pouységu L., *Org. Lett*. **2008** [31]
THF	IBX	t° ambiante	Pouységu L., *Org. Lett*. **2008**[30]
MeOH/H_2O (6/1)	PIDA	t° ambiante	–
MeOH/ CH_2Cl_2 (6/1)	PIDA	t° ambiante	–
MeOH/$KHCO_3$	PIDA	– 10 °C	Nielsen D. K., *J. Org. Chem.* **2009**[32]
MeOH/ACN	PIFA	– 10 °C	–
CH_2Cl_2	PIFA	t° ambiante	Quideau S., *Org. Lett*. **1999**[33]
CH_2Cl_2	$Pb(CH_3COO)_4$	– 40 °C	Green J. C., *J. Am. Chem. Soc*. **2011**[34]

Tableau 4-3. Résumé des conditions de désaromatisation oxydante mises en œuvre sur la curcumine.

Après ces résultats décevants, nous avons essayé de comprendre pourquoi les cycles aromatiques ne se désaromatisent pas dans cette structure. En regardant attentivement la structure de la curcumine, nous pouvons constater que toutes les doubles liaisons y compris les liaisons aromatiques sont impliquées dans la résonance, ce qui rend probablement ces cycles difficiles à désaromatiser.



C'est pourquoi nous avons pensé à "casser" cette résonance en réduisant les doubles liaisons au niveau du "*linker*" afin de pouvoir oxyder le cycle aromatique.

[31] Pouységu L., Marguerit M., Gagnepain J., Lyvinec G., Eatherton A. J., Quideau S., *Org. Lett*. **2008**, 10, 5211–5214.
[32] Nielsen D. K., Nielsen L. L., Jones S. B., Toll L., Asplund M. C., Castle S. L., *J. Org. Chem*. **2009**, 74, 1187–99.
[33] Quideau S., Looney M. A., Pouységu L., *Org. Lett*. **1999**, 1, 1651–1654.
[34] Green J. C., Pettus T. R., *J. Am. Chem. Soc*. **2011**, 133, 1603–8.

1) Réduction des doubles liaisons

a. Hydrogénation catalytique

La synthèse des composés réduits a été déjà décrite dans le cadre de l'évaluation des activités biologiques des analogues de la curcumine. Pour rappel, la réduction se passe en présence de palladium sur charbon 10 % (masse/masse) sous atmosphère d'hydrogène.
Trois composés ont été purifiés **Schéma 4-12**.

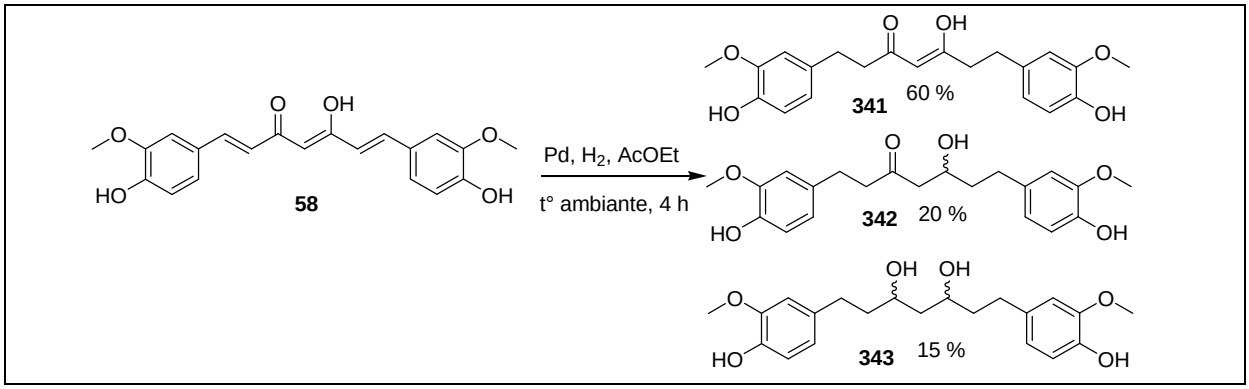
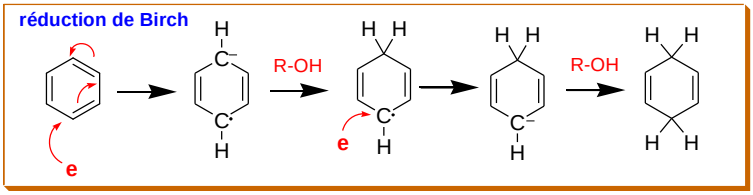


Schéma 4-12. Réduction de la curcumine.

b. La réaction de Birch

Le composé **343** a été aussi obtenu dans les conditions de la réaction de Birch. La réduction de Birch est une réduction de noyaux aromatiques par le sodium dans l'ammoniac liquide. Le métal peut aussi être le lithium ou le potassium et les atomes d'hydrogène sont fournis par un alcool comme l'éthanol. Comme nous pouvons le voir cette réduction est aussi une désaromatisation de cycle aromatique.
La première étape d'une réduction de Birch est l'addition d'un premier électron provenant du métal alkalin formant un radical anion. En présence d'un alcool, l'anion est protoné laissant un radical sur le cycle. Ce radical restant va former une charge négative par addition d'un nouvel électron. Le carbanion est ensuite protoné par un alcool, fournissant le cycle benzénique réduit et désaromatisé.



La curcumine a été solubilisée dans le THF, et dans l'ammoniac liquide, le lithium a été utilisé comme métal et le 2-méthyl propan-2-ol comme source d'hydrogène.
La réduction de Birch n'a pas réduit les cycles aromatiques de la curcumine, en revanche le composé majoritaire issu de cette réduction est un composé réduit au niveau du lien entre les deux cycles aromatiques. (**Schéma 4-13**).
En ce qui concerne la curcumine les groupements phénol et méthoxy enrichissent les cycles aromatiques en électrons (chapitre précédant) ceci ne favorise pas la réduction du noyau aromatique. A contrario, la réduction du *"linker"* s'est faite d'autant plus facilement que les doubles liaisons sont désactivées par les cétones

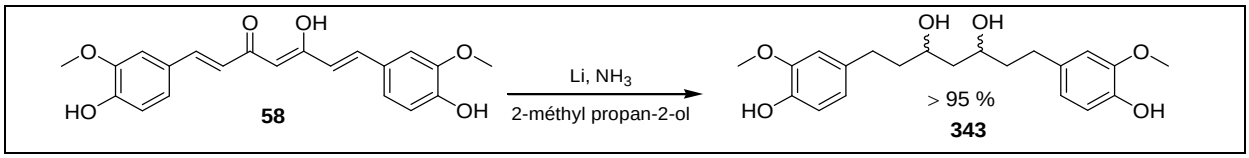


Schéma 4-13. Réaction de Birch

2) Désaromatisation oxydante des dérivés curcuminoïdes.

Nous avons essayé de désaromatiser les composés **341**, **342** et **343**. Dans la partie suivante nous présentons les résultats intéressants de ce travail.

a. Désaromatisation oxydante du composé 341

En ce qui concerne le composé **341** : Nous avons obtenu des résultats intéressants avec des expériences qui ont été réalisées avec plusieurs agents désaromatisants : le PIDA, IBX, et $Pb(OAc)_4$.
Avec le PIDA, nous avons suivi le protocole décrit par Nielsen *et al*.,.[32] Le composé **341,** avec le PIDA (2 éq) et $KHCO_3$, a donné le composé **344** qui a été purifié sur colonne de silice flash. La formation du composé **344** peut s'expliquer par une désaromatisation du composé **341** suivie d'une cyclisation accompagnée par une réaromatisation de l'intermédiaire généré par une double attaque de l'énolate central de la dione sur les cycles désaromatisés. Le **Schéma 4-14** montre le mécanisme proposé pour la formation du produit **344**.

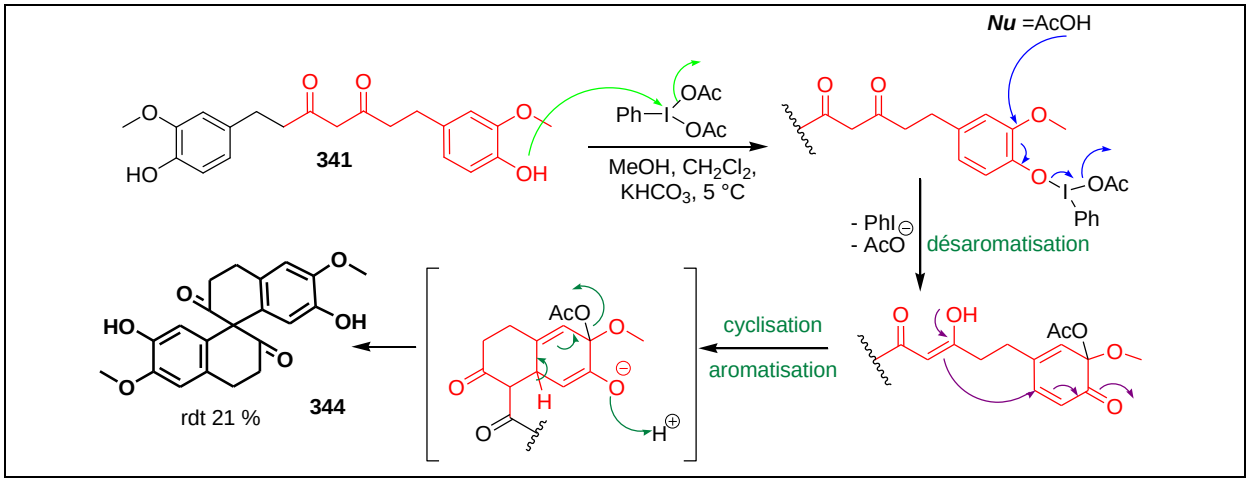


Schéma 4-14. Synthèse du composé **344.**

Ce type de réaromatisation a été déjà évoqué dans la littérature par l'équipe du Pr. Stéphane Quideau.[35]
Comme nous pouvons le constater, la molécule **344** a une structure originale synthétisée en une seule étape (21 %), sachant que la même structure a également été obtenue avec le SIBX mais avec un rendement un petit peu plus bas (8 %).
Le composé **344** ne possède pas de centre stéréogénique, mais il présente un cas particulier de la chiralité, il s'agit de chiralité axiale. Cette chiralité due à un axe de chiralité - un axe autour duquel un ensemble de substituants se trouvent dans un arrangement spatial qui n'est pas superposable à son image dans un miroir (**Figure 4-8**).

[35] Pouységu L., Avellan A. V., Quideau S., *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3425–3436.

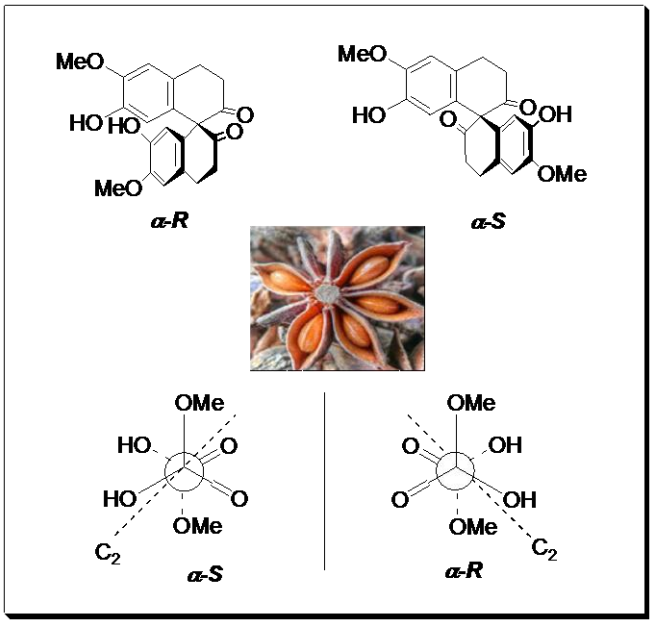


Figure 4-8. Les deux énantiomères du composé **344**.

Le composé racémique **344** est donc un mélange équimoléculaire des deux énantiomères (*α-R*) -**344** et (*α-S*)-**344**.
En essayant d'autres types de réactifs, nous avons désaromatisé le composé **341** en employant le tétracétate de plomb dans le dichlorométhane anhydre à – 40 °C selon le protocole qui a été déjà décrit par Green *et al*.,[34] une nouvelle structure a été synthétisée à partir de cette réaction (**Schéma 4-15**) mais avec un faible rendement après purification.

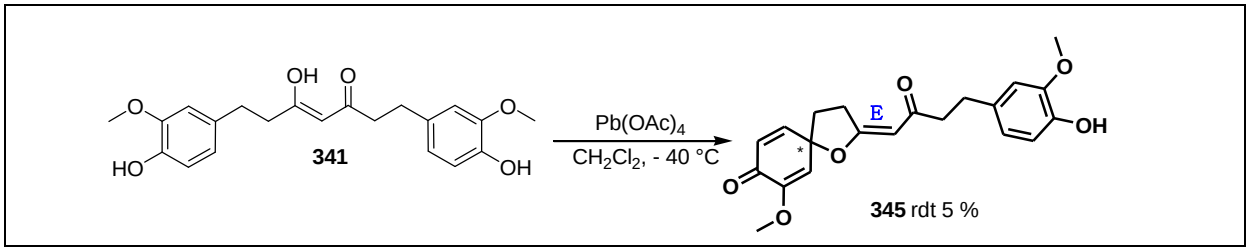


Schéma 4-15. Synthèse de composé **345.**

La formation du produit **345** (**Schéma 4-15**) s'explique par une oxydation appelée "oxydation de Wessely". En 1950, Wessely est l'un des premiers a avoir utilisé ce type d'oxydation à deux électrons pour réaliser la synthèse d'*o*-quinones monocétaliques *via* l'utilisation de tétracétate de plomb $Pb(OAc)_4$ dans l'acide acétique. Les produits d'*o*-acétoxylation sont les produits majoritairement isolés (**Schéma 4-16**).[36]

La réaction a lieu sur la position *ortho* la plus riche en électrons.[37] Aujourd'hui encore l'oxydation de Wessely reste très employée et peut, par exemple, être accompagnée d'une réaction de Diels−Alder pour effectuer la synthèse de plusieurs structures naturelles complexes.[38]

[36] Wessely F., Sinwel F., *Monatsh. Chem*. **1950**, 81, 1055–1070.
[37] Andersson G., *Acta Chem. Scand*. **1976**, B 30, 64–70.
[38] Gong J., Lin G., Sun W., Li C. C., Yang Z., *J. Am. Chem. Soc*. **2010**, 132, 16745–16746.

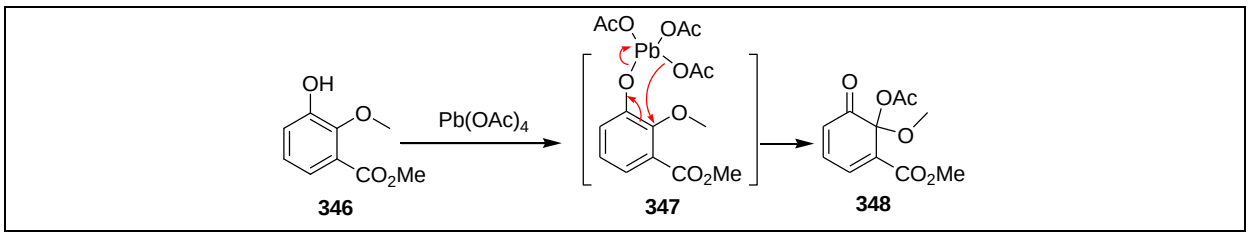


Schéma 4-16. Mécanisme de l'oxydation de Wessely.[39]

Le **Schéma 4-17**, résume le mécanisme de formation du composé **345** *via* une oxydation de Wessely. La double liaison (C-4, C-5) du composé **345** a une configuration probablement *E*, car aucune corrélation n'est observée entre le proton H-4 et H-6 sur le spectre NOESY.

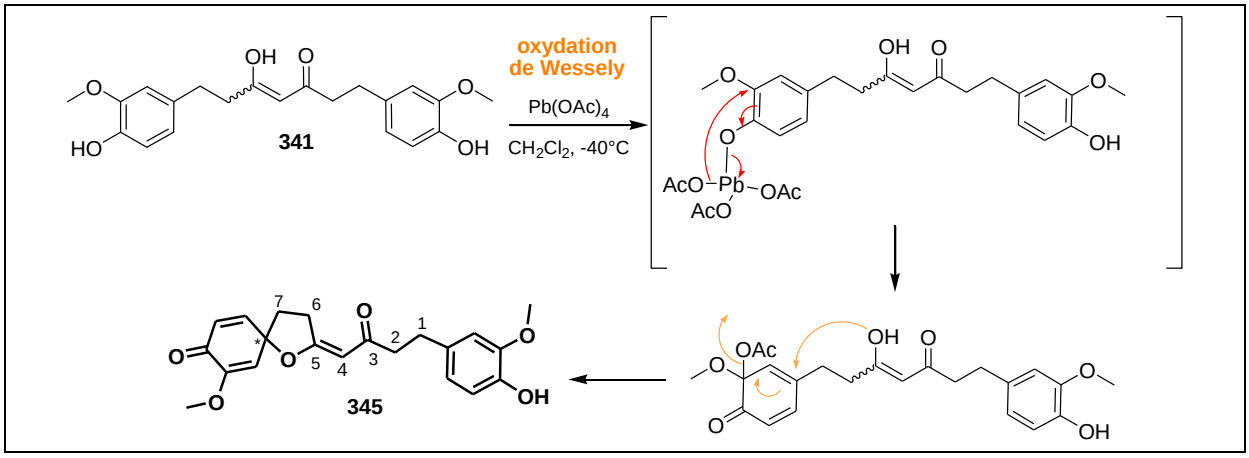


Schéma 4-17. Mécanisme proposé de synthèse de composé **345.**

Le rôle du pH et du solvant est probablement important pour expliquer cette formation, en favorisant la forme tautomérique énolique.

[39] Harrison, M. J., Norman R. O. C., *J. Chem. Soc. C*, **1970**, 728–730.

b. Désaromatisation oxydante du composé 342

Pour le composé **342**, nous n'avons pas eu de résultats positifs avec les réactifs à l'iode hypervalent. En revanche, avec le tétracétate de plomb une désaromatisation suivie par une attaque nucléophile entrainant une cyclisation pour offrir le composé **350** a été observée.
Comme pour le composé **341** la première étape de synthèse d'*o*-quinones monocétaliques a été réalisée par une oxydation de Wessely formant le composé intermédiaire **349**. La deuxième étape consiste en une double attaque nucléophile : une attaque nucléophile par l'hydroxyle de l'alcool secondaire forme un cycle furane, l'autre attaque nucléophile a été assurée par un groupement acétoxy (**Schéma 4-18**).

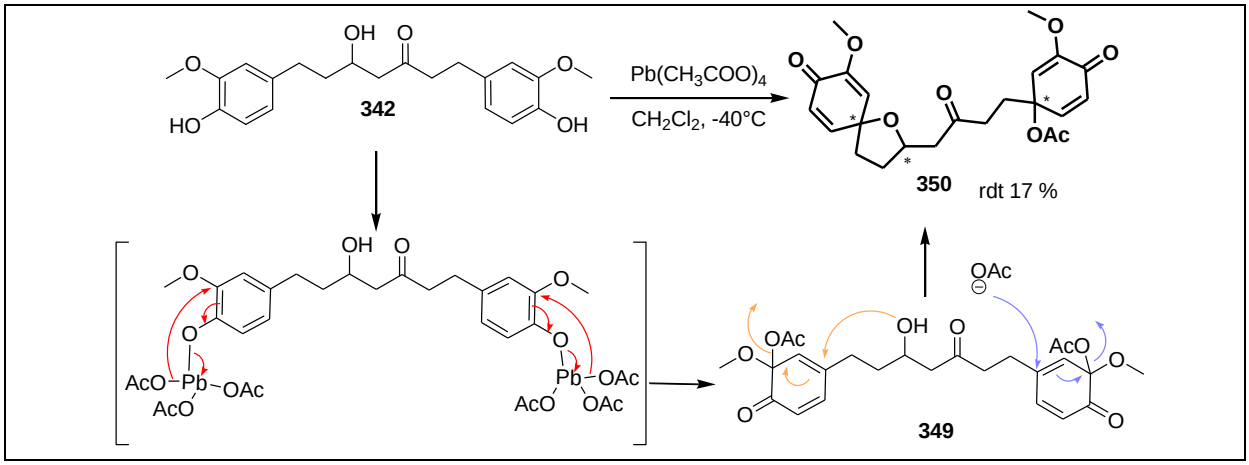
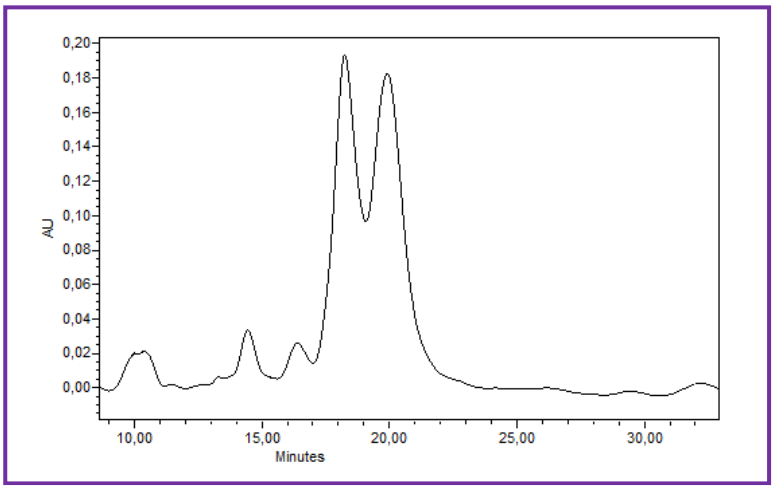


Schéma 4-18. Synthèse de composé **350.**

En ce qui concerne ce composé également, la présence de diastéréoisomères est possible. L'analyse HPLC analytique équipée d'une colonne chirale présente plusieurs pics avec deux pics majoritaires dans des conditions de résolution non optimisées (**chromatogramme 4-1**).



Chromatographie chirale, colonne CHIRALCEL AD, phase mobile : hexane + 0.1% TFA / isopropanol 70 : 30 1mL/min, λ_{max} = 225 nm

Chromatogramme 4-1. Analyse par HPLC chirale du composé **350**.

Les huit stéréoisomères possibles sont montrées dans la **Figure 4-9**.

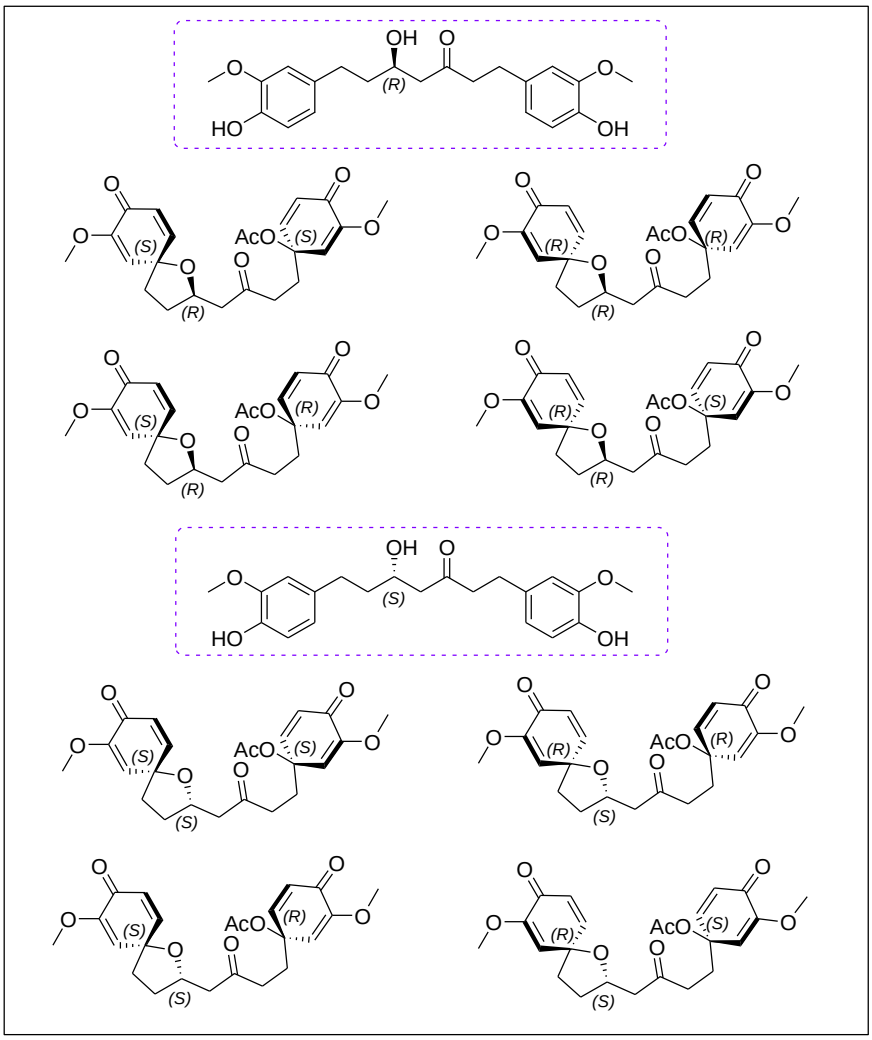


Figure 4-9. Possibilités de stéréochimie du composé **350**.

Cette hypothèse a été confirmée par la présence de plusieurs déplacements chimiques proches correspondants aux carbones sur le spectre de RMN du carbone.

c. Désaromatisation oxydante du composé 343.

Finalement pour le composé **343**, la désaromatisation oxydante avec l'acétate de plomb a donné deux molécules **351**, **352** (**Schéma 4-19**).

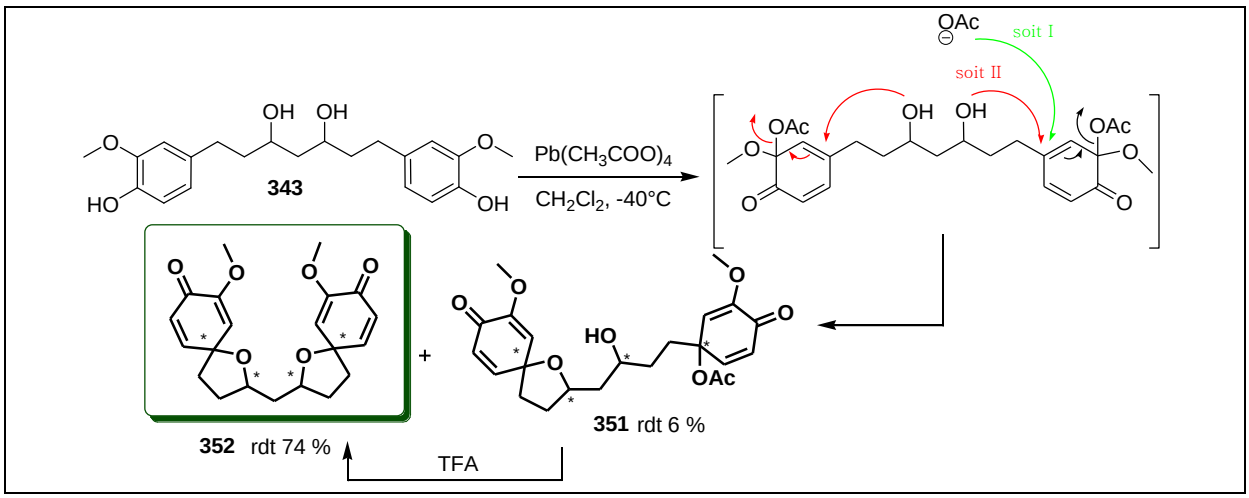


Schéma 4-19. Synthèse du composé **352**.

Le composé **352** a été formé majoritairement avec un rendement de 74 % et le composé **351** minoritairement, la formation de ce composé n'a pas été observée de façon systématique (rendement 0 à 6 %).
En ajoutant deux gouttes de TFA dans le tube de RMN du composé **351**, nous avons remarqué des transformations et l'apparition des signaux correspondants au composé **352**. Cette observation a été confirmée aussi par la spectrométrie de masse.
Le composé **352** qui présente une structure symétrique intéressante avec quatre centres stéréogéniques et un rendement élevé de formation a attiré particulièrement notre attention. C'est pourquoi, une étude a été réalisée a fin de déterminer la configuration des carbones quaternaires du composé **352**.

<u>Étude de stéréochimie du composé 352 :</u>

Rychnovsky S. D *et al*.,[40] ont développé une méthode de détermination de la configuration relative de diols 1,3 par RMN du carbone. L'étude est réalisée sur un cétal dérivé du 1,3-diol, et la valeur du déplacement chimique des carbones de la fonction cétal et des méthyles permet de déterminer sans ambigüité si le diol de départ est *syn* ou *anti*. Pour un diol *anti* le carbone quaternaire présente un déplacement chimique d'environ 100,6 ppm et les deux méthyles de 24,6 ppm. Pour un cétal issu d'un diol *syn* les valeurs attendues pour le carbone quaternaire sont d'environ 98,1 ppm et de 19,4 et 30,0 ppm pour les méthyles (**Figure 4-10**).

[40] Rychnovsky S. D., Rogers B., Yang G., *J. Org. Chem*. **1993**, 58, 3511–3515.

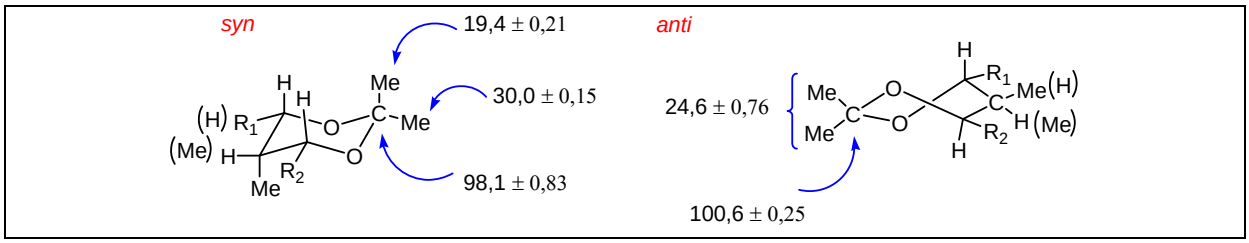


Figure 4-10. Déplacements chimiques ^{13}C pour les configurations *syn* et *anti* tel que décrits par Rychnovsky S. D *et al*.

Pour déterminer la configuration de l'alcool **343**, obtenu par la voie de réduction des doubles liaisons dans les conditions d'hydrogénation catalytiques. Le cétal **353** a été préparé (**Schéma 4-20**).

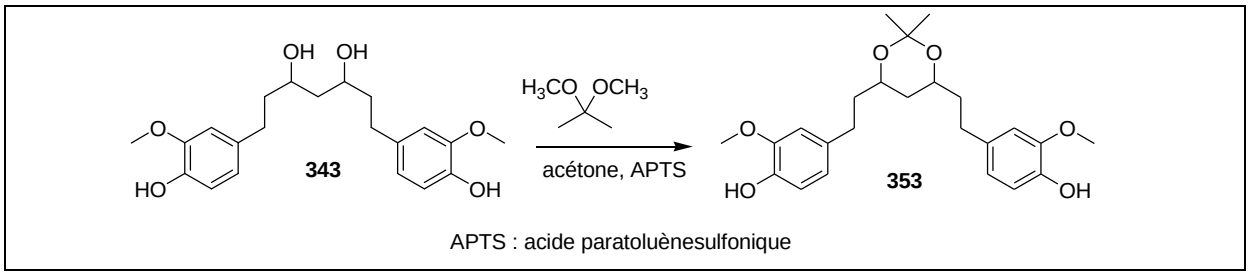


Schéma 4-20. Synthèse du composé **353**.

Le déplacement chimique mesuré du carbone quaternaire est de 98,5 ppm et ceux des méthyles de 20,0 et 30,3 ppm, permettant ainsi d'affirmer que le diol **343** a une configuration *syn* (**Figure 4-11**).

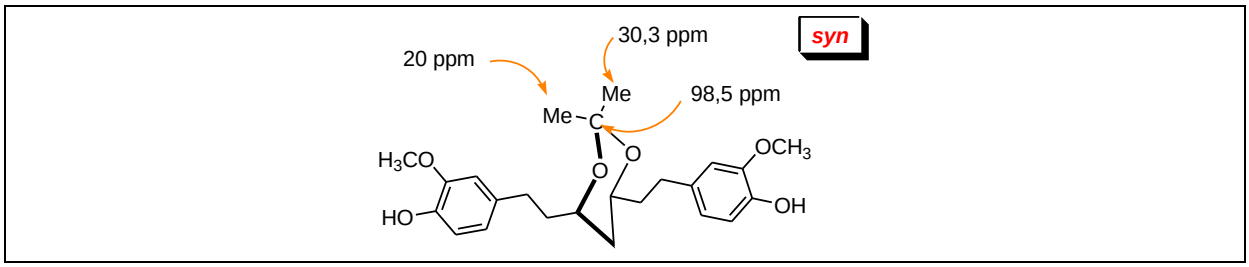


Figure 4-11. Déplacements chimiques ^{13}C du groupement acétal de pour le composé **353**.

Pour le composé **352**, il y a donc trois diastéréoisomères possibles dont deux diastéréoisomères sont *meso*, et le troisième diastéréoisomère présente deux énantiomères. Au final, quatre isomères sont possibles. Toutes les possibilités sont résumées dans la **figure 4-12.**
La même réaction menée à – 60 °C ne montre pas de changement de diastéréosélectivité.

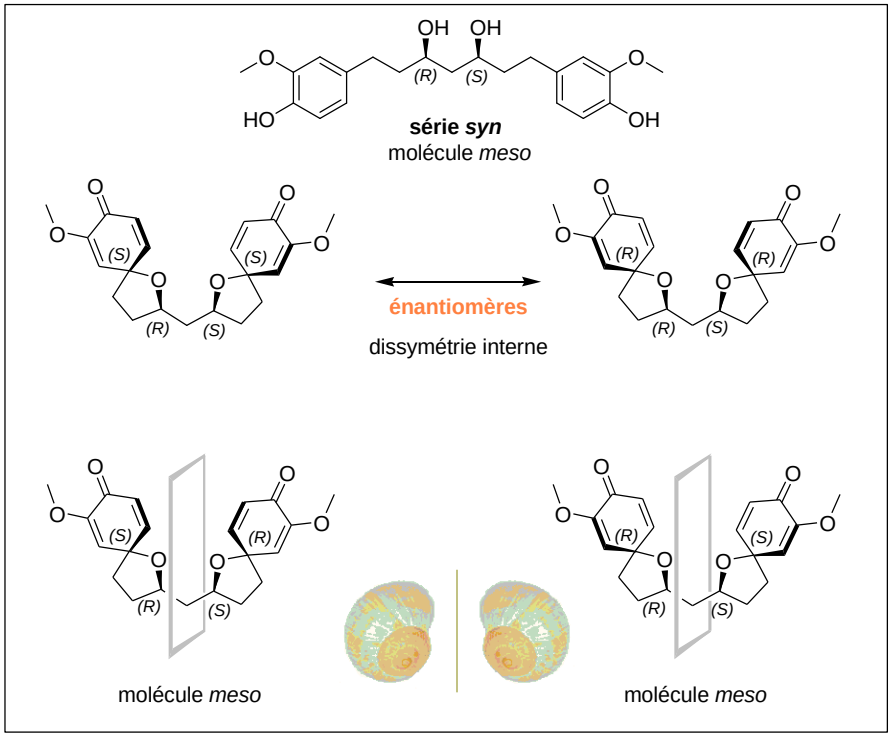
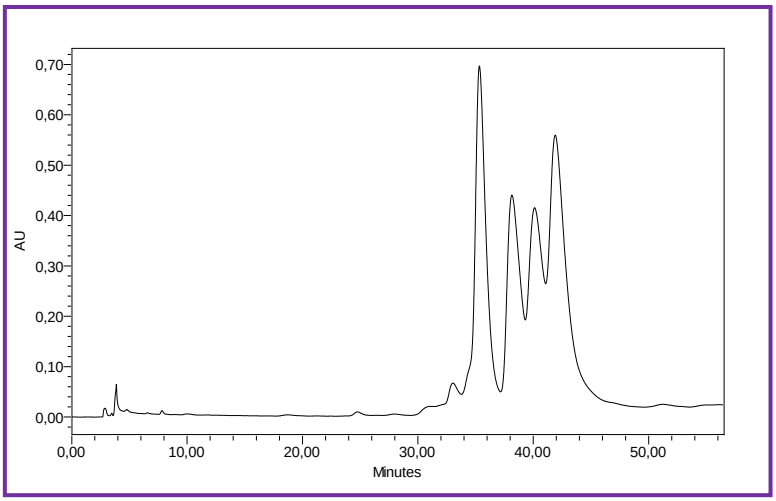


Figure 4-12. Les possibilités de structure de cette molécule avec la stéréochimie déterminée pour le produit **352**.

L'analyse HPLC analytique équipée d'une colonne chirale présente également quatre pics avec un ratio ~1:1:1:1 (**chromatogramme 4-2**).

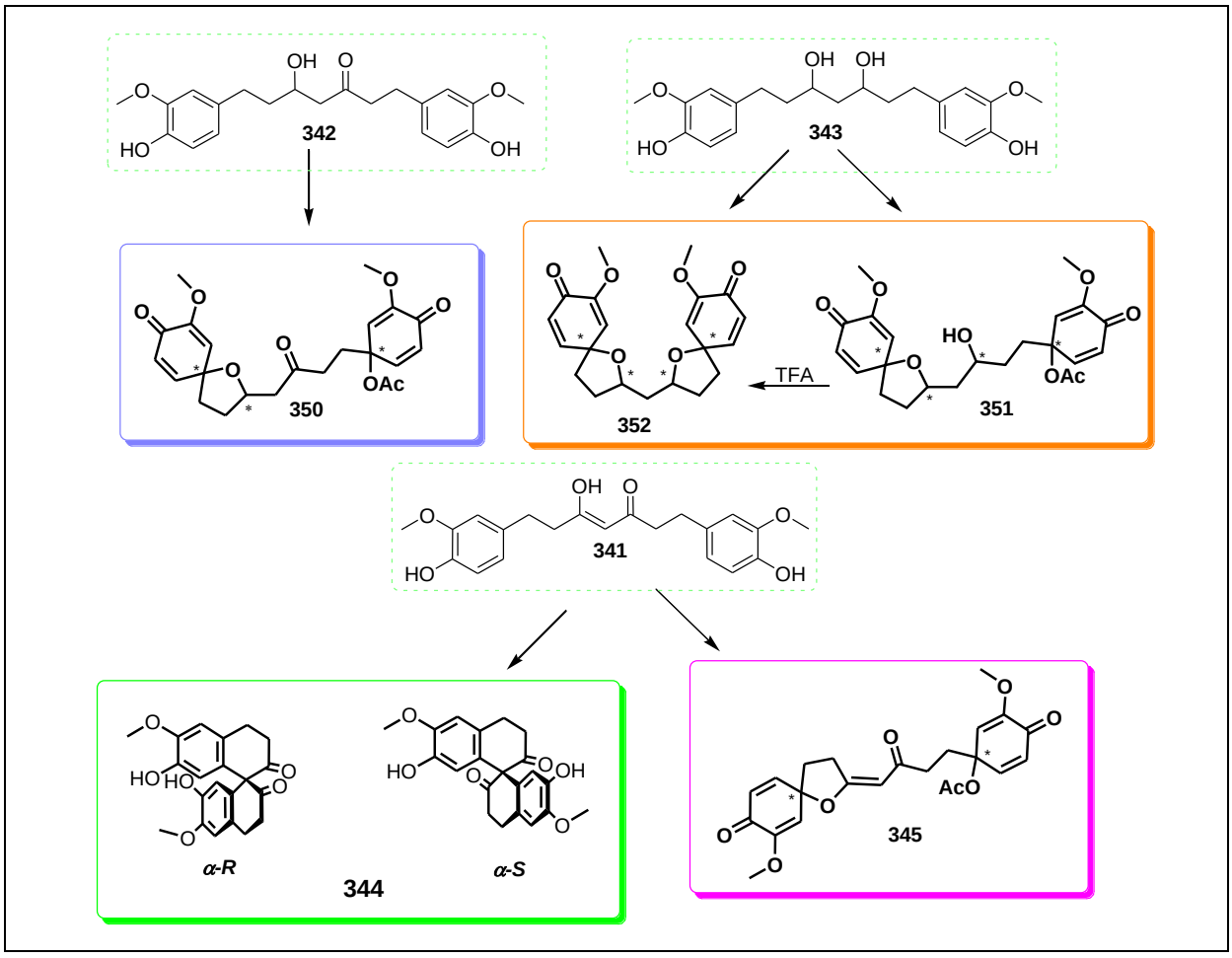


Chromatographie chirale, colonne CHIRALCEL AD, phase mobile : hexane/isopropanol 85:15 1mL/min,, λ_{max} = 236 nm

Chromatogramme 4-2. Analyse par HPLC chirale du composé **352**.

IV. Conclusion et perspectives

Les travaux concernant la réaction de désaromatisation oxydante de la curcumine et ses analogues ont porté leur fruit, nous sommes parvenus à synthétiser des composés originaux en une seule étape, il reste encore à approfondir les études concernant la stéréoséléctivité des réactions notamment avec le tétracétate de plomb et évaluer les activités biologiques de ces composés, sans oublier de réaliser des modifications structurales sur ces plateformes intéressantes.



Notes et références bibliographiques du chapitre 4

[1] Mizobuchi S., Sato Y., *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 399–403.
[2] Büchi G., Francisco M. A., Murray W. V., *Tetrahedron Lett*. **1983**, 24, 2527–2530.
[3] Roche S. P., Porco J. A. Jr., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2011**, 50, 4068–93.
[4] Arzeno H., Barton D. H. R., Bergé-Lurion R.-M., Lusinchi X., Pinto B. M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1984**, 2069–2076.
[5] Barton D. H. R., Bergé-Lurion R.-M., Lusinchi X., Pinto B. M., *J. Chem. Soc*., *Perkin Trans*. 1 **1984**, 2077–2080.
[6] Quideau S., Pouységu L., *Org. Prep. Proc. Int*. **1999**, 31, 617–680.
[7] Green JC., Pettus TR., *J. Am. Chem. Soc*. **2011**, 133, 1603–8.
[8] McKillop A., Perry D. H., Edwards M., Antus S., Farkas L., Nogradi M., Taylor E. C., *J. Org. Chem*. **1976**, 41, 282–287.
[9] Becker H. D., *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 2027–2029.
[10] Krohn K., Brügmann K., Döring D., Jones P. G., *Chem. Ber*. **1992**, 125, 2439–2442.
[11] Dong S., Hamel E., Bai R., Covell D. G., Beutler J. A., Porco J. A. Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1494–1497.
[12] Honda T., *Pure Appl. Chem*. **2010**, 82, 1773–1783.
[13] Pouyseégu L., Deffieux D., Quideau S., *Tetrahedron* **2010,** 66, 2235–2261.
[14] Silva L. F. Jr., Olofsson B., *Nat. Prod. Rep*. **2011**, 28, 1722–54.
[15] Barradas S., Carreño M. C., Gonzalez-López M., Latorre A., Urbano A., *Org. Lett*. **2007**, 9, 5019–5022.
[16] Heilmann J., Mayr S., Brun R., Rali T., Sticher O., *HeIV. Chim. Acta* **2000**, 83, 2939–2945.
[17] Chin Y. W., Salim A. A., Su B. N., Mi Q., Chai H. B., Riswan S., Kardono L. B., Ruskandi A., [18]Farnsworth N. R., Swanson S. M., Kinghorn A. D., *J. Nat. Prod*. **2008**, 71, 390–395.
Baldwin J. E., Adlington R. M., Sham V. W.-W., Marquez R., Bulger P. G., *Tetrahedron* **2005**, 61, 2353–2363.
[19] Falomir E., Alvarez-Bercedo P., Carda M., Marco J. A., *Tetrahedron Lett*. **2005**, 46, 8407–8410.
[20] Peuchmaur M., Wong Y-S., *J. Org. Chem*. **2007**, 72, 5374–5379.
[21] Wipf P., Rector S. R., Takahashi H., *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, 124, 14848–49.
[22] Nicolaou K. C., Edmonds D. J., Li A., Tria G. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 119, 4016–4019.
[23] Tisdale E. J., Slobodov I., Theodorakis E. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 12030–12035.
[24] Nicolaou K. C., Hao X., Wartmann M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 117, 766–771.
[25] Achilonu M. C., Bonnet S. L., van derWesthuizen J. H., *Org. Lett*. **2008**, 10, 3865–3868.
[26] Selenski C., Pettus T. R. R., *Tetrahedron* **2006**, 62, 5298–5307.
[27] Daquino C., Rescifina A., Spatafora C., Tringali C., *Eur. J. Org. Chem*. **2009**, 36, 6289–6300.
[28] Masuda T., Hidaka K., Shinohara A., Maekawa T., Takeda Y., Yamaguchi H., *J. Agric. Food. Chem*. **1999**, 47, 71–77.
[29] Masuda T., Maekawa T., Hidaka K., Bando H., Takeda Y., Yamaguchi H., *J. Agric. Food. Chem*. **2001**, 49, 2539–47.
[30] Chauhan S. M., Kandadai A. S., Jain N., Kumar A., *Chem. Pharm. Bull*. **2003**, 51, 1345–7.
[31] Pouységu L., Marguerit M., Gagnepain J., Lyvinec G., Eatherton A. J., Quideau S., *Org. Lett*. **2008**, 10, 5211–5214.
[32] Nielsen D. K., Nielsen L. L., Jones S. B., Toll L., Asplund M. C., Castle S. L., *J. Org. Chem*. **2009**, 74, 1187–99.
[33] Quideau S., Looney M. A., Pouységu L., *Org. Lett*. **1999**, 1, 1651–1654.
[34] Green J. C., Pettus T. R., *J Am Chem Soc*. **2011**, 133, 1603–1608.
[35] Pouységu L., Avellan A. V., Quideau S., *J. Org. Chem*. **2002**, 67, 3425–3436.
[36] Wessely F., Sinwel F., *Monatsh. Chem*. **1950**, 81, 1055–1070.
[37] Andersson G., *Acta Chem. Scand*. **1976**, B 30, 64–70.
[38] Gong J., Lin G., Sun W., Li C. C., Yang Z., *J. Am. Chem. Soc*. **2010**, 132, 16745–16746.
[39] Harrison M. J., Norman R. O. C., *J. Chem. Soc. C*, **1970**, 728–730.
[40] Rychnovsky S. D., Rogers B., Yang G., *J. Org. Chem*. **1993**, 58, 3511–3515.

Chapitre 5

Squalénisation de la curcumine

I. Introduction sur la squalénisation

II. Travaux personnels :

A. Synthèse de curcumines squalénisées et préparation de "nanocurcumines"

B. Évaluations biologiques.

1) Activités antiparasitaires.
2) Autres activités.

C. Étude de la stabilité enzymatique des curcumines squalénisées.

III. Conclusion

I. Introduction sur la squalénisation

La squalénisation est une stratégie de conception de nouveaux nanomédicaments, qui consiste à coupler de manière covalente un dérivé du squalène à un principe actif, afin de pouvoir augmenter sa biodisponibilité.
Cette invention récente de l'équipe de P. Couvreur repose sur l'observation fortuite que le couplage du squalène à des analogues nucléosidiques aboutit systématiquement à des molécules plus actives et qui s'auto-assemblent spontanément sous forme de nanoparticules (de 60 nm à 300 nm) en milieu aqueux. Ces nanosystèmes peuvent donc être administrés par voie intraveineuse.
Ce concept original de squalénisation a déjà été appliqué à deux analogues nucléosidiques à activité anticancéreuse (la gemcitabine et l'Ara-C) et à trois analogues nucléosidiques à activité antivirale (le ddI, le ddC et l'AZT). Des résultats spectaculaires ont été obtenus *in vitro* sur culture de cellules et *in vivo* sur différents cancers expérimentaux.[1]
Au cours de notre travail, la curcumine squalénisée a été préparée avec une caractérisation complète de nanoparticules dispersées en milieu aqueux.
Cette préparation a été réalisée dans l'espoir d'améliorer la biodisponibilité de la curcumine, en collaboration avec le Dr. D. Desmaële.

II. Travaux personnels

A. Synthèse de curcumines squalénisées et préparation de "nanocurcumines"

Pour la préparation il y a deux étapes :

La première étape est la synthèse de la curcumine squalénisée par une simple réaction de couplage déjà décrit par M. Lalanne *et al*.,[2] dans le cadre de la préparation de prodrogues, le **Schéma 5-1** résume la synthèse des deux composés, mono et bisqualénisés **354**, **355**, respectivement obtenus par estérification entre l'hydroxyle phénolique de la curcumine et le groupement carboxylique de l'acide squalénique (un dérivé en C-27 du squalène).

La deuxième étape consiste à mettre les composés synthétisés **354** et **355** en solution aqueuse sous forme de nanoparticules. Le protocole suivi a été décrit par Caron *et al.*[3]
Les nanoparticules (nano-**354** et nano-**355**) de **354** et **355** ont été préparées par précipitation directe d'une solution éthanolique dans une solution isotonique de glucose à 5 % en solution aqueuse. Deux concentrations de nanoparticules ont été préparées à 1 mg/mL et à 5 mg/mL. Ces particules ont un indice de polydispersité inférieur à 0,30 mesuré par diffusion de lumière quasi-élastique et montrent l'effet caractéristique des colloïdes Tyndall.



Nous avons remarqué que l'augmentation de la concentration jusqu'à 5 mg/mL n'entraîne qu'une légère augmentation de la taille des particules, qui reste inférieure à 200 nm de diamètre.
Par ailleurs, aucun changement significatif de la taille des nanoparticules n'a été détecté sur une période de stockage de 7 jours à 4 °C.

[1] Couvreur P., Stella B., Reddy L. H., Hillaireau H., Dubernet C., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Rocco F., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Rosilio V., Marsaud V., Renoir J.-M., Cattel L., *Nano Lett*. **2006**, *6*, 2544–2548.
[2] Lalanne M., Paci A., Andrieux K., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Deroussent A., Ré M., Vassal G., Couvreur P., Desmaële D., *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2007**, 17, 2237–2240.
[3] Caron J., Reddy L. H., Lepêtre-Mouelhi S., Wack S., Clayette P., Rogez-Kreuz C., Yousfi R., Couvreur P., Desmaële D., *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2010**, 20, 2761–2764.

Les nanoparticules ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET). Cette expérience a montré des particules sphériques d'un diamètre moyen de 50 nm et 100 nm **(Figure 5-1)**.

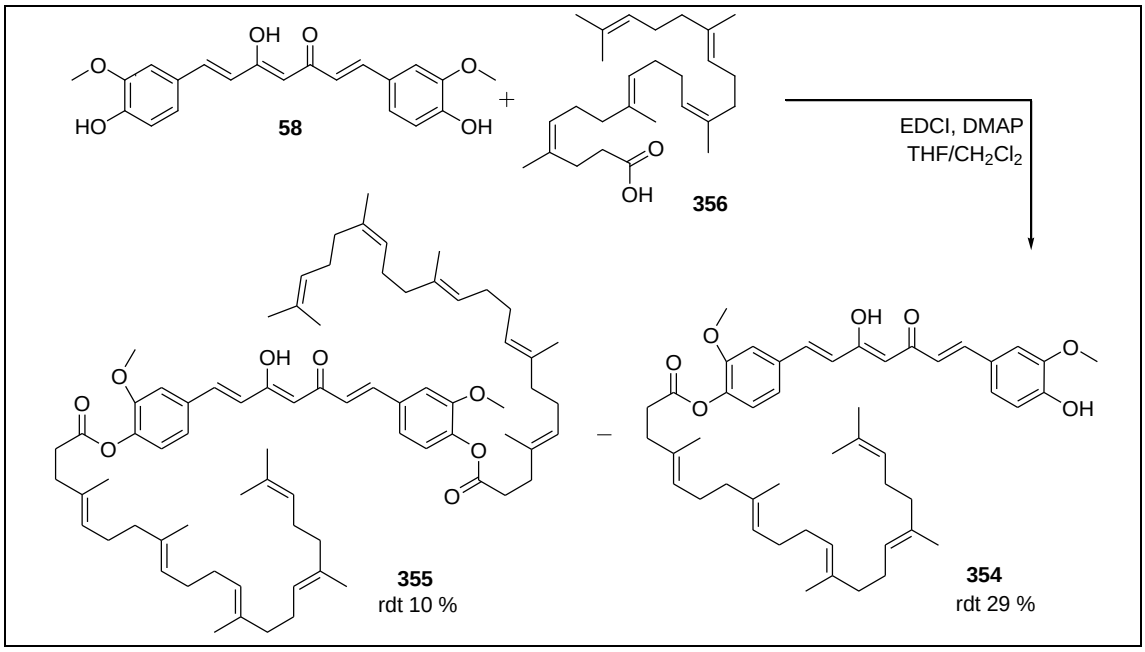


Schéma 5-1. Synthèse de deux curcumines squalénisées.

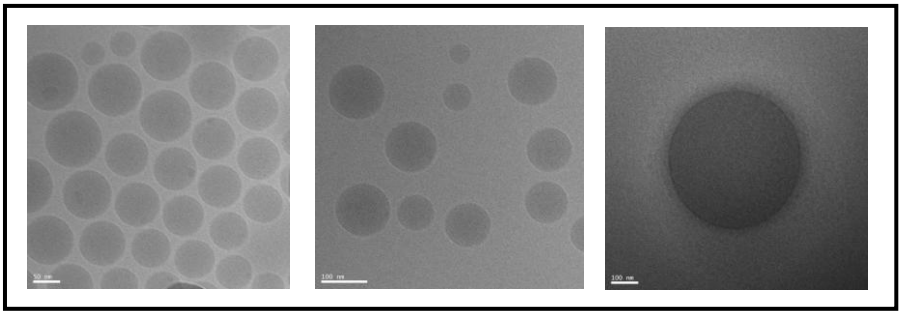


Figure 5-1. Images de MET de nanoparticule (**355**).

L'intérêt de cette forme est de pouvoir mettre la curcumine en suspension homogène dans l'eau (**Figure 5-2**), injectable, et même administrable par voie orale. En accrochant des bras hydrophobes sur la curcumine, nous formons une prodrogue de la curcumine qui peut favoriser beaucoup sa biodisponibilité.

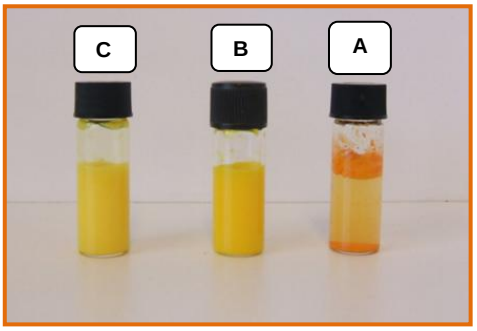


Figure 5-2. Suspension de la curcumine et des composés squalénisés,
A : curcumine, **B** : curcumine monosqualène, **C** : curcumine bisqualène.

Après avoir préparé les nanoparticules pour les deux composés squalénisés, nous avons évalué l'activité antiparasitaire *in vitro* et *in vivo*. Dans le cadre des tests *in vitro*, nous avons évalué l'activité pour les deux esters squalénisés et comparés leurs activités avec les activités des deux composés squalénisés sous forme nanoparticules (nano-**354** et nano-**355)**.

B. Évaluations biologiques

1) Activités antiparasitaires

Tous les composés, sous forme nanoparticulaire ou non, ont perdu leur activité trypanocide contre *T. b. brucei*. Par contre l'activité a été améliorée surtout pour les deux produits sous forme de nanoparticules contre *L. donovani* (forme promastigote). Les nanoparticules de **380** (monosqualène) ont une activité deux fois plus importante que la curcumine (**Tableau 5-1**), et les nanoparticules **355** (bisqualène) ont une activité beaucoup plus forte que la curcumine avec un CI_{50} de l'ordre ≈ 2 µM.

Produits	*T. b. brucei* CL_{100}% (µM)	*L.donovani* (promastigote) CI_{50} (µM)
58	8,5	17,5 ± 1,0
nano-**355**	-	1,8 ± 0,4
nano-**354**	-	6,0 ± 1,0
355	-	22,5 ± 4,5
354	-	12,5 ± 3,5

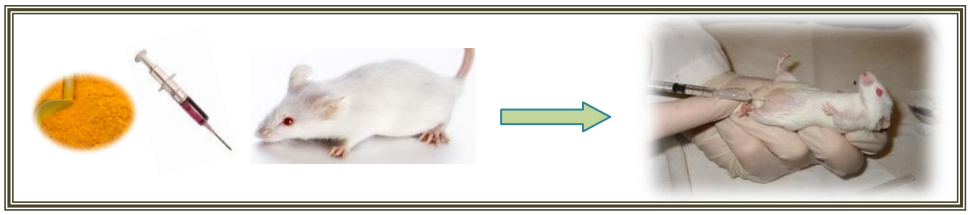
- pas d'activité

Tableau 5-1. Les résultats d'activité antiparasitaire des composés squalénisés

Malgré l'absence d'activité trypanocide *in vitro*, nous avons décidé de mener un test d'activité trypanocide *in vivo* chez la Souris, en comparaison avec la curcumine **58** *in vivo*. Cette prodrogue pourrait présenter une activité *in vivo* plus intéressante qu*'in vitro* via une augmentation de $t_{1/2}$ par rapport à la curcumine **58**.

Le test d'activité trypanocide *in vivo* chez les souris :

Le test biologique a été réalisé selon le protocole décrit par P. M. Loiseau *et al*.[4] Avant traitement, les souris ont été infectées par voie intrapéritonéale ***IP*** avec 10^{+4} trypomastigotes, le traitement des souris a commencé à 24 h après infestation.
Le traitement est considéré comme efficace lorsque la moyenne du temps de survie dépasse 30 jours. Les souris utilisées sont les souris "Swiss".
Le traitement a été réalisé par deux voies, intrapéritonéale (***IP***) et intraveineuse (***IV***), la différence entre les deux voies est le solvant utilisé pour solubiliser la curcumine et la concentration injectée.



Traitement par voie *IP* : 2 souris contrôles ne reçoivent que le solvant, les autres souris (4 souris par dose) ont reçu la curcumine, à deux doses différentes (100 et 200 mg/kg) de curcumine diluée dans le DMSO.
Traitement par voie *IV* : la dose de curcumine employée est 10 mg/kg solubilisée dans du PEG 300 (40 % dans H_2O). [Un test de toxicité a été réalisé pour les doses et les solvants injectés.[5]]
Pour les nanocurcumines préparées à partir de **354** et **355**, les souris ont été traitées aux mêmes doses d'équivalents que la curcumine seule.
Avant le test, une étude de toxicité de ces nanoparticules a été réalisée, chez les souris, par les deux voies d'injection, en surveillant le poids et l'état général des animaux. Si les souris perdent du poids, cela signifie que les nanoparticules ont un effet néfaste et une certaine toxicité sur les souris ; si les souris prennent du poids de la même manière que des souris non traitées, cela confirme l'absence de toxicité. Les souris ont bien toléré les nanoparticules avec une augmentation de poids comparable à celle des souris contrôles (ne recevant que le solvant).
L'absence de toxicité avérée ayant été déterminée, l'évaluation sur souris infectées par le trypanosoma a été menée.
Malheureusement, toutes les souris infectées avec le parasite sont mortes au bout du cinquième jour de traitement, et les souris contrôles sont toutes mortes après trois jours. Ces résultats décevants peuvent être liés à des problèmes de biodisponibilité ou de métabolisation rapide de la curcumine (déjà discuté dans chapitre 2).

2) Autres activités

La curcumine **58** et les composés nanosqualénisés ont été testés contre six souches de bactéries, par dilution en tube à hémolyse selon une série de concentrations testées à partir de 500 μg/mL jusqu'à 31,62 μg/mL. Nous avons observé que la curcumine a montré une activité avec une concentration minimale inhibitrice (la plus faible concentration inhibant la croissance des micro-organismes visibles dans le tube) de 500 μg/mL, par contre les composés nanosqualénisés n'ont pas d'activité contre ces bactéries.
Les activités antifongiques ont été également évaluées *in vitro*, mais les produits squalénisés n'ont pas non plus montré d'activité contre les souches testées (Chapitre 3).

[4] Loiseau P. M., Lubert P., Wolf J. G., *Antimicrob. Agents. Chemother*. **2000**, 44, 2954–2961.
[5] Bertholom C., Le Ray A. M., Olivier E., Merle C., *STP Pharma Pratiques* **2000**, 10, 137–143.

La cytotoxicité de la curcumine et des nanocurcumines a également été évaluée contre plusieurs lignées cellulaires :
- MCF7, cellules de carcinome mammaire humain ;
- MCF7 MDR, cellules de carcinome mammaire humain multidrogue resistantes ;
- A 549, cellules issues d'un carcinome pulmonaire humain ;
- B16F10, lignée cellulaire de mélanome murin ;
- KB 3.1, lignée cellulaire du cancer du col de l'utérus ;
- MiaPaCa-2, lignée cellulaire du cancer du pancréas.

Les résultats sont résumés dans le **tableau 5-2** et comme nous pouvons le constater, les nanocurcumines ont des cytotoxicités inférieures à celles de la curcumine sur les lignées cellulaires testées.

lignées cellulaires/ CI_{50} (µM)	**Curcumine 58**	**nano-354**	**nano-355**
A 549	20,5	80,5	60
MCF7	31,3	60,1	45,7
MCF7 MDR	54,2	>100	>100
B16F10	14,3	>100	>100
KB 3.1	19,4	58,8	36
MiaPaCa-2	18,6	>100	53,5

Tableau 5-2. Cytotoxicité de la curcumine et de ses nanoparticules.

C. Étude de la stabilité enzymatique des curcumines squalénisées

Nous avons essayé de comprendre pourquoi les nanoparticules "prodrogue" n'ont pas amélioré l'activité ?

Pour cela, nous avons décidé de réaliser une étude de stabilité enzymatique des nanoparticules *in vitro* pour vérifier la capacité des nanoparticules à libérer la curcumine en milieu physiologique. Pour libérer la curcumine, il faut que la liaison ester au niveau des –OH phénoliques soit coupée. (**Schéma 5-2**).

L'étude a été réalisée selon la méthode décrite par Hayashi *et al*.,[6] avec quelques modifications. Plusieurs concentrations des composés squalénisés (**354**, **355**) et des composés squalénisés sous forme de nanoparticules (nano-**354**, nano-**355**) ont été incubées avec une (l'estérase hépatique de porc PLE, EC 3.1.1.1) dans un tampon PBS (pH 7,4) à 37 °C. Des prélèvements après 1/5, 1/4, 1, 2, 4, 24 h ont été effectués et les échantillons prélevés ont été conservés dans de la carboglace pour les analyser ensuite par CHLP-UV.

[6] Hayashi Y., Skwarczynski M., Hamada Y., Sohma Y., Kimura T., Kiso Y., *J. Med. Chem*. **2003**, 46, 3782–3784.

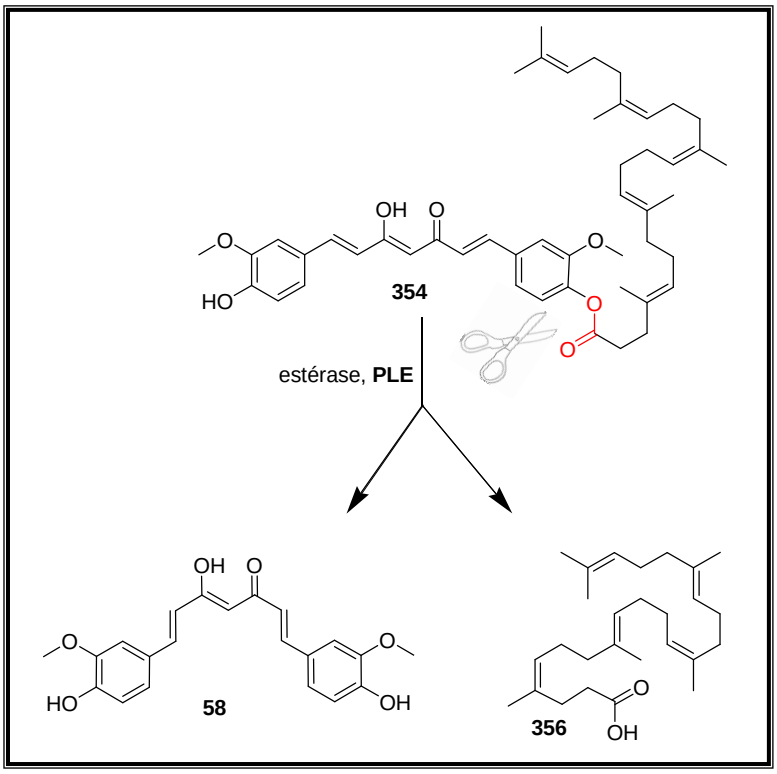


Schéma 5-2. Étude enzymatique de ″nanocurcumine″.

Tous les échantillons prélevés ont été ultérieurement analysés par chromatographie à polarité de phase inverse. Dans aucun échantillon prélevé, le pic correspondant à la curcumine n'a pas été détecté : l'absence d'hydrolyse pourrait expliquer la perte de l'activité *in vitro*, la curcumine sous forme estérifiée perd vraisemblablement l'affinité pour sa cible chez le trypanosome. En ce qui concerne l'activité leishmanicide, nous pouvons expliquer cette amélioration de l'activité par une implication directe de l'hybride curcumine-squalène lui-même dans le mécanisme d'action.

III. Conclusion

En conclusion des nanoparticules de curcumine squalénisée ont été préparées pour la première fois ; leurs activités antiparasitaires, antibactériennes, et cytotoxiques ont été évaluées.
Les ″nanocurcumines″ ont montré une forte activité leishmanicide *in vitro*, tandis qu'aucune activité trypanocide n'a été observée ni *in vitro*, ni *in vivo*.
Le test de stabilité enzymatique a montré une stabilité de la curcumine squalénisée avec l'estérase ce qui peut expliquer la perte d'activité de la curcumine.
L'activité leishmanicide *in vivo* des nano-curcumines reste à déterminer au vu son intéressante activité *in vitro.*

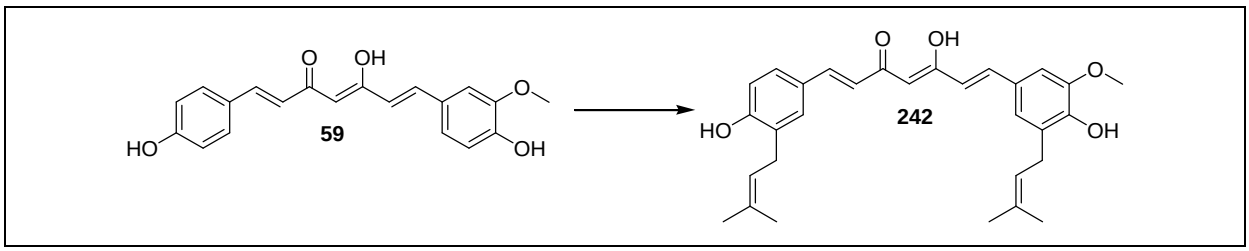
Notes et références bibliographiques du chapitre 5

[1] Couvreur P., Stella B., Reddy L. H., Hillaireau H., Dubernet C., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Rocco F., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Rosilio V., Marsaud V., Renoir J.-M., Cattel L., *Nano Lett*. **2006**, *6*, 2544–2548.
[2] Lalanne M., Paci A., Andrieux K., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Deroussent A., Ré M., Vassal G., Couvreur P., Desmaële D., *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2007**, 17, 2237–2240.
[3] Caron J., Reddy L. H., Lepêtre-Mouelhi S., Wack S., Clayette P., Rogez-Kreuz C., Yousfi R., Couvreur P., Desmaële D., *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2010**, 20, 2761–2764.
[4] Loiseau P. M., Lubert P., Wolf J. G., *Antimicrob. Agents. Chemother*. **2000**, 44, 2954–2961.
[5] Bertholom C., Le ray A. M., Olivier E., Merle C., *STP Pharma. Pratiques* **2000**, 10, 137–143.
[6] Hayashi Y., Skwarczynski M., Hamada Y., Sohma Y., Kimura T., Kiso Y., *J. Med. Chem*. **2003**, 46, 3782–3784.

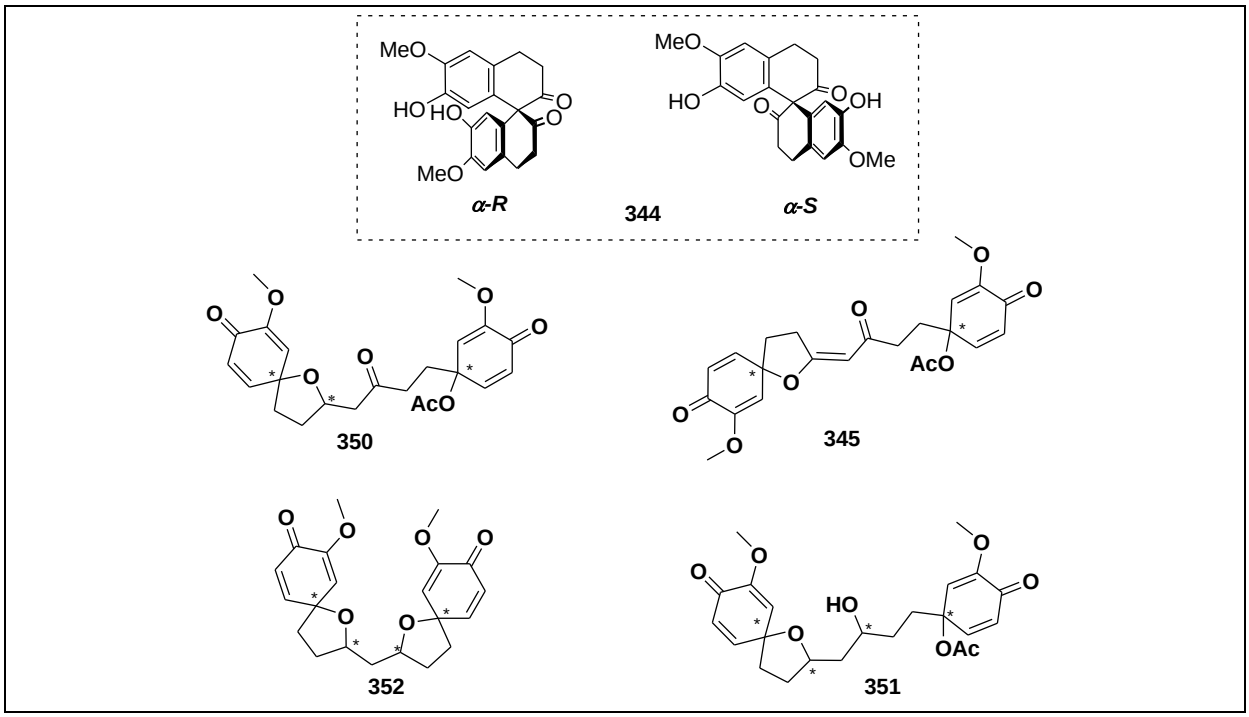
Conclusion générale de la partie chimie

Au cours de ce travail, nous avons abordé l'hémisynthèse de dérivés originaux à partir de la curcumine, avec pour objectif un gain ou une amélioration de fonction lors d'évaluations biologiques dans plusieurs domaines (**chapitre 3**). Des nanoparticules originales ont été préparé et leurs activités biologique ont également été évaluées (**chapitre 5**).

Le **chapitre 3**, relate synthétisé l'obtention de curcuminoïdes prénylés et de diméthyl-pyrano curcuminoïdes. Des résultats biologiques variés ont été obtenus, montrant généralement une diminution d'activité par rapport à la curcumine **58**. La molécule **242** a montré une forte activité dans le cadre d'un modèle d'inflammation macrophagique accrue par apport à la curcumine et aux autres analogues préparés.



Des squelettes originaux **344, 345, 350, 351, 352,** ont été préparés en une seule étape *via* des réactions de désaromatisation oxydante (**chapitre 4**). Plusieurs réactifs désaromatisants ont été employés comme des réactifs à l'iode hypervalent (IBX, PIDA, PIFA) ainsi qu'un réactif classique à base de métal : le tétracétate de plomb $Pb(OAc)_4$. Dans l'impossibilité de sa très forte conjugaison, ces produits ont été synthétisés à partir des composés issus de la curcumine en réduisant les doubles liaisons au niveau du "linker" (**341**, **342** et **343**).



Enfin, des nanoparticules de curcumine squalénisée ont été préparées afin de dépasser son problème de biodisponibilité (**chapitre 5**). Leurs activités antiparasitaires, antibactériennes et cytotoxiques ont été évaluées.

Ces "nanocurcumines" ont montré une forte activité leishmanicide (*L. donovani*) *in vitro* avec une CI_{50} = 6,0 ± 1,0 µM pour nano-**354** et CI_{50} = 1,8 ± 0,4 µM pour nano-**355** contre CI_{50} = 17,5 ± 1,0 µM pour la curcumine. Une poursuite de ces travaux biologiques est envisagée, avec une évaluation in vitro dans un modèle "amastigotes intramacrophagiques", et chez la Souris infectée.



Des analogues originaux de la curcumine ont été préparés. Des résultats mitigés ont été obtenus lors des criblages d'activité, mais la forte originalité de la majorité des molécules obtenues la indique la nécessité de poursuivre ce travail.

Abréviations et acronymes

A-β	les peptides β-amyloïdes
ADN	acide désoxyribonucléique
$AgBF_4$	tétrafluoroborate d'argent
AIBN	azobisisobutyronitrile
APCI	Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
APTS	acide paratoluènesulfonique
ARNm	acide ribonucléique messager
ax.	axial
BBr_3	Tribromure de bore
$BF_3.OEt_2$	éthérate de trifluorure de bore
BHE	barrière hémato-encéphalique
BHT	butylhydroxytoluène
Boc_2O	di-*tert*-butyldicarbonate
Bu_4NHSO_4	hydrogénosulfate de tétrabutylammonium
cat.	catalytique
CC	Colonne Chromatographique
CCM	chromatographie sur Couche Mince
CI_{50}	concentration inhibitrice 50 %
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CL_{100}	concentration létale 100 %
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance (à la polarité de phase inverse)
CMF	concentration minimale fongicide
CMI	concentrations minimales inhibitrices
CML	concentration minimale létale
COSY	*COrrelated SpectroscopY*
COX-2	cyclo-oxygénase isoenzymes 2
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DEAD	diéthyl azodicarboxylate
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DPPH	1,1-Diphényl-2-Pycril Hydrazil
EDCI	N-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochlorure
ESI	Ionisation électrospry (*ElectroSpray Ionisation*)
éq.	équivalent
eq.	equatorial
g	gramme
GC/FID	*Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme*
GC/MS	*Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse* (*Gas chromatography–mass spectrometry*)

HE	huile essentielle
HE-As	huile essentielle d'*A. sceptrum*
HE-Ma	huile essentielle des feuilles de *Melaleuca alternifolia* Cheel.
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HMDS	hexaméthyldisilazane
HRMS	*Hight Resolution Mass Spectroscopy*
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Correlation*
Hz	hertz
IBX	acide iodoxybenzoïque
IL	interleukines
IPP	isopentényl-pyrophosphate
^{x}J	constante de couplage
KB	carcinome buccal humain
K_3FeCN_6	ferricyanure de potassium
L	litre
LC/MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC/MS-MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
M	molarité
MEM	*Minimum Essential Medium*
Me_3SiOTf	trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
MHz	mégahertz
MLC	*Minimum Lethal Concentration*
$Mn(AcO)_3$	acétate de manganèse
m/z	rapport masse sur charge
n-BuLi	n-butyllithium
ND	non detecté
NF-E2	*Nuclear Factor-Erythroid 2p45*
NF-κB	*nuclear factor*
NO	Oxyde nitrique
nOe	*nuclear Overhauser effect*
NOESY	*Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange SpectroscopY*
NT	non testé
Nu^-	nucléophile
PBS	tampon phosphate salin
Pd/C	palladium sur charbon
$Pd(PPh_3)_4$	Tetrakis(triphenylphosphine)platinum(0)
PIDA	diacétoxyiodobenzène
PLE	porcine liver esterase

PPAR-γ	*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*
ppm	partie par million
R_f	Rapport frontal
ROS	espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMN 1D, 2D	RMN à 1 dimension et à 2 dimensions
souche CMP	Châtenay-Malabry, Parasitologie
TNF-α	Facteur Nécrosant de tumeurs (*Tumor Necrosis Factor*)
TPA	12-myristate 13-acétate de phorbol
Tr	Temps de rétention

Études chimiques et biologiques d'*Aframomum sceptrum* (Zingiberaceae) et de la curcumine

Résumé de thèse :

Ce travail de thèse consacré à la chimie de Zingiberaceae est divisé en deux parties distinctes.

Dans la première partie, une étude phytochimique des rhizomes d'une plante africaine, *Aframomum sceptrum* K. Schum., couramment employée en Côte d'Ivoire, a été réalisée. Deux nouveaux composés, nommés sceptrumlabdalactone A et sceptrumlabdalactone B ont été isolés. Ce sont des composés terpéniques type labdane. Le sceptrumlabdalactone B est fortement actif contre *L. donovani*, avec une CI_{50} proche de celle de la pentamidine.
L'extraction de l'huile essentielle des rhizomes a également été réalisée par hydrodistillation. L'analyse de l'huile par GC-MS a montré la présence de mono- et de sesquiterpènes avec une quasi-absence de monoterpènes aromatiques. L'évaluation des activités biologiques de l'huile a montré une activité contre les bactéries à Gram positif, et dans une moindre mesure, contre les bactéries à Gram négatif. Une forte activité trichomonicide a aussi été constatée.

La deuxième partie, est consacrée à la curcumine. Ce diarylheptanoïde, est fréquent dans plusieurs Curcumas, Des analogues originaux, par exemple prénylés ont été préparés. Plusieurs activités biologiques (activités antiparasitaires, antibactériennes, anti-inflammatoires, anti-agrégation de la protéine β-amyloïde) ont été évaluées *in vitro*. L'activité anti-inflammatoire apparait différente de celle du produit de départ pour un des analogues.
De même, la désaromatisation oxydante de la curcumine et ses analogues a permis l'accès en une ou deux étapes à des composés originaux à pharmacophore largement modifié.

Des nanoparticules à base de "curcumine-squalénisée" ont également été préparées afin de surmonter le problème de la faible biodisponibilité de la curcumine. L'activité leishmanicide *in vitro* semble prometteuse.

Mots clés : *Aframomum sceptrum*, diterpènes, huile essentielle, curcuminoïdes, désaromatisation oxydante, nanoparticules, squalénisation, activités biologiques.

Laboratoire de Pharmacognosie et chimie des substances naturelles
CNRS UMR 8076 BioCIS- LabEXLERMIT
Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie
5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry CEDEX