



HAL
open science

Recherche et etude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique

Sabrina Okombi

► **To cite this version:**

Sabrina Okombi. Recherche et etude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Chimie organique. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00846562

HAL Id: tel-00846562

<https://theses.hal.science/tel-00846562>

Submitted on 19 Jul 2013

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

UFR DE PHARMACIE

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université Joseph Fourier

Discipline : Chimie
Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue à huis clos

Par

SABRINA OKOMBI

Le 21 décembre 2005

***RECHERCHE ET ETUDE DE MOLECULES À ACTIVITE
ANTITYROSINASE ET LEUR UTILISATION COMME AGENTS
DEPIGMENTANTS EN DERMOCOSMETIQUE***

COMPOSITION DU JURY :

| | |
|---|----------------------|
| Dr. Odile Damour, Responsable du laboratoire des substituts cutanés, Lyon | Rapporteur |
| Pr. Pierre-Alain Carrupt, Professeur de Chimie thérapeutique, Genève | Rapporteur |
| Pr. Anne-Marie Mariotte, Professeur de Pharmacognosie, Grenoble | Codirecteur de thèse |
| Dr. Ahcène Boumendjel, Maître de Conférences en Pharmacognosie, Grenoble | Directeur de thèse |
| Dr. Edwige Nicolle, Maître de Conférences en Chimie Organique, Grenoble | Examinateur |
| Mme Delphine Rival, Chargé de projet (ENGELHARD), Lyon | Examinateur |

Remerciements :

A Monsieur Eric PERRIER,

Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée en m'intégrant dans votre équipe de recherche pendant la durée de ce projet. Je vous suis reconnaissante, pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury de thèse malgré vos nombreuses responsabilités.

A Madame le Docteur Odile DAMOUR,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant de l'examiner et d'en être le rapporteur.

A Monsieur le Professeur Pierre-Alain CARRUPT,

Vous avez accepté de faire partie de mon jury de thèse et surtout d'en être le rapporteur. Soyez donc assuré de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur Anne-Marie MARIOTTE

Je vous remercie pour l'intérêt que vous m'avez témoigné en m'accueillant au sein de votre équipe de recherche durant cette thèse.

A Madame Delphine RIVAL,

Je te suis profondément reconnaissante pour ta disponibilité et pour l'intérêt que tu m'as témoigné au cours de cette thèse. Je te remercie également d'avoir bien voulu examiner ce travail et de siéger dans ce jury de thèse.

A Monsieur Ahcène BOUMENDJEL,

Sois assuré de ma reconnaissance pour l'encadrement de ce travail et la confiance que tu m'as accordée dès le début de cette thèse. Je te remercie aussi pour tes conseils et le soutien que tu m'as apporté au cours de ces trois années.

A Madame Edwige NICOLLE,

Vous m'avez proposé votre aide et accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinatrice. Je vous en remercie vivement.

A Monsieur Sébastien BONNET,

Merci pour le temps investi dans la réalisation des tests biologiques et pour l'aide que tu m'as apportée dans ce domaine.

A Madame Madeleine BLANC

Tu m'as fait profité de ton expérience et m'a apporté un soutien considérable au cours de cette thèse, je t'exprime à travers ces quelques ligne ma profonde gratitude.

A Monsieur Jean Luc DECOUT,

Je vous remercie de m'avoir autorisée à effectuer ma thèse au sein du département que vous dirigez.

Je voudrais ensuite remercier les membres du DPM :

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA pour ses conseils en analyse

Madame Marie-Claire VIALATTE pour sa disponibilité et sa gentillesse

Madame Chantal BENEY pour sa sympathie et ses conseils techniques

Monsieur François THOMASSON pour ses conseils en spectrométrie RMN

Monsieur Gilbert CARTIER pour les services rendus

Madame Christine BRUNET-MANQUAT pour sa sympathie

Et à tous les autres membres (personnel et étudiants) qui ont facilité ce travail en me témoignant de la sympathie ou en m'apportant leur soutien.

J'adresse mes remerciements à tous les membres de la société ENGELHARD qui ont rendu plus agréables mes séjours à LYON et plus particulièrement à Monsieur Nabil-Abdul MALAK.

A Bruno

A ma famille.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 7 |
| INTRODUCTION GENERALE | 9 |
| CHAPITRE 1: RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE | 11 |
| 1.1 LA MELANOGENESE | 12 |
| 1.1.1 Introduction..... | 12 |
| 1.1.2 Les mélanocytes | 12 |
| 1.1.3 Biosynthèse des mélanines | 14 |
| 1.1.4 Régulation de la mélanogènèse | 16 |
| 1.1.5 Les dérèglements de la mélanogènèse | 17 |
| 1.1.6 Comment freiner la mélanogènèse ? | 19 |
| 1.2 LA TYROSINASE | 20 |
| 1.2.1 Structure de la tyrosinase | 20 |
| 1.2.2 Rôles de la tyrosinase..... | 21 |
| 1.2.3 Biosynthèse de la tyrosinase et sa régulation | 24 |
| 1.2.4 Composés utilisés ou décrits comme inhibiteurs de la tyrosinase | 25 |
| 1.2.5 Autres actifs dépigmentants..... | 31 |
| 1.3 BILAN SUR LES DEPIGMENTANTS..... | 31 |
| 1.4 FAMILLES DE MOLECULES CHOISIES POUR ETRE ETUDIEES COMME INHIBITEURS DE LA TYROSINASE..... | 32 |
| 1.4.1 Les aurones..... | 33 |
| 1.4.2 Les chromones..... | 42 |
| 1.4.3 Les dérivés des acides caféique et férulique | 48 |
| 1.5 CONCLUSION | 51 |
| CHAPITRE 2: RESULTATS-DISCUSSION..... | 53 |
| 2.1 CONCEPTION DES MOLECULES CHOISIES POUR ETRE ETUDIEES COMME INHIBITEURS DE LA TYROSINASE | 54 |
| 2.1.1 Choix et conception des aurones | 54 |
| 2.1.2 Choix et conception des chromones | 54 |
| 2.1.3 Choix et conception des dérivés des acides caféique et férulique..... | 55 |
| 2.1.4 Choix et conception des prodrogues | 56 |
| 2.2 SYNTHÈSE DES AURONES..... | 57 |
| 2.2.1 Synthèse des synthons précurseurs d'aurones | 58 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.2 Synthèse des aurones à partir des synthons précurseurs..... | 59 |
| 2.3 SYNTHÈSE DES CHROMONES | 64 |
| 2.4 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DES ACIDES CAFÉIQUES ET FÉRULIQUES | 67 |
| 2.5 SYNTHÈSE DES PRODRUGES DE TYPE PHOSPHATE ET SULFATE..... | 70 |
| 2.5.1 Synthèse des prodrugs de type phosphate | 70 |
| 2.5.2 Synthèse des prodrugs de type sulfate | 72 |
| 2.6 ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES MOLECULES SYNTHÉTISÉES..... | 74 |
| 2.6.1 Principe de l'étude de la cytotoxicité | 74 |
| 2.6.2 Principe des dosages de l'activité de la tyrosinase..... | 75 |
| 2.7 ANALYSE DES RESULTATS ET ÉLÉMENTS DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ..... | 76 |
| 2.7.1 Effets des aurones sur l'activité de la tyrosinase | 76 |
| 2.7.2 Effets des chromones sur l'activité de la tyrosinase | 90 |
| 2.7.3 Effets des dérivés des acides caféiques et féruliques sur l'activité de la tyrosinase | 92 |
| 2.7.4 Effet des dérivés des prodrugs de type phosphate et sulfate sur l'activité de la tyrosinase..... | 102 |
| 2.7.5 Conclusion | 102 |
| CHAPITRE 3: CONCLUSION-PERSPECTIVES..... | 103 |
| 3.1 CONCLUSION | 104 |
| 3.2 PERSPECTIVES | 105 |
| CHAPITRE 4: PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX..... | 107 |
| 4.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES | 108 |
| 4.2 PROTOCOLES DE SYNTHÈSE | 110 |
| 4.2.1 Synthèse des aurones | 110 |
| 4.2.2 Synthèse des chromones | 136 |
| 4.2.3 Synthèse des dérivés de l'acide caféique et de l'acide férulique..... | 145 |
| 4.2.4 Synthèse des analogues structuraux du tyrosol | 155 |
| 4.2.5 Réactions de phosphorylation | 159 |
| 4.2.6 Réactions de sulfatation | 162 |
| 4.3 PROTOCOLES D'ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES MOLECULES SYNTHÉTISÉES | 164 |
| 4.3.1 Évaluation de la cytotoxicité sur culture de mélanocytes humains normaux cultivés en monocouche | 164 |
| 4.3.2 Modèle <i>in vitro</i> d'inhibition de la tyrosinase de champignon isolée..... | 165 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.3 Modèle <i>in vitro</i> d'inhibition de la tyrosinase humaine extraite de mélanocytes | 165 |
| 4.3.4 Modèle <i>in vitro</i> d'inhibition de la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche | 165 |
| 4.3.5 Dosage des protéines sur les milieux de culture | 166 |
| 4.3.6 Protocoles enzymatiques | 166 |
| ANNEXES | 168 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 171 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-------------------|---|
| AMPc | Adénosine Monophosphate cyclique |
| AK | Acide Kojique |
| APTS | Acide <i>para</i> -toluène sulfonique |
| 6BH ₄ | 6(R)-L-érythro-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine |
| Bn | Benzyle |
| BOP | Benzotriazol-1-yloxy-tris-(diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate |
| ¹³ C | Carbone-13 |
| CHCl ₃ | Chloroforme |
| CI | Chemical Ionization |
| COSY | COrrrelation SpectroscopY |
| Da | Dalton |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimide |
| DCI | Desorption Chemical Ionization |
| DMF | Diméthylformamide |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DO | Densité Optique |
| DPPH | 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl |
| EDCI | 1-(3-Diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide |
| EI | Electronic Impact |
| éq. | équivalent |
| ESI | Electrospray |
| FAB | Fast Atom Bombardement |
| Glc | Glucose |
| ¹ H | Proton |
| HMQC | Heteronuclear Multiple Quantum Coherence |
| IR | Infra Rouge |
| <i>J</i> | Constante de couplage exprimée en Hertz |
| m/z | Masse/Charge |
| MEM | Méthoxy-Ethoxy-Méthyle |
| MeOH | Méthanol |
| nd | non déterminé |
| ³¹ P | Phosphore |

| | |
|----------------|--|
| Pf | Point de fusion |
| Rdt | Rendement |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| RSA | Relations Structure-Activité |
| SM | Spectrométrie de Masse |
| SMHR | Spectrométrie de Masse Haute Résolution |
| UV | Ultraviolet |
| δ (ppm) | Déplacement chimique exprimé en partie par million |

INTRODUCTION GENERALE

Notre peau est le reflet de notre santé. Elle joue le rôle d'interface entre notre organisme et l'environnement extérieur, et de barrière contre les agressions extérieures. De ce fait, elle fait l'objet d'attentions de plus en plus grandes. Les pathologies et les imperfections cutanées sont traitées au même titre que les dysfonctionnements des autres organes du corps humain. Parmi les dysfonctionnements cutanés, les hyperpigmentations et leur traitement tiennent une place importante dans la recherche en dermocosmétique. Ces hyperpigmentations ont pour origine, un dérèglement dans la production de mélanines, qui sont les pigments responsables de la coloration cutanée. Par conséquent, ces hyperpigmentations sont traitées par des produits dépigmentants inhibant la mélanogénèse. Notre projet de thèse se situe dans cet axe de recherche.

La mise au point de tels produits nécessite une bonne compréhension du phénomène de production de la mélanine ou mélanogénèse, mais également des régulations et des dysfonctionnements possibles de la synthèse. Pour inhiber la mélanogénèse, plusieurs mécanismes peuvent être mis en œuvre : bloquer la synthèse de mélanine à un stade donné, bloquer le transfert de la mélanine ou détruire les mélanocytes. Nous avons choisi pour notre part d'agir selon le premier mécanisme, en mettant au point des inhibiteurs de la tyrosinase, qui est une enzyme jouant un rôle primordial dans la synthèse des mélanines. Ces inhibiteurs sont des polyphénols appartenant à trois familles de molécules : les aurones, les chromones et les dérivés des acides caféique et férulique.

Nous allons relater dans une première partie, les résultats d'une recherche bibliographique se rapportant au sujet. Le processus de mélanogénèse sera décrit en détail et plus particulièrement les réactions biochimiques qui la sous-tendent, les régulations et les dérèglements possibles. Ensuite nous allons nous focaliser sur notre cible la tyrosinase, sa structure et son fonctionnement. Il est également intéressant d'établir un état des lieux des différents actifs utilisés dans ce domaine, afin de mieux nous positionner parmi ces molécules. Enfin, les différentes familles de molécules que nous avons choisi de synthétiser et d'évaluer au cours de nos travaux, feront aussi l'objet d'une recherche bibliographique concernant leurs procédés d'obtention par voie naturelle ou par voie chimique et leur propriétés biologiques.

Une deuxième partie consacrée aux résultats et à leur analyse suivra, et les protocoles expérimentaux utilisés constitueront le dernier chapitre. Enfin, pour clore ce manuscrit, nous ferons un bilan de ces trois années de recherche.

CHAPITRE 1: RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 LA MELANOGENESE

1.1.1 Introduction

Chez l'homme, la couleur de la peau ou carnation résulte de l'association de divers pigments tels que l'hémoglobine du sang, les caroténoïdes, la bilirubine et les pigments mélaniques qui sont de loin les plus importants [1]. Sur le plan biochimique, les mélanines sont un groupe hétérogène de pigments appartenant à deux principales familles chimiques que sont les eumélanines et les phaeomélanines ; elles jouent un rôle protecteur primordial contre les effets néfastes des rayonnements UV [2]. Ces pigments sont produits par les mélanocytes, grosses cellules dendritiques situées dans la couche basale de l'épiderme. Chez les mammifères, la synthèse des mélanines n'a lieu qu'à l'intérieur d'un organite spécialisé, le mélanosome. Elles seront ensuite distribuées dans les kératinocytes au niveau de l'épiderme pour jouer leur rôle physiologique [3,4].

Dans un premier temps, nous allons présenter les cellules responsables de la synthèse des mélanines, puis nous allons nous focaliser sur les mécanismes de biosynthèse et de régulation de ces pigments, et les possibles dérèglements pouvant survenir lors de la production des mélanines.

1.1.2 Les mélanocytes

Les mélanocytes sont issus de cellules non différenciées de la crête neurale. Il s'agit du tissu embryonnaire qui donne également naissance aux cellules nerveuses. Entre la huitième et la quatorzième semaine de la vie fœtale, les mélanoblastes migrent vers l'assise germinative de l'épiderme et des follicules pileux et se transforment en mélanocytes [5].

1.1.2.1 Description et distribution des mélanocytes

Les mélanocytes représentent environ 13% des cellules épidermiques. Chaque mélanocyte est une cellule isolée au sein de l'épiderme, n'ayant aucune attache avec les cellules voisines. Ils se situent normalement au niveau de la couche basale de l'épiderme, mais on en trouve aussi au niveau du follicule pileux et de la rétine. Ils présentent un faible taux de renouvellement chez l'adulte et avec l'âge, le nombre des mélanocytes en activité tend à diminuer (moins 10% tous les 10 ans), ce qui se remarque au grisonnement des cheveux et des poils.

Les mélanocytes sont des cellules de grande taille, dont les nombreuses extensions cellulaires, les dendrites peuvent atteindre la troisième couche de kératinocytes du corps muqueux de Malpighi. On y trouve des organites habituels de la cellule et des organites spécifiques, les mélanosomes qui sont des lysosomes sécrétoires (**Schéma 1**). Les mélanosomes sont le lieu de synthèse des mélanines, cela confère aux mélanocytes une spécialisation dans la synthèse de ces pigments.

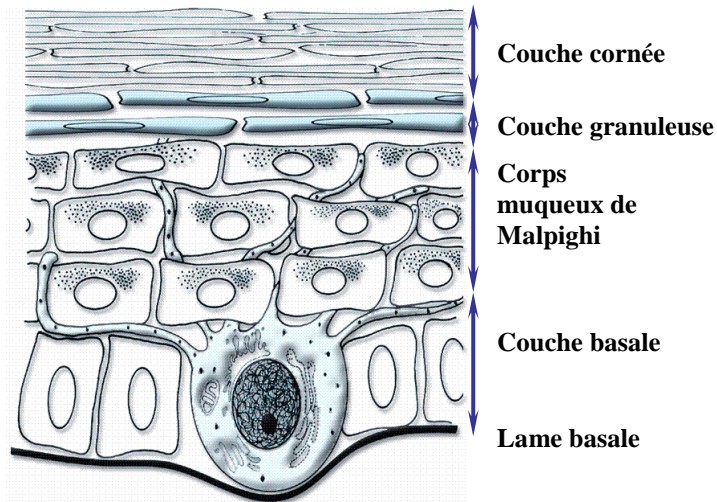


Schéma 1. Représentation dans l'épiderme d'un mélanocyte humain normal [6]

1.1.2.2 Les mélanosomes

Les mélanosomes se présentent sous la forme de vésicules ovoïdes qui bourgeonnent à partir de l'appareil de Golgi. Au sein de ces mélanosomes, les mélanines sont produites selon un enchaînement de réactions chimiques complexes au départ d'un acide aminé la tyrosine et en présence d'un certain nombre d'enzymes dont la tyrosinase. La tyrosinase est synthétisée par les ribosomes du réticulum endoplasmique sur information provenant du noyau des mélanocytes. Inactive au départ, elle s'active à son entrée dans la vésicule. Ensuite, l'activité de la tyrosinase va diminuer tout au long de la migration des vésicules vers les couches supérieures de l'épiderme. Au cours de cette migration, le degré de maturation et l'apparence en microscopie électronique des mélanosomes vont évoluer. Ainsi, il est possible de distinguer quatre stades de maturation [4] :

- Les mélanosomes de stade I qui sont des vésicules rondes incolores, contenant du matériel protéique non organisé et des micro-vésicules de tyrosinase
- Les mélanosomes de stade II de forme ovoïde dans lesquelles le matériel protéique s'organise en filament

- Les mélanosomes de stade III ayant une structure dense aux électrons
- Les mélanosomes de stade IV, entièrement mélanisés et totalement opaques. Ce sont ces structures qui seront transférées aux kératinocytes voisins.

Le transfert des mélanosomes aux kératinocytes va s'effectuer par le biais d'une phagocytose. Une fois dans les kératinocytes, les mélanosomes s'organisent de manière systématique autour du noyau et plus précisément vers le pôle supérieur de la cellule c'est-à-dire vers la surface du tégument : c'est le phénomène de « capping » [7]. L'ADN des kératinocytes sera ainsi protégé des rayonnements U.V. néfastes pour les kératinocytes et le tissu cutané. Après leur internalisation dans les kératinocytes, les mélanosomes seront digérés par les enzymes de la cellule et les grains de mélanines libérés.

En général un mélanocyte peut être connecté à environ 40 kératinocytes, cette unité fonctionnelle est appelée « unité épidermique de mélanisation ». La principale fonction de cette unité est la production de mélanine qui est un phénomène complexe, pouvant être divisée en plusieurs étapes avec différents points de contrôle.

1.1.3 Biosynthèse des mélanines

La synthèse des pigments mélaniques est une succession de processus enzymatiques complexes, sous contrôle génétique et enzymatique, qui ont lieu dans le mélanocyte à l'intérieur du mélanosome. L'ensemble de ces réactions permet l'oxydation de la tyrosine, acide aminé issu du sang en pigments mélaniques en passant par une série de plusieurs intermédiaires (**Schéma 2**) [8].

La synthèse des mélanines débute par l'oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphénylalanine), qui à son tour sera oxydée en dopaquinone. Ces deux transformations peuvent être catalysées par une seule et même métalloenzyme, la tyrosinase [9,10]. En réalité la transformation de la tyrosine en L-DOPA repose sur une compétition entre deux enzymes : la tyrosinase précédemment citée, plus connue, et la tyrosine hydroxylase qui a comme cofacteur le 6BH₄ [11,12]. Dans les deux cas, la L-DOPA sera transformée en dopaquinone par la tyrosinase. A ce stade, la mélanogénèse peut être orientée vers la voie des eumélanines, mélanines brun foncé présentes chez les personnes à chevelure foncée ou vers la voie des phaeomélanines, mélanines jaune orangé rencontrées chez les blonds ou les roux [13].

L'orientation vers l'une ou l'autre des deux voies de synthèse sera conditionnée par la teneur en dérivés soufrés dans les mélanocytes et plus particulièrement de la cystéine et du

glutathion [14]. Si les dérivés soufrés sont en quantité suffisante, la synthèse sera orientée vers la production de phaeomélanines. A l'inverse, s'ils sont en quantité insuffisante, la synthèse sera orientée vers la production d'eumélanines [15].

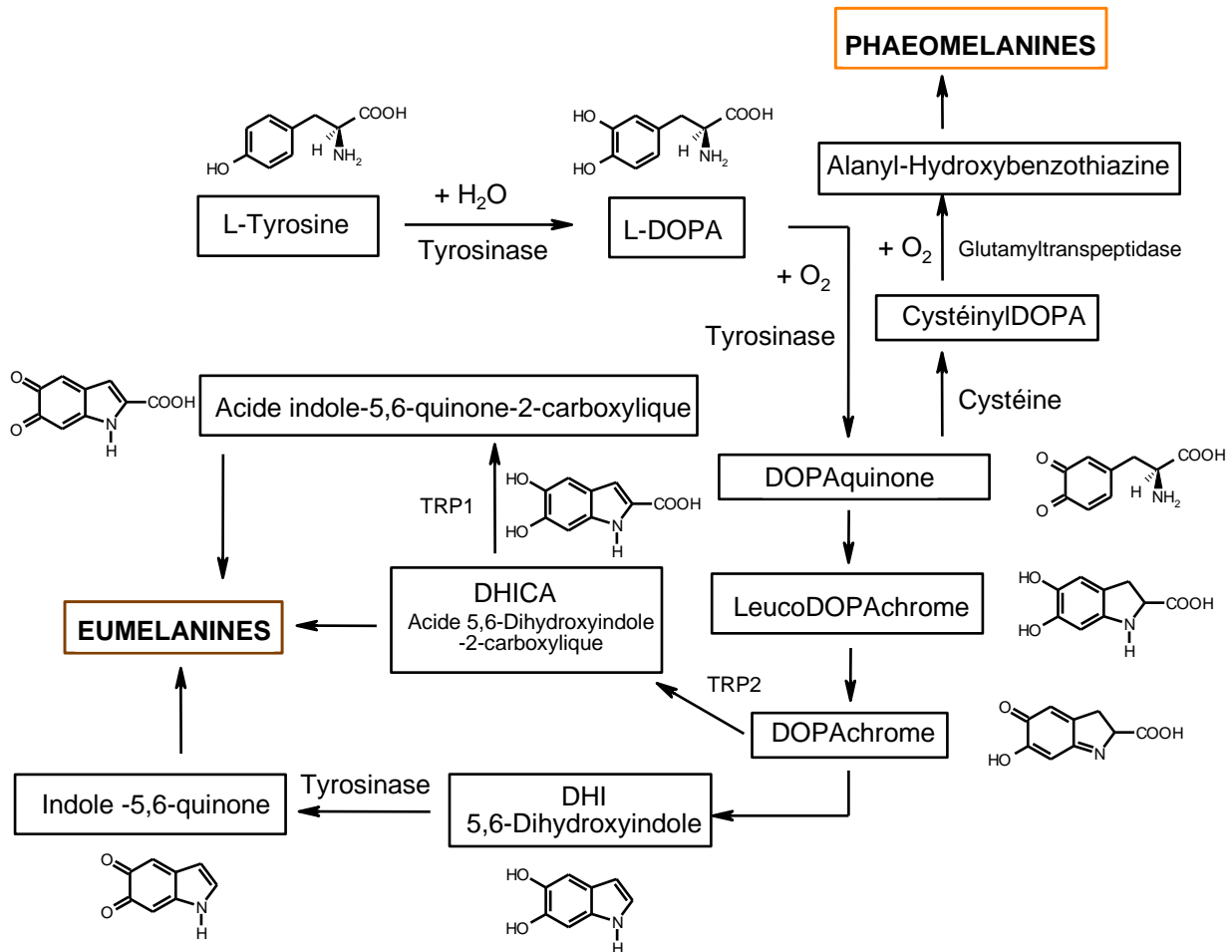


Schéma 2. Biosynthèse des mélanines [8]

1.1.3.1 La voie des eumélanines

La formation des eumélanines implique une cyclisation de la dopaquinone en leucodopachrome qui sera oxydé en dopachrome [16]. Ce dernier est converti à son tour soit en 5,6-dihydroxyindole (DHI), soit en acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA) par action de la TRP-2 (Tyrosinase Related Protein 2) [17]. La DHI et la DHICA sont alors oxydées respectivement par la tyrosinase en indole-5,6-quinone et par la TRP-1 (Tyrosinase Related Protein 1) en acide-5,6-quinone-2-carboxylique [17]. Ces deux composés polymérisent à leur tour pour former des mélanochromes moins bien définis, puis finalement des eumélanines.

1.1.3.2 La voie des phaeomélanines

Elle fait aussi intervenir diverses modifications de la L-dopaquinone. Il y a d'abord une première condensation de la dopaquinone avec la cystéine pour former la cystéinyl-dopa qui sera oxydée en alanyl-hydroxybenzothiazine par la γ -glutamyl transpeptidase. L'alanyl-hydroxybenzothiazine sera ultérieurement transformée en phaeomélanines.

Ces synthèses ne représentent en fait, qu'une partie de la mélanogénèse, qui englobe également le développement des mélanosomes, petites vésicules dans lesquelles sont synthétisés les grains de mélanine. Ces organites finissent par migrer vers les dendrites des mélanocytes, puis sont transférés en phase finale de maturation des dendrites au kératinocytes des couches supérieures de l'épiderme.

L'ensemble de tous ces phénomènes permettant la synthèse des mélanines est régi par différents facteurs de régulation.

1.1.4 Régulation de la mélanogénèse

Il existe plusieurs modes de régulation de la mélanogénèse qui peuvent être liés à des facteurs intrinsèques à l'organisme ou à des facteurs environnementaux :

1.1.4.1 Régulations liées à des facteurs intrinsèques

- a) La régulation génétique : un grand nombre de gènes sont impliqués dans la régulation de la mélanogénèse. Ces gènes peuvent coder pour des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, ou pour leurs récepteurs. Certains de ces gènes assureront la distribution des mélanocytes dans les tissus, d'autres seront responsables de la synthèse des pigments mélaniques ou encore de leur transfert aux kératinocytes.
- b) La régulation enzymatique : elle se fait par le biais des enzymes qui sont impliquées dans la biosynthèse des mélanines. Les principales enzymes impliquées dans cette régulation sont la tyrosinase et les TRP (Tyrosinases Related Proteins 1 et 2).
- c) Régulation neurohormonale : les mélanotropines, peptides neurotransmetteurs agissent comme des hormones de la pigmentation. L' α -MSH (Melanin Stimulating Hormone) possède un récepteur membranaire au niveau du mélanocyte dont l'activation stimule la mélanogénèse [15,18].

Les corticotropines ou ACTH (Adrenocortico-Trophic Hormone) stimulent la pigmentation de la peau sans soleil. Des récepteurs de cette hormone ont été identifiés

dans la peau humaine et leur activation stimulerait indirectement la production de tyrosinase [13].

d) La régulation biochimique [18] : l'activité des mélanocytes est modulée par de nombreuses substances épidermiques et diverses molécules de leur environnement comme :

- Les facteurs de croissance (FGF : Fibroblast Growth Factor, le facteur de croissance des mélanocytes)
- Les médiateurs de l'inflammation, leucotriènes et prostaglandines qui stimuleraient la multiplication des mélanocytes
- Des protéines de type « stablin » en se complexant avec la DHICA (acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique) et la DHI (5,6-dihydroxyindole) empêchent leur métabolisation et pourraient ainsi inhiber la mélanogenèse [8].

1.1.4.2 Régulations liées aux facteurs environnementaux

Il s'agit de la régulation photochimique. *In vivo*, la production de la mélanine est influencée par les UV A et UV B émis par le rayonnement solaire. Les UV stimulent la croissance des mélanocytes et entraînent une augmentation de la pigmentation cutanée, ce qui instaure une protection naturelle de la peau [18]. Cette activation de la mélanogenèse par les UV, impliquerait aussi une production de monoxyde d'azote (NO). Le NO est un gaz biologique produit lors de la conversion de l'arginine en 1-citrulline par la NO synthase [16,19]. Le NO est un messenger inter ou intracellulaire majeur ; il agirait par le biais de l'activation de la guanylate cyclase, ce qui conduit à une augmentation du GMPc intracellulaire et à une activation d'une protéine kinase GMPc dépendante [20]. Le NO et le GMPc sont impliqués dans la médiation de l'érythème cutané induit par les UVB [16,19]. D'autre part, les UV ont un effet indirect sur la mélanogenèse dans le sens où ils sont responsables de la production par les kératinocytes de facteurs activant la mélanogenèse (α -MSH, ACTH, NO, PGE₂) [16].

Tous ces facteurs font que la production de mélanine est un équilibre biochimique, qui peut néanmoins être rompu lors de la survenue de diverses conditions pathologiques, ou lors d'une surexposition au soleil.

1.1.5 Les dérèglements de la mélanogenèse

Au cours de la vie, des anomalies pigmentaires ou dyschromies peuvent survenir et il est classique de les distinguer en trois groupes :

- Des taches d'hyperpigmentation marquées cliniquement par un assombrissement de la peau
- Des taches d'hypopigmentations ou leucodermie marquées par une perte de la coloration naturelle de la peau (exemple : vitiligo)
- Des affections dyschromiques marquées par une coloration anormale de la peau.

Les hyperpigmentations représentent une forte préoccupation pour les populations féminines caucasiennes, asiatiques et africaines.

1.1.5.1 Les hyperpigmentations

Elles résultent d'une activation mélanocytaire caractérisée par une prolifération anarchique des mélanocytes, ou par une augmentation de la synthèse de mélanine ou enfin par une augmentation des capacités de transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes.

Cliniquement il est possible de distinguer plusieurs taches d'hyperpigmentation :

- a) Les lentigos ou lentigines : Ce sont des taches maculaires, uniformes, de couleur brun clair montrant une pigmentation en filet. Elles sont dues à une augmentation du nombre de mélanocytes et de la production mélanocytaire. Elles peuvent être de naissance (lentigo simplex) ou apparaître à partir d'un certain âge chez les caucasiens suite à des expositions solaires répétées [13]. Dans ce cas on parle de taches de vieillesse qui ont un aspect plus ou moins régulier et peuvent occasionnellement former des plaques.
- b) Le chloasma (mélasma ou masque de grossesse) : Elles ont un aspect de masque hyperpigmenté sous forme de nappes maculaires brunes à contour irrégulier. Ces taches sont dues à un excès de synthèse mélanique associé à des dérèglements hormonaux (grossesse, prise de pilules contraceptives) [21]
- c) Les éphélides ou taches de rousseur : Elles sont héréditaires et peuvent s'accroître au soleil.
- d) Le naevus ou grain de beauté : souvent congénitaux, ce sont des macules plates ou légèrement surélevées de taille et de forme variable pouvant dégénérer en mélanome malin. Ils sont liés à une hyperproduction mélanocytaire avec accumulation locale des mélanines.

Ces hyperpigmentations peuvent être particulièrement inesthétiques et motiver chez certaines personnes l'utilisation de composés à activité dépigmentante qui peuvent freiner la production de mélanines. D'autre part dans certains pays d'Afrique et d'Asie, l'utilisation de

tels produits est répandue pour des raisons « esthétiques » soutenues par des phénomènes de modes et de société. Les formulations utilisées dans ces cas, renferment des actifs de diverses natures ayant diverses cibles au niveau du processus de biosynthèse de mélanines.

1.1.6 Comment freiner la mélanogénèse ?

Un moyen simple et efficace à mettre en œuvre est d'éviter le soleil. Les UV sont en effet des déclencheurs de la pigmentation en stimulant l'ARNm de la tyrosinase. Ils provoquent également la synthèse de la vitamine D3 responsable de l'activation de la tyrosinase et de l' α -MSH (Melanocytes Stimulating Hormone). L'exposition aux UV en outre crée un stress oxydatif qui à son tour entraîne une inflammation qui au final générera un signal qui stimulera le mécanisme pigmentaire. De ce fait, il est possible de combattre les précurseurs de la mélanine dans la réaction d'oxydation à l'aide d'antioxydants [22].

Une autre possibilité consiste à réduire l'activité globale des mélanocytes par des agents mélanotoxiques [23]. Des antagonistes de l' α -MSH comme la mélatonine peuvent contrarier l'activation des mélanocytes [24].

Certaines approches permettent d'explorer des voies peu connues. Des travaux ont consisté à inhiber une protéase spécifique (la sérine protéase), dans le but d'empêcher le transfert des mélanosomes le long des dendrites des mélanocytes et au final le transfert vers les kératinocytes [25].

Les recherches les plus nombreuses ont porté sur la réduction de l'activité de la tyrosinase qui catalyse les étapes limitantes de la mélanogénèse. Pour ce faire trois voies sont possibles :

- Bloquer les facteurs inducteurs de la synthèse de cette enzyme.
- Inhiber sa glycosylation nécessaire à son absorption par les mélanosomes.
- Enfin, inhiber son activité enzymatique. Les efforts les plus importants se sont portés à ce niveau. Nous avons également choisi cette stratégie pour mettre au point des actifs freinant la production de mélanine.

Le rôle de la tyrosinase au cours de la mélanogénèse est relativement bien connu, par contre sa structure n'est pas totalement élucidée. Après une présentation de cette enzyme, de ses fonctions et des conditions physiologiques de sa production, nous allons passer en revue quelques composés inhibant son activité.

1.2 LA TYROSINASE

La tyrosinase est une métalloprotéine qui catalyse les deux premières étapes communes de la mélanogenèse et s'avère être ainsi l'enzyme limitante [26,27]. Son absence ou des mutations de son gène conduisent à une diminution voire à un arrêt de la pigmentation. Il a été établi que la mutation de son gène est associée à l'albinisme oculocutané de type I [28].

1.2.1 Structure de la tyrosinase

La tyrosinase humaine comme celle de mammifère appartient à la famille des protéines transmembranaires de type I [29]. C'est une métalloprotéine possédant deux atomes de cuivre au niveau de son site actif qui sont nécessaires à sa fonction catalytique. Le domaine de liaison des atomes de cuivre est situé dans la lumière du mélanosome [29]. La détermination complète de la structure primaire et la cristallisation de la tyrosinase humaine n'ont pas encore été réalisées à ce jour [29]. La présence d'une région transmembranaire et d'une extrémité *N*-glycosylée rend sa cristallisation très difficile [30].

Des données spectroscopiques ont permis de démontrer que le site catalytique cuivre dépendant impliqué dans la mélanogenèse, ressemble structurellement à celui des catechol oxydases et des hémocyanines (protéine transporteur d'oxygène contenant du cuivre) [31].

1.2.1.1 Structure du centre catalytique métallique

Sur la base de comparaison des séquences d'acides aminés des tyrosinases de mammifères et d'hémocyanines de mollusques et d'arthropodes, il a été identifié deux régions d'homologie évidente appelées « Cu A » et « Cu B » qui semblent être impliquées dans la liaison des deux atomes de cuivre nécessaires à l'activité catalytique [32]. Au total, six acides aminés histidine localisés dans les sites Cu A et Cu B sont conservés dans la tyrosinase humaine, de mammifères et dans les protéines associées aux tyrosinases TRP-1 et TRP-2 [33,29]. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré la présence de trois histidines au niveau du site Cu B en position 363, 367 et 390. Ces histidines sont autant nécessaires à la liaison de l'atome de cuivre qu'à l'activité de la tyrosinase [28,33]. La coordination du site Cu B est conservée dans les hémocyanines, les catéchol oxydases et la tyrosinase de mammifères alors que celle du site Cu A semble différente [31].

- L'hydroxylation de la L-tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) ; il s'agit de l'activité monophénol hydroxylase
- L'oxydation de la L-DOPA en Dopaquinone ; dans ce cas on parle d'une activité catéchol oxydase.
- L'oxydation de la 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole quinone [35].

Chez les insectes, les tyrosinases sont impliquées dans le processus de sclérotisation (durcissement de la chitine) et dans les mécanismes de défense [36,37].

Dans l'agroalimentaire, la tyrosinase est connue comme l'enzyme responsable du changement de la couleur des fruits et de certains végétaux (brunissement). Ce phénomène est dû à l'oxydation de composés diphenoliques en quinone [37].

1.2.2.1 Mécanisme des activités monophénol hydroxylase et catéchol oxydase de la tyrosinase

Le mécanisme catalytique de la tyrosinase a été étudié pour la première fois par Solomon et ses collaborateurs [38]. Suite à ces travaux, un mécanisme des deux activités catalytiques de la tyrosinase a été proposé.

a) Activité monophénolase ou monophénol hydroxylase (**Schéma 4**) :

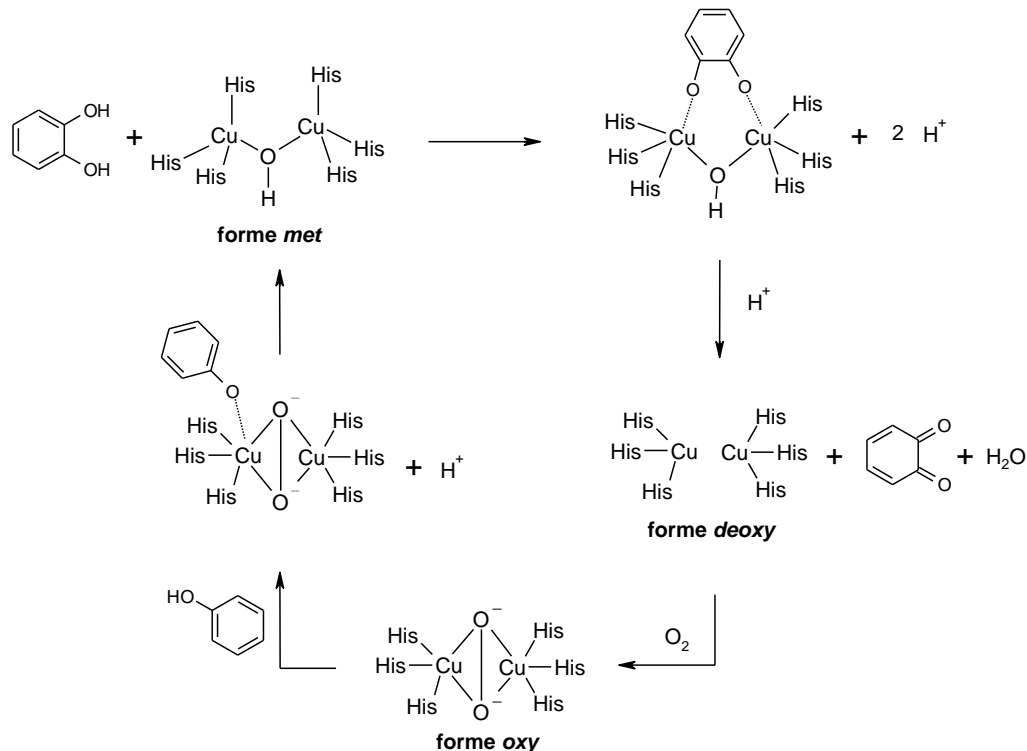


Schéma 4. Mécanisme de l'activité phénol hydroxylase [36]

Ce mécanisme suggère que la forme *oxy* est le point de départ de l'activité monophénol hydroxylase. Cette forme est présente à l'état de repos à environ 15% contre 85% pour la forme *met*. Un substrat phénolique (monophénol) se lie à la forme *oxy* et est ensuite oxydé en *ortho*-diphénol. Le composé diphénolique se fixe par la suite au centre métallique de la forme *met* par une liaison de type bidentate. L'oxydation du substrat diphénol en quinone entraîne la réduction du centre catalytique en forme *deoxy*; l'attaque d'une molécule d'oxygène permet la réoxydation de la forme réduite en forme *oxy*, ce qui clot le cycle catalytique.

Une période de latence dans l'activité monophénol hydroxylase de la tyrosinase a été mise en évidence. Elle serait le résultat d'une inhibition temporaire de la forme *met* par un excès du substrat monophénolique [39]. L'activité monophénolase augmente quand le substrat *o*-diphénol déplace le monophénol de la forme *met*, ce qui va permettre au cycle catalytique de se poursuivre.

b) Activité catéchol oxydase (**Shéma 5**) :

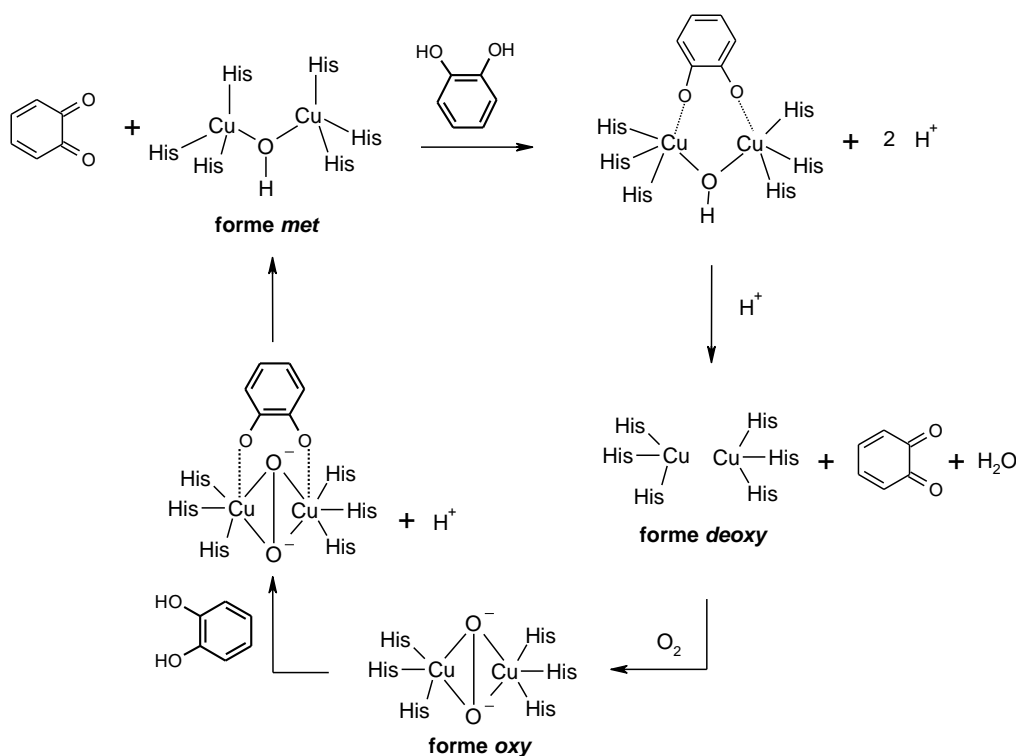


Schéma 5. Mécanisme de l'activité catéchol oxydase de la tyrosinase [36]

L'activité catéchol oxydase peut débuter au niveau des formes *oxy* et *met*. Un substrat *o*-diphénolique peut se lier à la forme *met* par exemple ; ensuite surviennent l'oxydation du substrat en une première quinone et la réduction de l'enzyme. La liaison de l'oxygène conduit

à la formation de la forme *oxy*, qui sera par la suite attaquée par un autre *o*-diphénol. L'oxydation du second substrat en quinone entraîne la formation de la forme *met* à nouveau et clot le cycle catalytique. La biosynthèse et le fonctionnement de la tyrosinase font l'objet d'une régulation ; il serait utile de comprendre quelques mécanismes de ces régulations avant d'aborder les différentes molécules inhibant son activité.

1.2.3 Biosynthèse de la tyrosinase et sa régulation

1.2.3.1 Biosynthèse [40]

La tyrosinase est une protéine transmembranaire de type I possédant potentiellement sept sites de *N*-glycosylation [41]. Après une transcription de son gène en ARNm et une traduction de ce dernier, elle va s'insérer dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle subira une glycosylation initiale et un début de maturation [41]. La maturation de la tyrosinase dans le RE nécessite la présence d'une protéine chaperone la calnexine, qui augmente son temps de rétention au niveau du RE, temps au cours duquel interviennent son repliement et sa liaison avec le cuivre [42]. Suite à cette première période de maturation dans le RE (réticulum endoplasmique), elle entrera dans l'appareil de Golgi où elle poursuivra son développement. A la fin de son développement elle va atteindre son organe cible le mélanosome par un système de transport vésiculaire [43].

1.2.3.2 Régulation [15]

L' α -MSH est un facteur important dans la synthèse de tyrosinase. Plusieurs études ont permis d'affirmer que le mélanocyte possède un récepteur spécifique de l' α -MSH. La liaison de l'hormone à son récepteur (MCR-1) se traduit par la formation d'un complexe rapidement internalisé par la cellule et par l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire suite à une hydrolyse de l'ATP par l'adénylate cyclase [44]. Les mélanocytes possédant ce récepteur, sont sensibles à la stimulation de l'hormone et montrent une augmentation du niveau d'activité de la tyrosinase, ainsi qu'une augmentation de sa synthèse. L'AMPc via l'activation de la protéine kinase A stimule l'expression du facteur MITF (Microphthalmia-associated transcription factor). De plus, l'AMPc par l'intermédiaire d'une glycogène synthase kinase va entraîner une phosphorylation du facteur MITF et accroître sa capacité à se lier au promoteur de la tyrosinase et à activer l'expression du gène de la tyrosinase [45,46].

L'activité de la tyrosinase peut être modulée par les TRP-1 et 2 qui peuvent stabiliser sa structure, et augmenter (TRP-2) ou baisser son activité (TRP-1) [47].

Un système de régulation de l'activité de la tyrosinase apparaît au cours de la première étape de synthèse de mélanine. Le 6BH4 cofacteur de la tyrosine hydroxylase (TH) qui est en compétition avec la tyrosinase, active cette dernière et réprime la tyrosinase. L'inhibition de l'activité hydroxylase de la tyrosinase par des taux élevés de 6BH4 est réversible et peut être levée par l' α -MSH [12].

D'autre part il a été montré que l'adjonction de vitamine D3 à des cultures de mélanocytes humains normaux induit une augmentation de la quantité de tyrosinase [18].

La régulation de la mélanogénèse se fait souvent par le biais de l'activation ou de l'inhibition des enzymes impliquées dans ce processus et notamment de la tyrosinase. Une inactivation de cette enzyme entraîne une baisse voire un manque de pigmentation (Vitiligo, albinisme). Une surexpression de son activité aboutit en revanche à une hyperpigmentation qui peut être pathologique ou particulièrement inesthétique. Vu le rôle important que joue la tyrosinase dans la biosynthèse des mélanines, la plupart des agents dépigmentants connus agissent en réduisant l'activité de cette enzyme.

1.2.4 Composés utilisés ou décrits comme inhibiteurs de la tyrosinase

Les molécules décrites comme inhibiteurs de la tyrosinase peuvent agir par plusieurs mécanismes. Elles peuvent interférer avec la transcription de son gène, sa glycosylation, réduire le contrôle post-transcriptionnel, ou inhiber son activité par différentes modalités.

- Contrôle de la transcription du gène et de l'expression de la tyrosinase : la transcription du gène codant pour la tyrosinase est sous le contrôle du facteur MITF (Microphthalmia Transcriptor Factor). Les substances capables d'inhiber son expression et son activité peuvent avoir une activité dépigmentante. Parmi ces molécules, il y a l'acide tout-trans rétinolique (ou Trétinoïne) qui stimule la différenciation des précurseurs de mélanocytes et entraîne ensuite l'apoptose des mélanocytes différenciés [48].
- Inhibition de la glycosylation et de la maturation de la tyrosinase : une modification de la glycosylation de la tyrosinase, entraîne une diminution de son activité et de son transfert vers le mélanosome. Certains aminosucres comme la glucosamine et la galactosamine sont susceptibles d'avoir cette action [48-50].
- Inhibition de l'activité de la tyrosinase : la majorité des produits dépigmentants agissent en inhibant l'activité de la tyrosinase. Ces produits peuvent être des analogues

de substrats, des inhibiteurs compétitifs ou encore des chélateurs de cuivre, cofacteur indispensable à l'activité tyrosinase.

1.2.4.1 Exemples d'inhibiteurs de la tyrosinase

Notons avant d'aborder les différents exemples, que l'activité antityrosinase des produits qui vont être cités a été mise en évidence dans la quasitotalité des cas sur la tyrosinase de champignon. L'avantage de cette dernière est sa disponibilité dans le commerce sous forme purifiée et elle offre donc la possibilité de conduire des études enzymatiques fiables. Mais il nous semble évident que si des molécules destinées à un usage humain sont ciblées, la tyrosinase de champignon ne peut être utilisée seule comme modèle de screening.

Les molécules capables d'inhiber la tyrosinase sont de nature chimique très diverse. Nous nous sommes limités dans cette recherche bibliographique aux dérivés phénoliques naturels.

a) L'hydroquinone et ses dérivés [48] :

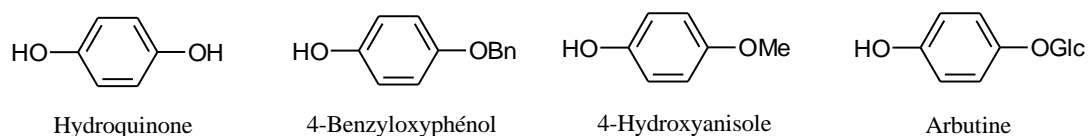


Schéma 6. Structures de l'hydroquinone et de ses dérivés

L'hydroquinone est l'un des premiers agents dépigmentants introduit en clinique depuis les années 60. Elle sert de substrat à l'enzyme et les produits issus de son oxydation sont des quinones (1,4-benzoquinone) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont toxiques pour le mélanocyte [51]. L'hydroquinone altère la synthèse d'ADN, d'ARN et la formation du mélanosome en modifiant son architecture, ce qui influe directement sur la synthèse de la mélanine. Efficace contre certains types d'hyperpigmentation (chloasma) [52], elle peut entraîner à forte dose une dépigmentation irréversible. L'hydroquinone a été prescrite par les dermatologues en association avec l'acide rétinoïque et les corticoïdes (trio de Kligman) [13]. Depuis 2000, son utilisation en dermocosmétique est interdite par la communauté Européenne (24^{ème} Dir. 2000/6/EC).

Ses éthers (4-benzyloxyphénol, 4-hydroxyanisole) ont aussi été utilisés en tant que dépigmentants. Le 4-benzyloxyphénol subit une métabolisation accompagnée d'une production excessive de radicaux libres à l'intérieur de la cellule, causant ainsi une dépigmentation permanente même à des sites éloignés du lieu d'application. Son utilisation

clinique est limitée à des cas de vitiligo, lorsqu'une dépigmentation généralisée est souhaitée [53].

L'arbutine est une prodrogue de l'hydroquinone largement utilisée en cosmétique. C'est un glycoside naturel, fréquent dans les plantes de la famille des Ericacées plus stable que l'hydroquinone. En présence d'une glycosidase, il se décompose rapidement en glucose et en hydroquinone pour exercer son action à des concentrations non cytotoxiques [48].

b) Le résorcinol et ses dérivés :

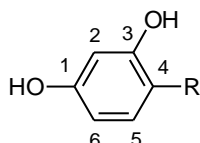


Schéma 7. Structure du résorcinol (R = H) et de ses dérivés

Ce sont aussi des analogues de substrat de la tyrosinase [54]. Certains dérivés substitués en 4 par des chaînes de type alkyl (exemple : *n*-butylrésorcinol [55]) ont révélé une bonne efficacité [56,57].

Une étude de relation structure-activité menée sur 3 familles de composés (résorcinols, stilbènes, et flavonoïdes) provenant d'extraits d'une même plante *Artocarpus incisus* (Moracées), a fait apparaître que les molécules possédant un squelette 4-R-résorcinol sont potentiellement inhibiteur de tyrosinase.

c) Les stilbènes :

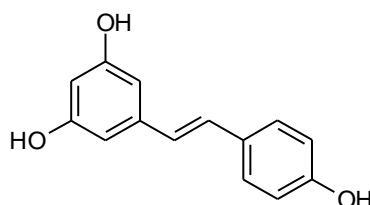


Schéma 8. Structure de type stilbène (resvératrol)

Ce sont des composés phénoliques qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène.

Le resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène) est une molécule naturelle présente dans de nombreuses plantes et dans le vin [58] sous forme de stilbène simple, ou sous forme glycosylée (exemple : *Rheum officinale*, Polygonacées [59]). Il se comporte comme un substrat de la tyrosinase [60], qui va l'oxyder en 3'-hydroxyresvératrol ; l'enzyme sera par la suite inhibée par ce métabolite [48,61]. L'oxyresvératrol (2',3',4, 5'-tétrahydroxystilbène) est un composé naturel que l'on retrouve particulièrement dans le murier blanc (*Morus alba*, L) et

qui inhibe l'activité DOPA-oxydase de la tyrosinase de manière non compétitive [48,62]. D'une manière générale, le nombre et la position des groupements hydroxyles semblent jouer un rôle important dans l'effet inhibiteur [63], leur méthylation entraîne plutôt une baisse de l'activité.

d) Acide kojique (5-hydroxy-2-hydroxyméthyl-4- γ -pyrone) :

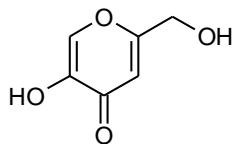


Schéma 9. Structure de l'acide kojique

C'est une substance antibiotique produite par plusieurs champignons du genre *Agaricus* et *Penicillium*, très utilisée comme agent dépigmentant en cosmétique [54,64]. Son mécanisme d'inhibition consiste à chélater le cuivre, cofacteur indispensable à l'activité de l'enzyme [65]. L'acide kojique inhibe l'activité catécholase de la tyrosinase selon un procédé qui se déroule en deux étapes. Il se lie dans un premier temps au complexe de cuivre (II), et ensuite à l'adduit formé par les deux atomes de cuivre et l'oxygène. Cela empêche dans les deux cas, la liaison d'un substrat de type catéchol [66]. Sa capacité à réduire les *o*-quinones en diphenol contribue aussi à l'inhibition de la mélanogenèse [67]. Instable à la chaleur, il s'oxyde facilement ; l'ajout d'acide ascorbique permet d'améliorer sa stabilité [68]. Son utilisation peut malheureusement conduire à des problèmes d'allergie [69]. Il fait actuellement l'objet d'une interdiction au Japon.

e) Mimosine (*N*-(2-amino-2-carboxyéthyl)-3-hydroxy-4-pyridone) :

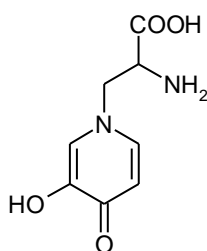


Schéma 10. Structure de la mimosine

La mimosine est un acide aminé végétal non protéique extraite des graines et des feuilles de *Mimosa pudica* (Fabacées), montrant une similarité structurale avec l'acide kojique, ce qui suppose qu'elle exercerait une inhibition par le biais d'une chélation du cuivre [54].

f) La phénylthiourée (PTU) [29,31] :

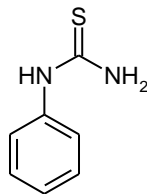


Schéma 11. Structure de la phénylthiourée

Cet inhibiteur est connu depuis les années 50, mais son mécanisme d'action n'a été étudié que récemment. L'atome de soufre se lie au deux atomes de cuivre du site actif de l'enzyme, remplaçant ainsi leur liaison avec l'oxygène. De plus, le noyau aromatique de la PTU entre en interaction avec certains résidus aromatiques du site actif. Cela entraîne une dégradation de la tyrosinase après la période de maturation dans l'appareil de Golgi.

g) Les flavonoïdes et dérivés:

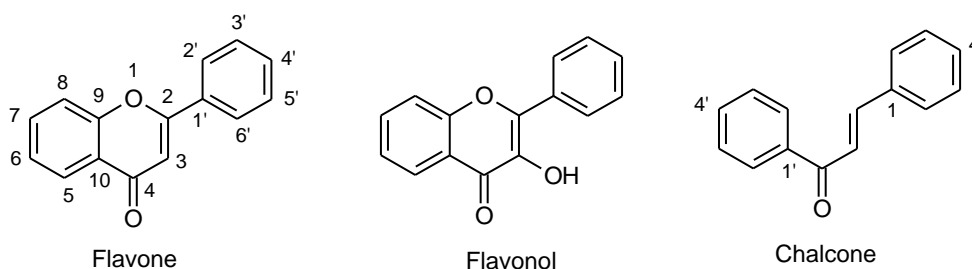


Schéma 12. Structure de quelques classes de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules ubiquitaires dans le domaine végétal. Ils possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 1,3-diphénylpropane et présentent différentes activités biologiques [70]. Certains sont connus comme des antioxydants. Ce potentiel antioxydant s'expliquerait en partie par une interaction avec les métaux de transition comme le cuivre et le fer ; cela aboutit à la formation de complexes et empêche ainsi la participation de ces ions à la formation de radicaux libres [71]. Cette famille renferme plusieurs classes de molécules dont les flavonols, les flavones, les chalcones et les aurones.

Certains flavonols sont capables d'inhiber l'activité de la tyrosinase en chélatant le cuivre. Cette chélation aurait lieu grâce à la proximité de l'hydroxyle en 3 et de la fonction cétone en 4 [72,73]. Ainsi, le kampférol et la quercétine qui sont des flavonols communs

isolés en particulier des fleurs des genres *Crocus* (*Crocus sativus*, Iridacées) [73], *Heterotheca* (*Heterotheca inuloides*, Astéracées) [74], *Buddleia* (*Buddleia coricea*, Loganiacées) [75] ont été décrits comme des inhibiteurs de la tyrosinase utilisant ce mécanisme d'action.

Parmi les flavones, deux dérivés la lutéoline (3',4',5,7-tétrahydroxyflavone) [74] et la nobilétine (3',4',5,6,7,8-hexaméthoxyflavone) ont montré une inhibition de la tyrosinase *in vitro*, mais leur mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé [76].

Les chalcones appartiennent à la grande famille des flavonoïdes. Elles renferment moins de molécules décrites comme des inhibiteurs de la tyrosinase, néanmoins l'isoliquiritigénine (4,2',4'-trihydroxychalcone), issue des racines de réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) peut exercer une inhibition compétitive vis-à-vis de la tyrosinase de mélanocyte [3]. Son activité pourrait être due à une homologie d'une partie de son squelette avec la tyrosine, substrat naturel de l'enzyme.

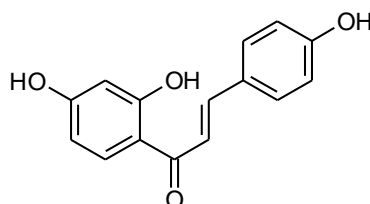


Schéma 13. Structure de l'isoliquiritigénine

Dans cette dernière catégorie de flavonoïdes, certains dérivés, les dihydrochalcones glycosylés ont été brevetés pour lutter contre les hyperpigmentations cutanées [77].

Nous pouvons aussi citer les chromones dont la structure se rapproche de celle des flavonoïdes.

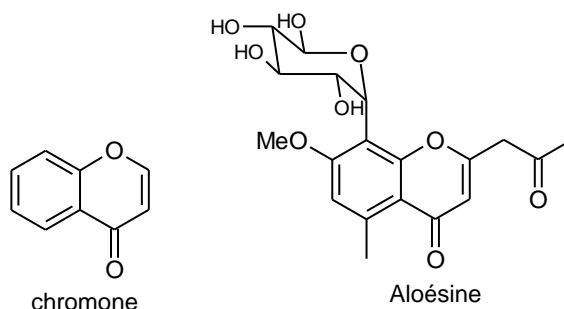


Schéma 14. Structure des chromones et de l'aloésine

L'aloésine (**Schéma 14**) (2-acétonyl-8- β -D-glucopyranosyl-7-hydroxy-5-méthylchromone) molécule isolée d'*Aloe vera* (Liliacées) peut moduler la synthèse de mélanine *via* une inhibition compétitive [78]. Deux autres chromones isolées de la même

plante de structure proche de l'aloésine, mais estérifiées par des dérivés d'acide cinnamique au niveau du glucose, ont également été décrites comme potentiellement inhibiteurs de la tyrosinase [79]. Une chromone de synthèse, la 5-méthyl-7-méthoxy-2-(2'-benzyl-3'-oxobutyl) chromone a aussi montré une activité inhibitrice de la tyrosinase plus importante que celles de l'acide kojique et de l'arbutine [80].

1.2.5 Autres actifs dépigmentants

Il apparaît clairement que la majorité des produits dépigmentants utilisés pour le traitement d'hyperpigmentations agissent sur l'enzyme clé de la mélanogenèse, la tyrosinase. Cependant il existe d'autres produits utilisés pour les mêmes indications dont le mécanisme d'action n'est pas directement lié à la tyrosinase. Nous pouvons citer dans ce cas l'acide ascorbique.

- L'acide ascorbique (vitamine C) :

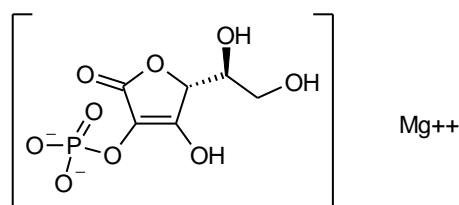


Schéma 15. Structure du magnésium ascorbylphosphate

La vitamine C est utilisée en cosmétologie pour stimuler la production de collagène ou éclaircir le teint et atténuer certaines hyperpigmentations [81]. Cette action est due à ses propriétés réductrices, qui lui permettent de réduire la dopaquinone en DOPA ou de réduire les précurseurs oxydés de la mélanine [51]. Il est de plus en plus remplacé dans les formulations par le magnésium ascorbyl phosphate, hydrosoluble et plus stable en formulation [49].

1.3 BILAN SUR LES DEPIGMENTANTS

Les connaissances sur la mélanogenèse ont beaucoup progressé ces dernières années, ouvrant de nouvelles voies dans les approches de traitement des hyperpigmentations. Dans le même temps, le sujet est devenu complexe et la classification des molécules plus difficile, car les mécanismes d'action sont variés et pas toujours élucidés. De nombreux composés ont été

décrits comme agents dépigmentants, mais des études cliniques plus poussées sont nécessaires pour affirmer leur innocuité.

L'hydroquinone, l'une des premières molécules dépigmentantes dont l'efficacité a été prouvée est actuellement interdite en Europe dans les formulations cosmétiques, car son utilisation peut entraîner de sérieux effets secondaires. L'acide kojique qui est très répandu dans les formulations dermocosmétiques a récemment vu son utilisation interdite au Japon, suite à des suspicions d'effets secondaires (effet mutagène).

En se basant sur la littérature, nous pouvons conclure que l'identification d'un agent dépigmentant idéal est difficile, ce qui justifie encore les nombreuses recherches menées dans ce domaine. La tyrosinase reste encore l'une des cibles les plus étudiées, dans la modulation de la mélanogenèse. L'activité des molécules est souvent évaluée sur cette enzyme, même si sa structure n'est pas complètement élucidée à ce jour. La connaissance de sa structure 3D serait un outil de choix pour concevoir des inhibiteurs sur mesure comme c'est le cas dans plusieurs domaines thérapeutiques.

1.4 FAMILLES DE MOLECULES CHOISIES POUR ETRE ETUDIEES COMME INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

Les inhibiteurs de la tyrosinase sont devenus des constituants importants des produits cosmétiques et dermatologiques ayant pour cible les hyperpigmentations cutanées. De ce fait, la recherche de molécules naturelles, d'origine végétale, inhibitrices de tyrosinase s'est considérablement développée, car les plantes constituent une source importante de molécules bioactives souvent exemptes d'effets secondaires. Nous avons choisi dans ce projet d'étudier trois familles de molécules naturelles : les aures, les chromones et les dérivés d'acide caféique et d'acide férulique. Différentes molécules naturelles ou non, appartenant à ces trois familles, seront synthétisées et évaluées sur notre cible la tyrosinase.

Avant d'exposer nos travaux et afin de situer ces trois familles de composés dans leur contexte actuel, nous avons jugé important d'aborder brièvement leur aspect structural et thérapeutique.

1.4.1 Les aurones

1.4.1.1 Introduction

Les aurones appartiennent à la famille des flavonoïdes, composés de nature phénolique principalement d'origine végétale [70]. Les aurones sont des pigments de type anthochlor, responsables de la coloration jaune d'une grande variété de plantes ornementales comme les dahlias par exemple [82]. Elles peuvent être aussi présentes dans les fruits et certains organismes marins comme des algues [83].

D'un point de vue structural, les aurones sont des 2-benzylidènebenzofuran-3 (2*H*)-one (ou benzylidènegoumaran-3-one) et peuvent être considérées comme des isomères de flavones [84].

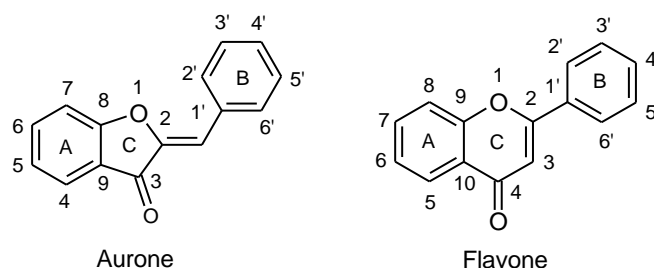
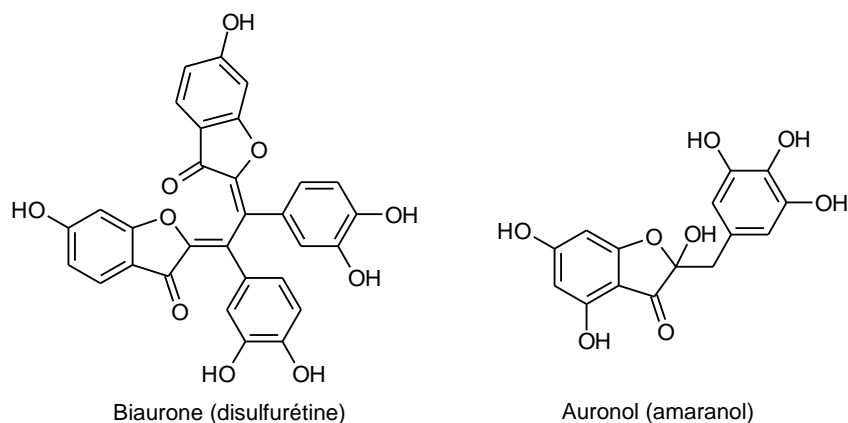


Schéma 16. Structure des aurones et des flavones

En dehors de leur rôle de pigmentation, les aurones ont été décrites comme des phytoalexines, utilisées par les plantes pour lutter contre les infections. Bien qu'étant moins connues que les autres flavonoïdes, les aurones sont de plus en plus étudiées dans le cadre de différentes activités biologiques [84].

Contrairement aux flavones qui peuvent être naturellement abondantes dans les végétaux, les aurones ont une répartition plus limitée et ont été de ce fait moins étudiées. Comme la plupart des flavonoïdes, les aurones naturelles sont le plus souvent hydroxylées, méthoxylées à l'état libre ou sous forme d'hétérosides et à un degré moindre sous forme de bioaurone [85]. Des aurones hydratées appelées auronols ont aussi été décrites dans la littérature (**Schéma 17**).



Biaurone (disulfurétine)

Auronol (amaranol)

Schéma 17. Exemples de biaurone et d'auronol

Malgré leur faible répartition dans les plantes, il existe des aurones naturelles décrites et structurellement caractérisées [82] :

| Nom | Structure | Plante d'origine (famille) |
|-------------|-----------|---|
| Auréusidine | | <i>Antirrhinum majus</i> (Scrophulariacées) <i>Citrus medica</i> (Rutacées) <i>Cyperus, Eleocharis</i> (Cypéracées) |
| Auréusine | | <i>Antirrhinum majus</i> (Scrophulariacées) <i>Mussaenda hirsutissima</i> (Rubiacees) |
| Cernuoside | | <i>Mussaenda hirsutissima</i> (Rubiacees) <i>Limonium bonduellii</i> (Rutacées) |
| Bractéatine | | <i>Helichrysum bracteatum</i> (Astéracées) <i>Antirrhinum nuttalianum</i> (Scrophulariacées) |
| Bractéine | | <i>Helichrysum bracteatum</i> (Astéracées) |

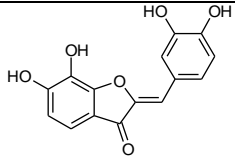
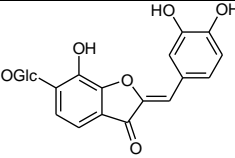
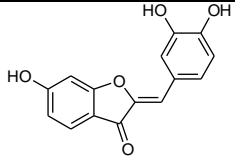
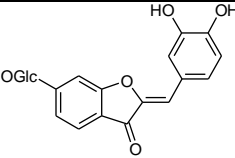
| | | |
|-------------|---|---|
| Maritiméine |  | <i>Coreopsis maritima</i> (Astéracées) <i>Bidens bipinnata</i> (Astéracées) |
| Maritiméine |  | <i>Coreopsis maritima</i> (Astéracées) <i>Coréopsis tinctoria</i> (Astéracées) <i>Baeria chrysostoma</i> (Astéracées) |
| Sulfurétine |  | <i>Bidens tripartita</i> (Astéracées) <i>Dahlia variabilis</i> (Astéracées) <i>Cosmos sulfuréus</i> (Astéracées) |
| Sulfuréine |  | <i>Coreopsis bigelovii</i> (Astéracées) <i>Zinnia linearis</i> (Astéracées) <i>Cotinus coggygria</i> (Anacardiacees) |

Tableau I. Exemples d'aurones naturelles

1.4.1.2 Biosynthèse des aurones

La plupart de ces molécules ont une origine biosynthétique commune, elles seraient issues de l'oxydation de certaines chalcones. Les premières tentatives d'explication de la biosynthèse des aurones ont été décrites dans la littérature dans les années 1970. D'après ces études, les aurones étaient synthétisées dans les semis de soja en deux étapes à partir des chalcones [86].

Récemment, des études plus approfondies ont été menées sur des extraits de fleurs de *Antirrhinum majus* (Scrophulariacées) pour établir une relation entre les chalcones et la biosynthèse des aurones [87,88]. Il a été établi qu'une enzyme l'auréusidine synthase était à l'origine de la transformation d'un certain nombre de chalcones (exemple : 2',4',6',4-tétrahydroxychalcone ou THC ; 2',4',6',3,4-pentahydroxychalcone ou PHC) présentes dans ces fleurs, en aurones. La conversion de la THC en auréusidine se fait en deux étapes : une hydroxylation suivie d'une cyclisation oxydative catalysée par la même enzyme, l'auréusidine synthase. L'auréusidine peut aussi être produite à partir de la PHC, dans ce cas il n'y a pas d'étape d'hydroxylation (**Schéma 18**).

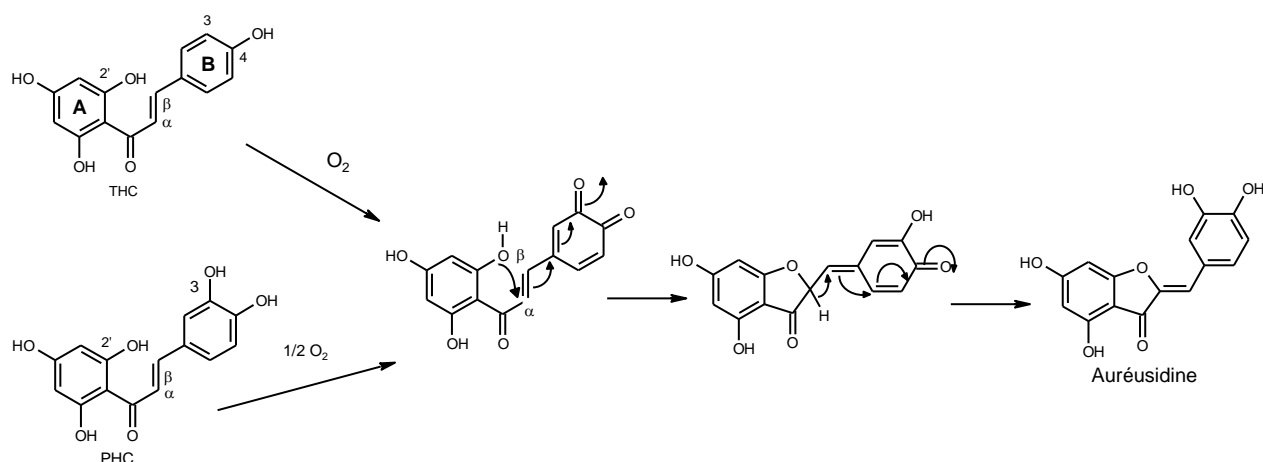


Schéma 18. Biosynthèse des aurones [87,88]

Le mécanisme d'action de l'auréusidine synthase est spécifique. Elle n'agit que sur les chalcones portant des hydroxyles en 2' et 4 pour produire des aurones. Cependant la THC et la PHC glycosylées en 4' sont aussi de bons substrats pour cette enzyme, dans ce cas les produits formés sont les aurones glycosylées correspondantes.

Il est important de noter que d'après le mécanisme précédemment décrit, les aurones produites doivent porter deux (en 3' et 4') ou trois (en 3', 4' et 5') groupements hydroxyles sur le noyau B. Cependant, il existe des aurones ne possédant aucun ou un seul hydroxyle (hispidol) sur le noyau B ; ce qui signifierait qu'elles sont synthétisées selon un autre mécanisme [88].

1.4.1.3 Synthèse chimique des aurones

L'extraction des aurones à partir des sources végétales ne fournissant qu'une faible quantité de produit, les chercheurs intéressés par les activités biologiques des aurones ont souvent recours à la synthèse chimique.

Les aurones peuvent être synthétisées selon deux principales méthodes : par cyclisation oxydative des 2'-hydroxychalcones ou à partir de la benzofuran-3(2*H*)-one.

a) Cyclisation oxydative des chalcones :

La transformation des 2-hydroxychalcones en aurones peut se faire sous diverses conditions. Généralement, les 2'-hydroxychalcones peuvent être oxydées par de l'acétate de mercure dans de l'acide acétique à reflux [89]. La toxicité de l'acétate de mercure fait qu'il est de moins en moins utilisé et remplacé par d'autres oxydants comme la DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone), mais dans ce cas les rendements n'excèdent pas les 8% [90].

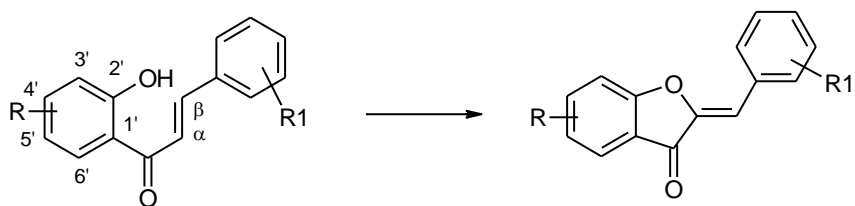


Schéma 19. Synthèse des aurones à partir d'une oxydation de chalcone

Cushman et ses collaborateurs ont décrit l'utilisation de trinitrate de thallium pour la cyclisation oxydative des 2'-hydroxy-4-méthoxychalcones [91,92]. La présence d'un groupement électrodonneur comme le groupement méthoxy en *para* de l'hydroxyle en 2' est nécessaire pour l'obtention de l'aurone (**Schéma 20**). D'autre part l'introduction d'un groupement méthoxy ou éthoxy en 4 (sur l'aurone), provenant du solvant sur le noyau A restreint l'utilisation de cette méthode à la synthèse de certains types d'aurones (4,5-diméthoxy ou 4,5-dihydroxyaurone).

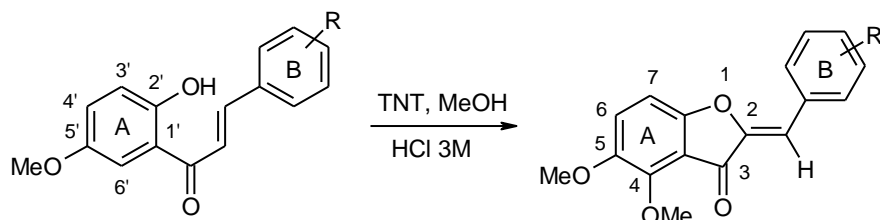


Schéma 20. Synthèse des aurones par la méthode de Cushman

Plus récemment, une autre méthode de synthèse plus adaptée a été décrite. Elle débute par la bromation d'une 2'-acétoxychalcone par le tribromure de *n*-tétrabutylammonium (TBATB) et le produit issu de l'addition est transformé en aurone par un traitement en milieu basique (**Schéma 21**) [93].

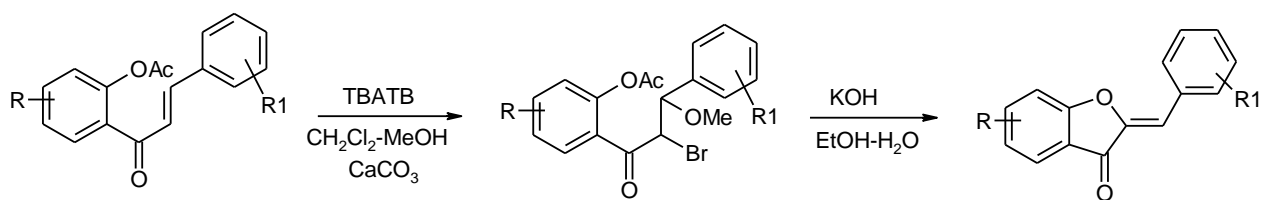


Schéma 21. Autre méthode de synthèse des aurones à partir d'une chalcone

b) Synthèse des aurones à partir de la benzofuran-3(2*H*)-one (**Schéma 22**) :

La benzofuran-3(2*H*)-one représente l'intermédiaire clé de cette voie de synthèse. Ce synthon est obtenu en 3 étapes : une acylation de type Friedel-Crafts d'un dérivé phénolique avec l'acide chloroacétique ou un de ses dérivés (halogénoacétonitrile) suivie d'une

cyclisation de la 2-hydroxyacétophénone. Une condensation acido ou basocatalysée avec différents benzaldéhydes conduit à la formation de diverses aures [94-98]. L'étape de condensation peut être réalisée sur un support solide comme l'alumine [99,100] ou encore en absence de solvant, notamment par irradiation aux micro-ondes [101].

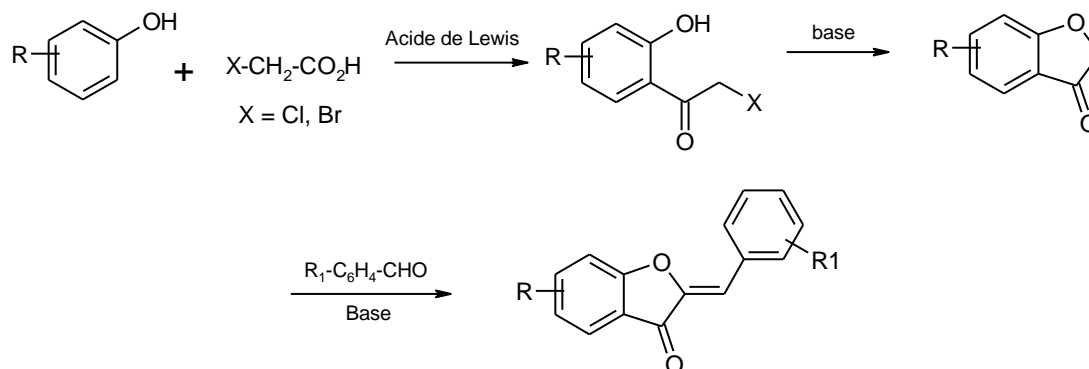


Schéma 22. Obtention des aures à partir de la benzofuran-3(2H)-one

1.4.1.4 Activités biologiques des aures

a) Potentialités dans le traitement des tumeurs cancéreuses :

Les activités biologiques des aures ainsi que leurs mécanismes d'action dans les domaines de la recherche contre le cancer ont été publiés par plusieurs groupes de recherche.

- Les aures comme modulateurs de la MDR (Multidrug Resistance) induite par la Pgp : la Pgp (Glycoprotéine P) est une protéine transmembranaire capable d'entraîner l'efflux hors de la cellule tumorale de molécules thérapeutiques [102,103]. L'interaction de certains flavonoïdes (flavones, flavonols, chalcones) avec la Pgp a été étudiée. Il a été démontré que les flavones possédant un groupement hydroxyle en 5, et un groupement méthoxy en 7 ont une grande affinité pour l'extrémité C terminale du domaine de liaison des nucléotides (NBD2) de la Pgp [104] et inhiberaient ainsi son activité. L'application de ces critères structuraux aux aures, a permis d'identifier des molécules beaucoup plus actives que celles qui ont été précédemment étudiées dans la famille des flavonoïdes [105].

- Inhibition de la kinase cycline dépendante : les kinases cycline dépendantes (CDKs) sont des enzymes ayant un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire. Les composés capables d'inhiber ces enzymes ont un potentiel quant à leur utilisation en tant que antiprolifératif [106]. Le flavopiridol est un inhibiteur connu de ces kinases et est actuellement en essais cliniques. Les chercheurs du groupe pharmaceutique Novartis ont

établi que le remplacement du noyau flavone par un noyau aurone peut fournir des analogues de flavopiridol capables d'inhiber les CDKs en mimant le flavopiridol [98] (**Schéma 23**).

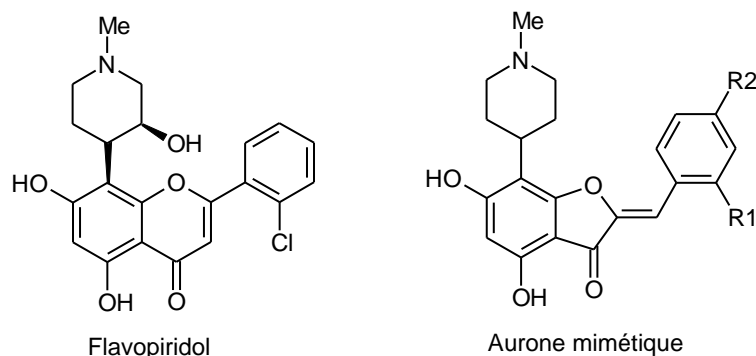


Schéma 23. Mimétisme de la structure du flavopiridol par une aurone

- Scission de l'ADN et inhibition de la télomérase : dans le cadre de la recherche de produits naturels potentiellement actifs en chimiothérapie anticancéreuse, une aurone l'hamiltrone (3',4'-dihydroxy-4,5,6-triméthoxyaurone) a été identifiée et caractérisée. Cette aurone a été isolée d'*Uvaria hamiltonii* (Annonacées). Des tests de scission du double brin d'ADN ont révélé que l'hamiltrone (**Schéma 24**) était 10 fois plus active que ses isomères de type chalcone (hamilcone) et flavanone (hamiltone B) [107].

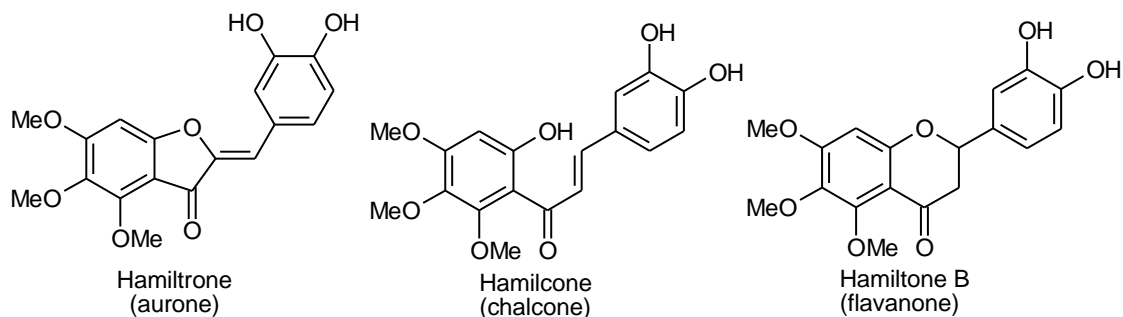


Schéma 24. Structure des flavonoïdes isolés d'*Uvaria hamiltonii*

Par ailleurs, des études sur l'activité antitumorale des 6,7-dihydroxyaurones ont été rapportées et l'activité de ces molécules semble être liée à l'inhibition de la télomérase qui est une enzyme responsable du pouvoir prolifératif indéfini des cellules tumorales [108].

b) Activité antiparasitaire :

Dans ce domaine, les chercheurs se sont intéressés à l'activité des auronnes sur des parasites du genre *Plasmodium* et *Leishmania*. Kayser et ses collaborateurs [109] ont étudié la capacité de diverses auronnes synthétiques ou naturelles à inhiber le développement de la forme érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*, l'une des quatre espèces entraînant de

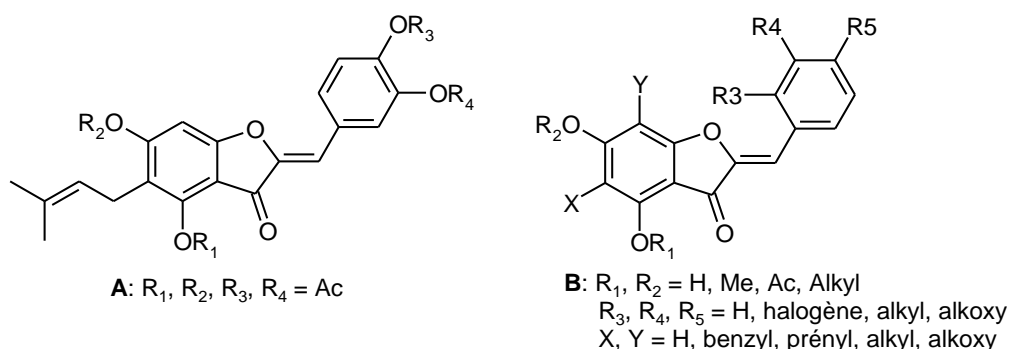
sévères crises de paludisme. Les auronés ont montré des IC_{50} de l'ordre du nanomolaire sur des souches aussi bien sensibles que résistantes de *Plasmodium falciparum* et contre toute attente les souches chloroquinorésistantes ont été plus sensibles aux auronés. Des études de relation structure activité ont mis en évidence que les auronés les plus actives étaient hydrophobes comme la 4,6,4'-triacétyl-3',5'-diméthoxyaurone (IC_{50} : 7 nM).

Les auronés ont également fait l'objet d'études dans le cadre du traitement des parasitoses induites par les espèces du genre *Leishmania*. Une série d'auronés substitués en 4, 6, 3', 4' et 5' a été soumise à une évaluation *in vitro*, mesurant l'inhibition exercée par ces molécules sur les formes promastigotes extracellulaires de différentes espèces comme *Leishmania donovani*, *L. infantum*, *L. enriettii* et *L. major*. Quelques dérivés ont montré une activité leishmanicide intéressante, avec une toxicité modérée vis-à-vis des cellules hôtes. La 6-hydroxyaurone s'est révélée comme étant la molécule la plus active. Ces auronés ont aussi montré une activité intéressante vis-à-vis de la forme intracellulaire de *Leishmania donovani* provenant de macrophages murins [110]. Leur mécanisme d'action en tant qu'antiprotozoaire résulte de leur interférence avec les enzymes respiratoires mitochondriales de ces parasites telles que les fumarates réductases [111].

De plus Kayser et ses collaborateurs [112] ont étudié les premiers l'efficacité d'une série d'auronés et d'auronols sur la croissance intracellulaire d'un parasite le *Cryptosporidium parvum*. Le *Cryptosporidium parvum* est un parasite des cellules épithéliales intestinales humaines, contre lequel il n'existe pas de traitement efficace. Des tests *in vitro* ont montré que certaines auronés inhibaient la croissance de la forme intracellulaire à environ 90% avec des concentrations allant de 25 à 100 μ M.

c) Activité antimicrobienne :

L'utilisation des auronés en tant que microbicide a été brevetée par des chercheurs du groupe Phytera, Inc. Ce brevet décrit la capacité des auronés à enrayer une infection aussi bien bactérienne que fongique [113]. Les auronés étudiés (**Schéma 25**) sont d'origine synthétique (structures A et B) ou naturelle (structure C).



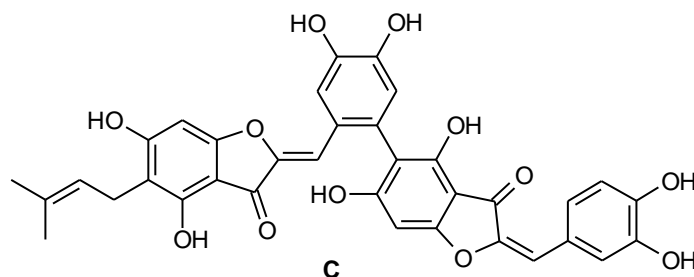


Schéma 25. Structure des aurones à activité microbicide

Le pouvoir bactéricide ou fongicide de ces composés a été déterminé en mesurant la croissance des organismes microbiens ou en utilisant des inhibitions d'enzymes cellulaires. Des tests *in vivo* sur des souris infectées par *Candida albicans* sensibles ou résistantes au fluconazole (antifongique) ont permis de conclure que l'administration d'aurone a prolongé significativement la survie des souris traitées par rapport à celles qui n'ont pas été traitées ou traitées par le fluconazole.

d) Activité antihormonale :

Des produits isolés de plantes ont été et continuent encore à être utilisés en médecine traditionnelle pour leur propriété antihormonale. Afin de vérifier l'activité antihormonale de certaines plantes, des études de fractionnements bioguidés ont été réalisées sur trois plantes : *Licopus virginicus* (Lamiacées), *Melissa officinale* (Lamiacées), *Lithospermum officinale* (Boraginacées) [114]. Cette étude avait pour cible la iodothyronine déiodinase du foie de rat, qui métabolise la thyroxine extrathyroïdienne (déiodination) [115]. La conclusion issue des études *in vitro* et *in vivo* est que les molécules actives impliquées dans l'inhibition de la déiodinase sont : l'acide rosmarinique, l'acide ellagique, la lutéoline-7- β -glucoside et les aurones notamment une aurone de synthèse la 3'-iodo-4,6,4'-trihydroxyaurone étaient les plus actives.

e) Activité antimétabolique:

Récemment, l'utilisation des aurones en tant qu'agents thérapeutiques potentiels dans le domaine du diabète a été rapportée notamment dans des brevets qui décrivent l'utilisation des aurones pour lutter contre les complications du diabète, en inhibant la réaction de Maillard [116]. La réaction de Maillard est une réaction non enzymatique du glucose avec les fonctions amines des protéines, conduisant à la formation réversible d'adduits de type base de Schiff. Ces adduits entraînent des pontages au niveau des protéines qui vont être à l'origine des complications métaboliques du diabète [117].

f) Activité antioxydante :

Les radicaux libres sont impliqués dans un grand nombre de maladies dont l'athérosclérose et certains cancers dont le cancer du colon [118]. Les radicaux libres endogènes ou exogènes peuvent être à l'origine de certaines lésions de l'ADN, lésions qui sont directement corrélées avec l'augmentation du risque de cancer. Une alimentation riche en antioxydants peut constituer une prévention contre ce stress oxydatif [119].

Les flavonoïdes en général ont fait l'objet de plusieurs études dans ce domaine. Une aurone la sulfurétine (**Tableau I**, page 31), ainsi que son analogue glycosylé en 6 (sulfuréine) et son dimère ont montré un potentiel antioxydant *in vitro* dans un test à la DPPH [85]. Ces trois aurones ont été isolées de la même plante *Cotinus coggygria* de la famille des Anacardiacees.

1.4.2 Les chromones

1.4.2.1 Introduction

Le terme « chromone » est utilisé pour toute molécule contenant la structure 1-benzopyran-4-one (**Schéma 26**).

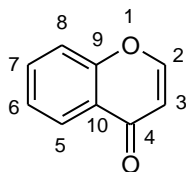


Schéma 26. Motif chromone

Les chromones sont à l'origine des polyphénols naturels dont l'unité fondamentale (1-benzopyran-4-one) peut être retrouvée dans des pigments végétaux plus particulièrement, les flavonoïdes ou d'autres substances naturelles.

Les chromones sont largement répandues dans les plantes, et plusieurs d'entre elles sont connues pour leurs propriétés biologiques exploitables en thérapeutique. Dans la nature, elles peuvent être sous forme libre, d'hétérosides ou de dérivés azotés.

Ces composés ont été isolés de végétaux, d'organismes marins ou de champignons (**Tableau II**).

| Nom | Structure | Origine |
|----------------|-----------|--------------------------------|
| Khélline [120] | | <i>Ammi visnaga</i> (Apiacées) |

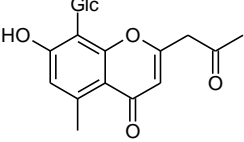
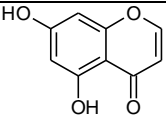
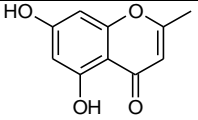
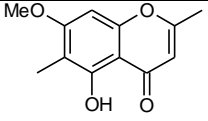
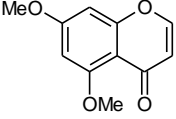
| | | |
|---|---|--|
| Aloésine |  | <i>Aloe vera</i> (Liliacées) |
| Eriodictyol [121] (5,7-dihydroxychromone) |  | <i>Arachis hypogaea</i> (Fabacées) |
| 5,7-Dihydroxy-3-méthylchromone [122] |  | <i>Hypericum annulatum</i> (Guttifères) |
| Eugénitine [123] |  | <i>Céphalosporium aphidicola</i> (champignon) |
| Dennettine [124] (2,6-diméthoxy) chromone |  | <i>Dennetia tripetala</i> (Annonacées) |

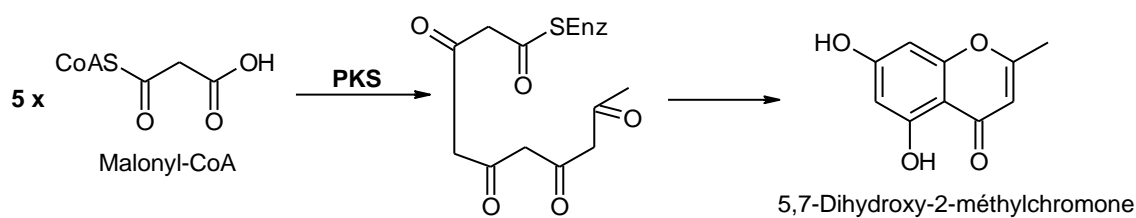
Tableau II. Exemples de chromones naturelles

Bien qu'étant structurellement proche des flavonoïdes, les chromones ont une origine biosynthétique particulière.

1.4.2.2 Biosynthèse des chromones

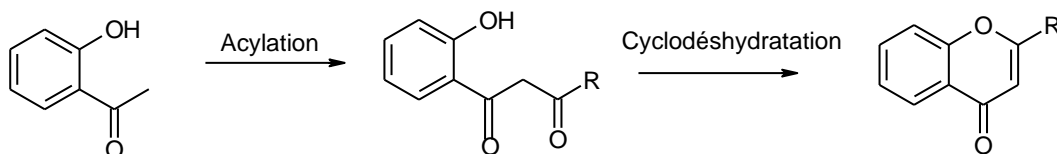
La biosynthèse de la plupart des métabolites secondaires des plantes comme les flavonoïdes et les chromones fait appel à des enzymes appartenant à la superfamille des chalcones synthases (CHS). Dans cette superfamille de chalcones synthases, il est possible de distinguer structurellement et mécaniquement le type I (modulaire) et le type II (type sous unitaire) ou polykétide synthase (PKS). Les PKS utilisent des thioesters d'acétylCoA comme substrat sans intervention d'une protéine transporteuse d'acyl, pour réaliser dans le même site actif, une série de réactions (décarboxylation, condensation, cyclisation et aromatisation) qui conduit à la formation de nombreux composés importants pour les plantes [125].

Récemment des études cristallographiques et de mutagenèse dirigée ont permis de découvrir des détails structuraux et fonctionnels d'une PKS de type III d'origine végétale ou bactérienne. Une PKS particulière de type III, la pentakétide chromone synthase peut catalyser la formation d'une chromone, la 5,7-dihydroxy-2-méthylchromone à partir de cinq molécules de malonyl-CoA [126] (**Schéma 27**).


Schéma 27. Biosynthèse des chromones

1.4.2.3 Synthèse des chromones

La cyclodéshydratation d'une *o*-hydroxyaryl-1,3-dicétone est l'une des méthodes les plus fréquemment utilisées pour la synthèse de chromones et de flavones. La 1,3-dicétone est synthétisée par acylation d'une *o*-hydroxyacétophénone (**Schéma 28**).


Schéma 28. Obtention des chromones par voie chimique

Dans la synthèse de type Baker-Venkataraman, une condensation interne de type Claisen est réalisée en milieu basique, suivie d'une cyclodéshydratation qui conduit à la formation du motif chromone [127]. L'étape clé de cette synthèse est le transfert du groupe acyl de l'ester induit par une base en passant par un intermédiaire de type énolate : c'est le réarrangement de Baker-Venkataraman (**Schéma 29**). Cette méthode a été reprise pour la synthèse des chromones substituées en 2 [128,129] ou disubstituées en 2 et 3 [130,131]. Les bases utilisées pour le transfert du groupe acyl peuvent être des bases classiques comme la potasse, les alcoolates ou des hydrures (NaH) [132].

La dernière étape de cyclodéshydratation se déroule généralement en milieu acide (H_2SO_4 , HCl, APTS).

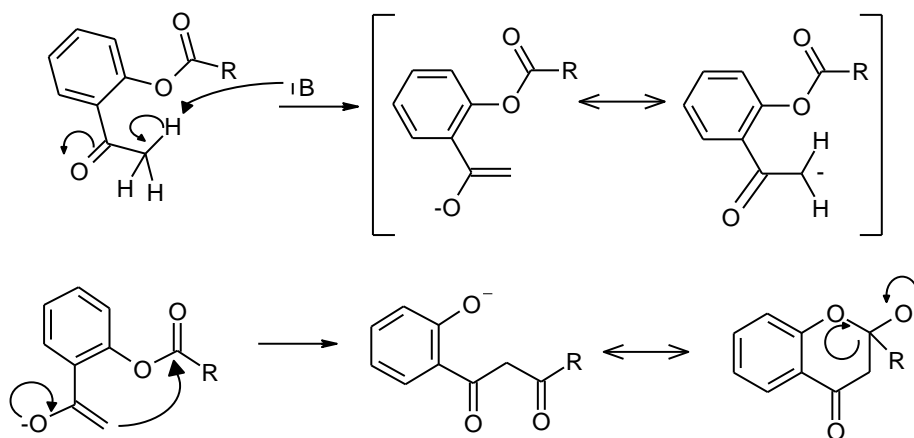


Schéma 29. Réarrangement de Baker-Venkataraman

1.4.2.4 Activités biologiques

Plusieurs publications font état d'un spectre d'activités biologiques étendu pour les chromones, incluant des activités antihistaminiques dans la prévention des crises d'asthme, des activités antivirales, antifongiques, antibactériennes et des propriétés antitumorales.

a) Activité antiallergique (inhibitrice de la dégranulation des mastocytes):

Cette propriété biologique des chromones a été découverte depuis les années 50 par le Dr Altounyan [133]. Une des substances les plus connues possédant cette propriété est le cromoglycate de sodium.

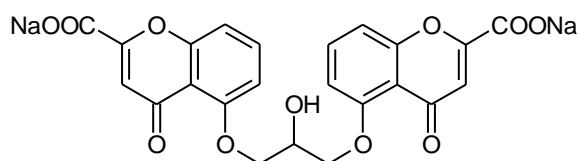


Schéma 30. Cromoglycate de sodium

Le cromoglycate disodique en inhalation (LOMUDAL[®], INAL[®]) a été introduit en thérapeutique à un moment où pendant des années, il n'y avait pas de nouveau traitement pour l'asthme. Son utilisation dans cette indication s'est largement répandue et a fait le succès de la firme Fisons Pharmaceuticals. Le cromoglycate disodique exerce une action locale au niveau de la muqueuse bronchique. Il inhibe la synthèse et la libération par les cellules de l'allergie, les mastocytes, des médiateurs de l'inflammation (histamine et Slow Reacting Substance of Anaphylaxis). Il inhibe également la dégranulation secondaire à des stimuli non en cause dans l'allergie. L'inhibition de la dégranulation pourrait avoir comme origine une inhibition des phosphodiésterases mastocytaires et ou un effet stabilisant de la membrane par une action sur les mouvements du calcium [134].

b) Propriétés anticancéreuses :

Budzisz et ses collaborateurs ont étudié les propriétés des dérivés de chromones phosphorylées en tant qu'antitumoraux [135]. Ils ont synthétisé, isolé et caractérisé une série de chromones substituées en 2 et portant une fonction acide phosphonique en 3. Le pouvoir alkylant de ces molécules et leur activité antitumorale ont été évalués respectivement *in vitro* et *in vivo*. Deux dérivés de chromone (Schéma 31, R = H et Me) ont montré un pouvoir alkylant intéressant *in vitro* et plus important que celui du cyclophosphamide (ENDOXAN[®]), un agent alkylant utilisé en thérapeutique. La chromone méthylée en 6 (R = Me) a montré une

activité antitumorale significative contre la lignée leucémique murine P388, après administration d'une dose de 500 mg/kg.

Une autre chromone, la 2-(4-morpholinyl)-8-phénylchromone (**Schéma 31**, LY294002) a montré une activité cytotoxique intéressante contre des cellules issues d'un cancer de colon. Elle inhibe la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) et inactive la Akt/protéine kinase B (PKB) qui permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose [136].

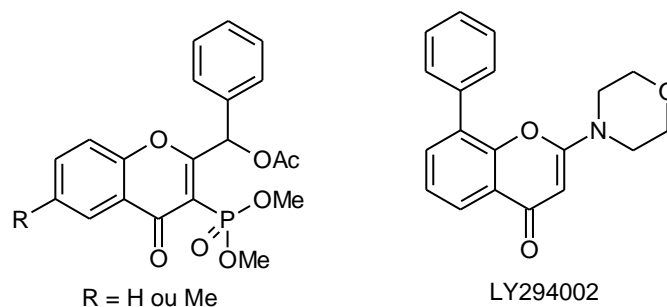


Schéma 31. Structure des chromones ayant montré une activité antitumorale *in vitro*.

La capacité des chromones à moduler la résistance aux anticancéreux (MDR) induite par la glycoprotéine P (Pgp) a aussi été étudiée. Des chromones de synthèse ont montré *in vitro* une inhibition de la Pgp [137]. Ces molécules ont été testées pour évaluer leur capacité à empêcher l'efflux d'un antibiotique anticancéreux la daunorubicine. La molécule la plus efficace dans ce test est la 5-hydroxy-2-(4-méthylpipérazine-1-ylcarbonyl)chromone et son potentiel *in vitro* est supérieur à celui de la ciclosporine utilisée comme référence pour l'inversion de la MDR (**Schéma 32**) :

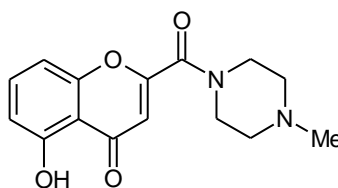


Schéma 32. Chromone modulatrice de la MDR

c) Activité antivirale :

Le screening des extraits de plantes comme source possible d'antiviraux a conduit à la découverte de potentiels inhibiteurs de la croissance virale *in vitro* et l'utilisation de l'approche ethnopharmacologique a augmenté la probabilité d'identifier de nouvelles molécules bioactives. *Selaginella uncinata* (Sélaginellacées) est une plante médicinale

chinoise utilisée pour traiter les maladies infectieuses. L'extrait éthanolique de cette plante a montré une activité inhibitrice significative sur le virus syncytial respiratoire (VSR). L'extrait actif a conduit à l'isolement de deux nouvelles chromones glycosylées : l'uncinoside A et l'uncinoside B (**Schéma 33**) ; les IC₅₀ de ces deux molécules sur le VSR étaient respectivement de 6,9 et 1,3 µg/mL [138].

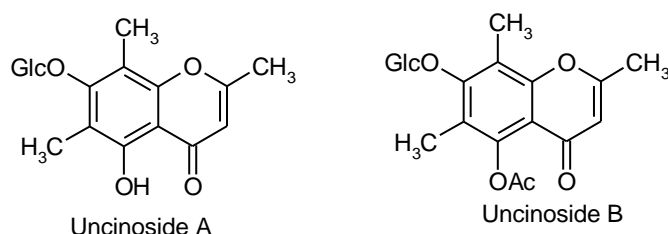


Schéma 33. Structure des deux chromones isolées de *Selaginella uncinata*

Une autre chromone isolée de *Schumanniphyton magnificum*, une herbe médicinale de l'Afrique occidentale (Rubiacées) s'est révélée active contre le virus VIH et le virus de l'herpès (Herpes Simplex Virus) [139]. La molécule responsable de l'activité, la Schumannificine provient d'une fraction apolaire de l'extrait méthanolique des écorces de racine de *Schumanniphyton magnificum*. Des dérivés acylés et méthylés sur l'azote et ou en 5 et 7' ont été synthétisés et testés. De toutes les molécules testées, la Schumannificine a montré l'activité anti-VIH la plus importante. La présence d'un noyau pipéridine et de groupements hydroxyles libres semble favoriser l'activité anti-VIH. Cette activité est due à une liaison irréversible de la molécule à la protéine gp 120 impliquée dans la réplication du virus.

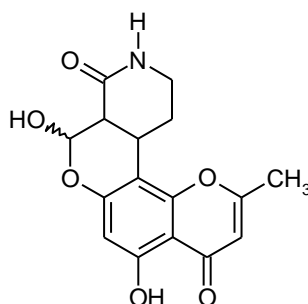


Schéma 34. Schumannificine

d) Activité antifongique et antibactérienne :

L'extraction des racines d'une plante chinoise *Eriosema tuberosum* (Fabacées) a permis la caractérisation de quatre chromones dont l'activité antifongique a été évaluée sur deux espèces fongiques : *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans* en comparaison

avec le Miconazole (DAKTARIN[®]) [140]. La molécule la plus active était l'ériosématine, les dérivés prénylés en 8 et en 6 n'étaient pas actifs.

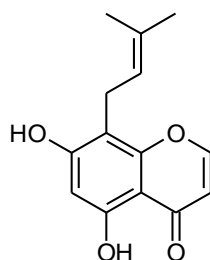


Schéma 35. Eriosématine

1.4.3 Les dérivés des acides caféique et férulique

1.4.3.1 Introduction

L'acide caféique, l'acide férulique et leurs analogues sont des phénylpropanoïdes très répandus dans le règne végétal, où ils jouent un rôle de précurseur dans la biogenèse des flavonoïdes.

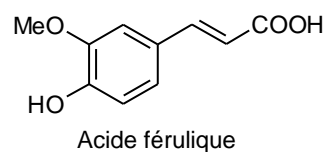
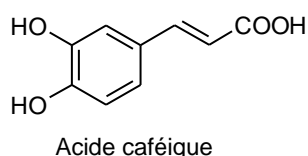


Schéma 36. Structure des acides caféique et férulique

L'acide férulique est souvent contenu dans des graines alimentaires et certains végétaux et représente l'un des antioxydants majeurs de la bière [141]. L'acide caféique et ses analogues recouvrent une distribution dans les végétaux similaire à celle de l'acide férulique ; il est aussi présent dans les fruits et légumes, les grains de café, les olives et la propolis [142]. Ces acides phénoliques sont rarement sous forme libre, mais souvent sous forme de dérivés incluant des esters, des amides, des hétérosides. L'existence de tels composés dans les aliments peut affecter la stabilité, la couleur, le goût ou encore la valeur nutritionnelle de certains aliments. Les fonctions physiologiques de ces dérivés font l'objet d'un intérêt grandissant de la part de plusieurs équipes de recherche. En outre, plusieurs travaux décrivent l'isolement de ces composés de différentes espèces végétales (**tableau III**).

| Dérivé | Formule | Plante d'origine |
|--|---------|--|
| <i>trans</i> -férulate de p-hydroxyphényléthyl | | <i>Stephania longa</i> (Ménispermacées) |

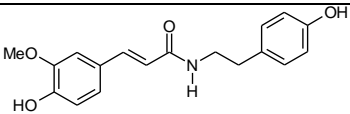
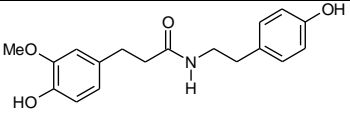
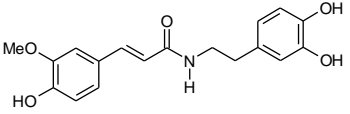
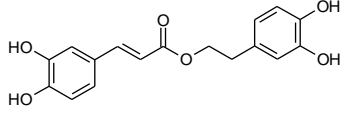
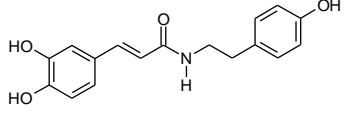
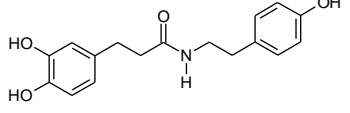
| | | |
|--|---|---|
| [143-145] | | <i>Polygonum orientale</i> (Polygonacées) <i>Coptidis sp</i> (Renonculacées) |
| <i>N-trans</i> -féruoyltyramine [146,147] |  | <i>Hibiscus cannabinus</i> (Malvacées) <i>Piper sp</i> (Pipéracées) <i>Porcelia macrocarpa</i> (Annonacées) |
| <i>N-dihydro</i> féruoyltyramine [148] |  | <i>Annona cherimola</i> (Annonacées) |
| <i>N-trans</i> -féruoyldopamine [149] |  | <i>Astraphaxis spinosa</i> (Polygonacées) |
| Teucrol [150] |  | <i>Teucrium pilosum</i> (Lamiacées) |
| <i>N-trans</i> -caféoyltyramine [151,152] |  | <i>Annona montana</i> (Annonacées) <i>Limonium sinense</i> (Plumbaginacées) |
| <i>N-dihydro</i> caféoyltyramine [153] |  | <i>Lycium chinense</i> (Solanacées) |

Tableau III. Exemples de dérivés naturels

1.4.3.2 Activités biologiques

a) Rôle physiologique

L'acide caféique et l'acide férulique peuvent être considérés comme des dérivés d'acide *p*-hydroxycinnamique (*p*-coumarique). Ces dérivés sont impliqués dans les mécanismes de défense de certaines plantes. La synthèse et l'intégration dans la barrière cellulaire d'amide d'acide hydroxycinnamique et d'octopamine constituent une réponse des tubercules de pomme de terre contre une agression fongique ou contre des agressions physiques (blessures) [154]. Ces amides contribuent à la formation d'une barrière phénolique qui augmente la résistance de la barrière cellulaire vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique [155].

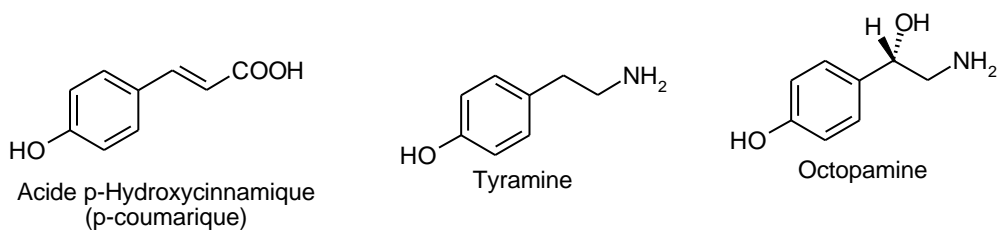


Schéma 37. Molécules entrant dans la composition de la barrière phénolique

b) Activité antioxydante :

C'est l'activité la plus étudiée et donc la mieux connue de ces molécules. La plupart des propriétés thérapeutiques attribuées à ces molécules sont au moins partiellement liées à leur pouvoir antioxydant. L'activité antioxydante des dérivés d'acide caféique et férulique naturels ou de synthèse a été évaluée dans plusieurs études dans le domaine médical et cosmétique [156]. L'activité antioxydante des polyphénols en général est due à leur groupement hydroxyle, mais ce point ne représente pas le seul facteur déterminant pour leur potentiel antioxydant.

Dans le cas de l'acide férulique, il n'y a qu'un seul groupe hydroxyle sur un cycle aromatique *para*-substitué lié à une chaîne latérale conjuguée. Cette *para*-substitution permet au radical phénoxy de l'acide férulique d'être délocalisé sur toute la molécule et être ainsi stabilisé. La présence d'un groupement électrodonneur en *ortho* (méthoxy) représente aussi un facteur augmentant la stabilité du radical phénoxy et donc son efficacité antioxydative [157].

La présence d'un second hydroxyle en *ortho*, augmente l'activité antioxydante à cause d'une stabilisation additionnelle par résonance et par une formation d'*ortho*quinone [141]. Cette hypothèse a été utilisée par certains auteurs pour expliquer une activité des esters de l'acide caféique par rapport aux mêmes esters de l'acide férulique.

c) Dérivés d'acide férulique et diabète :

Récemment une équipe de chercheurs japonais a pu démontrer que l'administration d'acide férulique chez des souris diabétiques STZ a entraîné une baisse de la glycémie chez ces animaux [158]. Cette découverte a conduit Nomura et ses collaborateurs à étudier la stimulation de la sécrétion d'insuline *in vitro* par des amides de l'acide férulique. La plupart des molécules synthétisées ont stimulé la synthèse de l'insuline par des cellules pancréatiques du rat RIN-5F. Les molécules les plus actives étaient des alkylamides (butylamide et pentylamide) et des amides de pipéridine et de pyrrolidine [159] (**Schéma 38**).

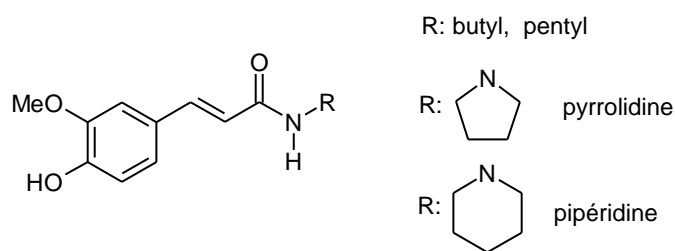


Schéma 38. Structure des molécules de synthèse les plus actives

d) Dérivés d'acide férulique et cancer :

Des investigations sur des alkylférulates ont montré qu'ils possédaient un potentiel anti-carcinogénique [160]. Un dérivé d'acide férulique (férulate d'éthyle) dont l'hydroxyle est acylé par un groupement géranyle a montré un bon potentiel *in vitro* dans certains modèles de cancer du colon [161] (**Schéma 39**).

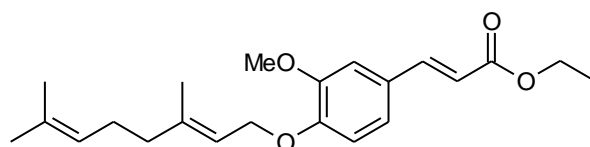
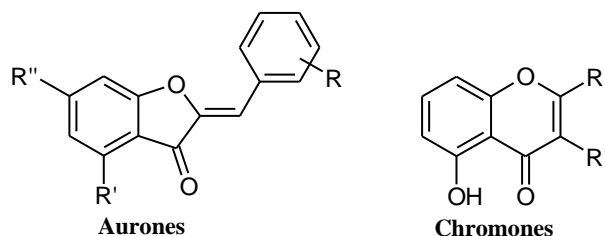
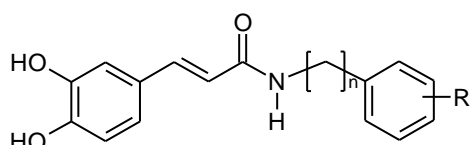


Schéma 39. Férulate d'éthyle géranylé

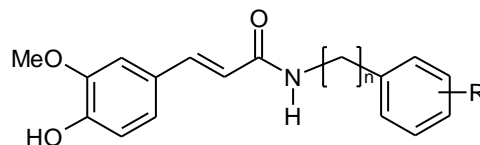
1.5 CONCLUSION

Au cours de notre recherche de nouvelles molécules inhibant la tyrosinase humaine, nous avons choisi de nous intéresser à trois familles de molécules à savoir les aurones, les chromones et les dérivés des acides caféique et férulique (**Schéma 40**). Notre choix s'est porté sur ces familles d'une part parce que certains de leurs représentants peuvent exister à l'état naturel dans les végétaux où ils jouent des rôles importants ; et d'autre part parce elles ont été relativement peu étudiées dans ce domaine.





Dérivés de l'acide caféique (n = 1 ou 2)

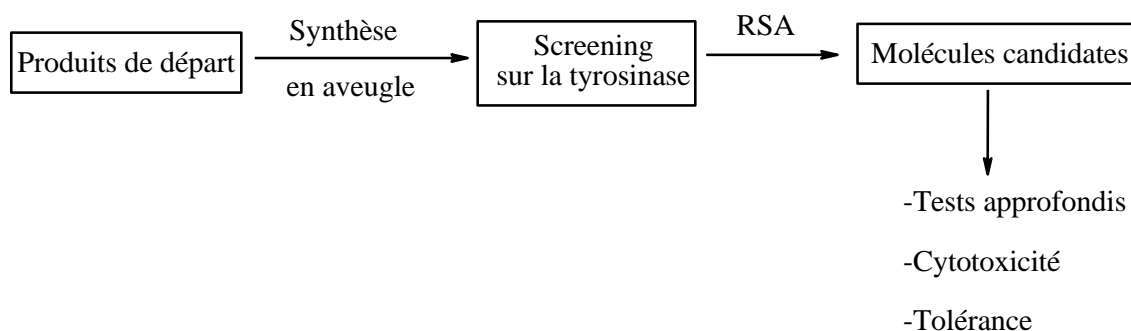


Dérivés de l'acide férulique (n = 1 ou 2)

Schéma 40. Structures générales des molécules ciblées dans notre étude

Nous avons adopté la stratégie suivante pour l'étude de ces trois familles de molécules :

Une première série de molécules sera synthétisée et testée sur notre cible biologique. Ensuite suivant les résultats de ce premier screening, des modifications structurales seront apportées sur les molécules les plus actives, et l'impact de ces dernières sur l'activité sera évalué afin de déterminer les éléments prépondérants pour l'efficacité biologique des molécules synthétisées.



CHAPITRE 2: RESULTATS-DISCUSSION

2.1 CONCEPTION DES MOLECULES CHOISIES POUR ETRE ETUDIEES COMME INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

2.1.1 Choix et conception des aurones

Les aurones ont particulièrement suscité notre intérêt dans ce projet, car elles ont été peu étudiées par rapport aux autres flavonoïdes. Aucune activité antityrosinase les concernant n'a été rapportée contrairement aux flavonols et aux chalcones (inhibition de la tyrosinase de champignon). Comme nous l'avons notifié dans la bibliographie, les aurones peuvent être considérées comme des isomères structuraux de flavones et des produits de cyclisation des chalcones, et donc ayant un fort potentiel comme inhibiteur de la tyrosinase.

Les aurones tout comme les autres flavonoïdes présentent l'avantage d'avoir une diversité structurale au sein des végétaux (hétéroside, dimères), mais comparativement à d'autres flavonoïdes (flavones, flavonols), elles sont présentes en plus faible quantité dans les organismes végétaux. La synthèse organique dans ce cas est d'un grand secours ; elle nous permet d'accéder à un large panel de composés permettant ainsi une étude de leur activité biologique, et des relations de type structure-activité.

Les possibilités de substitution sur le motif aurone étant nombreuses, nous avons décidé de limiter notre étude dans un premier temps aux 4,6-dihydroxyaurones (**Schéma 41**). Ce choix est justifié par le fait que la plupart des aurones naturelles sont hydroxylées sur ces positions. Après évaluation de la première série de molécules, la ou les molécules les plus actives seront soumises à des modifications structurales et l'apport de ces modifications en terme d'activité sera évalué.

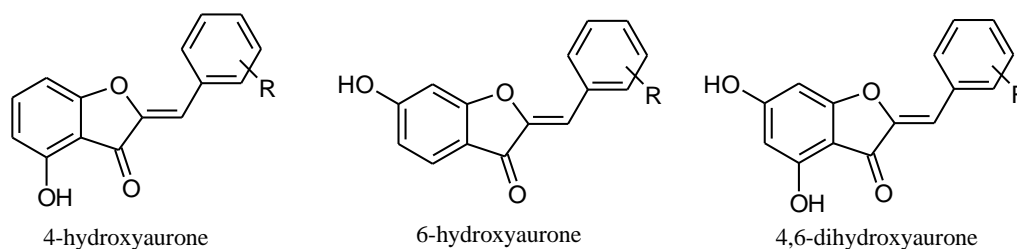


Schéma 41. Structure des aurones à étudier

2.1.2 Choix et conception des chromones

Quelques chromones, plus particulièrement les dérivés isolés de l'*Aloe vera* sont très utilisés en cosmétique sous forme d'extraits végétaux dans des formulations pour application

cutanée. Ces molécules sont moins souvent utilisées sous forme purifiée. L'Aloésine, une chromone naturelle extraite de cette plante a été décrite comme un inhibiteur de la tyrosinase de champignon. Elle exercerait son action par atteinte enzymatique de la conversion du DOPA en Dopachrome. L'utilisation de certaines chromones de synthèse comme inhibiteur de la mélanogénèse a fait l'objet de quelques brevets [162,163].

Dans un premier temps, nous avons ciblé les deux chromones ci-dessous (**Schéma 42**) qui ont été conçues comme des analogues structuraux de l'acide kojique.

Dans un deuxième temps, nous avons décidé de synthétiser des 5-hydroxychromones substituées en 2 par des groupements alkyl de longueur différente et de tester l'influence de ces groupements lipophiles sur l'activité biologique.

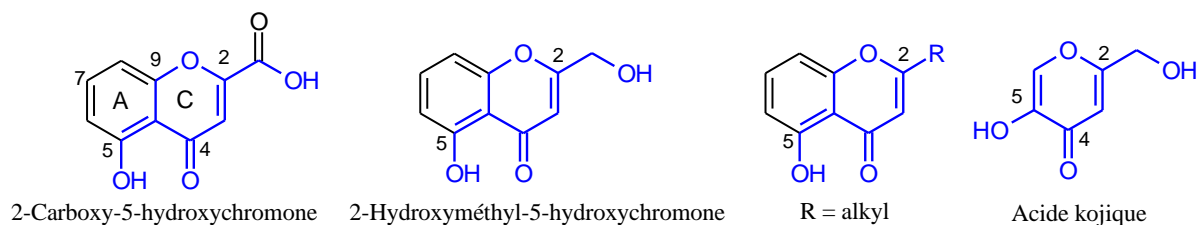


Schéma 42. Analogie structurale des chromones à étudier avec l'acide kojique

2.1.3 Choix et conception des dérivés des acides caféique et férulique

Pulsatilla cernua (Renonculacées) a fait l'objet de plusieurs études dans différents domaines d'activité biologique (antiinflammatoire, antimicrobien [164]). Des extraits méthanoliques de la racine de cette plante ont fait l'objet d'un screening utilisant la tyrosinase de champignon comme cible. Les molécules actives de ces extraits ont été isolées et caractérisées par différentes méthodes d'analyses. Il apparaît que la molécule la plus active est l'acide férulique (acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique). Des dérivés de type amide de l'acide caféique et de la lysine ont aussi montré une inhibition de la tyrosinase de champignon *in vitro* [165]. Récemment, l'inhibition de la mélanogénèse par des amides naturels formés par l'acide férulique ou l'acide *p*-hydroxycinnamique et la sérotonine a été décrite [166]. L'utilisation de certains dérivés des acides caféique et férulique, comme les alkylamides ont fait l'objet de dépôt de brevets par des sociétés de cosmétologie [167,168].

Au cours de notre étude, nous nous sommes aussi intéressés aux amides de ces deux acides (caféique et férulique) et à leur activité sur la tyrosinase. Nous avons voulu vérifier, si

la combinaison de l'acide caféique ou de l'acide férulique avec une phénylalkylamine permet de potentialiser l'activité des acides (**Schéma 43, A**). L'importance de la structure de type acide caféique ou acide férulique sera aussi vérifiée en synthétisant et en évaluant des analogues de type amide mais en utilisant des homologues saturés de l'acide férulique (4-hydroxy-3-méthoxycinnamique) et caféique (3,4-dihydroxycinnamique) ayant un ou deux carbones entre le noyau phényle et la fonction acide (**Schéma 43, B**). L'activité des deux produits de départ permettant la synthèse de ces amides sera aussi évaluée afin de vérifier l'apport respectif des deux parties de la molécule au niveau de l'activité.

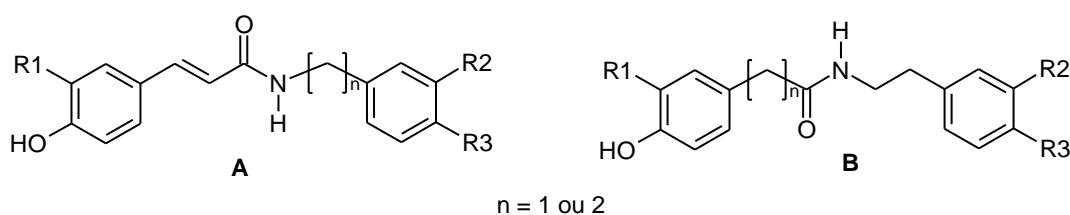


Schéma 43. Dérivés de type amide à étudier

2.1.4 Choix et conception des prodrogues

La découverte de molécules bioactives constitue une étape préliminaire importante à la mise au point d'un produit pharmaceutique ou cosmétique. L'un des problèmes majeurs survenant lors d'une formulation pharmaceutique ou cosmétique est la faible solubilité aqueuse des actifs. Ce problème peut être résolu en utilisant des véhicules non aqueux ou des systèmes de vectorisation. Une autre possibilité permettant de corriger cette faible solubilité aqueuse, consiste à utiliser des prodrogues hydrosolubles des molécules actives. Ces prodrogues seront hydrolysées par des enzymes au niveau de leur cible et libéreront ainsi la molécule active d'origine.

Si nous considérons la structure des molécules synthétisées, nous pouvons déduire qu'elles ont pour la majorité une faible solubilité aqueuse. Les tests biologiques *in vitro* pourront s'effectuer après solubilisation dans le DMSO, mais une faible solubilité aqueuse se révèle souvent être un handicap pour des évaluations biologiques *in vivo* ou pour une éventuelle exploitation industrielle. Pour s'affranchir de ce problème nous avons utilisé l'approche qui consiste à transformer les molécules actives en prodrogues hydrosolubles de type phosphate ou sulfate. Ce concept est de plus en plus utilisé en pharmacie afin de surmonter des problèmes de solubilité [169], de stabilité [170,171], ou encore des problèmes de biodisponibilité réduite qui peuvent être aussi liés à une faible solubilité aqueuse [172]. Les

prodrogues synthétisées peuvent être des esters de type phosphate, cependant les esters de type sulfate trouvent aussi des applications en pharmacie notamment dans le ciblage des cellules tumorales [173] ou d'organes à traiter [174].

De plus, l'utilisation de l'approche prodrogue pour nos molécules, qui sont destinées à être appliquées sur la peau est aussi justifiée par le fait que la peau humaine renferme un certain nombre d'enzymes dont des phosphatases et des sulfatases. Ces enzymes ont été mises en évidence dans l'épiderme au niveau du stratum corneum [175].

Les groupements phosphates et sulfates seront introduits par voie chimique en s'appuyant sur les méthodes développées dans la littérature et l'activité antityrosinase des prodrogues sera évaluée dans les mêmes conditions que les molécules initiales.

2.2 SYNTHÈSE DES AURONES

Pour accéder aux aurones (**Schéma 44**), nous avons choisi d'utiliser une méthode de synthèse récemment mise au point dans notre laboratoire [96]. Cette voie de synthèse utilise un intermédiaire clé dérivé du benzofuran-3(2*H*)-one ; elle possède certains avantages dans le sens où elle permet de synthétiser avec des rendements satisfaisants, des aurones substituées au niveau de différentes positions autant sur le noyau A que sur le noyau B.

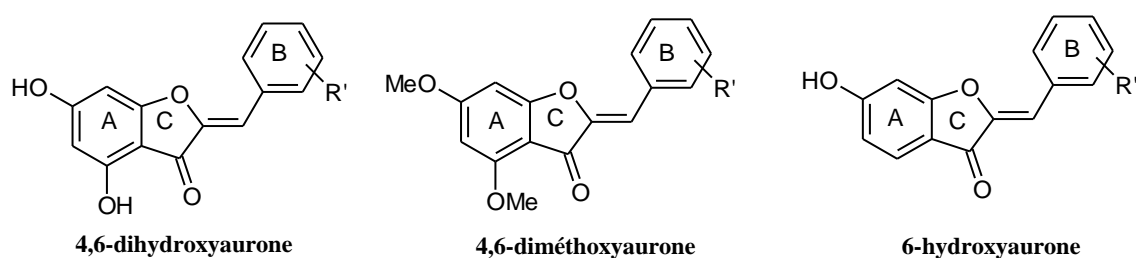


Schéma 44. Structure des aurones à étudier

Toutes les aurones ont été obtenues par condensation aldolique d'un intermédiaire clé de type benzofuran-3(2*H*)-one (**Schéma 45**) avec des benzaldéhydes différemment substitués.

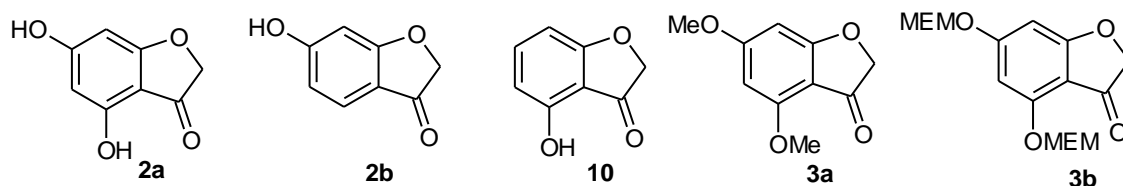
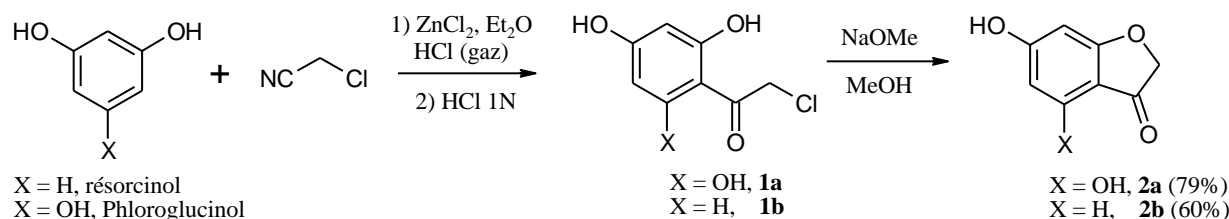


Schéma 45. Structure des synthons précurseurs d'aurones
2.2.1 Synthèse des synthons précurseurs d'aurones

- a) Synthèse de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **2a** et de la 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one **2b**

Les synthons **2a** et **2b** ont été synthétisés en deux étapes : la première est une acylation de type Friedel-Crafts du phloroglucinol et du résorcinol avec le chloroacétonitrile catalysée par un acide de Lewis, le chlorure de zinc. Cette réaction aboutit à la formation d'une imine qui est hydrolysée *in situ* respectivement en 2',4',6'-trihydroxy-2-chloroacétophénone (**1a**) et en 2',4'-dihydroxy-2-chloroacétophénone (**1b**) par une solution molaire d'acide chlorhydrique. Le synthon désiré est obtenu après une réaction de cyclisation en présence du méthylate de sodium comme base.


Schéma 46. Synthèse des synthons 2a et 2b

- b) Synthèse de la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one **3a** et de la 4,6-di-2-méthoxyéthoxyméthylbenzofuran-3(2H)-one **3b**

Des essais de condensation directe du synthon **2a** avec un benzaldéhyde en milieu basique ont été infructueux, même avec des bases plus douces comme la pipéridine dans de l'éthanol. Afin de palier à ce problème, une étape supplémentaire de protection des deux hydroxyles a été introduite pour la synthèse des 4,6-dihydroxyaurones. Les protections utilisées, ont été choisies en fonction des substituants qui seront portés par le noyau B de l'aurone. Ainsi, les deux hydroxyles seront protégés sous forme de méthoxy avec 56% de rendement par action d'iodure de méthyle en présence de carbonate de potassium (K_2CO_3). En revanche, l'obtention des 4'-alkoxy-4,6-dihydroxyaurones, n'est pas compatible avec l'utilisation de groupement protecteur de type méthoxy. Ceci nous a conduit à opter pour un groupement protecteur MEM, labile dans des conditions douces. Les hydroxyles en 4 et 6 de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (**2a**) seront alors protégés avec 41% de rendement par action de chlorure de méthoxyéthoxyméthyle (MEMCl) dans le DMF à température ambiante et en présence de la *N,N'*-diisopropyléthylamine comme base (Schéma 47).

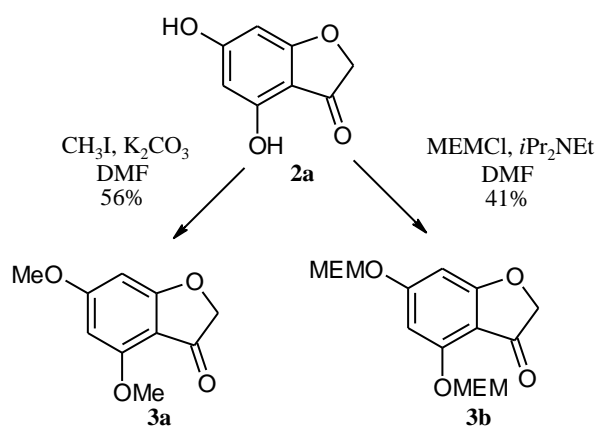


Schéma 47. Synthèse des synthons 3a et 3b

c) Synthèse de la 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one **10**

L'application de la méthode précédemment décrite n'a pas été concluante pour l'obtention de ce composé, nous avons donc eu recours à une autre voie de synthèse (**Schéma 48**).

Dans ce cas, le synthon clé est obtenu au départ de la 2',6'-dihydroxyacétophénone, dont les deux hydroxyles seront protégés sous forme d'acétate (**8**) par action d'anhydride acétique à chaud avec environ 70% de rendement. Une bromation sélective de la position α du carbonyle de l'acétophénone a été ensuite opérée en utilisant le tribromure de triméthylphénylammonium (PTT), un réactif connu pour bromer sélectivement la position ω des acétophénone sans attaquer le cycle aromatique. La bromoacétophénone (**9**) ainsi obtenue est cyclisée en milieu basique (KOH méthanolique) pour conduire à l'intermédiaire désiré (**10**).

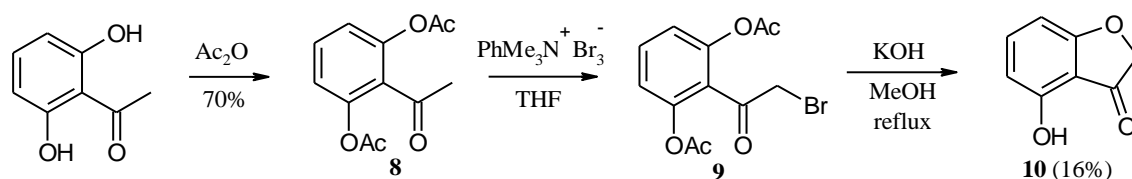


Schéma 48. Synthèse du synthon 10

2.2.2 Synthèse des aures à partir des synthons précurseurs

Dans tous les cas, les aures ont été obtenues par une condensation aldolique de l'intermédiaire clé de type benzofuran-3(2H)-one (**Schéma 45 : 2a, 2b, 3a, 3b et 10**) avec des benzaldéhydes portant différents substituants. Cette condensation est réalisée en milieu

basique (KOH méthanolique à 50%) dans la majorité des cas. Cependant, la synthèse de certaines aurones peut être effectuée par condensation aldolique en milieu acide.

a) Aurones obtenues après condensation aldolique en milieu basique

- 4,6-Dihydroxyaurones et 4-hydroxy-6-méthoxyaurones :

La protection des deux fonctions phénol en 4 et 6 a permis d'accéder après condensation à un grand nombre d'aurones portant différents substituants en 4' ou en 2' sur le noyau B (**Schéma 49**).

Les aurones **4** et **4'** ayant été obtenues, la dernière étape consiste à déprotéger les hydroxyyles. Concernant les 4,6-diméthoxyaurones (**4**), les deux hydroxyyles seront restitués avec de bons rendements après déprotection par le tribromure de bore (BBr_3) en milieu anhydre. L'utilisation du tribromure de bore (BBr_3) est délicate car ce réactif nécessite certaines conditions de conservation (endroit frais et sec) et sa durée de conservation est limitée dans le temps ; cependant contrairement à d'autres réactifs de déprotection comme l'acide bromhydrique ou le chlorure de pyridinium, il permet une déméthylation sélective de l'hydroxyle situé en position 4 (**5**). Cette sélectivité pourrait s'expliquer par une complexation du groupe méthoxy en 4 avec le carbonyle en 3, ce qui facilite la rupture de la liaison O-CH₃. Pour les 4'-alkoxyaurones, l'élimination des groupements MEM a été réalisée en milieu acide.

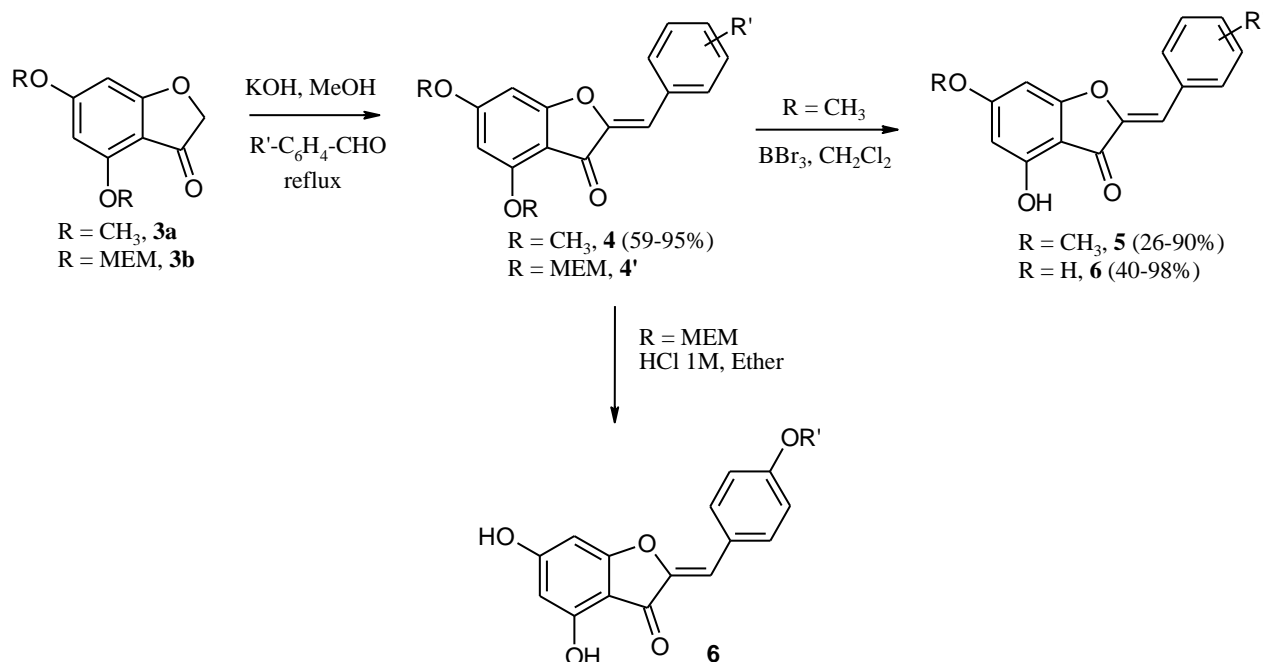


Schéma 49. Synthèse des 4,6-dihydroxyaurones par condensation aldolique en milieu basique

- Les 6-hydroxyaurones et la 4-hydroxyaurone :

Dans le cas des 6-hydroxyaurones et de la 4-hydroxyaurone, la protection de l'hydroxyle en 4 ou en 6 des motifs **2b** et **10** n'est pas nécessaire à l'obtention de la structure aurone (**Schéma 50**).

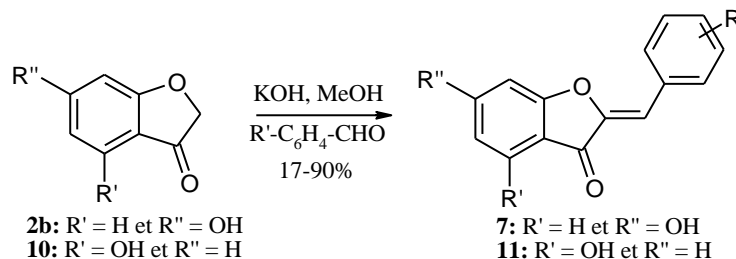


Schéma 50. Obtention des 6 et 4-hydroxyaurones

b) Aurones obtenues après condensation aldolique en milieu acide

Pendant notre étude, nous avons recherché d'autres méthodes de synthèses permettant d'accéder plus rapidement aux molécules de type aurones. Nous avons vu que la condensation de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (**2a**) avec un benzaldéhyde en milieu basique n'aboutit pas à la formation d'une aurone. Nous avons donc mis au point une synthèse, dont la dernière étape de condensation se déroule en milieu acide. Deux aurones hydroxylées en 4 et 6 et substituées en 4' par un fluor (**6r**) ou un hydroxyle (**6b**) ont été préparées avec succès, par condensation de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (**2a**) avec les benzaldéhydes correspondants en présence d'un équivalent d'acide sulfurique dans un solvant protique (MeOH, ou EtOH). Les rendements dans ces deux cas n'excèdent pas 30% (**Schéma 51**). Le même mode opératoire appliqué au même intermédiaire (**2a**) et au benzaldéhyde n'a pas permis d'isoler l'aurone correspondante avec des rendements acceptables (< 5%) et la réaction observée n'est pas complète.

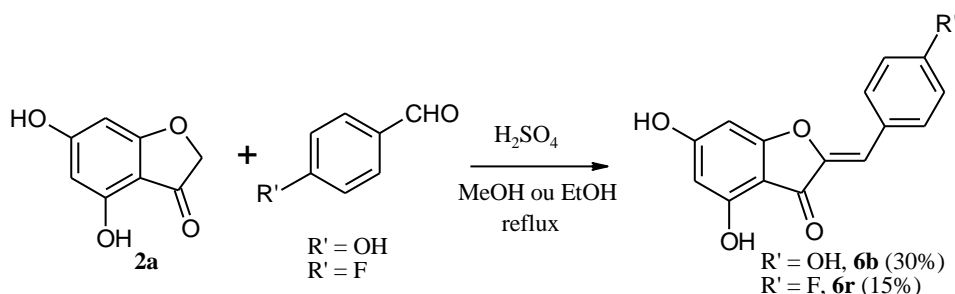
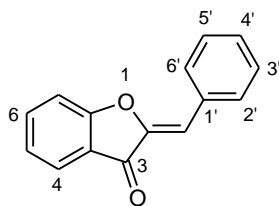


Schéma 51. Synthèse des aurones par condensation aldolique en milieu acide

Enfin, il est à signaler que la méthode de synthèse adoptée n'a fourni que des aurones dans lesquelles, la configuration de la double liaison exocyclique est de type Z, comme il a été

confirmé par RMN ^1H (δ entre 6,5 et 7 ppm). Notons aussi que la quasi-totalité des aurones naturelles répertoriées sont de configuration *Z*.

Les différentes aurones synthétisées par condensation aldolique de l'intermédiaire de type benzofuran-3(2*H*)-one avec un benzaldéhyde, et soumises à une évaluation biologique sont représentées dans le tableau ci-dessous :



| Référence | Substituants | | | | |
|-----------|--------------|-----|--------------------|-----|--------------------|
| | 4 | 6 | 2' | 3' | 4' |
| 4a | OMe | OMe | H | H | H |
| 4b | OMe | OMe | H | H | OH |
| 4c | OMe | OMe | H | H | Et |
| 4d | OMe | OMe | H | H | SMe |
| 4e | OMe | OMe | H | H | CN |
| 4f | OMe | OMe | SO ₃ Na | H | H |
| 4g | OMe | OMe | SO ₃ Na | H | SO ₃ Na |
| 5a | OH | OMe | H | H | H |
| 5d | OH | OMe | H | H | SMe |
| 5e | OH | OMe | H | H | CN |
| 6a | OH | OH | H | H | H |
| 6b | OH | OH | H | H | OH |
| 6c | OH | OH | H | H | Et |
| 6f | OH | OH | SO ₃ Na | H | H |
| 6h | OH | OH | H | H | Me |
| 6i | OH | OH | H | H | <i>i</i> Pr |
| 6j | OH | OH | H | H | <i>t</i> Bu |
| 6k | OH | OH | H | H | Pr |
| 6l | OH | OH | H | H | Bu |
| 6m | OH | OH | Et | H | H |
| 6n | OH | OH | H | H | OMe |
| 6o | OH | OH | H | H | OEt |
| 6p | OH | OH | H | OMe | OH |
| 6q | OH | OH | OH | H | H |
| 6r | OH | OH | H | H | F |
| 7a | H | OH | H | H | H |
| 7b | H | OH | H | H | OH |
| 7c | H | OH | H | H | Et |
| 7m | H | OH | Et | H | H |
| 11 | OH | H | H | H | OH |
| 12 | H | H | H | H | OH |

Tableau IV. Aurones synthétisées

2.3 SYNTHÈSE DES CHROMONES

Dans cette série, les deux molécules ayant suscité notre intérêt, la 2-carboxy-5-hydroxychromone (**16**) et la 2-hydroxyméthyl-5-hydroxychromone (**18**) sont obtenues à partir de l'ester de chromone (**14**). Ce dernier est synthétisé en 2 étapes à partir de la 2',6'-dihydroxyacétophénone qui est monométhylée en 2' à 89% (**13**) par action d'iodure de méthyle en milieu basique et ensuite condensée avec l'oxalate d'éthyle dans l'éthanol, en présence d'éthanolate de sodium. La réaction de **13** avec l'oxalate d'éthyle conduit successivement à deux intermédiaires qui ne sont pas isolés et aboutit à l'ester **14**. Celui-ci sera transformé en acide **15** et en alcool **17** respectivement par saponification et par réduction de la fonction ester en position 2 par le borohydure de sodium dans du méthanol à reflux (**Schéma 52**)

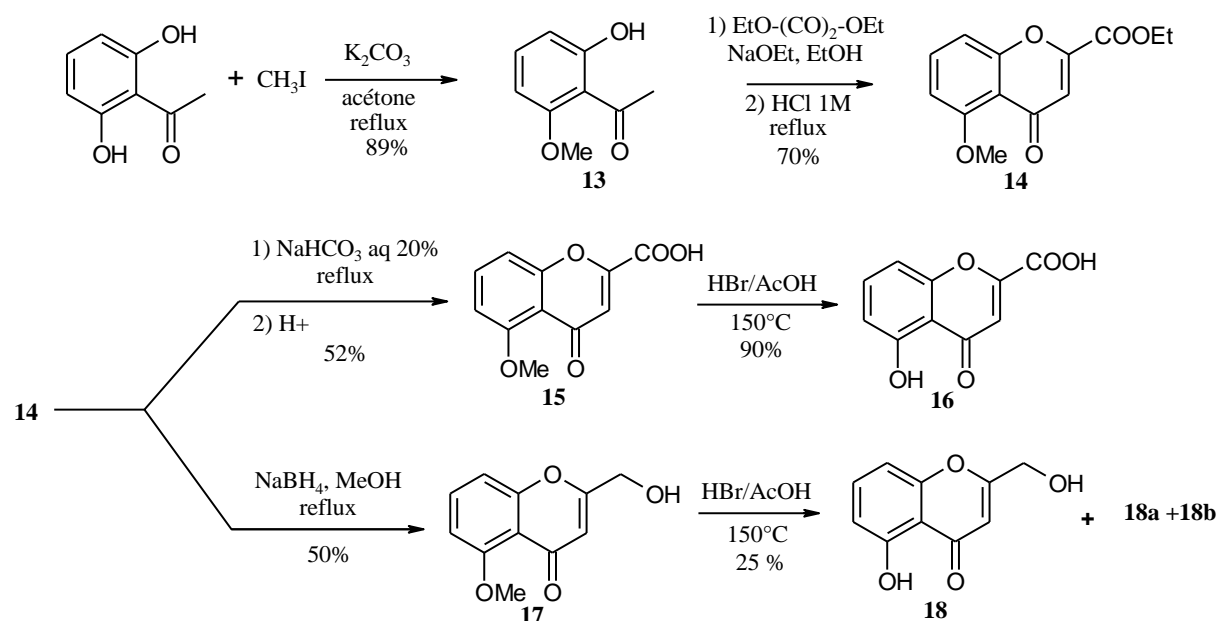


Schéma 52. Méthode de synthèse des chromones 16 et 18

La dernière étape de synthèse conduisant aux deux molécules désirées (**16** et **18**), est une déméthylation de l'hydroxyle en 5 en milieu acide fort. La déméthylation de l'acide (**15**) s'effectue avec un bon rendement (90%), alors que dans le cas de l'alcool (**17**), nous n'avons que 25% de rendement. Il est à noter que l'alcool déprotégé (**18**), est isolé sous la forme de deux conformères (**18**) et (**18a**) identifiés par RMN du proton et par spectrométrie de masse. La présence du conformère **18a** (**Schéma 53**) serait liée à l'existence d'une liaison hydrogène

intramoléculaire entre l'hydroxyle en 5 et la fonction cétone en 4. Le faible rendement obtenu avec le produit (**18**), est aussi dû au fait que la réaction conduit à la formation d'un ester (**18b**) provenant de la réaction de l'acide acétique avec la fonction alcool en 2.

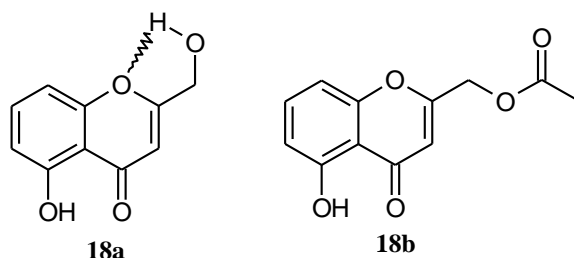


Schéma 53. Conformère et produit secondaire issus de la déprotection de la chromone

17

Dans un second temps, nous avons entrepris de diversifier les structures en greffant une chaîne alkyle en 2, et d'étudier l'apport de ces modifications en terme d'activité. Ces molécules ont été obtenues par une méthode originale qui nécessite une seule étape de synthèse par condensation à reflux de la 2',6'-dihydroxyacétophénone avec un chlorure d'acide en présence d'un large excès de base (5 éq. de K_2CO_3) dans de l'acétone. Cette méthode de synthèse a déjà été employée avec succès pour la synthèse des 5-hydroxyflavones [176]. Dans notre cas, cette réaction conduit à la formation de deux produits : la 2-alkyl-5-hydroxychromone qui est le produit attendu et une 2-alkyl-3-alcyl-5-hydroxychromone inattendue et majoritaire (**Schéma 54**). Ces deux produits sont séparables par chromatographie sur colonne de gel de silice et sont parfaitement identifiables en RMN 1H . Sur le spectre du produit dialkylé, il n'y a plus de signal correspondant au proton en position 3 ; ces résultats ont été appuyés par la spectrométrie de masse.

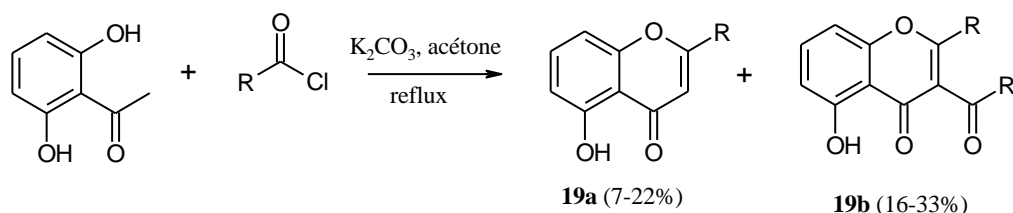


Schéma 54. Méthode d'obtention des chromones alkylées

Du point de vue mécanistique, lorsque la 2',6'-dihydroxyacétophénone est traitée avec du K_2CO_3 et un équivalent de chlorure d'acide, il y a d'abord une première étape d'estérification de la fonction phénol en 2'. Ensuite, il y a deux évolutions possibles pour l'ester formé :

- dans le cas des 2-alkyl-5-hydroxychromones, il y a une déprotonation en α de la fonction cétone, et attaque de l'anion formé sur le carbonyle de l'ester ; la dicétone formée est en équilibre avec la forme cyclisée, et une déshydratation va conduire au produit attendu (**Schéma 55**).

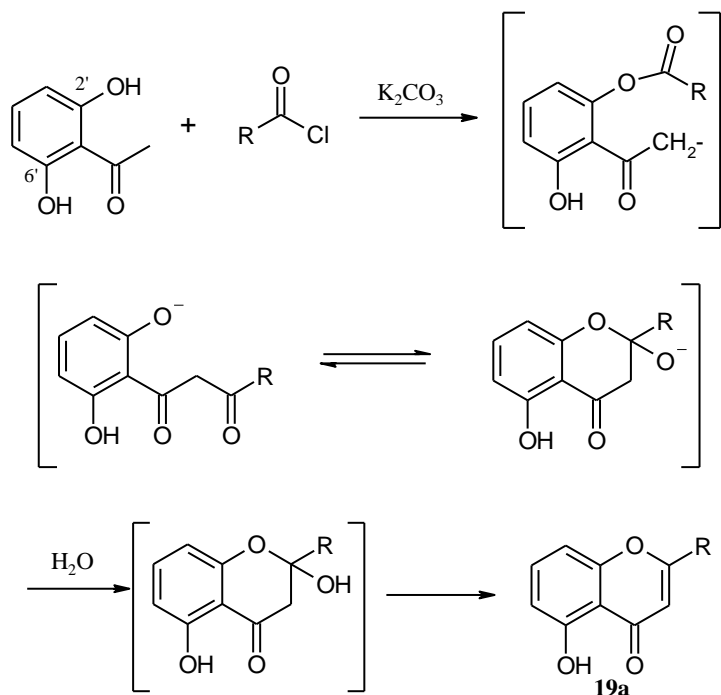


Schéma 55. Mécanisme d'obtention des 2-alkylchromones

- pour les 2-alkyl-3-alcyl-5-hydroxychromones, après formation de la dicétone, il y a une deuxième estérification de la fonction phénol en 2', ensuite déprotonation du proton situé entre les deux fonctions cétones et attaque de l'anion formé sur le carbonyle de l'ester (**Schéma 56**).

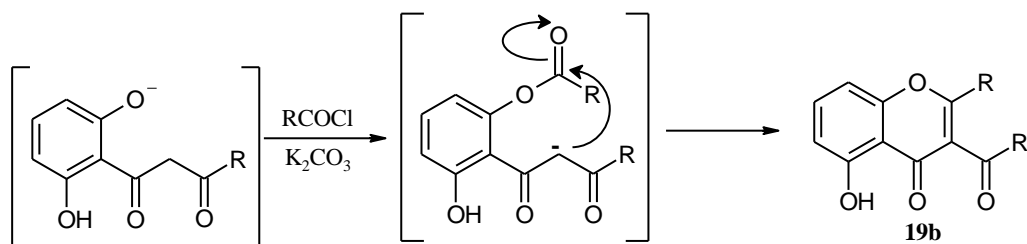


Schéma 56. Mécanisme d'obtention des 2-alkyl-3-alcylchromones

Les différentes chromones alkylées, préparées par la méthode décrite ci-dessus sont récapitulées dans le tableau suivant :

| Référence | R | Rendement total a+b (%) | Ratio a/b |
|-----------|--------|----------------------------|-----------|
| 19 | Pentyl | 46 | 1/1 |
| 20 | Hexyl | 34 | 4/5 |
| 21 | Octyl | 40 | 1/5 |
| 22 | Décyl | 29 | 4/5 |

Tableau V. Chromones alkylées

2.4 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DES ACIDES CAFÉIQUES ET FÉRULIQUES

Tous les dérivés de type amide ont été préparés par une réaction de couplage peptidique entre un acide et une amine. Des essais de couplage avec comme réactif l'EDCI n'ont permis d'isoler que deux amides et il s'est avéré que l'utilisation de ce réactif nécessite une protection des fonctions phénols situées sur l'acide et l'amine. Pour éviter ces étapes supplémentaires de protection et déprotection, nous avons choisi d'utiliser comme agent de couplage peptidique le BOP qui nous a permis d'accéder aux amides désirés (**Tableau VI**) en une seule étape avec d'assez bons rendements (**Schéma 57**).

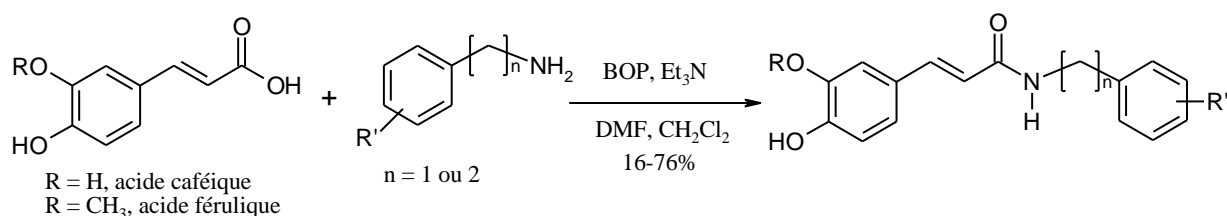
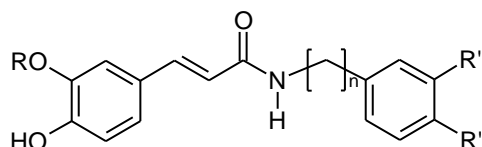


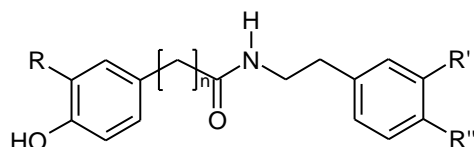
Schéma 57. Synthèse des amides des acides caféique et férulique



| Référence | R | R' | R'' | n |
|-----------|----|-----|-----|---|
| 23 | H | H | H | 2 |
| 24 | Me | H | H | 2 |
| 25 | Me | H | OH | 2 |
| 26 | H | H | OH | 2 |
| 27 | H | OH | OH | 2 |
| 28 | Me | OMe | OH | 1 |
| 29 | H | OMe | OH | 1 |
| 30 | H | OMe | OMe | 2 |
| 31 | Me | OH | OH | 2 |
| 32 | Me | OMe | OMe | 2 |

Tableau VI. Amides des acides caféique et férulique

En vue d'établir une étude de relation structure activité et en suivant le schéma de synthèse **57**, nous avons réalisé la synthèse d'une série d'amides dérivant d'un acide phénylcanoïque et d'une phényléthylamine.



| Référence | R | R' | R'' | n |
|-----------|-----|----|-----|---|
| 33 | OMe | H | OH | 1 |
| 34 | OMe | OH | OH | 1 |
| 35 | OH | H | OH | 1 |
| 36 | OMe | H | OH | 2 |
| 37 | OH | H | OH | 2 |
| 38 | OMe | OH | OH | 2 |
| 39 | H | H | OH | 2 |

Tableau VII. Molécules permettant d'établir une relation structure-activité

Toujours dans la perspective d'établir des relations structure-activité de petites molécules ayant une structure proche de la tyramine, amine de départ de certains composés (**25**, **26**) et du tyrosol (alcool homologue de la tyramine) ont été préparées selon les protocoles adéquats. La chaîne aliphatique entre le noyau phénol et la fonction alcool initiale du tyrosol a été rallongée de deux à quatre carbones. La fonction alcool a été remplacée dans un premier

temps par une fonction isostère, la fonction thiol [2-(4-hydroxyphényl)éthanethiol] et ensuite par un groupement électroattracteur volumineux le brome [4-(2-bromoéthyl)phénol].

Le 2-(4-hydroxyphényl)éthanethiol peut être préparé par conversion de la fonction alcool en thiol *via* un intermédiaire de type tosylate (**Schéma 58**)[177]. Le groupement tosylo sera déplacé par la thiourée pour conduire à la formation du produit désiré (**43**).

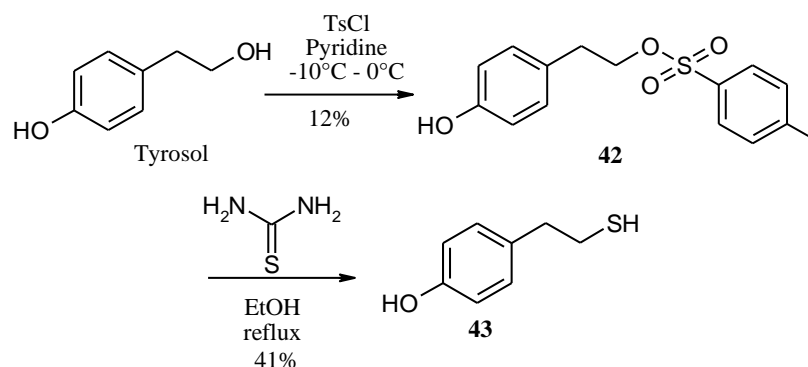


Schéma 58. Synthèse de la 2-(4-hydroxyphényl)éthanethiol

Le 3-(4-hydroxyphényl)propan-2-énol (un carbone en plus par rapport au tyrosol) et le 4-(4-hydroxyphényl)butanol (deux carbones en plus) ont été synthétisés selon le même protocole. Ils ont été obtenus après réduction de l'ester correspondant, ester préalablement synthétisé à partir de l'acide correspondant (**Schéma 59**).

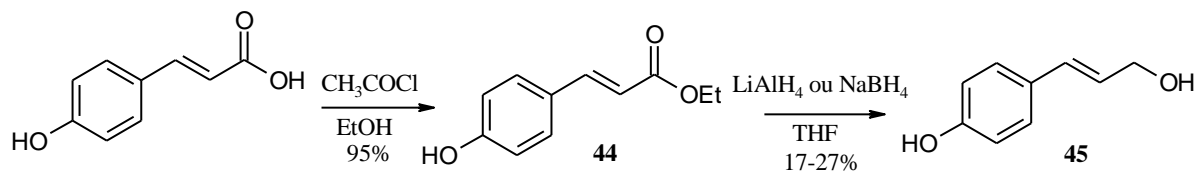


Schéma 59. Obtention du 3-(4-hydroxyphényl)propan-2-énol

Le dernier composé le 4-(2-bromoéthyl)phénol a été obtenu en une étape à partir de la 2-(4-méthoxyphényl)éthanol par action de l'acide bromhydrique avec 40% de rendement.

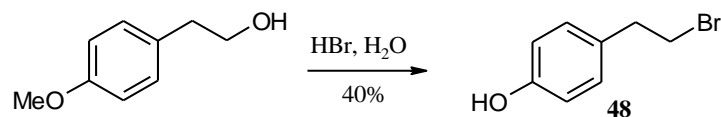


Schéma 60. Obtention du 4-(2-bromoéthyl)phénol

2.5 SYNTHÈSE DES PRODRUGES DE TYPE PHOSPHATE ET SULFATE

2.5.1 Synthèse des prodrogues de type phosphate

Différentes synthèses de prodrogues de molécules bioactives de type phosphate hydrosolubles sont décrites dans la littérature. Ces synthèses se font pour la plupart en deux étapes ; une première étape d'introduction du groupement phosphate sous forme de triester et une deuxième étape de déprotection des triesters de phosphate en monoester de phosphate. Les groupements phosphates peuvent être introduits à l'aide de différents agents de phosphorylation.

L'une des premières méthodes de phosphorylation décrite dans la littérature, consistait à phosphoryler une fonction phénol avec un mélange d'acide phosphorique et de pentoxyde de phosphore [178]. Le chlorure de trioxyde de phosphore (POCl_3) peut aussi être utilisé dans de la pyridine [179]. Le groupement phosphate peut également être introduit en utilisant du triméthylphosphate ($\text{OP}(\text{OMe})_3$) [180].

L'agent de phosphorylation le plus souvent choisi est le Di-*tert*-butyl *N,N*-diéthylphosphoramidite car il possède une bonne stabilité et une bonne réactivité [181]. Après activation par le 1*H*-tétrazole, il réagit rapidement avec une fonction hydroxyle et une oxydation *in situ* conduit à la formation du groupement phosphate protégé sous forme de triester. Une déprotection des deux groupements esters par de l'acide trifluoroacétique conduit à la formation du monoester d'acide phosphorique (**Schéma 61**). Il est aussi possible d'utiliser une méthode permettant de générer un triester de dialkylphosphate via une phosphorylation oxydative médiée par le tétrachlorure de carbone et à l'aide d'un dialkylphosphonate approprié (**Schéma 61**). Le triester généré pourra ensuite être déprotégé en monoester dans les conditions adéquates [182].

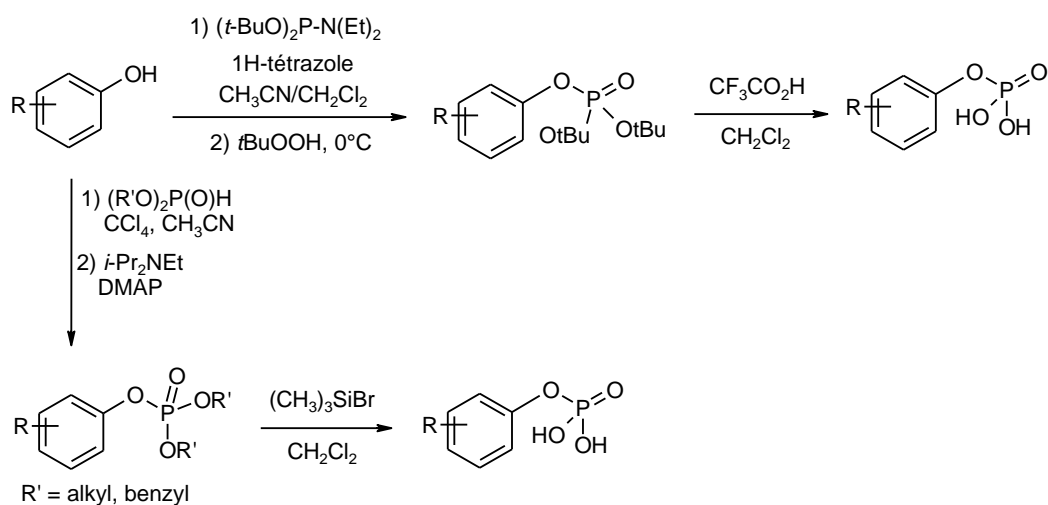


Schéma 61. Phosphatation d'un phénol

Récemment, l'utilisation du diéthylchlorophosphate a permis de phosphoryler des phénols avec succès. Cette réaction peut se dérouler en présence de différentes bases comme la triéthylamine ou l'hydrure de sodium [183,172]. Nous avons choisi d'utiliser cet agent de phosphorylation. Les groupements phosphates sont alors introduits avec environ 40% de rendement en milieu anhydre en présence d'une base qui est ici l'hydrure de sodium. Les groupements éthyl sont ensuite déplacés par action de bromure de triméthylsilyle en milieu anhydre (**Schéma 62**).

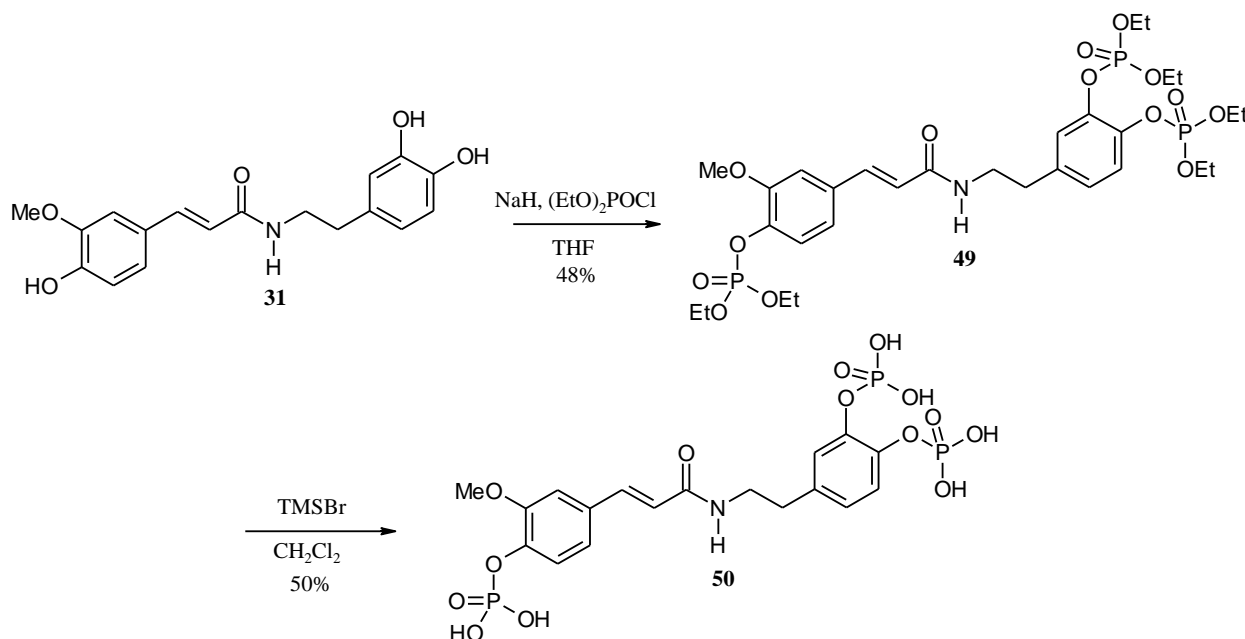


Schéma 62. Procédure de phosphorylation utilisée

Nous avons travaillé avec un excès de diéthylchlorophosphate afin de phosphoryler toutes les fonctions phénol. Une phosphorylation sélective d'une ou deux fonctions phénol, serait difficile à contrôler et nous obligerait à utiliser des protections sélectives des phénols à ne pas phosphoryler, ce qui s'avère assez difficile. Dans les cas que nous avons étudiés, les rendements globaux de phosphorylation varient de 20 à 40%.

- Caractéristiques spectrales des molécules phosphorylées :

L'obtention de ces dérivés a été confirmée par spectrométrie de masse et par RMN ¹H et en RMN ³¹P. Les produits finaux sont caractérisés :

- en RMN ¹H par des doublets et doublets dédoublés aromatiques dont deux doublets caractéristiques avec une constante de couplage d'environ 15 Hz correspondant aux protons de la double liaison de type E ; un singulet large correspondant au proton de l'azote de la fonction amide. Enfin on peut remarquer un déblindage des signaux situés en *ortho* des groupements phosphate, par rapport aux amides de départ.

- en RMN ^{31}P par un nombre de signal équivalent au nombre de groupements phosphates introduits.

2.5.2 Synthèse des prodrogues de type sulfate

Parmi les réactions de sulfatation, il est possible de distinguer des *C*-sulfatations et des *O*-sulfatations.

La réaction de *C*-sulfatation la plus connue est l'oxydation d'Elbs par des anions peroxydisulfates. Cette oxydation est la réaction d'un anion phénolate avec des ions peroxydisulfates pour former un mélange de *ortho* et *para*-sulfate du phénol initial [184].

La majorité des réactions de sulfatation développées sont des réactions de *O*-sulfatation d'alcool ou de phénol. Parmi les procédures de sulfatation de composés phénoliques, l'acide sulfamique a été très utilisé pour la synthèse des flavonoïdes sulfatés. Quand il s'agit de flavonoïdes polyhydroxylés, cette méthode conduit à un mélange complexe de molécules sulfatées à différents degrés, difficilement séparables.

Toujours dans le domaine de la synthèse des flavonoïdes sulfatés, Denis Barron et ses collaborateurs [185] ont utilisé du sulfate d'hydrogène de tétrabutylammonium (TBAHS) pour remplacer l'acide sulfurique en tant qu'agent de sulfatation en présence de DCC. Cette méthode a permis la synthèse de différents flavonoïdes sulfatés avec d'assez bons rendements qui ont pu être isolés et caractérisés par différentes méthodes d'analyse.

Des adduits de trioxyde de soufre font partie des réactifs de sulfatation les plus utilisés. Dans ces réactifs, le trioxyde de soufre est complexé avec la pyridine [186,187,188], le DMF [189] ou avec une amine tertiaire comme la triéthylamine [190]. Enfin, il est possible d'utiliser une autre alternative de sulfatation, en utilisant comme réactif de sulfatation l'acide chlorosulfonique dans de la pyridine [191,192].

Nous avons dans un premier temps essayé de mettre au point une méthode de sulfatation, en s'appuyant sur des travaux développés par D. Barron et ses collaborateurs [185] (**Schéma 63**). Des essais ont été effectués sur la chrysine, en utilisant un mélange de DCC et TBAH (sulfate d'hydrogène de tétrabutylammonium). Nous n'avons obtenu que des mélanges de produits sulfatés difficilement séparables.

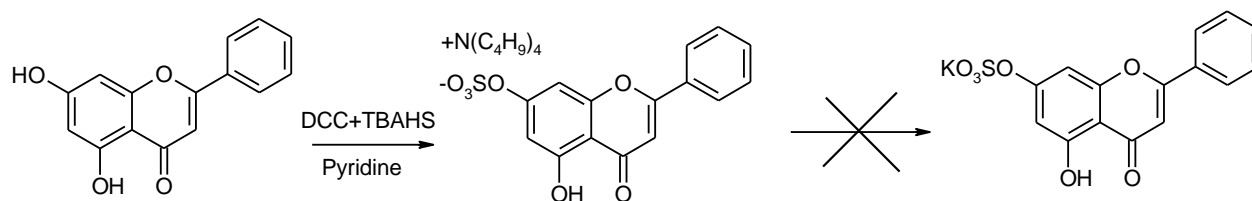


Schéma 63. Essai de sulfatation de la chryisine

Nous avons donc eu recours à une autre méthode de sulfatation et notre choix concernant le réactif de sulfatation s'est porté sur le complexe de pyridine et de trioxyde de soufre utilisé dans du DMF anhydre. La sulfatation a lieu en une seule étape (**Schéma 64**), et les fonctions sulfates sont salifiées en fin de réaction par adjonction d'une solution aqueuse de bicarbonate de soude. Nous avons sulfaté par cette méthode des dérivés d'acide caféique et férulique. L'aurone (**6b**) a été également sulfatée selon le même principe ; dans ce dernier cas, le réactif de sulfatation a été généré *in situ* à partir de l'acide chlorosulfonique et de la pyridine qui sert également de solvant.

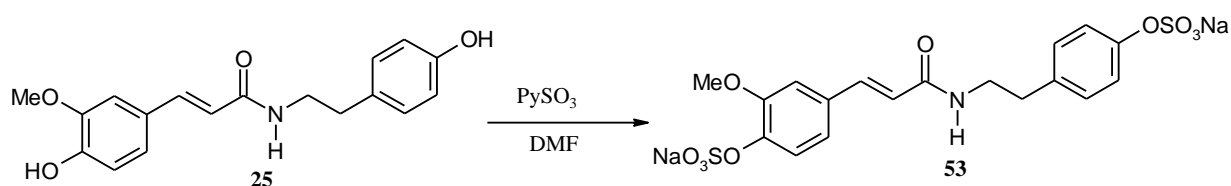


Schéma 64. Procédure de sulfatation utilisée

Les produits synthétisés ont été purifiés par chromatographie en phase inverse, en utilisant l'eau comme éluant. Les rendements de synthèses n'ont pu être exactement calculés, car le bicarbonate de soude utilisé en excès lors de la formation des sels est aussi entraîné par l'éluant (eau) de la colonne C18.

- Caractéristiques spectrales des molécules sulfatées :

Les caractéristiques spectrales de ces molécules sont les mêmes que celles des produits de départ (aurone et amides) en RMN et en infra-rouge, mais nous pouvons remarquer en RMN ^1H , un déblindage des signaux des protons situés en *ortho* des groupements sulfates d'au moins 0,5 ppm.

2.6 EVALUATION BIOLOGIQUE DES MOLECULES SYNTHETISEES

L'activité inhibitrice de la tyrosinase des molécules synthétisées et de certains intermédiaires, sera évaluée *in vitro* dans différents modèles : à savoir sur la tyrosinase de champignon et sur la tyrosinase humaine issue de mélanocytes humains normaux cultivés en monocouche. Ces différents modèles permettent d'étudier spécifiquement l'activité des molécules sur des enzymes d'origines différentes plus ou moins proches du vivant.

Il est aisé de travailler avec une tyrosinase de champignon dans la mesure où cette enzyme est disponible commercialement. Cependant, cette enzyme isolée reste éloignée de l'enzyme rencontrée *in vivo*.

La tyrosinase humaine n'étant pas disponible commercialement, nous avons développé deux modèles : un modèle utilisant un extrait mélanocytaire humain normal, permettant d'étudier l'inhibition de la tyrosinase humaine par contact direct avec les molécules testées et un modèle de culture de cellules en monocouche afin de pouvoir étudier l'inhibition de la tyrosinase du mélanocyte après application du produit dans le milieu de culture pendant 24 heures.

Les mélanocytes sont obtenus à partir de plasties abdominales issues de différents donneurs et des banques de donneurs peuvent être réalisées afin de classer ces donneurs selon leur âge ou encore selon leur phototype. En effet, il peut être pertinent de tester l'efficacité de nos molécules sur l'inhibition de la tyrosinase issue de donneurs de phototype clair, brun et négroïde.

Avant d'étudier l'activité inhibitrice sur mélanocytes humains normaux, une étude de cytotoxicité des molécules est réalisée afin de déterminer les concentrations à étudier. Ceci permettra d'éliminer les concentrations auxquelles les molécules pourraient exercer non pas une inhibition spécifique mais aspécifique en entraînant une mort du mélanocyte.

2.6.1 Principe de l'étude de la cytotoxicité

La cytotoxicité de nos molécules est étudiée sur des mélanocytes humains normaux cultivés en plaque 24 puits, par un dosage au PNPP (*p*-nitrophényl phosphate), substance transformée en *p*-nitrophénol par les phosphatases acides intracellulaires des mélanocytes viables. L'absorbance du *p*-nitrophénol à 405 nm est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

Une molécule sera considérée comme toxique si le pourcentage de viabilité des mélanocytes après traitement est inférieur à 75% du nombre de cellules des témoins négatifs (non traités).

2.6.2 Principe des dosages de l'activité de la tyrosinase

- Sur enzyme isolée issue de champignon [193]

La tyrosinase catalyse la formation de la L-dopaquinone puis du dopachrome à partir de la L-Dopa. Or le dopachrome est un composé coloré quantifiable par spectrophotométrie visible à 490 nm. L'utilisation d'un actif capable de modifier l'activité enzymatique va se traduire par une variation de la densité optique à 490 nm.

Le rapport des vitesses de formation du dopachrome permet de déterminer de façon précise les activations ou les inhibitions obtenues avec les différentes molécules testées. Le témoin positif utilisé est l'acide kojique (Sigma) à 0,001% ($7 \cdot 10^{-5}M$) et l'inhibition mesurée est de $55 \pm 5-10\%$.

- Sur enzyme isolée issue de mélanocytes humains normaux

La tyrosinase humaine obtenue à partir d'extraits mélanocytaires issus d'une culture primaire en monocouche de mélanocytes de donneurs sains, catalyse la formation de la L-Dopaquinone à partir de la L-Dopa. Or, la L-Dopaquinone peut être quantifiée par spectrophotométrie visible à 490 nm grâce à un chromogène : la 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH). Ce réactif piège les *o*-quinones synthétisées par la tyrosinase pour donner un composé MBTH-*o*-quinone stable et soluble possédant une densité optique molaire élevée à 490 nm [194].

Ainsi, l'utilisation d'un actif capable de modifier l'activité enzymatique va se traduire par une variation de la DO à 490 nm comparativement à celle obtenue dans le témoin négatif (100% d'activité). Le témoin positif utilisé est l'acide kojique à 0,01% ($60\% \pm 5\%$).

- Sur culture de mélanocytes humains normaux en monocouche [195]

Les mélanocytes humains normaux (issus de plastie abdominale) sontensemencés en plaque 24 puits à raison de 80000 cellules par puits. Ils sont cultivés jusqu'à confluence et les actifs sont appliqués pendant 24 heures dans les milieux de culture. Après 24 heures, les milieux sont éliminés et les mélanocytes sont décrochés par action mécanique. Une extraction douce de la tyrosinase est réalisée et les surnageants récupérés sont incubés avec le MBTH et la L-Dopa.

Le pourcentage d'inhibition de la tyrosinase est calculé d'après la formule suivante :

$$100 - \left[\frac{DOe / Pe}{DOT- / PT-} \times 100 \right]$$

DOe : DO de l'échantillon

DOT- : DO du témoin négatif

Pe : taux de protéine de l'échantillon

PT- : taux de protéine du témoin négatif (*les DO et les taux de protéine des témoins négatifs sont des moyennes de trois mesures*)

Chaque échantillon est testé en triplicat, avec pour chaque triplicat un contrôle. Le témoin positif par expérience est l'acide kojique appliqué à 0,01% ($7 \cdot 10^{-4}$ M) sur les mélanocytes et l'inhibition mesurée est de l'ordre de $20 \pm 5\%$.

Un dosage supplémentaire, celui du taux des protéines est introduit au cours de ce test. Ce dosage permet de vérifier que l'inhibition observée n'est pas due à une action cytotoxique des échantillons. Le pourcentage d'inhibition sera pris en compte lorsque le taux de protéines après traitement sera supérieur à 75% du taux de protéines du témoin négatif.

L'évaluation du taux des protéines est réalisé sur les milieux de culture, en exploitant la capacité des protéines à réduire le cuivre (II) en cuivre (I) au cours d'une réaction qui est concentration-dépendante. L'acide Bicinchoninique est un réactif chromogène spécifique du cuivre (I) formant avec celui-ci un complexe pourpre ayant une absorbance maximale à 562 nm qui est directement proportionnelle à la concentration de protéines.

2.7 ANALYSE DES RESULTATS ET ELEMENTS DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE

Pour toutes les molécules testées, les résultats sont exprimés sous la forme d'un pourcentage d'inhibition de la tyrosinase qui est une moyenne de trois mesures suivie de l'écart type.

2.7.1 Effets des aurones sur l'activité de la tyrosinase

Après une évaluation de leur cytotoxicité sur une culture de mélanocytes humains normaux, seules trois aurones (**4c**, **5d** et **6c**) ont montré une cytotoxicité sur 24 heures à 100 μ M (**Tableau VIII**). Elles ne seront donc pas testées à cette concentration dans le modèle utilisant les mélanocytes cultivés en monocouche.

Résultats-Discussion

| Référence | Viabilité à 100 μ M | Viabilité à 10 μ M |
|-----------|-------------------------|------------------------|
| 4a | 83,1 \pm 0,1 | 98,5 \pm 0,2 |
| 4b | 104,5 \pm 0,1 | 91 \pm 0,15 |
| 4c | 14 \pm 0,01 | 100 \pm 0,05 |
| 4d | 80 \pm 0,1 | 136 \pm 0,1 |
| 4e | 99 \pm 0,1 | 96,5 \pm 0,15 |
| 5a | 104,5 \pm 0,04 | 91 \pm 0,05 |
| 5d | 21 \pm 0,05 | 116 \pm 0,15 |
| 5e | 86 \pm 0,2 | 119 \pm 0,2 |
| 6b | 90,5 \pm 0,1 | 128,5 \pm 0,1 |
| 6c | 63,5 \pm 0,1 | 143 \pm 0,1 |

Tableau VIII. Pourcentages de viabilité obtenus pour quelques dérivés d'aurones sur une culture de mélanocytes humains normaux.

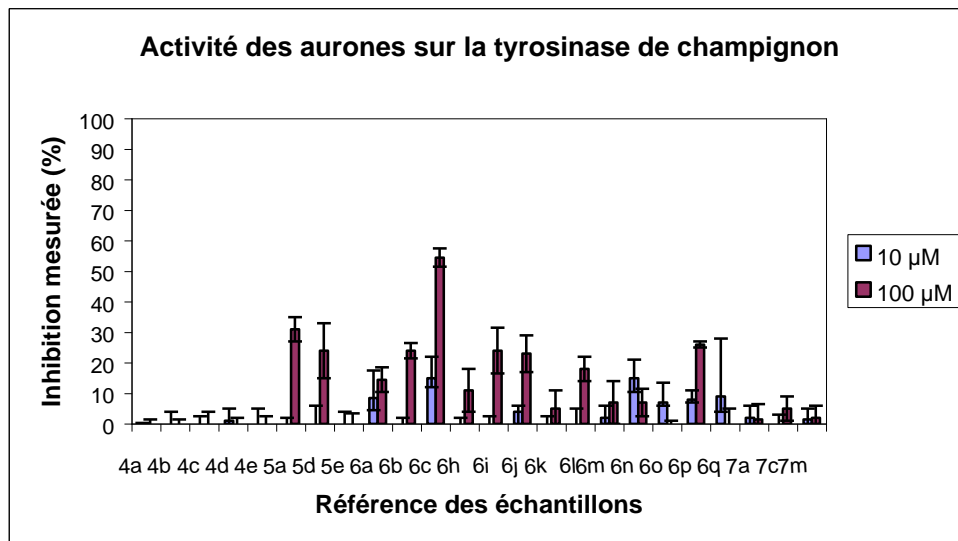
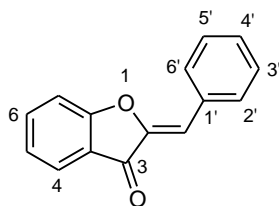


Figure 1. Inhibitions de la tyrosinase de champignon obtenues avec les aures

2.7.1.1 Effets des molécules testées sur la tyrosinase de champignon



| Référence | Substituants | | | | | % d'inhibition | |
|-----------------|--------------|-----|----|-----|-------------|----------------|--------------|
| | 4 | 6 | 2' | 3' | 4' | 10 μ M | 100 μ M |
| 4a | OMe | OMe | H | H | H | 0 \pm 0,3 | 0 \pm 1,5 |
| 4b | OMe | OMe | H | H | OH | 0 \pm 4 | 0 \pm 1,5 |
| 4c | OMe | OMe | H | H | Et | 0 \pm 2,5 | 0 \pm 4 |
| 4d | OMe | OMe | H | H | SMe | 1 \pm 4 | 0 \pm 2 |
| 4e | OMe | OMe | H | H | CN | 0 \pm 5 | 0 \pm 2,5 |
| 5a | OH | OMe | H | H | H | 0 \pm 2 | 31 \pm 4 |
| 5d | OH | OMe | H | H | SMe | 0 \pm 6 | 24 \pm 9 |
| 5e | OH | OMe | H | H | CN | 0 \pm 4 | 0 \pm 3,5 |
| 6a | OH | OH | H | H | H | 8,5 \pm 9 | 14,5 \pm 4 |
| 6b | OH | OH | H | H | OH | 0 \pm 2 | 24 \pm 2,5 |
| 6c | OH | OH | H | H | Et | 15 \pm 7 | 54,5 \pm 3 |
| 6h | OH | OH | H | H | Me | 0 \pm 2 | 11 \pm 7 |
| 6i | OH | OH | H | H | <i>i</i> Pr | 0 \pm 2,5 | 24 \pm 7,5 |
| 6j | OH | OH | H | H | <i>t</i> Bu | 4 \pm 2 | 23 \pm 6 |
| 6k | OH | OH | H | H | Pr | 0 \pm 2,5 | 5 \pm 6 |
| 6l | OH | OH | H | H | Bu | 0 \pm 5 | 18 \pm 4 |
| 6m | OH | OH | Et | H | H | 2 \pm 4 | 7 \pm 7 |
| 6n | OH | OH | H | H | OMe | 15 \pm 6 | 7 \pm 4,5 |
| 6o | OH | OH | H | H | OEt | 7 \pm 6,5 | 0 \pm 1 |
| 6p | OH | OH | H | OMe | OH | 8 \pm 3 | 26 \pm 1 |
| 6q | OH | OH | OH | H | H | 9 \pm 19 | 0 \pm 5 |
| 7a | H | OH | H | H | H | 2 \pm 4 | 1,5 \pm 5 |
| 7c | H | OH | H | H | Et | 0 \pm 3 | 5 \pm 4 |
| 7m | H | OH | Et | H | H | 1,5 \pm 3,5 | 2 \pm 4 |
| AK à 70 μ M | - | - | - | - | - | | 44 \pm 5 |

Tableau IX. Inhibitions (%) de la tyrosinase de champignon obtenues avec les aurones

D'après le tableau ci-dessus et la **Figure 1**, les aurones inhibent très faiblement la tyrosinase de champignon à une concentration de 100 μ M et le peu d'activité mesurée dépend de la structure des aurones, puisque celle-ci apparaît lorsque le noyau A est hydroxylé sur au moins

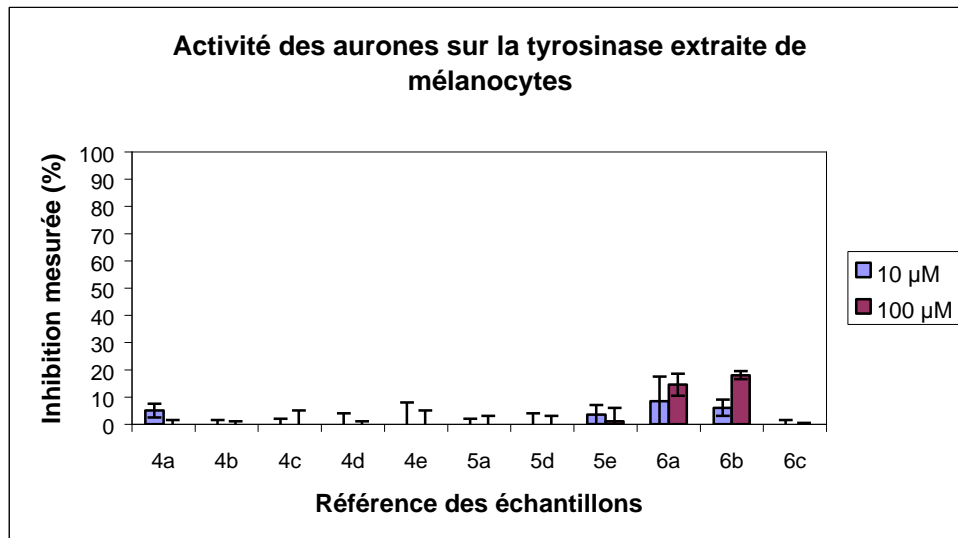


Figure 2. Inhibitions de la tyrosinase humaine extraite de mélanocytes obtenues avec les aurones

une des deux positions (4 ou 6) comme dans les molécules suivantes : **5a**, **5d**, **6b**, **6c**, **6i**, **6j** et **6p**.

2.7.1.2 Effets des molécules testées sur la tyrosinase humaine

| Référence | Substituants | | | % d'inhibition | |
|-------------------|--------------|-----|-----|----------------|--------------|
| | 4 | 6 | 4' | 10 μ M | 100 μ M |
| 4a | OMe | OMe | H | 5 \pm 2,5 | 0 \pm 1,5 |
| 4b | OMe | OMe | OH | 0 \pm 1,5 | 0 \pm 1 |
| 4c | OMe | OMe | Et | 0 \pm 2 | 0 \pm 5 |
| 4d | OMe | OMe | SMe | 0 \pm 4 | 0 \pm 1 |
| 4e | OMe | OMe | CN | 0 \pm 8 | 0 \pm 5 |
| 5a | OH | OMe | H | 0 \pm 2 | 0 \pm 3 |
| 5d | OH | OMe | SMe | 0 \pm 4 | 0 \pm 3 |
| 5e | OH | OMe | CN | 3,5 \pm 3,5 | 1 \pm 5 |
| 6a | OH | OH | H | 8,5 \pm 9 | 14,5 \pm 4 |
| 6b | OH | OH | OH | 6 \pm 3 | 18 \pm 1,5 |
| 6c | OH | OH | Et | 0 \pm 1,5 | 0 \pm 0,5 |
| AK à 0,01% | - | - | - | | 55 \pm 3 |

Tableau X. Inhibitions (%) de la tyrosinase humaine extraite de mélanocytes obtenues avec les aurones

D'après le tableau ci-dessus et la **Figure 2**, les aurones ne sont pas actives sur ce modèle particulier de la tyrosinase humaine isolée de mélanocytes.

2.7.1.3 Effets des molécules testées sur la tyrosinase de mélanocytes humains normaux en monocouche

Nous avons déjà vu dans les résultats précédents (tyrosinase de champignon) que l'hydroxylation du noyau A des aurones semblait être importante pour avoir une activité biologique. Toutes les molécules précédemment évaluées sont retestées dans ce modèle afin de confirmer leur activité. D'autres aurones qui n'étaient pas synthétisées lors des premiers tests seront incluses dans cette troisième évaluation.

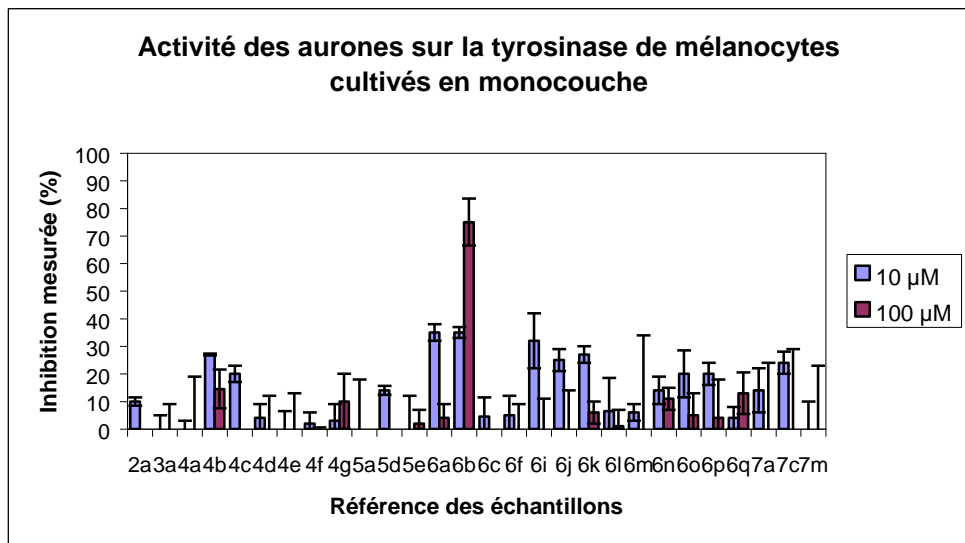
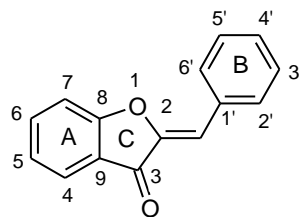


Figure 3. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec les aurones



| Référence | Substituants | | | | | % d'inhibition | |
|---------------|--------------|-----|--------------------|-----|--------------------|----------------|--------------|
| | 4 | 6 | 2' | 3' | 4' | 10 μ M | 100 μ M |
| 2a | OH | OH | - | - | - | 10 \pm 1,5 | nd |
| 3a | OMe | OMe | - | - | - | 0 \pm 5 | 0 \pm 9 |
| 4a | OMe | OMe | H | H | H | 0 \pm 3 | 0 \pm 19 |
| 4b | OMe | OMe | H | H | OH | 27 \pm 0,3 | 14,5 \pm 7 |
| 4c | OMe | OMe | H | H | Et | 20 \pm 3 | nd |
| 4d | OMe | OMe | H | H | SMe | 4 \pm 5 | 0 \pm 12 |
| 4e | OMe | OMe | H | H | CN | 0 \pm 6,5 | 0 \pm 13 |
| 4f | OMe | OMe | SO ₃ Na | H | H | 2 \pm 4 | 0 \pm 0,6 |
| 4g | OMe | OMe | SO ₃ Na | H | SO ₃ Na | 3 \pm 6 | 10 \pm 10 |
| 5a | OH | OMe | H | H | H | 0 \pm 18 | nd |
| 5d | OH | OMe | H | H | SMe | 14 \pm 1,6 | nd |
| 5e | OH | OMe | H | H | CN | 0 \pm 12 | 2 \pm 5 |
| 6a | OH | OH | H | H | H | 35 \pm 3 | 4 \pm 5 |
| 6b | OH | OH | H | H | OH | 35 \pm 2 | 75 \pm 8,5 |
| 6c | OH | OH | H | H | Et | 4,5 \pm 7 | nd |
| 6f | OH | OH | SO ₃ Na | H | H | 5 \pm 7 | 0 \pm 9 |
| 6i | OH | OH | H | H | <i>i</i> Pr | 32 \pm 10 | 0 \pm 11 |
| 6j | OH | OH | H | H | <i>t</i> Bu | 25 \pm 4 | 0 \pm 14 |
| 6k | OH | OH | H | H | Pr | 27 \pm 3 | 6 \pm 4 |
| 6l | OH | OH | H | H | Bu | 6,5 \pm 12 | 1 \pm 6 |
| 6m | OH | OH | Et | H | H | 6 \pm 3 | 0 \pm 34 |
| 6n | OH | OH | H | H | OMe | 14 \pm 5 | 11 \pm 4 |
| 6o | OH | OH | H | H | OEt | 20 \pm 8,5 | 5 \pm 8 |
| 6p | OH | OH | H | OMe | OH | 20 \pm 4 | 4 \pm 14 |
| 6q | OH | OH | OH | H | H | 4 \pm 9 | 13 \pm 7,5 |
| 7a | H | OH | H | H | H | 14 \pm 8 | 0 \pm 24 |
| 7c | H | OH | H | H | Et | 24 \pm 4 | 0 \pm 29 |
| 7m | H | OH | Et | H | H | 0 \pm 10 | 0 \pm 23 |
| AK à 0,01% | - | - | - | - | - | 25 \pm 2 | |

Tableau XI. Inhibitions (%) de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec les aurones

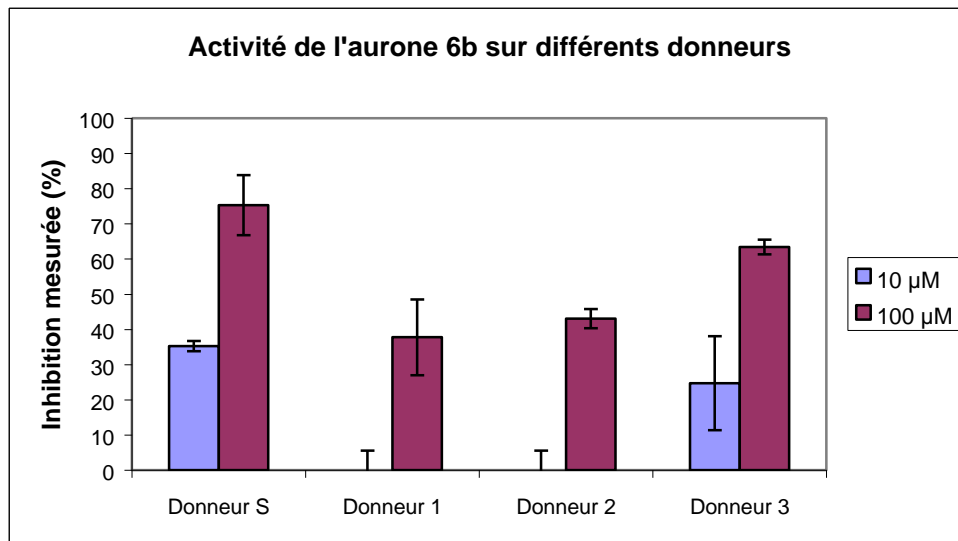


Figure 4. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec l'aurone 6b sur différents donneurs de phototype clair.

Les résultats obtenus confirment l'inhibition de la tyrosinase par certaines aurones hydroxylées en position 4 et 6 sur le noyau A. Cependant, la molécule la plus active dans le modèle de la tyrosinase de champignon (**6c**) a perdu de son efficacité dans ce modèle ; de même que les 4-hydroxy-6-méthoxyaurones **5a** et **5d**. Désormais ce modèle, plus proche du vivant que le modèle utilisant la tyrosinase de champignon ou celui utilisant la tyrosinase humaine isolée sera notre outil privilégié pour l'évaluation des échantillons à tester.

L'aurone la plus active la (*Z*)-4,6-dihydroxy-2-(4-hydroxybenzylidène)benzofuran-3(2*H*)-one (**6b**) est retestée sur trois autres donneurs de phototype clair (46, 47 et 33 ans) et son activité est reproductible (**Figure 4**). Cette molécule (**6b**) est également testée sur deux donneurs de phototype brun et un donneur de phototype négroïde (31 ans).

| Concentrations en 6b testées | % d'inhibition donneur Brun 1 | % d'inhibition donneur Brun 2 | % d'inhibition donneur Négroïde |
|--|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 10 ⁻³ M | 97,5±1 | 92±2 | nd |
| 10 ⁻⁴ M | 45±4 | 67±1,5 | 66±3 |
| 10 ⁻⁵ M | 25,5±4 | 32±1 | 39,5±5 |

Tableau XII. Inhibitions (%) de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec le composé 6b sur deux donneurs bruns et un donneur négroïde.

Les résultats obtenus avec les donneurs de phototype brun montrent que l'activité de l'aurone **6b** est importante et dose-dépendante. L'inhibition observée avec le donneur de phototype négroïde est également forte et confirme les résultats obtenus d'une part sur des donneurs de phototype clair et d'autre part sur les donneurs de phototype brun.

Une étude est réalisée avec des molécules décrites dans la littérature pour leur activité dépigmentante (vitamine C, magnésium ascorbylphosphate et acide kojique). Ces composés sont appliqués au modèle d'évaluation de l'activité de la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche, de façon à comparer leur efficacité par rapport à celle des aurones. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau suivant :

| Molécule et concentration testée | % d'inhibition | Cytotoxicité |
|----------------------------------|----------------|-----------------|
| VitC 3% | 98±1 | Mort cellulaire |
| VitC 0,3% | 49±5 | Mort cellulaire |
| VitC 0,03% | 0±7 | Non |
| VitC PMg 3% | 0±2 | Non |
| VitC PMg 0,3% | 1,5±3 | Non |
| VitC PMg 0,03% | 3±1,5 | Non |
| AK 0,5% | 25±3 | Mort cellulaire |
| AK 0,05% | 14±4 | Non |
| AK 0,005% | 7±4 | Non |

Tableau XIII. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes humains en monocouche obtenues avec des témoins de la littérature

Les molécules testées sont peu efficaces dans ce modèle. En effet, aucune molécule n'a permis d'inhiber la tyrosinase humaine à un seuil comparable à celui de l'aurone **6b**. La vitamine C à 3% et 0,3% présente des taux d'inhibition importants mais non spécifiques, car elle exerce une action cytotoxique sur le mélanocyte.

Les aurones étant des isomères de flavones, deux flavones la chrysin et l'apigénine correspondant respectivement aux aurones **6a** et **6b** ont été testées sur le même modèle, aux mêmes concentrations, et n'ont révélé aucune efficacité. Ces aurones s'avèrent donc être efficaces sur la tyrosinase humaine et l'inhibition observée est spécifique.

Le dérivé **6b** subira ensuite des modifications structurales, qui porteront sur le nombre et la position des hydroxyles sur les noyaux A et B. Les deux hydroxyles en 4 et 6 seront tour à tour supprimés et deux nouvelles aurones seront synthétisées : la (Z)-2-(4-Hydroxybenzylidène)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (**7b**) et la (Z)-2-(4-Hydroxybenzylidène)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (**11**). Une aurone monohydroxylée en position 4' sur le noyau B sera aussi synthétisée (**12**). Enfin l'hydroxyle en 4' sur le noyau B sera remplacé par un atome de fluor (**6r**), pour vérifier si l'activité est plutôt liée au caractère électroattracteur de l'hydroxyle, ou à d'autres paramètres comme par exemple son potentiel donneur de liaison hydrogène ou le volume occupé par ce groupement.

Les résultats obtenus avec ces nouvelles molécules sont consignés dans le tableau suivant accompagnés des résultats d'autres aurones structurellement proches de **6b**:

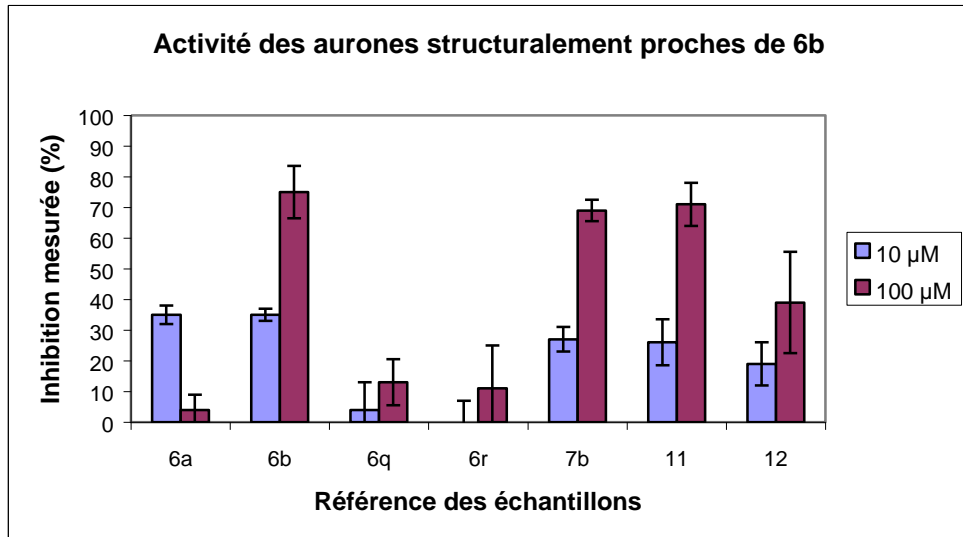
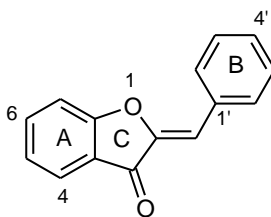


Figure 5. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec des aurones stucturalement proches de 6b



| Référence | Substituants | | | | | % d'inhibition | |
|-----------|--------------|----|----|----|----|----------------|---------------|
| | 4 | 6 | 2' | 3' | 4' | 10 μ M | 100 μ M |
| 6a | OH | OH | H | H | H | 35 \pm 3 | 4 \pm 5 |
| 6b | OH | OH | H | H | OH | 35 \pm 2 | 75 \pm 8,5 |
| 6q | OH | OH | OH | H | H | 4 \pm 9 | 13 \pm 7,5 |
| 6r | OH | OH | H | H | F | 0 \pm 7 | 11 \pm 14 |
| 7b | H | OH | H | H | OH | 27 \pm 4 | 69 \pm 3,5 |
| 11 | OH | H | H | H | OH | 26 \pm 7,5 | 71 \pm 7 |
| 12 | H | H | H | H | OH | 19 \pm 7 | 39 \pm 16,5 |

Tableau XIV. Inhibition (%) de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues après modifications structurales de l'aurone 6b

Ces résultats (**Tableau XIV et Figure 5**) nous permettent d'affirmer l'importance des groupements hydroxyles pour inhiber la tyrosinase. L'hydroxyle du noyau B doit être positionné en 4' pour avoir une activité, lorsque que celui-ci est supprimé (**6a**) ou déplacé en 2' par exemple (**6q**), on assiste à une baisse significative de l'activité. La présence simultanée des deux hydroxyles sur le noyau A n'est pas indispensable, puisque la présence de l'un ou l'autre en 4 ou 6 avec l'hydroxyle en 4' (**11 et 7b**) suffit à conserver l'activité. Par contre il est nécessaire d'avoir au moins un hydroxyle sur le noyau A, l'absence de ce dernier se traduit aussi par une baisse de l'inhibition de l'enzyme. Le remplacement de l'hydroxyle en 4' par un fluor (**6r**) ne permet pas de conserver l'activité.

D'après les éléments de relation-structure activité précédemment décrits, l'activité de l'aurone **6b** serait liée à la présence d'au moins deux hydroxyles, un sur le noyau A en 4 ou en 6 et un autre en 4' sur le noyau B.

Le mécanisme d'action de cette molécule et de ses analogues reste à étudier, mais nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elles n'agiraient pas par une chélation du cuivre, car la molécule **7b** n'ayant aucun site de chélation a une efficacité comparable à celle des deux autres (**6b et 11**) pouvant chélater le cuivre entre l'hydroxyle en 4 et la fonction cétone en 3. Elle pourrait cependant aussi agir en mimant la structure d'un substrat de l'enzyme comme la tyrosine. Des essais de superposition effectués avec le programme Surfex de l'aurone (**6b**) avec la tyrosinase et la L-DOPA ont fourni un meilleur score avec la L-tyrosine (**Schéma 65**).

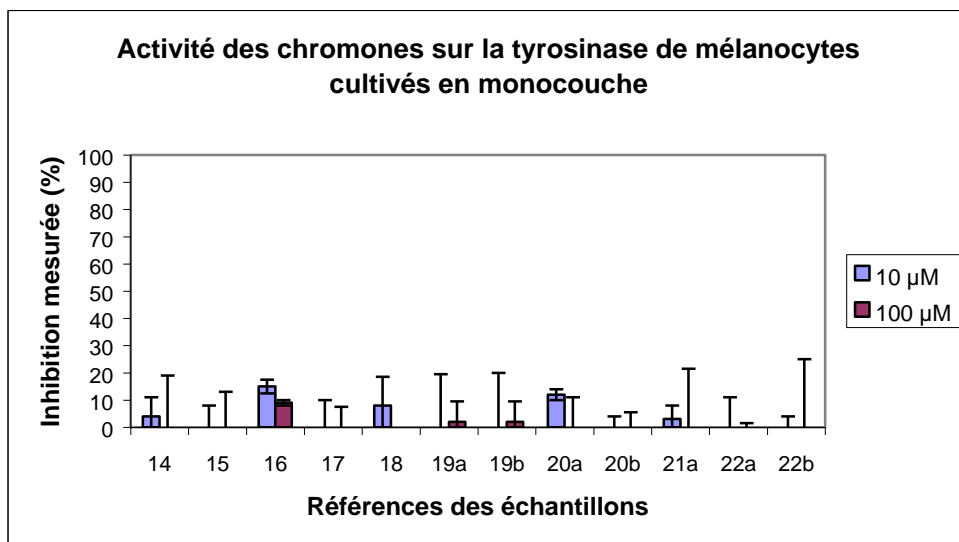


Figure 6. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec les chromones

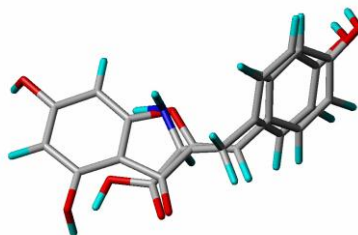
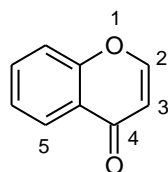


Schéma 65. Modèle du mimétisme de la L-tyrosine par l'aurone (6b)

2.7.2 Effets des chromones sur l'activité de la tyrosinase

2.7.2.1 Effets des molécules testées sur la tyrosinase de mélanocytes humains normaux cultivés en monocouche

Les résultats obtenus après application des chromones sur des mélanocytes cultivés en monocouche sont récapitulés dans le tableau suivant (et **Figure 6**) montrent que les chromones n'ont aucun effet significatif sur l'activité de la tyrosinase humaine.



| Référence | Substituants | | | % d'inhibition | |
|------------|--------------------|------------|-----|----------------|--------------|
| | 2 | 3 | 5 | 10 μ M | 100 μ M |
| 14 | COOEt | H | OMe | 4 \pm 7 | 0 \pm 19 |
| 15 | COOH | H | OMe | 0 \pm 8 | 0 \pm 13 |
| 16 | COOH | H | OH | 15 \pm 2,5 | 9 \pm 1 |
| 17 | CH ₂ OH | H | OMe | 0 \pm 10 | 0 \pm 7,5 |
| 18 | CH ₂ OH | H | OH | 8 \pm 10,5 | nd |
| 19a | pentyl | H | OH | 0 \pm 19,5 | 2 \pm 7,5 |
| 19b | pentyl | hexanoyl | OH | 0 \pm 20 | 2 \pm 7,5 |
| 20a | hexyl | H | OH | 12 \pm 2 | 0 \pm 11 |
| 20b | hexyl | heptanoyl | OH | 0 \pm 4 | 0 \pm 5,5 |
| 21a | octyl | H | OH | 3 \pm 5 | 0 \pm 21,5 |
| 22a | décyl | H | OH | 0 \pm 11 | 0 \pm 1,5 |
| 22b | décyl | undécanyol | OH | 0 \pm 4 | 0 \pm 25 |
| AK à 0,01% | - | - | - | | 15 \pm 2 |

Tableau XV. Inhibitions (%) de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec les chromones

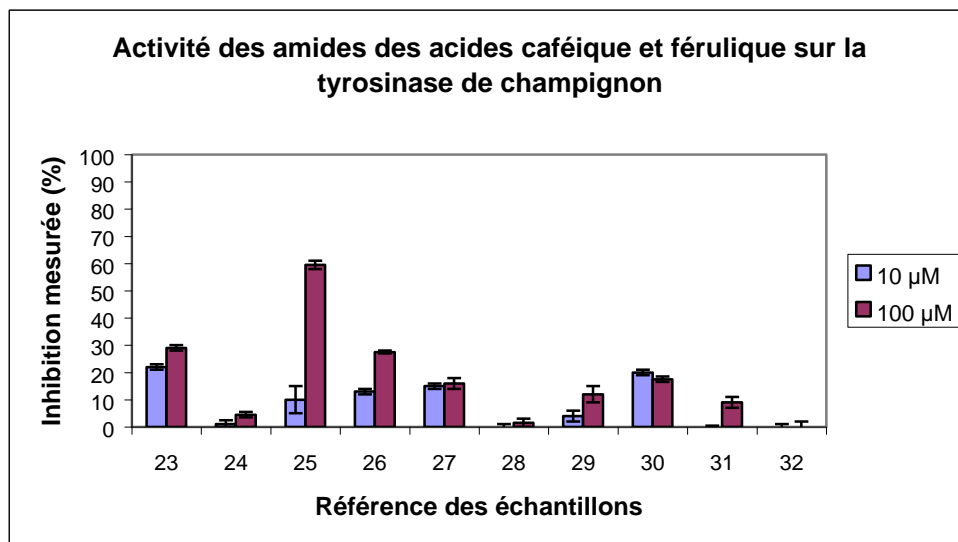


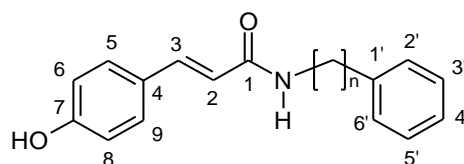
Figure 7. Inhibitions de la tyrosinase de champignon obtenues avec les amides des acides caféique et férulique

2.7.3 Effets des dérivés des acides caféique et férulique sur l'activité de la tyrosinase

L'absence de toxicité de la part de ces molécules vis à vis d'une culture de mélanocytes humains normaux a été vérifiée au préalable en utilisant le test au PNPP.

2.7.3.1 Effets des dérivés des acides caféique et férulique sur la tyrosinase de champignon

Les premières molécules synthétisées ont été pour la première fois testées sur la tyrosinase de champignon isolée et n'ont exprimé que de faibles inhibitions comme dans le cas des aures. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant (et sur la **Figure 7**) :



| Référence | Substituants | | | n | % d'inhibition | |
|-----------------|--------------|-----|-----|---|----------------|----------------|
| | 6 | 3' | 4' | | 10 μ M | 100 μ M |
| 23 | OH | H | H | 2 | 22 \pm 1 | 29 \pm 1 |
| 24 | OMe | H | H | 2 | 1 \pm 1,5 | 4,5 \pm 1 |
| 25 | OMe | H | OH | 2 | 10 \pm 5 | 59,5 \pm 1,5 |
| 26 | OH | H | OH | 2 | 13 \pm 1 | 27,5 \pm 0,5 |
| 27 | OH | OH | OH | 2 | 15 \pm 1 | 16 \pm 2 |
| 28 | OMe | OMe | OH | 1 | 0 \pm 1 | 1,5 \pm 1,5 |
| 29 | OH | OMe | OH | 1 | 4 \pm 2 | 12 \pm 3 |
| 30 | OH | OMe | OMe | 2 | 20 \pm 1 | 17,5 \pm 1 |
| 31 | OMe | OH | OH | 2 | 0 \pm 0,5 | 9 \pm 2 |
| 32 | OMe | OMe | OMe | 2 | 0 \pm 1 | 0 \pm 2 |
| AK à 70 μ M | - | - | - | - | | 49 \pm 1,5 |

Tableau XVI. Inhibitions (%) de la tyrosinase de champignon obtenues avec les amides des acides caféique et férulique

2.7.3.2 Effets des dérivés des acides caféique et férulique sur la tyrosinase de mélanocytes humains normaux

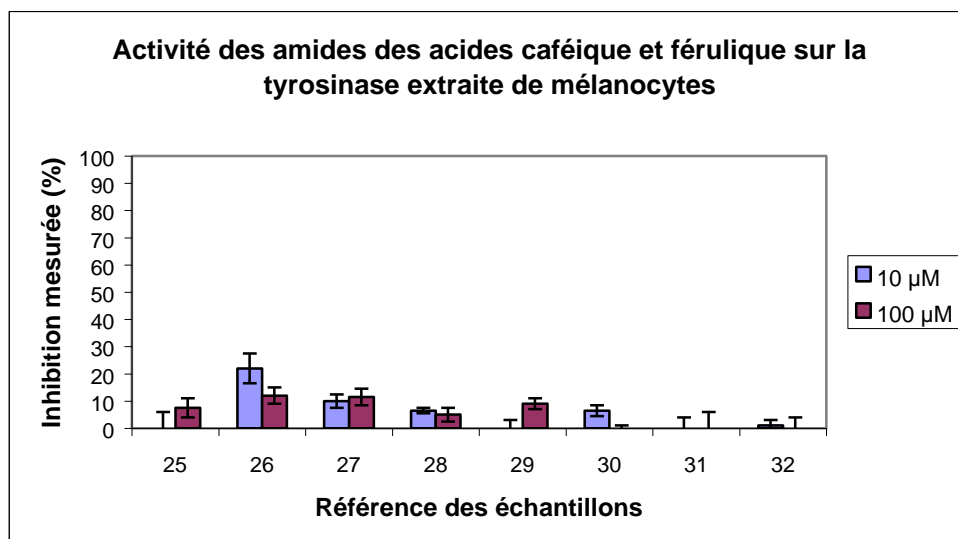


Figure 8. Inhibitions de la tyrosinase extraite de mélanocytes, obtenues avec les amides des acides caféique et férulique

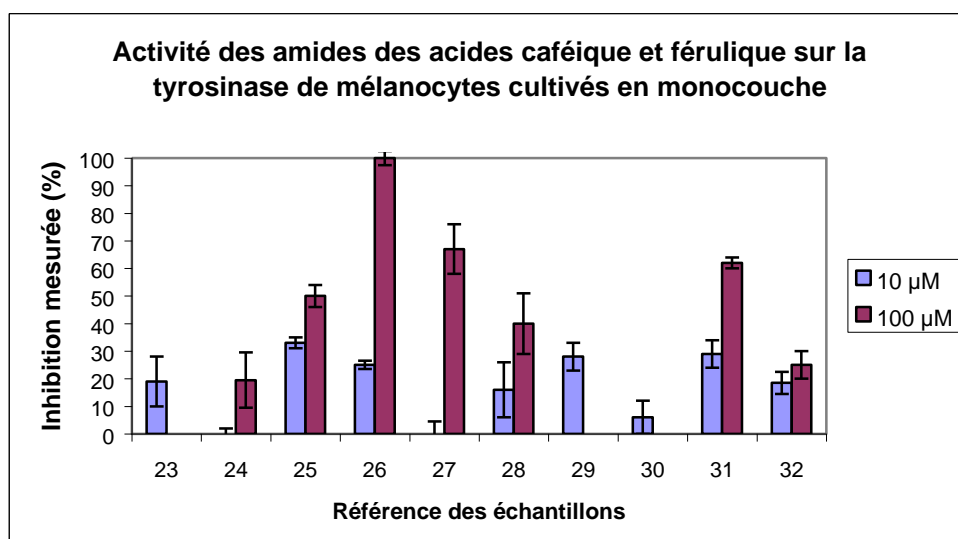


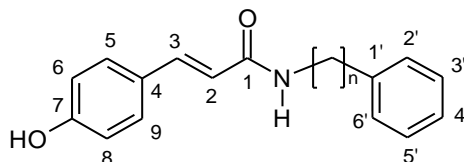
Figure 9. . Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche obtenues avec les amides des acides caféique et férulique

| Référence | Substituants | | | | % d'inhibition | |
|------------|--------------|-----|-----|---|----------------|---------|
| | 6 | 3' | 4' | n | 10 µM | 100 µM |
| 25 | OMe | H | OH | 2 | 0±6 | 7,5±3,5 |
| 26 | OH | H | OH | 2 | 22±5,5 | 12±3 |
| 27 | OH | OH | OH | 2 | 10±2,5 | 11,5±3 |
| 28 | OMe | OMe | OH | 1 | 6,5±1 | 5±2,5 |
| 29 | OH | OMe | OH | 1 | 0±3 | 9±2 |
| 30 | OH | OMe | OMe | 2 | 6,5±2 | 0±1 |
| 31 | OMe | OH | OH | 2 | 0±4 | 0±6 |
| 32 | OMe | OMe | OMe | 2 | 1±2 | 0±4 |
| AK à 0,01% | - | - | - | - | 57±7% | |

Tableau XVII. Inhibitions (%) de la tyrosinase extraite de mélanocytes, obtenues avec les amides des acides caféique et férulique

Il résulte du tableau ci-dessus (et de la **Figure 8**) que l'activité de ces composés dans ce modèle est peu importante. Toutes ces molécules vont être retestées sur la tyrosinase de mélanocytes en monocouche.

2.7.3.3 Effets des dérivés des acides caféique et férulique sur la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche



| Référence | Substituants | | | | % d'inhibition | |
|------------|--------------|-----|-----|---|----------------|---------|
| | 6 | 3' | 4' | n | 10 µM | 100 µM |
| 23 | OH | H | H | 2 | 19±9 | nd |
| 24 | OMe | H | H | 2 | 0±2 | 19,5±10 |
| 25 | OMe | H | OH | 2 | 33±2 | 50±4 |
| 26 | OH | H | OH | 2 | 25±1,5 | 100±2,5 |
| 27 | OH | OH | OH | 2 | 0±4,5 | 67±9 |
| 28 | OMe | OMe | OH | 1 | 16±10 | 40±11 |
| 29 | OH | OMe | OH | 1 | 28±5 | nd |
| 30 | OH | OMe | OMe | 2 | 6±6 | nd |
| 31 | OMe | OH | OH | 2 | 29±5 | 62±2 |
| 32 | OMe | OMe | OMe | 2 | 18,5±4 | 25±5 |
| AK à 0,01% | - | - | - | - | 23,5±6 | |

Tableau XVIII. Inhibitions (%) de la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche obtenues avec les amides des acides caféique et férulique

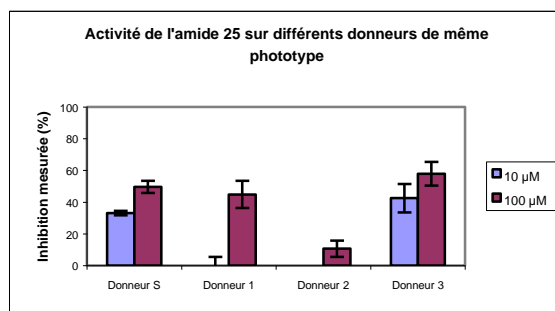


Figure 10. Inhibition de la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche obtenues avec la *trans-N*-féruoyltyramine (25) sur différents donneurs de phototype clair

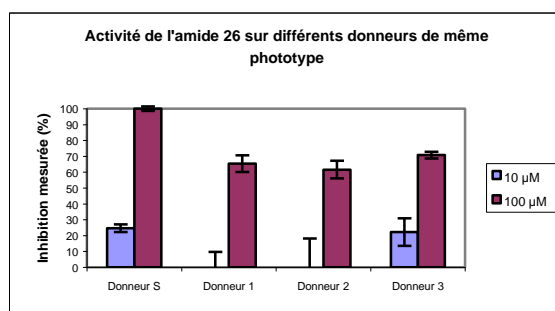


Figure 11. Inhibition de la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche obtenues avec la *trans-N*-caféoyltyramine sur différents donneurs de phototype clair

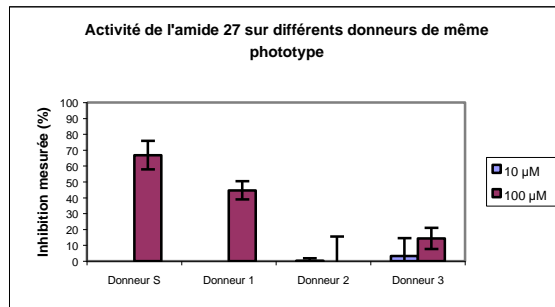


Figure 12. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec la *trans-N*-caféoyldopamine (27) sur différents donneurs de phototype clair

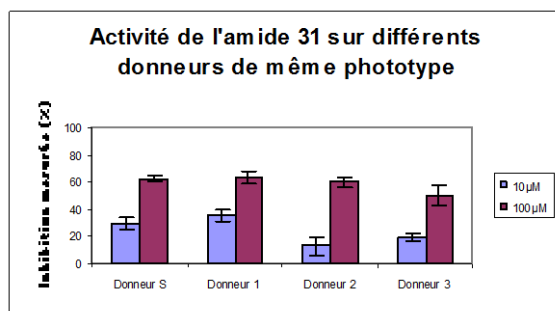


Figure 13. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec la *trans-N*-féruoyldopamine (31) sur différents donneurs de phototype clair.

Ces résultats montrent une inhibition de la tyrosinase par certains amides de l'acide caféique et de l'acide férulique, plus particulièrement ceux dotés d'au moins un hydroxyle sur les deux noyaux phénoliques. Cependant, nous pouvons effectuer la même remarque que dans le cas des aurones, à savoir qu'il y a des différences significatives au niveau des résultats. Par exemple la molécule **31** inactive dans le modèle de la tyrosinase de champignon, s'est révélée efficace dans ce modèle. De plus, l'activité de certaines molécules (**25**, **26**, **27**) a été plus importante dans ce modèle que dans les précédents. Nous avons donc uniquement conservé ce test comme modèle d'évaluation des dérivés issus de modifications structurales des molécules les plus actives.

Les quatre molécules les plus efficaces (**25**, **26**, **27**, **31**) ont été retestées aux deux concentrations sur trois autres donneurs différents de phototype clair afin de confirmer leur activité dans ce modèle. Les résultats obtenus montrent que trois molécules (**25**, **26**, **31**) ont une activité d'environ 40% d'inhibition sur au moins deux donneurs supplémentaires (**Figures 10 à 13**).

L'activité inhibitrice de deux (**25** et **26**) des quatre molécules les plus actives a été évaluée de nouveau en utilisant le même modèle, sur deux donneurs de phototype brun et un donneur de phototype négroïde (31 ans) :

| Molécules et concentrations testées | % d'inhibition donneur Brun 1 | % d'inhibition donneur Brun 2 | % d'inhibition donneur négroïde |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 25 à 10 ⁻³ M | 85,5±8,5 | 87,5±3 | nd |
| 26 à 10 ⁻³ M | 99±0,5 | 94,5±5 | nd |
| 25 à 10 ⁻⁴ M | 40,5±2 | 30,5±3 | 44,5±4 |
| 26 à 10 ⁻⁴ M | 44±12 | 44,5±2 | 49±3,5 |
| 25 à 10 ⁻⁵ M | 15,5±2 | 17±7 | 22±5 |
| 26 à 10 ⁻⁵ M | 21±2 | 19±3 | 16±1 |

Tableau XIX. Dosage de l'activité des molécules 25 et 26 sur des donneurs de phototype brun et négroïde.

Les résultats obtenus avec les phototypes bruns montrent que l'activité anti-tyrosinase est forte et dose-dépendante. Ces inhibitions sont confirmées par les résultats obtenus avec le phototype négroïde.

Une deuxième génération d'amides issus des molécules **25**, **26** et **31** a été synthétisée et évaluée dans ce modèle. Elle est obtenue par modification structurale, notamment au niveau de la chaîne latérale séparant la fonction amide du noyau phénolique provenant de l'acide et

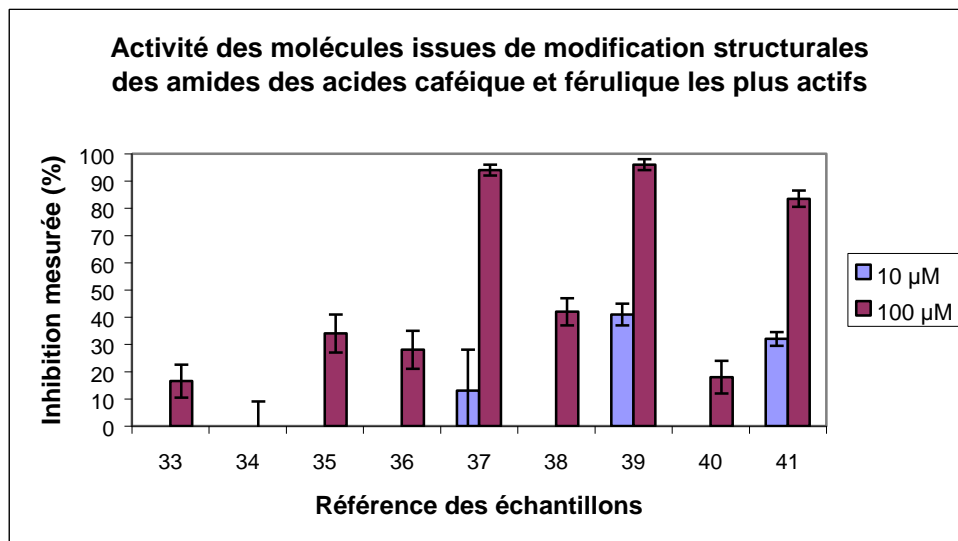
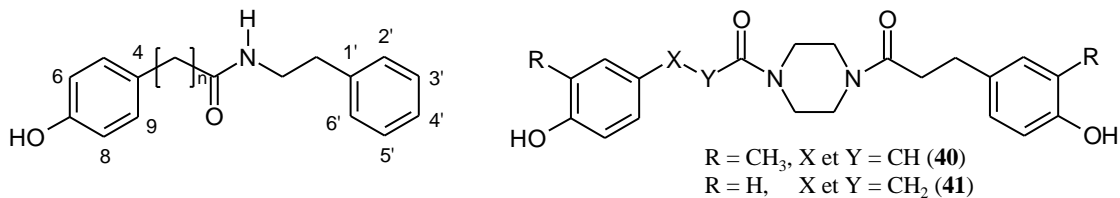


Figure 14. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec des dérivés des acides caféique et férulique de seconde génération

au niveau des substituants des deux noyaux phénoliques. Une symétrie et une rigidification ont aussi été introduites dans deux molécules (**40** et **41**) en faisant réagir la pipérazine avec deux acides différents. Les résultats des évaluations de ces nouvelles molécules figurent dans le tableau ci-dessous et sur la **Figure 14** :



| Référence | Substituants | | | | % d'inhibition | |
|------------|--------------|----|----|---|------------------|-------------------|
| | 6 | 3' | 4' | n | 10 μM | 100 μM |
| 33 | OMe | H | OH | 1 | nd | 16,5 \pm 6 |
| 34 | OMe | OH | OH | 1 | nd | 0 \pm 9 |
| 35 | OH | H | OH | 1 | nd | 34 \pm 7 |
| 36 | OMe | H | OH | 2 | nd | 28 \pm 7 |
| 37 | OH | H | OH | 2 | 13 \pm 15 | 94 \pm 2 |
| 38 | OMe | OH | OH | 2 | nd | 42 \pm 5 |
| 39 | H | H | OH | 2 | 41 \pm 4 | 96 \pm 2 |
| 40 | - | - | - | - | nd | 18 \pm 6 |
| 41 | - | - | - | - | 32 \pm 2,5 | 83,5 \pm 3 |
| Ak à 0,01% | | | | | 23 \pm 3,5 | |

Tableau XX. Inhibitions (%) de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec des dérivés des acides caféique et férulique de seconde génération

Dans cette deuxième génération de dérivés, les molécules actives sont celles qui portent au moins un hydroxyle sur chaque noyau aromatique et qui possèdent deux carbones de part et d'autre de la fonction amide. La présence de la double liaison provenant des deux acides de départ (caféique et férulique) n'a pas d'influence sur l'activité puisque les deux molécules les plus actives de cette série **37** et **39** n'en possèdent pas dans leur structure. Le fait de rigidifier la structure en introduisant un motif pipérazine produit des effets variables : dans un cas nous assistons à une baisse de l'activité (**40**) et dans un autre, l'activité est conservée (**41**).

Afin d'identifier le fragment des molécules synthétisées responsable de l'activité biologique, les produits de départ suivants ont été testés à 100 μM sur le même modèle biologique : les acides caféique et férulique, la dopamine, la tyramine et son équivalent sous forme d'alcool le tyrosol. Seul le tyrosol a montré une inhibition significative d'environ 54% de la tyrosinase dans ce modèle. Une série d'une vingtaine de produits commerciaux de

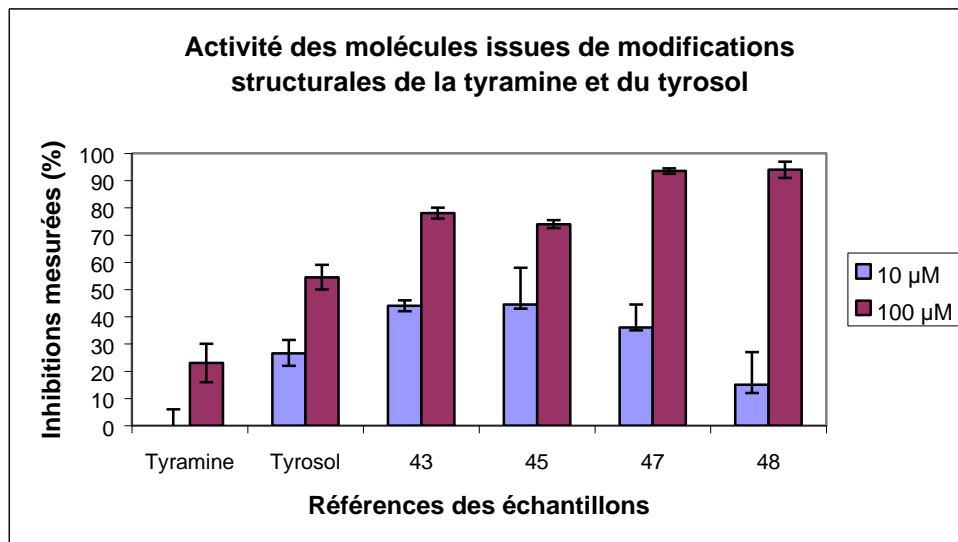
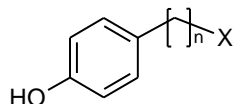


Figure 15. Inhibitions de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec les dérivés issus de modifications structurales de la tyramine et du tyrosol.

structure proche du tyrosol est alors testée dans les mêmes conditions (**tableau XXII** des annexes). Une seule molécule le 3-(4-hydroxyphényl)propanol a montré un pourcentage d'inhibition supérieur à celui du tyrosol (60%). Suite à ces résultats, une troisième série de molécules provenant des modifications de la structure du tyrosol a été synthétisée et évaluée.



| Référence | n | X | % d'inhibition | |
|---|---|-----------------|-----------------|----------------|
| | | | 10 μ M | 100 μ M |
| Tyrosol | 2 | OH | 26,5 \pm 5 | 54,5 \pm 4,5 |
| Tyramine | 2 | NH ₂ | 0 \pm 6 | 23 \pm 7 |
| 3-(4-Hydroxyphényl)propanol | 3 | OH | nd | 60,5 \pm 2,5 |
| 43 | 2 | SH | 44 \pm 2 | 78 \pm 2 |
| 3-(4-Hydroxyphényl)propan-2-èneol 45 | 3 | OH | 44,5 \pm 13,5 | 74 \pm 1,5 |
| 4-(4-Hydroxyphényl)butanol 47 | 4 | OH | 36 \pm 8,5 | 93,5 \pm 1 |
| 48 | 2 | Br | 15 \pm 12 | 94 \pm 3 |
| AK à 0,01% | - | - | | 17 \pm 5 |

Tableau XXI. Inhibitions (%) de la tyrosinase de mélanocytes cultivés en monocouche obtenues avec des dérivés provenant de modifications structurales de la tyramine et du tyrosol.

Après analyse des résultats précédents et ceux obtenus avec les dérivés commerciaux, quelques éléments de relation structure-activité peuvent être déduits.

- Concernant le noyau phényle :

La présence d'un hydroxyle en position *para* semble importante pour l'activité ; lorsque celui-ci est positionné en *ortho* ou en *méta*, on assiste à une nette diminution de l'activité. Il en est de même si cet hydroxyle est remplacé par un autre groupement (amine, alcane ou halogène).

Dans ce cas, contrairement aux amides, le fait de rajouter un méthoxy ou un autre hydroxyle sur le noyau phényle diminue considérablement l'activité.

- Concernant la chaîne aliphatique :

Le passage d'un chaînon de un à quatre carbones augmente à chaque fois l'activité.

La fonction alcool semble être plus favorable à l'activité par rapport à une fonction acide ou amine ; par contre, elle peut être remplacée par une fonction équivalente (la fonction thiol, **43**), ou par un groupement électroattracteur comme le brome (**48**) bien qu'étant plus volumineux.

Pour revenir aux molécules initialement testées les amides **25**, **26**, et **31** leur activité pourrait être due à un effet potentialisateur lié à la liaison des deux réactifs (acide et amine) qui sont pour leur part inactifs au départ.

2.7.4 Effet des dérivés des prodrogues de type phosphate et sulfate sur l'activité de la tyrosinase

Les molécules sulfatées et phosphatées n'ont montré aucune inhibition de la tyrosinase de mélanocytes humains normaux en monocouche. Après des essais de déphosphatation et de désulfatation à l'aide d'enzymes commerciales, deux molécules **50** et **56** ont montré une inhibition d'environ 34%. Les protocoles de déphosphatation et de désulfatation sont en cours d'optimisation.

2.7.5 Conclusion

A la lumière de ces résultats, il est évident que les molécules les plus actives sont celles qui possèdent un ou plusieurs groupements phénols. Ce critère structural a souvent été retrouvé sur la majorité des molécules à activité antityrosinase.

Comme il a été souligné auparavant, les aurones pourraient agir en mimant la L-tyrosine et la L-Dopa car la chélation du cuivre est peu probable, compte tenu de leur pauvre pouvoir chélateur.

En ce qui concerne la série des amides des acides caféique et férulique, les deux mécanismes sont envisageables. En effet parmi les molécules les plus actives, on trouve des dérivés possédant des motifs chélateurs de métaux (le motif *ortho*-dihydroxy).

L'analyse de la littérature concernant les inhibiteurs de la tyrosinase indique que l'enzyme de champignon est fréquemment utilisée comme modèle. Cette enzyme est disponible commercialement à l'état pur et permet donc de réaliser des cinétiques enzymatiques et de déterminer les aspects de l'inhibition (compétitive, suicide...). Comme nous l'avons déjà montré, l'inconvénient de ce modèle est que cette enzyme ne garantit pas une transposition à la tyrosinase humaine. L'utilisation de la tyrosinase de mélanocytes humains en culture, nous a semblé être le modèle de choix pour notre étude dont le but est de mettre au point des molécules utilisables chez l'homme.

CHAPITRE 3: CONCLUSION-PERSPECTIVES

3.1 CONCLUSION

Au cours de notre recherche de nouvelles molécules capables de moduler la mélanogenèse, notre attention s'est portée sur trois familles de molécules naturelles : les aurones, les chromones et les dérivés des acides caféique (3,4-dihydroxycinnamique) et férulique (4-hydroxy-3-méthoxycinnamique).

Les aurones et plus particulièrement les 4,6-dihydroxyaurones ont été obtenues en un procédé divisé en 5 étapes. La méthode de synthèse développée pour ces molécules, nous a également permis de synthétiser des 6-hydroxyaurones. Seules quelques difficultés persistent au niveau de la synthèse des 4-hydroxy-6-méthoxyaurones, pendant la déméthylation sélective en 4, difficultés liées aux conditions strictes d'utilisation du réactif de déprotection le tribromure de bore.

La synthèse des deux chromones analogues structuraux de l'acide kojique a été réalisée en quatre étapes à partir de la 2',6'-dihydroxyacétophénone commerciale. Ce même composé traité avec un chlorure d'acide, a permis d'accéder en une réaction aux 2-alkylchromones, réaction à l'issue de laquelle nous avons isolé pour la première fois les 2-alkyl-3-alkoylchromones.

Quant aux dérivés de l'acide caféique et de l'acide férulique, ils ont été obtenus par une réaction de couplage peptidique, après activation de la fonction acide par le BOP.

En terme de dérivés finaux, au total une trentaine d'aurones, une dizaine de chromones et 18 dérivés des acides caféique et férulique ont été synthétisés et leur activité biologique évaluée.

Leur évaluation sur notre cible, la tyrosinase humaine a été réalisée sur une culture de mélanocytes humains normaux. Les résultats obtenus ont permis de conclure à un réel potentiel pour quelques molécules dont trois aurones, deux dérivés de l'acide férulique, un dérivé de l'acide caféique, deux dérivés de l'acide *p*-dihydrocoumarique et quelques dérivés structurellement proche du tyrosol et de la tyramine.

Les trois aurones ayant montré une inhibition très significative de la tyrosinase sont : la 4,6,4'-trihydroxyaurone (**6b**), l'hispidol (**7b**) et la 4,4'-dihydroxyaurone (**11**). L'inhibition semble liée à la présence simultanée de deux hydroxyles, l'un en 4 ou 6 et l'autre en 4'. L'activité de ces aurones a été mise en évidence pour la première fois au cours de ce projet. Cette famille de molécules a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet et d'une publication dans une revue internationale (*J. Med. Chem.*).

Concernant les dérivés des acides caféique et férulique, les taux d'inhibition observés sur la tyrosinase humaine sont importants et leur efficacité dans le modèle utilisé est supérieure à celle de certaines références de la littérature (Vit C, acide kojique). Ces résultats sont très prometteurs et nous permettent d'envisager une exploitation industrielle. Une structure active (**39**) semble posséder les éléments structuraux requis pour l'activité c'est-à-dire une fonction amide qui peut être remplacée par une fonction ester, séparée par deux carbones de part et d'autre des deux noyaux phényl hydroxylés en *para*.

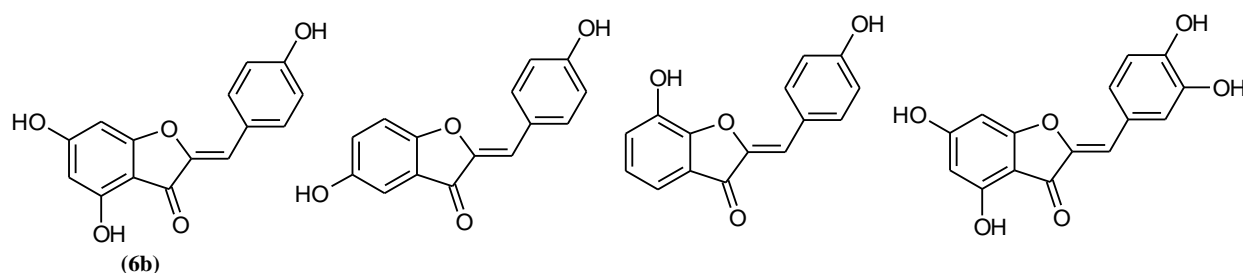
Les chromones n'ont révélé aucune activité significative sur notre cible la tyrosinase humaine.

La phosphorylation et la sulfatation des molécules actives ont permis d'améliorer leur solubilité aqueuse. Malheureusement, les molécules obtenues n'ont montré aucune activité. Leur activité pourrait être restituée en partie après des réactions de déphosphatation et de désulfatation enzymatiques, qui sont en cours d'optimisation.

3.2 PERSPECTIVES

Notre étude a abouti à l'identification de quelques molécules actives *in vitro*, et des éléments structuraux impliqués dans l'efficacité de ces molécules. Cependant d'autres pistes de modifications structurales peuvent être explorées afin de confirmer les relations structure-activité que nous avons établies.

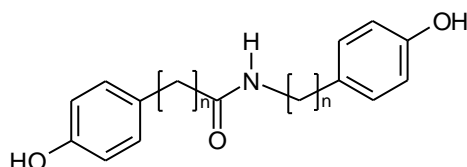
La synthèse de molécules supplémentaires (voir ci-dessous), de structure proche de la 4,6,4'-trihydroxyaurone (**6b**) pourrait être envisagée pour conclure sur l'importance du positionnement des hydroxyles sur la structure aurone avec certitude.



Il serait aussi intéressant de voir si l'augmentation du nombre d'hydroxyle sur le noyau B, entraîne un gain ou une perte d'activité. Dans le but d'identifier les caractéristiques physico-chimiques de l'hydroxyle favorables à cette activité, celui-ci pourra être remplacé par des groupements équivalents. L'implication du caractère donneur de liaison hydrogène par

exemple pourra être vérifiée en remplaçant l'hydroxyle par un autre groupement donneur de liaison hydrogène.

Dans le cadre de l'étude des dérivés des acides caféique et férulique, nous avons découvert que la modification de la structure du tyrosol a permis de conserver voire d'augmenter l'activité dans certains cas. Il serait judicieux d'évaluer l'impact sur l'activité de l'augmentation du nombre de carbones de part et d'autre de la liaison amide (voir formule ci-dessous).



avec $n > 2$

Pour toutes ces molécules, une étude de quantification des relations-structure-activité pourrait être intéressante dans le but d'appuyer les relations structure activité définies et de proposer un pharmacophore. Une meilleure sélection d'actifs pourrait être réalisée après une étude de l'affinité des meilleures molécules pour le site actif de la tyrosinase. Malheureusement, une telle étude n'est pas réalisable dans un proche avenir, car la structure de la tyrosinase humaine n'est pas encore parfaitement connue.

Les molécules les plus actives issues de cette étude vont devoir subir d'autres tests comme par exemple des tests d'innocuité, de stabilité ou de formulation avant une éventuelle mise sur le marché. Ces produits étant destinés à une application cutanée, des études d'absorption percutanée peuvent présenter un intérêt dans un argumentaire d'efficacité. Ces études peuvent être réalisées *in vitro* sur des biopsies de peau ou des modèles de peau reconstruite, à l'aide de dispositifs de diffusion appropriés comme les cellules de Franz. Ces expériences sont plutôt longues et ne peuvent être appliquées à un grand nombre de molécules. En revanche, une prédiction théorique de l'absorption cutanée d'après la structure d'une molécule, peut permettre d'accélérer le processus d'identification d'un principe actif à usage topique. L'absorption percutanée d'une entité chimique peut être influencée par ses facteurs physico-chimiques, comme son poids moléculaire, son coefficient de partage ($\log P$), son degré d'ionisation et son potentiel donneur ou accepteur de liaisons hydrogènes.

CHAPITRE 4: PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

4.1 MATERIEL ET METHODES

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice Macherey-Nagel POLYGRAM® SIL/UV sur support aluminium ou plastique de 0,20 mm d'épaisseur.

Les purifications sur colonne ont été effectuées en utilisant un gel de silice Merck (silica gel 60, 200-400 mesh) ou à l'aide d'une silice Macherey-Nagel (CHROMABOND® Sorbenz C-18) en phase inverse.

Les purifications par chromatographie préparative ont été réalisées sur des plaques (20 x 20 cm) de gel de silice Merck Kieselgel 60 PF 254.

Les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C ont été enregistrés respectivement à 400 MHz et 100 MHz sur un appareil BRUKER AVANCE 400. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en ppm par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne.

Les spectres RMN ^{31}P sont enregistrés à 400 MHz sur le même appareil, mais en utilisant cette fois-ci l'acide phosphorique comme étalon interne.

Les abréviations utilisées pour les interprétations des spectres RMN sont les suivantes : s, singulet ; sl, singulet large ; d, doublet ; dd, doublet dédoublé ; t, triplet ; td, triplet dédoublé ; q, quadruplet ; m, multiplet. Notons ici que l'interprétation de certains spectres 1D (^1H et ^{13}C) a nécessité des spectres 2D, de type COSY et HMQC qui ont été effectués sur l'appareil précédemment cité.

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil JEOL HX-110 en utilisant comme techniques d'ionisation : l'impact électronique, l'ionisation chimique, la désorption ionisation chimique, l'électrospray et le FAB en mode positif.

Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus auprès du CRMPO (Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest, Rennes) à l'aide d'un spectromètre Varian MAT 311 en utilisant l'impact électronique et l'électrospray comme techniques d'ionisation.

Les analyses élémentaires ont été déterminées par le département analytique du CNRS à Vernaison (France).

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil BUCHI 510 et ne sont pas corrigés.

Les spectres infra-rouges ont été enregistrés sur un appareil BRUKER VECTOR 22 , en utilisant soit la technique d'inclusion en pastille de bromure de potassium (KBr) pour les produits solides, soit entre deux pastilles de chlorure de sodium (NaCl) pour les huiles.

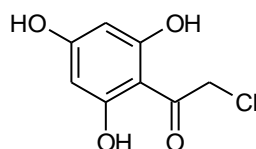
Les spectres UV ont été réalisés dans le méthanol sur un spectrophotomètre UV-Visible HELIOS γ Thermospectronic en mode balayage entre 190 et 500 nm.

Les produits chimiques ont été fournis par Aldrich, Fluka, Acros ou Avocado et sont utilisés sans purification supplémentaire.

4.2 PROTOCOLES DE SYNTHÈSE

4.2.1 Synthèse des aures

2', 4', 6'-Trihydroxy-2-chloroacétophénone (**1a**) :



A une solution de phloroglucinol (5 g ; 39,6 mmol) dans de l'éther (150 mL), sont successivement ajoutés du chloroacétonitrile (2,5 mL ; 39,5 mmol) et du chlorure de zinc préalablement séché à l'étuve (0,54 g ; 3,96 mmol). L'ensemble est refroidi à 0°C sous agitation à l'aide d'un bain de glace et de l'acide chlorhydrique est barboté dans le milieu pendant une heure. Le milieu est conservé une nuit entre 0 et 4°C et on y fait barboter à nouveau de l'acide chlorhydrique pendant une demi heure. Le précipité formé (l'imine) est récupéré par filtration et lavé 3 fois avec un minimum d'éther.

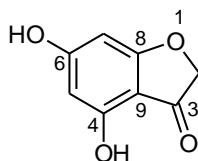
Le précipité est solubilisé dans de l'acide chlorhydrique 1N (100 mL) et la solution obtenue est portée à reflux pendant une heure. Le milieu est ramené à température ambiante ; le précipité orange formé est récupéré par filtration et lavé 3 fois avec de l'eau. Le filtrat est extrait par de l'acétate d'éthyle, la phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Les 2 précipités sont mélangés et séchés sous vide.

$C_8H_7ClO_4$. M = 202. Rdt : 75%. Pf : 184-186°C.

RMN 1H (DMSO- d_6): δ 10,56 (sl, 2 H, OH) ; 10,53 (sl, 1H, OH) ; 6,15 (s, 2H, H-3', H-5') ; 4,53 (s, 2H, CH₂Cl).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 194,7 (C-1) ; 165,6 (C-4') ; 164,0 (C-2') ; 102,6 (C-1') ; 94,8 (C-3', C-5') ; 50,8 (C-2).

4,6-Dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (**2a**):



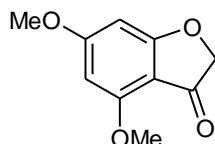
A une suspension de 2', 4', 6'-trihydroxy-2-chloroacétophénone **1a** (6,05 g ; 29,8 mmol) dans du méthanol (100 mL) est ajouté du méthylate de sodium (5,88 g ; 109,1 mmol).

La solution obtenue est agitée environ 10 minutes à froid, puis portée à reflux pendant 1h 30. Après retour à température ambiante, le milieu est acidifié (pH = 2-3) avec une solution d'HCl 1N et évaporé. Le résidu obtenu est repris par de l'acétate d'éthyle (100 mL) ; la phase organique est lavée avec de l'eau, une solution saturée de chlorure de sodium, puis séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec pour donner le produit attendu sous forme d'une poudre orange.

$C_8H_6O_4$. M = 166. Rdt = 79%.

RMN 1H (DMSO- d_6): δ 5,90 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 5,89 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 4,52 (s, 2H, H-2)

4,6-Diméthoxybenzofuran-3(2H)-one (3a):



A une solution de 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **2a** (2 g, 12,04 mmol) dans du DMF (30 mL) sont ajoutés du carbonate de potassium (4,09 g, 0,029 mmol) et de l'iodure de méthyle (1,84 mL, 4,20 g). Le mélange obtenu est chauffé pendant 1h (150°C), ramené à température ambiante, mélangé à de l'eau (30 mL) et extrait par de l'acétate d'éthyle (2 x 60 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec pour donner une huile marron. Le produit est isolé sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / cyclohexane 4).

$C_{10}H_{10}O_4$. M = 194. Rdt = 56%

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ 6,14 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-7) ; 6,00 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-5) ; 4,56 (s, 2H, H-2) ; 3,89 (s, 3H, OCH_3), 3,85 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ 194,6 (C-3) ; 177,4 (C-6) ; 169,8 (C-4) ; 158,9 (C-8) ; 104,8 (C-9) ; 93,1 (C-5) ; 88,9 (C-7) ; 75,6 (C-2) ; 56,06 (OCH_3) ; 56,04 (OCH_3).

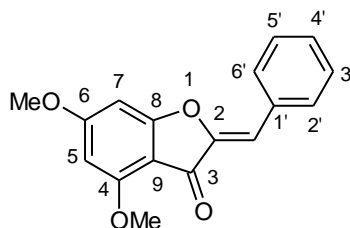
Analyse élémentaire ($C_{10}H_{10}O_4$) calculé C: 61,85 ; H: 5,19 trouvé C: 61,69 ; H: 5,21

4.2.1.1 4,6-Diméthoxyaurones

A une solution de 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one **3a** (0,77 mmol), dans du méthanol (20 mL), sont successivement ajoutés une solution de potasse à 50% (1,5 mL ; 13,38 mmol) et un benzaldéhyde (1,5 éq.). La solution obtenue est portée à reflux pendant 1 h.

Après retour à température ambiante, le méthanol est évaporé et le résidu obtenu repris par de l'eau (25 mL). La solution obtenue est acidifiée (pH = 1-2) à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2N, puis extraite 3 fois par de l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée sous vide.

(Z)-2-Benzylidène-4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one (4a):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune pâle après chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 3 / cyclohexane 1).

$C_{17}H_{14}O_4$. M = 282. Rdt = 80%. Pf = 154°C. Rf = 0.59 (Acétate d'éthyle 3 / cyclohexane 1)

UV (MeOH) : λ_{max} = 207, 364 et 370 nm

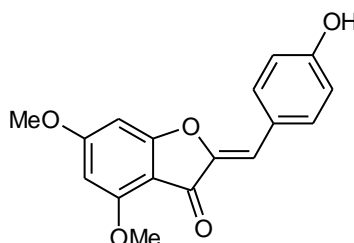
RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,87-7,35 (m, 5H, Phényl) ; 6,76 (s, 1H, =CH-) ; 6,39 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H-7), 6,14 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H-5) ; 3,95 (s, 3H, OCH_3) ; 3,91 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 180,73 (C-3) ; 169,10 (C-6) ; 169,01 (C-4) ; 159,45 (C-8) ; 147,88 (C-2) ; 132,60 (C-1') ; 131,12 (C-3', C5') ; 129,33 (C-2', C-6') ; 129,75 (C-4') ; 110,79 (=CH-) ; 105,24 (C-9) ; 94,07 (C-5) ; 89,26 (C-7) ; 56,24 (OCH_3) ; 56,14 (OCH_3).

SM (EI): m/z 282 [M] $^+$. SMHR ($C_{17}H_{14}O_4$) calculé 282,08921 ; trouvé 282,0882.

Analyse élémentaire ($C_{17}H_{14}O_4$) calculé C : 72,33 ; H : 5 trouvé C : 71,27 ; H : 5,06.

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(4-hydroxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4b) :



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / cyclohexane 4).

$C_{17}H_{14}O_5$. M = 298. Rdt = 85%. Pf = 260°C

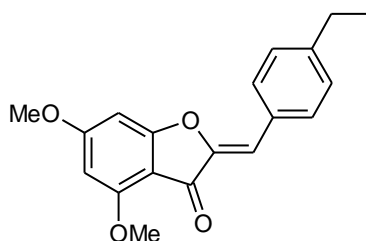
RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 7,82 (d, 2 H, $J = 8,6$ Hz, H-2', H-6') ; 6,93 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-3', H-5') ; 6,58 (s, 1 H, =CH-) ; 6,56 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H-7) ; 6,29 (d, 1 H, $J = 1,7$ Hz, H-5) ; 3,96 (s, 3H, OCH₃) ; 3,92 (s, 3H, OCH₃).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 179,27 (C-3) ; 168,94 (C-6) ; 168,30 (C-4) ; 160,71 (C-4') ; 159,18 (C-8) ; 145,86 (C-2) ; 133,56 (C-2', C-6') ; 122,80 (C-1') ; 116,74 (C3', C5') ; 111,22 (=CH-) ; 104,83 (C-9) ; 94,7 (C-5) ; 90,20 (C-7) ; 56,90 (OCH₃) ; 56,53 (OCH₃).

SM (ED): m/z 298 [M]⁺. SMHR (C₁₇H₁₄O₅) calculé 298,08412 ; trouvé 298,0862.

Analyse élémentaire (C₁₇H₁₄O₅) calculé C : 68,44 ; H : 4,74 trouvé C : 67,71 ; H : 5,72.

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(4-éthylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4c):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune pâle après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

C₁₉H₁₈O₄. M = 310. Rdt = 82%. Pf = 170°C

UV (MeOH): λ_{max} = 203 et 371 nm

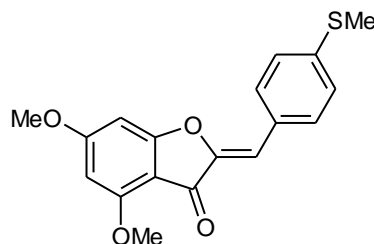
RMN ^1H (CDCl₃): δ 7,79 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-2', H-6') ; 7,26 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-3', H-5') ; 6,77 (s, 1H, =CH-) ; 6,38 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-7) ; 6,13 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-5) ; 3,95 (s, 3H, OCH₃) ; 3,91 (s, 3H, OCH₃) ; 2,68 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂) ; 1,26 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz, CH₃).

RMN ^{13}C (CDCl₃): δ 181,02 (C-3) ; 168,88 (C-4, C-6) ; 159,40 (C-8) ; 147,51 (C-2) ; 146,08 (C-4') ; 131,25 (C-2', C-6') ; 130,03 (C-1') ; 128,40 (C-3', C-5') ; 111,10 (=CH-) ; 106,60 (C-9) ; 93,99 (C-5) ; 89,21 (C-7) ; 56,23 (OCH₃) ; 56,12 (OCH₃) ; 28,90 (CH₂) ; 15,37 (CH₃).

SM (ED): m/z 310 [M]⁺. SMHR (C₁₉H₁₈O₄) calculé 310,12051 ; trouvé 310,1214.

Analyse élémentaire (C₁₉H₁₈O₄) calculé C : 73,53 ; H : 5,85 trouvé C : 71,85 ; H : 5,84

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(4-méthylthiobenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4d):



Le produit est isolé sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5).

$C_{18}H_{16}O_4S$. M = 328. Rdt = 63%. Pf = 157°C

UV (MeOH): λ_{max} = 205, 260 et 399 nm.

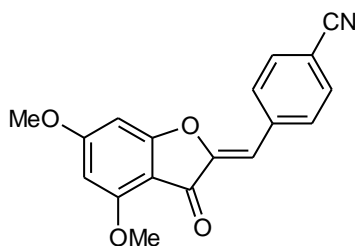
RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,78 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-6', H-2') ; 7,27 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H-3', H-5') ; 6,73 (s, 1H, =CH-) ; 6,45 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-7) ; 6,14 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-5) ; 3,95 (s, 3H, OCH_3) ; 3,91 (s, 3H, OCH_3) ; 2,52 (s, 3H, SCH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 180,54 (C-3) ; 168,88 (C-6) ; 168,83 (C-4) ; 159,37 (C-8) ; 147,56 (C-2) ; 140,93 (C-4') ; 131,39 (C-2', C-6') ; 129,07 (C-1') ; 125,88 (C-3', C-5') ; 110,49 (=CH-) ; 105,30 (C-9) ; 94,01 (C-5) ; 89,22 (C-7) ; 56,22 (OCH_3) ; 56,13 (OCH_3) ; 15,13 (SCH_3) ;

SM (ED): m/z 328 $[M]^+$. SMHR ($C_{18}H_{16}O_4S$) calculé 328,07693 ; trouvé 328,0790.

Analyse élémentaire ($C_{18}H_{16}O_4S$) calculé C : 65,84 ; H : 4,91 trouvé C : 65,01 ; H : 5,05

(Z)-2-(4-Cyanobenzylidène)-4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one (4e):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre orange après filtration du milieu réactionnel.

$C_{18}H_{13}NO_4$ M = 307. Rdt = 65%. Pf = 228°C. Rf = 0,53 (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4)

UV (MeOH) : 203, 213, 312 et 370 nm.

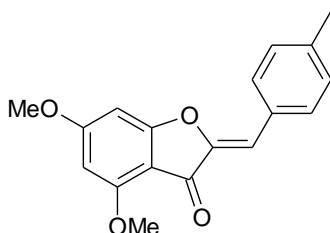
RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,93 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-3', H-5') ; 7,69 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-2', H-6') ; 6,70 (s, 1H, =CH-) ; 6,40 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-7) ; 6,18 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-5) ; 3,97 (s, 3H, OCH_3) ; 3,93 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 180,21 (C-3) ; 169,52 (C-6) ; 169,12 (C-4) ; 159,70 (C-8) ; 149,37 (C-2) ; 137,18 (C-1') ; 132,39 (C-3', C-5') ; 131,15 (C-2', C-6') ; 118,71 (CN) ; 112,02 (C-4') ; 107,91 (=CH-) ; 104,81 (C-9) ; 94,41 (C-5) ; 89,51 (C-7) ; 56,35 (OCH_3) ; 56,27 (OCH_3).

SM (EI): m/z 307 $[\text{M}]^+$. SMHR ($\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_4$) calculé 307,08446 ; trouvé 307,0828.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_4$) calculé C : 70,35 ; H : 4,26 ; N : 4,56 trouvé C : 68,03 ; H : 4,54 ; N : 4,35

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(4-méthylbenzylidène) benzofuran-3(2H)-one (4h):

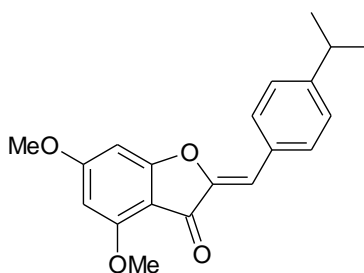


Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4$ M = 296. Rdt : 59%.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 7,71 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H-2', H-6') ; 7,18 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H-3', H-5') ; 6,71 (s, 1H, =CH-) ; 6,33 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,08 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 3,86 (s, 3H, OCH_3) ; 3,85 (s, 3H, OCH_3) ; 1,50 (s, 3H, CH_3).

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(4-isopropylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4i):

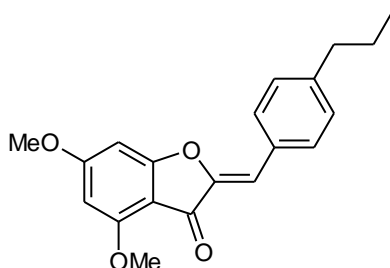


Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$. M = 324. Rdt : 78%

RMN ^1H (CDCl_3): δ 7,74 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H-2', H-6') ; 7,23 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H-3', H-5') ; 6,71 (s, 1H, =CH-) ; 6,33 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,07 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 3,89 (s, 3H, OCH_3) ; 3,85 (s, 3H, OCH_3) ; 2,88 (m, 1H, CH) ; 1,21 (d, 6H, $J = 5,2$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$).

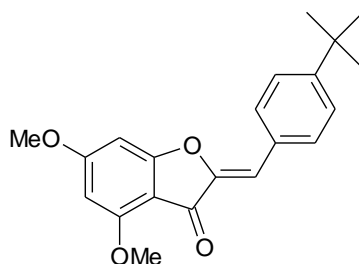
(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(4-propylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4k):



$C_{20}H_{20}O_4$. M = 324. Rdt = 69%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,82 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 7,19 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,71 (s, 1H, =CH-) ; 6,33 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,08 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 3,88 (s, 3H, OCH_3) ; 3,86 (s, 3H, OCH_3) ; 2,58 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, Ph- CH_2) ; 1,62 (m, 2H, CH_2) ; 0,91 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz, CH_3).

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(4-tert-butylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4j):

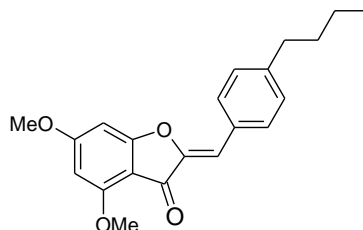


Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

$C_{21}H_{22}O_4$. M = 338. Rdt : 63%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,79 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 7,39 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,72 (s, 1H, =CH-) ; 6,32 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,07 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 3,89 (s, 3H, OCH_3) ; 3,85 (s, 3H, OCH_3) ; 1,27 (s, 9H, *t*Bu).

(Z)-2-(4-Butylbenzylidène)-4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one (4l):

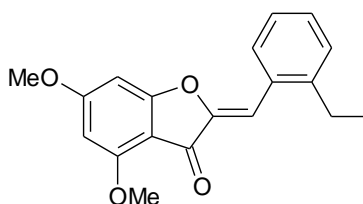


Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5).

$C_{21}H_{22}O_4$. M = 338. Rdt : 70%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,89 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 7,26 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,56 (s, 1H, =CH-) ; 6,31 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-7) ; 6,11 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 3,89 (s, 3H, OCH_3) ; 3,86 (s, 3H, OCH_3) ; 2,59 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, Ph- CH_2) ; 1,58 (m, 2H, CH_2) ; 1,29 (m, 2H, CH_2) ; 0,88 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz, CH_3).

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(2-éthylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4m):

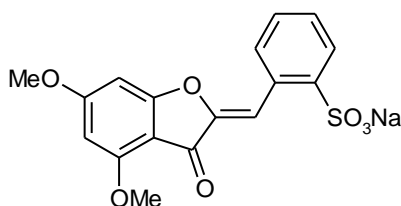


Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5).

$C_{19}H_{18}O_4$ M = 310 Rdt : 85%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 8,10 (m, 1H, H-4') ; 7,25 (m, 3H, H-3', H-5', H-6') ; 6,79 (s, 1H, =CH-) ; 6,26 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 3,90 (s, 3H, OCH_3) ; 3,85 (s, 3H, OCH_3) ; 2,80 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_2) ; 1,18 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz, CH_3).

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(2-sulfonylatebenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4f):



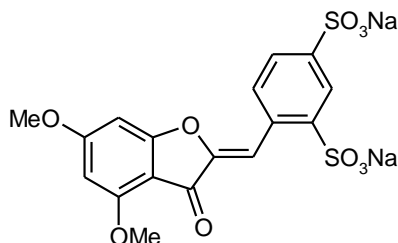
Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après filtration du milieu réactionnel.

$C_{17}H_{13}NaO_7S$. $M = 384$. Rdt = 86%. Pf = > 300°C

RMN 1H (DMSO- d_6): δ 8,10 (dd, 1H, $J = 1,2$ Hz, $J = 7,6$ Hz, H-6') ; 7,81 (dd, 1H, $J = 1,2$ Hz, $J = 7,6$ Hz, H-3') ; 7,80 (s, 1H, =CH-) ; 7,36 (td ; $J = 1,2$ Hz, $J = 7,6$ Hz, H-4') ; 7,28 (td, 1H, $J = 1,2$ Hz, $J = 7,6$ Hz, H-5') ; 6,63 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-7) ; 6,27 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 3,89 (s, 3H, OCH₃) ; 3,86 (s, 3H, OCH₃).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 179,65 (C-3) ; 169,32 (C-6) ; 168,80 (C-4) ; 159,40 (C-8) ; 148,45 (C-2') ; 147,37 (C-2) ; 131,47 (C-6') ; 129,47 (C-5') ; 129,37 (C-4') ; 128,90 (C-3') ; 127,65 (=CH-) ; 109,27 (C-1') ; 104,60 (C-9) ; 94,86 (C-5) ; 90,33 (C-7) ; 56,98 (OCH₃) ; 56,63 (OCH₃). SM (FAB, matrice glycérol): m/z 385 [M+H]⁺. SMHR ($C_{17}H_{13}O_7NaSK$) calculé 422,9917 ; trouvé 422,9918

(Z)-4,6-Diméthoxy-2-(2,4-disulfonylatebenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (4g):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après filtration du milieu réactionnel.

$C_{17}H_{12}Na_2O_{10}S_2$. $M = 486$. Rdt = 96%. Pf > 280°C

RMN 1H (DMSO- d_6): δ 8,09 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-3') ; 8,05 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-6') ; 7,75 (s, 1H, =CH-) ; 7,55 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz, H-5') ; 6,64 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,26 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 3,82 (s, 3H, OCH₃) ; 3,84 (s, 3H, OCH₃).

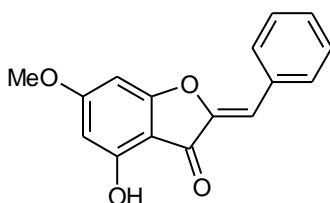
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ 179,63 (C-3) ; 169,33 (C-6), 168,81 (C-4) ; 159,37 (C-8) ; 148,34 (C-2' ou C-4') ; 148,01 (C-2' ou C-4') ; 147,49 (C-2) ; 130,93 (C-6') ; 129,45 (C-1') ; 126,15 (C-5') ; 125,35 (C-3') ; 108,82 (=CH-) ; 104,57 (C-9) ; 94,95 (C-5) ; 90,37 (C-7) ; 57,00 (OCH₃) ; 56,62 (OCH₃).

SM (FAB matrice NBA): m/z 487 [MH]⁺

4.2.1.2 4-Hydroxy-6-méthoxyaurones

A une solution de 4,6-diméthoxyaurone dans un minimum dichlorométhane est ajoutée une solution molaire de tribromure de bore dans du dichlorométhane (4 éq). Le mélange obtenu est agité 20 h à température ambiante. Il est ensuite versé dans 30 mL d'eau glacée et l'ensemble est extrait par de l'acétate d'éthyle (3x30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec.

(Z)-2-Benzylidène-4-hydroxy-6-méthoxybenzofuran-3(2H)-one (5a):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune.

IR (KBr) : 1705-1672 ($\nu_{C=O}$) ; 1230-1220 (ν_{C-O}).

$C_{16}H_{12}O_4$. M = 268. Rdt = 90%. Pf = 195°C

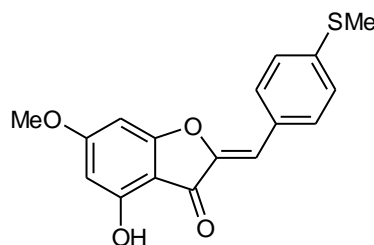
UV (MeOH): λ_{max} = 203, 314 et 371 nm.

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,43-7,89 (m, 5H, Phényle) ; 6,76 (s, 1H, =CH-) ; 6,34 (d, 1H, J = 1,7 Hz, H-7) ; 6,16 (d, 1H, J = 1,7 Hz, H-5) ; 3,89 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 183,2 (C-3) ; 169,85 (C-6) ; 166,50 (C-4) ; 157,78 (C-8) ; 147,65 (C-2) ; 132,17 (C-1') ; 131,37 (C-3', C-5') ; 129,82 (C-4') ; 128,91 (C-2', C-6') ; 111,85 (=CH-) ; 104,5 (C-9) ; 96,20 (C-5) ; 90,56 (C-7) ; 56,27 (OCH_3).

SM (EI): m/z 268 [M] $^+$. SMHR ($C_{16}H_{12}O_4$) calculé 268,07356 ; trouvé 268,0721

(Z)-4-Hydroxy-6-méthoxy-2-(4-méthylthiobenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (5d) :



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est un mélange (Acétate d'éthyle 5/ Cyclohexane 5).

$C_{17}H_{14}O_4S$. M = 314. Rdt = 26%. Pf = 162°C

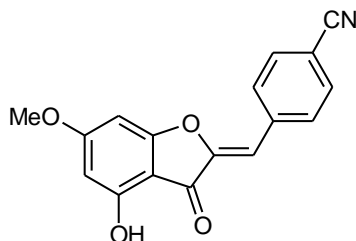
UV (MeOH): λ_{max} = 204 et 397 nm.

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,72 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-2', H-6') ; 7,21 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3', H-5') ; 6,65 (s, 1H, =CH-) ; 6,27 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 3,83 (s, 3H, OCH_3) ; 2,46 (s, 3H, SCH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 183,48 (C-3) ; 169,70 (C-6) ; 166,25 (C-4) ; 157,72 (C-8) ; 147,29 (C-2) ; 141,72 (C-4') ; 131,63 (C2', C6') ; 128,59 (C-1') ; 125,88 (C-3', C-5') ; 111,61 (=CH-) ; 104,26 (C-9) ; 96,14 (C-5) ; 90,51 (C-7) ; 56,25 (OCH_3) ; 15,08 (SCH_3).

SM (ED): m/z 314 $[M]^+$. SMHR ($C_{17}H_{14}O_4S$) calculé 314,06128 ; trouvé 314,0608.

(Z)-2-(4-Cyanobenzylidène)-4-hydroxy-6-méthoxybenzofuran-3(2H)-one (5e):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est un mélange Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5.

$C_{17}H_{11}NO_4$. M = 293. Rdt = 39%. Pf = 240°C

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,89 (d, 2H, J = 8 Hz, H-2', H-6') ; 7,66 (d, 2H, J = 8 Hz, H-3', H-5') ; 6,63 (s, 1H, =CH-) ; 6,30 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,12 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 3,84 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 185,50 (C-3) ; 174,67 (C-6) ; 172,5 (C-4) ; 164,70 (C-8) ; 155,33 (C-2) ; 140,92 (C-1') ; 134,67 (C-3', C-5') ; 133,2 (C-2', C-6') ; 122,66 (CN) ; 118,25 (C-4') ; 111,65 (=CH-) ; 109,43 (C-9) ; 99,04 (C-5) ; 94,35 (C-7) ; 61,02 (OCH_3). SM (EI) m/z 293 $[MH]^+$. SMHR ($C_{17}H_{11}NO_4$) calculé 293,06881 ; trouvé 293,0675.

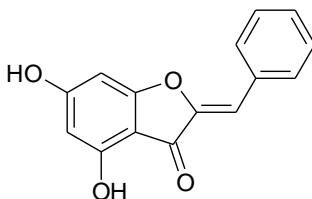
4.2.1.3 4,6-Dihydroxyaurones

A une solution de 4,6-diméthoxyaurone dans du dichlorométhane (1 mL) est ajouté du tribromure de bore (20 à 30 éq) ; le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 20 h. De l'eau glacée est ensuite versée goutte à goutte dans le milieu et la suspension ainsi

formée est extraite par de l'acétate d'éthyle (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec.

IR (pastille KBr) : 3252-3200 (ν_{OH}) ; 1705-1681 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1251-1206 ($\nu_{\text{C-O}}$).

(Z)-2-Benzylidène-(4,6-dihydroxy) benzofuran-3(2H)-one (6a):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$. M = 254. Rdt : 40%. Pf = 252°C

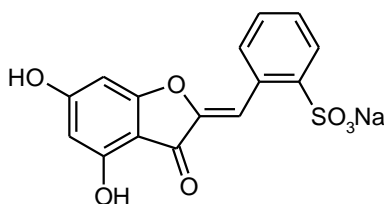
UV (MeOH): λ_{max} = 206, 218, 314, 370 nm.

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,87 (2H, Phényle) ; 7,42 (m, 2H, phényle) ; 7,35 (m, 1H, phényle) ; 6,57 (s, 1H, =CH-) ; 6,30 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 181,33 (C-3) ; 168,7 (C-4, C-6) ; 148,5 (C-2, C-8) ; 132,5 (C-1') ; 130,91 (C-3', C-5') ; 129,26 (C-4') ; 128,86 (C-2', C-6') ; 109,58 (C-9) ; 109,01 (=CH-) ; 91,8 (C-5) ; 89,8 (C-7). SM (EI) m/z $[\text{M}]^+$. SMHR ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4\text{-H}$) calculé 253,05008 ; trouvé 253,0517.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$) calculé C : 70,86 ; H : 3,96 trouvé C:70,85 ; H: 4,74.

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(2-sulfonylatebenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6f):



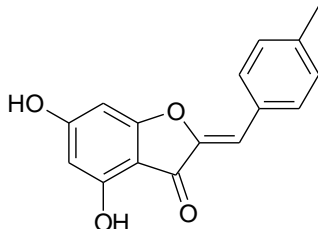
$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{NaO}_7\text{S}$. M = 356. Rdt = 44%. Pf > 300°C

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 8,21 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-6') ; 7,99 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-3') ; 7,73 (s, 1H, =CH-) ; 7,47 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-5') ; 7,35 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-4') ; 6,13 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 5,97 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 182,39 (C-3) ; 168,17 (C-6) ; 167,47 (C-4) ; 157,62 (C-8) ; 148,40 (C-2') ; 141,43 (C-2) ; 132,10 (C-6') ; 131,49 (C-5') ; 129,25 (C-4') ; 128,75 (C-3') ; 127,10 (=CH-) ; 107,24 (C-1') ; 103,31 (C-9) ; 100,3 (C-5) ; 91,55 (C-7).

SM (ES) m/z 333 $[M-Na]^+$

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-méthylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6h):



$C_{16}H_{12}O_4$. M = 268. Rdt : 98%. Pf = 250-252°C

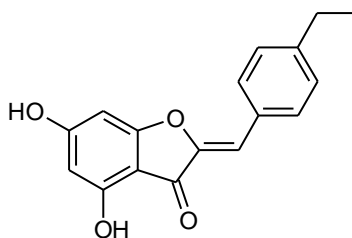
UV (MeOH): λ_{max} = 202, 221, 319 et 371 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 9,78 (s, 1H, OH) ; 9,05 (sl, 1H, OH) ; 7,75 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-2', H-6') ; 7,23 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3', H-5') ; 6,55 (s, 1H, =CH-) ; 6,29 (d, 1H, J = 2 Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, J = 2 Hz, H-5) ; 2,31 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,69 (C-3) ; 167,61 (C-6) ; 167,39 (C-4) ; 157,94 (C-8) ; 147,46 (C-2) ; 139,65 (C-4') ; 130,97 (C-3', C-5') ; 129,86 (C-1') ; 129,56 (C-2', C-6') ; 109,31 (=CH-) ; 103,26 (C-9) ; 97,75 (C-5) ; 91,19 (C-7) ; 20,59 (CH_3). SM (EI): m/z 268 $[M]^+$. SMHR ($C_{16}H_{12}O_4$) calculé 268,07356 ; trouvé 268,0721.

Analyse élémentaire ($C_{16}H_{12}O_4$) calculé C : 71,64 ; H : 4,51 ; trouvé C : 71,59 ; H : 4,72

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-éthylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6c):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est un mélange Acétate d'éthyle 5/ Cyclohexane 5.

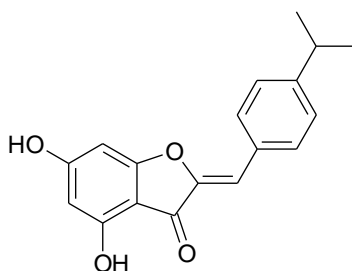
$C_{17}H_{14}O_4$. M = 282. Rdt = 65%. Pf = 230-232°C

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 7,80 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-2', H-6') ; 7,27 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3', H-5') ; 6,56 (s, 1H, =CH-) ; 6,29 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 2,62 (q, 2H, J = 7,6 Hz, CH_2) ; 1,20 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH_3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,79 (C-3) ; 167,64 (C-4, C-6) ; 157,99 (C-8) ; 147,53 (C-2) ; 145,95 (C-4') ; 131,09 (C-2', C-6') ; 130,10 (C-1') ; 128,37 (C-3', C-5') ; 109,42 (=CH-) ; 103,28 (C-9) ; 97,82 (C-5) ; 91,24 (C-7) ; 28,96 (CH_2) ; 14,88 (CH_3). SM (DCI) m/z 283 $[\text{MH}]^+$.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4$) calculé C : 72,33 ; H : 5,00 trouvé C : 72,02 ; H : 5,30

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-isopropylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6i):



$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4$. M = 296. Rdt : 80%. Pf = 218°C

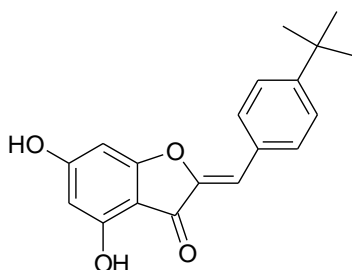
UV (MeOH): λ_{max} = 204, 320 et 380 nm.

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 9,8 (s, 1H, OH) ; 9,05 (s, 1H, OH) ; 7,79 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-2', H-6') ; 7,31 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3', H-5') ; 6,56 (s, 1H, =CH-) ; 6,29 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 2,88 (m, 1H, CH) ; 1,22 (d, 6H, J = 5,6 Hz, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,31 (C-3) ; 167,56 (C-6) ; 158,39 (C-4) ; 157,97 (C-8) ; 147,54 (C-2) ; 131,11 (C-2', C-6') ; 130,27 (C-4') ; 126,93 (C-3', C-5') ; 126,21 (C-1') ; 120,11 (C-9) ; 109,28 (=CH-) ; 97,80 (C-5) ; 91,21 (C-7) ; 33,92 (CH) ; 23,17 (2x CH_3). SM (EI): m/z 296 $[\text{M}]^+$. SMHR ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4$) calculé 296,10486 ; trouvé 296,0787.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4$) calculé C : 72,96 ; H : 5,44 trouvé C : 71,48 ; H : 5,24

(Z)-tert-Butylbenzylidène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (6j):



$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$. M = 310. Rdt : 93%. Pf = 218°C

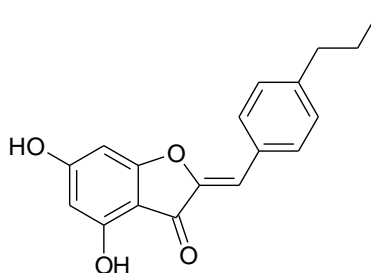
UV (MeOH): λ_{max} = 206, 317 et 371 nm.

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,82 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2', H-6') ; 7,46 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-3', H-5') ; 6,56 (s, 1H, =CH-) ; 6,29 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,10 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 1,27 (s, 9H, *t*Bu).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,73 (C-3) ; 167,74 (C-6) ; 158,05 (C-4) ; 152,60 (C-8) ; 147,71 (C-2) ; 130,82 (C-2', C-6') ; 129,88 (C-4') ; 125,79 (C-3', C-5') ; 125,17 (C-1') ; 109,21 (=CH-) ; 103,22 (C-9) ; 97,84 (C-5) ; 91,11 (C-7) ; 34,52 (C(CH $_3$) $_3$). SM (EI): m/z 296 [M] $^+$. SMHR (C $_{19}$ H $_{18}$ O $_4$) calculé 310,12051 ; trouvé 310,1191.

Analyse élémentaire (C $_{19}$ H $_{18}$ O $_4$) calculé C : 73,53 ; H : 5,85 trouvé C : 70,16 ; H : 5,90

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-propylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6k):



C $_{18}$ H $_{16}$ O $_4$. M = 296. Rdt : 89%. Pf = 232-234°C

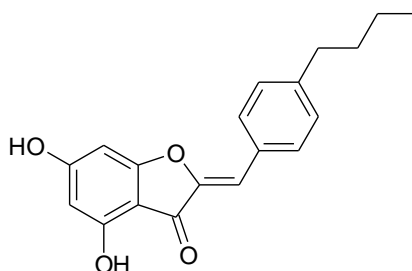
UV (MeOH): λ_{max} = 204, 320 et 382 nm.

Analyse élémentaire (C $_{18}$ H $_{16}$ O $_4$) calculé C : 72,96 ; H : 5,44 trouvé C:71,35 ; H: 5,61.

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,87 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 7,25 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,56 (s, 1H, =CH-) ; 6,29 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 2,59 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, Ph-CH $_2$) ; 1,60 (m, 2H, CH $_2$) ; 0,91 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz, CH $_3$).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,67 (C-3) ; 167,64 (C-6, C-4) ; 157,85 (C-8) ; 147,52 (C-2) ; 144,38 (C-4') ; 130,99 (C-2', C-6') ; 130,15 (C-1') ; 129,00 (C-3', C-5') ; 109,31 (=CH-) ; 103,23 (C-9) ; 97,74 (C-5) ; 91,15 (C-7) ; 37,59 (CH $_2$) ; 24,25 (CH $_2$) ; 13,13 (CH $_3$). SM (EI) m/z 296 [M] $^+$. SMHR (C $_{18}$ H $_{16}$ O $_4$) calculé 296,10486 trouvé 296,1024.

(Z)-2-(4-Butylbenzylidène)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (6l):



$C_{19}H_{18}O_4$. M = 310. Rdt : 80%. Pf = 228°C

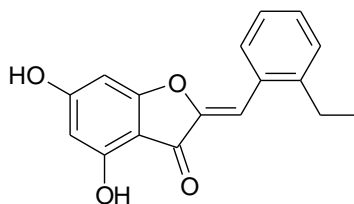
UV (MeOH): λ_{max} = 204, 325, et 371 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 7,81 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-2', H-6') ; 7,26 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3', H-5') ; 6,56 (s, 1H, =CH-) ; 6,30 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 2,60 (t, 2H, J = 7,6 Hz, CH_2) ; 1,56 (m, 2H, CH_2) ; 1,31 (m, 2H, CH_2) ; 0,87 (t, 3H, J = 7,6 Hz, CH_3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,67 (C-3) ; 167,85 (C-4, C-6) ; 158,5 (C-8) ; 147,52 (C-2) ; 144,61 (C-4') ; 131,00 (C-2', C-6') ; 130,11 (C-1') ; 128,96 (C-3', C-5') ; 109,30 (=CH-) ; 103,55 (C-9) ; 97,75 (C-5) ; 91,11 (C-7) ; 35,23 (CH_2) ; 33,36 (CH_2) ; 22,07 (CH_2) ; 13,28 (CH_3). SM (EI) m/z 310 [M] $^+$. SMHR ($C_{19}H_{18}O_4$) calculé 310,12051 ; trouvé 310,1205.

Analyse élémentaire ($C_{19}H_{18}O_4$) calculé C: 73,53 ; H: 5,85 trouvé C: 73,19 ; H: 6,19

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(2-éthylbenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6m):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est un mélange Acétate d'éthyle 5/ Cyclohexane 5.

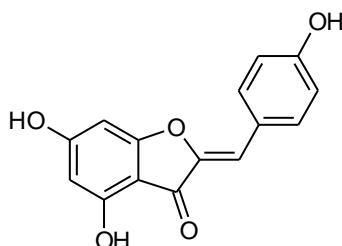
$C_{17}H_{14}O_4$. M = 282. Rdt : 84%. Pf = 208-210°C

UV (MeOH): λ_{max} = 203, 321 et 376 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6) : δ 8,09 (m, 1H, H-4') ; 7,25 (m, 3H, H-3', H-5', H-6') ; 6,79 (s, 1H, =CH-) ; 6,26 (d, 1H, J = 2 Hz, H-7) ; 6,09 (d, 1H, J = 2 Hz, H-5) ; 2,80 (q, 2H, J = 7,6 Hz, CH_2) ; 1,22 (t, 3H, J = 7,6 Hz, CH_3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,67 (C-3) ; 167,84 (C-6) ; 167,66 (C-4) ; 158,07 (C-8) ; 148,18 (C-2) ; 144,50 (C-2') ; 130,81 (C-4') ; 130,13 (C-1') ; 129,42 (C-6') ; 129,14 (C-3') ; 126,29 (C-5') ; 105,53 (=CH-) ; 103,19 (C-9) ; 97,82 (C-5) ; 91,23 (C-7) ; 59,65 (CH_2) ; 15,32 (CH_3).
SM (EI) m/z 282 $[\text{MH}]^+$.

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-hydroxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6b):



Le *p*-hydroxybenzaldéhyde (110 mg, 0,904 mmol) est solubilisé dans du méthanol (7 mL) suivi de l'acide sulfurique à 98% (48 μL , 1 éq). La solution obtenue est agitée 30 minutes à température ambiante, puis **2a** (0,904 mmol, 1 éq) est rajouté au milieu. L'ensemble est porté 2 heures à reflux. Après retour à température ambiante, le milieu est versé dans 50 mL d'eau et le mélange obtenu est extrait par de l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec.

Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6/ Cyclohexane 4, quelques gouttes d'acide acétique).

$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_5$. $M = 270$. Rdt = 31%. Pf = 295°C (décomposition)

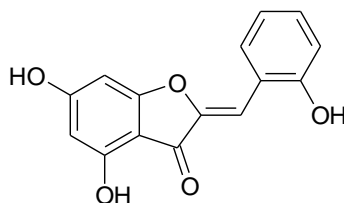
UV (MeOH): λ_{max} = 204, 226 et 391 nm.

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,82 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-2', H-6') ; 6,94 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-3', H-5') ; 6,59 (s, 1H, =CH-) ; 6,33 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H-7) ; 6,12 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H-5).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,84 (C-3) ; 167,32 (C-4, C-6) ; 158,93 (C-4') ; 157,82 (C-8) ; 146,31 (C-2) ; 133,03 (C-2', C-6') ; 124,13 (C-1') ; 115,92 (C-3', C-5') ; 109,98 (=CH-) ; 103,46 (C-9) ; 97,61 (C-5) ; 91,14 (C-7). SM (DCI) m/z 270 $[\text{MH}]^+$ SMHR ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_5$) calculé 270,05282 ; trouvé 270,0508.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_5$) calculé C : 66,67 ; H : 3,73 trouvé C: 66,23 ; H: 3,75

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(2-hydroxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6q) :



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5, quelques gouttes d'acide acétique).

$C_{15}H_{10}O_5$. M = 270. Rdt : 66%. Pf = 262-264°C

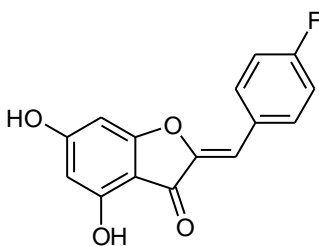
UV (MeOH): λ_{max} = 204, 306 et 394 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 8,12 (d, 1H, J = 7,2 Hz, H-6') ; 7,17 (m, 1H, H-4') ; 7,12 (s, 1H, =CH-) ; 6,90 (m, 2H, H-3', H-5') ; 6,29 (d, 1H, J = 2 Hz, H-7) ; 6,08 (d, 1H, J = 2 Hz, H-5).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,88 (C-3) ; 167,57 (C-6) ; 167,48 (C-4) ; 157,92 (C-8) ; 156,70 (C-2') ; 147,54 (C-2) ; 131,24 (C-6') ; 130,91 (C-4') ; 120,03 (=CH-) ; 119,62 (C1') ; 115,54 (C-5') ; 103,56 (C-9) ; 103,36 (C-3') ; 97,70 (C-5) ; 91,20 (C-7). SM (DCI) m/z 270 [MH] $^+$. SMHR ($C_{15}H_{10}O_5$) calculé 270,05282 ; trouvé 270,0534.

Analyse élémentaire ($C_{15}H_{10}O_5$) calculé C : 66,67 ; H : 3,73 trouvé C : 65,37 ; H : 4,61

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-fluorobenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6r):



Ce produit a été synthétisé selon le mode opératoire du produit **6b**.

Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Dichlorométhane 9 / Méthanol 1).

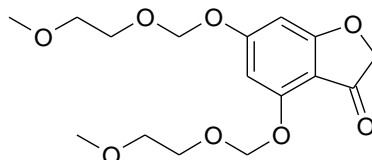
$C_{15}H_9FO_4$ M = 272 Rdt = 15,3% Pf = 266-268°C

UV (MeOH): λ_{max} = 203, 312 et 366 nm.

RMN 1H (DMSO- d_6): δ 7,88 (dd, 2H, J = 5,6 Hz, J = 8,8 Hz, H-2', H-6') ; 7,23 (t, 2H, J = 8,8 Hz, H-3', H-5') ; 6,56 (s, 1H, =CH-) ; 6,13 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,99 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 179,44 (C-3) ; 168,28 (C-6) ; 167,97 (C-4) ; 160,22 (d, $J = 248$ Hz, C-4') ; 147,91 (C-2) ; 133,35 (d, $J = 9$ Hz, C-2', C-6') ; 129,54 (C-1') ; 116,45 (d, $J = 21$ Hz, C-3', C-5') ; 107,47 (=CH-) ; 102,96 (C-9) ; 98,31 (C-5) ; 91,06 (C-7). SM (EI) m/z 272 $[\text{M}]^+$

4,6-Di-2-méthoxyéthoxyméthylbenzofuran-3(2H)-one (3b):



Une solution de 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **2a** et de *N,N*-diisopropyléthylamine (36 mmol ; 2 équ) dans du DMF anhydre (80 mL) est refroidie à 3°C à l'aide d'un bain de glace. Du chlorure de MEM [chlorure de 2-méthoxyéthoxyméthyl], (36 mmol ; 2 équ) est rajouté goutte à goutte et la solution obtenue est agitée 30 minutes à température ambiante. Le milieu est ensuite versé dans 100 mL d'eau et extrait 2 fois par de l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec.

Le produit est obtenu sous la forme d'une huile blanche après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 8 / Cyclohexane 2).

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_8$. $M = 342$. Rdt : 41%.

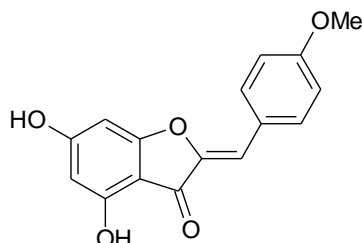
RMN ^1H (CDCl_3): δ 6,31 (m, 2H, H-5, H-7) ; 5,28 (s, 2H, O- CH_2 -O) ; 5,19 (s, 2H, O- CH_2 -O) ; 4,48 (s, 2H, H-2) ; 3,76 (m, 2H, CH_2 -O) ; 3,71 (m, 2H, CH_2 -O) ; 3,46 (m, 4H, 2x O- CH_2) ; 3,28 (s, 3H, O- CH_3) ; 3,27 (s, 3H, O- CH_3).

4.2.1.4 4'-Alkoxyaurones

A une solution de 4,6-diOMEMbenzofuran-2(2H)-one **3b** (1,02 mmol), dans du méthanol (35 mL), sont successivement ajoutés une solution aqueuse de potasse à 50 % (3,5 mL) et du *p*-anisaldéhyde (1,5 équ). La solution obtenue est portée à reflux pendant 1 h. Après retour à température ambiante le méthanol est évaporé et le résidu obtenu repris par de l'eau (25 mL). La solution obtenue est extraite 3 fois par de l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le résidu obtenu est repris par du méthanol et une solution d'acide chlorhydrique 1M dans de l'éther est rajoutée (9 mL). Le mélange obtenu est agité à environ 60 °C pendant 2 h. Après retour à température ambiante, le milieu est versé dans 40 mL d'eau et extrait par du dichlorométhane (90 mL). La

phase organique est successivement lavée avec de l'eau (2 x 100 mL), une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur sulfate de sodium avant d'être évaporée à sec.

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-méthoxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6n):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4 + quelques gouttes d'acide acétique).

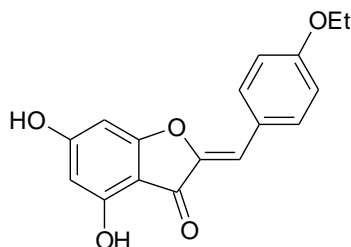
$C_{16}H_{12}O_5$. M = 284. Rdt = 20%. Pf = 208-210°C

UV (MeOH): λ_{max} = 202, 388 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 7,83 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-2', H-6') ; 6,97 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-3', H-5') ; 6,55 (s, 1H, =CH-) ; 6,28 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,07 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 3,80 (s, 3H, OCH₃).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,5 (C-3) ; 167,45 (C-6) ; 160,90 (C-4) ; 160,82 (C-4') ; 157,88 (C-8) ; 146,68 (C-2) ; 132,83 (C-2', C-6') ; 125,14 (C-1') ; 114,40 (C-3', C-5') ; 109,52 (=CH-) ; 103,37 (C-9) ; 96,78 (C-5) ; 91,15 (C-7) ; 54,86 (OCH₃). SM (EI) m/z 284 [M]⁺. SMHR ($C_{16}H_{12}O_5$) calculé 284,06847 trouvé 284,0676.

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-éthoxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6o) :



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5+quelques gouttes d'acide acétique).

$C_{17}H_{14}O_5$. M = 298. Rdt : 29%. Pf = 215-217°C

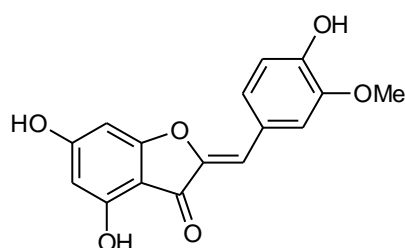
UV (MeOH): λ_{max} = 203, 224, 389 nm.

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,82 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-2', H-6') ; 6,95 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-3', H-5') ; 6,55 (s, 1H, =CH-) ; 6,28 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-7) ; 6,08 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 4,05 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2) ; 1,32 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,75 (C-3) ; 167,43 (C-6) ; 167,40 (C-4') ; 160,18 (C-4) ; 157,85 (C-8) ; 146,62 (C-2) ; 132,78 (C-2', C-6') ; 124,98 (C-1') ; 114,84 (C-3', C-5') ; 109,62 (=CH-) ; 103,39 (C-9) ; 97,66 (C-5) ; 91,14 (C-7) ; 63,37 (OCH_2) ; 14,12 (CH_3). SM (EI) m/z 298 $[\text{M}]^+$. SMHR ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$) calculé 298,08412 ; trouvé 298,0847.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$) calculé C : 68,45 ; H : 4,73 trouvé C : 65,44 ; H : 5,07

(Z)-4,6-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-méthoxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (6p):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5 + quelques gouttes d'acide acétique).

$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$. M = 300. Rdt : 16%. Pf = 262°C

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,50 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-2') ; 7,42 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8,4$ Hz, H-6') ; 6,87 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-5') ; 6,54 (s, 1H, =CH-) ; 6,29 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-7) ; 6,08 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 3,86 (OCH_3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 180,74 (C-3) ; 167,32 (C-6, C-4) ; 157,79 (C-8) ; 148,43 (C-3') ; 147,62 (C-4') ; 146,39 (C-2) ; 125,41 (C-1') ; 124,48 (C-2') ; 115,49 (C-6') ; 114,17 (C-5') ; 110,33 (=CH-) ; 103,40 (C-9) ; 97,57 (C-5) ; 91,18 (C-7) ; 55,39 (OCH_3). SM (EI) m/z 300 $[\text{M}]^+$. SMHR ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$) calculé 300,06339 trouvé 300,0632.

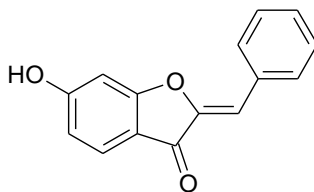
Analyse élémentaire ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$) calculé C : 64 ; H : 4,03 trouvé C : 62,61 ; H : 4,47

4.2.1.5 6-Hydroxyaurone

Le protocole utilisé est celui des 4,6-diméthoxyaurones.

IR (KBr) : 3200 (ν_{OH}) ; 1672-1644 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1243-1207 ($\nu_{\text{C-O}}$).

(Z)-2-Benzylidène-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (7a):



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune pâle après chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / cyclohexane 4).

$C_{15}H_{10}O_3$. M = 238. Rdt : 17%. Pf = 262°C

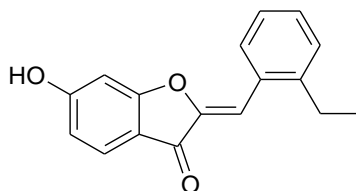
UV (MeOH): λ_{max} = 203 et 345 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 7,91 (d, 2H, J = 8,4 Hz, Phényle) ; 7,58 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-4) ; 7,42 (m, 3H, Phényle) ; 6,80 (d, 1H, J = 2 Hz, H-7) ; 6,74 (dd, 1H, J_1 = 2 Hz, J_2 = 8,4 Hz, H-5) ; 6,66 (s, 1H, =CH-).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): 181,67 (C-3) ; 166,25 (C-6) ; 158,60 (C-8) ; 147,85 (C-2) ; 132,25 (C-1') ; 131,10 (C-3' ; C-5') ; 130,83 (C-2') ; 128,89 (C-2' ; C-6') ; 128,25 (C-4') ; 125,92 (C-4) ; 113,71 (C-9) ; 112,86 (C-5) ; 110,12 (=CH-) ; 98,74 (C-7). SM (EI) m/z 238 [M] $^+$. SMHR ($C_{15}H_{10}O_3$) calculé 238,06299 ; trouvé 238,0625.

Analyse élémentaire ($C_{15}H_{10}O_3$) calculé C : 75,62 ; H : 4,23 trouvé C : 74,63 ; H : 4,86

(Z)-2-(2-Ethylbenzylidène)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (7m):



$C_{17}H_{14}O_7$. M = 266. Rdt : 90%. Pf = 235-237°C

UV (MeOH): λ_{max} = 205, 237, 296, et 369 nm.

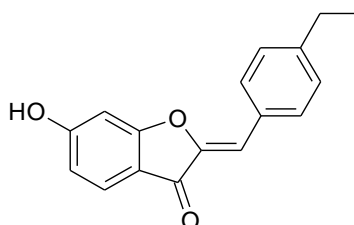
RMN 1H (DMSO- d_6): δ 7,78 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-4, H-6') ; 7,53 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-5') ; 7,26 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3' , H-4') ; 6,72 (d, 1H, J = 2 Hz, H-7) ; 6,68 (s, 1H, =CH-) ; 6,63 (dd, 1H, J = 2 Hz, J = 8,4 Hz, H-5) ; 2,55 (q, 2H, J = 7,6 Hz CH_2) ; 1,11 (t, 3H, J = 7,6 Hz, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 181,92 (C-3) ; 168,56 (C-8) ; 167,23 (C-6) ; 148,14 (C-2) ; 144,85 (C-2') ; 131,14 (C-1') ; 130,22 (C-6') ; 130,01 (C-4') ; 129,67 (C-4) ; 126,93 (C-3') ; 126,57

(C-5') ; 113,63 (=CH-) ; 113,14 (C-9) ; 107,07 (C-5) ; 99,10 (C-7) ; 39,29 (CH₂) ; 16,26 (CH₃). SM (EI) *m/z* 266 [M]⁺. SMHR (C₁₇H₁₄O₃) calculé 266,09429 ; trouvé 266,0953.

Analyse élémentaire (C₁₇H₁₄O₃) calculé C : 76,68 ; H : 5,30 trouvé C : 74,56 ; H : 5,41

(Z)-2-(4-Ethylbenzylidène)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (7c):



C₁₇H₁₄O₃. M = 266. Rdt : 60%. Pf = 228°C

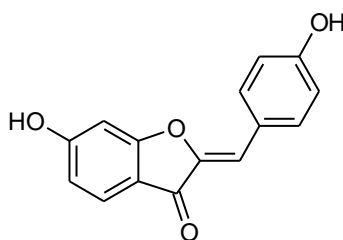
UV (MeOH): λ_{max} = 205, 238, 307 et 371 nm.

RMN ¹H (Acétone-*d*₆): δ 7,83 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H-2', H-6') ; 7,56 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-4) ; 7,28 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H-3', H-5') ; 6,78 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H-7) ; 6,72 (dd, 1H, *J*₁ = 2Hz, *J*₂ = 8,4 Hz, H-5) ; 6,65 (s, 1H, =CH-) ; 2,63 (q, 2H, *J* = 7,8 Hz, CH₂) ; 1,19 (t, *J* = 7,8 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (Acétone-*d*₆): δ 181,68 (C-3) ; 168,32 (C-6) ; 165,94 (C-8) ; 147,44 (C-2) ; 146,18 (C-4') ; 131,28 (C-2', C-6') ; 130,06 (C-1') ; 128,42 (C-3', C-5') ; 125,74 (C-4) ; 113,91 (C-9) ; 112,70 (=CH-) ; 110,40 (C-5) ; 95,41 (C-7) ; 28,96 (CH₂) ; 14,90 (CH₃). SM (EI) *m/z* 266 [M]⁺. SMHR (C₁₇H₁₄O₃) calculé 266,09429 ; trouvé 266,0919.

Analyse élémentaire (C₁₇H₁₄O₃) calculé 76,68 ; H : 5,30 trouvé C : 76,51 ; H : 5,30.

(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidène)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (7b):



C₁₅H₁₀O₄. M = 254. Rdt = 92 %. Pf = 286-288°C (Décomposition)

UV (MeOH): λ_{max} = 202, 211, 242 et 396 nm.

RMN ¹H(DMSO-*d*₆): δ 10,1 (sl, 1H, OH) ; 7,73 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, H-2', H-6') ; 7,52 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, H-4) ; 6,81 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, H-3', H-5') ; 6,71 (d, 1H, *J* = 1,6 Hz, H-7) ; 6,65 (s, 1H, =CH-) ; 6,63 (dd, 1H, *J*₁ = 1,6 Hz, *J*₂ = 8,8 Hz, H-5).

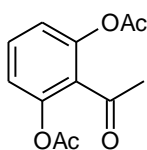
RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 181,70 (C-3) ; 167,97 (C-6) ; 166,64 (C-8) ; 159,74 (C-4') ; 146,10 (C-2) ; 133,72 (C-2', C-6') ; 126,18 (C-4) ; 123,49 (C-1') ; 116,53 (C-3', C-5') ; 113,61 (C-9) ; 113,34 (C-7) ; 111,84 (=CH-) ; 98,98 (C-5).

SM (DCI) m/z 255 $[\text{MH}]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$) calculé C : 70,86 ; H : 3,96 trouvé C : 70,72 ; H : 4,13

4.2.1.6 4-Hydroxyaurone :

2,6-Diacétoxyacétophénone (8):

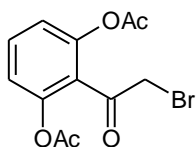


La 2,6-dihydroxyacétophénone (470 mg, 3,08 mmol) est dispersée dans 4 mL anhydride acétique et l'ensemble est porté à reflux pendant 4 heures. Le milieu est versé dans 40 mL d'eau glacée et extrait par de l'acétate d'éthyle (2x35 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile ambrée et est utilisé sans purification dans les étapes ultérieures.

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$. M = 236. Rdt = 70%

RMN ^1H (CDCl_3): δ 7,36 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-4) ; 6,99 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3, H-5) ; 2,45 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$) ; 2,21 (s, 3H, Ac) ; 2,17 (s, 3H, Ac).

2,6-Diacétoxy- α -bromoacétophénone (9):

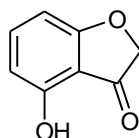


A une solution de 2,6-diacétoxyacétophénone **8** (450 mg ; 1,90 mL) dans du THF anhydre (2,5 mL) est ajouté lentement du tribromure de triméthylphénylammonium (2,28 mmol ; 1,2 éq). Le mélange obtenu est agité 6 h à température ambiante. 11 mL d'eau sont ensuite rajoutés dans le milieu et la solution obtenue est agitée quelques minutes à température ambiante, puis extraite par de l'acétate d'éthyle (2x10 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le produit brut est obtenu sous la forme d'une huile orange et utilisé dans les étapes suivantes sans purification.

$C_{12}H_{11}BrO_5$. $M = 315$.

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,43 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-4) ; 7,05 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3, H-5) ; 4,28 (s, 2H, CH_2Br) ; 2,24 (s, 6H, Ac).

4-Hydroxybenzofuran-3(2H)-one (10):



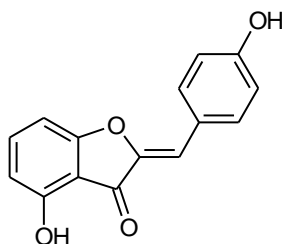
A une solution de 2,6-diacétoxy- α -bromoacétophenone brut **9** (380 mg) dans du méthanol (10 mL), est ajoutée une solution aqueuse de potasse à 50% (0,5 mL) et l'ensemble est porté à reflux pendant environ 3 h. Après retour à température ambiante, le méthanol est évaporé sous vide et le résidu obtenu est repris par 10 mL d'eau et acidifié jusqu'à pH 1-2 à l'aide d'une solution d'HCl 1N. La suspension obtenue est alors extraite par du dichlorométhane (2x15 mL) ; la phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium et évaporée à sec.

Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc cassé après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Dichlorométhane).

$C_8H_6O_3$. $M = 150$. Rdt = 16% (à partir de la 2,6-dihydroxyacétophénone)

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,42 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6) ; 6,55 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-7) ; 6,42 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-5) ; 4,58 (s, 2H, H-2).

(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidène)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (11):



A une solution de **10** (100 mg ; 0,66 mmol) dans du méthanol (10 mL), sont successivement ajoutés une solution de potasse à 50% (1 mL) et du *p*-hydroxybenzaldehyde (1,5 éq.). La solution obtenue est portée à reflux pendant 3 h. Après retour à température ambiante, le méthanol est évaporé et le résidu obtenu est repris par de l'eau. La solution obtenue est acidifiée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2N (jusqu'à pH = 2-3) : il

apparaît un précipité jaune qui est récupéré par filtration, lavé avec un minimum d'eau et séché sous vide.

Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité orange après purification par chromatographie préparative (Acétate d'éthyle 5/ Ether de pétrole 5).

$C_{15}H_{10}O_4$. M = 254. Rdt = 35,5%. Pf = 275-277°C

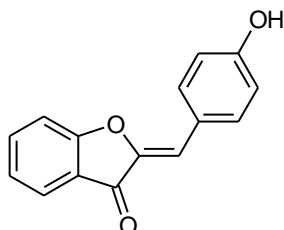
UV (MeOH): λ_{max} = 202, 230, 338 et 408 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 7,81 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-2', H-6') ; 7,50 (t, 1H, J = 8 Hz, H-6) ; 6,91 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-3', H-5') ; 6,81 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 6,66 (s, 1H, =CH-) ; 6,59 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-5).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 182,59 (C-3) ; 165,67 (C-4) ; 159,37 (C-8) ; 156,55 (C-4') ; 145,30 (C-2) ; 138,33 (C-6) ; 133,41 (C-2', C-6') ; 123,95 (C-7) ; 116,03 (C-3', C-5') ; 111,58 (=CH-) ; 110,17 (C-5) ; 109,74 (C-1') ; 103,08 (C-9). SM (EI) m/z 254 $[M]^+$. SMHR ($C_{15}H_{10}O_4$) calculée 254,05791 trouvée 254,0585

4.2.1.7 4'-Hydroxyaurone

(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (12):



A une solution de 3-coumaranone, (300 mg ; 2,23 mmol), dans du méthanol (20 mL), sont successivement ajoutés une solution aqueuse de potasse à 50% (2 mL) et du 4-hydroxybenzaldéhyde (3,35 mmol ; 1,5 éq.). La solution obtenue est portée à reflux pendant 1 h. Après retour à température ambiante le méthanol est évaporé et le résidu obtenu repris par de l'eau. La solution obtenue est acidifiée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2N (jusqu'à pH = 2-3) : il apparaît un précipité jaune qui est récupéré par filtration, lavé avec un minimum d'eau et séché sous vide.

Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune après 3 lavages successifs à l'éther.

$C_{15}H_{10}O_3$. M = 238. Rdt = 23%. Pf = 256-258°C (décomposition)

UV (MeOH): λ_{max} = 202, 256 et 396 nm.

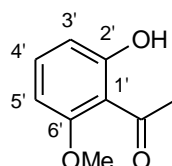
RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,86 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-2', H-6') ; 7,71 (m, 2H, H-4, H-6) ; 7,42 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-7) ; 7,24 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-5) ; 6,93 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-3', H-5') ; 6,76 (s, 1H, =CH-).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 183,29 (C-3) ; 165,66 (C-4') ; 159,49 (C-8) ; 145,39 (C-2) ; 136,76 (C-6) ; 133,65 (C-2', C-6') ; 123,95 (C-4) ; 123,53 (C-5) ; 121,78 (C-1') ; 116,08 (C-3', C-5') ; 115,99 (C-9) ; 112,97 (C-7) ; 112,67 (=CH-). SM (EI) m/z 238 $[\text{M}]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$) calculé C : 75,62 ; H : 4,23 trouvé C : 73,36 ; H : 4,71

4.2.2 Synthèse des chromones

2'-Hydroxy-6'-méthoxyacétophénone (13)

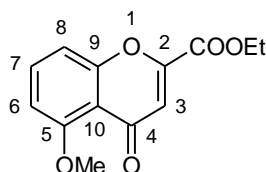


A une solution de 2',6'-dihydroxyacétophénone (10 g ; 65,7 mmol) dans de l'acétone (100 mL) sont successivement ajoutés, du carbonate de potassium (9,98 g ; 72,27 mmol) et de l'iodure de méthyle (CH_3I ; 4,9 mL ; 78,84 mmol). L'ensemble est porté à reflux (110°C) pendant 20 h. Le milieu est ensuite ramené à température ambiante, et acidifié avec une solution d'HCl 2N. Le précipité minéral formé en cours de réaction est éliminé par filtration et l'acétone évaporée sous vide. Le résidu pâteux obtenu est réacidifié (si besoin), puis extrait par de l'acétate d'éthyle (2 x 100 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution saturée de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de sodium et évaporée sous vide pour conduire à un précipité jaune clair.

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$. $M = 166$. Rdt = 89%

RMN ^1H (CDCl_3) : δ 7,30 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-4') ; 6,51 (dd, 1H, $J_1 = 0,8$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, H-5') ; 6,33 (dd, 1H, $J_1 = 0,8$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, H-3') ; 3,83 (s, 3H, OCH_3) ; 2,61 (s, 3H, COCH_3).

2-Ethylcarboxy-5-méthoxybenzopyran-4-one (14)



A une solution d'éthanolate de sodium préparée par addition de 7,45 g de sodium à 85 mL d'éthanol absolu est ajoutée goutte à goutte une solution de 2-hydroxy-6-méthoxyacétophénone **13** (9 g ; 54,2 mmol) dans de l'oxalate d'éthyle (29,4 mL ; 216,8 mmol). La solution obtenue est portée à reflux (120°C) pendant 3 h. Après retour à température ambiante, l'éthanol est évaporé et le résidu obtenu est repris par de l'eau. La solution obtenue est acidifiée (pH : 2-3) à l'aide d'une solution d'HCl 2N et extraite par de l'acétate d'éthyle (3x100 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution saturée de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le résidu obtenu est solubilisé dans de l'éthanol (70 mL), et la solution obtenue est chauffée à 100°C. Après quelques minutes de chauffage de l'acide chlorhydrique concentré (5 mL) est ajouté au milieu. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Après évaporation de l'éthanol, on obtient une huile marron qui est purifiée par chromatographie sur colonne de gel silice (Acétate d'éthyle 6/ Cyclohexane 4) pour donner le produit sous la forme d'un précipité beige.

$C_{13}H_{12}O_5$. M = 248. Rdt = 70%. Pf = 130-132°C

UV (MeOH): λ_{max} = 205, 218, 237, 271 et 326 nm.

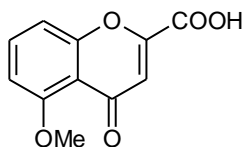
IR (CH_2Cl_2): 1743 ($\nu_{C=O}$ ester) ; 1656, 1632, 1606 ($\nu_{C=O}$ cétone en 4) ; 1265, 1222 (ν_{C-O}).

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ 7,53 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 7,10 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,97 (s, 1H, H-3) ; 6,78 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 4,37 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH_2) ; 3,92 (s, 3H, OCH_3) ; 1,35 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ 178,02 (C-4) ; 160,55 (CO) ; 159,78 (C-5) ; 158 (C-2) ; 150,32 (C-9) ; 134,71 (C-7) ; 116,44 (C-8) ; 115,24 (C-10) ; 110,59 (C-6) ; 106,86 (C-3) ; 62,84 (CH_2) ; 56,50 (OCH_3) ; 14,07 (CH_3). SM (CI) m/z 249 $[M+H]^+$.

Analyse élémentaire ($C_{13}H_{12}O_5$) calculé C: 62,90 ; H: 4,87 trouvé C: 62,99 ; H: 5,21

2-Carboxy-5-méthoxybenzopyran-4-one (**15**):



Le 2-éthylcarboxy-5-méthoxybenzopyran-4-one **14** (1,07 g) est dispersé dans 20 mL d'une solution aqueuse de $NaHCO_3$ à 20 %. Le milieu est chauffé à 100°C pendant 2 h, puis acidifié à l'aide d'une solution d'HCl 2 N. La solution obtenue est alors extraite 3 fois par de l'acétate d'éthyle (3x20 mL) ; la phase organique est lavée avec une solution saturée de

chlorure de sodium, séchée sur sulfate de sodium et évaporée sous vide. Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre beige après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4 puis méthanol).

$C_{11}H_8O_5$. M = 220. Rdt = 52%. Pf = 264-266°C

UV (MeOH): λ_{max} = 204, 236, 268 et 324 nm.

IR (KBr): 3400 (ν_{OH}) ; 1740 ($\nu_{C=O}$ acide) ; 1642, 1602 ($\nu_{C=O}$) ; 1265, 1239, 1216 (ν_{C-O})

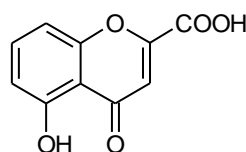
RMN¹H (MeOD): δ 7,65 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 7,13 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,96 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,84 (s, 1H, H-3) ; 3,88 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (MeOD): δ 179,04 (C-4) ; 161,41 (CO) ; 159,59 (C-5) ; 158,03 (C-2) ; 151,76 (C-9) ; 135,38 (C-7) ; 114,95 (C-8) ; 113,60 (C-10) ; 110,04 (C-6) ; 106,96 (C-3) ; 55,31 (OCH₃).

SM (CI) m/z 221 [MH]⁺.

Analyse élémentaire ($C_{11}H_8O_5$) calculé C : 60,01 ; H : 3,66 trouvé C : 57,02 ; H : 4,06.

2-Carboxy-5-hydroxybenzopyran-4-one (16) :



A une solution de 2-carboxy-5-méthoxy-pyran-4-one **15** (70 mg ; 0,32 mmol) dans de l'acide acétique (5 mL), est ajouté de l'acide bromhydrique (HBr 48%, 1mL). La solution jaune obtenue est chauffée à 150 °C pendant 4 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est mélangé à de l'eau glacée (40 mL) et la solution obtenue est extraite par de l'acétate d'éthyle (2x 45 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec pour donner le produit attendu sous la forme d'une poudre jaune clair.

$C_{10}H_6O_5$. M = 206. Rdt = 90%. Pf = 264°C

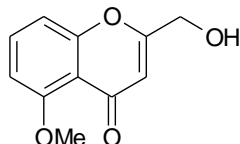
UV (MeOH): λ_{max} = 201, 226, 242, 265 et 334 nm.

RMN ¹H (Acétone- d_6) : δ 7,51 (t, 1H, J = 9,2 Hz, H-7) ; 7,05 (d, 1H, J = 9,2 Hz, H-8) ; 6,93 (s, 1H, H-3) ; 6,77 (d, 1H, J = 9,2 Hz, H-5).

RMN ¹³C (Acétone- d_6): δ 184,05 (C-4) ; 160,48 (CO, C-5) ; 156,34 (C-2) ; 154,60 (C-9) ; 136,57 (C-7) ; 112,50 (C-8) ; 111,41 (C-10) ; 111,27 (C-6) ; 107,69 (C-3). SM (DCI) m/z 207 [M+H]⁺.

Analyse élémentaire ($C_{10}H_6O_5$) calculé C : 58,26 ; H : 2,93 trouvé C : 57,45 ; H : 3,13

2-Hydroxyméthyl-5-méthoxybenzopyran-4-one (17):



A une solution de 2-éthylcarboxy-5-méthoxybenzopyran-4-one **14** (500 mg ; 2,01 mmol) dans du méthanol (15 mL) est ajouté du borohydrure de sodium (4.03 mmol ; 2éq.) sous agitation. L'ensemble est alors porté à reflux pendant 5 h. Après retour à température ambiante, le méthanol est évaporé et le résidu obtenu repris par 40 mL d'eau. Le mélange est acidifié à l'aide d'une solution d'HCl 2N jusqu'à pH 3, puis extrait par 50 mL d'acétate d'éthyle (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et purifiée par chromatographie sur colonne (Eluant : Acétate d'éthyle) pour donner le produit désiré sous la forme d'un précipité blanc.

$C_{11}H_{10}O_4$. M = 206. Rdt = 50%. Pf = 162-164°C.

UV (MeOH): λ_{max} = 201, 224, 253 et 315 nm.

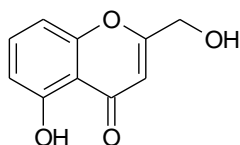
IR (KBr): 3370 (ν_{OH}) ; 1642, 1602 ($\nu_{C=O}$) ; 1297, 1260 (ν_{C-O}).

RMN 1H ($CDCl_3$): 7,47 (t, 1H, J = 8,4 Hz ; H-7) ; 6,91 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,73 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,30 (s, 1H, H-3) ; 4,48 (d, 2H, J = 6,8 Hz, CH_2O) ; 3,91 (s, 3H, OCH_3) ; 2,89 (t, 1H, J = 6,8 Hz, OH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 178,78 (C-4) ; 166,12 (C-5) ; 159,69 (C-2) ; 158,25 (C-9) ; 133,87 (C-7) ; 114,40 (C-10) ; 110,02 (C-8) ; 109,89 (C-6) ; 106,36 (C-3) ; 61,08 (CH_2) ; 56,39 (OCH_3). SM (EI) m/z 206 [M] $^+$.

Analyse élémentaire ($C_{11}H_{10}O_4$) calculé C : 64,08 ; H : 4,89 trouvé C : 63,72 ; H : 5,04.

5-Hydroxy-2-hydroxyméthylbenzopyran-4-one (18):



A une solution de 2-hydroxyméthyl-5-méthoxybenzopyran-4-one **17** (100 mg ; 0,485 mmol) dans de l'acide acétique (10 mL) sont rajoutés 1,5 mL d'acide bromhydrique ;

l'ensemble est chauffé à 150°C pendant 4 h. Après retour à température ambiante, le milieu est versé dans 100 mL d'eau et extrait par de l'acétate d'éthyle (2 x 100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice Acétate d'éthyle 6/ Cyclohexane 4) pour donner le produit attendu sous la forme d'un précipité beige.

$C_{10}H_8O_4$. M = 192. Rdt : 25%. Pf = 152-154°C

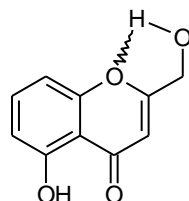
UV (MeOH): λ_{max} = 201, 226, 234, 253 et 324 nm.

RMN 1H (Acétone- d_6) : δ 7,52 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 7,03 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,80 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,55 (s, 1H, H-3) ; 4,60 (s, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 182,03 (C-4) ; 164,15 (C-5) ; 160,59 (C-2) ; 156,80 (C-9) ; 135,72 (C-7) ; 112,23 (C-10) ; 110,09 (C-8) ; 108,80 (C-6) ; 107,02 (C-3) ; 28,37 (CH_2). SM (EI) m/z 192 $[M]^+$.

Analyse élémentaire ($C_{10}H_8O_4$) calculé C : 62,50 ; H : 4,20 trouvé C : 62,82 ; H : 4,51.

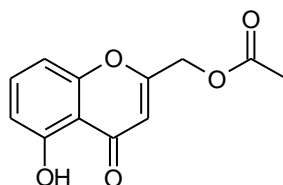
5-Hydroxy-2-hydroxyméthylbenzopyran-4-one (18a):



RMN 1H (Acétone- d_6) : δ 7,65 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 6,99 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,78 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,38 (s, 1H, H-3) ; 5,09 (s, 2H, CH_2) ; 2,17 (s, 3H, CH_3).

SM (EI) m/z 192 $[M]^+$.

Acétate de 5-hydroxybenzopyran-4-oneméthyl (18 b):



RMN 1H (Acétone- d_6) : δ 7,60 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 6,90 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,75 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,40 (s, 1H, H-3) ; 4,99 (t, 1H, J = 6 Hz, OH) ; 4,58 (s, 2H, CH_2).

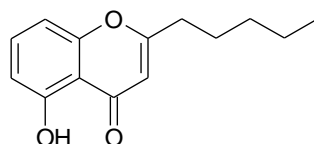
SM (EI) m/z 234 $[M]^+$.

• **Synthèse des 2-alkyl-5-hydroxybenzopyran-4-ones et des 3-alkoyl-2-alkyl-5-hydroxybenzopyran-4-ones**

Une suspension de 2',6'-dihydroxyacétophénone (1 g ; 6,57 mmol) et de carbonate de potassium (35,85 mmol ; 5éq.) dans de l'acétone (33 mL) est agité pendant 15 minutes à température ambiante, puis du chlorure d'alkyle est ajouté (1éq.). L'ensemble est porté à reflux pendant 24 h ; après retour à température ambiante, l'acétone est évaporée. Le résidu obtenu est dispersé dans de l'eau (30 mL), le mélange obtenu acidifié à pH 6 à l'aide d'une solution d'HCl 1N puis extrait par de l'acétate d'éthyle (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec pour fournir un mélange contenant le produit mono et dialkylé.

IR (pastille NaCl) : 1693-1609 ($\nu_{C=O}$) ; 1292-1220 (ν_{C-O}).

5-Hydroxy-2-pentylbenzopyran-4-one (19a) :



Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 1 / Cyclohexane 9).

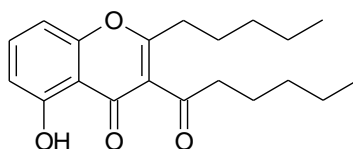
$C_{14}H_{16}O_3$. M = 232. Rdt : 22%.

UV (MeOH): λ_{max} = 201, 226, 234, 253 et 324 nm.

RMN¹H (CDCl₃): δ 7,45 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 6,80 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,71 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,04 (s, 1H, H-3) ; 2,55 (t, 2H, J = 7,6 Hz, C2-CH₂) ; 1,66 (m, 2H, CH₂) ; 1,31 (m, 2H, CH₂) ; 0,86 (m, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ 183,64 (C-4) ; 171,33 (C-5) ; 160,81 (C-2) ; 156,82 (C-9) ; 135,06 (C-7) ; 111,13 (C-8) ; 110,60 (C-10) ; 108,38 (C-6) ; 106,87 (C-3) ; 34,30 (C2-CH₂) ; 31,10 (CH₂) ; 26,92 (CH₂) ; 26,45 (CH₂) ; 13,90 (CH₃). SM (EI) m/z 232 [M]⁺.

3-Hexanoyl-5-hydroxy-2-pentylbenzopyran-4-one (19b):



Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 1 / Cyclohexane 9).

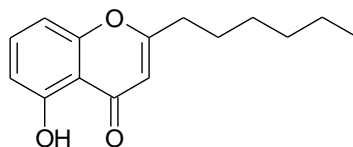
$C_{20}H_{20}O_4$. M = 330. Rdt = 23%.

UV (MeOH): λ_{max} = 201, 228, 234 et 326 nm.

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,46 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 6,81 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,72 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 2,85 (m, 2H, $COCH_2$) ; 2,61 (m, 2H, C2- CH_2) ; 1,65 (m, 4H, 2x CH_2) ; 1,30 (m, 8H, 3x CH_2) ; 0,86 (m, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 202,56 (CO) ; 181,41 (C-4) ; 171,43 (C-5) ; 160,97 (C-2) ; 155,80 (C-9) ; 135,69 (C-7) ; 122,65 (C-3) ; 111,75 (C-8) ; 110,29 (C-10) ; 106,81 (C-6) ; 44,41 (CH_2) ; 32,69 (CH_2) ; 31,44 (CH_2) ; 27,54 (CH_2) ; 26,91 (CH_2) ; 23,66 (CH_2) ; 22,51 (CH_2) ; 22,31 (CH_2) ; 13,95 (CH_3) ; 13,88 (CH_3). SM (FAB, NBA) m/z 331 $[M+H]^+$.

2-Hexyl-5-hydroxybenzopyran-4-one (20a):



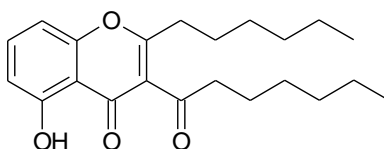
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 1 / Cyclohexane 9).

$C_{15}H_{18}O_3$. M = 246. Rdt : 15%.

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,43 (t, 1H, J = 8,4 Hz, H-7) ; 6,80 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-8) ; 6,71 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,04 (s, 1H, H-3) ; 2,55 (t, 2H, J = 7,6 Hz, C2- CH_2) ; 1,68 (m, 2H, CH_2) ; 1,26 (m, 6H, 6x CH_2) ; 0,83 (m, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 183,64 (C-4) ; 171,35 (C-5) ; 160,80 (C-2) ; 156,82 (C-9) ; 135,06 (C-7) ; 111,13 (C-8) ; 110,60 (C-10) ; 108,37 (C-6) ; 106,86 (C-3) ; 34,34 (CH_2) ; 31,41 (CH_2) ; 28,64 (CH_2) ; 26,92 (CH_2) ; 26,73 (CH_2) ; 14,02 (CH_3). SM (EI) m/z 246 $[M]^+$.

3-Heptanoyl-2-hexyl-5-hydroxybenzopyran-4-one (20b):



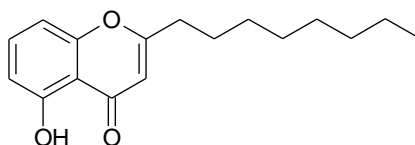
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 1 / Cyclohexane 9).

$C_{22}H_{30}O_4$. M = 358. Rdt : 19%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,46 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-7) ; 6,81 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 6,73 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6) ; 2,87 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, $COCH_2$) ; 2,61 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, $=COCH_2$) ; 1,70 (m, 2H, CH_2) ; 1,64 (m, 2H, CH_2) ; 1,32 (m, 12H, $6 \times CH_2$) ; 0,87 (m, 6H, $2 \times CH_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 202,57 (CO) ; 181,41 (C-4) ; 171,73 (C-5) ; 160,98 (C-2) ; 155,81 (C-9) ; 135,69 (C-7) ; 122,66 (C-3) ; 111,76 (C-8) ; 110,30 (C-10) ; 106,81 (C-6) ; 44,57 (CH_2) ; 32,74 (CH_2) ; 31,65 (CH_2) ; 31,40 (CH_2) ; 29,01 (CH_2) ; 28,95 (CH_2) ; 27,83 (CH_2) ; 23,95 (CH_2) ; 22,52 (CH_2) ; 22,48 (CH_2) ; 14,04 (CH_3) ; 14,02 (CH_3). SM (EI) m/z 358 $[M]^+$.

5-Hydroxy-2-octylbenzopyran-4-one (21a):



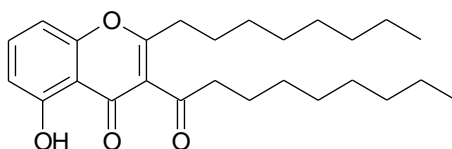
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 2 / Cyclohexane 8).

$C_{17}H_{22}O_3$. M = 274. Rdt : 7%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,43 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-7) ; 6,80 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 6,70 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6) ; 6,04 (s, 1H, H-3) ; 2,54 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz, C2- CH_2) ; 1,65 (m, 2H, CH_2) ; 1,25 (m, 10H, $5 \times CH_2$) ; 0,82 (m, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 183,65 (C-4) ; 171,36 (C-5) ; 160,99 (C-2) ; 156,81 (C-9) ; 135,07 (C-7) ; 111,13 (C-8) ; 110,61 (C-10) ; 108,39 (C-6) ; 106,88 (C-3) ; 34,35 (CH_2) ; 31,79 (CH_2) ; 29,21 (CH_2) ; 29,12 (CH_2) ; 28,98 (CH_2) ; 26,92 (CH_2) ; 26,77 (CH_2) ; 22,64 (CH_2) ; 14,10 (CH_3). SM (EI) m/z 274 $[M]^+$.

5-Hydroxy-3-nonanoyl-2-octylbenzopyran-4-one (21b):



Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 2 / Cyclohexane 8).

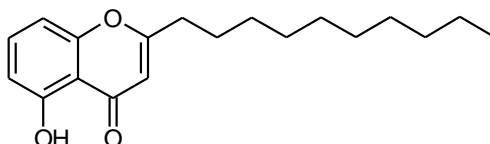
$C_{26}H_{38}O_4$. M = 414. Rdt : 33%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,45 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-7) ; 6,81 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 6,74 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6) ; 2,87 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, $COCH_2$) ; 2,61 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, C2- CH_2) ; 1,66 (m, 2H, CH_2) ; 1,62 (m, 2H, CH_2) ; 1,30 (m, 20H, CH_2) ; 0,83 (m, 6H, $2 \times CH_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 202,58 (CO) ; 181,41 (C-4) ; 171,73 (C-5) ; 160,99 (C-2) ; 155,81 (C-9) ; 135,68 (C-7) ; 122,67 (C-3) ; 111,76 (C-8) ; 110,31 (C-10) ; 106,81 (C-6) ; 44,58 (CH_2) ; 32,74 (CH_2) ; 31,84 (CH_2) ; 29,43 (CH_2) ; 29,36 (CH_2) ; 29,29 (CH_2) ; 29,21 (CH_2) ; 29,18 (CH_2) ; 29,11 (CH_2) ; 27,87 (CH_2) ; 26,92 (CH_2) ; 24,00 (CH_2) ; 22,64 (CH_2) ; 14,09 ($2 \times CH_3$).

SM (EI) m/z 414 $[M]^+$

2-Décyl-5-hydroxybenzopyran-4-one (22a):



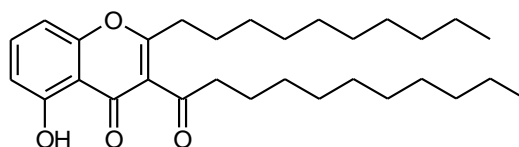
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 1 / Cyclohexane 9).

$C_{19}H_{26}O_3$. M = 302. Rdt = 13%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,43 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-7) ; 6,80 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 6,71 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6) ; 6,04 (s, 1H, H-3) ; 2,54 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, C2- CH_2) ; 1,65 (m, 2H, CH_2) ; 1,23 (m, 14H, $7 \times CH_2$) ; 0,81 (m, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 183,64 (C-4) ; 171,35 (C-5) ; 160,81 (C-2) ; 156,82 (C-9) ; 135,06 (C-7) ; 111,13 (C-8) ; 110,61 (C-10) ; 108,39 (C-6) ; 106,81 (C-3) ; 34,35 (C2- CH_2) ; 31,88 (CH_2) ; 29,54 (CH_2) ; 29,44 (CH_2) ; 29,29 (CH_2) ; 29,24 (CH_2) ; 28,97 (CH_2) ; 26,77 (CH_2) ; 22,68 (CH_2) ; 14,12 (CH_3). SM (EI) m/z 302 $[M]^+$.

2-Décyl-5-hydroxy-3-undecanoylbenzopyran-4-one (22b):



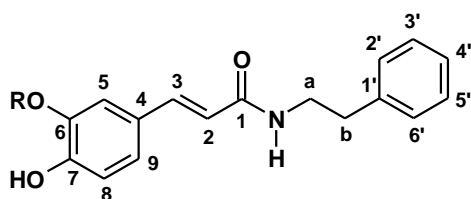
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 1 / Cyclohexane 9).

$C_{30}H_{46}O_4$. $M = 470$. Rdt = 16%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,46 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-7) ; 6,81 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 6,74 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6) ; 2,87 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, $COCH_2$) ; 2,61 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, C2- CH_2) ; 1,64 (m, 4H, 2x CH_2) ; 1,19 (m, 28H, 14x CH_2) ; 0,79 (m, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 202,58 (CO) ; 181,41 (C-4) ; 171,73 (C-5) ; 160,99 (C-2) ; 155,81 (C-9) ; 135,68 (C-7) ; 122,67 (C-3) ; 111,76 (C-8) ; 110,31 (C-10) ; 106,81 (C-6) ; 44,58 (C2- CH_2) ; 32,74 (CH_2) ; 31,90 (CH_2) ; 29,59 (CH_2) ; 29,53 (CH_2) ; 29,47 (CH_2) ; 29,31 (CH_2) ; 29,26 (CH_2) ; 27,87 (CH_2) ; 24,00 (CH_2) ; 22,69 (CH_2) ; 14,12 (CH_3). SM (EI) m/z 470 $[M]^+$.

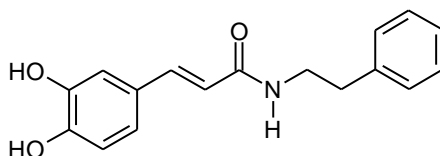
4.2.3 Synthèse des dérivés de l'acide caféique et de l'acide férulique



Une solution d'acide caféique ou férulique (300 mg) et de triéthylamine (1,5 équ.) dans du DMF (3,5 mL) est refroidie à 3-4°C à l'aide d'un bain de glace. L'amine (1 équ.) suivie d'une solution de BOP (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium-hexafluorophosphate, 1équ.) dans du dichlorométhane (3,5 mL) sont rajoutés au milieu ; l'ensemble est agité une trentaine de minutes dans le bain de glace puis 20 h à température ambiante. L'agitation est ensuite arrêtée et le dichlorométhane est évaporé sous vide. 30 mL d'eau sont versés dans la solution restante et le mélange obtenu est extrait par de l'acétate d'éthyle (3x75 mL). La phase organique est successivement lavée avec 100 mL d'une solution d'HCl 1N, 100 mL d'eau et 100 mL d'une solution 1M de $NaHCO_3$. Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec.

IR (KBr ou NaCl) : 3403-3290 (ν_{OH} , ν_{NH}) ; 1675-1655 (ν_{CONH}) ; 1519-1515 (δ_{NH}) ; 1269, 1033 (ν_{C-O}).

***trans*-N-Caféoylphényléthylamine (23):**



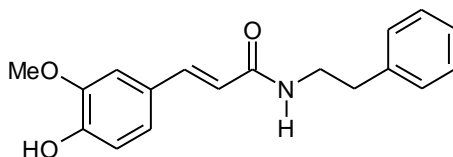
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

$C_{17}H_{17}NO_3$. M = 283. Rdt = 16%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,49 (sl, 1H, NH) ; 7,32 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H-3) ; 7,15 (m, 5H, Ph) ; 6,98 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 6,86 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-9) ; 6,76 (d, 1H, $J_1 = J_2 = 8$ Hz, H-8) ; 6,35 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H-2) ; 3,45 (m, 2H, H-a) ; 2,20 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 167,43 (C-1) ; 147,49 (C-6) ; 146,90 (C-7) ; 144,54 (C-3) ; 142,15 (C-1') ; 138,61 (C-4) ; 127 (Ph) ; 126,73 (Ph) ; 126,61 (Ph) ; 121,33 (C-2) ; 117,13 (C-4') ; 115,77 (C-9) ; 115,41 (C-8) ; 114,60 (C-5) ; 41,12 (C-a) ; 35,43 (C-b). SM (EI) m/z 283 $[M]^+$

***trans*-N-féruoylphényléthylamine (24):**



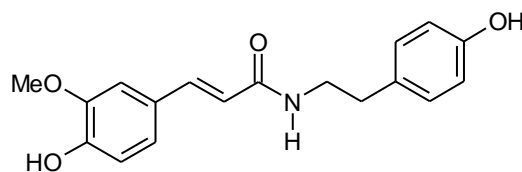
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6/ Cyclohexane 4).

$C_{18}H_{19}NO_3$. M = 297. Rdt = 60%

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 7,47 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,25 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-2', H-6') ; 7,17 (m, 4H, H-3', H-4', H-5') ; 6,90 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 6,87 (dd, 1H, $J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-9) ; 6,83 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 6,15 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 5,58 (sl, 1H, NH) ; 3,86 (s, 3H, OCH_3) ; 3,65 (m, 2H, H-a) ; 2,83 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 166,16 (C-1) ; 147,37 (C-6) ; 146,68 (C-7) ; 141,10 (C-3) ; 138,94 (C-1') ; 128,84 (Ph) ; 128,70 (Ph) ; 128,62 (ph) ; 127,33 (Ph) ; 126,55 (Ph) ; 122,15 (C-9) ; 118,12 (C-2) ; 114,70 (C-8) ; 109,57 (C-5) ; 55,93 (OCH_3) ; 40,73 (C-a) ; 35,70 (C-b). SM (EI) m/z 297 $[M]^+$

***trans*-N-féruoyltyramine (25):**



Le produit est obtenu sous la forme d'une mousse blanche après chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

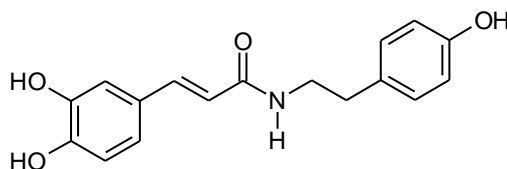
$C_{18}H_{19}NO_4$. M = 313. Rdt = 41%

RMN 1H (Acétone- d_6) : δ 8,24 (sl, 1H, OH) ; 8,15 (sl, 1H, OH) ; 7,44 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,23 (sl, 1H, NH) ; 7,14 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 7,03 (m, 3H, H-9, H-2', H-6') ; 6,82 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 6,74 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,49 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2), 3,92 (s, 3H, OCH₃) ; 3,46 (m, 2H, H-a) ; 2,72 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6) : δ 165,77 (C-1) ; 155,87 (C-4') ; 148,29 (C-6) ; 147,74 (C-7) ; 139,67 (C-3) ; 131,16 (C-1') ; 129,64 (C-2', C-6') ; 127,42 (C-4) ; 124,51 (C-9) ; 121,71 (C-2) ; 119,03 (C-8, C-3', C-5') ; 115,22 (C-5) ; 55,33 (OCH₃) ; 41,11 (C-a) ; 34,86 (C-b). SM (EI) m/z 313 [M]⁺.

Analyse élémentaire ($C_{18}H_{19}NO_4$) calculé C : 69 ; H : 6,11 ; N : 4,47 trouvé C : 62,58 ; H : 6,38

***trans*-N-Caféoyltyramine (26):**



Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité beige après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 3 / Cyclohexane 1).

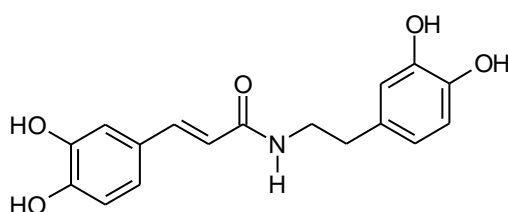
$C_{17}H_{17}NO_4$. M = 299. Rdt = 43%. Pf = 205-207°C

RMN 1H (DMSO- d_6) : δ 9,31 (s, 1H, OH) ; 9,11 (s, 1H, OH) ; 9,05 (s, 1H, OH) ; 7,92 (sl, 1H, NH) ; 7,13 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 6,92 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 6,84 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 6,74 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-9) ; 6,62 (m, 3H, H-8, H-3', H-5') ; 3,22 (m, 2H, H-a) ; 2,55 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ 165,54 (C-1) ; 155,72 (C-4') ; 146,75 (C-6) ; 145,21 (C-7) ; 139,58 (C-3) ; 130,28 (C-1') ; 129,64 (C-2', C-6') ; 127,59 (C-4) ; 120,62 (C-9) ; 118,85 (C-2) ;

115,43 (C-8) ; 115,09 (C-3', C-5') ; 113,95 (C-5) ; 43,46 (C-a) ; 34,86 (C-b). SM (EI) m/z 299 [M]⁺.

***trans*-N-Caféoyldopamine (27):**



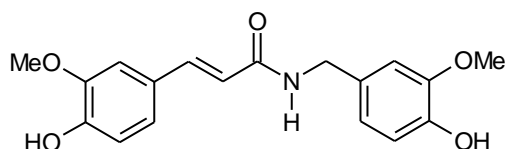
Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité jaune.

C₁₇H₁₇NO₅. M = 315. Rdt = 59%. Pf = 168-170°C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 9,27 (sl, 1H, OH) ; 9,07 (se, 1H, OH) ; 8,7 (sl, 1H, OH) ; 8,5 (sl, 1H, OH) ; 7,90 (sl, 1H, NH) ; 7,13 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H-3) ; 6,84 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H-5) ; 6,74 (dd, 1H, *J*₁ = 2 Hz, *J*₂ = 8,4 Hz, H-9) ; 6,64 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-8) ; 6,55 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H-5') ; 6,52 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H-2') ; 6,37 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 8 Hz, H-6') ; 6,22 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H-2) ; 3,21 (m, 2H, C-a) ; 2,48 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, C-b).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 165,74 (C-1) ; 147,69 (C-6) ; 145,97 (C-7) ; 145,50 (C-3') ; 143,39 (C-4') ; 139,39 (C-3) ; 130,71 (C-1') ; 126,86 (C-4) ; 120,82 (C-5) ; 119,66 (C-9) ; 119,04 (C-8) ; 116,42 (C-5') ; 116,19 (C-6') ; 115,94 (C-2') ; 114,24 (C-2) ; 41,18 (C-a) ; 35,21 (C-b). SM (EI) m/z 315 [M]⁺.

***trans*-N-Féruoyl-4-hydroxy-3-méthoxyphénylméthylamine (28):**



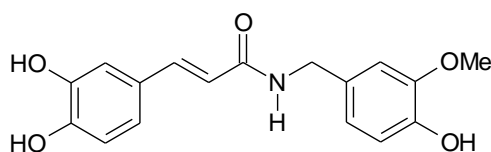
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'Ethyle 8/ Cyclohexane 2).

C₁₈H₁₉NO₅. M = 329. Rdt = 53%

RMN ^1H (Acétone- d_6) : δ 7,42 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,41 (sl, 1H, NH) ; 7,10 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 6,99 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, H-9) ; 6,89 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-2') ; 6,77 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 6,71 (m, 2H, H-5', H-6') ; 6,44 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 4,33 (d, 2H, $J = 4,4$ Hz, CH₂) ; 3,81 (s, 3H, OCH₃) ; 3,74 (s, 3H, OCH₃).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6) : δ 165,43 (C-1) ; 148,30 (C-6) ; 147,75 (C-7) ; 147,42 (C-4') ; 145,74 (C-3') ; 139,70 (C-3) ; 130,92 (C-1') ; 127,33 (C-4) ; 121,67 (C-9) ; 120,39 (C-5') ; 119,01 (C-2) ; 115,24 (C-8) ; 114,75 (C-6') ; 11,52 (C-2') ; 110,40 (C-5) ; 55,33 (OCH₃) ; 42,71 (CH₂). SM (EI) m/z 329 [M]⁺.

***trans*-N-Caféoyl-4-hydroxy-3-méthoxyphénylméthylamine (29):**



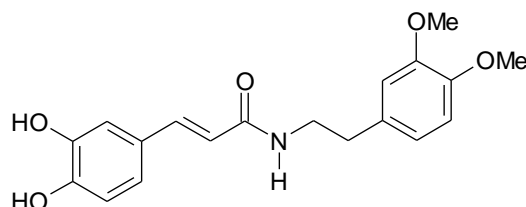
Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre beige après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'Ethyle 3/ Cyclohexane 1).

C₁₇H₁₇NO₅. M = 315. Rdt : 40%. Pf = 228°C

RMN ^1H (Acétone- d_6) : δ 7,43 (sl, 1H, NH) ; 7,37 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 6,86 (m, 2H, H-8, H-9) ; 6,76 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-5') ; 6,70 (m, 2H, H-2', H-6') ; 6,42 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 4,33 (d, 2H, $J = 6$ Hz, NCH₂) ; 3,74 (s, 3H, OCH₃).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6) : δ 165,40 (C-1) ; 147,38 (C-6) ; 146,91 (C-7) ; 145,70 (C-3') ; 145,34 (C-4') ; 169,83 (C-3) ; 130,93 (C-1') ; 127,59 (C-4) ; 120,68 (C-5) ; 120,40 (C-9) ; 118,80 (C-8) ; 115,42 (C-5') ; 114,72 (C-6') ; 113,92 (C-2') ; 113,92 (C-2) ; 55,32 (OCH₃) ; 42,72 (CH₂). SM (EI) m/z 315 [M]⁺.

***trans*-N-Caféoyl-3,4-diméthoxyphényléthylamine (30):**



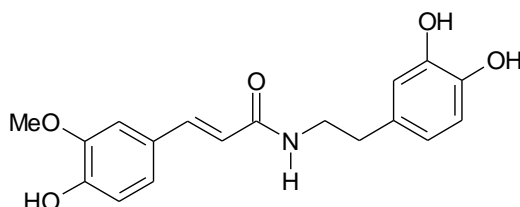
Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité beige.

C₁₉H₂₁NO₅. M = 343. Rdt : 33 %. Pf = 114-116°C

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,33 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,15 (sl, 1H, NH) ; 6,98 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 6,86 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-9) ; 6,78 (m, 3H, H-8, H-2', H-5') ; 6,67 (dd, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-6') ; 3,43 (dd, 2H, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz, H-a) ; 2,70 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-b) ; 3,70 (s, 3H, OCH₃) ; 3,69 (s, 3H, OCH₃).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 165,53 (C-1) ; 149,42 (C-6) ; 148,00 (C-7) ; 146,83 (C-3') ; 145,31 (C-4') ; 139,53 (C-3) ; 132,27 (C-1') ; 127,60 (C-4) ; 120,65 (C-9, C-6') ; 118,92 (C-2) ; 115,40 (C-8) ; 113,90 (C-5) ; 112,77 (C-2') ; 112,07 (C-5') ; 55,24 (OCH₃) ; 55,11 (OCH₃) ; 40,84 (C-a) ; 35,23 (C-b). SM (EI) m/z 343 [M]⁺

***trans*-N-Féruoyldopamine (31):**



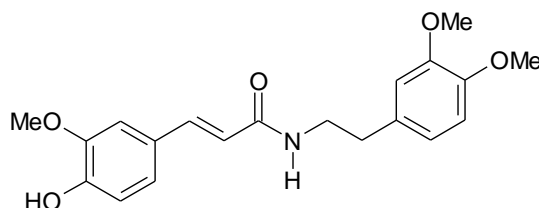
Le produit est obtenu sous la forme d'une mousse jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 3 / Cyclohexane 1).

C₁₈H₁₉NO₅ M = 329 Rdt = 30%

RMN ^1H (Acétone- d_6): δ 7,75 (sl, 2H, OH) ; 7,35 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,09 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 7,06 (sl, 1H, NH) ; 6,96 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz, H-9) ; 6,76 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 6,66 (m, 2H, H-2', H-5') ; 6,49 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-6') ; 6,44 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 3,81 (s, 3H, OCH₃) ; 3,40 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, Ha) ; 2,62 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 165,40 (C-1) ; 148,18 (C-6) ; 147,70 (C-7) ; 144,94 (C-3') ; 143,41 (C-4') ; 139,37 (C-3) ; 131,25 (C-1') ; 127,42 (C-4) ; 121,64 (C-9) ; 119,95 (C-6') ; 119,23 (C-2) ; 115,71 (C-8) ; 115,17 (C-2', C-5') ; 110,30 (C-5) ; 59,64 (OCH₃) ; 40,93 (C-a) ; 35,10 (C-b). SM (EI) m/z 329 [M]⁺

***trans*-N-Féruoyl-3,4-diméthoxyphényléthylamine (32):**



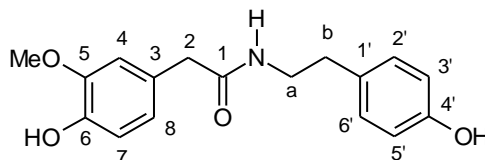
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair.

$C_{20}H_{23}NO_5$. $M = 357$. Rdt = 76%

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ 7,47 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 6,98 (dd, $J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-9) ; 6,91 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 6,83 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 6,76 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-5') ; 6,69 (m, 2H, H-2', H-6') ; 6,11 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 5,53 (sl, 1H, NH) ; 3,83 (s, 3H, OCH_3) ; 3,79 (s, 6H, 2x OCH_3) ; 3,58 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-a) ; 2,82 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ 166,21 (C-1) ; 149,06 (C-6) ; 147,72 (C-7) ; 147,41 (C-3') ; 146,71 (C-4') ; 141,15 (C-3) ; 131,39 (C-1') ; 127,30 (C-4) ; 122,17 (C-9) ; 120,68 (C-2) ; 118,07 (C-6') ; 114,71 (C-8) ; 111,98 (C-5) ; 111,39 (C-2') ; 109,56 (C-5') ; 55,94 (OCH_3) ; 40,86 (C-a) ; 35,22 (C-b). SM (EI) m/z 357 $[M]^+$

***N*-(4-hydroxyphényléthyl)-2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)acétamide (33):**



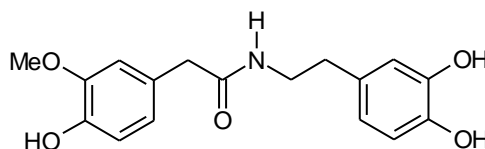
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair.

$C_{17}H_{19}NO_4$. $M = 301$. Rdt = 50%

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ 6,77 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-7) ; 6,72 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 6,64 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,54 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz, H-8) ; 6,50 (d, 1H, $J = 2$ Hz ; H-4) ; 3,40 (s, 2H, H-2) ; 3,37 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-a) ; 2,57 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ 162,14 (C-1) ; 155,34 (C-5) ; 147,23 (C-6) ; 145,15 (C-4') ; 129,59 (C-2', C-6') ; 129,30 (C-1') ; 126,15 (C-3) ; 122,25 (C-8) ; 115,62 (C-3', C-5') ; 115,06 (C-7) ; 111,84 (C-4) ; 55,78 (OCH_3) ; 43,35 (C-2) ; 40,80 (C-a) ; 36,66 (C-b). SM (EI) m/z 301 $[M]^+$

***N*-(3,4-dihydroxyphényléthyl)-2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)acétamide (34):**



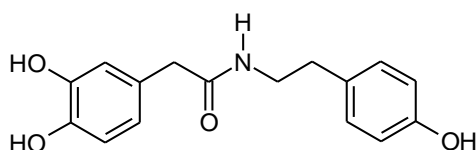
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile claire.

$C_{17}H_{19}NO_5$. $M = 317$. Rdt = 32%

RMN 1H (Acétone- d_6) : δ 6,85 (sl, 1H, NH) ; 6,81 (d, 1H, $J = 2$ Hz ; H-4) ; 6,68-6,59 (m, 4H, H-7, H-8, H-2', H-5') ; 6,38 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz, H-6') ; 3,72 (s, 3H, OCH_3) ; 3,26 (s, 2H, H-2) ; 3,24 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, Ha) ; 2,52 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 161,92 (C-1) ; 147,03 (C-5) ; 145,36 (C-6) ; 144,94 (C-3') ; 143,40 (C-4') ; 131,08 (C-1') ; 127,42 (C-3) ; 121,74 (C-7) ; 119,94 (C-6') ; 115,66 (C-4) ; 115,09 (C-2') ; 114,80 (C-8) ; 112,70 (C-5') ; 55,29 (OCH₃) ; 42,66 (C-2) ; 40,94 (C-a) ; 34,93 (C-b).
SM (EI) m/z 317 [M]⁺

***N*-(4-hydroxyphényléthyl)-2-(3,4-dihydroxyphényl)acétamide (35) :**



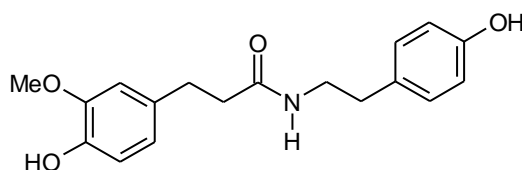
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair.

C₁₆H₁₇NO₃. M = 287. Rdt = 41%

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 9,12 (sl, 1H, OH) ; 8,71 (s, 1H, OH) ; 8,60 (s, 1H, OH) ; 7,82 (t, 1H, $J = 6$ Hz, NH) ; 6,86 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 6,57 (m, 4H, H-3', H-5', H-4, H-7) ; 6,37 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-8) ; 3,09 (m, 4H, H-2, H-a) ; 2,47 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 170,93 (C-1) ; 156,06 (C-4') ; 145,36 (C-5) ; 144,22 (C-6) ; 129,94 (C-1', C-2', C-6') ; 127,62 (C-3) ; 120,18 (C-7) ; 116,89 (C-8) ; 115,73 (C-4) ; 115,53 (C-3', C-5') ; 42,36 (C-2) ; 41,17 (C-a) ; 34,84 (C-b). SM (DCI) m/z 288 [MH]⁺

***N*-Dihydroféruloyltyramine (36):**



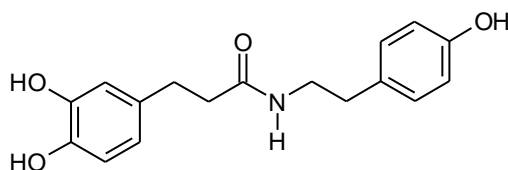
Le produit est obtenu sous forme d'un précipité rose clair.

C₁₈H₂₁NO₄. M = 315. Rdt = 41%. Pf = 129-131°C

RMN ^1H (CDCl₃): δ 6,85 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 6,75 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 6,69 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,62 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 6,58 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz, H-9) ; 5,27 (sl, 1H, NH) ; 3,78 (s, 3H, OCH₃) ; 3,37 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-2) ; 2,82 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-a) ; 2,58 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-3) ; 2,33 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 173,96 (C-1) ; 155,47 (C-6) ; 147,47 (C-7) ; 144,49 (C-4') ; 132,30 (C-1') ; 129,86 (C-4) ; 129,30 (C-2', C-6') ; 120,42 (C-9) ; 114,79 (C-8) ; 114,73 (C-3', C-5') ; 111,71 (C-8) ; 54,91 (OCH $_3$) ; 40,90 (C-a) ; 37,97 (C-2) ; 34,31 (C-3) ; 31,23 (C-b). SM (EI) m/z 315 [M] $^+$

***N*-Dihydrocaféoyltyramine (37):**



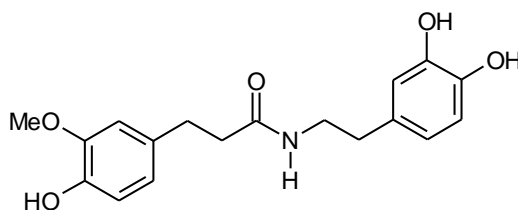
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile claire après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Dichlorométhane 8 / Méthanol 2).

C $_{17}$ H $_{19}$ NO $_4$. M = 301. Rdt = 42%

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ 9,09 (s, 1H, OH) ; 8,66 (s, 1H, OH) ; 8,55 (s, 1H, OH) ; 7,75 (sl, 1H, NH) ; 6,86 (d, 2H, J = 8 Hz, H-2', H-6') ; 6,58 (d, 2H, J = 8 Hz, H-3', H-5') ; 6,52 (d, 1H, J = 8 Hz, H-8) ; 6,47 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 6,33 (dd, 1H, J_1 = 1,6 Hz, J_2 = 8 Hz, H-9) ; 3,07 (q, 2H, J = 7,6 Hz, H-a) ; 2,51 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-2) ; 2,45 (t, 2H, J = 7,6 Hz, H-b) ; 2,15 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-3).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 172,79 (C-1) ; 156,03 (C-4') ; 145,47 (C-6) ; 143,19 (C-7) ; 132,84 (C-1') ; 130,08 (C-4) ; 129,93 (C-2', C-6') ; 119,87 (C-9) ; 116,92 (C-8) ; 115,83 (C-5) ; 115,53 (C-3', C-5') ; 38,04 (C-a) ; 36,25 (C-2) ; 34,98 (C-b) ; 31,07 (C-3). SM (EI) m/z 301 [M] $^+$

***N*-Dihydrofêruloyldopamine (38):**



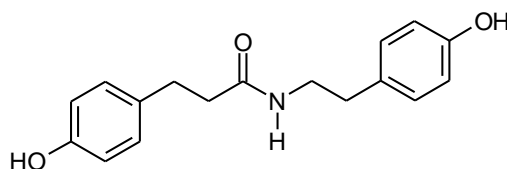
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile orange.

C $_{18}$ H $_{21}$ NO $_5$. M = 331. Rdt = 28%

RMN ^1H (MeOD): δ 6,70 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5) ; 6,63 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 6,59 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-5') ; 6,55 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-9) ; 6,54 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-2') ; 6,37 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-6') ; 3,76 (s, 3H, OCH₃) ; 3,24 (m, 2H, H-a) ; 2,73 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-2) ; 2,49 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-3) ; 2,33 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 171,79 (C-1) ; 147,80 (C-6) ; 145,50 (C-7) ; 145,02 (C-3') ; 143,95 (C-4') ; 132,64 (C-1') ; 130,70 (C-4) ; 120,68 (C-9) ; 119,64 (C-6') ; 116,38 (C-2) ; 115,92 (C-8) ; 115,71 (C-2', C-6') ; 112,84 (C-5) ; 55,94 (OCH₃) ; 41,02 (C-a) ; 38,03 (C-2) ; 35,22 (C-b) ; 31,29 (C-3). SM (EI) m/z 331 [M]⁺.

***N*-Dihydrocoumaroyltyramine (39):**



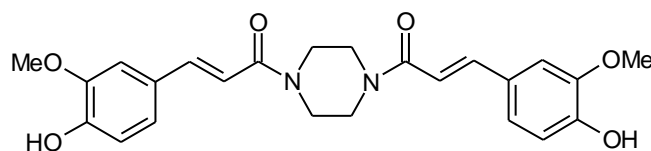
Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc après purification par chromatographie sur colonne de gel silice (Acétate d'éthyle 6 / Cyclohexane 4).

C₁₇H₁₉NO₃. M = 285. Rdt = 40%. Pf = 180-182°C

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ 9,13 (sl, 2H, OH) ; 7,75 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH) ; 6,87 (m, 4H, H-5, H-9, H-2', H-6') ; 6,58 (m, 4H, H-6, H-8, H-3', H-5') ; 3,08 (m, 2H, H-a) ; 2,59 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-2) ; 2,44 (t, 2H, $J = 8$ Hz, H-b) ; 2,19 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-3).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 171,80 (C-1) ; 156,03 (C-7) ; 155,86 (C-4') ; 131,88 (C-1') ; 130,02 (C-4) ; 129,92 (C-5, C-9) ; 129,50 (C-2', C-6') ; 115,51 (C-6, C-8) ; 115,45 (C-3', C-5') ; 40,99 (C-a) ; 37,99 (C-2) ; 34,87 (C-b) ; 30,81 (C-3). SM (EI) m/z 285 [M]⁺.

***trans*-*N*-Diféruoylpipérazine (40) :**



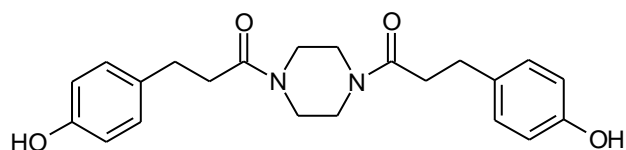
Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle).

C₂₄H₂₆N₂O₆. M = 438. Rdt = 22%. Pf = 198-200°C

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 9,42 (sl, 2H, OH) ; 7,37 (d, 2H, $J = 15,2$ Hz, H-3) ; 7,26 (d, 2H, $J = 2$ Hz, H-5) ; 7,05 (dd, 2H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz, H-9) ; 7,02 (d, 2H, $J = 15,2$ Hz, H-2) ; 6,70 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 3,76 (s, 6H, OCH $_3$) ; 3,66 (sl, 4H, NCH $_2$) ; 3,52 (se, 4H, NCH $_2$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 165,52 (C-1) ; 149,01 (C-7) ; 148,31 (C-6) ; 142,99 (C-3) ; 127,10 (C-4) ; 123,07 (C-9) ; 115,91 (C-8) ; 114,83 (C-2) ; 111,69 (C-5) ; 60,22 (CH $_2$) ; 56,25 (OCH $_3$). SM (EI) m/z 438 [M] $^+$.

N,N-*p*-Dihydrocoumaroylpipérazine (41):



Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc.

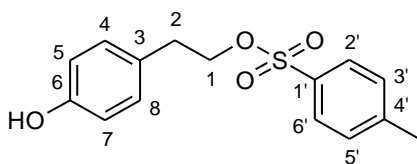
C $_{22}$ H $_{26}$ N $_2$ O $_4$. M = 382 Rdt = 36%.

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 9,07(sl, 2H, OH) ; 6,93 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz, H-5, H-9) ; 6,57 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz, H-6, H-7) ; 3,35-3,26 (m, 8H, Pipérazine) ; 2,60 (t, 4H, $J = 7,2$ Hz, H-2) ; 2,44 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-3).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 170,74 (C-1) ; 155,90 (C-7) ; 155,77 (C-7) ; 131,75 (C-4) ; 129,72 (C-5, C-9) ; 115,44 (C-6, C-8) ; 115,35 (C-6, C-8) ; 45,32 (C-2) ; 40,36 (C-2) ; 34,83 (C-3) ; 30,41 (C-3). SM (EI) m/z 382 [M] $^+$.

4.2.4 Synthèse des analogues structuraux du tyrosol

2-(4-Hydroxyphényl)-1-(*p*-tolyl)oxyéthane (42):



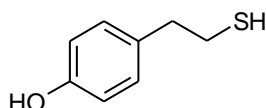
A une solution de 4-hydroxyphényléthanol (600 mg ; 4,35 mmol) dans de la pyridine (2 mL) refroidie à -10°C , est ajouté lentement sous argon une solution de chlorure de tosylé (870,7 mg ; 4,56 mmol) dans de la pyridine (2 mL). Le milieu est agité à -10°C pendant 10 min puis à 0°C pendant 2 h. De l'eau glacée (15 mL) est ensuite rajoutée dans le milieu ; la solution obtenue est agitée une heure à température ambiante, puis extraite par de l'éther. La

phase organique est successivement lavée par une solution aqueuse d'HCl 1% et de l'eau. Elle est ensuite séchée et évaporée à sec pour donner une huile jaune qui est utilisée sans purification pour les étapes suivantes.

$C_{15}H_{16}O_4S$. M = 292. Rdt = 12%

RMN 1H (Acétone- d_6): δ 8,5 (s, 1H, OH) ; 7,15 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 7,36 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-4, H-8) ; 6,92 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 6,65 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-5, H-7) ; 4,10 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-1) ; 2,78 (m, 2H, H-2) ; 2,38 (s, 3H, CH_3).

2-(4-Hydroxyphényl)éthanethiol (43):



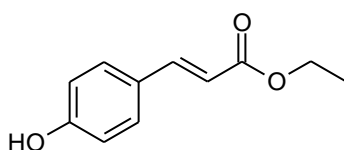
A une solution de 2-(4-hydroxyphényl)-1-(*p*-tolylloxy)éthane **42** (150 mg ; 0,48 mmol) dans de l'éthanol anhydre (1,5 mL) sont ajoutées sous argon la thiourée (36,76 mg ; 0,483 mmol) et de l'eau (20 μ L) ; le mélange obtenu est porté à reflux pendant 2h30. Une solution aqueuse de soude (274 mg de NaOH dans 250 μ l d'eau) est ajoutée et l'agitation à reflux est poursuivie pendant 2h30. Après retour à température ambiante, le milieu est acidifié (jusqu'à pH 5) à l'aide d'une solution molaire d'HCl et extrait par du dichlorométhane (2 x 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées et évaporées à sec. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile incolore après purification par colonne de gel de silice (Acétate d'éthyl 5/ cyclohexane 5).

$C_8H_{10}OS$ M = 154 Rdt = 42%

RMN 1H (DMSO- d_6) : δ 9,15 (sl, 1H, OH) ; 6,94 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-4, H-8) ; 6,60 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-5, H-7) ; 2,65 (m, 2H, H-2) ; 2,57 (m, 2H, H-1) ; 2,10 (sl, 1H, SH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 156,20 (C-6) ; 130,75 (C-3) ; 129,89 (C-4, C-8) ; 115,50 (C-5, C-7) ; 40,59 (C-1) ; 26,09 (C-2). SM (EI) m/z 154 $[M]^+$

4-Hydroxycinnamate d'éthyle (44):

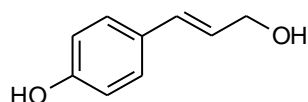


A une solution glacée d'acide *p*-hydroxycinnamique (1 g ; 6,09 mmol) dans de l'éthanol absolu (50 mL), on ajoute goutte à goutte du chlorure d'acétyle (3,35 g ; 42,6 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 jours puis évaporé. Le résidu solide obtenu est solubilisé dans 50 mL d'eau et extrait par 50 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée et évaporée à sec pour donner le produit sous la forme d'un précipité blanc cassé.

$C_{11}H_{12}O_3$ M = 192 Rdt = 95%

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ 7,57 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H-3) ; 7,35 (d, 2H, $J = 9,6$ Hz, H-5, H-9) ; 6,81 (d, 2H, $J = 9,6$ Hz, H-6, H-8) ; 6,23 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H-2) ; 4,21 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2) ; 1,27 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_3).

3-(4-Hydroxyphényl)propan-2-énol (45):



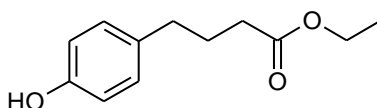
De l'hydrure de lithium et d'aluminium (735,2 mg ; 19,36 mmol) est ajouté à une solution de *p*-hydroxycinnamate d'éthyle **44** (310 mg ; 1,61 mmol) dans du THF anhydre (15 mL). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 3 h et hydrolysé avec une solution molaire d'acide chlorhydrique après retour à température ambiante. Le milieu est extrait par de l'acétate d'éthyle et la phase organique obtenue est séchée puis évaporée à sec. Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5 / Cyclohexane 5).

$C_9H_{10}O_2$. M = 150. Rdt = 17%

RMN 1H ($DMSO-d_6$) : δ 9,41 (sl, 1H, OH) ; 7,16 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-5, H-9) ; 6,63 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-6, H-8) ; 6,33 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H-3) ; 6,04, td, 1H, $J_1 = 5,6$ Hz, $J_2 = 16$ Hz, H-2) ; 4,69 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, OH) ; 3,97 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C ($DMSO-d_6$) : δ 157,26 (C-7) ; 129,13 (C-3) ; 128,36 (C-2) ; 127,84 (C-5, C-9) ; 127,61 (C-4) ; 115,81 (C-6, C-8) ; 62,18 (CH_2). SM (EI) m/z 150 $[M]^+$.

4-(4-Hydroxyphényl)butanoate d'éthyle (46):

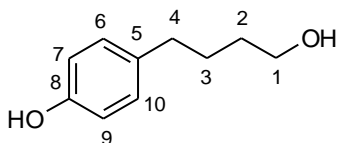


Ce produit a été synthétisé selon le mode opératoire décrit pour le *p*-hydroxycinnamate d'éthyle **44** en partant de 300 mg de l'acide 4-(4-hydroxyphényl)butanoïque.

$C_{12}H_{16}O_3$. M = 208. Rdt = 95%

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ 6,97 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-6, H-10) ; 6,68 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-7, H-9) ; 4,06 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, O- CH_2) ; 2,51 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-2) ; 2,24 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-3) ; 1,86 (m, 2H, H-4) ; 1,21 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3).

4-(4-Hydroxyphényl)butanol (**47**):



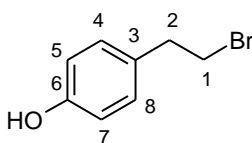
Une solution de 4-(4-hydroxyphényl)butanoate d'éthyle **46** (170 mg ; 0,876 mmol) dans de l'éthanol absolu (5 mL) est refroidie $-15^\circ C$, puis une suspension de chlorure de calcium (194,5 mg, 1,75 mmol) dans du THF (5 mL) suivie du borohydrure de sodium ($NaBH_4$; 132,6 mg ; 3,5 mmol) sont rajoutés. Le milieu est agité à température ambiante pendant 1h, puis porté à reflux pendant 4 h. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé et le résidu obtenu est repris par 20 mL d'une solution d'HCl 1N et extrait par de l'acétate d'éthyle (20 mL). La phase organique est séchée et évaporée à sec. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 5/ Cyclohexane 5).

$C_{10}H_{14}O_2$ M = 166 Rdt = 27%

RMN 1H (Acétone- d_6) : δ 6,94 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-6, H-10) ; 6,67 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-7, H-9) ; 3,46 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-1) ; 2,47 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-4) ; 1,54 (m, 2H, H-2) ; 1,49 (m, 2H, H-3).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6): δ 156,45 (C-8) ; 133,27 (C-5) ; 129,16 (C-6, C10) ; 114,96 (C-7, C-9) ; 61,43 (C-1) ; 61,29 (C-4) ; 34,58 (C-2) ; 32,43 (C-3). SM (EI) m/z 166 $[M]^+$.

4-(2-bromoéthyl)phénol (**48**):



Du 2-(*p*-Méthoxyphényl)éthanol (1,52 g ; 10 mmol) est solubilisé dans de l'acide bromhydrique à 48% (15 mL), la solution obtenue est portée à reflux pendant 2 h. Après retour à température ambiante le milieu est versé dans 10 mL d'eau froide et extrait par de l'acétate d'éthyle (2 x 25 mL). La phase organique est séchée et évaporée à sec. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile verte après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Acétate d'éthyle 3/ Cyclohexane 7).

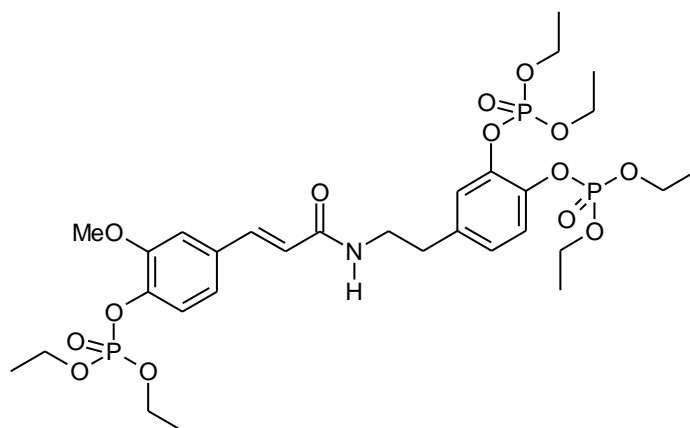
C_8H_9BrO M = 201 Rdt = 40%

RMN 1H (DMSO- d_6): δ 9,19 (sl, 1H, OH) ; 6,98 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-4, H-8) ; 6,60 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-5, H-7) ; 3,55 (t, 2H, J = 7,6 Hz, H-1) ; 2,91 (t, 2H, J = 7,6 Hz, H-2).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 156,55 (C-6) ; 130,16 (C-4, C-8) ; 129,54 (C-3) ; 115,57 (C-5, C-7) ; 38,27 (C-1) ; 35,45 (C-2). SM (EI) m/z 201 $[M]^+$

4.2.5 Réactions de phosphatation

trans-*N*-(2-[3,4-diéthylphosphatephényl]éthyl)-3-(4-éthylphosphate-3-méthoxyphényl)propénamide (49)

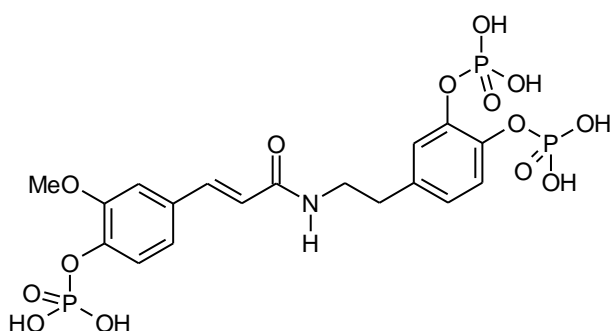


De l'hydrure de sodium (61,2 mg ; 2,54 mmol) est ajouté sous argon à une solution froide (0°C) de **31** (200 mg ; 0,607 mmol) dans du THF ; l'ensemble est agité 30 minutes à 0°C, puis du diéthylchlorophosphate (278 μ L ; 1,91 mmol) est additionné au milieu. L'agitation est poursuivie 20 h à température ambiante. Le milieu est versé dans 10 mL d'eau glacée et extrait par de l'acétate d'éthyle (2 x 50 mL). La phase organique est séchée et évaporée à sec. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile claire après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Dichlorométhane 95 / Méthanol 5).

$C_{26}H_{46}NO_{14}P_3$. M = 689. Rdt = 48%

RMN ^1H (CDCl_3) : δ 7,47 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,27 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 7,19 (dd, 1H, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, H-9) ; 7,17 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz, H-5) ; 7,02 (sl, 1H, H-2') ; 6,99 (d, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, H-5') ; 6,93 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-6') ; 6,31 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 5,90 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH) ; 4,18 (m, 8H, CH_2) ; 3,87 (s, 3H, OCH_3) ; 3,54 (q, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-a) ; 2,77 (t, 2H, $J_1 = J_2 = 6,4$ Hz, H-b) ; 1,29 (m, 12 H, CH_3).

***trans*-N-(2-[3,4-diphosphatephényl]éthyl)-3-(3-méthoxy-4-phosphatephényl)propénamide 50 :**



Le produit **49** (180 mg ; 0,274 mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane anhydre (1,5 mL) et la solution ainsi obtenue est refroidie à 0°C. Un excès de bromure de triméthylsilane est rajouté au milieu et l'ensemble est agité 4 h à température ambiante. Le solvant et l'excès de réactif sont évaporés sous vide et le produit est obtenu sous la forme d'une poudre blanche après précipitation dans l'acétone.

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_{14}\text{P}_3$. M = 569. Rdt = 50%. Pf = 248-250°C (décomposition)

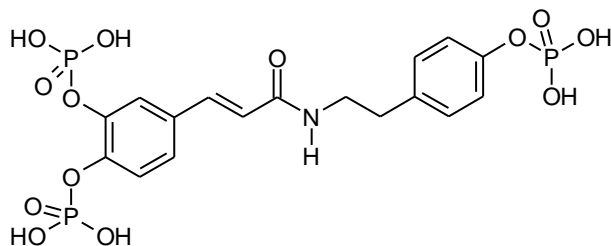
RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) : δ 8,15 (t, 1H, $J = 6,4$ Hz, NH) ; 7,31 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,23-7,15 (m, 4H, H-5, H-8, H-2', H-5') ; 7,03 (dd, 1H, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, H-9) ; 6,92 (dd, 1H, $J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, H-6') ; 6,05 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 3,74 (s, 3H, OCH_3) ; 3,30 (q, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-a) ; 2,64 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) : δ 165,49 (C-1) ; 150,93 (C-7) ; 142,65 (C-3') ; 141,97 (C-4') ; 141,22 (C-6) ; 138,69 (C-3) ; 136,36 (C-4) ; 131,86 (C-1') ; 125,03 (C-6') ; 122,54 (C-5, ou C-8, C-2', ou C-5') ; 122,24 (C-2) ; 122,03 (C-5, ou C-8, C-2', ou C-5') ; 121,11 (C-5, ou C-8, C-2', ou C-5') ; 120,54 (C-9) ; 112,00 (C-5, ou C-8, C-2', ou C-5') ; 56,10 (OCH_3) ; 40,59 (C-a) ; 34,96 (C-b).

RMN ^{31}P ($\text{DMSO}-d_6$) : δ -4,67 ; -4,79 ; -5,18.

SM (FAB matrice glycérol) m/z 570 $[\text{M}+\text{H}]^+$

***trans*-N-(2-[4-phosphatephényl]éthyl)-3-(3,4-diphosphatephényl)propenamamide (51) :**



$C_{17}H_{20}NO_{13}P_3$. M = 539. Rdt = 26% (depuis la *trans*-N-caféoyltyramine **26**).

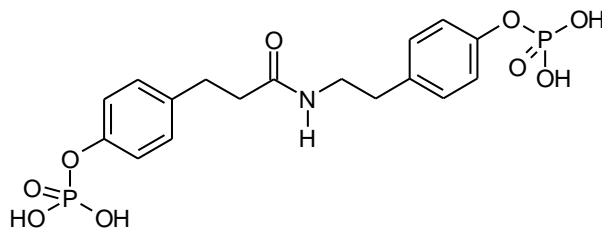
Le produit est obtenu sous la forme d'une huile orange après purification par chromatographie sur colonne phase inverse (eau)

RMN 1H (DMSO- d_6) : δ 8,23 (sl, 1H, NH) ; 7,48 (sl, 1H, H-5) ; 7,32-7,22 (m, 3H, H-3, H-8, H-9) ; 7,12 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5') ; 7,014 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2', H-6') ; 6,43 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 3,29 (m, 2H, H-a) ; 2,66 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ 165,24 (C-1) ; 150,35 (C-4') ; 143,88 (C-6) ; 143,22 (C-7) ; 137,87 (C-3) ; 135,48 (C-4) ; 131,79 (C-1') ; 130,03 (C-2', C-6') ; 124,89 (C-8) ; 122,56 (C-2, C-9) ; 120,46 (C-5) ; 120,42 (C-3', C-5') ; 40,87 (C-a) ; 34,76 (C-b).

RMN ^{31}P (DMSO- d_6) : δ -4,96 ; -5,10 ; -5,18. SM (FAB- matrice glycérol) m/z 538 $[M-H]^+$

***N*-(4-phosphatephényléthyl)-3-(4-phosphatephényl)propanamide (52)**



Ce produit a été synthétisé selon le mode opératoire du produit **50** à partir de 180 mg de *N*-(4-hydroxyphényléthyl)-3-(4-hydroxyphényl)propanamide (**39**). Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc après purification par chromatographie phase inverse (Eau 85 / Méthanol 15).

$C_{17}H_{21}NO_9P_2$. M = 445. Rdt = 43%. Pf = 197-198°C

RMN 1H (DMSO- d_6) : δ 7,84 (sl, 1H, NH) ; 7,15 (m, 4H, H-5, H-9, H-2', H-6') ; 7,01 (m, 4H, H-6, H-8, H-3', H-5') ; 3,20 (q, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-a) ; 2,85 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-3) ; 2,57 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-b) ; 2,22 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-2).

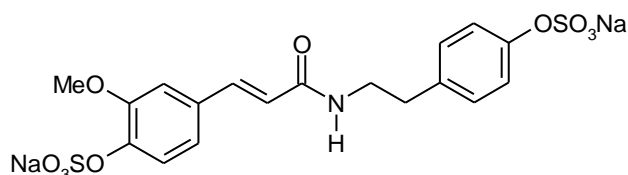
RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 171,64 (C-1) ; 150,31 (C-7, C-4') ; 137,36 (C-1') ; 135,51 (C-4) ; 130,02 (C-5, C-9) ; 129,58 (C-2', C-6') ; 120,34 (C-6, C-8, C-3', C-5') ; 40,57 (C-a) ; 37,50 (C-3) ; 34,84 (C-b) ; 30,76 (C-2).

RMN ^{31}P (DMSO- d_6): δ -5,84 ; -5,85.

SM (FAB, matrice glycérol) m/z 446 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.2.6 Réactions de sulfatation

trans-*N*-(2-[4-sulfatephényl]éthyl)-3-(3-méthoxy-4-sulfatephényl)propénamide (53)



A une solution de *trans*-*N*-féruoyltyramine **25** (150 mg ; 0,455 mmol) dans du DMF anhydre (2 mL) est ajouté un complexe de pyridine et de trioxyde de soufre (2,73 mmol ; 434 mg) et l'ensemble est agité 6 h à température ambiante. Une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (4 mL) est ensuite additionnée au milieu. Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc après purification par chromatographie sur colonne phase inverse (Eau 70 / Méthanol 30), et lyophilisation du résidu obtenu après évaporation des fractions.

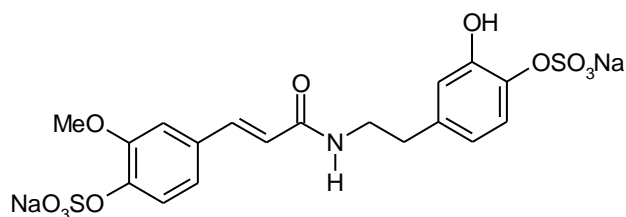
$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NNa}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$. $M = 517$. Rdt = 50%. Pf > 300°C

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 8,06 (sl, 1H, NH) ; 7,39 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-8) ; 7,27 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,07-6,95 m, 6H, H-5, H-9, H-2', H-3', H-5', H-6') ; 6,45 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 3,69 (s, 3H, OCH₃) ; 3,26 (m, 2H, H-a) ; 2,63 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-b).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 165,60 (C-1) ; 152,36 (C-4') ; 150,85 (C-6) ; 144,42 (C-7) ; 139,01 (C-1') ; 130,48 (C-8) ; 129,30 (C-2', C-6') ; 121,21 (C-4, C-9) ; 121 (C-3', C-5') ; 120,56 (C-9) ; 111,15 (C-5) ; 56,01 (OCH₃) ; 36,25 (C-a) ; 31,21 (C-b).

SM (FAB matrice glycérol) m/z 518 $[\text{M}+\text{H}]^+$

trans-*N*-(2-[4-hydroxy-3-sulfatephényl]éthyl)-3-(3-méthoxy-4-sulfatephényl)propénamide (54)

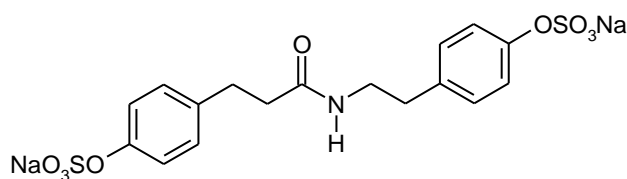


Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc après purification par chromatographie phase inverse (eau), et lyophilisation du résidu obtenu après évaporation des fractions de colonne.

$C_{18}H_{17}NNa_2O_{11}S_2$. $M = 533$.

RMN 1H (DMSO- d_6) : δ 8,07 (sl, 1H, NH) ; 7,39 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H-8) ; 7,37 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-5') ; 7,34 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-5) ; 7,27 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-3) ; 7,08 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-2') ; 6,96 (dd, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-9) ; 6,69 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8,4$ Hz, C-6') ; 6,45 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, H-2) ; 3,70 (s, 3H, OCH $_3$) ; 3,27 (m, 2H, H-a) ; 2,58 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-b).
 RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ 165,55 (C-1) ; 150,83 (C-3') ; 144,37 (C-4') ; 144,21 (C-7) ; 142,71 (C-6) ; 139,01 (C-3) ; 133,26 (C-1') ; 130,51 (C-4) ; 122,28 (C-9) ; 121,29 (C-2 ou C-8 ou C-2' ou C-5' ou C-6') ; 120,95 (C-2 ou C-8 ou C-2' ou C-5' ou C-6') ; 120,59 (C-2 ou C-8 ou C-2' ou C-5' ou C-6') ; 120,54 (C-2 ou C-8 ou C-2' ou C-5' ou C-6') ; 120,36 (C-2 ou C-8 ou C-2' ou C-5' ou C-6') ; 111,50 (C-5) ; 55,99 (OCH $_3$) ; 41,11 (C-a) ; 35,54 (C-b). SM (FAB matrice glycérol) m/z 533 [M] $^+$

***N*-(2-[4-sulfatephényl]éthyl)-3-(4-sulfatephényl)propanamide (55) :**

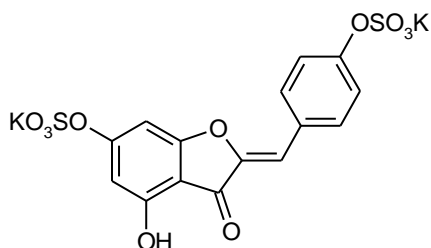


Le produit est obtenu sous la forme d'un précipité blanc.

$C_{17}H_{17}NNa_2O_9S_2$. $M = 489$. Rdt = 30%

RMN 1H (DMSO- d_6) : δ 7,79 (sl, 1H, NH) ; 7,38 (m, 4H, H-6, H-8, H-3', H-5') ; 6,98 (m, 4H, H-5, H-9, H-2', H-6') ; 3,08 (m, 2H, H-a) ; 2,54 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-3) ; 2,42 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-b) ; 2,24 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-2). SM (FAB matrice glycérol) m/z 489 [M] $^+$

(*Z*)-4-Hydroxy-6-sulfate-(4-sulfatebenzylidène)benzofuran-3(2*H*)-one (56):



Une solution de **6b** (100 mg ; 0,37 mmol) dans de la pyridine anhydre (4 mL) est refroidie à 0°C, puis de l'acide chlorosulfonique (172 µL ; 2,59 mmol) est rajouté goutte à goutte. Le mélange est agité 20 h à température ambiante et la pyridine est ensuite évaporée. Le résidu jaune obtenu est repris par de l'eau (4 mL) ; du carbonate de potassium est rajouté à la solution jusqu'à pH 10. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne phase inverse (Eau 85 / Méthanol 15). Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune après lyophilisation du résidu issu de la colonne.

$C_{15}H_8O_{11}K_2S_2$. M = 506. Rdt = 37%. Pf = supérieur à 300°C

UV (MeOH): λ_{max} = 204, 291, 324 et 378 nm.

RMN 1H (DMSO- d_6) : δ 7,80 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-2', H-6') ; 7,18 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-3', H-5') ; 7,02 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-7) ; 6,88 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H-5) ; 6,62 (s, 1H, =CH-).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ 179,75 (C-3) ; 166,87 (C-4) ; 162,42 (C-6) ; 155,21 (C-8) ; 152,93 (C-4') ; 146,79 (C-2) ; 132,60 (C-2', C-6') ; 130,64 (C-1') ; 120,85 (C-3', C-5') ; 110,37 (=CH-) ; 106,68 (C-9) ; 105,12 (C-5) ; 96,96 (C-7). SM (FAB matrice glycérol) m/z 507 $[M+H]^+$

4.3 PROTOCOLES D'EVALUATION BIOLOGIQUE DES MOLECULES SYNTHETISEES

4.3.1 Evaluation de la cytotoxicité sur culture de mélanocytes humains normaux cultivés en monocouche

Les mélanocytes sont cultivés jusqu'à confluence dans des plaques 96 puits à raison de 50000 cellules/cm². Les molécules sont solubilisées dans du DMSO et rajoutées à deux concentrations différentes (100 µM et 10 µM), concentrations qui seront reprises lors du dosage de l'activité de la tyrosinase. L'ensemble est incubé à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 h. Les milieux de culture sont ensuite retirés et une solution de *p*-nitrophénylphosphate dans un tampon acétate (PH 8) est rajoutée aux cellules. La réaction est stoppée au bout de 2 heures par addition d'une solution de soude (NaOH 1N). Le dosage au PNPP est réalisé sur le

tapis cellulaire et les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin négatif (puits non traité).

4.3.2 Modèle *in vitro* d'inhibition de la tyrosinase de champignon isolée

L'échantillon à tester est incubé en présence de tyrosinase de champignon (Sigma) et de tampon Phosphate 10 mM à pH 7 (PBS, Sigma) pendant cinq minutes sous agitation. La L-DOPA (Sigma), substrat de la tyrosinase, est incubée dix minutes à l'abri de la lumière en présence ou non des molécules à tester. Le calcul du pourcentage d'inhibition est réalisé en rapportant la DO de l'essai à la DO du témoin négatif sans molécule.

Le témoin positif utilisé est l'acide kojique (Sigma) à 0,001% (55% \pm 5-10% d'inhibition). La lecture à 490 nm est réalisée avec le lecteur de plaque Victor²V (Perkin Elmer).

4.3.3 Modèle *in vitro* d'inhibition de la tyrosinase humaine extraite de mélanocytes

L'extrait mélanocytaire est obtenu après lyse des membranes cellulaires des mélanocytes humains normaux réalisée par choc thermique. Le surnageant est récupéré puis incubé avec le MBTH (Sigma) et la L-DOPA (Sigma) en présence de tampon Phosphate 100 mM à pH 7. La DO à 490 nm mesurée après 30 minutes d'incubation est rapportée pour chaque actif testé à celle obtenue pour le témoin et le pourcentage d'inhibition est calculé en rapportant la DO de l'essai (molécule testée) à la DO du témoin négatif (sans molécule). Le témoin positif utilisé est l'acide kojique à 0,01% (60% \pm 5% d'inhibition).

4.3.4 Modèle *in vitro* d'inhibition de la tyrosinase de mélanocytes humains cultivés en monocouche

Les mélanocytes humains normaux (issus de plastie abdominale) sont ensemencés en plaque 24 puits à raison de 80000 cellules par puits. Ils sont cultivés jusqu'à confluence et les échantillons solubilisés dans le DMSO, sont appliqués pendant 24 heures dans les milieux de culture. Après 24 heures, les milieux sont éliminés et les mélanocytes sont décrochés par action mécanique. Les culots secs sont récupérés après centrifugation (1500 rpm), puis une extraction douce en présence de tampon Tris/HCl 10 mM et Triton X100 à 0,1% (Sigma) est réalisée par choc thermique en soumettant les culots secs à quatre bains successifs de deux minutes dans azote liquide et dans de l'eau à 40°C. Après centrifugation à 14500 rpm pendant 30 minutes, les surnageants sont récupérés puis incubés avec le MBTH (Sigma) et la L-Dopa (Sigma) en présence de tampon Phosphate 100 mM à pH = 7,0. La DO à 490 nm est mesurée

après 30 minutes d'incubation, et l'inhibition de la tyrosinase est calculée en rapportant la DO à 490 nm au taux de protéines (mesuré dans chaque puits de culture) de l'essai par rapport au ratio DO 490 nm/concentration en protéines du témoin négatif (témoin non traité). Un pourcentage de l'activité anti-tyrosinase est ainsi calculé par rapport au témoin non traité.

Le témoin positif d'expérience est l'acide kojique appliqué à 0,01% sur les mélanocytes (pour une inhibition mesurée de $20\% \pm 5\%$).

4.3.5 Dosage des protéines sur les milieux de culture

Les protéines sont dosées dans chaque puits de culture par la technique de dosage BCA (Acide Bicinchiniquique) en utilisant un kit disponible commercialement (Uptima, Interchim France) :

25 μL de milieu sont incubés avec 200 μL de réactif BCA pendant 30 minutes à 37°C . La DO est ensuite lue à 562 nm et le taux de protéines est déterminé par rapport à une gamme étalon réalisée à partir d'un standard commercial de sérum albumine bovine à 2 mg/ml.

4.3.6 Protocoles enzymatiques

4.3.6.1 Essai de déphosphatation par une phosphatase alcaline type VII-S de muqueuses intestinales bovines (Sigma)

L'enzyme est solubilisée à 100 Unités par mL dans un tampon Tris à pH 9,9 (tris/HCl 0,1 M-MgCl₂ 1 mM). Les molécules sont solubilisées à 10^{-3} M dans le même tampon ($V = 10$ mL) et à chacune des solutions on ajoute 10 mL de solution enzymatique ; l'ensemble est agité 30 minutes à 37°C (une Unité enzymatique peut catalyser 1 μmol par minute à 37°C et à pH = 9,8). La réaction est stoppée en abaissant le pH à 6,5 et 200 μL de cette solution sont déposés sur les mélanocytes en monocouche. Au final les molécules sont testées à 10^{-4} M (100 μM) sur les mélanocytes (dosage de l'activité de la tyrosinase).

Pour chaque essai un témoin molécule constitué par la molécule seule préparée dans les mêmes conditions mais sans enzyme, est préparé afin de comparer les activités avant et après déphosphorylation. Un témoin enzyme sans molécule est réalisé également pour s'affranchir des interférences dues à l'enzyme

4.3.6.2 Essai de désulfatation par une sulfatase bactérienne type VI-S d'Aerobacter aerogenes

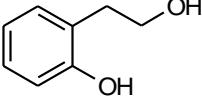
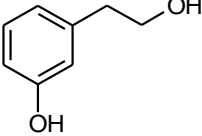
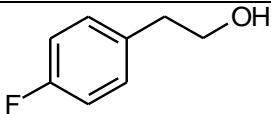
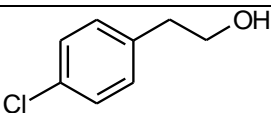
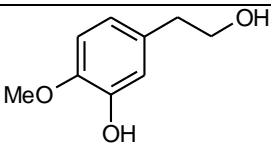
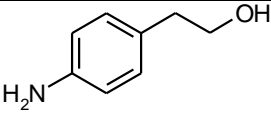
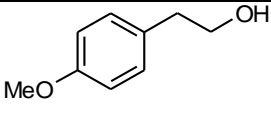
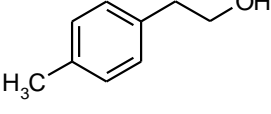
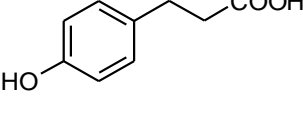
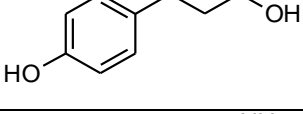
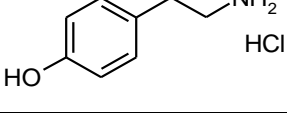
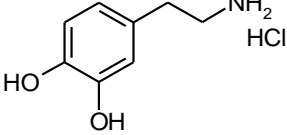
Les molécules sont solubilisées à 10^{-3} M dans un tampon Tris à pH 7,1. 1 mL d'enzyme à 19 U/mL est rajouté à chaque solution de molécule à traiter. Les solutions

obtenues sont agitées 17 h à 37°C (une unité enzymatique hydrolyse 1,0 μmol de *p*-nitrophényl sulfate par minute à pH 7,1 à 37°C). La réaction est stoppée en abaissant le pH à 5 et la solution obtenue est déposée sur les mélanocytes en monocouche. Les molécules sont testées au final à 10^{-4}M (dosage de l'activité de la tyrosinase).

Pour chaque essai un témoin molécule constitué par la molécule seule préparée dans les mêmes conditions mais sans enzyme, est préparé afin de comparer les activités avant et après déphosphorylation. Un témoin enzyme sans molécule est réalisé également pour s'affranchir des interférences dues à l'enzyme

ANNEXES

**Liste des produits chimiques de structure proche du tyrosol évalués sur la tyrosinase de
mélanocytes cultivés en monocouche.**

| Produit | Formule développée | % d'inhibition | Ecart-type |
|---|---|----------------|------------|
| 2-Hydroxyphenethyl alcohol |  | 0 | 8 |
| 3-Hydroxyphenethyl alcohol |  | 0 | 5 |
| 4-Fluorophenethyl alcohol |  | 0 | 3 |
| 4-Chlorophenethyl alcohol |  | 0 | 9 |
| 4-Hydroxy-3-methoxyphenethyl alcohol (Homovanillyl alcohol) |  | 3,5 | 4 |
| 4-aminophenethyl alcohol |  | 3,5 | 2 |
| 4-Methoxyphenethyl alcohol |  | 8,5 | 14 |
| 4-Methylphenethylalcohol |  | 0 | 4 |
| 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid |  | 4 | 2 |
| 3-(4-Hydroxyphenyl)1-propanol |  | 62 | 6 |
| Tyramine hydrochloride |  | 23 | 3 |
| 3-Hydroxytyramine Hydrochloride (Dopamine Hydrochloride) |  | 10 | 2,5 |

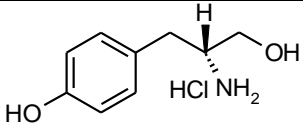
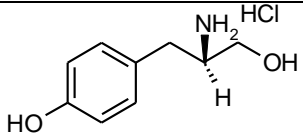
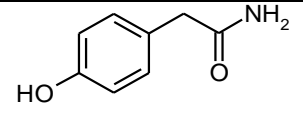
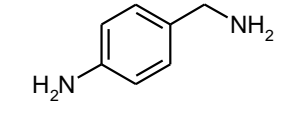
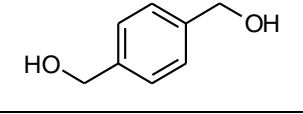
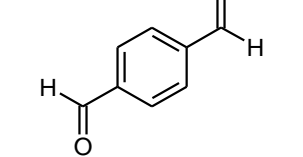
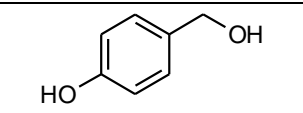
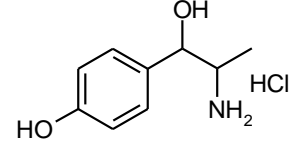
| | | | |
|--|---|------|------|
| D-Tyrosinol hydrochloride |  | 10 | 14 |
| L-Tyrosinol hydrochloride |  | 1 | 4 |
| 4-Hydroxyphenylacetamide |  | 5 | 14,5 |
| 4-Aminobenzylamine |  | 6 | 11,5 |
| 1,4-Benzenedimethanol |  | 14,5 | 6 |
| Terephthalaldehyde |  | 9 | 1,5 |
| 4-Hydroxybenzyl alcohol |  | 8,5 | 6 |
| α -(1-Aminoethyl)-4-hydroxybenzyl alcohol hydrochloride |  | 0 | 5 |

Tableau XXII. Produits commerciaux (Aldrich) testés sur la tyrosinase de mélanocytes en monocouche à 100 μ M.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Tortora, G. J. ; Grabowsky, S. R. Le système tégumentaire. Principes d'anatomie et de physiologie. Editions de Boeck université, Paris, 2^{ème} édition française. **1994**.
- 2 Riley, P. A. Melanogenesis and melanoma. *Pigment cell Res.* **2003**, 16, 548-552.
- 3 Neyra, O. ; Vaya, J. ; Musa, R. ; Izrael, S. ; Ben-Arie, R. ; Tamir, S. Glabrene and Isoliquiritigenine as Tyrosinase Inhibitors from Licorice Roots. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1201-1207.
- 4 Vijayasaradhi, S. The melanosome: Dark pigment granule shines bright light on vesicle biogenesis and more. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, 121 (4), 650-660.
- 5 Melissopoulos, A. ; Levacher, C. La peau structure et physiologie. Editions médicales internationales ; Paris ; Tec & Doc Lavoisier ; **1998**.
- 6 Peyrefitte, G. Biologie de la peau. Cahier d'esthétique-Cosmétique. Editions Simep, Paris ; **1993**.
- 7 Kobayashi, N. ; Nakagawa, A. ; Muramatsu, T. ; Yamashina, Y. ; Shirai, T. ; Hashimoto, M. W. ; Ishigaki, Y. ; Ohnishi, T. ; Mori, T. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, 110: 806-810.
- 8 Aroca, P. ; Urabe, K. ; Kobayashi, T. ; Tsukamoto, K. ; Hearing, V. J. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (34), 25650-25655.
- 9 Prota, G. Regulatory mechanism of melanogenesis : beyond the tyrosinase concept. *J. Invest. Dermatol.* **1993**, 100, 156S-161S.
- 10 Nylander, K. ; Bourdon, J-C. ; Bray, S. E. ; Gibbs, N. K. ; Kay, R. ; Hall, P. A. Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-I by the p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J. Pathol.* **2000**, 190, 39-46.
- 11 Marles, L. K. ; Peters, E. M. ; Tobin, D. J. ; Hibberts, N. A. ; Schallreuter, K. U. Tyrosine hydroxylase isoenzyme I is present in human melanosomes: a possible novel function in pigmentation. *Exp. Dermatol.* **2003**, 12, 61-70.
- 12 Schallreuter, K. U. A review of recent advances on the regulation of pigmentation in the human epidermis. *Clin. Exp. Dermatol.* **1999**. 45 (7), 943-949.
- 13 Martini M-C. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. Lavoisier, Paris ; **2003**, 117-149
- 14 Potterf, S. B. ; Virador, V. ; Wakamatsu, K. ; Furumura, M. ; Santis, C. ; Shosuke, I. ; Hearing, V. J. Cysteine transport in melanosomes from murine melanocytes. *Pigment Cell Res.* **1999**, 12 (1), 4-12.
- 15 Hearing, V. J. ; Jimenez, M. Mammalian tyrosinase : the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **1987**, 19 (12), 1141-1147.
- 16 Busca, R. ; Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **2000**, 13, 60-69.
- 17 Sturm, R. A ; O'Sullivan, B. J. Box, N. F ; Smith, A. G. Chromosomal structure of human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of tyrosinase-related protein gene family. *Genomics.* **1995**, 29, 24-34.
- 18 Ortonne, J. P. Mélanogénèse 1989: aspects biochimiques et cellulaires. *Séminaires INSERM*, **1989**, 201, 143-157.
- 19 Horikoshi, T. ; Nakahara, M. ; Kaminaga, H. ; Sasaki, M. ; Uchiwa, H. ; Miyachi, Y. Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Pigment Cell Res.* **2000**, 13, 358-363.

- 20 Sasaki, M. ; Horikoshi, T. ; Uchiwa, H. ; Miyashi, Y. Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **2000**, 13 (4), 248-242.
- 21 Larousse médical. Editions VUEF Paris. **2003**
- 22 Huh, C-S. ; Seo, K-I. ; Park, J-Y. ; Lim, J-G. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin C ionophoresis in melasma. *Dermatology.* **2003**, 206 (4), 316-320.
- 23 Behrooz, K. Peroxidase-mediated mechanisms are involved in the melanocytotoxic and melanogenesis-inhibiting effects of chemical agents. *Dermatology.* **2002**, 205 (4), 329-339.
- 24 Causse, C. ; Marrot, L. ; Perez, P. Melatonin or its analogues for inhibiting human skin pigmentation induced by alpha-MSH. Brevet FR 2756733. **1998**.
- 25 Seiberg, M. ; Paine, C. ; Sharlow, E. ; Andrade-Gordon, P. ; Costanzo, M. ; Eisinger, M. ; Shapiro, S. S. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, 115, 162-167.
- 26 Seo, B. ; Yun, J. ; Lee, S. ; Kim, M. ; Hwang, K. ; Kim, J. ; Min, K. R. Kim, Y. ; Moon, D. Barbarin as a new tyrosinase inhibitor from *Barbarea orthocerus*. *Planta Med.* **1999**, 65, 683-686.
- 27 Shimizu, K. ; Kondo, R. ; Sakai, K. ; Lee, S-H. ; Sato, H. Inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin biosynthesis. *Planta Med.* **1998**, 64, 408-412.
- 28 Spritz, R. ; Ho, L. ; Furumura, M. ; Hearing, V. J. Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* **1997**, 109, 207-212.
- 29 Hall, A, M ; Orlow, S, J. Degradation of tyrosinase induced by phenylthiourea occurs following Golgi maturation. *Pigment Cell Res.* **2005**, 18, 122-129
- 30 Garcia-Borron, J. C. ; Solano, F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment. Cell. Res.* **2002**, 15, 162-173.
- 31 Klabunde, T. ; Eicken, C. ; Sacchettini, J. C. ; Krebs, B. Crystal Structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5 (12), 1084-1090.
- 32 Tripathi, R. K. ; Hearing, V. J. ; Urabe, K. ; Aroca, P. ; Spritz, A. Mutational mapping of the catalytic activity of human tyrosinase. *J. Biol. Chemistry.* **1992**, 267 (33), 23707-23712.
- 33 Olivares, C. ; Garcia-Borron, J. C. ; Solano, F. Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry.* **2002**, 41, 679-686.
- 34 Zhao, H. ; Eling, D. J. ; Medrano, E. E. ; Boissy, R. E. Retroviral infection with human tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) cDNA upregulated tyrosinase activity and melanin synthesis in a TRP-1-deficient melanoma cell line.L. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, 106, 744-752.
- 35 Hearing, V. J. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase) : purification, properties, and reactions catalysed. *Meth. Enzymol.* **1987**, 142, 154-167.
- 36 Gedermann, C. ; Eicken, C. ; Krebs, B. Structure of catechol oxydase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 183-191.
- 37 Lee, H-S. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1400-1403.
- 38 Solomon, E. I. ; Sudaram, U. M. ; Machonkin, T. E. Multicopper oxydases and oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563-2605.

- 39 Sanchez-Ferrer, A. ; Rodriguez-Lopez, J. N. ; Garcia-Canovas, F. ; Garcia-Carmona, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, 1247, 1-11.
- 40 Watanabe, H. ; Valencia, J. C. ; Yasumoto, K-I. ; Kushimoto, T. ; Ando, H. ; Muller, J. ; Vieira, W. D. ; Mizogushi, M. ; Apella, E. ; Hearing, V. J. Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (9), 7971-7981.
- 41 Ujvari, A. ; Aron, R. ; Eisenhaure, T. ; Cheng, E. ; Parag, H. A. ; Smicun, Y. ; Halaban, R. ; Hebert, D. Translation rate of human tyrosinase determines its N-linked glycosylation level. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (8), 5924-5931.
- 42 Olivares, C. ; Solano, F. ; Garcia-Boron, J. C. Conformation-dependant post-translational glycosylation of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (18), 15735-15743.
- 43 Costin, G. E. ; Valencia, J. C. ; Vieira, W. D. ; Lamoureux, M. L. ; Hearing, V. J. Tyrosinase processing and trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J. Cell. Sci.* **2003**, 116 (15), 3203-3212.
- 44 Min, K. R. ; Kim, K-S. ; Ro, J. S. ; Lee, S. H. ; Kim, J. A. ; Son, J. K. ; Kim, Y. Piperlonguminine from *Piper longum* with inhibitory effects on alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis in melanoma B16 cells. *Planta med.* **2004**, 70, 1115-1118.
- 45 Khaled, M. ; Larribere, L. ; Bille, K. ; Aberdam, E. ; Ortonne, J-P. ; Ballotti, R. ; Bertolotto, C. Glycogene synthase kinase 3 β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (37), 33690-33697.
- 46 Bertolotto, C. ; Busca, R. ; Ballotti, R. ; Ortonne, J-P. L'AMP cyclique est un régulateur de la pigmentation de la peau. *Med. Sci.* **2001**, 17, 177-185.
- 47 Manga, P. ; Sato, K. ; Ye, L. ; Beermann, F. ; Lamoureux, M. L. ; Orlow, S. J. Mutational Analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro. *Pigment Cell Res.* **2000**, 13, 364-374.
- 48 Briganti, S. ; Camera, E. ; Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **2003**, 16, 101-110.
- 49 Chavigny, C. Dépigmentants: de nouvelles voies en perspective. *Parfums cosmétiques actualités.* **2000**, 155, 44-53
- 50 Imokawa, G. ; Mishima, Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer res.* **1982**, 42, 1994-2002.
- 51 Kasraee, B. Peroxydase-mediated mechanisms are involved in the melanocytotoxic and melanogenesis-inhibiting effects of chemical agents. *Dermatology.* **2002**, 205, 329-339.
- 52 Matsubayashi, T. ; Sakaeda, T. ; Kita, T. ; Nara, M. ; Funasaka, Y. ; Ichihashi, M. Pharmaceutical and clinical assessment of hydroquinone ointment prepared by extemporaneous nonsterile compounding. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25 (1), 91-96.
- 53 Njoo, M. D. ; Westerhof, W. ; Bos, D. J. ; Bossuyt, P. M. The development of guidelines for the treatment of vitiligo. *Arch. Dermatol.* **1999**, 135, 1514-1521.
- 54 Rescigno, A. ; Sollai, F. ; Pisu, B. ; Rinaldi, A. ; Sanjust, E. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J. Enzyme. Inhib. and Med. Chem.* **2002**, 17 (4), 207-218.

- 55 Takayuki, K. ; Tadashi, O. ; Oyobikawa, M. ; Kiyoko, F. ; Masao, S. ; Mitsuo, K. ; Masaki, T. Inhibitory action of 4-n-butylresorcinol (Rucinol) on melanogenesis and its skin whitening effects. *Nippon Keshohin Gijyutsusha Kaishi*. **2001**, 35 (1), 42-49.
- 56 Kubo, I. ; Kinst-Hori, I. ; Yokokawa, Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57 (4), 545-551.
- 57 Shimizu, K. ; Kondo, R. ; Sakai, K. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substitued resorcinols: stucture-activity investigations. *Planta Med.* **2000**, 66, 11-15.
- 58 Cornwell, T. ; Cohick, W. ; Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 995-1016.
- 59 Iida, K. ; Hase, K. ; Shimomura, K. ; Sudo, S. ; Kadota, S. ; Namba, T. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. *Planta Med.* **1995**, 61, 425-428.
- 60 Gilly, R. ; Mara, D. ; Oded, S. ; Zohar, K. Resveratrol and a novel tyrosinase in carignan grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1479-1485.
- 61 Bernard, P. ; Berthon, J-Y. Resveratrol : an original mechanism on tyrosinase inhibition. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2000**, 22, 219-226.
- 62 Shin, N-H. ; Ryu, S. Y. ; Choi, E. J. ; Kang, S-H. ; Chang, I-M. ; Min, K. R. ; Youngsoo, K. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on Dopa oxydase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 243, 801-803
- 63 Kim, Y. M. ; Yun, J. ; Lee, C-K. ; Lee, H. ; Min, K. R. ; Kim, Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (18), 16340-16344.
- 64 Chen, C-S. ; Liu, K-J. ; Lou, Y-H. ; Shieh, C-J. Optimisation of kojic acid monolaurate synthesis with lipase PS from *Pseudomonas cepacia*. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, 82, 601-605.
- 65 Wu, L-C. ; Chen, Y-C. ; Ho, J-A. A. ; Yang, C-S. Inhibitory effect of red koji extracts on mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4240-4246.
- 66 Battaini, G. ; Monzani, E. ; Casella, L. ; Santagostini, L. ; Pagliarin, R. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 262-268.
- 67 Chen, J. S. ; Wei, C-I. ; Marshall, M. R. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39 (11), 1897-1900.
- 68 Kazuo, M. ; Shoichiro, O. Design of novel hybrid vitamin C derivatives : thermal stability and biological activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44 (9), 1647-1655.
- 69 Michel, P. Use of monoester of arbutin as skin depigmentation agent. Brevet Eur. Pat. Appl. 895779. **1999**.
- 70 Bruneton, J. Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3^{ème} édition, Tec & Doc, Paris. **1999**.
- 71 Fernandez, M. T. ; Mira, M. L. ; Florencio, M. H. ; Jennings, K. R. Iron and copper chelation by flavonoïds: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 92, 105-111.
- 72 Badria, F. A. ; ElGayyar, M. A. A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. *Boll. Chim. Farmac.* **2001**, 140 (4)267-271.

- 73 Kubo, I. Kinst-Hori, I. Flavonols from saffron flower : tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4121-4125.
- 74 Kubo, I. ; Kinst-Hori, I. ; Chaudhuri, S. K. ; Kubo, Y. ; Sanchez, Y. ; Ogura, T. Flavonols from *Heterotheca inuloides* : tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1749-1755.
- 75 Kubo, I. ; Yokokawa, Y. Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coricea*. *Phytochemistry.* **1992**, 31 (3), 1075-1077.
- 76 Sasaki, K. ; Yoshizaki, F. Nobiletin as a tyrosinase inhibitor from the peel of *Citrus* fruit. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25 (6), 806-808.
- 77 Yukiko, Y. ; Masaru, W. ; Akinori, N. (Mitsui Chemicals Inc., Japan). Cosmetics containing hydrochalcone glycosides. Brevet JP 391721. **2000**
- 78 Jones, K. ; Hughes, J. ; Hong, M. ; Jia, Q. ; Orndorff, S. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* **2002**, 15, 335-340.
- 79 Okamura, N. ; Hine, N. ; Harada, S. ; Fujioka, T. ; Mihashi, K. ; Yagi, A. Three chromone components from *Aloe vera* leaves. *Phytochemistry.* **1996**, 43 (2), 495-498.
- 80 Piao, L. Z. ; Park, H. R. ; Park, Y. K. Lee, S. K. Park, J. H. ; Park, M. K. Mushroom tyrosinase inhibition activity of some chromones. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50 (3), 309-311.
- 81 Josse, M. ; Couteau, C. ; Coiffard, L. Hyperpigmentations, dépigmentants et éclaircissants : traitements et solutions cosmétiques. *Dermocosmétologie.* **2004**, 12 (4), 100-104.
- 82 Harborne, J. B. ; Baxter, H. *Phytochemical dictionary.* Taylor & Francis, Londres. **1993**.
- 83 Atta-Ur-Rhman ; Choudary, M. I. ; Hayat, S. ; Khan, A. M. ; Ahmed, A. Two new aurones from marine brown alga *Spatoglossum variabile*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49 (1), 105-107.
- 84 Boumendjel, A. Aurones : a subclass of flavone with promising biological potential. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 2621-2630.
- 85 Westenburg, H. E. ; Lee, K-J. ; Lee, S. ; Kfong, H. S. , Van Breemen, R. B. ; Pezzuto, J. M. ; Kinghorn, A. D. Activity-guided isolation of antioxydative constituents of *Cotinus coggygria*. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1696-1698.
- 86 Sato, T. ; Nakayama, T. ; Kikuchi, S. ; Fukui, Y. ; Yonekura-Sakakibara, K. ; Ueda, T. ; Nishino, T. ; Tanaka, Y. ; Kusumi, T. Enzymatic formation of aurones in the extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Sci.* **2001**, 160, 229-236.
- 87 Sato, T. ; Nakayama, T. ; Fukui, Y. ; Yonekura-Sakakibara, K. ; Hayashi, H. ; Tanaka, Y. ; Kusumi, T. ; Nishino, T. Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett.* **2001**, 499, 107-111.
- 88 Nakayama, T. Enzymology of aurone biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, 94 (6), 487-491.
- 89 Sekizaki, H. Synthesis of 2-benzylidene-3(2H)-benzofuran-3-one (aurone) by oxydation of 2'-hydroxychalcones with mercury (II) acetate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, 61, 1407-1409.
- 90 Imafu, K. ; Honda, M. ; Omie, M. C. Cyclodehydrogenation of 2'-hydroxychalcones with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone: a simple route for flavones and aurones. *Synthesis.* **1987**, (2), 199-201.

- 91 Thakkar, K. ; Cushman, M. A novel oxydative cyclization of 2'-Hydroxychalcones to 4,5-Dialkoxyaurones by Thallium (III) nitrate. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6499-6510.
- 92 Thakkar, K. ; Cushman, M. A novel oxydative cyclization of 2'-Hydroxychalcones to 4-methoxyaurones by Thallium (III) nitrate. *Tetrahedron. Lett.* **1994**, 35 (35), 6441-6444.
- 93 Bose, G. ; Modal, E. ; Khan, A. T. ; Bordoloi, M. J. An environmentally benign synthesis of aurones and flavones from 2'-acetoxychalcones using n-tetrabutylammonium tribromide. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 8907-8909.
- 94 Venkateswarlu, S. ; Panchagnula, G. K. ; Subbaraju, G. V. Synthesis and antioxydative activity of 3', 4', 6, 7-Tetrahydroxyaurone, a metabolite of *Bidens frondosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68 (10), 2183-2185.
- 95 Mohan, P. ; Joshi, T. Two aurone glycosides from the flowers of *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry.* **1988**, 28 (4), 1287-1288.
- 96 Beney, C. ; Mariotte, A-M. ; Boumendjel, A. An efficient synthesis of 4,6-Dimethoxyaurones. *Heterocycle.* **2001**, 55 (5), 967-972.
- 97 Zheng, X. ; Cao, J-G. ; Meng, W-D. ; Qing, F-L. Synthesis and anticancer effect of B-ring trifluoromethylated flavonoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13 (20), 3423-3427.
- 98 Schoepfer, J. ; Fretz, H. ; Chaudhuri, B. ; Muller, L. ; Seeber, E. ; Meijer, L. ; Lozach, O. ; Vangrevelinghe, E. ; Furet, P. Structure-based design and synthesis of 2-benzylidene-benzofuran-3-ones as flavopiridol mimics. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1741-1747.
- 99 Varma, R. S. ; Varma, M. Alumina-mediated condensation, a simple synthesis of aurones. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33 (40), 5937-5940.
- 100 Lawrence, N. J. ; Rennison, D. ; McGowan, A. T. ; Hadfield, J. A. The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: aurones and flavones as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13 (21), 3759-3763.
- 101 Villemen, D. ; Martin, B. ; Bar, N. Application of microwave in organic synthesis. Dry synthesis of 2-arylmethylene-3(2)-naphthofuranones. *Molecules.* **1998**, 3, 88-93.
- 102 Bois, F. ; Boumendjel, A. ; Mariotte, A-M. ; Conseil, G. ; Di Pietro, A. Synthesis and biological activity of 4-Alkoxychalcones : potential hydrophobic modulator of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2691-2695.
- 103 Comte, G. ; Daskiewicz, J-B. ; Bayet, C. ; Coneil, G. ; Viornerly-Vanier, A. ; Dumontet, C. ; Di Pietro, A. ; Barron, D. C-Isoprenylation of flavonoids enhances binding affinity toward p-Glycoprotein and modulation of cancer cell chemoresistance. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 763-768.
- 104 Boumendjel, A. ; Di Pietro, A. ; Dumontet, C. ; Barron, D. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Med. Res. Rev.* **2002**, 22 (5), 512-529.
- 105 Boumendjel, A. ; Beney, C. ; Deka, N. ; Mariotte, A-M. ; Lawson, M. A. ; Trompier, D. ; Baubichon-Cortay, H. ; Di Pietro, A. 4-Hydroxy-6-methoxyaurones with high-affinity binding to cytosolic domain of P-Glycoprotein. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50 (6), 854-856.

- 106** Sielecki, T. M. ; Boylan, J. F. ; Benfield, P. A. ; Trainor, G. L. Cyclin-dependent kinase inhibitors : useful targets in cell cycle regulation. *J. Med. Chem.* **2000**, 43 (1), 1-18.
- 107** Huang, L. ; Wall, M. E. ; Wani, M. C. ; Navarro, H. ; Santisuk, T. ; Reutrakul, V. ; Seo, E-K. ; Farnworth, N. R. ; Kinghorn, D. New compounds with DNA strand-scission activity from the combined leaf and stem of *Uvaria hamiltonii*. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 446-450.
- 108** Ballinari, D. ; Bonomini, L. ; Ermoli, A. ; Gude, M. ; Menichincheri, M. ; Jurgen, M. ; Vanotti, E. Preparation of alkylidenebenzofuranones as telomerase inhibitors. PCT Int. Appl. WO 083123. **2002**.
- 109** Kayser, O. ; Kiderlen, A. F. ; Brun, R. *In vitro* activity of aurones against *Plasmodium falciparum* strains K1 and NF54. *Planta Med.* **2001**, 67, 718-721.
- 110** Kayser, O. ; Kiderlen A. F. Leishmanicidal activity of aurones. *Tokai J. Exp. Clin. Medecine.* **1998**, 23 (6), 423-426.
- 111** Kayser, O. ; Chen, M. ; Kharazmi, A. ; Kiderlen, A. F. Aurones interfere with *Leishmania major* mitochondrial fumarate reductase. *J. Biosci.* **2002**, 57 (7/8), 717-720.
- 112** Kayser, O. ; Waters, W. R. ; Woods, K. M. ; Upton, S. J. ; Keithly, J. S. ; Kiderlen, A. F. Evaluation of *in vitro* activity of aurones and related compounds against *Cryptosporidium parvum*. *Planta. Med.* **2001**, 67, 722-725.
- 113** Chu, W-L. A. ; Jensen, F. ; Rjensen, T. B. ; Mcalpine, J. B. ; Sokilde, B. ; Santana-Sorensen, A. M. ; Ratnayake, S. ; Jiang, J. B. ; Noble, C. ; Stafford, A. M. Preparation of aurones as microbicides. Brevet US 6307070. **2001**
- 114** Auf'mkolk, M. ; Koehle, J. ; Hesch, R-D. ; Cody, V. Inhibition of rat iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 (25), 11623-11630.
- 115** Koehle, J. ; Auf'mkolk, M. ; Rokos, H. ; Hesch, R. D. ; Cody, V. Rat liver iodothyronine monodeiodinase. Evaluation of the iodothyronine ligand-binding site. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 (25), 11613-11622.
- 116** Takahashi, H. ; Kimura, K. ; Yoshihama, M. ; Shioda, K. ; Negishi, K. ; Seri, K. Maillard reaction inhibitors containing aurone derivatives. Brevet JP 09241165. **1997**
- 117** Coussons, P. J. ; Jacoby, J. ; McKay, A. ; Kelly, S. M. ; Price, N. C. ; Hunt, J V. Glucose modification of human serum albumin: a structural study. *Free Radic Biol. medicine.* **1997**, 22(7), 1217-1227.
- 118** Inserra, P. F. ; Ardestani, S. K. ; Watson, R. R. In antioxydant and disease prevention. Garewal, H. S. Ed. ; CRC Press: Boca Raton, FL. **1997**, 19-29.
- 119** Lee, B. M. ; Lee, S. K. ; Kim, H. S. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, β -carotene and red ginseng). *Cancer Lett.* **1998**, 132, 219-227.
- 120** Singh, T. ; Handa, K. L. ; Rao, P. R. Isolation of Khellin from the fruits of *Ammi visnaga*. *Research and Industry.* **1977**, 22 (1), 11-12.
- 121** Pendse, R. ; Rao, A. V. R. ; Venkataraman, K. 5,7-Dihydroxychromone from *Arachis hypogoea* shells. *Phytochemistry.* **1973**, 12 (8), 2033-2034.
- 122** Paraskev, T. N. ; Gerassim, M. K. Two benzophenone *O*-arabinosides and a chromone from *Hypericum annulatum*. *Phytochemistry.* **2002**, 59, 867-871.

- 123 Hanson, J. R. ; Hitchcock, P. B. ; Oebels, D. ; Yeoh, B. L. The isolation and biosynthesis of the chromone 6-hydroxymethyleugenin in *Cephalosporium aphidicola*. *J. Chem. Res. Synop.* **1987**, 1, 8-9.
- 124 Lopez-Martin, J. ; Anam, E. M. ; Boira, H. ; Sanz, M. J. ; Blazquez, M. A. Chromone and phenanthrene alkaloids from *Dennettia tripetala*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50 (12), 1613-1615.
- 125 Jez, J. M. ; Ferrer, M. E. ; Bowman, M. E. ; Dixon, R. A. ; Noel, J. P. Dissection of malonyl-Coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry.* **2000**, 39 (5), 890-902.
- 126 Abe, I. ; Utsumi, Y. ; Oguro, S. ; Morita, H. ; Sano, Y. ; Nogushi, H. A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1362-1363.
- 127 Mahal, H. S. ; Venkataraman, J. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1767.
- 128 Ares, J. J. ; Outt, P. E. ; Randall, J. L. Johnston, J. N. Murray, P. D. ; O'Brien, L. M. ; Weissnar, P. S. ; Ems, B. L. Synthesis and biological evaluation of flavonoids related compounds as gastroprotective agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6 (8), 995-998.
- 129 Gray, C. A. ; Kaye, P. T. ; Nchinda, A. T. Chromone studies. Part 13. Synthesis and electron-impact mass spectrometric studies of 5-hydroxy-2-isopropyl-7-methoxychromone, a constituent of the medicinal plant *Baeckea frutescens*, and side-chain analogues. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1144-1146.
- 130 Pinto, D. C. G. A. ; Silva, A. M. S. ; Cavaleiro, J. A. S. A convenient synthesis of a new (E)-5-hydroxy-2-styrylchromones by modifications of the Baker-Venkataraman method. *New J. Chem.* **2000**, 24, 85-92.
- 131 Santos, C. M. M. ; Silva, A. M. S. ; Cavaleiro, J. A. S. Synthesis of new hydroxy-2-styrylchromones. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4575-4585.
- 132 Hirao, I. ; Yamaguchi, M. ; Hamada, M. A convenient synthesis of 2 and 2,3-substitued 4H-chromen-4-ones. *Synthesis.* **1984**, 1076-1078.
- 133 Edwards, A. M. ; Howell, J. B. L. The chromones: history, chemistry and clinical development. A tribute to the work of Dr R. E. C. Altounyan. *Clin. Exp. Allergy.* **2000**, 30, 756-774.
- 134 Dictionnaire VIDAL®.
- 135 Budzisz, E. ; Graczyk-Wojciechowska, J. ; Zieba, R. ; Nawrot, B. A new serie of 2-substitued 3-phosphonic derivatives of chromone. Part II. Synthesis, *in vitro* alkylating and *in vivo* antitumour activity. *New. J. Chem.* **2002**, 26, 1799-1804.
- 136 Semba, S. ; Itoh, N. ; Ito, M. ; Harada, M. ; Yamakawa, M. The *in vitro* and *in vivo* effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clin. Res.* **2002**, 8, 1957-1963.
- 137 Hadjeri, M. ; Barbier, M. ; Ronot, X. ; Mariotte, A-M. ; Boumendjel, A. ; Boutonnat, J. Modulation of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance by flavonoid derivatives and analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2125-2131.
- 138 Ma, L-Y. ; Ma, S-C. ; Wei, F. ; Lin, R-C. ; But, P. P-Y. ; Lee, S. H-S. ; Lee, S. F. Uncinoside A and B, two new antiviral chromone glycoside from *Selginella uncinata*. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51 (11), 1264-1267.

- 139 Houghton, P. J. ; Woldemariam, T. Z. ; Khan, A. I. ; Burke, A. ; Mahmood, N. Antiviral activity of natural and semi-synthetic chromone alkaloids. *Antiviral Res.* **1994**, 25 (3-4), 235-244.
- 140 Ma, W. G. ; Fuzzati, N. ; Xue, Y. ; Yang, C. R. ; Hostettmann, K. Four chromones from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry.* **1996**, 41 (5), 1287-1291.
- 141 Chen, J. H. ; Ho, C-T. Antioxydant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2374-2378.
- 142 Son, S. ; Lewis, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, 50, 468-472.
- 143 Deng, J. ; Zhao, S. Isolation and identification of nonalkaloidal constituents of aerial parts of *Stephania longa*. *Zhongguo Taoke Daxue Xuebao.* **1993**, 24 (2), 73-75.
- 144 Yang, G. ; Song, L. ; Li, K. ; Hu, C. Studies on chemical constituents of *Polygonum orientale*. *Zhongguo Yaoxue Zazhi.* **2003**, 38 (5), 338-340.
- 145 Hirano, H. ; Tokuhira, T. ; Yoshioka, Y. ; Yokoi, T. ; Shingu, T. Analysis of gastric mucous membrane-protective compounds in *Coptidis rhizoma*. *Nat. Med.* **2000**, 54 (5), 209-212.
- 146 Sêca, A. M. L. ; Silva, A. M. S. ; Silvestre, A. J. D. ; Cavaleiro, J. A. S. ; Dominges, F. M. L. ; Neto, C. P. *Erythro-canabisina* H, a new phenolic derivatives from kenaf. *Polyphenols communications.* **2000**, 11-15.
- 147 Chaves, M. ; Roque, N. F. Amides and lignamides from *Porcelia macrocarpa*. *Phytochemistry.* **1997**, 46 (5), 879-881.
- 148 Chen, C-Y. ; Chang, F-R. ; Yen, H-F. ; Wu, Y-C. Amides from stems of *Annona cherimola*. *Phytochemistry.* **1998**, 49 (5), 1443-1447.
- 149 El-Gamal, A. A. ; Takeya, K. ; Itokawa, H. ; Halim, A. F. ; Amer, M. M. ; Saad, H-E. A. ; Awad, S. A. Studies on the chemical constituents of *Atraphaxis spinosa* L. Var. *Sinaica* Boiss. *Nat. Med.* **1994**, 48 (4), 304-306.
- 150 El-Mousallamy, A. M. D. ; Hawas, U. W. ; Hussein, S. A. M. Teucrol, a decarboxyrosmarinic acid its 4'-O-triglycoside, teucroside from *Teucrium pilosum*. *Phytochemistry.* **2000**, 55 (8), 927-931.
- 151 Wu, Y-C. ; Chang, G-Y. ; Ko, F-N. ; Teng, C-M. Bioactive constituent from stems of *Annona montana*. *Planta Med.* **1995**, 61 (2), 146-149.
- 152 Lin, L-C. ; Kuo, Y-C. ; Chou, C-J. Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and flavanone from the root of *Limonium sinense*. *Planta Med.* **2000**, 66 (4), 33-336.
- 153 Lee, D. G. ; Park, Y. ; Kim, M-R. ; Jung, H. J. ; Seu, Y. Bae. ; Hahm, K-S. ; Woo, E-R. Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnol. Lett.* **2004**, 26 (14), 1125-1130.
- 154 Landtarg, J. ; Baumert, A. ; Degenkolb, T. ; Schmidt, J. ; Wray, V. ; Scheel, D. ; Strack, D. ; Rosahl, S. Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase. *Phytochemistry.* **2002**, 60(7), 683-689.
- 155 Negrel, J. ; Pollet, B. ; Lapierre, C. Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry.* **1996**, 43 (6), 1195-1199.

- 156** Ley, J. P. Phenolic acid amides of phenolic benzylamines against UVA-induced oxidative stress skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2001**, 23, 35-48.
- 157** Rajan, P. ; Vedernikova, I. ; Cos, P. ; Vanden Berghe, D. ; Augustyns, K. ; Haemers, A. Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxydants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 215-217.
- 158** Ohnishi, M.; Matuo, T.; Tsuno, T.; Hosoda, A.; Nomura, E.; Taniguchi, H.; Sasaki, H.; Morishita, H. Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice. *BioFactors.* **2004**, 21(1-4), 315-319.
- 159** Nomura, E. ; Kashiwada, A. ; Hosoda, A. ; Nakamura, K. ; Morishita, H. ; Tsuno, T. ; Taniguchi, H. Synthesis of amide compounds of ferulic acid and their stimulatory effects on insulin secretion in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3807-3813.
- 160** Murakami, A. ; Kadota, M. ; Takahashi, D. ; Taniguchi, H. ; Nomura, E. ; Hosoda, A. ; Tsuno, T. ; Maruta, Y. ; Ohigashi, H. ; Koshimizu. Suppressive effects of novel ferulic acid derivatives on cellular responses induced by phorbol ester, and by combined lipopolysaccharide and interferon- γ . *Cancer Lett.* **2000**, 157, 77-85.
- 161** Nomura, E. ; Hosoda, A. ; Morishita, H. ; Murakami, A. ; Koshimizu, K. ; Ohigashi, H. ; Taniguchi, H. Synthesis of a novel polyphenols consisted of ferulic and gallic acids, and their inhibitory effects on phorbol ester-induced Epstein-Barr virus activation and superoxide generation. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1069-1075.
- 162** Park, H. R ; Park, J. H ; Park, M. G ; Park, Y. G. ; Park, Y. S. Novel whitening composition. Brevet KR 012681. **2002**.
- 163** Hori, T. ; Ichinose, S. ; Saizawa, Y. Preparation of chromones as melanin biosynthesis inhibitors. Brevet JP 10017563. **1998**.
- 164** Lee, H-S. ; Beon, M-S. ; Kim, M-K. Selective growth inhibitor toward human intestinal bacteria derived from *Pulsatilla cernua* root. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4656-4661.
- 165** Takahiro, T. ; Kazuomi, O. ; Takashi, K. ; Kunio, I. Synthetic search for cosmetic ingredients: preparations tyrosinase inhibitory activity and antioxydant activities of caffeic amides. *J. Oleo Sci.* **2002**, 541 (1), 19-28.
- 166** Roh, J. S. ; Han, J. Y. ; Kim, J. H. ; Hwang, J. K. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, 27 (12), 1976-1978.
- 167** Makiko, A. ; Tomoyasu, T. Cinnamic acid derivatives as tyrosinase inhibitors and antioxydants, and their uses. Brevet JP 175778. **2004**.
- 168** Millecamps, F. ; Montastier, C. ; Candau, D. ; N Guyen, Q. L. ; Charpin, I. Pharmaceutical and cosmetic depigmentation compositions with a caffeic acid base. Brevet US 5164185. **1992**
- 169** Golik, G. ; Wong, H. S. L. ; Chen, S. H. ; Doyle, T. W. ; Wright, J. J. K. ; Knipe, J. ; Rose, W. C. ; Casazza, A. M. ; Vyas, D. M. Synthesis and antitumor evaluation of paclitaxel phosphonooxymethyl ethers: a novel class of water soluble paclitaxel pro-drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6 (15), 1837-1842.

- 170 Pettit, G. R. ; Lippert, J. W. Preparation of combretastatin A-1 phosphate and combretastatin B-1 phosphate prodrugs with increased solubility. PCT Int. Appl. WO 01/81355. **2001**
- 171 Kim, D. H. ; Hwang, J-S. ; Baek, H. S. ; Kim, K-J. ; Lee, B. G. ; Chang, I. ; Kang, H. H. ; Lee, O. S. Development of 5-[(3-aminopropyl)phosphinoxy]-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one as a novel whitening agent. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51 (2), 113-116.
- 172 Mäntylä, A. ; Garnier, T. ; Rautio, J. ; Nevalainen, T. ; Vepsäläinen, J. ; Koskinen, A. ; Croft, S. L. ; Järvinen, T. Synthesis, in vitro evaluation, and antileishmanial activity of water-soluble prodrugs of buparvaquone. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 188-195.
- 173 Leenders, R. G. G. Scheeren, H. W. Synthesis and evaluation of a novel daunomycin-phosphate-sulfate- β -glucuronide and β -glucoside prodrugs for application in ADEPT. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5 (24), 2975-2980.
- 174 Jung, Y. J. ; Doh, M. J. ; Kim, I. H. ; Kong, H. S. ; Lee, J. S. ; Kim, Y. M. Prednisolone 21-sulfate sodium: a colon specific pro-drug of prednisolone. *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, 55, 1075-1082.
- 175 Forestier, J. P. Les enzymes de l'espace extra-cellulaire du stratum corneum. *Int. J. Cosmetic. Sci.* **1992**, 14, 47-63.
- 176 Bois, F. ; Beney, C. ; Mariotte, A-M. ; Boumendjel, A. A one step synthesis of 5-Hydroxyflavones. *Synlett.* **1999**, (9), 1480-1482.
- 177 Snow, A. W.; Foos, E. E. Conversion of alcohols to thiols via tosylate intermediates. *Synthesis.* **2003**, 4, 509-512.
- 178 Slotin, L. A. Currents methods of phosphorylation of biological molecules. *Synthesis.* **1976**, 737-752.
- 179 Leppanen, J. ; Huuskonen, J. ; Savolainen, J. ; Nevalainen, T. ; Taipale, H. ; Vepsäläinen, J. ; Gynther, J. ; Jarvinen, T. Synthesis of a water-soluble prodrug of entacapone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10(17), 1967-1969.
- 180 Lim, H-S. ; Park, J-J. ; Ko, K. ; Lee, M-H. ; Chung, S-K. Synthesis of sphingosine-1-phosphate analogues and their interaction with EDG/S1P receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2499-2503.
- 181 Sauer, R. ; Maurinsh, J. ; Reith, U. ; Fülle, F. ; Klotz, K-N. ; Müller, C. E. Water-soluble phosphate prodrugs of 1-Propargyl-8-styrylxanthine derivatives, A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 440-448.
- 182 Pettit, G. R. ; Grealish, M. P. ; Jung, M. K. ; Hamel, E. ; Pettit, R. K. Chapuis, J. C. ; Schmidt, J. M. Antineoplastic agents. 465. structural modification of resveratrol: sodium resveratin phosphate. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2534-2542.
- 183 Zhu, Q. ; Uttamchandani, M. ; Li, D. ; Lesaicherre, M. L. Yao, S. Q. Enzymatic profiling system in a small-molecule microarray. *Org. Lett.* **2003**, 5 (8), 1257-1260.
- 184 Behrman, E. C. ; Chen, S. ; Behrman, E. J. On the mechanism of the Elbs peroxydisulfate oxidation and a new peroxide rearrangement. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3221-3224.
- 185 Barron, D. ; Ibrahim, R. K. Synthesis of flavonoid sulfates: I-stepwise sulfation of positions 3,7, and 4' using *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide and tetrabutylammonium hydrogen sulfate. *Tetrahedron.* **1987**, 43 (22), 5197-5202.

- 186** Kawai, N. ; Takao, K-I. ; Kobayashi, S. Synthetic study of akaterpin: determination of the relative stereochemistry of the upper decalin moiety with disulfated hydroquinone. *Tetrahedron*, **1999** (40), 4193-4196.
- 187** Bogenstätter, M. ; Limberg, A. ; Overman, L. E. ; Tomasi, A. L. Enantioselective total synthesis of kinesin motor protein inhibitor adociasulfate 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 12206-12207.
- 188** Gueyrard, D. ; Barillari, J. ; Iori, R. ; Palmieri, S. ; Rollin, P. First synthesis of an *O*-glycosylated glucosinolate isolated from *Moringa oleifera*. *Tetrahedron. Lett.* **2000**, 41, 8307-8309.
- 189** Shiroh, F. ; Takashi, T. ; Takeshi, Y. ; Toyoko, O. ; Tadashi, A. ; Kouki, K. Use of dimethylformamide-sulfur trioxide complex as a sulfating agent of tyrosine. *J. Chem. Soc Perkin Trans I.* **1990**, 6, 1739-1744.
- 190** Santos, G. A. G. ; Murray, A. P. ; Pujol, C. A. ; Damonte, E. B. ; Maier, M. S. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 β ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids*. **2003**, 68(2), 125-132.
- 191** Davidson, N. E. ; Rutherford, T. ; Botting, N. P. Synthesis, analysis and rearrangement of a novel unnatural glucosinolates. *Carbohydr. Res.* **2001**, 330, 295-307.
- 192** Fairley, B. ; Botting, N. P. Cassidy, A. The synthesis of daidzein sulfates. *Tetrahedron*. **2003**, 59, 5407-5410.
- 193** Kubo, I. ; Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitors from cumin. *J. Agric. Food. Chem.* **1998**, 46, 5338-5341.
- 194** Espin, J. C. ; Morales, M. ; Garcia-Ruiz, P. A. ; Tudela, J. ; Garcia-Casanova, F. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1084-1090.
- 195** Winder, A. J. ; Harris, H. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxydase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **1991**, 198, 317-326.