



**HAL**  
open science

**Phytochimie de *Zanthoxylum chiloperone* var.  
*angustifolium* (Rutaceae). Chimie et pharmacochimie de  
la canthin-6-one**

Gerardo Cebrian Cebrian-Torrejon

► **To cite this version:**

Gerardo Cebrian Cebrian-Torrejon. Phytochimie de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* (Rutaceae). Chimie et pharmacochimie de la canthin-6-one. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114844 . tel-00923141

**HAL Id: tel-00923141**

**<https://theses.hal.science/tel-00923141v1>**

Submitted on 2 Jan 2014

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

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

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE : Pharmacognosie

ANNÉE 2010 – 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1118

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 06/12/2011

par

Gerardo CEBRIÁN-TORREJÓN

**Phytochimie de *Zanthoxylum chiloperone* var.  
*angustifolium* (Rutaceae). Chimie et  
pharmacochimie de la canthin-6-one**

<b>Directeur de thèse :</b>	Erwan POUPON	Professeur des Universités (Université Paris-Sud).
<b><u>Composition du jury :</u></b>		
<i>Rapporteurs :</i>	Diego CORTES	Professeur des Universités (Université de Valence).
	Soizic PRADO	Maître de Conférences (Muséum National d'Histoire Naturelle).
<i>Examineurs :</i>	Joëlle DUBOIS	Directeur de Recherche (Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette)
	Bruno FIGADÈRE	Directeur de Recherche (Université Paris-Sud).
	Alain FOURNET	Directeur de Recherche (Institut de Recherche pour le Développement).



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements au Professeur Diego Cortes, au Docteur Soizic Prado, au Docteur Joëlle Dubois, au Docteur Bruno Figadère et au Docteur Alain Fournet, membres du jury, qui ont accepté de juger mon travail de thèse et avec lesquels j'ai eu des échanges très agréables et intéressants. Je remercie, tout particulièrement, le Professeur Diego Cortes pour m'avoir montré le chemin depuis Valence à Châtenay-Malabry et le Docteur Alain Fournet pour m'avoir transmis sa passion et son intérêt aux produits naturels ; merci à vous deux pour les très enrichissantes discussions scientifiques que nous avons eues.

J'adresse mes remerciements les plus amicaux au Professeur Erwan Poupon qui m'a guidé tout au long de ce travail tout en me laissant libre de mes choix et pour la confiance qu'il a bien voulu placer en moi. Ses conseils, sa patience et sa rigueur ont très largement contribué au bon déroulement de ces années, aussi bien d'un point de vue scientifique que d'un point de vue personnel. *Merci chef!!*

Je remercie également tous les collaborateurs qui ont contribué aux différents sujets abordés ici, et plus particulièrement le Professeur Antonio Doménech, le Professeur Antonieta Rojas de Arias, les Docteurs Suzana Kahn, Kevin Spelman, Rafael Vázquez-Manrique, José Luis Arias et le futur Docteur Laura de Miguel.

J'adresse mes remerciements à Alexandre Maciuk et à Karine Leblanc pour leur contribution analytique, à Laurent Ferrié Laurent Evannoet à Pierre Champy pour toutes les discussions de chimie et phytochimie, au Professeur Michel Leboeuf pour m'avoir montré l'importance de la bonne recherche bibliographique, et à tous les autres membres du laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse; à François Roblot ainsi qu'à Jean-Christophe Jullian, Estelle Morvan et Claire Troufflard pour leur aide avec la RMN. En particulier, je remercie cordialement les Docteurs Lok-Hang Yan, Rim Salame et très vivement le futur Docteur Zakaria Cheikh Ali, qui furent des collègues mais surtout des amis, et qui j'espère le resteront. Un grand merci à la « joie du laboratoire »: Blandine, Kadiria, Zahra, Landry, Gael, Faustin, Flore, Isabel, Katalina, Sandra, Marina, Jessica, Asmaa, Johan, Natacha, Nicolas, et bien sûr, le stagiaire Christian N'Tondele pour les bons moments et pour l'ambiance qu'elles apportent au quotidien.

Je remercie cordialement le Docteur Bruno Figadère pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant « *un peu plus* » de quatre années de doctorat.

Je remercie la Communauté Européenne pour le soutien financier (bourse « *Marie Curie Early Stage Training* ») et spécialement à notre gentille coordinatrice le Docteur Danièle Bonnet-Delpon.

J'adresse également de chaleureux remerciements à tous mes collègues et amis, pour leur soutien et leur aide.

Les plus profonds et sincères remerciements sont pour ma famille et pour Ana et Suzana, parce qu'ils ont été toujours là.

**Gracias !**

<b>Introduction générale.....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre 1-Aspects botaniques.....</b>	<b>5</b>
I– Généralités sur la famille des Rutaceae.....	7
II– Généralités sur le genre <i>Zanthoxylum</i> .....	7
III– Étude chimique des différentes espèces de <i>Zanthoxylum</i> .....	9
<b>Chapitre 2- Étude phytochimique de <i>Zanthoxylum chiloperone</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>I– Travaux précédents du laboratoire</b>	
A– Introduction.....	13
B– Récolte et identification de l'écorce de <i>Zanthoxylum chiloperone</i> .....	14
C– Différents composés isolés de l'écorce de <i>Zanthoxylum chiloperone</i> .....	14
<b>II– Travaux personnels : caractérisation des extraits de <i>Z. chiloperone</i>.....</b>	<b>15</b>
A– Isolement de composés à partir des extraits des écorces de tronc, de racines, de feuilles, de résine et des fruits de <i>Zanthoxylum chiloperone</i> .....	15
1– Isolement et caractérisation des alcaloïdes type canthin-6-one à partir des extraits dichlorométhaniques des écorces et des feuilles de <i>Zanthoxylum chiloperone</i> .....	15
a– Caractérisation des alcaloïdes.....	15
b– Biosynthèse des alcaloïdes type canthinone.....	17
2– Isolement et caractérisation de trois coumarines des écorces, des racines et des feuilles de <i>Zanthoxylum chiloperone</i> , l'hydroxycoumarine : umbelliforine (21) et les pyranocoumarines : <i>cis/trans</i> -avicennol (10 et 11).....	19
a– Présence d'hydroxycoumarines.....	19
α– Isolement de l'umbelliforine.....	19
β – Biosynthèse des hydroxycoumarines.....	20
b– Présence de pyranocoumarines.....	21
α– Isolement des avicennols.....	21
β– Biosynthèse des pyranocoumarines.....	22
B– Identification d'alkylamides dans <i>Z. chiloperone</i> : Identification du Sanshoolpar LC-ESI-MS/MS.....	23
Biosynthèse des alkylamides.....	26
C– Élaboration du profil phytochimique de la plante par HPLC-UV-MS des extraits éthanoliques et dichlorométhaniques d'écorces, racines, fruits et feuilles de <i>Zanthoxylum chiloperone</i> pour le développement d'un traitement de la maladie de Chagas.....	26
1– Intérêt du profil phytochimique.....	26

2– Avantages du travail avec des organes « renouvelables » de la plante : fruits, feuilles, résine.....	27
3– Élaboration d'un profil phytochimique des différentes organes de la plante <i>Z. chiloperone</i> : fruits, écorce, rhizomes, feuilles et résine.....	27
a– Étude qualitative : identification.....	27
b– Étude quantitative : dosage.....	32
c– Profil phytochimique annuel des feuilles.....	34
<b>Conclusion de chapitre 2.....</b>	<b>38</b>
<b>Chapitre 3- Chimie des canthinones.....</b>	<b>41</b>
<b>I– Généralités.....</b>	<b>43</b>
Le squelette canthinone.....	43
<b>II– Synthèse totale du squelette canthin-6-one.....</b>	<b>43</b>
A– La cyclisation de Pictet-Spengler.....	44
B– La cyclisation de Bischler–Napieralski.....	45
C– Étude comparée des réactions de Pictet-Spengler et Bischler-Napieralski.....	46
D– Les différentes stratégies pour l'accès au squelette de la canthinone.....	47
1– Stratégies de synthèse à partir de composés à unités $C_8N_2 + C_6$ .....	48
2– Stratégies de synthèse à partir de composés à unités $C_{10}N_2 + C_2 + C_2$ .....	49
a– Synthèses antérieures.....	49
b– Travaux personnels : stratégies de synthèse de $\beta$ -carbolines à partir de composés à unités $C_{10}N_2 + C_2 + C_2$ .....	49
$\alpha$ – Essai de synthèse d'analogues de la canthin-6-one <i>via</i> réaction de Pictet-Spengler.....	49
$\beta$ – Essai de synthèse d'analogues de la canthin-6-one par une réaction <i>one-pot</i> Pictet-Spengler/Diels-alder.....	51
3– Stratégies de synthèse à partir de composés à unités $C_{10}N_2 + C_4$ .....	52
a– Synthèses antérieures.....	52
b– Approche type $C_{10}N_2 + C_4$ développé par notre laboratoire.....	53
$\alpha$ – Travaux antérieurs.....	53
$\beta$ – Travaux personnels : synthèse totale et modulations autour de la canthin-6-one.....	55
Synthèse totale de canthinones.....	55
Synthèse totale à partir de diverses tryptamines fonctionnalisées.....	55
Synthèse totale à partir de divers anhydrides fonctionnalisés.....	56
Synthèse totale de la benzo[4,5]canthin-6-one et cyclohexyl[4,5]canthin-6-one.....	56

Modification des conditions pour notre synthèse totale de la canthin-6-one.....	57
<b>III– Relation entre la synthèse chimique et la biosynthèse : « <i>naviguant</i> » à travers l’hypothèse de biosynthèse de Crespi-Perellino.....</b>	<b>57</b>
<b>Chapitre 4- Travaux personnels : Modulations diverses sur la canthin-6-one par hémisynthèse.....</b>	<b>65</b>
<b>I– Modulations diverses sur la canthin-6-one.....</b>	<b>67</b>
A– Quaternarisation de l’azote pyridinique.....	67
Formation des dérivés halogénoalkyles.....	67
B– Hémisynthèse de la 4-amino-canthin-6-one et essai de synthèse de la 5-hydroxyméthyl-canthin-6-one.....	67
C– Hémisynthèse et réactivité du N-oxyde de canthin-6-one.....	68
1– Préparation du N-oxyde de canthin-6-one.....	68
2– Réactivité du N-oxyde de canthin-6-one.....	70
a– Accès à des 2-chloro-canthinones.....	70
b– Synthèse d’analogue de la butyl-β-carboline.....	71
Hémisynthèse de la 2-butyl-canthin-6-one.....	71
<b>II– Nanoformulation de la canthin-6-one.....</b>	<b>72</b>
A– Encapsulation de la canthin-6-one.....	72
B– Fixation de l’infractine à la surface des nanoparticules : Essai d’immobilisation par « <i>chimie click</i> ».....	74
<b>Conclusion des chapitres 3 et 4.....</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre 5- La prénylation des substances naturelles &amp; application à la canthin-6-one.....</b>	<b>81</b>
<b>I– Rappels de biosynthèse.....</b>	<b>83</b>
A– Les unités de base : formes activées de l’isoprène.....	83
1– Généralités.....	83
2– Distribution des voies du MVA et du MEP.....	86
B– Pourquoi la nature recourt-elle à la prénylation ?.....	87
1– Diversification.....	88
2– Activité.....	88
a– Pourquoi cet incrément d’activité ?.....	89
Mécanisme biosynthétique de la prénylation : les prényltransférases.....	90
b– Origine biosynthétique de l’acide lysergique.....	95
3– Biosynthèse des diméthylbenzodéhydropyranes.....	98
<b>II– Les méthodes de prénylation des molécules en synthèse organique.....</b>	<b>98</b>



A– Schéma général.....	98
1– Prénylation directe.....	99
a– Prénylation directe par réaction apparentée à la réaction de Friedel-Crafts.....	99
b– Prénylation directe <i>via</i> des réactions organométalliques.....	102
c– Prénylation directe <i>via</i> des réactions organométalliques <i>vi</i> rearrangement d'aryle prényleethers.....	105
2– Prénylation de composés 1,3-dicarbonylés.....	106
3– Prénylation <i>via</i> la transposition de Claisen.....	107
a– Rappel sur la réaction de Claisen.....	107
b– Quelques exemples représentatifs.....	108
Synthèse totale de l' $\alpha$ -mangostine.....	108
Synthèse du (-)-héliannulol C.....	109
Synthèse des clausamines et clausevatines : réarrangement de <i>para</i> -Claisen.....	110
Synthèse totale de l'okaramine J.....	111
4– Prénylation <i>via</i> la réduction de diméthylbenzopyrènes.....	111
B– Comparaison des voies de prénylation : enzymatiques et chimiques.....	112
<b>III– Les méthodes de synthèse du noyau diméthylbenzopyrène en synthèse organique.....</b>	<b>114</b>
A– Schéma général.....	114
1– Accès direct aux diméthylbenzopyrenes.....	114
a– Formation directe du noyau diméthylbenzopyrene par réaction apparentée à la réaction de Friedel et Crafts.....	115
b– Formation du noyau diméthylbenzopyrène directe par condensation de Knoevenagel et réaction d'addition 1,6.....	116
c– Formation du noyau diméthylbenzopyrene directe par condensation aldolique.....	117
d– Formation du noyau diméthylbenzopyrene directe par cyclocondensation.....	117
2– Accès aux diméthylbenzopyrènes <i>via</i> une réaction de Claisen.....	117
a– Rappel sur la réaction de Claisen.....	118
b– Quelques exemples représentatifs.....	118
<b>IV– Travaux personnels : synthèses d'analogues prénylés et diméthylbenzopyrène de la canthin-6-one.....</b>	<b>120</b>
A– Le traitement de la maladie.....	120
B– Canthin-6-one et propriétés antimycobactériennes.....	121

C– Cibles envisagées = Travaux personnels.....	121
1– Accès aux tryptamines fonctionnalisées.....	121
a– Propargylation de la sérotonine.....	122
b– Protection de la sérotonine.....	122
c– Synthèse de la diméthylbenzopyrène-tryptamine.....	122
Étude théorique du rearrangement de Claisen de l'éther propargylique de la phtalimidesérotonine.....	124
d– Synthèse de la sérotonine prénylée.....	126
e– Accès aux canthin-6-ones fonctionnalisées.....	127
α Synthèse des dérivés diméthylbenzopyrène de la canthin-6-one.....	129
Synthèse du dérivé diméthylbenzopyrano de la canthin-6-one par la voie 2.....	129
Synthèse du dérivé diméthylbenzopyrène et prénylé de la canthin-6-one par la voie 1.....	130
Synthèse du dérivé diméthylbenzopyrène.....	130
β– Synthèse du dérivé prénylé de la canthin-6-one.....	130
<b>Conclusion du chapitre 5.....</b>	<b>132</b>
<b>Chapitre 6- Études d'activités biologiques.....</b>	<b>135</b>
<b>I– La Maladie de Chagas.....</b>	<b>137</b>
A– Généralités.....	137
1– État des lieux sur la maladie de Chagas.....	137
2– Traitement.....	138
Molécules trypanocides actuellement disponibles.....	138
B– Travaux personnels.....	139
1– Évaluation de l'activité des extraits de <i>Z. chiloperone</i> et des produits isolés.....	139
a– Étude d'activité <i>in vitro</i> .....	139
b– Activité <i>in vivo</i> des extraits de feuilles.....	141
c– Activité <i>in vitro</i> des extraits mensuels de feuilles.....	142
2– Étude de l'inhibition enzymatique de la trypanothione réductase.....	142
<b>II– Le paludisme.....</b>	<b>142</b>
A– Généralités.....	142
1– État des lieux sur le paludisme.....	143

2– Traitement.....	144
a– Molécules antipaludiques actuellement disponibles.....	144
b– Les phénomènes de résistance.....	146
B– Travaux personnels.....	147
1– Évaluation de l’activité des extraits de <i>Zanthoxylumchiloperone</i> et des produits isolés.....	147
a– Activité <i>in vitro</i> .....	147
b– Activité <i>in vivo</i> .....	149
2– Étude de la formation d’adduits avec le groupe hème.....	149
<b>III– La tuberculose.....</b>	<b>152</b>
A– Généralités.....	152
1– Biologie des mycobactéries.....	153
a– Généralités sur les mycobactéries.....	153
b– Traitement.....	155
α– Molécules antituberculeuses actuellement disponibles.....	155
β– Les phénomènes de résistance.....	<b>158</b>
γ– Travaux antérieurs.....	159
B– Travaux personnels : évaluation de l’activité <i>in vitro</i> des canthin-6-ones.....	159
α– Activité <i>in vitro</i> .....	159
Résultats.....	159
Relation structure/activité.....	160
β– Étude du mécanisme d’action.....	163
<b>IV– Activité antiproliférative.....</b>	<b>166</b>
A– Généralités.....	166
1– État des lieux sur les gliomes et cellules souches cancéreuses.....	166
2– Traitement.....	167
B– Travaux personnels.....	167
1– Évaluation de l’activité <i>in vitro</i> des extraits de <i>Z. chiloperone</i> et des produits isolés.....	167
2– Activités <i>in vitro</i> .....	167
3– Étude de la voie MAPK / ERK.....	171
4– Relations structure-activité.....	173
5– Étude d’inhibition de l’indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO).....	172

<b>V– Activité nématocide.....</b>	<b>175</b>
A– Généralités : État des lieux sur <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	175
B– Travaux personnels : Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité des $\beta$ -carboline.....	177
<b>Conclusion du chapitre 6.....</b>	<b>181</b>
<b>Chapitre 7- Étude électrochimique des canthinones.....</b>	<b>188</b>
Introduction.....	188
Travaux personnels : étude électrochimique des canthinones.....	189
Conclusion du chapitre 7.....	96
Conclusion générale.....	200
<b>Abréviations et symboles.....</b>	<b>204</b>

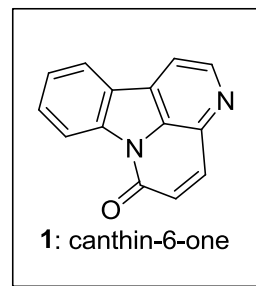


# Introduction générale



La canthin-6-one (**1**) est un alcaloïde qui a été isolé et décrit pour la première fois en 1952. Depuis, plus d'une quarantaine de composés de ce type ont été décrits et plusieurs d'entre eux ont montré des activités pharmacologiques intéressantes.

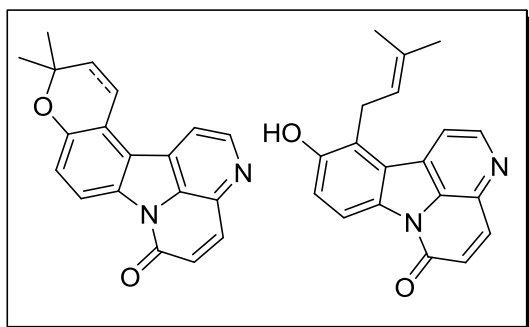
Dans le but de trouver de nouvelles activités biologiques de la canthin-6-one et d'étudier les mécanismes d'action, ainsi que d'avoir une voie de synthèse efficace pour son obtention en quantités importantes, nous avons réalisé un travail de recherche en collaboration avec l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Université Nationale d'Asunción (UNA) au Paraguay.



Nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* (*Rutaceae*), ainsi qu' à la recherche d'une voie d'accès générale aux alcaloïdes de type canthin-6-one (**1**).

Dans une première partie (chapitres 1 et 2), nous discuterons de l'extraction des alcaloïdes de type canthin-6-one (**1**) ainsi que de deux pyranocoumarines et une hydroxycoumarine isolés des écorces, feuilles et racines de *Zanthoxylum chiloperone*.

Dans une deuxième partie (chapitres 3 et 4), nous décrivons les réactions chimiques et la mise au point d'une nouvelle voie de synthèse pour l'obtention de la canthin-6-one (**1**) et d'autres analogues en tirant profit de considérations biogénétiques.



Le cinquième chapitre sera consacré à un mode particulier de pharmacomodulation : la prénylation. Des analogues originaux de la tryptamine et de la canthin-6-one ont ainsi été synthétisés.

Le sixième chapitre présente les études biologiques que nous avons menées sur les extraits bruts de *Z. chiloperone*, les produits isolés de ces extraits et les molécules synthétisées par voie chimique. Seront développées l'activité antituberculeuse, l'activité antiproliférative sur cellules souches cancéreuses, ainsi que plusieurs activités antiparasitaires (maladie de Chagas, paludisme, activités nématocides).

Enfin, dans le dernier chapitre nous décrivons une étude originale d'électrochimie sur des canthinones, avec l'établissement de relation réponse voltampérométrique-activité antitumorale.





# Chapitre 1

## Aspects botaniques



## -CHAPITRE 1-

### Aspects botaniques

#### I– Généralités sur la famille des Rutaceae

La famille des Rutaceae comprend environ 900 espèces regroupées dans 150 genres réparties dans la zone tropicale et dans les régions tempérées de l'hémisphère Sud.

Les Rutaceae se présentent sous forme d'arbres, d'arbustes parfois de lianes ligneuses ou de plantes herbacées. Elles possèdent fréquemment des aiguillons sur le tronc, les rameaux et sur les limbes de feuilles avec des poches schizolysigènes situées dans différentes parties de la plante. La plupart des Rutaceae produisent des huiles essentielles dégageant d'intenses odeurs souvent agréables. Les feuilles sont généralement alternes, composées ou imparipennées ou digitées ou simples. Les inflorescences sont très variées : cymes, racèmes, corymbes, panicules ou, rarement, fleurs isolées. Les fleurs sont le plus souvent régulières et généralement hermaphrodites. Les pétales se trouvent généralement libres. Les filets des étamines sont libres ou soudés à la base et les anthères présentent une déhiscence longitudinale. Le fruit peut être très variable (baies, drupes, samares capsules ou follicules)<sup>1,2</sup>.

#### II– Généralités sur le genre *Zanthoxylum*

Selon Heywood<sup>3</sup>, la famille des Rutaceae est divisée en quatre sous-familles : Rutoideae, Toddaloideae, Rhabdodendroideae et Aurantioideae. La sous-famille des Rutoideae est à son tour divisée en cinq tribus parmi lesquelles se trouvent les Zanthoxyleae, dans laquelle est inclus le genre *Zanthoxylum*. Le terme *Zanthoxylum* est une modification du mot *Xanthoxylum* qui vient du grecque *xanthon xylon* « bois jaune », d'où l'utilisation par certains auteurs du terme *Zanthoxylum* ou *Xanthoxylum*. Le genre *Zanthoxylum* a été créé par Linné en 1757 et confondu avec le genre *Fagara*. En 1896, Engler<sup>4</sup> a fait la distinction entre les deux genres par les caractères suivants : les espèces appartenant au genre *Zanthoxylum* présentent un périanthe simple, alors que celui des espèces appartenant au genre *Fagara* est double (Figure 1 et 2). Les travaux de Brizicky en 1962<sup>5</sup>,



Figuras 1-5. *Zanthoxylum caribaeum*. 1. Hábito. 2. Inflorescência. 3. Flor masculina evidenciando estames e pistilóide (Melo 249). 4. Fruto (Chappuis 297). 5. Folículo aberto evidenciando semente (Melo 250). Figuras 6-10. *Zanthoxylum fagara*. 6. Hábito. 7. Detalhe dos acúleos (Silva 168). 8. Detalhe do botão. 9. Flor masculina evidenciando estames e pistilóide (Silva 168). 10. Folículo aberto. Figuras 11-14. *Zanthoxylum garberi*. 11. Flor masculina evidenciando estames e pistilóide (Fernando de Bezerra s.n. IEC 9585). 12. Ramo de inflorescência. 13. Detalhe do botão (Foto de Miranda s.n. EAV 9082). 14. Folículo evidenciando semente (Schubert 119).

-Figure 1-Illustration des caractéristiques du genre *Zanthoxylum*.

1 Engler A., Die natürlichen plazenfamilien (Engelmann (Leipzig)), 1931, 19a, 187.  
 2 Spichiger R., Stutz de Ortega L., Flora de Paraguay: Rutaceae (Missouri botanical garden),1987.  
 3 Heywood V. H., Les plantes à fleurs (Nathan (Paris)), 1996.  
 4 Engler A., Rutaceae. In : natürlichen pflanzenfamilie III (Engelmann (Leipzig)), 1896, 4, 95.  
 5 Brizicky G. K., The genera of Rutaceae in the Southeastern United States, *J. Arnold Arbor.* 1962, 43, 80.

grâce à la découverte d'espèces présentant un périanthe intermédiaire entre celui de *Zanthoxylum* et celui de *Fagara*, ont démontré que le périanthe simple de *Zanthoxylum* dérivait de celui de *Fagara* par avortement de quelques sépales, voire tous les sépales (Figure 1). De là, il a conclu que le genre *Fagara* était un sous-genre de *Zanthoxylum*.

Ce n'est qu'en 1966 que Hartley regroupa *Zanthoxylum* et *Fagara* sous le nom de *Zanthoxylum*<sup>6,7</sup>, ce qui a été confirmé par Zepernick et Timler<sup>8</sup> en 1981 et c'est sous cette dernière appellation que ce genre est répertorié dans l' « *International Index of Plant Name* ». Néanmoins, certains auteurs continuent d'utiliser le terme *Fagara*<sup>9</sup>.



-Figure 2- Fruits de *Z. chiloperone*.

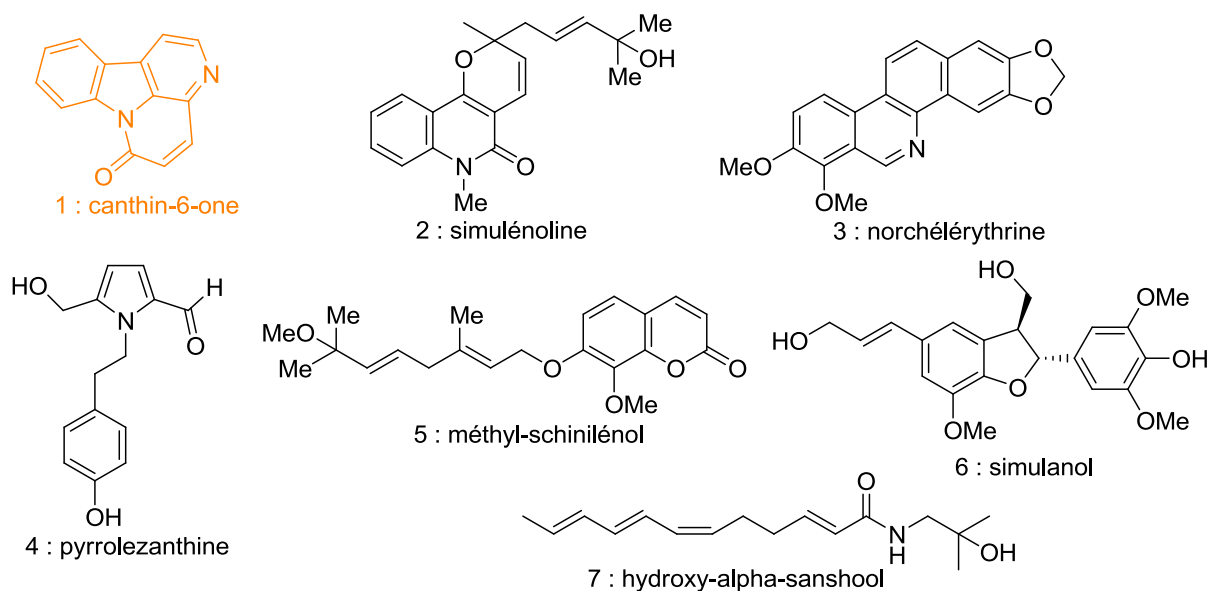
Le genre *Zanthoxylum* comprend environ 250 espèces réparties dans le monde entier, principalement dans les régions tropicales et tempérées de l'hémisphère Sud, dans les régions tropicales d'Amérique, Afrique, Asie et Australie<sup>5,10</sup>. Il est représenté par des arbres, arbustes monoïques ou dioïques, le tronc, les rameaux et les feuilles sont souvent épineux (Figure 1). L'écorce du bois est jaune, odorante et parfois épicée. Les feuilles sont alternes, composées et souvent impaires (3 à 11). Les fleurs peuvent être bisexuelles ou polygames. Les étamines sont en nombre égal à celui des pétales, ces derniers étant imbriqués ou valvaires. Les fruits ont un noyau noir et brillant (Figure 2)<sup>5</sup>.

- 6 Fish F., Waterman P. G., Alkaloids and coumarins of *Zanthoxylum elephantiasis*, *Taxon* 1973, **22**, 177.
- 7 Hartley T. G., A revision of the Malesian species of *Zanthoxylum* (Rutaceae), *J. Arnold Arbor.* 1966, **47**, 171.
- 8 Zepernick B., Timler F. K., *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler comb. nova (Rutaceae), *Willdenowia* 1981; **11**, 361.
- 9 Chaaib F., Queiroz E. F., Ndjoko K., Diallo D., Hostettmann K., Antifungal and antioxidant compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides*, *Planta Med.* 2003, **69**, 316.
- 10 Waterman V. H., New combination in *Zanthoxylum* L., *Taxon* 1973, **24**, 361.
- 11 Chen I. S., Wu S. J., Tsai I. L., Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*, *J. Nat. Prod.* 1994, **57**, 1206.
- 12 Chen I. S., Tsai I. W., Teng C. M., Chen J. J., Chang Y. L., Ko F. N., Lu M. C., Pezzuto J. M., Pyranoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans*, *Phytochem.* 1997, **46**, 525.
- 13 de Moura N. F., Morel A. F., Dessoy E. C., Zanatta N., Burger M. M., Ahlert N., Porto G. P., Baldisserotto B., Alkaloids, amides and antispasmodic activity of *Zanthoxylum hyemale*, *Planta Med.* 2002, **68**, 534.
- 14 de Moura N. F., Ribeiro H. B., Machado E. C. S., Ethur E. M., Zanatta N., Morel A. F., Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*, *Phytochem.* 1997, **46**, 1443.
- 15 Fish F., Gray A. I., Waterman P. G., Alkaloids, coumarins, triterpenes and a flavanone from the root of *Zanthoxylum dipetalum*, *Phytochem.* 1975, **14**, 2073.
- 16 Ross S. A., Sultana G. N. N., Burandt C. L., ElSohly M. A., Marais J. P. J., Ferreira D., Syncarpamide, a new antiplasmodial (+)-norepinephrine derivative from *Zanthoxylum syncarpum*, *J. Nat. Prod.* 2003, **67**, 88.
- 17 Nguyen Q. A., Van-Dufat H. T., Michel S., Tillequin F., Dumontet V., Sévenet T., A new phenylpropanoid ester from the bark of *Zanthoxylum scandens* (Rutaceae), *Z. Naturforsch. C.*, 2002, **57**, 986.
- 18 de A Gonzaga W., Weber A. D., Giacomelli S. R., Dalcol I. I., Hoelzel S. C. S., Morel A. F., Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*, *Planta Med.* 2003, **69**, 371.
- 19 Yang Y. P., Cheng M. J., Teng C. M., Chang Y. L., Tsai I. L., Chen I. S., Chemical and anti-platelet constituents from Formosan *Zanthoxylum simulans*, *Phytochem.* 2002, **61**, 567.
- 20 Diehl E. E., Lino von Poser G., Teresinha Henriques A., Constituents of *Zanthoxylum rugosum* St.-Hil & Tul, *Biochem. Syst. Ecol.* 2000, **28**, 275.
- 21 Mai H. D., Van-Dufat H. T., Michel S., Tillequin F., Bastien D., Sévenet T. Z., Constituents of *Zanthoxylum rugosum* St.-Hil & Tul, *Z. Naturforsch. C* 2001, **56**, 492.
- 22 He W., Puyvelde L. V., Kimpe N. D., Verbruggen L., Anthonissen K., Flaas M. V. d., Bosselaers J., Mathenge S. G., Mudida F. P., Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum usambarense*, *Phytother. Res.* 2002, **16**, 66.
- 23 Chang C. T., Doong S. L., Tsai I. L., Chen I. S., Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*, *Phytochem.* 1997, **45**, 1419.
- 24 Gray A. I., Waigh R. D., Waterman P. G., Avicennol: a new pyranocoumarin from the root bark of *Zanthoxylum avicennae*, and its conversion into avicennin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1975, **197**, 488.
- 25 Abe F., Yahara S., Kubo K., Nonaka G., Okabe H., Nishioka I., Studies on *Xanthoxylum* spp. II. Constituents of the bark of *Xanthoxylum piperitum* DC., *Chem. Pharm. Bull.* 1974, **22**, 2650.
- 26 Xiong Q., Shi D., Hirofumi Y., Mizuo M., Alkylamides from pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*, *Phytochem.* 1997, **46**, 1123.

### III- Étude chimique des différentes espèces de *Zanthoxylum*

Du point de vue chimique, les espèces du genre *Zanthoxylum* constituent une source riche de métabolites secondaires. Cette diversité chimique est liée à la diversité des voies du métabolisme secondaire présent chez les *Rutaceae*<sup>10</sup>. Parmi les composés isolés des différentes espèces de *Zanthoxylum*, nous trouvons des alcaloïdes de type pyranoquinoline<sup>11-13</sup> (2), benzophénanthridine<sup>11,14-17</sup> (3), dihydrobenzophénanthridine<sup>18</sup>, pyrrole<sup>19</sup> (4) et de type canthin-6-one<sup>15,20-22</sup> (1) ainsi que des coumarines<sup>16,21,23</sup> (5), des pyranocoumarines<sup>15,20,24</sup>, des amides aromatiques<sup>11,13</sup>, des lignanes<sup>25</sup> (6), des alkylamides<sup>26</sup> (7), des flavonoïdes<sup>27,28</sup> et des triterpénoïdes<sup>29</sup> (Figure 3).

Les alcaloïdes de type canthin-6-one forment un groupe important d'un point de vue taxonomique et se caractérise par une diversité structurale moyenne. La plupart d'entre eux ont été trouvés dans des racines et des écorces de certaines *Rutaceae* et *Simaroubaceae* principalement réparties dans des zones tropicales<sup>30-32</sup>.



-Figure 3- Différents composés isolés du genre *Zanthoxylum*.

27 Fang S. D., Wang L. K., Hecht S. M., Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*, *J. Org. Chem.* 1993, **58**, 5025.

28 Talapatra S. K., Dutta S., Talapatra B. Alkaloids and terpenoids of *Zanthoxylum ovalifolium*, *Phytochem.* 1973, **12**, 729.

29 Corie E. T., Green G. H., Ritchie E., Taylor W. C., The chemical constituents of Australian *Zanthoxylum* species. V. The constituents of *Z. pluviatile* Hartley; the structures of two new lignans, *Aust. J. Chem.* 1970, **23**, 133.



## Chapitre 2

# Étude phytochimique de *Zanthoxylum chiloperone*





## -CHAPITRE 2-

### Étude phytochimique de *Zanthoxylum chiloperone*

#### I– Travaux précédents du laboratoire

##### A– Introduction

En collaboration avec l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) en France et l'Université Nationale d'Asunción (UNA) au Paraguay, notre laboratoire s'est intéressé à l'étude de *Zanthoxylum chiloperone* (*Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* Engl. (syn. *Fagara chiloperone* Engl. Ex Chod. & Hassl.)). C'est un arbre dioïque de 5 à 20 m de haut et de 20 à 50 cm de diamètre. Souvent, mais pas toujours, il possède des épines sur le tronc et les rameaux. L'écorce est grise et dégage une odeur intense parfois considérée comme désagréable. L'aire de distribution de cette espèce est restreinte au Paraguay dans la partie orientale, c'est à dire à l'Est du fleuve Paraguay et à sa frontière



-Figure 1- *Z. chiloperone*.

avec le Brésil. Au Paraguay, où il est appelé « *tembetary hu* » (« *tembé* » = lèvres, « *itá* » = pierre, « *y* » = abréviation de « *yvyrá* » = arbre, « *hu* » = noir), « *tembetary hovy* » ou « *mamicão* » (Figure 1)<sup>2,33</sup>, cet arbre est utilisé en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire, antipyrétique, emménagogue, antirhumatismal<sup>34,35</sup>, antiparasitaire en général, parfois pour traiter la malaria<sup>36</sup> et les infections fongiques de la peau<sup>37,38</sup>.

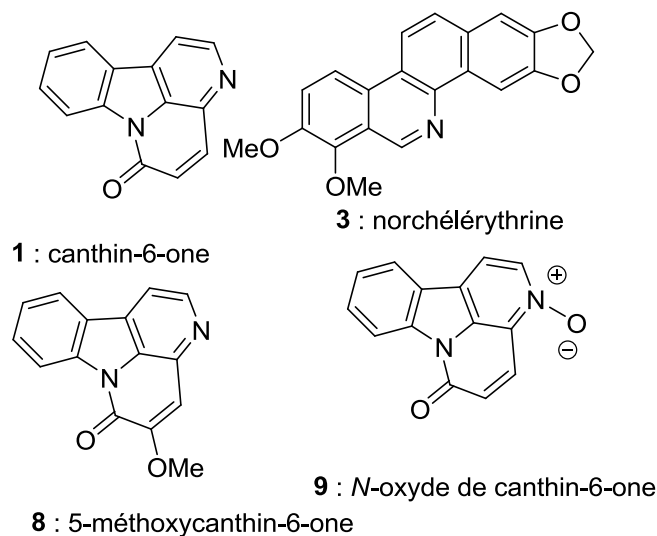


-Figure 2- Écorce du *Z. chiloperone*.

- 2 Spichiger R., Stutz de Ortega L., Flora de Paraguay: Rutaceae ( Missouri botanical garden), 1987.
- 30 Ohmoto T., Koike K., Arnold B., *In the alkaloids: Chemistry and pharmacology* (Academic Press), 1990, **36**, 135.
- 31 Jiao W.-H., Gao H., Zhao F., Lin H.-W., Pan Y.-M., Zhou G.-X., Yao X.-S., Anti-inflammatory alkaloids from the stems of *Picrasma quassioides* Bennet, *Chem. Pharm. Bull.* 2011, **59**, 359.
- 32 Jiang M.-Y., Feng T., Liu J.-K., *N*-Containing compounds of macromycetes, *Nat. Prod. Rep.*, **28**, 783.
- 33 Tabanez M. F., Durigan G., Keuroghlian A., Barbosa A. F., de Freitas C. A., da Silva C. E. F., da Silva D. A., Eaton D. P., Brisolla G., de Faria H. H., Mattos I. F. d., Lobo M.T., Barbosa M. R., Rossi M., M. d. G. d. S, Machado R. B., Pfeifer R. M., Ramos V. S., Andrade W. J. D., Contieri W. A., Plano de manejo da estação ecológica dos caetetus (In Florestal I (São Paulo)), 2005.
- 34 Ferreira M. E., Nakayama H., de Arias A. R., Schinini A., de Bilbao N. V., Serna E., Lagoutte D., Soriano-Agaton F., Poupon E., Hocquemiller R., Fournet A., Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice, *J. Ethnopharmacol.* 2007, **109**, 258.
- 35 Ferreira M. E., Rojas de Arias A., Torres de Ortiz S., Inchausti A., Nakayama H., Thouvenel C., Hocquemiller R., Fournet A., Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, *J. Ethnopharmacol.* 2002, **80**, 199.

## B– Récolte et identification de l'écorce de *Zanthoxylum chiloperone*

*Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, a été récoltée au Paraguay, près de Piribebuy dans le département de Cordillera, par les docteurs Alain Fournet de l'IRD et Maria Elena Ferreira de l'UNA. Des spécimens de différentes parties de cette plante (écorces (Figure 2), feuilles (Figure 3), rhizomes, fruits et résine) ont été récoltés et mis en collection puis identifiés à l'Herbier de la Faculté de Chimie de San Lorenzo, au Paraguay, sous les codes AF917 et MF55<sup>34,35,38</sup>.



## C– Différents composés isolés de l'écorce de *Zanthoxylum chiloperone*

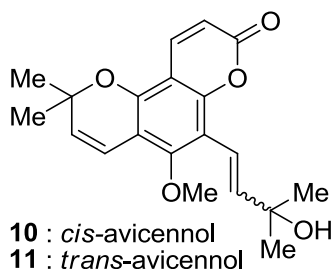
Dans les travaux précédents du laboratoire 6 composés ont été isolés et caractérisés à partir de l'extrait dichlorométanique des écorces de *Zanthoxylum chiloperone*<sup>34,35,37,38</sup> :

- ♣ Quatre alcaloïdes :
  - i- canthin-6-one (1).
  - ii- 5-méthoxycanthin-6-one (8).
  - iii- N-oxyde de canthin-6-one (9)
  - iv- norchélytrine (3).

- ♣ Deux pyranocoumarines :

- i- *cis*-avicennol (10).

- ii- *trans*-avicennol (11).



36 Milliken W., Malaria and antimalarial plants in Roraima, Brazil, *Trop. Doc.* 1997, 27, 20.

37 Thouvenel C., Gantier J. C., Duret P., Fourneau C., Hocquemiller R., Ferreira M. E., de Arias A. R., Fournet A., Antifungal compounds from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, *Phytother. Res.* 2003, 17, 678.

38 Soriano-Agaton F., Lagoutte D., Poupon E., Roblot F., Fournet A., Gantier J. C., Hocquemiller R., Extraction, hemisynthesis and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities, *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 1581.

## II– Travaux personnels : caractérisation des extraits de *Z. chiloperone*

### A– Isolement de composés à partir des extraits des écorces de tronc, de racines, de feuilles, de résine et des fruits de *Zanthoxylum chiloperone*

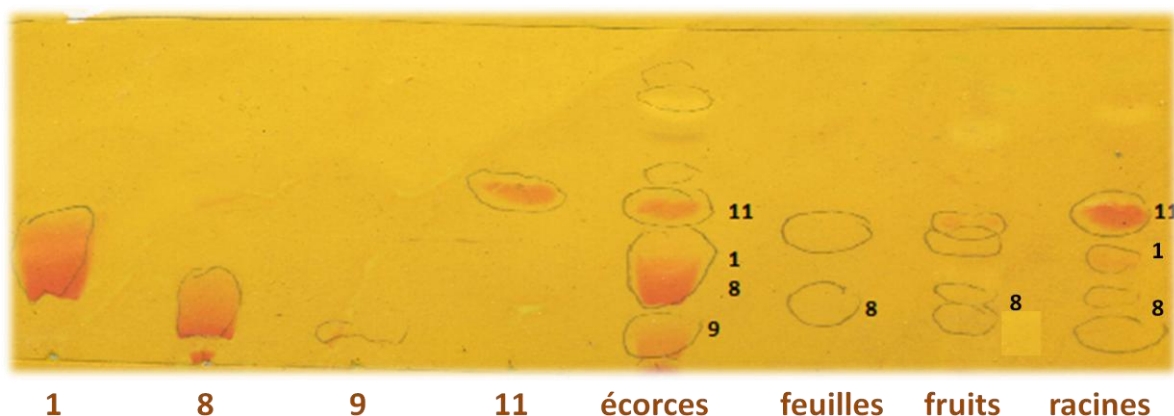
Les écorces de tronc (Figure 2) et les feuilles (Figure 3) de *Zanthoxylum chiloperone* sont séchées, broyées et traitées avec une solution alcaline d'ammoniaque, puis extraites par du dichlorométhane et du méthanol successivement selon la méthode décrite dans la partie expérimentale<sup>34,35,37,38</sup>.



-Figure 3-Feuilles de *Z. chiloperone*

Les écorces de racines de *Zanthoxylum chiloperone* sont également séchées, broyées et traitées avec une solution alcaline d'ammoniaque, puis extraites par macération avec du méthanol.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'extrait dichlorométhanique de l'écorce du tronc. D'après les études réalisées par Thouvenel, Ferreira et Soriano-Agaton<sup>34,35,37,38</sup>, les alcaloïdes canthin-6-one (**1**), 5-méthoxy-canthin-6-one (**8**) et les pyranocoumarines *cis/trans*-avicennol (**10** et **11**) avaient été extraits et identifiés dans ces écorces. Des chromatographies sur couche mince (CCM) (Figure 4) ont tout de suite révélées la présence de quelques uns de ces composés dans les extraits de différentes parties de cette plante (racines, écorces, feuilles et fruits).



-Figure 4-Chromatographies sur couche mince (CCM) des différents extraits de *Z. chiloperone* (cyclohexane:AcOEt (1 : 1)).

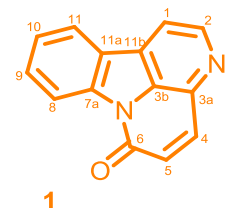
### 1– Isolement et caractérisation des alcaloïdes type canthin-6-one à partir des extraits dichlorométhaniques des écorces et des feuilles de *Zanthoxylum chiloperone*

#### a– Caractérisation des alcaloïdes

- La **canthin-6-one** (**1**) a été isolée de l'extrait dichlorométhanique des écorces de *Zanthoxylum chiloperone*, avec un très bon rendement (13 %).

La canthin-6-one (**1**) un alcaloïde à formule brute  $C_{14}H_8N_2O$ , peut être considérée comme la tête de série d'une sous-classe de composés de type  $\beta$ -carboline. La canthin-6-one (**1**) est une poudre jaune cristalline ( $R_f$ : 0,6 (cyclohexane/acétate d'éthyle 1 : 1)) qui donne la coloration caractéristique au réactif de Dragendorff.

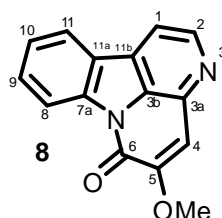
Les spectres de RMN ( $^1H$  et  $^{13}C$  par Jmod\*) de ce composé ont montré la présence de 8 protons et de 14 carbones aromatiques. Le spectre RMN du proton a montré un système AB de 2 protons ( $\delta$  8,70 et  $\delta$  7,80 ppm ;  $^3J = 5$  Hz) qui correspondent aux H-2 et H-1 respectivement. Un autre système AB de 2 protons  $\delta$  7,90 et  $\delta$  6,87 ppm ( $^3J = 9,8$  Hz) a été attribué aux H-4 et H-5 respectivement.



Les signaux des 4 protons du noyau aromatique *ortho*-disubstitué ( $^3J = 8$  Hz) ont montré deux doublets ( $\delta$  8,50 et  $\delta$  7,94 ppm) et deux triplets ( $\delta$  7,58 et  $\delta$  7,41 ppm) correspondant aux protons H-8, H-11, H-9 et H-10 respectivement ( $^3J = 8$  Hz).

Le spectre de masse (SM/ES) a montré un ion  $m/z$   $[M+Na]^+ = 243$  correspondant à une masse moléculaire compatible avec la formule brute  $C_{14}H_8N_2O$  et le spectre IR a montré, en particulier, une bande d'absorption à  $1673\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O).

Les données spectrales ont été comparées à celles reportées dans la bibliographie pour la canthin-6-one (**1**) et nous ont permis de confirmer l'identification de cet alcaloïde<sup>38,39</sup>.



La **5-méthoxy-canthin-6-one (8)** a été isolée des extraits dichlorométhaniques de l'écorce et des feuilles de *Zanthoxylum chiloperone*, avec un très bon rendement dans le cas de l'écorce (6,5 %) et avec un rendement plus faible dans le cas des feuilles (1 %).

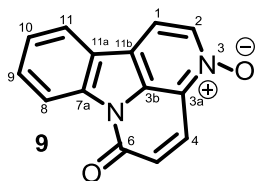
La 5-méthoxycanthin-6-one (**59**) est un alcaloïde avec une formule brute  $C_{15}H_{10}N_2O$ . Elle se présente sous l'apparence d'une poudre marron clair ( $R_f$ : 0,3 ( $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1)) et donne la coloration caractéristique au réactif de Dragendorff. Les spectres de RMN ( $^1H$  et  $^{13}C$  par Jmod) de ce composé ont montré au total, 10 protons et 15 carbones. L'ensemble de données spectrales a montré des signaux correspondant à un alcaloïde de type canthin-6-one monosubstitué par un groupement méthoxyle. Le spectre RMN du proton a montré un système AB de 2 protons ( $\delta$  8,74 et  $\delta$  7,80 ppm ;  $^3J = 5,1$  Hz) qui correspondent aux H-2 et H-1 respectivement. Deux doublets dédoublés ( $^3J = 8$  Hz,  $^4J = 1,8$  Hz) pour 2 protons centrés sur  $\delta$  8,67 et  $\delta$  8,06 ppm, ainsi que deux triplets ( $^3J = 8$  Hz) pour deux autres protons centrés sur  $\delta$  7,68 et  $\delta$  7,51 ppm ont été attribués aux H-8, H-11, H-9 et H-10; respectivement. Un singulet  $\delta$  7,18 ppm d'un proton a été attribué à H-4 et un autre singulet  $\delta$  4,05 ppm de trois protons a été attribué au groupement méthoxyle en position C-5.

Le spectre de masse (SM/ES) a montré un ion  $m/z$   $[M+H]^+ = 251$  correspondant à une masse moléculaire compatible avec la formule brute  $C_{15}H_{10}N_2O_2$  et le spectre IR a montré, en

\*

JMOD :  $^{13}C$  J-Modulation experiments

particulier, des bandes d'absorption à  $1668\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C=O}$ ) et à  $1354\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ OMe}$ ). En comparant ces données avec les données de la littérature, nous avons attribué à ce composé, la structure de la 5-méthoxy-canthin-6-one (**8**)<sup>38</sup>.



Un autre alcaloïde de cette série a été isolé dans l'écorce de la plante : le **N-oxyde de canthin-one (9)**.

Cet alcaloïde est très minoritaire dans l'extrait, avec un rendement de 0,4 %. Cette molécule qui a une apparence de poudre jaune brillant ( $R_f$ : 0,6 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1)) a donné la coloration caractéristique au réactif de Dragendorff. Les spectres de RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  par Jmod) de ce composé ont montré au total, 8 protons et 14 carbones. L'ensemble de données spectrales a montré des signaux correspondant à un alcaloïde de type canthin-6-one N-oxydé sur l'azote « pyridinique ».

Le spectre RMN du proton a montré un système AB de 2 protons ( $\delta$  8,34 et  $\delta$  7,82 ppm ;  $^3J = 6,6\text{ Hz}$ ) qui correspondent aux H-2 et H-1 respectivement. Deux doublets ( $^3J = 8\text{ Hz}$ ) pour 2 protons centrés sur  $\delta$  8,65 et  $\delta$  7,99 ppm, ainsi que deux triplets ( $^3J = 8\text{ Hz}$ ) pour d'autres protons centrés sur  $\delta$  7,65 et  $\delta$  7,53 ppm ont été attribués aux H-8, H-11, H-9 et H-10 respectivement. Un autre système AB de 2 protons  $\delta$  8,38 et  $\delta$  6,92 ppm ( $^3J = 10\text{ Hz}$ ) a été attribué aux H-4 et H-5 respectivement.

Le spectre de masse (SM/ES) a montré un ion  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 237$  correspondant à une masse moléculaire compatible avec la formule brute  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$  et le spectre IR a montré, en particulier, des bandes d'absorption à  $1677\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C=O}$ ). En comparant ces données avec les données de la littérature nous avons attribué à ce composé, la structure du N-oxyde de canthin-6-one (**9**)<sup>38</sup>.

## b– Biosynthèse des alcaloïdes type canthinone

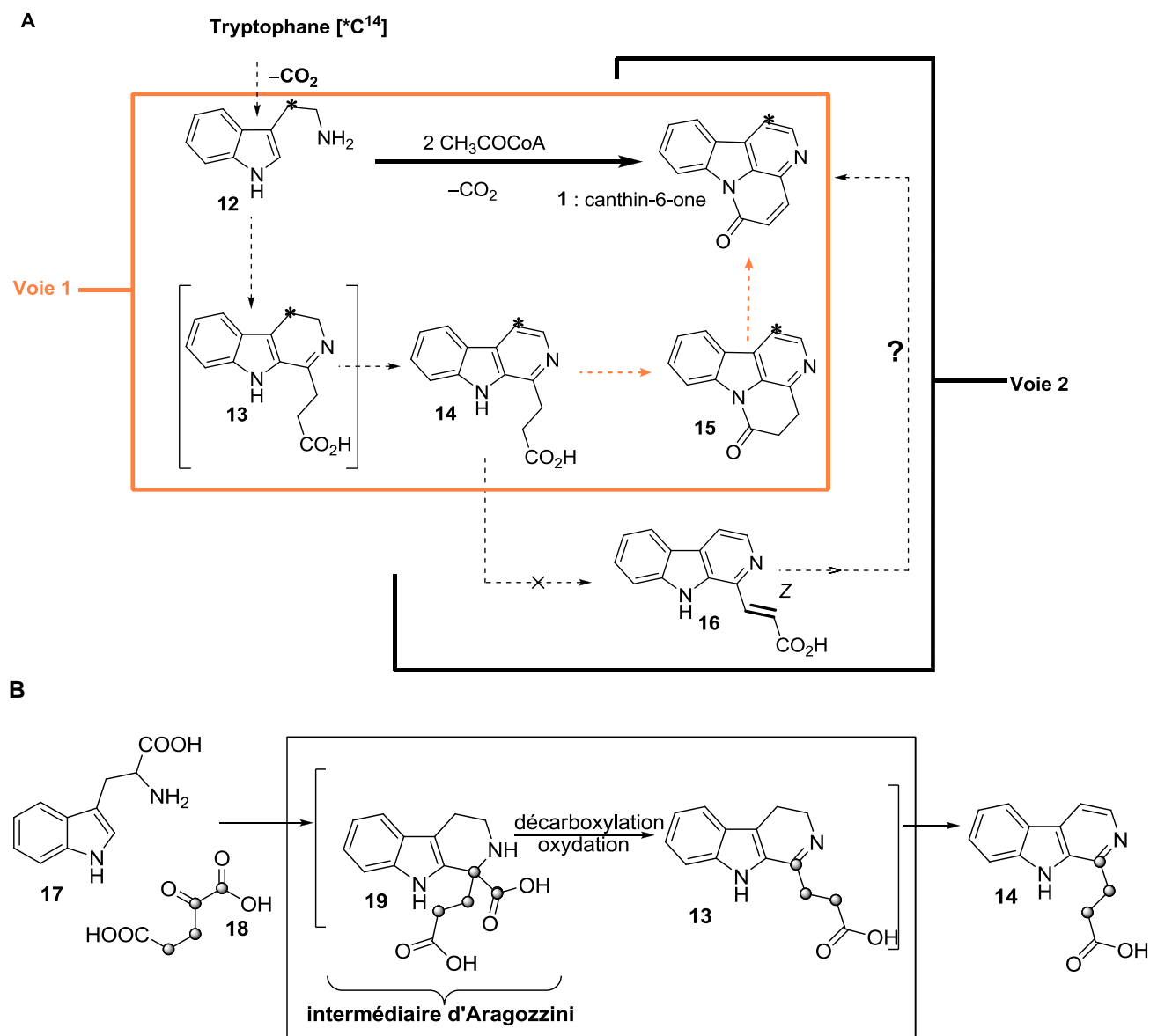
Les alcaloïdes de type canthin-6-one sont des composés issus du tryptophane (**14**). Ils sont formés par condensation d'une tryptamine (**12**) et deux unités acétiques, donnant lieu à une série d'intermédiaires de type  $\beta$ -carboline, chaque fois plus oxydés. Le groupe de Crespi-Perellino a proposé concrètement deux voies biosynthétiques complémentaires par l'accès au squelette de la canthin-6-one (**1**) désignées ici **voie 1** et **voie 2**, s'appuyant sur le marquage isotopique  $^{13}\text{C}$  du tryptophane<sup>40</sup> :

**Voie 1**, considérée comme la voie principale est l'unique de ces deux voies où tous les intermédiaires ont été isolés dans la nature. Cette voie consiste en la séquence : **tryptophane (17)**  $\rightarrow$  **acide  $\beta$ -carboline propionique (14)**  $\rightarrow$  **4, 5-dihydrocanthin-6-one (15)**  $\rightarrow$  **canthin-6-one (1)** (Schéma 1).

39 Haynes H. F. N., E. R., Price J. R., Alkaloids of the Australian Rutaceae: *Pentaceras australis* Hook. F. I. Isolation of the alkaloids and identification of canthin-6-one, *Aust. J. Chem.* 1952, 5, 387.

40 Crespi-Perellino N., Guicciardi A., Malyszko G., Minghetti A., Biosynthetic relationship between indole alkaloids produced by cell cultures of *Ailanthus altissima*, *J. Nat. Prod.* 1986, 49, 814.

**Voie 2**, cette voie reste une hypothèse, parce que l'intermédiaire postulé, l'acide  $\beta$ -carboline acrylique (**16**) n'a jamais été isolé dans la nature, ni même détecté dans les expériences de marquage isotopique  $^{14}\text{C}$ . Cette voie consiste en la séquence : **tryptophane (17)**  $\rightarrow$  **acide  $\beta$ -carboline propionique (14)**  $\rightarrow$  **acide  $\beta$ -carboline acrylique (16)**  $\rightarrow$  **canthin-6-one (1)** (**Schéma 1**). Nous pouvons noter que la publication en question donne une stéréochimie *trans* pour la double liaison (**16**) telle qu'indiquée sur le schéma et *a priori* peu compatible avec la cyclisation en canthin-6-one (**1**).

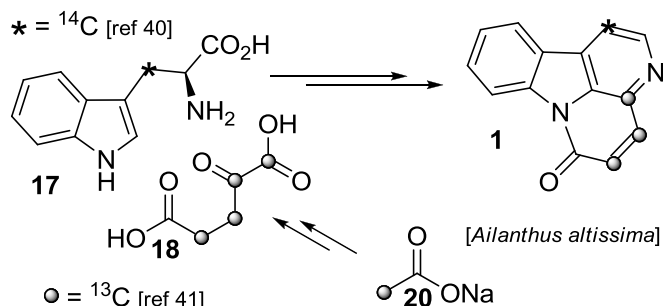


-Schéma 1- Voies de biosynthèse de l'alcaloïde canthin-6-one proposées par Crespi-Perellino. **B.** Positionnement de l'intermédiaire **13** dans l'hypothèse d'Aragozzini.

41 Aragozzini F., Maconi E., Gualandris R., Evidence for involvement of ketoglutarate in the biosynthesis of canthin-6-one from cell cultures of *Ailanthus altissima*, *Plant Cell Rep.* 1988, 7, 213.

42 Anderson L. A., Hay C. A., Roberts M. F., Phillipson J. D., Studies on *Ailanthus altissima* cell suspension cultures, *Plant Cell Rep.* 1986, 5, 387.

Une autre étude biogénétique proposée en 1988 par Aragozzini<sup>41</sup>, complète la précédente en ajoutant un intermédiaire, produit de la réaction entre le tryptophane (**17**) et le cétooglutarate (**18**) (Schéma 1 et 2), et démontrant son implication dans la biosynthèse des canthinones par des études de marquage isotopique <sup>13</sup>C de l'acétate (**20**). Dans le chapitre 3



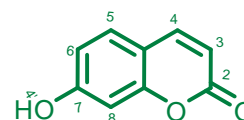
-Schéma 2- Bilan des marquages isotopiques <sup>13</sup>C et <sup>14</sup>C réalisés par les équipes de Crespi-Perellino et Aragozzini.

nous montrerons la viabilité de la voie **2** du point de vue chimique (Schéma 1). Nous pouvons trouver plusieurs travaux qui complètent cette biogenèse comme les études réalisées par le groupe de Phillipson<sup>42</sup> (London, UK) : ils ont prouvé que la méthylméthionine était à l'origine du groupement méthyle dans la 1-méthoxycanthin-6-one.

**2- Isolement et caractérisation de**

trois coumarines des écorces, des racines et des feuilles de *Zanthoxylum chiloperone*, l'hydroxycoumarine : **umbelliforine (21)** et les pyranocoumarines : **cis/trans-avicennol (10 et 11)**.

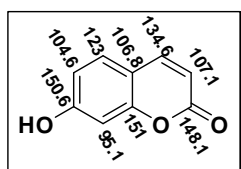
### a- Présence d'hydroxycoumarines α- Isolement de l'umbelliforine



**21 : umbelliforine**

Un composé solide incolore ( $R_f$  : 0,4 (cyclohexane/AcOEt 5:5)) a donné une déroutante coloration caractéristique au réactif de Dragendorff et a été isolé par chromatographie sur HPLC préparative (0,75 %) (HPLC isocratique avec une phase mobile de 55/45 % H<sub>2</sub>O + 0,05 % TFA/MeOH).

Les données spectrales de RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C par Jmod) de ce composé ont montré au total 6 protons et 9 carbones. Le spectre de proton a montré un système ABM de trois protons qui se présentent comme deux doublets (entre  $\delta$  6,76 et  $\delta$  7,42 ppm) et un doublet ( $\delta$  6,67 ppm) avec une constante de couplage <sup>3</sup>J = 8,4 et <sup>4</sup>J = 2,1 Hz, respectivement.



-Figure 5- <sup>13</sup>C RMN

GIAO DFT (21).

Enfin, un système AB de 2 protons ( $\delta$  6,14 et  $\delta$  7,81 ppm) avec une constante de couplage <sup>3</sup>J = 9,3 Hz, nous a fait supposer qu'il s'agissait d'un système en position  $\alpha\beta$  d'un groupement carbonyle (C=O) (la présence d'un groupement carbonyle a été confirmée par le spectre Jmod (163 ppm). Le spectre de masse (SM/ES) a montré un ion  $m/z$   $[M+H]^+ = 163$ . La structure a été calculée par le Pr Sahmil Latypov (Kazzan, Russie)<sup>43</sup>, en utilisant l'approche GIAO DFT\* (Figure



5). La comparaison avec les données expérimentales montre de bonnes corrélations dans le cas des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , et nous a aidés à confirmer la structure correspondant à un composé déjà connu, à savoir, l'umbelliférone (**21**)<sup>8</sup>.

## $\beta$ – Biosynthèse des hydroxycoumarines

Les composés coumariniques sont formés à partir d'un précurseur de type acide cinnamique (**23**) provenant de la *L*-phénylalanine (**22**). L'hydroxylation de l'acide cinnamique (**23**) en position *ortho* de la chaîne latérale, est fondamentale pour la formation finale des lactones typiques des coumarines. L'hydroxylation du noyau aromatique des acides cinnamiques peut se présenter sous deux voies différentes (Schéma 3) :

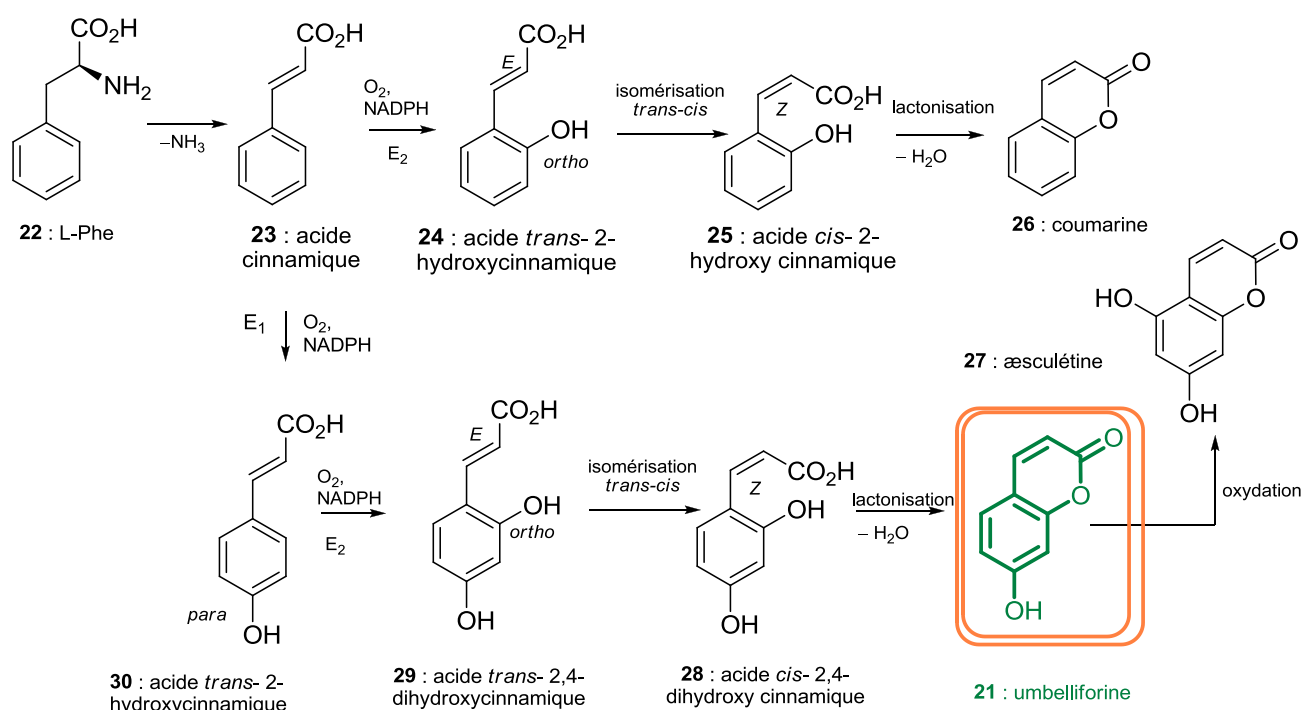
- ✿ Une oxydation en position 4, position *para* de la chaîne latérale, pour donner l'acide 4-coumarique (**30**) et suivie d'une hydroxylation en *ortho* de la chaîne latérale, pour donner l'acide 2,4-dihydroxy-cinnamique (**29**).
- ✿ Une deuxième voie, sans l'oxydation en position 4 (*para*), mais seulement avec une oxydation en *ortho* de la chaîne latérale (position 2), pour donner l'acide 2-coumarique (**24**).

Finalement, les deux acides 2-hydroxycinnamiques (**24** et **29**) subissent une isomérisation de la double liaison de la chaîne latérale, pour passer de la configuration (*E*) (**25** et **28**, respectivement) à la (*Z*), permettant la lactonisation de l'acide 2-coumarique (**25**), en coumarine (**26**) et de l'acide 2,4-coumarique (**28**) en umbelliférone (**21**), qui peut continuer vers des processus d'oxydation et donner des produits comme l'æsculétine (**27**) (Schéma 3).

---

43 Balandina A., Kalinin A., Mamedov V., Figadère B., Latypov S., Structure–NMR chemical shift relationships for novel functionalized derivatives of quinoxalines, *Magn. Reson. Chem.* 2005, **43**, 816.

\* Signification (GIAO)-DFT NMR : quantum chemical gauge-independent atomic orbital .



-Schéma 3- Biosynthèse des composés coumariniques.

## b- Présence de pyranocoumarines

### α- Isolement des avicennols

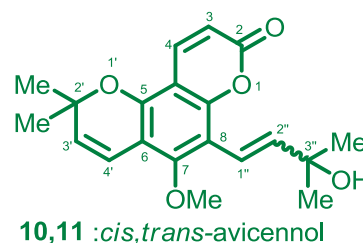
Un composé solide de couleur jaune décrit pour la première fois en 1975<sup>24</sup>. Depuis, a été isolé de l'écorce ( $R_f = 0,4$  (hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 60:35:5)) par chromatographie sur gel de silice et donne aussi une coloration caractéristique au réactif de Dragendorff.

Les données spectrales de RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  par Jmod) de ce composé présentent, au total, 22 protons et 20 carbones.

Le spectre de proton a montré trois systèmes AB (entre  $\delta$  5,61 et  $\delta$  7,97 ppm), un singulet ( $\delta$  3,78 ppm), un singulet ( $\delta$  2,82 ppm) et deux singulets ( $\delta$  1,47 et  $\delta$  1,28 ppm pour 6 protons chacun).

Un des systèmes AB de 2 protons ( $\delta$  5,61 et  $\delta$  6,55 ppm) a montré une constante de couplage  $^3J = 10$  Hz. L'autre système AB de 2 protons ( $\delta$  7,97 et  $\delta$  6,22 ppm) avec une constante de couplage  $^3J = 9,6$  Hz, nous a fait supposer qu'il s'agissait d'un système en position  $\alpha\beta$  d'un groupement carbonyle (C=O) (la présence d'un groupement carbonyle a été confirmée par le spectre IR qui a montré, en particulier, une bande d'absorption à  $1724\text{ cm}^{-1}$ ). Enfin, avec une constante de couplage  $^3J = 12,4$  Hz et des déplacements chimiques  $\delta$  6,16 et  $\delta$  5,94 ppm pour chaque proton, un système pour une *cis*-oléfine a été proposé.

Le spectre de masse (SM/ES) a montré un ion  $m/z$   $[M+Na]^+ = 365$ . Une recherche bibliographique nous a aidé à confirmer la structure du composé isolé, à savoir, le *cis*-avicennol (**10**)<sup>24</sup> (8 %). Un autre composé (cristal jaune,  $R_f = 0,2$  (hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 60:35:5) isolé de l'extrait chlorométhylénique a montré des données spectrales quasiment identiques à celles du *cis*-avicennol (cte couplage 12,4 Hz) (**10**), sauf qu'en RMN du proton, la valeur de l'une des constantes de couplage s'est avérée différente pour un des systèmes AB. Ceci nous a fait penser qu'il s'agissait des isomères *trans-cis* du même produit. La structure du *trans*-avicennol (**11**) (cte couplage 16,4 Hz) (15 %) a été confirmée grâce aux données bibliographiques<sup>38,44</sup>.



Le *trans*-avicennol (**11**) a aussi été isolé de l'extrait méthanolique des racines de *Zanthoxylum chiloperone* avec un très bon rendement (33 %).

D'après la bibliographie, des pyranocoumarines de type avicennol ont été retrouvées dans différentes espèces de *Zanthoxylum*, à savoir *Zanthoxylum rugosum*<sup>20</sup> (Amérique du Sud), *Zanthoxylum dipetalum*<sup>15</sup> (Hawaï), *Zanthoxylum elephantiasis*<sup>45</sup> (Amérique Centrale et Caraïbes), *Zanthoxylum avicennae* (Asie), entre autres.

Des espèces des genres *Asterolasia*<sup>46</sup>, *Eriostemon*<sup>47-49</sup> et *Philothea*<sup>50</sup> contiennent également les pyranocoumarines *cis*- et *trans*-avicennol (**10** et **11**), de même que les écorces de *Zanthoxylum avicennae*<sup>24</sup>.

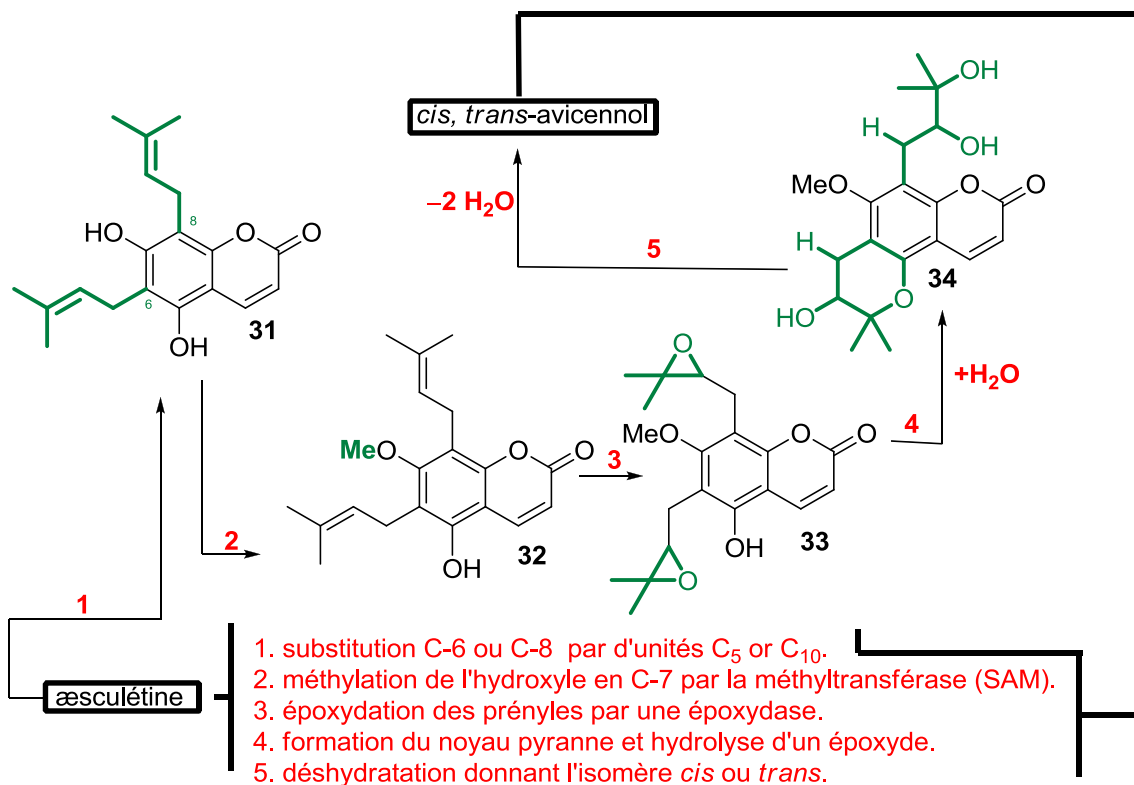
## β– Biosynthèse des pyranocoumarines

Les coumarines (**21** et **27**) peuvent subir plusieurs oxydations, des glycosylations, des substitutions par des unités prényles, et cyclisations ultérieures conduisant aux furanocoumarines et aux pyranocoumarines (Schéma 4).

Dans le cas particulier de l'avicennol (**10** et **11**) nous pouvons observer l'addition de deux unités prényle sur la base de l'æsculétine (**27**). Ces unités se fixent aux carbones en *ortho* des hydroxyles phénoliques (ces processus seront étudiés dans le chapitre 5) puis évoluent pour donner la structure finale de l'avicennol (**10** et **11**).

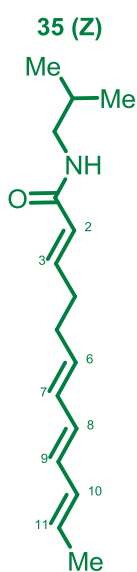
Les étapes qui conduisent de l'æsculétine (**27**) à l'avicennol (**10** et **11**) sont illustrées sur le schéma 4.

- 44 Murray R. D. H., Forbes I. T., . Synthesis of the coumarins, avicennol, dipetaline and dipetalolactone, *Tetrahedron Lett.* 1976, **17**, 953.
- 45 Fish F., Gray A. I., Waterman P. G., Alkaloids and coumarins of *Zanthoxylum elephantiasis*, *J. Pharm. Pharmacol.* 1976, **28**, 69.
- 46 Sarker S. D., Gray A. I., Waterman P. G., Armstrong J. A., . Coumarins from two *Asterolasia* Species, *J. Nat. Prod.* 1994, **57**, 324.
- 47 Rashid M. A., Armstrong J. A., Gray A. I., Waterman P. G., Pyranocoumarins as chemotaxonomic markers in *Eriostemon coccineus* and *Philothea citrine*, *Phytochem.* 1991, **30**, 4033.
- 48 Sarker S. D., Armstrong J. A., Gray A. I., Waterman P. G., Pyranocoumarins from *Eriostemon apiculatus*, *Biochem. Syst. Ecol.* 1994, **22**, 641.
- 49 Sarker S. D., Armstrong J. A., Waterman P. G., Angular pyranocoumarines from *Eriostemon thryptomenoides* (Rutaceae), *Biochem. Syst. Ecol.* 1994, **22**, 863.
- 50 Sultana N., Sarker S. D., Armstrong J. A., Wilson P. G., Waterman P. G., The coumarins of *Philothea sensu lato* : distribution and systematic significance, *Biochem. Syst. Ecol.* 2003, **31**, 681.



- Schéma 4- Biosynthèse des pyranocoumarines

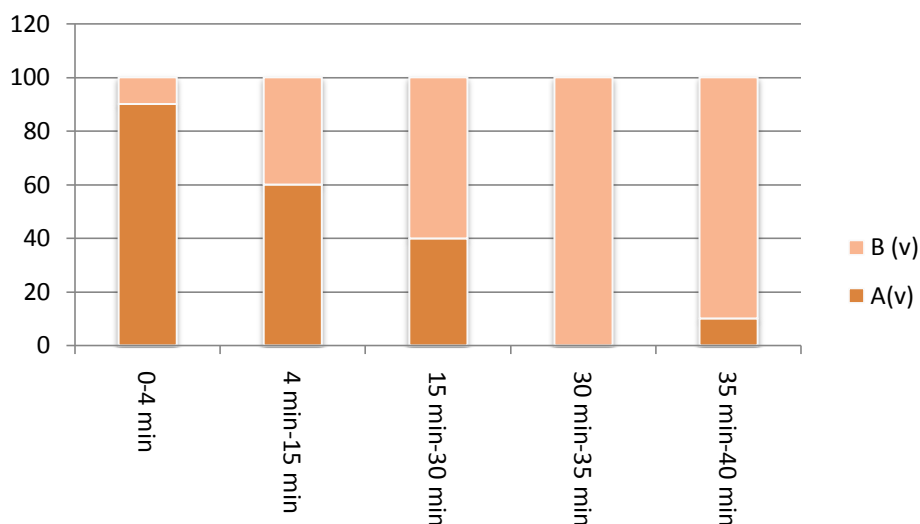
## B- Identification d'alkylamides dans *Z. chiloperone*: Identification du Sanshool par LC-ESI-MS/MS



Nous avons mis en évidence la présence d'alkylamides dans l'extrait brut des écorces de *Z. chiloperone* par analyse de type LC-ESI-MS/MS par la méthode mise au point par le docteur Kevin Spelman (NHI, USA)<sup>51</sup>. L'extrait des écorces a été utilisé pour identifier leur structure en les comparant avec celles déjà identifiées dans les espèces du genre *Zanthoxylum*. Le gradient de solvant employé pour analyser l'extrait éthanolique de l'écorce en HPLC était le suivant (voir figure 6) : le solvant **A** est une solution aqueuse d'acide acétique (17 mM d'origine et pH 2,74) et le solvant **B** est l'acétonitrile. Les gradients utilisés sont :

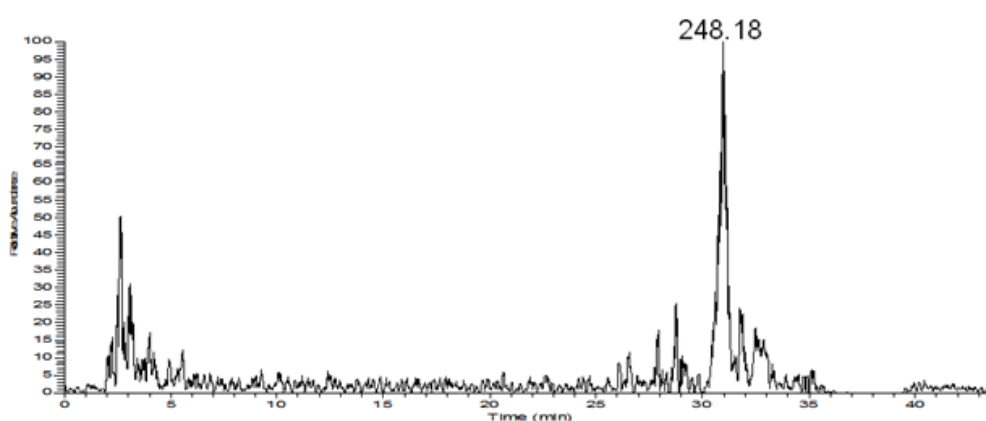
Pour  $t = 0$  à 4 min, une composition constante de AB (90:10 v/v), pour  $t = 4$  à 15 min, un gradient linéaire de AB (90:10, v/v) à AB (60:40, v/v), pour  $t = 15$  à 30 min, un gradient linéaire de AB (60:40, v/v) à AB (40:60, v/v), pour  $t = 30,1$  à 35 min, une composition constante de AB (0:100, v/v) et finalement pour  $t = 35,1$  à 43 min, une composition constante de AB (90:10, v/v) (Figure 6). Un spectromètre

de masse avec une source d'ionisation d'électrospray en mode d'ions positifs a été employée pour la détection.



-Figure 6- Gradient de solvants employé pour l'étude de LC-ESI-MS/MS.

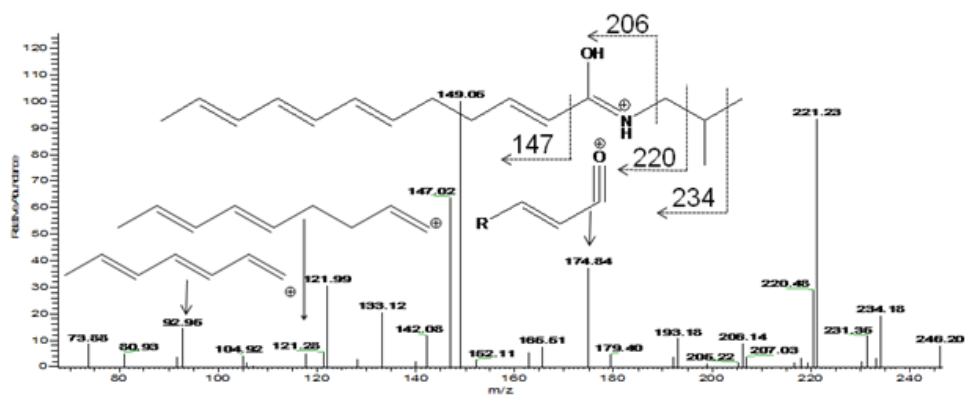
L'étude MS/MS de *Z. chiloperone* démontre la présence d'alkylamides dans cette espèce. La présence d'alkylamides dans différents espèces du genre *Zanthoxylum*<sup>19,26</sup> a été décrite dans la littérature. La figure 7 illustre le chromatogramme de l'analyse de l'extrait éthanolique de l'écorce. Cette figure représente également le spectre MS/MS. La masse de l'ion étudié correspond à la d'une présence d'alkylamide ( $M^+$ ) de mase de 247 (35).



-Figure 7- Ionogramme sélectionnés et MS / MS de spectra du dodeca-2, 6, 8,10-tetraenoic acid isobutylamide (35). Le chromatogramme d'ions sélectionnés illustre l'ion  $[M+H]^+$  à m/z 248.

- 51 Spelman K., Wetschler M. H., Cech N. B., Comparison of alkylamide yield in ethanolic extracts prepared from fresh versus dry *Echinacea purpurea* utilizing HPLC-ESI-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, **49**, 1141.
- 19 Yang Y. P., Cheng M. J., Teng C. M., Chang Y. L., Tsai I. L., Chen I. S., Chemical and anti-platelet constituents from Formosan *Zanthoxylum simulans*, *Phytochem.* 2002, **61**, 567.
- 26 Xiong Q., Shi D., Hirofumi Y., Mizuo M., Alkylamides from pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*, *Phytochem.* 1997, **46**, 1123.

Pour plus de commodité, la figure 8 et le tableau 1 illustrent les fragments primaires obtenus dans l'étude MS/MS. On peut identifier plusieurs types de fragments, qui sont cohérents avec ceux observés antérieurement pour des alkylamides<sup>51</sup>. Avec toutes ces données nous pouvons confirmer la présence de l'acide isobutylamide dodéca-2,6,8,10-tétraénoïque, également connu sous le nom de sanshool (35). Dans ces conditions, il n'est pas possible de distinguer les isomères *E/Z* avec la méthode LC-MS utilisée ici.



-**Figure 8**- Les spectres de MS/MS de l'ion 248 M identifient le composé comme étant le sanshool (35), l'acide isobutylamide dodéca-2,6,8,10-tétraénoïque bien que la stéréochimie ne puisse être identifiée. La structure représentée est celle de la forme protonée  $[M+H]^+$ .

-**Table 1**- Fragments formés par induction par « Collisionally Induced Dissociation » (MS-MS) de l'ion  $[M+H]^+$  des alkylamides de divers *Z. chiloperone*

Désignation, nom, <i>m/z</i>	groupe <i>i</i> <sup>4</sup>	groupe <i>ii</i> <sup>5</sup>	groupe <i>iii</i> <sup>6</sup>	groupe <i>iv</i> <sup>7</sup>	groupe <i>v</i> <sup>8</sup>	groupe <i>vi</i> <sup>9</sup>
	IR <sup>3</sup> 37 %	IR 64 %	IR 100 %	IR 9 %	IR 19-29 %	IR 5-14 %
248 <sup>1</sup> acide isobutylamide dodéca-2,6,8,10-tétraénoïque (35) <sup>2</sup>	175	147	149	206	220, 234	81, 93, 121, 133

1. Le nombre sous la valeur de *m/z* pour l'ion  $[M+H]^+$
2. Structure proposée pour le composé 35 basée sur le temps de rétention et la fragmentation MS/MS.
3. IR correspond à l'intensité relative.
4. Les fragments du groupe *i* correspondent à l'ion acylium comme on peut le voir sur la Fig. 8.
5. Les fragments du groupe *ii* sont des carbocations, qui correspondent à la chaîne alkyle de l'alkylamide, qui sont formés de la perte de la portion amide (isobutylamide ou 2-méthylbutylamide).
6. Les fragments du groupe *iii* correspondent à la chaîne alkyle de l'alkylamide et sont formés de la perte de la portion amide de la molécule et saturation d'une des doubles liaisons de la chaîne alkyle. La valeur de *m/z* de ces fragments de +2 par rapport au groupe *ii* de fragments.
7. Les fragments du groupe *iv* correspondent à l'alkylamide protonné moins le groupement *N*-alkyle.
8. Les fragments du groupe *v* correspondent à l'alkylamide protonné moins plusieurs portions du groupement *N*-alkyle.
9. Les fragments du groupe *vi* correspondent à des carbocations des divers fragments formés après la perte de plusieurs portions du groupement *C*-alkyle.

## Biosynthèse des alkylamides

Les alkylamides (aussi appelés alkamides) sont un mélange complexe d'amides primaires d'acides gras insaturés avec l'isobutylamide. Les fragments acides prédominants sont normalement en C<sub>11</sub> et C<sub>12</sub> diène-diyne ou tétraènes (**36** et **37**). L'origine des alkylamides vient d'une variante du métabolisme des acides gras.

### C– Élaboration du profil phytochimique de la plante par HPLC-UV-MS des extraits éthanoliques et dichlorométhaniques d'écorces, racines, fruits et feuilles de *Zanthoxylum chiloperone* pour le développement d'un traitement de la maladie de Chagas

#### 1– Intérêt du profil phytochimique

Les médicaments traditionnels à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international. La reconnaissance de leur valeur clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement

**Tétraène alkamide (36) :** selon les pays. Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. Malgré l'utilisation de médicaments à base de plantes pendant de nombreux siècles, seul un nombre relativement petit d'espèces de plantes ont



**Diène-diyne alkamide (37) :**



été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent. Avec l'objectif d'augmenter ce nombre de plantes, il est nécessaire de pouvoir contrôler et analyser la composition en principes actifs qu'elles contiennent. Pour cela, il serait judicieux et important d'établir un profil phytochimique de la plante. Cette « empreinte » devra permettre d'identifier et de quantifier les différents principes actifs présents dans toutes les parties de la plante. L'élaboration de ce profil nous aidera à étudier

les variations de la composition chimique selon l'époque de la collecte, le lieu de récolte de la plante<sup>52</sup>.

## 2– Avantages du travail avec des organes « renouvelables » de la plante : fruits, feuilles, résine

Les informations obtenues par le profilage phytochimique des plantes nous permettra d'évaluer l'utilisation de différentes parties des plantes en médecine traditionnelle. L'importance de travailler avec des organes « renouvelables » comme les feuilles, les fruits, les graines ou encore la résine est évidente. La récolte de ces parties n'affectera pas la survie des arbres et permettra d'obtenir de la matière première en permanence sans affecter la ressource naturelle d'une espèce dont nous ne connaissons pas le mode de propagation et de multiplication. Aujourd'hui nous collaborons à un projet de culture avec l'Université d'Asunción (Paraguay) (Figure 9).

## 3– Élaboration d'un profil phytochimique des différentes organes de la plante *Z. chiloperone* : fruits, écorce, rhizomes, feuilles et résine

L'écorce, les feuilles, les racines, les fruits et la résine de *Zanthoxylum chiloperone* ont été séchés, broyés et traités avec une solution alcaline d'ammoniaque, puis extraits avec l'éthanol ou le dichlorométhane selon la méthode décrite dans la partie expérimentale.



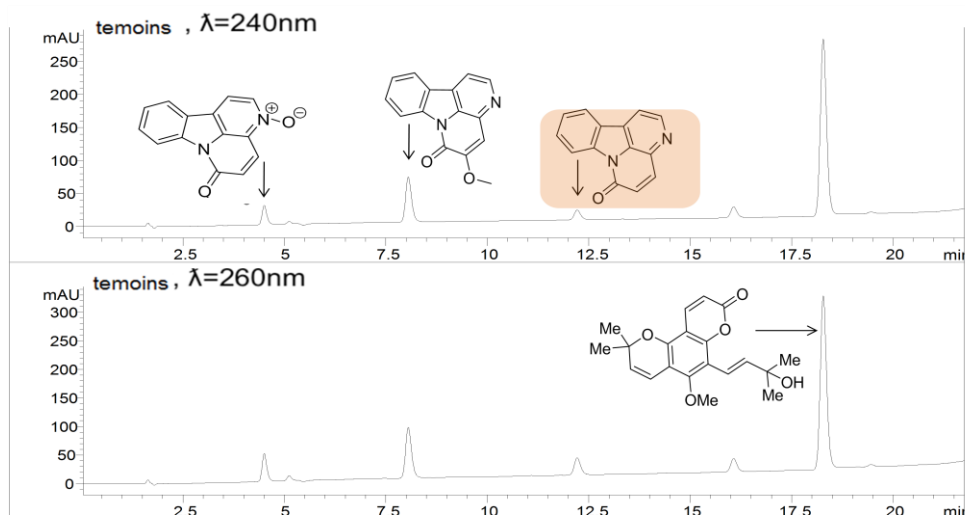
-Figure 9- Culture à Itaipu (Paraguay).

### a– Étude qualitative :

#### identification

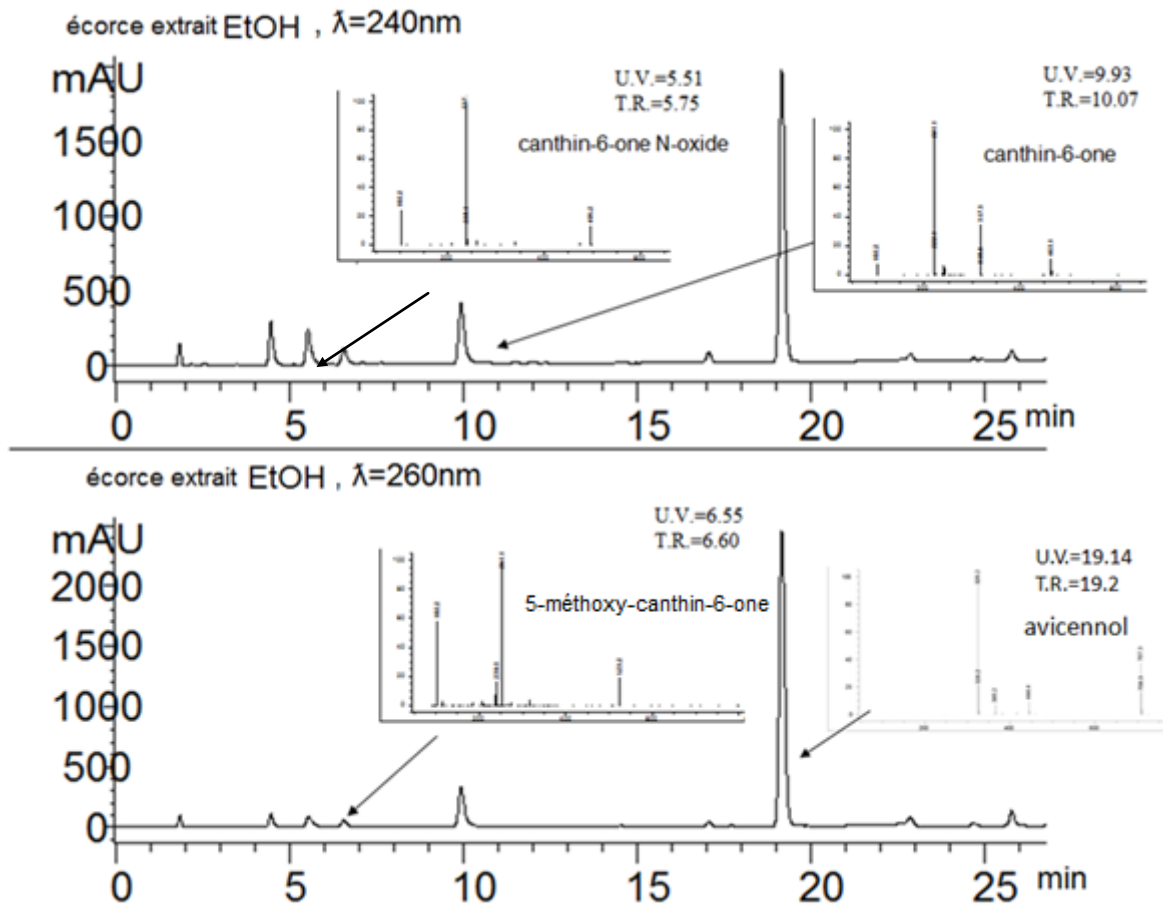
L'évaluation qualitative et quantitative du contenu des organes est réalisée par la méthode HPLC-UV-MS en identifiant les trois canthinones isolées (**1**, **8** et **9**) et une des coumarines isolées, le *trans*-avicennol (**11**) dans les extraits des différentes parties de *Zanthoxylum chiloperone* (Figure 10).

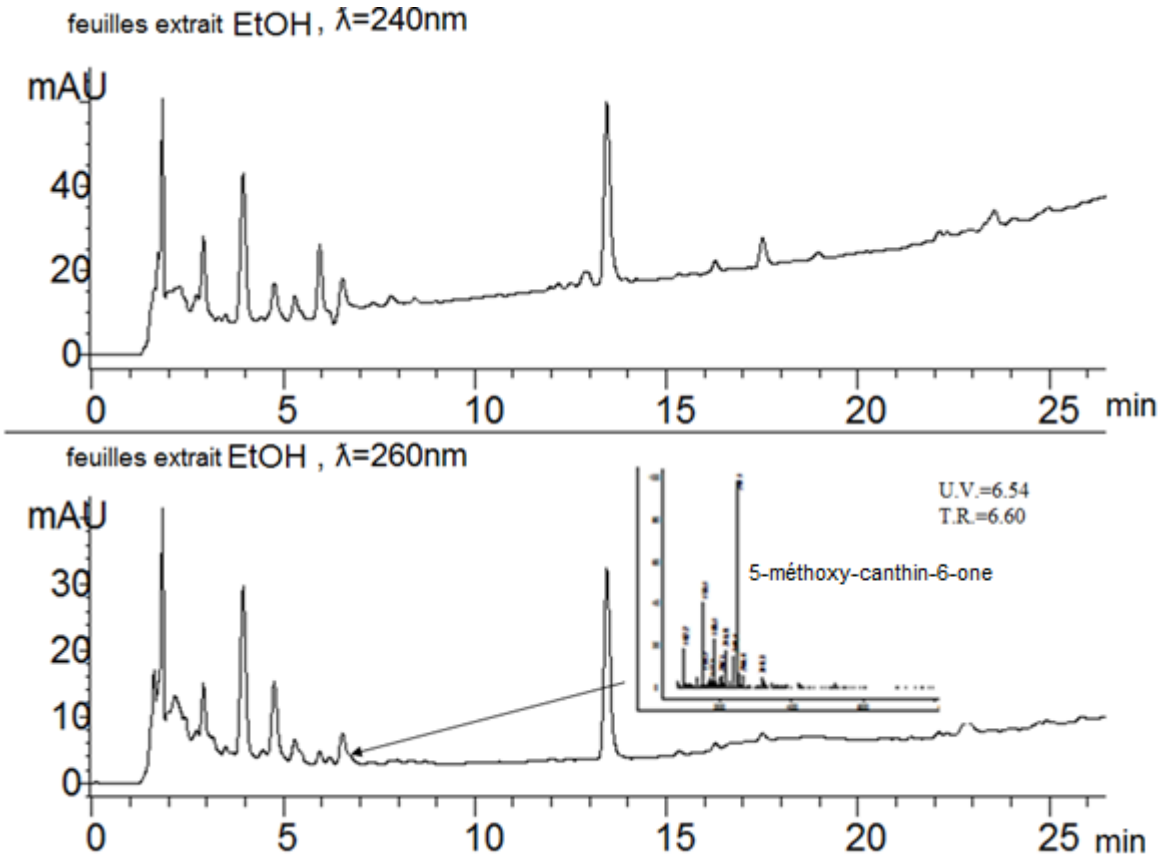




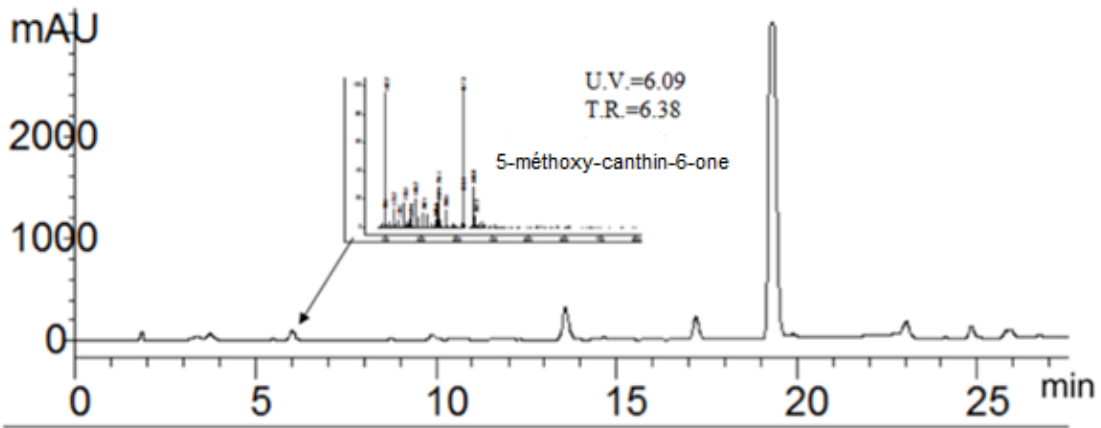
-Figure 10- Chromatogrammes des molécules témoins

Pour réaliser cette étude par méthode HPLC, on utilise un spectromètre LC / MSD série 1100 + 1100 séries (Agilent Technologies) avec une colonne d'acier inoxydable Sunfire (WATERS) C<sub>18</sub> de 150 mm x 4,6 mm. Les solvants d'élution sont (A) H<sub>2</sub>O + TFA à 0,1 % et (B) MeOH + 0,1 % de TFA. Les séparations ont été réalisées à température ambiante par un gradient d'élution solvant A 50 %/B 50 %, B 80 %/A 20 % en 20 min, puis à 100 % B en 12 min à un flux de 1 mL/min. Le volume d'injection était de 5 µL. L'identification des pics a été réalisée par comparaison des temps de rétention (T.R.), l'absorption UV à différentes longueurs d'onde (240 nm et 260 nm) et l'étude de spectrométrie de masse avec les composés *trans*-avicennol (11) canthin-6-one (1), 5-méthoxy-canthin-6-one (8) et *N*-oxyde de canthin-6-one (9) comme référence (Figure 10 et 11). Les profils chromatographiques des composés employés en référence sont présentés dans la figure 10 et les profils des différents extraits sont présentés dans la figure 11.

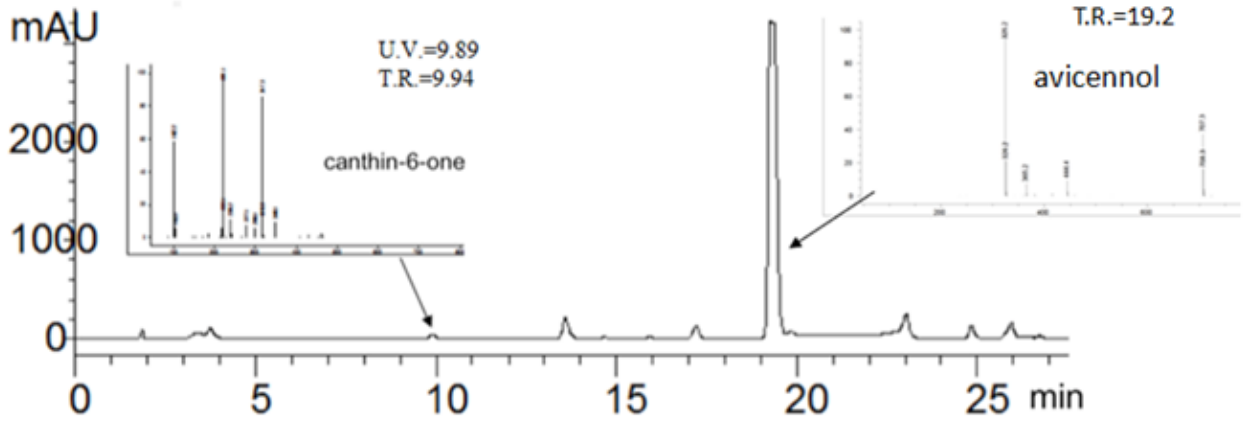


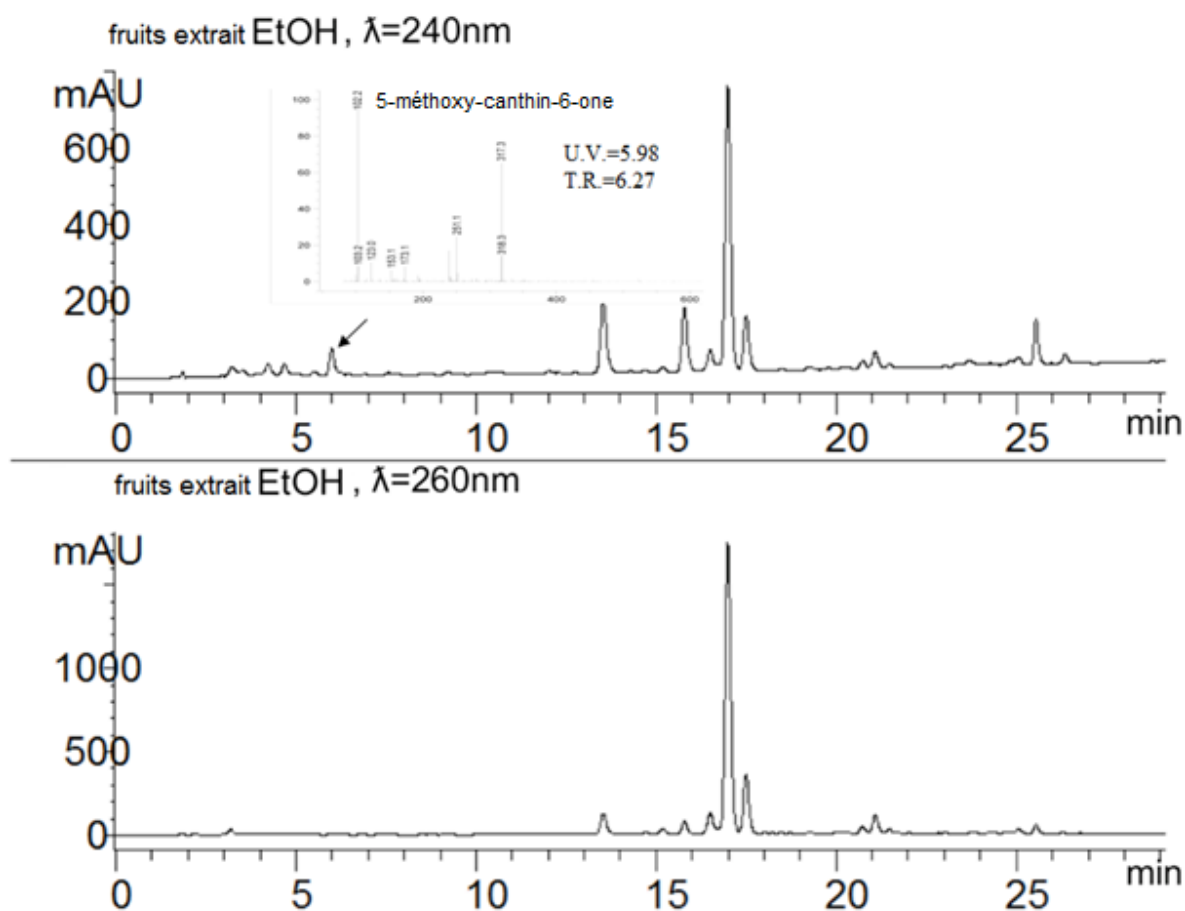


rizhome extrait EtOH,  $\lambda=240\text{nm}$



rizhome extrait EtOH,  $\lambda=260\text{nm}$





-Figure 11- Identification des canthinones par ses chromatogrammes d'HPLC-UV des extraits de l'écorce du tronc, feuilles, racines et fruits de la plante *Z. chiloperone*.

## b- Étude quantitative : dosage

L'analyse quantitative a été effectuée par une méthode consistant à comparer les profils avec un témoin externe, en utilisant une courbe d'étalonnage construite à partir de solutions contenant différentes concentrations des échantillons de référence (**1**, **8**, **9** et **11**). Les solutions mères ont été préparées dans un mélange de méthanol et DMSO, puis diluées avec la phase mobile dans des proportions différentes\*. Les courbes d'étalonnage des différents échantillons représentent la concentration « **C** » de chaque molécule de référence par rapport à la surface du pic « **S** », ce graphique présente un comportement linéaire ( $C = a + bS$ ) dans la gamme de concentrations de 0,01 à 0,3 mg/mL (Tableau 2). Le coefficient  $R^2$  est linéaire avec une valeur de 0,999.

Des solutions des composés de référence avec concentrations de l'ordre de 10, 50, 100, 150, 200, 300  $\mu\text{g/mL}$  ont été utilisées. Chaque détermination a été réalisée en trois exemplaires ( $N = 3$ ).

\* Tous les échantillons pour l'analyse HPLC ont été utilisés directement sans purification préalable. Un système modulaire composé d'un contrôleur 600 E, d'une pompe et d'un détecteur PDA 2996 UV (Waters) a été utilisé dans l'expérience de quantification HPLC UV.

L'évaluation quantitative des pics précédemment identifiés dans les extraits bruts a été faite par l'intégration de la surface du pic et la comparaison avec la zone du pic de référence correspondant (Tableau 2).

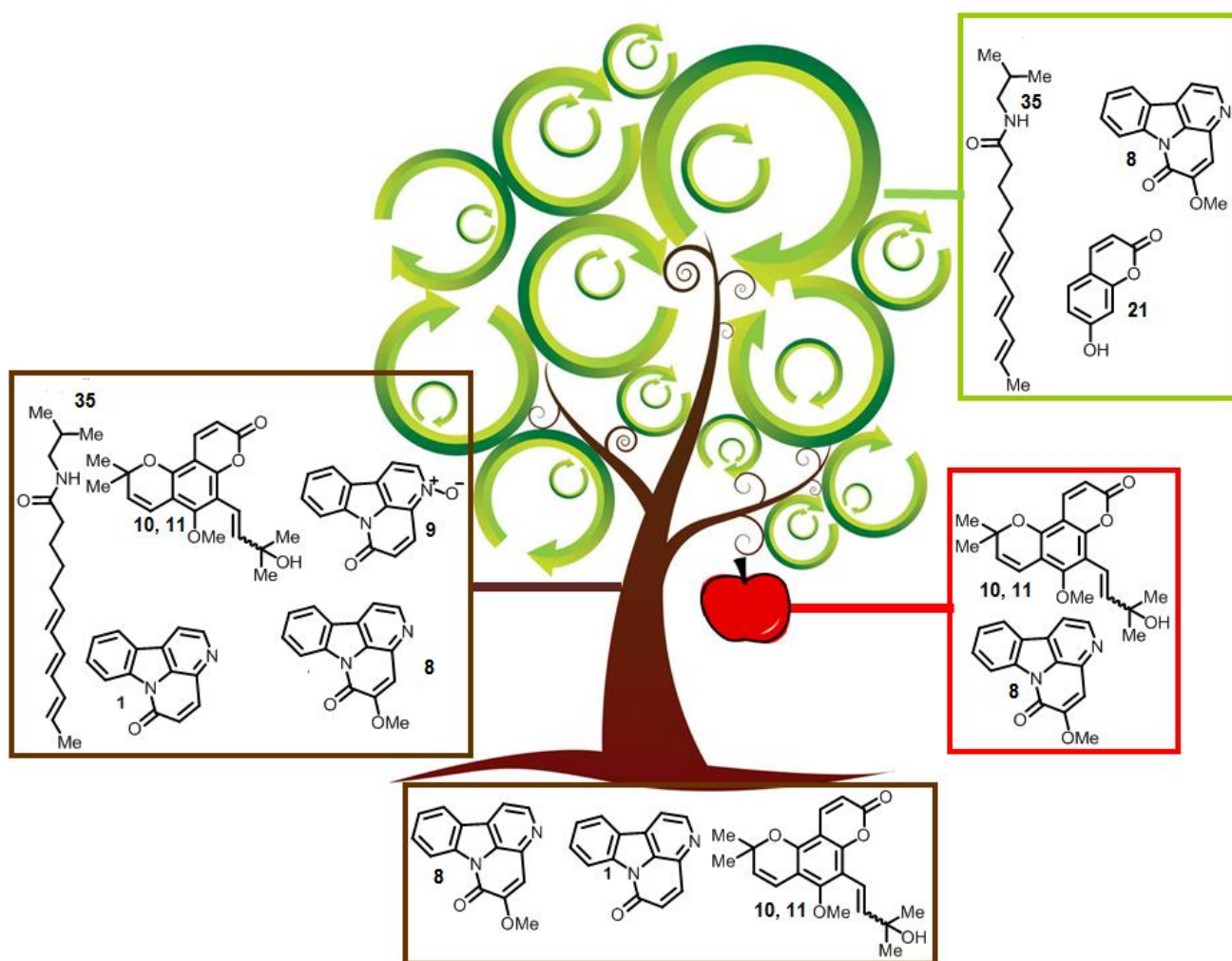
-Tableau 2- Concentrations des composés dans des extraits préparés avec les différents organes de *Z. chiloperone*.

Concentration (mg/g extrait)		canthin-6-one (1)	5-méthoxy- canthin-6-one (8)	N-oxyde de canthin-6-one (9)	trans- avicennol (11)
Echantillon / partie de la plante	écorce (dichlorométhane)	64,7	29,4	ND	63,2
	écorce (éthanol)	85,6	19,1	8,2	85,6
	feuilles (dichlorométhane)	ND	10,8	ND	ND
	feuilles (éthanol)	ND	5,0	ND	ND
	fruits (éthanol)	ND	3,5	ND	1,2
	rhizome (éthanol)	8,2	2,5	ND	51,79
	résine (éthanol)	0,6	5	1,9	3,8

ND= non détecté

Comme conclusion à l'étude du tableau 2, nous avons quantifié la concentration des différents composés présents dans les extraits, la canthin-6-one (1) a été identifiée comme

principal composé de l'écorce du tronc (85,6 mg/g) et est présente à une concentration remarquable dans l'écorce des racines (8,2 mg/g). Elle est finalement aussi détectée dans la résine (0,6 mg/g), tandis que la 5-méthoxy-canthin-6-one (**8**) est présente dans l'écorce (29,4 mg/g), est l'unique composé trouvé dans les feuilles (10,8 mg/g), et est détectée dans l'écorce des racines, les fruits et la résine (2,5- 5 mg/g). Le *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**) est minoritaire dans la résine et l'écorce du tronc (1,9 et 8,2 mg/g respectivement). Enfin le *trans*-avicennol (**11**) est trouvé comme composé majoritaire des rhizomes (presque 50 % de la masse de l'extrait) et avec une concentration assez importante comparable à la concentration de canthin-6-one (**1**) dans l'écorce (85,6 mg/ g). L'avicennol (**11**) est aussi détecté dans les fruits et la résine (1,2 et 3,8 mg/g respectivement). Ces résultats sont illustrés dans la figure 12 (voir tableau 2).



-Figure 12-Distribution des composés isolés de *Z. chiloperone*.

### c– Profil phytochimique annuel des feuilles

Notre dernière étude va être focalisée sur l'étude saisonnière des feuilles. Pour développer cette étude nous avons besoin de l'aide de nos collaborateurs de l'UNA qui gentiment, ont

récolté chaque mois pendant une année un lot de feuilles (12 lots) du même arbre et ont réalisé un extrait éthanolique (par macération). Avec les douze échantillons qu'ils nous ont envoyés, nous avons caractérisé leur composition en 5-méthoxycanthin-6-one (**8**), et avons observé que sa concentration était plus grande pendant l'été européen (ce qui correspond à l'hiver au Paraguay). Nos collègues de l'UNA ont eu accès à des données climatiques relatives\* à l'humidité, aux précipitations, aux températures enregistrées par la station météorologique de Caacupe (Paraguay) (voir tableau 3).

-Tableau 3- Étude saisonnière des concentrations de **8** dans les feuilles de *Z. chiloperone*.

<u>2010</u>	Concentration (mg/g)	T moyenne* (° C)	T max * (° C)	T min* (° C)	Précipitation (mm)	Humidité relative (%)
janvier	0,487	27,1	32,4	21,9	78,5	59,6
février	0,446	27,5	32,6	22,4	102	60,4
mars	1,233	26,1	30,8	21,5	150	60,5
avril	1,207	22,4	27,3	17,5	59	60,4
mai	3,608	17,4	21,6	13,2	232,6	71,1
juin	3,705	18,3	22,7	14	15,5	68,5
juillet	3,428	15,6	19,7	11,4	174	64,6
août	3,805	17,7	23,1	12,3	3	56,6
septembre	5,790	20,3	25,1	15,4	94	60,7
octobre	2,239	20,9	26,1	15,7	250,5	56,9
novembre	0,481	22,9	28,3	17,6	78,3	47,3
décembre	0,878	26,5	31,7	21,2	210	63

L'analyse statistique de ces données a été effectuée en appliquant des tests de corrélation de Pearson, cette analyse nous permet d'établir une corrélation significative ( $p = 0,01$ ) entre la concentration de 5-méthoxycanthin-6-one (**8**) de l'extrait et les températures relevées (Tmax, Tmin et Tmoy).

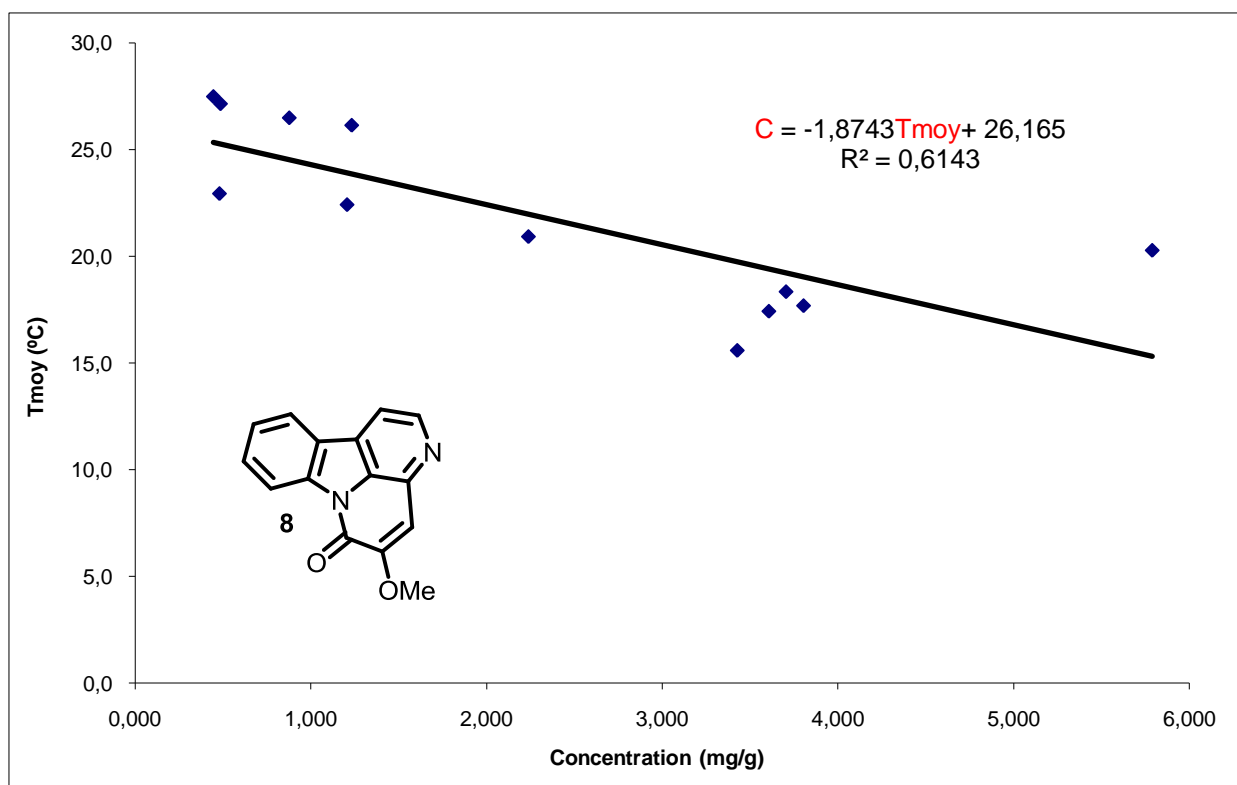
Nous allons continuer notre exposé en prenant en compte seulement la température moyenne, en la considérant plus représentative que les autres. La courbe qui suit représente la concentration « **C** » de 5-méthoxycanthin-6-one (**50**) par rapport à la température moyenne « **Tmoy** », ce graphique montre un comportement linéaire ( $C = a + bTmoy$ ) dans la gamme de concentrations de 0,4 à 5,7 mg/g (Tableau 3). Le  $R^2$  est linéaire avec une valeur de 0,613 ( $p = 0,01$ ) (voir Figure 13).

\* Données climatiques relatives à l'année 2010.

Signification :

T moyenne (Tmoy) : température moyenne ; Tmax : température maximale ; Tmin : température minimale.

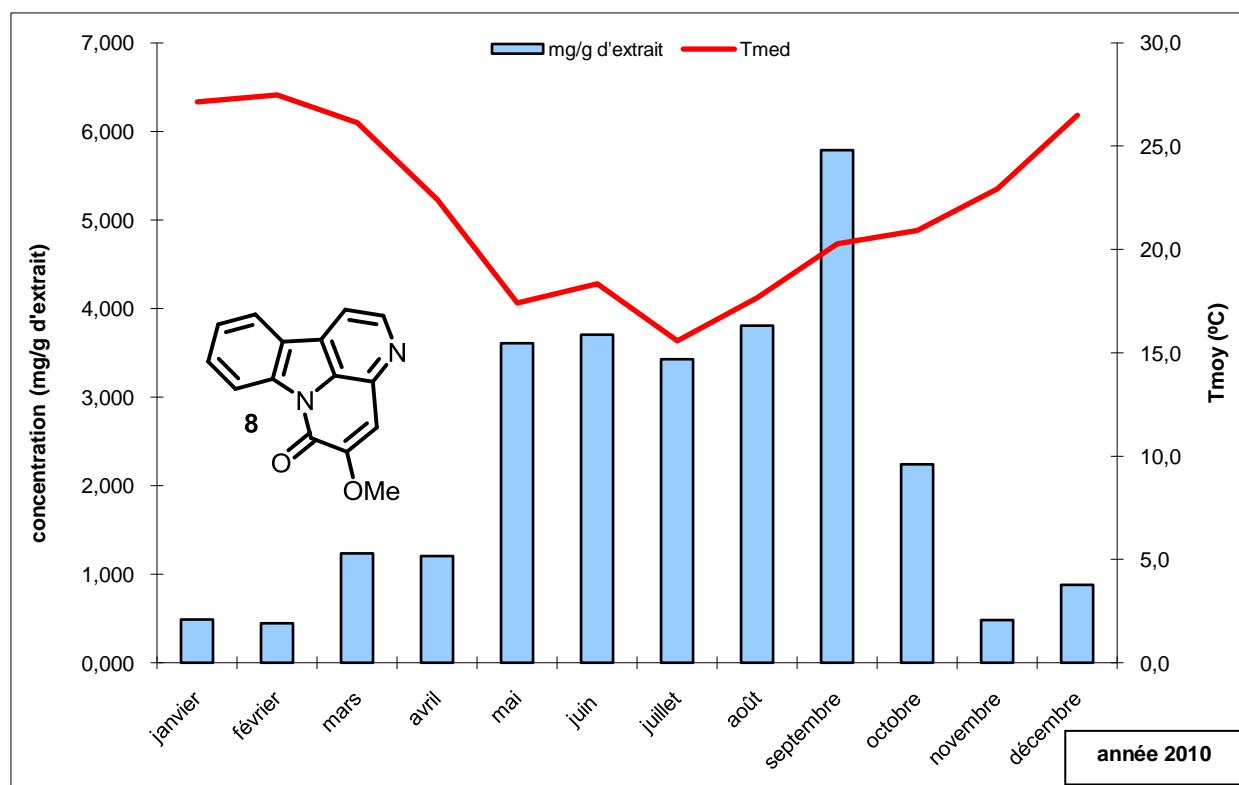




-**Figure 13**- Représentation de la corrélation entre la concentration « **C** » de 5-méthoxycanthin-6-one (**8**) (mg/g d'extrait) et la température moyenne « **Tmoy** » en 2010.

Avec l'information obtenue avec l'étude statistique nous pouvons confirmer la corrélation significative ( $p = 0,01$ ) existant entre la concentration et la température ( $C = -1,8743T_{moy} + 26,165$ ). La courbe représentée à la figure 13 présente une pente négative ( $-1,8743$ ).

Pour mieux comprendre toute cette étude statistique, la figure 14 illustre le rapport existant entre la concentration de composé (**C**) (mg/g d'extrait) et la température moyenne (**Tmoy**), en superposant les graphiques de variation mensuelle de concentration du composé **8** et la température moyenne (voir figure 14).



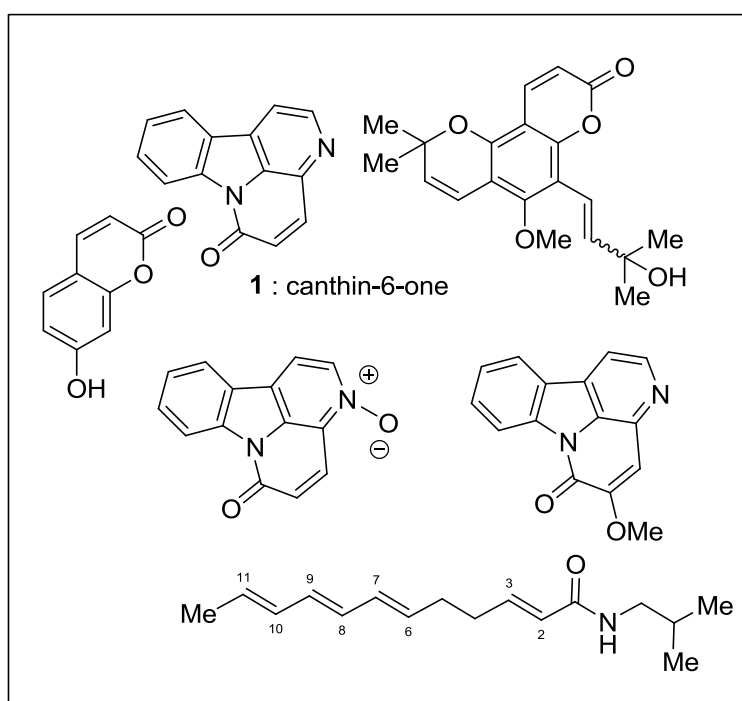
-Figure 14-Superposition des graphiques de variation mensuelle de concentration des composés et température.

Pour conclure cette partie, nous pouvons dire qu'en 2010, la période la plus propice pour la récolte de feuilles était le mois de septembre avec une teneur maximale en 5-méthoxycanthin-6-one (8).

Cependant, plusieurs enquêtes mensuelles de ce type devaient être menées sur plusieurs années pour valider ce résultat intéressant

## -Conclusion de chapitre 2-

- Pour la première fois, les extraits bruts des différents organes de *Zanthoxylum chiloperone* ont été caractérisés de façon qualitative et quantitative avec notamment une étude sur une année.
- Un alkylamide (sanshool) a été identifié dans l'extrait brut de l'écorce de la même plante.
- Dans ces mêmes extraits, nous avons aussi isolé les composés canthin-6-one, 5-méthoxycanthin-6-one, *N*-oxyde de canthin-6-one. Les composés *cis*-avicennol, *trans*-avicennol et umbelliférone ont été isolés de l'extrait chlorométhylénique des écorces, feuilles ou racines de *Zanthoxylum chiloperone*.



## -Bibliographie des chapitres 1 et 2-

- 1 Engler A., Die natürlichen plazenfamilien (Engelmann (Leipzig)), 1931, 19a, 187.
- 2 Spichiger R., Stutz de Ortega L., Flora de Paraguay: Rutaceae (Missouri botanical garden), 1987.
- 3 Heywood V. H., Les plantes à fleurs (Nathan (Paris)), 1996.
- 4 Engler A., Rutaceae. In : natürlichen pflanzenfamilie III (Engelmann (Leipzig)), 1896, 4, 95.
- 5 Brizicky G. K., The genera of Rutaceae in the Southeastern United States, *J. Arnold Arbor.* 1962, **43**, 80.
- 6 Fish F., Waterman P. G., Alkaloids and coumarins of *Zanthoxylum elephantiasis*, *Taxon* 1973, **22**, 177.
- 7 Hartley T. G., A revision of the Malesian species of *Zanthoxylum* (Rutaceae), *J. Arnold Arbor.* 1966, **47**, 171.
- 8 Zepernick B., Timler F. K., *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler comb. nova (Rutaceae), *Willdenowia* 1981; **11**, 361.
- 9 Chaaib F., Queiroz E. F., Ndjoko K., Diallo D., Hostettmann K., Antifungal and antioxidant compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides*, *Planta Med.* 2003, **69**, 316.
- 10 Waterman V. H., New combination in *Zanthoxylum* L., *Taxon* 1973, **24**, 361.
- 11 Chen I. S., Wu S. J., Tsai I. L., Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*, *J. Nat. Prod.* 1994, **57**, 1206.
- 12 Chen I. S., Tsai I. W., Teng C. M., Chen J. J., Chang Y. L., Ko F. N., Lu M. C., Pezzuto J. M., Pyranoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans*, *Phytochem.* 1997, **46**, 525.
- 13 de Moura N. F., Morel A. F., Dessoy E. C., Zanatta N., Burger M. M., Ahlert N., Porto G. P., Baldisserotto B., Alkaloids, amides and antispasmodic activity of *Zanthoxylum hyemale*, *Planta Med.* 2002, **68**, 534.
- 14 de Moura N. F., Ribeiro H. B., Machado E. C. S., Ethur E. M., Zanatta N., Morel A. F., Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*, *Phytochem.* 1997, **46**, 1443.
- 15 Fish F., Gray A. I., Waterman P. G., Alkaloids, coumarins, triterpenes and a flavanone from the root of *Zanthoxylum dipetalum*, *Phytochem.* 1975, **14**, 2073.
- 16 Ross S. A., Sultana G. N. N., Burandt C. L., ElSohly M. A., Marais J. P. J., Ferreira D., Syncarpamide, a new antiplasmodial (+)-norepinephrine derivative from *Zanthoxylum syncarpum*, *J. Nat. Prod.* 2003, **67**, 88.
- 17 Nguyen Q. A., Van-Dufat H. T., Michel S., Tillequin F., Dumontet V., Sévenet T., A new phenylpropanoid ester from the bark of *Zanthoxylum scandens* (Rutaceae), *Z. Naturforsch. C.*, 2002, **57**, 986.
- 18 de A Gonzaga W., Weber A. D., Giacomelli S. R., Dalcol I. I., Hoelzel S. C. S., Morel A. F., Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*, *Planta Med.* 2003, **69**, 371.
- 19 Yang Y. P., Cheng M. J., Teng C. M., Chang Y. L., Tsai I. L., Chen I. S., Chemical and anti-platelet constituents from Formosan *Zanthoxylum simulans*, *Phytochem.* 2002, **61**, 567.
- 20 Diehl E. E., Lino von Poser G., Teresinha Henriques A., Constituents of *Zanthoxylum rugosum* St.-Hil & Tul, *Biochem. Syst. Ecol.* 2000, **28**, 275.
- 21 Mai H. D., Van-Dufat H. T., Michel S., Tillequin F., Bastien D., Sévenet T. Z., Constituents of *Zanthoxylum rugosum* St.-Hil & Tul, *Z. Naturforsch. C* 2001, **56**, 492.
- 22 He W., Puyvelde L. V., Kimpe N. D., Verbruggen L., Anthonissen K., Flaas M. V. d., Bosselaers J., Mathenge S. G., Mudida F. P., Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum usambarensis*, *Phytother. Res.* 2002, **16**, 66.
- 23 Chang C. T., Doong S. L., Tsai I. L., Chen I. S., Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*, *Phytochem.* 1997, **45**, 1419.
- 24 Gray A. I., Waigh R. D., Waterman P. G., Avicennol: a new pyranocoumarin from the root bark of *Zanthoxylum avicennae*, and its conversion into avicennin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1975, **197**, 488.
- 25 Abe F., Yahara S., Kubo K., Nonaka G., Okabe H., Nishioka I., Studies on *Xanthoxylum* spp. II. Constituents of the bark of *Xanthoxylum piperitum* DC., *Chem. Pharm. Bull.* 1974, **22**, 2650.
- 26 Xiong Q., Shi D., Hirofumi Y., Mizuo M., Alkylamides from pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*, *Phytochem.* 1997, **46**, 1123.
- 27 Fang S. D., Wang L. K., Hecht S. M., Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*, *J. Org. Chem.* 1993, **58**, 5025.
- 28 Talapatra S. K., Dutta S., Talapatra B. Alkaloids and terpenoids of *Zanthoxylum ovalifolium*, *Phytochem.* 1973, **12**, 729.
- 29 Corie E. T., Green G. H., Ritchie E., Taylor W. C., The chemical constituents of Australian *Zanthoxylum* species. V. The constituents of *Z. pluviatile* Hartley; the structures of two new lignans, *Aust. J. Chem.* 1970, **23**, 133.
- 30 Ohmoto T., Koike K., Arnold B., *In the alkaloids: Chemistry and pharmacology* (Academic Press), 1990, **36**, 135.
- 31 Jiao W.-H., Gao H., Zhao F., Lin H.-W., Pan Y.-M., Zhou G.-X., Yao X.-S., Anti-inflammatory alkaloids from the stems of *Picrasma quassioides* Bennet, *Chem. Pharm. Bull.* 2011, **59**, 359.
- 32 Jiang M.-Y., Feng T., Liu J.-K., N-Containing compounds of macromycetes, *Nat. Prod. Rep.*, **28**, 783.
- 33 Tabanez M. F., Durigan G., Keuroghlian A., Barbosa A. F., de Freitas C. A., da Silva C. E. F., da Silva D. A., Eaton D. P., Brisolla G., de Faria H. H., Mattos I. F. d., Lobo M.T., Barbosa M. R., Rossi M., M. d. G. d. S, Machado R. B., Pfeifer R. M., Ramos V. S., Andrade W. J. D., Contieri W. A., Plano de manejo da estação ecológica dos caetetus (In Florestal I (São Paulo)), 2005.
- 34 Ferreira M. E., Nakayama H., de Arias A. R., Schinini A., de Bilbao N. V., Serna E., Lagoutte D., Soriano-Agaton F., Poupon E., Hocquemiller R., Fournet A., Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice, *J. Ethnopharmacol.* 2007, **109**, 258.
- 35 Ferreira M. E., Rojas de Arias A., Torres de Ortiz S., Inchausti A., Nakayama H., Thouvenel C., Hocquemiller R., Fournet A., Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, *J. Ethnopharmacol.* 2002, **80**, 199.
- 36 Milliken W., Malaria and antimalarial plants in Roraima, Brazil, *Trop. Doc.* 1997, **27**, 20.
- 37 Thouvenel C., Gantier J. C., Duret P., Fourneau C., Hocquemiller R., Ferreira M. E., de Arias A. R., Fournet A., Antifungal compounds from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, *Phytother. Res.* 2003, **17**, 678.
- 38 Soriano-Agaton F., Lagoutte D., Poupon E., Roblot F., Fournet A., Gantier J. C., Hocquemiller R., Extraction, hemisynthesis and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities, *J. Nat. Prod.* 2005, **68**, 1581.
- 39 Haynes H. F. N., E. R., Price J. R., Alkaloids of the Australian Rutaceae: *Pentaceras australis* Hook. F. I. Isolation of the alkaloids and identification of canthin-6-one, *Aust. J. Chem.* 1952, **5**, 387.

- 40 Crespi-Perellino N., Guicciardi A., Malyszko G., Minghetti A., Biosynthetic relationship between indole alkaloids produced by cell cultures of *Ailanthus altissima*, *J. Nat. Prod.* 1986, **49**, 814.
- 41 Aragozzini F., Maconi E., Gualandris R., Evidence for involvement of ketoglutarate in the biosynthesis of canthin-6-one from cell cultures of *Ailanthus altissima*, *Plant Cell Rep.* 1988, **7**, 213.
- 42 Anderson L. A., Hay C. A., Roberts M. F., Phillipson J. D., Studies on *Ailanthus altissima* cell suspension cultures, *Plant Cell Rep.* 1986, **5**, 387.
- 43 Balandina A., Kalinin A., Mamedov V., Figadère B., Latypov S., Structure–NMR chemical shift relationships for novel functionalized derivatives of quinoxalines, *Magn. Reson. Chem.* 2005, **43**, 816.
- 44 Murray R. D. H., Forbes I.T., . Synthesis of the coumarins, avicennol, dipetaline and dipetalolactone, *Tetrahedron Lett.* 1976, **17**, 953.
- 45 Fish F., Gray A. I., Waterman P. G., Alkaloids and coumarins of *Zanthoxylum elephantiasis*, *J. Pharm. Pharmacol.* 1976, **28**, 69.
- 46 Sarker S. D., Gray A. I., Waterman P. G., Armstrong J. A., . Coumarins from two *Asterolasia* Species, *J. Nat. Prod.* 1994, **57**, 324
- 47 Rashid M. A., Armstrong J. A., Gray A. I., Waterman P. G., Pyranocoumarins as chemotaxonomic markers in *Eriostemon coccineus* and *Philothea citrine*, *Phytochem.* 1991, **30**, 4033.
- 48 Sarker S. D., Armstrong J. A., Gray A. I., Waterman P. G., Pyranocoumarins from *Eriostemon apiculatus*, *Biochem. Syst. Ecol.* 1994, **22**, 641.
- 49 Sarker S. D., Armstrong J. A., Waterman P. G., Angular pyranocoumarines from *Eriostemon thryptomenoides* (Rutaceae), *Biochem. Syst. Ecol.* 1994, **22**, 863.
- 50 Sultana N., Sarker S. D., Armstrong J. A., Wilson P. G., Waterman P. G., The coumarins of *Philothea sensu lato* : distribution and systematic significance, *Biochem. Syst. Ecol.* 2003, **31**, 681.
- 51 Spelman K., Wetschler M. H., Cech N. B., Comparison of alkylamide yield in ethanolic extracts prepared from fresh versus dry *Echinacea purpurea* utilizing HPLC-ESI-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, **49**, 1141.
- 52 WHO: Regulatory Situation of Herbal Medicines - A worldwide review, 1998 (<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip57e/>).

# Chapitre 3

## Chimie des canthinones



## -CHAPITRE 3-

### Chimie des canthinones

#### I– Généralités

##### Le squelette canthinone

Les alcaloïdes de type canthin-6-one peuvent être considérés comme une sous-classe des composés de type  $\beta$ -carboline possédant un **noyau-D additionnel**.

Les  $\beta$ -carboline sont des composés résultant de la fusion des systèmes benzène-pyrole-pyridine, qui représentent une très vaste famille d'alcaloïdes se différenciant par l'état d'hydrogénation du noyau pyridinique en  $\beta$ -carboline, 1,2-dihydro- $\beta$ -carboline (**38**) et 1,2,3,4-tétrahydro- $\beta$ -carboline (**39**) (Figure 1).

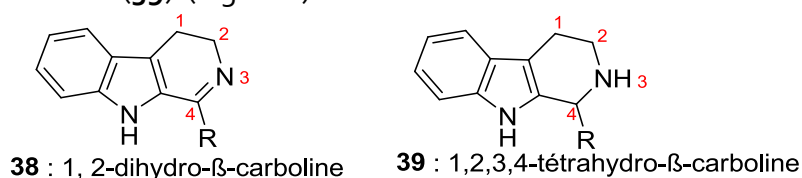
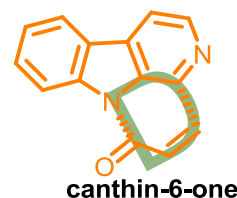


Figure 1- Différents types de  $\beta$ -carboline.

Dans ce chapitre, nous souhaitons donner réponse à deux questions :

- 🌀 Comment pouvons-nous obtenir par **synthèse chimique** ces alcaloïdes ?
- 🌀 Est-il possible de **corrélér** une voie de **synthèse chimique** avec la **biosynthèse** ?

Comment pouvons-nous obtenir des canthinones par synthèse chimique ?

#### II– Synthèse totale du squelette canthin-6-one

Les principales stratégies reposent sur deux grandes réactions de la chimie organique :

- 🌀 La réaction de Bischler-Napieralski.
- 🌀 La réaction de Pictet-Spengler.

Dû à ses nombreux avantages, la réaction de Pictet-Spengler a été la plus communément utilisée pour synthétiser des composés 1,2,3,4-tétrahydro- $\beta$ -carboline<sup>1</sup>. Cependant si on utilise cette réaction dans le but d'obtenir des composés  $\beta$ -carboliniques complètement

<sup>1</sup> Stöckigt J., Antonchick A. P., Wu F., Waldmann H., The Pictet–Spengler reaction in nature and in organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, **50**, 8538.



aromatisés, il faut trouver une méthode adéquate, avec des conditions spécifiques, car il n'existent pas de méthodes générales de déshydrogénation pour l'obtention de composés  $\beta$ -carbolines à partir de composés tétrahydro- $\beta$ -carbolines<sup>2</sup>.

Une méthode de synthèse alternative utilisée pour l'obtention des  $\beta$ -carbolines est l'utilisation de la réaction de Bischler-Napieralski à laquelle nous nous sommes intéressés de façon très particulière pour des raisons que seront détaillées par la suite.

## A– La cyclisation de Pictet-Spengler

La réaction de Pictet-Spengler, appelée aussi synthèse de tétrahydroisoquinoléines de Pictet-Spengler, consiste historiquement en la condensation d'une  $\beta$ -aryléthylamine avec un composé carbonylé en présence ou bien d'un acide protique, ou bien d'un acide de Lewis dans le but de synthétiser une tétrahydroisoquinoléine. Cette réaction provient du travail rapporté par A. Pictet et T. Spengler en 1911, où ils dévoilent la condensation de la phénylalanine et du diméthoxyméthane dans l'acide chlorhydrique concentré pour obtenir la 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine avec un rendement modéré<sup>3</sup>.

Par rapport à notre travail la variante la plus intéressante est celle dans laquelle le substrat est un indole et permet avantageusement d'obtenir des tétrahydro- $\beta$ -carbolines (45)<sup>4-7</sup> (Schéma 1).

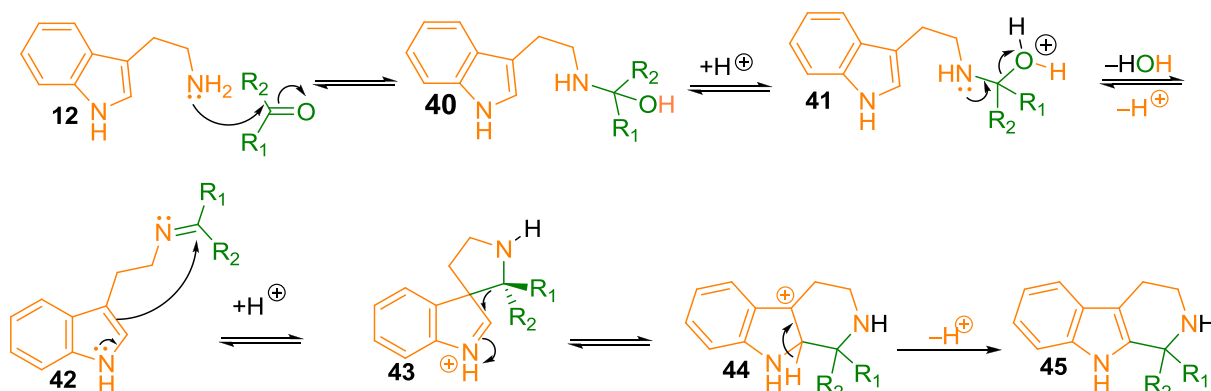


Schéma 1- Réaction de Pictet-Spengler pour la synthèse de tétrahydro- $\beta$ -carbolines (45).

- 2 Abramovitch R. A., Spenser I. D., The carbolines, *Adv. in Het. Chem.* 1964, **3**, 79.
- 3 Pictet A., Spengler, T., Formation of isoquinoline derivates by the action of methylal on phenylethylamine, phenylalanine and tyrosine, *Chem. Ber.* 1911, **44**, 2030.
- 4 Chrzanowska M., Rozwadowska M. D., Asymmetric synthesis of isoquinoline alkaloids, *Chem. Rev.* 2004, **104**, 3341.
- 5 Ungemach F., Cook J. M., The spiroindolenine intermediate, a review, *Heterocycles* 1978, **9**, 1089.
- 6 Royer J., Bonin M., Micouin L., Chiral heterocycles by iminium ion cyclization, *Chem. Rev.* 2004, **104**, 2311.
- 7 Stuart K., Woo-Ming R.,  $\beta$ -carboline alkaloids, *Heterocycles* 1975, **3**, 223.
- 8 Bischler A., Napieralski, B., A new method for the synthesis of isoquinoleines, *Chem. Ber.* 1893, **26**, 1903.

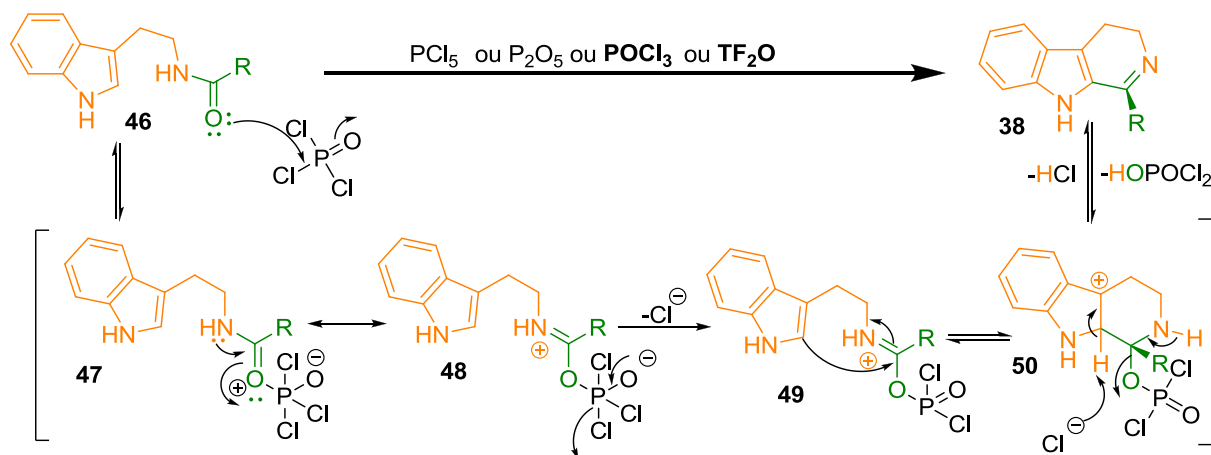
Les réactifs nécessaires pour cette réaction sont les suivants :

- ☞ Les  **$\beta$ -aryléthylamines** avec des substituant électro-donneurs pour de meilleurs résultats.
- ☞ Les **composés carbonylés** qui peuvent être des aldéhydes, des cétones, ou certains dérivés acides faibles.
- ☞ La présence d'un **acide de Lewis** ou d'un **acide Brønsted** avec l'objectif d'activer l'intermédiaire de type base de Schiff (voir intermédiaire 42 sur le schéma 2).

## B– La cyclisation de Bischler–Napieralski

La réaction de Bischler-Napieralski provient du travail rapporté par A. Bischler et B. Napieralski en 1893. Cette réaction a son origine dans l'acylation de Friedel-Crafts orientée vers la synthèse d'isoquinoléines<sup>9</sup>.

Ici encore une fois, comme dans le cas de la réaction précédente, une variante aux substrats de départ est connue avec des substrats indoliques. Dans cette variante la réaction a été adaptée avec succès pour obtenir des composés de type 3,4-dihydro- $\beta$ -carbolines (**38**) issus de la cyclo-déshydratation d'un dérivé  $N_b$ -acyltryptaminique par un réactif déshydratant tel que l'oxychlorure de phosphore ( $\text{POCl}_3$ ), le pentachlorure de phosphore ( $\text{PCl}_5$ ), l'anhydride phosphorique ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) ou encore plus récemment l'anhydride trifluorométhanesulfonique ( $\text{Tf}_2\text{O}$ ) (Schéma 2)<sup>9,10</sup>.

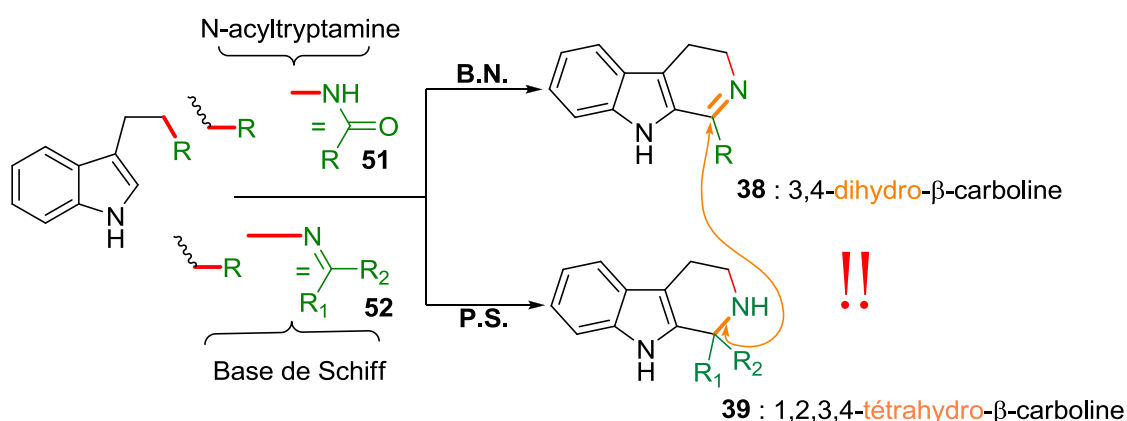


-Schéma 2- Cyclisation de Bischler-Napieralski pour la synthèse de la 3,4-dihydro- $\beta$ -carbolines (**38**).

9 Rozwadowska M. D., Recent progress in the enantioselective synthesis of isoquinoline alkaloids, *Heterocycles* 1994, **39**, 903.  
 10 Soriano-Agaton F., Lagoutte D., Poupon E., Roblot F., Fournet A., Gantier J. C., Hocquemiller R., Extraction, hemisynthesis, and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities, *J. Nat. Prod.* 2005, **68**, 1581.

## C- Étude comparée des réactions de Pictet-Spengler et Bischler-Napieralski

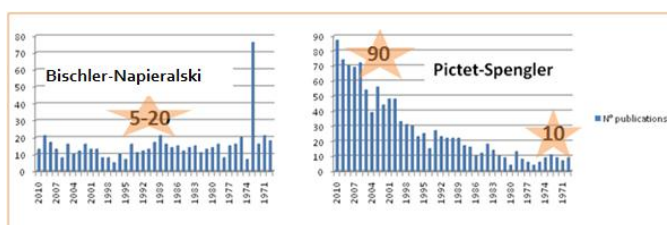
Les différences entre ces deux réactions sont multiples et résident surtout au niveau des états d'hydrogénation des intermédiaires et des produits finaux. Ces différences sont liées d'une façon directe à la structure chimique de l'intermédiaire qui les génère. Ainsi, la réaction de Pictet-Spengler permet d'obtenir des composés 1,2,3,4-tétrahydro- $\beta$ -carboline (**45**) à partir d'une base de Schiff d'un dérivé tryptaminique (**42**), tandis que la réaction de Bischler-Napieralski permet d'obtenir des composés 3,4-dihydro- $\beta$ -carboline (**38**) à partir d'un intermédiaire  $N_b$ -acyltryptaminique (**46**) (Schéma 3).



-Schéma 3-Cyclisation de Pictet-Spengler versus cyclisation de Bischler-Napieralski.

Si nous comparons le « scénario réactionnel » de façon générale, nous pouvons dire que les conditions utilisées pour la réaction de Pictet-Spengler sont beaucoup moins drastiques que celles utilisées pour la réaction de Bischler-Napieralski.

Des comparaisons peuvent être faites aussi au niveau de la **stabilité** des produits de réaction, en particulier dans le cas de la réaction de Bischler-Napieralski, les composés de type 3,4-dihydro- $\beta$ -carboline (**38**) sont généralement très instables. Néanmoins, ils présentent un avantage sur des composés de type 1,2,3,4-tétrahydro- $\beta$ -carboline (**39**), tels que les produits de la réaction de Pictet-Spengler, lorsque l'on cherche à synthétiser des  $\beta$ -carboline (comme c'est notre cas) les **rendements de synthèse des composés  $\beta$ -carboline** s'avèrent souvent plus favorables à partir des produits 3,4-dihydro- $\beta$ -carboline (**38**) qu'à partir des 1,2,3,4-tétrahydro- $\beta$ -carboline (**39**).



-Figure 2- Analyse de la bibliographie des réactions de Pictet-Spengler et Bischler-Napieralski au cours des 40 dernières années\*.

Pour finir avec les comparaisons entre ces deux réactions, nous avons trouvé également intéressant d'étudier ces deux réactions au niveau de l'évolution du nombre publications au fil du temps\* (Figure 2).

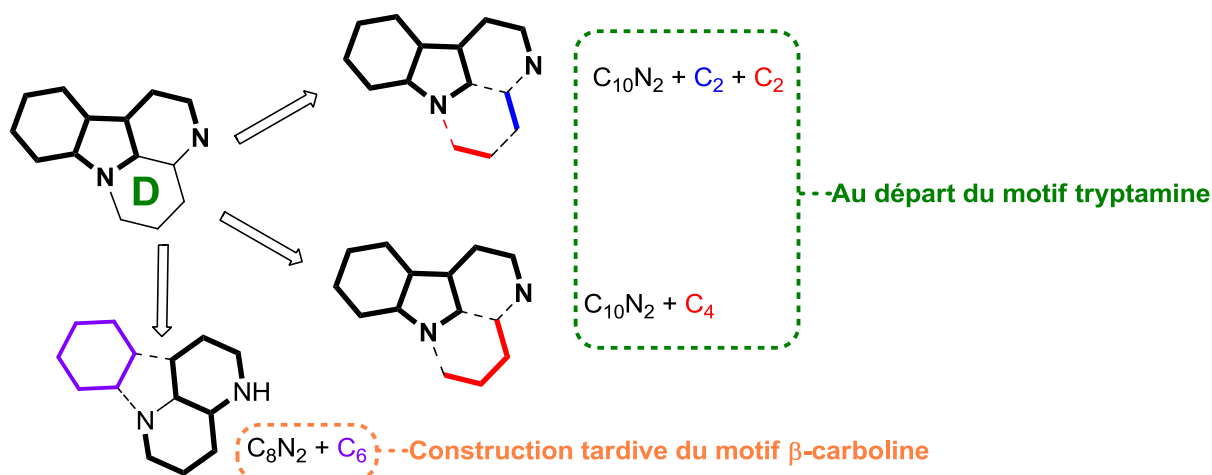
## D- Les différentes stratégies pour l'accès au squelette de la canthinone

Nous allons donner un bref aperçu sur l'état de lieu des différentes stratégies qui ont été exploitées pour l'accès au squelette de type canthinone.

Les stratégies utilisées dans la plupart des travaux font appel soit à la réaction de Pictet-Spengler soit à la réaction de Bischler-Napieralski partant, généralement, d'un dérivé du substrat naturel pour la synthèse de ces alcaloïdes, la tryptamine (**12**). Nous notons également quelques synthèses originales ayant la particularité *contre nature* de ne pas partir de dérivés de la tryptamine ou de l'indole pour accéder au squelette qui nous intéresse<sup>11</sup>.

Pour rendre plus pratique notre exposé, nous allons subdiviser les différentes approches en plusieurs groupes selon le nombre de carbones apportés par chacun des produits de départ<sup>10-27</sup>. Les stratégies utilisées dans la plupart des travaux consistent à obtenir, aussi bien avec la cyclisation de Bischler-Napieralski que celle de Pictet-Spengler, un intermédiaire issu de composés à unités  $C_{10}N_2 + C_2 + C_2$ , ou  $C_{10}N_2 + C_4$ , ou bien  $C_8N_2 + C_6$  (Schéma 4).

Selon le cas, cet intermédiaire peut être engagé dans une réaction de cyclisation inter- ou intramoléculaire pour former le noyau-D additionnel caractéristique des canthinones. La plupart de ces synthèses doivent faire face à des étapes finales d'oxydation qui, en général, sont la cause des rendements globaux faibles à très faibles<sup>28-32</sup>. Dans le schéma 4 nous schématisons ces trois approches qui seront développées pour la synthèse de la structure de base des canthinones.

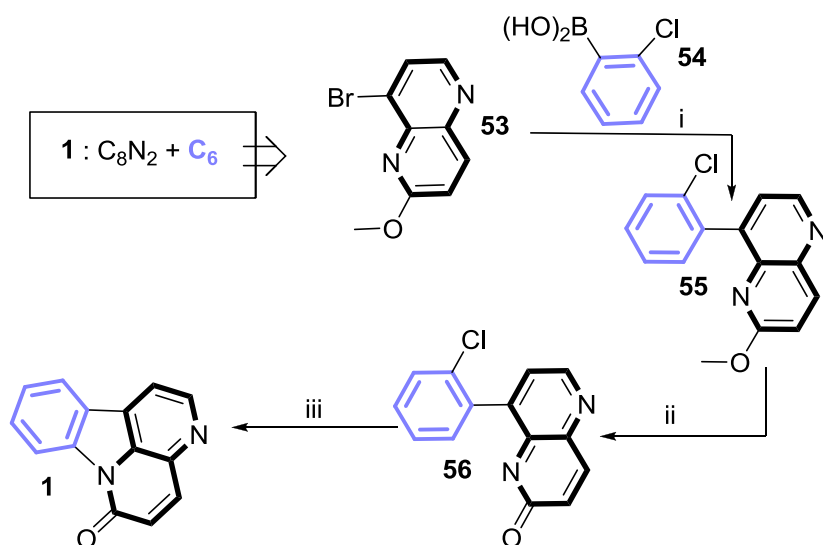


-Schéma 4- Différentes stratégies de synthèse de canthinones.

\* SciFinder Scholar™ consulté en avril 2011.

## 1- Stratégies de synthèse à partir de composés à unités $C_8N_2 + C_6$

Nous allons commencer par la synthèse publiée le plus récemment, qui a la particularité *contre nature* de ne pas partir de dérivés de la tryptamine ou de l'indole pour accéder au



squelette qui nous intéresse. Par une synthèse originale exploitant une stratégie de type  $C_8N_2 + C_6$ .

**Réactifs et conditions :** (i)  $ArB(OH)_2$ ,  $Pd(dppf)Cl_2$ ,  $K_2CO_3$ , dioxane: $H_2O$ , reflux ; (ii)  $HCl$  aq., dioxane, reflux; (iii)  $CuI$ ,  $DMEDA$ ,  $Cs_2CO_3$ ,  $H_2O$ , dioxane, reflux.

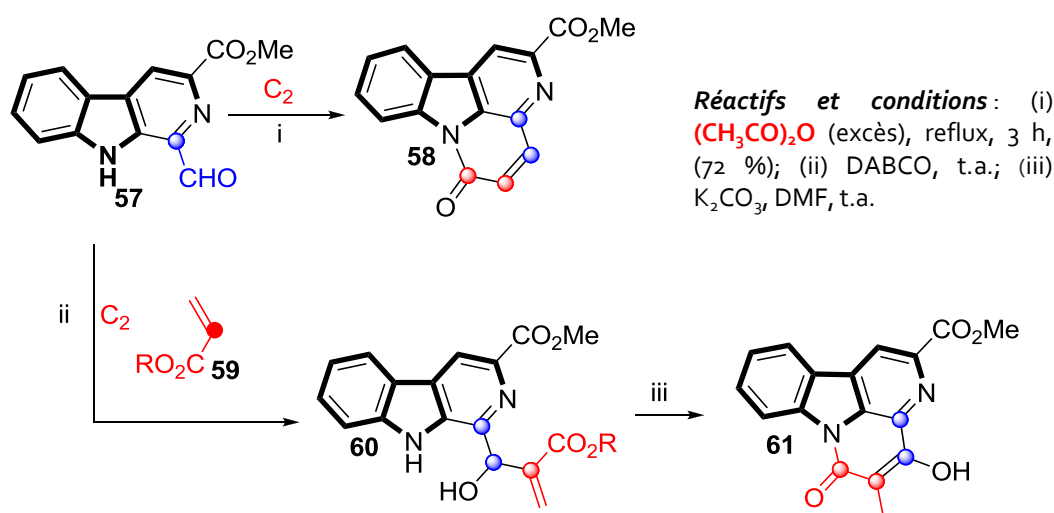
**-Schéma 5-**Synthèse de 1 à partir de composés à unités  $C_8N_2 + C_6$

- 11 Gollner A., Koutentis P. A., Two-step total syntheses of canthin-6-one alkaloids: new one-pot sequential Pd-catalyzed Suzuki-Miyaura coupling and Cu-catalyzed amidation reaction, *Org. Lett.* 2010, **12**, 1352.
- 12 Cain M., Campos O., Guzman F., Cook J. M., Selenium dioxide oxidations in the indole area. Synthesis of  $\beta$ -carboline alkaloids, *J. Am. Chem. Soc.* 1983, **105**, 907.
- 13 Condie G. C., Bergman J., Synthesis of some fused  $\beta$ -carbolines including the first example of the pyrrolo[3,2-c]- $\beta$ -carboline system, *J. Heterocycl. Chem.* 2004, **41**, 531.
- 14 Condie G.C., Bergman J., Reactivity of  $\beta$ -carbolines and cyclopenta[b]indolones prepared from the intramolecular cyclization of 5(4H)-oxazolones derived from L-tryptophan, *Eur. J. Org. Chem.* 2004, **6**, 1286.
- 15 Czerwinski K. M., Zifcsak C. A., Stevens J., Oberbeck M., Randlett C., King M., Mennen S., An improved synthesis of canthin-6-one, *Synth. Commun.* 2003, **33**, 1225.
- 16 Giudice M. R. D., Gatta F., Settini G., New tetracyclic compounds containing the  $\beta$ -carboline moiety, *J. Heterocycl. Chem.* 1990, **27**, 967.
- 17 Guzman F., Cain M., Larscheid P., Hagen T., Cook J. M., Schweri M., Skolnick P., Paul S. M., Biomimetic approach to potential benzodiazepine receptor agonists and antagonists, *J. Med. Chem.* 1984, **27**, 564.
- 18 Hagen T. J., Cook J. M., Synthesis of 1-methoxy canthine-6-one, *Tetrahedron Lett.* 1988, **29**, 2421.
- 19 Hagen T. J., Narayanan K., Names J., Cook J. M., DDO oxidations in the indole area. Synthesis of 4-alkoxy- $\beta$ -carbolines including the natural products crenatine and 1-methoxycanthin-6-one, *J. Org. Chem.* 1989, **54**, 2170.
- 20 Haynes H. F. N., E. R., Price, J. R., Alkaloids of the Australian Rutaceae: *Pentaceras australis* Hook. F. I. Isolation of the alkaloids and identification of canthin-6-one, *Aust. J. Chem.* 1952, **5**, 387.
- 21 Koike K., Yoshino H., Nikaido T., Synthesis and antitumor activity of canthin-5,6-dione derivatives, *Heterocycles* 1999, **51**, 315.
- 22 Lester A. M., Shipchandler M., Showalter H., Bathala M.S., Antimicrobial agents from higher plants. synthesis in the canthin-6-one (6H-Indolo[3,2,1-de][1,5]naphthyridin-6-one) series, *Heterocycles* 1975, **3**, 7.
- 23 Markgraf J. H., Dowst A. A., Hensley L. A., Jakobsche C. E., Kaltner C. J., Webb P. J., Zimmerman P. W., A versatile route to benzocanthinones, *Tetrahedron* 2005, **61**, 9102.
- 24 Matus I., Fischer J., An unusually simple procedure for the synthesis of canthin-alkaloid derivatives using dialkyl oxalates as new regioselective *N*-alkylating agents, *Tetrahedron Lett.* 1985, **26**, 385.
- 25 Narayanan K., Schindler L., Cook J. M., Carboxyl-mediated Pictet-Spengler reaction. Direct synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolines from tryptamine-2-carboxylic acids, *J. Org. Chem.* 1991, **56**, 359.
- 26 Suzuki H., Adachi M., Ebihara Y., Gyoutoku H., Furuya H., Murakami Y., Okuno H. A Total synthesis of 1-methoxycanthin-6-one: An efficient one-pot synthesis of the canthin-6-one skeleton from  $\beta$ -Carboline-1-carbaldehyde, *Synthesis* 2005, **28**.
- 27 Suzuki H., Iwata C., Sakurai K., Tokumoto K., Takahashi H., Hanada M., Yokoyama Y., Murakami Y., A general synthetic route for 1-substituted 4-oxygenated  $\beta$ -carbolines, *Tetrahedron* 1997, **53**, 1593.
- 28 Kobayashi J., Cheng J. F., Ohta T., Nozoe S., Ohizumi Y., Sasaki T., Eudistomidins B, C, and D: novel antileukemic alkaloids from the *Okinawan* marine tunicate *Eudistoma glaucus*, *J. Org. Chem.* 1990, **55**, 3666.
- 29 Hamguchi F., Ohki S., Synthesis of 1,3-bis(hydroxymethyl)- $\beta$ -carboline derivatives, *Heterocycles* 1977, **8**, 383.
- 30 Soerens D., Sandrin J., Ungemach F., Mokry P., Wu G. S., Yamanaka E., Hutchins L., DiPierro M., Cook J. M., Study of the Pictet-Spengler reaction in aprotic media: synthesis of the  $\beta$ -galactosidase inhibitor, pyridindolol, *J. Org. Chem.* 1979, **44**, 535.
- 31 VanWagenen B. C., Cardellina J. H., Short efficient syntheses of the antibiotic eudistomins I and T, *Tetrahedron Lett.* 1989, **30**, 3605.
- 32 Rinehart K. L., Kobayashi J., Harbour G. C., Gilmore J., Mascall M., Holt T. G., Shield L. S., Lafargue F., Eudistomins A-Q,  $\beta$ -carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, **109**, 3378.
- 33 Singh V., Hutait S., Batra S., Baylis-Hillman reaction of 1-formyl- $\beta$ -carboline: One-step synthesis of the canthin-6-one framework by an unprecedented cascade cyclization reaction, *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 6211.

## 2– Stratégies de synthèse à partir de composés à unités $C_{10}N_2 + C_2 + C_2$

### a– Synthèses antérieures

Nous allons étudier un exemple d'une telle stratégie au départ de la tryptamine. La première synthèse que nous allons étudier a été développée dans les travaux de Settimj et ses collaborateurs (Rome, Italie)<sup>16</sup>. Ils ont rapporté la synthèse de la 2-méthoxycarbonyl-canthin-6-one (**58**) en utilisant l'intermédiaire  $\beta$ -carbolinique (**57**) issu de composés à unités  $C_{10}N_2 + C_2$  (Schéma 6). Les deux carbones supplémentaires sont apportés par l'**anhydride acétique**. L'acétylation de l'azote de l'indole suivie de l'aldolisation–crotonisation intramoléculaire ont conduit à la 2-méthoxycarbonyl-canthin-6-one (**58**). Une autre synthèse très similaire a été récemment publiée dans le travail du group de Singh<sup>33</sup> (Weinheim, Allemagne), les deux carbones supplémentaires son introduits *via* des **acrylates** (**59**) par une réaction de Baylis Hillman suivi d'une cyclisation intramoléculaire<sup>33</sup> (Schéma 6) pour obtenir les produits **60** et **61**, respectivement.



-Schéma 6- Synthèse de canthinones à partir de composés à unités  $C_{10}N_2 + C_2 + C_2$ .

### b– Travaux personnels : stratégies de synthèse de $\beta$ -carbolines à partir de composés à unités $C_{10}N_2 + C_2 + C_2$ .

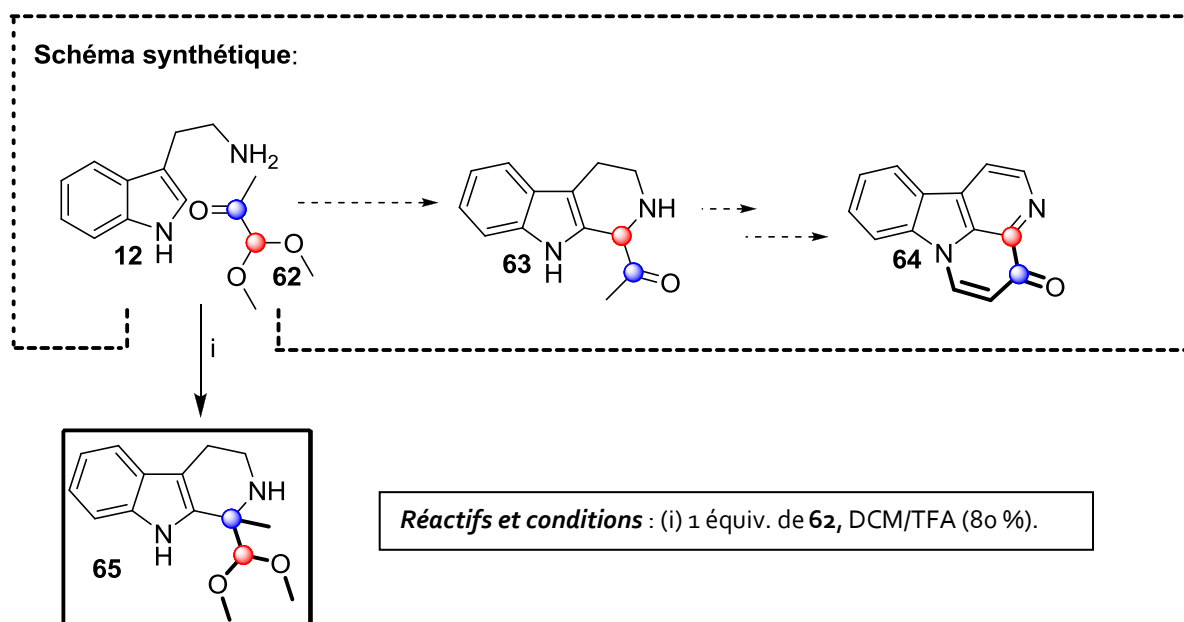
Deux approches ont été essayées, qui sont basées sur des réactions multicomposants (MCR) comprenant la Pictet-Spengler<sup>34,35</sup>.

#### $\alpha$ – Essai de synthèse d'analogues de la canthin-6-one *via* réaction de Pictet-Spengler

34 Yang M.-L., Kuo P.-C., Damu A. G, Chang R.-J., Chiou W.-F., Wu T.-S., A versatile route to the synthesis of 1-substituted [beta]-carbolines by a single step Pictet-Spengler cyclization, *Tetrahedron* 2006, **62**, 1090.

35 Paulvannan K., Hale R., Mesis R., Chen T., Tandem *N*-acyliminium/Pictet-Spengler/intramolecular Diels-Alder reaction: an expedient route to hexacyclic tetrahydro-[beta]-carbolines, *Tetrahedron Lett.* 2002, **43**, 203.

Le schéma suivant montre la synthèse que nous avons envisagée dans un premier temps pour obtenir l'analogue **64** de la canthin-6-one (Schéma 7). Dans cette approche, la tryptamine (**12**) a été mise à réagir avec **62** dans le DCM pour former la tétrahydro- $\beta$ -carboline **63**, le produit attendu était le résultat d'une réaction de type Pictet-Spengler entre la tryptamine (**12**) et l'aldéhyde pyruvique. Cet aldéhyde se trouve protégé sous la forme diacétal (**62**), et nous avons pensé que l'acide trifluoroacétique (TFA), que nous avons employé comme catalyseur pour la cyclisation de Pictet-Spengler, aurait déprotégé l'aldéhyde, mais cette déprotection ne s'est pas produite et nous avons obtenu la tétrahydro- $\beta$ -carboline **65** produit de la réaction de Pictet-Spengler avec l'unité cétone de l'acétal **62**<sup>34</sup>.



-Schéma 7- Nouvelle synthèse de  $\beta$ -carbolines originales par une approche Pictet-Spengler

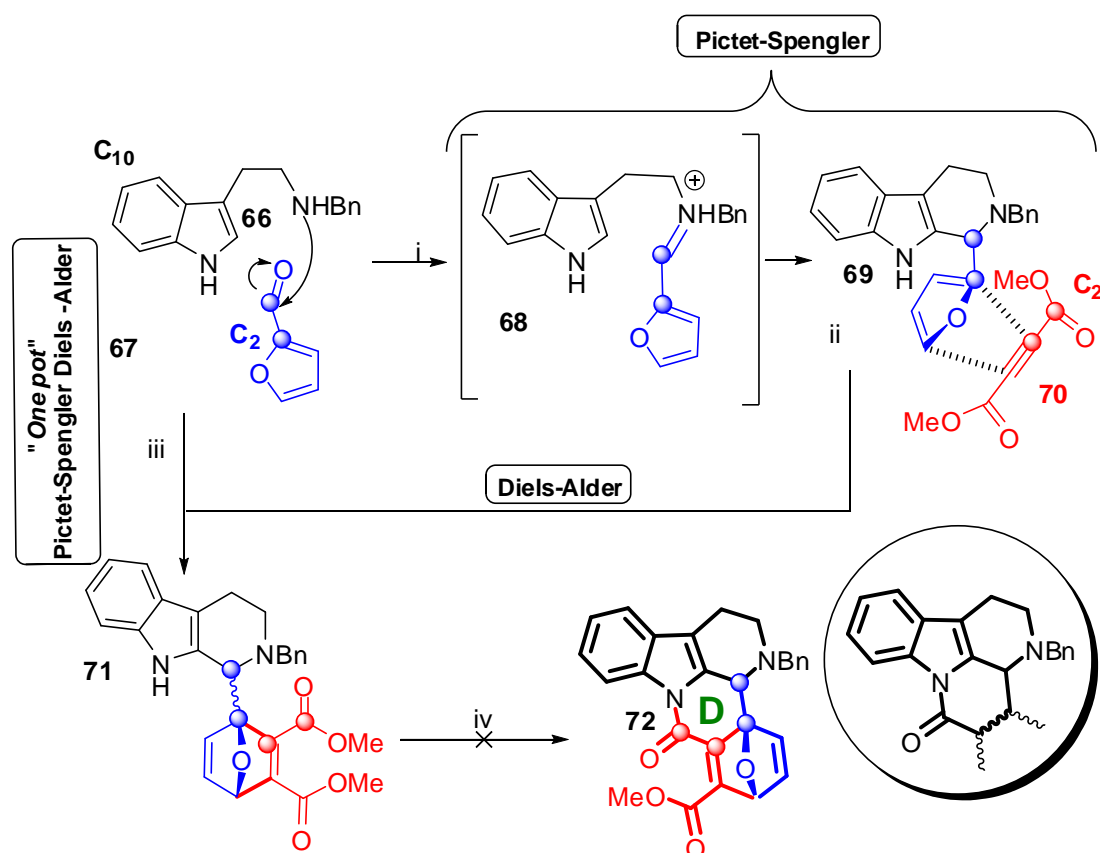
D'autres essais de déprotection de l'aldéhyde ont été réalisés en utilisant différents mélanges de DCM et TFA (Tableau 1). Malheureusement, aucun changement n'a été observé.

-Tableau 1- Résumé des conditions employées pour la déprotection de l'acétal diméthyle de l'aldéhyde pyruvique (**62**).

tryptamine ( <b>12</b> )	aldéhyde ( <b>62</b> )	DCM	TFA
1 équiv.	1,5 équiv.	90 %	10 %
1 équiv.	1,5 équiv.	50 %	50 %
1 équiv.	1,5 équiv.	70 %	30 %

## $\beta$ - Essai de synthèse d'analogues de la canthin-6-one par une réaction *one-pot* Pictet-Spengler/Diels-alder

Basée sur une approche de type  $C_{10}N_2 + C_2 + C_2$  l'obtention d'analogues « non cyclisés » du noyau canthin-6-one (**1**) a aussi été étudiée. Cette approche commence avec la tryptamine monobenzylée (**66**) qui est soumise à une réaction de Pictet-Spengler avec le furfuraldéhyde (**67**) dans des conditions de réaction classiques<sup>35</sup>. Avec le produit de la réaction de Pictet-Spengler (**69**) en main, nous avons continué avec la réaction de Diels-Alder prenant comme diène le dérivé indolique synthétisé (**69**) et comme diénophile le réactif **70**, pour obtenir le composé pentacyclique **71**. La cyclisation intramoléculaire pour fermer le cycle D et obtenir le dérivé type canthinone (**72**) est *en cours* d'étude. Nos premiers tests, réalisés avec l'utilisation d'une base forte stériquement encombrée, le diazabicycloundécène (DBU) dans des conditions douces (dichlorométhane à température ambiante) nous ont donné des mélanges inexploitable (Schéma 8).



**Réactifs et conditions :** (i) 1,5 équiv. **67**, DCM, 0,1 équiv.  $Pr(OTf)_2$  (60-70 %) (ii) toluène, 1 équiv **70**, reflux 72 h (40 %) ; (iii) toluène, 1,5 équiv. **67**, 0,1 équiv.  $Pr(OTf)_2$ , puis 1 équiv. **70** reflux 72 h (30 %) ; (iv) 3 équiv. DBU, DCM.

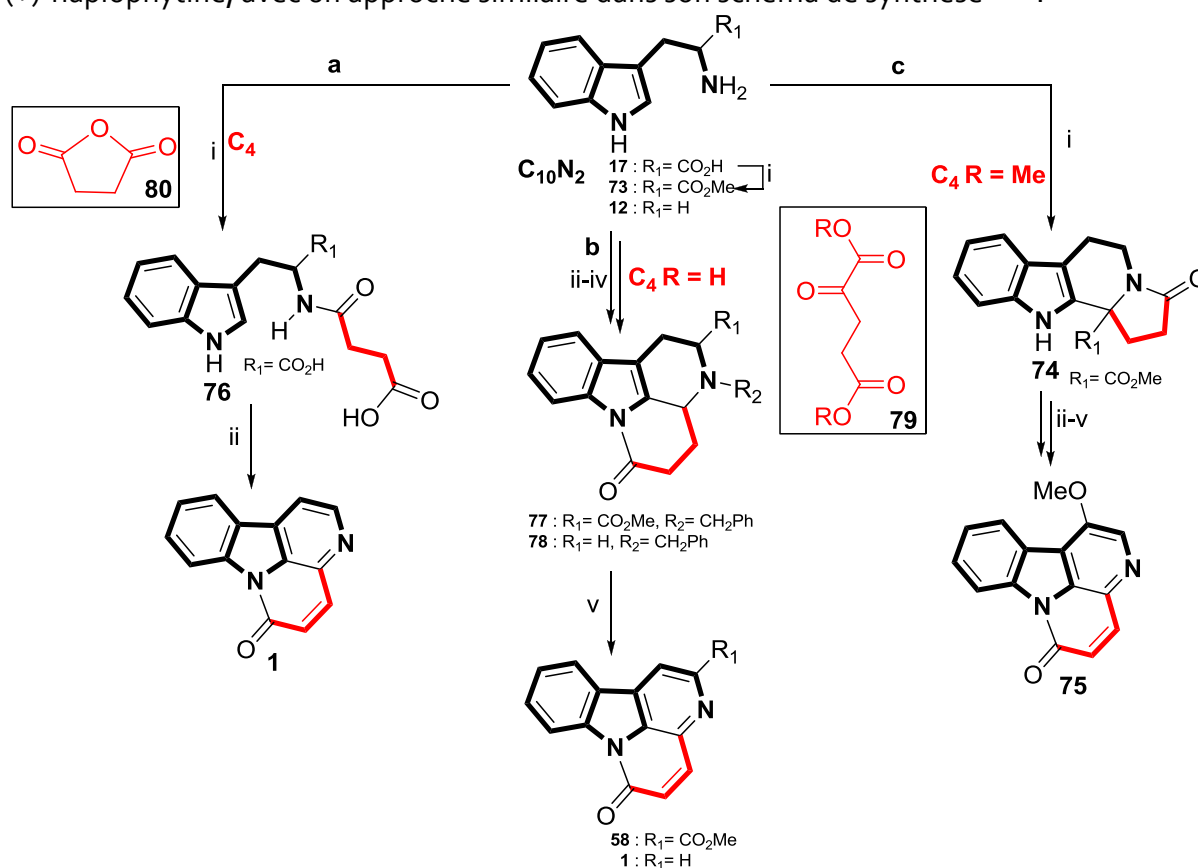
-Schéma 8- Nouvelle synthèse de  $\beta$ -carbolines originales par une réaction de Pictet-Spengler puis de Diels-Alder *one pot*.



### 3– Stratégies de synthèse à partir de composés à unités $C_{10}N_2 + C_4$ a– Synthèses antérieures

À continuation nous allons détailler des synthèses où les intermédiaires issus des réactions de type  $C_{10}N_2 + C_4$ , sont des molécules qui possèdent le même nombre de carbones que le squelette de la canthin-6-one (**1**).

Le groupe de Rosenkranz (Zürich, Suisse) <sup>36</sup> a rapporté la synthèse de la canthin-6-one (**1**) en deux étapes à partir du tryptophane (**17**) en passant par la formation de l'intermédiaire **76** (Schéma 9, voie a). Cook et collaborateurs (Wisconsin, USA) sont parvenus à synthétiser des composés analogues de **1** par deux voies de synthèse différentes. Ils ont aussi synthétisé la canthin-6-one (**1**) en quatre étapes à partir de la tryptamine (**12**). Une dernière étape d'oxydation a montré de très faibles rendements <sup>12,19</sup> (Schéma 9, voie b). Plus récemment, Czerwinski et collaborateurs<sup>15</sup> (Wisconsin, USA) ont rapporté une méthodologie qui améliorerait les rendements de cette étape d'oxydation (Schéma 9, voie c). Entre les années 2007 et 2009 le laboratoire du professeur Nicolaou en Californie a décrit la synthèse de la (+)-haplophytine, avec un approche similaire dans son schéma de synthèse <sup>37,38</sup>.



**Réactifs et conditions :** a : (i) Acide succinique (1,1 équiv.), sol. 2N  $K_2CO_3$ , 30 min, t.a. (60 %) ; (ii) Acide polyphosphorique,  $V_2O_5$ ,  $POCl_3$  (excès), 1 h, 115 °C, (25 %). b : (i) Na / $NH_3$ , MeI, 30 min, -70 °C, (80 %) ; (ii) PhCHO, MeOH, 6 h, t.a. ; (iii)  $NaBH_4$ , MeOH, 0-5 °C, 3 h, (deux étapes, 95 %) ; (iv) Acide 2-cétoglutarique (1,1 équiv.), benzène, 7 jours, reflux (82 %) ; (v)  $SeO_2$  (1,5 équiv.), dioxane, reflux, 24 h, (30 %). c : (i) Diméthyl 2-cétoglutarate (1,5 équiv.), MeOH, 20 h, reflux (92 %) ; (ii) DDQ (excès), THF / $H_2O$ , t.a., (75 %) ; (iii) HCl, AcOH,

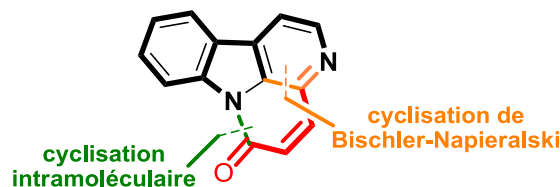
reflux, 3 h (88 %); (iv) MeOH, CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, PTSA, reflux 24 h, (82 %); (v) DDQ (excès), dioxane, 10 h, reflux, (70 %).

-Schéma 9- Synthèse des alcaloïdes de type canthin-6-one à partir de composés à unités C<sub>10</sub>N<sub>2</sub> + C<sub>4</sub>.

## b– Approche type C<sub>10</sub>N<sub>2</sub> + C<sub>4</sub> développé par notre laboratoire

### α– Travaux antérieurs

En 2006, Flor Soriano-Agaton a fini ses études de doctorat dans notre laboratoire. Pendant ces études était conçu une nouvelle voie de synthèse des canthinones en se basant sur l'idée d'apporter directement sur la tryptamine (**12**), les quatre atomes de carbone manquants par de l'anhydride succinique (**80**). Selon l'analyse rétrosynthétique proposée ci-contre deux cyclisations sont envisagées<sup>10</sup> (Figure 3).



-Figure 3- Analyse rétrosynthétique de la canthin-6-one.

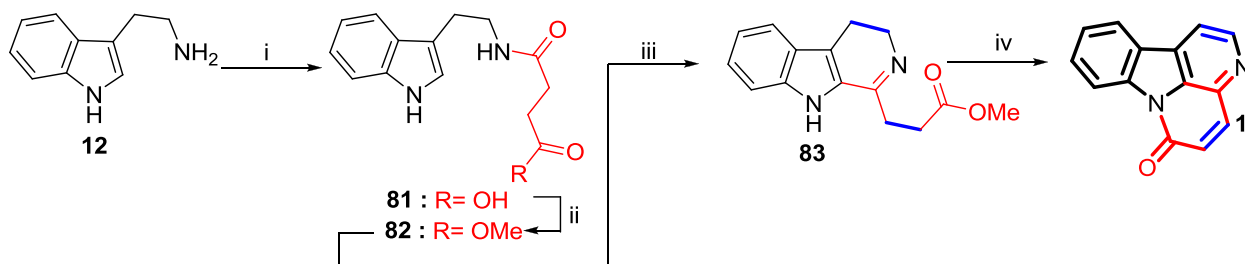
La séquence réactionnelle comprend quatre étapes. En présence d'anhydride succinique, la tryptamine (**12**) est facilement convertie en tryptamide **81**. De nombreux essais ont montré que la réaction de Bischler-Napieralski nécessitait une protection préalable de la fonction acide carboxylique sous forme d'ester méthylique (**82**). Les meilleures conditions pour la cyclisation de Bischler-Napieralski se sont avérées être l'utilisation de POCl<sub>3</sub> à reflux dans le benzène après plusieurs d'essais d'optimisation pour obtenir le produit **83** avec des meilleurs rendements<sup>39-42</sup>.

L'utilisation de DBU dans le dichlorométhane à température ambiante a ensuite conduit à la cyclisation attendue. Mieux encore, l'oxydation spontanée aromatisant totalement le système tétracyclique formé a conduit directement à la canthin-6-one (**1**) avec un rendement global de l'ordre de 60 % (Schéma 10).

Cette dernière réaction a été une surprise bienvenue, notamment quant à l'oxydation spontanée des positions 4, 5 sur le squelette canthin-6-one (**1**). Par exemple, il est fait mention

- 36 Rosenkranz H. J., Botyos G., Schmid H., Synthese von tuboflavin, 4-äthyl-canthin-6-on und canthin-6-on, *Just. Lieb. Ann. Chem.* 1966, **691**, 159.
- 37 Nicolaou K. C., Majumder U., Roche S. P., Chen D. Y. K., Construction of the "left domain" of haplophytine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, **46**, 4715.
- 38 Nicolaou K. C., Dalby S. M., Li S., Suzuki T., Chen D. Y. K., Totalsynthesis of (+)-haplophytine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, **121**.
- 39 Torisawa Y., Hashimoto A., Nakagawa M., Sek H., Hara R., Hino T., A total synthesis of manzamine C and its geometrical isomer, *Tetrahedron* 1991, **47**, 8067.
- 40 Martin, S. F., Benage, B., Hunter, J. E., A concise strategy for the syntheses of indole alkaloids of the heteroyohimboïd and corynantheïd families. Total syntheses of (±)-tetrahydroalstonine, (±)-cathenamine and (±)-geissoschizine, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, **110**, 5925.
- 41 Radchenko, O. S., Novikov, V. L., Willis, R. H., Murphy, P. T., Elyakov, G. B., Synthesis of polycarpine, a cytotoxic sulfur-containing alkaloid from the ascidian *Polycarpa aurata* and related compounds, *Tetrahedron Lett.* 1997, **38**, 3581.
- 42 Snyder, H. R., Werber, F. X., Polyphosphoric acid as a dehydrating agent. I. The cyclodehydration of some α-acylamino-β-arylpropionic acids, *J. Am. Chem. Soc.* 1950, **72**, 2962.
- 43 Rößler U., Blechert S., Steckhan E., Single electron transfer induced total synthesis of canthin-6-one, *Tetrahedron Lett.* 1999, **40**, 7075.
- \* Flor Soriano-Agaton, thèse de l'Université Paris-Sud 2006, n° 901.

dans la littérature de faibles rendements dans les étapes d'oxydation de composés 4-5-dihydro-canthinones (**15**) en canthinones avec le noyau tétracyclique totalement aromatisé<sup>43</sup>.



**Réactifs et conditions** : (i) anhydride succinique (1,1 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a., (>97 %) ; (ii) Amberlyst® H-15 (20 % m/m), MeOH reflux, 18 h, (>97 %) ; (iii) POCl<sub>3</sub> (3 équiv.), benzène, 1 h, reflux ; (iv) DBU (3 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (60 % + 80 %).

-Schéma 10- Synthèse de **1** à partir de composés à unités C<sub>10</sub>N<sub>2</sub> + C<sub>4</sub> développée par Soriano-Agaton.

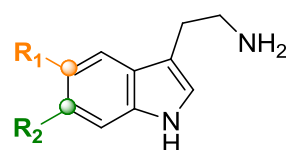
## β- Travaux personnels : synthèse totale et modulations autour de la canthin-6-one

### ▪ Synthèse totale de canthinones

Dans notre travail de thèse, nous avons utilisé la stratégie développée par Soriano-Agaton<sup>10</sup> avec l'objectif de synthétiser la canthin-6-one (**1**) et d'autres analogues simples à partir de diverses tryptamines fonctionnalisées (**12,84-86**). Nous pouvons ensuite envisager la préparation d'analogues par hémisynthèse (voir chapitre 5) et par synthèse totale en jouant sur la diversité des tryptamines de départ, voire des anhydrides.

#### ○ Synthèse totale à partir de diverses tryptamines fonctionnalisées

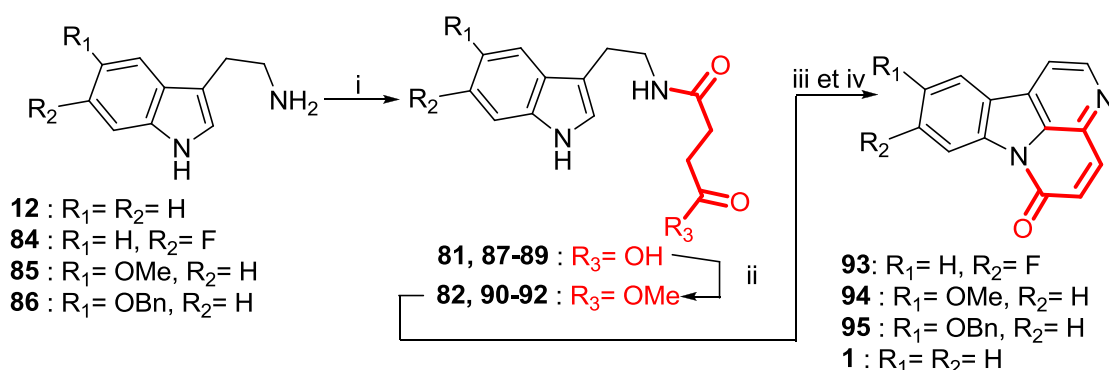
La synthèse d'analogues à partir de tryptamines fonctionnalisées a été étudiée pendant ce doctorat. Nous avons donc décidé dans un premier temps de diriger nos travaux vers la synthèse d'analogues simples, en partant de tryptamines fonctionnalisées accessibles commercialement (**12,84-86**) (Figure 4).



<b>12</b>	: R <sub>1</sub> =H; R <sub>2</sub> =H
<b>84</b>	: R <sub>1</sub> =H; R <sub>2</sub> =F
<b>85</b>	: R <sub>1</sub> =OMe; R <sub>2</sub> =H
<b>86</b>	: R <sub>1</sub> =OBn; R <sub>2</sub> =H

-Figure 4- Différentes tryptamines fonctionnalisées utilisées comme matière première.

Nous avons travaillé avec l'objectif de trouver un compromis entre les étapes de purification des composés intermédiaires du type 3,4-dihydro-β-carbolinique et les rendements obtenus pour les différentes canthin-6-ones synthétisées (**1, 93-95**), en raison de l'instabilité des intermédiaires. Ainsi donc, nous avons décidé d'engager directement le mélange réactionnel des composés **81, 90-92** dans la réaction de cyclisation intramoléculaire. Vus les résultats en termes de rendements globaux obtenus (**20-60%**), cette décision s'est avérée un bon choix (Schéma 11)



**Réactifs et conditions** : (i) **anhydride succinique** (1,1 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (97 %) ; (ii) Amberlyst<sup>®</sup> H-15 (20 % m/m), MeOH reflux, 18 h (>97 %) ; (iii) POCl<sub>3</sub> (3 équiv.), benzène, 1 h, reflux ; (iv) DBU (3 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (**1, 94 et 95**: 60 %, **93**: 20 % en deux étapes).

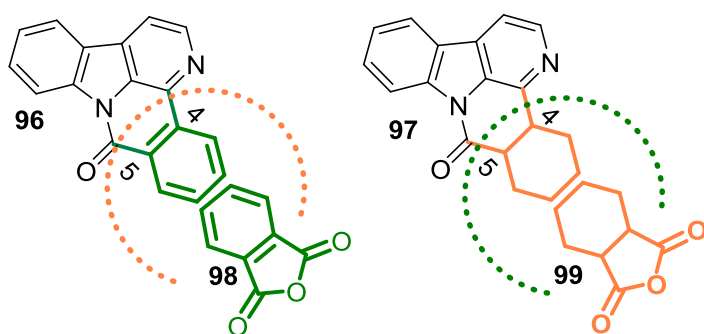
-Schéma 11- Formation de canthinones fonctionnalisées (**1, 93-95**).

Les nouveaux analogues synthétisés ont été : la 10-méthoxy-canthin-6-one (**94**), la 9-fluoro-canthin-6-one (**93**) et la 10-benzyloxy-canthin-6-one (**95**) (Schéma 11).

### ○ Synthèse totale à partir de divers anhydrides fonctionnalisés

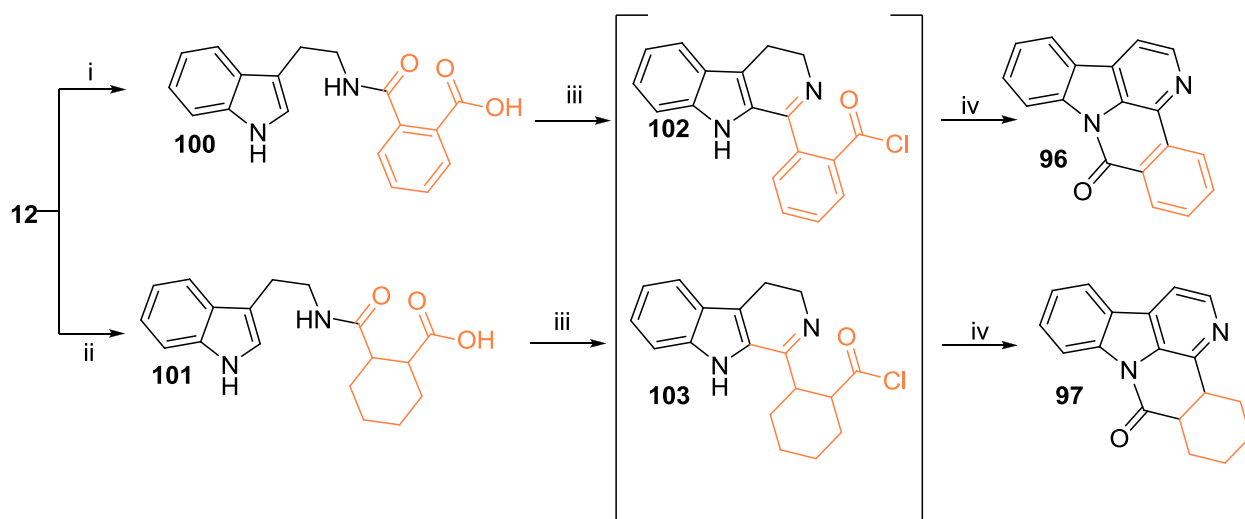
Une fois que nous avons synthétisé ces premiers analogues, il allait de soi de se demander si nous pouvions appliquer notre méthode de synthèse pour obtenir d'autres analogues de **1**, en changeant d'anhydride, dans le but de former des nouvelles canthinones fonctionnalisées en position 4 et 5 (**96** et **97**) qui seraient très utiles pour une future étude de relation structure-activité (voir chapitre 6).

### • Synthèse totale de la benzo[4,5]canthin-6-one et cyclohexyl[4,5]canthin-6-one



Nous avons choisi pour un premier essai l'utilisation de l'anhydride phthalique (**98**). La formation du tryptamide **100** ne pose pas de problème dans les conditions utilisées précédemment. La cyclisation de Bischler-Napieralski est

directement menée sur le composé **100**. Sans même essayer d'isoler un quelconque intermédiaire, le mélange réactionnel a été directement soumis aux conditions de cyclisation/oxydation par la cyclisation avec du DBU. Nous avons constaté la formation du composé attendu (**96**) avec un rendement global de 70 %. Nous pouvons suspecter la formation d'un intermédiaire tel que **102** après la réaction de Bischler-Napieralski (Schéma 12), qui nous permet une cyclisation intramoléculaire rapide. Avec l'anhydride 3,4-cyclohexylsuccinique (**99**), le protocole est identique et conduit de façon comparable au composé **97**<sup>10</sup> (Schéma 12).

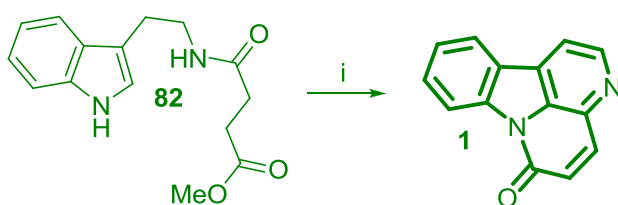


**Réactifs et conditions** : (i) anhydride phthalique (1,1 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (98 %) ; (iv) anhydride 3,4-cyclohexylsuccinique (1,1 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (98 %) ; (iii) POCl<sub>3</sub>, benzène, reflux, (iv) DBU (3 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (60 % en deux étapes).

-Schéma 12-Synthèse de la benzo[4,5]canthin-6-one (**96**) et la cyclohexyl[4,5]canthin-6-one (**97**).

### ○ Modification des conditions pour notre synthèse totale de la canthin-6-one

La synthèse développée par Soriano-Agaton possède des avantages évidents par rapport à d'autres stratégies décrites auparavant, mais a aussi ses limites. Ces contraintes apparaissent principalement au niveau de la synthèse à grande échelle, la synthèse développée n'est pas appropriée si nous augmentons la quantité de matière première au-delà de 250 mg de tryptamide de type **82**<sup>10</sup>. Cette synthèse a lieu dans des conditions assez drastiques (POCl<sub>3</sub>, benzène à reflux).



**Réactifs et conditions** : (i) POCl<sub>3</sub> (3 équiv.), 1 h, reflux, puis DBU (3 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (40 %).

-Schéma 13- Synthèse de **1** à partir de la Bischler-Napieralski sans solvant.

Nous avons poursuivi les recherches sur notre stratégie de synthèse de canthinones avec l'objectif de tenter d'améliorer les performances de la réaction, ce qui nous a conduit à une petite modification des conditions de la réaction. Cette approche ne constitue qu'une simplification des conditions décrites par Soriano-Agaton pour la réaction de Bischler-Napieralski<sup>10</sup>. Nous avons éliminé le benzène (solvant connu pour sa toxicité) du milieu

réactionnel et solubilisé l'ester méthylique **82** dans un excès de POCl<sub>3</sub> à reflux pendant 2 h. Après ce temps de réaction il faut procéder avec précaution à l'hydrolyse du POCl<sub>3</sub> (fortement exothermique). La cyclisation intramoléculaire reste inchangée, en présence de DBU dans le dichlorométhane, pour obtenir le produit final **1** (Schéma 13).

Est-il possible de corréler une voie de synthèse chimique de canthinones avec sa biosynthèse ?

### III- Relation entre la synthèse chimique et la biosynthèse : « naviguant » à travers l'hypothèse de biosynthèse de Crespi-Perellino

Depuis le début, notre groupe a montré un intérêt pour la biosynthèse des canthinones. Dans le chapitre 2 nous avons envisagé la biogenèse de ces alcaloïdes particulièrement nous avons fait mention des hypothèses biosynthétiques postulées par Crespi-Perellino<sup>44</sup> et Aragozzini<sup>45</sup>.

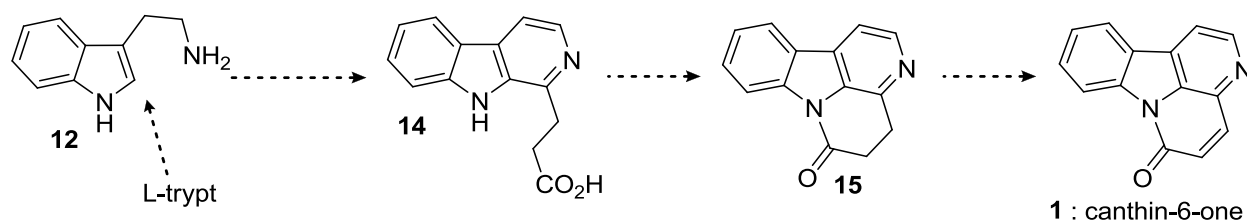
<sup>10</sup> Soriano-Agaton F., Lagoutte D., Poupon E., Roblot F., Fournet A., Gantier J. C., Hocquemiller R., Extraction, hemisynthesis, and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities, *J. Nat. Prod.* 2005, **68**, 1581.

En recherchant des conditions alternatives plus douces à la réaction de Bischler-Napierlaski, nous avons, de façon surprenante, reproduit plusieurs étapes de la biosynthèse des alcaloïdes de type canthin-6-one comme nous allons maintenant le voir.

Cette nouvelle approche est centrée, encore une fois, sur la réaction Bischler-Napieralski, mais dans ce travail nous avons complètement modifié ses conditions<sup>10</sup>. Dans le cas présent, la réaction va se dérouler dans des conditions beaucoup plus douces. Nous partons de l'ester **82** et en présence de réactifs décrits par l'équipe de Movassaghi<sup>46</sup>, tels que la 2-chloro-pyridine et l'anhydride triméthanesulfonique dans le dichlorométhane à  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

De cette réaction nous avons isolé deux  $\beta$ -carboline originales : l'alcaloïde infractine<sup>47</sup> (**83**) et la (*E*)-4,5-déhydroinfractine (**104**), avec un rendement de 60 % et 24 % respectivement<sup>48,49</sup>.

Ces deux produits isolés pendant ce doctorat étaient démontrés comme intermédiaires dans les travaux de Crespi-Perellino<sup>44</sup> (Schéma 14 et revoir chapitre 2, schéma 1).



-Schéma 14- Rappel des voies de biosynthèse de la canthin-6-one proposées par Crespi-Perellino.

L'infractine (**83**), qui est l'ester méthylique de l'acide  $\beta$ -carboline propionique (**14**) le précurseur biosynthétique de la 4,5-dihydrocanthin-6-one (**15**) d'après les prédictions de Crespi-Perellino (ces trois alcaloïdes ont été extraits des cultures cellulaires d'*Ailanthus altissima*<sup>50</sup>). Un des postulats de l'hypothèse de Crespi-Perellino présente la (*E*)-4,5-déhydroinfractine (**104**) comme un hypothétique précurseur direct de la canthin-6-one (**1**)\*, mais ce point n'a pas été confirmé par l'isolement ou même la détection de ce produit<sup>44,50</sup>.

Notre résultat mime les premières étapes de l'hypothèse biosynthétique de Crespi-Perellino<sup>44</sup> et nous montrons la viabilité de la synthèse chimique de la (*E*)-4,5-déhydroinfractine (**104**) et de l'infractine (**83**) (Schéma 15).

44 Crespi-Perellino N., Guicciardi A., Malyszko G., Minghetti A., Biosynthetic relationship between indole alkaloids produced by cell cultures of *Ailanthus altissima*, *J. Nat. Prod.* 1986, **49**, 814.

45 Aragozzini F., Maconi E., Gualandris R., Evidence for involvement of ketoglutarate in the biosynthesis of canthin-6-one from cell cultures of *Ailanthus altissima*, *Plant Cell Rep.* 1988, **7**, 213.

46 Movassaghi M., Hill M. D., A versatile cyclodehydration reaction for the synthesis of isoquinoline and  $\beta$ -carboline derivatives, *Org. Lett.* 2008, **10**, 3485.

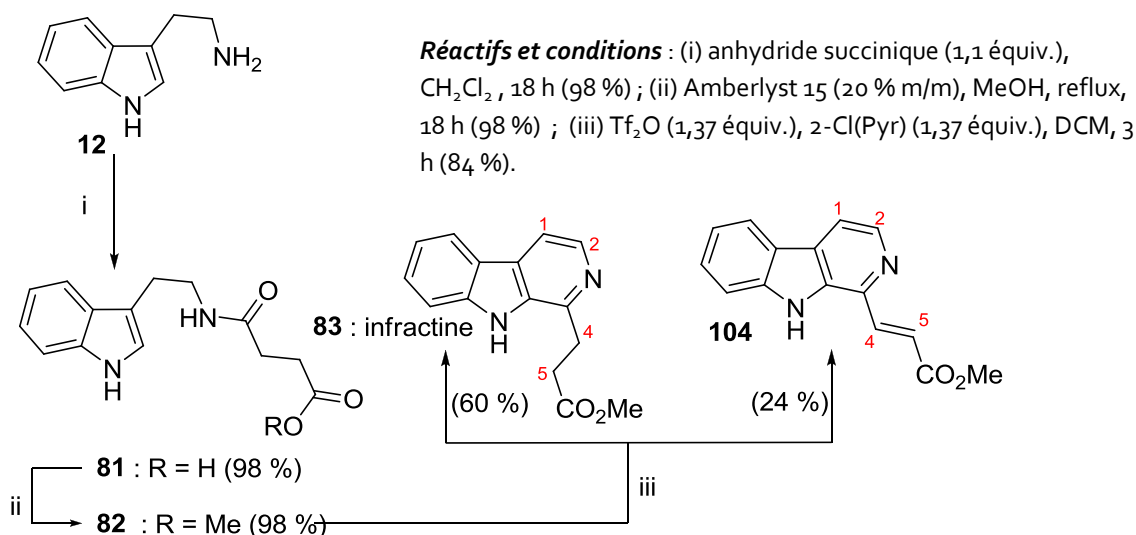
47 Steglich W., Kopanski L., Wolf M., Moser M., Tegtmeier G., Indolalkaloide aus dem Blätterpilz (agaricales), *Tetrahedron Lett.* 1984, **25**, 2341.

48 Bracher F., Hildebrand D.,  $\beta$ -Carboline alkaloids. Part 6. Total synthesis of the phosphodiesterase inhibitor infractine, *Pharmazie* 1995, **50**, 182.

49 Nowak W., Gerlach H., Synthese von manzamin Cinfractin und 6-hydroxyinfractin, *Lieb. Ann. Chem.* 1993, 153.

50 Crespi-Perellino N., Guicciardi A., Malyszko G., Arlandini E., Ballabio M., Minghetti A., Occurrence of indole alkaloids in *Ailanthus altissima* cell cultures, *J. Nat. Prod.* 1986, **49**, 1010.

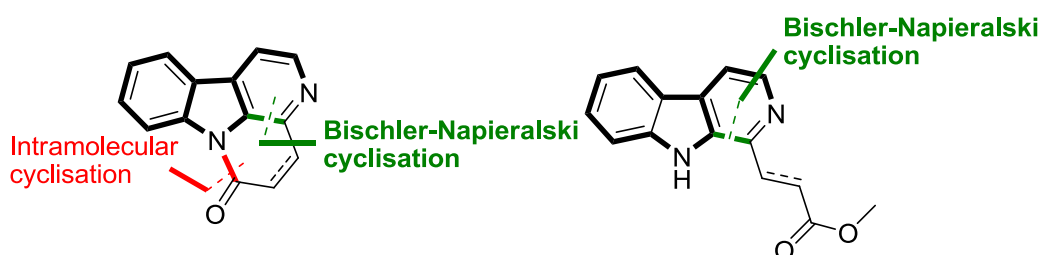
\* Bien que l'on imagine mal comment une telle molécule puisse se cycliser du fait de sa géométrie *E*.



-Schéma 15- Synthèse de l'infractine (**83**) et la (E)-4,5-déhydroinfractine (**104**).

En accord avec la bibliographie<sup>46</sup>, l'oxydation en positions 1 et 2 qui donne naissance à la structure  $\beta$ -carboline des deux produits (**83** et **104**) est décrite comme une réaction parasite et indésirable, textuellement dans la publication de Movassaghi<sup>46</sup> nous pouvons lire : « ...*this was a significant complication...* ». Cette « *heureuse* » complication, due à l'excès de réactifs employés pour nous, était une surprise bienvenue, parce que nous avons réussi à obtenir le squelette  $\beta$ -carboline avec efficacité (84 %) sans besoin de réactions d'oxydations additionnelles<sup>43</sup>.

L'origine d'une telle oxydation aussi efficace en positions 4 et 5, conduisant à la (E)-4,5-déhydroinfractine (**104**) est cohérent avec l'oxydation décrite par Soriano-Agaton *et al*<sup>10</sup>, des études sont en cours de réalisation afin de déterminer si l'origine de cette réaction réside probablement en une addition-élimination due à l'oxygène atmosphérique ou à l'excès du  $\text{Tf}_2\text{O}$ .



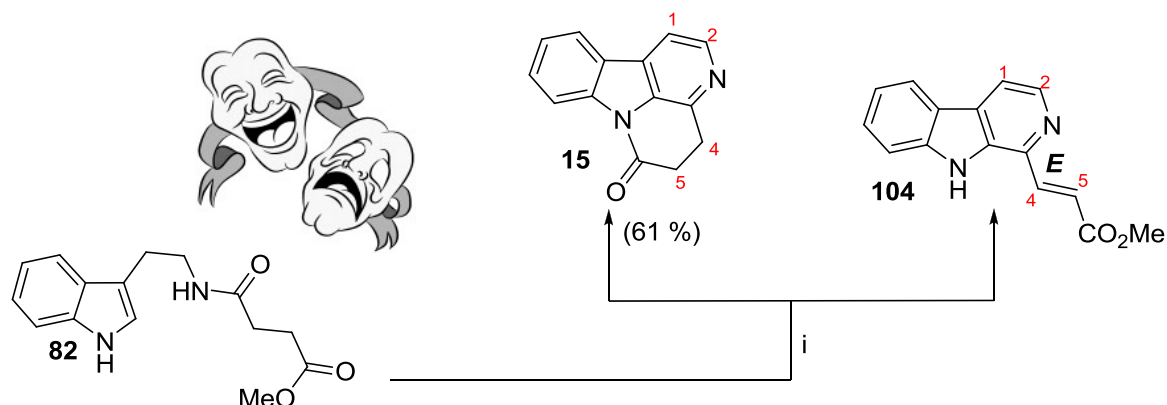
-Figure 5- Analyse rétrosynthétique des produits isolés de la réaction de Bischler-Napieralski.

Après avoir identifié ces deux produits, nous avons mené une autre réaction de Bischler-Napieralski<sup>46</sup>, cette fois-ci suivie par l'étape de cyclisation en ajoutant une base telle que DBU (Schéma 16)<sup>10</sup>. Comme produits de cette séquence réactionnelle, nous avons isolé la 4,5-dihydrocanthin-6-one (**15**) (61 %) et une petite quantité de (E)-4,5-déhydroinfractine (**104**).

Nous avons reçu le résultat de cette synthèse avec joie, pour avoir réussi à synthétiser la 4,5-dihydrocanthin-6-one (**15**). Ce composé était prédit comme un précurseur biosynthétique de la canthin-6-one par Crespi-Perellino<sup>44</sup> (Schéma 4 et voir chapitre 2). Dans notre cas le produit de départ pour obtenir la 4,5-dihydrocanthin-6-one (**15**) était l'infractine (**83**)<sup>44</sup>. Mais aussi avec



déception, vu que l'oxydation spontanée dans les positions 4 et 5 n'avait pas lieu ici.

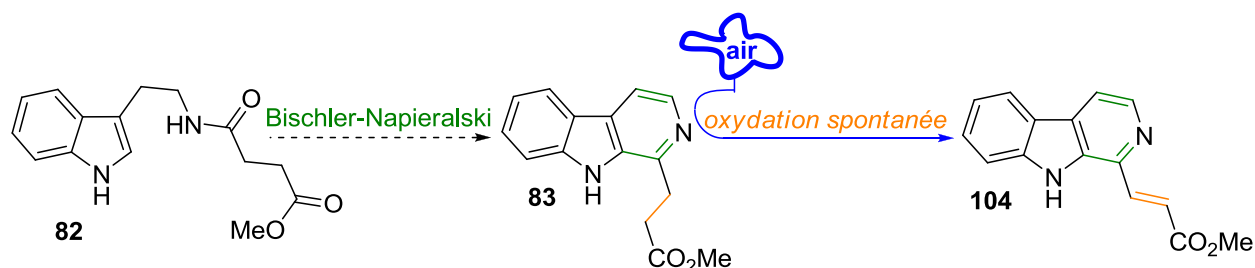


**Réactifs et conditions :** (i)  $\text{Tf}_2\text{O}$  (1,37 équiv.), 2-Cl(Pyr) (1,37 équiv.), DCM, 3 h, puis DBU (3 équiv.), DCM 18 h (61 % deux étapes).

-Schéma 16- Synthèse de la 4,5-dihydrocanthin-6-one (15).

Le mélange de produits obtenu lors de la réaction de cyclisation (15 et 104) est très informatif de la réactivité des deux  $\beta$ -carbolines formées lors de la réaction de Bischler-Napieralski (83 et 104). Autant l'infractine (83) va pouvoir donner la cyclisation intramoléculaire en présence de DBU, autant la (E)-4,5-déhydroinfractine (104) ne pourra pas *a priori*.

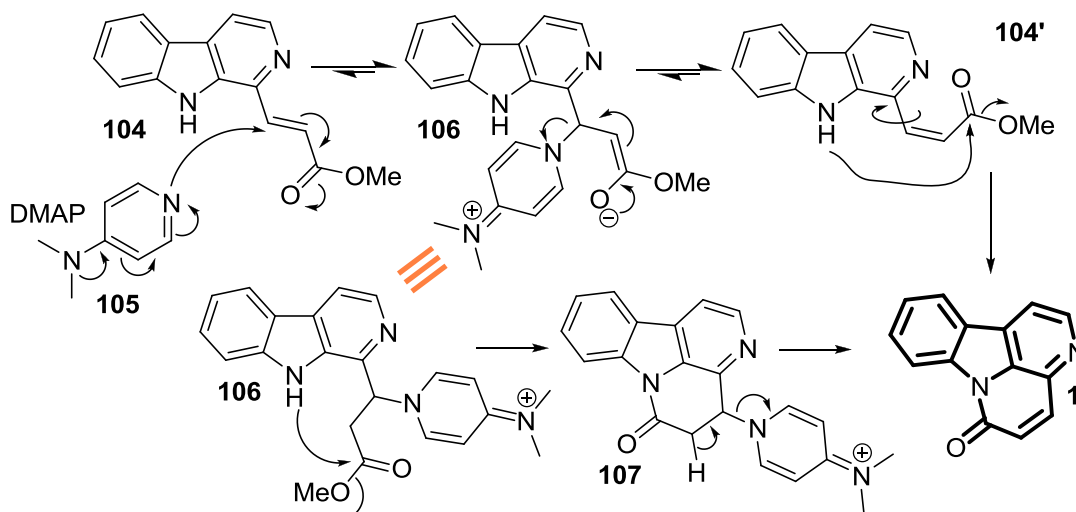
Finalement, pour synthétiser la canthin-6-one (1) nous avons fixé une stratégie : faire avancer la réaction de Bischler-Napieralski jusqu'à la (E)-4,5-déhydroinfractine (104) (Schéma 17).



-Schéma 17- Stratégie pour favoriser la synthèse de la (E)-4,5-déhydroinfractine (104).

Pour réussir la conversion de 82 en canthinone nous avons mis un large excès des deux réactifs employés dans la réaction de Bischler-Napieralski<sup>46</sup> et nous avons précipité l'hypothétique *oxydation spontanée* par l'insufflation d'air comprimé dans le mélange réactionnel pendant tout le processus synthétique. Puis, nous avons ajouté la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (plus basique que DBU) (105) dans le but de promouvoir deux réactions :

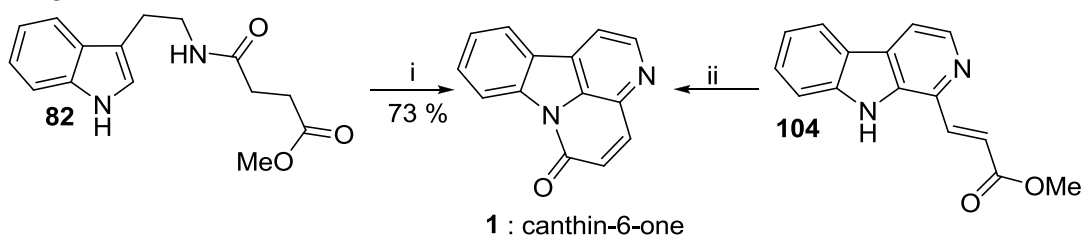
- i- L'isomérisation de la double liaison de la (E)-4,5-déhydroinfractine (104), qui une fois en conformation Z (104') cyclisera facilement et donnera la canthin-6-one (1), ou la cyclisation suivie par une élimination qui donnera la double liaison en 4,5 (Schéma 18).



-Schéma 18- Mécanismes de formation de la canthin-6-one (**1**) parmi une réaction avec du DMAP.

- ii- L'infrafractine (**104**) subira une cyclisation intramoléculaire simple tout comme lors de la synthèse de la dihydrocanthin-6-one (**15**) avec le DBU, mais nous attendons que l'excès de réactifs<sup>46</sup> ajouté à l'insufflation d'air donne le produit totalement oxydé (**1**).

Cette réaction a marché selon nos prévisions, et nous avons isolé la canthin-6-one (**1**) avec un bon rendement de 73 %. Nous avons essayé cette réaction avec des masses de produits de départ plus importante (1 g contre 250 mg) : le rendement est alors plus modeste (45 %). Parallèlement pour démontrer notre hypothèse nous avons essayé la réaction entre la (*E*)-4,5-déhydroinfrafractine (**104**) et le DMAP, et nous avons suivi la réaction par CCM. Finalement nous avons confirmé par analyse RMN <sup>1</sup>H et MS du mélange réactionnel la formation majoritaire de la canthin-6-one (**1**) (Schéma 19).



**Réactifs et conditions :** (i) Tf<sub>2</sub>O (4 équiv.), 2-Cl(Pyr) (4 équiv.), DCM, air, 5 h, puis DMAP (3 équiv.), air, 18 h (73 % global des deux étapes) ; (ii) DMAP (3 équiv.), toluène, 48 h.

-Schéma 19- Synthèse optimisée de la canthin-6-one (**1**).

Pour finir avec cette « promenade chimique » dans l'hypothèse biosynthétique de Crespi-Perellino, nous avons étudié l'interconversion entre la canthin-6-one (**1**) et la 4,5-dihydrocanthin-6-one (**15**), par des méthodologies d'oxydation-réduction classiques.

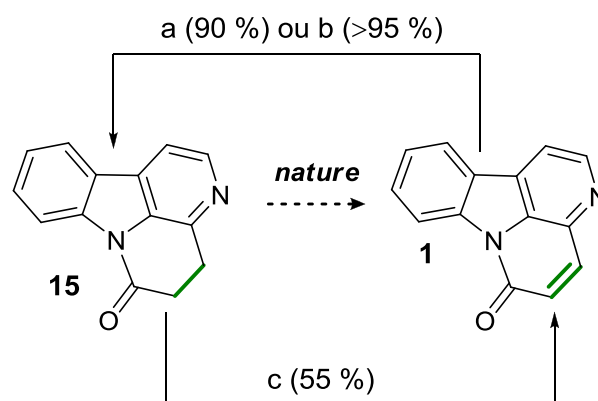
Pour aboutir à cet objectif, nous avons d'abord travaillé à la réduction de la double liaison en position 4,5 de la canthin-6-one (**1**), par réduction avec Pd/C en atmosphère réductrice.

En collaboration avec le Pr Antonio Domenech de l'Université de Valencia nous avons mené, comme nous le détaillerons plus tard des études d'électrochimie (voir chapitre 7). Des expériences

d'électrolyse d'une solution 1 mM de canthin-6-one (**1**) en milieu neutre ne produisent pas de résultats clairs, probablement à la suite de complications d'adsorption et à la formation de mélanges de produits. Dans l'acide chlorhydrique 0,1 M, toutefois des expériences coulométriques à potentiel contrôlé utilisant des électrodes de graphite pyrolytique produisent une électrolyse « propre » de **1**, donnant lieu à la réduction sélective des positions 4 et 5 (**15**) (Schéma 20).

Nous avons essayé ensuite la réaction inverse : avec un oxydant tel que le DDO la conversion est possible et redonne la canthin-6-one (**1**) (Schéma 20).

En conclusion, nous avons, en nous penchant sur de nouvelles conditions de la réaction de Bischler-Napierlaski, retracé sans le vouloir, l'ensemble des intermédiaires biosynthétiques vers la canthin-6-one. Nous avons, de plus, mis au point un maillage de réactions permettant des interconversions efficaces de toutes ces molécules (tous les produits synthétisés moins l'acide dihydro- $\beta$ -carboline propionique (**14**) et la (*E*)-4,5-déhydroinfractine (**104**), sont trouvés dans la nature chez plusieurs plantes comme *Ailantus altissima*, *Coriantus infractus* ou *Cortinarius brunneus*) (Schéma 21)<sup>47,51</sup>.



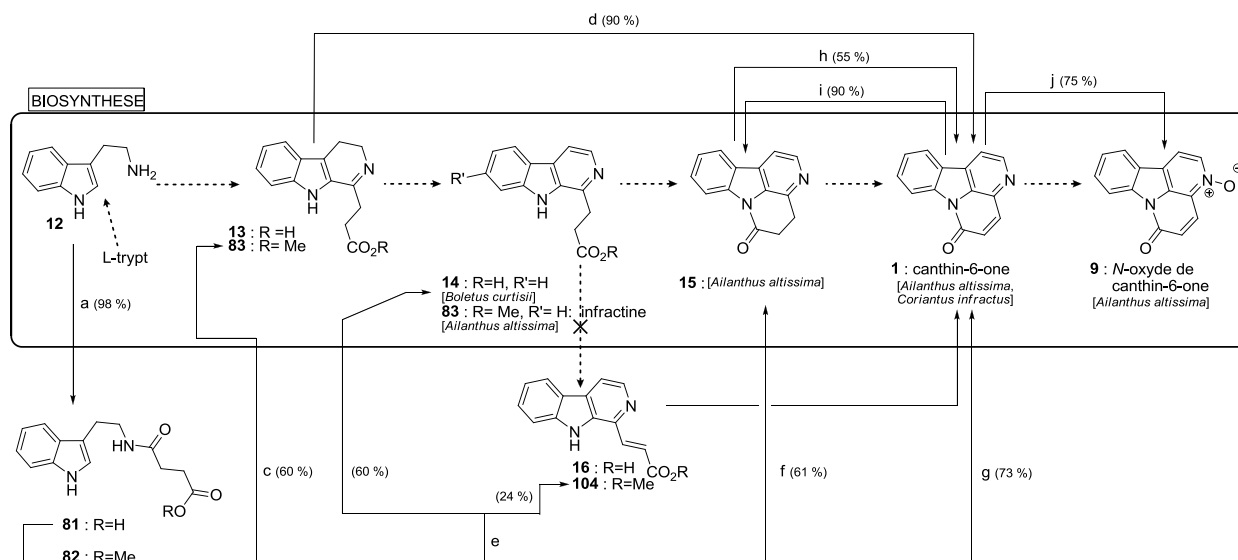
**Réactifs et conditions :** (a) Pd/C, (5 %), H<sub>2</sub>, EtOAc, 5 h (90 %); (b) HCl, électrolyse (>90 %), (c) DDO (1 équiv.), toluène, une journée (55 %).

**-Schéma 20-** Interconversion entre la canthin-6-one (**1**) et la 4,5-dihydrocanthin-6-one (**15**).

51 Teichert A., Schmidt J.R., Porzel A., Arnold N., Wessjohann L., Brunneins,  $\beta$ -carboline alkaloids from *Cortinarius brunneus*, *J. Nat. Prod.* 2007, **70**, 1529.

52 Ohmoto T., Koike K., Arnold B., In the alkaloids : chemistry and pharmacology ( Academic press), 1990, **36**, 135.

53 Basavaiah D., Krishnamacharyulu M., Hyma R. S., Sarma P. K. S., Kumaragurubaran N., A facile one-pot conversion of acetates of the Baylis– Hillman adducts to [E]- $\pm$ -methylcinnamic acids *J. Org. Chem.* 1999, **64**, 1197.



**Réactifs et conditions :** (a) anhydride succinique (1,1 équiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 18 h, t.a. (>97 %) ; (b) Amberlyst® H-15 (20 % m/m), MeOH reflux, 18 h (>97 %) ; (c)  $\text{POCl}_3$ , reflux (60 %) ; (d) DBU (3 équiv.), DCM 18 h (90 %) ; (e)  $\text{Tf}_2\text{O}$  (1,37 équiv.), 2-Cl(Pyr) (1,37 équiv.), DCM, 3 h (84 %) ; (f)  $\text{Tf}_2\text{O}$  (1,37 équiv.), 2-Cl(Pyr) (1,37 équiv.), DCM, 3 h, puis DBU (3 équiv.), DCM 18 h (61 % global des deux étapes) ; (g)  $\text{Tf}_2\text{O}$  (4 équiv.), 2-Cl(Pyr) (4 équiv.), DCM, air, 5 h, puis DMAP (3 équiv.), air, 18 h (73 % global des deux étapes) ; (h) DDQ, toluène, un jour (55 %) ; (i) Pd/C, (5 %),  $\text{H}_2$ , EtOAC, 5 h (90 %) ou sol. HCl (0,1 N), électrolyse (95 %) ; (j) mCPBA (3 equiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 18 h (75 %).

**-Schéma 21-** Hypothèse biosynthétique de Crespi-Perellino et réseau de réactions chimiques mis au point lors de notre travail.



## Chapitre 4

# Travaux personnels : Modulations diverses sur la canthin-6-one par hémisynthèse



## -Chapitre 4-

## Travaux personnels : Modulations diverses sur la canthin-6-one par hémisynthèse

## I– Modulations diverses sur la canthin-6-one

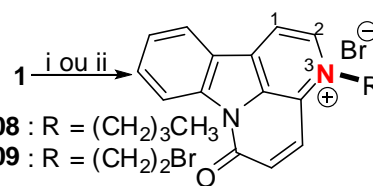
Dans cette partie, nous avons cherché à faire des modifications directement sur le noyau de la canthin-6-one pour mieux connaître sa réactivité.

## A– Quaternarisation de l'azote pyridinique

Une première approche a consisté à tester la réactivité nucléophile de l'azote *pyridinique* en position 3 (*N*-3). La quaternarisation de l'atome d'azote entraîne une meilleure solubilité dans l'eau ce qui constitue un élément important pour les futures utilisations thérapeutiques.

## Formation des dérivés halogénoalkyles

Nous avons réalisé des essais avec des dérivés halogénoalkyles lesquels ont réagi par alkylation pour former quelques dérivés de type *N*-3-alkyl-canthin-6-one que l'on peut voir sur le schéma 1 (**108** et **109**). La formation d'un chlorhydrate de canthin-6-one est aussi possible par traitement par l'acide chlorhydrique.



**108** : R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
**109** : R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Br

**Réactifs et conditions** : (i) R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> (70 %) ; ou (ii) R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Br (excès de RX), 48 h, reflux (50 %).

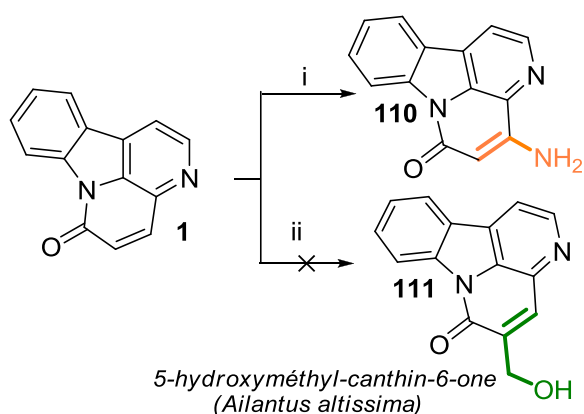
-Schéma 1- Alkylation de l'azote *N*-3.

## B– Hémisynthèse de la 4-amino-canthin-6-one et essai de synthèse de la 5-hydroxyméthyl-canthin-6-one

Une première approche a consisté à tester la réactivité de l'accepteur de Michael présent dans la canthin-6-one (**1**). Nous avons fait réagir l'azoture de sodium sur la canthin-6-one (**1**), plus spécifiquement sur son accepteur de Michael selon les conditions décrites par Soriano-Agaton<sup>10</sup>. Une réaction d'amination (**110**) a eu lieu permettant une fonctionnalisation intéressante en une étape (Schéma 2).

Le deuxième test de la réactivité de l'accepteur de Michael a comme objectif la synthèse d'un dérivé naturel de la canthin-6-one (**1**), la 5-hydroxyméthyl-canthin-6-one (**111**) (une molécule isolée également d'*Ailantus altissima*<sup>52</sup>) par une réaction de Bayllis-Hillman dans des conditions classiques décrites par Basavaiah<sup>53</sup>. Malheureusement, les premiers essais pour obtenir ce dérivé naturel n'ont pas marché, mais d'autres études sont *en cours* notamment au départ du 4,5-dehydroinfractine (**104**).





**Réactifs et conditions :** (i) NaN<sub>3</sub> (5 équiv.) ; ZnBr<sub>2</sub> (5 équiv.) ; H<sub>2</sub>O/DMF; pH ~ 8; reflux ; 24 h (60 %) ; (ii) DABCO (1 équiv), formol (1 équiv), CHCl<sub>3</sub>.

**-Schéma 2-** Schéma de synthèse de le 4-NH<sub>2</sub>-canthin-6-one (**110**) et 5-hydroxyméthyl-canthin-6-one (**111**).

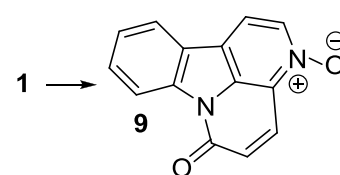
## C– Hémisynthèse et réactivité du *N*-oxyde de canthin-6-one

### 1– Préparation du *N*-oxyde de canthin-6-one

D'autres essais de fonctionnalisation sur la position *N*-3 de la canthin-6-one (**1**) ont été réalisés, principalement l'oxydation de cet atome qui réagit avec l'acide *m*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) en milieu aprotique pour former le *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**) (Schéma 3)<sup>10</sup>.

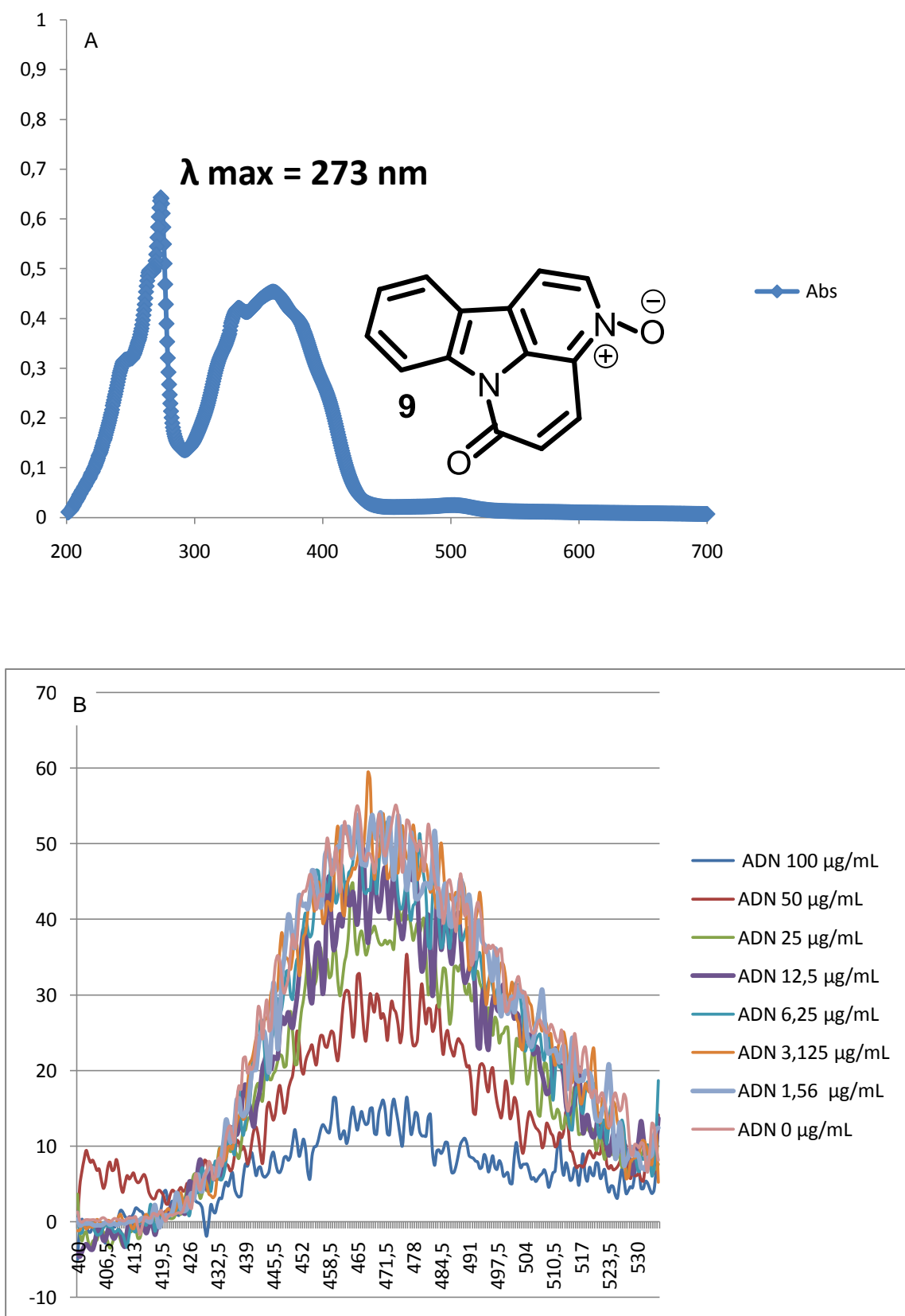
Notre laboratoire a utilisé le *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**) comme sonde fluorescente pour essayer de déterminer la cible cellulaire des canthinones, parce qu'il possède une fluorescence détectable par microscopie confocale beaucoup plus importante que celle de la canthin-6-one<sup>54</sup>. Dans le cadre du criblage de cibles nous avons trouvé intéressant d'étudier la fixation à l'ADN par méthodes spectrométriques<sup>55a</sup>, telles que la spectrométrie UV-Visible et de fluorescence. Cette étude est actuellement *en cours* en collaboration avec Laura de Miguel (UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud 11).

Avant d'étudier la fixation à l'ADN nous avons caractérisé la fluorescence du *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**) à une longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance ( $\lambda$ ) de 273 nm (Figure 1A), et nous avons étudié le spectre d'émission en solution H<sub>2</sub>O:MeOH du *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**) (Figure 1B).



**Réactifs et conditions :** *m*CPBA (3 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (75 %).

**-Schéma 3-** oxydation de l'azote *N*-3.



-Figure 1- **A.** Étude d'absorbance du *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**). **B.** Étude de fluorescence du *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**) avec des concentrations croissantes d'ADN de sperme de saumon (aucune émission détectée à ( $\lambda$ ) de 273 nm)

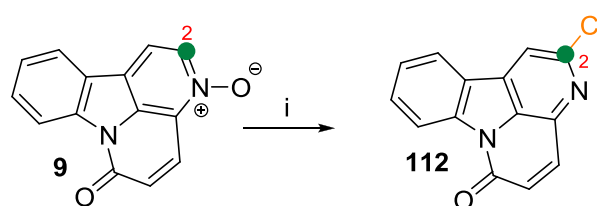
Pour l'étude du spectre de fluorescence du *N*-oxyde de canthin-6-one (**9**), à une concentration de 3  $\mu\text{M}$  avec des concentrations croissantes d'ADN de sperme de saumon, nous constatons un effet de « quenching » de la fluorescence par son interaction avec l'ADN tel que décrit par Wei *et al.*<sup>55b</sup>

## 2– Réactivité du *N*-oxyde de canthin-6-one

Nous avons entrepris quelques études de réactivité de **9** pour essayer d'élargir au squelette canthinone les nombreuses possibilités synthétiques qu'offre la chimie des *N*-oxydes en série pyridinique. En particulier, nous nous sommes intéressés aux réactions d' $\alpha$ -substitution sur ces cycles, car à notre connaissance, les composés 2-substitués de la canthin-6-one sont très peu nombreux<sup>52,56,57</sup>.

### a– Accès à des 2-chloro-canthinones

Nous avons préparé la 2-chloro-canthin-6-one (**112**) par réaction de **9** avec l'oxychlorure de phosphore (Schéma 4).

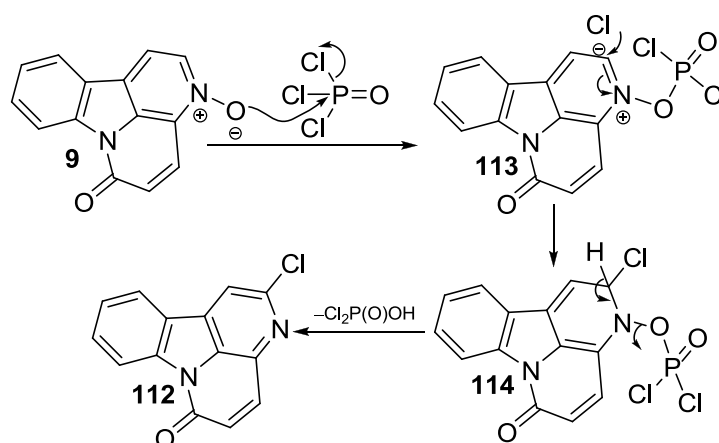


Réactifs et conditions :  $\text{POCl}_3$  (excès), 1 h, 90 °C (60%).

-Schéma 4- Chloration en position 2.

La réaction a lieu selon le mécanisme proposé dans le schéma 5.

Ce composé nous a paru fort intéressant pour des essais postérieurs tels que des couplages catalysés par des sels de fer. Un premier essai de couplage a été étudié (Schéma 5).

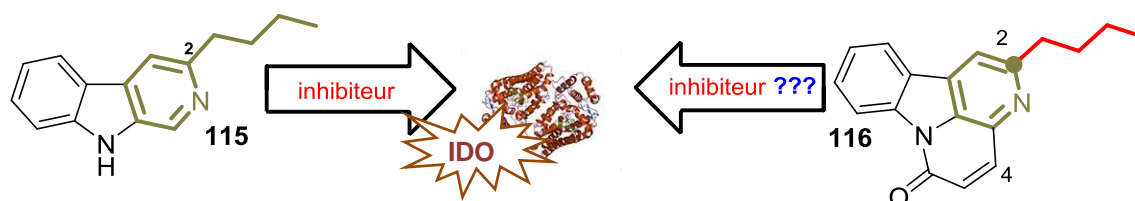


-Schéma 5- Synthèse de la 2-chloro-canthin-6-one (**112**) : mécanisme.

- 54 Lagoutte D., Nicolas V., Poupon E., Fournet A., Hocquemiller R., Libong D., Chaminade P., Loiseau P. M., Antifungal canthin-6-one series accumulate in lipid droplets and affect fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biomed. Pharmacother.* 2008, **62**, 99.
- 55 (a) Patel M., Chhasatia M., Bhatt B., *In vitro* bacteriostatic and DNA interaction studies of drug-based mixed-ligand complexes of cobalt (II), *Med. Chem. Res.* 2011, **20**, 220. (b) Wei W., Gao S.-G., Shi N.-N., Study on the interaction between gatifloxacin mesylate and salmon sperm DNA by fluorescence method, *J. Chin. Chem. Soc.* 2006, **53**, 721.
- 56 Lindsley C. W., Wisnoski D. D., Wang Y., Leister W. H., Zhao Z., A 'one pot' microwave-mediated synthesis of the basic canthine skeleton: expedient access to unnatural [beta]-carboline alkaloids, *Tetrahedron Lett.* 2003, **44**, 4495.
- 57 Allen M. S., Tan Y. C., Trudell M. L., Narayanan K., Schindler L. R., Martin M. J., Schultz C., Hagen T. J., Koehler K. F., Synthetic and computer-assisted analyses of the pharmacophore for the benzodiazepine receptor inverse agonist site, *J. Med. Chem.* 1990, **33**, 2343.

## b- Synthèse d'analogue de la butyl- $\beta$ -carboline

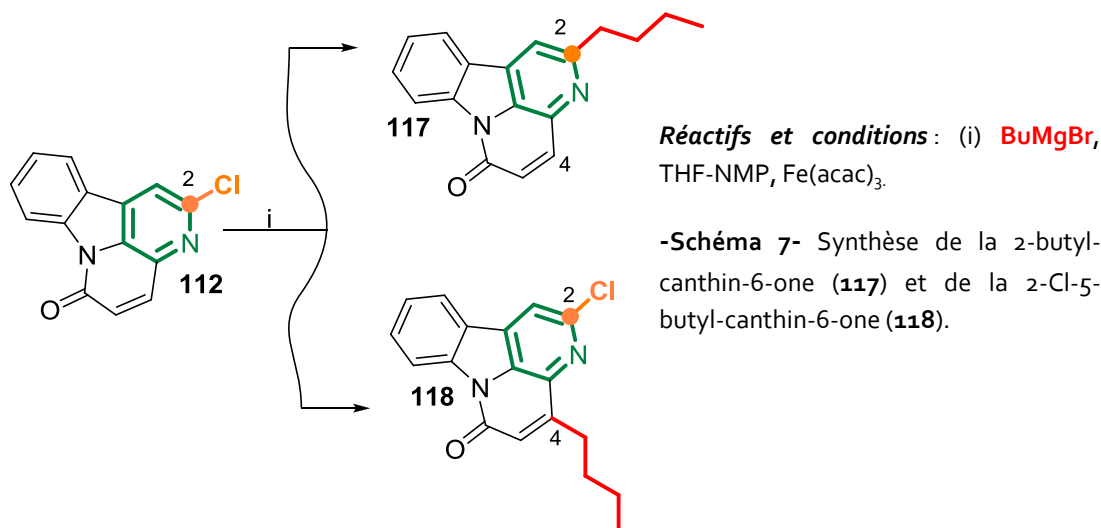
Dans ce cas, nous utilisons une réaction de couplage catalysée au fer (III) pour synthétiser un analogue de canthin-6-one (**1**) qui présente un butyle en position 2 (**116**). Ce butyle donne à la canthinone un structure similaire à la 3-butyl- $\beta$ -carboline (**115**)<sup>58</sup>, qui a est un des plus puissants inhibiteurs d'une enzyme impliquée dans le métabolisme du tryptophane : l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)<sup>59</sup> (Schéma 6).



-Schéma 6- Structure-fonction de la 2-butyle- $\beta$ -carboline (**115**).

## Hémisynthèse de la 2-butyl-canthin-6-one

Un bon exemple de réactions entre les chlorures d'imidoyle et les réactifs de Grignard a été décrit par le groupe de Olsson en 2006<sup>60</sup>. Cette réaction présente la formation efficace d'une liaison de type  $sp^2-sp^2$  (Schéma 7).



-Schéma 7- Synthèse de la 2-butyl-canthin-6-one (**117**) et de la 2-Cl-5-butyl-canthin-6-one (**118**).

Dans cette réaction le bromure de butylmagnésium a été ajouté directement à la 2-chloro-canthin-6-one (**112**), avec une catalyse au fer (quantité catalytique de Fe(acac)<sub>3</sub>). Le solvant de réaction a été un mélange THF/NMP avec l'obtention de deux produits de réaction (**117** et **118**)

58 Gaspari P., Banerjee T., Malachowski W. P., Muller A. J., Prendergast G. C., DuHadaway J., Bennett S., Donovan A. M., Structure/activity study of brassinin derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors, *J. Med. Chem.* 2005, **49**, 684.

59 Takikawa O., Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, **338**, 12.

60 Ottesen L. K., Ek F., Olsson R., Iron-catalyzed cross-coupling of imidoyl chlorides with Grignard reagents, *Org. Lett.* 2006, **8**, 1771.

(Schéma 7).

Nous avons obtenu deux produits différents lors de cette réaction :

- i-* Le produit désiré de la réaction entre le réactif de Grignard et le chlorure d'imidoyle (**117**) (Schéma 7).
- ii-* Le produit de la réaction entre le réactif de Grignard et l'accepteur de Michael situé en positions 4,5 de la 2-Cl-canthin-6-one (**118**) suivie d'une oxydation spontanée (Schéma 7).

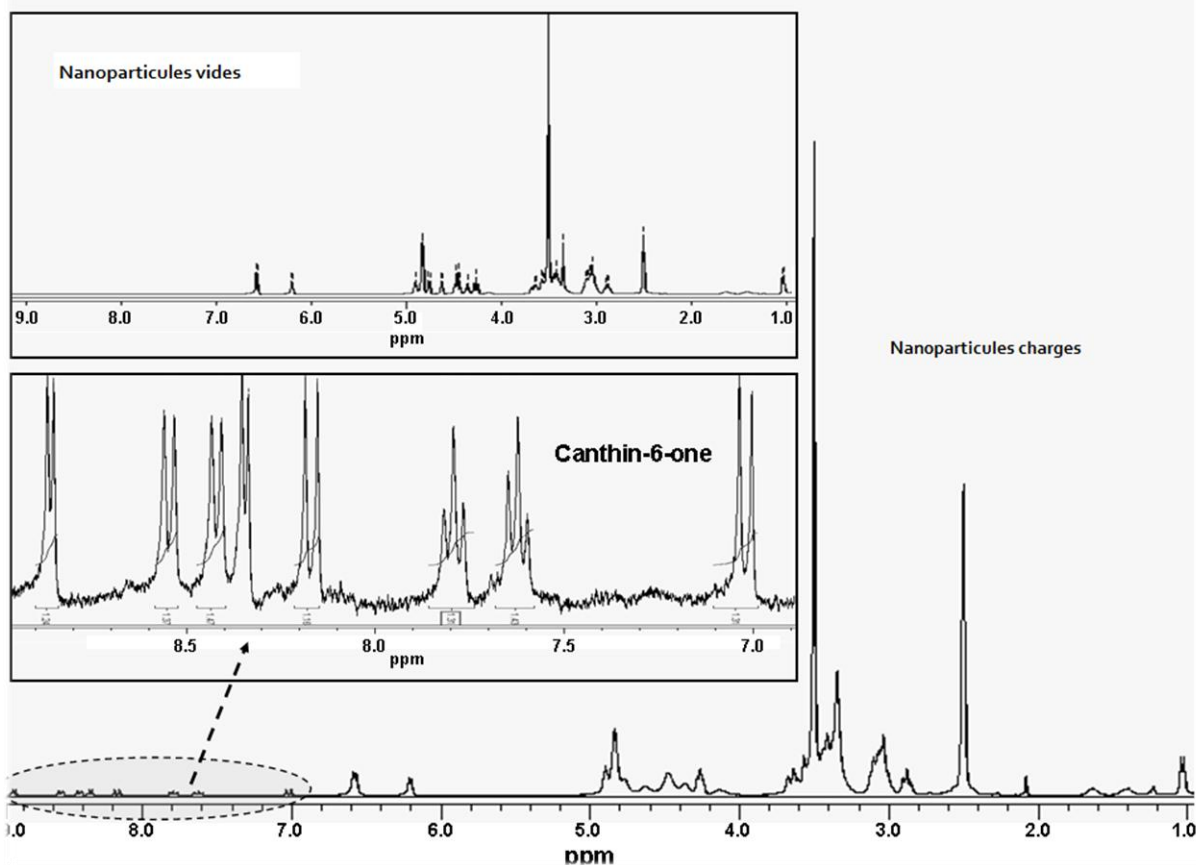
## II– Nanoformulation de la canthin-6-one

### A– Encapsulation de la canthin-6-one

L'efficacité des agents antiprotozoaires contre les infections intracellulaires (telles que le paludisme<sup>61</sup>) est très souvent limitée par un accès presque négligeable au niveau cellulaire, où les agents pathogènes sont « cachés ». En conséquence, des doses élevées de chimiothérapie sont nécessaires pour être administrées, mais l'incidence d'effets indésirables graves des médicaments conduit parfois à l'échec<sup>62</sup>. Afin d'améliorer l'effet pharmacologique de la canthin-6-one (**1**)<sup>10</sup>, le chargement de nanoparticules biodégradables de poly(octylcyanoacrylate) (POCA) a été envisagé<sup>63,64</sup>. La préparation d'une nanoformulation de canthin-6-one a été réalisées par une procédure d'absorption simple avec un chargement d'alcaloïde élevé déterminée par HPLC-RP. D'autres caractérisation de cette nanoformulation ont été réalisées entre autres par microscopie, mesures de potentiel Zeta ( $\zeta$ ) (Figure 3) et analyse RMN <sup>1</sup>H (Figure 2).

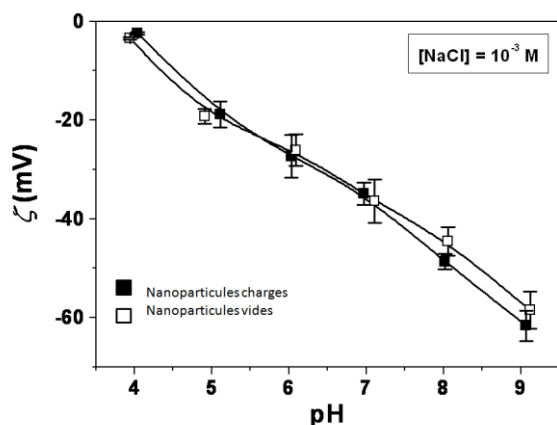
Nous avons choisi comme première analyse la RMN <sup>1</sup>H, le résultat de cette analyse est présenté sur la figure 2, où nous pouvons voir une comparaison du spectre de RMN <sup>1</sup>H des nanoparticules vides et des nanoparticules chargées de canthin-6-one (**1**).

Par cette étude nous pouvons être assurés que la canthine et le POCA sont ensablées, mais nous ne pouvons savoir si la canthin-6-one est encapsulée à l'intérieur ou adsorbée à la surface.



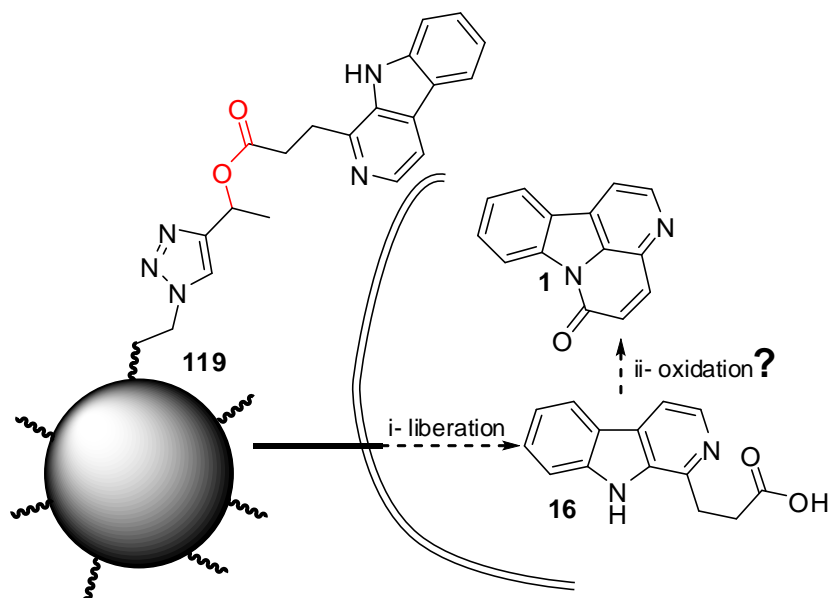
-Figure 2- RMN  $^1\text{H}$  des nanoparticules chargées avec la canthin-6-one et vides (contrôle).

Le potentiel *Zeta* ( $\zeta$ , mV) nous donnera cette information. En prenant comme référence la nanoparticule vide, le potentiel *Zeta* devrait ou non changer selon que l'alcaloïde est à la surface ou à l'intérieur. Dans notre cas une faible variation, explicable par des déformations de la surface dues au contenu, permet de conclure à une présence à l'intérieur donc à une encapsulation effective du principe actif (Figure 3).



-Figure 3- Potential *Zeta* ( $\zeta$ , mV) des nanoparticules chargées avec la canthin-6-one (1) versus nanoparticules vides (control).

L'étude physicochimique des nanoparticules a été réalisée par le Dr José Luis Arias de l'Université de Granada avec la collaboration du Pr Patrick Couvreur (UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud 11) et a conclu que les nanoparticules chargées en canthin-6-one sont caractérisées par une hydrophobicité importante et une charge de surface électrique grande dans des conditions physiologiques. Ce sont deux facteurs physicochimiques clés pour déterminer la reconnaissance par le système réticuloendothélial, ce qui en général entraîne une absorption rapide intracellulaire (intéressant par les phagocytes infectés de la tuberculose)<sup>65</sup>.



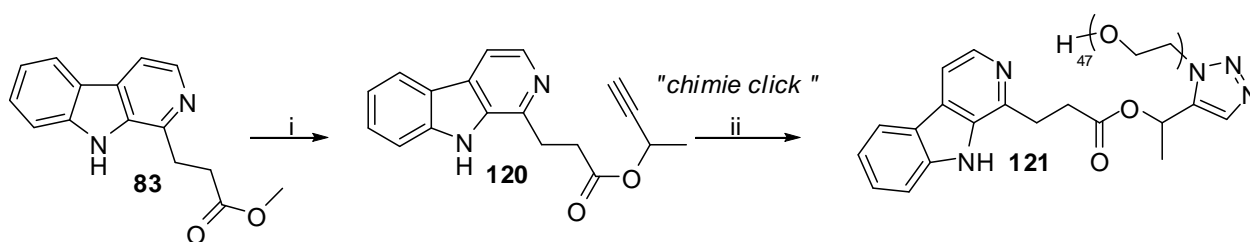
-Figure 4- Illustration d'une particule présentant en surface l'infrafractine (83) et schéma de la possible synthèse *de novo* de la canthin-6-one.

## B- Fixation de l'infrafractine à la surface des nanoparticules : Essai d'immobilisation par « chimie click »

Parallèlement, nous avons envisagé la synthèse de nanoparticules présentant des  $\beta$ -carboline accolées sur la surface, avec l'objectif de libérer les précurseurs des canthinones. Le but étant de pouvoir réaliser une chimie à la surface des nanoparticules qui pourrait en mimant l'action d'une estérase suivi d'une oxydation entraîner la formation de la canthin-6-one (Figure 4).

Pour poursuivre cet objectif nous avons dérivatisé l'infrafractine (83) par réaction avec le 3-butyn-2-ol en présence de trifluoromethanesulfonate d'ytterbium ( $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ ), pour obtenir le produit 120. Cette étape de dérivatisation nous fournit le matériel de départ nécessaire pour réaliser des premiers essais d'immobilisation de cet alcaloïde sur un support solide. À cet égard, une connexion de type 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué entre la  $\beta$ -carboline et le support solide doit nous donner une liaison non hydrolysable qui peut être facilement introduite par « chimie click » pour une cycloadition de type Huisgen (Schéma 8).

Dans notre travail, un essai préliminaire de couplage de cet alcaloïde sur un polymère a été réalisé avec l'objectif d'étudier la faisabilité de la « réaction click » avec le composé 120. Pour ce couplage nous avons employé un azoture de polyéthylène glycol (PEG) avec 46 unités de PEG, pour avoir un accès rapide et facile au « composé clické » (121). La « réaction click » a été conduite et le produit immobilisé étudié par spectroscopie d'absorbance, SEC et RMN.



**Réactifs et conditions :** (i) Yb(OTf)<sub>3</sub> (catalytique), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 80-100 °C, 18 h (27 %) ; (ii) PEG2000 (1 équiv.), DMF, CuBr (1 équiv.), PMDETA (2 équiv.), 24 h (46 %).

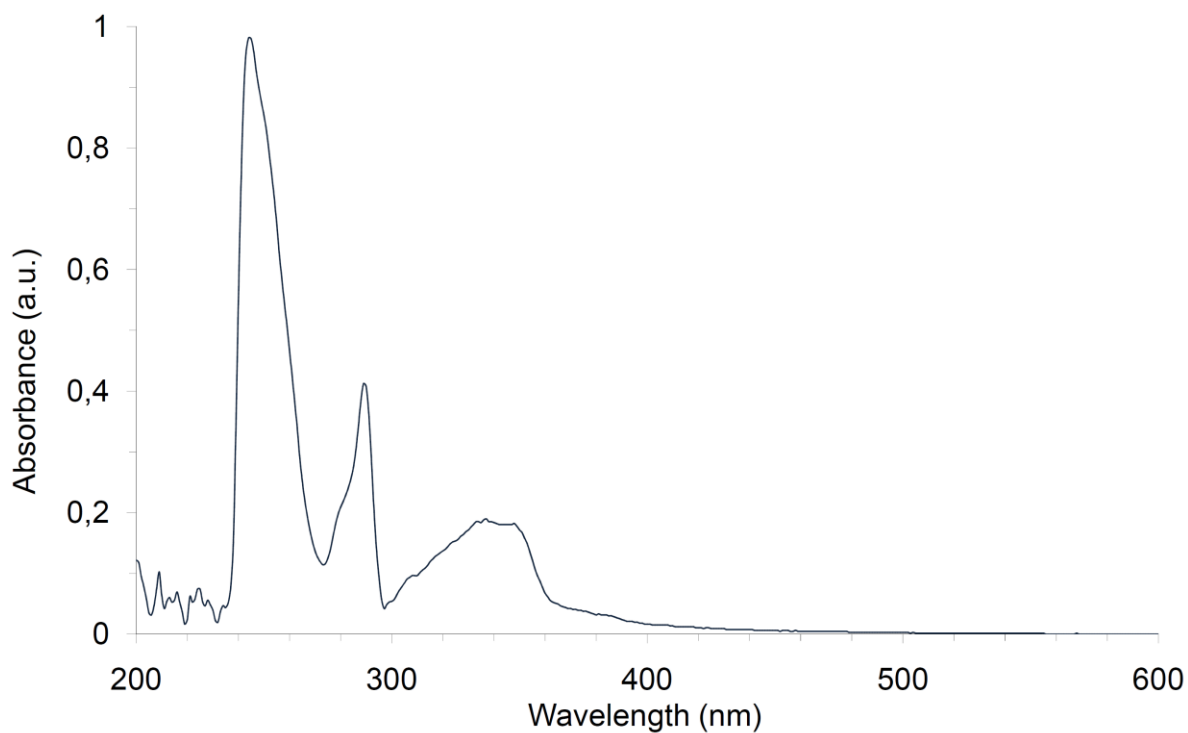
**-Schéma 8-**Immobilisation de l'infraactine (**83**).

L'analyse du spectre UV du composé final montre trois pics (246, 289 and 337 nm) (voir figure 5A). Par conséquent, pour l'analyse de SEC la longueur d'onde choisie a été 337 nm à cette longueur d'onde nous ne trouvons aucune interférence avec le signal d'UV du toluène. Le chromatogramme (Figure 5B) montre que le signal UV du composé **120** (rose) suit le signal de l'indice de réfractivité (bleu) du polymère. Cette expérience confirme que l'alcaloïde est bien fixé au polymère. L'analyse RMN du PEG-alcaloïde **121** montre la présence des signaux caractéristiques du triazole (hydrogène à 7,81 ppm) confirmant que la « réaction click » a bien eu lieu. Par ailleurs, l'intégration des protons assignés de l'alcaloïde **120** permet de quantifier un rendement de couplage de l'ordre de 46 %.

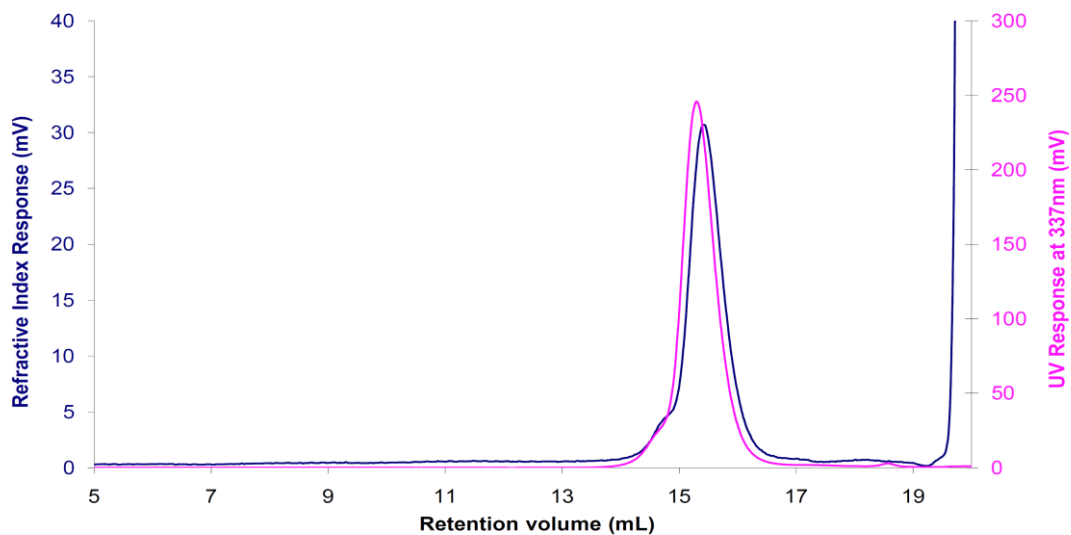
- 61 Singh K. K., Vingkar S. K., Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine, *Inter. J. Pharm.* 2008, **347**, 136.
- 62 Fattal E., Youssef M., Couvreur P., Andremont A., Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, **33**, 1540.
- 63 Arias J. L., Ruiz M. A., López-Viota M., Delgado Á. V., Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study, *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008, **62**, 64.
- 64 Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P., Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003, **55**, 519.
- 65 Arias J. L., Cebrián-Torrejón G., Fournet A., Poupon E., Couvreur P., Biodegradable polymeric nanoformulation based on the antiprotozoal canthin-6-one, *J. Nanopar. Res.* 2011, *in press*.



A



B

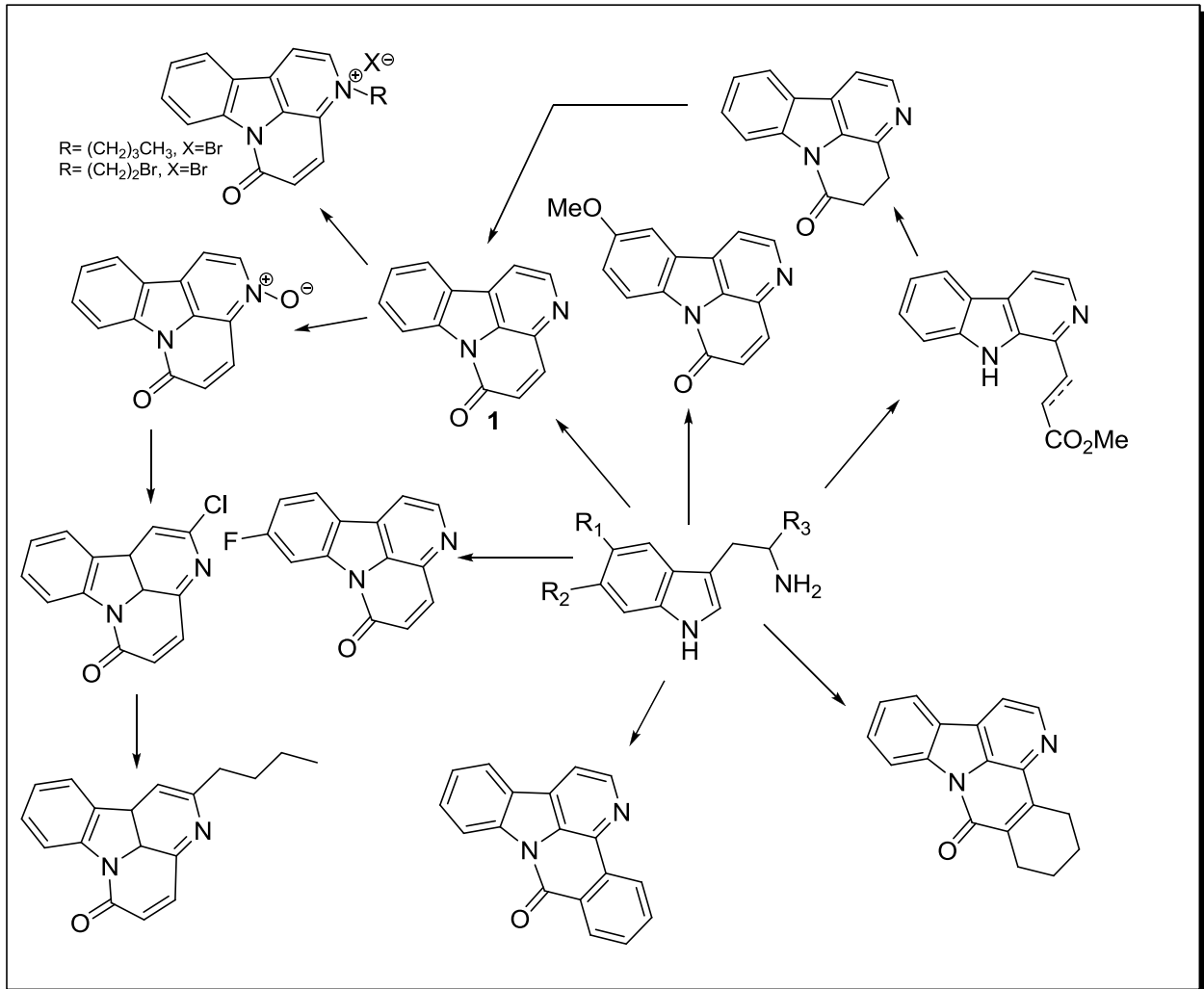


$M_w/M_n = 1,17$

-Figure 5- A. Spectre UV du produit final de la « réaction click » : 3 pics sont détectés (246, 289 et 337 nm). B. Signal UV à 337 nm du « produit clické » (121) (rose) superposé au signal de l'indice de réfractivité (bleu) du polymère.

### ***-Conclusion des chapitres 3 et 4-***

- Nous avons obtenu quelques analogues de la canthin-6-one par hémisynthèse, en exploitant la réactivité nucléophile de « N-3 », c'est par exemple ce qui nous a permis de parvenir à l'obtention d'un autre analogue fonctionnalisé en position 2, à savoir la 2-chloro-canthin-6-one puis à des dérivés alkylés.
- Nous avons mis au point une nouvelle voie de synthèse pour obtenir la canthin-6-one et d'autres analogues à partir des composés tryptaminiques. D'autre part, nous avons réussi à synthétiser tous les intermédiaires décrits dans la biosynthèse des canthinones.
- D'autres analogues de type benzo[e]canthin-6-one comportant un groupement cyclique en position 4-5 ont aussi été obtenus par synthèse, grâce à l'utilisation de différents anhydrides commerciaux.



- Pour la première fois, l'interaction des canthinones avec l'ADN est également démontrée par méthodes spectrophotométriques.
- Finalement, nous avons, par la préparation de nanoparticules, commencé à étudier les problèmes de formulation galénique de la canthin-6-one.

**-Bibliographie des chapitres 3 et 4-**

- 1 Stöckigt J., Antonchick A. P., Wu F., Waldmann H., The Pictet–Spengler reaction in nature and in organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, **50**, 8538.
- 2 Abramovitch R. A., Spenser I. D., The carbolines, *Adv. in Het. Chem.* 1964, **3**, 79.
- 3 Pictet A., Spengler, T., Formation of isoquinoline derivatives by the action of methylal on phenylethylamine, phenylalanine and tyrosine, *Chem. Ber.* 1911, **44**, 2030.
- 4 Chrzanowska M., Rozwadowska M. D., Asymmetric synthesis of isoquinoline alkaloids, *Chem. Rev.* 2004, **104**, 3341.
- 5 Ungemach F., Cook J. M., The spiroindolenine intermediate, a review, *Heterocycles* 1978, **9**, 1089.
- 6 Royer J., Bonin M., Micouin L., Chiral heterocycles by iminium ion cyclization, *Chem. Rev.* 2004, **104**, 2311.
- 7 Stuart K., Woo-Ming R.,  $\beta$ -carboline alkaloids, *Heterocycles* 1975, **3**, 223.
- 8 Bischler A., Napieralski, B., A new method for the synthesis of isoquinolines, *Chem. Ber.* 1893, **26**, 1903.
- 9 Rozwadowska M. D., Recent progress in the enantioselective synthesis of isoquinoline alkaloids, *Heterocycles* 1994, **39**, 903.
- 10 Soriano-Agaton F., Lagoutte D., Poupon E., Roblot F., Fourmet A., Gantier J. C., Hocquemiller R., Extraction, hemisynthesis, and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities, *J. Nat. Prod.* 2005, **68**, 1581.
- 11 Gollner A., Koutentis P. A., Two-step total syntheses of canthin-6-one alkaloids: new one-pot sequential Pd-catalyzed Suzuki–Miyaura coupling and Cu-catalyzed amidation reaction, *Org., Lett.* 2010, **12**, 1352.
- 12 Cain M., Campos O., Guzman F., Cook J. M., Selenium dioxide oxidations in the indole area. Synthesis of  $\beta$ -carboline alkaloids, *J. Am. Chem. Soc.* 1983, **105**, 907.
- 13 Condie G. C., Bergman J., Synthesis of some fused  $\beta$ -carbolines including the first example of the pyrrolo[3,2-c]- $\beta$ -carboline system, *J. Heterocycl. Chem.* 2004, **41**, 531.
- 14 Condie G.C., Bergman J., Reactivity of  $\beta$ -carbolines and cyclopenta[b]indolones prepared from the intramolecular cyclization of 5(4H)-oxazolones derived from L-Tryptophan, *Eur. J. Org. Chem.* 2004, **6**, 1286.
- 15 Czerwinski K. M., Zifcick C. A., Stevens J., Oberbeck M., Randlett C., King M., Mennen S., An improved synthesis of canthin-6-one, *Synth. Commun.* 2003, **33**, 1225.
- 16 Giudice M. R. D., Gatta F., Settimj G., New tetracyclic compounds containing the  $\beta$ -carboline moiety, *J. Heterocycl. Chem.* 1990, **27**, 967.
- 17 Guzman F., Cain M., Larscheid P., Hagen T., Cook J. M., Schwenk M., Skolnick P., Paul S. M., Biomimetic approach to potential benzodiazepine receptor agonists and antagonists, *J. Med. Chem.* 1984, **27**, 564.
- 18 Hagen T. J., Cook J. M., Synthesis of 1-methoxy canthine-6-one, *Tetrahedron Lett.* 1988, **29**, 2421.
- 19 Hagen T. J., Narayanan K., Names J., Cook J. M., DDQ oxidations in the indole area. Synthesis of 4-alkoxy- $\beta$ -carbolines including the natural products crenatine and 1-methoxycanthin-6-one, *J. Org. Chem.* 1989, **54**, 2170.
- 20 Haynes H. F. N., E. R., Price, J. R., Alkaloids of the Australian Rutaceae: *Pentaceras australis* Hook. F. I. Isolation of the alkaloids and identification of canthin-6-one, *Aust. J. Chem.* 1952, **5**, 387.
- 21 Koike K., Yoshino H., Nikaido T., Synthesis and antitumor activity of canthin-5,6-dione derivatives, *Heterocycles* 1999, **51**, 315.
- 22 Lester A. M., Shipchandler M., Showalter H., Bathala M.S., Antimicrobial agents from higher plants. synthesis in the canthin-6-one (6H-Indolo[3,2,1-de][1,5]naphthyridin-6-one) series, *Heterocycles* 1975, **3**, 7.
- 23 Markgraf J. H., Dowst A. A., Hensley L. A., Jakobsche C. E., Kaltner C. J., Webb P. J., Zimmerman P. W., A versatile route to benzocanthinones, *Tetrahedron* 2005, **61**, 9102.
- 24 Matus I., Fischer J., An unusually simple procedure for the synthesis of canthin-alkaloid derivatives using dialkyl oxalates as new regioselective N-alkylating agents, *Tetrahedron Lett.* 1985, **26**, 385.
- 25 Narayanan K., Schindler L., Cook J. M., Carboxyl-mediated Pictet–Spengler reaction. Direct synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolines from tryptamine-2-carboxylic acids, *J. Org. Chem.* 1991, **56**, 359.
- 26 Suzuki H., Adachi M., Ebihara Y., Gyouto H., Furuya H., Murakami Y., Okuno H. A Total synthesis of 1-methoxycanthin-6-one: An efficient one-pot synthesis of the canthin-6-one skeleton from  $\beta$ -Carboline-1-carbaldehyde, *Synthesis* 2005, **28**.
- 27 Suzuki H., Iwata C., Sakurai K., Tokumoto K., Takahashi H., Hanada M., Yokoyama Y., Murakami Y., A general synthetic route for 1-substituted 4-oxygenated  $\beta$ -carbolines, *Tetrahedron* 1997, **53**, 1593.
- 28 Kobayashi J., Cheng J. F., Ohta T., Nozoe S., Ohizumi Y., Sasaki T., Eudistomidins B, C, and D: novel antileukemic alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*, *J. Org. Chem.* 1990, **55**, 3666.
- 29 Hamguchi F., Ohki S., Synthesis of 1,3-bis(hydroxymethyl)- $\beta$ -carboline derivatives, *Heterocycles* 1977, **8**, 383.
- 30 Soerens D., Sandrin J., Ungemach F., Mokry P., Wu G. S., Yamanaka E., Hutchins L., DiPiero M., Cook J. M., Study of the Pictet–Spengler reaction in aprotic media: synthesis of the  $\beta$ -galactosidase inhibitor, pyridindolol, *J. Org. Chem.* 1979, **44**, 535.
- 31 VanWagenen B. C., Cardellina J. H., Short efficient syntheses of the antibiotic eudistomins I and T, *Tetrahedron Lett.* 1989, **30**, 3605.
- 32 Rinehart K. L., Kobayashi J., Harbour G. C., Gilmore J., Mascal M., Holt T. G., Shield L. S., Lafargue F., Eudistomins A–Q,  $\beta$ -carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, **109**, 3378.
- 33 Singh V., Hutait S., Batra S., Baylis–Hillman reaction of 1-formyl- $\beta$ -carboline: One-step synthesis of the canthin-6-one framework by an unprecedented cascade cyclization reaction, *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 6211.
- 34 Yang M.-L., Kuo P.-C., Damu A. G., Chang R.-J., Chiou W.-F., Wu T.-S., A versatile route to the synthesis of 1-substituted [beta]-carbolines by a single step Pictet–Spengler cyclization, *Tetrahedron* 2006, **62**, 1090.
- 35 Paulvannan K., Hale R., Mesis R., Chen T., Tandem N-acyliminium/Pictet–Spengler/intramolecular Diels–Alder reaction: an expedient route to hexacyclic tetrahydro-[beta]-carbolines, *Tetrahedron Lett.* 2002, **43**, 203.
- 36 Rosenkranz H. J., Botyos G., Schmid H., Synthese von tuboflavin, 4-äthyl-canthin-6-on und canthin-6-on, *Just. Lieb. Ann. Chem.* 1966, **691**, 159.
- 37 Nicolaou K. C., Majumder U., Roche S. P., Chen D. Y. K., Construction of the “left domain” of haplophytine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, **46**, 4715.
- 38 Nicolaou K. C., Dalby S. M., Li S., Suzuki T., Chen D. Y. K., Totalsynthesis of (+)-haplophytine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, **121**.
- 39 Torisawa Y., Hashimoto A., Nakagawa M., Seki H., Hara R., Hino T., A total synthesis of manzamine C and its geometrical isomer, *Tetrahedron* 1991, **47**, 8067.
- 40 Martin, S. F., Benage B., Hunter J. E., A concise strategy for the syntheses of indole alkaloids of the heteroyohimboid and

- corynantheoid families. Total syntheses of (±)-tetrahydroalstonine, (±)-cathenamine and (±)-geissoschizine, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, **110**, 5925.
- 41 Radchenko O. S., Novikov V. L., Willis R. H., Murphy P. T., Elyakov G. B., Synthesis of polycarpine, a cytotoxic sulfur-containing alkaloid from the ascidian *Polycarpa aurata* and related compounds, *Tetrahedron Lett.* 1997, **38**, 3581.
- 42 Snyder H. R., Werber F. X., Polyphosphoric acid as a dehydrating agent. I. The cyclodehydration of some  $\alpha$ -acylamino- $\beta$ -arylpropionic acids, *J. Am. Chem. Soc.* 1950, **72**, 2962.
- 43 Rößler U., Blechert S., Steckhan E., Single electron transfer induced total synthesis of canthin-6-one, *Tetrahedron Lett.* 1999, **40**, 7075.
- 44 Crespi-Perellino N., Guicciardi A., Malyszko G., Minghetti A., Biosynthetic relationship between indole alkaloids produced by cell cultures of *Ailanthus altissima*, *J. Nat. Prod.* 1986, **49**, 814.
- 45 Aragozzini F., Maconi E., Gualandris R., Evidence for involvement of ketoglutarate in the biosynthesis of canthin-6-one from cell cultures of *Ailanthus altissima*, *Plant Cell Rep.* 1988, **7**, 213.
- 46 Movassaghi M., Hill M. D., A versatile cyclodehydration reaction for the synthesis of isoquinoline and  $\beta$ -carboline derivatives, *Org. Lett.* 2008, **10**, 3485.
- 47 Steglich W., Kopanski L., Wolf M., Moser M., Tegtmeyer G., Indolalkaloide aus dem Blätterpilz (agaricales), *Tetrahedron Lett.* 1984, **25**, 2341.
- 48 Bracher F., Hildebrand D.,  $\beta$ -Carboline alkaloids. Part 6. Total synthesis of the phosphodiesterase inhibitor infractine, *Pharmazie* 1995, **50**, 182.
- 49 Nowak W., Gerlach H., Synthese von manzamin Cinfractin und 6-hydroxyinfractin, *Lieb. Ann. Chem.* 1993, 153.
- 50 Crespi-Perellino N., Guicciardi A., Malyszko G., Arlandini E., Ballabio M., Minghetti A., Occurrence of indole alkaloids in *Ailanthus altissima* cell cultures, *J. Nat. Prod.* 1986, **49**, 1010.
- 51 Teichert A., Schmidt J.R., Porzel A., Arnold N., Wessjohann L., Brunneins,  $\beta$ -carboline alkaloids from *Cortinarius brunneus*, *J. Nat. Prod.* 2007, **70**, 1529.
- 52 Ohmoto T., Koike K., Arnold B., In the alkaloids : chemistry and pharmacology ( Academic press), 1990, **36**, 135.
- 53 Basavaiah D., Krishnamacharyulu M., Hyma R. S., Sarma P. K. S., Kumaragurubaran N., A facile one-pot conversion of acetates of the Baylis– Hillman adducts to [E]- $\pm$ -methylcinnamic acids *J. Org. Chem.* 1999, **64**, 1197.
- 54 Lagoutte D., Nicolas V., Poupon E., Fournet A., Hocquemiller R., Libong D., Chaminade P., Loiseau P. M., Antifungal canthin-6-one series accumulate in lipid droplets and affect fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biomed. Pharmacother.* 2008, **62**, 99.
- 55 (a) Patel M., Chhasatia M., Bhatt B., *In vitro* bacteriostatic and DNA interaction studies of drug-based mixed-ligand complexes of cobalt (II), *Med. Chem. Res.* 2011, **20**, 220. (b) Wei W., Gao S.-G., Shi N.-N., Study on the interaction between gatifloxacin mesylate and salmon sperm DNA by fluorescence method, *J. Chin. Chem. Soc.* 2006, **53**, 721.
- 56 Lindsley C. W., Wisnoski D. D., Wang Y., Leister W. H., Zhao Z., A 'one pot' microwave-mediated synthesis of the basic canthine skeleton: expedient access to unnatural [beta]-carboline alkaloids, *Tetrahedron Lett.* 2003, **44**, 4495.
- 57 Allen M. S., Tan Y. C., Trudell M. L., Narayanan K., Schindler L. R., Martin M. J., Schultz C., Hagen T. J., Koehler K. F., Synthetic and computer-assisted analyses of the pharmacophore for the benzodiazepine receptor inverse agonist site, *J. Med. Chem.* 1990, **33**, 2343.
- 58 Gaspari P., Banerjee T., Malachowski W. P., Muller A. J., Prendergast G. C., DuHadaway J., Bennett S., Donovan A. M., Structure/activity study of brassinin derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors, *J. Med. Chem.* 2005, **49**, 684.
- 59 Takikawa O., Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, **338**, 12.
- 60 Ottesen L. K., Ek F., Olsson R., Iron-catalyzed cross-coupling of imidoyl chlorides with Grignard reagents, *Org. Lett.* 2006, **8**, 1771.
- 61 Singh K. K., Vingkar S. K., Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine, *Inter. J. Pharm.* 2008, **347**, 136.
- 62 Fattal E., Youssef M., Couvreur P., Andreumont A., Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, **33**, 1540.
- 63 Arias J. L., Ruiz M. A., López-Viota M., Delgado Á. V., Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study, *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008, **62**, 64.
- 64 Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P., Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003, **55**, 519.
- 65 Arias J. L., Cebrián-Torrejón G., Fournet A., Poupon E., Couvreur P., Biodegradable polymeric nanoformulation based on the antiprotozoal canthin-6-one, *J. Nanopar. Res.* 2011, *in-press*.

# **Chapitre 5**

## **La prénylation des substances naturelles & application à la canthin-6-one**



## -Chapitre 5-

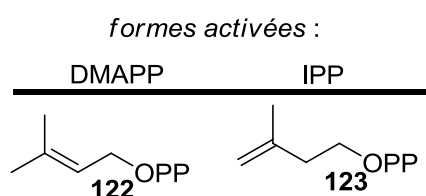
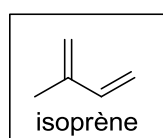
# La prénylation des substances naturelles & application à la canthin-6-one

Avant de commencer ce chapitre il est important de se souvenir que nous cherchions à synthétiser de nouveaux composés de type canthinone. Notre démarche a été ici rationnelle dans le but de rechercher des composés à activité antimycobactérienne améliorée et a été guidée par l'importance des motifs prényle comme support (ou au moins comme éléments favorables) à une telle activité.

### I- Rappels de biosynthèse

#### A- Les unités de base : formes activées de l'isoprène

##### 1- Généralités



-Figure 1- Unités prényle.

Les unités prényle sont constituées de cinq carbones (C<sub>5</sub>) (Figure 1). Elles sont introduites sur les substrats *via* des formes dites « activées » de l'isoprène à savoir le diméthylallyldiphosphate ou DMAPP (122) et l'isopentényldiphosphate ou IPP (123).

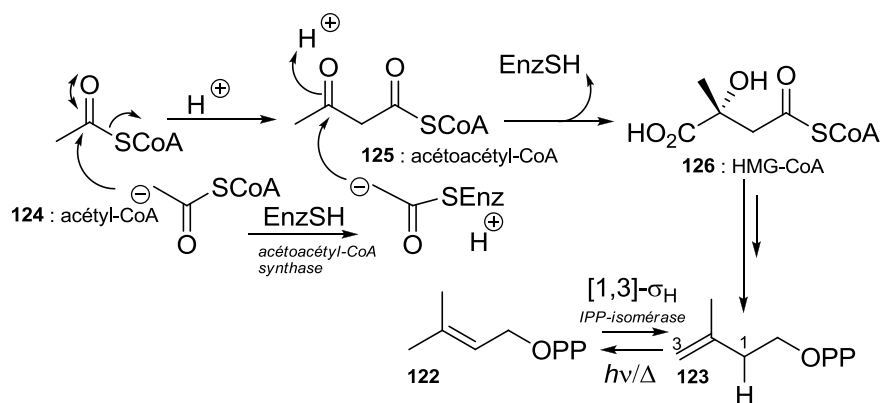
Ces deux unités s'interconvertissent sous l'influence d'isomérases (Schéma 1). L'origine de l'unité isoprène n'est pas unique, nous pouvons distinguer deux voies de formation constituant un phénomène de convergence évolutive intéressant :

- i-* La première voie de formation de cette unité est la voie dite « *du mévalonate (MVA)* ». Dans cette voie, l'acétoacétylcoenzyme A (125) se condense avec une molécule d'acétylcoenzyme A (124) pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutarylcoenzyme A (126). Celui-ci est ensuite converti en IPP (123) obtenu en équilibre avec le DMAPP (122). Cette dernière réaction est catalysée par l'IPP isomérase (*via* une tautomérie) (Schéma 1)<sup>1,2</sup>.

1 Rohmer M., The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants, *Nat. Prod. Rep.* 1999, **16**, 565.

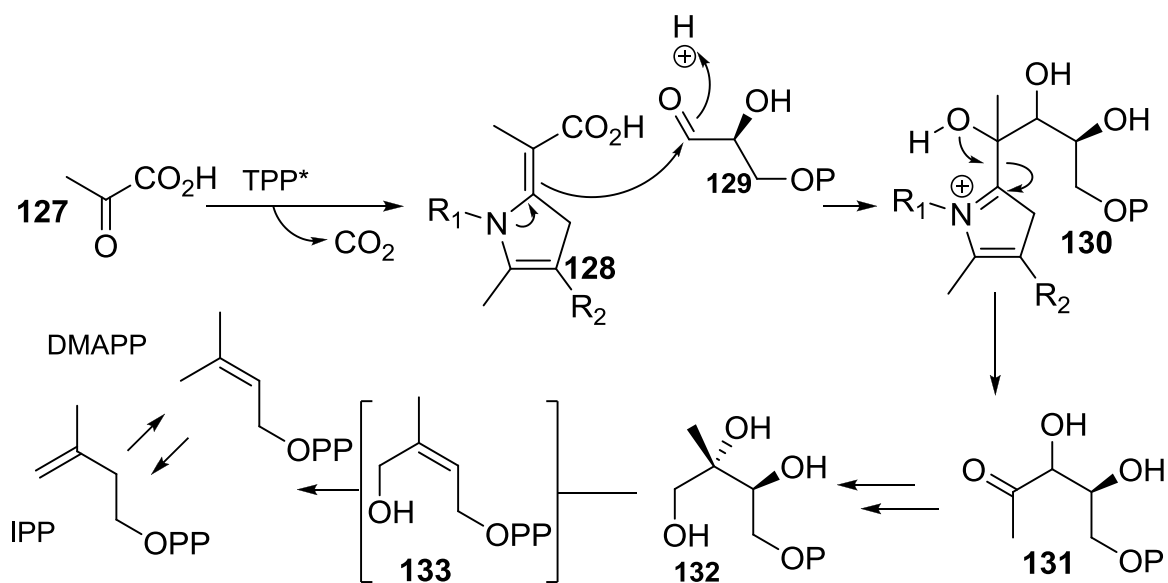
2 Dewick P. M., The biosynthesis of C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> terpenoid compounds, *Nat. Prod. Rep.* 2002, **19**, 181.





-Schéma 1- Voie du MVA pour la synthèse du DMAPP (122) et de l'IPP (123).

- ii- L'étude chez certaines bactéries de la biosynthèse d'hopanoïdes a démontré l'existence d'une autre voie de biogenèse indépendante de la voie du mévalonate, dite « voie du méthylérythritol phosphate (MEP) ». Cette deuxième voie implique la condensation d'un pyruvate (127) avec le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) (128) pour conduire au 1-déoxyxylulose-5-phosphate (131). Celui-ci est ensuite transformé en 2-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (132) qui se cyclise en un composé 2,4-cyclodiphosphate *via* un alcool allylique (133) conduisant à l'IPP et au DMAPP<sup>1-3</sup> (Schéma 2).



-Schéma 2- Voie du MEP pour la synthèse du DMAPP et de l'IPP.

3 Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H., Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate, *Biochem. J.* 1993, **295**, 517.

\* signification TPP : thiamine pyrophosphate.

\*\* signification CTP : cytidine triphosphate.

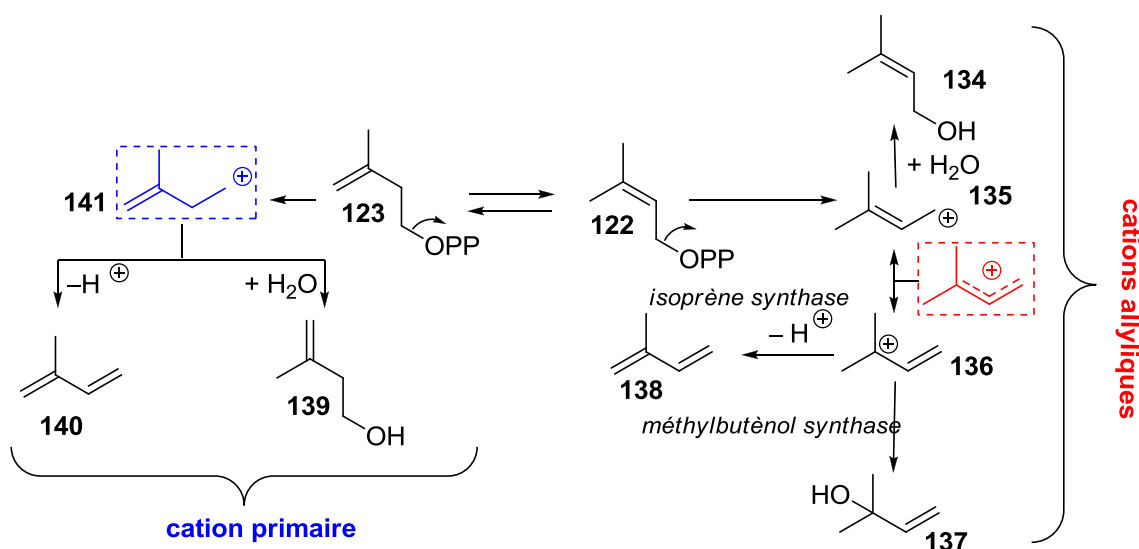
4 Rohmer M., *Comprehensive natural product chemistry, isoprenoids including carotenoids and steroids* (Pergamon (Oxford)), 1999, **2**, 45.

Énergétiquement parlant, pour la synthèse d'IPP, la voie du MVA emploie une molécule de NADPH et trois d'ATP, cependant que la voie du MEP emploie une molécule de NADPH, une de CTP et une d'ATP<sup>1</sup>.

Nous allons faire un petit rappel sur la réactivité de base des unités : **la formation des carbocations**. Les carbocations proviennent des unités DMAPP et IPP et présentent des comportements différents. Respectivement :

- ✿ le DMAPP donne deux formules limites allyliques (**135, 136**);
- ✿ l'IPP donne un carbocation primaire (**141**).

Dans le cas du DMAPP, le carbocation formé est stabilisé par résonance et par ce phénomène deux formules limites allyliques sont possibles. De l'autre côté, l'IPP donne un carbocation primaire, moins délocalisable. Pour illustrer cette diversité, nous allons étudier quelques exemples de réactivité de ces carbocations (Schéma 3), au départ du DMAPP ou de l'IPP. Il est passionnant de constater que cette réactivité de type carbocation est à l'origine de la grande majorité des terpènes.



-Schéma 3- Voies de formation des carbocations au départ du DMAPP (**122**) et de l'IPP (**123**) et quelques exemples de réactivité.

5 Putra S. R., Disch A., Bravo J.-M., Rohmer M., Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some Gram-negative bacteria and mycobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, **164**, 169.  
 6 Boucher Y., Doolittle, W. F., The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways, *Mol. Microbiol.* 2000, **37**, 703.

## 2– Distribution des voies du MVA et du MEP

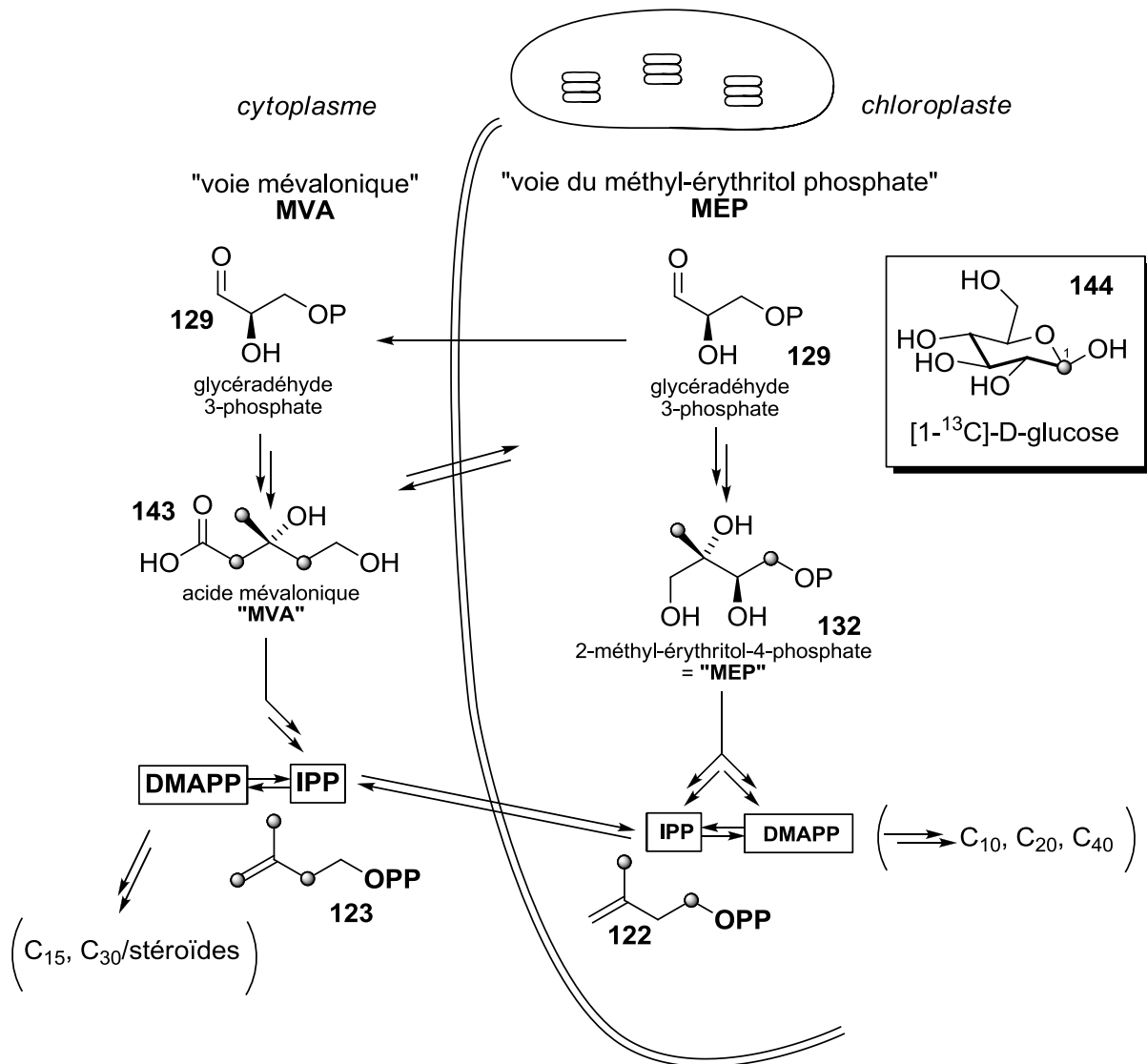
La voie de biosynthèse des isoprénoïdes par le mévalonate est présente chez les animaux, les champignons, les végétaux (cytoplasme), quelques eubactéries et les archéobactéries<sup>4</sup> (Schéma 4).

La distribution de la voie du MEP résulte en premier lieu des résultats biochimiques obtenus après des expériences d'incubations de précurseurs marqués par des isotopes stables et analyse des marquages des isoprénoïdes obtenus<sup>4,5</sup>. Ces expériences ont été appliquées aux bactéries puis étendues aux algues unicellulaires et aux plantes. Par la suite, une analyse bioinformatique des gènes connus de la voie du MEP a précisé la distribution de cette voie dans les organismes étudiés<sup>6</sup>.

La voie indépendante du mévalonate est répandue parmi les bactéries (Schéma 4). Par exemple dans des *Streptomyces* sp., les deux voies sont présentes, mais ne sont pas simultanément exprimées<sup>7,8</sup>. La voie du MEP est préférentiellement utilisée pendant la phase exponentielle de croissance correspondant à la biosynthèse des métabolites essentiels comme les ménaquinones, tandis que la voie du mévalonate est impliquée pendant la phase stationnaire où des métabolites secondaires comme les antibiotiques à motif isoprénique sont synthétisés.

La voie du MEP est également présente dans les chloroplastes de plantes supérieures (Schéma 4). En effet, chez les végétaux où coexistent les deux voies de biosynthèse, une compartimentation a été trouvée<sup>9</sup>. La voie du mévalonate est présente dans le cytoplasme où sont synthétisés les triterpènes, incluant les stérols qui jouent un rôle de stabilisateur des membranes, et la chaîne prényle de l'ubiquinone. À l'opposé, la plastoquinone ou encore les caroténoïdes sont formés dans les chloroplastes par la voie du MEP (Schéma 4).

- 
- 7 Seto H., Watanabe H., Furihata K., Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioovifer*, *Tetrahedron Lett.* 1996, **37**, 7979.
- 8 Seto H., Rihara N., Furihata K., Studies on the biosynthesis of terpenoids produced by Actinomycetes. Part 4. Formation of BE-40644 by the mevalonate and non mevalonate pathways, *Tetrahedron Lett.* 1998, **39**, 9497.
- 9 Disch A., Hemmerlin A., Bach T., Rohmer M., Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells, *Biochem. J.* 1998, **331**, 615.



-Schéma 4- Résumé des deux voies de la synthèse du DMAPP et IPP et leur localisation chez les végétaux.

## B- Pourquoi la nature recourt-elle à la prénylation ?

Au-delà des terpènes à proprement parlé, il existe dans la nature des molécules (très souvent aromatiques) qui présentent des motifs en C<sub>5</sub> (ou un multiple). Ce sont ces molécules prénylées qui vont nous intéresser maintenant.

Le phénomène biochimique de prénylation est fortement intéressant. À bien regarder le nombre de molécules naturelles prénylées, on ne trouve pas beaucoup de molécules prénylées naturelles, en comparaison avec la globalité des substances naturelles. **Pourquoi des voies biochimiques particulières ont-elles évolué vers la prénylation ?** La réponse peut être trouvée dans deux mots : **diversification et activité.**

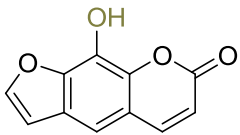
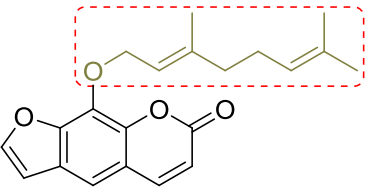
## 1– Diversification

La **diversification** des produits naturels aromatiques par prénylation, comme par exemple celle des flavonoïdes, coumarines, etc<sup>10</sup> est le résultat de trois paramètres :

- ✿ L'existence de plusieurs positions de prénylation.
- ✿ L'existence de différences de taille de la chaîne prénylée.
- ✿ L'existence de plusieurs possibilités de modifications chimiques sur l'unité prényle.

## 2– Activité

L'**activité** est également, probablement, un facteur important dans la sélection naturelle de molécules prénylées. Un exemple très clair de l'importance de l'unité prényle au niveau de l'activité est illustrée dans le travail de Row<sup>11</sup>, dans lequel l'activité d'inhibition de l'isoforme CYP3A4 du cytochrome P<sub>450</sub> dans le foie humain, d'une furanocoumarine hydroxylée (**144**) est comparée à celle de son analogue géranylé (**145**). La différence d'activité semble être patente. Le composé avec l'hydroxyle phénolique libre (**144**) n'est pas actif contrairement au composé possédant la chaîne géranyle (**145**) liée à l'oxygène phénolique. Ce dernier présente une activité inhibitrice nette (Tableau 1).

Molécules	IC <sub>50</sub> (μM)
<p><b>144</b></p> 	>100 ( <b>inactive</b> , aucune inhibition de CYP3A4)
<p><b>145</b></p> 	3,93 ± 0,53 ( <b>inhibiteur</b> de CYP3A4)

-Tableau 1- Activité d'inhibition du CYP3A4 par les molécules **144** et **145**.

<sup>10</sup> Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y., Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites, *Phytochem.* 2009, **70**, 1739.

<sup>11</sup> Row E. C., Brown S. A., Stachulski A. V., Lennard M. S., Synthesis of 8-geranyloxyporsolen analogues and their evaluation as inhibitors of CYP3A4, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, **14**, 3865.

## a- Pourquoi cet incrément d'activité ?

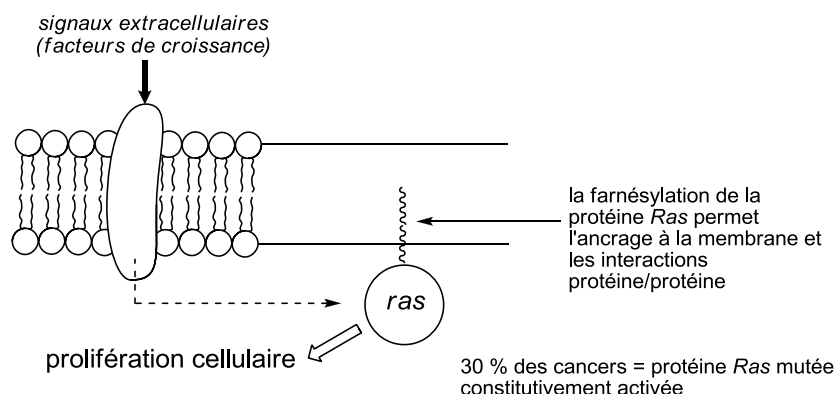
Pour donner des éléments de réponse à cette question nous allons prendre un exemple connu dans la nature, la farnésylation des protéines.

Cette fixation se fait par l'adjonction post-traductionnelle d'une chaîne farnésyle. Cette modification post-traductionnelle est catalysée par une enzyme : la farnésyltransférase, et consiste en l'introduction d'une unité farnésyle sur un résidu sérine ( $R-OH$ ) dans une protéine.

Le rôle de la farnésylation est important dans l'**association à la membrane** et aussi dans les **interactions protéine-protéine** (Figure 2).

Un exemple très illustratif est la protéine *Ras*, que se caractérise par\* :

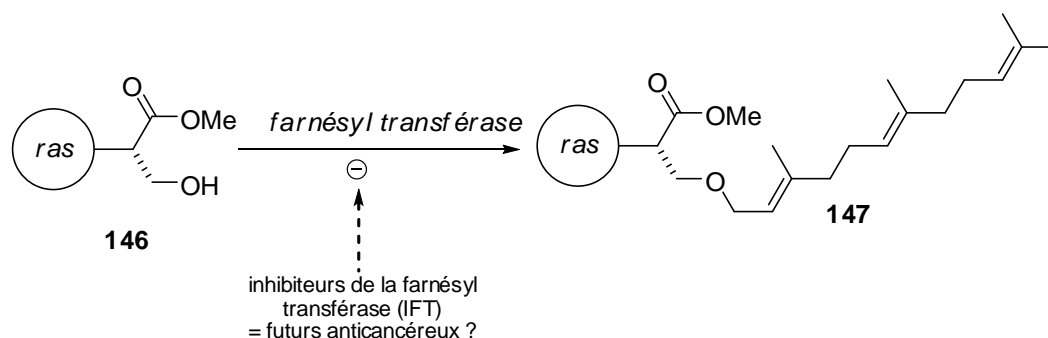
- ✿ L'expression du c-oncogène *Ras*.
- ✿ C'est une petite protéine G, la protéine *Ras* à une seule chaîne de 150 acides aminés pour une masse de 21 kDa.
- ✿ La protéine *Ras* hydrolyse le GTP en GDP pour transmettre le



-Figure 2- La protéine ras.

- ✿ le signal des récepteurs à activité tyrosine kinase vers la cascade des MAP kinases.
- ✿ Pour être active *Ras* doit être ancrée à la face interne de la membrane plasmique. La découverte de la nécessité pour les protéines *Ras* d'être farnésylées pour être fonctionnelles a conduit au développement des inhibiteurs de farnésyltransférase (FTI) pour contrôler la croissance des tumeurs présentant des mutations de l'oncogène *Ras*. Des études précliniques sur des modèles murins ont précisé l'effet inhibiteur sur la transformation tumorale et ont permis leur développement clinique. (Schéma 5) Les études de phase I et II confirment leur potentiel antitumoral et leur faible toxicité. Des essais cliniques de phase III sont actuellement en cours (Tipifarnib (Zarnestra®)), pour le traitement d'hémopathies malignes. Les résultats de ces essais devront définir la place des IFTs comme agents anticancéreux, en particulier en association avec des traitements chimiothérapeutiques, hormonaux ou radiothérapeutiques<sup>12</sup>.

\* <http://www.chups.jussieu.fr>



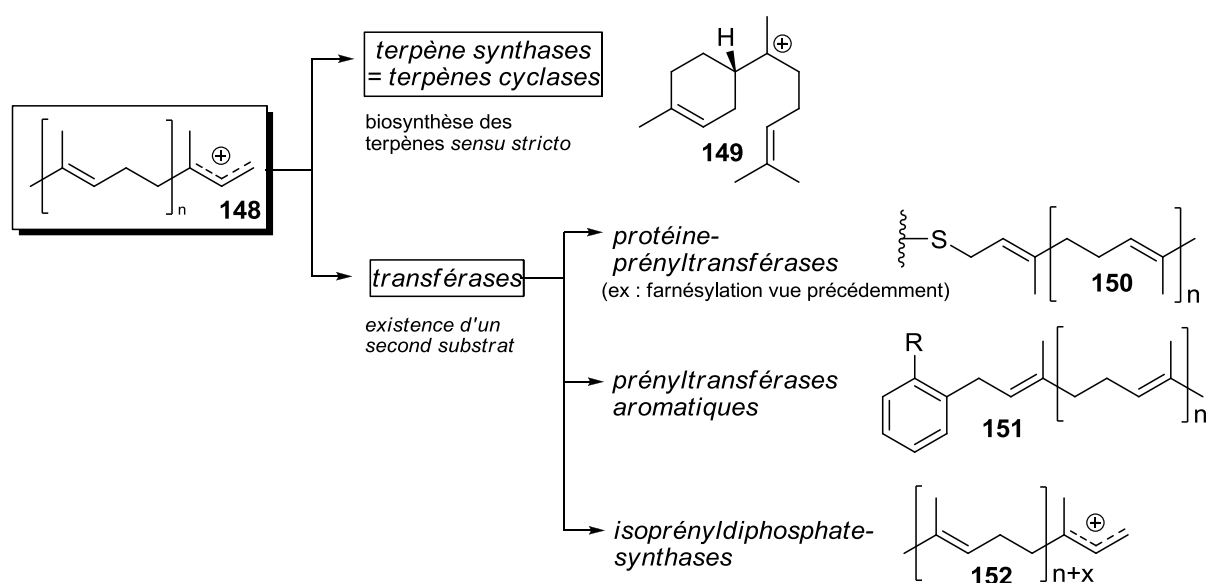
-Schéma 5- Résidu de protéine ras O-farnésylé.

## Mécanisme biosynthétique de la prénylation : les prényltransférases

Le phénomène de prénylation est un processus biochimique général. Nous pouvons parler de « prénylation » dès lors qu'un motif prényle est transféré sur un substrat quel qu'il soit.

La prénylation a lieu dans la nature grâce à l'existence de diverses familles d'enzymes qui interviennent sur les chaînes prénylées. Ces familles peuvent être regroupées en deux grandes catégories<sup>13</sup> (Schéma 6) :

- ✿ **Les terpènes synthases**, enzymes responsables de la biosynthèse des terpènes.
- ✿ **Les transférases (PTases)**, enzymes qui ont une fonction de « pont » entre le DMAPP ou l'I'PP et un second substrat à prényler. Ce groupe est plus hétérogène que le premier, parce que le type de substrats possibles est plus varié.

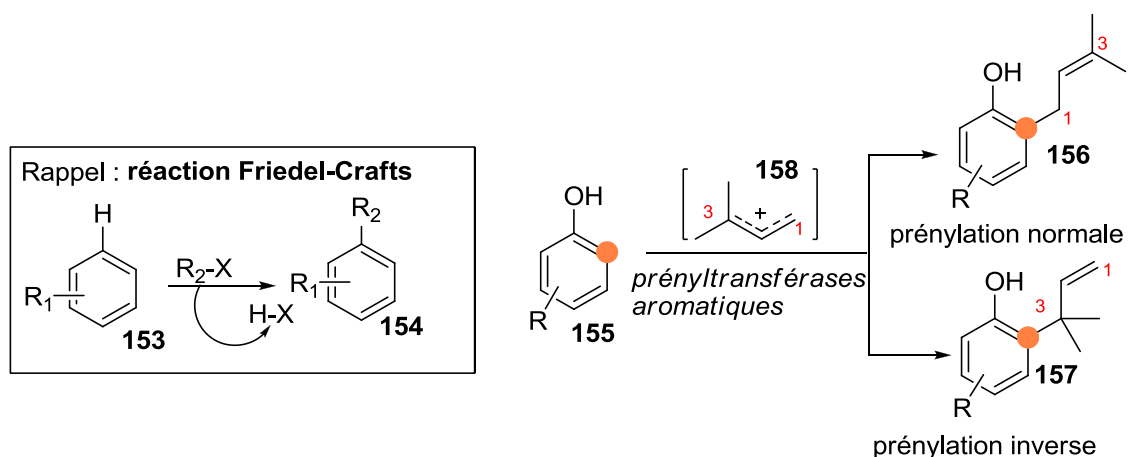


<sup>12</sup> Heide L., .Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology , *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, **13**, 171.

<sup>13</sup> Cestac P., Doisneau-Sixou S., G., F., Développement des inhibiteurs de farnésyl transférase comme agents anticancéreux, *Ann.Pharm. Fr.* 2005, **63**, 76.

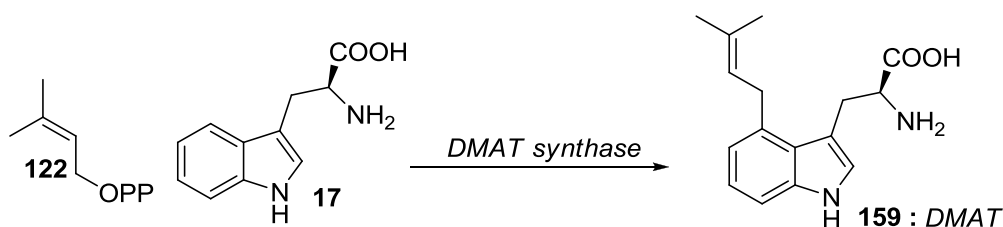
-Schéma 6- Enzymes polyprénylantes.

Pour notre sujet, nous sommes intéressés particulièrement aux prénylations aromatiques. Les prényltransférases (PTases) aromatiques sont les enzymes qui catalysent la fixation d'unités prényle sur un accepteur aromatique en formant des liaisons carbone-carbone entre le C-1 (prénylation « normale ») ou C-3 (prénylation « inverse ») du substrat isoprénique et un des carbones aromatiques de l'accepteur. Ce transfert s'apparente à une réaction de la chimie organique bien connue : la **réaction de Friedel-Crafts** (Schéma 7).



-Schéma 7- Prénylations aromatiques.

Les enzymes prényltransférases présentent dans le site actif une série d'acides aminés (Tyr, Arg, Lys, Asp, Asn et plusieurs acides aminés de type hydrophobe) qui vont faciliter la prénylation en favorisant une orientation optimale des substrats qui diminuera l'énergie d'activation nécessaire pour que la réaction de prénylation se déroule. Nous allons étudier plus en détails le cas de la *diméthylallyl tryptophane synthase (DMAT synthase)*<sup>14a,15</sup> (Schéma 8), nous pouvons trouver un exemple récent dans le travail de Yu et Li<sup>14b</sup>, où ils ont prénylé des flavonoïdes avec une *DMAT synthase (7-DMATS)* isolée d'*Aspergillus fumigatus*.

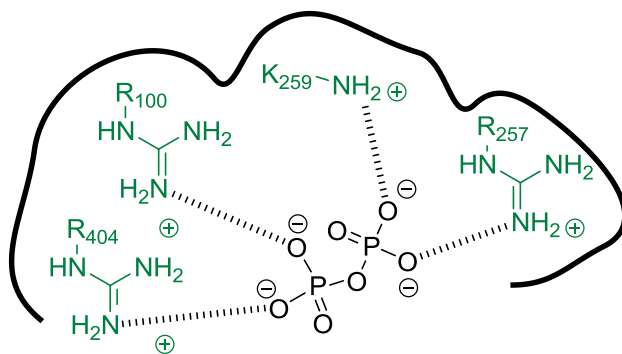


-Schéma 8- Réaction catalysée par la diméthylallyl tryptophane synthase (DMAT synthase).

14 (a) Metzger U., Schall C., Zocher G., Unsöld I., Stec E., Li S. M., Heide L., Stehle T., The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sc.USA* 2009, **106**, 14309. (b) Yu X., Li S.M., Prenylation of flavonoids by using a dimethylallyl synthase, 7-DMATS, from *Aspergillus fumigatus*, *Chem. Bio. Chem.* 2011, **00**, 1.

15 Koehl P., Relaxed specificity in aromatic prenyltransferases, *Nature Chem. Biol.* 2005, **1**, 71.



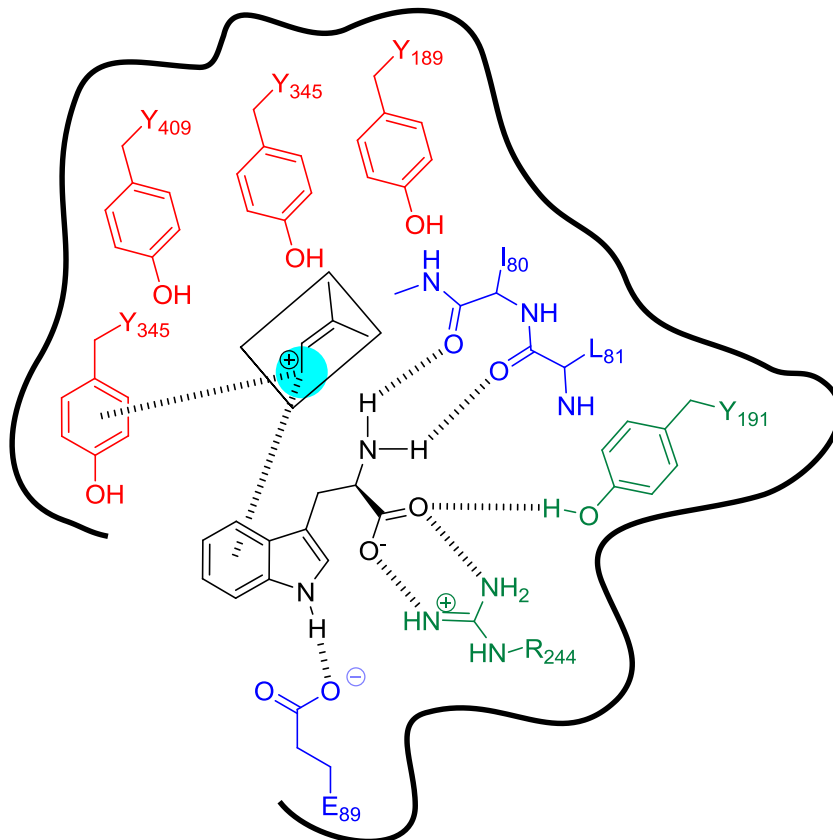


Dans le site actif de cette enzyme, nous pouvons observer des liaisons hydrogène qui se forment avec le diphosphate (Figure 3).

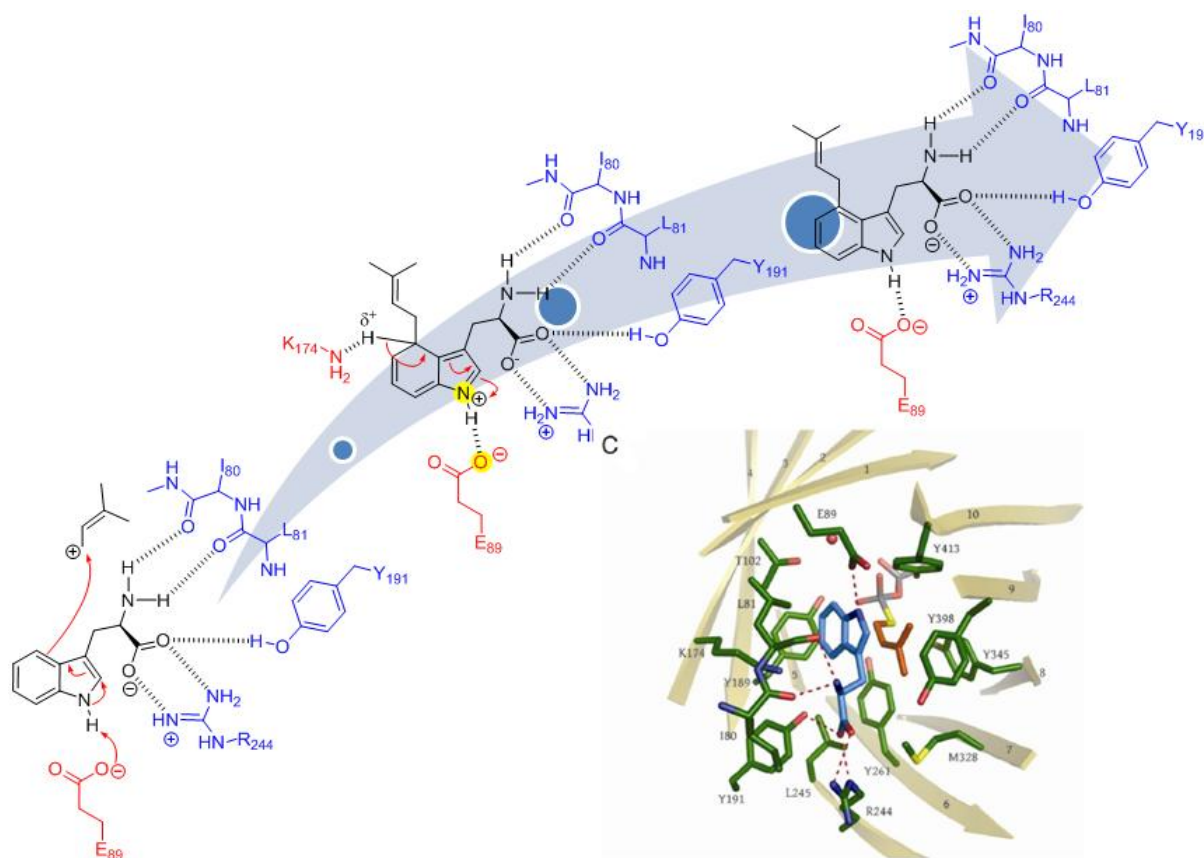
-Figure 3- liaisons hydrogène qui se forment avec le diphosphate dans le centre actif de l'enzyme diméthylallyle tryptophane synthase.

Nous trouvons aussi une forte proximité entre les substrats, assez forte pour que le tryptophane lui-même stabilise le cation allylique par  $\pi$ -stacking de la même façon que la tyrosine-345 stabilise aussi le carbocation qui est maintenu dans une poche de tyrosine qui le protège de l'eau (Figure 4).

-Figure 4- Positionnement du tryptophane et du carbocation allylique au centre actif de l'enzyme diméthylallyle tryptophane synthase.



Finalement la réaction à proprement parlé a lieu grâce à l'activation du substrat *via* une liaison hydrogène avec l'indole <sup>14,15</sup> (Schéma 8).



-Schéma 8- Mécanisme chimique de la réaction enzymatique de la DMAT synthase.

Recemment, le groupe de Schmidt<sup>16</sup> a décrit pour la première fois des réactions de prénylation (normale et inverse) dans le cadre des peptides ribosomale.

Leur étude est basée sur une famille de peptides macrocycliques appelés cyanobactines qu'expérimentent des réactions de prénylation catalysées parmi des protéines *O*-prényltransférases de la famille LynF/TruF isolées de *Lyngbya aestuarii*.

Ces prényltransférases prénylent les cyanobactines au niveau des atomes d'oxygène, présents sur la sérine, la thréonine et la tyrosine. Ces enzymes catalysent autant la prénylation normale (C-1 du DMAT (**159**)) comme l'inverse (C-3 du DMAT (**159**)), dépendant du résidu à prényler, voire dans le cas de la sérine (Ser) et la thréonine (Thr) la prénylation que nous trouvons c'est la prénylation dite « normale » et avec la tyrosine (Tyr) nous trouvons plutôt la « inverse ».

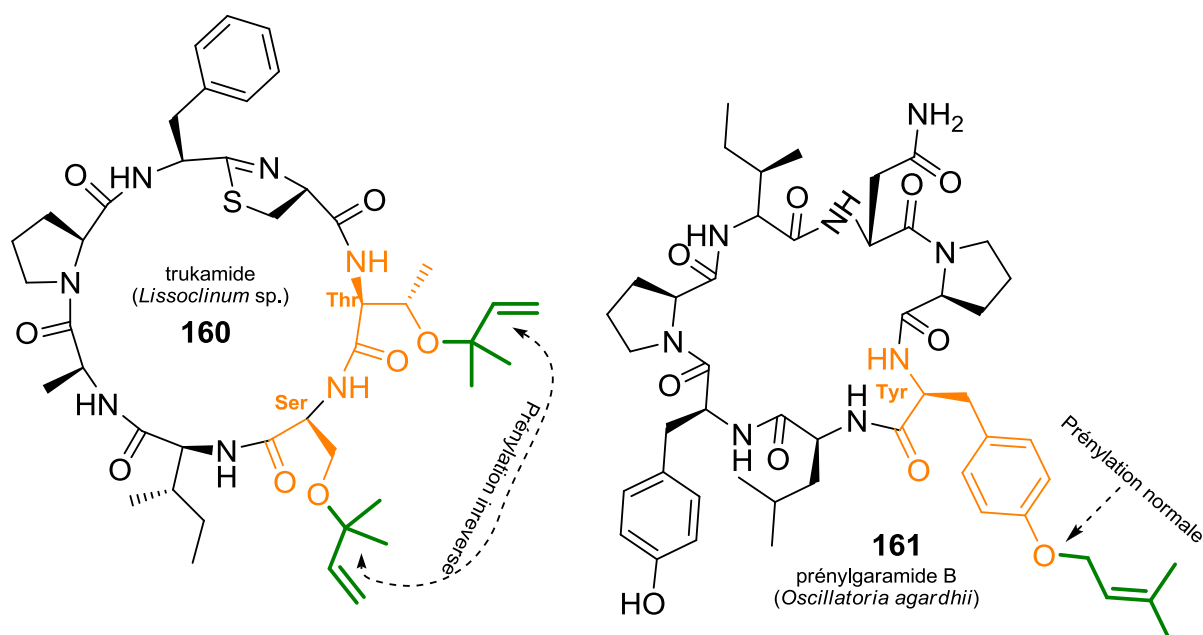


*Lyngbya aestuarii*

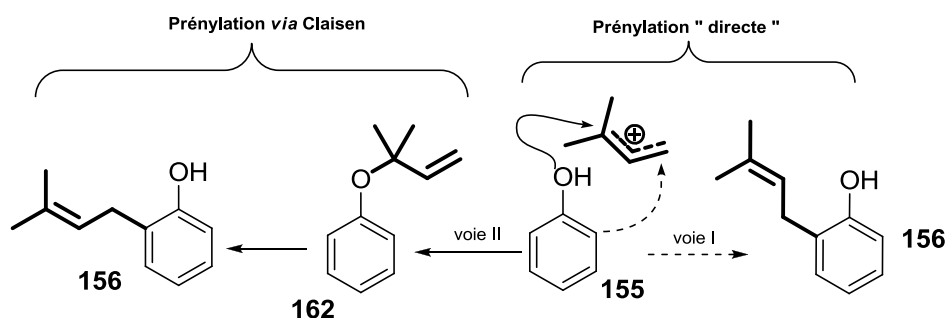
Complétant l'étude de ces prényltransférases, ils ont caractérisé des cyanobactines prénylées (**160** et **161**) (Schéma 9) et ont postulé deux hypothèses pour aboutir à cette prénylation. Ce résultat est à la base de deux propositions mécanistiques. À savoir, qu'une C-prénylation pourrait être aboutie de façon directe *via* un substituant électrophile

aromatique (voie I) ou bien de façon indirecte *via* une prénylation sur un hydroxyle aromatique suivie du réarrangement de Claisen\* (voie II) (Schéma 9).

A



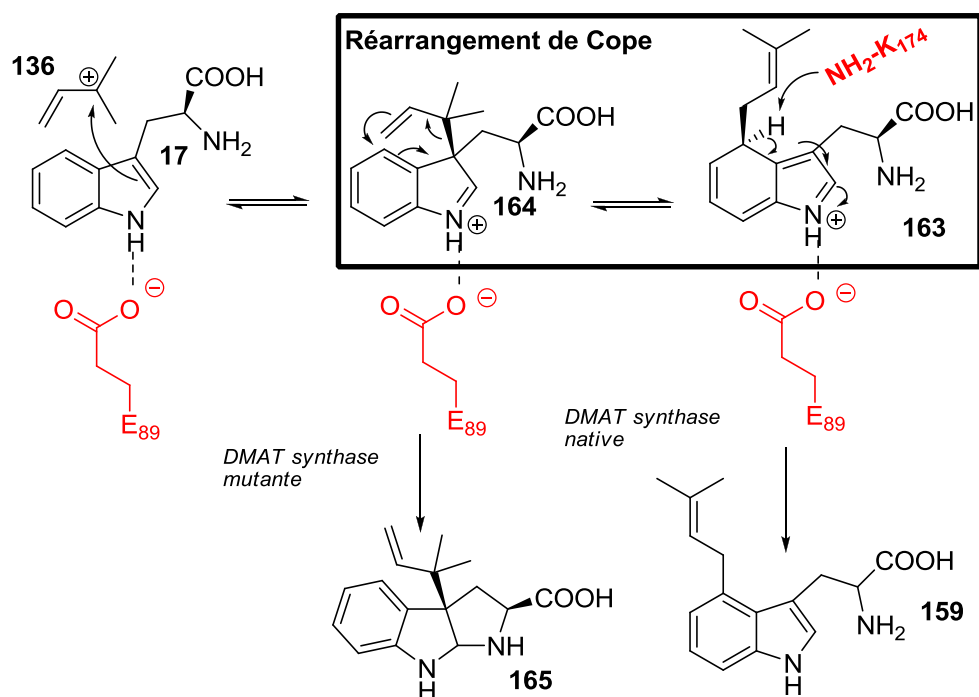
B



-Schéma 9- A. Cyanobactines représentatives (prénylation normale et inverse). B. Deux mécanismes chimiques possibles pour la réaction de C-prénylation directe (voie I) et Claisen (voie II).

Pour compléter cette introductions nous voulons mentionner le travail développé par le groupe de Tanner (Vancouver, Canada) qui a étudié la réaction enzymatique de la DMAT synthase par mutation de cette enzyme. Ils ont observé que la DMAT synthase native catalyse la prénylation en position C-4 du tryptophane (**17**)<sup>17</sup>. Mais un des mutants, concrètement la mutation *Lys174Ala* donne lieu à une « *prénylation inverse* » en position C-3.

Ce résultat est à la base d'une nouvelle proposition mécanistique pour cette prénylation. À savoir, qu'une prénylation inverse initiale en C-3 pourrait être suivie d'un réarrangement de Cope\*\* puis d'une aromatisation (Schéma 10)



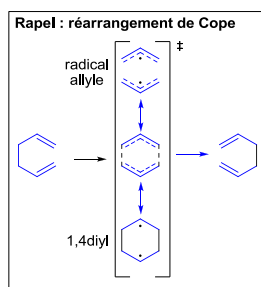
-Schéma 10- Mécanisme de la réaction enzymatique de la DMAT synthase par réarrangement de Cope.

Pour illustrer les multiples possibilités biosynthétiques liées à la prénylation des cycles aromatiques, nous nous attarderons sur deux cas particuliers : nous détaillerons la biosynthèse de l'acide lysergique (**166**) comme étant représentative de la prénylation en série indolique puis nous verrons la biosynthèse du noyau benzopyrène, étudié avec la diméthylpyranocoumarine avicennol (**11**).

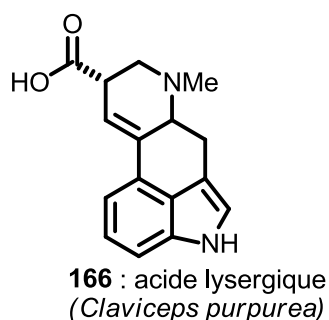
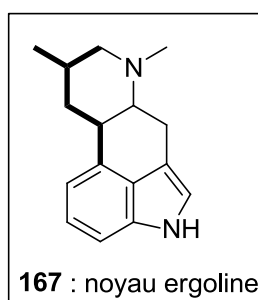
## b– Origine biosynthétique de l'acide lysergique

Un cas particulier se présente avec les alcaloïdes caractérisés dans le champignon *Claviceps purpurea* aussi appelé « ergot de seigle », un champignon susceptible de parasiter des

- 16 McIntosh J. A., Donia M. S., Nair S. K., Schmidt E. W., Enzymatic basis of ribosomal peptide prenylation in cyanobacteria, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 13698.
- 17 Luk L. Y. P., Qian Q, Tanner M. E., A cope rearrangement in the reaction catalyzed by dimethylallyltryptophan synthase?, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 12342.
- 18 Dewick P. M., *Medicinal natural products : A biosynthetic approach*. Third edition (Wiley), 2009.
- \* Remarquons que la prénylation a lieu à 37 °C cela signifie que le réarrangement de Claisen a lieu ici sans un apport thermique important.
- \*\* Ainsi, la réaction en tant que réarrangement sigmatropique [3,3] thermique, procède par un mécanisme concerté par l'intermédiaire d'un état de transition cyclique à 6 chaînons :



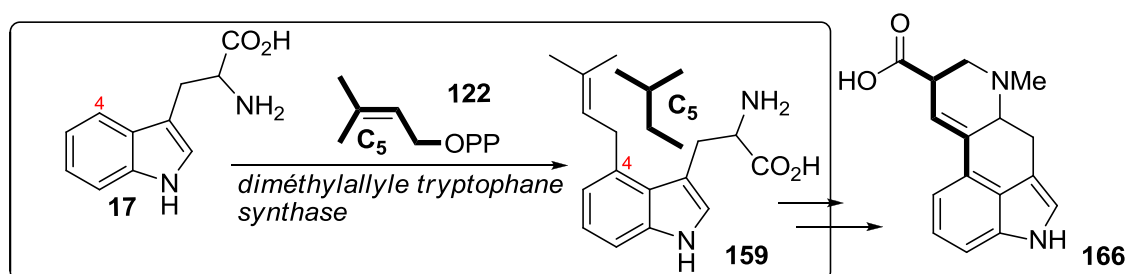
Poacæ. Les alcaloïdes de l'ergot ou ergolines (**167**) sont les produits d'une combinaison des métabolismes du champignon et de la plante, ces alcaloïdes peuvent être biosynthétisés aussi par cultures de champignons des genres *Claviceps*, *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Penicillium* (production industriel). Il est aussi possible de les isoler dans les plantes de la famille des Convolvulaceae (Figure 5)<sup>18</sup>.



La structure de ce type d'alcaloïdes est très originale avec à la base une structure très conservée (Figure 5).

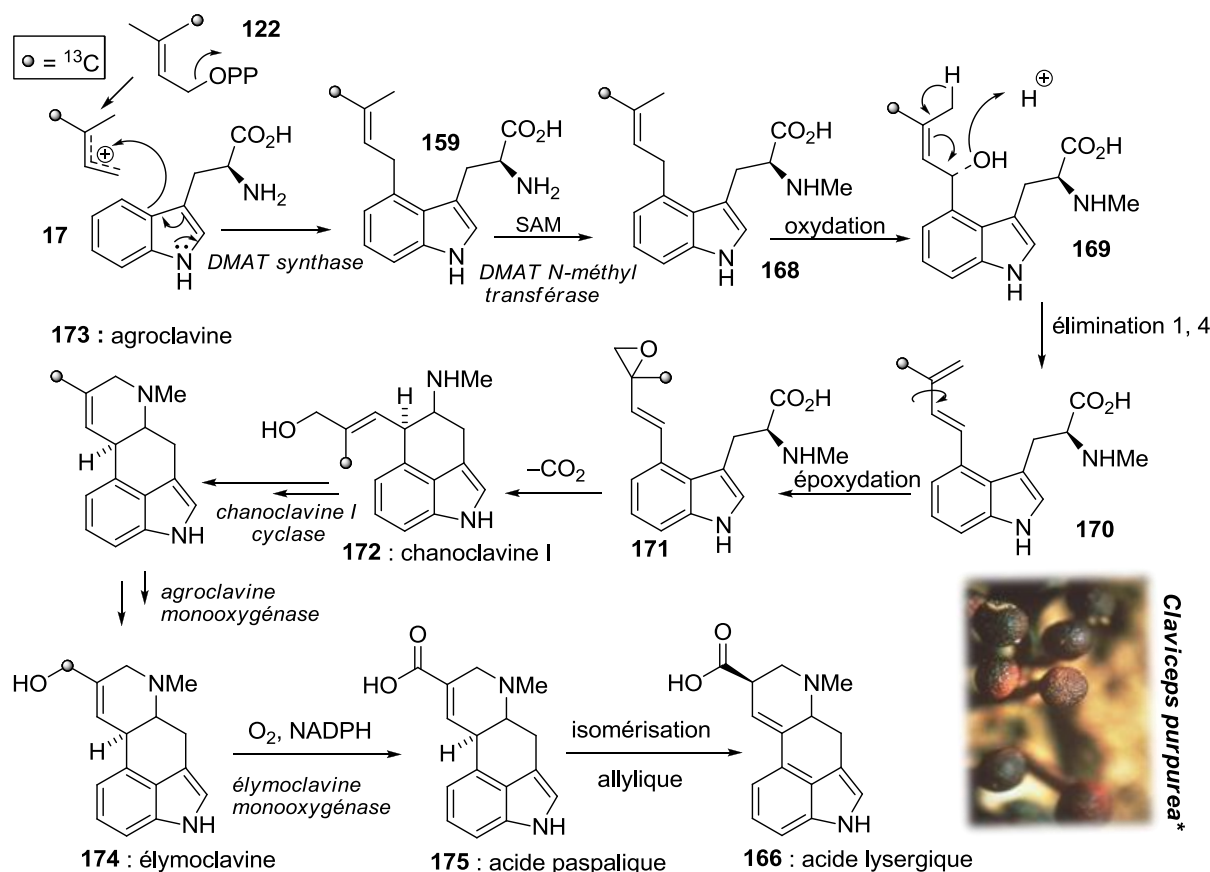
-Figure 5- Structure des noyaux acide lysergique (**166**) et du noyau ergoline (**167**).

La possibilité de réaliser des cultures saprophytiques de l'ergot de seigle a grandement facilité l'étude de la biogenèse de ces molécules. Si quelques points restent à préciser, les grandes étapes qui conduisent, chez le champignon, à l'élaboration des alcaloïdes sont maintenant bien décrites (Schéma 11)<sup>18</sup>.



-Schéma 11- Structure et origine biosynthétique de l'acide lysergique **166**.

Les expériences de marquage isotopique montrent que les précurseurs de l'enchaînement de l'acide lysergique (**166**) sont le tryptophane (**17**) et le diméthylallyle diphosphate (DMAPP) (**122**).

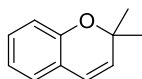


-Schéma 12- Origine biosynthétique de l'acide lysergique (166) chez *Claviceps purpurea*.

Une fois synthétisé le 4-diméthylallyl tryptophane (**159**), l'étape suivante conduit à la chanoclavine (**172**), dans cette étape le DMAT est décarboxylé et son azote méthylié. Le méthyle est ensuite oxydé en hydroxyméthyle et la double liaison isomérisée devenant Z. Au cours de l'étape suivante, la double liaison est une deuxième fois isomérisée devenant E, l'hydroxyméthyle est encore oxydé en aldéhyde puis réagit avec l'amine secondaire, donnant par fermeture du cycle D la formation de l'agroclavine (**173**). Ultérieurement, une mono-oxygénase induit l'hydroxylation du méthyle en C-8 pour donner l'élymo-clavine (**174**) et son l'alcool primaire est oxydé pour donner l'acide paspalique (**175**), ces deux réactions sont catalysées par un cytochrome P-450. L'acide lysergique (**166**) se forme par isomérisation allylique spontanée (Schéma 12)<sup>18</sup>.

\* Photographie obtenue de : <http://ephytia.inra.fr>

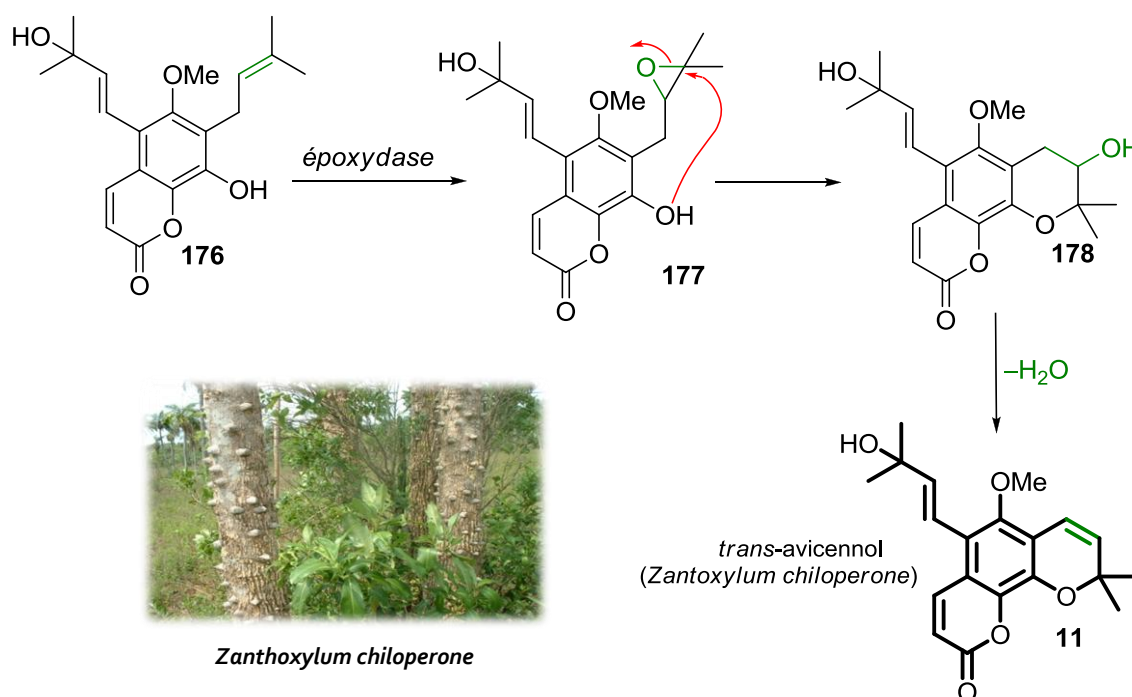
\*\* Pour plus de commodité nous allons appeler le noyau « 2,3-diméthyl-2H-1-benzopyrane » comme « diméthylbenzodéhydro-pyrane » ou simplement « benzopyrane » ou « pyrano » (dans le cas par exemple des pyranocoumarines).



2,3-diméthyl-2H-1-benzopyrane

### 3- Biosynthèse des diméthylbenzodéhydropyranes\*\*

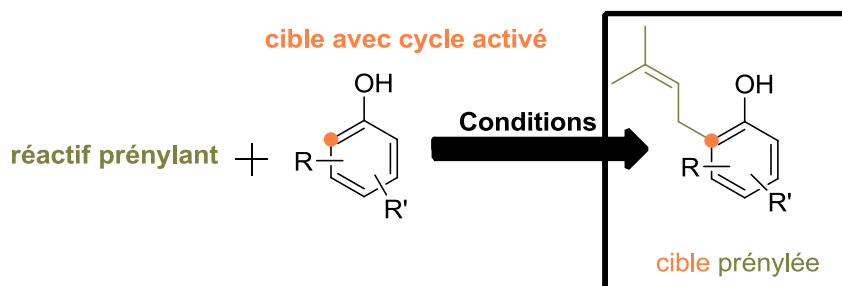
La possibilité d'époxydation enzymatique de la double liaison présente sur l'unité prényle laisse envisager l'accès à plusieurs molécules. Le cas de la formation du noyau diméthylbenzobenzopyrene est particulier, parce que cette époxydation devient le « point de non retour » pour une série de réactions où la présence d'un hydroxyle phénolique en *ortho* sur le cycle aromatique est indispensable. Sur le schéma 13 nous pouvons voir la voie de formation du noyau diméthylbenzopyrane illustrée par la diméthylbenzopyranecoumarine *trans*-avicennol (**11**), isolée pendant cette thèse (voir chapitre 1).



-Schéma 13- Biosynthèse du noyau diméthylbenzopyrane dans le cas particulier du *trans*-avicennol (**11**).

## II- Les méthodes de prénylation des molécules en synthèse organique

### A- Schéma général



-Schéma 14- Idée générale de la réaction de prénylation.

## 1– Prénylation directe

Le schéma 14 nous montre l'idée générale de prénylation directe. Le reste prényle se fixe aux carbones aromatiques activés sans n'avoir aucun contact avec l'hydroxyle aromatique. Les paires d'électrons non partagées de l'oxygène se délocalisent par résonance et donnent une augmentation de sa densité électronique, en particulier dans les positions *ortho* et *para*.

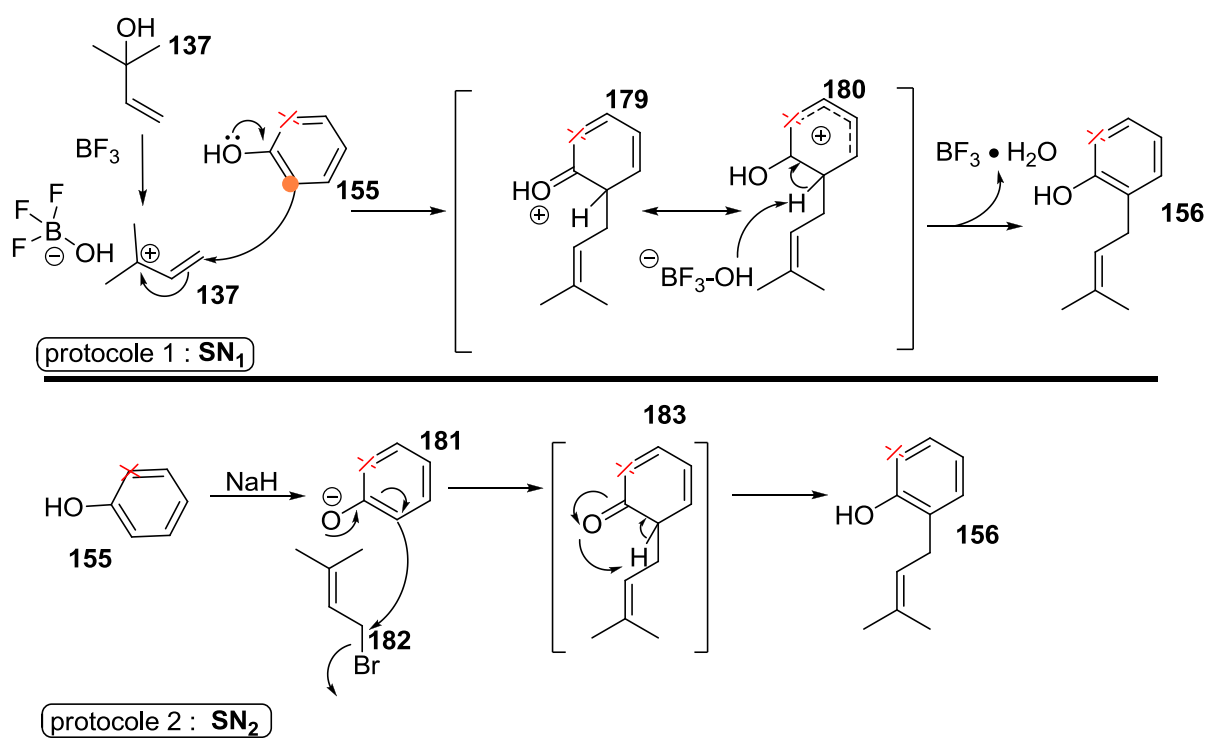
### a– Prénylation directe par réaction apparentée à la réaction de Friedel-Crafts

Les méthodes que nous allons décrire ici sont les plus proches des voies de prénylation utilisées dans la nature. Nous verrons qu'il sera plus difficile au laboratoire d'atteindre le niveau de régiosélectivité des enzymes prényltransférases. Globalement, nous trouvons un composant commun dans toutes les méthodes : un **substrat phénolique** (avec un ou plusieurs hydroxyles). Dans chacun des différents protocoles que nous pouvons trouver des réactifs différents sont utilisés:

- i-* dans le protocole appelé **1** au schéma 15, le réactif employé est le 2-méthyl-but-3-èn-2-ol (**137**), ce protocole nous pouvons le trouver, par exemple, publié dans le travail de l'équipe de Christian Marazano<sup>19</sup> de l'ICSN à Gif-sur-Yvette et le travail du groupe de Puri (Lucknow, Inde)<sup>20</sup>. La prénylation par ce protocole a lieu en **milieu acide de Lewis** (BF<sub>3</sub>) par une réaction de type SN<sub>1</sub> entre un composé phénolique (**155**) et un carbocation prényle (**137**).
- ii-* dans le protocole appelé **2**, le réactif employé est le bromure de prényle (**182**), ce protocole est, par exemple, détaillé dans les travaux du groupe de Puri<sup>20</sup>. La prénylation par ce protocole a lieu en **milieu basique** (NaH) par une réaction de type SN<sub>2</sub> avec un composé phénolique (**155**).

En prenant comme exemple un dérivé schématique du phénol avec seulement une position en *ortho* activée (Schéma 15), nous pouvons illustrer les mécanismes respectifs de prénylation directe avec les protocoles **1** et **2** (Schéma 15).





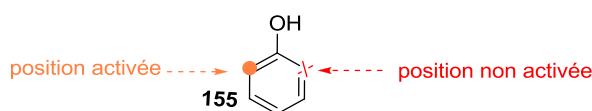
-Schéma 15 : Protocoles de prénylation directe\*.

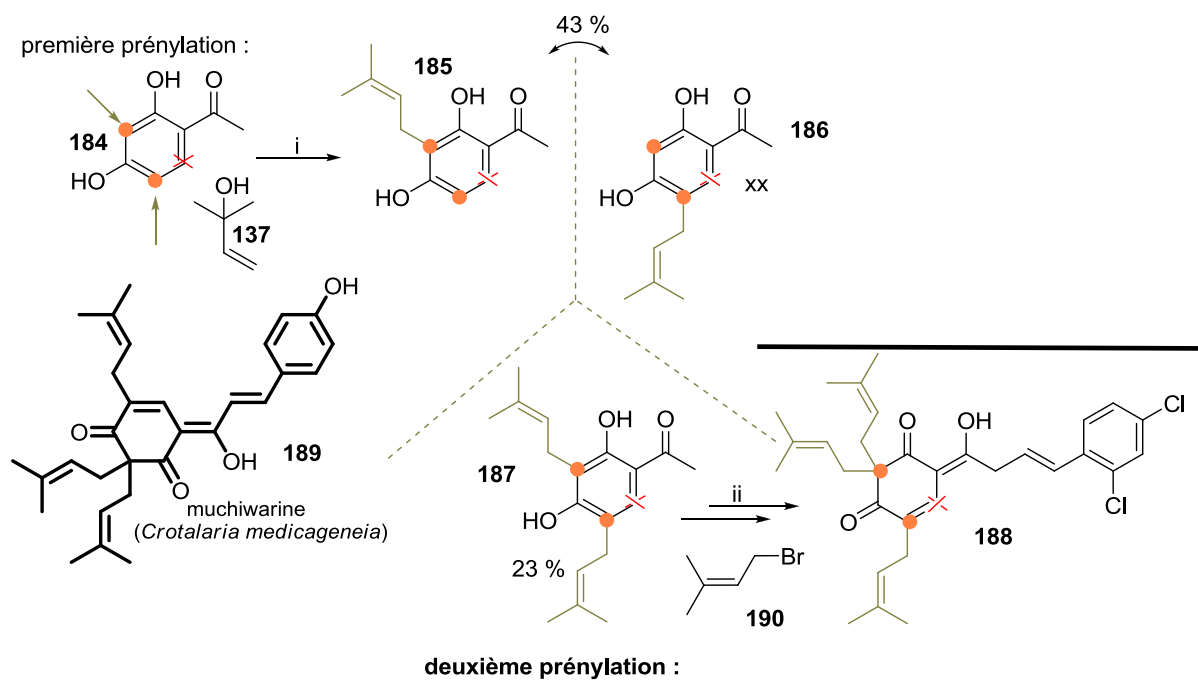
Pour illustrer le mécanisme de prénylation directe, nous allons étudier un de ces protocoles avec plus de détails. En 2007, le groupe de Puri a publié une voie de prénylation pour synthétiser la muchiwarine (**189**)<sup>20</sup>, une chalcone triprénylée isolée de *Crotalaria medicagenia*. Dans ce protocole nous pouvons trouver une première étape de prénylation où l'unité prényle est fixée en deux positions activées du cycle aromatique de la 2,4-dihydroxy-3,5-acétophénone (**184**) (représentées par un point de couleur orange), avec un rendement global de prénylation d'environ 66 %. Les réactifs employés pour effectuer cette étape de prénylation sont le 2-méthyl-but-3-èn-2-ol (**137**) et un acide de Lewis, dans ce cas  $BF_3 \cdot Et_2O$  (Schéma 16).

19 Raikar S. B., Nuhant P., Delpech B., Marazano C., Synthesis of polyprénylated benzoylphloroglucinols by regioselective prénylation of pohlorglucinol in an aqueous medium, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1358.

20 Narender T., Reddy K. P., Shweta, Srivastava K., Mishra D. K., Puri S. K., Total synthesis of munchiwarin, a triprénylated chalcone from *Crotalaria medicagenia*, *Org. Lett.* 2007, 9, 5369.

\*

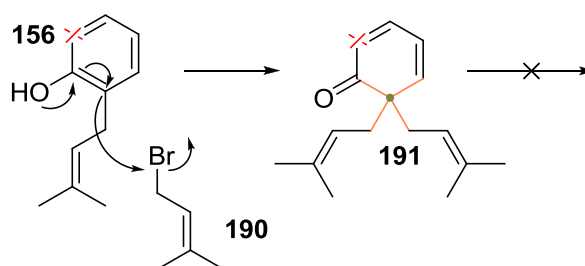




**Réactifs et conditions :** (i)- première réaction de prénylation :  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , 1,4-dioxane,  $\text{N}_2$ , t. a., 1 h (54 %), (ii)- deuxième réaction de prénylation : 1-bromo-3-méthyl-but-2-ène, NaH, DMF,  $-50^\circ\text{C}$ , 2 h (83 %).

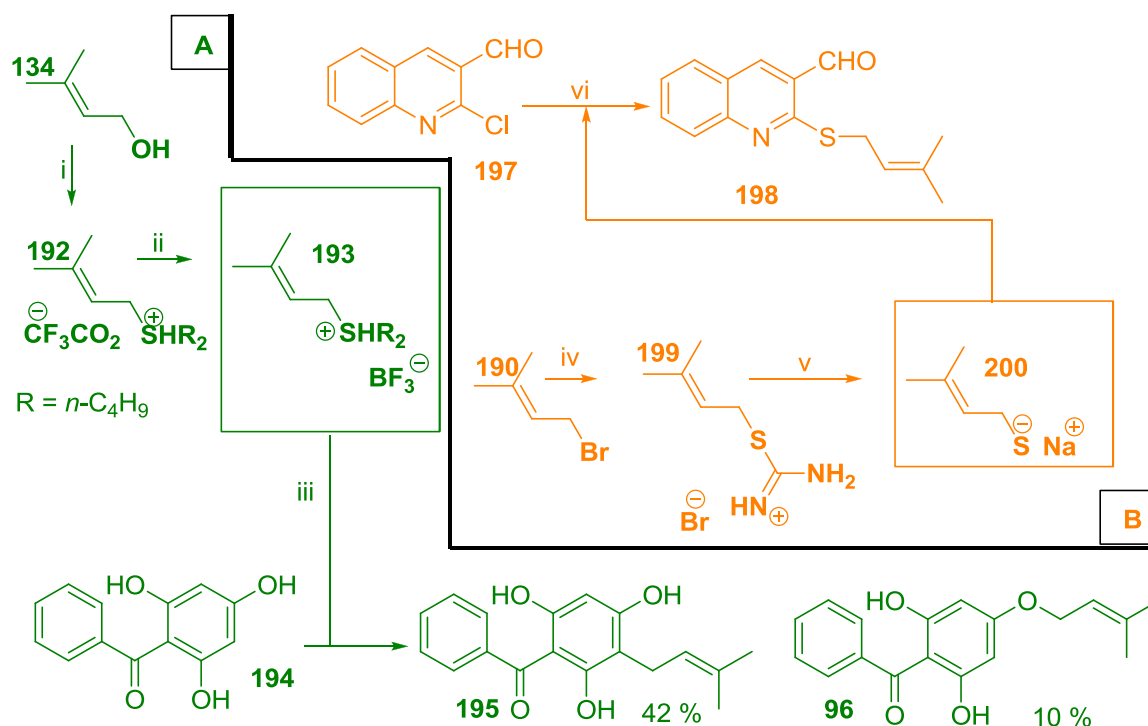
-Schéma 16- protocole de prénylation massive développé pour synthétiser la muchiwarine (189).

Avec ce protocole de synthèse ils ont réussi à isoler deux produits monoprénylés **185** et **186** (43 %), et un produit diprénylé **187** (23 %). La cible qu'ils se sont fixée (**189**), présente deux curiosités dans sa structure : une diprénylation sur une même position et un cycle central ayant perdu son aromaticité. Pour introduire cette dernière unité prényle dans la structure et réussir la désaromatization en une étape, ils ont employé le protocole appelé 2 dans le schéma 17<sup>20</sup>.



-Schéma 17 : Diprénylation directe.

Une autre voie de prénylation a été publiée pour l'équipe de Marazano. Elle présente comme originalité l'activation de l'unité prénylante par la synthèse de sels de sulfonium du prényle en question (**192** et **193**) en partant du prényl correspondant (**134**). Dans cette réaction, en une seule étape, un produit prénylé est obtenu (Schéma 17)<sup>21</sup>.



**Réactifs et conditions :** (i) 4 équiv.  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20 °C, 20 h ; (ii)  $\text{HBF}_4$  (34 % dans  $\text{H}_2\text{O}$ ), MeOH, 20 °C, 1 h (99 %) ; (iii) 1,1 équiv. base de Hünigs,  $\text{CHCl}_3$ , t. a., 7 h ; (iv) tiourée, éthanol, reflux ; (v) NaOH excès ; (vi) éthanol, reflux.

**-Schéma 17-** Activation des unités prénylantes (134 et 190) par formation de sels de sulfonium.

Un objectif envisagé dans ce travail est une nouvelle conception de réactions de prénylation : la prénylation dans des conditions « neutres »\* (Schéma 17 A). Avec l'emploi des sels de sulfonium une alternative utile à l'emploi des acides de Lewis et des conditions basiques fortes pour prényler est mise à disposition<sup>20</sup>. Une approche très similaire a été développée par le groupe de Raghunathan (Chennai, Inde), ils ont réussi à faire des composés thioprénylés par réaction entre les sels de sulfonium du prényle (200) et des composés aromatiques chlorés (197)<sup>22</sup> (Schéma 17 B).

## b– Prénylation directe via des réactions organométalliques

L'équipe de Nishiyama (Yokohama, Japon), a fait une incursion dans l'étude de la synthèse de produits prénylés afin d'accéder à l' $\alpha$ -mangostine (201)<sup>23</sup>, une substance naturelle isolée de *Garcinia mangostana*. Cette équipe a réalisé la réaction de prénylation avec le bromure de prényle (190) et  $n\text{BuLi}$  : un produit prénylé a été obtenu directement en une seule étape (Schéma 18). Cette méthode permet un accès rapide aux produits prénylés et a aussi été

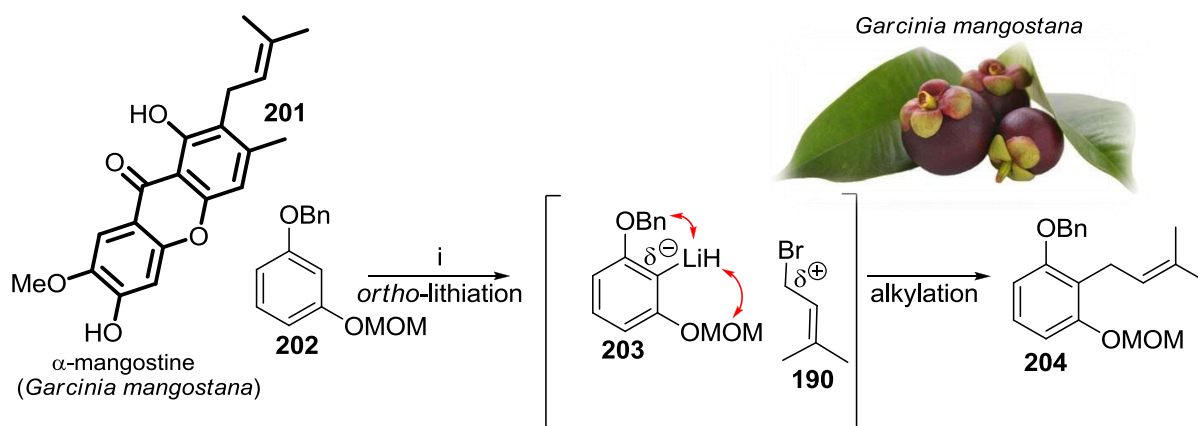
<sup>21</sup> Brajeul S., Delpéch B., Marazano C., Sulfonium salts as prenyl, geranyl, and isolavandulyl transfer agents towards benzoylephloroglucinol derivatives, *Tetrahedron Lett.* 2007, **48**, 5597.

<sup>22</sup> Ramesh E., Sree Vidhya T. K., Raghunathan R., Indium chloride/silica gel supported synthesis of pyrano/thiopyranoquinolines through intramolecular imino Diels-Alder reaction using microwave irradiation, *Tetrahedron Lett.* 2008, **49**, 2810.

<sup>23</sup> Iikubo K., Ishikawa Y., Ando N., Umezawa K., Nishiyama S., The first direct synthesis of [ $\alpha$ ]-mangostin, a potent inhibitor of the acidic sphingomyelinase, *Tetrahedron Lett.* 2002, **43**, 291.

\* Les protocoles emploient en général des conditions acides ou basiques (Schéma 17).

employée par le groupe de Marazano pour la préparation de dérivés géranyle-, isolavandulyle- et lavandulyle- du phloroglucinol<sup>19</sup>. Une approche similaire été publiée par l'équipe de Pettus<sup>24</sup> (Santa Barbara, USA).



**Réactifs et conditions :** (i) *n*BuLi ; bromure de prényle, THF, 0 °C.

-Schéma 18- Prénylation *via* une réaction d'*ortho*-métallation.

Finalement, parmi les approches se basant sur les réactions pallado-catalysées, nous pouvons citer ici le travail de Xuegong She (Lanzhou, Chine) qui réussit à faire la prénylation en position 5 d'un indole par un couplage de Stille catalysé par Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> et employant le bromure de prényle (**190**) comme agent prénylant et une molécule de tryptophane avec toutes ses positions réactives protégées (**205**)<sup>25</sup>. Dans cette publication nous trouvons décrite aussi la « **prénylation inverse** » (**208**), qui consiste en l'accrochage de l'unité prénylée par sa position 3. Pour réussir cette prénylation inverse, ils ont déprotégé l'azote de l'indole de la molécule de tryptophane prénylé (**206**), et fait réagir cette molécule avec l'hypochlorite de *tert*-butyle pour conduire à la formation d'une 3-chlorindolénine instable (**207**) qui va être couplée avec le prényl-9-BBN<sup>\*\*</sup> pour donner le dérivé du tryptophane 2,5-disubstitué (Schéma 19).

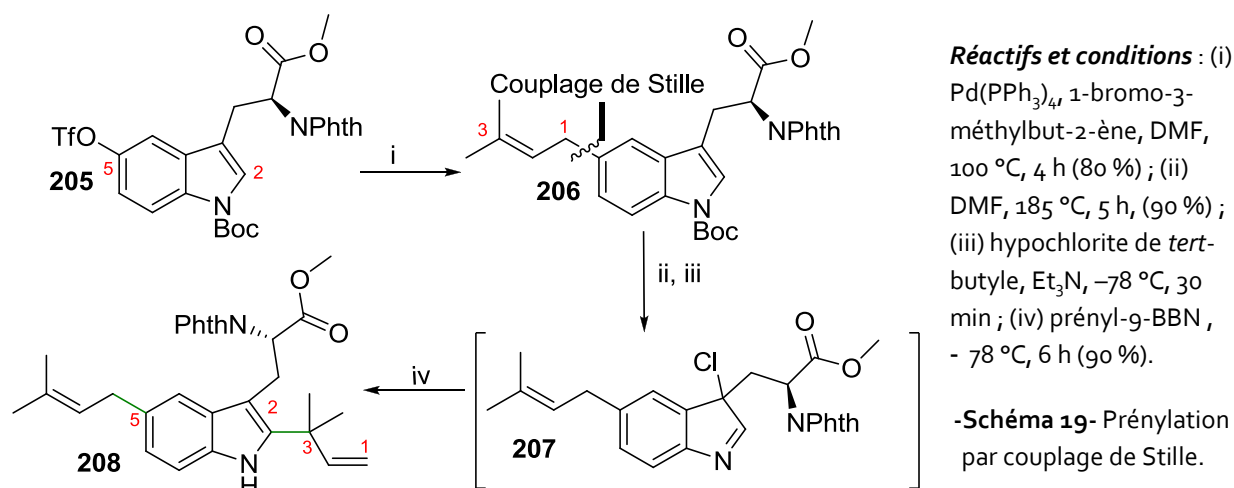
<sup>24</sup> Hoarau T, Pettus C. R. R., Strategies for the preparation of differentially protected *ortho*-prenylated phenols, *Synlett.* 2003, 127.

<sup>25</sup> Dai Q., Xie X., Xu S., Ma D., Tang S., She X., Total syntheses of tardoioxopiperazine A, isoechinulin A, and varicolorin C, *Org. Lett.* 2011, **13**, 2302.

\*\*

**Signification :**

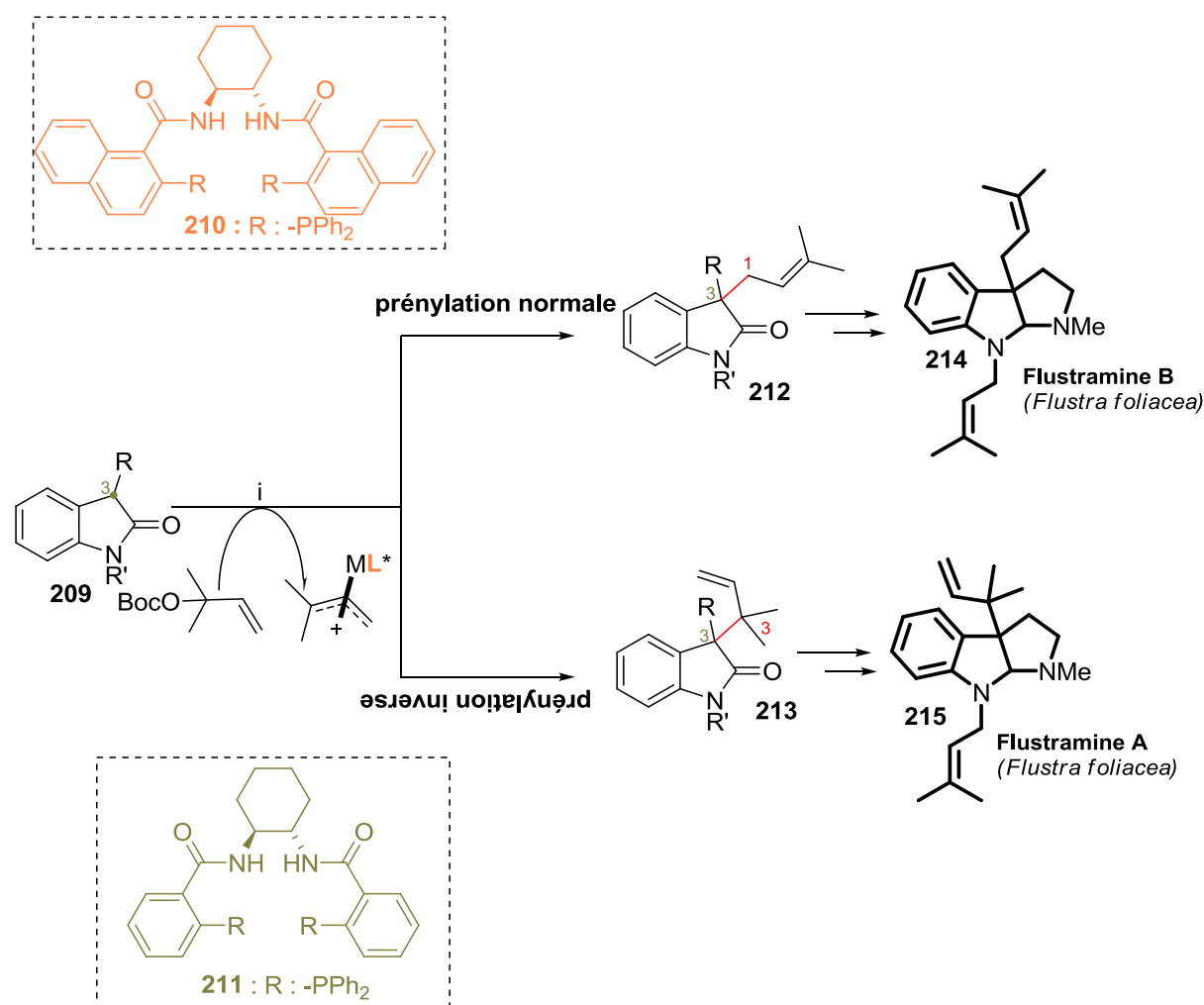
prényl-9-BBN : prényl- 9-borabicyclo[3.3.1]nonane  
Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> : tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium(o)



Nous pouvons trouver un autre application des réactions pallado-catalysées pour obtenir des dérivés prénylés avec le travail de l'équipe de Walter H. Chan (Stanford, USA), avec la singularité de pouvoir prényler la position 3 d'un oxindole (**209**)<sup>26</sup>. Dans ce travail, ils ont décrit également une prénylation inverse (S<sub>N</sub>2') de cette même position de l'oxindole. Cette dualité est le point le plus fort de cette publication, ils ont effectué un travail méthodologique de cette réaction pallado-catalysée en employant plusieurs ligands et ont contrôlé sélectivement l'accrochage de l'unité prénylante de façon normale (par sa position 1) ou de façon inverse (par sa position 3). L'oxindole prénylé de façon normale (**212**) ou de façon inverse (**213**) va être la base de la synthèse des flustramines A (**215**) et B (**214**), ces alcaloïdes prénylés sont isolés du bryozoaire marin *Flustra foliacea*<sup>27</sup>.

<sup>26</sup> Trost B. M., Malhotra S., Chan W. H., Exercising regiocontrol in palladium-catalyzed asymmetric prenylations and geranylations : Unifying strategy toward flustramines A and B, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 7328.

<sup>27</sup> Kawasaki T., Shinada M., Ohzono M., Ogawa A., Terashima, R., Sakamoto M., Total synthesis of (±)-flustramines A and C, (±)-flustramide A, and (-) and (+)-debromoflustramines A, *J. Org. Chem.* 2008, **73**, 5959.



**Réactifs et conditions :** (i)  $Pd_2dba_3 \cdot CHCl_3$ , 7,5 mol% **ligand**, 30 mol % TBAT,  $CH_2Cl_2$ .

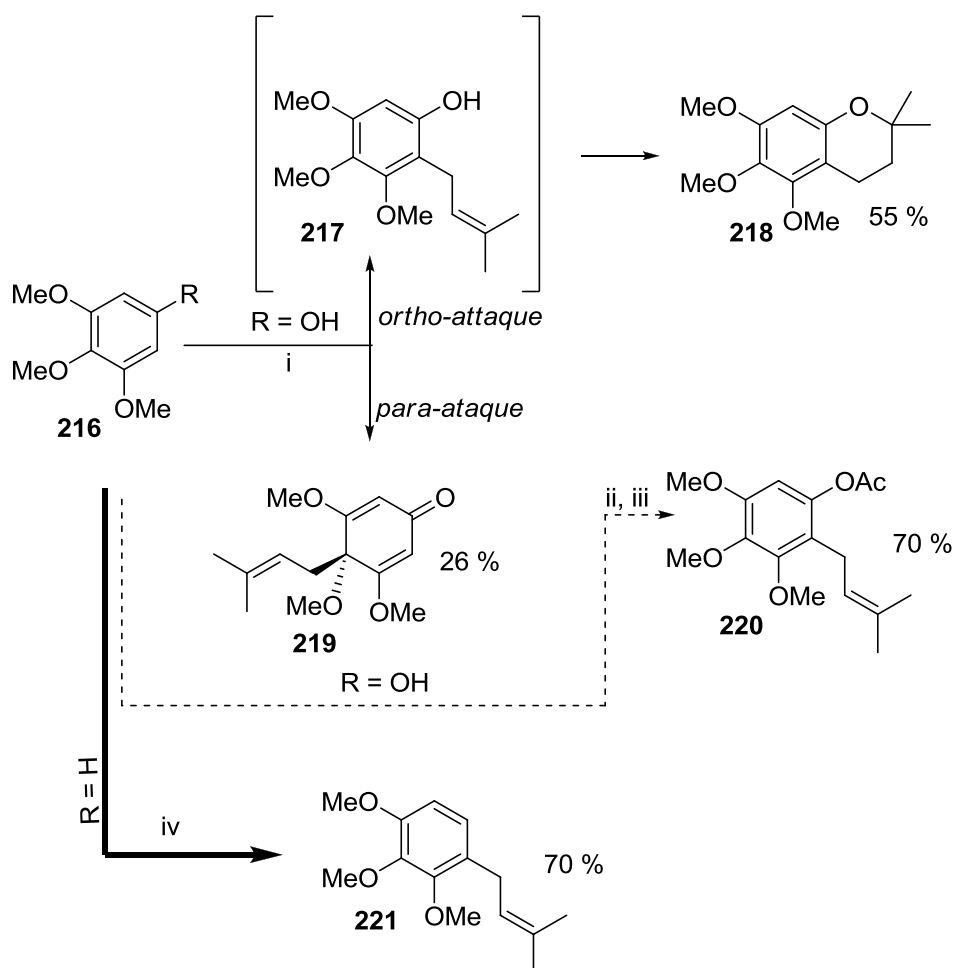
-Schéma 20- Réaction de prénylation asymétrique pallado-catalysée.

### c- Prénylation directe *via* des réactions organométalliques *via* réarrangement d'aryle prényle ethers

Finalement, une dernière synthèse a été développée par le groupe de Caggiano<sup>28</sup> qui présente une remarquable versatilité, donnant accès facilement à dérivés de diméthylbenzopyranes (**218**) et prénylés (**219-221**), parmi des réactions de réarrangement catalysées par le  $Bi(OTf)_3$ .

28 Judd K. E., Caggiano L.,  $Bi(OTf)_3$ -catalysed prenylation of electron-rich aryl ethers and phenols with isoprene: a direct route to prenylated derivatives, *Org. Biomol. Chem.* 2011, **9**, 5201.

29 Tseng T. H., Chuang S. K., Hu C. C., Chang C. F., Huang Y. C., Lin C. W., Lee Y. J., The synthesis of morusin as a potent antitumor agent, *Tetrahedron* 2010, **66**, 1335.

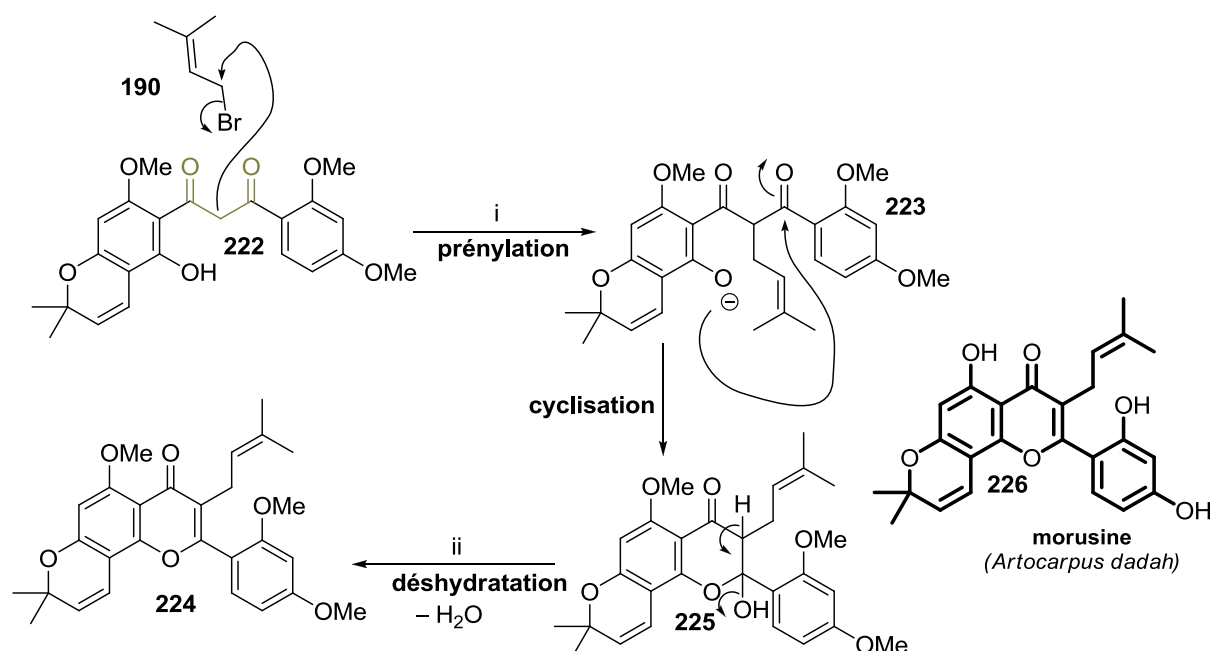


**Réactifs et conditions :** (i) Bi(OTf)<sub>3</sub> (10 % mol), isoprène (2 équiv.), toluène, 40 °C, 18 h ; (ii) Ac<sub>2</sub>O (1.5 équiv.), Bi(OTf)<sub>3</sub> (10 % mol) ; (iii) isoprène (2 équiv.), toluène, 40 °C, 1 h ; (iv) Bi(OTf)<sub>3</sub> (10 % mol), isoprène (2 équiv.), toluène, 20 °C, 18 h

-Schéma 21- Synthèse de diméthylbenzopyranes et prényles basée sur un réarrangement d'aryle prényle ether.

## 2– Prénylation de composés 1,3-dicarbonylés

Un cas particulier est décrit par l'équipe de Yean-Jang Lee (Changhua, Taiwan), ils ont travaillé sur la synthèse de prényl flavonoïdes<sup>29</sup>, et ont trouvé une voie intéressante de prénylation que nous pouvons appeler le « **prénylation pseudodirecte** ». Dans ce protocole de synthèse, ils ont travaillé avec un composé (222) qui présente une singularité : c'est un composé 1,3-dicarbonylé, se caractérisant par une forte densité électronique en position en  $\alpha$ . En milieu basique, la prénylation est possible mais une intéressante cyclisation a également lieu conduisant à la *O*-triméthylmorusine (226), analogue méthoxylé d'une flavone naturelle isolée d'*Artocarpus dadah*.



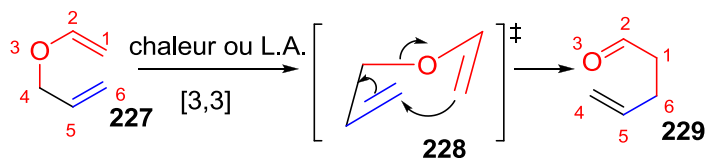
**Réactifs et conditions :** (i) LDA, bromure de prényle; (ii) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/AcOH (76 %).

-Schéma 22- Réaction de « pseudoprénylation ».

### 3- Prénylation *via* la transposition de Claisen

#### a- Rappel sur la réaction de Claisen

En 1912, L. Claisen décrit le réarrangement des éthers d'allyl-phényles pour donner des C-allyl-phénols<sup>30</sup> (Schéma 23). Nous appellerons transposition de Claisen un réarrangement thermique sigmatropique [3,3] des éthers d'allyle vinyliques (**227**), donnant comme résultat le composé carbonylé correspondant insaturé (**229**). Le traitement est thermique ou réalisé en présence d'un acide de Lewis (Schéma 23). Le réarrangement de Claisen se déroule de préférence par un état de transition « chaise » (**228**). Un état de transition « bateau » est également possible, et peut conduire à la formation des mêmes produits (Schéma 23).



-Schéma 23- Transposition de Claisen d'un éther d'allyle vinylique (**227**)<sup>\*</sup>.

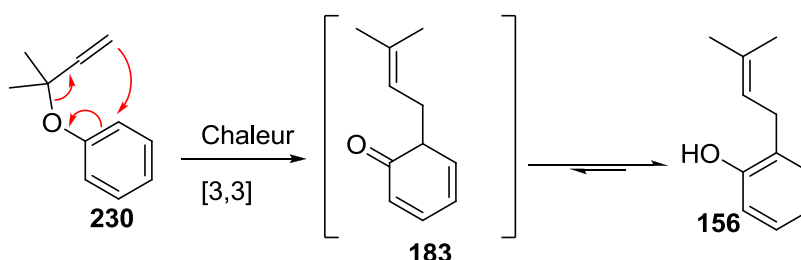
Si nous regardons le mécanisme de la réaction, la transposition des éthers des phénols (**230**) se déroule dans des conditions thermiques précises et donne lieu à un réarrangement qui

<sup>30</sup> Claisen L., Lowman O., Base-catalyzed condensation of an ester containing an  $\alpha$ -hydrogen atom with a molecule of the same ester or a different one to give  $\beta$ -keto esters, *Chem. Ber.* 1887, 20, 651.

\* En toute rigueur nous ne pouvons pas utiliser le symbolisme des flèches.



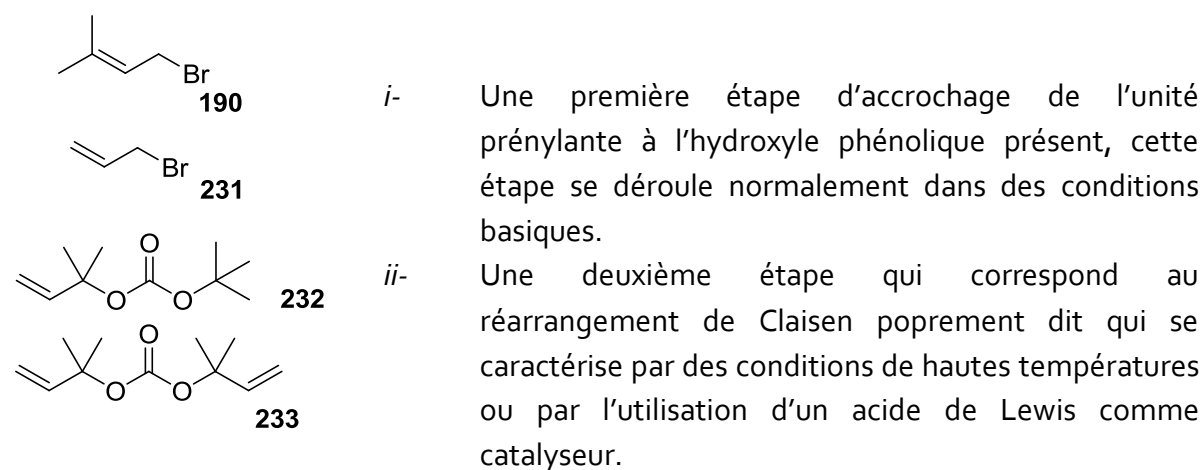
est accompagné d'une désaromatisation (intermédiaire **183**), pour finir avec une réaromatisation donnant le produit final (**156**) (Schéma 24). Une telle réaction a été appliquée à une réaction de prénylation fort utile et efficace.



-Schéma 24- Transposition de Claisen d'un éther d'allyl phényle (**230**) pour donner un C-allyl phénol (**156**).

## b– Quelques exemples représentatifs

Diverses approches peuvent être exploitées pour procéder à la prénylation *via* un réarrangement de Claisen. Dans les différentes synthèses décrites dans la littérature, nous trouvons comme produit de départ un composé avec une fonction hydroxyle phénolique et présentant des carbones aromatiques activés et plusieurs réactifs agissant comme unité prénylante : le bromure de prényle (**190**), le bromure d'allyle (**231**), le carbonate de *t*-butyl 1,1-diméthylpropényle (**232**), et finalement le carbonate de *bis*-1,1-diméthylpropényle (**233**). Dans tous le cas il y a deux étapes incontournables (Figure 6) :



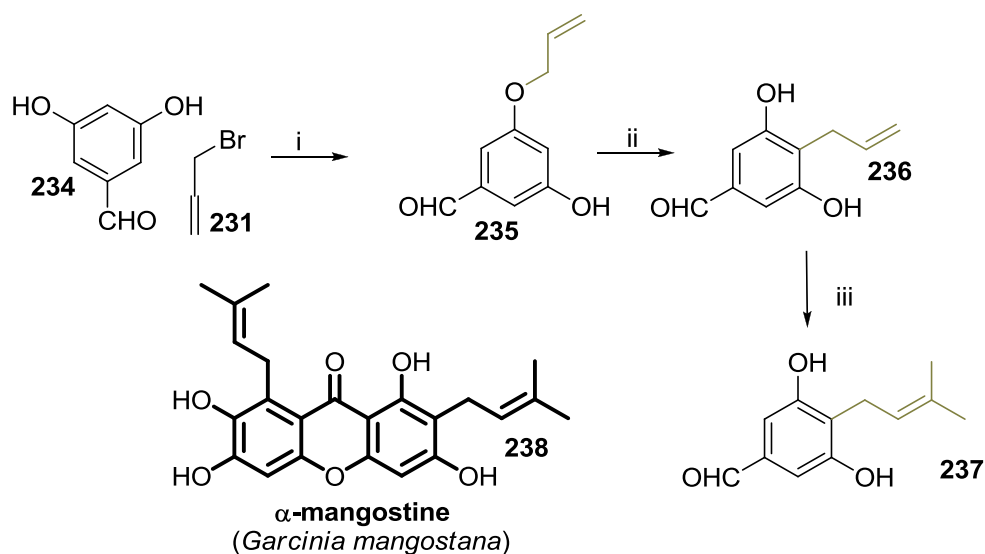
-Figure 6- Unités prénylantes.

Nous allons maintenant étudier plus en détails quelques-uns de ces protocoles:

### ✿ Synthèse totale de l' $\alpha$ -mangostine

L'équipe de Nishiyama (Yokohama, Japon) a réalisé la synthèse de produits prénylés pour accéder à l' $\alpha$ -mangostine (**238**), une xanthone isolée de *Garcinia mangostana*<sup>23</sup>. Ainsi en 2002, ils ont réalisé la synthèse de l' $\alpha$ -mangostine (**238**) à partir de la chimie développée au départ du phloroglucinol (**234**). La réaction de prénylation s'effectue en présence de bromure d'allyle (**231**) et de  $K_2CO_3$  comme base, suivi d'un traitement thermique puis de

conditions oxydantes ( $\text{OsO}_4$  et  $\text{NaIO}_4$ ) et finalement une réaction de Wittig pour donner le produit prénylé final (Schéma 25)<sup>31</sup>. Une méthode très similaire a été développée par le groupe de Suzuki (Sendai, Japon). Ils ont développé une stratégie pour le réarrangement de Claisen dans un système de microréaction dans l'eau en phase subcritique et en absence de catalyseur<sup>31</sup>



**Réactifs et conditions :** (i)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF (80 %) ; (ii)  $160^\circ\text{C}$  ; (iii)  $\alpha$ -  $\text{OsO}_4$ ,  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ , t. a. (95 %)  $b$ -  $i\text{PrPh}_3\text{P}^+\text{I}^-$ ,  $n\text{BuLi}$ , THF,  $0^\circ\text{C}$  (72 %).

-Schéma 25- Synthèse de composés prénylés développée par Nishiyama pour un accès à l'α-mangostine (238).

Nous noterons que dans ce protocole une oxydation puis une réaction de Wittig sont nécessaires pour accéder au motif prényle alors qu'en choisissant bien le réactif de départ la prénylation peut se faire en une étape.

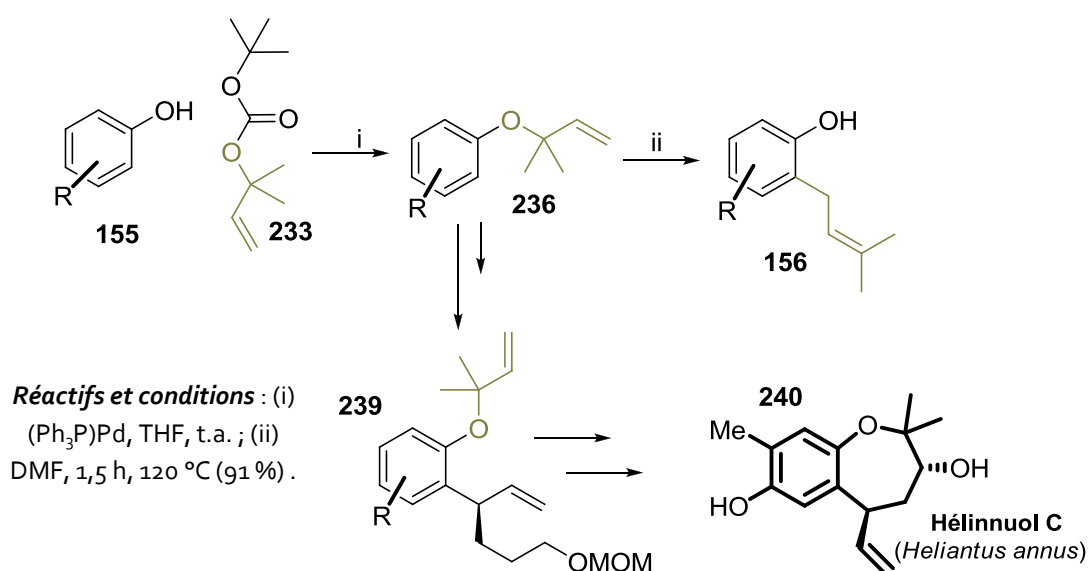
### ✿ Synthèse du (-)-héliannulol C

En 2003, le groupe de Kozo Shishido (Tokushima, Japon) a publié une nouvelle méthodologie utilisant des composés comme le carbonate de 1,1-diméthylpropène et d'isobutyle (233) par une réaction pallado-catalysée<sup>32</sup>, pour la prénylation suivie d'un traitement thermique, pour donner le structure du (-)-héliannulol C (240), isolée d'*Helianthus annuus* (Schéma 26). En 2009, le groupe de Theodorakis a travaillé avec cette méthodologie en utilisant des molécules telles que le carbonate de 1,1-diméthylpropénylisobutyle et le carbonate de bis (1,1-diméthylpropène) (233)<sup>33</sup> (Schéma 26).

<sup>31</sup> Sato M., Otabe N., Tuji T., Matsushima K., Kawanami H., Chatterjee M., Yokoyama T., Ikushima Y., Suzuki T. M., Highly-selective and high-speed Claisen rearrangement induced with subcritical water microreaction in the absence of catalyst, *Green Chem.* 2009, **11**, 763.

<sup>32</sup> Kamei T., Shindo M., Shishido K., First enantioselective total synthesis of (-)-heliannulol C, *Tetrahedron Lett.* 2003, **44**, 8505.

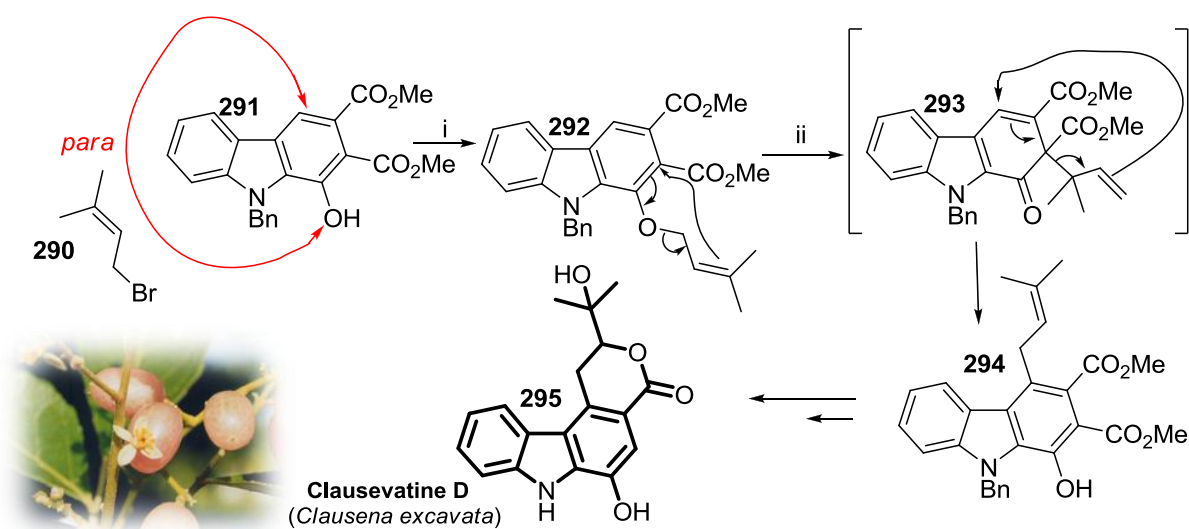
<sup>33</sup> Chantarasriwong O., Cho W. C., Batova A., Chavasiri W., Moore C., Rheingold A. L., Theodorakis E. A., Evaluation of the pharmacophoric motif of the caged *Garcinia* xanthones, *Org. Biomol. Chem.* 2009, **7**, 4886.



-Schéma 26- Synthèse du noyau prényle développée pour synthétiser l'héliannuol C (240).

### 🌀 Synthèse des clausamines et clausevatines : réarrangement de *para*-Claisen

En 2010, l'équipe de Dipakrajan Mai (Kharagpur, Inde), a développé une application nouvelle de cette chimie adaptée à la chimie des indoles pour accéder au squelette des clausamines et les clausevatines (295)<sup>34</sup>. La prénylation est réalisée avec le bromure de prényle (290), en présence d'iodure de sodium pour donner un éther de prényle (292) qui par chauffage dans la diméthylamine donnera le produit prénylé par un réarrangement particulier de *para*-Claisen (Schéma 27).



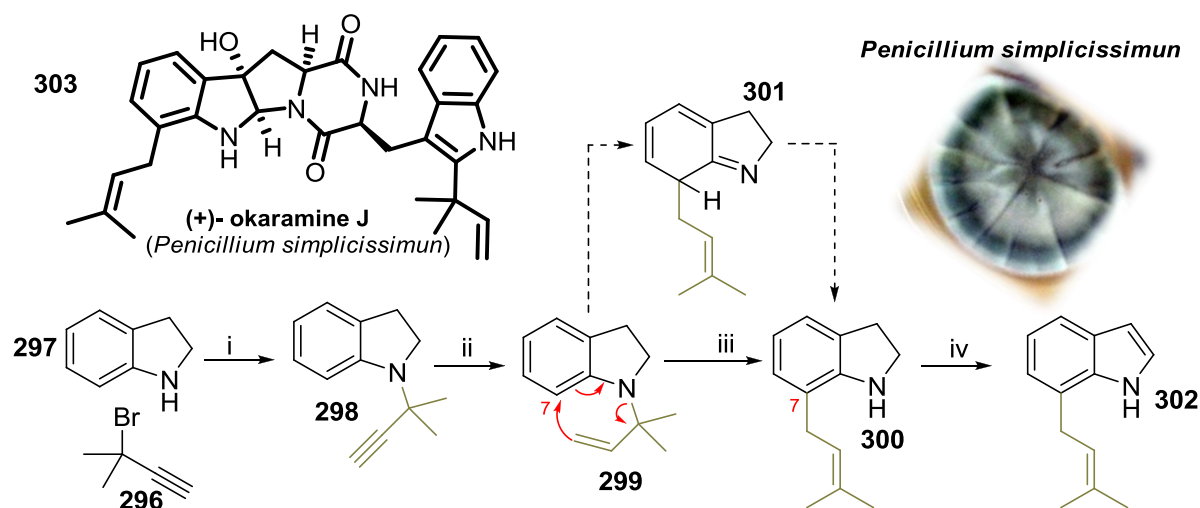
**Réactifs et conditions :** (i)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acétone, NaI, reflux 12-24 h (65 %) ; (ii) DMA ou DEA, reflux, 10 min (68 %).

-Schéma 27- Synthèse de composés prénylés développée pour un accès au squelette des clausamines (295).

34 Jana A. K., Mal D., A rapid entry to C-prenylcarbazoles: total synthesis of clausamine C-D, clausevatine D and clausine F, *Chem. Commun.* 2010, 46, 4411.

### Synthèse totale de l'okaramine J

En 2003, une approche différente est publiée avec le travail du groupe de A. Ganesan (Southampton, UK), qui traite de la synthèse de la (+)-okaramine J (**303**) isolée de *Penicillium simplicissimum* et *Aspergillus aculeatus* et par le groupe de Pirrung en 2007<sup>35</sup> (Riverside, USA). Lors de ces travaux, une étude intéressante de prénylation d'indole (**302**) a été réalisée<sup>36</sup>. Une étude modèle sur l'indoline (**296**) a été effectuée et a permis d'étendre les possibilités de prénylation par réaction de Claisen à des substrats indoliques. En particulier c'est la position 7 du noyau qui est ici accessible au départ d'un substrat *N*-alkylé (Schéma 28).



**Réactifs et conditions :** (i) CuCl (10 mol %), 1,2 équiv. *i*-Pr<sub>2</sub>NEt, THF, 3 h (65 %) ; (ii) 1 atm. H<sub>2</sub>, 5 wt % Lindlar, EtOAc, 3 h (95 %) ; (iii) DMF, 1,5 h, 120 °C (91 %) ; (iv) MnO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (88 %).

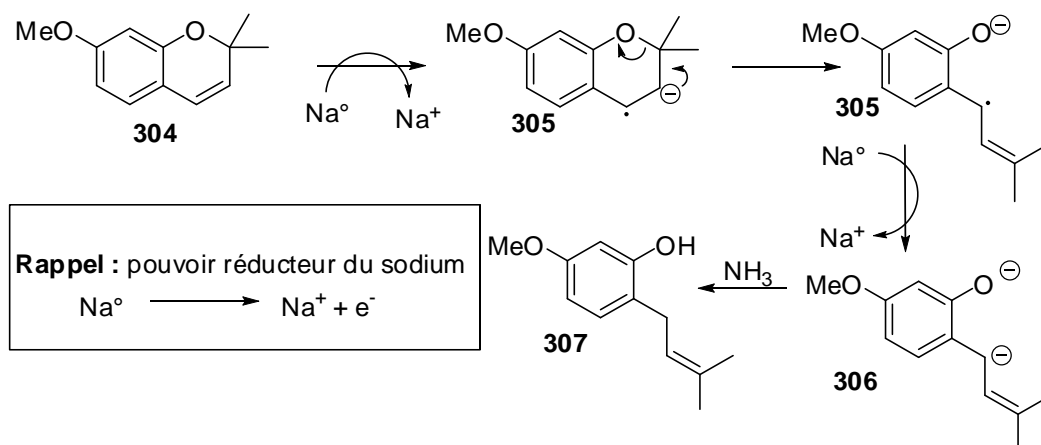
-Schéma 28- Synthèse du 7-prényl-indole (**302**) base de la structure de l'okaramine J (**303**).

### 4- Prénylation *via* la réduction de diméthylbenzopyrènes

Une approche totalement différente est la stratégie basée sur la réduction de Birch pour la préparation de dérivés *ortho* prénylés de phénols (**307**) par l'ouverture réductrice d'un diméthylbenzopyrène (**304**) par une série de transferts monoélectroniques (deux) provenant du sodium<sup>24</sup> (Schéma 29).

35 Roe J. M., Webster R. A. B., Ganesan A., Total synthesis of (+)-okaramine J featuring an exceptionally facile *N*-reverse-prenyl to *C*-prenyl aza-Claisen rearrangement, *Org. Lett.* 2003, **5**, 2825.

36 Xiong X., Pirrung M. C., Practical synthesis of 7-prenylindole, *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 5832.



**Réactifs et conditions** : Na/NH<sub>3</sub> (83 %).

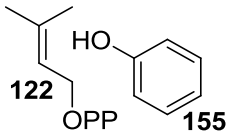
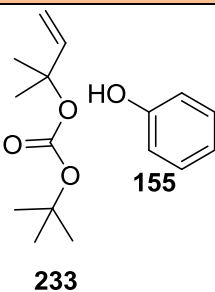
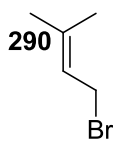
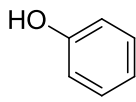
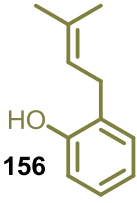
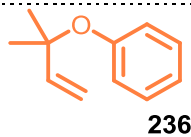
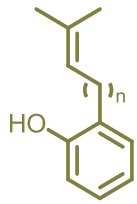
-Schéma 29- Stratégie de prénylation basée sur la réduction de Birch.

## B– Comparaison des voies de prénylation : enzymatiques et chimiques

1. Nous allons étudier en détail une prényltransférase de *Streptomyces* (PTase *orf2*)<sup>15</sup>, qui intervient dans la biosynthèse de la naphterpine, et comparer le mécanisme d'action de cette enzyme avec les réactions de prénylation chimique directe<sup>35,36</sup> et *via* le réarrangement de Claisen<sup>33</sup>. Pour faire cette comparaison à différents niveaux sont à envisager :
  - i*- utilisation de différentes unités pour apporter le prényle (unités prénylantes) ;
  - ii*- utilisation de différents accepteurs aromatiques (accepteurs de prénylation) ;
  - iii*- utilisation de différentes conditions réactionnelles.

Au travers de différentes études, il a été établi que l'enzyme *Orf2*<sup>15</sup> est :

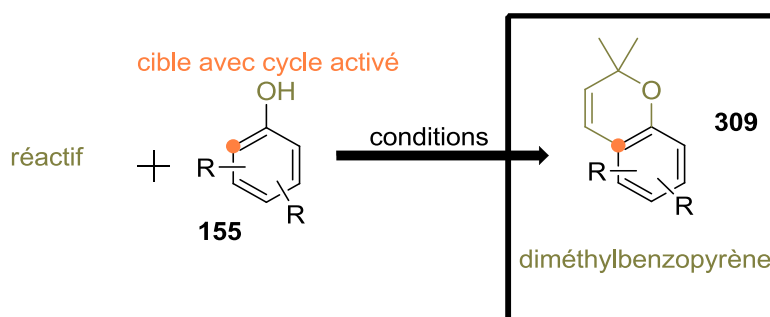
- ✿ **Sélective en ce qui concerne l'unité prénylante**, parce que l'enzyme tolère très bien le géranyl diphosphate (GPP, C<sub>10</sub>), moyennement le farnésyl diphosphate (FPP, C<sub>15</sub>) mais pas le diméthylallyl diphosphate (DMAPP, C<sub>5</sub>).
- ✿ **Faiblement sélective avec différents accepteurs aromatiques**, la réaction a lieu avec plusieurs substrats.
- ✿ La réaction a **besoin du cation Mg<sup>2+</sup>**.

		Prénylation		
		Enzymatique <sup>14,15</sup>	Chimique	
			Claisen <sup>33</sup>	Directe <sup>20</sup>
Réactifs				
Conditions	$Mg^{2+}$	$(Ph_3P)Pd$		NaH
Produits				
			DMF, 120 °C	
Tolérance pour les unités	±	NON		OUI
Besoin -OH <sup>35</sup> ou -NH <sup>36</sup> .	NON	OUI		NON

-Tableau 2 - trois façons de prénylet : voie enzymatique et deux voies chimiques : directe et via une transposition de Claisen.

### III- Les méthodes de synthèse du noyau diméthylbenzopyrène en synthèse organique

## A– Schéma général



-Schéma 30- Réaction de formation du diméthylbenzopyrène (309).

### 1– Accès direct aux diméthylbenzopyrenes

Nous pouvons trouver plusieurs méthodes efficaces pour la synthèse de diméthylbenzopyrènes impliquant des réactifs différents appliqués sur des composés phénoliques qui présentent des carbones en *ortho* activés (Schéma 30).

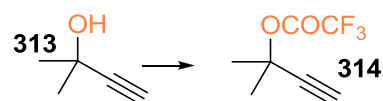
Trois méthodes principales sont connues pour la synthèse des noyaux diméthylbenzopyrenes impliquant des réactifs différents : l'acide  $\beta,\beta$ -diméthylacrylique (310) le 3-méthyl-2-buténal (311) et le 1,1-diéthoxy-3-méthyl-but-2-ène (312), 2-méthyl-3-butyn-2-ol (313) (Tableau 3).

<b>310</b> : Tisdale <i>et al</i> , 2003 <sup>37</sup>	<b>311</b> : Rok Lee <i>et al</i> , 2005 <sup>38</sup>	<b>312</b> : Erhardt <i>et al</i> , 2008 <sup>39</sup>	<b>313</b> : Zeng <i>et al</i> , 2011 <sup>40</sup>

Tableau 3 : Réactifs employés pour la formation du noyau diméthylbenzopyrène.

- 37 Tisdale E. J., Vong B. G., Li H., Kim S. H., Chowdhury C., Theodorakis E. A., Total synthesis of *seco*-lateriflorone, *Tetrahedron* 2003, **59**, 6873.
- 38 Lee Y. R., Choi J. H., Yoon S. H., Efficient and general method for the synthesis of benzopyrans by ethylenediamine diacetate-catalyzed reactions of resorcinols with [alpha],[beta]-unsaturated aldehydes. One step synthesis of biologically active ( $\pm$ )-confluentin and ( $\pm$ )-daurichromenic acid, *Tetrahedron Lett.* 2005, **46**, 7539.
- 39 Khupse R. S., Erhardt P. W., Total syntheses of racemic natural (-) and unnatural (+) glyceollin I, *Org. Lett.* 2008, **10**, 5007.
- 40 Zeng H., Ju J., Hua R., ReCl(CO)<sub>5</sub>-catalyzed cyclocondensation of phenols with 2-methyl-3-butyn-2-ol to afford 2,2-dimethyl-2H-chromenes, *Tetrahedron Lett.* 2011, **52**, 3926.
- 41 Gruner K. K., Knölker H. J., Palladium-catalyzed total synthesis of euchrestifoline using a one-pot Wacker oxidation and double aromatic C-H bond activation, *Org. Biomol. Chem.* 2008, **6**, 3902.

Une publication récente nous montre une approche différente pour activer ce type de noyaux. Le groupe de Knölker (Dresden, Allemagne)<sup>41</sup> décrit une activation forte intéressante du 2-méthyl-3-butyn-2-ol



(**313**) sous forme de trifluoroacétate (**314**) (Schéma 31). Le produit d'activation est ensuite engagé dans des conditions classiques pour la synthèse des noyaux diméthylbenzopyrènes, mais avec une amélioration de la réactivité de l'unité activée, cette approche nous rappelle l'activation du prénol décrite par Marazano<sup>21</sup> (Schéma 17).

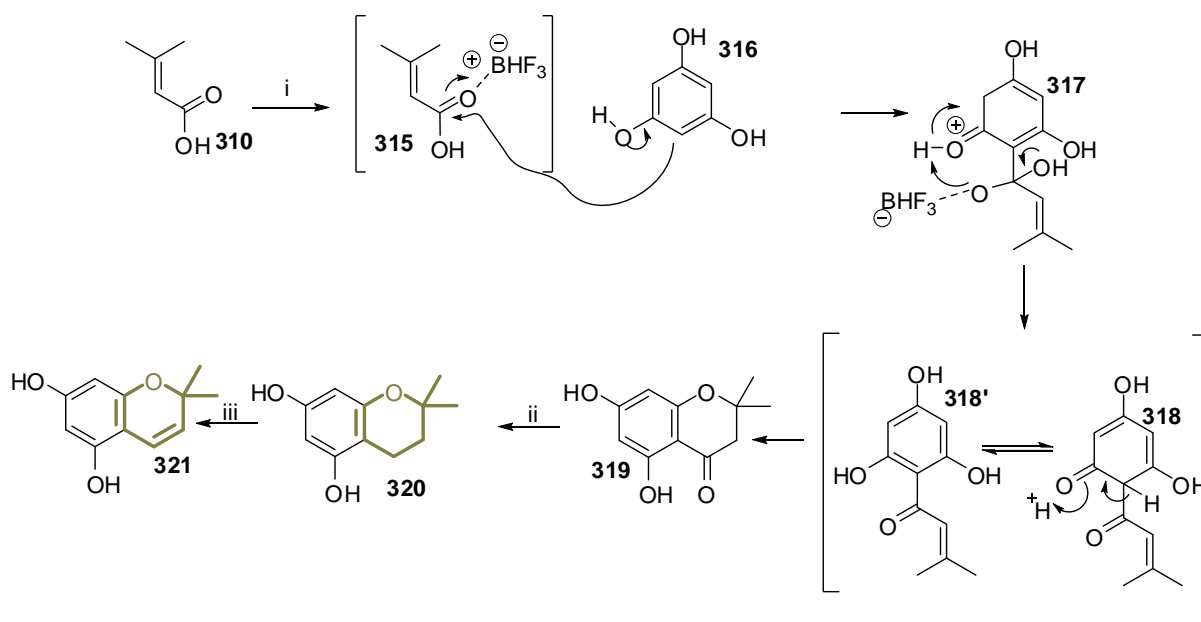
**Réactifs et conditions** : 1 équiv.  $(CF_3CO)_2O$ , 1,3 équiv. DBU, MeCN,  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ , 70 min.

**-Schéma 31-** Activation du 2-méthyl-3-butyn-2-ol (**313**).

Nous allons maintenant approfondir chacune de ces trois méthodes.

### a- Formation directe du noyau diméthylbenzopyrene par réaction apparentée à la réaction de Friedel et Crafts.

En 2003, le groupe de Theodorakis<sup>37</sup> a publié la formation du noyau diméthylbenzopyrene utilisant l'acide  $\beta,\beta$ -diméthylacrylique (**310**), par une réaction de Friedel-Crafts ( $BF_3 \cdot Et_2O$ ), suivie d'une réduction de la cétone, pour finir par une oxydation classique avec le DDQ (Schéma 32). Un protocole très proche a également été publié en 2010 par le groupe de Van Heerden (Pietermaritzburg, Afrique du Sud) pour la synthèse d'isoflavones<sup>42</sup>.



**Réactifs et conditions** : (i)  $BF_3 \cdot Et_2O$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 12 h (84 %) ; (ii) Zn (10 équiv.), HCl (excès), MeOH,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 12 h (>90 %) ; (iii) DDQ (2,1 équiv.), toluène,  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h (72 %).

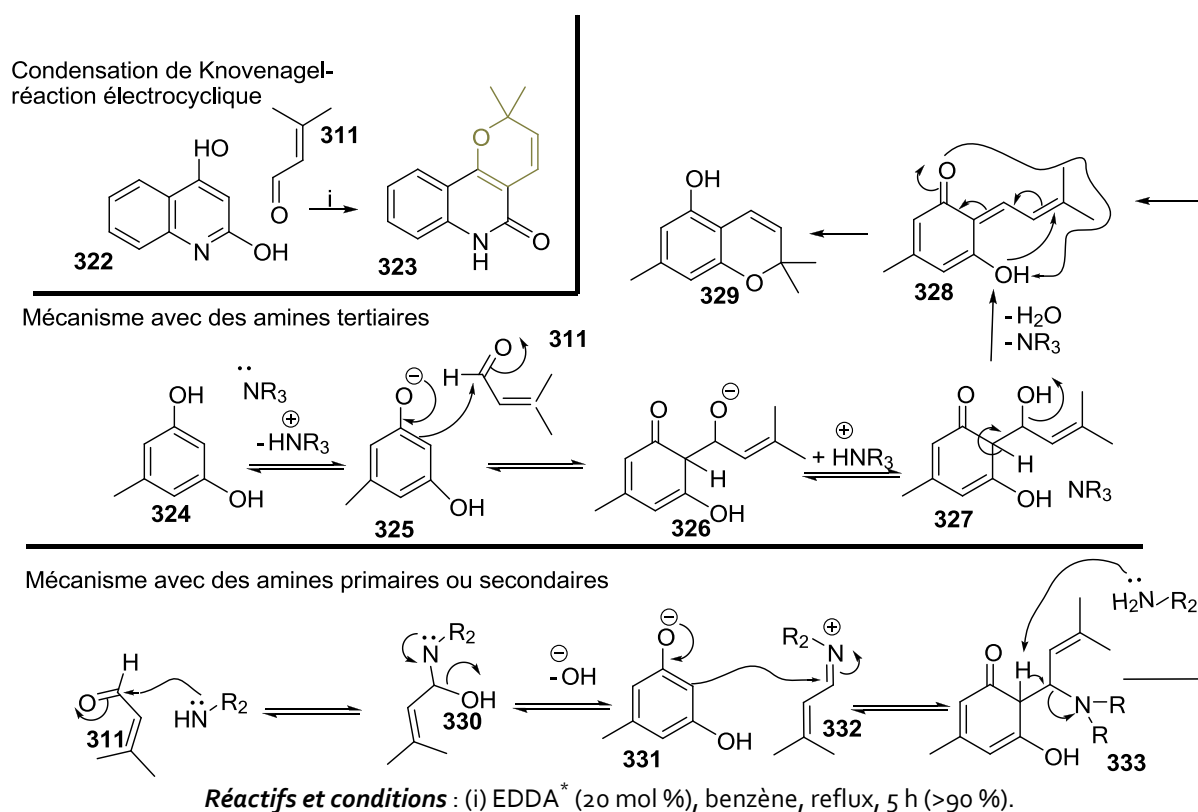
**-Schéma 32-** Réaction de Friedel et Crafts décrite par Tisdale *et al.*

<sup>42</sup> Selepe M. A., Drewes S. E., Van Heerden F. R., Total synthesis of the pyranoisoflavone kraussianone 1 and related isoflavones, *J. Nat. Prod.* 2010, **73**, 1680.



## b- Formation du noyau diméthylbenzopyrène directe par condensation de Knoevenagel et réaction d'addition 1,6

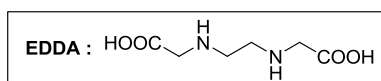
Une voie innovante est développée par le groupe de Yong Rok Lee (Gyeongsang, Corée). Dans leur étude, ils ont travaillé avec le 3-méthyl-2-butène (**311**) et toujours un accepteur possédant des hydroxyles phénoliques et un carbone en *ortho* activé, pour donner une réaction tandem consistant en une condensation de Knoevenagel et une réaction d'addition 1,6, en employant l'éthylène-diamine-diacétate (EDDA) comme catalyseur<sup>38,43,44</sup>. Le catalyseur est très important pour cette réaction organocatalysée, ce doit être une molécule aminée. Selon que l'amine est tertiaire ou primaire/secondaire, le mécanisme se déroulera d'une façon ou d'une autre. Le groupe de Van Heerden exploitant le même réactif a, lui, utiliser l'hydroxyde de calcium comme catalyseur<sup>42</sup> (Schéma 33).



-Schéma 33- Synthèse de diméthylbenzopyrènes développée par le groupe de Rok Lee et basée sur une réaction tandem avec une condensation de Knoevenagel organocatalysée et une réaction d'addition 1,6.

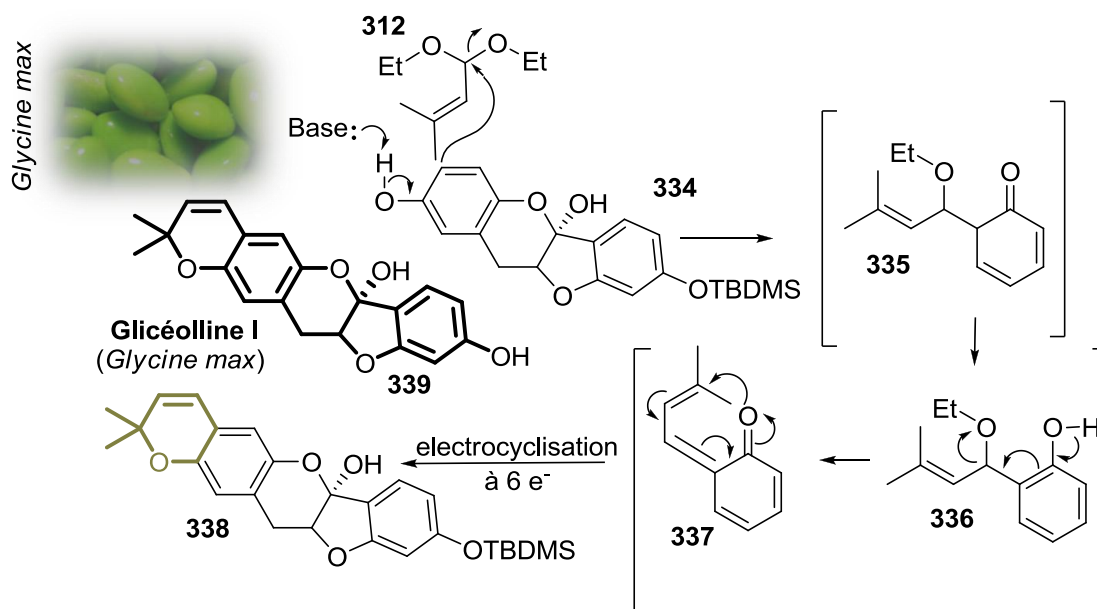
43 Lee Y. R., Xia L., Concise total synthesis of biologically interesting pyranochalcone natural products: citrunobin, boesenbergin A, boesenbergin B, xanthohumol C, and glabrachromene, *Synthesis* 2007, 3240.

44 Lee Y. R., Kim Y. M., Kim S. H., Efficient one-pot synthesis of benzopyranobenzopyrans and naphthopyranobenzopyrans by domino aldol-type reaction/hetero Diels-Alder reaction of resorcinols and naphthols, *Tetrahedron* 2009, **65**, 101.



### c– Formation du noyau diméthylbenzopyrène directe par condensation aldolique

Une autre synthèse, est développée par le groupe d'Erhardt (Ohio, USA). Ce groupe a réalisé la synthèse de la (+)-glycéolline I (**339**)<sup>39</sup>. La formation d'un noyau diméthylbenzopyrène est effectuée par une condensation aldolique modifiée catalysée par la picoline, avec du 1,1-diéthoxy-3-méthyl-butène (**312**) et le composé accepteur (Schéma 34).

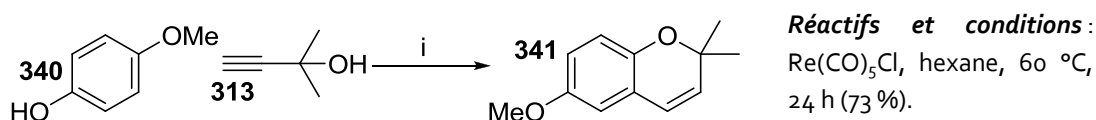


**Réactifs et conditions** : picoline, xylène, 130 °C (61 %).

-Schéma 34- Synthèse de diméthylbenzopyrènes développée pour la synthèse de la glycéolline I (**339**) basée sur une condensation aldolique modifiée\*.

### d– Formation du noyau diméthylbenzopyrène directe par cyclocondensation

Récemment, une dernière synthèse, a été développée par le groupe d'Hua<sup>40</sup> (Tianjin, Chine). Ce groupe a réalisé la formation d'un noyau diméthylbenzopyrène (**341**) par une cyclocondensation catalysée par  $\text{ReCl}(\text{CO})_5$  et le composé accepteur (Schéma 35).



-Schéma 35- Synthèse de diméthylbenzopyrènes basée sur une cyclocondensation catalysée par  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ .

## 2– Accès aux diméthylbenzopyrènes via une réaction de Claisen

\* En toute rigueur nous ne pouvons pas utiliser le symbolisme des flèches.

## a– Rappel sur la réaction de Claisen

Le réarrangement thermique [3,3] sigmatropique des éthers propargyliques, ou réarrangement de Claisen appliqué aux éthers propargyliques a lieu suivant un protocole réactionnel similaire à celui décrit avec les éthers d'allyle (**227**) avec un traitement thermique ou par la présence d'un acide de Lewis (Schéma 23).

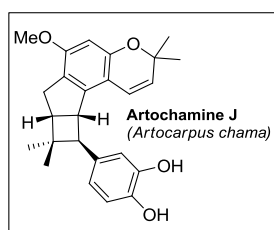
## b– Quelques exemples représentatifs

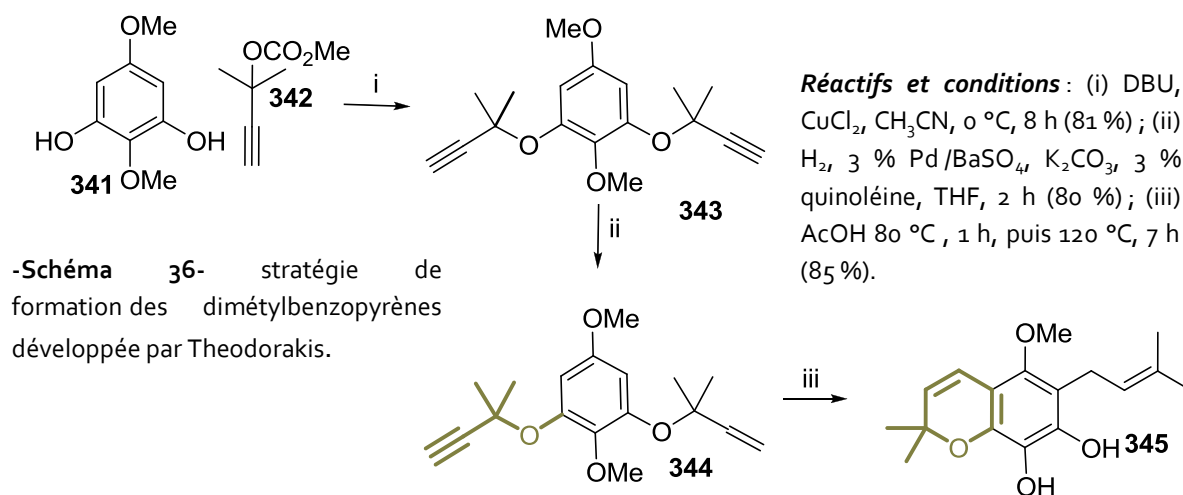
En 2003, l'équipe d'Emmanuel A. Theodorakis a publié la synthèse de la *seco*-latériorone<sup>37</sup>. La *seco*-latériorone présente dans sa structure des motifs diméthylbenzopyrène et prényle. Nous avons déjà évoqué la voie de prénylation développée par ce groupe avec d'excellents rendements.

Dans ses publications, le groupe de Theodorakis a effectué la réaction suivant deux protocoles différents :

- i- En 2003, ils ont publié le premier de ces protocoles. Dans ce cas les réactifs employés sont le carbonate de 1,1-diméthyl-propyn-2-yl et de méthyle (**342**), CuCl<sub>2</sub> et le DBU, suivi d'une étape de réduction avec l'hydrogène et Pd/BaSO<sub>4</sub> et quinoléine. De façon étrange et avec de bons rendements décrits, une seule des triples liaisons est réduite conduisant au composé **344** (Schéma 36). Ce dernier subit finalement le traitement thermique qui rend possible les réarrangements de Claisen, conduisant en une étape à la fois à la formation du diméthylbenzopyrène et à la prénylation (**345**)<sup>37</sup>(Schéma 36). Cette méthode a aussi été employée par le groupe de Nicolaou (San Diego, USA) en 2007 pour la synthèse du noyau diméthylbenzopyrène des artochamines<sup>\* 45</sup>.

45 Nicolaou K. C., Lister T., Denton R. M., Gelin C. F., Cascade reactions involving formal [2+2] thermal cycloadditions: total synthesis of artochamins F, H, I, and J, *Angew. Chem. Int Ed.* 2007, **46**, 7501.

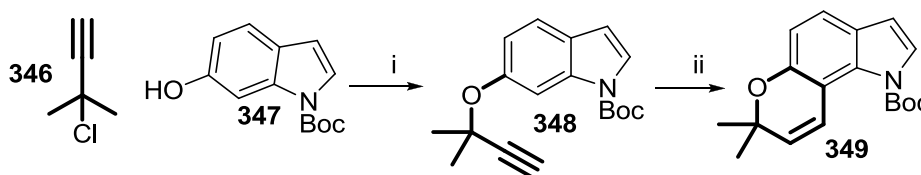




-Schéma 36- stratégie de formation des diméthylbenzopyrènes développée par Theodorakis.

- ii- Une autre voie de synthèse a été proposée en 2004, dans laquelle est utilisée comme réactif le 3-chloro-3-méthyl-but-1-yne (346) suivi d'un traitement thermique pour donner le réarrangement de Claisen.

Un protocole similaire au deuxième protocole publié par Theodorakis était publié par le groupe de Robert M. Williams (Colorado, USA), en 2007, pour la synthèse des stéphacidines A, B et du notoamide B<sup>46a</sup>. Cette publication a retenu notre attention spécialement parce qu'elle traite des indoles (Schéma 37), ces types de produits ont été isolés récemment de *Talaromyces thermophilus* YM3-4 par le groupe de Zhang (Kunming, China)<sup>46b</sup>.



**Réactifs et conditions :** (i) CuCl<sub>2</sub>, DBU, CuCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 0 °C puis t.a., 12 h (58 %) ; (ii) *o*-DCB, 180 °C, 2 h (83 %) ou CH<sub>3</sub>CN, micro-ondes 180 °C, 20 min (95 %).

Schéma 37- Stratégie de formation du noyau diméthylpyrène développée par le groupe de Williams.

- 46 (a) Artman G. D., Grubbs A. W., Williams R. M., Concise, asymmetric, stereocontrolled total synthesis of stephacidins A, B and notoamide B, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, **129**, 6336. (b) Guo J.-P., Tan J.-L., Wang Y.-L., Wu H.-Y., Zhang C.-P., Niu X.-M., Pan W.-Z., Huang X.-W., Zhang K.-Q. Isolation of talathermophilins from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* YM3-4. *J. Nat. Prod.* 2011, 00-00.
- 47 Janin Y. L., Antituberculosis drugs: Ten years of research, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**, 2479.
- 48 Copp B. R., Pearce A. N., Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat. Prod. Rep.* 2007, **24**, 278.
- 49 Suksamrarn S., Suwannapoch N., Phakhodee W., Thanuhiranlert J., Ratananukul P., Chimnoi N., Suksamrarn A., Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*, *Chem. Pharm. Bull.* 2003, **51**, 857.
- 50 Prado S., Toum V., Saint-Joanis B., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Janin Y. L., Antimycobacterial benzofuro[3,2-f]chromenes from a 5-bromochromen-6-ol, *Synthesis* 2007, 1566.

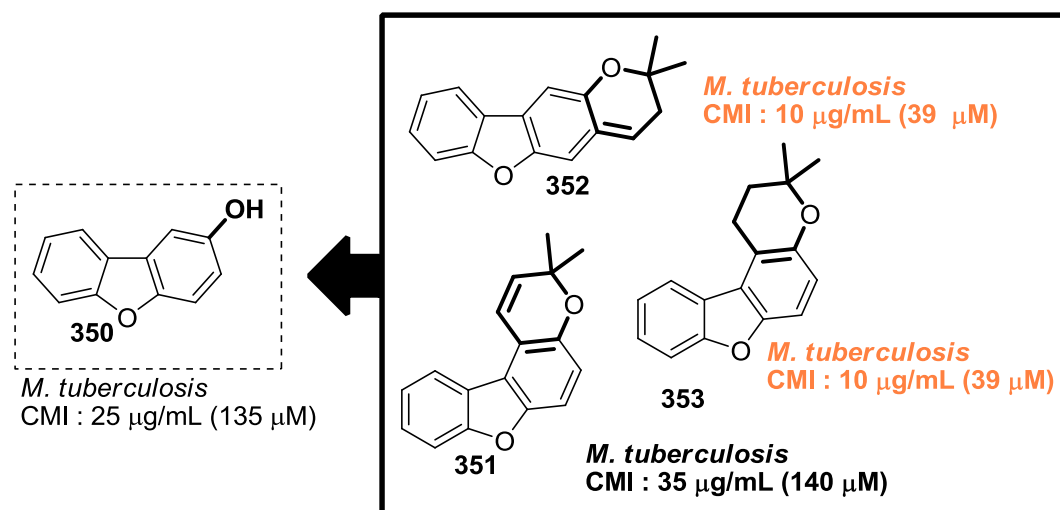
## IV– Travaux personnels : synthèses d'analogues prénylés et diméthylbenzopyrène de la canthin-6-one

La tuberculose (TB) reste une des infections les plus importantes en nombre de morts, avec plus de 2 millions de morts et 8 millions de nouveaux cas chaque année (voir chapitre 6). Avec cette problématique, il s'avère vraiment nécessaire de développer de nouvelles familles de médicaments antimycobactériens pour combattre la résistance et diminuer la durée de la thérapie (WHO, 2011).

### A– Le traitement de la maladie

De très nombreuses substances naturelles présentent des propriétés antimycobactériennes. Nous ne pouvons pas ici en donner une liste exhaustive (voir chapitre 6). Le lecteur intéressé se reportera à de nombreux articles de revue<sup>47,48</sup>.

Dans le domaine des produits naturels antituberculeux nous avons trouvé plusieurs composés qui présentent comme caractéristiques la présence du noyau prényle ou diméthylbenzopyrène, comme exemple nous avons plusieurs xanthones prénylées, comme l' $\alpha$ -mangostine (238) (Schéma 25), isolée de *Garcinia mangostana* qui présentent une IC<sub>50</sub> comprise entre 6,25 et 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>49</sup>, un autre exemple récent sont les benzofuro[3,2-*f*]chromènes (351-353) (Schéma 38) synthétisés par le groupe du Professeur François Tillequin qui présentent une IC<sub>50</sub> comprise entre 10 et 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>50</sup>. Cette activité présente une amélioration en comparaison avec le 2-hydroxydibenzofurane (350) pris comme référence.

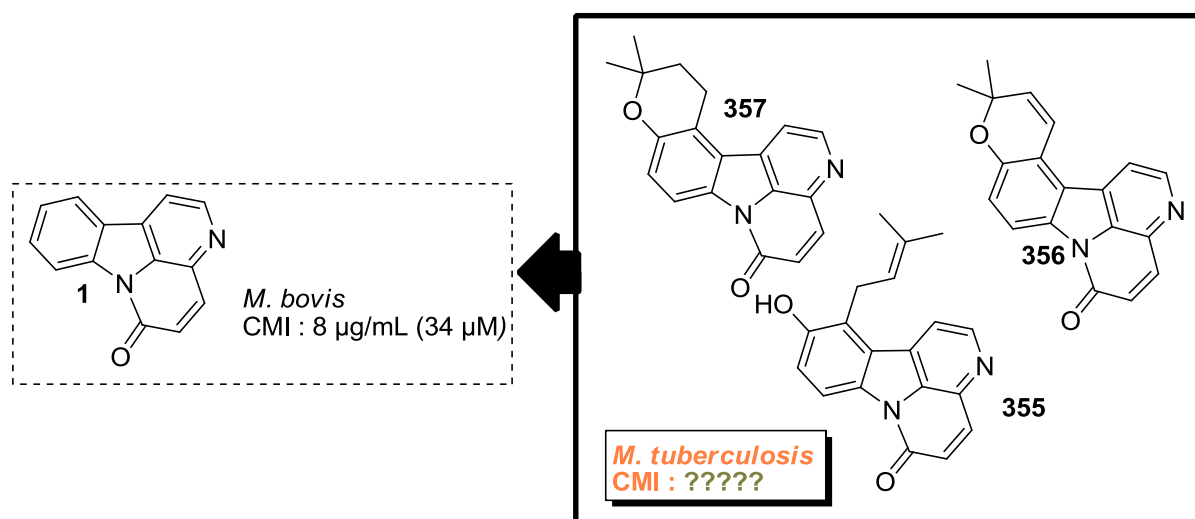


-Schéma 38-Benzofuro[3,2-*f*]chromènes (351-353) antituberculeux décrits par Tillequin *et coll.*

### B– Canthin-6-one et propriétés antimycobactériennes

En 2007, dans la thèse de Delphine Lagoutte<sup>\*</sup>, a été décrite l'activité antibactérienne vis-à-vis de *Mycobacterium bovis*<sup>\*\*</sup>, de canthinones obtenues par extraction, hémisynthèse ou synthèse totale. Les résultats seront exposés au chapitre 6, mais nous pouvons dès à présent dire que la canthin-6-one (**1**) présente une CMI de l'ordre de 8 µg/mL (34 µM).

Maintenant, l'objectif de notre travail va être la synthèse de molécules analogues à la canthin-6-one (**1**) qui présenteraient les unités prényle comme dans le cas de l' $\alpha$ -mangostine (238) (Schéma 25) et diméthylbenzopyrène comme dans le cas des benzofurochromènes (351-353) (Schéma 38), pour tenter d'améliorer l'activité antimycobactérienne de **1**, inspirés des travaux décrits ci-dessus, nous avons proposé de suivre la méthodologie de synthèse décrite par S. Prado<sup>50-52</sup> et E. Tisdale<sup>37</sup>.



-Schéma 39- Canthinones (355-357) cibles comme possibles antituberculeux.

## C– Cibles envisagées = Travaux personnels

Dans cette partie de notre travail nous avons deux objectifs prioritaires :

- i- La synthèse d'analogues prénylés de la sérotonine et diméthylbenzopyrène de la tryptamine (**360**, **361** et **369**).
- ii- La synthèse des analogues prénylés et diméthylbenzopyrènes de la canthin-6-one (**355-357**) avec l'objectif d'étudier leur activité antimycobactérienne (Schéma 39).

## 1– Accès aux tryptamines fonctionnalisées

51 Prado S., Janin Y. L., Saint-Joanis B., Brodin P., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Bost P.-E., Synthesis and antimycobacterial evaluation of benzofurobenzopyran analogues, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**, 2177.

52 Prado S., Ledoit H., Michel S., Koch M., Darbord J. C., Cole S. T., Tillequin F., Brodin P., Benzofuro[3,2-f][1]benzopyrans: a new class of antitubercular agents, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, **14**, 5423.

\* Delphine Lagoutte, thèse de l'Université Paris-Sud 11 2007, n°954.

\*\* La souche atténuée utilisée pour la fabrication du vaccin dit « BCG ».

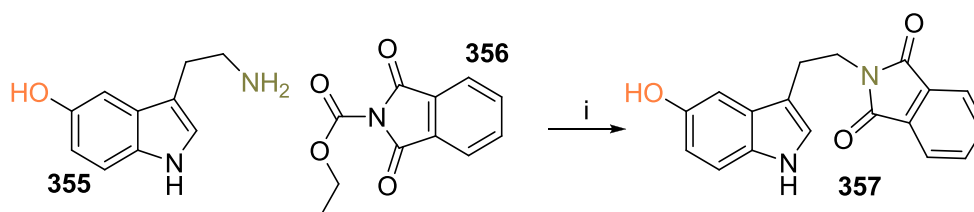
## a– Propargylation de la sérotonine

Pour commencer, nous avons fait réagir directement des composés analogues type diméthylbenzolpyrène de la sérotonine (**360** et **361**) (Schéma 40).

Malheureusement, cette réaction a donné un mélange inexploitable de produits, sans aucun produit majoritaire. Ce n'est pas si surprenant vu que la sérotonine, présente plusieurs centres réactifs (Schéma 40).

## b– Protection de la sérotonine

Nous avons essayé différentes conditions de protection de la sérotonine. Dans un premier temps nous avons tenté une réaction de protection par un groupement *tert*-butyloxycarbonyl (Boc), mais cette réaction a donné également un mélange de produits très complexe. Une étude de spectrométrie de masse de ce mélange montre des masses correspondant à la sérotonine plus deux unités Boc et également plus trois unités Boc.



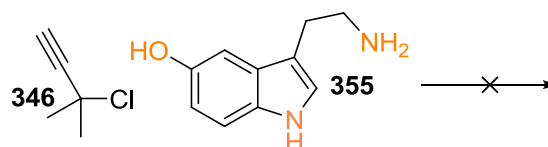
**Réactifs et conditions** : (i) NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O : THF (1:1) 18 h (90 %).

-Schéma 41- Protection de l'amine primaire de la sérotonine (**355**) sous forme de phtalimide (**357**).

Nous avons ensuite opté pour la protection sélective sous la forme d'un phtalimide (**357**) (Schéma 41). Cette synthèse est réalisée par réaction de la sérotonine (**355**) avec le *N,N*-carbéthoxyphtalimide (**356**), dans un mélange THF/eau en milieu basique<sup>53</sup>. Nous obtenons le produit final, avec un très bon rendement, sans avoir recours à une purification par colonne.

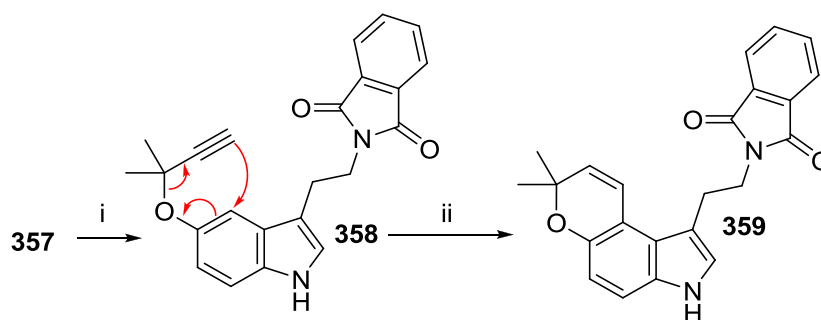
## c– Synthèse de la diméthylbenzopyrène-tryptamine

Une fois le phtalimide de la sérotonine (**357**) synthétisé, la propargylation a été effectuée (**358**) avec un bon rendement suivi d'un traitement thermique pour donner le composé cible<sup>50-52</sup> (**359**) (Schéma 42).



**Réactifs et conditions** : DBU/CuCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN.

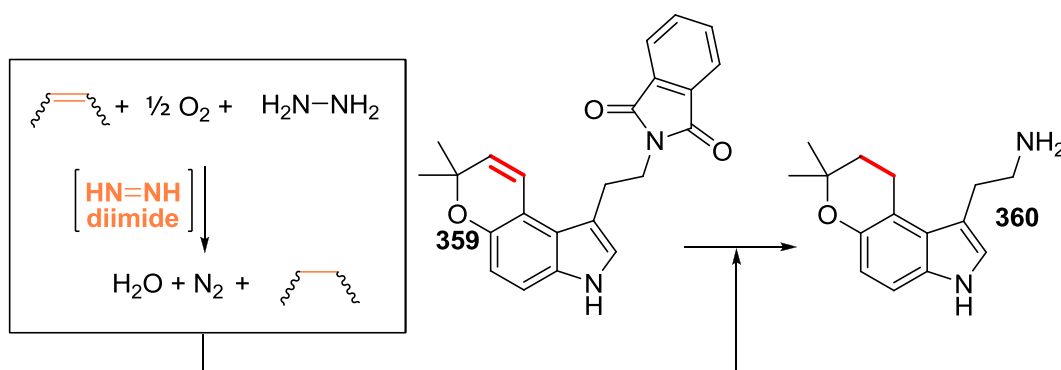
-Schéma 40- Réaction de la sérotonine (**355**) avec le 3-chloro-3-méthyl-but-1-yne (**346**).



**Réactifs et conditions :** (i) **346**, DBU, CuCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 18 h, t.a (>70 %); (ii) 1,3-dichlorobenzène, reflux (99 %).

-Schéma 42- Synthèse de la diméthylpyrène-tryptamine phtalimide (**359**) via éther propargylique (**358**).

L'étape suivante doit être la déprotection du dérivé de la tryptamine (**359**) protégé sous forme de phtalimide. Pour réaliser cette étape, nous avons suivi une méthodologie classique utilisant de l'hydrate d'hydrazine dans l'éthanol absolu<sup>53</sup>. D'une façon surprenante, le produit de cette réaction n'était pas le produit attendu (**360**). Après la purification sur colonne, nous ne retrouvons pas les signaux caractéristiques du noyau diméthylbenzopyrène que nous attendions sur les spectres de RMN H<sup>1</sup>, C<sup>13</sup>. Apparemment une réduction de la double liaison du noyau diméthylbenzopyrène s'est produite (Schéma 43)<sup>54-56</sup>. Cette réduction s'est produite du fait du pouvoir réducteur du diimide provenant de la dégradation de l'hydrazine tel que décrit dans le travail de Koppes<sup>57</sup>.



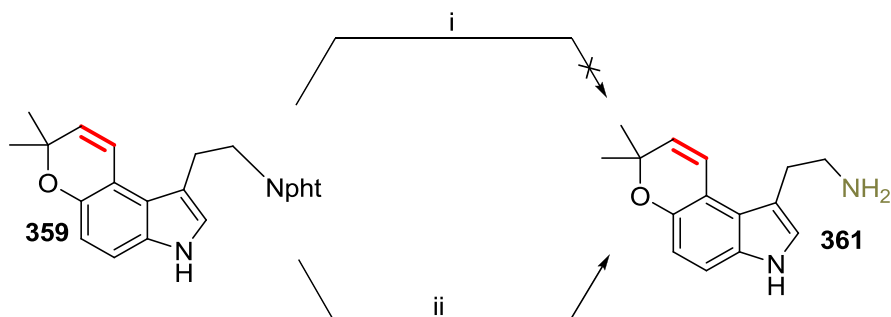
**Réactifs et conditions :** NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, EtOH (absolue), 18 h, t.a. (>90 %).

-Schéma 43- Déprotection réductrice du phtalimide de la diméthylbenzopyrène-tryptamine (**360**).

- 53 Barf T. A., de Boer P., Wikström H., 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist properties of novel 2-[5-[[[(trifluoromethyl)sulfonyl]oxy]indolyl]ethylamines and their use as synthetic intermediates, *J. Med. Chem.* 1996, **39**, 4717.
- 54 Imada Y., Iida H., Naota T., Flavin-catalyzed generation of diimide. An environmentally friendly method for the aerobic hydrogenation of olefins, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 14544.
- 55 Imada Y., Iida H., Ono S., Murahashi S. I., Flavin catalyzed oxidations of sulfides and amines with molecular oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125**, 2868.
- 56 Smit C., Fraaije M. W., Minnaard A., Enantioselective total synthesis of (-)-calicheamicinone, *J. Org. Chem.* 2008, **73**, 9482.
- 57 Koppes W. M., Moran J. S., Oxley J. C., Smith J. L., Azo bond hydrogenation with hydrazine, R-NHNH<sub>2</sub>, and hydrazobenzene, *Tetrahedron Lett.* 2008, **49**, 3234.
- 58 Horii Z. I., Iwata C., Tamura Y., Reduction of phthalimides with sodium borohydride, *J. Org. Chem.* 1961, **26**, 2273.
- 59 Smith A. L., Hwang C. K., Pitsinos E., Scarlato G. R., Nicolaou K. C., Enantioselective total synthesis of (-)-calicheamicinone, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, **114**, 3134.



L'obtention de la diméthylpyrano tryptamine (**360**) était un objectif envisageable dans notre projet. Nous pensions faire la synthèse du **360** suivant la méthode classique décrite dans la bibliographie avec une étape de réduction du noyau par hydrogénation catalytique du noyau **361**, pour réduire la double liaison d'une façon sélective. Avec ce résultat nous avons trouvé, de façon accidentelle, une nouvelle méthode pour réduire cette double liaison de façon sélective (Schéma 43). Nous avons poursuivi nos efforts vers la synthèse de la diméthylbenzopyrène-tryptamine (**361**) et avons essayé différentes conditions pour réussir cette déprotection dans des conditions non réductrices (Schéma 44).



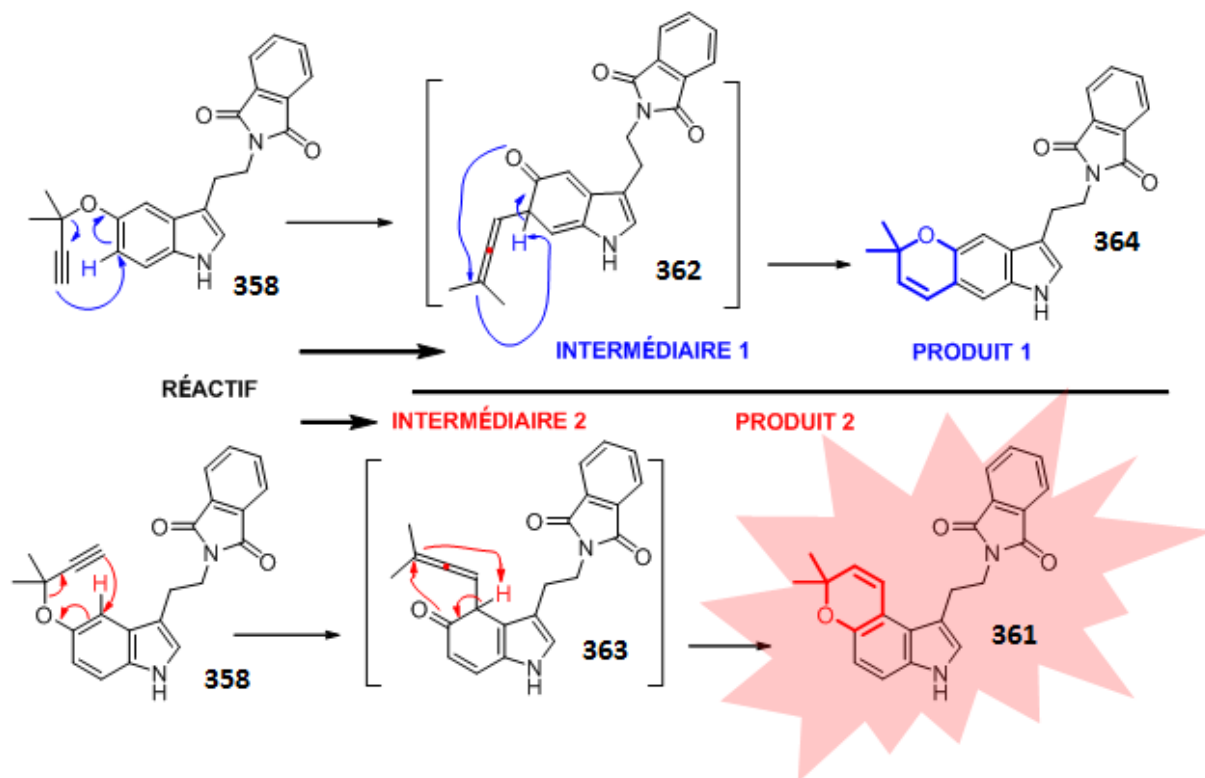
**Réactifs et conditions** : (i) propan-2-ol/H<sub>2</sub>O, NaBH<sub>4</sub>, t. a., 18 h ; (ii) CH<sub>3</sub>NH-NH<sub>2</sub>, EtOH, 18 h, t. a. (>97 %).

-Schéma 44- Déprotection de la diméthylbenzopyrène-sérotonine **361**.

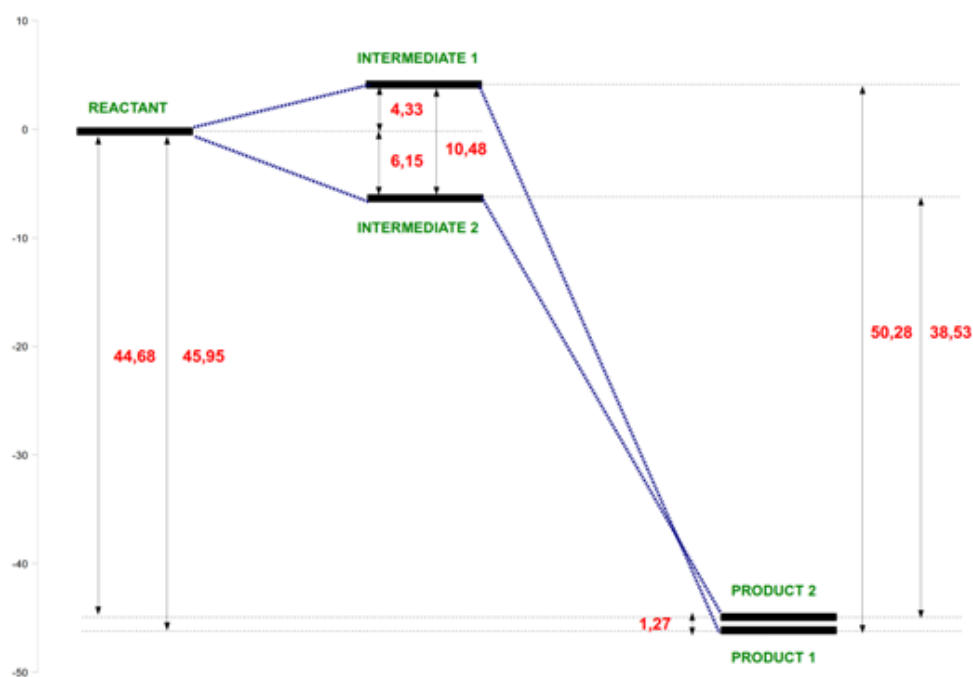
Dans la bibliographie, nous trouvons l'emploi du borohydrure de sodium<sup>58</sup> pour la déprotection des amines sous forme de phtalimides. Cette déprotection n'a pas fonctionné et nous récupérons le produit de départ (**359**). Nous avons essayé un autre protocole très proche du premier décrit en utilisant la méthylhydrazine<sup>59</sup> (Schéma 44). Avec ce réactif la déprotection marche très bien et nous obtenons le produit attendu (**361**) sans aucune réduction au niveau de la double liaison du noyau diméthylbenzopyrène (Schéma 44).

### Étude théorique du rearrangement de Claisen de l'éther propargylique de la phtalimide serotonine

A



B



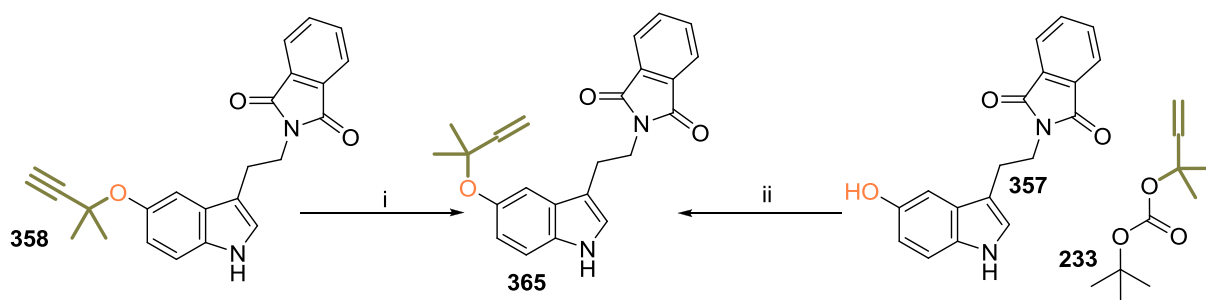
**Schéma 45-** Mécanismes proposés pour le réarrangement de Claisen de la phtalimide sérotonine. Étude théorique comparée des géométries minimales d'énergie des réactifs, intermédiaires et produits du réarrangement de Claisen de l'éther propargylique de la phtalimide serotonine.

Nous avons mené une étude théorique du réarrangement de Claisen du **réactif 358** qui pourrait conduire à deux produits (**361** et **364**) parmi deux intermédiaires possibles (**363** et **362**) (Schéma 45).

L'étude a consisté en une optimisation des géométries minimales d'énergie correspondantes au réactif, les intermédiaires et les différents produits possibles. En conséquence nous pouvons conclure que les deux produits finaux (**361** et **364**) sont presque dégénérés en énergie, en étant le **produit 1 (364)** est 1,27 kcal / mol plus stable que le **produit 2 (361)**. Contrairement à ces observations, si nous nous appuyons sur les énergies correspondant aux **intermédiaires 1 (362)** et **2 (363)**, nous voyons que la différence d'énergie entre les deux est 10,8 kcal / mol, l'**intermédiaire 2 (363)** étant le plus stable. Cette différence d'énergie est très élevée, et nous pouvons prédire la formation de l'**intermédiaire 2 (363)** avant l'**intermédiaire 1 (362)**, donnant lieu au **produit 2 (361)**. Ces résultats ont été confirmés par les résultats obtenus au laboratoire où seulement le **produit 2 (361)** a été isolé.

## d- Synthèse de la sérotonine prénylée

Pour obtenir le dérivé prénylé (**369**) nous sommes partis de l'éther propargylique du phtalimide de sérotonine (**358**). Nous avons réduit la triple liaison par hydrogénation catalytique en présence du catalyseur de Lindlar et de quinoléine pour obtenir l'éther allylique **365** avec un rendement modeste mais conforme à la littérature<sup>60</sup>. L'alternative utilisant le carbonate de 1,1-diméthylpropénylisobutyle (**233**), dont nous avons déjà parlé, a été exploitée avec satisfaction et permet de contourner les problèmes liés aux mauvais rendements et à la reproductibilité de la réaction de réduction (Schéma 46)<sup>32,33</sup>.



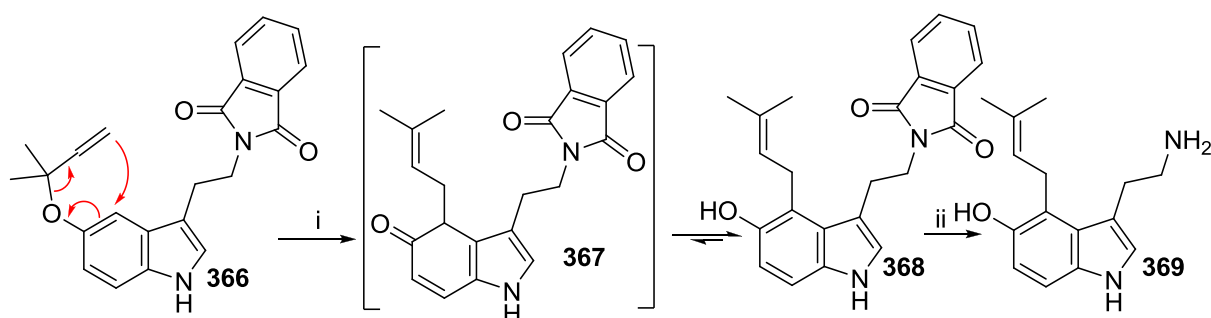
**Réactifs et conditions :** (i) Pd/Lindlar (5 %), quinoléine (0,2 %) (55 %) ; (ii) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, THF, 1 h, t. a. (70 %).

-Schéma 46- Synthèse de l'éther d'allylique de la sérotonine (**365**).

Une fois l'éther allylique **365** obtenu nous avons chauffé ce produit dans le toluène, le réarrangement de Claisen se produit et nous obtenons le phtalimide de 4-prényl-sérotonine

60 McGaffin G., Michalski S., Stolle A., Bräse S., Salaün J., De Meijere A., Palladium(o)-catalyzed SN<sub>2</sub>' displacement on 1-chloro-1-ethenylcyclopropanes: A versatile preparation of functionally substituted methylenecyclopropanes, *Synlett*. 1992, 558 .

(368). Ensuite, nous avons à déprotégé avec la méthyl-hydrazine pour donner la 4-prénylsérotonine (369) (Schéma 47).



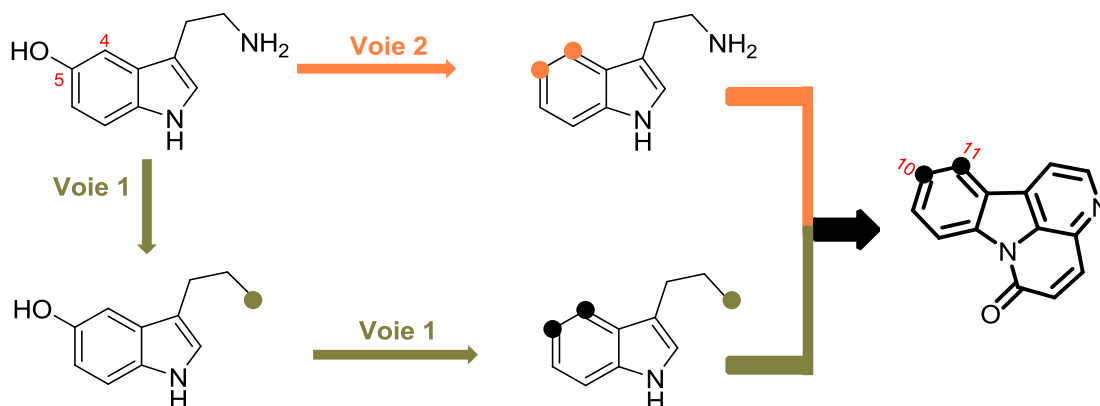
**Réactifs et conditions :** (i) toluène, reflux (>90 %) ; (ii) CH<sub>3</sub>NH-NH<sub>2</sub>, EtOH, 18 h, t. a. (>97 %).

-Schéma 47- Synthèse de la prényl-sérotonine (369).

## e– Accès aux canthin-6-ones fonctionnalisées

Chronologiquement au cours de la thèse deux voies de synthèse ont été étudiées pour accéder aux canthinones cibles (Schéma 48).

- ✿ **Voie 1 :** incorporation des fonctionnalités en position 4-5 sur une sérotonine déjà fonctionnalisée sur l'amine primaire puis construction du cycle D.
- ✿ **Voie 2 :** Construction du cycle D à partir des sérotonines fonctionnalisées en 4 et 5 préparées dans la partie précédente.

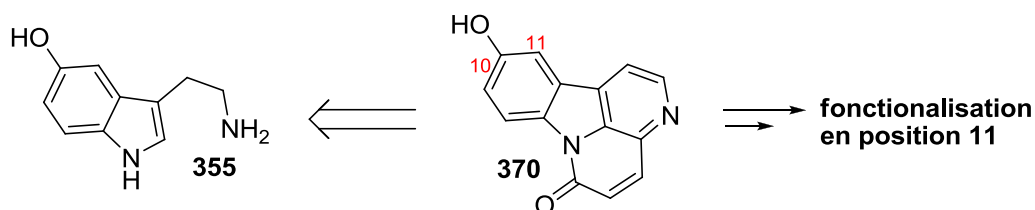


-Schéma 48- Voies de synthèse des dérivés de canthin-6-one 10, 11-disubstitués.

La première approche que nous avons développée pour faire les dérivés prényle- et diméthylbenzopyrène- de la canthin-6-one (1) était basée sur la **voie dite 1**. Notre objectif

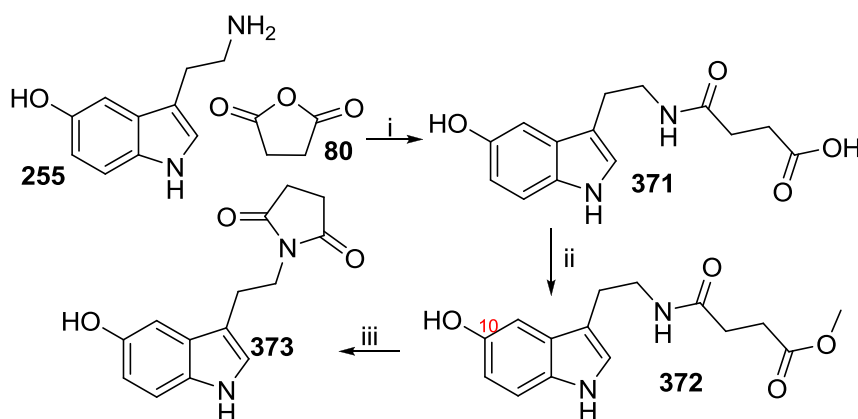
était la synthèse de la 10-hydroxycanthin-6-one (**370**) (Schéma 49) (suivant le protocole décrit pour synthétiser les canthinones au chapitre 3) et avec ce produit procéder ensuite à sa fonctionnalisation (par l'unité prényle ou le noyau diméthylbenzopyrène).

Schéma réactionnel :



-Schéma 49- Synthèse de la 10-hydroxycanthin-6-one (**370**).

Pour commencer cette synthèse nous avons fait réagir la sérotonine (**255**) avec de l'anhydride succinique (**80**). Le « sérotoninamide » obtenu (**371**) est ensuite estérifié sous forme d'ester méthylique (**372**), et finalement l'ester (**372**) est soumis aux conditions classiques du laboratoire <sup>61</sup> pour obtenir la 10-hydroxycanthin-6-one (**370**) (Schéma 50), malheureusement nous n'obtenons pas le produit attendu (**370**), à la place nous avons isolé le produit **373**.



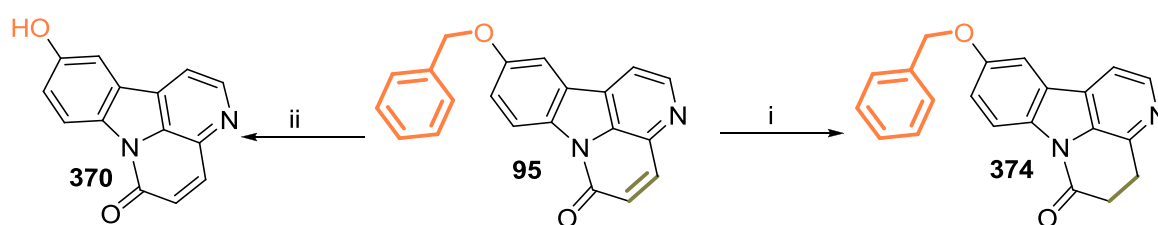
**Réactifs et conditions :** (i) anhydride succinique (1,1 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t. a. (>97 %) ; (ii) Amberlyst® H-15 (20 % m/m), MeOH reflux, 18 h (>97 %) ; (iii) POCl<sub>3</sub> (3 équiv.), benzène, 1 h, reflux, puis DBU (3 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t. a. (60 %).

-Schéma 50- Synthèse de l'ester méthylique du

sérotoninamide **372** à partir de la sérotonine (**371**) basée sur la **voie dite 1**.

Une modification de cette approche a été développée pour réaliser la synthèse de la 10-hydroxycanthin-6-one (**370**). Nous avons tenté la déprotection de la 10-benzyloxy-canthin-6-one (**95**) (voir synthèse au chapitre 3) avec une méthodologie classique comme l'hydrogénation catalytique (Pd/C sous atmosphère réductrice (H<sub>2</sub>)). Dans les conditions que nous avons testées (et réalisées une seule fois) le groupement benzyle n'est pas modifié, l'hydroxyle en position 10 de la canthinone **95** n'a pas été déprotégé. De surcroît, nous observons la réduction de la double liaison en position 4 et 5 et nous obtenons la canthinone réduite **374** (Schéma 51).

<sup>61</sup> Soriano-Agaton F., Lagoutte D., Poupon E., Roblot F., Fournet A., Gantier J. C., Hocquemiller R., Extraction, hemisynthesis, and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities, *J. Nat. Prod.* 2005, **68**, 1581.



**Réactifs et conditions** : (i) H<sub>2</sub>/Pd (1 %), EtOAc, 5 h, t. a. (80 %) ; (ii) BCl<sub>3</sub>, DCM, 8 h, 0 °C (70 %).

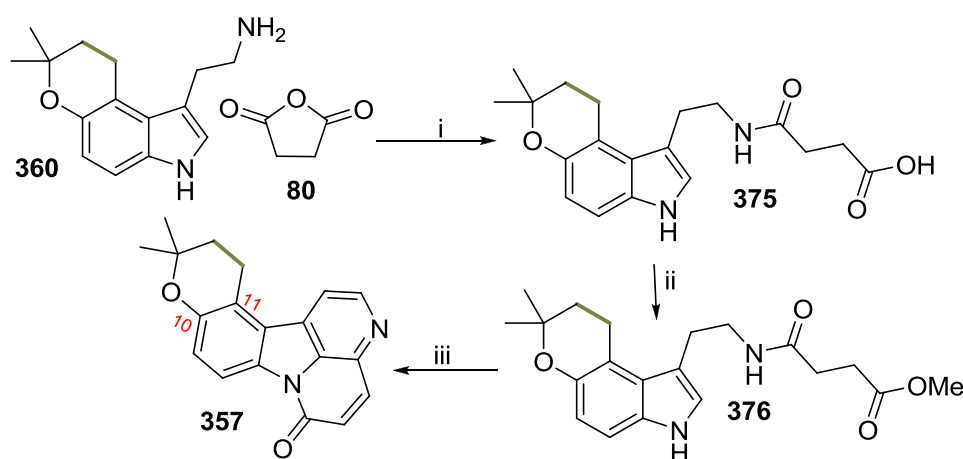
-Schéma 51- Obtention de la 10-hydroxycanthin-6-one (370).

Chronologiquement, ce n'est que récemment que nous avons repris les essais de débenzylation en utilisant avec succès une déprotection de 95 par le trichlorure de bore<sup>62</sup>. La molécule cible a donc pu être synthétisée (Schéma 51).

## α- Synthèse des dérivés « diméthylbenzopyrane » de la canthin-6-one

### Synthèse du dérivé diméthylpyranocanthin-6-one de la canthin-6-one par la voie 2

D'abord, nous allons présenter l'approche basée sur la **voie 2**, c'est-à-dire synthétisant la canthinone en partant des nouvelles tryptamines synthétisées (360). Nous avons poursuivi la synthèse de la diméthylpyranocanthin-6-one (357), par réaction de 360 avec l'anhydride succinique (80), pour donner l'amide (375), puis formation du cycle D par la méthode habituelle conduisant à la diméthylpyranocanthin-6-one (357) (Schéma 52).



**Réactifs et conditions** : (i) anhydride succinique (1.1 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t. a., (>97 %) ; (ii) Amberlyst® H-15 (20 % m/m), MeOH reflux, 18 h, (>97 %) ; (iii) POCl<sub>3</sub> (3 équiv.), benzène, 1 h, reflux, puis DBU (3 équiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, t.a. (70 %).

-Schéma 52- Synthèse de la diméthylpyranocanthin-6-one (357) selon la **voie 2**.

62 Desvergnès S., Vallée Y., Py S., Novel polyhydroxylated cyclic nitrones and N-hydroxypyrrolidines through BCl<sub>3</sub>-mediated deprotection, *Org. Lett.* 2008, 10, 2967.

## Synthèse du dérivé diméthylbenzopyrène et prénylé de la canthin-6-one par la voie 1

### Synthèse du dérivé diméthylbenzopyrène

Parallèlement, une autre approche selon la **voie dite 1** a été étudiée par synthétiser la diméthylbenzopyrène-canthin-6-one (**356**), où l'ester méthylique (**372**) est soumis au 3-chloro-3-méthylbut-1-yne (**346**), puis au traitement thermique dans le 1,3-dichlorobenzène pour donner le réarrangement de Claisen<sup>37</sup>. Finalement, l'ester (**379**) est soumis à la réaction de cyclisation de Bischler-Napieralski, puis à la cyclisation intramoléculaire, pour donner le diméthylbenzopyrène-canthin-6-one<sup>61</sup> (**356**) (Schéma 53).

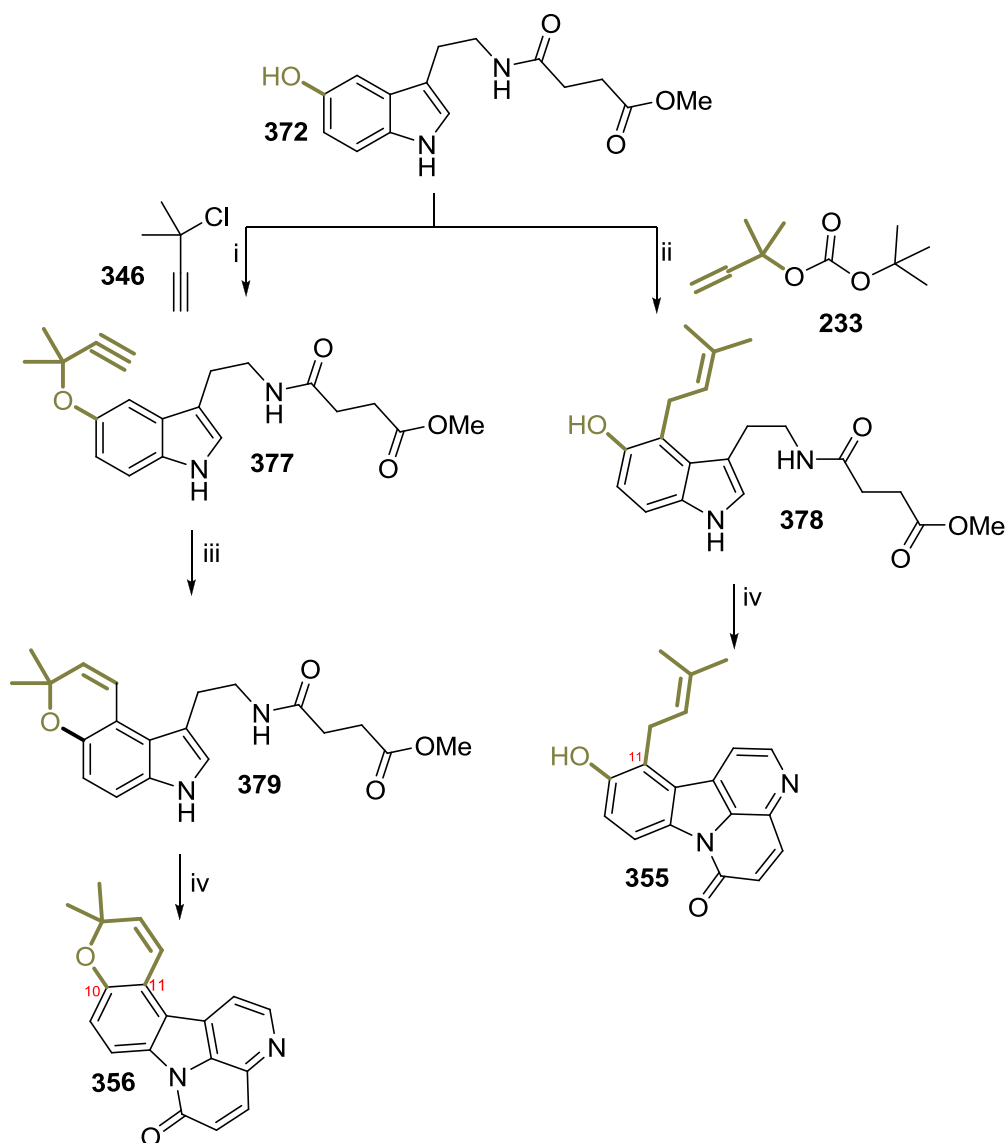
### Synthèse du dérivé prénylé de la canthin-6-one

La cible suivante est la 10-prényl-canthin-6-one (**355**). Dans ce cas la prénylation\* est réalisée par réaction du méthylester de sérotoninamide (**372**), avec le carbonate de 1,1-diméthylpropène et d'isobutyle (**233**) qui est soumis au traitement thermique de la réaction de Claisen, puis aux conditions de cyclisation classiques de la réaction de Bischler-Napieralski et la cyclisation intramoléculaire pour donner finalement le composé cible **355** (Schéma 53). Les activités biologiques de ces nouveaux composés seront détaillées au chapitre 6.

---

\*

Si nous comparons les deux protocoles en termes de rendements nous n'observons pas de grandes différences, mais si nous envisageons l'économie d'étapes, nous pouvons voir une différence claire entre les deux protocoles. Le protocole qui se base sur la **voie dite 2**, présente deux étapes additionnelles que nous n'avons pas dans le protocole de la **voie dite 1**. Ces étapes sont la protection et la déprotection de l'amine primaire.



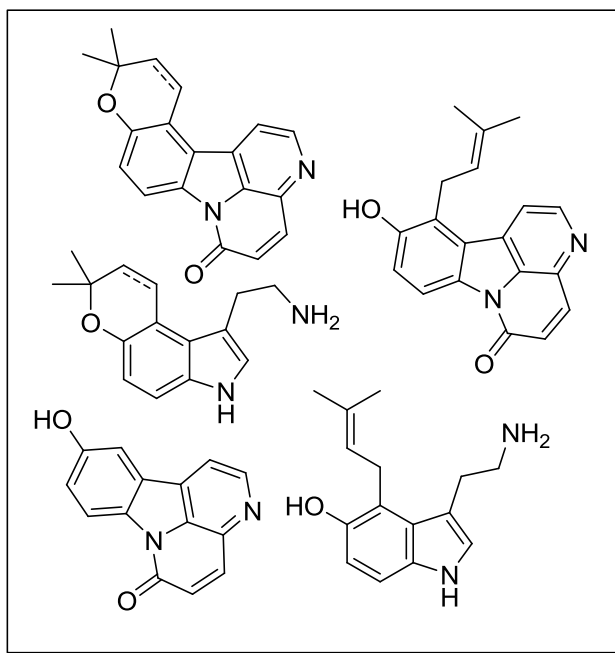
**Réactifs et conditions :** (i) DBU,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 18 h, t. a. (>80 %); (ii)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , THF, 1 h, t.a. (>70 %) ; (iii) 1,3-dichlorobenzène, reflux (70 %) ; (iv)  $\text{POCl}_3$  (3 équiv.), benzène, 1 h, reflux, DBU (3 équiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 18 h, t. a. (65 %).

-Schéma 53-Synthèse de la diméthylpyrène et prényle canthin-6-one (**356** et **355**) par la stratégie basée sur la **voie dite 1.**



### **-Conclusion du chapitre 5-**

- Nous nous sommes focalisés sur des dérivés originaux prénylés de la canthin-6-one en nous basant sur l'intérêt démontré de telles substitutions notamment dans les travaux du groupe du Pr Tillequin.
- Nous avons mis au point une nouvelle voie de synthèse pour obtenir ces dérivés à partir de composés tryptaminiques fonctionnalisés. De façon parallèle, nous avons réussi à synthétiser ces dérivés par une introduction plus tardive des motifs prényle et diméthylbenzopyrène, diminuant ainsi le nombre d'étapes de la synthèse.
- Finalement, un analogue de type 10-hydroxycanthin-6-one a été obtenu par synthèse, grâce à l'utilisation de différentes méthodologies.



## -Bibliographie du chapitre 5-

- 1 Rohmer M., The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants, *Nat. Prod. Rep.* 1999, **16**, 565.
- 2 Dewick P. M., The biosynthesis of C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> terpenoid compounds, *Nat. Prod. Rep.* 2002, **19**, 181.
- 3 Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H., Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate, *Biochem. J.* 1993, **295**, 517.
- 4 Rohmer M., Comprehensive natural product chemistry, isoprenoids including carotenoids and steroids (Pergamon (Oxford)), 1999, **2**, 45.
- 5 Putra S. R., Disch A., Bravo J.-M., Rohmer M., Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some Gram-negative bacteria and mycobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, **164**, 169.
- 6 Boucher Y., Doolittle, W. F., The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways, *Mol. Microbiol.* 2000, **37**, 703.
- 7 Seto H., Watanabe H., Furihata K., Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aeriovivifer*, *Tetrahedron Lett.* 1996, **37**, 7979.
- 8 Seto H., Rihara N., Furihata K., Studies on the biosynthesis of terpenoids produced by Actinomycetes. Part 4. Formation of BE-40644 by the mevalonate and non mevalonate pathways, *Tetrahedron Lett.* 1998, **39**, 9497.
- 9 Disch A., Hemmerlin A., Bach T., Rohmer M., Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells, *Biochem. J.* 1998, **331**, 615.
- 10 Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y., Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites, *Phytochem.* 2009, **70**, 1739.
- 11 Row E. C., Brown S. A., Stachulski A. V., Lennard M. S., Synthesis of 8-geranyloxyporsalins analogues and their evaluation as inhibitors of CYP3A4, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, **14**, 3865.
- 12 Heide L., Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, **13**, 171.
- 13 Cestac P., Doisneau-Sixou S., G., F., Développement des inhibiteurs de farnésyl transférase comme agents anticancéreux, *Ann.Pharm. Fr.* 2005, **63**, 76.
- 14 (a) Metzger U., Schall C., Zocher G., Unsöld I., Stec E., Li S. M., Heide L., Stehle T., The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sc.USA* 2009, **106**, 14309. (b) Yu X., Li S.M., Prenylation of flavonoids by using a dimethylallyl synthase, 7-DMATS, from *Aspergillus fumigates*, *Chem. Bio. Chem.* 2011, **00**, 1.
- 15 Koehl P., Relaxed specificity in aromatic prenyltransferases, *Nature Chem. Biol.* 2005, **1**, 71.
- 16 McIntosh J. A., Donia M. S., Nair S. K., Schmidt E. W., Enzymatic basis of ribosomal peptide prenylation in cyanobacteria, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 13698.
- 17 Luk L. Y. P., Qian Q., Tanner M. E., A cope rearrangement in the reaction catalyzed by dimethylallyltryptophan synthase?, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 12342.
- 18 Dewick P. M., *Medicinal natural products : A biosynthetic approach*. Third edition (Wiley), 2009.
- 19 Raikar S. B., Nuhant P., Delpech B., Marazano C., Synthesis of polyprenylated benzoylphloroglucinols by regioselective prenylation of pohlorglucinol in an aqueous medium, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1358.
- 20 Narender T., Reddy K. P., Shweta, Srivastava K., Mishra D. K., Puri S. K., Total synthesis of munchiwarin, a triprenylated chalcone from *Crotalaria medicagenia*, *Org. Lett.* 2007, **9**, 5369.
- 21 Brajeul S., Delpech B., Marazano C., Sulfonium salts as prenyl, geranyl, and isolavandulyl transfer agents towards benzoylphloroglucinol derivatives, *Tetrahedron Lett.* 2007, **48**, 5597.
- 22 Ramesh E., Sree Vidhya T. K., Raghunathan R., Indium chloride/silica gel supported synthesis of pyrano/thiopyranoquinolines through intramolecular imino Diels-Alder reaction using microwave irradiation, *Tetrahedron Lett.* 2008, **49**, 2810.
- 23 Iikubo K., Ishikawa Y., Ando N., Umezawa K., Nishiyama S., The first direct synthesis of [alpha]-mangostin, a potent inhibitor of the acidic sphingomyelinase, *Tetrahedron Lett.* 2002, **43**, 291.
- 24 Hoarau T., Pettus C. R. R., Strategies for the preparation of differentially protected *ortho*-prenylated phenols, *Synlett.* 2003, 127.
- 25 Dai Q., Xie X., Xu S., Ma D., Tang S., She X., Total syntheses of tardioxopiperazine A, isoechinulin A, and varicolorin C, *Org. Lett.* 2011, **13**, 2302.
- 26 Trost B. M., Malhotra S., Chan W. H., Exercising regiocontrol in palladium-catalyzed asymmetric prenylations and geranylations : Unifying strategy toward flustramines A and B, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 7328.
- 27 Kawasaki T., Shinada M., Ohzono M., Ogawa A., Terashima, R., Sakamoto M., Total synthesis of (±)-flustramines A and C, (±)-flustramide A, and (-) and (+)-debromoflustramines A, *J. Org. Chem.* 2008, **73**, 5959.
- 28 Judd K. E., Caggiano L., Bi(OTf)<sub>3</sub>-catalysed prenylation of electron-rich aryl ethers and phenols with isoprene: a direct route to prenylated derivatives, *Org. Biomol. Chem.* 2011, **9**, 5201.
- 29 Tseng T. H., Chuang S. K., Hu C. C., Chang C. F., Huang Y. C., Lin C. W., Lee Y. J., The synthesis of morusin as a potent antitumor agent, *Tetrahedron* 2010, **66**, 1335.
- 30 Claisen L., Lowman O., Base-catalyzed condensation of an ester containing an α-hydrogen atom with a molecule of the same ester or a different one to give β-keto esters, *Chem. Ber.* 1887, **20**, 651.
- 31 Sato M., Otabe N., Tuji T., Matsushima K., Kawanami H., Chatterjee M., Yokoyama T., Ikushima Y., Suzuki T. M., Highly-selective and high-speed Claisen rearrangement induced with subcritical water microreaction in the absence of catalyst, *Green Chem.* 2009, **11**, 763.
- 32 Kamei T., Shindo M., Shishido K., First enantioselective total synthesis of (-)-heliannuol C, *Tetrahedron Lett.* 2003, **44**, 8505.

- 33 Chantarasriwong O., Cho W. C., Batova A., Chavasiri W., Moore C., Rheingold A. L., Theodorakis E. A., Evaluation of the pharmacophoric motif of the caged *Garcinia* xanthenes, *Org. Biomol. Chem.* 2009, **7**, 4886.
- 34 Jana A. K., Mal D., A rapid entry to C-prenylcarbazoles: total synthesis of clausamine C-D, clausevatine D and clausine F, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 4411.
- 35 Roe J. M., Webster R. A. B., Ganesan A., Total synthesis of (+)-okaramine J featuring an exceptionally facile N-reverse-prenyl to C-prenyl aza-Claisen rearrangement, *Org. Lett.* 2003, **5**, 2825.
- 36 Xiong X., Pirrung M. C., Practical synthesis of 7-prenylindole, *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 5832.
- 37 Tisdale E. J., Vong B. G., Li H., Kim S. H., Chowdhury C., Theodorakis E. A., Total synthesis of *seco*-lateriflorone, *Tetrahedron* 2003, **59**, 6873.
- 38 Lee Y. R., Choi J. H., Yoon S. H., Efficient and general method for the synthesis of benzopyrans by ethylenediamine diacetate-catalyzed reactions of resorcinols with [alpha],[beta]-unsaturated aldehydes. One step synthesis of biologically active (±)-confluentin and (±)-daurichromenic acid, *Tetrahedron Lett.* 2005, **46**, 7539.
- 39 Khupse R. S., Erhardt P. W., Total syntheses of racemic natural (-) and unnatural (+) glyceollin I, *Org. Lett.* 2008, **10**, 5007.
- 40 Zeng H., Ju J., Hua R., ReCl(CO)<sub>5</sub>-catalyzed cyclocondensation of phenols with 2-methyl-3-butyn-2-ol to afford 2,2-dimethyl-2H-chromenes, *Tetrahedron Lett.* 2011, **52**, 3926.
- 41 Gruner K. K., Knölker H. J., Palladium-catalyzed total synthesis of euchrestifoline using a one-pot Wacker oxidation and double aromatic C-H bond activation, *Org. Biomol. Chem.* 2008, **6**, 3902.
- 42 Selepe M. A., Drewes S. E., Van Heerden F. R., Total synthesis of the pyranoisoflavone kraussianone 1 and related isoflavones, *J. Nat. Prod.* 2010, **73**, 1680.
- 43 Lee Y. R., Xia L., Concise total synthesis of biologically interesting pyranochalcone natural products: citrunobin, boesenbergin A, boesenbergin B, xanthohumol C, and glabrachromene, *Synthesis* 2007, 3240.
- 44 Lee Y. R., Kim Y. M., Kim S. H., Efficient one-pot synthesis of benzopyranobenzopyrans and naphthopyranobenzopyrans by domino aldol-type reaction/hetero Diels-Alder reaction of resorcinols and naphthols, *Tetrahedron* 2009, **65**, 101.
- 45 Nicolaou K. C., Lister T., Denton R. M., Gelin C. F., Cascade reactions involving formal [2+2] thermal cycloadditions: total synthesis of artochamins F, H, I, and J, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, **46**, 7501.
- 46 (a) Artman G. D., Grubbs A. W., Williams R. M., Concise, asymmetric, stereocontrolled total synthesis of stephacidins A, B and notoamide B, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, **129**, 6336. (b) Guo J.-P., Tan J.-L., Wang Y.-L., Wu H.-Y., Zhang C.-P., Niu X.-M., Pan W.-Z., Huang X.-W., Zhang K.-Q. Isolation of Talathermophilins from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* YM3-4. *J. Nat. Prod.* 2011, 00-00.
- 47 Janin Y. L., Antituberculosis drugs: Ten years of research, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**, 2479.
- 48 Copp B. R., Pearce A. N., Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat. Prod. Rep.* 2007, **24**, 278.
- 49 Suksamrarn S., Suwannapoch N., Phakhodee W., Thanuhiranlert J., Ratananukul P., Chimnoi N., Suksamrarn A., Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*, *Chem. Pharm. Bull.* 2003, **51**, 857.
- 50 Prado S., Toum V., Saint-Joanis B., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Janin Y. L., Antimycobacterial benzofuro[3,2-f]chromenes from a 5-bromochromen-6-ol, *Synthesis* 2007, 1566.
- 51 Prado S., Janin Y. L., Saint-Joanis B., Brodin P., Michel S., Koch M., Cole S. T., Tillequin F., Bost P.-E., Synthesis and antimycobacterial evaluation of benzofurobenzopyran analogues, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**, 2177.
- 52 Prado S., Ledoit H., Michel S., Koch M., Darbord J. C., Cole S. T., Tillequin F., Brodin P., Benzofuro[3,2-f][1]benzopyrans: a new class of antitubercular agents, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, **14**, 5423.
- 53 Barf T. A., de Boer P., Wikström H., 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist properties of novel 2-[5-[[[(trifluoromethyl)sulfonyl]oxy]indolyl]ethylamines and their use as synthetic intermediates, *J. Med. Chem.* 1996, **39**, 4717.
- 54 Imada Y., Iida H., Naota T., Flavin-catalyzed generation of diimide. An environmentally friendly method for the aerobic hydrogenation of olefins, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 14544.
- 55 Imada Y., Iida H., Ono S., Murahashi S. I., Flavin catalyzed oxidations of sulfides and amines with molecular oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125**, 2868.
- 56 Smit C., Fraaije M. W., Minnaard A., Enantioselective total synthesis of (-)-calicheamicinone, *J. Org. Chem.* 2008, **73**, 9482.
- 57 Koppes W. M., Moran J. S., Oxley J. C., Smith J. L., Azo bond hydrogenation with hydrazine, R-NHNH<sub>2</sub>, and hydrazobenzene, *Tetrahedron Lett.* 2008, **49**, 3234.
- 58 Horii Z. I., Iwata C., Tamura Y., Reduction of phthalimides with sodium borohydride, *J. Org. Chem.* 1961, **26**, 2273.
- 59 Smith A. L., Hwang C. K., Pitsinos E., Scarlato G. R., Nicolaou K. C., Enantioselective total synthesis of (-)-calicheamicinone, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, **114**, 3134.
- 60 McGaffin G., Michalski S., Stolle A., Bräse S., Salaün J., De Meijere A., Palladium(0)-catalyzed SN<sub>2</sub>' displacement on 1-chloro-1-ethenylcyclopropanes: A versatile preparation of functionally substituted methylenecyclopropanes, *Synlett.* 1992, 558.
- 61 Soriano-Agaton F., Lagoutte D., Poupon E., Roblot F., Fournet A., Gantier J. C., Hocquemiller R., Extraction, hemisynthesis, and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities, *J. Nat. Prod.* 2005, **68**, 1581.
- 62 Desvergnès S., Vallée Y., Py S., Novel polyhydroxylated cyclic nitrones and N-hydroxypyrrolidines through BCl<sub>3</sub>-mediated deprotection, *Org. Lett.* 2008, **10**, 2967.

# Chapitre 6

## Études d'activités biologiques



## -Chapitre 6-

### Études d'activités biologiques

L'évaluation de l'activité biologique des molécules naturelles et synthétiques a été étendue face à plusieurs agents parasitaires, notamment *Trypanosoma cruzi*, le parasite responsable de la **trypanosomiase sud-américaine**, *Plasmodium falciparum*, le parasite du **paludisme**, puis l'activité **antituberculeuse**, sur *Mycobacterium tuberculosis*. Ensuite, leur activité **antiproliférative** à été évaluée sur des différentes lignées cellulaires et finalement sur *Caenorhabditis elegans*, le parasite modèle pour l'**helminthiases**. Les résultats biologiques de ces tests seront exposés dans ce chapitre.

#### I– La Maladie de Chagas

Lors de travaux antérieurs<sup>1,2</sup>, il a été mis en évidence que l'extrait de l'écorce de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* et les canthinones isolées (**1** et **8**) étaient actifs sur les trypanosomes responsables de la trypanosomiase américaine, également appelée maladie de Chagas, baptisée du nom du médecin brésilien spécialiste des maladies infectieuses Carlos Chagas, qui l'a décrite pour la première fois en 1909<sup>3</sup>.

#### A– Généralités

##### 1–État des lieux sur la maladie de Chagas

En Amérique latine, environ 90 millions de personnes vivent dans des régions où la maladie de Chagas est endémique. Cette maladie parasitaire affecte près de 20 millions de personnes essentiellement dans les régions tropicales d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud (la figure 1 présente la distribution des cas d'infection par *T. cruzi*<sup>\*</sup>).

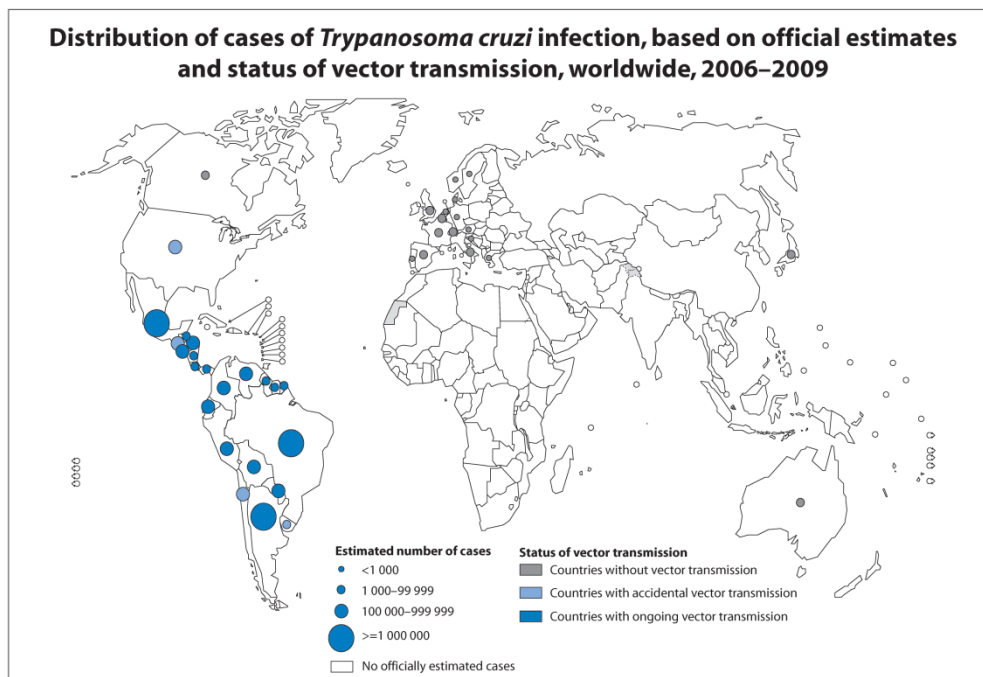
---

1 Ferreira M. E., Rojas de Arias A., Torres de Ortiz S., Inchausti A., Nakayama H., Thouvenel C., Hocquemiller R., Fournet A., Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *80*, 199.

2 Ferreira M. E., Nakayama H., de Arias A. R., Schinini A., de Bilbao N. V., Serna E., Lagoutte D., Soriano-Agaton F., Poupon E., Hocquemiller R., Fournet A., Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice, *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 258.

3 Chagas C., Neue Trypanosomen, *Vorläufige Mitteilung Arch. Schiff Tropenhyg.* **1909**, *13*, 120.

\* <http://www.who.int>



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

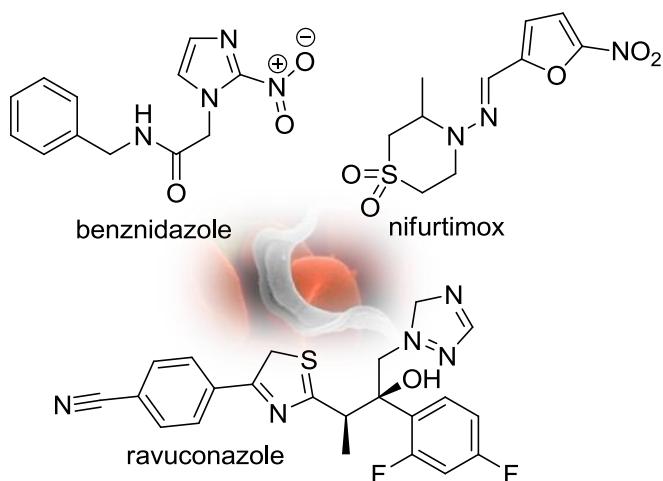
Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



-Figure 1- Distribution des cas de trypanosomiase sud-américaine.

## 2– Traitement

### Molécules trypanocides actuellement disponibles



\*Les traitements chimiothérapeutiques de cette maladie reposent à ce jour sur deux familles de molécules : les nitroimidazoles, tels que le benznidazole; les nitrofuranes, tels que le nifurtimox. Ces deux composés peuvent avoir une efficacité sur la maladie de Chagas au début de l'infection<sup>4,5a,b,6a</sup>, mais ils en ont peu ou pas du tout sur cette maladie lorsque *Trypanosoma cruzi* s'est installé dans l'organisme et que la maladie a pris un caractère chronique. À ce stade, cette maladie est considérée comme

4 Sgambatti de Andrade A. L. S., Zicker F., de Oliveira R. M., Almeida de Silva S., Luquetti A., Travassos L. R., Almeida I. C., de Andrade S. S., Guimarães de Andrade J., Martelli C. M.T., Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection, *The Lancet* 1996, **348**, 1407.

5 (a) Cerecetto H., Gonzalez M., Chemotherapy of Chagas disease: status and new developments, *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, **2**, 1187. (b) Muñoz M. J., Murcia L., Segovia M., The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2011, **9**, 5.

incurable, une dernière classe de médicaments est en cours de développement clinique, les triazoles antifongiques (posaconazole, voriconazole et ravuconazole) qui sont apparus comme de nouveaux traitements potentiels<sup>6b</sup>.

Les traitements avec le benznidazole (Lafepe<sup>®</sup>) et le nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>) sont, en outre, confrontés à l'apparition de souches résistantes de *T. cruzi*, ce qui diminue encore leur efficacité dans la phase première de la maladie de Chagas. De plus, ces molécules provoquent des effets secondaires non négligeables tels qu'anorexie, vomissements, neuropathie périphérique et dermatopathie allergique<sup>4</sup>. Le besoin se fait donc sentir d'un nouveau traitement de la maladie de Chagas qui soit efficace tant dans la première phase de la maladie, où *T. cruzi* est présent essentiellement dans le sang, que dans la seconde phase de cette maladie, où l'on trouve le parasite essentiellement dans les organes : cœur et système digestif<sup>7</sup>.

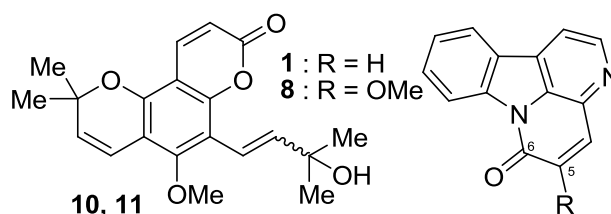
## B– Travaux personnels

### 1– Évaluation de l'activité des extraits de *Z. chiloperone* et des produits isolés

À l'origine de ce travail, une approche empirique associant les tests biologiques *in vitro* contre les parasites et le fractionnement bio-guidé avait été choisie, principalement parce qu'aucune approche ethnopharmacologique n'a été possible afin d'orienter la sélection des plantes actives contre la maladie de Chagas<sup>8</sup> en raison de l'absence de symptômes externes. Cependant cette plante était utilisée pour traiter d'autres maladies parasitaires en médecine traditionnelle.

#### a–Étude d'activité *in vitro*

Nous avons étudié l'activité *in vitro* des extraits préparés à partir des différents organes de *Z. chiloperone* : écorces, feuilles, rhizomes et fruits et des différents produits isolés, tels l'avicennol (*cis* et *trans*) (**10**, **11**), la canthin-6-one (**1**) et la 5-méthoxycanthin-6-one (**8**) et ce contre les formes trypomastigotes, amastigotes et épimastigotes de *T. cruzi*. Ainsi, les différents extraits, la canthin-6-one (**1**) et 5-méthoxy-canthin-6-one (**8**) lysent



6 (a) Sánchez-Moreno M., Sanz A.M., Gómez-Contreras F., Navarro P., Marin C., Ramirez-Macias I., Rosales M. J., Olmo F., Garcia-Aranda I., Campayo L., Cano C., Arrebola F., Yunta M.J. R. *In vivo* trypanosomicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against acute and chronic phases of Chagas disease, *J. Med. Chem.* 2011, **54**, 970. (b) Ribeiro I., Sevcsik A.-M., Alves F., Diap G., Don R., Harhay M. O., Chang S., Pecoul B., New improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009, **3**, e484. 6a. Rowe A., Body Borer, *Chem. Eng. News* 2011, **89**, 32.

7 Rassi A., Rassi A., Marin-Neto J. A., Chagas disease, *The Lancet* 2010, **375**, 1388.

8 Izumi E., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Veiga Junior V. F., Nakamura C. V., Natural products and Chagas disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*, *Nat. Prod. Rep.* 2011, **28**, 809.



entre 45 et 79 % des parasites. Parallèlement les *cis*- et *trans*-avicennol (**10**, **11**) lysent entre 35 et 86 % des parasites. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Il est important remarquer que l'activité des canthinones et des extraits est très proche de l'activité de la molécule employée en thérapie actuellement, le benznidazole. Cette équivalence de niveau d'activité antitrypomastigote donne une grande valeur aux canthinones, mais aussi aux extraits comme possible alternative thérapeutique. Parmi les extraits, nous avons trouvé spécialement intéressante l'activité enregistrée avec l'extrait préparé à partir des feuilles. Les feuilles peuvent être récoltées sans endommager l'arbre et devenir une source renouvelable de matière première pour un futur développement d'un phytomédica base de cet extrait, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 2.

composé	trypomastigote % lyse <sup>a,b</sup>	intracellulaire amastigote (µM)	AA <sup>c</sup>	épimastigote % lyse <sup>d</sup>
<b>tige</b>				
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	51			
EtOH	56			
<b>feuilles</b>				
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	73			
EtOH	78			
<b>fruits</b> EtOH	45			
<b>rihzone</b> CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	48			
canthin-6-one ( <b>1</b> )	79	15,1	90	
5-méthoxy-canthin-6-one ( <b>8</b> )	75	15,1	66,4	
<i>trans</i> -avicennol ( <b>11</b> )				85,3
<i>cis</i> -avicennol ( <b>10</b> )				75,6
Violet de gentiane	100			
benznidazole	87	192	97,5	

<sup>a</sup> % Lyse = pourcentage de lyse du parasite à 250 µg/mL du composé.  
<sup>b</sup> Résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes avec une déviation standard de moins de 10 % dans tous les cas.  
<sup>c</sup> AA, pourcentage de l'activité anti-amastigotes .  
<sup>d</sup> % Lyse = pourcentage de lyse du parasite à 128 µM du

-Tableau 1- Activité trypanocide *in vitro* des extraits de *Z. chiloperone* (sur les formes trypomastigotes et épimastigotes) et effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires de fibroblastes.

9 Ferreira M. E., Cebrián-Torrejón G., Corrales A. S., Vera de Bilbao N., Rolón M., Gomez C. V., Leblanc K., Yaluf G., Schinini A., Torres S., Serna E., Rojas de Arias A., Poupon E., Fournet A., *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment, *J. Ethnopharmacol.* 2011, **133**, 986.

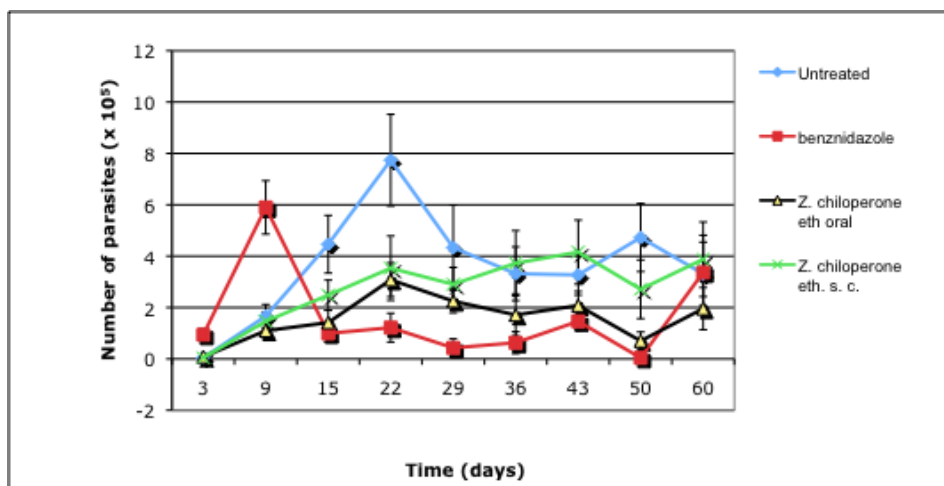
Pour compléter notre étude sur l'activité antitrypanosome, nous avons évalué l'activité anti-amastigotes des canthinones isolées des extraits. Les résultats sont présentés dans le tableau 1, pour la canthin-6-one (**1**) et la 5-méthoxy-canthin-6-one (**8**) à une concentration de 15,1 µM après 7 jours d'incubation<sup>9</sup>.

### b- Activité *in vivo* des extraits de feuilles

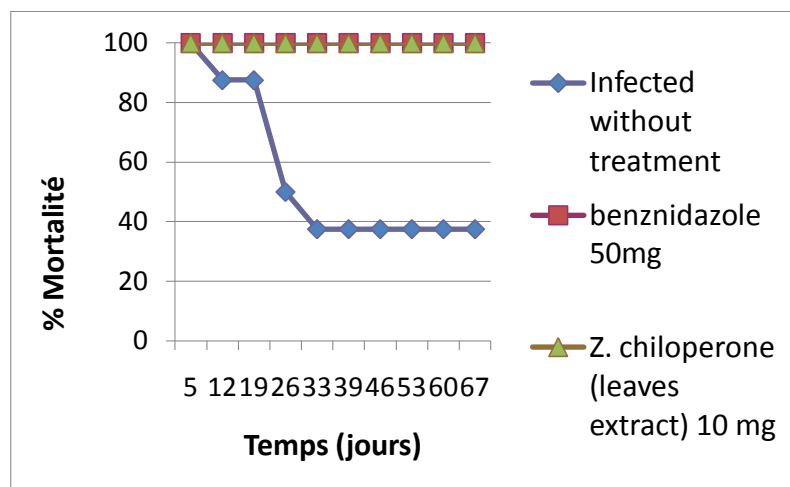
Pour finir avec notre étude d'activité antitrypanosome, nous avons décidé d'approfondir l'évaluation de l'activité de l'extrait éthanolique des feuilles. Les résultats sont présentés dans la figure 2 et montrent les données obtenus pour le test *in vivo* sur *T. cruzi*.

Nous trouvons une activité intéressante *in vivo* sur souris BALB/c infectées par les deux souches (CL\* et Y\*\*)<sup>9</sup>.

**A**



**B**



-Figure 2- Effets du benznidazole à 50 mg/kg et de l'extrait éthanolique des feuilles de *Z. chiloperone* à une concentration de 10 mg/kg sur des souris BALB/c infectées d'une façon aiguë avec *T. cruzi* (A) souche CL ou souche Y (B).

\* signification : souche CL-Brener.  
 \*\* signification : souche réticulotrope.

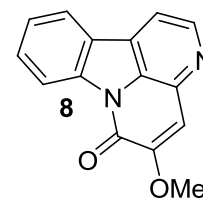
## c– Activité *in vitro* des extraits mensuels de feuilles

<u>2010</u>	%AE <sup>a</sup>	± %DS	<u>2010</u>	%AE	± %DS
janvier	78,44	5,37	juin	53,82	5,87
février	66,12	3,45	juillet	56,8	0,35
mars	38,28	4,6	août	57,37	4,45
avril	73,5	0,35	septembre	71,72	4,81
mai	86,66	2,06	octobre	70,7	3,33
			novembre	43,7	7,35
			décembre	21,34	9,9

<sup>a</sup> % Lyse = pourcentage de lyse du parasite à 1 mg/mL d'extrait.

-Tableau 2- Activité trypanocide *in vitro* des extraits mensuels des feuilles de *Z. chiloperone* (sur les formes epimastigotes)

L'activité de l'extrait des feuilles est attribuée principalement à la présence de la 5-méthoxycanthin-6-one (**8**) (tableau 2), le principal composé isolé de cet extrait, mais nous pouvons penser aussi à la présence de plusieurs composés actifs dans cet extrait qui augmenteraient l'activité biologique en synergie<sup>9</sup>.



## 2– Étude de l'inhibition enzymatique de la trypanothione réductase

L'activité trypanocide enregistrée avec les canthinones est intéressante, mais le mécanisme d'action de ces composés sur *T. cruzi* reste toujours inconnu. Les enzymes spécifiques de *T. cruzi* telles que la trypanothione réductase, représentent des cibles potentielles de recherche de nouveaux médicaments, car ils jouent un rôle essentiel dans la vie de cet organisme<sup>10</sup>.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Davioud-Charvet (Université de Strasbourg) nous avons évalué l'activité inhibitrice des canthinones sur la trypanothione réductase, ces essais d'inhibition *in vitro* n'ont donné aucun résultat positif avec les canthinones (**1** et **8**).

## II– Le paludisme

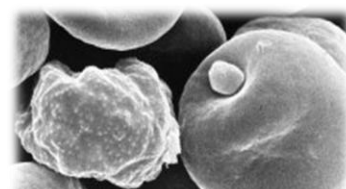
### A– Généralités

<sup>10</sup> Bonnet B., Soulez D., Girault S., Maes L., Landry V., Davioud-Charvet E., Sergheraert, C., Trypanothione reductase inhibition/trypanocidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine series, *Bioorg. Med. Chem.* 2000, **8**, 95.

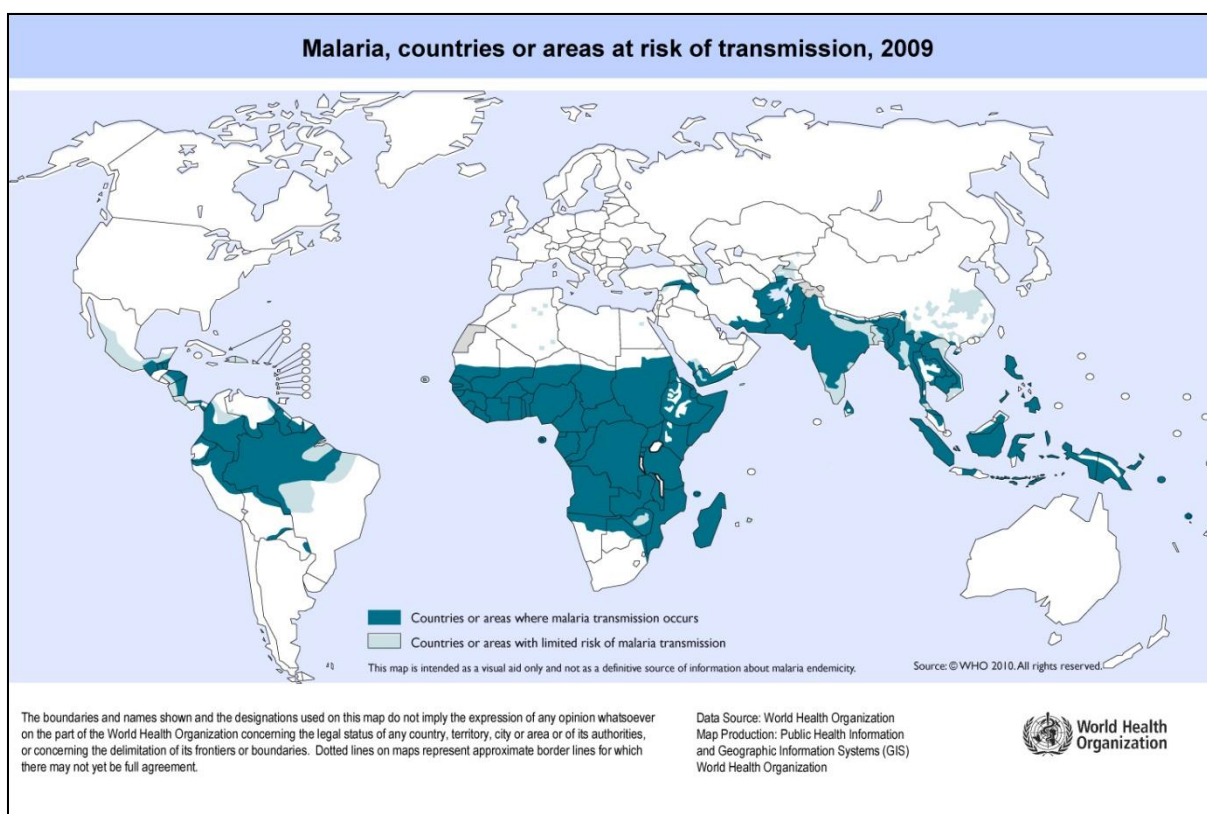
\* <http://www.who.int>.

## 1- État des lieux sur le paludisme

Le paludisme (ou malaria) est de loin la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. En effet, en 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 2,4 milliards le nombre de personnes exposées à des risques d'infection palustre (soit environ 50 % de la population mondiale, répartie dans une centaine de pays situés principalement dans les régions tropicales et subtropicales) et environ 250 millions le nombre d'individus impaludés<sup>11a,\*</sup>. Chaque année, 1 million de personnes décèderaient des suites de cette maladie (OMS 2010\*). Sur la figure 4 nous pouvons observer la distribution des aires de transmission de l'infection centrée notablement dans l'hémisphère sud.



-Figure 3- Effets de *Plasmodium falciparum* sur les érythrocytes.



-Figure 4- Distribution des pays en risque de malaria.

L'agent responsable du paludisme est un protozoaire du genre *Plasmodium* transmis par un moustique femelle du genre *anophèle*. Sur plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium* parasitant des mammifères, des rongeurs, des oiseaux ou même des batraciens, seules cinq sont impliquées dans le paludisme humain (*P. knowlesi*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P.*

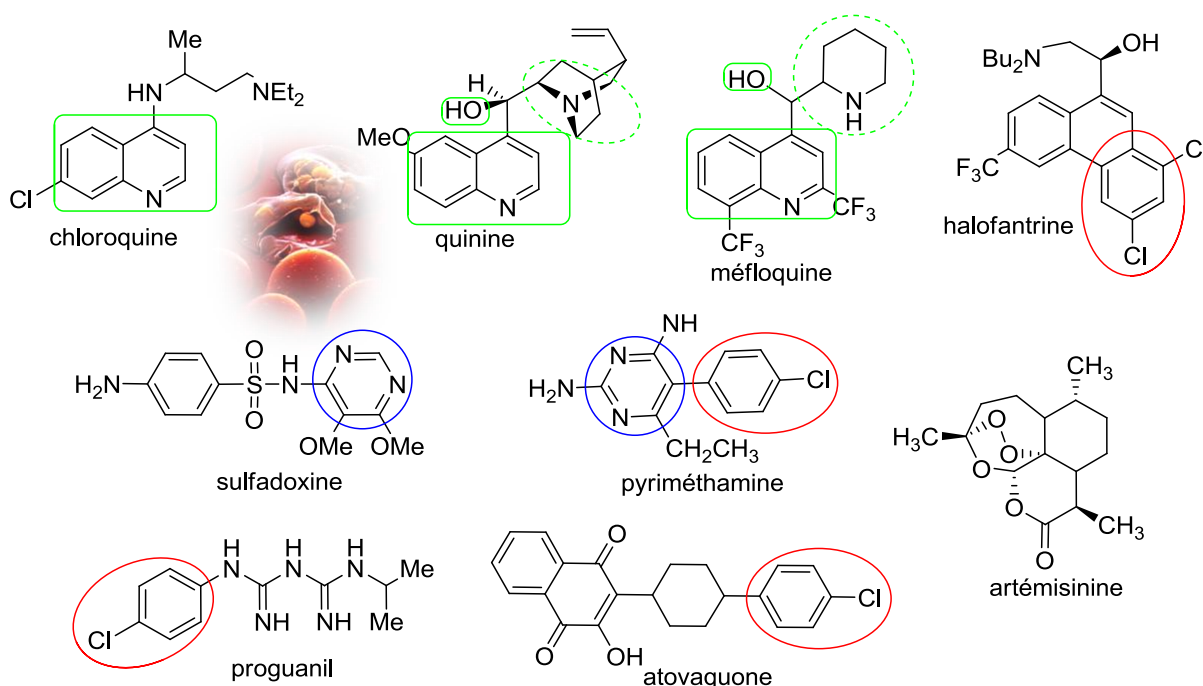
11 (a) Snow R. W., Guerra C. A., Noor A. M., Myint H. Y., Hay S.I., The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature* 2005, **434**, 214. (b) Sharp P. M., Liu W., Learn G. H., Rayner J.C., Peeters M., Hahn B. H., Source of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, **108**, E744.  
 12 Newton P., White N., Malaria: new developments in treatment and prevention, *Annu. Rev. Med.* 1999, **50**, 179.

*falciparum*) et peuvent déclencher la maladie sous des formes plus ou moins sévères. *Plasmodium falciparum*<sup>11b</sup> (Figure 3), l'espèce la plus pathogène, est responsable des accès pernecieux (neuropaludisme) souvent mortels.

Les échecs des campagnes d'éradication menées jusqu'à présent sont essentiellement dus à la résistance acquise du vecteur, l'anophèle femelle, aux insecticides, et celle progressive du parasite, le *Plasmodium*, aux médicaments classiques, notamment à la chloroquine. Cette multi-résistance, semble aujourd'hui toucher toutes les molécules antipaludiques classiques et s'étend à la fois en intensité et géographiquement. Le besoin se fait donc sentir, de traitements du paludisme qui soient efficaces sans présenter ce problème de résistance.

## 2- Traitement

### a- Molécules antipaludiques actuellement disponibles



-Figure 5-Principaux agents antipaludiques.

Ces molécules peuvent être utilisées soit en prophylaxie (prévention lors d'un voyage en pays endémique), soit en thérapie (après diagnostic d'une infection). Les médicaments les plus efficaces agissent lors de la phase d'infection des globules rouges, responsable de la pathologie (médicaments schizonticides). Ce sont la chloroquine, la quinine, l'halofantrine, la méfloquine... (Figure 5). Les molécules actives contre les autres stades parasitaires (stade hépatique, formes sexuées) sont rarement utilisées en raison de leur toxicité<sup>12,13</sup>.

La **quinine** : cette molécule est extraite de l'écorce du quinquina (*Cinchona officinalis*) et a été utilisée pendant des siècles pour le traitement du paludisme. Aujourd'hui, elle est

réservée au traitement du neuropaludisme grave à *P. falciparum*, en partie à cause d'effets indésirables.

La **chloroquine** (Nivaquine<sup>®</sup>) : elle appartient à la famille des 4-amino-quinoléines qui agissent en inhibant la polymérisation de l'hème (toxique pour le parasite) en hémozoïne sans toucher les enzymes analogues de l'hôte. Sa première utilisation remonte à la seconde guerre mondiale. Elle est très efficace, à la fois pour l'utilisation en prophylaxie et en traitement, et elle provoque peu d'effets secondaires lors d'administration aux doses recommandées. Malheureusement, aujourd'hui la plupart des souches de *P. falciparum* sont résistantes à la chloroquine.

La **méfloquine** (Lariam<sup>®</sup>) : cette molécule, introduite en 1971, est structurellement proche de la quinine, c'est pourquoi ces deux composés ne doivent pas être administrés ensemble. Ce médicament était très efficace contre le paludisme résistant aux autres formes de traitement lorsqu'il a été introduit. Cependant, sa longue demi-vie plasmatique (6-22 jours) a favorisé l'émergence de souches résistantes en Asie du sud-est.

La **sulfadoxine** et la **pyriméthamine** (Fansidar<sup>®</sup>) : à partir de 1973, l'association de ces deux molécules, structurellement proches, est devenue une alternative dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* chloroquino-résistant car une grande résistance aux sulfonamides (sulfadoxine) est associée à une hypersensibilité aux antifoliques (pyriméthamine), et inversement. Ce « cocktail » a donné de bons résultats jusqu'au milieu des années 80, mais des phénomènes de résistance sont apparus depuis, sans doute favorisés par une durée de demie-vie plasmatique longue.

Le **proguanil** et l'**atovaquone** (Malarone<sup>®</sup>) : le proguanil a été synthétisé pour la première fois en 1946. Sa structure est proche de celle de la pyriméthamine. Ce médicament est toujours utilisé en prophylaxie dans certains pays. L'atovaquone, une hydroxyquinone, a un spectre d'activité antiparasitaire très large et était déjà utilisée seule en 1992 pour le traitement de *Pneumocystis carinii*. En 1998, une nouvelle association médicamenteuse, combinaison du proguanil et d'atovaquone, a été disponible en Australie. L'association de ces deux molécules produit un effet synergique et est actuellement très efficace même sur les formes résistantes de *P. falciparum*. Par contre, le prix prohibitif de ce médicament ne le destine pas à une utilisation pour le traitement des populations des zones endémiques.

L'**halofantrine** (Halfan<sup>®</sup>) : cet antipaludique efficace a été introduit dans les années 80. Néanmoins, des souches résistantes apparaissent de plus en plus, et ce médicament n'est pas dénué d'effets secondaires, en particulier une toxicité cardiaque. Structuralement, nous pouvons trouver une faible relation de cette molécule avec le pyriméthamine, l'atovaquone et le proguanil.

L'**artémisinine** et ses dérivés (artésunate et artéméther) : son utilisation est croissante dans plusieurs pays d'Asie du Sud-Est et en Afrique en raison de son faible coût et de son

efficacité dans le traitement de souches de *P. falciparum* polyrésistants. L'utilisation en prophylaxie des dérivés de l'artémisinine est cependant déconseillée afin de limiter l'émergence de résistance. On appelle « Artemisinin-based Combination Treatment »<sup>\*\*</sup> (ACT), plusieurs combinaisons efficaces : artésunate + méfloquine (AS+MQ); artéméther + luméfantine + primaquine (AL+PQ)) pour soigner la malaria<sup>14</sup>.

## b– Les phénomènes de résistance

Les premières souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine ont été découvertes au début des années 60 à la frontière de la Thaïlande et du Cambodge et aux frontières de la Colombie et du Vénézuéla<sup>15</sup>. Depuis cette date, cette résistance s'est étendue à toute la péninsule Indo-Chinoise, la région amazonienne de l'Amérique du Sud et à l'Afrique et, aujourd'hui, elle concerne toutes les molécules antipaludiques classiques. Une étude faite en 2008 suggère que l'artémisinine est en train de perdre sa puissance au Cambodge<sup>16</sup>. Ces résultats ont ensuite été appuyés par une étude détaillée de l'Ouest du Cambodge<sup>17,\*,\*\*</sup>.

L'augmentation de la pression médicamenteuse sur *P. falciparum*, en particulier l'utilisation massive et incontrôlée d'antipaludiques, est la première cause favorisant l'apparition des phénomènes de résistance. Néanmoins, l'utilisation de plusieurs molécules antipaludiques en association peut permettre de retarder ou de limiter le développement d'une résistance.

En conclusion, *P. falciparum* s'adapte à n'importe quel traitement antipaludique et aucune raison ne laisse penser qu'il n'en sera pas de même pour les nouvelles molécules. Dans le futur, deux aspects sont fondamentaux : la recherche de nouvelles molécules qui augmentent l'arsenal thérapeutique disponible pour combattre cette maladie, et une utilisation raisonnée et responsable des nouveaux traitements sont donc impératives afin de limiter l'émergence de nouvelles souches résistantes (OMS 2010).

Au jour d'aujourd'hui, les substances naturelles continuent d'être une source très importante de molécules à potentialités antipaludiques<sup>18,19a,b</sup>. Nous avons pensé qu'il était intéressant d'évaluer l'activité des canthinones et de l'avicennol que nous avons isolés de *Z. chiloperone*, en partant d'une base ethnopharmacologique<sup>20</sup>.

14 Mutabingwa, T. K., Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy!, *Acta Trop.* 2005, **95**, 305.

15 Kondrachine A.V., Trigg P.I., Global overview of malaria, *Indian J. Med. Res.* 1997, **106**, 39.

16 Noedl H., Se Y., Schaefer K., Smith B. L., Socheat D., Fukuda M. M., Evidence of artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia, *New Engl. J. Med.* 2008, **359**, 2619.

17 Dondorp A. M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyto A. P., Tarning J., Lwin K. M., Ariey F., Hanpithakpong W., Lee S. J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S. S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N. P. J., Lindegardh N., Socheat D., White N. J., Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria, *New Engl. J. Med.* 2009, **361**, 455.

\* <http://www.who.int>; <http://www.malariainexus.com/> ; <http://www.malaria-world.org/>

\*\* World Malaria Report 2010 ([http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html))

## B– Travaux personnels

### 1– Évaluation de l'activité des extraits de *Zanthoxylum chiloperone* et des produits isolés

Dans la majorité des pays fortement affectés par le paludisme, les plantes médicinales contribuent de façon significative aux soins de santé primaires en raison de traditions culturelles et du manque d'accès à des produits pharmaceutiques. En outre, les produits naturels sont des sources potentielles de nouveaux agents pour le traitement des maladies tropicales causées par des protozoaires<sup>21-23</sup>.

Notre projet se base sur une approche ethnopharmacologique, partant de l'étude publiée par Milliken en 1997, où il a décrit l'emploi d'une décoction de la racine et de la tige de l'écorce de *Z. chiloperone* en médecine traditionnelle pour traiter le paludisme<sup>20</sup>.

#### a– Activité *in vitro*

L'évaluation de l'activité antipaludique\* de l'extrait dichlorométhanique des écorces de *Z. chiloperone*, de l'avicennol (**11**), de la canthin-6-one (**1**) et de la 5-méthoxycanthin-6-one (**8**) nous a permis d'évaluer la concentration inhibitrice 50 % (CI<sub>50</sub>) contre des parasites de plusieurs souches, telles que<sup>24</sup> :

- i- la souche colombienne FcB<sub>1</sub>, résistant à la chloroquine.
- ii- la souche brésilienne PFB, faiblement résistante à la chloroquine.
- iii- la souche tanzanienne F<sub>32</sub>, chloroquine sensible et mefloquine résistante.
- iv- la souche thaïlandaise K<sub>1</sub>, multi-drogue résistante.

Le tableau 3 illustre les CI<sub>50</sub> ainsi que sur la souche F<sub>32</sub> de *Plasmodium falciparum* (chloroquine sensible et méfloquine résistante). Ces données montrent que F<sub>32</sub> est la souche la plus sensible à l'avicennol (**11**) et à la canthin-6-one (**1**) (0,5 et 2 µg/mL respectivement). Les tests supplémentaires sur d'autres souches de *P. falciparum* ont démontré que ces composés avaient tous, à peu près, la même activité sur les souches K<sub>1</sub>, PFB et FcB<sub>1</sub>. Notez

- 
- 18 Turschner S., Efferth T., Drug resistance in *Plasmodium*: natural products in the fight against malaria, *Mini Rev. Med. Chem.* 2009, **9**, 206.
- 19 (a) Wells T., Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots?, *Malar. J.* 2011, **10**, S3. (b) Huang H, Yao Y., He Z., Yang T. Ma J., Tian X., Li Y., Huang C., Chen X., Li W., Zhang S., Zhang C., Ju J., Antimalarial β-carboline and indolactam alkaloids from *marinactinospora thermotolerans*, a deep sea isolate, *J. Nat. Prod.* 2011, **00**, 00.
- 20 Milliken W. Malaria and antimalarial plants in Roraima, Brazil, *Trop. Doct.* 1997, **27**, 20.
- 21 Karioti A., Skaltsa H., Kaiser M., Tasdemir D., Trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects of anthecotulide-type linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata*, *Phytomedicine* 2009, **16**, 783.
- 22 Luize P. S., Tiunan T. S., Morello L. G., Maza P. K., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Garcia-Cortez D. A., de Mello J.C.D., Nakamura C. V., Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2005, **41**, 85.
- 23 Froelich S., Onegi B., Kakooko A., Siems K., Schubert C., Jenett-Siems K., Plants traditionally used against malaria: phytochemical and pharmacological investigation of *Momordica foetida*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 2007, **17**, 1.
- 24 Cebrián-Torrejón G., Spelman K., Leblanc K., Muñoz-Durango K., Gutierrez S. T., Ferreira, M. E., Arias A. R. d., Figadere B., Fournet A., Maciuk A., Grellier P., Cech N. B., Poupon E., The antiplasmodium effects of a traditional South American remedy: *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* against chloroquine resistant and chloroquine sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2011, **21**, 652.
- 25 Spelman K., Depoix D., McCray M., Mouray E., Grellier P., The Traditional Medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-diyonic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity, *Phytother. Res.* 2010, **25**, 1098.
- \* En collaboration avec le Dr. Kevin Spelman (NHI Baltimore, USA) et le Prof. Philippe Grellier (MNHN Paris, France).



que l'extrait brut de *Z. chiloperone* montre une activité plus importante. Ceci pourrait être dû à la combinaison de composés (possibles effets synergiques), ainsi que par la présence des alkylamides identifiées dans les extraits (voir chapitre 2), connues pour être actifs contre *P. falciparum in vitro* et *P. yoelii in vivo*<sup>25</sup> (Tableau 3).

-Tableau 3- Cl<sub>50</sub> des extraits de *Z. chiloperone* et des composés isolés.

	Cl <sub>50</sub> (µg/mL (µM))			
	F <sub>32</sub>	K <sub>1</sub>	PFB	FcB <sub>1</sub>
<i>trans</i> -avicennol (11)	0,5 (1,4)	2,7 (7,9)	1,2 (3,5)	2,2 (6,5)
canthin-6-one (1)	2 (9)	5,3 (24,1)	3,2 (14,5)	4 (18,2)
5-méthoxycanthin-6-one (8)	10,4 (41,6)	5,1 (20,4)	nt	Nt
<b>Extraits :</b>				
DCM	8,9	8,9	nt	Nt
EtOH	10,5	9,3	nt	Nt
contrôle positif				
chloroquine*	2,6	77,4	27,8	62,8

\*Chloroquine concentrations en nM. nt – non testé.

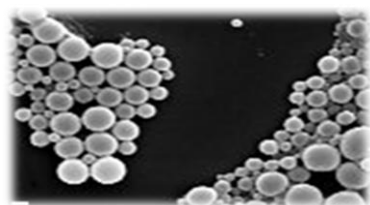
## b– Activité *in vivo*

Les résultats des essais *in vivo* en collaboration avec l'équipe du Pr Philippe Loiseau (BioCIS, Université Paris-Sud 11) sur des souris infectées avec *P. falciparum* montrent qu'aucune activité significative n'a été trouvée pour l'ensemble des molécules et des extraits testés, autant qu'aucune toxicité. Nous pouvons penser que cette absence d'activité pourrait être due à une faible biodisponibilité des produits.

Pour essayer d'améliorer la biodisponibilité nous avons, comme déjà présenté, envisagé la formulation de ces produits dans des nanoparticules (voir chapitre 4). Les essais *in vivo* afin de confirmer cette hypothèse n'ont pas encore été menés (Figure 6).

## 2– Étude de la formation d'adduits avec le groupe hème

Un des mécanismes d'action majeur des médicaments antipaludiques est basé sur leur interférence avec la voie de détoxification de l'hème<sup>26</sup>. La plupart des médicaments antipaludiques sont connus pour former des adduits avec l'hème (quinoléines, artémisinine et dérivés), ce qui nuit à la biocrystalisation de l'hème et conduit à la mort des parasites au stade trophozoïte<sup>27,28</sup>. Notre laboratoire a utilisé la spectrométrie de masse et la dissociation induite par collision (CID) pour détecter de tels adduits et évaluer leur stabilité. Dans cette méthode\*, l'hème est incubé avec le composé ou le mélange de composés et analysé par spectrométrie de masse. Une étape de fragmentation utilisant une tension croissante d'accélération vise à dissocier pour fragmenter l'adduit formé. Une évaluation de la stabilité relative des adduits peut être obtenue et comparée à un composé de référence, comme la quinine. La formation d'adduits entre les composés et l'hème est une indication de la capacité du composé à interférer avec le processus de formation d'hémozoïne et donc permet d'extrapoler une activité à potentielle contre le paludisme. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Alexandre Maciuk, les spectres de masse des incubations



-Figure 6- Photographie au microscope électronique des nanoparticules chargés avec la canthin-6-one.

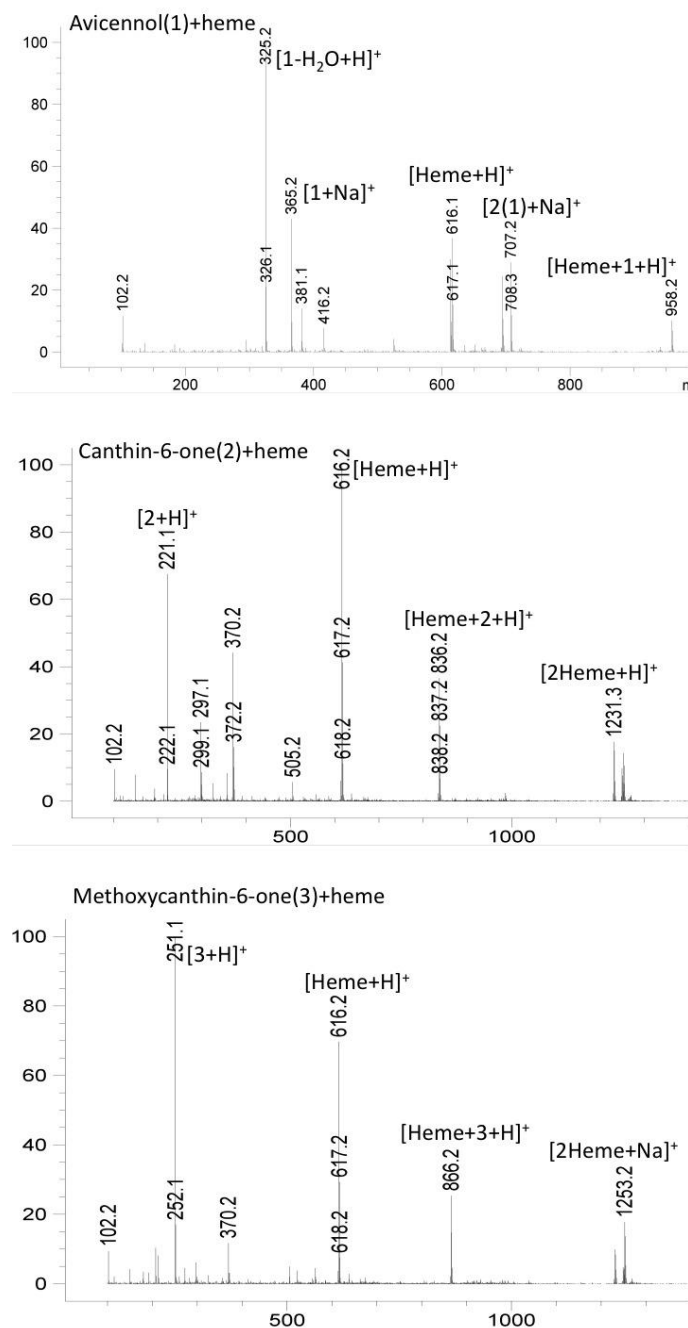
de nos produits (**1**, **8**, **11**), et l'extrait brut de l'écorce de *Z. chiloiperone* avec l'hème (Figure 7) montrent un adduit clair pour chacun des composés<sup>24</sup>.

<sup>26</sup> Weissbuch I., Leiserowitz L., Interplay between malaria, crystalline hemozoin formation, and antimalarial drug action and design, *Chem. Rev.* 2008, **108**, 4899.

<sup>27</sup> Bilia A. R., Lazari D., Messori L., Taglioli V., Temperini C., Vincieri F. F., Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin: its application to *Artemisia annua* constituents, *Life Scienc.* 2002, **70**, 769.

<sup>28</sup> Pashynska V. A., Van den Heuvel H., Claeys M., Kosevich, M. V., Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, **15**, 1181.

\* Figadère B, Munoz-Durango K, Maciuk A, Londono J, Arrango Acosta G.J. New method for detecting antimalarial drugs. PCT Int. Appl. (2010), 97pp. WO 2010103025 (A1) 2010-09-16.



-Figure 7- Spectres de masse des incubats de l'hème avec le *trans*-avicennol (11), la canthin-6-one (1) et la 5-méthoxycanthin-6-one (8).

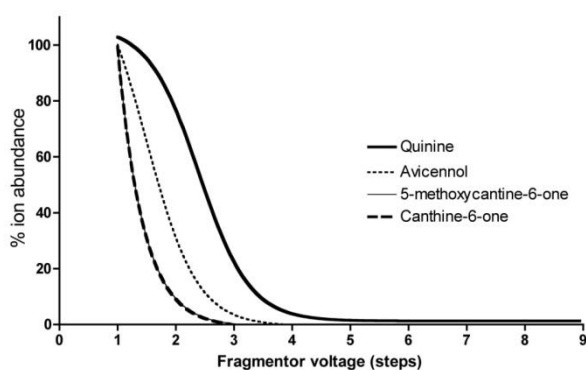
Pour valider cette approche de criblage nous avons travaillé avec un instrument de triple quadrupôle qui nous donnera les masses des composés formant des adduits avec l'hème. Ce test a été appliqué à l'extrait brut et les molécules isolées, confirmant les données obtenues par spectrométrie de masse (Tableau 4).

-Tableau 4- Données extraites des spectres de masse des extraits des feuilles et écorce incubés avec de l'hème.

extrait dichlorométhanique	ion moléculaire (m/z) <sup>o</sup>	adduits (m/z) <sup>o</sup>	IC <sub>50</sub> contre <i>P. falciparum</i> *
<b>Écorce <i>Z. chiloperone</i></b>			
avicennol ( <b>11</b> )	352,2 [M+Na] <sup>+</sup>	959,19 [M+Hème] <sup>+</sup>	0,5
canthin-6-one ( <b>1</b> )	221 [M+H] <sup>+</sup>	835,57 [M+Hème] <sup>+</sup>	2
5-méthoxycanthin-6-one ( <b>8</b> )	251 [M+H] <sup>+</sup>	866,58 [M+Hème] <sup>+</sup>	10,4
N-oxyde de canthin-6-one ( <b>9</b> )	237,1 [M+H] <sup>+</sup>	853,57 [M+Hème] <sup>+</sup>	nt
<b>Feuilles <i>Z. chiloperone</i></b>			
5-méthoxycanthin-6-one	251 [M+H] <sup>+</sup>	866,5 [M+Hème] <sup>+</sup>	10,4

\* Souche F32 (µg/mL).

La stabilité des adduits entre l'hème et les différents composés a été évaluée en soumettant les adduits à un gradient de fragmentation de type CID et en comparant les résultats à l'adduit formé par la quinine (Figure 8). Le *trans*-avicennol (**11**) montre un adduit relativement plus stable avec l'hème que les dérivés de type canthinone (**1,8**), ce qui peut être corrélé avec les différences de résultats dans les tests *in vitro* (voir tableau 3). Cette différence de stabilité observée suggère un type de liaison à l'hème différent pour les deux squelettes.



.Figure 8- Stabilité des adduits entre le hème et les composés.

Ces données donnent une indication de la capacité de ces composés à se lier à l'hème, bien qu'une corrélation entre la stabilité de l'adduit et l'activité biologique n'ait pas encore été établie avec certitude<sup>24</sup>.

### III– La tuberculose

#### A– Généralités

Chaque année, la tuberculose touche plus de 8 millions de personnes dans le monde et en tue 2 millions. Les pays les plus pauvres sont les plus touchés avec 95 % des cas et 98 % des décès, principalement des sujets jeunes.

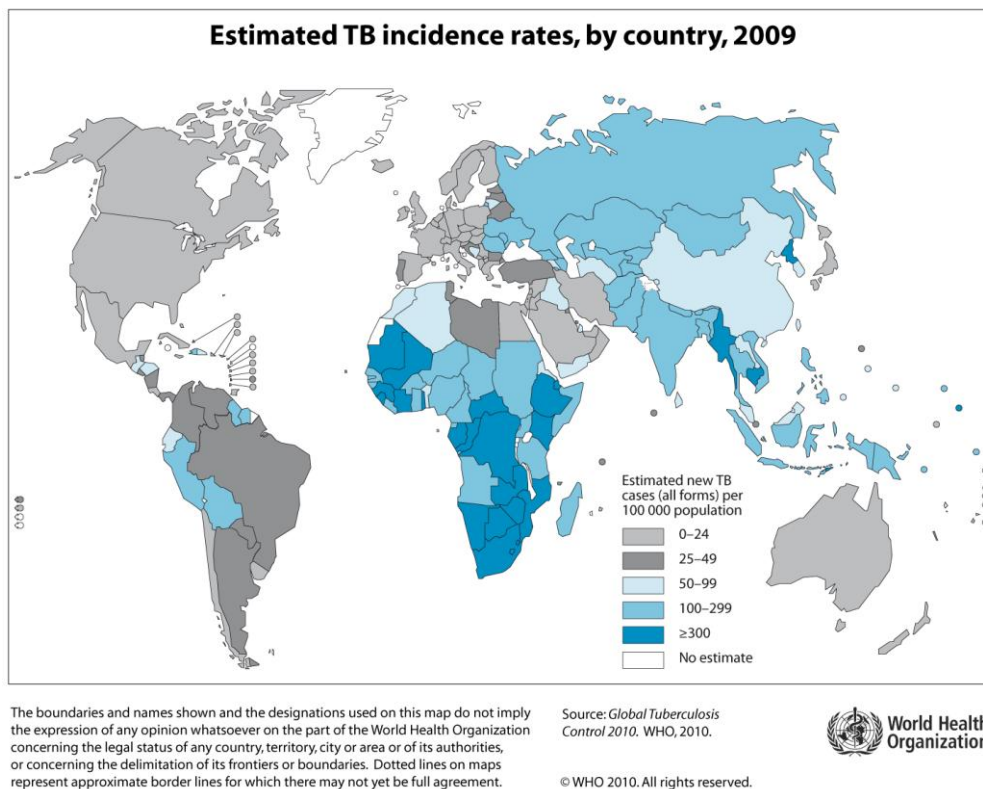
La résistance commune à l'isoniazide et à la rifampicine, deux antituberculeux majeurs, concerne 250 000 nouveaux cas environ et constitue un problème majeur compte tenu de la mortalité importante. La recrudescence de la tuberculose n'est pas uniquement attribuable à l'épidémie de l'infection par le VIH mais également à la destruction progressive des systèmes sanitaires spécialisés surtout en zone périurbaine des grandes mégalo-poles des pays en voie de développement.

En France, l'incidence de la tuberculose stagne depuis 5 ans et environ 6 000 nouveaux cas surviennent chaque année ; 700 décès sont attribués à la tuberculose\*.

---

\* <http://www.who.int>.

29 Barksdale L., Kim K. S., *Mycobacterium*, *Bacteriol. Rev.* 1977, **41**, 217.



-Figure 9-distribution de la tuberculose.

## 1– Biologie des mycobactéries

### a– Généralités sur les mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles droits ou légèrement incurvés de 0,2 à 0,6  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1 à 10  $\mu\text{m}$  de longueur, considérées comme des bactéries à Gram positif mais avec une structure particulière<sup>29</sup>.

Mycobacterium tuberculosis



Comme toutes les autres bactéries elles sont constituées d'un cytoplasme qui a généralement une structure homogène et renferme essentiellement des ribosomes. Dans le cytoplasme l'appareil nucléaire a un aspect fibrillaire, il occupe une place importante et n'est pas entouré par une membrane. La membrane plasmique est une membrane trilamellaire formée de phospholipides dont les pôles hydrophobes sont face à face, entourant des protéines, elle est l'interface entre le cytoplasme et des structures externes. À la périphérie de la membrane plasmique on trouve la paroi dont la structure est variable selon les bactéries et qui forme une enveloppe rigide. La spécificité des mycobactéries réside dans la structure de cette paroi qui est constituée<sup>29</sup>:

- i- d'une couche basale composée de peptidoglycane. C'est un hétéropolymère composé de chaînes glucidiques reliées les une aux autres par des chaînons

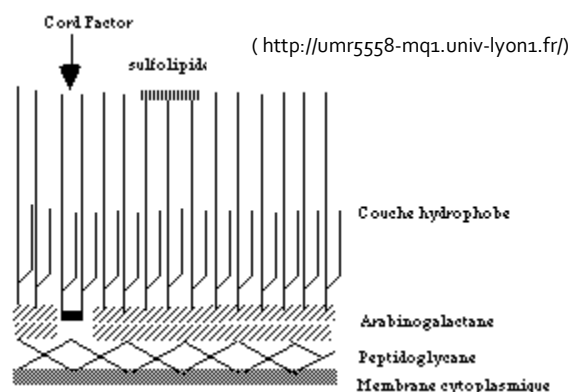
peptidiques. La chaîne polysaccharide est formée de chaînons d'acide *N*-acétylglucosamine-*N*-acétylmuramique ou d'acide *N*-glucosylmuramique.

- ii- Les chaînons peptidiques sont constitués d'unités térapeptidiques et de ponts interpeptidiques. Le peptidoglycane constitue une structure très rigide, véritable exosquelette qui est responsable de la forme des bactéries et qui leur permet de résister à la forte pression osmotique intracytoplasmique.
- iii- La couche intermédiaire est composée d'acides mycoliques. Les acides mycoliques sont des acides gras à longue chaîne carbonée,  $\alpha$ -ramifiées et  $\beta$ -hydroxylés. Ils sont des constituants majeurs de la paroi et ils sont liés au peptidoglycane par l'intermédiaire d'arabinogalactane. Ils constituent une barrière hydrophobe autour de la bactérie; ils diffèrent selon les bactéries. Chez les mycobactéries ce sont des molécules de haut poids moléculaire, contenant 60 à 90 atomes de carbone. De plus, seules certaines espèces de mycobactéries, synthétisent des acides mycoliques porteurs de fonctions oxygénées supplémentaires.
- iv- La couche externe contient des sulfolipides, des lipo-arabinomannanes et du mycolate de tréhalose. En fait la structure de la couche externe est variable selon les espèces et notamment seules les souches virulentes possèdent du mycolate de tréhalose (*cord factor*).

La structure particulière de la paroi des mycobactéries, très riche en lipides, explique en grande partie leur résistance aux antibiotiques qui ne peuvent atteindre leur site d'action. Les acides mycoliques constituent une barrière hydrophobe autour de la cellule s'opposant à l'action d'agents chimiques (Figure 10).

Les mycobactéries pathogènes sont celles de la tuberculose et l'agent de la lèpre. Les mycobactéries responsables de la tuberculose sont les suivantes :

- i- *Mycobacterium africanum*, fréquemment isolé chez les tuberculeux en Afrique de l'Ouest et du centre, et qui est très proche du précédent.
- ii- *Mycobacterium bovis*, pouvant infecter l'homme et d'autres animaux, qui est l'agent de la tuberculose bovine. Un mutant de *Mycobacterium bovis*, le bacille de Calmette et Guérin (BCG), est utilisé comme vaccin<sup>29</sup>.
- iii- *Mycobacterium tuberculosis*, agent le plus fréquent de la tuberculose humaine, est un pathogène spécifique de l'homme mais est capable d'infecter certaines espèces animales vivant à ses côtés. Il n'est pas présent dans l'environnement sauf en cas de contamination par l'homme infecté.



-Figure 10- Paroi des mycobactéries.

Le *M. tuberculosis* est très sensible à certains agents physiques : chaleur, rayon X and UV. Il résiste bien au froid et à la dessiccation et peut demeurer plusieurs jours dans des produits contaminés, tels des produits d'expectorations. Il est peu sensible à de nombreux agents chimiques (acides, bases dilués ou détergents divers). La contamination se fait par voie aérienne, par inhalation de micro-gouttelettes contenant les bactéries présentes dans les sécrétions respiratoires des patients infectés. Après contamination, les bacilles vont être phagocytés par les macrophages et vont se multiplier à l'intérieur de ces cellules. Si la multiplication des bacilles est limitée, on voit apparaître en 3 à 6 semaines un petit tubercule fait de cellules épithéloïdes et de cellules géantes entourées d'une couronne de lymphocytes, et centré par une zone de nécrose (caseum). Les bacilles se trouvent alors dans un environnement défavorable et le plus grand nombre meurt progressivement. C'est la primo-infection latente qui se traduit seulement par l'apparition de l'immunité retardée et qui va évoluer spontanément vers une guérison définitive. Si la multiplication des bacilles est importante, les ganglions pourront être envahis et les bacilles pourront essaimer dans tout l'organisme par voie lymphatique et sanguine. Les lésions nécrotiques pulmonaires sont alors plus étendues et les lésions sont visibles à la radiologie. La primo-infection est patente. L'encapsulation de la nécrose caséuse avec tendance à l'autostérilisation spontanée est fréquente. Cependant dans environ 10 % des cas l'évolution est défavorable : le ramollissement du caseum entraîne son évacuation et la formation d'une caverne avec prolifération bactérienne. La maladie tuberculeuse se constitue ainsi. La malade expectore, il élimine des bacilles en quantité, il est ainsi contagieux. La localisation la plus fréquente est pulmonaire et la lésion principale, la caverne est la forme contagieuse de la maladie. Les principales localisations non respiratoires de la tuberculose sont ganglionnaires, méningées, ostéo-articulaires et génito-urinaires. Parfois très graves, elles sont peu ou pas contagieuses.

### b– Traitement

#### α– Molécules antituberculeuses actuellement disponibles

Les antituberculeux dits de « première intention » sont les plus efficaces et les moins toxiques : l'**isoniazide**, la **rifampicine**, la **pyrazinamide**, l'**éthambutol**. Leur utilisation en association permet d'éviter l'apparition de résistances. Les antituberculeux de seconde intention : la **streptomycine**, la **rifabutine**, la **kanamycine**, l'**amikacine**, les **fluoroquinolones** et certains **macrolides** sont utilisés après échec des dérivés de première ligne et sont considérés comme moins efficaces et/ou plus toxiques (Figure 11)<sup>30</sup>.

L'OMS recommande l'association pendant 2 mois de l'isoniazide, de la rifampicine, de l'éthambutol, et du pyrazinamide et pendant 4 mois d'isoniazide et de la rifampicine.

La **streptomycine** : premier antituberculeux, a été isolée pour la première fois en 1944 à partir de *Streptomyces griseus*. C'est un des rares aminosides (hormis la kanamycine et l'amikacine) à posséder une action antituberculeuse, mais elle n'est plus utilisée en



thérapeutique. Elle agit en perturbant la synthèse protéique par fixation sur les ribosomes. La production de protéines non fonctionnelles va induire la mort cellulaire<sup>31</sup>.

L'**isoniazide** : la découverte de l'action bactéricide de l'isoniazide (isonicotinyl hydrazide) date de 1945, suite à la découverte de l'action tuberculostatique du nicotinamide. L'isoniazide est encore considéré comme la molécule la plus importante dans la chimiothérapie antituberculeuse. Cet antituberculeux agit en inhibant la synthèse des acides mycoliques, il est bactéricide sur les bacilles extra- et intracellulaires. Cet antituberculeux possède une hépatotoxicité ainsi qu'une neurotoxicité importantes<sup>31</sup>.

Le **pyrazinamide** : est l'analogue pirazidinique du nicotinamide. Son mode d'action est assez mal connu, il induirait une déplétion de l'énergie membranaire. Il est actif sur les bacilles intracellulaires<sup>31</sup>.

La **rifampicine** : a été obtenue par hémisynthèse à partir de la rifamycine B isolée de *Streptomyces mediterranei* en 1957. Elle agit sur les mycobactéries en inhibant l'ARN polymérase. Elle possède une action bactéricide sur bacilles intra et extracellulaires. Cette molécule induit de nombreuses interactions médicamenteuses<sup>31</sup>.

L'**éthambutol** : a été découvert en 1968, mais son mode d'action, n'a été décrit que récemment : il inhibe la synthèse de l'arabinogalactane et du lipoarabinomannane (composants de la paroi bactérienne). L'éthambutol exerce une action bactériostatique sur les bactéries extracellulaires<sup>31</sup>.

L'**éthionamide** : est issu des études sur les dérivés du thioisonicotinamide, montrant que les molécules «  $\alpha$ -éthyle » étaient plus efficaces que la molécule princeps. Cette molécule possède une action bactériostatique sur les bacilles intra et extracellulaires. Elle possède une très mauvaise tolérance digestive et une neurotoxicité<sup>32,33</sup>.

Les **fluoroquinolones** : ces antibiotiques sont bactéricides sur les bacilles intra et extracellulaires et possèdent une assez bonne tolérance, ils inhibent la synthèse de l'ADN en agissant sur l'ADN gyrase. Plusieurs fluoroquinolones sont en cours d'essais cliniques, ce sont des 8-méthoxyfluoroquinolones connues (ofloxacin). La gatifloxacine est en essai clinique de phase III en Afrique. Elle est utilisée en combinaison avec l'isoniazide, rifampicine et pyrazinamide pendant 2 mois, puis en association avec l'isoniazide et la rifampicine pendant encore 2 mois. La moxifloxacine est en essai de phase III et pourrait remplacer l'éthambutol dans le traitement de référence en diminuant la durée du traitement. Les

---

30 Ducati R. G., Ruffino-Netto A., Basso L. A., Santos D. S., The resumption of consumption, a review on tuberculosis, *Mems. I nst. Oswaldo Cruz* 2006, **101**, 697.

31 du Toit L., Pillay V., Danckwerts M., Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches, *Respir. Res.* 2006, **7**, 118.

32 Saltini C., Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis, *Respir. Med.* 2006, **100**, 2085.

33 DeBarber A. E., Mdluli K., Bosman M., Bekker L.-G., Barry C. E., Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 9677.

34 Ibrahim M., Andries K., Lounis N., Chauffour A., Truffot-Pernot C., Jarlier V., Veziris N., Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, **51**, 1015.

diarylquinoléines<sup>34</sup> représentent une nouvelle classe d'antituberculeux. Ils agissent en inhibant l'ATP synthase. Le TMC 207 est en essai de phase II<sup>32</sup>.

Les **nitroimidazoles** : représentent également une nouvelle classe d'antituberculeux avec un mécanisme d'action peu connu. Deux molécules de cette classe sont en cours d'essais cliniques de phase I: le PA-824 et l'OPC-67683. Deux autres molécules sont en cours d'évaluation dans le traitement de la tuberculose un dérivé pyrrole, le LL-3858 et le SQ-109 (dérivé éthylènediamine) tous les deux en essais de phase I. Enfin, les oxazolidinones représentent également une classe d'antituberculeux potentiellement intéressants<sup>35-37</sup>,

Les **oxazolidinones** : ces molécules ont montré leur efficacité dans le traitement des tuberculoses multirésistantes, mais la première oxazolidinone développée, le linézolide, induit une toxicité importante lors d'un traitement au long cours. Les différentes études ont donc cherché à diminuer la toxicité de cette classe thérapeutique. C'est ainsi que plusieurs dérivés sont en cours d'étude, c'est le cas de l'U100480, du RBX 7644 et 8700<sup>38</sup>.

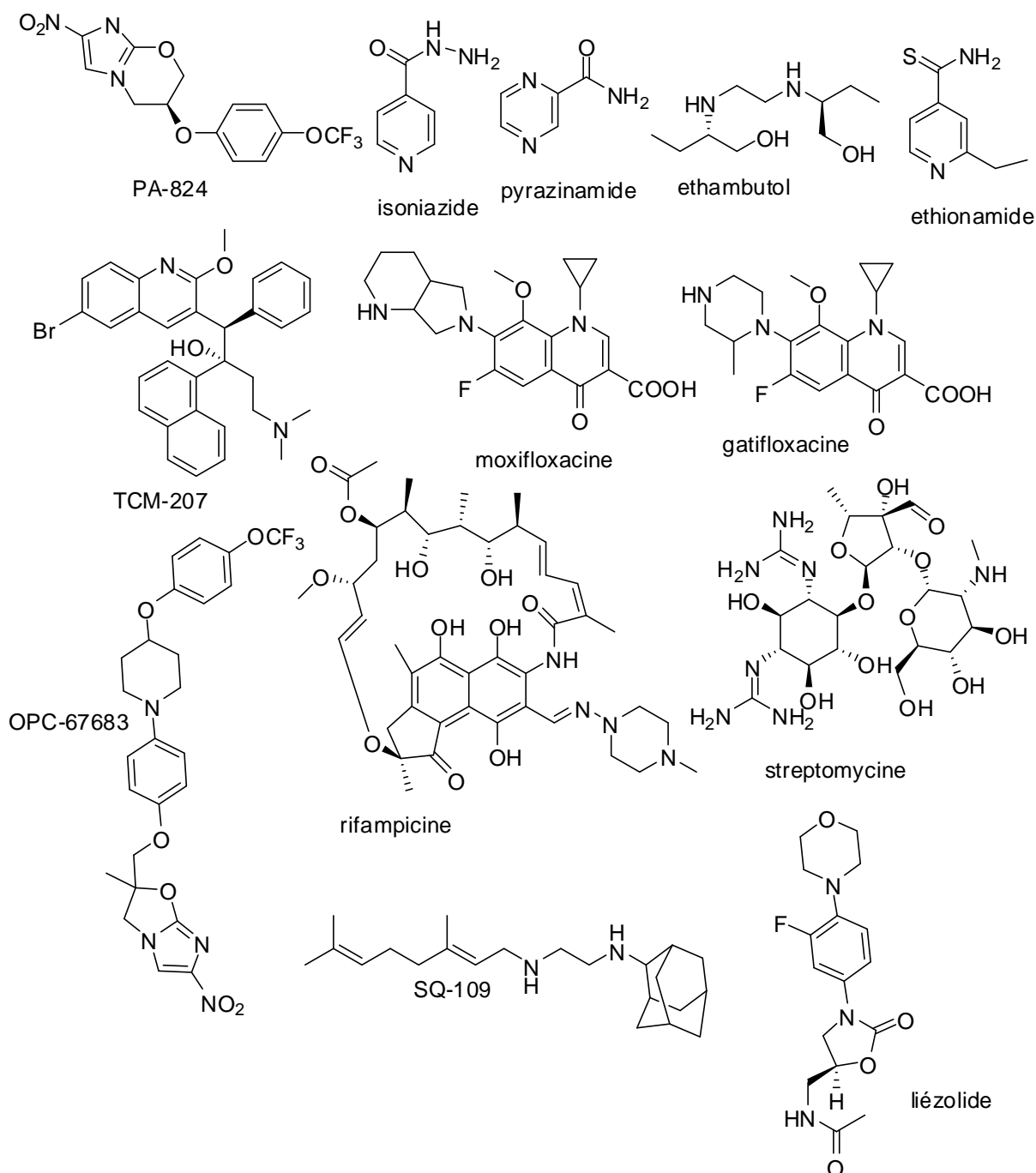
---

35 Mdluli K., Spigelman M., Novel targets for tuberculosis drug discovery, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006, **6**, 459.

36 Ballell L., Field R. A., Duncan K., Young R., New small-molecule synthetic antimycobacterials, *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**, 2153.

37 Ginsberg A. M., Spigelman M., Challenges in tuberculosis drug research and development, *Nat. Med.* 2007, **13**, 290.

38 Sood R., Rao M., Singhal S., Rattan A., Activity of RBx 7644 and RBx 8700, new investigational oxazolidinones, against *Mycobacterium tuberculosis* infected murine macrophages, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2005, **25**, 464.



-Figure 11- Principaux antituberculeux.

## β– Les phénomènes de résistance

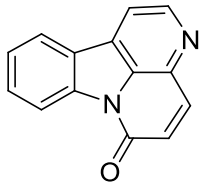
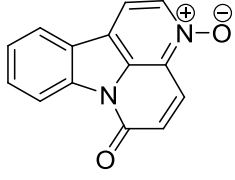
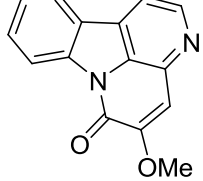
La tuberculose est une maladie qui se guérit à condition de respecter un traitement standardisé internationalement consistant en une association de plusieurs antibiotiques durant une période longue de 6 mois minimum. Ainsi, nombreux sont les patients qui l'interrompent avant terme ou espacent les prises. Ce phénomène accroît le risque de rechute et favorise l'émergence de souches de bacilles pathogènes multirésistantes. C'est pourquoi les formes galéniques combinées sont recommandées afin de favoriser l'observance et de réduire le risque de résistance.

La survenue de multirésistances rend en effet la prise en charge plus complexe car les autres médicaments sont peu efficaces et induisent beaucoup d'effets indésirables.

### $\gamma$ – Travaux antérieurs

Les essais préliminaires décrits dans la thèse de Delphine Lagoutte, montrent des activités intéressantes des canthinones naturelles contre *Mycobacterium bovis*. Ces résultats nous ont paru assez prometteurs pour continuer l'étude avec les dérivés des canthinones synthétiques contre *Mycobacterium tuberculosis* (Tableau 5).

-Tableau 5- CMI des canthinones naturelles contre *M. Bovis*.

	<i>M. bovis</i> (CMI) ( $\mu$ M)
 <b>1</b>	34
 <b>9</b>	20
 <b>8</b>	80

### B– Travaux personnels : évaluation de l'activité *in vitro* des canthin-6-ones

#### $\alpha$ – Activité *in vitro*

L'activité antibactérienne vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) en collaboration avec le Dr José Antonio Ainsa Claver (Université de Zaragoza, Espagne) a été évaluée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice des canthinones d'extraction, d'hémisynthèse et de synthèse totale, avec comme témoin l'isoniazide (ou l'éthambutol).

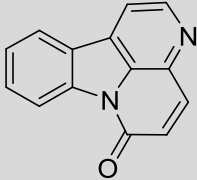
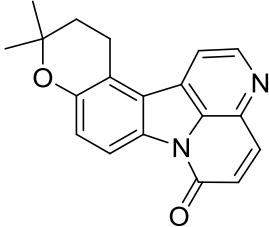
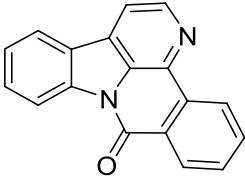
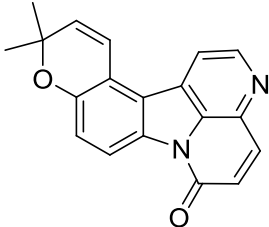
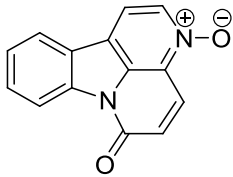
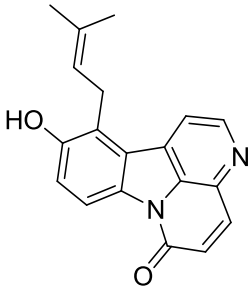
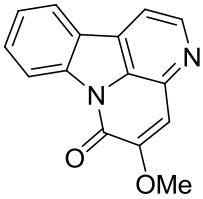
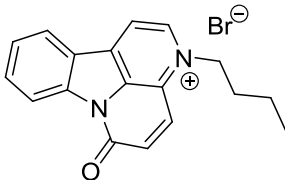
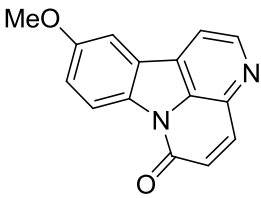
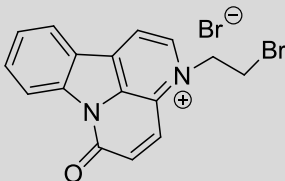
#### Résultats

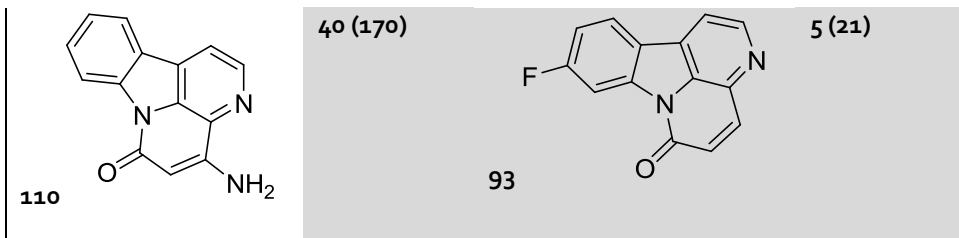
Les résultats montrent que les molécules la plus actives sont la fluoro-canthin-6-one (**93**) et le *N*-bromo-éthyl-canthin-6-one (**169**) avec une CMI de 5  $\mu$ g/mL. Les autres molécules les plus actives sont la canthin-6-one (**1**) et certains de ses dérivés avec des activités ( $10 \leq \text{CMI} \leq 40$ ) proches de celle de l'éthambutol (24,5  $\mu$ M) (Tableau 6).

Cependant certains autres dérivés de la canthin-6-one montrent une diminution importante et même une perte de l'activité sur le *Mycobacterium tuberculosis*, avec des CMI  $\geq 80$  pour les composés **96** et **355** (Tableau 6).

### Relation structure/activité

Les relations structure/activité pour l'effet antimycobactérien sont représentées dans la figure 20 et apparaissent peu éloignées de celles établies par l'activité antiproliférative comme nous verrons par la suite (Figure 20). Tous les composés possédant des substitutions simultanément aux positions 4 et 5 (**96**) (accepteur de Michael du motif quinoneimine) n'ont montré aucune activité (CMI  $80 \mu\text{g/mL}$ ). En outre, une seule substitution en l'accepteur de Michael est controversée si le substituant est pas très polaire (**8**) (OMe) la substitution à peu d'effet, dans le cas de l'aminocanthine (**110**) il faut penser aussi qu'il y a une modification drastique de la répartition électronique (groupement électrodonneur) et la présence de ce substituant montre une claire diminution de l'activité. Ainsi, une liaison libre double à la sous-structure quinonéimine est plus ou moins essentielle pour l'activité antimycobactérienne. Par ailleurs la substitution en position 10 n'a pas beaucoup de répercussion (contraire à l'activité antiproliférative). L'augmentation de polarité des canthinones par quaternarisation de l'azote (**168**, **169** et **9**) ne modifie pas sensiblement l'activité. La présence de groupement oxygéné sur un des cycles n'apporte aucun effet sur l'activité (**8,357** et **356**). La fluoration de la canthine (**93**), augmente la lipophilie parallèlement à l'activité, donnant une meilleure efficacité. Malheureusement, la présence du noyau diméthylpyrène n'a pas beaucoup d'effet sur l'activité, nous retrouvons une activité équivalente à celle de la canthine (**1**).

	CMI*		CMI*
<p>1</p> 	10 (45)	 <p>357</p>	20 (65)
<p>96</p> 	>80 (290)	 <p>356</p>	40 (132)
<p>9</p> 	20 (84)	 <p>355</p>	80 (263)
<p>8</p> 	10 (40)	 <p>168</p>	20 (56)
<p>94</p> 	20 (80)	 <p>169</p>	5 (12)



**-Tableau 6- CMI M. tuberculosis.**  
**\* CMI : µg/mL (µM) ; éthambutol 5 µg/mL**

## $\beta$ – Étude du mécanisme d'action

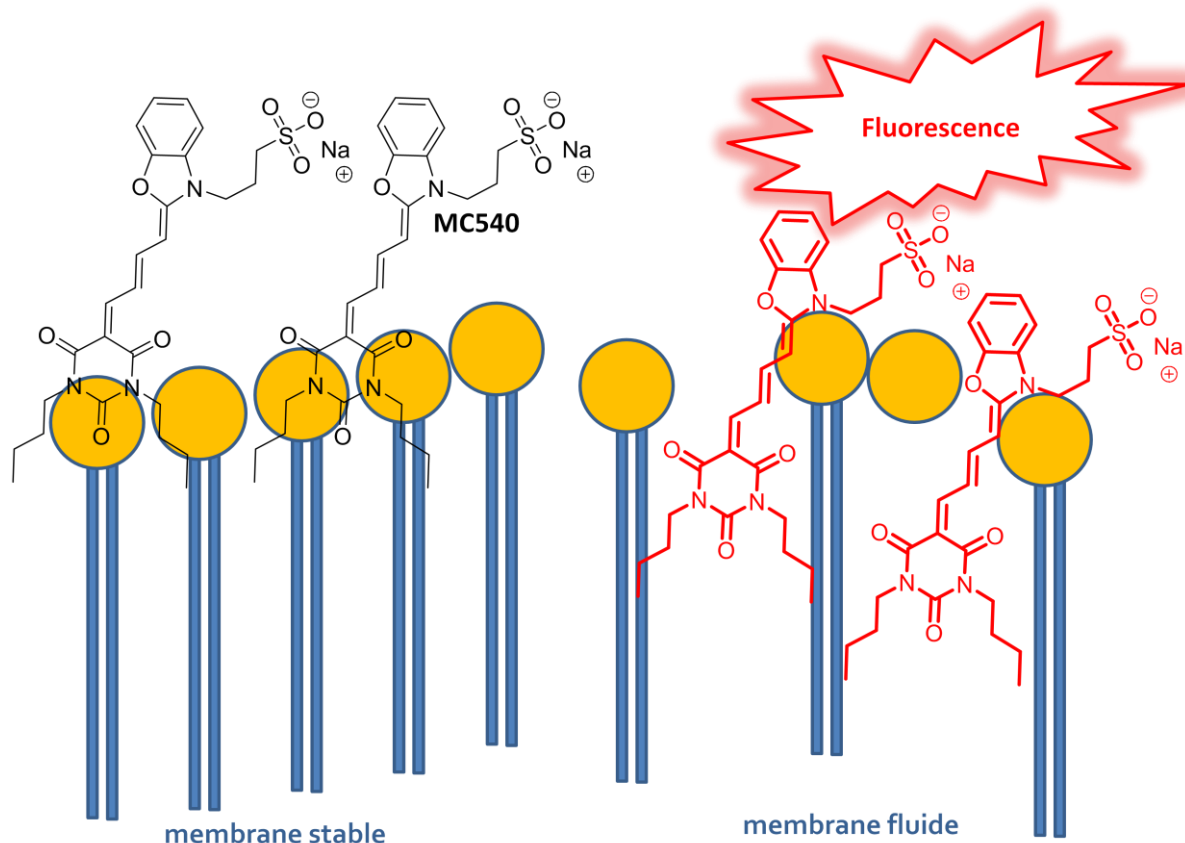
Dans le travail de thèse de Delphine Lagoutte a été mis en évidence un organite subcellulaire chez *Mycobacterium bovis* dans lequel la canthin-6-one s'accumule, les particules lipidiques, organites indispensables au stockage des lipides et qui jouent un rôle important dans le métabolisme des stérols et des acides gras.

Les molécules qui présentent ces activités ont la particularité de se fixer à la membrane plasmique des microorganismes et d'induire différentes perturbations<sup>39,40</sup>. Tous ces éléments vont induire une modification de la fluidité membranaire qui va causer une perte d'intégrité de la membrane cellulaire. La cellule va répondre à ce stress en régulant la fluidité membranaire par un changement de sa composition en acides gras<sup>41</sup>.

Les interactions médicament-lipides jouent un rôle important dans la caractérisation physico-chimique de composés pendant le développement de médicaments parce la perméation passive membranaire est la principale voie pour les médicaments de franchir les barrières cellulaires<sup>42</sup>. En outre, la membrane lipidique pourrait représenter la cible réelle de certains médicaments<sup>43</sup>, comme c'est le cas pour l'amphotéricine B et des peptides antimicrobiens, tels que magainine, cécropine et défensine<sup>44</sup>

Dans cette étude, nous avons utilisé la mérocyanine 540 (MC540), une sonde fluorescente qui est connue pour se localiser dans la membrane légèrement au-dessus du domaine du squelette de glycérol des phospholipides, et il a été démontré que cette liaison de la sonde est très sensible à la composition de la bicouche de phospholipides<sup>45</sup>. Williamson et ses collègues ont observé que la fluorescence du MC540 augmente en présence de liquide et d'une membrane peu compacte (Figure 12).

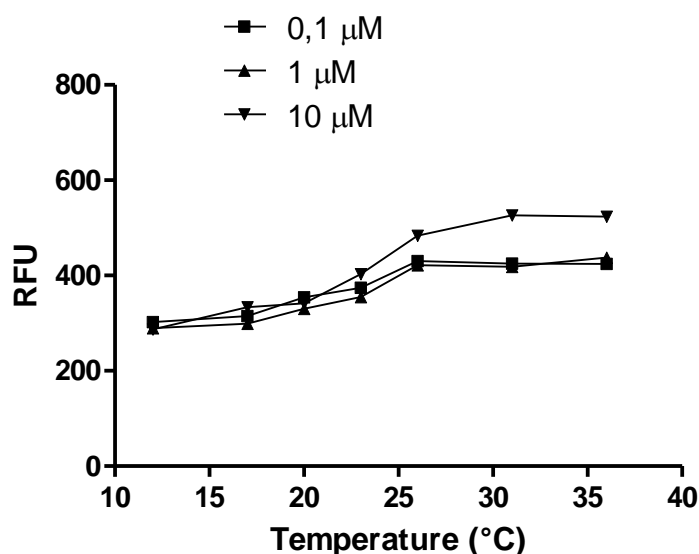




-Figure 12- Illustration du mécanisme d'action de la mérocyanine 540 (MC540) (Williamson *et al* 1983).

Par conséquent, nous suggérons que la canthin-6-one (**1**) perturbe la membrane dans la position où MC540 est situé, juste au-dessus du squelette de glycérol, augmentant la libération MC540 avec augmentation de fluorescence associée. En fait, l'incorporation de la drogue dans les membranes est affectée par des interactions électrostatiques, la formation de liaisons hydrogène avec les groupes polaires des phospholipides, interaction hydrophobe avec les chaînes acyle gras et par la géométrie moléculaire des phospholipides<sup>46</sup>. La facilité de ce composé pour modifier la structure ordonnée de la bicouche lipidique dépend probablement de sa capacité à adopter une conformation plane. D'autres facteurs devraient moduler l'interaction des médicaments avec des lipides dans le modèle de la membrane. Par exemple, la présence de centres d'énergie dans la structure du squelette de la drogue a été clairement démontrée comme pouvant moduler leur incorporation ou leur interaction avec les lipides dans le modèle de la membrane<sup>47</sup>. La figure 13 présente l'effet de canthin-6-one (**1**) sur l'emballage des vésicules de dipalmitoylphosphatidylcholine (DMPC). La fluorescence des liposomes-MC540 a montré une augmentation typique avec un point d'inflexion aux alentours de la température de transition du DMPC ( $\approx 24^\circ \text{C}$ ). En présence de concentrations croissantes de canthin-6-

one, la fluorescence augmente suggérant un incrément de l'union de MC540 à une bicouche lipidique peu compacte (Figure 13).



-Figure 13- Mesure d'intensité de fluorescence du MC540 dans les vésicules de DMPC avec canthin-6-one (0,1, 1 and 10 μM).

- 39 Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B., Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol Rev.* 1995, **59**, 201.
- 40 Lagoutte D., Nicolas V., Poupon E., Fournet A., Hocquemiller R., Libong D., Chaminade P., Loiseau P. M., Antifungal canthin-6-one series accumulate in lipid droplets and affect fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biomed. Pharmacother.* 2008, **62**, 99.
- 41 Tocher D. R., Leaver M. J., Hodgson P. A., Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases, *Prog. Lip. Res.* 1998, **37**, 73.
- 42 Frye J., Albert A. D., Selinsky B. S., Yeagle P. L., Cross polarization P-31 nuclear magnetic resonance of phospholipids, *Biophys. J.* 1985, **48**, 547.
- 43 Kinnunen P. K. J., On the principles of functional ordering in biological membranes *Chem. Phys. Lip.* 1991, **57**, 375.
- 44 Sitaram N., Nagaraj R., Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity, *Biochim. Biophys. Acta – Biomemb.* 1999, **1462**, 29.
- 45 Williamson P., Mattocks K., Schlegel R. A., Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing, *Biochim. Biophys. Acta – Biomemb.* 1983, **732**, 387.
- 46 Pawlikowska-Pawlega B., Ignacy Gruszecki W., Misiak L., Paduch R., Piersiak T., Zarzyka B., Pawelec J., Gawron A., Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group, *Biochim. Biophys. Acta – Biomemb* 2007, **1768**, 2195.
- 47 Castelli F., Valencia G., Opioid structure: lipid thermotropic behaviour correlation study on a series of DPPC liposomes containing opioids, *Thermochim. Acta* 1989, **154**, 323.

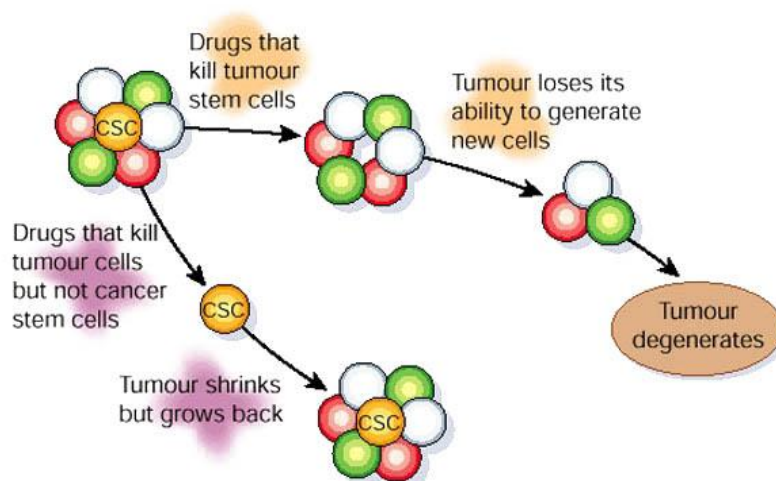
## IV– Activité antiproliférative

### A– Généralités

#### 1– État des lieux sur les gliomes et cellules souches cancéreuses

Les gliomes représentent la majorité des tumeurs primaires du système nerveux central (SNC) et le pronostic

des patients est généralement mauvais, avec moins de 24 mois de survie après le diagnostic<sup>48</sup>. Récemment, il a été identifié un sous-ensemble de tumeurs cérébrales primaires de haut grade qui systématiquement génèrent, à long terme, des sphères flottantes, capables d'auto-renouvellement, et qui peuvent donner naissance à des tumeurs par xénotransplantation<sup>49</sup>. Ce sous-ensemble correspond à des tumeurs malignes glioneuronales (MGNT). Les MGNT sont considérées selon l'Organisation Mondiale de la Santé comme des gliomes de grade III ou IV. Des études ont identifié des sous-populations de cellules dans les tumeurs responsables de la croissance tumorale, appelées cellules souches cancéreuses (CSC)<sup>50,51,52</sup>. Les CSC sont résistantes aux traitements contre le cancer en cours, autant par chimiothérapie que par radiothérapie<sup>53</sup>. Cette forte résistance donne à penser que de nombreuses thérapies contre le cancer, tout en tuant la majorité des cellules tumorales, peuvent échouer parce qu'elles n'éliminent pas les CSC, qui survivent et régénèrent de nouvelles tumeurs (Figure 14).

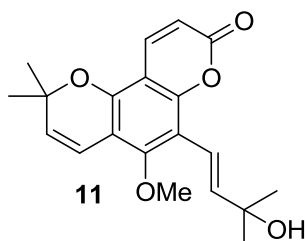


-Figure 14- Modèle d'action des thérapies conventionnelles anticancer.

- 48 Kleihues P., Cavenee W. K., World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system (Lyon), 2000.
- 49 Patru C., Romao L., Varlet P., Coulombel L., Raponi E., Cadusseau J., Renault-Mihara F., Thirant C., Leonard N., Berhneim A., Mihalescu-Maingot M., Haiech J., Bièche I., Moura-Neto V., Daumas-Duport C., Junier M.-P., Chneiweiss H., CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioblastoma, *BMC Cancer* 2010, **10**, 66.
- 50 Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* 2001, **414**, 105.
- 51 Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri, M. A., Dick J. E., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, *Nature* 1994, **367**, 645.
- 52 Schatton T., Murphy G. F., Frank N. Y., Yamaura K., Waaga-Gasser A. M., Gasser M., Zhan, Q., Jordan S., Duncan L. M., Weishaupt C., Fuhlbrigge R. C., Kupper T. S., Sayegh M. H., Frank M. H., Identification of cells initiating human melanomas, *Nature* 2008, **451**, 345.

## 2– Traitement

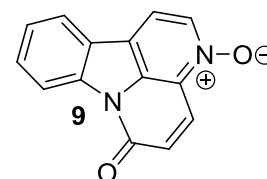
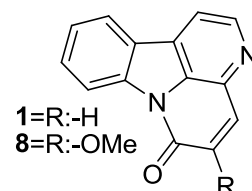
Actuellement, le témozolomide (Temodal®) est l'agent alkylant le plus largement utilisé dans le traitement des gliomes de haut grade et a montré un bénéfice clinique significatif<sup>54</sup>.



### B– Travaux personnels

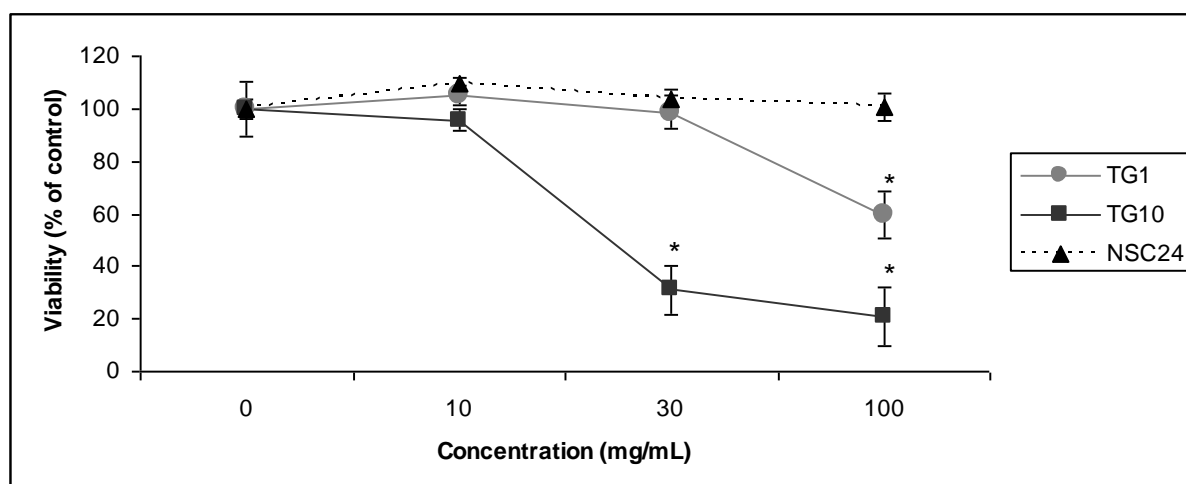
#### 1– Évaluation de l'activité *in vitro* des extraits de *Z. chiloperone* et des produits isolés

De très nombreux essais biologiques guidés par des enquêtes sur des plantes utilisées en médecine traditionnelle et/ou leurs composés actifs isolés ont conduit à la découverte de nombreux nouveaux agents potentiellement antitumoraux. Par exemple, le groupe de De Feo<sup>55</sup> a publié l'activité antitumorale de l'extrait de « l'arbre du ciel » (*Ailanthus altissima*) et de son principal composé la 1-méthoxycanthin-6-one.



#### 2– Activités *in vitro*

Nous avons étudié l'activité antiproliférative *in vitro* des extraits préparés à partir de l'écorce de la tige (Figure 15) et des racines de *Z. chiloperone* en collaboration avec le groupe du Dr Hervé Chneiweiss (INSERM, France).

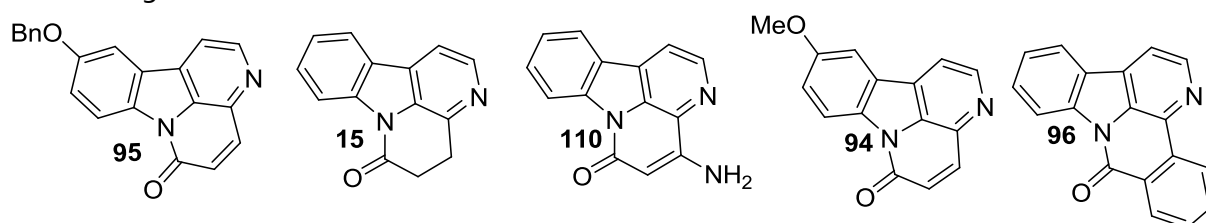


-**Figure 15**- Essai de viabilité sur les cellules TG1\*, TG10\* et NSC24\* traitées avec l'extrait dichlorométhanique d'écorce de la tige de *Z. chiloperone*.

Aussi, nous avons évalué l'activité des différents produits isolés de l'écorce comme la canthin-6-one (**1**), la 5-méthoxycanthin-6-one (**8**), le *N*-oxyde de canthin-6-one et le *trans*-avicennol (**11**) sur les cellules souches cancéreuses (CSC), l'agent responsable de la croissance des tumeurs, et nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus sur cellules souches neuronales (CSN).

Notez dans la figure 15, d'une façon approximative, que l'extrait brut de l'écorce\*\* de *Z. chiloperone* montre une activité plus marquée que les molécules pures. Ceci est probablement dû à la combinaison de composés présents dans sa composition (possibles effets synergiques).

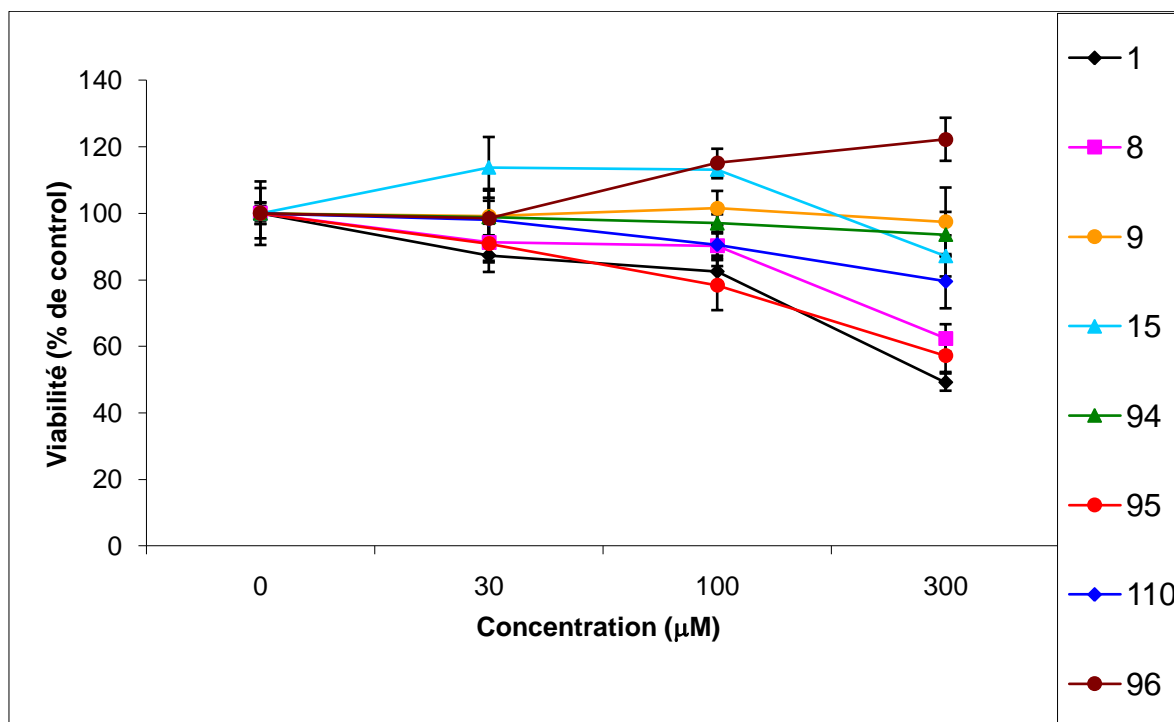
Pour aller un peu plus loin avec l'évaluation de l'activité des canthinones, nous avons évalué l'activité antiproliférative de quelques dérivés obtenus par synthèse ou hémisynthèse sur les CSC (Figure 16).



- 53 Bao S., Wu Q., McLendon R. E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A. B., Dewhirst M. W., Bigner D. D., Rich J. N., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature* 2006, **444**, 756.
- 54 Stupp R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M. J. B., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J. r., Janzer R. C., Ludwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *New Engl. J. Med.* 2005, **352**, 987.
- 55 De Feo V., Martino L. D., Santoro A., Leone A., Pizza C., Franceschelli S., Pascale M., Antiproliferative effects of tree-of-heaven (*Ailanthus altissima Swingle*), *Phytother. Res.* 2005, **19**, 226.

\* **signification**: TG1 = tumeur gliale 1 ; TG10 = tumeur gliale 10 ; NSC24 = cellules souches neuronales.

\*\* L'extrait de rizhème présente le même profil.



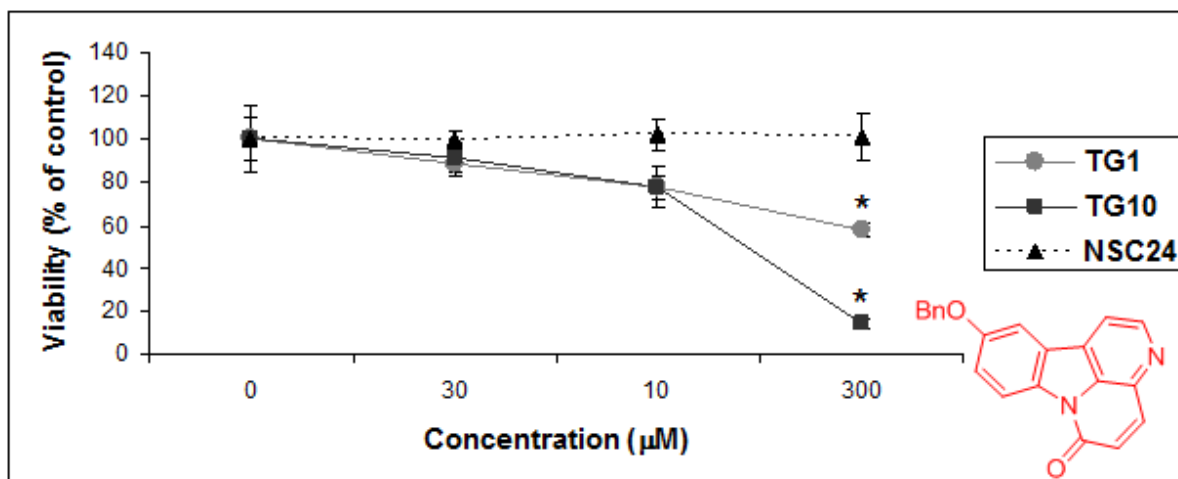
-Figure 16- Essai de viabilité sur CSC traitées avec des différentes canthinones sélectionnées.

Lors des essais sur les cellules souches cancéreuses, les extraits se sont montrés plus sélectifs<sup>\*\*</sup> que les produits isolés des extraits, seul le *trans*-avicennol (**11**) se montre sélectif. En revanche, la 5-méthoxycanthin-6-one (**8**) ne montre aucune sélectivité et la canthin-6-one (**1**) devient sélective à des concentrations élevées. Ces résultats sont présentés dans la figure 17. La sélectivité importante observée avec les extraits est comparable à celle que montre l'avicennol (**11**).

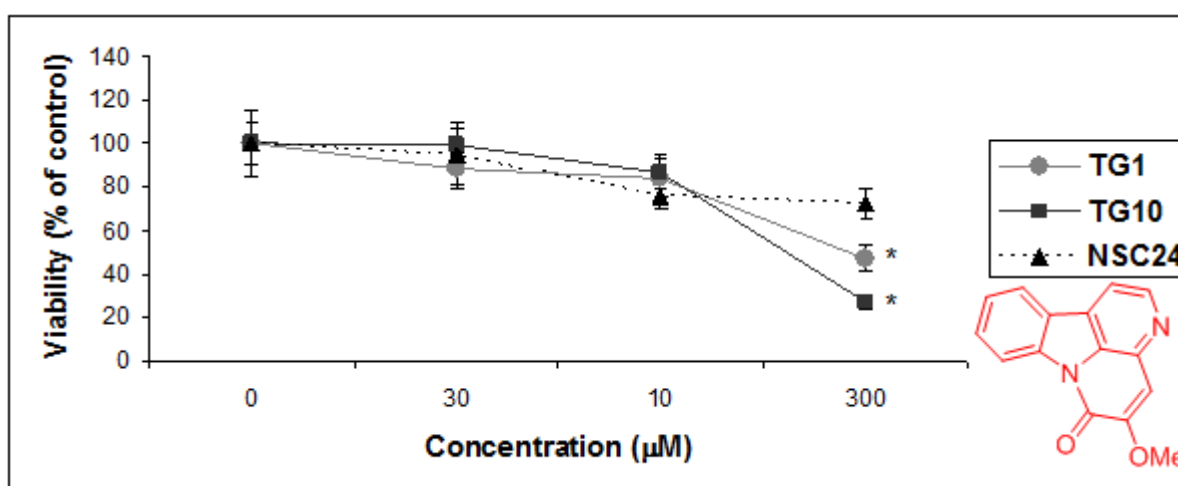
Parmi les dérivés obtenus par synthèse ou hémisynthèse, seule la 10-benzyloxyanthin-6-one (**95**) s'est montrée plus intéressante que les canthinones naturelles: elle est active à des concentrations équivalentes à **1** et **8** mais elle est plus sélective contre les cellules souches cancéreuses (du même ordre que l'avicennol). Les résultats sont présentés dans la figure 17.

<sup>\*\*</sup> Au niveau de la sélectivité nous pouvons voir une grande sélectivité avec les extraits, comparable à la sélectivité de l'avicennol. Nous pouvons penser que la majeure partie de la sélectivité présentée par les extraits peut être expliquée par la présence d'avicennol.

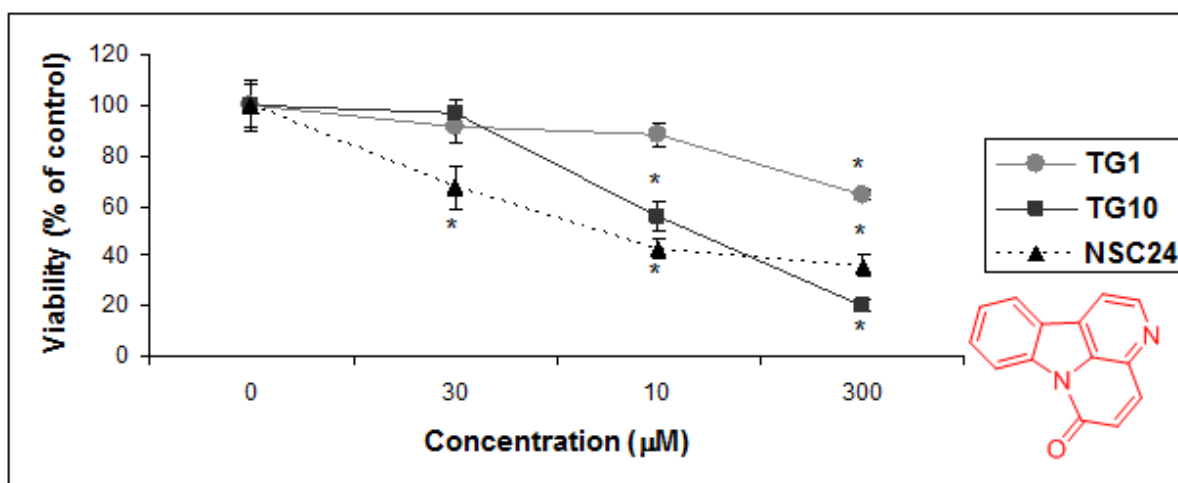
**A**



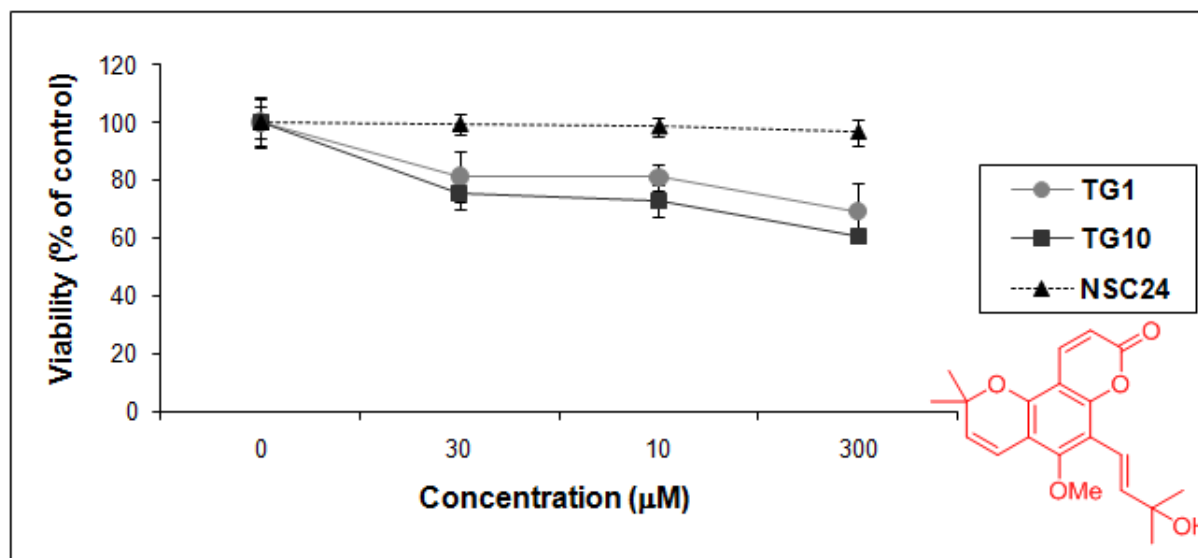
**B**



**C**



D



-Figure 17- Essais de viabilité sur TC<sub>1</sub>, TG<sub>10</sub> et NSC<sub>24</sub> traitées avec : **A**) la 10-benzoyloxycanthin-6-one (**95**) qui inhibe sélectivement la viabilité des CSC. **B**) la canthin-6-one (**1**) qui inhibe les CSC et la viabilité des NSC. **C**) la 5-méthoxycanthin-6-one (**8**) qui inhibe les CSC et la viabilité des NSC. **D**) le *trans*-avicennol (**11**) qui inhibe sélectivement la viabilité des CSC.

### 3- Étude de la voie MAPK / ERK

La voie de signalisation MAPK/ERK<sup>56,\*</sup> (Schéma 1) a suscité un intérêt considérable au cours de la dernière décennie, car elle joue un rôle central dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaires. Elle contribue aux propriétés oncogènes telles que l'indépendance vis à vis des facteurs de croissance.

56 Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.-E., Karandikar M., Berman K., Cobb M. H., Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr. Rev.* 2001, **22**, 153.

57 Montagut C., Settleman J., Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy, *Cancer Lett.* 2009, **283**, 12.

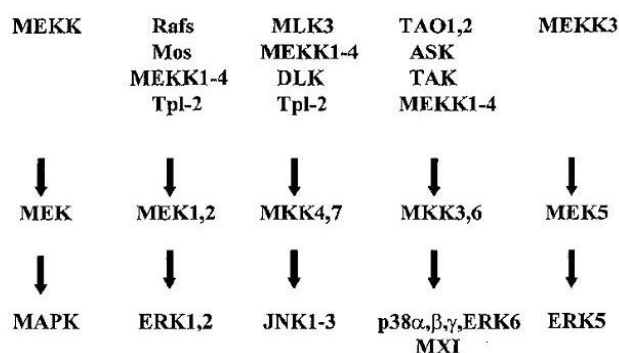
\* **signification:**

ERK : extracellular signal-regulated kinase.

MAP : mitogen-activated protein kinase.

AKT : Le nom « Akt » ne se réfère pas à sa fonction. Le « Ak » était semble-t-il une classification temporaire pour une lignée de souris qui développait spontanément des lymphomes thymiques. Le « t » vient de *transforming*, la lettre fut ajoutée lorsqu'un rétrovirus mutant fut isolé à partir de la lignée Ak, qui fut nommé « Akt-8 ». Lorsque l'oncogène codé dans ce virus fut découvert, il fut appelé v-Akt. Ainsi, les analogues humains identifiés plus tard utilisèrent des noms analogues.

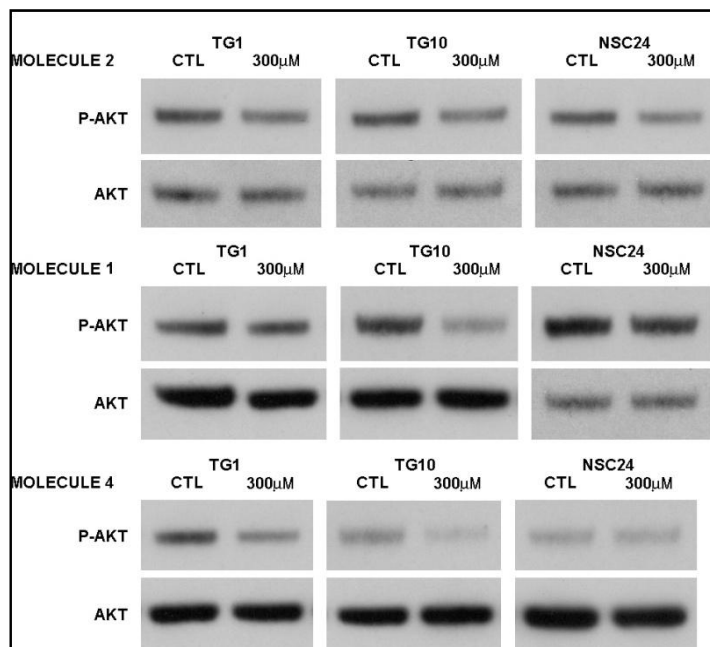




-Schéma 1- Voie de signalisation MAPK/ERK pour mammifères.

malignes de gliome (TG1) et des cellules souches neurales (NSC24) traitées pendant 30 minutes avec 100 µM de **1**, **8** et **95**.

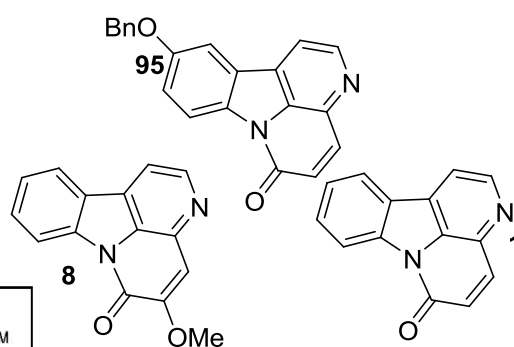
Comme le montre la figure 19, avec le *trans*-avicennol (**11**), les cellules TG1 présentent des niveaux élevés de phospho-ERK en comparaison



phosphorylation d'ERK (Figure 19). Ces résultats suggèrent que l'activation d'ERK participe à l'effet antiproliférative de nos composés. Après cela, nous avons effectué une analyse en *Western blot* de la phospho-Akt et de l'AKT totale des cellules souches TG1, TG10 et NSC24 traitées pendant 30 minutes avec 300 µM des molécules **1**, **8** et **95** (Figure 18). Conformément aux essais de WST-1\*\* (Figure 17), la molécule **8** réduit la phosphorylation d'Akt des cellules TG1, TG10 et NSC24 (Figure 18). La réduction de la phosphorylation d'Akt est plus évidente sur les CSC (TG1 et TG10) traitées

Par ailleurs, la fréquence avec laquelle cette voie est dérégulée dans les cancers humains rend cette cascade une cible attrayante pour le développement de nouveaux médicaments<sup>57</sup>.

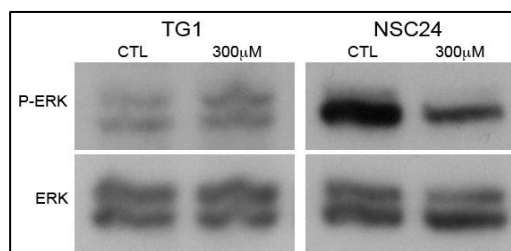
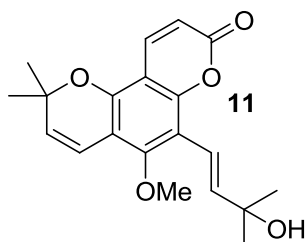
Nous avons donc effectué des expériences *Western blot* pour visualiser la phospho- et ERK totale dans des cellules souches



avec les cellules qui ont été traitées avec le véhicule (DMSO). D'autre part, le traitement des cellules NSC24 avec le *trans*-avicennol (**11**) conduit à une inhibition de la

-Figure 18- Effet de la canthin-6-one (appelé dans la figure 18 molécule 1), 5-méthoxycanthin-6-one (appelé dans la figure 18 molécule 2) et 10-benzoxycanthin-6-one (appelé dans la figure 18 molécule 4) sur l'état de phosphorylation d'AKT\* des cellules souches neurales et de gliome.

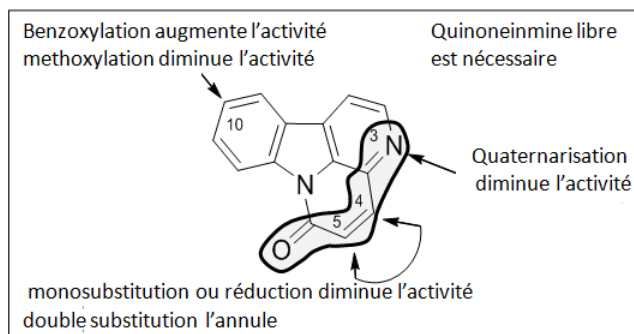
avec 300 µM de **1**, en comparaison avec les cellules NSC24, cellules traitées avec la même concentration de cette molécule (Figure 18). Enfin, avec la 10-benzyloxycanthin-6-one (**95**) le traitement réduit la phosphorylation d'Akt des CSC (TG1 et TG10), mais ne présente pas de variation sur les niveaux de phosphorylation de l'Akt des cellules NSC24 (Figure 18). Ces résultats suggèrent que **95** pourrait réduire la viabilité des CGC de façon relativement sélective par inhibition de la voie de signalisation Akt.



-Figure 19- Effet du *trans*-avicennol sur l'état de phosphorylation d'ERK des cellules souches neurales et de gliome.

#### 4- Relations structure-activité

Les relations structure-activité (Figure 20) pour l'effet antiprolifératif demeurent floues du fait d'un nombre somme toute faible d'analogues testés (Figure 16). Tous les composés possédant des substitutions simultanément aux positions 4 et 5 (accepteur de Michael du motif quinonéimine) ont montré une activité réduite. En outre, une seule substitution en position 4 est préjudiciable. Une double liaison 4,5 libre semble plus ou moins importante pour l'activité antiproliférative. Par ailleurs la substitution en position 10 est peu rationnelle avec nos exemples (Figure 16). Cette hypothèse est également soutenue par les résultats du



-Figure 20- Relation structure-activité antiproliférative

que la plupart des cellules tumorales malignes (y compris les CSC utilisées dans notre travail) expriment une dioxygénase à hème : l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)<sup>59</sup> (Figure 21).

groupe de Lindsley<sup>58</sup>.

#### 5- Étude d'inhibition de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)

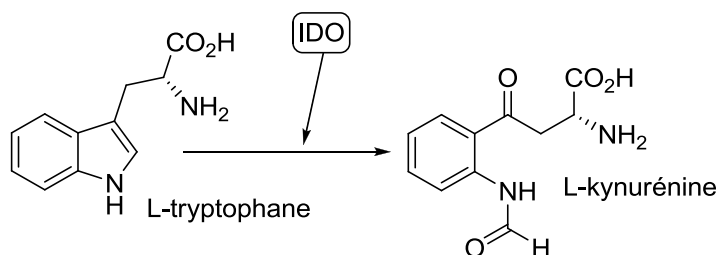
De nombreuses tumeurs développent la capacité d'inhiber l'activation de la réponse immunitaire. Il a été démontré

58 Lindsley C. W., Wisnoski D. D., Wang Y., Leister W. H., Zhao Z., A 'one pot' microwave-mediated synthesis of the basic canthine skeleton: expedient access to unnatural [beta]-carboline alkaloids, *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 4495.

59 Muller A. J., Prendergast G. C., Marrying immunotherapy with chemotherapy: Why say IDO?, *Cancer Res.* 2005, 65, 8065.

\*\* Réactive pour l'étude de la prolifération cellulaire.

Cette enzyme catalyse la première étape (limitante) dans la voie majeure du catabolisme de L-tryptophane chez les mammifères (Figure 22). Cette voie métabolique est impliquée non seulement dans une variété de fonctions physiologiques, mais aussi dans de nombreuses maladies, avec un accent particulier sur un rôle important dans l'évasion de la réponse immunitaire.

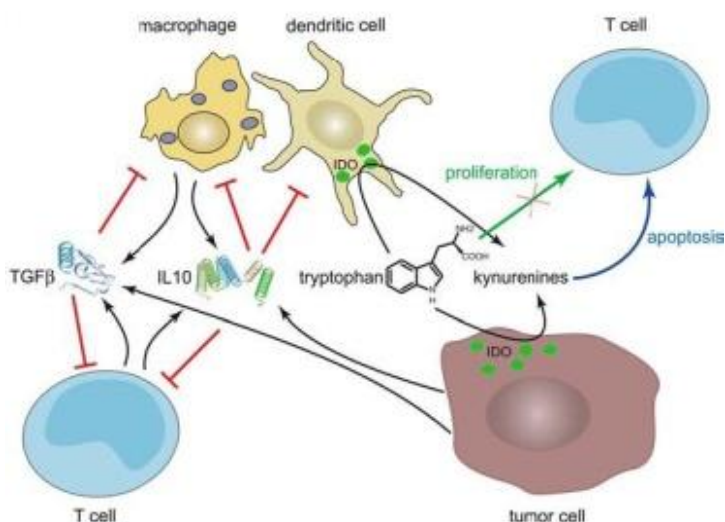


-Figure 22- Dégradation du tryptophane catalysée par l'IDO.

Le *trans*-avicennol (**11**) a tout d'abord été évalué comme un possible inhibiteur de l'IDO, par modélisation moléculaire en collaboration avec le Dr Jordi Rodrigo (BioCIS), puis par un test d'inhibition enzymatique *in vitro*<sup>60</sup>

en collaboration avec le Dr Flavia Castellano (INSERM).

Les résultats de la modélisation moléculaire étaient plutôt encourageants avec un bon recouvrement du *trans*-avicennol au site actif concordant avec d'autres travaux étudiant l'inhibition de l'IDO par modélisation<sup>61,62</sup>, nous avons également trouvé une superposition avec un des inhibiteurs de l'IDO : le phénylimidazole (PI\*) (Figure 23).

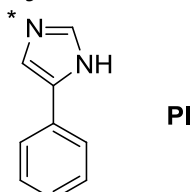


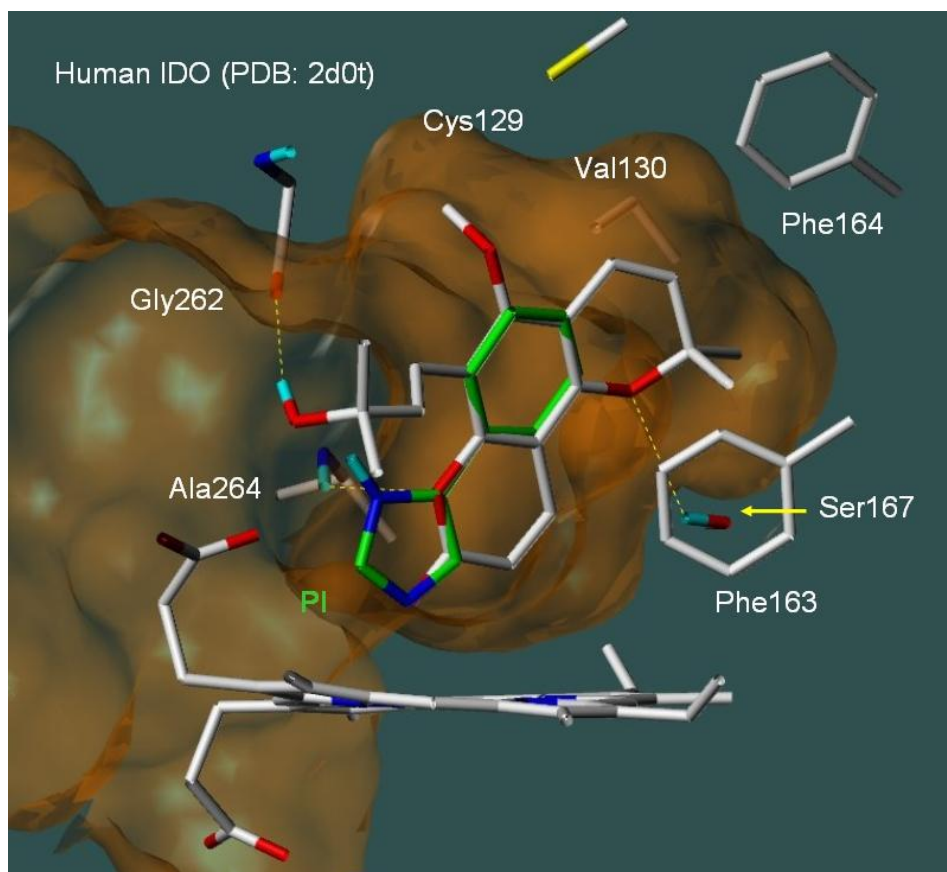
-Figure 21- Positionnement de l'IDO à la reponse immunitaire (<http://www.fmhs.auckland.ac.nz>).

60 Martin A., Streete I. M., Jamie I. M., Truscott R. J. W., Jamie J. F., A fluorescence-based assay for indoleamine 2,3-dioxygenase, *Anal. Biochem.* 2006, **349**, 96.

61 Kumar S., Jaller D., Patel B., LaLonde J. M., DuHadaway J. B., Malachowski W. P., Prendergast G. C., Muller A. J., Structure based development of phenylimidazole-derived inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase, *J. Med. Chem.* 2008, **51**, 4968.

62 Röhrig U. F., Awad L., Grosdidier A. I., Larrieu P., Stroobant V., Colau D., Cerundolo V., Simpson A. J. G., Vogel P., Van den Eynde B. t. J., Zoete V., Michielin O., Rational design of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors, *J. Med. Chem.* 2010, **53**, 1172.





-Figure 23- Modélisation moléculaire entre les structures rayons X de l'IDO (Code PDB: 2dot) complexée avec le 4-phénylimidazole (PI) et le *trans*-avicennol (**11**).

Malheureusement le résultat d'inhibition enzymatique ne montre pas d'effets inhibiteurs appréciables (avec une constante d'inhibition ( $K_i$ ) de l'ordre de  $650 \mu\text{M}$ ). Des études d'inhibition de l'IDO avec des canthinones sont *en cours*.

## V- Activité nématocide

### A- Généralités : État des lieux sur *Caenorhabditis elegans*

Tout au long du XX<sup>e</sup> siècle, grâce à la recherche sur une variété d'organismes modèles des progrès ont été faits dans la compréhension de nombreux processus biologiques. À bien des égards la biologie des organismes est très similaire, mais il est généralement beaucoup plus facile d'étudier un aspect particulier d'un organisme que d'autres. Chacun de ces organismes a une ou plusieurs caractéristiques qui les rendent idéals pour l'étude de laboratoire. Les organismes modèles les plus populaires ont un certain nombre de caractéristiques telles que : *i*- un développement rapide avec une durée de vie courte, *ii*- une petite taille adulte, *iii*- une facilité à manier et une bonne disponibilité, *iv*- et ce d'autant plus qu'un nombre très important de scientifiques travaillent sur cet organisme. Ainsi, beaucoup d'informations provenant de ces organismes peuvent être obtenues, fournissant ainsi des données qui

peuvent, parfois, être extrapolées à l'étude de maladies génétiques humaines. Dans ce travail nous avons utilisé un organisme modèle courant : *Caenorhabditis elegans*<sup>63-65</sup>.

*Caenorhabditis elegans* est un petit nématode vivant en liberté dans de nombreuses régions du monde. Il se nourrit principalement de bactéries, et dans des conditions optimales d'environnement a besoin seulement de 3 jours pour compléter son cycle de vie, facilitant ainsi les études biologiques.

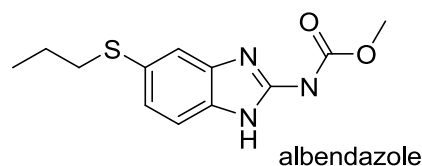
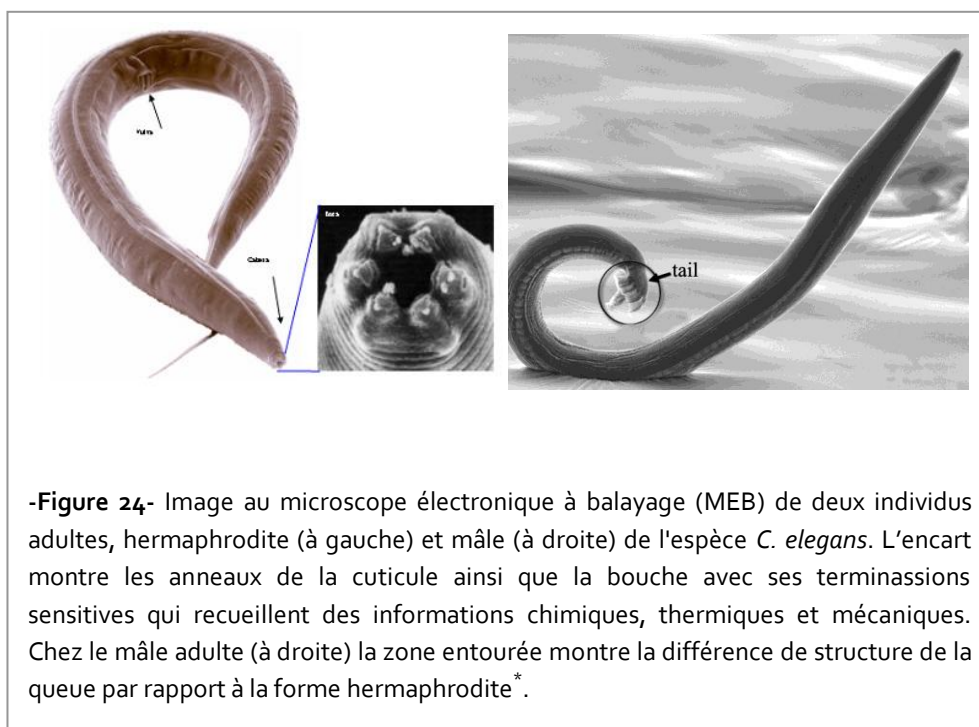
Le maintien de *C. elegans* au laboratoire est très simple, car il peut survivre et grandir sur des plaques de gélose ou en milieu liquide avec *Escherichia coli* comme source de nourriture.

Les organismes, avec l'aide d'un microscope stéréoscopique, peuvent être observés et manipulés individuellement (Figure 24).

La taille du génome est de  $8 \cdot 10^7$  paires de bases, environ 8 fois la taille du génome de la levure

#### *Saccharomyces*

*cerevisiae* et environ 1/30 de la taille du génome humain. Le génome de *C. elegans* a été entièrement séquencé en 1998, devenant ainsi le premier organisme multi-cellulaire dont la séquence complète de génome était dévoilée<sup>66</sup>. Il est important de mentionner que son génome montre une ressemblance avec le génome humain (40 % d'homologie), pour ces raisons *C. elegans* est un organisme attractif pour étudier certaines maladies humaines.



63 Nisbet A. J., Cottee P. A., Gasser R. B., Genomics of reproduction in nematodes: prospects for parasite intervention?, *Trends Parasitolog.* 2008, **24**, 89.  
64 Gilleard J., The use of *Caenorhabditis elegans* in parasitic nematode research, *Parasitology* 2004, **128**, 49.  
65 Hulme, S. E., Whitesides, G. M., Chemistry and the Worm: *Caenorhabditis elegans* as a platform for integrating chemical and biological research *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, **50**, 4774.  
66 The, C. e. S. C., Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology, *Science* 1998, **282**, 2012.

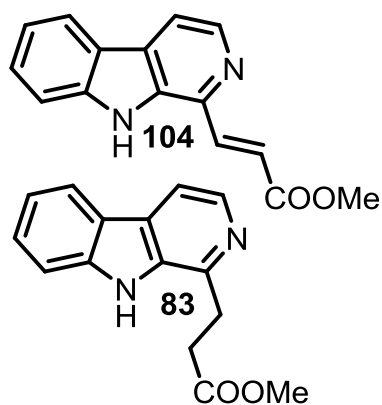
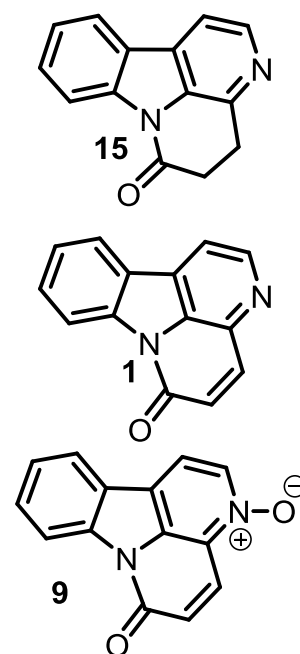
## B– Travaux personnels : Évaluation *in vitro* de l'activité des $\beta$ -carbolines

S'appuyant sur la double activité bien connue de certains anthelminthiques, qui agissent aussi comme antitrypanosomes, tel l'**albendazole**<sup>67</sup> (il s'agit d'une molécule de la famille de l'antihelminthique benzimidazole), nous avons étudié l'action exercée par les canthinones sur *C. elegans* en collaboration avec le Dr Rafael Vazquez-Manrique (University of Cambridge, UK).

Notre objectif dans cette étude n'est pas simplement de démontrer les activités anthelminthiques des canthinones, nous voulons aussi analyser si ces molécules ont une action sur le nématode et voir si ce ver peut être proposé comme un modèle animal pour les études futures sur le mécanisme d'action des canthinones.

Dans cette partie de notre travail, nous avons effectué deux tests d'activité : **tests de coordination et tests de croissance**.

Nous avons réalisé ces deux types de tests sur des organismes de type sauvage. Tout d'abord, nous avons testé les performances des animaux nageant dans un tampon biologique, par comptage du nombre de mouvements par minute. Ces tests permettent de mesurer les capacités de coordination des animaux. Deuxièmement, nous avons testé la croissance : normalement les nématicides peuvent diminuer la croissance normale des vers. Nous avons réalisé ce test en mesurant le pourcentage d'adultes au sein de différentes populations à différents moments. Pour trouver une dose de travail qui produise un effet sur la croissance, nous avons testé les produits à différentes concentrations : 0  $\mu$ M (contrôle négatif), 0,2  $\mu$ M, 20  $\mu$ M et 200  $\mu$ M. Nous avons observé que les animaux progressent très lentement avec une concentration de 200  $\mu$ M, et parfois à 20  $\mu$ M avec les composés **1**, **9**, **15**, **83** et **104**. Nous avons décidé d'utiliser la concentration de 200  $\mu$ M avec chacun d'eux, car l'effet y est plus marqué, dans les deux tests (incoordination et croissance).

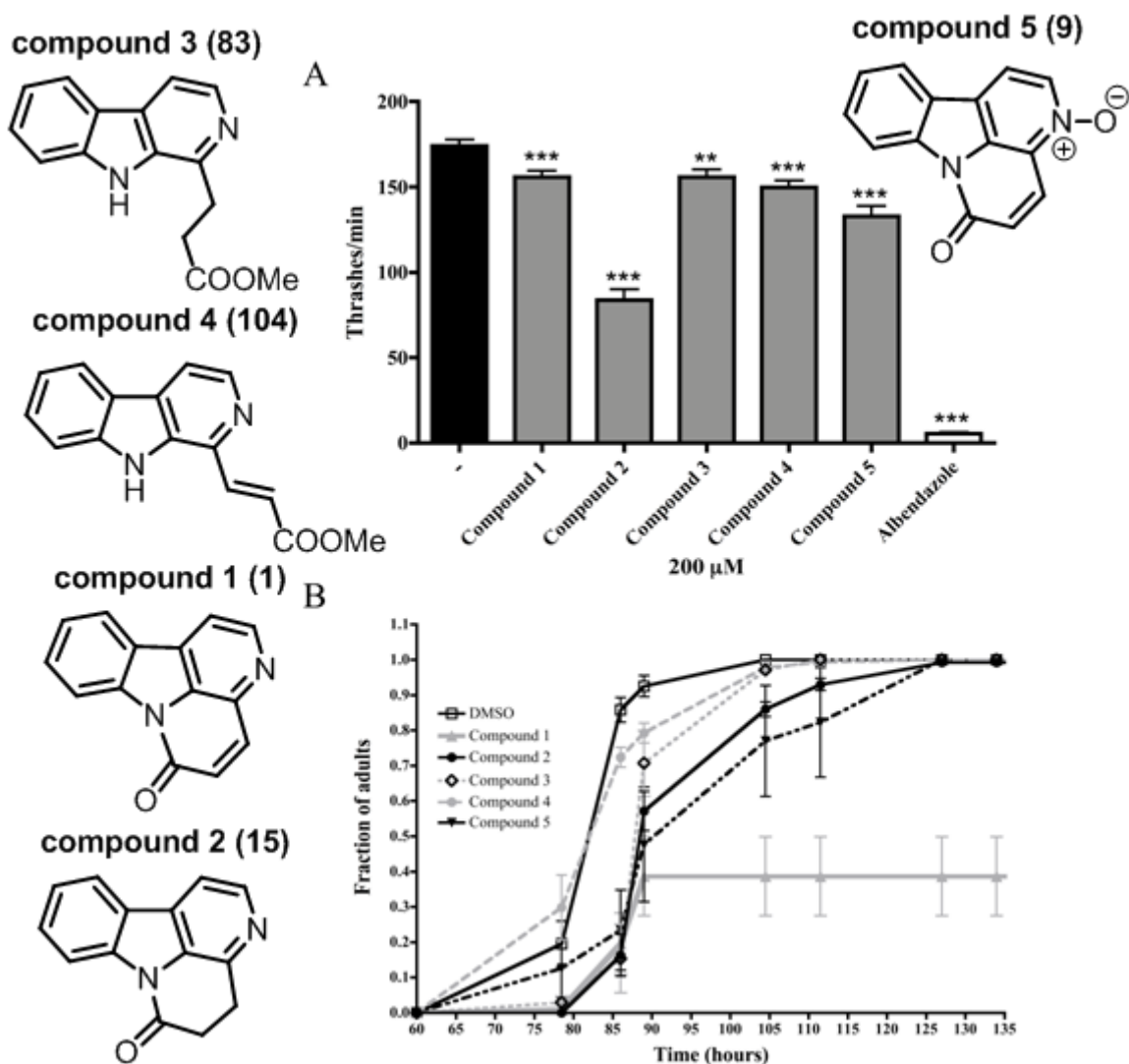


Nous avons testé la mobilité des vers, traités avec les différents composés décrits ci-dessus. Nous avons utilisé l'albendazole comme contrôle positif. Il est intéressant de noter que tous les composés diminuent la mobilité des vers dans une certaine mesure, par rapport au contrôle des vers non traités (p du test  $t < 0,0001$  avec les composés **1**, **9**, **15** et **104**, et  $p < 0,001$  pour le composé **83**) (Figure 25A). Toutefois, il convient de noter que les composés **15** et **9** réduisent la mobilité des vers de 50 % et 25 % respectivement par rapport

67 Martin R. J., Modes of action of anthelmintic drugs, *Vet. J.* 1997, **154**, 11.  
\* Récupérée de <http://wormatlas.org>.

aux témoins (Figure 25A), ce qui suggère fortement que ces molécules méritent une évaluation plus poussée comme nématicides. La structure de ces molécules peut être également un point de départ de nouvelles stratégies pour la synthèse de meilleures nématicides.

Comme indiqué plus haut, nous avons également testé la croissance de *C. elegans* en utilisant les mêmes conditions. Fait intéressant, dans cet essai, encore une fois toutes les molécules induisent un phénotype (un retard de croissance). Toutefois, nous avons observé que 60 animaux ont été arrêtés au développement du premier stade larvaire avec le composé **1** (Figure 25B), ce qui suggère que cette molécule est un inhibiteur puissant de la croissance des nématodes. La fraction des animaux qui ont atteint l'âge adulte a été retardée d'environ 10 heures par rapport aux témoins (40 % des animaux de contrôle ont atteint l'âge adulte en  $\approx$  80 heures, contre 90 h pour les animaux traités avec le composé **1** (Figure 25A). Aussi, la croissance des animaux a été fortement retardée avec les composés **15** et **9** par rapport aux contrôles (voir les valeurs de p à différents moments dans le tableau 7). Le résultat de ces deux expériences suggère fortement que certaines molécules (**1**, **15** et **9**) peuvent potentiellement avoir des propriétés nématicides.



**-Figure 25-** Essai d'activité nématicide sur *C. elegans*. **A.** essai de « comptage de mouvements » réalisées chez l'animal de type sauvage cultivé avec DMSO (témoin négatif) ou les différents composés. L'albendazole est un nématicide bien connu et a été utilisé comme contrôle positif. Toutes les  $\beta$ -carbolines testées dans ce travail (**1** appelée « compound 1 », **9** appelée « compound 5 », **15** appelée « compound 2 », **83** appelée « compound 3 » et **104** appelée « compound 4 » à la figure 25) de coordination induisent des défauts chez les nématodes, tels que montrés par les tests de mobilité réalisés en culture liquide. Cependant, le composé **15** induit une réduction de 50 % de la mobilité des animaux. La perte de coordination peut être due à une insuffisance des muscles de la paroi du corps ou du système nerveux (ou les deux), causée par les composés. \*\* valeur de  $p < 0,001$ ; \*\*\* valeur de  $p < 0,0001$ . **B.** Essais de croissance effectués sur des animaux de type sauvage cultivés en présence de chacun des composés décrits dans ce travail, et le DMSO comme contrôle négatif. Le graphique montre la proportion d'adultes par rapport aux stades larvaires à différents moments. Plusieurs plaques contenant les nématodes ont été suivies simultanément. Tous les composés induisent un retard de croissance chez les nématodes. Toutefois, cette tendance est très significative pour le composé **15**, qui induit un fort retard de croissance des vers. Le composé **1** induit un arrêt touchant 40 % des animaux pendant les premiers stades larvaires et montre donc un potentiel nématicide. Les valeurs de  $p$  de comparaison de la moyenne des adultes pour chaque condition, pour chaque point de temps, peuvent être trouvées dans le tableau 7.



-Tableau 7- T-test p valeurs de la Figure 25B<sup>a</sup>.

Temps (heures)	Composé 1	Composé 15	Composé 83	Composé 104	Composé 9
86	0,0001	0,0001	0,0001	0,0129	0,0031
86	0,0001	0,0015	0,0438	0,0087	0,0217
89	0,0001	0,0008	0,0832	0,2086	0,1742
105	0,0001	0,0026	1	1	0,2436
112	0,0001	0,3409	1	1	1
127	0,0001	0,3409	1	1	1
134	0,0001	0,3409	1	1	1
160	0,0001	0,3409	1	1	1

<sup>a</sup> Les valeurs p ont été obtenues en comparant la moyenne de chaque point de temps pour un composé donné, par rapport au contrôle contenant du DMSO.

Code couleur : fond noir = statistiquement très important ; gris foncé = statistiquement important ; gris clair = statistiquement peu significatif ; blanc = aucune signification.

### **-Conclusion du chapitre 6-**

- Une évaluation biologique poussée des composés isolés de *Zanthoxylum chiloperone* (canthinones et pyranocoumarines), et des extraits bruts de l'écorce et des feuilles a été conduite. Ils présentent une activité inhibitrice intéressante de la prolifération des formes trypomastigotes, épimastigotes et amastigotes de *Trypanosoma cruzi in vitro* (ces études ont été confirmées par des études *in vivo*).
- Les mêmes composés isolés de *Zanthoxylum chiloperone* présentent une activité inhibitrice intéressante sur différentes souches de *Plasmodium falciparum in vitro*, mais cette activité n'est pas retrouvée dans les études *in vivo*. Des études de nanoformulation ont été réalisées avec l'objectif d'améliorer la biodisponibilité intracellulaire.
- Des canthinones (naturelles et synthétiques) présentent une activité inhibitrice intéressante de la prolifération de *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Ces études ont confirmé des résultats préliminaires décrits dans les travaux de Delphine Lagoutte sur *Mycobacterium bovis*. Quelques relations structure-activité semblent se dégager, mais l'introduction des motifs prénylés n'a pas apporté les effets escomptés. Le positionnement de ces mêmes motifs en d'autres endroits sur la molécule pourrait être une piste intéressante à suivre. L'étude d'un possible mécanisme d'action basé sur la distorsion de la bicouche lipidique a été effectuée.
- L'extrait brut de l'écorce de *Zanthoxylum chiloperone*, les composés isolés (canthinones et pyranocoumarines) et les canthinones synthétiques présentent une activité inhibitrice intéressante de la prolifération des cellules souches cancéreuses. Quelques relations structure-activité apparaissent en cohérence avec celles établies pour l'activité antituberculeuse. Des études d'expression de kinases ont été effectuées pour mieux comprendre les mécanismes d'action.
- Finalement, la canthin-6-one et ses précurseurs biosynthétiques présentent une activité inhibitrice intéressante de la prolifération de l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans in vitro*.

## -Bibliographie du chapitre 6-

- 1 Ferreira M. E., Rojas de Arias A., Torres de Ortiz S., Inchausti A., Nakayama H., Thouvenel C., Hocquemiller R., Fournet A., Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *80*, 199.
- 2 Ferreira M. E., Nakayama H., de Arias A. R., Schinini A., de Bilbao N. V., Serna E., Lagoutte D., Soriano-Agaton F., Poupon E., Hocquemiller R., Fournet A., Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice, *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 258.
- 3 Chagas C., Neue Trypanosomen, *Vorläufige Mitteilung Arch. Schiff Tropenhyg.* **1909**, *13*, 120.
- 4 Sgambatti de Andrade A. L. S., Zicker F., de Oliveira R. M., Almeida de Silva S., Luquetti A., Travassos L. R., Almeida I. C., de Andrade S. S., Guimarães de Andrade J., Martelli C. M.T., Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection, *The Lancet* **1996**, *348*, 1407.
- 5 (a) Cerecetto H., Gonzalez M., Chemotherapy of Chagas disease: status and new developments, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1187. (b) Muñoz M. J., Murcia L., Segovia M., The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* **2011**, *9*, 5.
- 6 (a) Sánchez-Moreno M., Sanz A.M., Gómez-Contreras F., Navarro P., Marin C., Ramirez-Macias I., Rosales M. J., Olmo F., Garcia-Aranda I., Campayo L., Cano C., Arrebola F., Yunta M.J. R., *In vivo* trypanosomicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against acute and chronic phases of Chagas disease, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 970. (b) Ribeiro I., Sevcsik A.-M., Alves F., Diap G., Don R., Harhay M. O., Chang S., Pecoul B., New improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e484. 6a. Rowe A., Body Borers, *Chem. Eng. News* **2011**, *89*, 32.
- 7 Rassi A., Rassi A., Marin-Neto J. A., Chagas disease, *The Lancet* **2010**, *375*, 1388.
- 8 Izumi E., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Veiga Junior V. F., Nakamura C. V., Natural products and Chagas disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 809.
- 9 Ferreira M. E., Cebrián-Torrejón G., Corrales A. S., Vera de Bilbao N., Rolón M., Gomez C. V., Leblanc K., Yaluf G., Schinini A., Torres S., Serna E., Rojas de Arias A., Poupon E., Fournet A., *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment, *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 986.
- 10 Bonnet B., Soulez D., Girault S., Maes L., Landry V., Davioud-Charvet E., Sergheraert, C., Trypanothione reductase inhibition/trypanocidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine series, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 95.
- 11 (a) Snow R. W., Guerra C. A., Noor A. M., Myint H. Y., Hay S.I., The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature* **2005**, *434*, 214. (b) Sharp P. M., Liu W., Learn G. H., Rayner J.C., Peeters M., Hahn B. H., Source of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E744.
- 12 Newton P., White N., Malaria: new developments in treatment and prevention, *Annu. Rev. Med.* **1999**, *50*, 179.
- 13 Ridley R.G., Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs, *Nature* **2002**, *415*, 686.
- 14 Mutabingwa, T. K., Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy!, *Acta Trop.* **2005**, *95*, 305.
- 15 Kondrachine A.V., Trigg P.I., Global overview of malaria, *Indian J. Med. Res.* **1997**, *106*, 39.
- 16 Noedl H., Se Y., Schaefer K., Smith B. L., Socheat D., Fukuda M. M., Evidence of artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia, *New Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2619.
- 17 Dondorp A. M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A. P., Tarning J., Lwin K. M., Arie F., Hanpithakpong W., Lee S. J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S. S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N. P. J., Lindegardh N., Socheat D., White N. J., Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria, *New Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455.
- 18 Turschner S., Efferth T., Drug resistance in *Plasmodium*: natural products in the fight against malaria, *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 206.
- 19 (a) Wells T., Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots?, *Malar. J.* **2011**, *10*, S3. (b) Huang H, Yao Y., He Z., Yang T. Ma J., Tian X., Li Y., Huang C., Chen X., Li W., Zhang S., Zhang C., Ju J., Antimalarial  $\beta$ -carboline and indolactam alkaloids from *marinactinospora thermotolerans*, a deep sea isolate, *J. Nat. Prod.* **2011**, *00*, 00.
- 20 Milliken W. Malaria and antimalarial plants in Roraima, Brazil, *Trop. Doct.* **1997**, *27*, 20.
- 21 Karioti A., Skaltsa H., Kaiser M., Tasdemir D., Trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects of anthecotulide-type linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata*, *Phytomedicine* **2009**, *16*, 783.
- 22 Luize P. S., Tiunan T. S., Morello L. G., Maza P. K., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Garcia-Cortez D. A., de Mello J.C.D., Nakamura C. V., Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2005**, *41*, 85.
- 23 Froelich S., Onegi B., Kakooko A., Siems K., Schubert C., Jenett-Siems K., Plants traditionally used against malaria: phytochemical and pharmacological investigation of *Momordica foetida*, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 1.
- 24 Cebrián-Torrejón G., Spelman K., Leblanc K., Munoz-Durango K., Gutierrez S. T., Ferreira, M. E., Arias A. R. d., Figadere B., Fournet A., Maciuk A., Grellier P., Cech N. B., Poupon E., The antiplasmodium effects of a traditional South American remedy: *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* against chloroquine resistant and chloroquine sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 652.
- 25 Spelman K., Depoix D., McCray M., Mouray E., Grellier P., The Traditional Medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-diyonic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity, *Phytother. Res.* **2010**, *25*, 1098.

- 26 Weissbuch I., Leiserowitz L., Interplay between malaria, crystalline hemozoin formation, and antimalarial drug action and design, *Chem. Rev.* 2008, **108**, 4899.
- 27 Bilia A. R., Lazari D., Messori L., Taglioli V., Temperini C., Vincieri F. F., Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin: its application to *Artemisia annua* constituents, *Life Scienc.* 2002, **70**, 769.
- 28 Pashynska V. A., Van den Heuvel H., Claeys M., Kosevich, M. V., Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, **15**, 1181.
- 29 Barksdale L., Kim K. S., Mycobacterium, *Bacteriol. Rev.* 1977, **41**, 217.
- 30 Ducati R. G., Ruffino-Netto A., Basso L. A., Santos D. S., The resumption of consumption, a review on tuberculosis, *Mems. I nst. Oswaldo Cruz* 2006, **101**, 697.
- 31 du Toit L., Pillay V., Danckwerts M., Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches, *Respir. Res.* 2006, **7**, 118.
- 32 Saltini C., Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis, *Respir. Med.* 2006, **100**, 2085.
- 33 DeBarber A. E., Mdluli K., Bosman M., Bekker L.-G., Barry C. E., Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 9677.
- 34 Ibrahim M., Andries K., Lounis N., Chauffour A., Truffot-Pernot C., Jarlier V., Veziris N., Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, **51**, 1015.
- 35 Mdluli K., Spigelman M., Novel targets for tuberculosis drug discovery, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006, **6**, 459.
- 36 Ballell L., Field R. A., Duncan K., Young R., New small-molecule synthetic antimycobacterials, *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**, 2153.
- 37 Ginsberg A. M., Spigelman M., Challenges in tuberculosis drug research and development, *Nat. Med.* 2007, **13**, 290.
- 38 Sood R., Rao M., Singhal S., Rattan A., Activity of RBx 7644 and RBx 8700, new investigational oxazolidinones, against *Mycobacterium tuberculosis* infected murine macrophages, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2005, **25**, 464.
- 39 Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B., Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.* 1995, **59**, 201.
- 40 Lagoutte D., Nicolas V., Poupon E., Fournet A., Hocquemiller R., Libong D., Chaminade P., Loiseau P. M., Antifungal canthin-6-one series accumulate in lipid droplets and affect fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biomed. Pharmacother.* 2008, **62**, 99.
- 41 Tocher D. R., Leaver M. J., Hodgson P. A., Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases, *Prog. Lip. Res.* 1998, **37**, 73.
- 42 Frye J., Albert A. D., Selinsky B. S., Yeagle P. L., Cross polarization P-31 nuclear magnetic resonance of phospholipids, *Biophys. J.* 1985, **48**, 547.
- 43 Kinnunen P. K. J., On the principles of functional ordering in biological membranes *Chem. Phys. Lip.* 1991, **57**, 375.
- 44 Sitaram N., Nagaraj R., Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity, *Biochim. Biophys. Acta – Biomemb.* 1999, **1462**, 29.
- 45 Williamson P., Mattocks K., Schlegel R. A., Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing, *Biochim. Biophys. Acta – Biomemb.* 1983, **732**, 387.
- 46 Pawlikowska-Pawlega B., Ignacy Gruszecki W., Misiak L., Paduch R., Piersiak T., Zarzyka B., Pawelec J., Gawron A., Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group, *Biochim. Biophys. Acta – Biomemb* 2007, **1768**, 2195.
- 47 Castelli F., Valencia G., Opioid structure: lipid thermotropic behaviour correlation study on a series of DPPC liposomes containing opioids, *Thermochim. Acta* 1989, **154**, 323.
- 48 Kleihues P., Cavenee W. K., World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system (Lyon), 2000.
- 49 Patru C., Romao L., Varlet P., Coulombel L., Raponi E., Cadusseau J., Renault-Mihara F., Thirant C., Leonard N., Berhneim A., Mihalescu-Maingot M., Haiech J., Bièche I., Moura-Neto V., Daumas-Duport C., Junier M.-P., Chneiweiss H., CD133, CD15/SSSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma-neuronal tumors, *BMC Cancer* 2010, **10**, 66.
- 50 Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* 2001, **414**, 105.
- 51 Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri, M. A., Dick J. E., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, *Nature* 1994, **367**, 645.
- 52 Schatton T., Murphy G. F., Frank N. Y., Yamaura K., Waaga-Gasser A. M., Gasser M., Zhan, Q., Jordan S., Duncan L. M., Weishaupt C., Fuhlbrigge R. C., Kupper T. S., Sayegh M. H., Frank M. H., Identification of cells initiating human melanomas, *Nature* 2008, **451**, 345.
- 53 Bao S., Wu Q., McLendon R. E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A. B., Dewhirst M. W., Bigner D. D., Rich J. N., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature* 2006, **444**, 756.
- 54 Stupp R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M. J. B., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J. r., Janzer R. C., Ludwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *New Engl. J. Med.* 2005, **352**, 987.
- 55 De Feo V., Martino L. D., Santoro A., Leone A., Pizza C., Franceschelli S., Pascale M., Antiproliferative effects of tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle), *Phytother. Res.* 2005, **19**, 226.
- 56 Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.-E., Karandikar M., Berman K., Cobb M. H., Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr. Rev.* 2001, **22**, 153.
- 57 Montagut C., Settleman J., Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy, *Cancer Lett.* 2009, **283**, 12.
- 58 Lindsley C. W., Wisnoski D. D., Wang Y., Leister W. H., Zhao Z., A 'one pot' microwave-mediated synthesis of the basic canthine skeleton: expedient access to unnatural [beta]-carboline alkaloids, *Tetrahedron Lett.* 2003, **44**, 4495.
- 59 Muller A. J., Prendergast G. C., Marrying immunotherapy with chemotherapy: Why say IDO?, *Cancer Res.* 2005, **65**, 8065.
- 60 Matin A., Streete I. M., Jamie I. M., Truscott R. J. W., Jamie J. F., A fluorescence-based assay for indoleamine 2,3-dioxygenase, *Anal. Biochem.* 2006, **349**, 96.
- 61 Kumar S., Jaller D., Patel B., LaLonde J. M., DuHadaway J. B., Malachowski W. P., Prendergast G. C., Muller A. J., Structure based development of phenylimidazole-derived inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase, *J. Med. Chem.* 2008, **51**, 4968.

- 62 Röhrig U. F., Awad L., Grosdidier A. I., Larrieu P., Stroobant V., Colau D., Cerundolo V., Simpson A. J. G., Vogel P., Van den Eynde B. t. J., Zoete V., Michielin O., Rational design of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors, *J. Med. Chem.* 2010, **53**, 1172.
- 63 Nisbet A. J., Cottee P. A., Gasser R. B., Genomics of reproduction in nematodes: prospects for parasite intervention?, *Trends Parasitolog.* 2008, **24**, 89.



# Chapitre 7

## Étude électrochimique des canthinones





## -CHAPITRE 7-

### Étude électrochimique des canthinones

#### Introduction

À la recherche de nouvelles méthodologies visant l'étude des mécanismes d'action des produits naturels, nous avons établi une collaboration avec le professeur Antonio Domenech de l'Université de Valencia pour étudier le comportement électrochimique de certaines canthinones.

L'obtention d'informations sur les propriétés électroniques et structurales des molécules organiques peut être déterminante pour la compréhension des activités biologiques, et peut même être cruciale pour l'étude des bases moléculaires des dommages causés à la cellule tumorale<sup>1</sup>. Des corrélations entre l'activité antitumorale et les résultats d'études électrochimiques en solution ont été rapportées pour des sels de quinolinium<sup>2</sup>, des dérivés d'acridine<sup>3,4</sup>, la nogalomycine<sup>5</sup>, des dérivés de la morine<sup>6</sup>, des quinones hétérocycliques<sup>7</sup>, des pipérazinylamidrazones<sup>8</sup>, des chalcones<sup>9</sup> et des naphthoquinones<sup>10</sup> entre autres. En dépit des différences existant entre la réactivité biochimique et électrochimique, où les composés sont soumis à un transfert de charge interfacial à la surface d'une électrode, nous pouvons dans certains cas trouver une corrélation entre les réactivités biochimiques et électrochimiques avec à la base l'utilisation judicieuse des paramètres thermodynamiques et cinétiques.

- 
- 1 Ma Z., Day C.S., Bierbach U., Unexpected reactivity of the 9-aminoacridine chromophore in guanidylation reactions. *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 5387.
  - 2 Crawford P.W., Foye W.O., Ryan M.D., Kovacic P., Cyclic voltammetry of quinolinium salts and related compounds: correlation with structure and anticancer activity, *J. Pharm. Sci.* 1987, **76**, 481.
  - 3 Kimura M., Okabayashi I., Inoue H., Acridine derivatives. VI. Redox chemistry of novel 9-anilinoacridines with antitumor activities, *J. Heterocyclic Chem.* 1995, **32**, 265.
  - 4 Chen J., Zhang J., Huang L., Lin X., Chen G., Hybridization biosensor using 2-nitroacridone as electrochemical indicator for detection of short DNA species of chronic myelogenous leukemia, *Biosens. Bioelectr.* 2008, **24**, 349.
  - 5 Ibrahim M.S., Voltammetric studies of the interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA, *Anal. Chim. Acta* 2001, **443**, 63.
  - 6 Temerk Y.M., Ibrahim M.S., Koth M., Voltammetric and spectroscopic studies on binding of antitumor morin, morin-Cu complex and morin-beta-cyclodextrin with DNA, *Spectrochim. Acta A* 2009, **71**, 1830.
  - 7 Koyama J., Morita I., Yamori T., Correlation between cytotoxic activities and reduction potentials of heterocyclic quinines, *Molecules* 2010, **15**, 6559.
  - 8 Abdel-Jalil R.J., El Momani E. Q., Hamad M., Voelter W., Mubarak M.S., Smith B.H., Peters D.G., Synthesis, antitumor activity, and electrochemical behavior of some piperazinyl amidrazones, *Monatsh. Chem.* 2010, **141**, 251.
  - 9 Ratkovic Z., Juranic Z.D., Stanojkovic T., Manojlovic D., Vukicevic R.D., Radulovic N., Joksovic M.D., Synthesis, characterization, electrochemical studies and antitumor activity of some new chalcone analogues containing ferrocenyl pyrazole moiety, *Bioorg. Chem.* 2010, **38**, 26.

### Travaux personnels : étude électrochimique des canthinones

Dans ce chapitre nous avons réalisé une étude électrochimique des canthinones **1**, **8**, **9**, **15**, **96** (Figure 1) en réalisant des films sur une électrode de carbone vitrifié, employant la méthodologie décrite par Compton *et al.*<sup>11</sup>, et en réalisant également des dépôts microparticulaires sur des électrodes de graphite imprégnées de paraffine suivant les travaux de voltamétrie avec microparticules immobilisées décrits par Scholz (VIMP)<sup>12,13</sup>. L'emploi de ces techniques a été motivé par la faible solubilité des canthinones dans l'eau, et obéit à deux paramètres :

- ✿ les composés présentent des signaux voltamétriques d'adsorption en solution aqueuse (*vide infra*), ces signaux rendent difficiles l'étude électrochimique (Figure 2).
- ✿ les processus d'électrochimie à l'état solide apportent certaines contraintes structurales plus ou moins importantes, qui peuvent mimer les contraintes structurales associées aux processus biochimiques conduits par les biocatalyseurs (Figure 3).

Le procédé VIMP offre l'opportunité d'étudier des réactions qui sont inhibées en solution ou obscurés pour processus électrochimiques plus rapides à l'électrochimie dans solution conventionnel.

Pour resituer cette étude dans le cadre de nos recherches sur les propriétés biologiques des canthinones, nous rappelons sur la figure suivante (Figure 1) une classification binaire de quelques molécules en fonction de leur activité antiproliférative.

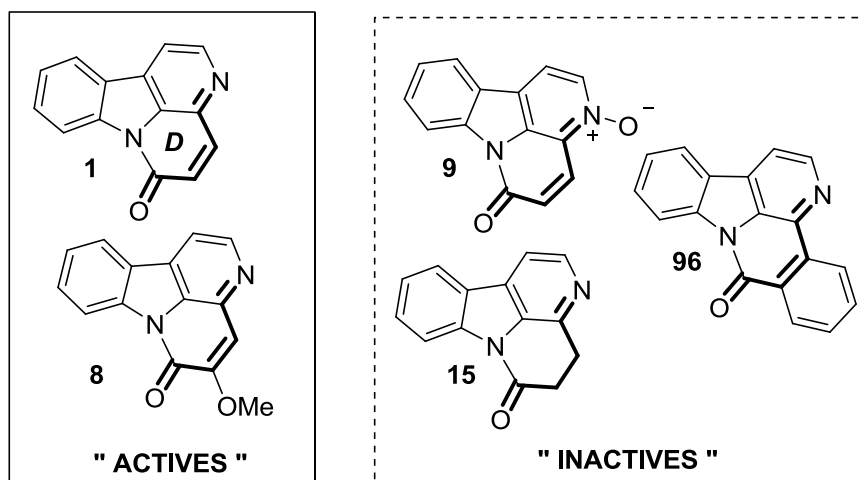
---

10 Francisco A.I., Casellato A., Neves A.P., Carneiro J.W.d.M., Vargas M.D., Visentin L.d.C., Magalhães A., Câmara C.A., Pessoa C., Costa-Lotufo L.V., Filho J.D.B.M., de Moraes M.O., Novel 2-(*R*-phenyl)amino-3-(2-methylpropenyl)-[1,4]-naphthoquinones: synthesis, characterization, electrochemical behavior and antitumor activity, *J. Braz. Chem. Soc.* 2010, **21**, 169.

11 Moore R.R., Banks C.E., Compton R.G., Basal plane pyrolytic graphite modified electrodes: comparison of carbon nanotubes and graphite powder as electrocatalysts, *Anal. Chem.* 2004, **76**, 2677.

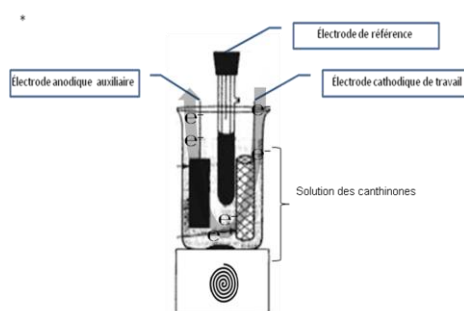
12 Scholz F., Meyer B., Voltammetry of solid microparticles immobilized on electrode surfaces, *Electroanal. Chem., A Series of Advances* 1998, **20**, 1.

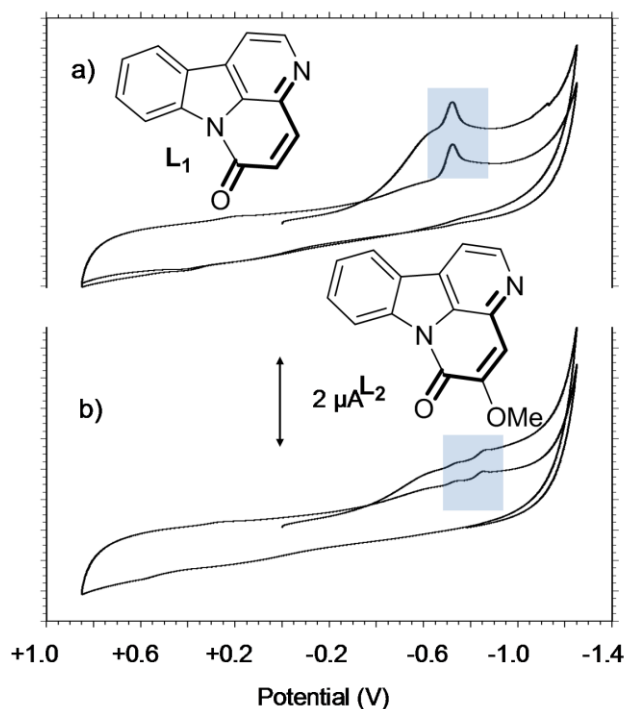
13 Scholz F., Schröder U., Gulabowski R., *Electrochemistry of immobilized particles and droplets*, Springer, Berlin, 2005.



- **Figure 1**- Essai de classification des canthinones en fonction de leur activité antiproliférative contre les CSC (voir chapitre 6).

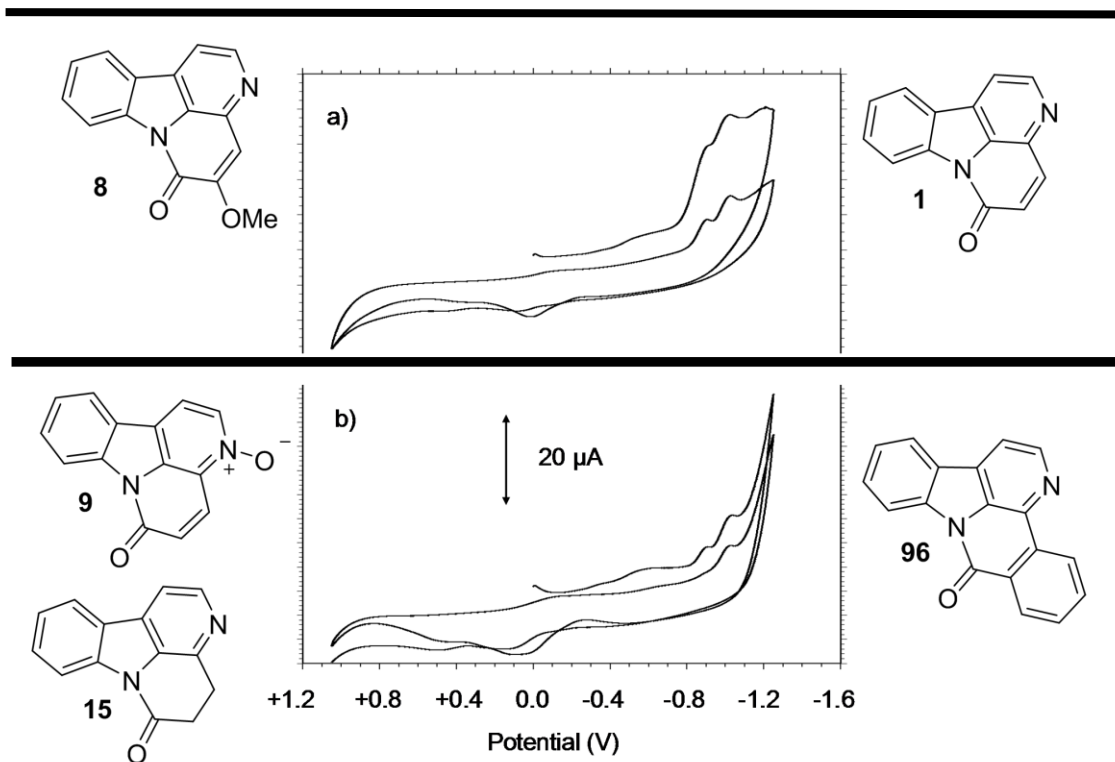
La figure 2 montre les courbes de voltamétrie cyclique (VC) pour des solutions de : a) **1** et b) **8** dans un tampon aqueux phosphate de potassium à pH 7,4. Ces signaux sont mal définis et sont accompagnés de pics d'adsorption (carré bleu figure 2), obtenus, en utilisant plusieurs électrodes\*, pour tous les composés testés à la concentration maximale possible (environ 0,2 mM).





-Figure 2- CV pour les solutions de : a) **1** b) **8**.

En revanche, la réponse voltampérométrique de dépôts microparticulaires de composés, est bien plus intense, présentant de larges pics qui se chevauchent, comme on le voit sur la figure 3. Les CVs pour les dépôts microparticulaires de **1** et **8**, donnent deux pics qui se chevauchent à  $-0,85$  et  $-1,00$  V, pour **9** seul un pic à  $-1,0$  V est enregistré. Les composés **15** et **96** affichent une réponse similaire à celle de **9** avec un seul pic à  $-1,25$  V. Ces profils voltamétriques deviennent insensibles aux variations du potentiel de balayage entre 10 et 1000 mV/s, sans aucune apparition de signaux anodiques couplés à la réduction des pics mentionnés ci-dessus, mais sont plus clairs avec des courants de potentiel inférieurs.

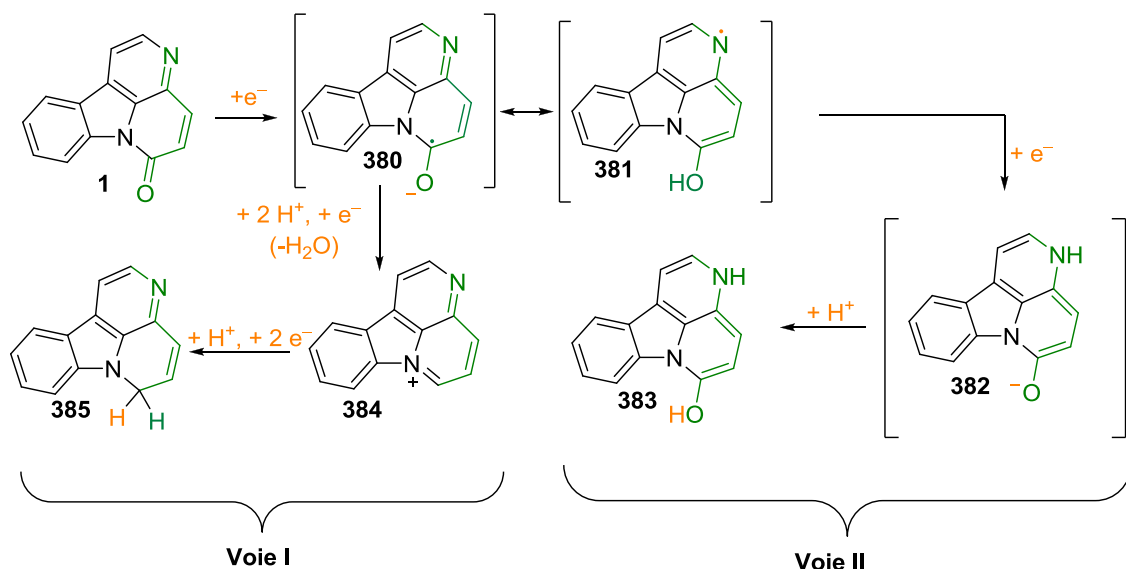


-Figure 3- CV pour les solutions de : a) 1 et 8 b) 9, 15 et 96.

Ces réponses sont typiques de phénomènes de type réductif. L'électrochimie réductrice peut être décrite en termes de transfert de couples de protons et d'électrons vers les canthinones à la frontière triphasique formée par l'électrode, l'électrolyte et les particules solides (alcaloïde)<sup>14,15</sup>.

14 Doménech A., Doménech M.T., Chronoamperometric study of proton transfer/electron transfer in solid state electrochemistry of organic dyes, *J. Solid State Electrochem.* 2006, **10**, 949.

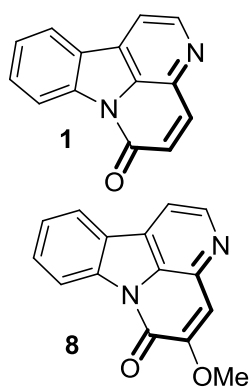
15 Doménech A., Doménech M.T., *In situ* AFM study of proton-assisted electrochemical oxidation/reduction of microparticles of organic dyes, *Electrochem. Commun.* 2008, **10**, 1238.



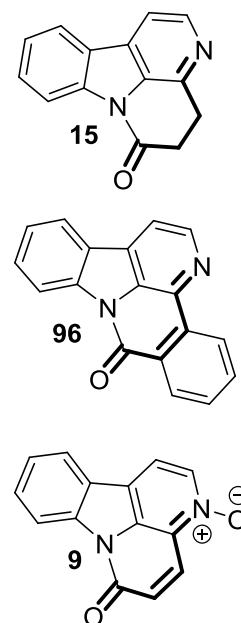
-Schéma 1- Deux voies électrochimiques prédites pour les canthinones.

Considérant les structures des composés étudiés deux itinéraires électrochimiques différents peuvent être envisagés (les voies I et II). Comme nous avons illustré au schéma 1 pour **1**, la voie dite I peut être suivie par toutes les canthinones, par contre la voie II ne peut être suivie que par les composés **1**, **8**, **9**. La voie I peut être reliée à la réduction ayant lieu à potentiels plus négatifs, tandis que la voie II, correspond au processus redox quinone/hydroquinone, et apparaît à potentiels moins négatifs.

-Table 1- Corrélation entre l'activité antiproliférative (AA) des composés étudiés (cellules souches cancéreuses TG1 et TG10) et les signaux voltammétriques des dépôts microparticulaire obtenus avec les mêmes composés dilués dans un tampon phosphate de potassium (0,25 M). Les pics de potentiels ( $E_p$ ) (mV AgCl/Ag) sont enregistrés par VCs à un balayage de potentiel de 50 mV/s.

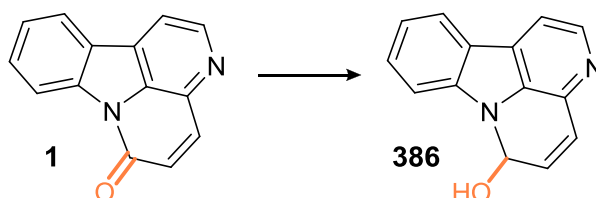


Composé	$E_p$ (mV)	$E_p$ (mV)	$E_p$ (mV)	AA (TG1 and TG10)
<b>1</b>	-850 (II)	-1000 (I)		+
<b>8</b>	-850 (II)	-1000 (I)		+
<b>9</b>		-1150 (I)		-
<b>15</b>			-1250 (I)	-
<b>96</b>			-1260 (I)	-



Les résultats obtenus ont été comparés à l'activité antiproliférative des canthinones contre les cellules souches tumorales (CSC), décrite dans le chapitre 6. La corrélation entre la réponse observée par voltamétrie à l'état solide et l'activité antiproliférative pour les canthinones peut être déduite des données présentées dans le tableau 1. Ces données suggèrent clairement que **l'activité antiproliférative peut être associée à la voie II**.

D'autres études d'électrochimie ont été réalisées telles que l'électrolyse de la canthin-6-one (**1**) (voir suite et chapitre 4) entre autres, qui ne seront pas détaillées dans le présent manuscrit.

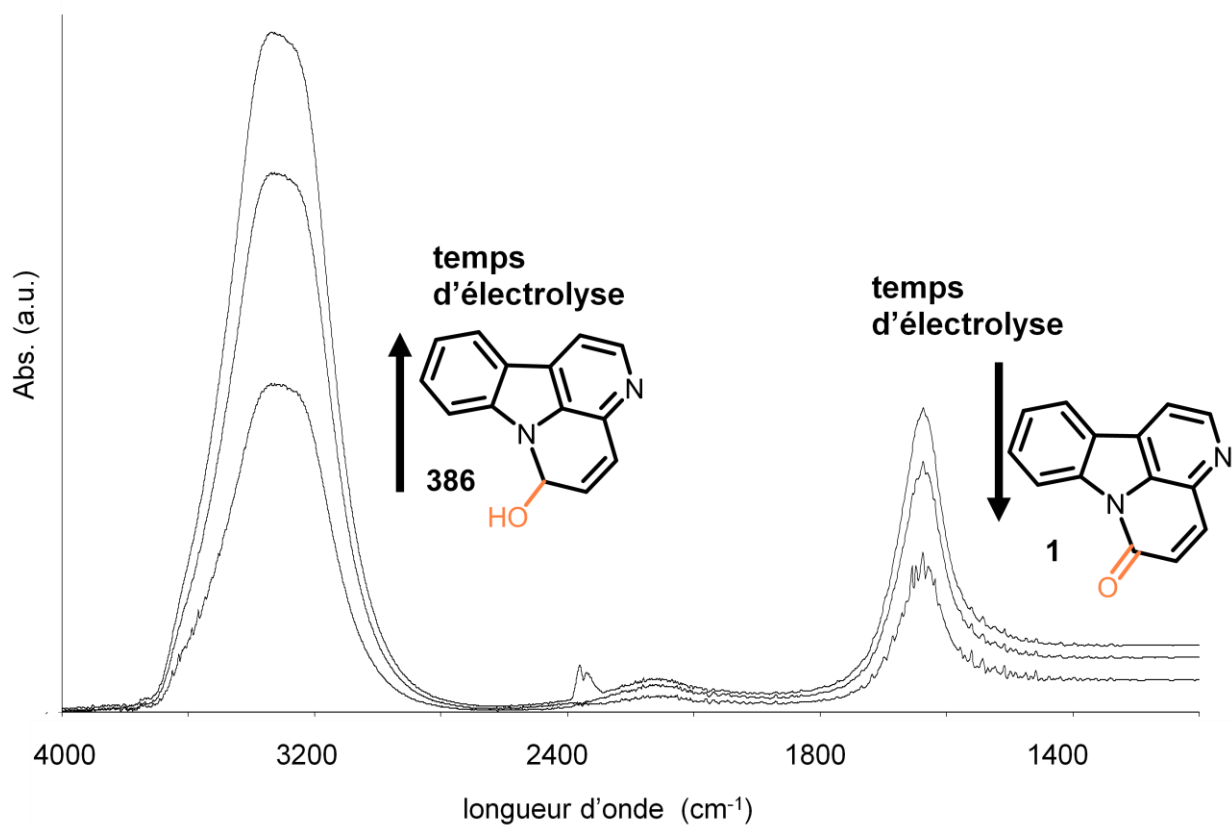


Avant de finir cette partie, parmi les études d'électrochimie que nous avons réalisées récemment nous a paru fort intéressant de décrire la synthèse par électrolyse d'un dérivé réduit de la canthin-6-one la 6-hydroxycanthine (**386**) (Schéma 2).

**Réactifs et conditions** : NaCl (pH 7), électrolyse.

**-Schéma 2-** Conversion de la canthin-6-one (**1**) à la 6-hydroxycanthine (**386**) (Schéma 2).

La figure 4 montre l'analyse du spectre infrarouge enregistré sur une solution de canthin-6-one (**1**) dans 0,10 M de NaCl (pH 7), au cours de l'électrolyse contrôlée à potentiels de  $-1,35$  V avec une électrode de graphite pyrolytique, après soustraction des spectres infrarouges de la solution 0,10 M de NaCl.



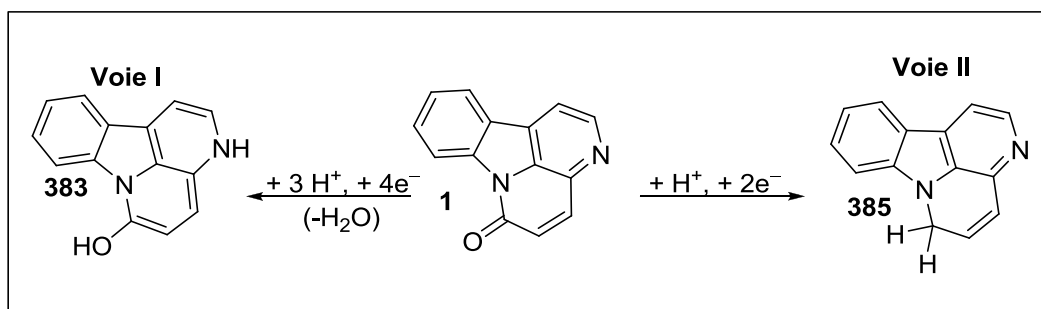
-Figure 4- Analyse de l'évolution d'un spectre infrarouge enregistré sur une solution de canthin-6-one (1) dans 0,10 M de NaCl (pH 7).

La bande « C=O » à 1700 cm<sup>-1</sup> diminue progressivement alors que le groupe « OH » à 3300 cm<sup>-1</sup> augmente de façon concomitante (Figure 4).



### -Conclusion du chapitre 7-

- Une étude de la réponse voltampérométrique des canthinones a été effectuée. Considérant les structures des composés étudiés, deux itinéraires électrochimiques différents peuvent être envisagés (les voies I et II), Ces données suggèrent clairement que l'activité antiproliférative que nous avons étudiée peut être associée à la voie II.





### **-Bibliographie du chapitre 7-**

- 1 Ma Z., Day C.S., Bierbach U., Unexpected reactivity of the 9-aminoacridine chromophore in guanidylation reactions. *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 5387.
- 2 Crawford P.W., Foye W.O., Ryan M.D., Kovacic P., Cyclic voltammetry of quinolinium salts and related compounds: correlation with structure and anticancer activity, *J. Pharm. Sci.* 1987, **76**, 481.
- 3 Kimura M., Okabayashi I., Inoue H., Acridine derivatives. VI. Redox chemistry of novel 9-anilinoacridines with antitumor activities, *J. Heterocyclic Chem.* 1995, **32**, 265.
- 4 Chen J., Zhang J., Huang L., Lin X., Chen G., Hybridization biosensor using 2-nitroacridone as electrochemical indicator for detection of short DNA species of chronic myelogenous leukemia, *Biosens. Bioelectr.* 2008, **24**, 349.
- 5 Ibrahim M.S., Voltammetric studies of the interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA, *Anal. Chim. Acta* 2001, **443**, 63.
- 6 Temerk Y.M., Ibrahim M.S., Koth M., Voltammetric and spectroscopic studies on binding of antitumor morin, morin-Cu complex and morin-beta-cyclodextrin with DNA, *Spectrochim. Acta A* 2009, **71**, 1830.
- 7 Koyama J., Morita I., Yamori T., Correlation between cytotoxic activities and reduction potentials of heterocyclic quinines, *Molecules* 2010, **15**, 6559.
- 8 Abdel-Jalil R.J., El Momani E. Q., Hamad M., Voelter W., Mubarak M.S., Smith B.H., Peters D.G., Synthesis, antitumor activity, and electrochemical behavior of some piperazinyl amidrazones, *Monatsh. Chem.* 2010, **141**, 251.
- 9 Ratkovic Z., Juranic Z.D., Stanojkovic T., Manojlovic D., Vukicevic R.D., Radulovic N., Joksovic M.D., Synthesis, characterization, electrochemical studies and antitumor activity of some new chalcone analogues containing ferrocenyl pyrazole moiety, *Bioorg. Chem.* 2010, **38**, 26.
- 10 Francisco A.I., Casellato A., Neves A.P., Carneiro J.W.d.M., Vargas M.D., Visentin L.d.C., Magalhães A., Câmara C.A., Pessoa C., Costa-Lotufo L.V., Filho J.D.B.M., de Moraes M.O., Novel 2-(*R*-phenyl)amino-3-(2-methylpropenyl)-[1,4]-naphthoquinones: synthesis, characterization, electrochemical behavior and antitumor activity, *J. Braz. Chem. Soc.* 2010, **21**, 169.
- 11 Moore R.R., Banks C.E., Compton R.G., Basal plane pyrolytic graphite modified electrodes: comparison of carbon nanotubes and graphite powder as electrocatalysts, *Anal. Chem.* 2004, **76**, 2677.
- 12 Scholz F., Meyer B., Voltammetry of solid microparticles immobilized on electrode surfaces, *Electroanal. Chem., A Series of Advances* 1998, **20**, 1.
- 13 Scholz F., Schröder U., Gulabowski R., Electrochemistry of immobilized particles and droplets, Springer, Berlin, 2005.
- 14 Doménech A., Doménech M.T., Chronoamperometric study of proton transfer/electron transfer in solid state electrochemistry of organic dyes, *J. Solid State Electrochem.* 2006, **10**, 949.
- 15 Doménech A., Doménech M.T., *In situ* AFM study of proton-assisted electrochemical oxidation/reduction of microparticles of organic dyes, *Electrochem. Commun.* 2008, **10**, 1238.



# Conclusion générale



Dans ce travail, nous avons présenté une série de résultats centrés sur le motif indole dont l'importance en chimie mais également en pharmacie n'est pas à démontrer.

■ Nous nous sommes intéressés à la canthin-6-one, un alcaloïde de type  $\beta$ -carboline. L'étude phytochimique des différents organes de *Zanthoxylum chiloperone* nous a permis d'isoler, outre la canthin-6-one, un analogue méthoxylé et un autre *N*-oxydé ainsi que les composés *cis*- et *trans*-avicennol et umbelliferone. L'identification de l'alkylamide sanshool est également décrite pour la première fois dans cette espèce.

■ Des analogues de la canthin-6-one ont, ensuite, été obtenus par synthèse et hémisynthèse. Notamment des analogues substitués sur le cycle tryptamine et des molécules de type aryl[e]canthin-6-one. La réaction de Bischler-Napieralski est utilisée comme réaction pivot dans notre schéma de synthèse. Une synthèse rapide de la canthin-6-one a été optimisée et a permis la préparation d'un maillage de réactions permettant de mimer la voie biosynthétique des canthinones.

La stratégie mise au point a, ensuite, été spécifiquement adaptée à la synthèse de molécules à motifs prénylés.

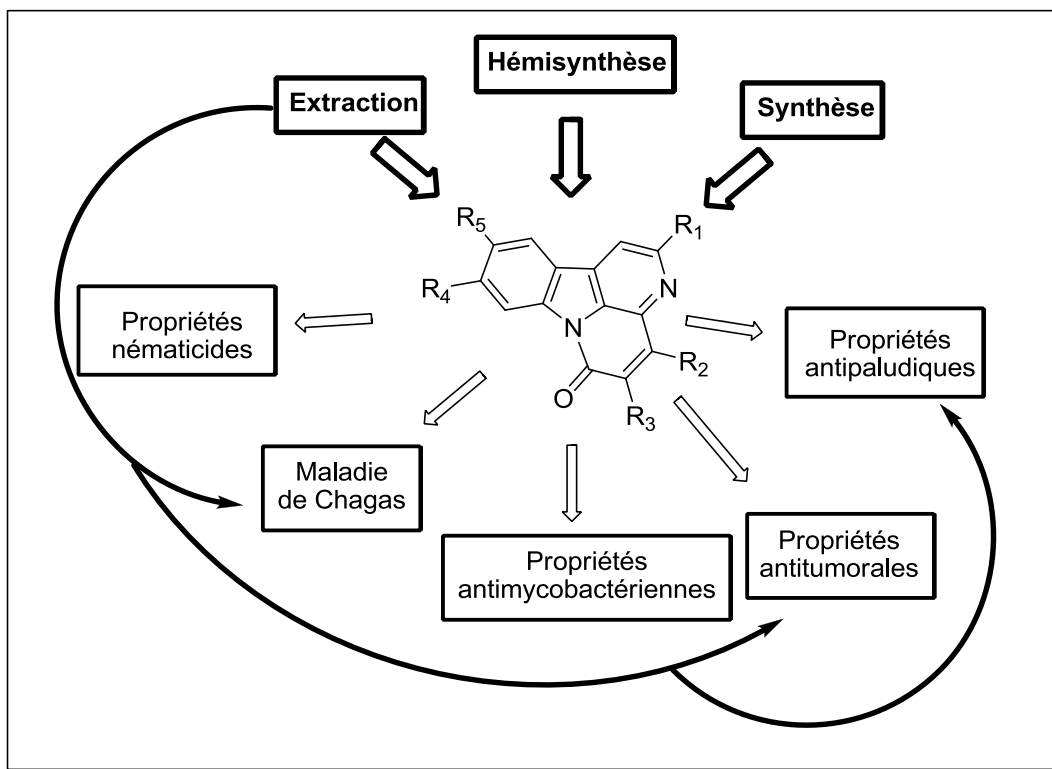
■ Les extraits des différents organes de la plante *Z. chiloperone*, la canthin-6-one, les analogues synthétisés et le *trans*-avicennol ont fait l'objet d'études biologiques dans quatre domaines différents.

■ Tout d'abord des quantités suffisantes de canthin-6-one et d'analogues synthétisés dans le cadre de ce travail ont permis des études *in vivo* chez la souris pour le traitement de la maladie de Chagas. La canthin-6-one est aussi efficace que le benznidazole (traitement de référence) aussi bien dans les formes aiguës que chroniques de la maladie.

■ Dans le domaine de l'activité antitumorale, le nombre d'analogues a été suffisant pour pouvoir entrevoir les premiers éléments de relation structure-activité. Sur quelques analogues choisis, des études de mécanisme d'action sont actuellement en cours. Qui plus est, l'activité antiproliférative peut être associée à la réponse voltampérométrique des canthinones dans des expériences d'électrochimie.

■ Dans le cadre de l'activité antipaludique et antihelminthique, les premiers essais d'activité ont été effectués.

■ Mais c'est la découverte de propriétés antimycobactériennes intéressantes qui a suscité un intérêt tout particulier et va constituer un axe important des recherches futures du laboratoire autour de la canthin-6-one.





# Abréviations et symboles



## Abréviations et symboles

CuCl	chlorure de cuivre
$\Delta$	chauffage au reflux
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
E <sup>+</sup>	électrophile
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
ESI	<i>ElectroSpray Ionisation</i>
Et <sub>2</sub> O	éther diéthylique
Et <sub>3</sub> N	triéthylamine
EtOH	éthanol
EtONa	éthanoate de sodium
éq.	équivalent
g	Gramme
GIAO DFT	quantum chemical gauge-independent atomic orbital
h	Heure
H <sub>2</sub>	Dihydrogène
H <sub>2</sub> O	Eau
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	acide sulfurique
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
hν	exposition à la lumière
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IR	Infrarouge
j	Jour
JMOD	<sup>13</sup> C J-modulation experiments
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonate de potassium
L	Litre
LDA	diisopropylamide de lithium
M	Molarité
MeOH	Méthanol
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
MnO <sub>2</sub>	dioxyde de manganèse
mol	Mole
MsCl	chlorure de méthanesulfonate (ou de mésyle)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonate de sodium
NaBH <sub>4</sub>	borohydrure de sodium
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
nOe	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>

## Abréviations et symboles

Nu <sup>-</sup>	Nucléophile
Pd/C	palladium sur charbon
Pd(OH) <sub>2</sub> /C	hydroxyde de palladium sur charbon
ppm	partie par million
Ph	phényl(e)
Phth	Phtalimide
POCl <sub>3</sub>	oxychlorure de phosphore
<i>p</i> -TolSO <sub>2</sub>	<i>para</i> -toluènesulfonate (ou tosylate)
<i>p</i> -TsCl	chlorure de <i>para</i> -toluènesulfonate (ou de tosyle)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SiO <sub>2</sub>	dioxyde de silicium (silice)
SM	Spectrométrie de Masse
TA	température ambiante
TFA	acide trifluoroacétique
TF <sub>2</sub> O	anhydride trifluorométhanesulfonique
THF	Tétrahydrofurane
Tmax	température maximale
Tmoy	température moyenne
Tmin	température minimale
TPP	Thiamine PyroPhosphate
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organisation
Yb(OTf) <sub>3</sub>	trifluoromethanesulfonate (ou triflate) d'ytterbium

## **-Résumé de thèse-**

Les alcaloïdes canthin-6-one, 5-méthoxy-canthin-6-one et *N*-oxyde de canthin-6-one ainsi que l'alkylamide sanshool et trois coumarines ont été identifiés et quantifiés des écorces, feuilles (dans ce cas une étude annuelle a été menée), fruits et racines de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* (Rutaceae) récoltée en Amérique du Sud.

Divers analogues de la canthin-6-one ont été obtenus par hémisynthèse en exploitant la réactivité de l'azote pyridinique N-3. De nouveaux analogues ont été synthétisés à partir de différentes tryptamines et anhydrides fonctionnalisés. La mise au point de nouvelles voies de synthèse, permettant leur obtention en 3 ou 4 étapes avec de bons rendements, a permis notamment de retracer toute la voie de biosynthèse de ces alcaloïdes.

La stratégie de synthèse a, ensuite, été spécifiquement adaptée à la synthèse de molécules à motifs prénylés.

L'activité antituberculeuse, l'activité antiproliférative sur cellules souches cancéreuses, ainsi que plusieurs activités antiparasitaires (maladie de Chagas, paludisme, activité nématocide) ont été étudiées et divers mécanismes d'action proposés.

Finalement, nous avons réalisé une étude originale d'électrochimie sur des canthinones ainsi que les premiers essais de formulation galénique avec cette famille d'alcaloïdes.

◆ **Mots clés relatifs:** substances naturelles, alcaloïdes, canthin-6-one,  $\beta$ -carbolines, indoles, chimie biomimétique, Bischler-Napieraski, Rutaceae, prénylation, tuberculose, cancer, Chagas, nématocide.

### ◆ **Le nom du laboratoire de rattachement :**

Laboratoire de pharmacognosie – CNRS UMR 8076 BioCIS

Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie

5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, CEDEX

**PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean-Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY CEDEX

