



HAL
open science

Pharmacochimie d'anthranoïdes issus du genre Psorospermum (Hypericaceae) : isolement, activités antiparasitaires et synthèse d'analogues structuraux

Jean-Baptiste Gallé

► To cite this version:

Jean-Baptiste Gallé. Pharmacochimie d'anthranoïdes issus du genre Psorospermum (Hypericaceae) : isolement, activités antiparasitaires et synthèse d'analogues structuraux. Chimie thérapeutique. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAF052 . tel-01292597

HAL Id: tel-01292597

<https://theses.hal.science/tel-01292597>

Submitted on 23 Mar 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES (ED 222)

Laboratoire d'Innovation Thérapeutique

(UMR 7200 CNRS/Unistra)

THÈSE

présentée par :

Jean-Baptiste GALLÉ

soutenue le 6 novembre 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Pharmacognosie

**Pharmacochimie d'anthranoïdes issus
du genre *Psorospermum*
(Hypericaceae)**

**Isolement, activités antiparasitaires et synthèse
d'analogues structuraux**

THÈSE dirigée par :

Mme VONTHRON-SÉNÉCHEAU Catherine
M. GIRARD Nicolas

Maître de Conférences (HDR), Université de Strasbourg
Maître de Conférences (HDR), Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. DAVID Bruno
M. CHAMPY Pierre

Docteur (HDR), Laboratoires Pierre Fabre
Professeur, Université Paris-Sud

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. BLANCHARD Nicolas
M. LOISEAU Philippe
M. RENAULT Jean-Hugues

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg
Professeur, Université Paris-Sud
Professeur, Université de Reims

Table des matières

Table des matières _____	i
Remerciements _____	vii
Liste des abréviations _____	xi
Introduction _____	1
1 Contexte de la thèse et résultats antérieurs _____	3
2 Objectifs généraux de la thèse _____	6
Chapitre I : Généralités et données bibliographiques _____	7
1 Présentation du genre <i>Psorospermum</i> _____	9
1.1 Aspects botaniques _____	9
1.2 Ethnobotanique du genre <i>Psorospermum</i> _____	12
1.3 Pharmacognosie du genre <i>Psorospermum</i> _____	14
2 Les dihydroanthracénones _____	29
2.1 Dihydroanthracénones monomériques _____	29
2.2 Vismiones _____	33
2.3 Biosynthèse des dihydroanthracénones _____	37
2.4 Dihydroanthracénones dimériques _____	38
2.5 Conclusion _____	40
3 Les leishmanioses _____	41
3.1 Taxonomie _____	41
3.2 Epidémiologie _____	42
3.3 Vecteur _____	43
3.4 Cycle parasitaire _____	44
3.5 Aspects cliniques _____	45
3.6 Vaccins contre la leishmaniose _____	47
3.7 Traitements actuels _____	49
3.8 Coût des traitements _____	52
3.9 Résistances aux traitements _____	53
3.10 Recherches en chimiothérapie antileishmanienne _____	54
3.11 Intérêt des substances naturelles _____	59
4 Le paludisme _____	61
4.1 Répartition géographique des différentes espèces de <i>Plasmodium</i> _____	62
4.2 Prévalence _____	63
4.3 Cycle parasitaire _____	64
4.4 Physiopathologie de la maladie _____	65
4.5 Formes cliniques du paludisme _____	66
4.6 Diagnostic biologique _____	67
4.7 Développement de vaccins _____	68
4.8 Traitements disponibles - Classification chimique des antipaludiques _____	70

4.9	Autres moyens de lutte et de prévention	74
4.10	Résistances aux antipaludiques	74
4.11	Développement de nouveaux antipaludiques	75
4.12	Intérêt des substances naturelles	77
Chapitre II : Approche phytochimique		79
1	Objectifs	81
2	Récolte	81
3	Extraction	83
Fractionnement conventionnel		84
3.1	Données bibliographiques	84
3.2	Fractionnement de l'extrait PGE2E	84
3.3	Détermination structurale des molécules isolées	86
3.4	Bilan du fractionnement de la fraction F2 de l'extrait PGE2E	92
4	Contenu en vismiones potentielles de l'extrait brut PGE2E	93
5	Développement d'une nouvelle stratégie de purification de l'extrait PGE2E	94
5.1	La chromatographie de partage centrifuge	95
5.2	Partition liquide-liquide de l'extrait PGE2E	100
5.3	Fractionnement de la fraction enrichie en vismiones polaires PGPAF	102
5.4	Détermination structurale des molécules E à K isolées de PGPAF	103
5.5	Bilan du fractionnement de la fraction PGPAF	109
5.6	Détermination des coefficients de partage des vismiones	110
5.7	Fractionnement par Extraction de Partage Centrifuge	110
5.8	Conclusion	119
6	Etude de la répartition des vismiones dans différentes espèces du genre <i>Psorospermum</i>	121
6.1	Comparaison CCM des différents extraits de <i>Psorospermum</i>	121
6.2	Dosage des vismiones dans les extraits de <i>Psorospermum</i>	124
7	Etude de la stabilité des vismiones en solution	129
7.1	Stabilité de l'acétylvismione D dans le DMSO par RMN ¹ H	130
7.2	Suivi de la dégradation de l'acétylvismione D dans le DMSO par HPLC	131
7.3	Stabilité de l'acétylvismione D dans le méthanol par RMN ¹ H	132
7.4	Stabilité de la vismione H dans le DMSO	133
7.5	Stabilité des vismiones lors des tests biologiques	136
8	Etude du rendement quantique de fluorescence de l'acétylvismione D	138
8.1	Détermination des paramètres d'absorbance de l'acétylvismione D	138
8.2	Détermination des paramètres de fluorescence de l'acétylvismione D	139
8.3	Détermination du rendement quantique de fluorescence de l'acétylvismione D	139
8.4	Conclusion	141

9	Tentatives de caractérisation de la stéréochimie des vismiones _____	142
9.1	Mesure du pouvoir rotatoire _____	142
9.2	Essais de cristallisation _____	142
9.3	Criblage de conditions HPLC chirale _____	143
9.4	Discussion _____	143
10	Recherche de vismiones dans d'autres genres botaniques _____	144
10.1	Recherche de vismiones dans le genre <i>Aloe</i> _____	144
10.2	Recherche de vismiones au sein d'Hypericaceae tempérées _____	145
10.3	Recherche de vismiones dans la famille des Clusiaceae _____	145
10.4	Conclusion _____	146
Chapitre III : Synthèse organique _____		147
1	Introduction _____	149
2	Synthèse totale de l'émodine _____	151
2.1	Données de la littérature _____	151
2.2	Stratégie 1 : Condensation successive de deux diènes sur une 1,4-benzoquinone ____	157
2.3	Stratégie 2 : Cyclisation de dérivés de l'acide 2-benzylbenzoïque _____	159
3	Alkylation de l'émodine _____	168
3.1	Alkylation par réaction avec un dérivé halogéné _____	168
3.2	Alkylation par réaction avec un dérivé tosylé _____	170
3.3	Alkylation par réaction de Mitsunobu _____	171
4	Synthèse de la 6-desméthylémodine _____	172
5	Synthèse d'antrones 3-O-alkylées _____	173
5.1	Tentatives de réduction des anthraquinones 3-O-alkylées en anthrones _____	173
5.2	Alkylation de l'émodine anthrone _____	178
6	Synthèse de dihydroanthracénones et des anthrones correspondantes _____	180
6.1	Synthèse du noyau dihydroanthracénone - données de la littérature _____	180
6.2	Synthèse des dihydroanthracénones _____	187
6.3	Synthèse d'antrones par couplage de Stille _____	192
7	Conclusion _____	194
Chapitre IV : Activités Biologiques _____		197
1	Réalisation des tests _____	199
2	Extraits de <i>Psorospermum</i> _____	200
2.1	Activités antiplasmodiales _____	200
2.2	Activités antileishmaniennes _____	203
3	Molécules de type antranoïde _____	203
3.1	Criblage d'antrones et d'antraquinones _____	203
3.2	Criblage d'analogues synthétiques _____	207
3.3	Evaluation biologique des vismiones isolées de <i>P. glaberrimum</i> _____	209
4	Conclusion _____	214
5	Perspectives _____	215

5.1	Nouveaux tests sur amastigotes intramacrophagiques _____	215
5.2	Approche protéomique _____	215
5.3	Tests <i>in vivo</i> sur modèle murin de leishmaniose viscérale _____	216
5.4	Tests sur espèces à tropisme cutané _____	217
5.5	Hypothèses concernant le mécanisme d'action _____	217
5.6	Possibilités de valorisation des vismiones _____	218
Conclusion générale _____		219
Chapitre V : Experimental section _____		225
1	General experimental procedure _____	227
2	Collection of plant material _____	228
2.1	Collection of <i>Psorospermum</i> species _____	228
2.2	Collection of plant material for vismiones investigation _____	228
3	Extraction _____	229
3.1	Methylene chloride extractions _____	229
3.2	Water extractions _____	230
4	HPLC analysis of the extracts and vismiones quantification _____	231
4.1	HPLC method "Vismione" _____	231
4.2	Calibration curves _____	231
4.3	Vismiones quantification _____	231
5	Partition chromatography general procedure _____	232
5.1	Preparation of the two-phase solvent systems _____	232
5.2	Rapid Estimation of the Partition Coefficients and suitable biphasic system by TLC ____	232
5.3	Estimation of the Partition Coefficients and suitable biphasic system by HPLC _____	232
5.4	Instrumentation _____	232
5.5	TLC monitoring _____	233
6	Vismiones isolation _____	233
6.1	PGE2E fractionation _____	233
6.2	Obtention of PGPAF and PGPO _____	234
6.3	RP18-Flash fractionation of PGPAF _____	234
6.4	FCPE fractionation of PGPO _____	235
6.5	FCPE fractionation of PGPAF _____	237
7	Vismione stability test in organic solvents _____	238
8	Quantum yield measurement _____	238
9	Chiral HPLC Screening _____	239
10	Biological assays _____	240
10.1	<i>In vitro</i> antiplasmodial and cytotoxicity assays conducted in Strasbourg _____	240
10.2	<i>In vitro</i> antiprotozoal assays conducted in Basel _____	240
10.3	<i>In vitro</i> antiprotozoal assays conducted in Toulouse _____	242
11	Synthesis _____	245
12	Natural products _____	269

Bibliographie générale	275
Annexes	295
Annexe 1 : Dihydroanthracénones monomériques	297
Annexe 2 : Vismiones	303
Annexe 3 : Dihydroanthracénones dimériques	307
Annexe 4 : Spectres RMN ^1H et ^{13}C des vismiones isolées de <i>P. glaberrimum</i>	313
Annexe 5: Codification des extraits	335
Annexe 6 : Molécules fréquemment citées dans le manuscrit	337

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie Monsieur le Docteur Bruno DAVID, des laboratoires Pierre Fabre et Monsieur le Professeur Pierre CHAMPY, de l'Université Paris Sud d'avoir accepté la charge de rapporteurs de ce travail. Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Nicolas BLANCHARD, de l'Université de Strasbourg, Monsieur le Professeur Philippe LOISEAU, de l'Université Paris Sud et Monsieur le Professeur Jean-Hugues RENAULT, de l'Université de Reims pour l'attention, l'intérêt et le temps qu'ils ont consacrés à la lecture de ce travail.

Je tiens vivement à remercier ma directrice de thèse, Madame le Docteur Catherine VONTHRON-SÉNÉCHEAU. Un grand merci pour m'avoir accompagné dans mon parcours scientifique depuis déjà un certain nombre d'années maintenant et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail sous ta direction. Merci pour ta grande disponibilité, jusque dans les dernières heures de la rédaction et pour ta bienveillance naturelle.

Je tiens également à remercier chaleureusement mon co-directeur de thèse, Monsieur le Docteur Nicolas GIRARD.

Je suis arrivé en thèse sans n'avoir jamais fait de synthèse organique et tu as fait preuve de beaucoup de patience, d'une grande pédagogie et d'une disponibilité qui m'ont permis d'appréhender cette discipline pour avancer dans ce projet.

Un grand merci à tous les deux pour m'avoir guidé tout au long de ces trois années en me laissant également la possibilité de faire mes propres choix. Merci de m'avoir accordé votre confiance et une autonomie qui m'a permis de découvrir de multiples approches et de vivre ces années de thèse de manière très enrichissante à la fois sur le plan scientifique et humain.

Merci enfin à tous les deux pour votre optimisme et votre soutien dans des moments de doutes.

Merci à Flore NARDELLA pour le temps qu'elle a consacré à travailler sur ma thématique et pour la réalisation d'une partie des tests d'activité biologiques. Merci également à Mélanie pour sa bonne humeur et son énergie communicative.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Marcel HIBERT pour m'avoir accueilli dans son unité ainsi que dans son équipe. Merci pour l'humanité et la vision de la science qu'il a su développer au sein de l'UMR.

J'aimerais remercier Monsieur le Docteur Jean Suffert pour m'avoir accordé une place dans son laboratoire, mais aussi pour les échanges de coins à morilles. Merci à l'ensemble des membres du laboratoire, Gaëlle, Michaela, Angèle, Morgan, Jessie, Sarah, Thomas pour m'avoir gentiment accueilli parmi eux.

Je remercie Monsieur le Docteur Dominique Bonnet pour m'avoir permis l'accès aux équipements de son laboratoire. Merci aussi à Stéphanie RICHÉ et à Pierre-Michel REGENASS, le pro du polarimètre, pour le temps qu'ils ont consacré à me former à l'utilisation des appareils toujours avec une grande disponibilité.

Un grand merci à Monsieur le Docteur Bruno NDJAKOU LENTA pour avoir initié ce projet avec ses travaux de recherche et pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé au Cameroun au sein de son laboratoire. Merci également à Jules pour son amitié et sa disponibilité ; à Monsieur Victor NANA pour les sorties en brousses et les déterminations botaniques ainsi qu'à l'ensemble des doctorants et stagiaires du laboratoire de l'École Normale Supérieure de Yaoundé, Flaure, Aimée, Louis-Marie, Donald, Rosine, Joël et tous les autres, pour m'avoir réservé un excellent accueil et m'avoir aidé, avec leur maîtrise aigüe de la machette, à préparer les échantillons.

Je tiens à remercier une nouvelle fois Monsieur le Professeur Jean-Hugues RENAULT mais cette fois-ci, pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire avec une très grande générosité et une grande disponibilité malgré les nombreuses charges qu'il occupe par ailleurs. Merci également à Madame le Docteur Jane HUBERT pour le temps qu'elle a consacré à me former à la CPC toujours avec une infinie gentillesse. Merci aussi à Sébastien CHOLLET pour ses conseils avisés et pour être resté parfois tard au laboratoire pour me permettre de finir des manip. Merci également aux autres membres du laboratoire, notamment Nicolas, Lila et Charlotte pour leur sympathie et leur accueil.

Merci à l'ensemble des stagiaires qui ont travaillé assidûment sur la thématique et que j'ai eu la chance et le plaisir d'encadrer : Antoine MURBACH, Floriane GSELL, Claire VIT, Nicolas Wasser et Marie-Adèle DUTERTRE.

Merci également à Quentin EBERT qui a participé à des aspects de synthèse au cours de son stage.

Je tenais également à adresser mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce travail de recherche :

- L'équipe de la plateforme d'analyses (PACSI), Pascale BUISINE, Barbara SCHAEFFER, Justine VIEVILLE, Patrick WEHRUNG et Cyril ANTHEAUME.
- L'équipe du Docteur Marcel KAISER à l'Institut Tropical Suisse de Bâle pour la réalisation d'une partie des tests biologiques.
- Monsieur le Professeur Ermano CANDOLFI à l'Institut de Parasitologie et de Pathologies Tropicales de Strasbourg chez qui Flore réalise une autre partie des tests biologiques.

- Monsieur le Docteur Éric DEHARO, de l'unité PharmaDEV à Toulouse pour la réalisation des tests sur *Leishmania infantum*. Merci en particulier à Yenny Lozano, Lucie Paloque et Sandra Bourgeade-Delmas pour la réalisation de ces tests.
- Madame le Docteur Christine SCHAEFFER du Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique à Strasbourg et Benoit Westermann pour la réalisation des analyses de protéomique.
- Monsieur le Professeur Yves MELY pour m'avoir permis de faire la caractérisation de la fluorescence de l'acétylvismione D dans son laboratoire. Merci en particulier à Nicolas HUMBERT pour le temps qu'il a consacré à me former et pour sa sympathie.
- Monsieur Frédéric TOURNAY, responsable des collections du Jardin Botanique de Strasbourg pour la fourniture d'échantillons.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique au sein duquel il fut très agréable de travailler au cours de ces trois années et en particulier à Séverine, Patrick, Stéphanie pour les moments de détente partagés le midi à l'aquarium. Merci également aux amis et aux proches qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse aussi bien dans les moments de joie que dans d'autres, plus difficiles.

Merci à Serge et Marie-Claude pour m'avoir accueilli au calme de leur ferme pour me ressourcer, à Aline et Thierry pour leurs discussions passionnantes autour des plantes et de leurs usages populaires. Merci à Zoé pour m'avoir permis de trouver un petit bout de terrain où m'aérer la tête et que la rédaction de ce manuscrit a probablement retourné à l'état de friche.

Merci à l'association Abribus pour m'avoir permis de me sentir utile quand le quotidien de la science laissait parfois place au doute, une petite pensée en particulier pour Ben, Josette et Steph.

Merci à mes parents pour m'avoir permis d'arriver où je suis et pour le soutien qu'ils m'ont apporté sans toujours forcément bien comprendre, il faut l'avouer, le quotidien d'un thésard. Merci à ma famille, ma sœur, mes grands-parents pour l'amour qu'ils me témoignent.

Merci aux amis pour les bons moments passés ensemble, à Fanny, Mathieu, Marie, Max, Camille, Sylvain, JP, Jefferson, Sophie et toutes celles et ceux que je n'ai pas cités et avec qui j'ai partagé de bons moments.

Liste des abréviations

[α] _D	Pouvoir rotatoire
°C	Degrés Celsius
μ M	Micromolaire
μ w	Micro-ondes
€	Euros
ABq	Système AB sous forme de quadruplet
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMA-1	Apical membrane antigen 1
AmBic	Bicarbonate d'ammonium
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
APG III	Angiosperm phylogeny group III
APTS	Acide p-toluènesulfonique
ARN	Acide ribonucléique
ATPase	Adénosine triphosphatase
BALB/C	Albino laboratory-bred strain mouse
BODIPY	Boron-dipyrrromethene
BRMS	Spectroscopie de masse basse résolution
<i>c</i>	Concentration
C ₅	Pentane
calcd.	Calculated
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD8+	Lymphocyte T exprimant la <i>cluster differentiation 8 glycoprotein</i>
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA)
CDK	Protéines kinases cyclines-dépendantes
CeTOS	Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50
CMH-1	Complexe majeur d'histocompatibilité 1
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNRS	Centre national pour la recherche scientifique
CoA	Coenzyme A
CRK	Cdc-2 related kinases
CSP	Circumsporozoite protein de <i>P. falciparum</i>
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DFT	Density functional theory
DHFR	Dihydrofolate réductase
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DME	Diméthoxyéthane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO-d ₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
DMT	Département de médecine traditionnelle
DXP	1-Désoxy-D-xylulose-5-phosphate
ϵ	Coefficient d'absorption
\varnothing	Cellule
EBA 175	Erythrocyte binding antigen
EMA	European Medicine Agency
EPC	Extraction de partage centrifuge
ESI	Electrospray ionisation
EtOAc	Ethyl acetate
Et	Ethyle
EVCI	Espérance de vie corrigée de l'incapacité
FBS	Fetal bovine serum
Φ_f	Rendement quantique de fluorescence

GIS	Groupement d'intérêt scientifique
gp63	Promastigote surface endopeptidase
GSK	Glaxo Smith Kline
h	Heure
H187	NCI-H187 human lung cancer cell line
H-460	Human lung cancer cell line
HCl conc	HCl concentré
Hept	Heptane
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC semiprep	Semi-preparative high performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
HRP2	Histidine Rich Protein 2
HSCCC	High-speed countercurrent chromatography
IL-6	Interleukine 6
IPA	Alcool isopropylique
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
IS	Indice de sélectivité
<i>J</i>	Constante de couplage
KB	Human 9 KB cancer cell line
K_D	Coefficient de partage
λ	Longueur d'onde
LC	Leishmaniose cutanée
LDA	Lithium diisopropylamide
LeIF	Elongation and initiation factor
LMC	Leishmaniose Muco-Cutanée
LmPOT1	Transporteurs de polyamines de <i>Leishmania</i>
LmST11	Stress inductible protein-1
LOQ	Limite de quantification
LPG	Lipophosphoglycane
LRMS	Low resolution mass spectrometry
LV	Leishmaniose viscérale
maj/min	Majoritaire/minoritaire
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line
Me	Méthyle
MeCN	Acétonitrile
MeOD-d4	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
min	Minute
MMV	Medicine for Malaria Venture
MP	Mobile phase
MSP	Merozoite surface protein
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NDHF	Primary Normal Dermal Human Fibroblasts
MOM	Méthoxyméthyle
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONG	Organisation non gouvernementale
P-388 S/R	Murine leukemia cell line doxorubicine sensitive/resistant
PCR	Polymerase chain reaction
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylèneglycol
Pfs25	Protéine du stade anophélique de <i>P. falciparum</i>
PfSPZ	Sporozoïtes entiers diminués de <i>P. falciparum</i>
Ph	Phényle
PKDL	Post Kala-azar dermal <i>Leishmaniasis</i>
pLDH	Lactate déshydrogénase pan spécifique de <i>Plasmodium</i>
PMM	Peritoneal murine macrophage
ppm	Partie par million
PR	Ptéridine réductase
PR 259 CT1	Extrait quantifié de l'écorce de <i>Nauclea pobeguinii</i>
Ref	Référence
Rf	Rapport frontal

RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPMI	Milieu de culture Roswell Park Memorial Institute
RSA	Relation structure activité
sec-BuLi	<i>sec</i> -butyllithium
SP	Stationary phase
SPE	Solid phase extraction
$t_{1/2}$	Temps de demi-vie
ta ou TA	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétra-n-butylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
tBu	<i>tert</i> -butyle
tBuOK	<i>tert</i> -butanolate de potassium
tert-BuLi	<i>tert</i> -butyllithium
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography
TMEDA	Tétraméthyléthylènediamine
TMS	Triméthylsilane
TNF	Tumor necrosis factor
TOF	Time of flight
t_R	Temps de rétention
TRAP	Thrombospondin related adhesive protein
TS	Thymidilate synthase
TSA	Thiol-specific antioxidant protein
UA	Unités d'aire
uma	Unité de masse atomique
UMR	Unité mixte de recherche
Unistra	Université de Strasbourg
UPS	Université Paul Sabatier
USD	Dollar américain
UV	Ultraviolet
v:v	Volume:volume
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
VLC	<i>Vacuum</i> liquid chromatography
VS	Vanilline sulfurique
WST-8	Cell counting kit 8

Liste des communications orales et posters

Poster Flash

Convergent approaches to find out new leishmanicidal lead molecules

GALLÉ J.B., NDJAKOU-LENTA B., SUFFERT J., GIRARD N., VONTHRON-SENECHEAU C.

Regio Symposium 2013, Mittelwihr, France

Communication orale

Isolation of vismiones from *Psorospermum* species and synthetic approach toward leishmanicidal molecules

J.B. Gallé, B. Ndjakou-Lenta, J. Hubert, J.H. Renault, N. Girard, C.Vonthron-Sénécheau.

Symposium International AFERP-STOLON, juillet 2015, Lyon, France

En préparation

- 1 publication portant sur l'isolement et la caractérisation structurale et biologique des vismiones.

Identification of key structural characteristics of *Psorospermum* sp. prenylated anthranoids involved in leishmanicidal activity.

Gallé JB, Ndjakou-Lenta B, Nardella F, Paloque L, Kaiser M, Deharo E, Girard N, Vonthron-Sénécheau C.

- 1 publication portant sur la synthèse de dérivés de l'émodine et les activités biologiques associées.
- 1 revue sur les dihydroanthracénones isolées de végétaux supérieurs.

Introduction

1 Contexte de la thèse et résultats antérieurs

Les maladies parasitaires sont une cause majeure de mortalité et de morbidité dans le monde. Malheureusement, la chimiothérapie de ces pathologies est majoritairement restreinte à des médicaments comportant des effets indésirables importants, difficiles d'utilisation ou inefficaces face aux résistances développées par les parasites¹. Il est donc urgent de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques aux mécanismes d'action originaux.

Les produits naturels représentent une chimiodiversité importante et jouent un rôle significatif dans la découverte de nouveaux médicaments contre les maladies infectieuses^{2,3}.

Une approche ethnopharmacologique a conduit le Dr Bruno Ndjakou Lenta à étudier plusieurs espèces appartenant au genre *Psorospermum* au cours d'un stage post-doctoral au sein de l'équipe en 2007 (Figure 1).

L'écorce de *Psorospermum glaberrimum* Hochr., une Hypericaceae tropicale, est utilisée en médecine traditionnelle camerounaise pour traiter des cas graves de paludisme⁴. A travers une approche chimiotaxonomique, le Dr Lenta a étendu son étude à 6 espèces appartenant au genre *Psorospermum*. Des extraits bruts ont été réalisés et testés *in vitro* sur des cultures des stades sanguins de *Plasmodium falciparum* K1 et d'amastigotes de *Leishmania donovani*.

Parmi ces espèces, les extraits de *P. glaberrimum*, *P. densipunctatum* et *P. corymbiferum* ont révélé des activités antiparasitaires antileishmaniennes et antiplasmodiales *in vitro* intéressantes.

Les CI_{50} de ces extraits se sont en effet montrées inférieures à 5 $\mu\text{g/mL}$ pour les deux parasites considérés et leurs indices de sélectivité supérieurs à 10 vis-à-vis de cellules musculaires squelettiques de rat (L6) en culture.

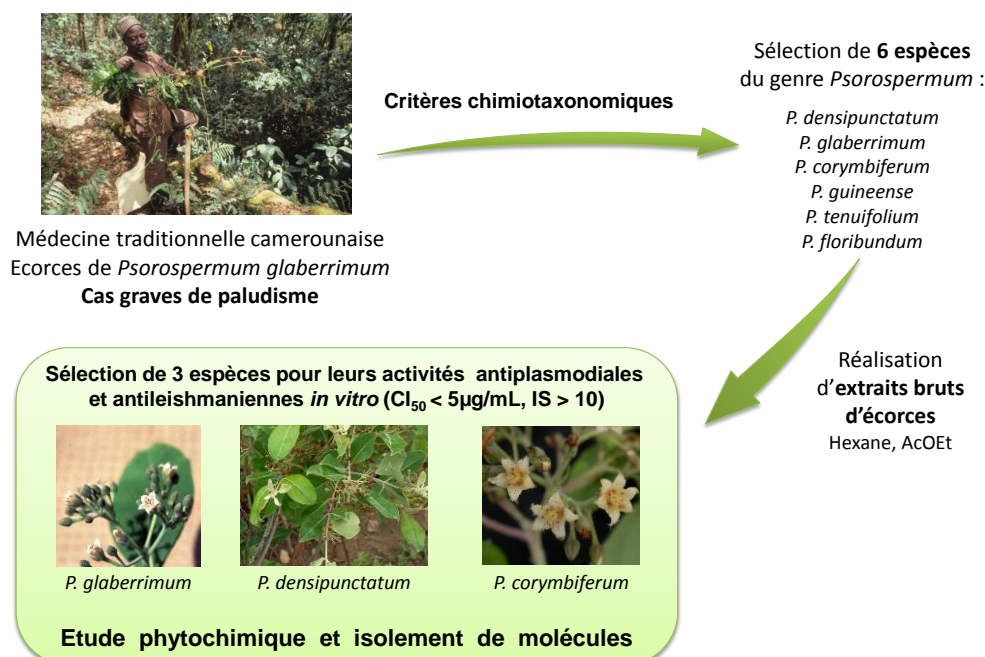
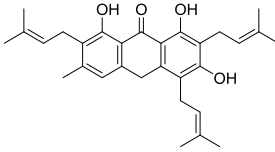
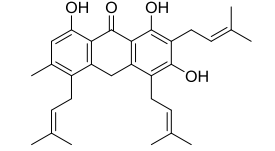
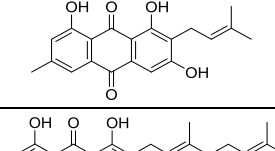
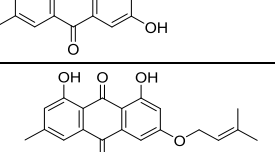
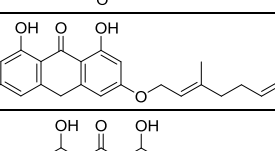
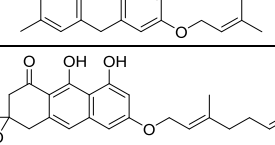
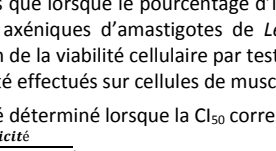
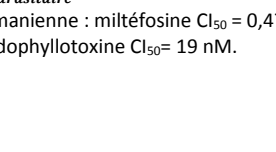


Figure 1 : Sélection des espèces de *Psorospermum* par le Dr Bruno Ndjakou Lenta en vue de l'isolement de principes actifs antiprotozoaires.

Une étude phytochimique a alors été menée sur ces espèces pour isoler et identifier les molécules responsables de l'activité.

Ces molécules appartiennent toutes à la famille des anthranoïdes (Tableau 1).

Tableau 1: Activités antiparasitaires et cytotoxiques *in vitro* des molécules isolées de *Psorospermum glaberrimum* et indices de sélectivité correspondants.

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> Cl ₅₀ (µM) IS	Activité <i>P. falciparum</i> K1 Cl ₅₀ (µM) IS	Cytotoxicité Cellules L6 Cl ₅₀ (µM)
(1)		12.15	0.3	nd
Harungine anthrone (2)		11.89	0.3	nd
2-prénylémodine (3)		nd	0.3	nd
2-géranylémodine (4)		>2	1.7	nd
Madagascine (5)		2.90 25	nd	73
3-Géranyloxyémodine anthrone (6)		0.60 40	nd	24
Madagascine anthrone (7)		0.18 150	6.9 4.3	30
Acétylvismione D (8)		0.09 136	nd	12

Les Cl₅₀ n'ont été déterminées que lorsque le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire était > 50% à 1 µg/mL. Les activités ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *Leishmania donovani* et de stades sanguins de *Plasmodium falciparum* K1, respectivement par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine et d'incorporation de l'hypoxanthine tritiée (n=3). Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat par test à la résazurine (n=3).

L'indice de sélectivité (IS) a été déterminé lorsque la Cl₅₀ correspondant à l'activité antileishmanienne était inférieure à 5 µg/mL.

$$IS = \frac{Cl_{50} \text{ cytotoxicité}}{Cl_{50} \text{ activité antiparasitaire}}$$

Références : activité antileishmanienne : miltéfosine Cl₅₀ = 0,47 µM ; activité antiplasmodiale : chloroquine Cl₅₀ = 0,28 µM ; cytotoxicité : podophylotoxine Cl₅₀ = 19 nM.

Les anthranoïdes substitués sur l'hydroxyle en position 3 par un groupement géranyle ou prényle ont montré les meilleures activités antileishmaniennes (**5**, **6**, **7** et **8**) (Tableau 1). Parmi ceux-ci, l'acétylvismione D (**8**), la seule vismione isolée, présente une activité remarquable contre le genre *Leishmania*.

Les anthrones quant à elles présentent de meilleures activités que les anthraquinones correspondantes.

Les anthrones ou anthraquinones polyprénylées, en particulier lorsque la position 2 est substituée (**1**, **2** et **3**) ont quant à elles montré les meilleures activités antiplasmodiales avec des valeurs submicromolaires.

Ces résultats préliminaires suggéraient :

- une activité distincte sur les 2 parasites en fonction de la position substituée. Les anthranoïdes substitués en position 3 étant plus actifs sur *Leishmania* et ceux substitués en position 2 sont plus actifs contre *Plasmodium*.

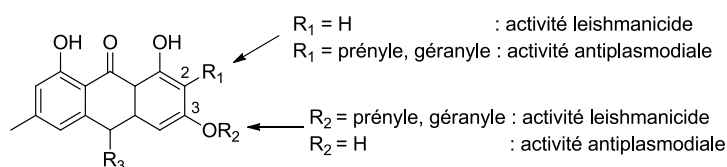


Figure 2 : Relations structure-activité préliminaires découlant des anthranoïdes isolés de *Psorospermum*.

- une activité distincte sur les deux parasites en fonction de la nature de l'anthranoïde. La vismione est plus active contre *Leishmania* que les anthrones testées, elles-mêmes plus actives que les anthraquinones testées.

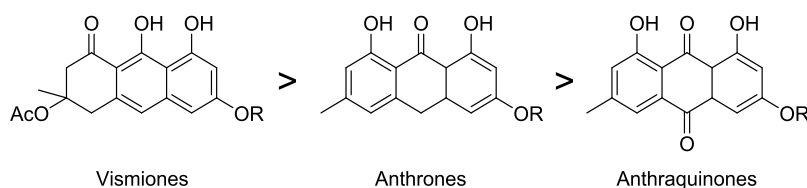


Figure 3 : Activités antileishmaniennes relatives des dérivés anthranoïdes.

2 Objectifs généraux de la thèse

Les résultats préliminaires, montrant l'intérêt des anthranoïdes en tant que molécules antiparasitaires, ont permis de définir les objectifs généraux de la thèse qui consistent à :

- Confirmer et optimiser les activités antiparasitaires *in vitro* de cette famille de molécules en chimie médicinale, par une approche de type relation structure-activité (RSA) ;
- Isoler de nouveaux anthranoïdes naturels analogues de ceux dont les propriétés antiprotozoaires ont été mises en évidence ;
- Contribuer à la compréhension du ou des mécanisme(s) d'action de ces molécules et à l'identification de la (des) cible(s) parasite(s) impliquée(s).

Pour cela, différentes stratégies convergentes ont été menées en parallèle, elles reposent sur le criblage antiparasitaire *in vitro*:

- d'analogues structuraux naturels de vismiones dans plusieurs espèces du genre *Psorospermum*, impliquant l'étude de leur répartition au sein du genre et des différents organes (approche phytochimique) ;
- d'analogues structuraux synthétiques et/ou hémisynthétiques d'anthrones, d'antraquinones et de vismiones actives, auparavant isolées (approche de synthèse organique) ;
- d'analogues structuraux de type anthrones et anthraquinones commerciaux ou disponibles dans différentes chimiothèques.

Dans un premier chapitre, nous présenterons un état de l'art des connaissances sur la botanique, l'ethnobotanique et la phytochimie du genre *Psorospermum* ainsi que sur les différentes dihydroanthracénones isolées à partir de sources végétales. Nous présenterons également les pathologies parasitaires auxquelles ce travail s'intéresse, en précisant leur impact dans le monde et les données épidémiologiques qui s'y rattachent, les symptômes qui les caractérisent et les moyens thérapeutiques utilisés actuellement et en développement.

Un second chapitre sera consacré à l'approche phytochimique mise en œuvre, ainsi que la caractérisation des vismiones isolées du genre *Psorospermum* et leur répartition au sein des différentes espèces étudiées.

Le chapitre trois s'intéressera à la synthèse organique de différents dérivés anthranoïdes, analogues des molécules naturelles ayant montré des activités antiprotozoaires.

Dans un quatrième chapitre, la caractérisation des activités antiprotozoaires de l'ensemble des extraits, molécules isolées et synthétisées dans les chapitres précédents sera présentée.

Enfin, nous proposerons les conclusions et perspectives ouvertes par ces travaux de thèse.

Un cinquième chapitre consacré à la partie expérimentale précèdera les annexes qui reprendront un état des lieux détaillé des dihydroanthracénones monomériques, des vismiones et des dihydroanthracénones dimériques isolées d'espèces végétales, la codification des différents extraits réalisés et les spectres RMN des vismiones isolées de *P. glaberrimum*.

Des tables reprenant les structures des molécules citées fréquemment tout au long du manuscrit sont également incluses à la fin du manuscrit dans un format dépliant afin d'en faciliter la lecture.

Chapitre I :

Généralités et données bibliographiques

1 Présentation du genre *Psorospermum*

1.1 Aspects botaniques

1.1.1 Taxonomie

Le genre *Psorospermum* appartient à la famille des Hypericaceae qui comprend 3 tribus, les Cratoxyleae, les Vismieae et les Hypericeae. La classification de Cronquist (1981) incluait les genres actuels des Hypericaceae dans les Clusiaceae - ou Guttiferae - dans l'ordre des Theales.

La classification phylogénétique (APG III, 2009) a par la suite engendré un certain nombre de modifications en déplaçant les Clusiaceae dans l'ordre des Malpighiales et en séparant les Hypericaceae des Clusiaceae (Figure 4).

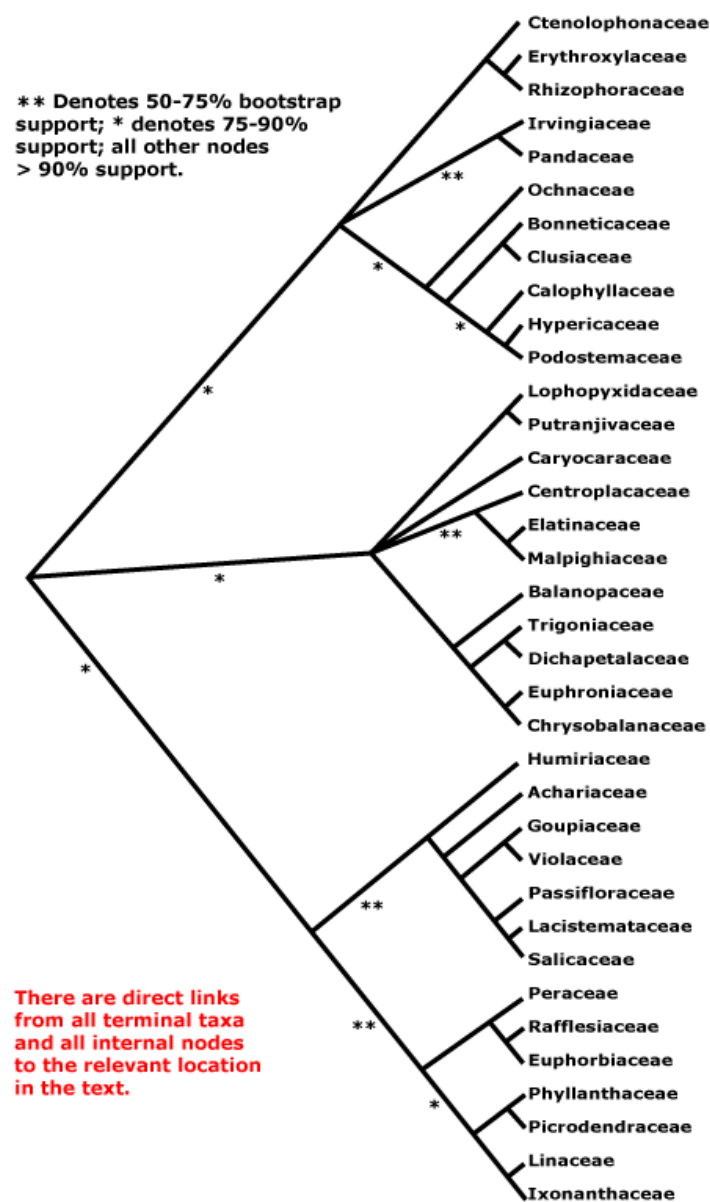


Figure 4 Classification phylogénétique APG III des Malpighiales⁵.

D'après les travaux de Ruhfel *et al.*⁶ portant sur l'analyse phylogénétique de 81 espèces de Clusioideae (Malpighiales), les genres *Vismia* et *Psorospermum* ne sont pas monophylétiques. Les données de biologie moléculaire couplées à des caractères morphologiques indiquent que les Vismieae nécessiteraient de faire l'objet d'une révision taxonomique afin de redéfinir correctement les trois genres - *Harungana*, *Psorospermum*, *Vismia* - appartenant à la tribu. Les auteurs proposent de restreindre le genre *Vismia* aux seules espèces sud-américaines, d'étendre le genre *Harungana* pour intégrer *Vismia rubescens* et d'étendre le genre *Psorospermum* à toutes les autres espèces africaines et malgaches de Vismieae (Figure 5). Néanmoins, des études plus poussées sur le plan moléculaire et morphologique seraient nécessaires avant d'effectuer de telles modifications taxonomiques.

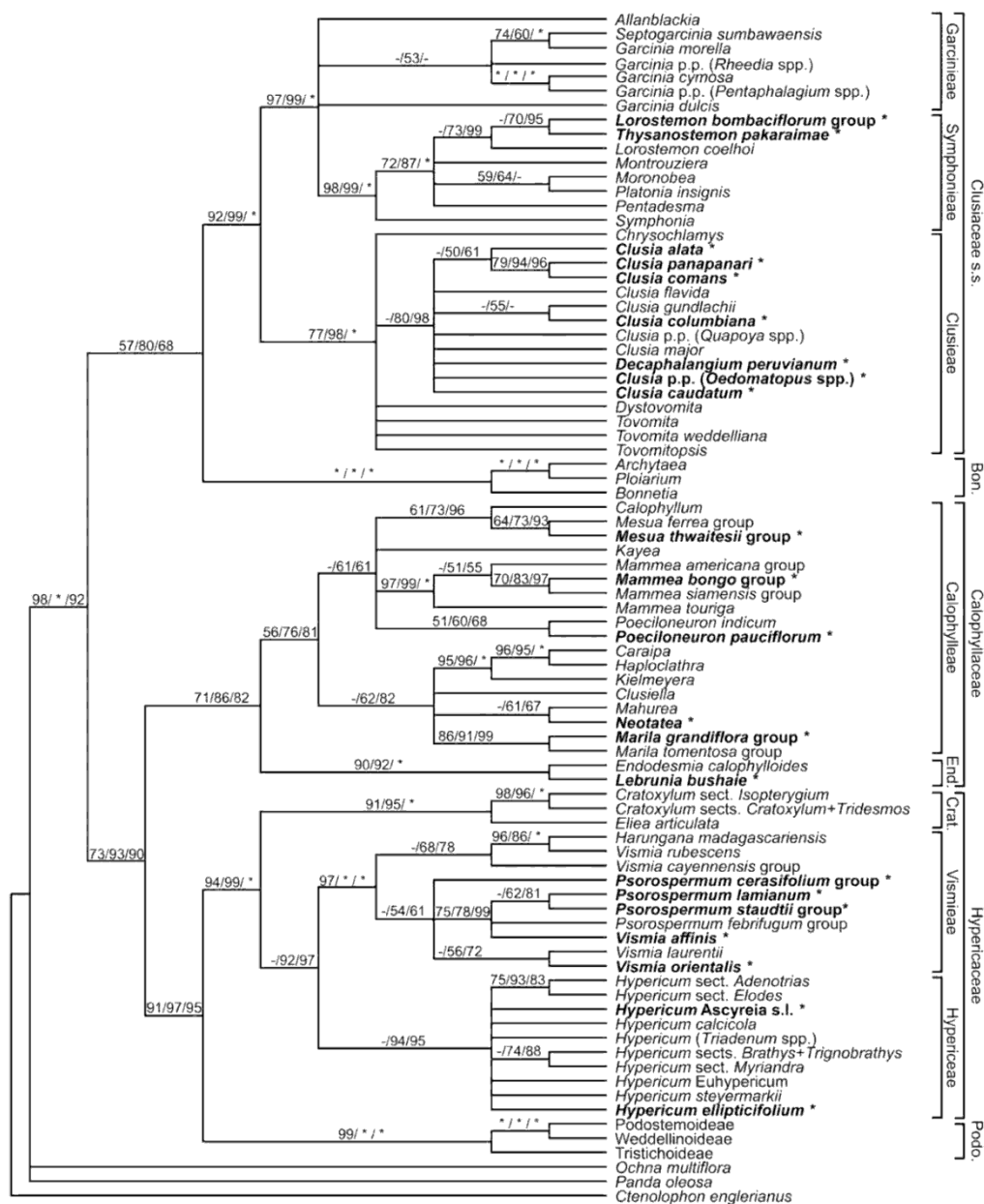


Figure 5 : Arbre phylogénétique des Clusioideae établi par Ruhfel *et al.* sur la base de critères moléculaires et morphologiques⁶.

1.1.2 Description botanique⁷

Les espèces appartenant au genre *Psorospermum* sont des arbres, des arbustes ou des arbrisseaux à feuilles généralement opposées, plus rarement sub-opposées ou alternes et présentant souvent des ponctuations glandulaires sombres et un indumentum de poils étoilés. L'inflorescence se compose d'une panicule terminale couramment en cyme. Les fleurs, hermaphrodites, sont composées de cinq sépales villeux munies de glandes longitudinales linéaires et de cinq pétales villeux à l'intérieur et dotés de glandes longitudinales et de tissus nectarifères enflés à la base. L'androcée est constitué de cinq faisceaux d'étamines comportant un nombre variable d'étamines dans chaque faisceau, les filaments étant soudés sur une bonne partie de leur longueur. Des faisceaux de staminodes, écailleux et charnus, alternent avec les faisceaux d'étamines. Les ovaires, pentaloculés contenant un -parfois deux- ovule par loge ont une placentation basale. Ils sont surmontés de cinq styles libres. Le fruit est une baie. Les graines sont larges et surmontées d'une testa charnue présentant des glandulations ponctuées.

Le genre *Psorospermum* comprend 44 espèces acceptées, 20 taxons correspondant à des synonymes et 53 espèces non résolues sur le plan taxonomique⁸.

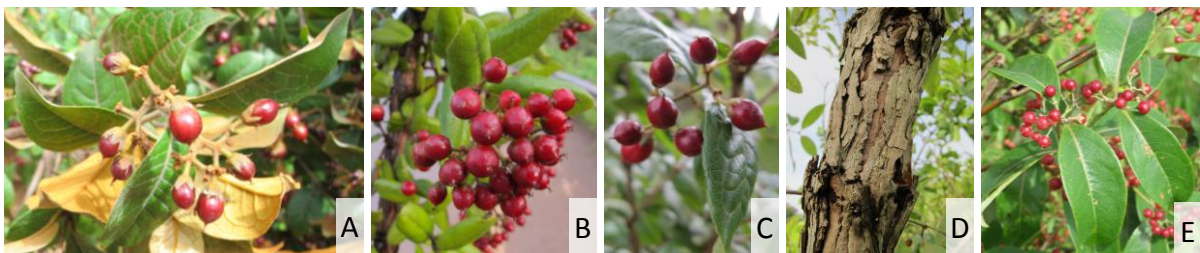


Figure 6 : Détails d'espèces du genre *Psorospermum*. A : *P. aurantiacum* ; B : *P. febrifugum* ; C : *P. guineense* ; D, E : *P. glaberrimum*. © JB Gallé.

1.1.3 Répartition géographique

La répartition géographique établie essentiellement à partir des échantillons d'herbier et des descriptions provenant de diverses flores montre la présence du genre *Psorospermum* sur l'ensemble de l'Afrique tropicale et équatoriale ainsi qu'à Madagascar⁹ (Figure 7).

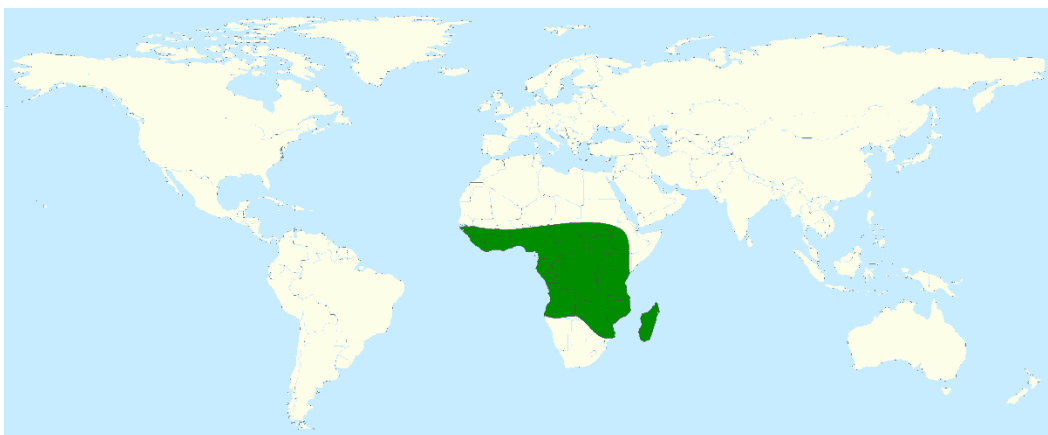


Figure 7 : Répartition des espèces du genre *Psorospermum*. D'après la base de données des plantes d'Afrique⁹.

1.2 Ethnobotanique du genre *Psorospermum*

1.2.1 Dénominations vernaculaires

De multiples enquêtes ethnobotaniques ont permis de recenser les noms vernaculaires utilisés dans les zones où poussent les différentes espèces de *Psorospermum* suivantes :

1.2.1.1 *Psorospermum androsaemifolium* Baker

Madagascar : *tsifady, harongampanihy, fanerana, hazomafaika*¹⁰

1.2.1.2 *Psorospermum corymbiferum* Hochr.

Côte d'Ivoire : *soungalani* (Malinké), *diourasoungali* (Bambara)¹¹

Mali : *karijakuma* (Bambara, Malinké), *sorosow* (Bwa)¹², *cardiacouma*¹³

Afrique de l'Est : *etki diankouma* (Fulbe)¹⁴

1.2.1.3 *Psorospermum febrifugum* Spach

Bénin : *bakanbo, gorinyika* (Bariba), *nagada yménon*¹⁵

RDC : *votolo, votila, nsoko-nsoko, kisoko soko* (Kikongo)¹⁶⁻¹⁸, *kiwotolo, kindia, buti* (Beembe), *masintchiendzie* (Vili), *echoacho* (Tié), *ikubi* (Laali), *otoï* (Mbaamba)¹⁹, *kiso-soka* (Laadi)^{19,20}, *mpere mutie mpere* (Kiyanzi)¹⁷, *muti-a-mper* (Yanzi)²¹, *muhota*²², *umukubagwa* (Kinyarwanda)^{23,24}, *muwotabatwa*²³, *mothabatwa* (Kinande), *umukubagwa* (Kinyarwanda), *mukuta* (Kihema)²⁴

Burundi : *umukubagwa* (Kirundi)²⁵⁻²⁷

Angola : *topota-vaso* (Umubundu)²⁸

Tanzanie : *kitunu* (Zaramo)²⁹, *kitakata, kitakala* (Kimbunga), *kifyifyi* (Kibena), *mkauka, matwendwe* (Kingindo)³⁰, *mkandandogowe* (Shambaa)³¹, *ekiana* (Haya)³², *kalilokabali* (Tongwe)³³, *mwisha* (Ndali)³⁴

Rwanda : *umukubagwa* (Kinyarwanda)³⁵

Ouganda : *ketit ap pras* (Sebei)³¹, *akanzironziro*³⁶, *kanzilo nzilo*³⁷, *emococ* (Ngakarimojong)³⁸

Kenya : *kithinia* (Kamba)³¹, *nangoso*³⁹

Côte d'Ivoire : *wanzokoroma* (Agni)¹¹

Mali : *karijakuma* (Bambara, Malinké), *sorosow* (Bwa)¹²

Malawi : *mdima*⁴⁰

Bénin : *iyun orisa, legun oko*⁴¹

1.2.1.4 *Psorospermum senegalense* Spach

Sénégal : *kotidakuma* (Firdou), *katidakuma* (Fouladou)⁴², *kourkoutoumandi, kounkoutou mandion, kating diankomon* (Socé)⁴³

Nigéria : *kashekaji, kaskawami*⁴⁴

Guinée : *kéti diankouma, kitidiankouma, karédiangouma, karidiakouma* (Malinké), *kéti, kéeti, kéeti diankouma* (Poular), *kobéra-firé* (Soussou)⁴⁵

1.2.2 Usage traditionnel en médecine humaine

Quatre espèces de *Psorospermum* ont été répertoriées dans plusieurs enquêtes ethnobotaniques pour leurs usages thérapeutiques en médecine traditionnelle humaine. Parmi celles-ci, *P. febrifugum* est de loin la plus citée mais *P. corymbiferum*, *P. guineense* et *P. senegalense* sont également employées.

Ces quatre espèces sont largement employées à travers toute l'Afrique tropicale pour le soin des problèmes cutanés. Un nombre important d'enquêtes indique l'utilisation des écorces et des racines, plus rarement des feuilles et des fruits, en application locale, essentiellement sous la forme de cataplasmes, d'onguents réalisés à l'aide d'un corps gras, de poudres ou de lotions. Dans de rares cas le traitement est pris par voie orale. Ces remèdes sont employés pour soigner diverses éruptions cutanées, les ulcérations, les plaies, les problèmes liés à des ectoparasites comme la gale ou des mycoses^{11,12,16,19,22,25-32,35-37,42-44,46-55}.

Les écorces et tiges feuillées sont également employées, généralement en décoction et par voie orale, pour le soin des fièvres, assorties ou non d'une notion de paludisme^{4,11,12,27,36,42,46,47,50,55-57}.

L'utilisation, majoritairement des feuilles mais également des racines, a largement été rapportée pour le traitement des diarrhées^{19-21,25,37,49,50,58} et autres désordres gastro-intestinaux^{12,22,43,53,55}.

Les problèmes respiratoires font également partie des symptômes pour lesquels la médecine traditionnelle a recours à l'usage de *Psorospermum*. Différents organes de la plante sont employés dans cette indication, essentiellement par l'utilisation par voie orale de décoctions^{15,19,28,43,49,51} ou de poudre^{50,58} mais aussi en bains¹⁷ ou en inhalation³⁵.

Ces espèces sont également utilisées dans de plus rares cas pour le soin des problèmes psychiatriques (épilepsie^{12,15}, psychoses^{25,28}, géophagie¹²), rhumatismaux^{41,42,49,58}, gynécologiques^{18,19,25,28,36} et infectieux (syphilis^{30,36,37,42,55,58}, otite^{35,58}).

Des usages magico-religieux de la plante ont également été décrits^{22,42} pour porter chance ou éloigner les mauvais esprits.

1.2.3 Usage vétérinaire

La médecine traditionnelle ne retient pas seulement l'usage de *Psorospermum* pour la médecine humaine, certaines enquêtes indiquent aussi leur utilisation à des fins vétérinaires pour des indications similaires.

Des lotions ou des cataplasmes réalisés à partir de feuilles, de tiges ou de racines provenant des espèces *P. baumii*, *P. corymbiferum* et *P. febrifugum* sont utilisés en Afrique de l'Est et au Mali pour traiter les parasitoses externes du bétail^{13,39,59}.

La décoction des écorces de *P. febrifugum* est également préconisée par voie orale en Afrique centrale et de l'Est pour traiter les cas de dysenteries hémorragiques et prévenir les fausses couches chez les bovins^{23,24,34}.

1.2.4 Médicament Traditionnel Amélioré

Une pommade pour le traitement de l'eczéma et des dermatoses, la Psorospermine, a été développée par le Département de la Médecine Traditionnelle du Mali à partir d'extrait de racine de *Psorospermum guineense* (Figure 8). Un essai clinique en double aveugle sur 110 patients utilisant soit la pommade Psorospermine, soit du beurre de karité a montré une efficacité significative de la pommade Psorospermine⁶⁰.



Figure 8 : Pot de Psorospermine ©DMT Mali.

1.3 Pharmacognosie du genre *Psorospermum*

Dix espèces appartenant au genre *Psorospermum* ont été étudiées à notre connaissance sur le plan phytochimique. Elles renferment une grande variété de métabolites secondaires, en particulier des anthraquinones, anthrones, bianthrones, vismiones, flavonoïdes, xanthones et leurs dérivés O- et C-prénylés, des alcaloïdes, des alcools à longues chaînes, des terpènes, des triterpènes et des tanins. Ces molécules ont notamment montré des activités antibactériennes, antiparasitaires, antifongiques, antivirales, anticancéreuses, antioxydantes et neuroprotectrices.⁶¹

Pour chaque espèce déjà étudiée, une monographie analytique reprend les molécules qui ont été isolées et les activités biologiques mises en évidence.

1.3.1 *Psorospermum adamauense* Engl.

Deux études menées par Tsaffack *et al.*^{62,63}, respectivement sur les extraits au méthanol et à l'aide d'un mélange MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) d'écorce de *P. adamauense* ont permis d'isoler 8 anthraquinones (9-13,3-5), 3 xanthones (14-16), 2 bianthrone (17,18), la 3-géranyloxyemodine anthrone (6), le kenganthranol A (19) et la catéchine (20) (Figure 9).

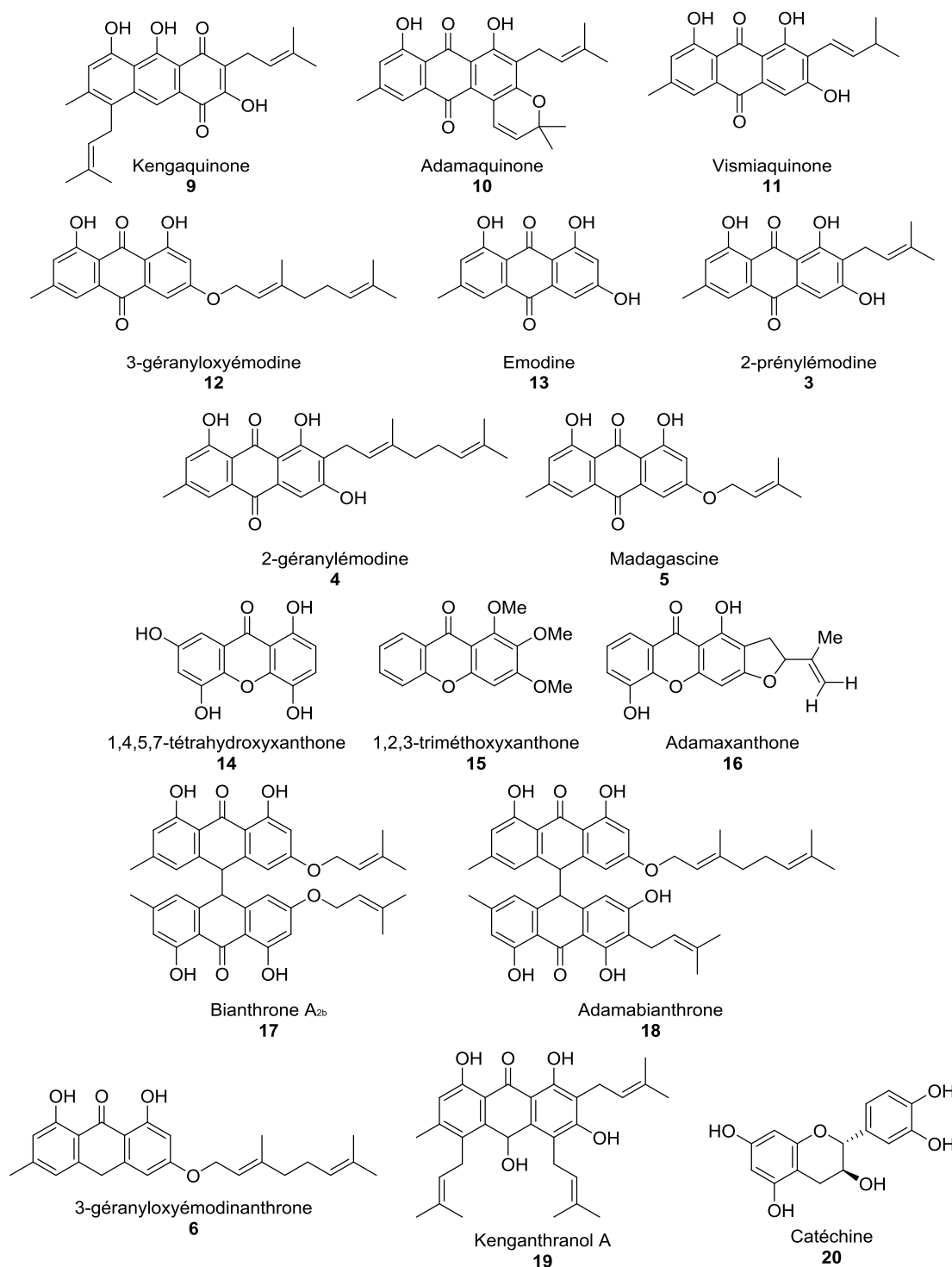


Figure 9 : Molécules isolées de *P. adamauense*.

L'adamabianthrone a été testée sur une variété de micro-organismes, bactéries Gram +, Gram – et levures, sans toutefois montrer d'activité antimicrobienne intéressante (CMI > 25 µM).

La tétrahydroxyxanthone a montré des activités intéressantes pratiquement identiques aux agents antimicrobiens de référence^{62,63}.

1.3.2 *Psorospermum androsaemifolium* Baker

Une première étude phytochimique de l'extrait méthanolique de feuilles de *P. androsaemifolium* a permis d'isoler plusieurs flavonoïdes (**21-24**), la vismiaquinone (**11**), des triterpènes (α et β amyryne **25, 26**) et des alcanes linéaires (hentriacontane **27** et 12-hentriacontanol **28**)¹⁰.

L'extrait au chloroforme de l'écorce a permis d'obtenir les composés (**22, 23, 11**) déjà isolés dans les feuilles ainsi que le physcion (**29**) et l'acétate de lupéol (**30**)⁶⁴ (Figure 10).

Ces composés isolés de *P. androsaemifolium* ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes mais n'ont montré que de faibles activités¹⁰.

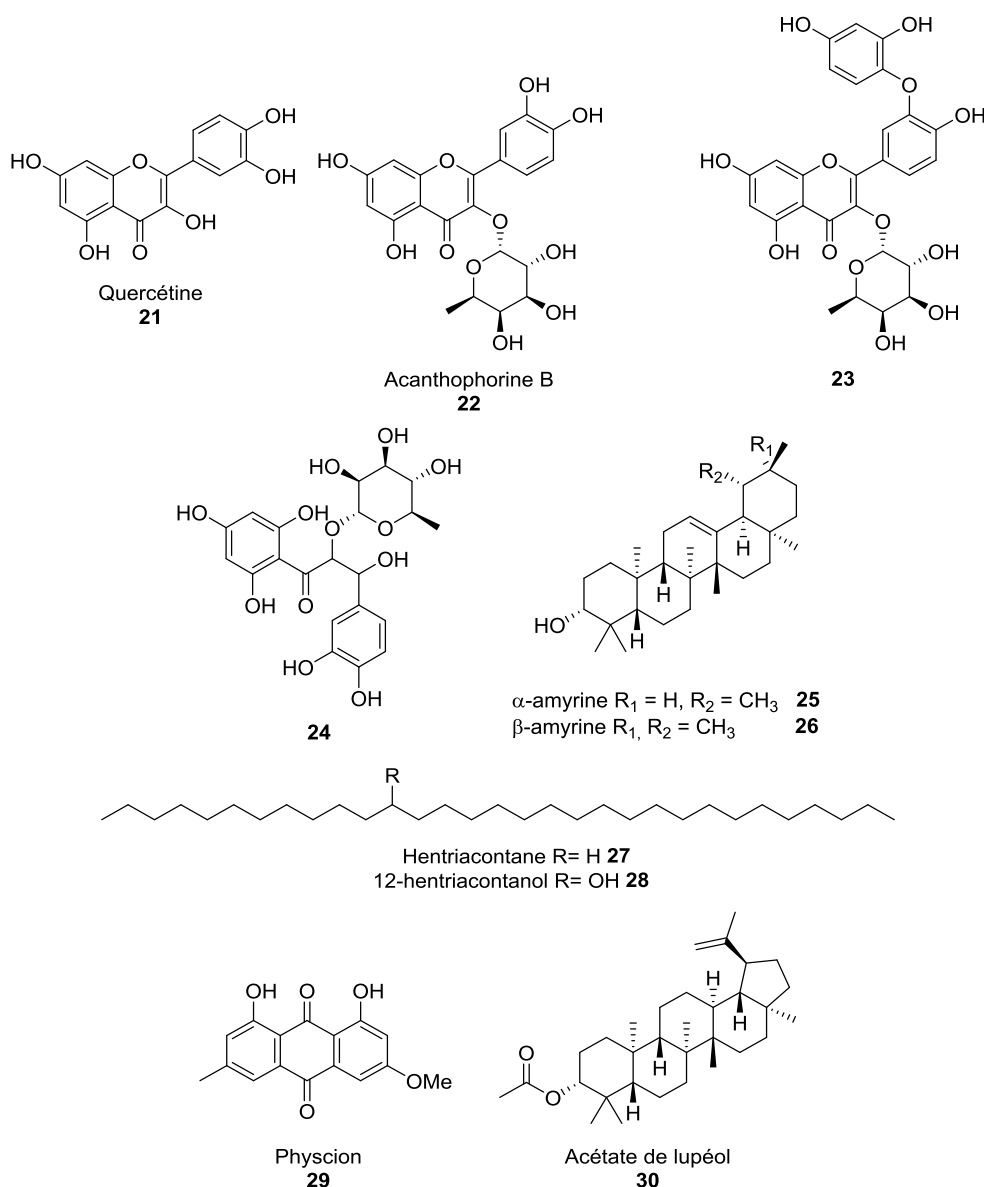


Figure 10 : Molécules isolées de *P. androsaemifolium*.

1.3.3 *Psorospermum aurantiacum* Engl.



Figure 11 : *Psorospermum aurantiacum*. © JB Gallé.

L'extrait hexanique des fruits de *P. aurantiacum* (Figure 11) a permis d'isoler de nombreux métabolites, parmi lesquels des antranoïdes comme la ferruginine B (**31**), la vismine (**32**), la vismione D (**33**), l'harungine anthrone (**2**), le kenganthranol B (**34**), la kenganthraquinone (**9**), la psorantine (**35**) et le kenganthranol E (**36**) ; la 1,7-dihydroxyxanthone (**37**) et des terpènes comme le paradisiol (**38**) et la friedelan-3one (**39**)⁶⁵.

L'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles a permis d'isoler différents antranoïdes [physcion (**29**), 3-géranxyloxyémidine (**12**), kenganthranol B (**34**), vismiaquinone (**11**)] et de l'octacosanol (**40**)⁶⁶.

L'extrait à l'acétate d'éthyle de la plante entière a permis d'isoler d'autres antranoïdes tels que la 3-géranxyloxyémidinanthrone (**6**), la 2-géranxyloxyémidine (**4**), la bianthrone A1 (**41**), les vismiones D (**33**) et M (**42**) et la vismiaquinone C (**43**)⁶⁷ (Figure 12).

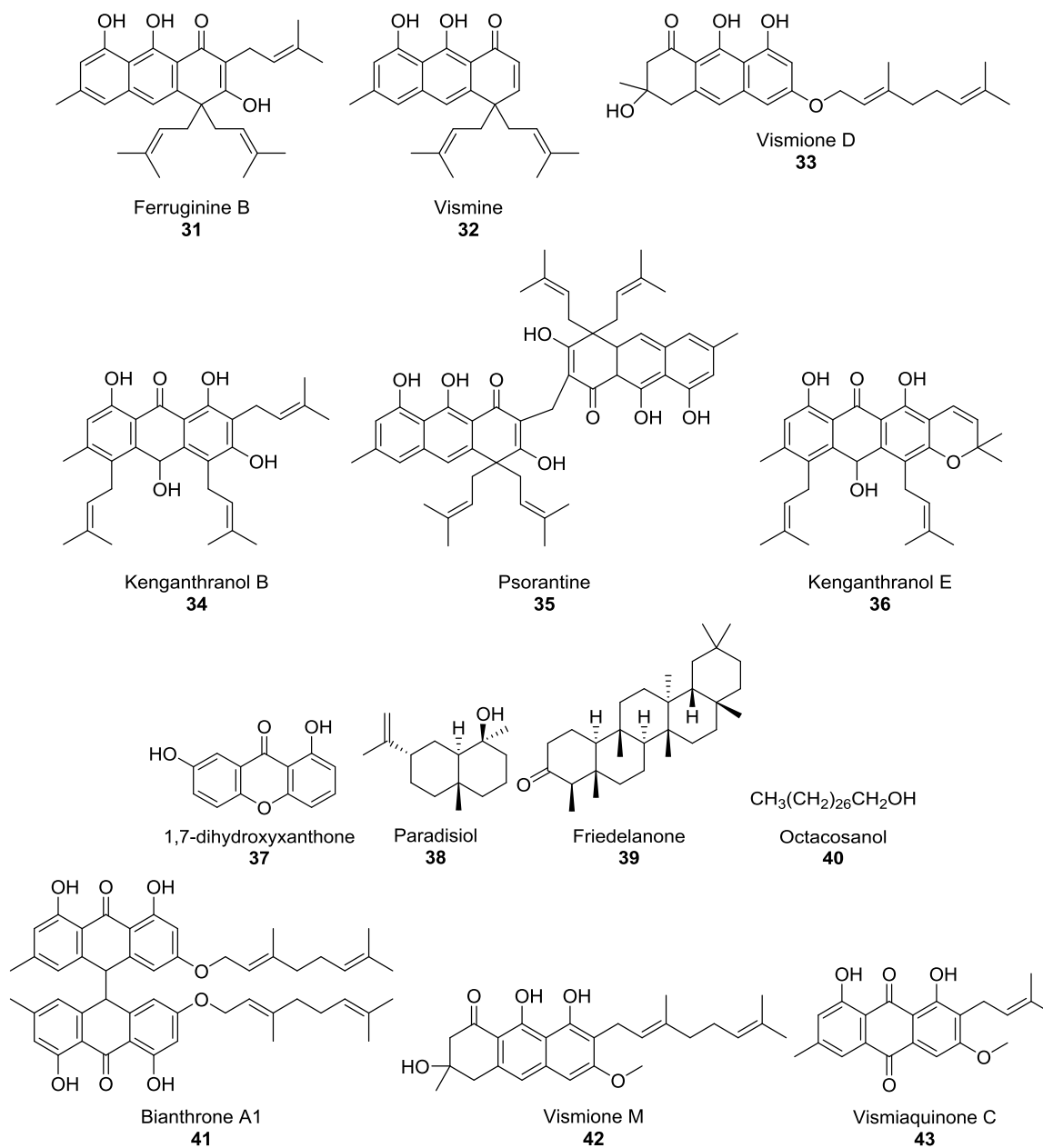


Figure 12 : Molécule isolées de *P. aurantiacum*.

Parmi ces composés, la vismiaquinone a montré une activité antibactérienne modérée avec une CMI de 24 μM contre *Klebsiella pneumoniae*⁶⁶.

1.3.4 *Psorospermum corymbiferum* Hochr.

L'étude de l'extrait des racines de *P. corymbiferum* a permis d'en isoler l'acétylvismione F (**44**) et la 2-géranylémidine anthrone (**45**)⁶⁸ ainsi que la bianthrone A_{2b} (**17**), la danthrone (**46**) et la diosgénine (**47**)⁶⁹ (Figure 13).

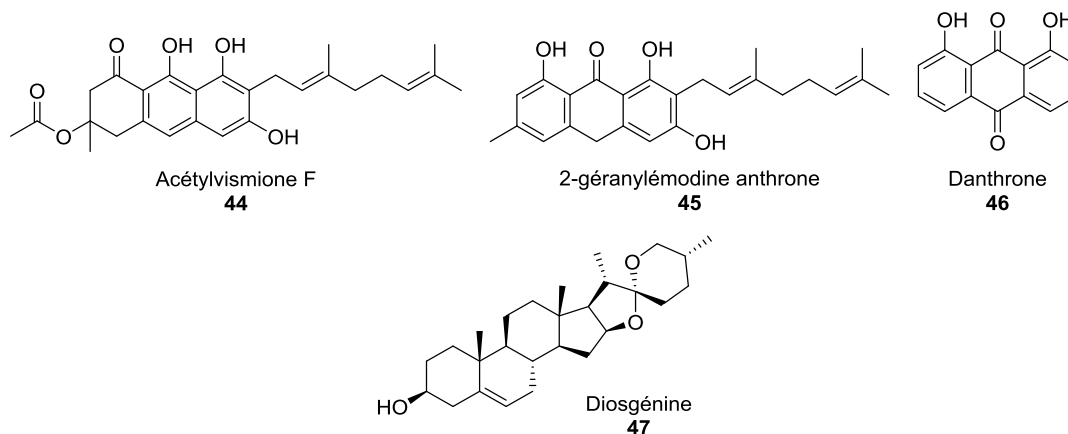


Figure 13 : Molécules isolées de *P. corymbiferum*.

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *P. corymbiferum* contient comme composants majoritaires le β -caryophyllène (46.8%), l' α -cadinène (3.4%), le limonène (3.9%) et l'oxyde de caryophyllène (3.0%)⁷⁰.

La diosgénine isolée de *P. corymbiferum* a montré une activité antifongique avec une CMI de l'ordre de 40 μ M sur différents isolats cliniques de *Candida*⁶⁹.

1.3.5 *Psorospermum febrifugum* Spach

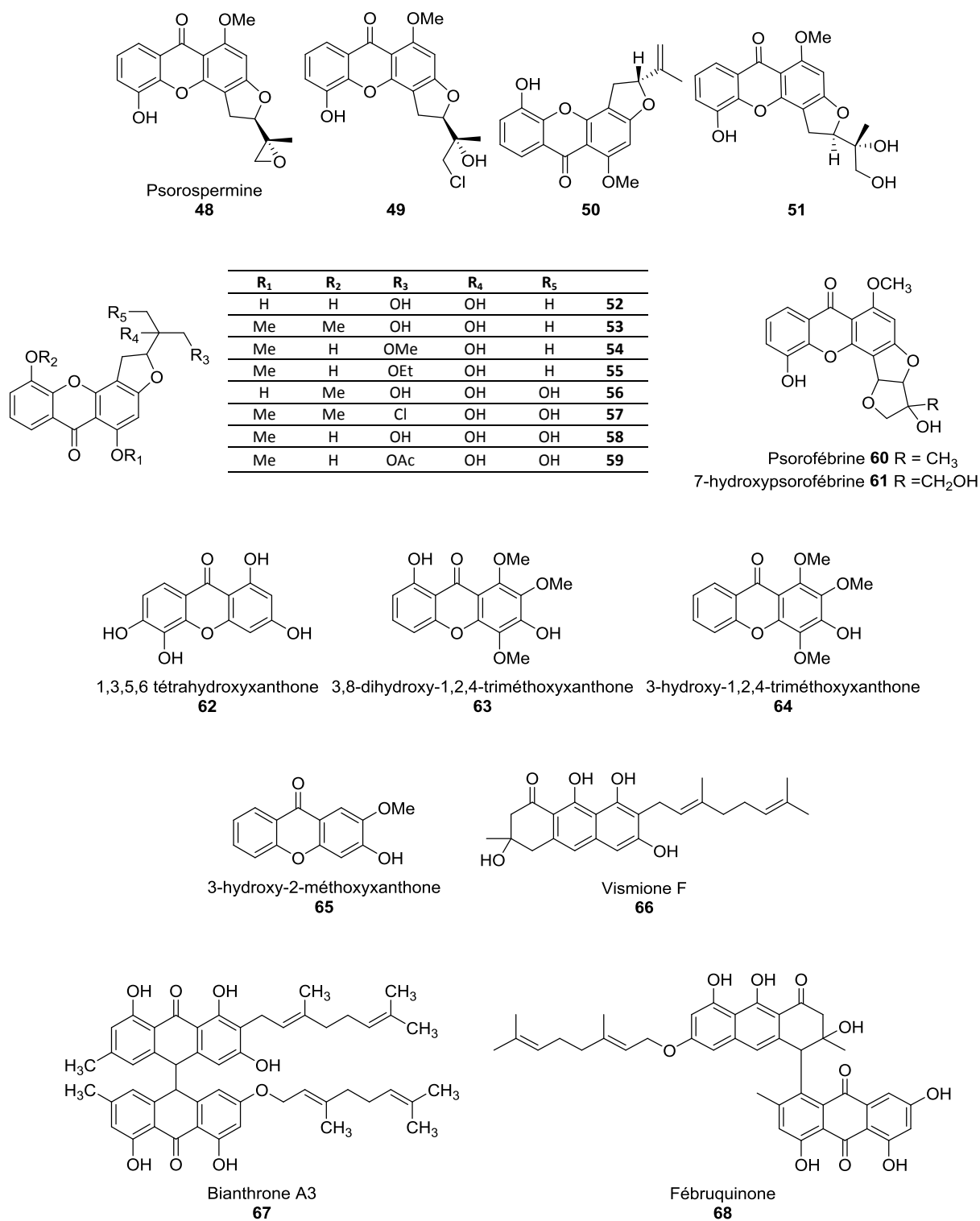


Figure 14 : *Psorospermum febrifugum*. © JB Gallé.

L'espèce *P. febrifugum* (Figure 14) est de loin l'espèce qui a été la plus étudiée.

Les racines renferment des xanthones [psorospermine (**48**) et ses nombreux dérivés (**49-59**), psorofébrine (**60**), 5-hydroxypsorofébrine (**61**), ainsi que des xanthones plus simples, 1,3,5,6 tétrahydroxyxanthone (**62**), 3,8-dihydroxy-1,2,4-triméthoxyxanthone (**63**), 3-hydroxy-1,2,4-triméthoxyxanthone (**64**), 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (**65**)]⁷¹⁻⁷⁵ ainsi que de la 3-géranxyloxyémidine anthrone (**6**)⁷⁶, des vismiones [D (**33**), F (**66**), M (**42**) et acétylvismione D (**8**)]⁷⁷, des bianthrone [A₁ (**41**) et A₃ (**67**)], de la fébruquinone (**68**)⁶², des anthraquinones [3-géranxyloxyémidine (**12**)]^{78,79}, des xantholignoïdes [kielcorine (**69**), cadensine D (**70**), isocadensine D (**71**), isocadensine D monoacétate (**72**), cadensine F (**73**), 6-hydroxycadensine F (**74**), cadensine G (**75**)]⁸⁰.

Les baies contiennent des anthraquinones [3-géranxyloxyémidine (**12**), 2-prénylémodine (**3**), chrysophanol (**76**), ferruginine B (**31**)] et des vismiones [A (**77**), C (**78**), D (**33**) et E (**79**)]⁸¹ (Figure 15).

Figure 15: Molécules isolées de *P. febrifugum*.

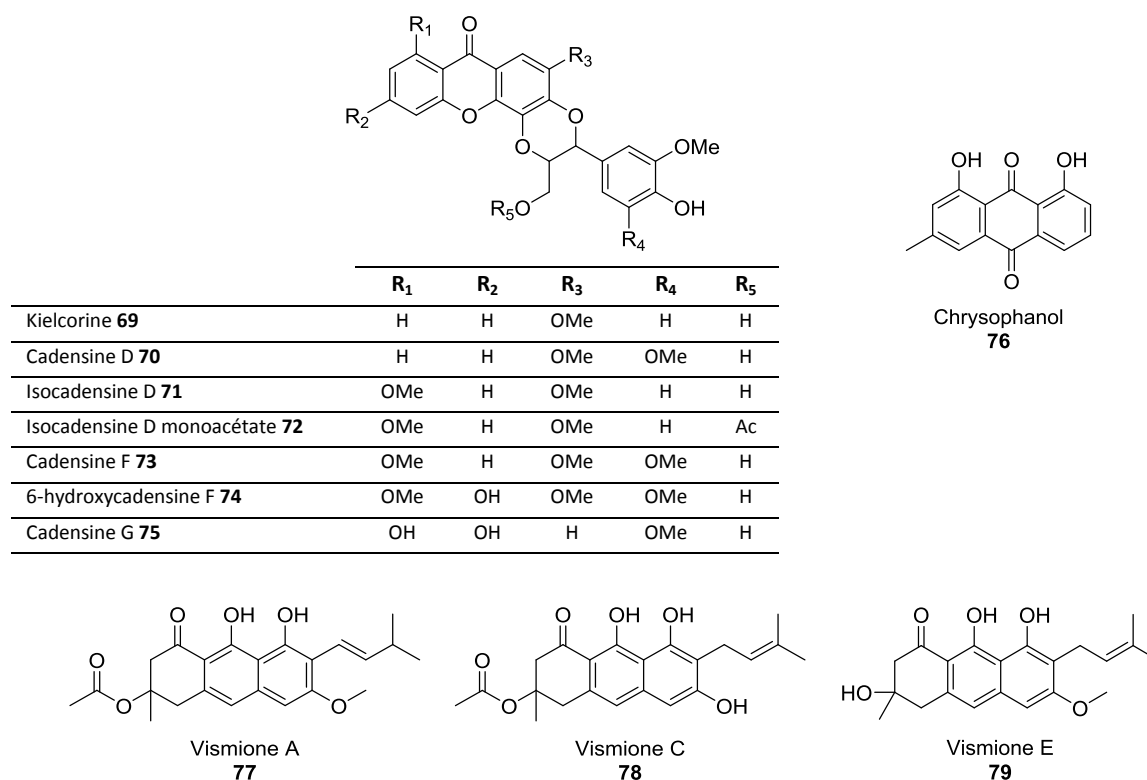


Figure 15 (suite) : Molécules isolées de *P. febrifugum*.

La psorospermine (**48**) et ses dérivés ont montré des activités cytotoxiques intéressantes vis-à-vis de plusieurs lignées cancéreuses avec des Cl_{50} inférieures au nanomolaire dans certains cas⁸². La 3-géranyloxyémidine anthrone (**6**) a elle aussi montré des activités cytotoxiques bien que moins prononcées⁷⁶.

1.3.6 *Psorospermum glaberrimum* Hochr.

L'écorce des racines de *P. glaberrimum* contient des anthraquinones [3-géranxyloxyémidine (**12**), 2-prénylémodine (**3**), émoline (**13**)] et des vismiones [C (**78**), D (**33**), F (**66**) et G (**80**)]⁶⁸.

L'écorce du tronc a permis d'isoler de multiples anthranoïdes : anthraquinones [3-géranxyloxyémidine (**12**), madagascine (**5**), 2-géranxyloxyémidine (**4**), 2-prénylémodine (**3**), émoline (**13**)] des anthrones [3-géranxyloxyémidine anthrone (**6**), madagascine anthrone (**7**)], des bianthrone [glabérianthrone (**81**), bianthrone A₁ (**41**) et A_{2b} (**17**)], la vismione D (**33**) et des triterpènes [friedelan-3-one (**39**), friedelan-3-ol (**82**), acide bétulinique (**83**)]⁸³.

Les fruits contiennent des dérivés lactoniques d'antranoïdes prénylés, les psorolactones A (**84**) et B (**85**) ; des anthraquinones [madagascine (**5**), physcion (**29**), 2-géranxyloxyémidine (**4**), 2-prénylémodine (**3**)], des anthrones [3-O-géranxyloxyémidine anthrone (**6**), 2-prénylphyscion anthrone (**86**)], des vismiones [D (**33**), C (**78**), E (**79**), F (**66**), acétylvismione F (**44**), 6-O-prénylvismione E (**87**)], une dihydroanthracénone, la 6-acétyltorosachrysonne (**88**) et de l'homoferrugine B (**89**)^{84,85} (Figure 16).

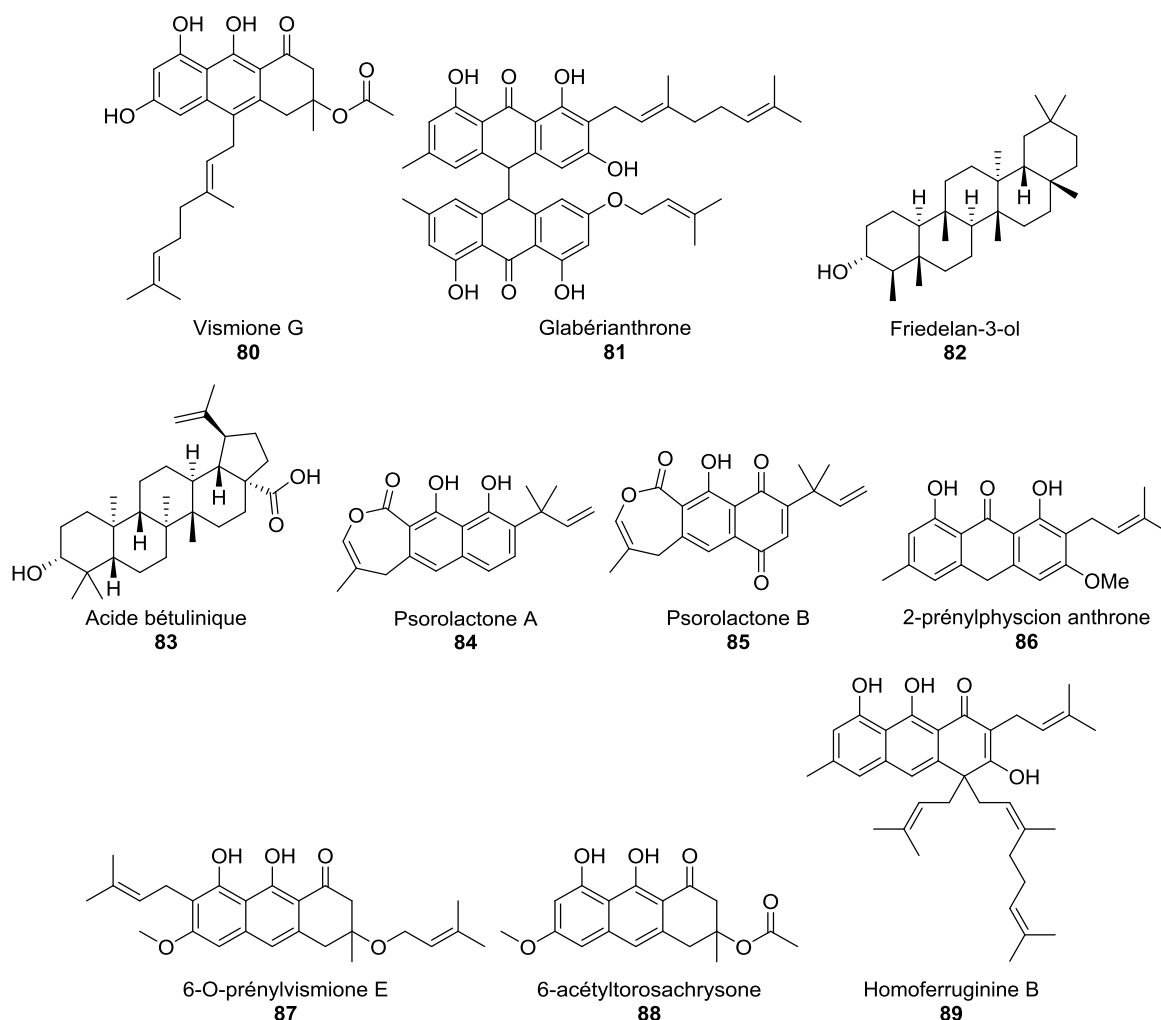


Figure 16 : Molécules isolées de *P. glaberrimum*.

L'acétylvismione D (**8**), la 3-géranxyloxyémidine (**12**) et la madagascine anthrone (**7**) isolées de l'écorce ont montré des activités antiplasmodiales de 0,12 ; 1,68 et 1,98 μ M respectivement⁸³.

1.3.7 *Psorospermum guineense* Hochr.



Figure 17 : *Psorospermum guineense*. © JB Gallé.

Aucune étude phytochimique de *P. guineense* (Figure 17) n'a été effectuée mais des extraits de différentes polarités de feuilles et d'écorces de racines ont été étudiés de façon préliminaire pour leurs propriétés antileishmaniennes vis-à-vis de *L. tropica*, une espèce responsable de manifestations cutanées. Les extraits dichlorométhaniques ont montré de bonnes activités antileishmaniennes sur les formes promastigotes, amastigotes et amastigotes intramacrophagiques avec respectivement 3,5 ; 14 et 80 % de survie du parasite à la concentration de 35 µg/mL. Une légère cytotoxicité vis-à-vis des macrophages a également été observée.⁵⁴

1.3.8 *Psorospermum molluscum* Hochr.

Cette espèce de *Psorospermum* est présente à Madagascar.

Un criblage réalisé par Leet *et al.*⁸⁶ sur les extraits obtenus à partir d'un mélange dichlorométhane-méthanol des écorces et des racines a montré des activités cytotoxiques allant de 0,2 à 4 µg/mL sur un panel de cellules cancéreuses mammifères.

Un fractionnement bioguidé a conduit à l'isolement de cinq xanthones.

De l'écorce ont été isolées la psoroxanthine chlorhydrate (**90**), la 2-hydroxyxanthone (**91**) et la 1,7-dihydroxyxanthone (**37**). Des racines ont été isolées la 2-hydroxyxanthone (**91**), la 8-(4'-hydroxyprényl)-1,7-dihydroxyxanthone (**92**) et la psoroxanthine (**93**) (Figure 18).

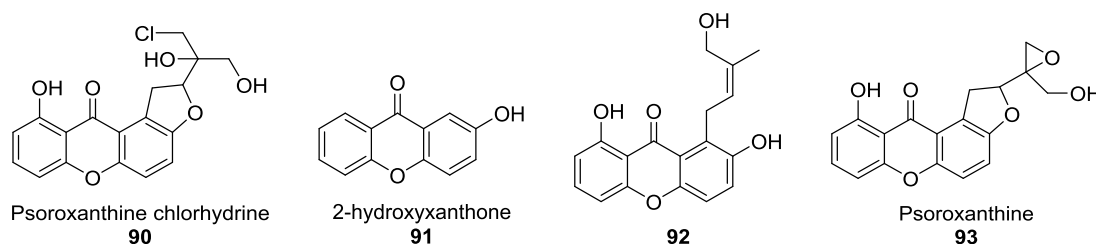


Figure 18 : Molécules isolées de *P. molluscum*.

Les deux dérivés de la psoroxanthine ont été testés pour leurs activités cytotoxiques sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, montrant de bonnes CI_{50} allant de 2 µM à 4 nM en fonction du type cellulaire considéré⁸⁶.

1.3.9 *Psorospermum senegalense* Spach

Aucune étude phytochimique n'a été réalisée à ce jour sur *P. senegalense*.

Des extraits bruts ont cependant été testés pour leur activités antiépileptiques et antiplasmodiales d'après les usages de la plante en médecine traditionnelle.

L'extrait éthanolique de racines a montré des effets encourageants sur des modèles *in vitro* d'épilepsie mais n'a pas démontré d'effet significatif chez la souris⁸⁷.

L'extrait dichlorométhanique de feuilles a montré une activité antiplasmodiale intéressante avec une CI_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$ sans montrer de signe de toxicité sur des fibroblastes humains⁵⁷.

1.3.10 *Psorospermum tenuifolium* Kotschy

L'extrait de racines de *P. tenuifolium* a révélé la présence de bianthrone [bianthrone A₁ (**41**), A_{2b} (**17**)], de vismiones [vismiones D (**33**), C (**78**), G (**80**), H (**94**), F (**66**) ; acétylvismiones D (**8**), K (**95**), F (**44**), désacétylvismione G (**96**) et H (**97**)], d'anthrones [2-géranylémidine anthrone (**45**), madagascine anthrone (**7**)], d'anthraquinones [2-géranylémidine (**4**), 2-prénylémidine (**3**), émoline (**13**), madagascine (**5**), 3-géranyloxyémoline (**12**), 2-(18,19-dihydro-19-hydroxygéranyl)émoline (**98**), 3-(18,19-dihydro-19-hydroxygéranyl)émoline (**99**)], d'un anthranol [10-prénylémidine anthran-10-ol (**100**)] et de triterpènes [bétuline (**101**), friedeline (**102**)]^{88,89} (Figure 19).

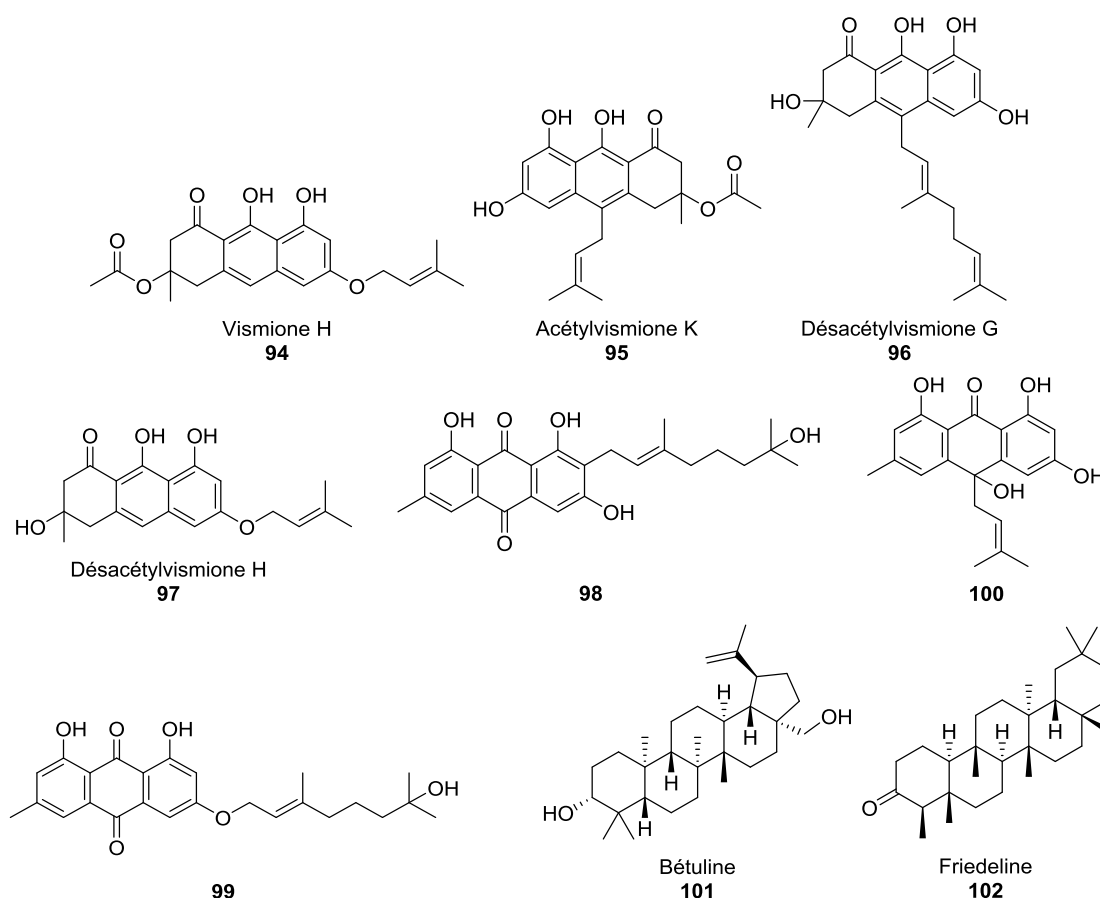


Figure 19 : Molécules isolées de *P. tenuifolium*.

La composition de l'huile essentielle de différentes parties de *P. tenuifolium* a également été étudiée. L'huile essentielle des feuilles renferme notamment comme composants majoritaires le β -caryophyllène (25 %), le 3-carène (23 %), le myrcène (7 %), le limonène (6 %), l'oxyde de caryophyllène (4 %) et le linalol (4 %). L'huile essentielle provenant des racines contient quant à elle essentiellement de l' α et du β -pinène (28 et 15 %), du limonène (10 %), du myrcène (7 %), du cymène (6 %) et du thujène (6 %).

L'huile essentielle extraite des feuilles a montré une activité anti-inflammatoire intéressante sur un modèle animal⁹⁰.

1.3.11 Discussion

La phytochimie du genre *Psorospermum* a déjà été relativement bien étudiée depuis la fin des années 1970. Les fractionnements réalisés sur un certain nombre d'espèces, parmi lesquelles *P. febrifugum* a de loin été la plus explorée. Ils ont révélé l'importance quantitative des dérivés anthranoïdes et xanthonoïdes dans le genre. Ces dérivés subissent en outre une variété de modifications, notamment des C- et O- prénylations et géranylations sur diverses positions, qui augmentent le nombre et la diversité des structures retrouvées au sein du genre.

Ce sont essentiellement les écorces et les racines, et dans une moindre mesure les fruits, qui ont été étudiés et qui se sont avérés riches en anthranoïdes et xanthonoïdes.

Concernant leurs activités biologiques, ces structures ont essentiellement été étudiées pour leur cytotoxicité qui s'est avérée intéressante vis-à-vis d'un certain nombre de lignées cancéreuses^{76,82,86}.

Les activités antiparasitaires ont été peu évaluées et majoritairement vis-à-vis de *Plasmodium*.

Ainsi, un extrait dichlorométhanique de feuilles de *P. senegalense* a montré une bonne activité antiplasmodiale⁵⁷, tout comme certains anthranoïdes isolés de *P. glaberrimum* (Tableau 1, p 4, réf 83).

Par ailleurs, plusieurs vismiones, retrouvées chez *Psorospermum* mais isolées à partir d'autres genres et étudiées pour leurs activités antiprotozoaires, ont également montré des activités antiplasmodiales intéressantes (paragraphe 2.2.2.2, p 36).

En revanche, concernant les activités antileishmaniennes, la seule activité rapportée vis-à-vis d'une souche de *Leishmania* à tropisme cutané date de 2007, pour un extrait dichlorométhanique d'écorces de *P. guineense*⁵⁴. Cette activité n'a cependant pas fait l'objet d'une caractérisation précise et n'a pas conduit par la suite à l'isolement et à la caractérisation des molécules susceptibles d'être à l'origine de l'activité observée.

Il apparaît que les données ethnopharmacologiques (paragraphe 1.2.2 et 1.2.3, p 13), dont certaines ont poussé à étudier le genre, viennent appuyer l'intérêt d'investiguer les propriétés antiprotozoaires des métabolites en présence. Si certains usages traditionnels suggèrent très fortement l'intérêt du genre *Psorospermum* dans le traitement du paludisme (utilisation contre les fièvres et certains désordres gastro-intestinaux), d'autres, et notamment le large recours aux écorces et aux racines pour le traitement de problèmes cutanés, font écho aux manifestations provoquées par la leishmaniose cutanée (ulcérations, plaies).

En conclusion, le genre *Psorospermum* offre donc une large diversité de structures de nature anthranoïde qui restent encore à étudier pour leurs activités antiprotozoaires, à la fois à la lumière des résultats antérieurs obtenus au laboratoire (paragraphe 1, p 3), des usages traditionnels étendus de la plante et du peu d'investigations existantes des activités antiparasitaires de ce type de composés.

2 Les dihydroanthracénones

Les dihydroanthracénones, aussi qualifiées de tétrahydroanthraquinones ou de pré-anthraquinones sont des précurseurs des anthrones et anthraquinones retrouvées dans certains macro et micromycètes et végétaux supérieurs. Elles sont caractérisées par une structure tricyclique de base 3,4-dihydroanthracèn-1(2H)-one (**103**) (Figure 20) sur laquelle sont présents différents substituants.

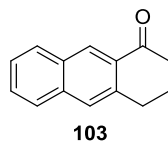


Figure 20 : Structure de base des dihydroanthracénones.

Les dihydroanthracénones présentes chez les macromycètes ont largement été étudiées par Mc Gill et Steglich et leurs équipes, et ont fait l'objet de plusieurs revues portant essentiellement sur la description de nouvelles structures et de leur intérêt sur le plan taxonomique⁹¹⁻⁹⁵.

Nous nous intéresserons ici aux dihydroanthracénones monomériques et dimériques isolées de végétaux supérieurs ainsi qu'aux activités biologiques qui leur ont été associées.

Si les dihydroanthracénones ont été isolées d'un certain nombre d'espèces végétales, il est fort probable qu'elles soient présentes dans d'autres espèces contenant des dérivés de nature anthranoïde mais que leur réactivité n'ait pas permis de les isoler avec les approches phytochimiques classiques. Certaines espèces renferment toutefois ces molécules en quantités relativement importantes sans que leur utilité pour la plante n'ait pu être déterminée.

2.1 Dihydroanthracénones monomériques

Des dihydroanthracénones monomériques ont été identifiées dans plusieurs familles botaniques. Des études phytochimiques plus ou moins récentes ont permis d'isoler de telles structures au sein de Xanthorrhoeaceae, de Fabaceae et d'Hypericaceae et, dans une moindre mesure de Rubiaceae, d'Orchidaceae, d'Ochnaceae et de Rhamnaceae. Les dihydroanthracénones isolées d'Hypericaceae et d'Ochnaceae, presque exclusivement C ou O-prénylées ou géranylées ont été regroupées au sein de la sous-famille des vismionies qui sera détaillée au paragraphe suivant.

Les dihydroanthracénones isolées des autres familles sont, à notre connaissance, propres à chacune des familles considérées. Ceci à l'exception de la torosachrysonne (**121**) isolée de plusieurs espèces du genre *Senna* (Fabaceae)⁹⁶⁻¹⁰³ et de l'espèce *Aliorhamnus vaginata* (Rhamnaceae), bien que les configurations absolues du carbone asymétrique semblent inversées¹⁰⁴.

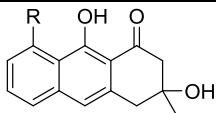
Ainsi, si certaines structures peuvent être présentes dans plusieurs genres botaniques proches au sein d'une même famille, ces dernières ne se retrouvent pas dans les autres familles botaniques, suggérant que chaque famille possède des voies et des enzymes de biosynthèse propres.

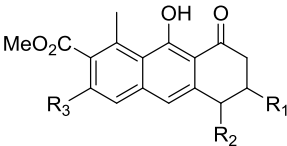
Le paragraphe suivant recense les différentes structures de dihydroanthracénones isolées dans chaque famille. Un tableau plus détaillé, reprenant les espèces et parties de plantes dans lesquelles ont été isolées les différentes structures, constitue l'Annexe 1, p 297.

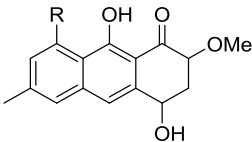
2.1.1 Familles d'intérêt et structures

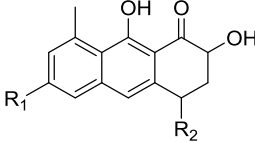
2.1.1.1 Xanthorrhoeaceae

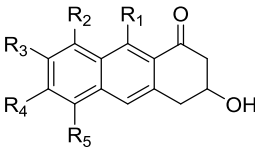
Les dihydroanthracénones présentes chez les Xanthorrhoeaceae (Figure 21) ont fait l'objet de nombreuses études, essentiellement en ce qui concerne le rôle chimiotaxonomique de ces molécules. Au sein de la famille, les molécules ont été essentiellement isolées du genre *Aloe* mais également des genres *Lomatophyllum*, *Kniphofia*, *Gasteria*, *Eremurus* et *Asphodelus* (références en Annexe 1, p 297).

		R	Ref
Préchrysophanol 104	OH	105	
Aloéchrysonne 105	OMe	106-109	

				
	R ₁	R ₂	R ₃	Ref
Aloésaponol I 106	OH	H	OH	105,108-114
Gastériacénone C 107	H	OH	OH	115
Aloésaponol I glucoside 108	OH	H	O-β-D-glucose	116

		R	Ref
Aloésaponol IV 109	OH	117	
Aloésaponol IV glucoside 110	O-β-D-glucose	118	

			
	R ₁	R ₂	Ref
Gastériacénone A 111	OH	OH	115
Gastériacénone B 112	OMe	H	115

						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Ref
Aloésaponol II 113	OH	Me	H	OH	H	105,108,119-122
Aloébarbendol 114	Me	H	OH	H	OH	107,123
6-méthylaloésaponol II 115	OH	Me	H	OMe	H	114
Aloésaponol II glucoside 116	OH	Me	H	O-β-D-glucose	H	116

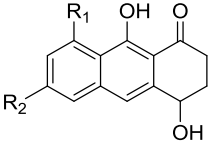
			
	R ₁	R ₂	Ref
Aloésaponol III 117	OH	Me	111,117,124
8-méthylaloésaponol III 118	OMe	Me	124,125
119	OMe	CH ₂ OH	125
Aloésaponol III glucoside 120	O-β-D-glucose	Me	116

Figure 21 : Dihydroanthracénones isolées de plantes appartenant à la famille des Xanthorrhoeaceae.

Ces structures ont essentiellement été isolées des parties souterraines (tiges et racines), dans une moindre mesure des tiges des parties supérieures et plus rarement des feuilles des différentes espèces. Elles présentent notamment un intérêt chimiotaxonomique. Une étude réalisée par Van Wyk *et al.* portant sur les constituants des parties souterraines de 172 espèces d'*Aloe* montre que l'aloésaponol I (**106**) et l'aloésaponol II (**113**) avec d'autres dérivés de la voie des 1-méthyl-8-hydroxyanthraquinones présentent un intérêt chimiotaxonomique particulier pour l'analyse infragénérique des espèces d'*Aloe*¹⁰⁸. Une seconde étude du même groupe s'intéresse à la présence de ces mêmes molécules au sein du genre *Lomatophyllum*, proche du genre *Aloe* et pose la question d'une réévaluation de la classification de certaines espèces appartenant à ces deux genres, sur la base de la distribution des marqueurs chimiotaxonomiques mis en évidence¹⁰⁹.

2.1.1.2 Fabaceae

Les structures isolées des Fabaceae sont moins diversifiées que celles observées chez les Xanthorrhoeaceae. Il s'agit essentiellement de dérivés de la torosachrysonne (**121**). Dans la famille, ces molécules n'ont été isolées qu'au sein du genre *Senna*.

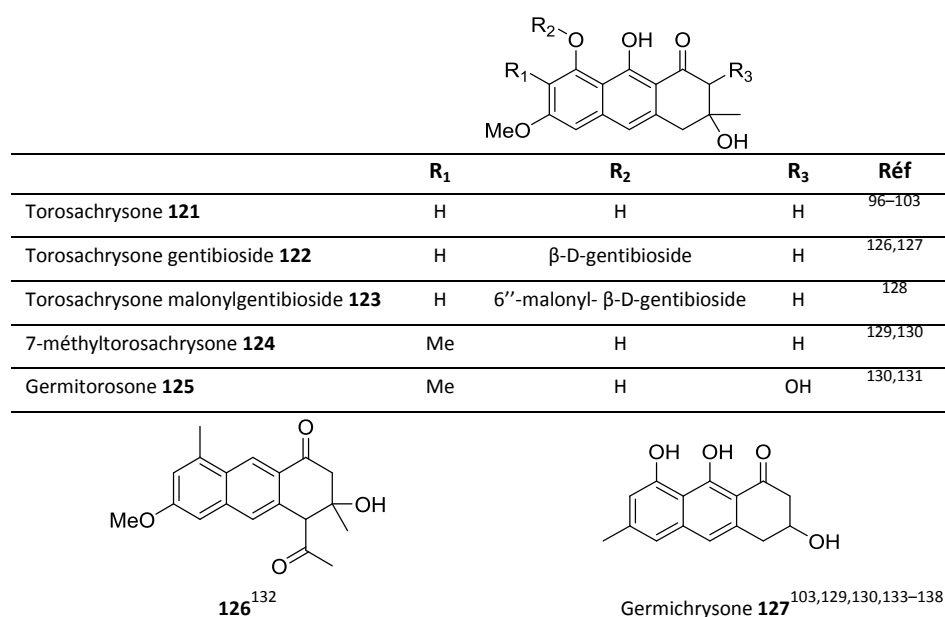


Figure 22 : Dihydroanthracénones isolées de plantes appartenant au genre *Senna*.

2.1.1.3 Rubiaceae et Orchidaceae

D'autres dihydroanthracénones ont été isolées de manière plus anecdotique de l'espèce *Plocama pendula* (Rubiaceae), c'est le cas des ménamésones A (**128**) et B (**129**)¹³⁹ (Figure 23).

La (S)-3,6,9-trihydroxy-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (**130**) est le seul exemple de dihydroanthracénone isolée à ce jour de la famille des Orchidaceae. Elle a été isolée de deux espèces du genre *Dendrobium*, *D. polyanthum* et *D. chrysotoxum*^{140,141}.

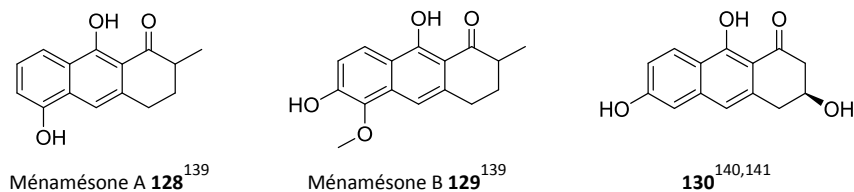


Figure 23 : Dihydroanthracénones isolées de plantes appartenant aux familles des Rubiaceae et des Orchidaceae.

2.1.2 Activités biologiques

Les dihydroanthracénones ont relativement peu fait l'objet d'études concernant leurs activités biologiques. Les gastériacénones A (**111**) et B (**112**) isolées de *Gasteria bicolor* (Xanthorrhoeaceae) ont montré une activité cytotoxique sur lignée HL-60 (*Human promyelocytic leukemia cells*) avec des Cl_{50} de 19 et 7 μM ¹¹⁵, respectivement.

L'aloésaponol I (**106**) et le 6-méthylaloésaponol II (**115**) isolés des racines d'*Aloe dawei* (Xanthorrhoeaceae) ont montré des cytotoxicités très modérées sur lignées de cancer du sein MCF7 et MDA-MB-231 avec des valeurs de Cl_{50} supérieures à la centaine de micromolaire¹¹⁴.

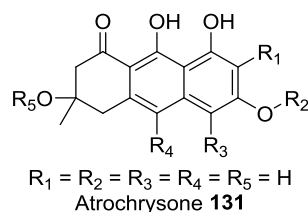
Les activités antibactériennes évaluées pour la germichrysonne (**127**) et la torosachrysonne (**120**) isolées de *Senna singueana* se sont également montrées modérées avec des valeurs de CMI supérieures à la centaine de micromolaire sur plusieurs souches bactériennes⁹⁶. De la même manière, la dihydroanthracénone (**126**) isolée de *Senna petersiana* n'a pas montré d'activité significative sur différentes souches de *Salmonella*¹³².

2.2 Vismiones

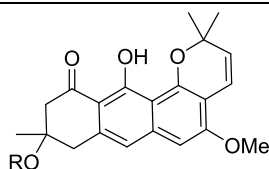
2.2.1 Structures et intérêt chimiotaxonomique

Les vismiones sont une sous-classe des dihydroanthracénones. Ces dernières sont C- ou O- substituées par un ou plusieurs groupements prényles ou géranyles (Figure 24).

Elles dérivent toutes d'un même noyau atrochrysonne (**131**) commun :



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
6-acétyltorosachrysonne 88	H	Me	H	H	Ac
Désacétylvismione H 97	H		H	H	H
Désacétylvismione A 132		H	H	H	H
Vismione E 79		Me	H	H	H
Vismione C 78		H	H	H	Ac
Vismione H 94	H		H	H	Ac
Acétylvismione K 95	H	H	H		Ac
Vismione A 133		H	H	H	Ac
Vismione D 33	H		H	H	H
Vismione F 66		H	H	H	H
Vismione L 134	H	H		H	H
Désacétylvismione G 96	H	H	H		H
Vismione M 42		Me	H	H	H
6-O-prénylvismione E 87		Me	H	H	
Vismione G 80	H	H	H		Ac
Acétylvismione F 44		H	H	H	Ac
Acétylvismione D 8	H		H	H	Ac



R = H : Vismione B **135**

R = Ac : Acétylvismione B **136**

Figure 24 : Structures des vismiones.

La vismione B (**135**) a subi une étape de cyclisation entre la chaîne prényle et l'hydroxyle adjacent.

Les vismiones ont essentiellement été isolées d'Hypericaceae tropicales, en particulier du genre *Psorospermum*. Des travaux menés sur d'autres genres de cette famille ont également permis d'établir leur présence au sein des genres *Vismia* et *Cratoxylum*.

Par ailleurs, le genre *Harungana* appartenant également à la tribu des Vismieae, tout comme les genres *Psorospermum* et *Vismia*, a révélé la présence de dérivés qui pourraient être, au moins en partie, des artefacts de dégradation de vismiones formés au cours des opérations de fractionnement (Figure 25). C'est notamment le cas de la madagascine (5), de la madagascine anthrone (7), de la vismiaquinone (11), de la vismiaquinone C (43)¹⁴²⁻¹⁴⁵ isolées de cette espèce et qui pourraient être des produits de dégradation des vismiones H (94), A (133) et E (79).

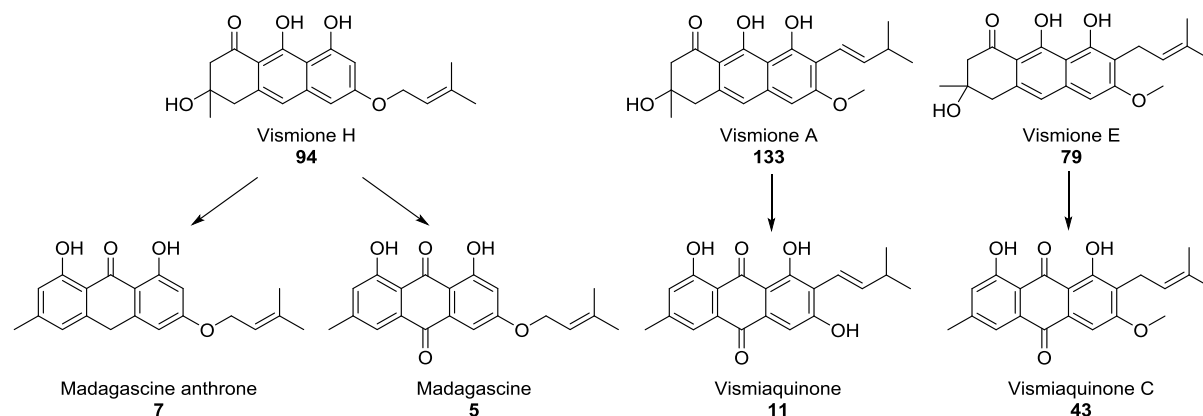


Figure 25 : Hypothèse de relation entre les molécules isolées de l'écorce d'*Harungana madagascariensis* et les vismiones.

Les vismiones, isolées uniquement d'un petit nombre de genres botaniquement proches pourraient servir de marqueurs chimiotaxonomiques pour mieux organiser la classification des espèces au sein d'un genre qui nécessite encore d'être étudié sur le plan taxonomique⁶.

Les travaux de Sibanda *et al.* ont conduit à isoler les vismiones D (33), L (134), M (42) et l'acétylvismione D (8) des racines de l'arbuste *Ochna pulchra* appartenant à la famille des Ochnaceae. Les études phylogénétiques menées par Ruhfel *et al.* sur les Clusioideae⁶ ont tendance à classer les Ochnaceae très à l'écart des Cratoxyleae et des Vismieae. La présence de vismiones au sein de ce genre pourrait conduire à reconsidérer la place de cette famille au sein des Clusioideae ou bien de nuancer l'intérêt chimiotaxonomique des vismiones elles-mêmes.

2.2.2 Activités biologiques

2.2.2.1 Cytotoxicité

Les activités biologiques les plus étudiées des vismiones concernent leur cytotoxicité qui a été évaluée sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Tableau 2)

Tableau 2 : Activités cytotoxiques des vismiones sur différentes lignées cellulaires.

	MCF-7 ¹⁴⁶	H-460 ¹⁴⁶	SF-268 ¹⁴⁶	KB ¹⁴⁷	P-388/S ¹⁴⁷	P-388/R ¹⁴⁷	H187 ¹⁴⁸	L6 ¹⁴⁹
Désacétylvismione H (95)	1,2	1,8	1,8	-	-	-	-	-
Vismione B (135)	4,5	7,9	4,5	28,2	28,2	8,5	3,4	-
Désacétylvismione A (132)	5,1	5,3	6,2	2,0	1,1	0,8	-	-
Vismione C (78)	-	-	-	5,5	-	-	-	-
Acétylvismione B (136)	-	-	-	105,9	12,6	5,0	-	-
Vismione A (133)	-	-	-	0,6	1,1	2,8	-	-
Vismione D (33)	-	-	-	34,1	34,1	43,8	-	10,0
Vismione F (66)	-	-	-	6,8	4,9	32,9	16,1	-
Vismione G (80)	-	-	-	7,1	66,3	66,3	-	-
Acétylvismione F (44)	-	-	-	2,2	6,0	6,6	-	-
Acétylvismione D (8)	-	-	-	11,0	4,0	-	-	-

Les valeurs indiquées dans le tableau correspondent aux Cl_{50} exprimées en μM pour chaque lignée cellulaire considérée. MCF-7 : human breast cancer cell line ; H-460 : human lung cancer cell line ; SF-268 : human central nervous system cancer cell line ; KB : Human 9 KB cancer cell line ; P-388/S : murine leukemia cell line doxorubicine sensitive ; P-388/R : murine leukemia cell line doxorubicine resistant ; H187 : NCI-H187 human lung cancer cell line ; L6 : rat skeletal myoblasts cell line.

On remarque que l'ensemble des vismiones étudiées présente une cytotoxicité de l'ordre du micromolaire ou de la dizaine de micromolaires avec une faible sélectivité vis-à-vis du type cellulaire utilisé.

La vismione D a par ailleurs montré une certaine toxicité sur *Artemia salina* avec une Cl_{50} de $179 \mu M$ ¹⁴⁹.

2.2.2.2 Activités antiparasitaires

Quelques vismiones ont été évaluées pour leurs propriétés antiplasmodiales sur différentes souches de *P. falciparum* (Tableau 3).

Tableau 3 : Activités antiplasmodiales des vismiones décrites dans la littérature.

	Activité antiplasmodiale (CI ₅₀)
Acétylvismione D (8)	0,12 µM (<i>P. falciparum</i> W2) ⁸³
Vismione H (94)	0,23 µM (<i>P. falciparum</i> NF54) ¹⁵⁰
Vismione B (135)	1,9 µM (<i>P. falciparum</i> NF54) ¹⁴⁹
Vismione D (33)	2,46 µM (<i>P. falciparum</i> NF54) ¹⁴⁹
Vismione F (66)	4,75 µM (<i>P. falciparum</i> K1) ¹⁴⁸
Vismione E (79)	10,23 µM (<i>P. falciparum</i> K1) ¹⁴⁸

Les activités antiplasmodiales décrites dans la littérature pour les vismiones sont plutôt encourageantes avec des activités submicromolaires observées pour la vismione H (**94**) et l'acétylvismione D (**8**) qui permettent d'envisager une sélectivité même si elle est relativement faible par rapport aux cytotoxicités observées sur différentes cellules mammifères (Tableau 2).

La vismione D (**33**) est, à notre connaissance, la seule molécule à avoir été étudiée pour son activité antileishmanienne. Elle a ainsi montré une CI₅₀ de 0,90 µM sur amastigotes axéniques de *L. donovani*¹⁴⁹.

Cette dernière a aussi été évaluée pour ses effets trypanosomatocides avec des CI₅₀ respectives de 11,2 et 21,9 µM sur *Trypanosoma cruzi* et *T. brucei rhodesiense*¹⁴⁹.

2.3 Biosynthèse des dihydroanthracénones

Les voies de biosynthèse qui conduisent à la formation des dihydroanthracénones, des anthrones et anthraquinones correspondantes restent encore à l'heure actuelle relativement mal connues.

De récents travaux d'Abdel-Rhman *et al*¹⁵¹, portant sur l'étude d'extraits cellulaires de *Senna bicapsularis* proposent le schéma de biosynthèse suivant (Figure 26).

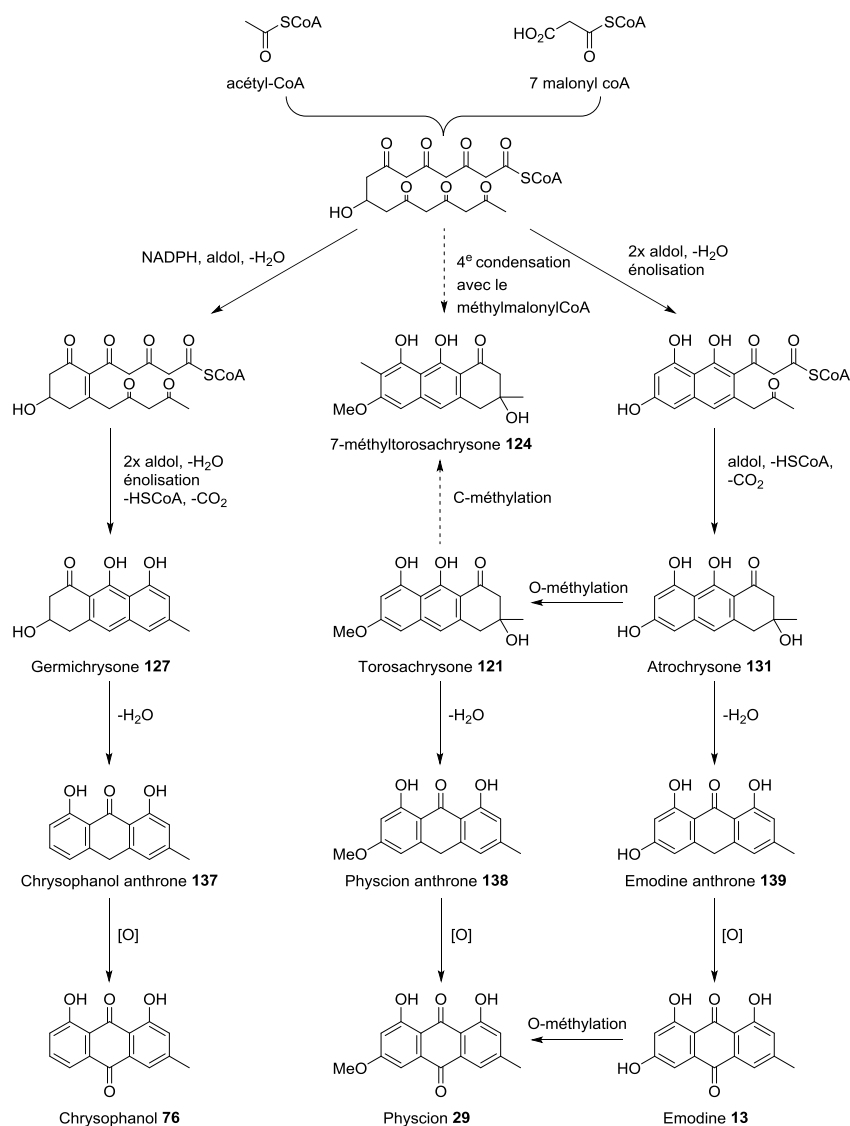


Figure 26 : Voies de biosynthèse des dihydroanthracénones de *Senna bicapsularis*¹⁵¹.

Chez les plantes, la biosynthèse des anthranoïdes est catalysée par l'octacétide synthase, une enzyme de la superfamille des polycétides synthases de type III. Les polycétides synthases génèrent une grande variété de molécules naturelles en catalysant la condensation d'unités acétyles provenant du malonyl-CoA en une chaîne polycétide¹⁵². La grande diversité des molécules issues de ces voies de biosynthèse provient de variations liées au substrat de départ, au nombre d'unités acétyles condensées et au mécanisme de cyclisation impliqué. L'octacétide synthase débute la condensation à partir d'une unité acétyle qui est ensuite condensée avec 7 unités de malonyl-CoA pour donner un intermédiaire octacétide linéaire¹⁵³.

Trois condensations aldoliques mènent alors à la formation des dihydroanthracénones de type atrochrysonne (**131**). Si l'un des carbonyles de la chaîne est réduit par le NADPH, un dérivé de type germichrysonne (**127**) est alors obtenu. Les dihydroanthracénones peuvent alors subir une déshydratation conduisant à la formation des anthrones qui peuvent ensuite être oxydées en anthraquinones¹⁵¹.

Dans le cas des vismionnes, l'atrochrysonne (**131**) ainsi formée peut être C- ou O- prénylée ou géranylée par des enzymes appartenant à la grande famille des prényltransférases. Ces enzymes peuvent être cytosoliques mais semblent le plus souvent ancrées à la membrane plasmique et sont connues pour catalyser la prénylation d'une grande variété de polyphénols¹⁵⁴. Néanmoins, aucune prényltransférase spécifique des dihydroanthracénones n'a encore été étudiée à ce jour. Il est possible que de telles réactions soient catalysées par des prényltransférases permissives acceptant un certain nombre de substrats polyphénoliques différents.

2.4 Dihydroanthracénones dimériques

Les dihydroanthracénones dimériques isolées d'espèces végétales n'ont quant à elles été caractérisées chez les végétaux qu'au sein des genres *Senna* (Fabaceae) et *Karwinskia* (Rhamnaceae) où elles sont largement présentes. Ceci à l'exception de la fébruquinone (**68**), qui a été isolée du genre *Psorospermum* (Hypericaceae) (Figure 27).

Ici encore les structures observées sont spécifiques à la famille botanique, et même au genre considéré.

Il existe une grande variété de structures, pour plusieurs raisons. Les dihydroanthracénones dimériques peuvent être :

- des homodimères vrais, formés par la condensation de deux dihydroanthracénones identiques comme la peroxyomicine A1 (**140**).
- des homodimères où les deux produits de condensation sont des dihydroanthracénones différentes comme l'occidentalol I (**141**).
- des hétérodimères formés par la condensation d'une dihydroanthracénone avec une anthrone [anhydrophlegmacine (**142**)], une anthraquinone [anhydrophlegmacine 9,10-quinone (**143**)], un dérivé dihydronaphtopyrane [tullidinol (**144**)] ou un dérivé naphtol [éleuterogonzalone (**145**)]. Seul un hétérodimère, la fébruquinone (**68**) a été décrit comme résultant de la condensation d'une vismionne avec une anthraquinone¹⁵⁵.

En outre, ces dimères peuvent être reliés entre eux par différents types de substitutions comme par exemple dans le cas de la peroxyomicine A1 (**140**) et de l'isoperoxyomicine A1 (**146**).

A ces variations s'ajoutent les considérations stéréochimiques déjà évoquées pour les dihydroanthracénones monomériques ainsi que des problématiques d'atropoisomérisation [peroxyomicine A1 (**140**) et peroxyomicine A2 (**147**)].

Un inventaire le plus exhaustif possible des différentes structures isolées de végétaux supérieurs est présenté à l'Annexe 3, p 307.

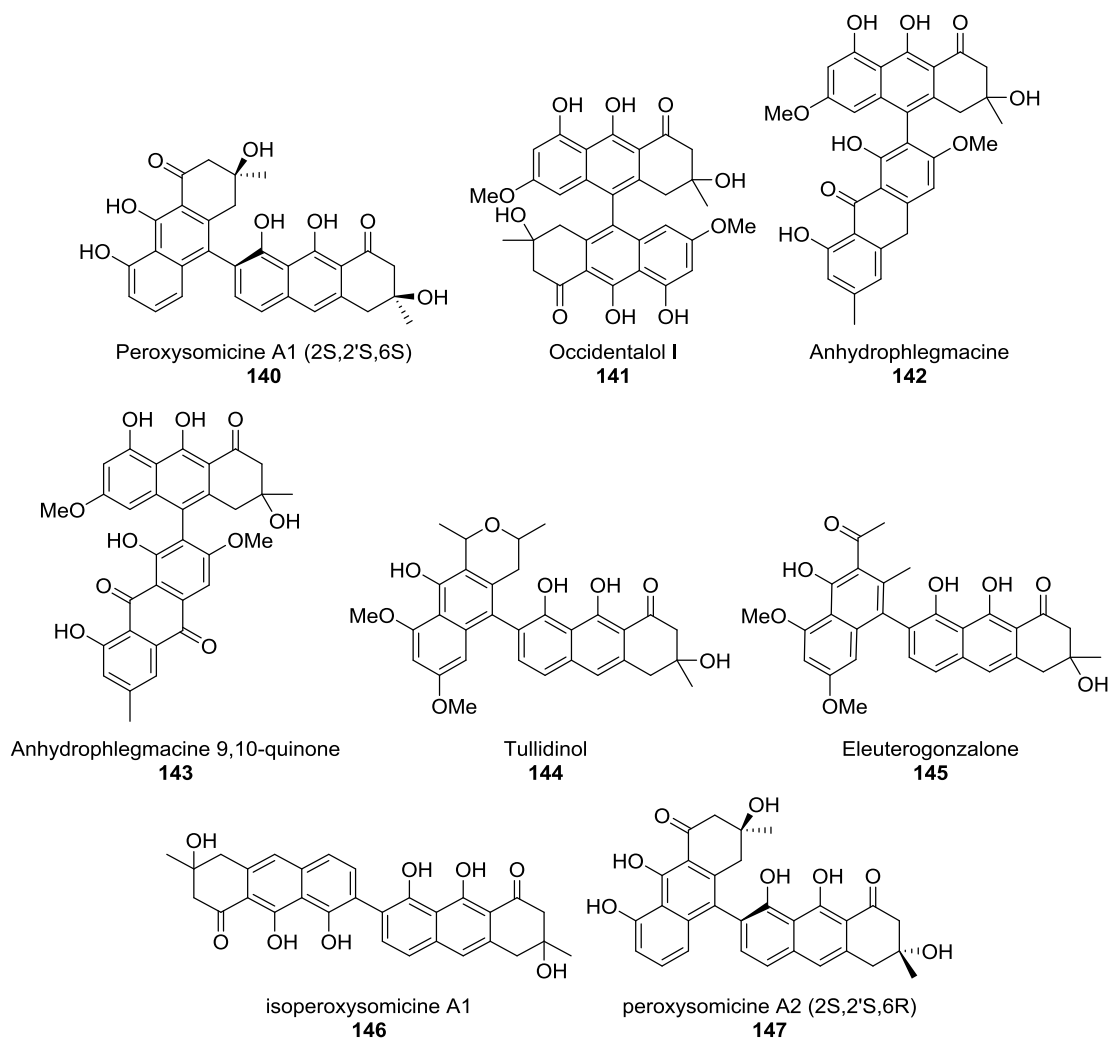


Figure 27 : Aperçu de la diversité des dihydroanthracénones dimériques.

Les dihydroanthracénones dimériques d'origine végétale n'ont, à notre connaissance, pas fait l'objet d'évaluation de leurs activités biologiques à l'exception des peroxysomicines retrouvées dans le genre *Karwinskia* (Rhamnaceae). Les peroxysomicines sont en effet des toxines responsables de fréquentes intoxications suite à l'ingestion des baies de ces arbrisseaux d'Amérique centrale par l'homme ou le bétail. Celles-ci engendrent notamment des neuropathies (*Buckthorn neuropathy*) pouvant conduire à la mort ou entraîner d'importantes séquelles¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

2.5 Conclusion

Les dihydroanthracénones sont des molécules de distribution relativement restreinte dans le règne végétal. Cependant, compte-tenu de leur réactivité, il est possible qu'elles soient également présentes parmi certaines familles à anthraquinones mais que les approches classiquement utilisées en phytochimie n'aient pas pu permettre de les en isoler.

Si les dihydroanthracénones monomériques n'ont pas fait l'objet de beaucoup d'études concernant des activités biologiques potentielles, leurs dérivés prénylés, les vismiones, ont montré des activités cytotoxiques et antiparasitaires intéressantes.

Les études des propriétés antiparasitaires de ces molécules sont néanmoins peu documentées en dehors des activités antiplasmodiales évaluées pour un certain nombre d'entre elles (Tableau 3).

Dans ce contexte, compte-tenu des résultats préliminaires obtenus pour l'acétylvismione D (**8**) sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, une étude plus poussée de l'activité antileishmanienne de ces molécules pourrait s'avérer pionnière.

3 Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires vectorielles provoquées par un parasite intracellulaire du genre *Leishmania*. Les manifestations cliniques des leishmanioses sont variées en fonction de l'espèce incriminée allant de l'ulcère cutané spontanément résolutif à des atteintes systémiques sévères provoquant la défaillance de multiples organes.

Parmi les manifestations les plus fréquentes, on distingue la leishmaniose cutanée (LC), la leishmaniose mucocutanée (LMC) et la leishmaniose viscérale (LV)¹⁵⁹ ; celles-ci seront développées au paragraphe 3.5, p 45.

En dépit des importants problèmes de santé publique qu'elles occasionnent à travers le monde, les leishmanioses font encore partie des maladies négligées.

En effet, les leishmanioses représentent la neuvième maladie infectieuse la plus importante et la deuxième maladie parasitaire causant le plus grand nombre de décès après le paludisme.

Ces pathologies restent cependant peu considérées dans les priorités de santé publique internationales en termes de maladies tropicales¹⁶⁰.

3.1 Taxonomie

Les *Leishmania* sont des protozoaires de l'ordre des Kinetoplastida et de la famille des Trypanosomatidae.

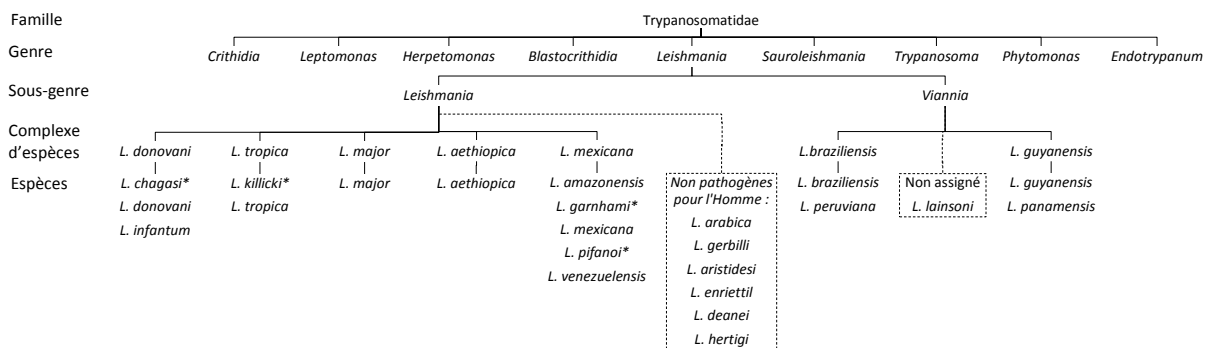


Figure 28 : Taxonomie du genre *Leishmania* (OMS, 2010)¹⁶¹.

* espèces dont le statut est en cours de discussion. *L. chagasi* dans le Nouveau-Monde est synonyme de *L. infantum*.

Le genre *Leishmania* est divisé en deux sous genres, *Leishmania stricto sensu* présent sur la grande majorité des zones tropicales et comportant des espèces responsables de l'ensemble des manifestations cliniques liées à la leishmaniose et le sous-genre *Viannia* présent uniquement en Amérique tropicale responsable de formes cutanées et mucocutanées (Figure 28, Tableau 4)¹⁶¹.

Tableau 4 : Espèces de *Leishmania* pathogènes pour l'Homme (OMS, 2010)¹⁶¹.

Sous-genre	<i>Leishmania</i>		<i>Viannia</i>	
Ancien Monde	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Nouveau Monde	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoi^a</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhami^a</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis^b</i>	
Tropisme majeur	Viscéral	Cutané	Cutané	Muco-cutané

^a : Statut de l'espèce en discussion, b : Taxonomie en discussion.

3.2 Epidémiologie

On estime qu'il y a entre 200 000 et 400 000 nouveaux cas de leishmaniose viscérale et entre 700 000 et 1,2 millions de nouveaux cas de LC chaque année à travers le monde¹⁶⁰. Les leishmanioses sont endémiques dans 98 pays, ce qui représente un risque pour 350 millions d'individus¹⁶¹.

Une large majorité des cas de LV (90%) proviennent de seulement 6 pays : l'Inde, le Bangladesh, le Soudan, le Soudan du Sud, l'Éthiopie et le Brésil¹⁶⁰ (Figure 29).

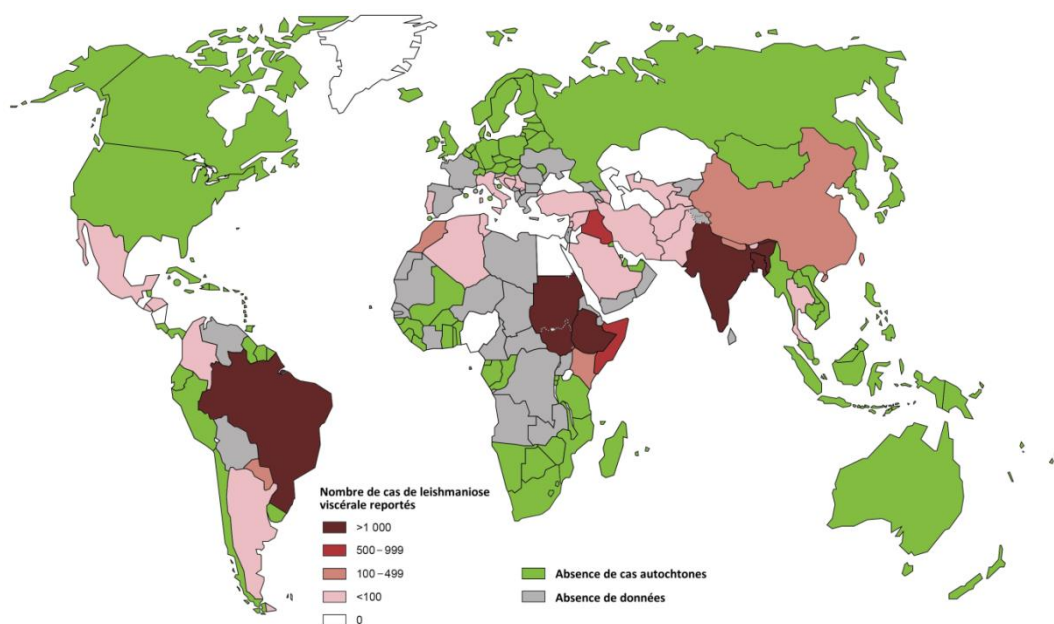


Figure 29 : Cas de leishmaniose viscérale reportés en 2013 (OMS, 2015)¹⁶².

Les formes cutanées sont plus largement distribuées. On considère qu'un tiers des cas de LC provient respectivement des Amériques, du bassin méditerranéen et d'Asie occidentale. Dans ces zones, dix pays représentent à eux seuls 70 à 75 % des cas de LC (Afghanistan, Algérie, Colombie, Brésil, Iran, Syrie, Ethiopie, Soudan, Costa Rica et Pérou)¹⁶⁰(Figure 30).

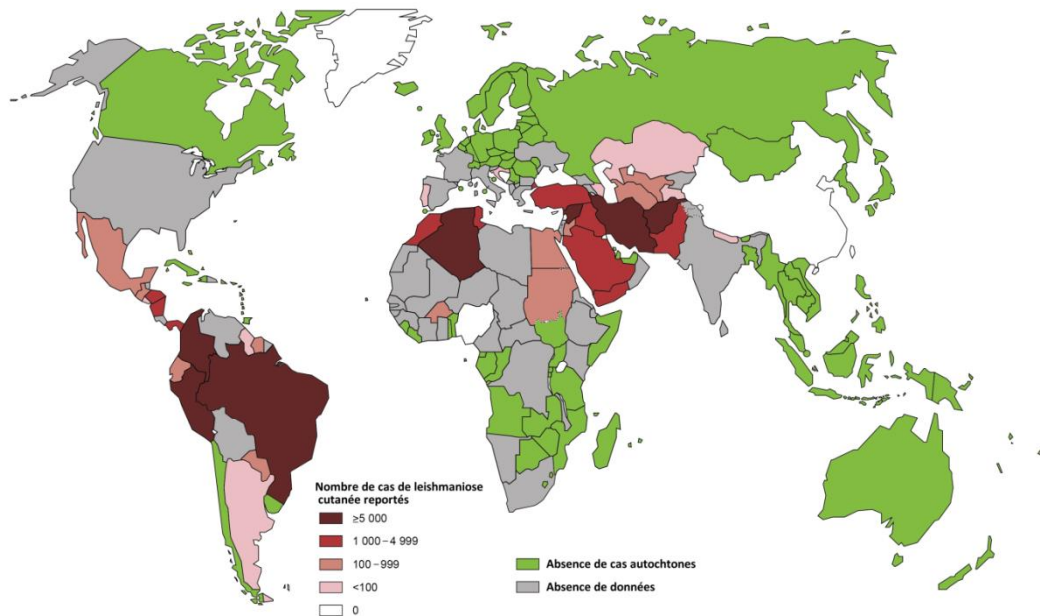


Figure 30 : Cas de leishmaniose cutanée reportés en 2013 (OMS, 2015)¹⁶².

3.2.1 Mortalité et morbidité

Chaque année, les leishmanioses sont responsables de plus de 50 000 décès. On estime également l'impact global des leishmanioses sur la population mondiale à 2 357 000 années d'espérance de vie corrigée de l'incapacité (EVCI)¹⁶¹. Cet outil d'évaluation de l'OMS permet une mesure de la charge de morbidité globale. Ce paramètre représente le nombre cumulé d'années perdues en raison d'une mauvaise santé, d'un handicap ou d'une mort précoce.

3.3 Vecteur

La leishmaniose est transmise par la piqûre, d'insectes des genres *Phlebotomus spp.* et *Lutzomyia spp.* Parmi les 500 espèces de phlébotomes connues, seule une trentaine d'entre elles ont clairement été identifiées comme vecteur.



Figure 31 : Repas sanguin de *Phlebotomus papatasi*. © CDC J Gathany.

3.4 Cycle parasitaire

Le parasite existe sous deux formes distinctes, les formes promastigotes et amastigotes. Les formes promastigotes sont présentes chez le vecteur. Ce sont des formes extracellulaires allongées et pourvues d'un flagelle qui les rend mobiles. Les formes amastigotes sont intracellulaires, arrondies et non mobiles. Elles vivent et se multiplient à l'intérieur du phagolysosome des cellules du système immunitaire (essentiellement les macrophages) des hôtes vertébrés¹⁶³. La transmission de la maladie peut être anthroponotique ou zoonotique en fonction des régions et des espèces impliquées. Dans le second cas, les rongeurs et les canidés essentiellement peuvent ainsi jouer le rôle de réservoirs¹⁶¹.

La leishmaniose est transmise par la piqûre du phlébotome femelle (Figure 32). Celle-ci injecte le parasite sous sa forme promastigote au cours d'un repas sanguin (1). Les promastigotes sont alors pris en charge par le système immunitaire de l'individu, notamment par les macrophages mais aussi par les neutrophiles et les cellules dendritiques (2). Une partie des promastigotes seront détruits au moment de la phagocytose mais certains vont se transformer en formes amastigotes et se multiplier par division binaire au sein du phagolysosome (3). Les amastigotes, intracellulaires, en se multipliant font éclater les cellules infectées avant de coloniser de nouveaux macrophages (4). La propagation des macrophages dans différents tissus est responsable des manifestations cliniques associées aux différentes formes de leishmanioses. Un phlébotome femelle peut se contaminer au cours d'un nouveau repas sanguin pris sur un hôte malade lorsqu'il ingère des macrophages infectés (5). Dans l'intestin du phlébotome, les parasites relargués par la rupture des macrophages (6) se différencient en promastigotes (7), qui se multiplient par division binaire (8) et migrent dans la trompe du phlébotome, prêts à infecter un nouvel hôte (9).

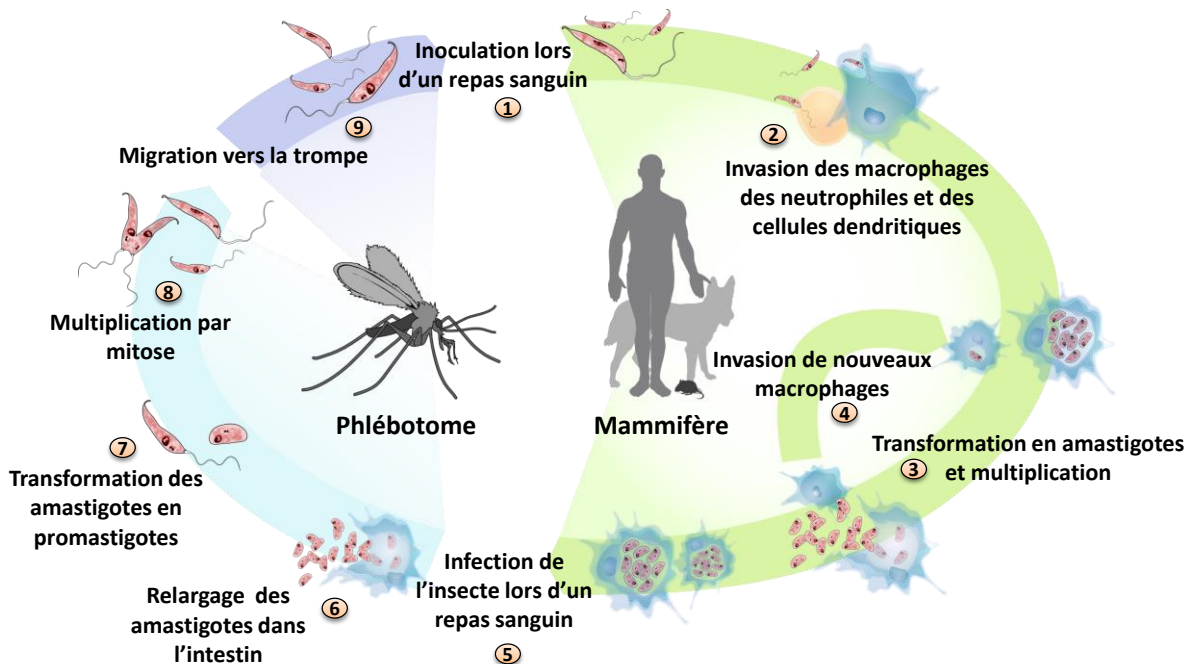


Figure 32 : Cycle parasitaire de *Leishmania* sp. Adapté de Wikimedia Commons.

3.4.1 Survie et interactions à l'intérieur du macrophage

Pour survivre au sein de sa cellule hôte (Figure 33), la forme amastigote a dû s'adapter à la survie dans un milieu particulièrement hostile. Les interactions *Leishmania*-macrophage impliquent de nombreux facteurs de pathogénicité qui permettent au parasite non seulement de survivre en court-circuitant les voies de signalisation qui provoqueraient sa destruction mais également de capter des nutriments et de se multiplier¹⁶⁴. La protéase GP63, très abondante à la surface des promastigotes, empêche ainsi la fusion entre le phagosome et des vésicules qui favorisent l'oxydation au sein du phagosome et qui permettent la présentation des peptides microbiens à la surface de la cellule via le CMH I, entraînant ainsi une diminution de la stimulation des lymphocytes T CD₈⁺¹⁶⁵. Cette protéase permet également d'augmenter la sécrétion de TNF et d'IL-6 par le macrophage, ce qui pourrait entraîner le recrutement de neutrophiles et de monocytes qui pourront à leur tour être parasités¹⁶⁶.

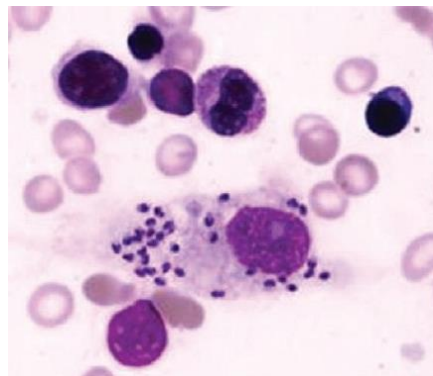


Figure 33 : Histiocyte infecté par des amastigotes de *L. tropica*. Leishman stain X100¹⁶⁷.

3.5 Aspects cliniques

Les espèces du genre *Leishmania* pathogènes pour l'homme, sont responsables de manifestations cliniques très variées allant de la forme asymptomatique à la forme mortelle d'atteinte viscérale en passant par des formes cutanées bénignes et muco-cutanées beaucoup plus sévères.

Nous traiterons ici des 3 principales manifestations cliniques : les leishmanioses cutanée, muco-cutanée et viscérale. Cependant, parmi ces 3 catégories, un nombre relativement important de manifestations atypiques et rares peuvent également être observées¹⁶⁸.

3.5.1 Leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée est peut-être la forme la plus difficile à diagnostiquer car elle peut être à l'origine d'une grande variété de lésions^{159,168}.

Plusieurs espèces sont responsables de ces manifestations : *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* et *L. guyanensis*. Des espèces généralement responsables de leishmaniose viscérale comme *L. infantum* et dans une moindre mesure *L. donovani*, peuvent également dans certains cas occasionner de simples lésions cutanées¹⁶⁸.

Des formes localisées ou diffuses de LC peuvent être observées selon l'espèce en cause et certains paramètres dépendants de l'hôte, en particulier son statut immunitaire.

La lésion typique correspond à un ulcère de forme arrondie apparaissant au niveau du site de piqûre et dont la résolution est spontanée. Les cicatrices laissées peuvent toutefois dans certains cas avoir un impact social invalidant.

Des manifestations satellites peuvent dans certains cas apparaître le long des trajets lymphatiques ou évoluer en forme disséminée. Ces formes disséminées sont essentiellement causées par les espèces *L. aethiopica*, *L. amazonensis* et *L. mexicana* qui provoquent des lésions nodulaires non spontanément résolutive et pouvant occasionner des rechutes même en cas de traitement¹⁶⁸.

Une forme d'évolution particulière de la LV à *L. donovani*, la PKDL (pour Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis) peut se développer après un à deux ans chez des patients traités pour une LV. Cette manifestation est caractérisée par des hypopigmentations ou des érythèmes de la face. Ces manifestations peuvent être retrouvées chez 50 à 60 % des patients atteints de LV au Soudan et 5 à 10 % des patients du sous-continent indien¹⁶⁹.

3.5.2 Leishmaniose muco-cutanée

La leishmaniose muco-cutanée est une manifestation tégumentaire présente dans les régions du Nouveau-Monde où elle porte également le nom d'«*espundia*». Elle est essentiellement due à l'espèce *L. braziliensis* mais peut également être consécutive à une infection à *L. panamensis*, *L. guyanensis* et *L. amazonensis*.

Cette manifestation provoque la destruction des cavités nasales et oropharyngées conduisant à d'importantes lésions défigurantes de la face en l'absence de traitement.

Les atteintes de la muqueuse nasale sont prédominantes (90 % des cas) mais les lèvres, le palais, la bouche, le pharynx, le larynx et l'oreille moyenne peuvent également être touchés¹⁶⁸.

3.5.3 Leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) encore appelée « kala-azar » sur le sous-continent indien est la forme la plus grave de leishmaniose car elle est fatale en l'espace de quelques semaines en l'absence de traitement. Cette manifestation est caractérisée par une fièvre ondulante, une perte de poids et une hépatosplénomégalie associées ou non à des lymphadénopathies et une pancytopenie caractérisée en particulier par une anémie.

Elle est due aux espèces du complexe *donovani* comprenant *L. donovani* et *L. infantum*. *L. chagasi* présent sur le continent américain est en fait un synonyme de *L. infantum*¹⁶⁸.

3.6 Vaccins contre la leishmaniose^{170,171}

Une primo-infection, si celle-ci est traitée, confère une immunité qui suggère la possibilité de développer un vaccin contre la leishmaniose.

En dépit du large nombre d'espèce de *Leishmania*, les analyses génomiques montrent un important degré d'homologies de séquences entre les différentes espèces. Ceci suggère la possibilité de développer un vaccin qui pourrait être efficace contre plusieurs espèces et contre différentes manifestations cliniques.

A ce jour, aucun vaccin destiné à l'homme n'est disponible pour prévenir les leishmanioses mais plusieurs d'entre eux font l'objet de recherches, certains sont notamment en cours d'essais cliniques.

3.6.1 Vaccins de première génération

Des candidats vaccins basés sur des formes promastigotes inactivées ont été testés dès les années 1940, seuls ou en combinaison avec des adjuvants. Les essais cliniques allant jusqu'à la phase III ont cependant montré une variabilité trop importante en terme de sécurité et d'efficacité. La réponse immunitaire s'est en effet montrée trop variable en fonction des individus. D'autre part, les difficultés liées à la délivrance et au stockage de telles préparations n'ont pas permis leur développement¹⁷⁰.

Différentes formulations basées sur des parasites atténués ont été testées sur modèles animaux. Les résultats sur modèles animaux (souris et hamsters) se sont montrés encourageants. Cependant, la crainte d'un recouvrement de la virulence de ces parasites atténués n'a pas permis le développement de telles formulations pour une application humaine.

3.6.2 Vaccins de seconde génération

D'autres candidats vaccins ont été développés sur la base de formulations contenant des antigènes de surface. Une formulation contenant un ligand fucose-mannose, un antigène exprimé tout au long du cycle parasitaire, a montré une bonne sécurité, une bonne immunogénicité et une bonne protection sur des modèles animaux. Ces résultats ont conduit au développement du vaccin vétérinaire Leishmune[®] indiqué dans la prévention de la leishmaniose canine.

D'autres antigènes de surface sont actuellement en cours d'étude mais se heurtent à un certain polymorphisme pouvant être retrouvé sur le terrain, conduisant à une immunité partielle.

Des vaccins basés sur des protéines recombinantes de *Leishmania* ont également été développés et testés en études précliniques. Parmi les combinaisons de protéines recombinantes envisagées, seulement un petit nombre a pu passer le stade du modèle animal pour entrer dans des études précliniques chez l'homme. Le vaccin recombinant Leish-111F/MPL-SE est néanmoins le premier candidat de seconde génération à entrer en essais cliniques de phase II. La construction de ce vaccin fait appel à une polyprotéine recombinante constituée de la *thiol-specific antioxidant protein* (TSA) et la *stress-inducible protein-1* (LmSTI1) de *L. major* et l'*elongation and initiation factor* (LeIF) de *L. braziliensis* associé à l'adjuvant lipidique MPL-SE.

3.6.3 Vaccins de troisième génération

Des vaccins à ADN sont actuellement en cours de développement et d'évaluation.

Cette approche permet notamment de diminuer les coûts de production associés, engendre des formulations de plus grande stabilité et provoque une expression soutenue des antigènes d'intérêt aboutissant à la constitution d'une bonne mémoire immunitaire. Plusieurs candidats antigènes sont actuellement en cours d'essai chez l'animal.

Le développement de vaccins contre la leishmaniose est particulièrement intéressant permettant à la fois de prévenir la maladie et de limiter sa propagation en zones d'endémie. Cependant, si des candidats vaccins font l'objet à l'heure actuelle d'études cliniques et que des formulations vétérinaires ont pu récemment être mises sur le marché laissant espérer un développement possible chez l'homme, un certain nombre d'obstacles reste encore à surmonter. Il est donc nécessaire de poursuivre les investigations sur le plan du développement de nouvelles molécules antileishmaniennes.

3.7 Traitements actuels

L'arsenal thérapeutique pour lutter contre la leishmaniose est particulièrement limité puisque l'ensemble des molécules disponibles sont représentées ci-dessous (Figure 34). Elles présentent, en outre, des effets secondaires relativement importants et font, pour certaines, face au développement de résistances chez le parasite.

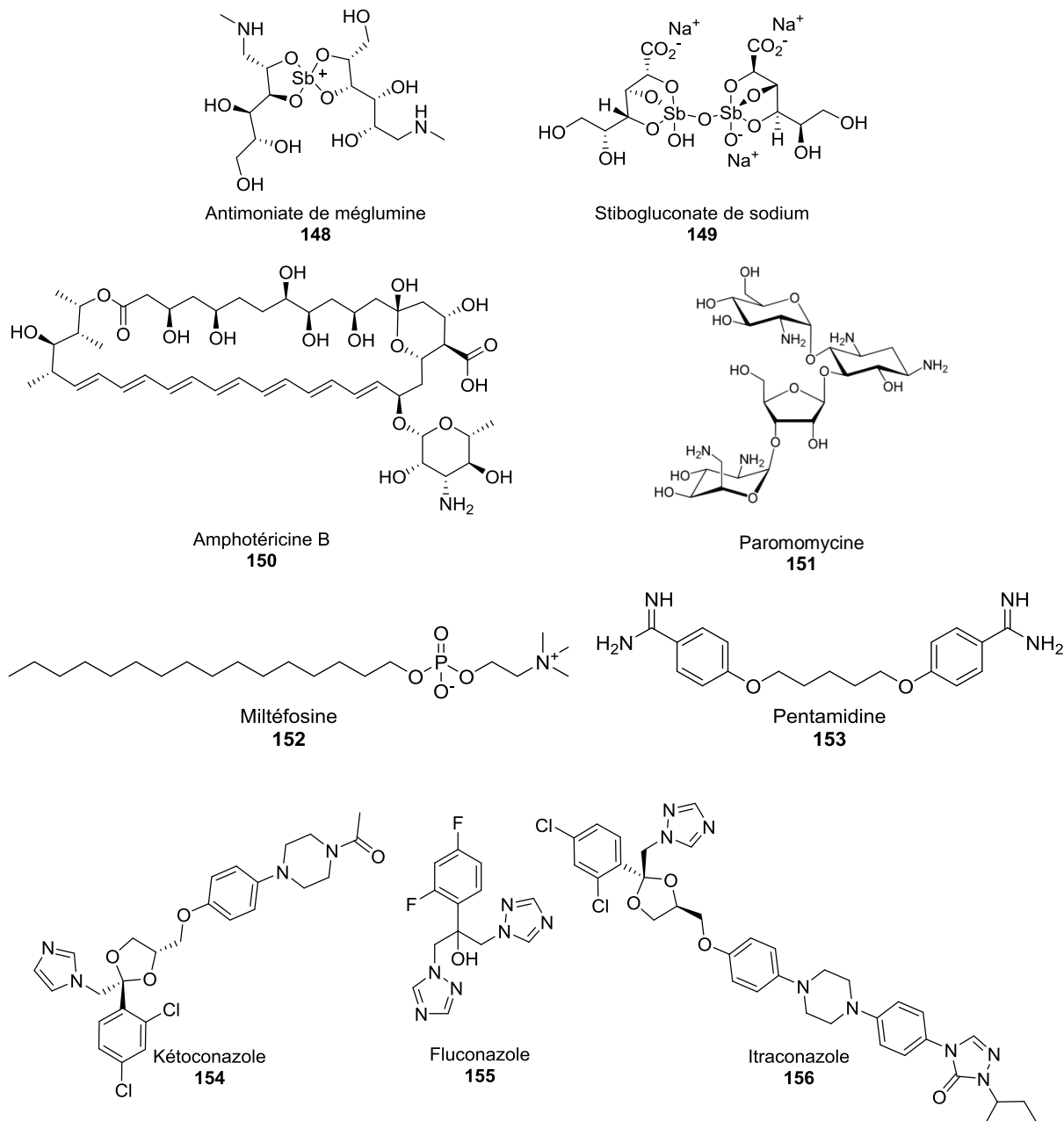


Figure 34 : Molécules utilisées dans le traitement des leishmanioses.

3.7.1 Dérivés pentavalents de l'antimoine

Deux dérivés pentavalents de l'antimoine sont disponibles pour le traitement des différentes formes de leishmanioses. L'antimoniote de méglumine (**148**) et le stibogluconate de sodium (**149**) ont tous deux été développés à partir de 1945¹⁶³. Ils possèdent une structure similaire et leur activité et toxicité sont relatives à leur contenu en antimoine sous forme Sb^{5+} , respectivement 81 et 100 mg/mL¹⁶¹. Les deux formes présentant des dosages différents, cela pose des problèmes de substitution dans le cadre de programmes internationaux de contrôle des leishmanioses¹⁷².

L'administration se fait par voie intramusculaire ou par voie intraveineuse en infusion lente. Une administration intralésionnelle peut également être réalisée pour traiter les cas de leishmaniose cutanée.

Ces traitements peuvent comporter des effets secondaires graves de toxicité cardiaque, hépatique et pancréatique¹⁶¹. Leur administration dans le cadre du traitement de la leishmaniose viscérale requière une hospitalisation prolongée allant de 3 à 4 semaines¹⁶³.

Les dérivés pentavalents agissent comme prodrogues en étant réduits en forme trivalente active. Leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé à l'heure actuelle. Ils pourraient avoir un effet sur plusieurs cibles parasitaires, notamment en inhibant des voies impliquées dans le métabolisme énergétique et la synthèse des macromolécules par inhibition de la glycolyse, de la β -oxydation des acides gras et de la phosphorylation de l'ADP^{163,173,174}. Les dérivés trivalents de l'antimoine interfèrent également avec le potentiel rédox des thiols au sein de la cellule en induisant l'efflux des thiols intracellulaires et en inhibant la trypanothione réductase¹⁷⁵.

3.7.2 Amphotéricine B

L'amphotéricine B (**150**) est un antibiotique de la famille des polyènes.

Sous sa forme désoxycholate, elle est administrée par voie intraveineuse. Des réactions à l'injection sont assez fréquentes incluant des fièvres, des frissons voire des thrombophlébites. Pour cela, il est préconisé d'administrer une dose de test puis de compléter avec la dose entière après une observation de 4 à 6 h.

Des effets secondaires de néphrotoxicité sont fréquents et peuvent conduire à l'arrêt du traitement chez certains patients. D'autres effets indésirables tels qu'une hypokaliémie ou des risques de myocardite peuvent apparaître.

Une formulation liposomale, Ambisome[®] présente la même efficacité que la forme désoxycholate mais avec une toxicité largement diminuée. Son administration est effectuée par perfusion sur 2 h mais les coûts associés au traitement rendent son accès difficile dans les zones d'endémie¹⁶¹.

L'amphotéricine B (**150**) agit en créant des pores au niveau de la membrane du parasite provoquant un efflux de cations qui est responsable de la mort du parasite. La sélectivité de l'amphotéricine B (**150**) vis-à-vis de *Leishmania* provient d'une plus grande affinité pour les stérols 24-substitués (notamment l'ergostérol) constitutifs de la membrane du parasite qui diffèrent du cholestérol des membranes des cellules mammifères¹⁷⁶.

3.7.3 Paromomycine

La paromomycine (**151**) est un antibiotique de la famille des aminosides administré généralement par voie intramusculaire. L'effet indésirable le plus fréquent correspond à une douleur au point d'injection. D'autres effets secondaires comme une ototoxicité réversible, une néphrotoxicité ou une hépatotoxicité sont plus rares aux doses thérapeutiques employées pour le traitement des leishmanioses¹⁷⁷.

Une formulation topique existe pour le traitement de la leishmaniose cutanée¹⁶¹. Elle présente l'avantage de faciliter l'administration du traitement et de réduire les effets secondaires et les coûts liés au traitement de la LC¹⁷⁸.

La paromomycine (**151**) provoque la dépolarisation de la membrane mitochondriale du parasite et un dysfonctionnement des ribosomes et de la respiration cellulaire ce qui contribuerait à l'activité antiparasitaire de la molécule¹⁷⁴.

3.7.4 Miltéfosine

Ce dérivé phospholipide est le premier dérivé antileishmanien disponible par voie orale. D'abord développé comme anticancéreux, la miltéfosine (**152**) est relativement bien tolérée avec comme effets secondaires fréquents des troubles gastro-intestinaux. Des effets indésirables plus sévères de type allergie cutanée, augmentation des marqueurs de toxicité hépatique ou rénale sont parfois observés. Potentiellement tératogène, elle est contre-indiquée aux femmes enceintes et aux femmes en âge de procréer en l'absence de contraception efficace¹⁶¹.

La miltéfosine (**152**) induit la mort du parasite par un mécanisme de type apoptotique¹⁷⁹ dont les déterminants sont encore mal connus. Elle provoque également une perturbation du métabolisme lipidique¹⁸⁰. Enfin, la cytochrome c oxydase pourrait également être une cible de cette molécule¹⁷⁴.

3.7.5 Pentamidine

L'iséthionate de pentamidine (**153**) est administré par voie intramusculaire ou préférentiellement en perfusion intraveineuse. Son utilisation en traitement de second choix pour les cas de leishmaniose viscérale réfractaires aux antimoniés est progressivement abandonnée. Des effets secondaires graves de type diabète, hypoglycémie, myocardite et néphrotoxicité limitent notamment son utilisation. La molécule a été abandonnée dans le traitement de la LV en Inde à la suite d'apparition de résistances contribuant à inverser la balance bénéfice-risque de la molécule^{161,181}.

La pentamidine (**153**) pénètre les formes amastigotes et promastigotes de *Leishmania* par un transporteur très affiné pour les diamidines. Le mécanisme d'action implique une altération du fonctionnement mitochondrial^{161,174}.

3.7.6 Dérivés azolés : kétoconazole, fluconazole et itraconazole

Les dérivés azolés (**154 – 156**) sont utilisés par voie orale et/ou par voie topique dans le traitement des leishmanioses cutanées et muco-cutanées. Ils agissent en inhibant la synthèse de l'ergostérol, constituant important de la membrane parasitaire.

3.7.7 Traitements locaux non médicamenteux

A côté des traitements médicamenteux conventionnels, d'autres approches comme la thermothérapie ou la cryothérapie sont employées dans le soin des leishmanioses.

La thermothérapie consiste à chauffer la zone lésionnelle, généralement à l'aide de radiofréquences, à une température de 50°C pendant 30 secondes. Différents schémas thérapeutiques sont employés, généralement plusieurs sessions sont réalisées avec ou sans adjonction de traitement médicamenteux. Les taux de guérison, même en l'absence de traitement médicamenteux présentent de très bons résultats¹⁵⁹.

La cryothérapie consiste à appliquer de l'azote liquide sur les lésions plusieurs fois par semaine sur plusieurs semaines en association ou non avec un traitement médicamenteux. Cette technique a montré de relativement bons résultats¹⁵⁹.

3.8 Coût des traitements

Le traitement de la leishmaniose viscérale fait généralement appel à une administration prolongée sur plusieurs semaines engendrant des coûts de traitement importants pour des populations peu solvables. Si la mise en place de programmes de l'OMS, l'action d'organisations non gouvernementales et la négociation des prix permettent de réduire les coûts des traitements, les difficultés économiques des populations exposées restent un problème majeur dans l'accès au traitement de cette pathologie.

A titre d'exemple, le Tableau 5 indique les coûts de traitement en 2011 pour un patient atteint de LV.

Tableau 5 : Prix des traitements de la leishmaniose viscérale (exprimés pour un patient de 35 kg) en USD. Prix disponibles au 01/07/2011¹⁷²

Traitement	Durée (j)	Coût (USD)
Ambisome® (20 mg/kg)	2-4	252
Amphotéricine B (1 mg/kg)	30	20
Miltéfosine (100 mg/j)	28	65-150
Paromomycine (15 mg/kg/j)	21	15
Stibogluconate de sodium (20 mg/kg/j)	30	56
Antimoniote de méglumine (20 mg/kg/j)	30	60

3.9 Résistances aux traitements

Les options disponibles pour le traitement de la leishmaniose sont relativement limitées et l'apparition de résistances menace les solutions thérapeutiques à la disposition des cliniciens.

Les premiers cas de résistances à des traitements antileishmaniens remontent aux années 1980 dans l'état du Bihar au Nord de l'Inde. Les dérivés antimoniés se sont ainsi montrés inefficaces chez plus de 30 % des patients. La cause principale de cette résistance est imputable aux schémas thérapeutiques employés de 10 mg/kg/j sur une durée courte de six à dix jours alors que les recommandations actuelles correspondent à une dose de 20 mg/kg/j sur trente jours. La disponibilité des traitements en dehors d'un cadre strictement médical a également contribué à des mésusages qui ont contribué au développement de résistances¹⁸¹. Dans ces régions, les isolats de *L. donovani* résistants ont montré des susceptibilités *in vitro* trois fois inférieures à celles des isolats normaux¹⁸².

Le remplacement de l'utilisation des dérivés antimoniés comme traitement de première intention dans le traitement de la LV dans l'état du Bihar par la pentamidine a provoqué une diminution de son efficacité de l'ordre de 30 % en l'espace d'une vingtaine d'années. La diminution de l'efficacité du traitement à la pentamidine dans cette région et l'importance de ses effets secondaires qui y sont associés ont rendu négative la balance bénéfice/risque de ce traitement qui a été remplacé. La pentamidine reste néanmoins efficace dans d'autres régions du monde, notamment en Amérique du Sud pour le traitement des formes cutanées et muco-cutanées¹⁸¹.

L'apparition de résistances aux autres molécules utilisées actuellement en thérapeutique n'a pas encore été observée sur le terrain. Cependant, une pression sélective réalisée sur des cultures de parasites *in vitro* a conduit à l'obtention de souches résistantes à l'amphotéricine B¹⁸³, à la miltéfosine et à la paromomycine¹⁸⁴.

L'utilisation de thérapies combinées, efficaces dans le cas d'autres maladies infectieuses comme la tuberculose et le paludisme, est actuellement en cours de développement dans le cadre d'essais cliniques¹⁶¹. De telles combinaisons thérapeutiques permettent non seulement de lutter contre l'apparition de résistances mais également de diminuer les doses, limitant ainsi une partie des effets indésirables et des coûts de traitements¹⁵⁹. Cependant, même si la survenue de résistances est minorée par l'utilisation de thérapies combinées, des essais *in vitro* ont montré qu'elles pouvaient tout de même donner lieu à l'apparition de phénomènes de résistance¹⁸⁵.

L'utilisation et le développement d'associations basées sur une molécule associée à un pharmacomodulateur permettant d'inhiber les mécanismes de résistance auxquels elle est confrontée¹⁸⁶ pourrait également permettre de prolonger la durée de vie du petit nombre de molécules antileishmaniennes disponibles en thérapeutique à l'heure actuelle.

3.10 Recherches en chimiothérapie antileishmanienne

Les molécules disponibles pour le traitement des leishmanioses posent un certain nombre de problèmes associés à leur toxicité, au coût des traitements, leur durée, la difficulté liée à leur administration (essentiellement parentérale) ainsi qu'à l'apparition de résistances pour un certain nombre de molécules alors que l'arsenal thérapeutique est lui-même déjà limité. C'est la raison pour laquelle il est important de développer de nouveaux traitements.

En plus des paramètres pharmacocinétiques classiques qui doivent permettre à la molécule d'atteindre son site d'action au sein de l'organisme, le caractère intracellulaire du parasite rend la mise au point de nouvelles molécules antileishmaniennes complexes puisque pour atteindre leur cible parasitaire, celles-ci vont devoir passer un nombre important de membranes.

3.10.1 Cibles potentielles pour le développement de nouvelles molécules^{173,187}

Parmi les voies de biosynthèse du parasite, certaines présentent un intérêt particulier pour la mise au point de nouvelles molécules antileishmaniennes. Celles-ci doivent être suffisamment différentes de celles de l'organisme hôte afin de présenter une sélectivité suffisante et causer un nombre limité d'effets secondaires.

Ainsi, on peut notamment distinguer les voies de biosynthèse et les cibles suivantes :

3.10.1.1 Voie de biosynthèse des stérols

Les membranes cellulaires de *Leishmania* sont caractérisées par la présence d'ergostérol et de stigmastérol à la différence de celles des cellules mammifères qui contiennent du cholestérol. Cette différence permet d'envisager la mise au point de molécules sélectives en interférant avec les enzymes clés de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. C'est le cas des dérivés azolés (**154 - 156**) dont certains sont déjà utilisés dans le traitement de la leishmaniose cutanée en inhibant la 14- α -méthylstérol-14-déméthylase.

3.10.1.2 Trypanothione réductase

La trypanothione réductase est une enzyme de détoxification permettant la survie du parasite au sein des macrophages dans un environnement oxydatif particulièrement marqué. Le site actif de l'enzyme présentant des différences significatives par rapport à la glutathione réductase mammifère, elle pourrait faire l'objet du développement de molécules sélectives.

3.10.1.3 Lipophosphoglycane

L'un des composants majeurs de l'enveloppe de *Leishmania* est le lipophosphoglycane (LPG), responsable de la protection du parasite vis-à-vis de la voie alterne du complément et des hydrolases. Le LPG joue un rôle important dans la virulence des promastigotes.

3.10.1.4 Voie de la glycolyse

Les enzymes responsables de la glycolyse chez *Leishmania* font l'objet d'une compartimentation (glycosomes) et leurs séquences sont suffisamment éloignées de celles de l'hôte mammifère pour envisager le développement de molécules sélectives.

3.10.1.5 Voie de sauvetage des purines

Les parasites du genre *Leishmania* sont incapables de synthétiser *de novo* le noyau purine et sont de ce fait entièrement dépendants du recyclage des bases puriques de l'hôte. Certaines transférases de cette voie présentent des différences suffisamment significatives avec celles de l'hôte pour envisager le développement d'inhibiteurs sélectifs. L'allopurinol, qui cible l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) est incorporé dans les acides nucléiques du parasite après phosphorylation provoquant son activité antileishmanienne.

Le transport des nucléosides est également réalisé par des transporteurs différents de ceux des cellules mammifères les indiquant comme cible potentielle pour le développement de nouvelles molécules.

3.10.1.6 Protéines kinases cyclines-dépendantes (CDK)

Les CDK ont un rôle crucial pour la multiplication cellulaire. Chez *Leishmania* les cdc-2 related kinases (CRK), protéines homologues des CDK assurent les mêmes fonctions. Des inhibiteurs sélectifs de ces enzymes (CRK3) pourraient s'avérer intéressants.

3.10.1.7 Enzymes de la voie de biosynthèse des polyamines.

Les polyamines et leurs voies métaboliques présentent un rôle important dans la croissance, la différenciation et la résistance au stress oxydant. L'arginase et l'ornithine décarboxylase sont deux enzymes présentes chez *Leishmania* et responsables de la synthèse des polyamines qui pourraient représenter des cibles potentielles. Les transporteurs de polyamines (LmPOT1) pourraient aussi être envisagés comme cibles.

3.10.1.8 Voies de biosynthèse des folates

La voie de biosynthèse des folates est une voie qui présente un intérêt important dans la recherche de molécules anti-infectieuses et anticancéreuses. Les folates sont des cofacteurs importants dans la synthèse de l'ADN et de l'ARN ainsi que dans le métabolisme des acides aminés. De par leur importance dans la croissance et la multiplication cellulaire, les enzymes impliquées dans cette voie sont d'importantes cibles thérapeutiques, en particulier la thymidilate synthase (TS) et la dihydrofolate réductase (DHFR).

Chez les Trypanosomatidae, la TS et la DHFR existent sous la forme d'un seul polypeptide et les inhibiteurs classiques de la DHFR se sont montrés inefficaces chez *Leishmania*. Le parasite possède une autre enzyme, la ptéridine réductase (PR) qui peut être surexprimée pour pallier à l'inhibition de la DHFR-TS. Ainsi, une inhibition efficace de la voie des folates chez *Leishmania* qui pourrait impacter la croissance du parasite devrait inhiber à la fois la DHFR-TS et la PR.

La connaissance de ces cibles moléculaires et le développement des tests d'activité *in vitro* correspondants pourraient permettre de développer des modèles simplifiés permettant le criblage à haut débit de vastes chimiothèques. Le développement d'inhibiteurs sélectifs par une démarche de chimie médicinale basée sur la cible impliquée pourrait permettre d'accélérer la mise en évidence de nouveaux candidats chefs-de-file.

3.10.2 Modèles expérimentaux

Différents modèles expérimentaux ont été développés afin de tester et mettre en évidence de nouvelles molécules antileishmaniennes. Certains modèles *in vitro* basés sur les cibles moléculaires d'intérêt du parasite énoncées au paragraphe précédent ont été mis au point. Les molécules ainsi développées ne montrent cependant pas toujours une efficacité dans un contexte cellulaire plus complexe.

Les modèles *in vitro* impliquant des parasites en culture permettent d'obtenir des informations bien plus pertinentes sur l'activité d'une molécule dans un contexte biologique et présentent une meilleure corrélation avec une éventuelle activité *in vivo*. En parallèle, des tests de cytotoxicité réalisés sur des cellules mammifères en culture permettent d'évaluer la sélectivité des molécules vis-à-vis du parasite. Cependant, la culture de *Leishmania* est exigeante et peut s'avérer limitante¹⁸⁸. Pour les molécules avec un fort potentiel, des modèles animaux permettent de confirmer, le cas échéant, les touches dans un contexte physiopathologique en tenant compte de paramètres pharmacocinétiques et toxicologiques plus proches de la pathologie chez l'être humain.

3.10.2.1 Modèles *in vitro* extracellulaires

La culture des formes promastigotes de *Leishmania* est la plus simple à mettre en œuvre. C'est une des raisons pour laquelle elle a largement été utilisée pour évaluer le potentiel antileishmanien des molécules. Cependant, la forme promastigote n'existe que chez le vecteur de la maladie. En effet, le métabolisme et l'environnement dans lequel évoluent ces formes présentes chez le vecteur sont très différentes des formes amastigotes présentes chez l'hôte vertébré. Les résultats obtenus à partir de tels modèles sont relativement faiblement corrélés avec les activités observées sur modèles animaux et ils ne présentent pas ou peu d'intérêt pour le criblage de potentielles molécules antileishmaniennes^{188,189}.

Les amastigotes de certaines espèces de *Leishmania* sont cultivables seuls dans des milieux adaptés¹⁹⁰. La culture des amastigotes axéniques imite parfaitement les conditions biologiques observées à l'intérieur du macrophage (pH acide et températures supérieures à 32°C) et répondent bien aux composés utilisés en clinique humaine. Le criblage de molécules sur ces formes en culture présente en outre plusieurs avantages : les amastigotes correspondent à la phase responsable de la symptomatologie chez l'hôte vertébré, la culture du parasite est pratiquement aussi simple que pour les formes promastigotes et la quantification de l'activité antileishmanienne est relativement facile à mettre en œuvre, rapide et présente un coût relativement limité.

Ce modèle est toutefois semi-prédictif puisqu'il ne prend en compte ni la pénétration des molécules dans la cellule hôte du parasite, ni l'environnement particulier du phagolysosome dans lequel elle se trouve^{188,189}. De plus le métabolisme des amastigotes axéniques est relativement différent des formes intracellulaires comme l'indiquent notamment plusieurs études protéomiques comparatives¹⁹¹.

3.10.2.2 Modèles *in vitro* intracellulaires

Le modèle basé sur l'évaluation de la susceptibilité aux molécules de formes amastigotes intramacrophagiques est beaucoup plus proche de la réalité physiopathologique de l'hôte mammifère. Ce modèle est néanmoins plus complexe à mettre en œuvre et est généralement utilisé en deuxième intention pour des molécules ayant montré de bonnes activités et sélectivités vis-à-vis d'amastigotes axéniques. Il a l'avantage de présenter une bonne sensibilité aux molécules antileishmaniennes usuelles. Les cellules péritonéales exsudatives de souris sont simples à obtenir en petite quantité mais les propriétés des macrophages péritonéaux peuvent ne pas correspondre aux propriétés des macrophages du système réticulo-histiocytaire et cutanés humains infectés en clinique.

L'évaluation de l'activité des composés testés est mesurée soit par comptage microscopique du nombre de macrophages infectés ou du nombre d'amastigotes par macrophage¹⁹², soit à l'aide de méthodes fluorimétriques ou colorimétriques¹⁸⁹.

L'inconvénient majeur des modèles *in vitro* existants est l'absence de métabolisme des molécules par l'hôte, qu'elle soit totale (promastigotes, amastigotes axéniques), ou partielle (macrophages infectés). Il est par conséquent difficile de prévoir si la nature et la concentration des principes actifs et de leurs métabolites sont similaires à celles rencontrées par les organismes au niveau des lésions humaines.

3.10.2.3 Modèles *in vivo*

Les molécules ayant présenté de bonnes activités sur des modèles cellulaires peuvent alors être évaluées sur des modèles animaux qui sont censés correspondre davantage à la physiopathologie et aux mécanismes immunitaires impliqués chez l'humain. Plusieurs modèles *in vivo* chez l'animal ont donc ainsi été développés sans toutefois réussir à reproduire tout à fait ce qui se passe chez l'être humain. Plusieurs espèces animales servent de modèles expérimentaux pour la leishmaniose viscérale. Parmi les plus importants les souris BALB/c et les hamsters dorés sont utilisés comme modèles primaires, le chien comme modèle secondaire et les primates non humains comme modèles tertiaires. Au laboratoire, les seuls modèles réellement accessibles se limitent néanmoins aux rongeurs.

Les modèles *in vivo* sont potentiellement comparables à une situation clinique, même si le manque de données immunologiques pour ces modèles constitue un inconvénient. Les modèles animaux permettent notamment de déterminer l'efficacité des molécules en relation avec certains de leurs paramètres pharmacocinétiques mais également d'évaluer leur toxicité à l'échelle d'un organisme entier^{188,189}.

3.10.3 Molécules en cours de développement

De nombreuses molécules montrent des activités antileishmaniennes intéressantes *in vitro* et même *in vivo* sur modèles animaux. Cependant, pour des raisons d'efficacité et de toxicité, relativement peu d'entre elles arrivent au stade des études cliniques^{173,193}.

Parmi les molécules actuellement en étude clinique, le composé CpG-D35 est un oligodéoxynucléotide dont le but est de stimuler l'immunité innée afin de faciliter la clairance parasitaire (Figure 35). Il fait actuellement l'objet d'études précliniques dans le cadre du traitement de la LV et de la PKDL¹⁹⁴.

L'essentiel des études cliniques sont en phase II et impliquent un traitement de chimiothérapie seul ou associé à la thermothérapie. Les chimiothérapies mises en jeu impliquent essentiellement des molécules déjà connues mais dans des formulations ou combinaisons thérapeutiques originales. Parmi celles-ci, citons notamment :

- Le fexinidazole, un nitroimidazole en phase IIa dans le traitement de la LV qui pourrait aboutir à l'obtention d'un nouveau traitement par voie orale dans cette indication. Une combinaison avec la miltéfosine est également à l'étude en phase IIa¹⁹⁴ ;
- Un protocole de traitement rapide de la LC qui est actuellement en essai clinique de phase IIa. Il fait appel à la thermothérapie (1 fois 50°C pendant 30 s) associée à un traitement de courte durée (3 semaines) par la miltéfosine¹⁹⁴ ;
- Antifoleish, une formulation topique à base d'amphotéricine B étudiée en phase Ib/II des essais cliniques dans le cadre de la leishmaniose cutanée¹⁹⁴ ;
- Enfin, une étude de phase III impliquant une combinaison à base de la formulation liposomale d'amphotéricine B Ambisome® et de miltéfosine est actuellement évaluée pour les patients atteints de LV présentant une co-infection avec le VIH¹⁹⁴.

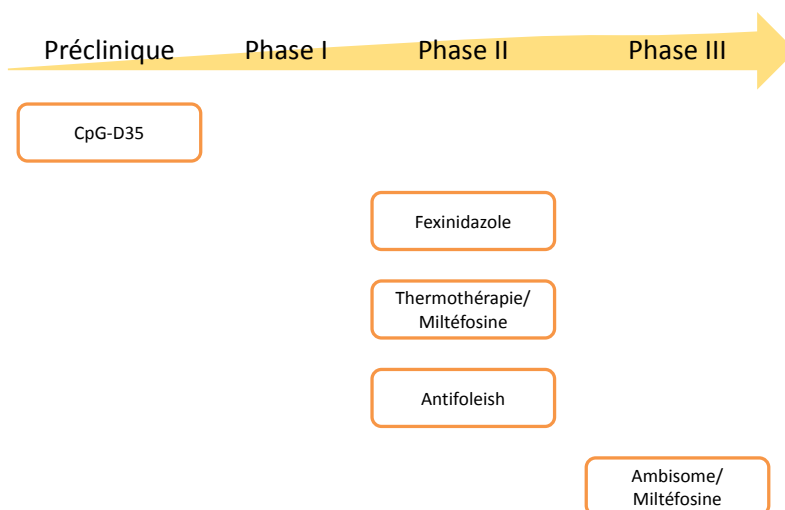


Figure 35 : Principaux traitements contre la leishmaniose en cours de développement.

Par ailleurs, plusieurs combinaisons de molécules déjà mises sur le marché sont également à l'étude dans différents pays pour éviter l'apparition de phénomènes de résistance et permettre la diminution des doses de chaque molécule permettant la limitation des effets indésirables associés et le coût global des traitements¹⁶¹.

3.11 Intérêt des substances naturelles dans la découverte de nouvelles molécules antileishmaniennes

Les substances naturelles constituent un réservoir important de molécules antileishmaniennes potentielles.

Nous mentionnerons ici une partie des espèces et molécules qui ont montré une activité significative sur plusieurs modèles animaux de leishmanioses cutanée et/ou viscérale.

La revue de la littérature concernant les espèces médicinales utilisées traditionnellement contre les manifestations cliniques des leishmanioses montre qu'il s'agit essentiellement de plantes des principaux pays d'endémie de la leishmaniose, tous situés en Amérique latine : la Colombie^{195,196}, le Brésil¹⁹⁷, le Pérou^{198,199} et le Mexique²⁰⁰ en particulier.

Parmi les plantes utilisées traditionnellement, une activité antileishmanienne a pu être justifiée sur des bases scientifiques pour un certain nombre d'espèces médicinales. C'est le cas notamment d'espèces appartenant aux genres *Allium*, *Aspidosperma*, *Senna*, *Croton*, *Ocimum* et *Physalis*¹⁹⁷.

Une revue récente de Hussain *et al.* décrit 340 molécules d'origine naturelle étudiées entre 2002 et 2012 pour leurs propriétés antileishmaniennes¹⁷³. Parmi les classes de métabolites les plus étudiées, on retrouve notamment des alcaloïdes, des dérivés phénoliques, des terpènes, des acétogénines, des peptides et des quinones.

Certaines molécules en particulier, montrent des activités *in vivo* intéressantes sur modèles animaux (Figure 36).

C'est notamment le cas de la γ -fagarine (**157**), un alcaloïde appartenant à la famille des furoquinolines qui a montré une diminution significative des lésions et du nombre de parasites après administration par voie orale sur un modèle murin de leishmaniose cutanée²⁰¹. Deux coumarines, le (+)-3-(1'-diméthylallyl)-décursinol (**158**) et la (-)-héliétine (**159**) isolées de la même plante, *Helietta apiculata* (Rutaceae) ont également montré des activités significatives *in vivo* sur le même modèle cutané après une administration sous-cutanée²⁰¹.

La licochalcone A (**160**), une chalcone prénylée a montré une activité intéressante par voie orale sur des modèles de leishmanioses viscérales et cutanées, respectivement chez la souris et le hamster²⁰².

La flavokavaine B (**161**), une autre chalcone isolée des racines de *Piper rusbyi* (Piperaceae) a montré une activité significative *in vitro* sur un modèle cutané murin après administration sous-cutanée du dose de 5 mg/kg/j pendant 28 jours²⁰³.

La quercétine (**162**), un flavonol largement distribué dans le monde végétal, a également montré une activité, toutefois modérée sur un modèle de leishmaniose viscérale chez la souris avec une diminution de la charge parasitaire de 15 % par rapport au contrôle, après 5 jours d'administration intrapéritonéale d'une dose de 30 mg/kg²⁰⁴.

Le nérolidol (**163**), un sesquiterpène, a montré une activité significative sur un modèle murin de leishmaniose cutanée par administration intrapéritonéale ou topique même si la guérison des animaux n'a pu être observée²⁰⁵. Plus récemment, une huile essentielle riche en nérolidol a également montré des activités antileishmaniennes intéressantes²⁰⁶.

Un dérivé diterpène de type clérodane (**164**) a montré une bonne activité sur un modèle de leishmaniose viscérale à la dose de 50 mg/kg après administration par voie orale chez le hamster, sans montrer de signe de toxicité particulière²⁰⁷.

Les maésabalides III (**165**) et IV (**166**) isolés de *Maesa balansea*, une plante médicinale asiatique a montré une activité significative sur des modèles de leishmanioses viscérales et cutanées. Néanmoins, PX-6518 contenant un mélange de 6 maésabalides a montré des effets toxiques qui pourraient compromettre un développement ultérieur²⁰⁸.

Une partie des molécules citées offrant de nouveaux châssis moléculaires, fait en outre l'objet d'études de relation structure-activité afin de développer de nouveaux analogues synthétiques¹⁷³.

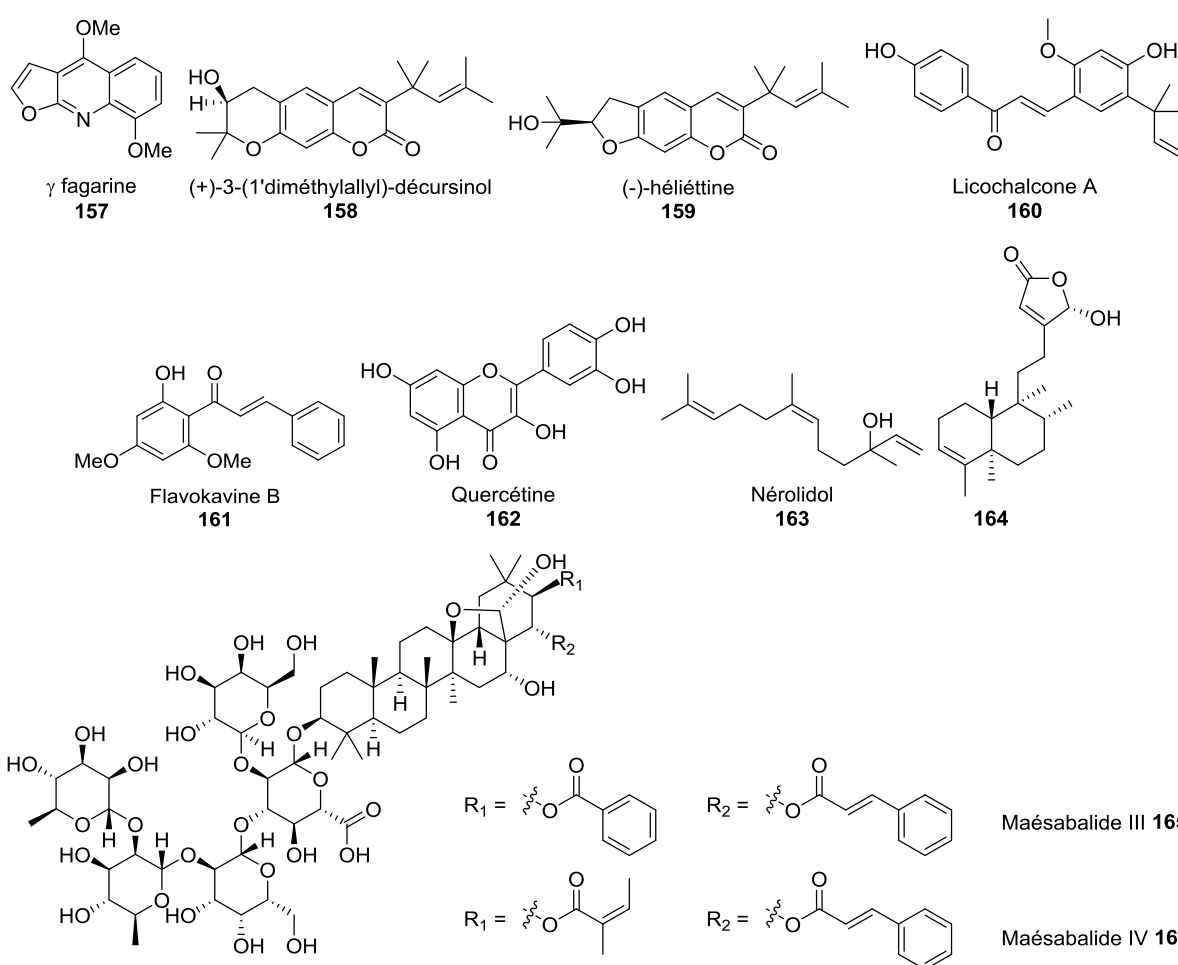


Figure 36 : Exemples de molécules naturelles ayant montré une activité significative sur plusieurs modèles animaux de leishmanioses cutanées et viscérales.

4 Le paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il existe plus de 100 espèces de *Plasmodium* capable d'infecter toutes sortes de vertébrés (reptiles, oiseaux, mammifères). Parmi elles, quatre possèdent un réservoir strictement humain : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. Des cas d'infections humaines par *P. knowlesi*, une espèce zoonotique présente en Asie du Sud-Est, ont également été observées et d'autres espèces zoonotiques peuvent exceptionnellement infecter l'homme²⁰⁹. Ces parasites sont transmis par la piqûre d'un moustique femelle appartenant au genre *Anopheles*. Il existe environ 400 espèces du genre *Anopheles* mais parmi elles, seulement une trentaine montre un rôle significatif de vecteur. Ces espèces présentent des aires géographiques de répartition variées qui conditionnent les zones où s'effectue la transmission de la maladie (Figure 37)²¹⁰.

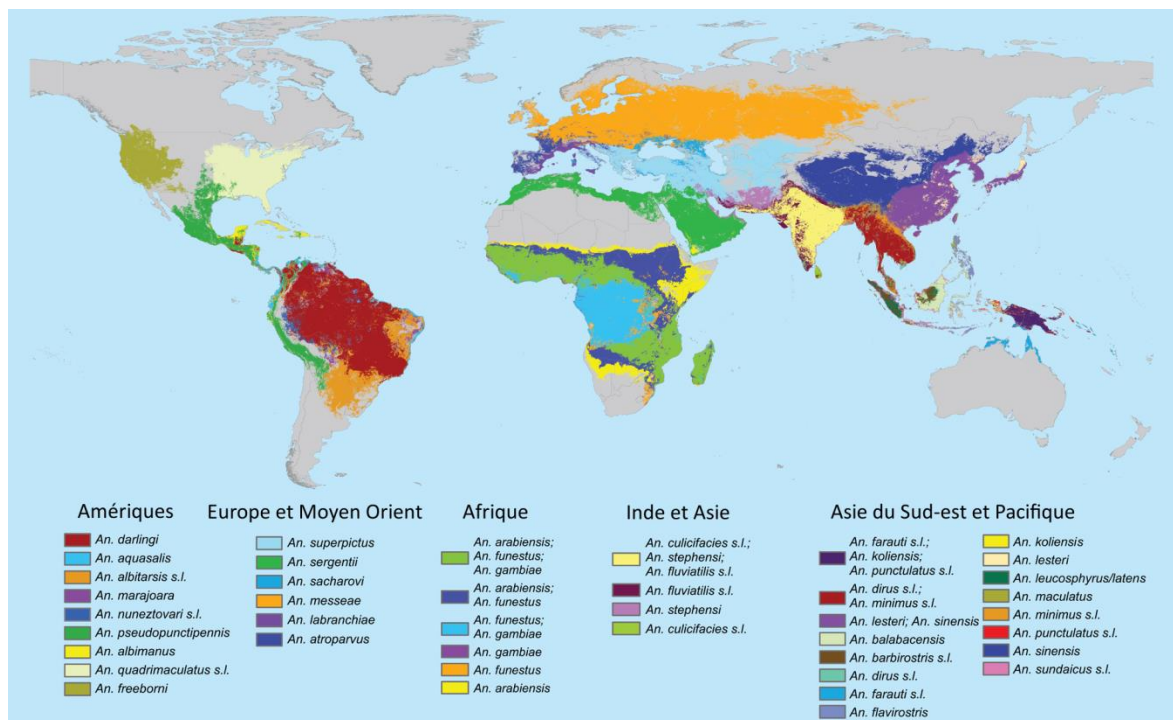


Figure 37 : Carte de répartition des principales espèces d'*Anopheles* vectrices du paludisme. D'après Sinka *et al.*, 2012²¹⁰.

4.1 Répartition géographique des différentes espèces de *Plasmodium*

Les deux espèces les plus répandues, *P. falciparum* et *P. vivax*, sont aussi celles qui ont le plus d'impact sur la santé humaine.

P. falciparum est présent dans l'ensemble des zones tropicales et intertropicales en Afrique, Amérique et Asie du Sud-Est (Figure 38). C'est l'espèce la plus dangereuse et est responsable de la plupart des décès liés au paludisme. A elle seule, elle représente plus de 90% des cas de paludisme en Afrique²¹¹.

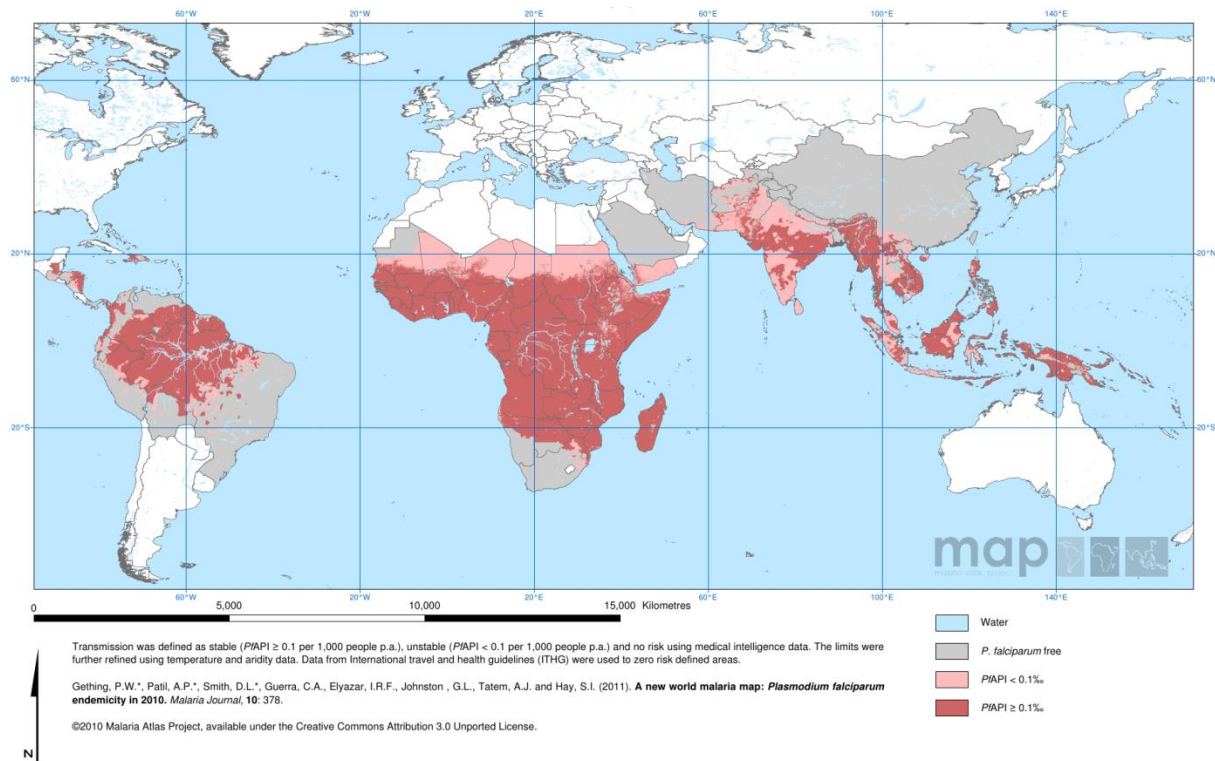


Figure 38 : Limites spatiales de la transmission du paludisme à *P. falciparum* dans le monde en 2010²¹².

P. vivax a une distribution plus étendue car les vecteurs responsables de sa transmission sont capables de survivre à des températures inférieures et à plus haute altitude. Cette espèce est caractérisée par l'existence de formes dormantes infectant les hépatocytes (hypnozoïtes) qui peuvent conduire à des rechutes des mois, voire des années après la primo-infection. Cette capacité lui permet de survivre pendant les périodes où les vecteurs ne peuvent pas assurer la transmission. L'espèce est relativement peu fréquente en Afrique à cause de la fréquence du groupe sanguin Duffy-négatif. Cette protéine de surface des hématies est en effet nécessaire pour que le parasite puisse envahir les globules rouges²¹³.

La distribution de *P. malariae* est plus clairsemée. Il est principalement présent en Afrique subsaharienne et dans le Sud-Ouest du pacifique²¹⁴.

On retrouve *P. ovale* essentiellement en Afrique ainsi que dans les îles du Pacifique Ouest. Elle est aussi présente de façon très sporadique (prévalence < 5%) au Moyen Orient, en Inde et en Asie du Sud-Est²¹⁴.

P. knowlesi est une espèce zoonotique dont l'hôte mammifère est normalement le macaque mais qui peut également infecter l'homme. Elle est présente dans les forêts du Sud-Est asiatique²¹⁵.

4.2 Prévalence

L'OMS estime à 3,3 milliards le nombre d'individus à risque d'infection par le paludisme dans 97 pays à travers le monde (Figure 39).

Les dernières estimations font état 198 millions de cas de paludisme pour l'année 2013, responsables du décès de près de 600 000 personnes à travers le monde. Malgré ces chiffres toujours dramatiques, le nombre de cas et les taux de mortalité ont diminué respectivement de 30 % et 47 % depuis l'an 2000 grâce au programme global de lutte contre le paludisme mené par l'OMS avec l'aide des ministères de la santé des zones d'endémie et un nombre important d'autres partenaires (Fonds Mondial, ONG, Fondations, ...). D'importants efforts restent toutefois à effectuer afin de diminuer de façon importante les chiffres alarmants liés à cette pathologie.

C'est en Afrique que l'impact du paludisme est le plus important. C'est sur ce continent que surviennent 90 % de l'ensemble des décès liés à la maladie. La population des enfants de moins de 5 ans est la plus exposée, représentant près de 80 % des décès liés au paludisme²¹¹.

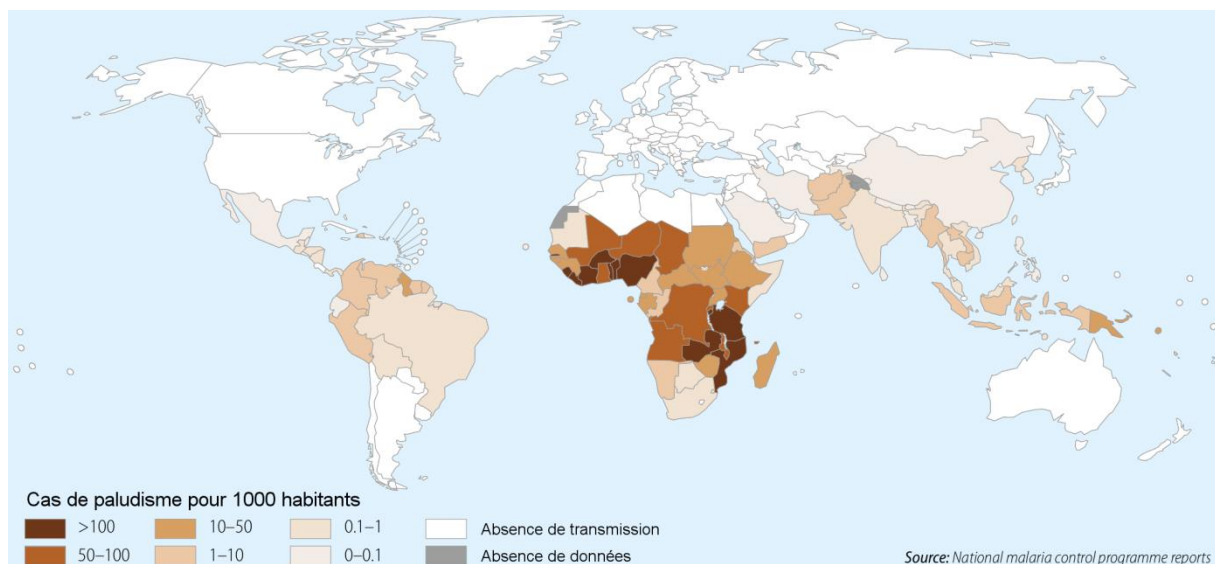


Figure 39 : Nombre de cas de paludisme dans le monde pour 1000 habitants en 2013 (OMS, 2014)²¹¹.

4.3 Cycle parasitaire

L'infestation se fait par inoculation du parasite sous sa forme sporozoïte par l'anophèle femelle lors d'un repas sanguin (1) (Figure 40). Après un premier séjour très court dans la circulation générale, les sporozoïtes infestent les hépatocytes (2) où ils se multiplient de manière asexuée, par schizogonie, donnant naissance à un schizonte plurinucléé dans le cytoplasme de l'hépatocyte (3). Cette phase hépatocytaire (A) dure 1 à 3 semaines. Puis, les schizontes provoquent la lyse des hépatocytes, libérant de nombreux mérozoïtes dans la circulation générale (4) qui envahissent les hématies grâce à leur complexe apical (5). Ils sont alors internalisés dans des vacuoles parasitophores, on parle de trophozoïtes. Ceux-ci se multiplient de manière asexuée pour donner des schizontes qui libèrent des mérozoïtes, qui vont infester d'autres hématies, après maturation (6), et permettre à un autre cycle érythrocytaire de redémarrer. La lyse massive de nombreuses hématies entraîne une anémie chez la personne parasitée. Dans les hématies, le parasite se nourrit d'hémoglobine et rejette l'hème sous forme d'hémozoïne, un pigment pyrogène responsable des accès de fièvre caractéristiques de la maladie.

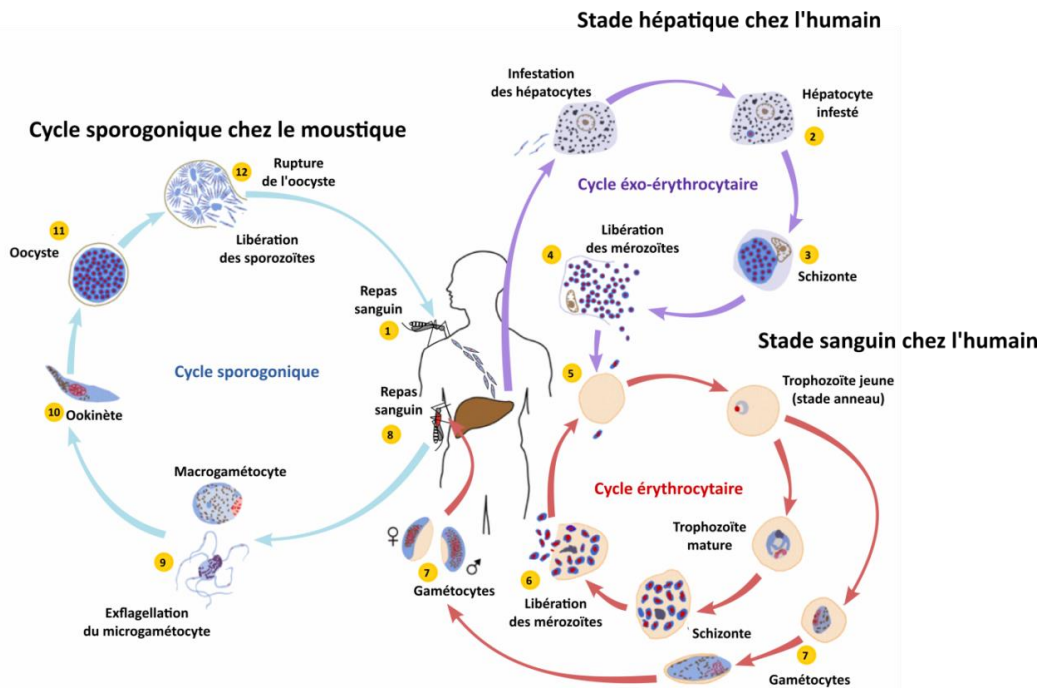


Figure 40 : Cycle parasitaire de *Plasmodium* sp. d'après le CDC²¹⁶.

Certains trophozoïtes deviennent des cellules sexuées, les gamétocytes mâles (microgamétocytes) ou femelles (macrogamétocytes) (7), qui peuvent uniquement se développer chez l'anophèle. Ce sont les gamétocytes qui constituent la forme infestante pour le moustique. Au cours de son repas sanguin (8), l'anophèle femelle ingère des gamétocytes qui vont mûrir dans son estomac (9). Ceux-ci donnent naissance à des gamètes mâles qui vont féconder les gamètes femelles donnant naissance à un œuf mobile, l'ookinète (10). Après avoir traversé la paroi du mésentéron, celui-ci s'enkyste pour former un oocyste (11). L'oocyste subit une sporogonie et libère des sporozoïtes (12) qui vont migrer vers les glandes salivaires et pourront contaminer un autre hôte lors du repas sanguin suivant²¹⁶.

4.4 Physiopathologie de la maladie

La physiopathologie du paludisme est associée à un ensemble de mécanismes cellulaires, humoraux et immunologiques. Les modifications subies par les hématies parasitées expliquent ces mécanismes dont la gravité dépend à la fois des spécificités liées à l'hôte et à l'espèce de *Plasmodium* impliquée.

Le développement du parasite dans l'érythrocyte entraîne un certain nombre de modifications au niveau de l'hématie, notamment des altérations membranaires impliquant une modification de la forme et de la déformabilité de l'hématie parasitée. De nouveaux antigènes membranaires d'origine parasitaire ou liés à la modification des composants érythrocytaires sont également observés ainsi que l'apparition d'adhésines responsables notamment des phénomènes d'auto-agglutination des érythrocytes infectés à l'origine des formes graves de la maladie.

L'hémolyse observée est liée à plusieurs phénomènes comme la rupture des globules rouges lors de la libération des mérozoïtes, la prise en charge de certaines hématies parasitées par les macrophages ainsi que la réduction de la déformabilité cellulaire. La lyse des globules rouges infectés libère de l'hémozoïne provenant de la digestion de l'hémoglobine par le parasite. Cette substance présente des propriétés pyrogènes à l'origine des fièvres liées à la maladie. Le relargage important d'hémoglobine provoque un ictère caractéristique suite à sa métabolisation en bilirubine par le foie. En cas d'hémolyse massive, l'excès d'hémoglobine peut conduire à une surcharge rénale conduisant à un phénomène d'hémoglobinurie^{217,218}.

Une partie des hématies parasitées est phagocytée par les macrophages dans la rate qui exerce également une séquestration des hématies parasitées dont la déformabilité est altérée, contribuant à l'anémie palustre²¹⁹.

Des phénomènes de cytoadhérence et d'autoagglutination, concernant essentiellement *P. falciparum*, sont en lien avec la gravité du paludisme. L'accumulation d'amas d'hématies dans les microvaisseaux réduit le flux sanguin pouvant être à l'origine de phénomènes hypoxiques.

Ce phénomène est amplifié par la diminution de la déformabilité des hématies et est responsable de lésions dans différents organes en particulier au niveau cérébral²²⁰.

4.5 Formes cliniques du paludisme²¹⁸

La symptomatologie du paludisme est liée à la présence des parasites dans les hématies. Les signes cliniques sont variables allant de l'infection asymptomatique à l'accès simple avec une évolution possible vers un accès grave. La chronicité de l'infection en zone d'endémie peut conduire à d'autres manifestations cliniques particulières.

4.5.1 Paludisme simple

Le paludisme simple se définit par la succession de poussées fébriles associées à d'autres symptômes liés à la présence du parasite au niveau sanguin. Il fait suite à une période d'incubation asymptomatique correspondant à la phase hépatique primaire de durée variable allant de 7 jours à 2 mois pour les infections à *P. falciparum* et de 10 à 15 jours voire plusieurs années pour les espèces *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*.

La primo-invasion concerne les populations non immunisées. Elle est définie par une symptomatologie aspécifique de syndrome grippal avec une fièvre désarticulée, des frissons, des céphalées et des myalgies. Ces symptômes sont souvent associés à des troubles gastro-intestinaux et une anorexie.

En l'absence de traitement, une splénomégalie, une hépatomégalie et un ictère peuvent être observés après quelques jours.

La périodicité des accès dépend de l'espèce impliquée : quotidienne pour *P. knowlesi*, tous les 2 jours (fièvre tierce) pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* et tous les 3 jours (fièvre quarte) pour *P. malariae*.

Ces accès, d'une dizaine d'heures sont caractérisés par la succession de trois phases cliniques à répétition périodique impliquant des frissons intenses suivis d'une forte fièvre accompagnée de céphalées et de douleurs abdominales laissant place à une sudation importante pouvant conduire à une hypothermie. La répétition de ces accès conduit à une anémie croissante et à une splénomégalie.

Une guérison spontanée peut être possible mais des phénomènes de reviviscence peuvent avoir lieu plusieurs mois ou années après la piqûre infectante pour les espèces *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*.

4.5.2 Paludisme grave

Les accès graves sont généralement imputables à *P. falciparum* mais les espèces *P. vivax* et *P. knowlesi* peuvent également en être responsables.

Les enfants, les personnes âgées, les femmes enceintes, les sujets naïfs vis-à-vis du paludisme, les sujets splénectomisés ou immunodéprimés sont particulièrement à risque en ce qui concerne les accès graves.

Les manifestations cliniques du paludisme grave peuvent survenir de manière isolée ou en association. Les accès graves sont notamment caractérisés par des troubles de la conscience, des convulsions, un syndrome de détresse respiratoire aigu, une défaillance cardio-circulatoire, un œdème pulmonaire, la survenue d'hémorragies, un ictère, une hémoglobinurie, une anémie sévère, une hypoglycémie, une acidose métabolique et une insuffisance rénale.

Le pronostic global dépend de la rapidité du diagnostic et de la prise en charge avec des risques importants de mortalité ou de séquelles associées.

4.5.3 Paludisme de la femme enceinte

Les femmes enceintes présentent un risque majoré de paludisme en particulier chez les primipares. Le placenta présente des ligands favorisant la cytoadhérence des globules rouges infectés ayant pour conséquence une surmortalité infantile, un risque d'avortement spontané ou de mort fœtale.

4.6 Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique repose sur la mise en évidence de formes asexuées de *Plasmodium* par examen microscopique d'un échantillon sanguin par frottis sanguin et goutte épaisse. Celui-ci permet un diagnostic de l'espèce et une estimation de la charge parasitaire. Il doit être réalisé en moins de deux heures.

Dans le cas où un diagnostic microscopique de qualité ne peut pas être assuré, un test de diagnostic rapide peut être utilisé. Ces tests sont basés sur la mise en évidence d'antigènes parasitaires par une méthode immunochromatographique. Les antigènes détectables combinés dans ces tests sont généralement l'HRP2 (Histidine Riche Protein 2), spécifique de *P. falciparum*, la pLDH (Lactate déshydrogénase) ou l'aldolase, panspécifiques du genre *Plasmodium*²²¹.

La PCR peut également être utilisée. C'est une méthode extrêmement sensible mais longue à mettre en œuvre et coûteuse, qui nécessite un laboratoire spécialisé ne permettant pas de l'utiliser en routine²¹⁸.

4.7 Développement de vaccins

Le développement de vaccins contre le paludisme s'avérerait particulièrement efficace pour circonscrire l'impact humain de la maladie. Avec l'intérêt et les moyens économiques déployés depuis les années 2000 pour la lutte contre le paludisme, une quarantaine de candidats vaccins ont pu accéder au stade des essais cliniques entre 2000 et 2010²²².

Parmi les principaux vaccins en cours d'étude clinique (Figure 41), différents stades du parasite, pré-érythrocytaires, sanguins ou sexués sont ciblés. Les antigènes les plus étudiés pour cibler le stade érythrocytaire sont les familles MSP (*merozoite surface protein*), AMA-1 (*apical membrane antigen*) et EBA 175 (*erythrocyte binding antigen*)²²².

Le candidat vaccin le plus avancé développé par GSK, le RTS,S-A01 a passé les essais cliniques de phase III en 2014 en montrant une protection relative pendant 12 mois sur des nourrissons de 5 à 17 mois. Il a cependant été montré que l'efficacité du vaccin était inversement proportionnelle à l'exposition à la transmission et que son efficacité diminuait après un an. Compte-tenu de la sécurité d'emploi associée et de l'importance de la mortalité en zone d'endémie, ces résultats ont cependant conduit l'Agence Européenne du Médicament (EMA) à adopter une opinion scientifique favorable à l'utilisation du vaccin en zone d'endémie au mois de juillet 2015²²³. L'OMS devrait se prononcer sur le sujet en novembre 2015.

La construction du vaccin est basée sur une protéine recombinante de fusion entre la *circumsporozoite protein* (CSP) de *P. falciparum* et un antigène de surface du virus de l'hépatite B associé à l'adjuvant AS01E développé par GSK. Il cible donc un stade pré-érythrocytaire et protège également contre l'hépatite B.

Un autre vaccin développé lui aussi par GSK utilise les propriétés antigéniques de la CSP dans un vaccin à ADN utilisant la souche d'adénovirus 35 comme vecteur (Ad35.CS). Différentes combinaisons sont en cours de phase II des essais cliniques.

D'autres vaccins ciblant les stades pré-érythrocytaires sont basés sur les antigènes TRAP (*Thrombospondin related adhesive protein*) ou CelTOS (*Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites*)²²².

Les protéines Pfs25 impliquée dans le stade anophélique du parasite sont étudiées comme cibles antigéniques en phase I des essais cliniques pour bloquer la transmission du parasite de l'homme au moustique et ainsi contrecarrer la transmission de la maladie en zone d'endémie²²².

En parallèle des recherches portant sur les antigènes, des essais basés sur des sporozoïtes entiers diminués (PfSPZ) sont également menés²²².

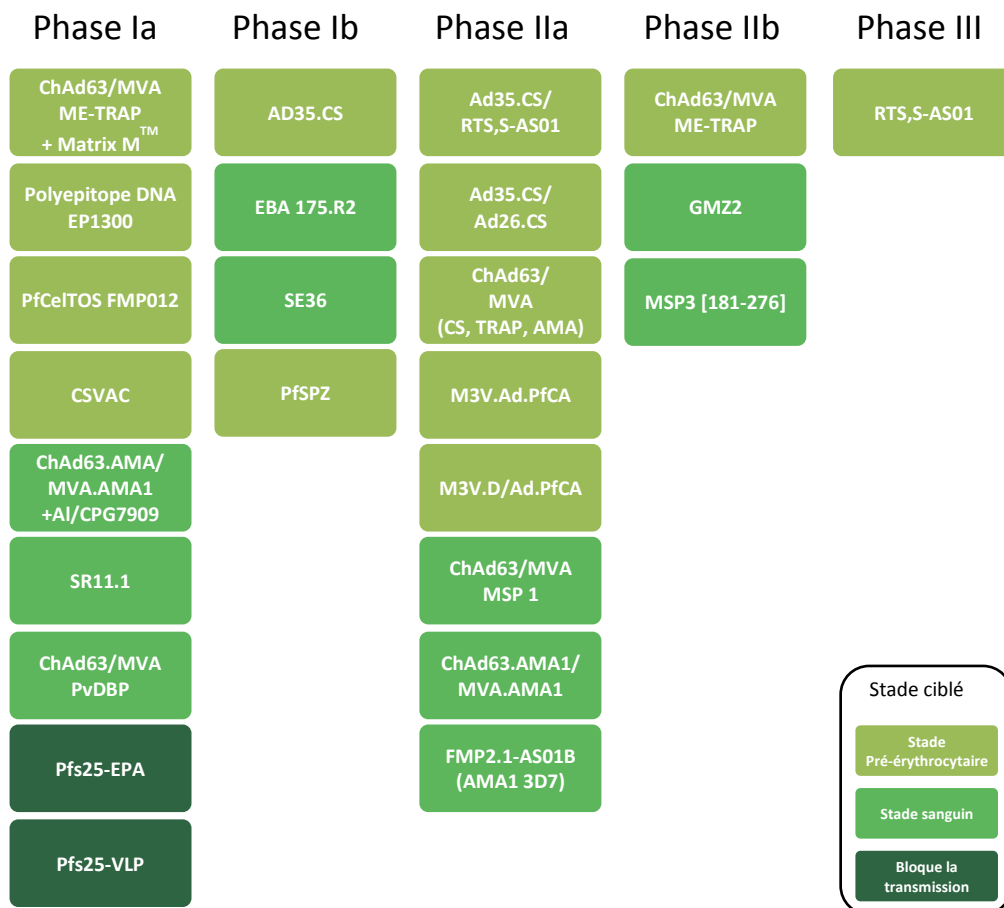


Figure 41 : Principaux vaccins antipaludiques en cours de développement²²⁴.

4.8 Traitements disponibles - Classification chimique des antipaludiques

4.8.1 Arylaminoalcools

La quinine (**167**) est un alcaloïde naturel provenant de l'écorce de quinquina (*Cinchona ledgeriana*) (Figure 42). La faible basicité de la molécule entraîne son accumulation dans la vacuole digestive de *Plasmodium*. En induisant une augmentation du pH de la vacuole, elle inhibe la polymérisation de l'hème-fer qui est un produit de dégradation du métabolisme de l'hémoglobine par le parasite. L'accumulation de l'hème-fer entraîne une toxicité responsable de l'action schizonticide de la molécule. On suppose aussi que la quinine (**167**) est capable d'inhiber la synthèse des acides nucléiques et des protéines parasitaires.

La méfloquine (**168**), l'halofantrine (**169**) et la luméfántrine (**170**) appartiennent également à la classe des arylaminoalcools et présentent le même mécanisme d'action que la quinine (**167**). L'halofantrine (**169**) présente des effets indésirables cardiaques qui diminuent son utilisation. La méfloquine (**168**) est responsable, dans certains cas, de manifestations psychiatriques pouvant conduire au suicide. Ces effets indésirables sont plus importants lors de son utilisation en traitement curatif.

La luméfántrine (**170**) quant à elle est bien tolérée et est seulement disponible en association avec l'artéméter (**183**)²¹⁸.

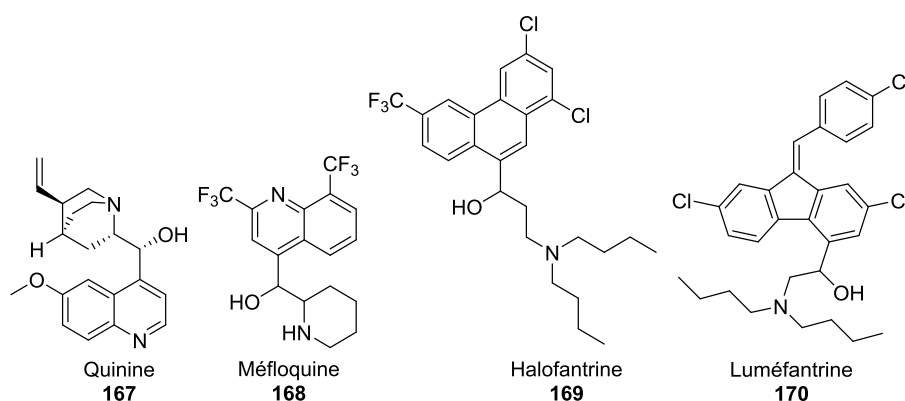


Figure 42 : Dérivés arylaminoalcools.

4.8.2 4-Aminoquinoléines

La chloroquine (**171**), la pipéraquline (**172**) et l'amodiaquine (**173**) (Figure 43) sont des dérivés synthétiques de la quinine (**167**) qui présentent le même mécanisme d'action. L'utilisation extensive de la chloroquine (**171**) a provoqué l'apparition de résistances qui empêchent son utilisation pour le traitement de la majorité des cas de paludisme à *P. falciparum*. Son utilisation se restreint donc aux infections à *P. vivax*, *ovale* et *malariae*²¹⁸.

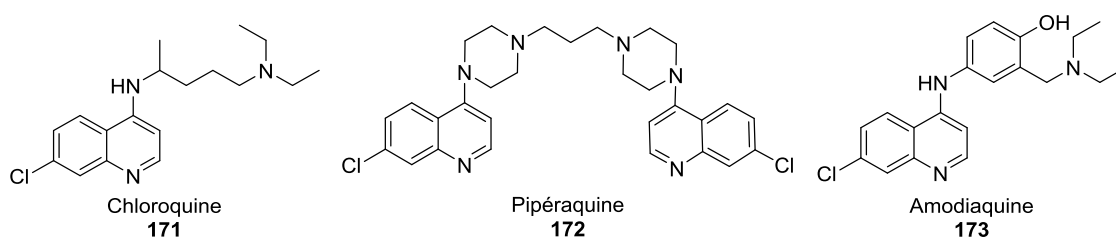


Figure 43 : Dérivés 4-aminoquinoléines.

4.8.3 8-Aminoquinoléines

La primaquine (**174**) est une 8-aminoquinoléine dont le mécanisme d'action est mal connu (Figure 44). Elle aurait une interaction avec l'ADN parasite, perturberait les membranes mitochondriales et entraînerait un stress oxydatif. Efficace contre les formes hépatiques du parasite, elle est particulièrement indiquée pour lutter contre les rechutes des infections à *P. vivax* et *P. ovale* en association avec un schizonticide sanguin. Elle est cependant contre-indiquée chez les individus déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase chez qui elle est susceptible de provoquer une hémolyse²¹⁸.

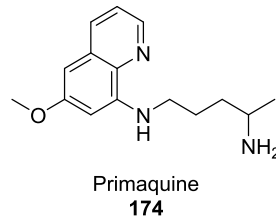


Figure 44 : Dérivé 8-aminoquinoléine : Primaquine.

4.8.4 Sulfonamides

La sulfadoxine (**175**) est un sulfamide antifolinique analogue structural de l'acide p-aminobenzoïque (Figure 45). Il agit comme inhibiteur compétitif de la diptéroate synthétase, une enzyme nécessaire à la synthèse des acides nucléiques²¹⁸.

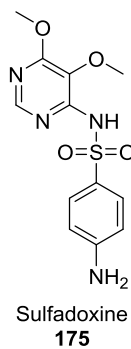


Figure 45 : Dérivé sulfonamide : Sulfadoxine.

4.8.5 Diaminopyrimidines, biguanides

Ce sont des analogues structuraux du dihydrofolate. En inhibant la dihydrofolate réductase plasmodiale, ils empêchent la synthèse de l'acide folique nécessaire à la réplication du parasite.

La pyriméthamine (**176**) appartient à la classe des diaminopyrimidines (Figure 46). Elle est associée à la sulfadoxine (**175**) afin de limiter l'apparition de phénomènes de résistance.

Le proguanil (**177**), un biguanide est quant à lui une prodrogue dont le métabolite actif est le cycloguanil. Un polymorphisme génétique entraîne une différence d'activité selon les populations concernées²¹⁸.

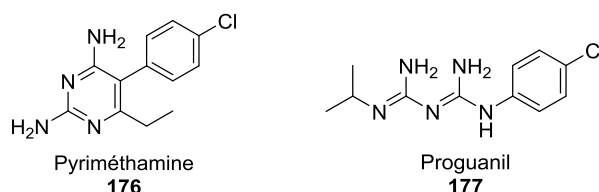


Figure 46 : Dérivés diaminopyrimidines et biguanides.

4.8.6 Hydroxynaphtoquinone

L'atovaquone (**178**) est une hydroxynaphtoquinone (Figure 47) qui inhibe la dihydroorotate déhydrogénase induisant une perturbation au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie du parasite. Ceci a pour conséquence une modification du potentiel membranaire mitochondrial et un blocage de la synthèse des bases pyrimidiques²¹⁸.

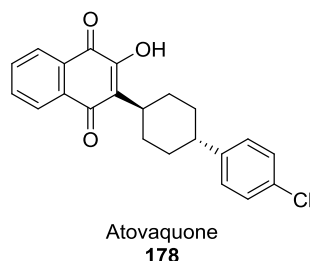


Figure 47 : Dérivé hydroxynaphtoquinone : Atovaquone.

4.8.7 Antibiotiques

La doxycycline (**179**) est une tétracycline qui agirait à la fois sur la dihydroorotate déshydrogénase et sur la traduction des protéines de l'apicoplaste par interaction avec l'ARN ribosomal 16s (Figure 48)

La clindamycine (**180**), un lincosamide, agirait elle aussi par interaction avec l'ARN ribosomal 16s²¹⁸.

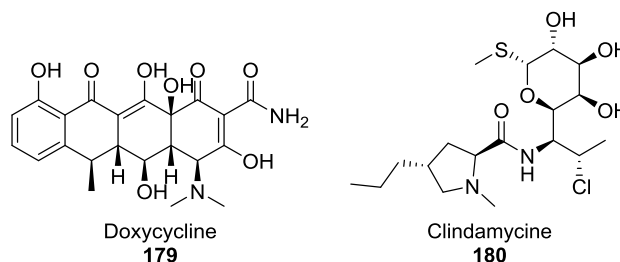


Figure 48 : Dérivés de nature antibiotique.

4.8.8 Dérivés de l'artémisinine

L'artémisinine (**181**) est une lactone sesquiterpénique isolée de l'armoise de Chine *Artemisia annua* (Figure 49). Elle et ses dérivés hémisynthétiques [dihydroartémisinine (**182**), artéméther (**183**), artéether (**184**) et artésunate (**185**)] agissent en libérant des radicaux libres toxiques par un mécanisme fer-dépendant. Cette toxicité est principalement liée à l'inhibition de pompes calcium-ATPase, à une interférence avec la chaîne respiratoire mitochondriale et à une altération des membranes.

L'artéméther (**183**), l'artéether (**184**) et l'artésunate (**185**) sont métabolisés *in vivo* en dihydroartémisinine (**182**) qui est le métabolite actif.

Ces dérivés agissent pratiquement sur l'ensemble des stades parasitaires. De plus, ils inhibent la cytoadhérence, le phénomène de rosetting et facilitent l'épépinage des globules rouges parasités par la rate²¹⁸.

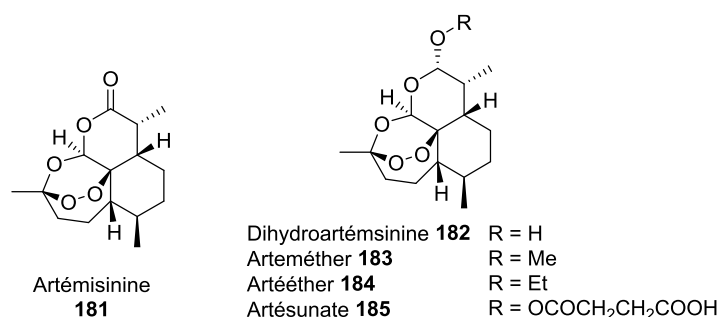


Figure 49 : Artémisinine et dérivés.

4.8.9 Chimiothérapie antiplasmodiale et stades de développement

Ces molécules agissent sur différentes phases du cycle parasitaire (Tableau 6), conditionnant ainsi leur usage à titre curatif, prophylactique ou pour éviter les reviviscences²²⁵.

Tableau 6 : Efficacité des antipaludiques selon la phase du cycle parasitaire²¹⁸.

Médicament	Schizonticide sanguin	Schizonticide tissulaire		Gamétocytocide	Sporonticide
		primaire	secondaire		
Quinine 167	+	-	-	vmo	-
Méfloquine 168	+	-	-	-	-
Halofantrine 169	+	-	-	-	-
Luméfantrine 170	+	-	-	-	-
Chloroquine 171	+	-	-	vmo	-
Pipéraquline 172	+	-	-	vmo	-
Primaquine 174	±	+	+	+	+
Sulfadoxine 175	+ (lent)	-	-	-	+
Pyriméthamine 176	+ (lent)	f	-	-	+
Proguanil 177	+ (lent)	f	-	-	+
Atovaquone 178	+	f	-	-	+
Doxycycline 179	+ (retardé)	f	-	-	-
Clindamycine 180	+ (retardé)	-	-	-	-
Artémisinine et dérivés 181 à 185	++	-	-	+	-

f = médicament actif sur *P. falciparum* ; vmo = médicament actif sur *P. vivax, malariae* et *ovale*.

4.9 Autres moyens de lutte et de prévention

L'élimination du paludisme en zone d'endémie passe par une lutte antivectorielle. Celle-ci fait appel à l'emploi de moustiquaires imprégnées et à la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent dans les habitations. En complément de ces méthodes, la destruction et la réduction des gîtes larvaires par des travaux d'assainissement permettent de réduire la présence des anophèles, vecteurs de la maladie²¹¹.

4.10 Résistances aux antipaludiques

La résistance aux médicaments antipaludiques correspond à une élimination retardée ou incomplète des parasites dans le sang du malade, malgré l'administration de médicaments aux doses habituellement recommandées.

La résistance croisée entre différents médicaments de même mode d'action a fortement diminué le nombre de médicaments disponibles pour traiter le paludisme.

Des résistances à l'ensemble des classes d'antipaludiques ont été rapportées. Ce phénomène est essentiellement dû à une large utilisation inappropriée de molécules antiplasmodiales conduisant au développement de hauts niveaux de résistance²²¹.

La Figure 50 reprend les dates d'introduction des principales molécules antipaludiques et celles de l'observation de l'apparition des premières résistances cliniques.

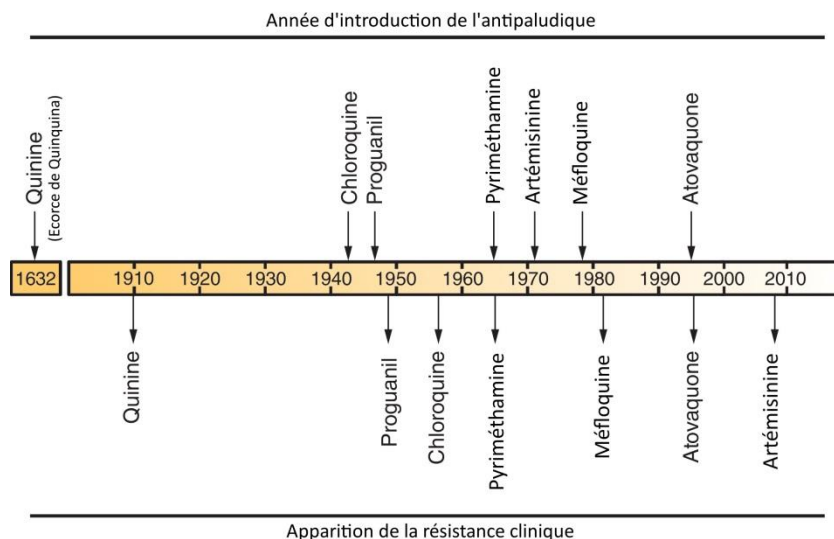


Figure 50 : Chronologie de l'introduction des antipaludiques et apparition des résistances cliniques²²⁶.

Ces phénomènes de résistance peuvent être prévenus par l'utilisation de combinaisons thérapeutiques basées sur des molécules à modes d'action différents et en s'assurant d'une bonne observance des traitements à la dose recommandée. Actuellement, ces combinaisons sont essentiellement basées sur l'utilisation d'un dérivé de l'artémisinine associé à une autre classe d'antipaludique²²¹.

4.11 Développement de nouveaux antipaludiques

Pour pallier au problème de l'apparition des résistances ou tenter d'interrompre la transmission, un certain nombre de nouvelles molécules antiplasmodiales, appartenant à des classes chimiques inédites, sont en cours de développement et font actuellement l'objet d'études cliniques (Figure 51). De nouvelles combinaisons d'antipaludiques existants mais de mécanismes d'action différents sont également à l'étude.

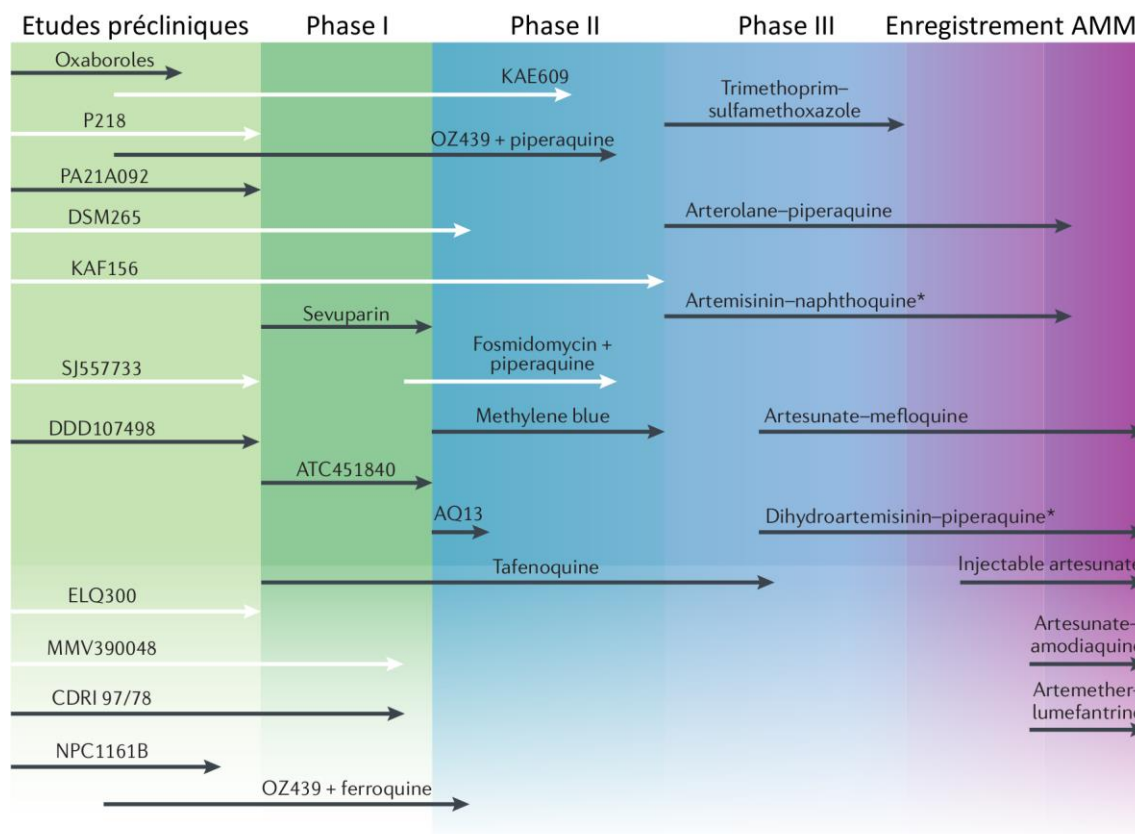


Figure 51 : Molécules antiplasmodiales et combinaisons d'antipaludiques en cours de développement clinique au cours des 5 dernières années²²⁷. Les flèches blanches représentent les molécules pour lesquelles les cibles moléculaires sont connues. Les traitements signalés par un astérisque sont déjà sur le marché dans certaines zones d'endémies mais n'ont pas encore fait l'objet de l'approbation des instances internationales de santé.

Parmi ces molécules présentant un bon potentiel de développement, on peut notamment distinguer (Figure 52) :

- Le composé KAE609 (**186**) (anciennement NITD609) qui appartient à une nouvelle classe d'antipaludiques, les spiroindolones. Une touche obtenue à partir du criblage d'environ 12000 molécules d'origines synthétique et naturelle a ensuite été optimisée pour aboutir au KAE609, actuellement en phase II des essais cliniques²²⁸. La molécule agit par inhibition de la synthèse protéique du parasite²²⁹ ;
- le composé DSM265 (**187**) est une version améliorée par chimie médicinale d'une touche également découverte par une approche de criblage à haut-débit. Il agit comme inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase²³⁰ ;

- le composé P218 (**188**) est un inhibiteur de dihydrofolate réductase de nouvelle génération. Le risque de mécanisme de résistance croisé avec les inhibiteurs déjà utilisés en thérapeutique est néanmoins à craindre²³⁰;
- la fosmidomycine (**189**) est un antibiotique initialement développé comme herbicide. Elle agit en inhibant la DXP réductoisomérase une enzyme clé dans la voie de biosynthèse des isoprénoïdes de l'apicoplaste de *Plasmodium*²³¹;
- le composé OZ439 (**191**) un nouvel endopéroxyde synthétique. Il dérive du composé OZ277 (**190**), rebaptisé depuis artérolane actuellement en phase III des essais cliniques en combinaison avec la pipéraquine. Le composé OZ439 (**191**) présente de meilleures propriétés pharmacocinétiques que son prédécesseur OZ277 (**190**) et a passé le stade de la phase IIa²³⁰;
- le bleu de méthylène (**192**) avait été proposé comme antipaludique par Paul Ehrlich en 1891²³² mais a ensuite été abandonné. Son intérêt a récemment été réévalué²³³ le menant en phase II en combinaison avec d'autres antipaludiques, notamment la chloroquine²³⁴. Les combinaisons évaluées se sont toutefois montrées moins actives que les combinaisons à base d'artémisinine mais cette molécule pourrait toutefois montrer un intérêt par une action exercée sur les gamétocytes²³⁰;
- le composé MMV 390048 (**193**) a montré de très bonnes activités sur souris infectées par *P. berghei*. Cette molécule a rapidement fait l'objet d'études pré-cliniques car elle dispose d'un potentiel intéressant avec un CI_{50} de 25 nM, une longue demi-vie plasmatique et une bonne biodisponibilité par voie orale²²⁷;
- la ferroquine (**194**) est un dérivé organométallique de la chloroquine aux propriétés antipaludiques prometteuses. Elle fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II²³⁵.

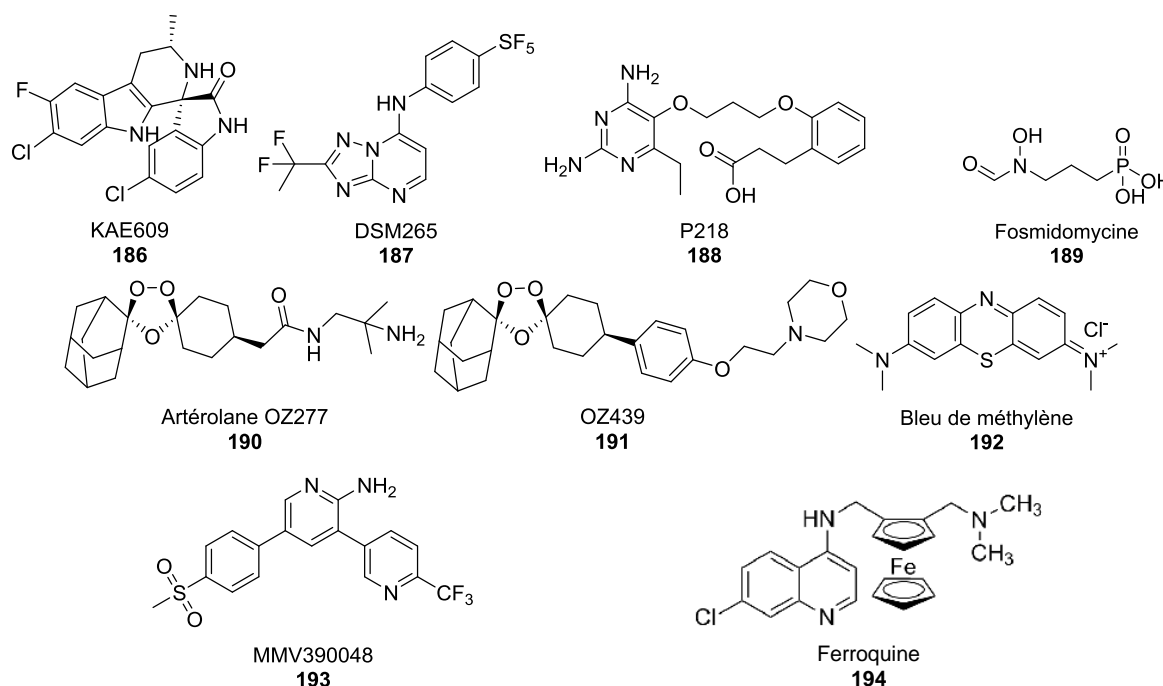
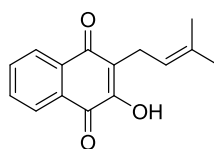


Figure 52 : Molécules en développement pour le traitement du paludisme.

4.12 Intérêt des substances naturelles dans la découverte de nouvelles molécules antiplasmodiales

Les substances naturelles ont joué un rôle très important dans le développement de la chimiothérapie antipaludique.

La quinine (**167**), la première molécule utilisée comme antipaludique a été isolée en 1820 de l'écorce de quinquina. Cette molécule naturelle a ensuite ouvert la voie à l'ensemble des dérivés synthétiques de la famille des 4-aminoquinoléines et des arylaminoalcools (paragraphe 4.8.1 et 4.8.2, p 70), qui ont constitué la base du traitement du paludisme au siècle dernier, progressivement devancés par les dérivés de l'artémisinine (**181**) (paragraphe 4.8.8, p 73), une autre molécule naturelle isolée d'*Artemisia annua* en 1971. Cette dernière, caractérisée par son pont endopéroxyde a également ouvert la voie à de nouveaux endopéroxydes de synthèse [comme l'artérolane (**190**) et le composé OZ439 (**191**)] à plus longue durée d'action et qui sont en cours d'essais cliniques à l'heure actuelle. Le lapachol (**195**), une naphtoquinone naturelle isolées du lapacho, *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae), a donné naissance à l'atovaquone (**178**) (paragraphe 4.8.6, p 72), à la suite d'une optimisation par chimie médicinale³.



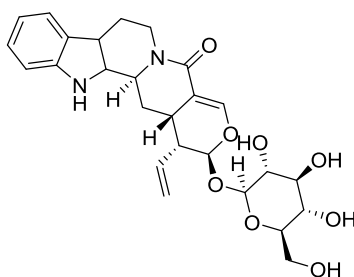
Lapachol
195

Il est intéressant de noter que l'ensemble de ces molécules, point de départ des grandes classes d'antipaludiques actuels ont été isolées de plantes utilisées traditionnellement contre le paludisme, confirmant par trois fois l'intérêt de l'approche ethnopharmacologique dans la découverte de nouvelles substances bioactives.

Par ailleurs, certaines préparations à base de plantes font actuellement l'objet d'études cliniques dans le traitement du paludisme.

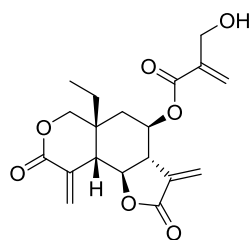
C'est notamment le cas de l'extrait quantifié de l'écorce de *Nauclea pobeguinii* (Rubiaceae) (PR 259 CT1) qui a fait l'objet d'essais cliniques de phase IIb en République Démocratique du Congo³.

Il est d'ailleurs surprenant de noter que l'une des molécules contenue dans l'extrait, le strictosamide (**196**) présente une structure très proche des spiroindolones²³⁶ dont le chef de file est le KAE609 (**186**) découvert par criblage à haut-débit d'une chimiothèque.



Strictosamide
196

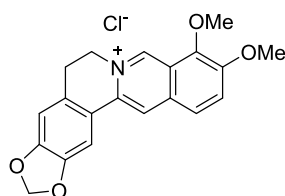
L'infusion de *Vernonia amygdalina* (Asteraceae) utilisée traditionnellement en Ouganda a également fait l'objet d'essais cliniques dont les résultats sont plutôt encourageants²³⁷. La vernodaline (**197**) retrouvée dans la préparation a par ailleurs montré une activité antiplasmodiale micromolaire *in vitro*^{3,238}.



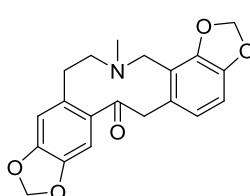
Vernodaline
197

Ces nombreux exemples montrent l'intérêt de l'étude des substances naturelles dans la découverte de nouvelles molécules antiplasmodiales.

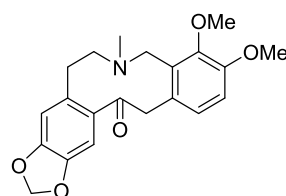
Un autre extrait naturel a également fait l'objet d'essais cliniques de phase II, il s'agit de l'extrait d'*Argemone mexicana* (Papaveraceae), utilisée traditionnellement au Mali. L'extrait renferme notamment de la berbérine (**198**) et ses dérivés la protopine (**199**) et l'alocryptopine (**200**), des alcaloïdes dont l'activité antiplasmodiale a par ailleurs été démontrée *in vitro*^{3,239-241}.



Berbérine
198



Protopine
199



Allocryptopine
200

Chapitre II :

Approche phytochimique

1 Objectifs

Le premier objectif de cette approche est d'isoler de façon chimioguidée les dérivés de nature anthranoïde, en particulier les vismiones, présents dans l'écorce de *Psorospermum glaberrimum*.

Il s'agit de rechercher des analogues structuraux des composés isolés antérieurement, afin de confirmer et d'enrichir les informations de relation structure-activité vis-à-vis des activités antiprotozoaires déjà mises en évidence (paragraphe 1, p 3). Par ailleurs, le matériel précédemment étudié étant épuisé, il est nécessaire de ré-isoler les molécules afin de constituer des références.

Un second objectif, conditionné par le précédent, est de mettre au point un protocole d'extraction efficace qui permettra d'isoler les molécules actives à l'échelle de la centaine de milligramme ou du gramme, pour permettre une investigation pharmacologique plus poussée, ainsi que pour envisager une démarche d'hémisynthèse.

Enfin, un troisième objectif consiste à étudier la variabilité chimique des anthranoïdes au sein du genre *Psorospermum*, ainsi que dans les divers organes des différentes espèces récoltées. Cette approche chimiotaxonomique permet également la recherche d'éventuels nouveaux analogues pourvus d'une activité antiprotozoaire intéressante et qui pourraient être absents de l'écorce de *P. glaberrimum* étudiée initialement.

2 Récolte

Pour répondre à ces objectifs, il a d'abord fallu réaliser de nouveaux extraits. Pour cela, un séjour de deux mois au Cameroun de mai à juillet 2013 a été effectué, afin de récolter les matières premières végétales et de réaliser les extraits à partir desquels ont été isolées par la suite les différentes molécules.

Des échantillons de 10 espèces appartenant au genre *Psorospermum* ont été récoltés dans différentes localités du Cameroun (Figure 53, Figure 54). Dans le cas de *P. glaberrimum* et *P. corymbiferum* la collecte a été effectuée sur 2 sites géographiquement distincts afin d'évaluer les critères de variabilité intraspécifique qui pourraient exister.

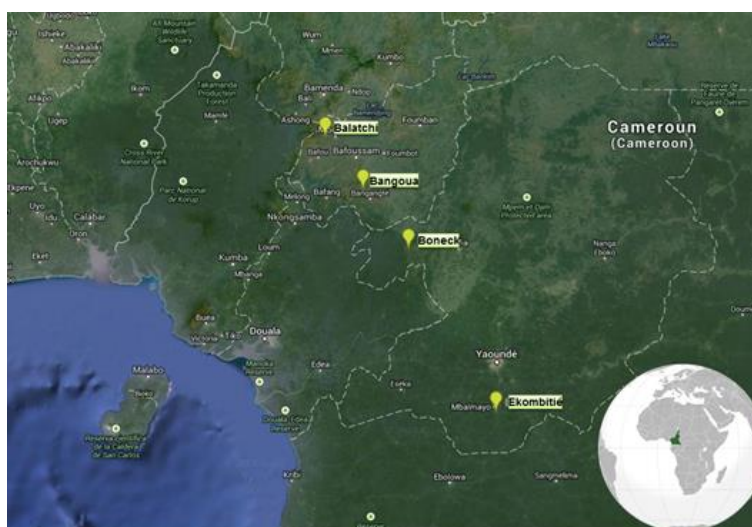


Figure 53 : Carte des localités de récolte des différentes espèces de *Psorospermum*.



Figure 54 : Récolte des échantillons de *Psorospermum*.

L'identité botanique de ces échantillons a été déterminée par un botaniste de l'Herbier National du Cameroun (Yaoundé), Monsieur Victor Nana et des échantillons ont été déposés à ce même Herbier (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des récoltes.

Espèce	N° d'herbier	Date de récolte	Localité
<i>P. adamauense</i> Engl.	41149HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. corymbiferum</i> Hochr.	49966HNC	05/05/2013	Ekombitie
<i>P. corymbiferum</i> Hochr.	4149HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. febrifugum</i> Spach	26345SRFcam	12/05/2013	Bangoua
<i>P. floribundum</i> Hutch. & Dalziel	B41150HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. glaberrimum</i> Hochr.	-	05/05/2013	Ekombitie
<i>P. glaberrimum</i> Hochr.	38061HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. glaucum</i> Engl.	41148HNC	05/05/2013	Ekombitie
<i>P. guineense</i> (L) Hochr.	-	11/05/2013	Balatchi
<i>P. kerstingii</i> Engl.	41147HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. aurantiacum</i> Engl.	52651HNC	11/05/2013	Balatchi
<i>P. senegalense</i> Spach	39946HNC	05/05/2013	Ekombitie

Les différents échantillons ont été divisés selon les différentes parties de plantes disponibles (écorce, tronc, tige, feuille, fruit) pour chaque espèce. Les drogues ainsi détaillées ont été fragmentées puis séchées (paragraphe 2.1, p 228) (Figure 55). Les échantillons une fois séchés ont été broyés avant d'être extraits.



Figure 55 : Préparation et séchage des échantillons de *Psorospermum*.

Approche phytochimique

3 Extraction

Le laboratoire d'accueil dans lequel j'ai réalisé mon séjour étant équipé d'évaporateur rotatif mais ne disposant pas de pompes, les extraits ont dû être concentrés à pression atmosphérique. Les composés d'intérêt étant supposés peu stables et très apolaires, l'extraction par le dichlorométhane a été préférée car davantage compatible avec les conditions de travail du terrain, la sensibilité des molécules recherchées et la durée du séjour sur place. Pour mémoire, l'extrait à partir duquel le Dr Bruno Lenta avait isolé les molécules responsables de l'activité antiparasitaire de *P. glaberrimum* avait été réalisé par 2 macérations successives de 24h de la poudre d'écorce dans un mélange dichlorométhane/méthanol 1:1 (v/v) (Tableau 8).

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des extractions au dichlorométhane des échantillons de *Psorospermum*.

Espèce	Localité	Organe	Code	Masse échantillon (g)	Masse extrait (g)	Rendement d'extraction (%)
<i>P. adamauense</i>	Boneck	Feuille	PAF	25	1	4,0
		Fruit	PAFr	5,135	0,604	11,8
		Tige	PAT	25	1	4,0
<i>P. corymbiferum</i>	Boneck	Feuille	PCEF	25	0,9	3,6
		Fruit	PCEFr	5,265	0,546	10,4
		Tige	P CET	1214	103,2	8,5
	Ekombitie	Feuille	PCE2F	25	0,7	2,8
		Fruit	PCE2Fr	5,338	0,384	7,2
		Tronc	PCE2Tc	1893	80	4,2
<i>P. febrifugum</i>	Bangoua	Feuille	PFEF	25	1,2	4,8
		Fruit	PFFr	1595	115	7,2
		Tige	PFT	50	2,6	5,2
<i>P. floribundum</i>	Boneck	Feuille	PFLOF	25	0,8	3,2
		Fruit	PFLOFr	5,106	0,634	12,4
		Tronc	PFLOTc	50	3,2	6,4
<i>P. glaberrimum</i>	Ekombitie	Feuille	PGEF	25	2	8,0
		Fruit	PGEFr	5,1	0,332	6,5
	Boneck	Ecorce	PGE2E	747	207	27,7
		Feuille	PGE2F	1367	240	17,6
		Fruit	PGE2Fr	5,1	1,184	23,2
		Tige	PGE2T	50	2,6	5,2
Tronc	PGE2Tc	1160	49,5	4,3		
<i>P. glaucum</i>	Ekombitie	Feuille	PGLOF	25	2	8,0
		Fruit	PGLOFr	5,212	0,543	10,4
		Tige	PGLOT	2776	108,5	3,9
<i>P. guineense</i>	Balatchi	Ecorce	PGUE	513	66,4	12,9
		Feuille	PGUF	1439,0	412,2	28,6
		Fruit	PGUFr	5,1	0,659	12,9
		Tige	PGUT	25,0	0,9	3,6
		Tronc	PGUTc	25,0	0,8	3,2
<i>P. kerstingii</i>	Boneck	Feuille	PKF	797	123	15,4
		Fruit	PKFr	5,138	0,488	9,5
		Tige	PKT	50	2	4,0
		Tronc	PKTc	2514	241,6	9,6
<i>P. aurantiacum</i>	Balatchi	Ecorce	POE	533	41,2	7,7
		Feuille	POF	25	1	4,0
		Fruit	POFr	314	33,7	10,7
<i>P. senegalense</i>	Ekombitie	Feuille	PSEF	25	1	4,0
		Fruit	PSEFr	5,169	0,504	9,8

Concernant la codification, le préfixe se rapporte à l'espèce : **PA-** : *P. adamauense*, **PC-** : *P. corymbiferum*, **PFE-** : *P. febrifugum*, **PFLO-** : *P. floribundum*, **PGE-** : *P. glaberrimum*, **PGLO-** : *P. glaucum*, **PGU-** : *P. guineense*, **PK-** : *P. kerstingii*, **PO-** : *P. aurantiacum*, **PSE-** : *P. senegalense*.

Le chiffre intermédiaire se rapporte à la localité pour les échantillons récoltés dans deux localités différentes le cas échéant. Le suffixe se rapporte à la partie de plante concernée : **-E** : écorce, **-Tc** : tronc, **-T** : Tige, **-F** : feuille, **-Fr** : fruit.

Fractionnement conventionnel

L'objectif de ce premier fractionnement chimio guidé consiste à isoler les anthranoïdes contenus dans l'écorce de *P. glaberrimum* afin de constituer dans un premier temps des références. Cette première étape est un prérequis à l'amélioration de paramètres de séparation pouvant permettre d'isoler les molécules à tester sur le plan biologique dans des quantités adaptées à une investigation pharmacologique.

Une première stratégie de fractionnement s'est donc appuyée sur les méthodologies décrites dans la littérature pour isoler ce type de structures dans des extraits végétaux analogues. Dans un second temps, une méthode alternative a été développée afin de contourner les limites observées lors de l'utilisation de ces techniques classiques de séparation.

3.1 Données bibliographiques

Les travaux antérieurs portant sur la purification des vismionones font essentiellement appel à des techniques chromatographiques classiques sur gel de silice répétées avec des mélanges de solvants de polarité croissante^{65,68,78,81,83,89,148,149,242,243}, après une éventuelle étape de partition liquide/liquide préliminaire^{84,88}. Des publications, généralement plus récentes, peuvent cependant faire appel à des étapes de purification sur Séphadex LH-20²⁴⁴ combinées éventuellement à des purifications en polarité de phase inverse²⁴⁵, l'utilisation de résines²⁴⁶ ou de la chromatographie de partage^{247,248}.

3.2 Fractionnement de l'extrait PGE2E

Le détail des conditions de fractionnement sont reprises sur le schéma récapitulatif du fractionnement (Figure 58) et au paragraphe 6.1, p 233.

Compte-tenu du nombre de références faisant état de la purification de ce type de molécules par chromatographie sur gel de silice, une première étape de fractionnement de l'extrait brut PGE2E d'écorces de *P. glaberrimum* a été entreprise par *Vacuum Liquid Chromatography* sur silice avec un mélange de polarité croissante n-pentane/AcOEt 80:20 jusqu'à 0:100 (v:v) puis AcOEt/MeOH 100:0 jusqu'à 85:15 (v:v).

Ce fractionnement a permis d'obtenir 5 fractions après regroupement d'après leurs profils CCM (Figure 56).

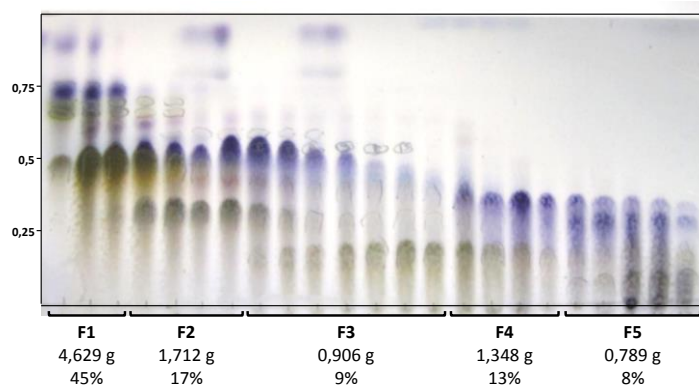


Figure 56 : Fractionnement VLC de PGE2E.
Conditions CCM : C₅/AcOEt 70:30, révélation VS.

La fraction F2 présentant une masse de 1,712 g contenant 2 molécules d'intérêt potentiel, comme le suggèrent leur polarité et leurs propriétés d'absorption à $R_f = 0,5$ et $R_f = 0,35$ ($C_5/AcOEt$ 70:30) a ensuite été fractionnée en chromatographie flash en polarité de phase inverse sur colonne C18. Le choix du changement de polarité de phase est consécutif à l'observation de la tendance à la coélution de triterpènes (colorés en mauve à la révélation par la VS) avec les composés supposés d'intérêt lors de la purification en phase normale. Ce fractionnement a conduit à l'obtention de 7 fractions (F2A-F2G) regroupées selon leur profil CCM (Figure 57).

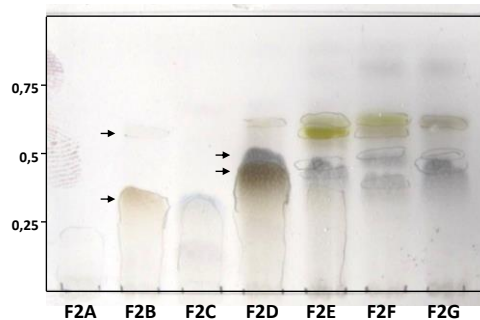


Figure 57 : Fractionnement de la fraction F2 en polarité de phase inverse.

Conditions CCM : $C_5/AcOEt$ 70:30, révélation VS.

La fraction F2B présente un profil intéressant renfermant un potentiel composé d'intérêt à $R_f=0,35$. Il subsiste néanmoins la trace d'un composé minoritaire à $R_f=0,57$. Cette fraction a donc été refractionnée par chromatographie en polarité de phase normale sur colonne de silice permettant d'obtenir 20 mg (0,2%) de la molécule **A**. Au cours de la purification, un phénomène d'adsorption irréversible d'une partie de la fraction sur la silice a pu être observé (persistance de la coloration jaune de la phase stationnaire).

La fraction F2D a également été purifiée par chromatographie en polarité de phase normale sur colonne de silice. La difficulté de cette séparation provient de la coélution de la molécule d'intérêt majoritaire ($R_f = 0,5$) avec un triterpène. La séparation a permis l'obtention de 7 fractions (F2D1 à F2D7) regroupées selon leur profil CCM. La fraction F2D4 (96 mg) s'est avérée pratiquement pure par analyse RMN 1H , une étape de recristallisation dans le méthanol a permis d'obtenir 62 mg (0,6 %) de la molécule **B**. Comme lors de la purification de la molécule **A**, un phénomène d'adsorption irréversible a pu être observé ainsi que l'apparition de nouvelles taches en CCM, absentes de la fraction mère et pouvant correspondre à des produits de dégradation.

La fraction F2F (200 mg) présentant 2 composés d'intérêt potentiel à $R_f = 0,57$ et $0,62$ a été une nouvelle fois purifiée par chromatographie flash en polarité de phase inverse ce qui a permis de réaliser 5 fractions selon les profils CCM (F2F1-5).

La sous-fraction F2F3 (32 mg) a ensuite été refractionnée en polarité de phase normale sur colonne de silice permettant d'isoler 5 mg (0,05 %) de la molécule **C**.

La sous-fraction F2F4 (16 mg) a été recristallisée dans le méthanol permettant d'obtenir 9 mg (0,09 %) de la molécule **D**.

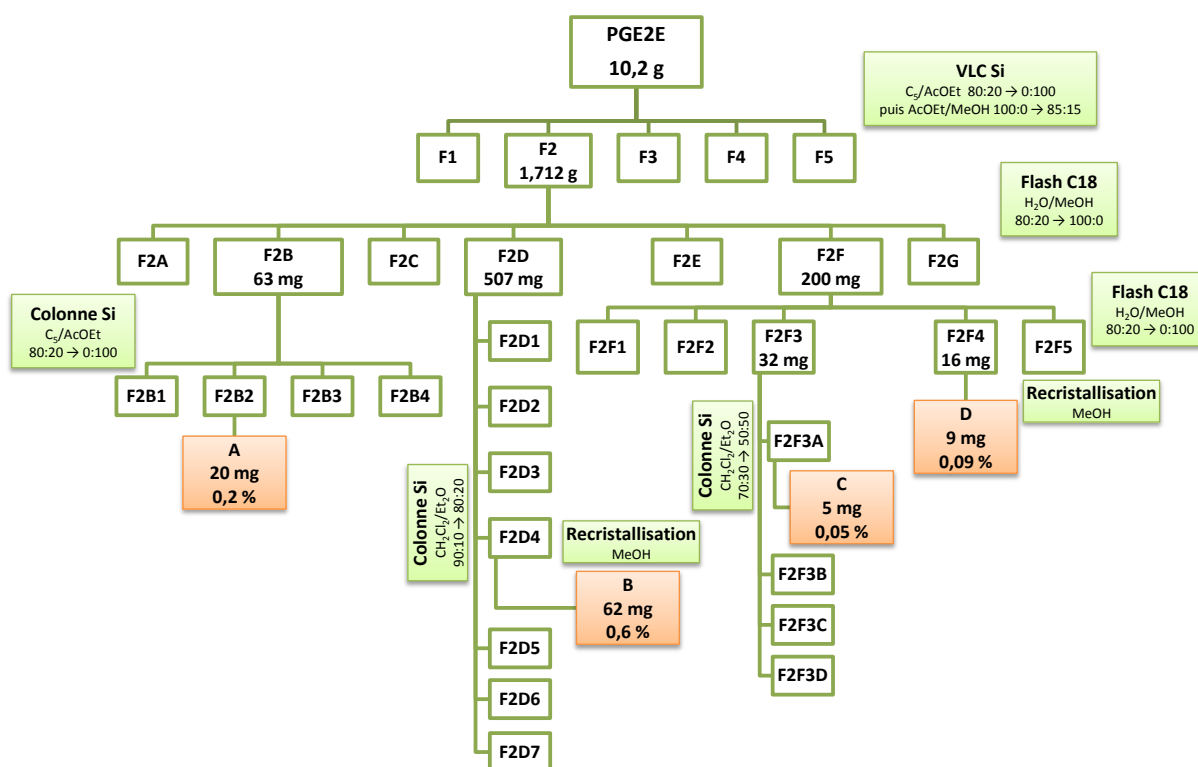


Figure 58 : Schéma de fractionnement de l'extrait PGE2E.

3.3 Détermination structurale des molécules isolées de la fraction F2 de l'extrait d'écorces de *P. glaberrimum*

3.3.1 Molécule A

L'analyse en spectrométrie de masse haute résolution (ESI-TOF) de la molécule **A** indique une masse de 407,14788 uma correspondant à l'adduit sodium $[M+Na]^+$ de formule brute $C_{22}H_{24}NaO_6$ (Figure 59). On observe également des pics à 385,16506 uma correspondant à $[M+H]^+$ et 325,14477 uma correspondant à $[M-CH_3COOH]^+$. La masse de la molécule est donc de 384,15866 uma ce qui correspond à la formule brute $C_{22}H_{24}O_6$.

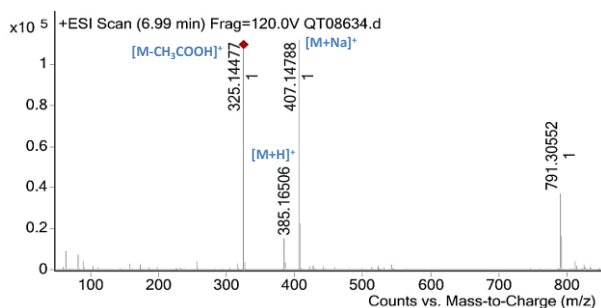


Figure 59 : Spectre de masse HRMS de la molécule A.

Sur le spectre RMN ^1H on observe :

- deux protons très déblindés (15,92 et 9,73 ppm), correspondant à des hydroxyles aromatiques engagés dans des liaisons hydrogènes.
- 3 protons aromatiques (6,83, 6,56 et 6,50 ppm) dont 2 sont présents sous forme de doublets avec des constantes de couplage de 2,4 et 2,3 Hz indiquant qu'ils sont en position méta l'un par rapport à l'autre.
- 1 proton éthylénique (5,52 ppm) présent sous forme de triplet de septuplets.
- 1 $\text{CH}_2\text{-O}$ (4,60 ppm) sous forme de doublet couplant avec un proton éthylénique ($J=6,5$ Hz).
- 4 protons sous forme de doublets ou de doublets de doublets entre 3,72 et 2,85 ppm dotés d'une grande constante de couplage ($J=16,0$ à $17,7$ Hz).
- 4 méthyles

Le spectre RMN ^{13}C indique :

- 2 carbonyles (200,6 et 170,4 ppm)
- 3 carbones liés à un hydroxyle aromatique (165,7, 163,0 et 159,7 ppm)
- 8 carbones éthyléniques (141,0 à 100,7 ppm)
- 2 carbones oxygénés (80,6 et 65,1 ppm)
- 6 carbones saturés (49,2 à 18,3 ppm)

La présence de 2 hydroxyles aromatiques dont l'un est très fortement engagé dans une liaison hydrogène et de 4 protons méthyléniques est caractéristique du noyau vismione⁸¹. Les 4 protons méthyléniques, sous forme de doublets entre 3,72 et 2,85 ppm indiquent que l'hydroxyle en C-6 est acétylé⁸¹ ce que confirme également la présence d'un deuxième carbonyle à 170,4 ppm ainsi que la perte du groupement CH_3COOH en spectrométrie de masse. Le proton éthylénique sous forme de triplet de septuplets qui couple avec un groupe $\text{CH}_2\text{-O}$ (4,60 ppm) ainsi que la présence de 2 carbones éthyléniques est caractéristique d'une chaîne O-prényle. La présence des 3 protons aromatiques (dont 2 sont couplés en méta l'un par rapport à l'autre) suggère que la vismione est 3-O prénylée, ce que confirment les corrélations HMBC (Figure 60).

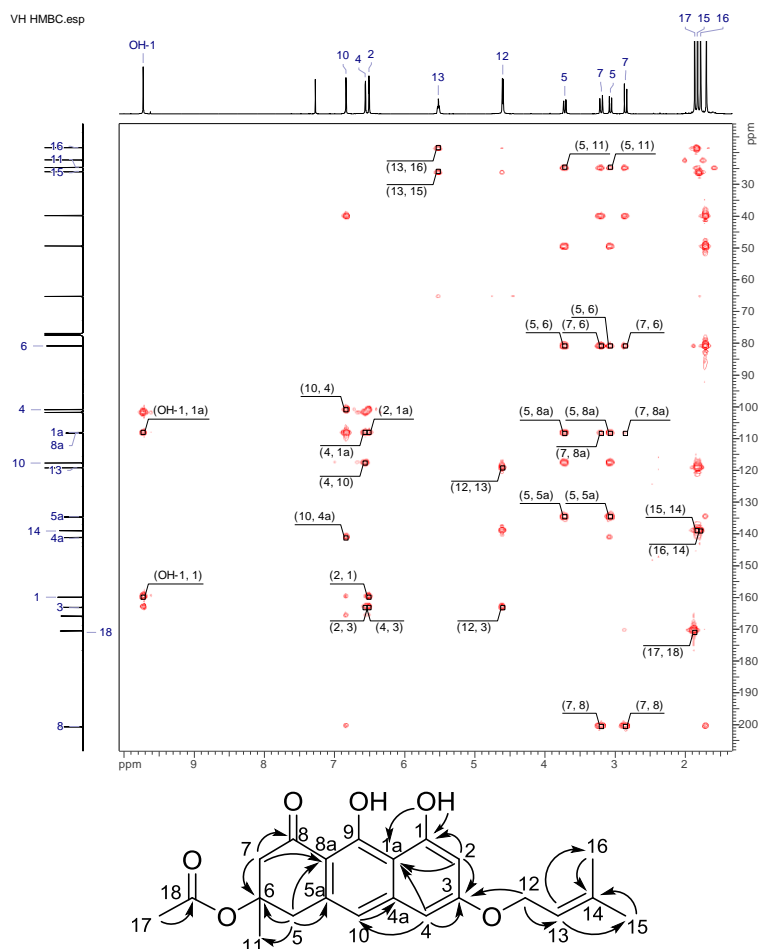


Figure 60 : Principales corrélations HMBC de la molécule A.

La molécule **A** correspond donc à la vismione H (**94**) déjà isolée de *P. tenuifolium*¹⁴⁷ et *Vismia guineensis*²⁴² et les données RMN ¹H sont en accord avec celles de la littérature. C'est la première fois cependant que cette molécule est isolée de l'espèce *P. glaberrimum*.

3.3.2 Molécule B

Les spectres RMN ¹H et ¹³C du composé **B** sont très similaires à ceux de la vismione H.

On note cependant en plus en RMN ¹H :

- 1 proton éthylénique à 5,11 ppm
- Un massif (2,17-2,07 ppm) intégrant pour 4 protons soit 2 CH₂
- 1 méthyle supplémentaire

Ces informations suggèrent que la chaîne présente en position 3 est une chaîne géranyle.

Le spectre de masse HRMS indique une masse de 475.21016 uma correspondant à l'adduit sodium $[M+Na]^+$ de formule brute $C_{27}H_{32}NaO_6$ (Figure 61). On observe également des pics à 453,22808 uma correspondant à $[M+H]^+$, 393,20725 uma correspondant à $[M-CH_3COOH]^+$, 317,10270 uma correspondant à $[M-Géranyle]^+$ et 257,08129 uma correspondant à $[M-CH_3COOH-Géranyle]^+$. La masse de la molécule est donc de 452,22094 uma ce qui correspond à la formule brute $C_{27}H_{30}O_6$.

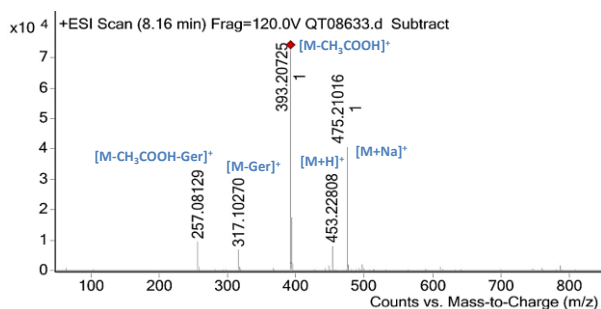


Figure 61 : Spectre de masse HRMS de la molécule B.

Enfin les données HMBC permettent de confirmer la présence d'une substitution par une chaîne géranyle en position 3 (Figure 1).

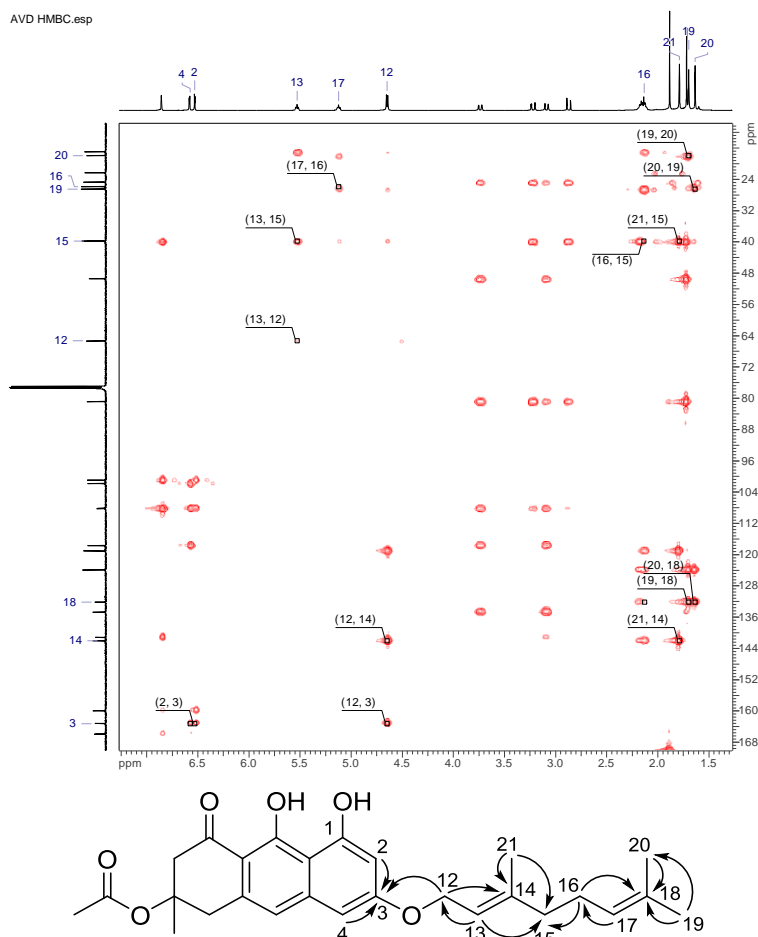


Figure 62 : Principales corrélations HMBC de la chaîne latérale de la molécule B.

La molécule **B** correspond donc à l'acétylvismione D (**8**), déjà isolée ou caractérisée dans les espèces *P. febrifugum*²⁴⁹, *P. tenuifolium*¹⁴⁷, *P. glaberrimum*⁸³, *Ochna pulchra*²⁴⁸ et *Vismia guineensis*²⁵⁰.

3.3.3 Molécule C

Sur le spectre RMN ^1H de la molécule **C**, on observe :

- deux hydroxyles aromatiques (12,21 et 12,05 ppm).
- 4 protons aromatiques (7,54, 7,29, 7,00 et 6,60 ppm) dont 2 sont présents sous forme de doublets avec des constantes de couplage de 2,6 et 2,4 Hz indiquant qu'ils sont situés en position méta l'un par rapport à l'autre.
- 1 proton éthylénique (5,41 ppm) présent sous forme de triplet de septuplets.
- 1 $\text{CH}_2\text{-O}$ (4,57 ppm) sous forme de doublet couplant avec un proton éthylénique ($J = 6,7$ Hz).
- 3 méthyles

Le spectre RMN ^{13}C indique :

- 2 carbonyles (189,6 et 180,8 ppm)
- 3 carbones liés à un hydroxyle aromatique (164,8, 164,0, 161,4 ppm)
- 11 carbones éthyléniques (147,3 à 106,4 ppm)
- 1 carbone oxygéné (64,7 ppm)
- 6 carbones saturés (49,2 à 18,3 ppm)

Une analyse en spectrométrie de masse basse résolution indique une masse $[\text{M-H}]^-$ de 337 uma avec un fragment $[\text{M-prényle-H}]^-$ à 269,0 uma (Figure 63).

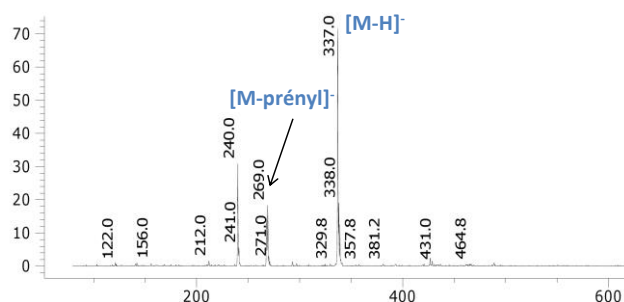


Figure 63 : Spectre de masse basse résolution de la molécule **C**. APCI mode négatif.

L'ensemble de ces données suggère une anthraquinone substituée en position 3 par une chaîne prényle. Ces données sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature pour la madagascine (**5**)^{142,251}.

3.3.4 Molécule D

La molécule **D** présente un spectre RMN ^1H très proche de celui de la madagascine.

On retrouve les 2 hydroxyles aromatiques (12,28 et 12,12 ppm), les 4 protons aromatiques (7,61 ; 7,36 ; 7,07 et 6,68 ppm) avec les mêmes constantes de couplage et un méthyle aromatique à 2,45 ppm. La chaîne en position 3 diffère, correspondant à une chaîne géranyle (2 protons éthyléniques à 5,48 et 5,09 ppm, un $\text{CH}_2\text{-O}$ à 4,68 ppm, 2 CH_2 sous forme d'un massif mal résolu entre 2,20 et 2,06 ppm et 3 méthyles à 1,79 ; 1,68 et 1,61 ppm). Les données de spectrométrie de masse basse résolution sont cohérentes avec un ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ à 407,2 uma et un fragment correspondant à la perte de la chaîne géranyle à $[\text{M-géranyl}]^+$ à 271 uma.

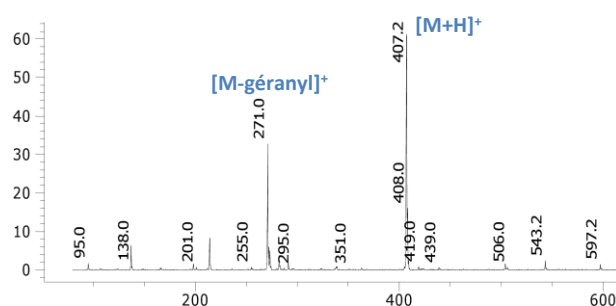


Figure 64 : Spectre de masse basse résolution de la molécule D. APCI mode positif.

Ces données sont cohérentes avec celles de la littérature correspondant à la 3-géranyloxyémidine (**12**)⁸¹.

3.4 Bilan du fractionnement de la fraction F2 de l'extrait PGE2E

Le fractionnement de la fraction F2 de l'extrait PGE2E a permis d'isoler quatre molécules dont deux vismiones : la vismione H (**94**, 20 mg) et l'acétylvismione D (**8**, 62 mg) et deux anthraquinones : la madagascine (**5**, 5 mg) et la 3-géranxyloxyémidine (**12**, 9 mg). La Figure 58, page 86 reprend l'ensemble des étapes de fractionnement réalisées sur cet extrait.

Les anthraquinones isolées, la madagascine (**5**) et la 3-géranxyloxyémidine (**12**) semblent être, au moins en partie des artéfacts liés à la purification et notamment au contact avec le gel de silice d'après les observations réalisées en cours de fractionnement et les informations de la littérature⁸¹.

La difficulté à isoler la vismione H (**94**) et l'acétylvismione D (**8**) provient du fait que celles-ci se dégradent en cours de purification aboutissant à un mélange contenant les vismiones et un ou plusieurs produits d'oxydation. De plus, la coélution de ces molécules avec des triterpènes de polarité très proche s'est avérée problématique. Une adsorption irréversible de ces molécules ou de leurs produits de dégradation a également pu être observée en provoquant une coloration du gel de silice qui n'a pas pu être éluée même à l'aide de solvants de polarité importante (AcOEt/MeOH 85:15).

Bien que les vismiones aient majoritairement été isolées par chromatographies répétées sur support de silice^{65,68,78,81,83,89,148,149,242,243}, leur instabilité vis-à-vis de ce support chromatographique est déjà connue depuis longtemps. Botta *et al.* indiquaient en 1983 qu'elles étaient sensibles au contact prolongé avec le gel de silice, provoquant des pertes considérables durant le processus de purification. Ils émettaient déjà l'hypothèse que certaines des anthraquinones isolées n'étaient peut-être pas présentes dans la plante et qu'il pouvait ne s'agir que d'artéfacts de purification. Les vismiones sont aussi connues pour leur instabilité vis-à-vis des conditions alcalines, en particulier celles qui présentent un groupement acétyle en position 6. En effet, son élimination entraîne l'aromatisation de la molécule en anthrone qui peut facilement s'oxyder en anthraquinone et en bianthrone correspondantes⁸¹. Cette dégradation a également lieu spontanément en solution. Politi *et al.* ont en effet observé et caractérisé la dégradation des vismiones contenues dans un extrait dichlorométhanique de racines de *Vismia guineensis* en solution dans le méthanol après trois semaines²⁵⁰.

4 Contenu en vismiones potentielles de l'extrait brut PGE2E

L'analyse HPLC de l'extrait PGE2E a permis de révéler la présence probable de nombreuses vismiones. En effet, ces molécules présentent un spectre UV caractéristique du noyau dihydroanthracénone (cf Figure 65)^{81,250}. De tels spectres UV ont pu être observés pour huit pics chromatographiques parmi la dizaine de pics majoritaires de l'extrait (Figure 65).

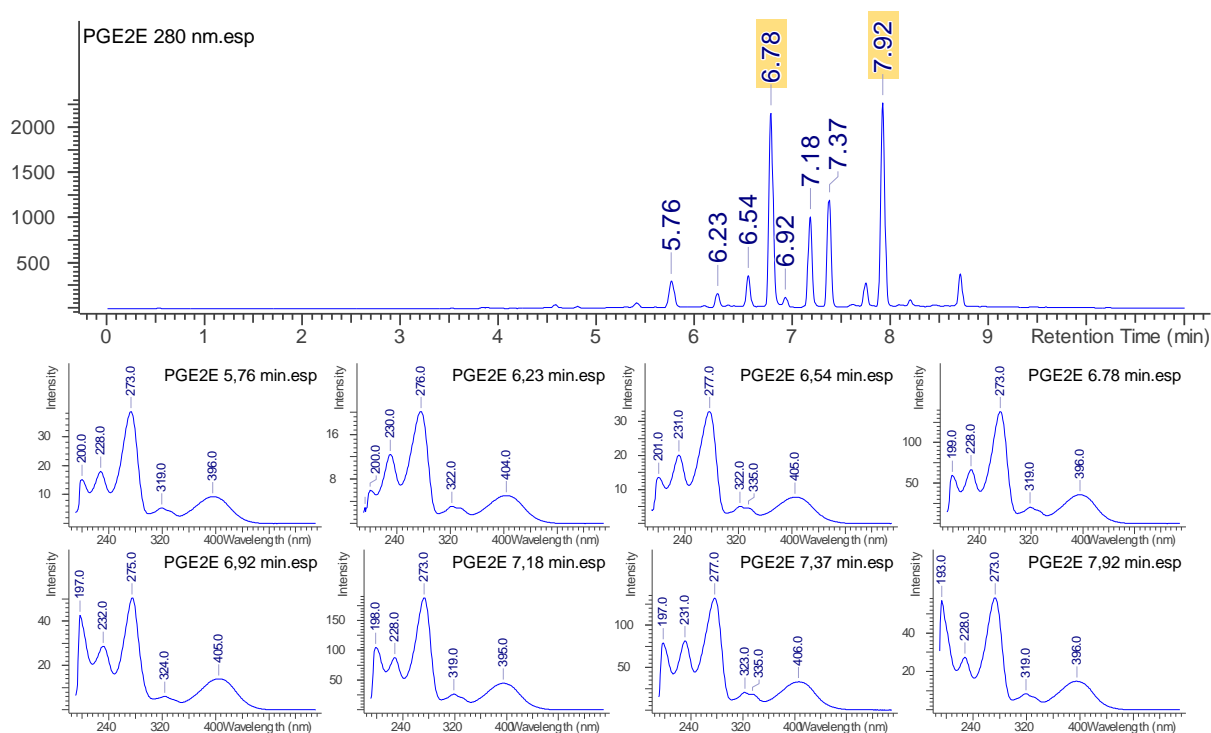


Figure 65 : Chromatogramme de l'extrait PGE2E à 280 nm (méthode vismiones).

Spectres UV caractéristiques de vismiones pour les pics majoritaires.

Les pics $t_R = 6,78$ min et $t_R = 7,92$ min correspondent respectivement à la vismione H (**94**) et à l'acétylvismione D (**8**) préalablement isolées. Il s'agit des 2 vismiones majoritairement présentes dans l'extrait. Néanmoins, notre travail montre que leur purification s'est avérée complexe. Il s'est donc révélé pertinent de développer une autre stratégie de purification plus adaptée, afin d'accéder à ces molécules de façon efficace et sans occasionner leur dégradation.

5 Développement d'une nouvelle stratégie de purification de l'extrait PGE2E

Au vu du nombre de vismes potentielles contenues dans l'extrait et afin de surmonter les problèmes de dégradation observés préalablement, d'autres stratégies de purification ont été envisagées. L'utilisation d'autres supports chromatographiques ne s'est cependant pas montrée efficace.

En effet, des essais de conditions de séparation en CCM sur alumine neutre et polyamide-6 n'ont pas permis d'obtenir des profils suffisamment résolus pour envisager d'utiliser ces supports.

Les molécules présentes dans l'extrait étant structurellement très proches, un essai de purification en chromatographie d'exclusion stérique sur séphadex LH-20 n'a pas non plus permis d'obtenir une bonne séparation.

La purification par flash chromatographie en polarité de phase inverse sur C₁₈ a déjà été employée comme méthode orthogonale dans certaines étapes de la purification précédente. Cependant, l'extrait brut dichlorométhanique étant très apolaire, la plupart des molécules ne sont éluées qu'à partir de 90% de phase organique ce qui ne laisse pas beaucoup de marge d'optimisation des paramètres de gradient. Les produits ayant par ailleurs tendance à traîner lors de l'élution provoquent des problématiques de co-élution. De plus cette phase étant relativement chère, bien que réutilisable, son utilisation pour purifier des grandes quantités d'extrait brut s'avèrerait coûteuse d'autant plus que des phénomènes d'adsorption irréversible ont également été observés en tête de colonne pour des composés très apolaires contenus dans l'extrait.

Des phases stationnaires greffées avec des chaînes carbonées de longueur inférieure, de type C8 ou C4, auraient pu s'avérer intéressantes en entraînant moins de rétention des composés très apolaires. Elles auraient pu permettre d'optimiser plus finement les paramètres d'élution. Ne disposant pas de ce type de phase au laboratoire, celles-ci n'ont pas été testées.

La chromatographie de partage centrifuge s'est rapidement imposée comme solution de choix compte-tenu des contraintes liées à l'échantillon. Elle présente en effet les avantages de pouvoir réaliser des fractionnements dans des conditions douces évitant les phénomènes de dégradation, tout en permettant de récupérer la totalité de l'échantillon injecté sans craindre de phénomènes d'adsorption irréversible.

Dans cette optique, une collaboration avec le Pr Jean-Hugues Renault et le Dr Jane Hubert à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims a été mise en place.

5.1 La chromatographie de partage centrifuge

5.1.1 Principe

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) est une technique chromatographique basée sur la répartition des analytes entre 2 phases liquides non miscibles d'un mélange de 2 solvants ou plus. Cette technique a été développée dans les années 1940 par Lyman Craig qui a effectué des séparations en réalisant des extractions liquide-liquide en série d'un même échantillon (Figure 66 A). Dans cet exemple, l'échantillon, constitué de 3 molécules est dissout dans un mélange des phases inférieure et supérieure. Après décantation, la phase inférieure est transférée dans une seconde ampoule contenant de la phase supérieure fraîche et une nouvelle extraction est réalisée. La phase mobile correspondant ici à la phase inférieure, on parle de mode descendant. Ces étapes sont renouvelées un certain nombre de fois ce qui permet de réaliser la séparation des molécules selon leurs coefficients de partage ($K_D = \frac{[X]_{\text{phase supérieure}}}{[X]_{\text{phase inférieure}}}$) pour le système de solvant considéré. Les molécules avec un faible K_D , très affines pour la phase inférieure sont éluées les premières (rouge) alors que celles qui présentent un K_D élevé ont tendance à être retenues dans la phase supérieure. Craig avait développé un appareil de Distribution à Contre-Courant constitué d'une succession d'ampoules à décanter dont il avait modifié l'architecture afin d'automatiser le procédé de fractionnement (Figure 66 B).

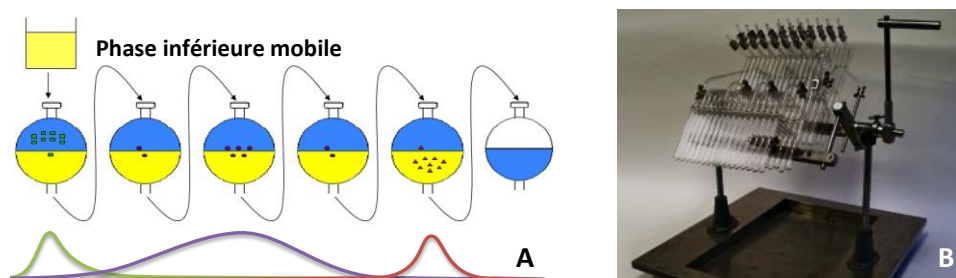


Figure 66 : Principe de la CPC. A : Extractions successives en ampoules à décanter. B : Appareil de Distribution à Contre-Courant de L. Craig. © University of Cincinnati, 2010²⁵².

La résolution de la technique étant principalement liée au nombre de cellules de fractionnement, les améliorations technologiques ont progressivement conduit à la chromatographie de partage d'aujourd'hui.

La Chromatographie de Partage Centrifuge actuelle repose sur un principe développé dans les années 1980 par Sanki engineering²⁵³. Il est basé sur un équilibre hydrostatique. La colonne, nommée ainsi par analogie avec la chromatographie classique, est en fait un rotor tournant autour d'un axe central. Des cellules qui agissent comme une multitude d'ampoules à décanter reliées entre elles par des capillaires, sont gravées dans des disques métalliques superposés et séparés par des joints. Une pompe permet de faire circuler la phase mobile dans ces cellules alors que la phase servant de phase stationnaire est immobilisée dans les cellules par la force centrifuge exercée par la rotation du rotor (Figure 67).

Approche phytochimique

Développement d'une nouvelle stratégie de purification de l'extrait PGE2E

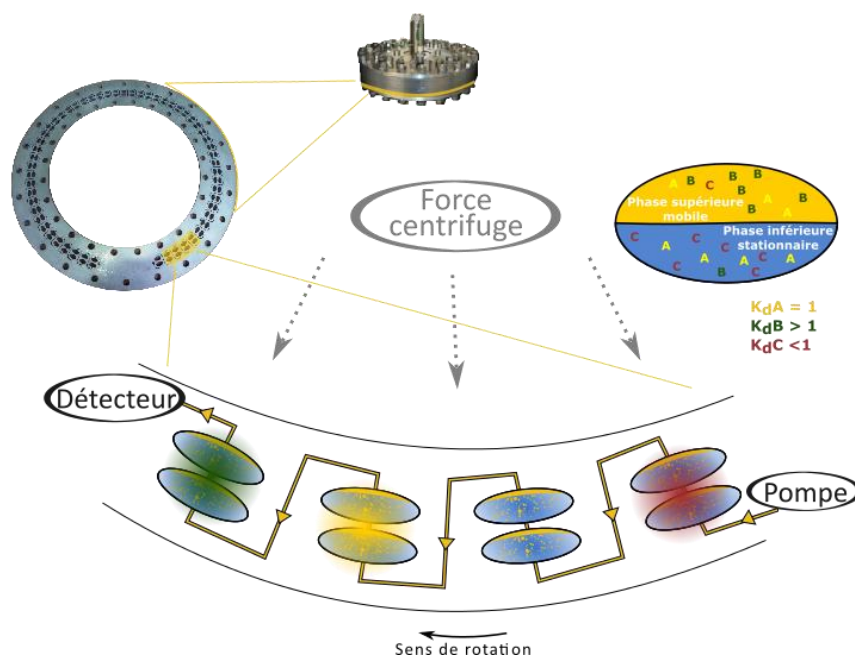


Figure 67 : Schéma de principe du fonctionnement de la CPC.

La sortie de la colonne peut être couplée, comme en HPLC, à un détecteur et/ou un collecteur de fractions.

5.1.2 Avantages de la CPC

La CPC présente de multiples avantages dans le champ d'application des substances naturelles²⁵⁴ :

- Elle ne nécessite pas l'acquisition de phases stationnaires onéreuses et offre une grande possibilité de sélectivité.
- Les solvants employés peuvent être de qualité technique.
- Le débit d'élution peut être élevé par l'absence de contre-pression exercée par une phase stationnaire solide.
- Il n'y a pas de risque d'adsorption irréversible de l'échantillon puisque la colonne peut être vidée entièrement. Le pourcentage de recouvrement de l'échantillon est ainsi total.
- Il n'y a pas de risque de dénaturation de l'échantillon par contact avec la phase stationnaire
- Le domaine d'application est très important. La CPC peut notamment être utilisée pour purifier des composés ioniques, chiraux, aux propriétés acido-basiques, des plus polaires aux plus apolaires.
- Les méthodes peuvent être transposées de l'échelle analytique à l'échelle préparative.
- La capacité de charge peut être très élevée, permettant la séparation d'échantillons allant jusqu'à plusieurs grammes.
- La résolution peut être comparable à celle de l'HPLC avec la possibilité d'isoler des composés dotés d'une pureté supérieure à 99% avec de bons rendements.

5.1.3 Choix des systèmes biphasiques

La CPC repose sur l'utilisation de systèmes biphasiques qui doivent être adaptés à l'échantillon. Le grand nombre de systèmes décrits²⁵⁴ entraîne la nécessité de tester ceux qui sont les plus appropriés à la purification de chaque échantillon.

5.1.4 Criblage de gammes de solvants

Différentes gammes de systèmes appropriées à la séparation de molécules apolaires ont été testées sur l'extrait PGE2E. Dans un premier temps, un système permettant de séparer les 2 vismiones isolées de l'extrait d'écorces de *P. glaberrimum* a été recherché. L'objectif de ce criblage de systèmes consiste à trouver les mélanges de solvants biphasiques pour lesquels le coefficient de partage de l'extrait (K_D) est proche de 1. En effet, on considère que la résolution chromatographique en CPC est optimale pour des molécules présentant des coefficients de partage compris entre 0,5 et 2 pour le système de solvant considéré.

Dans un premier temps, la détermination des coefficients de partage a été effectuée par une estimation rapide en CCM (paragraphe 5.2, p 232).

5.1.4.1 Criblage de la gamme Acétone/H₂O/Hept/Toluène

Tableau 9 : Proportions des solvants de la gamme Acétone/H₂O/Hept/Toluène.

Système	Acétone	H ₂ O	Heptane	Toluène
1	50	19,0	31,0	0,0
2	50	21,1	27,1	1,8
3	50	23,3	23,3	3,5
4	50	27,5	15,5	8,0
5	50	31,8	7,8	10,5
6	50	33,9	3,9	12,3
7	50	36,0	0,0	14,0

Une première gamme basée sur un système composé de 4 solvants (acétone, eau, heptane et toluène, Tableau 9) développée pour la séparation de flavonoïdes prénylés²⁵⁵ a été testée.

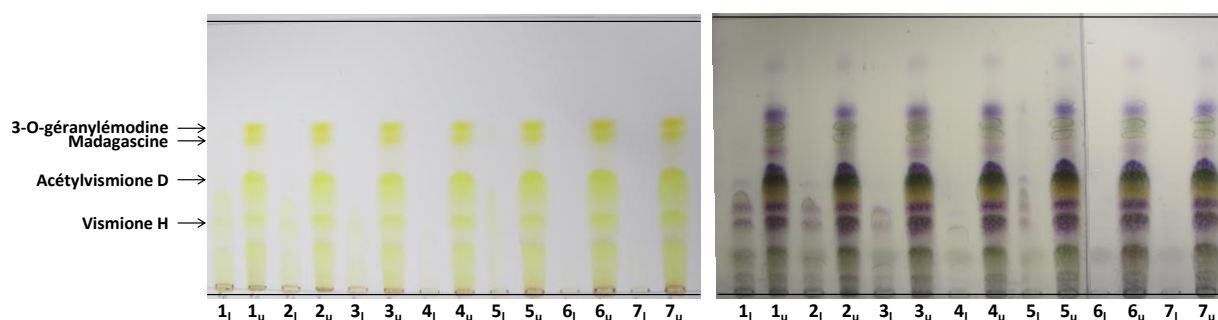


Figure 68 : Evaluation des coefficients de partage par CCM avec la gamme Acétone/H₂O/Heptane/Toluène d'après Renault *et al.*²⁵⁵.

Pour chaque système caractérisé par un nombre, les indices correspondent respectivement aux phases inférieures (l) et supérieures (u). Conditions CCM : Eluant : Hept/AcOEt (70:30) Révélation : VS.

Cette gamme ne convient pas à la séparation de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* puisque dans tous les cas la majorité de l'échantillon se retrouve dans la phase supérieure du système biphasique (Figure 68).

Approche phytochimique

Développement d'une nouvelle stratégie de purification de l'extrait PGE2E

5.1.4.2 Criblage de la gamme Hept/THF/MeCN/DMSO/H₂O

Une gamme basée sur un système à 5 solvants (heptane, THF, acétonitrile, DMSO et H₂O, Tableau 10) développée pour la séparation de peptides synthétiques hydrophobes²⁵⁶ a été testée.

Tableau 10 : Proportions des solvants de la gamme Hept/THF/MeCN/DMSO/H₂O.

Système	Hept	THF	MeCN	DMSO	H ₂ O
1	50,1	4,4	41,4	4,1	0
2	48,3	9,6	32,7	6	3,4
4	40,8	19,7	23	10,9	5,6
5	35,2	23,6	19,8	14,9	6,5
6	28,3	28,6	17,4	17,6	8,1

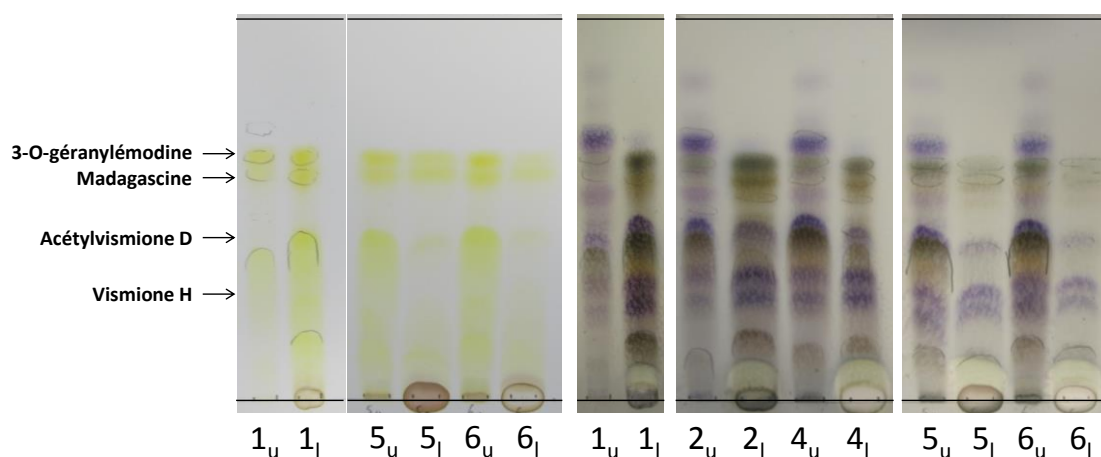


Figure 69 : Evaluation des coefficients de partage par CCM avec la gamme Hept/THF/MeCN/DMSO/H₂O d'après Amarouche *et al.*²⁵⁶

Pour chaque système caractérisé par un nombre, les indices correspondent respectivement aux phases inférieures (I) et supérieures (u).
Conditions CCM : Eluant : Hept/AcOEt (70:30) Révélation : VS.

Dans le système 1, la majorité de l'extrait se retrouve dans la phase inférieure alors que dans le système 2, une majorité des 2 vismiones se retrouve dans la phase supérieure. Une telle gamme de solvant pourrait s'avérer intéressante pour la purification des 2 vismiones mais nécessiterait de développer un système de solvant intermédiaire entre les systèmes 1 et 2.

5.1.4.3 Criblage de la gamme ARIZONA (Hept/AcOEt/MeOH/H₂O)

Une troisième gamme à 4 solvants a été étudiée. Il s'agit de la gamme ARIZONA, développée par Margraff²⁵⁷ qui est très largement utilisée en chromatographie de partage centrifuge car elle balaye une large gamme de polarités allant d'un mélange binaire AcOEt/H₂O à un mélange binaire Hept/MeOH avec toute une série de systèmes quaternaires intermédiaires (Tableau 11).

Tableau 11 : Proportions des solvants de la gamme ARIZONA Hept/AcOEt/MeOH/H₂O²⁵⁷.

Système	Heptane	AcOEt	MeOH	H ₂ O
A	0	1	0	1
B	1	19	1	19
C	1	9	1	9
D	1	6	1	6
F	1	5	1	5
G	1	4	1	4
H	1	3	1	3
J	2	5	2	5
K	1	2	1	2
L	2	3	2	3
M	5	6	5	6
N	1	1	1	1
P	6	5	6	5
Q	3	2	3	2
R	2	1	2	1
S	5	2	5	2
T	3	1	3	1
U	4	1	4	1
V	5	1	5	1
W	6	1	6	1
X	9	1	9	1
Y	19	1	19	1
Z	1	0	1	0

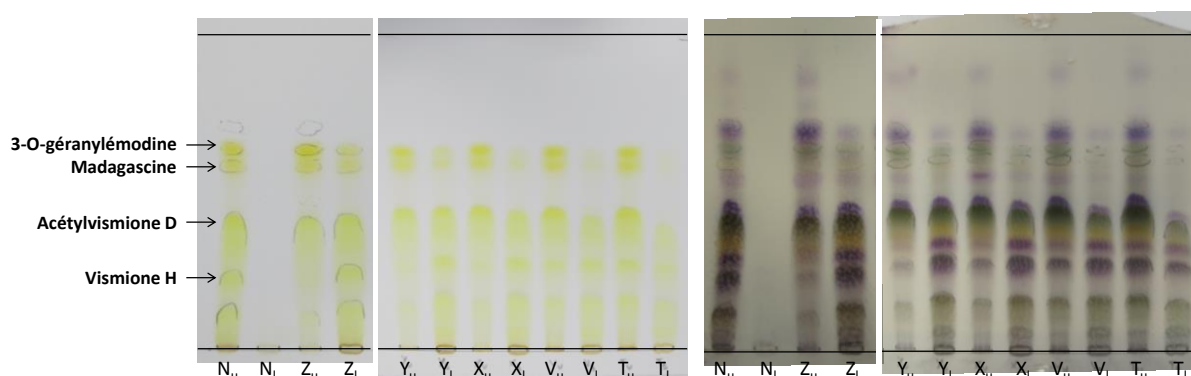


Figure 70 : Evaluation des coefficients de partage par CCM avec la Gamme ARIZONA²⁵⁷.

Pour chaque système caractérisé par une lettre, les indices correspondent respectivement aux phases inférieures (l) et supérieures (u).

Conditions CCM : Eluant : Hept/AcOEt (70:30) Révélation : VS.

L'évaluation rapide en CCM permet de voir que les 2 vismiones d'intérêt présentent des K_D proches de 1 pour les systèmes Y et Z, l'intensité des taches correspondant aux 2 molécules étant pratiquement identique dans les 2 phases.

5.1.5 Evaluation de coefficients de partage par HPLC

Une série de systèmes de la gamme ARIZONA (Heptane/AcOEt/MeOH/H₂O) s'est montrée adaptée à l'isolement de l'acétylvismione D et de la vismione H. C'est notamment le cas des systèmes Y et Z qui suggèrent des coefficients de partages proches de 1 pour les deux molécules considérées. Les coefficients de partage de ces deux molécules pour différents systèmes de la gamme ARIZONA ont donc été déterminés plus précisément par une méthode HPLC (paragraphe 5.3, p 232).

Les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Détermination des coefficients de partage de l'acétylvismione D et de la vismione H Gamme ARIZONA.

	T	V	X	Y	Z
Proportion solvants	3/1/3/1	5/1/5/1	9/1/9/1	19/1/19/1	99/0/99/2
Acétylvismione D	16,35	5,54	2,62	0,96	0,8
Vismione H	3,93	1,58	0,73	0,46	0,44

En vert sont soulignés les systèmes pour lesquels les conditions de séparation sont optimales ($0,5 < K_D < 2$).

5.2 Partition liquide-liquide de l'extrait PGE2E

En étudiant les coefficients de partage des molécules contenues dans l'extrait d'écorce PGE2E, il est apparu que le système ARIZONA Y (Heptane/AcOEt/MeOH/H₂O 19:1:19:1 v/v/v/v) permettait de diviser l'extrait en deux groupes de composés de polarité différente de manière relativement efficace. La phase supérieure contenant majoritairement l'acétylvismione D et la vismione H ainsi que les molécules plus apolaires (Figure 71, A) et la phase inférieure contenant majoritairement les molécules plus polaires et notamment toute une série de vismiones potentielles d'après les caractéristiques des spectres UV correspondants aux pics chromatographiques (Figure 71, B).

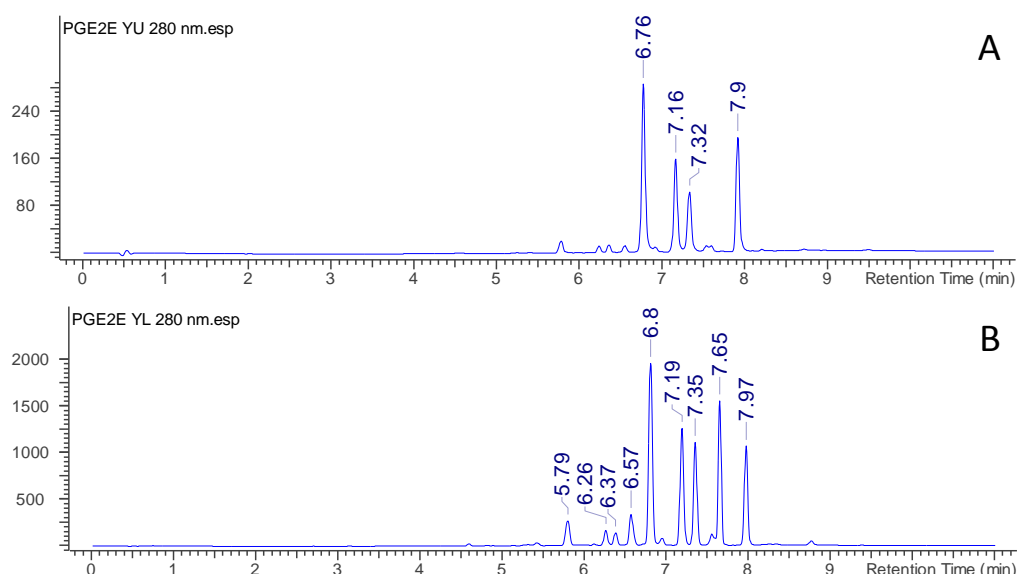


Figure 71 : Chromatogrammes à 280 nm (méthode vismiones) des phases supérieure (A) et inférieure (B) de la partition liquide-liquide de l'extrait PGE2E avec le système ARIZONA Y. Les pics identifiés présentent des spectres UV caractéristiques du noyau dihydroanthracénone.

La phase inférieure de l'extraction liquide-liquide de PGE2E par le système ARIZONA Y correspond donc à un extrait enrichi en vismiones les plus polaires.

Il nous est donc apparu pertinent de procéder à un premier fractionnement liquide-liquide de l'extrait PGE2E, permettant ainsi de séparer l'extrait en 2 groupes de molécules de polarité et de concentration distinctes. Vingt-six grammes de l'extrait PGE2E ont été fractionnés à l'aide du système ARIZONA Y Hept/EtOAc/MeOH/H₂O (19:1:19:1 v/v/v/v). Cette partition liquide-liquide a permis d'obtenir d'une part une fraction PGPO (20,4 g, 78%) correspondant à la phase supérieure, enrichie en vismione H et en acétylvismione D et d'autre part une fraction PGPA (5,4 g, 21 %) enrichie en vismiones plus polaires. La fraction PGPA a ensuite été dissoute dans du dichlorométhane froid, permettant la précipitation d'une partie des triterpènes contenus dans la fraction afin d'enrichir d'avantage la fraction et de limiter les problèmes de coélutions observées précédemment. Cette étape de précipitation a permis d'obtenir la fraction soluble correspondante PGPAF (4,3 g, 17%) (Figure 72).

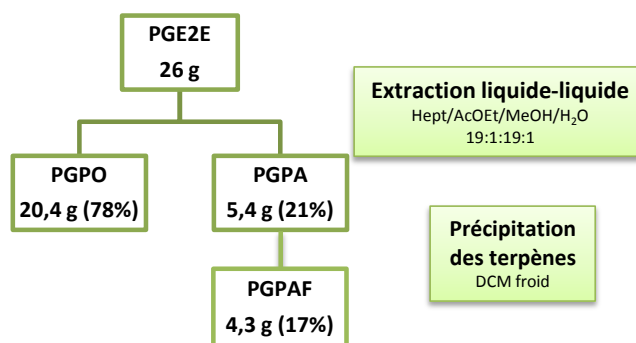


Figure 72 : Fractionnement de PGE2E par partition liquide-liquide à l'aide du système de solvants ARIZONA Y et précipitation des triterpènes.

5.3 Fractionnement de la fraction enrichie en vismiones polaires PGPAF

En attendant de pouvoir purifier les fractions obtenues par CPC à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims, une partie de la fraction PGPAF (2,4 g) a d'abord été fractionnée par plusieurs étapes de chromatographie flash et HPLC semi-préparative en polarité de phase inverse (paragraphe 6.3, p 234). Ce fractionnement a ainsi permis d'isoler 9 molécules. La vismione H (**94**, 125 mg) et l'acétylvismione D (**8**, 83 mg), tout de même présentes dans la fraction PGPAF mais de façon minoritaire par rapport à leur concentration dans l'extrait brut ont donc ainsi été isolées avec sept nouvelles vismiones minoritaires dans l'extrait (**E**, 12 mg ; **F**, 13 mg ; **G**, 22 mg ; **H**, 16 mg ; **I**, 34 mg ; **J**, 13 mg ; **K**, 8 mg), avec des rendements compris entre 0,05 % et 0,9 % à partir de l'extrait brut PGE2E (Figure 73). Ces rendements, non optimisés, ne correspondent qu'aux fractions contenant les molécules à l'état pur, les différentes vismiones isolées étant également présentes en mélange dans certaines autres fractions. Cette première approche a avant tout eu pour but d'isoler des quantités de molécules suffisantes pour réaliser leur caractérisation structurale et déterminer leur activité biologique.

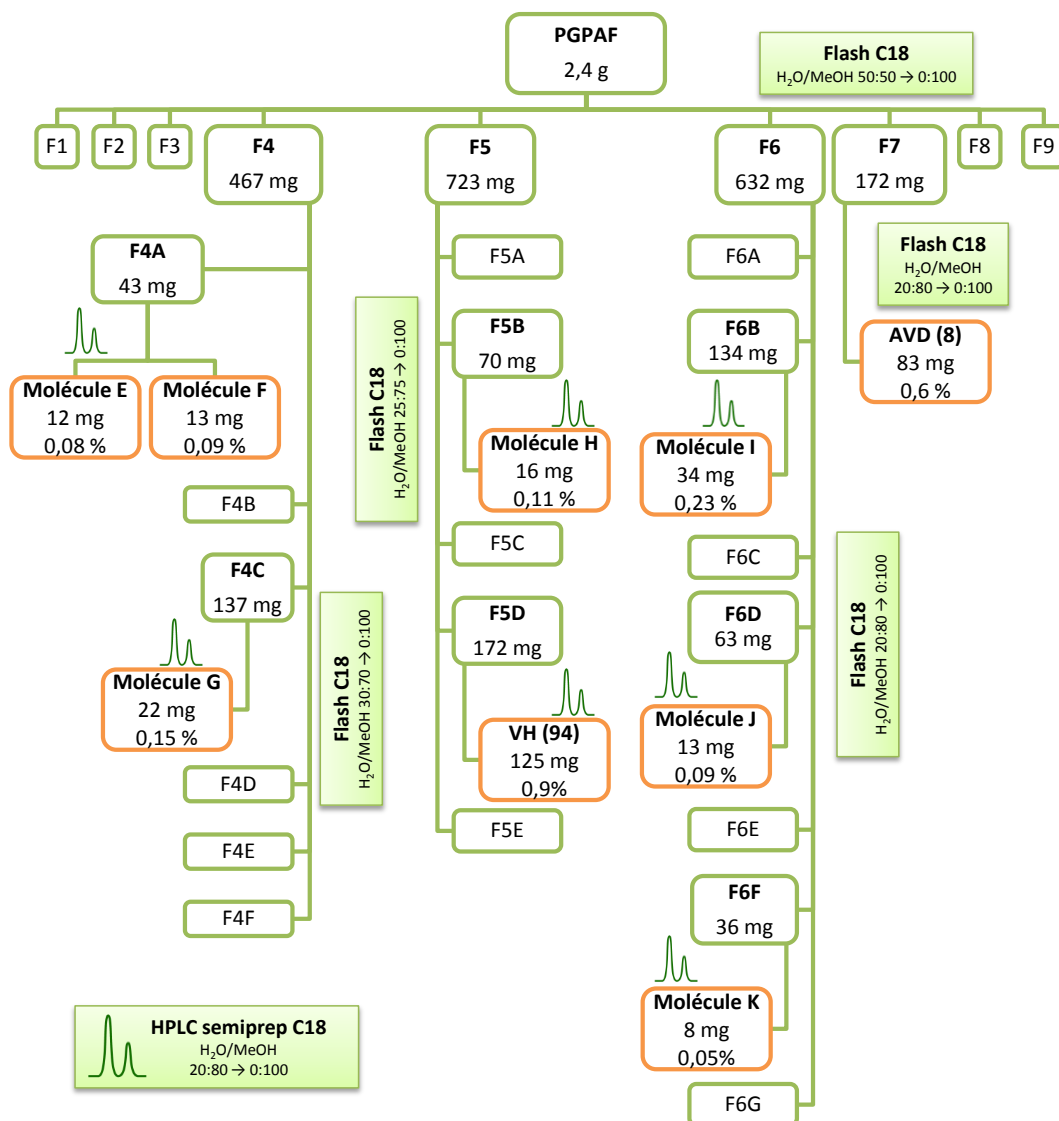


Figure 73 : Fractionnement de la fraction PGPAF en polarité de phase inverse.

Approche phytochimique

5.4 Détermination structurale des molécules E à K isolées de PGPAF

5.4.1 Molécule E ($t_R = 6,26$ min)

La molécule **E** présente bien les caractéristiques du noyau dihydroanthracénone observées pour les molécules précédentes :

En RMN ^1H on observe :

- Les deux hydroxyles très déblindés, (16,15 et 10,12 ppm)
- Les 4 protons sous forme de doublets ou de doublets de doublets entre 3,71 et 2,85 ppm avec une grande constante de couplage ($J=16,0$ à $17,7$ Hz).
- Un méthyle à 1,70 ppm

En RMN ^{13}C on observe :

- 1 carbonyle à 200,2 ppm
- 3 carbones liés à un hydroxyle aromatique (166,3 ; 159,6 et 156,8 ppm)
- Les méthylènes du cycle saturé à 49,1 et 39,5 ppm

En ce qui concerne la substitution de la dihydroanthracénone, on observe :

- La présence d'une chaîne prényle (1 proton éthylénique (5,30 ppm) sous forme de triplet de septuplets, 1 $\text{CH}_2\text{-O}$ (3,52 ppm) sous forme de doublet couplant avec le proton éthylénique ($J=6,5$ Hz), 2 méthyles à 1,85 et 1,75 ppm)
- La présence d'un groupement acétyle avec un méthyle à 1,87 ppm en RMN ^1H et un la présence d'un deuxième carbonyle à 170,9 ppm en RMN ^{13}C .

En HRMS, on observe un ion de masse 407.14951 uma correspondant à l'adduit sodium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de la formule $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NaO}_6$. On observe également le fragment correspondant à la perte du groupement acétyle $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$ de masse 325,14289 uma et un fragment correspondant à la perte de l'acétyle et d'une partie de la chaîne prényle $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_4\text{H}_7]^+$ de 269.08002 uma, caractéristique de la fragmentation d'une vismione C-prénylée²⁵⁰ (Figure 74).

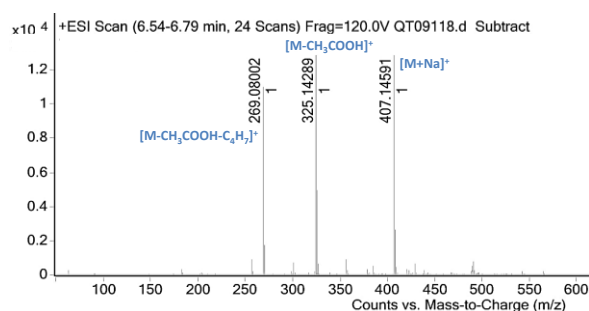


Figure 74 : Spectre HRMS de la molécule E.

Cependant, par rapport à la vismione H (**94**), il manque le proton aromatique en position 2. On peut en déduire que la dihydroanthracénone est C-substituée en position 2, ce que confirment les corrélations HMBC (Figure 75).

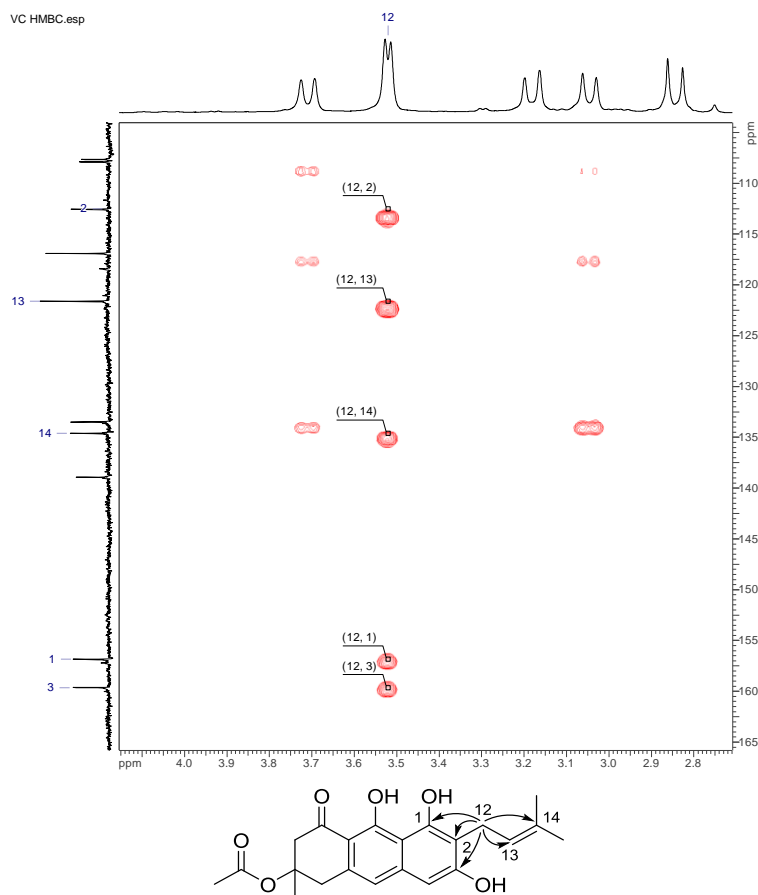


Figure 75 : Principales corrélations HMBC de la molécule E.

La molécule E correspond donc à la vismione C (**78**) déjà isolée de *P. febrifugum*⁸¹, *P. glaberrimum*^{68,84} et *P. tenuifolium*⁸⁸ et ses données spectrales sont en accord avec celles décrites dans la littérature.

5.4.2 Molécule F ($t_R = 6,34$ min)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de la molécule **F** est très proche de celui de la vismione **C (78)** à l'exception de :

- La présence d'un groupement méthoxy caractérisé par un singulet comptant pour 3 H à 3,95 ppm et un carbone à 55,6 ppm.
- L'absence du groupement acétyle qui fait apparaître les protons des positions 5 et 7 sous la forme de deux systèmes ABq à 3,07 et 2,86 ppm présentant de grandes constantes de couplage $J_{AB} = 16,2$ et $17,4$ Hz respectivement (Figure 76) et la valeur de déplacement chimique du méthyle en position 11 passe de 1,70 ppm à 1,47 ppm. Ces caractéristiques avaient déjà été soulignées par Botta *et al.* qui les avaient qualifiées de larges singulets⁸¹.

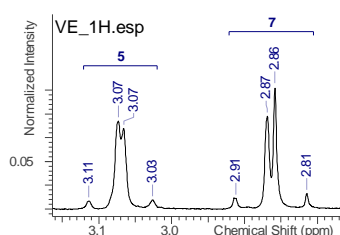


Figure 76 : Système AB des protons 5 et 7 de la molécule **F**.

Les corrélations HMBC permettent de confirmer la présence du méthoxy sur la position 3 (Figure 77).

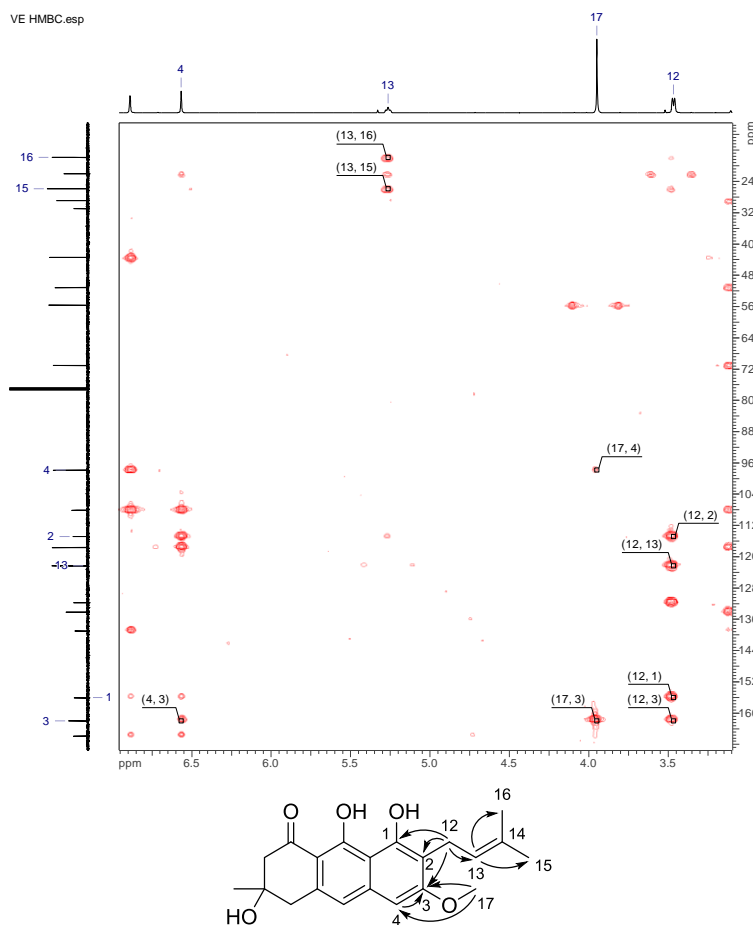


Figure 77 : Principales corrélations HMBC de la molécule **F**.

Les données HRMS sont en accord avec les informations fournies en RMN. On observe notamment les ions $[M+Na]^+$ à 379,15127 uma et $[M+H]^+$ à 357,16972 uma ainsi qu'un fragment caractéristique de la perte d'une partie de la chaîne C-prényle $[M-C_4H_7]^+$ à 301,10684 uma caractéristique des vismiones C-prénylées²⁵⁰ (Figure 78).

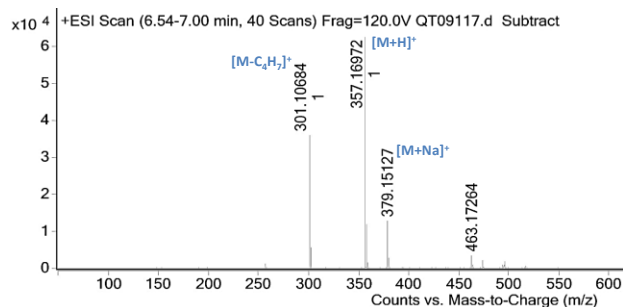


Figure 78 : Spectre HRMS de la molécule F.

La molécule **F** correspond donc à la vismione E (**79**) déjà isolée de *P. febrifugum*⁸¹, *P. glaberrimum*⁸⁴ et *Cratoxylum cochinchinense*¹⁴⁸ et les données spectrales sont en accord avec celles de la littérature.

5.4.3 Molécule G ($t_R = 5,79$ min)

Les spectres RMN 1H et ^{13}C de la molécule **G** sont fortement semblables à ceux de la vismione H (**94**) à cela qu'il manque le groupement acétyle. On observe également les mêmes systèmes ABq que pour la vismione E (**79**) ainsi que l'absence du méthyle à 1,86 ppm et du carbonyle à 170,4 ppm.

Le spectre HRMS indique un ion $[M+H]^+$ à 343,15343 uma mais qui perd rapidement une molécule d'eau pour donner $[M-OH]^+$ à 325,14319 uma (Figure 79).

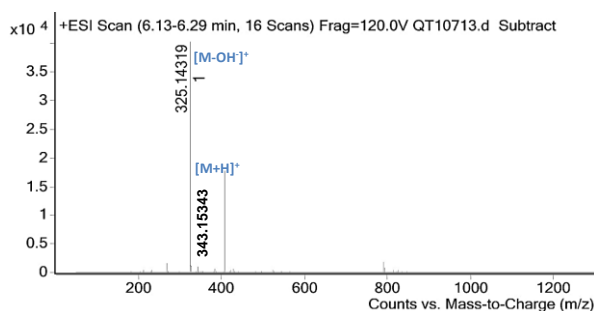


Figure 79 : Spectre de masse HRMS de la molécule G.

La molécule **G** correspond donc à la désacétylvismione H (**97**) déjà isolée de *P. tenuifolium*⁸⁸, *Vismia jefensis* et *V. baccifera*²⁴⁵.

5.4.4 Molécule H ($t_R = 6,57$ min)

La molécule **H** présente un noyau dihydroanthracénone non acétylé en position 6 (présence du système ABq RMN ^1H et absence du carbonyle en RMN ^{13}C) et C-substituée en position 2 par une chaîne géranyle (2 triplets éthyléniques en RMN ^1H et perte d'un fragment C_9H_{15} en HRMS). Les données RMN ^1H et ^{13}C et HMBC concordent avec les informations apportées par la HRMS (Figure 80) et permettent de déduire qu'il s'agit de la vismione **F** (**66**).

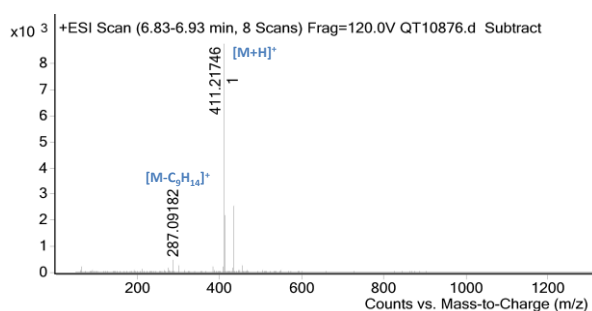


Figure 80 : Spectre HRMS de la molécule **F**.

Cette molécule a déjà été isolée ou caractérisée dans de nombreuses espèces de *Psorospermum* (*P. febrifugum*⁷⁸, *P. corymbiferum*⁶⁸, *P. glaberrimum*^{68,84}, *P. tenuifolium*⁸⁸) ainsi que dans *Vismia guineensis*²⁵⁰ et *Cratoxylum cochinchinense*¹⁴⁸.

5.4.5 Molécule I ($t_R = 7,19$ min)

L'analyse des données RMN ^1H et ^{13}C et HMBC de la molécule **I** indique qu'il s'agit d'une dihydroanthracénone non acétylée en position 6 et O-substituée en position 3 par une chaîne géranyle. Ces données sont en accord avec la masse déterminée en HRMS indiquant un ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 411,21673 uma et un fragment à 275,09147 uma correspondant à la perte d'un fragment géranyle (Figure 81).

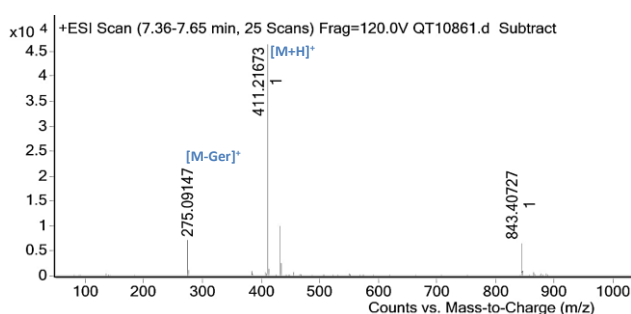


Figure 81 : Spectre HRMS de la molécule **I**.

Elle correspond donc à la vismione **D** (**33**) déjà isolée des genres *Psorospermum* (*P. febrifugum*^{78,81}, *P. corymbiferum*⁶⁸, *P. glaberrimum*^{68,84}, *P. tenuifolium*⁸⁸ et *P. aurantiacum*^{67,258}), *Vismia* (*V. guineensis*²⁵⁰ et *V. orientalis*¹⁴⁹) et de *Cratoxylum formosum*²⁵⁹ et *Ochna pulchra*²⁴⁸.

5.4.6 Molécule J ($t_R = 7,35$ min)

L'analyse des données RMN ^1H et ^{13}C et HMBC de la molécule **J** indique qu'il s'agit d'une dihydroanthracénone acétylée en position 6 et C-substituée en position 2 par une chaîne géranyle. Ces données sont en accord avec la masse déterminée en HRMS indiquant un ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de 475,20981 uma, un ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 453,22772 uma ainsi que des fragments à 393,20681 uma et 269,08171 uma correspondant respectivement à la perte d'un groupement acétyle et à la perte d'un groupement acétyle et d'un fragment C_9H_{15} caractéristique des vismiones C-géranylées²⁵⁰ (Figure 82).

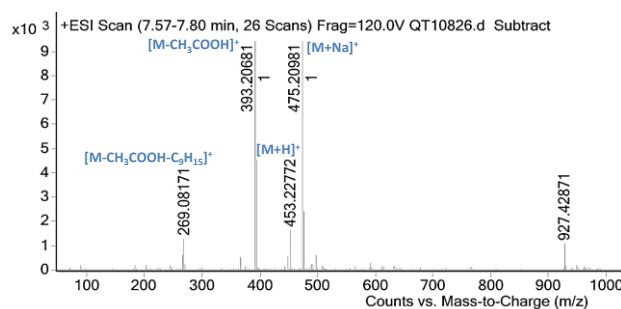


Figure 82 : Spectre HRMS de la molécule J.

Elle correspond donc à l'acétylvismione F (**44**) déjà isolée des espèces *P. corymbiferum*⁶⁸, *P. glaberrimum*^{84,147} et *P. tenuifolium*⁸⁸.

5.4.7 Molécule K ($t_R = 7,65$ min)

L'analyse des données RMN ^1H et ^{13}C et HMBC de la molécule **K** indique qu'il s'agit d'une dihydroanthracénone non acétylée en position 6, C-substituée en position 2 par une chaîne géranyle et méthoxylée en position 3. Ces données sont en accord avec la masse déterminée en HRMS indiquant un ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 425,23366 uma. Un fragment de masse 301,10864 uma correspondant à l'ion $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{14}]^+$ caractéristique d'une vismione C-géranylée²⁵⁰ est également observé (Figure 83).

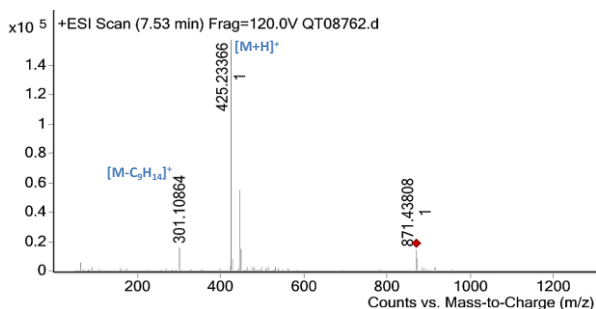


Figure 83 : Spectre HRMS de la molécule K.

Elle correspond donc à la vismione M (**42**) déjà isolée des espèces *P. febrifugum*²⁶⁰, *P. aurantiacum*⁶⁷, *Ochna pulchra*²⁶¹, *Vismia guineensis*²⁵⁰.

5.5 Bilan du fractionnement de la fraction PGPAF

Le fractionnement de la fraction enrichie en vismiones polaires PGPAF par chromatographie flash et HPLC semi préparative en polarité de phase inverse a permis d'isoler 9 vismiones de l'extrait d'écorces de *P. glaberrimum* PGE2E (Figure 84).

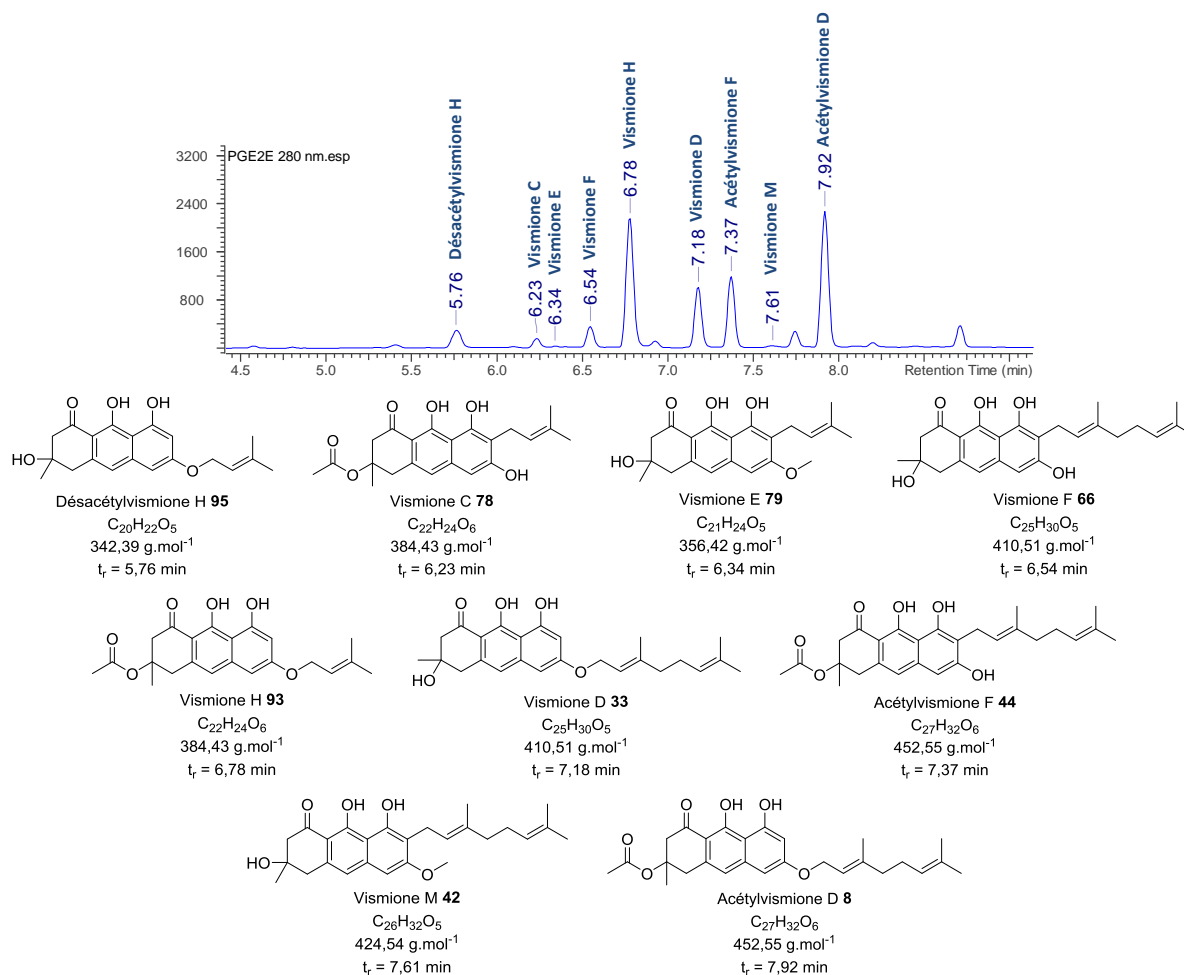


Figure 84 : Bilan du fractionnement de PGPAF en polarité de phase inverse.

Méthode HPLC *Vismione*, $\lambda = 280$ nm.

Si toutes ces molécules ont déjà été isolées et décrites au sein du genre *Psorospermum*, à notre connaissance, c'est la première fois que la désacétylvismione H, la vismione H et la vismione M sont isolées de l'espèce *P. glaberrimum*.

C'est également la première fois qu'un aussi grand nombre de vismiones sont isolées à partir d'un seul et même extrait. Ceci peut être dû à des teneurs variables d'un extrait à l'autre mais également à un processus de dégradation de ces molécules sensibles en leurs formes anthrones, anthraquinones et bianthrones fréquemment isolées lors des procédés de purification.

Toutes ces molécules ont été testées sur des cultures *in vitro* de *Plasmodium* et de *Leishmania* ainsi que sur des cultures de différentes souches de cellules mammifères afin de déterminer leurs activités biologiques (paragraphe 3.3 p 209).

5.6 Détermination des coefficients de partage des vismiones isolées pour différents systèmes de solvant de la gamme ARIZONA

L'identification des neuf vismiones contenues dans l'extrait et précédemment isolées par des méthodes de fractionnement classiques a permis de déterminer leur coefficients de partage par HPLC, à partir de la fraction enrichie PGPAF pour différents systèmes de solvant de la gamme ARIZONA (Heptane/AcOEt/MeOH/H₂O) (Tableau 13). Ces valeurs permettent de déterminer les systèmes de solvants qui se montreront les plus adaptés pour réaliser le fractionnement de l'extrait en CPC (valeurs de K_D comprises entre 0,5 et 2).

Tableau 13 : Détermination des coefficients de partage pour les vismiones contenues dans l'extrait PGE2E – Gamme ARIZONA.

	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Proportion solvants	5/2/5/2	3/1/3/1	4/1/4/1	5/1/5/1	6/1/6/1	9/1/9/1	19/1/19/1	99/0/99/2
Acétylvismione D	14,21	16,35	6,16	5,54	2,95	2,62	0,96	0,8
Vismione M	1,85	2,52	1,17	1,00	0,42	0,16	0,12	-
Acétylvismione F	2,66	2,53	0,90	0,74	0,40	0,21	0,12	-
Vismione D	1,97	1,94	0,78	0,65	0,43	0,23	0,16	-
Vismione H	3,70	3,93	1,85	1,58	1,01	0,73	0,46	0,44
Vismione F	0,33	0,29	0,11	0,09	0,05	0,03	0,02	-
Vismione E	0,67	0,65	0,28	0,25	0,16	0,11	0,08	-
Vismione C	0,63	0,60	0,24	0,20	0,12	0,08	0,05	-
Déacétyl vismione H	0,46	0,41	0,19	0,16	0,10	0,07	0,05	-

En vert sont soulignés les systèmes pour lesquels les conditions de séparation sont optimales ($0,5 < K_D < 2$).

5.7 Fractionnement par Extraction de Partage Centrifuge

Les vismiones majoritaires ayant été isolées de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* en quantités suffisantes pour évaluer leur activité biologique *in vitro*, le second objectif était de mettre au point une méthodologie de fractionnement permettant de purifier aisément les molécules majoritaires en quantité importante de manière à permettre de développer une approche hémisynthétique. Par ailleurs, la vismione H étant présente en quantité importante dans l'extrait et son activité antileishmanienne en ayant fait notre nouveau chef de file (paragraphe 3.3.2, p 210), il était indispensable de mettre au point une méthodologie permettant de la purifier en quantité adaptée à une investigation pharmacologique plus poussée.

L'extraction de partage centrifuge s'est montrée particulièrement indiquée pour la productivité que nous souhaitons développer dans la purification des vismiones de l'extrait PGE2E.

L'Extracteur de Partage Centrifuge est un appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge doté d'une architecture de cellules légèrement différente de celle d'une CPC classique permettant ainsi de réaliser des fractionnements sur des échantillons de masse plus importante et à un débit plus élevé²⁶².

5.7.1 Fractionnement de la fraction PGPO par EPC

La fraction PGPO enrichie en acétylvismione D et en vismione H obtenue précédemment (paragraphe 5.2, p 100) a été fractionnée par Extraction de Partage Centrifuge selon les conditions décrites au paragraphe 6.4.1 (p 235).

Ces conditions ont permis une bonne séparation des deux vismiones d'intérêt donnant lieu à deux fractions d'intérêt très largement enrichies respectivement en acétylvismione D (F2, 1152 mg, 36 % / PGPO) et en vismione H (F3, 735 mg, 23 % / PGPO). Deux autres vismiones également présentes dans la fraction PGPO, la vismione D et l'acétylvismione F, ont été récupérées dans la fraction F4 lors de la phase d'extrusion (Figure 85). La phase d'extrusion consiste à évacuer la phase stationnaire avec de la phase mobile par effet piston en basculant du mode ascendant vers le mode descendant. Leur forte rétention par la phase stationnaire ne permet pas dans ces conditions leur séparation correcte.

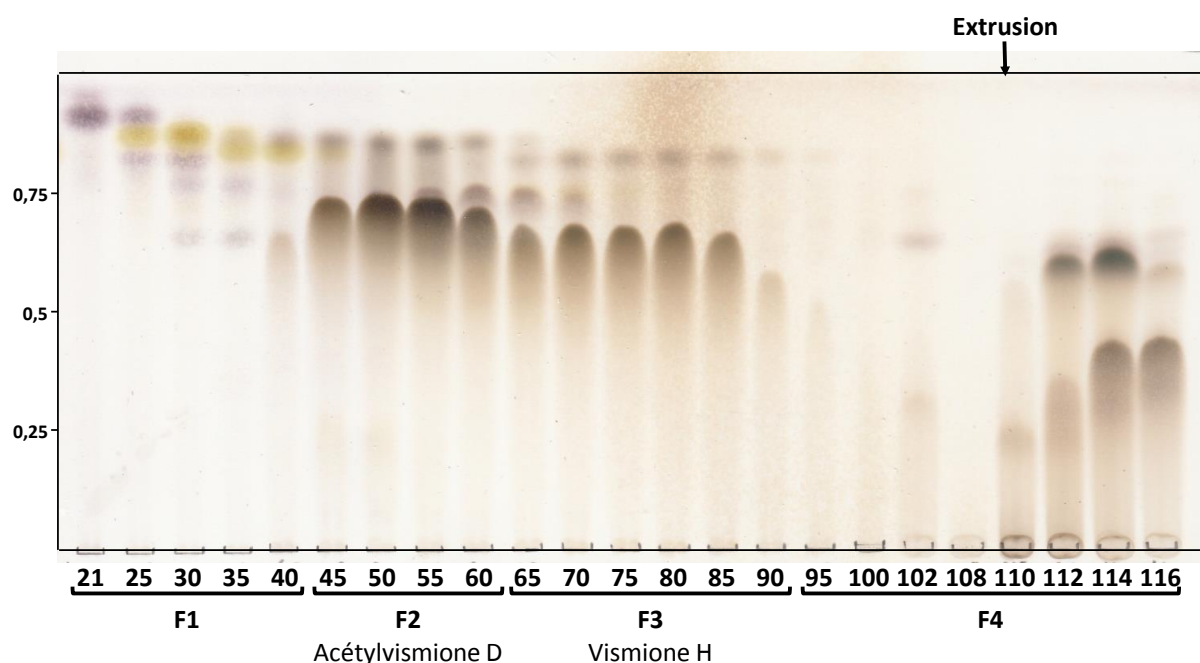


Figure 85 : Fractionnement de la fraction PGPO par EPC.

Conditions CCM : Eluant Hept/AcOEt (50:50), révélation VS.

Les fractions F2 et F3, respectivement largement enrichies en acétylvismione D (**8**) et vismione H (**94**) ont ensuite été fractionnées par chromatographie flash en polarité de phase inverse sur colonne C18 permettant ainsi d'obtenir 852 mg d'acétylvismione D (**8**) et 453 mg de vismione H (**94**) avec plus de 98% de pureté estimée en RMN ¹H.

Le pourcentage de recouvrement sur l'extrait brut de départ suite à ces 3 étapes de fractionnement est estimé respectivement à 78 et 80 % pour l'acétylvismione D (**8**) et la vismione H (**94**), d'après le dosage de ces molécules réalisé dans l'extrait PGE2E (Paragraphe 6.2, p 124).

5.7.1.1 Tentative d'augmentation de la productivité du fractionnement de la fraction PGPO

L'objectif du fractionnement de la fraction PGPO est de produire de l'acétylvismione D (**8**) et de la vismione H (**94**) en quantités importantes en vue de la réalisation de tests pharmacologiques plus approfondis et de servir de matières premières à des réactions d'hémisynthèse.

5.7.1.1.1 Augmentation de la charge

Afin de purifier davantage d'extrait en une fois, la masse d'extrait injecté a été augmentée à 5 g dans les mêmes conditions de fractionnement que celles utilisées précédemment.

Cependant, une telle augmentation de la charge a conduit à un déséquilibre qui a dramatiquement réduit la rétention de la phase stationnaire à seulement 25 % provoquant une séparation médiocre et le recouvrement de certaines fractions contenant de l'acétylvismione D (**8**) et de la vismione H (**94**).

Un essai avec 4 g d'extrait n'a pas pu être réalisé du fait de la durée limitée des séjours réalisés à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims.

5.7.1.1.2 Utilisation du mode co-courant

Le co-courant est une technique qui peut être utilisée en cas de faible rétention de la phase stationnaire. Elle consiste à renouveler une partie de la perte de phase stationnaire en utilisant une phase mobile contenant un faible pourcentage de la phase correspondant à la phase stationnaire.

Un essai en co-courant a été réalisé avec 10% de phase stationnaire dans la phase mobile en injectant 5 g de la fraction PGPO.

Avec cette technique, le volume de rétention finale a pu être restauré à 49 %, relativement proche des 59 % dans le cas de l'injection de 3 g en élution classique.

Cependant, le co-courant a l'inconvénient de ralentir l'élution des molécules possédant les K_D les plus importants et d'augmenter celui présentant des K_D plus faibles²⁶³.

Dans le cas de la fraction PGPO, cette technique a dramatiquement fait chuter la résolution de la séparation.

5.7.1.1.3 Multiple Dual Mode

En chromatographie de partage centrifuge, le dual mode consiste à changer le rôle de chacune des de phase liquides au cours de l'élution. La phase employée comme phase stationnaire en début d'élution devient dans un second temps la phase mobile et inversement. Ce mode d'élution permet ainsi d'éluer des composés présentant une forte affinité pour la phase stationnaire utilisée au début du fractionnement.

Le multiple dual mode dérive de ce mode d'élution. Il consiste à réaliser plusieurs étapes de dual mode successives. Entre ces différentes étapes de dual mode, l'échantillon peut être réinjecté afin d'augmenter la productivité de la purification sans avoir à vidanger et reconditionner la colonne entre les différentes injections. Ce mode est particulièrement utile pour purifier un mélange de deux analytes mal résolus et pour lesquels on observe une zone de recouvrement²⁶⁴.

Ce mode d'élution a été réalisé pour tenter d'améliorer la productivité du fractionnement de la fraction enrichie PGPO (Figure 86).

Les conditions du fractionnement sont détaillées au paragraphe 6.4.3 (p 236).

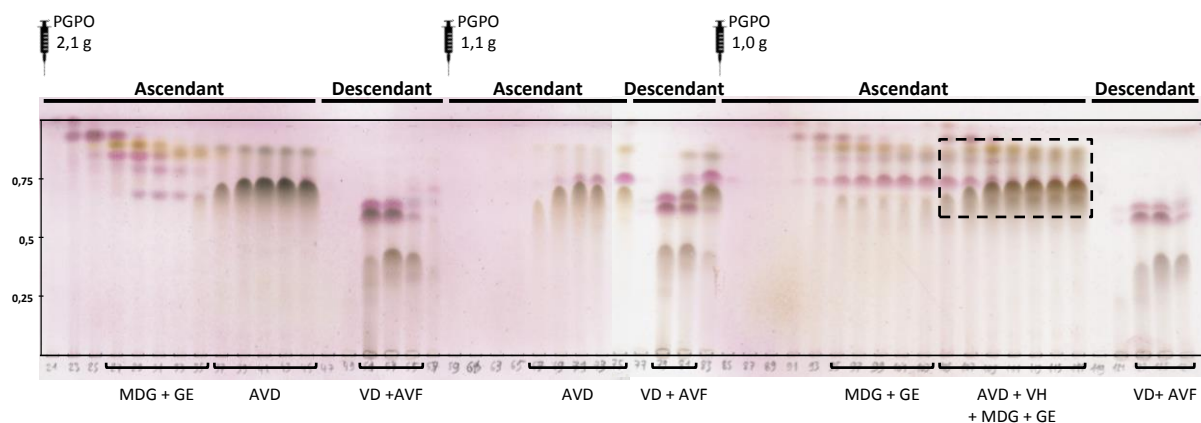


Figure 86 : Fractionnement de PGPO en Multiple Dual Mode.

Conditions CCM : Eluant Hept/AcOEt (50:50), révélation VS.

En observant la CCM des fractions recueillies, on remarque une zone de chevauchement qui apparaît après la troisième injection. On observe un recouvrement de la vismione H ($R_f = 0,67$) et de l'acétylvismione D ($R_f = 0,69$) avec la madagascine ($R_f = 0,84$) et la 3-géranxyoxyémidine ($R_f = 0,88$) (encadré en pointillés). L'extrait étant complexe et le volume d'injection important (18 mL pour une colonne de 300 mL), on observe un décalage des groupes de molécules ce qui provoque des coélutions. Pour éviter de tels désagréments, il aurait probablement fallu n'injecter un nouvel échantillon que tous les deux cycles afin de mieux synchroniser l'avancée des molécules dans la colonne, mais dans ce cas la productivité recherchée au départ aurait été perdue.

5.7.1.2 Conclusion

La méthode la plus simple d'éluion est aussi la plus efficace pour purifier l'acétylvismione D (**8**) et la vismione H (**94**) en Extraction de Partage Centrifuge.

Cette méthode permet ainsi en 52 minutes de fractionner 3 g de la fraction enrichie afin d'obtenir deux fractions très enrichies en chacune de ces deux molécules. Cela représente une consommation en solvant réduite d'environ 1,2 L d'heptane et 500 mL de méthanol de qualité technique nécessaires à l'éluion.

Ces 2 fractions peuvent alors être purifiées en polarité de phase inverse afin d'obtenir des molécules pures à plus 98 % par estimation en RMN ^1H avec un taux de recouvrement de 78 % pour l'acétylvismione D et 80% pour la vismione H à partir de l'extrait brut dichlorométhanique d'écorce de *P. glaberrimum* PGE2E en seulement 3 étapes de fractionnement.

5.7.2 Fractionnement de la fraction PGPAF par EPC

Des essais de fractionnement de la fraction enrichie en vismiones polaires PGPAF ont ensuite été réalisés par EPC dans le but de proposer une méthode de purification alternative et plus efficace que les fractionnements répétés par chromatographie conventionnelle en polarité de phase inverse.

5.7.2.1 Fractionnement par EPC en dual mode

Dans cette expérience, le système intermédiaire ARIZONA 8/1/8/1 (Hept/AcOEt/MeOH/ H₂O v:v:v:v) a été employé pour fractionner 1,03 g de la fraction enrichie PGPAF selon les conditions décrites au paragraphe 6.5.1 (p 237).

200 tubes de 10 mL ont été collectés et regroupés selon leur profil CCM en 13 fractions (Figure 87). Les fractions de masse supérieure ou égale à 40 mg ont ensuite été analysées en HPLC afin de déterminer leur contenu en vismiones (Tableau 14).

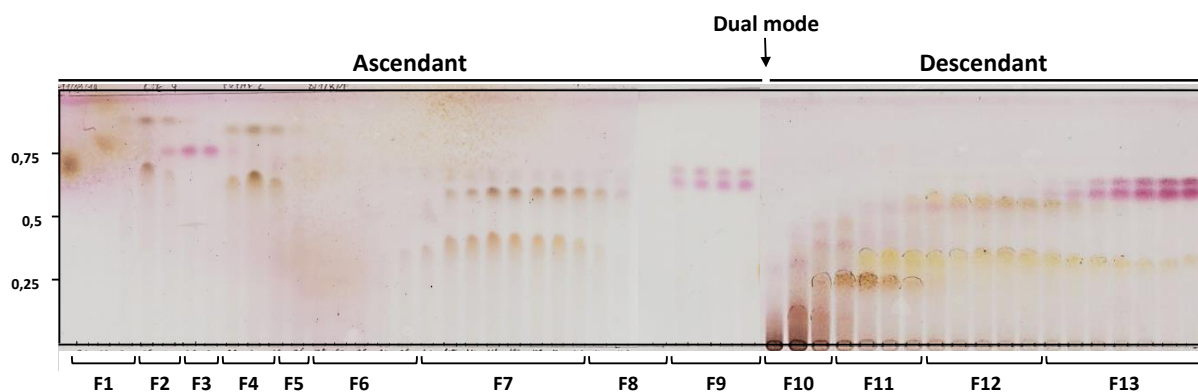


Figure 87 : Fractionnement EPC de la fraction enrichie PGPAF en dual mode avec le système ARIZONA 8/1/8/1.

Conditions CCM : Eluant Hept/AcOEt (50:50), révélation VS.

Tableau 14: Tableau récapitulatif du fractionnement de la fraction enrichie PGPAF en dual mode avec le système ARIZONA 8/1/8/1.

Fraction	Masse (mg)	Rendement (%)	Contenu en vismiones
1	1,3	0,13	-
2	40,0	3,86	Acétylvismione D
3	8,0	0,77	-
4	142,5	13,77	Vismione H
5	12,1	1,17	-
6	31,1	3,01	-
7	188,2	18,19	Vismione D + Acétylvismione F + Vismione M
8	36,2	3,50	-
9	144,6	13,97	Triterpènes
10	104,2	10,07	Vismione F
11	120,0	11,61	Vismione F
12	91,4	8,83	Désacétylvismione H + Vismione C
13	114,7	11,08	Désacétylvismione H + Vismione E
TOTAL	1034,5	99,95	

Cette tentative de fractionnement en *dual mode* n'a pas permis d'isoler efficacement les vismiones contenues dans l'extrait. De par leurs proximités structurales, plusieurs d'entre elles présentent des coefficients de partage très proches ce qui provoque une faible sélectivité vis-à-vis de la séparation et engendre des coélutions. Néanmoins, cette technique est intéressante car elle permet de réaliser lors d'une séparation de 100 minutes un important enrichissement en vismiones minoritaires dans l'extrait qui pourront ensuite être séparées en une seule étape d'HPLC semi-préparative.

La fraction 11 présente notamment un profil HPLC intéressant en plus de la vismione F (**66**) $t_R = 6,52$ min, la présence d'un pic à $t_R = 4,56$ min associé à un spectre UV caractéristique d'un noyau dihydroanthracénone (Figure 88).

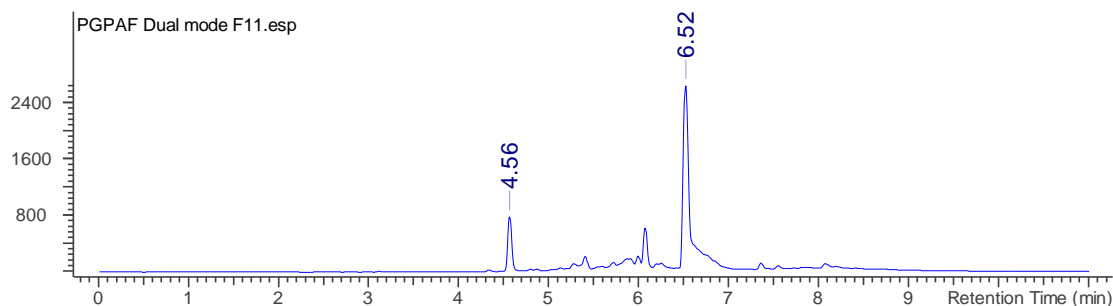


Figure 88 Chromatogramme de la fraction 11 issue du fractionnement EPC de la fraction enrichie PGPAF en dual mode avec le système ARIZONA 8/1/8/1.
Méthode HPLC *Vismione*, $\lambda = 280$ nm.

La fraction 11 a par conséquent été sous-fractionnée par HPLC semi préparative en polarité de phase inverse et a permis d'isoler 2 mg de la molécule **L** présentant le temps de rétention $t_R = 4,56$ min.

Cette molécule présente toutes les caractéristiques RMN ^1H et ^{13}C d'une dihydroanthracénone acétylée en position 6. Par contre les spectres ne montrent aucune substitution de ce noyau dihydroanthracénone : on observe en RMN ^1H les 3 protons aromatiques caractéristiques à 6,82, 6,55 et 6,45 ppm ainsi que les 3 hydroxyles aromatiques à 16,01, 9,84 et 5,86 ppm.

Le spectre HRMS indique la présence d'un ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à 339,08396 uma et d'un ion à 257,08099 uma correspondant la forme anthrone protonée. à la formule $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ (Figure 89) présentant une masse exacte de 316,09469 uma.

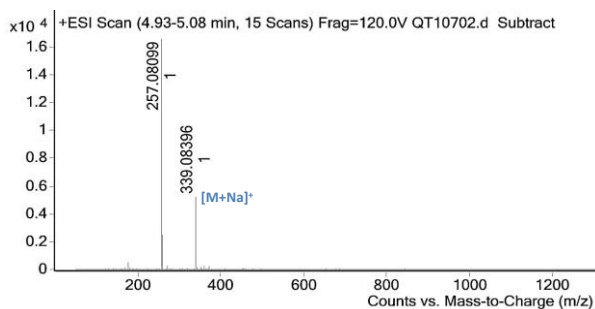


Figure 89 : Spectre HRMS de la molécule L.

La molécule **L** correspond donc sans ambiguïté à une molécule nouvelle, la 6-acétyltrochryson (**201**) (Figure 90).

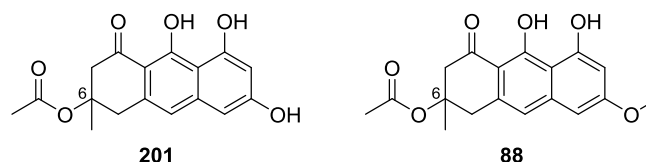


Figure 90 : Structure de la 6-acétyltrochryson (201**) et de la 6-acétyltorosachryson (**88**).**

L'atrochryson (**131**), le précurseur de la 6-acétylatrochryson (**201**) a déjà été identifié dans les carpophores de macromycètes du groupe des Dermocybes *Cortinarius atrovirens*, *C. odoratus* et *Dermocybe sp.*^{94,265}. Si elle est supposée être présente, l'atrochryson (**131**) n'a, à notre connaissance, pas encore été isolée à partir de sources végétales¹⁵¹.

Un dérivé méthylé, la 6-acétyltorosachryson (**88**), a lui déjà été isolé des fruits de *P. glaberrimum*⁸⁴. La mise en évidence de ce dérivé 6-acétylatrochryson (**201**) ouvre des questionnements nouveaux quant à la biosynthèse des vismiones. Les vismiones acétylées sont-elles acétylées avant ou après l'étape de prénylation, les deux mécanismes peuvent-ils être présents en parallèle ? Les vismiones 3-O-méthylées sont-elles dérivées d'un précurseur de type torosachryson ou bien l'étape de méthylation intervient-elle dans un second temps sur des vismiones C-prénylées ? Aucune hypothèse sur la biosynthèse de ces dérivés n'a été formulée à notre connaissance à l'heure actuelle.

D'autres dérivés dihydroanthracénones minoritaires seront recherchés afin d'essayer d'isoler de potentiels intermédiaires biosynthétiques qui permettraient d'éclairer le fonctionnement de cette voie de biosynthèse singulière.

5.7.2.2 Fractionnement par EPC en mode gradient

Au vu des résultats obtenus lors de l'essai du *dual mode* pour fractionner l'extrait PGPAF, un autre fractionnement a été envisagé reposant sur l'utilisation d'un gradient de phase mobile afin d'essayer d'améliorer la séparation des vismiones ayant tendance à coéluer.

L'éluion en mode gradient consiste à modifier la composition de la phase mobile au cours du processus de fractionnement. Ce mode est particulièrement utile lorsque les constituants du mélange à séparer présentent des valeurs de K_D très différentes les unes des autres.

Une séparation en mode ascendant avec un gradient allant du système Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 8:1:8:1 (v/v/v/v) au système Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 4:1:4:1 (v/v/v/v) a été effectuée. La phase stationnaire utilisée correspond à la phase inférieure du système intermédiaire Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 6:1:6:1 (v/v/v/v).

Le détail des conditions expérimentales est précisé au paragraphe 6.5.2 (p 237).

200 tubes de 10 mL ont été collectés et regroupés selon leur profil CCM en 14 fractions dont le profil CCM est présenté dans la Figure 91.

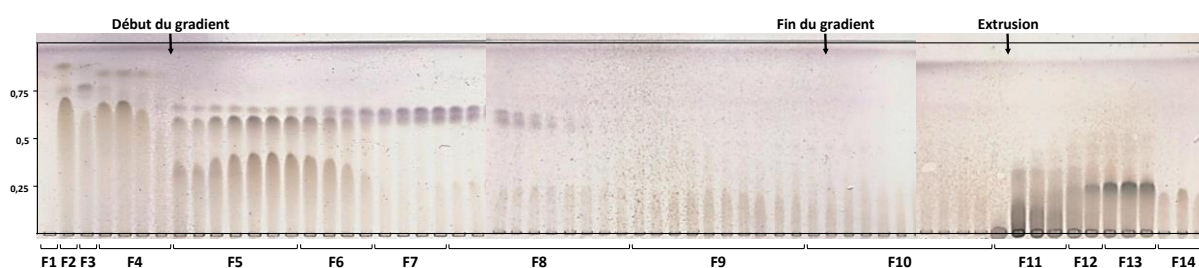


Figure 91 : Fractionnement EPC de la fraction enrichie PGPAF en en mode gradient.

Conditions CCM : Eluant Hept/AcOEt (50:50), révélation VS.

On observe que les vismiones présentant un faible K_D , très affines pour la phase stationnaire lors du fractionnement précédent réalisé en *dual mode*, ont toujours tendance à être retenues de manière importante par la phase stationnaire (Fractions 11 à 14). Elles ne sortent en effet de la colonne qu'au moment de l'extrusion. On observe également que les vismiones présentant un K_D très proche (vismione D (**33**) et acétylvismione F (**44**), fraction 5) ont toujours tendance à coéluer.

L'utilisation du mode gradient ne présente donc pas d'intérêt particulier pour le fractionnement de la fraction PGPAF.

5.7.3 Discussion

Différentes conditions et modes de fractionnement ont été envisagées afin de séparer les vismiones contenues dans la fraction enrichie en vismiones polaires PGPAF. L'objectif était de développer une méthode permettant de séparer ces molécules en une seule étape d'extraction de partage centrifuge.

Cette fraction présente néanmoins l'inconvénient de contenir des molécules de polarités très différentes et donc une plage de coefficients de partage très importante. D'autre part, certaines des molécules contenues dans la fraction présentent des coefficients de partage très proches les uns des autres ce qui entraîne une faible sélectivité et provoque des phénomènes de co-élution.

L'utilisation d'un mode tel que le *pH-zone refining* qui consiste à créer un gradient de pH au sein de la colonne permettant ainsi d'éluer les constituants d'un extrait d'une part selon les coefficients de partage mais également selon leur pKa, pourrait permettre de résoudre cette problématique de co-élution. Ce mode consiste par exemple à utiliser une phase stationnaire basique qui se retrouve progressivement neutralisée par une phase mobile acide. Les molécules sont ainsi éluées selon deux de leurs caractéristiques permettant de résoudre des problèmes de co-élution pour des molécules présentant des coefficients de partage très proches²⁶⁶. Cependant, compte-tenu de la sensibilité des vismiones aux conditions de pH, cette technique ne s'avère pas applicable à la purification de ce type de molécules.

Néanmoins, les deux modes de fractionnement utilisés ont permis de fournir des fractions très enrichies en vismiones pouvant être purifiées en une seule étape d'HPLC semi-préparative ultérieure. La capacité de charge de l'EPC permettant aisément de séparer jusqu'à 2 g d'échantillon en un seul *run* a permis un gain non négligeable de temps et de solvants en comparaison avec le fractionnement préalablement réalisé par des méthodes chromatographiques classiques en polarité de phase inverse.

L'utilisation d'une Chromatographie de Partage Centrifuge au lieu de l'Extracteur de Partage Centrifuge aurait éventuellement pu permettre d'obtenir une meilleure résolution dans la séparation des molécules. Cette technique, plus résolutive, n'aurait cependant probablement pas pu permettre d'éviter certains phénomènes de co-élution observés en Extraction de Partage Centrifuge. De plus, la capacité de charge de la CPC étant inférieure à celle de l'EPC, le gain de productivité ne se serait pas montré intéressant.

L'EPC constitue donc également une méthode de choix dans l'enrichissement de fractions en vismiones contenues dans la fraction PGPAF.

5.8 Conclusion

Les méthodes de fractionnement conventionnelles décrites dans la littérature ayant permis l'isolement et la description des différentes vismiones connues ont, dans un premier temps, été appliquées au fractionnement de l'extrait dichlorométhanique d'écorces de *P. glaberrimum*. Ce premier fractionnement a permis d'isoler la vismione H (**94**) pour la première fois dans l'espèce, ainsi que l'acétylvismione D (**8**), la madagascine (**5**) et la 3-géranxyloxyémidine (**12**).

Cela nous a permis de nous rendre compte de la propension à la dégradation des vismiones lors des étapes de purification successives, conduisant à la formation de différents artéfacts que sont les anthrones et les anthraquinones.

Pour surmonter ces problèmes de dégradation, la chromatographie de partage centrifuge a semblé être une méthode de choix particulièrement adaptée à la purification de ce type de molécules. L'étude des systèmes de solvants nécessaires à ce type d'approche a permis de mettre en évidence l'intérêt du système ARIZONA Y (Hept/AcOEt/MeOH/H₂O 19:1:19:1 v/v/v/v) pour séparer l'extrait en deux parties par une étape de fractionnement liquide-liquide : d'une part, une fraction riche en vismiones particulièrement apolaires et présentes en grande quantité dans l'extrait [Vismione H (**94**) et acétylvismione D (**8**)] et d'autre part, une fraction riche en vismiones plus polaires minoritaires dans l'extrait.

La fraction enrichie en vismiones polaires minoritaires a par la suite été fractionnée par chromatographies flash et HPLC semi-préparative répétées en polarité de phase inverse afin d'isoler les vismiones C (**78**), D (**33**), E (**79**), F (**66**), H (**94**) et M (**42**), la désacétylvismione H (**97**) et les acétylvismiones D (**8**) et F (**44**) avec des masses comprises entre 8 et 125 mg soit des rendements satisfaisants allant de 0,05 % à 0,9 % à partir de l'extrait brut d'écorces de *P. glaberrimum* PGE2E.

C'est, à notre connaissance, la première fois que la désacétylvismione H (**97**), la vismione H (**94**) et la vismione M (**42**) sont isolées de l'espèce *P. glaberrimum*. C'est également la première fois qu'un aussi grand nombre de vismiones sont isolées à partir d'un seul et même extrait, soulignant l'intérêt de la méthodologie développée ici.

Cette fraction enrichie a également été purifiée par Extraction de Partage Centrifuge. Cependant, la large gamme de coefficients de partage des différentes molécules et le manque de sélectivité entre structures très proches n'a pas permis d'isoler directement les molécules. Une étape supplémentaire de purification par HPLC semi-préparative s'est en effet avérée nécessaire. La capacité de charge intéressante et les principes de séparation différents de la chromatographie en polarité de phase inverse font néanmoins de l'Extraction de Partage Centrifuge une méthode intéressante pour pré-purifier et enrichir les fractions à partir d'un mélange complexe. Cette méthodologie de fractionnement a ainsi notamment permis d'isoler une nouvelle dihydroanthracénone très minoritaire dans l'extrait, la 6-acétylatrochryson (**201**) dont la structure suggère de nouvelles hypothèses quant à la biosynthèse des vismiones.

La fraction apolaire riche en vismione H (**94**) et acétylvismione D (**8**) a également été fractionnée par Extraction de Partage Centrifuge. Cette méthode permet en moins d'une heure de fractionner 3 g de fraction enrichie. Une simple étape consécutive de chromatographie flash en phase inverse permet

d'obtenir les deux vismiones pures à plus de 98% (RMN ^1H) avec un taux de recouvrement de 78% pour l'acétylvismione D (**8**) et 80% pour la vismione H (**94**) à partir de l'extrait brut dichlorométhanique d'écorce de *P. glaberrimum* PGE2E, en seulement 3 étapes de fractionnement. La vismione H s'étant montrée la molécule la plus intéressante sur le plan des activités biologiques, la méthodologie de fractionnement ainsi développée, permettant de purifier cette molécule sensible avec une productivité importante, est compatible avec les besoins d'une étude pharmacologique plus poussée.

6 Etude de la répartition des vismiones dans différentes espèces du genre *Psorospermum*

Concernant la purification des vismiones, les efforts se sont concentrés autour de l'extrait d'écorces de *P. glaberrimum*, sur la base des travaux antérieurs réalisés au laboratoire. Cependant, dans une optique d'étudier la diversité de ce type de molécules, nous nous sommes intéressés de façon plus large à leur répartition dans les différents organes de plusieurs espèces du genre *Psorospermum*, collectées au même moment et extraites selon le même protocole.

Le premier objectif de cette approche était d'identifier les espèces ainsi que les parties de plantes les plus riches en vismiones. Celles-ci pourraient faire l'objet de matières premières d'intérêt pour l'isolement ultérieur de ces composés en quantité importante.

Le second objectif a consisté à observer l'homogénéité des proportions relatives en vismiones au sein du genre ou au contraire leur disparité selon les espèces. De telles observations pourraient avoir un intérêt taxonomique pour reconsidérer la classification au sein d'une famille complexe du point de vue botanique (paragraphe 1.1.1, p 9).

Enfin les profils des extraits obtenus ont été analysés pour repérer dans certaines espèces ou parties de plante des vismiones qui n'auraient pas été retrouvées dans l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum*.

6.1 Comparaison CCM des différents extraits de *Psorospermum*

Une première comparaison des profils des différents extraits par chromatographie sur couche mince a été effectuée. L'établissement et la comparaison des profils CCM des extraits d'un même organe de différentes espèces permet en effet d'observer rapidement les ressemblances et dissemblances selon les espèces. Les CCM ont été regroupées par organes considérés : fruits (Figure 92), feuilles (Figure 93), tiges (Figure 94) et troncs et écorces (Figure 95). Les codifications reprennent celles du Tableau 8, p 83 et sont également reprises à l'Annexe 5, p 335).

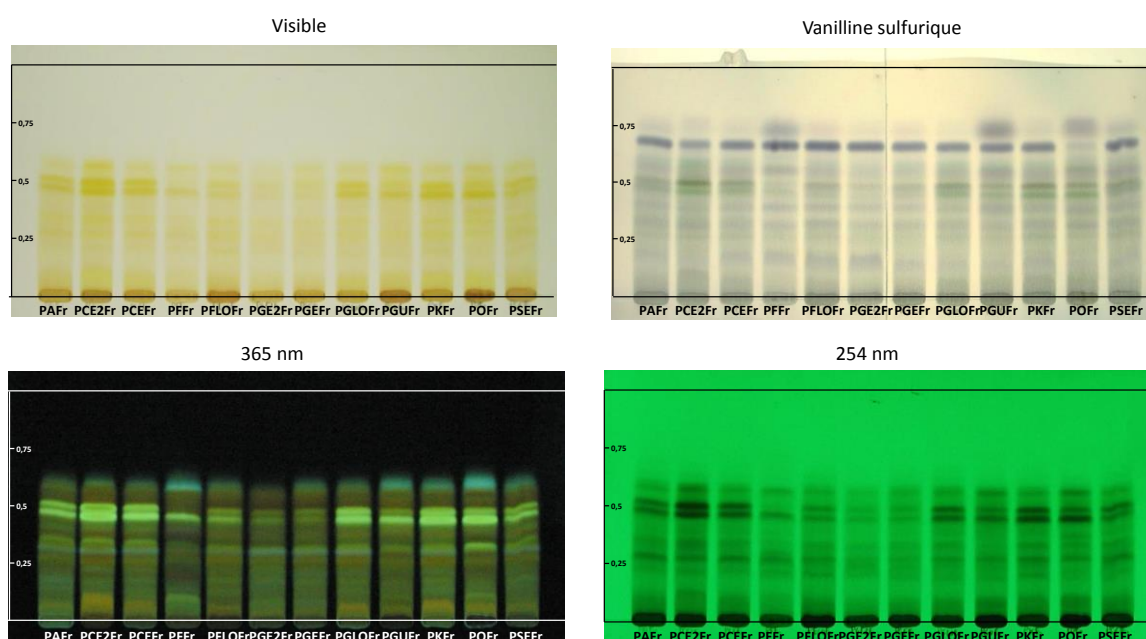


Figure 92 : Profils CCM des extraits DCM de fruits de *Psorospermum*.

Conditions CCM : Hept/AcOEt (70:30) 10 μ L à 20 mg/mL.

Les profils des extraits dichlorométhaniques des fruits de *Psorospermum* sont très similaires d'une espèce à l'autre. Seul l'extrait de *P. febrifugum* (PFFr) présente une légère différence avec l'absence d'une bande fluorescente en jaune au $R_f = 0,5$ (365 nm).

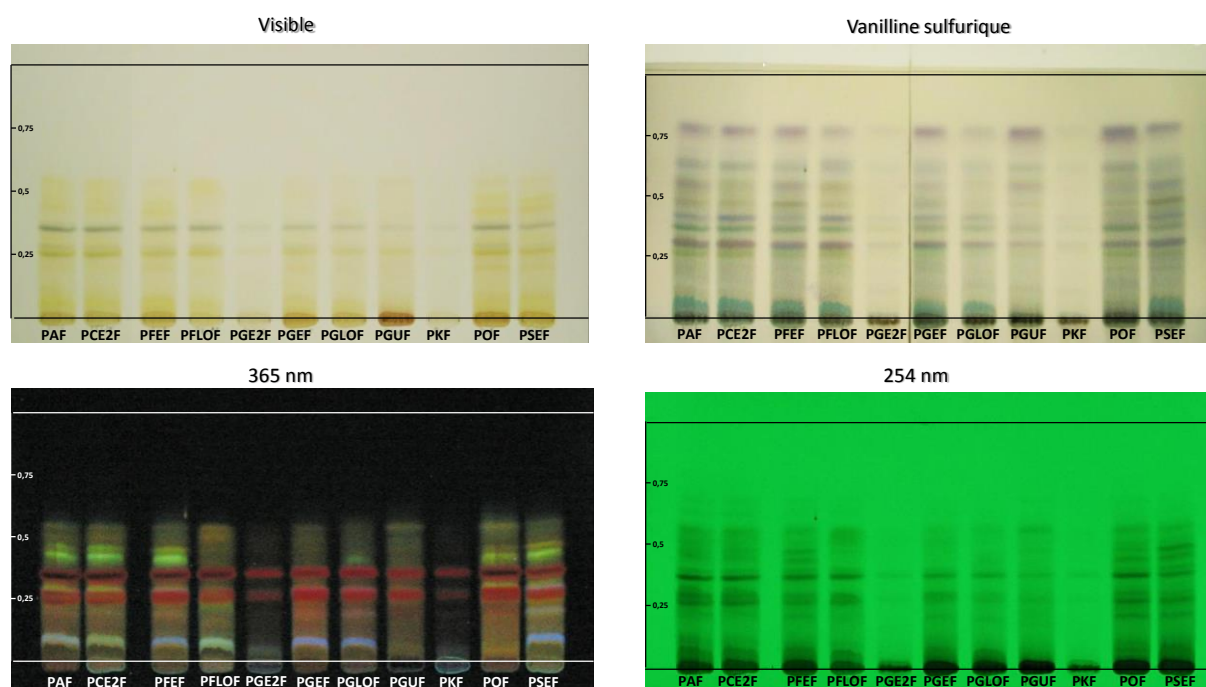


Figure 93 Profils CCM des extraits DCM de feuilles de *Psorospermum*.

Conditions CCM : Hept/AcOEt (70:30) 10 μ L à 20 mg/mL.

En ce qui concerne les extraits de feuilles, on observe une plus grande différence dans les profils CCM. Une hétérogénéité intraspécifique peut être observée en ce qui concerne *P. glaberrimum*. L'extrait est bien moins concentré en métabolites dans l'espèce récoltée à Boneck (PGE2F) que dans celle récoltée à Ekombitie (PGEF), le premier présentant un profil plus proche de *P. glaucum* (PGLOF) et le second un profil plus proche de celui de *P. kerstingii* (PKF). On note cependant une certaine homogénéité dans les espèces *P. adamauense*, *P. corymbiferum*, *P. febrifugum*, et *P. senegalense*. *P. aurantiacum* présente également un profil similaire avec cependant l'absence d'une bande fluorescente bleue à $R_f = 0,1$ (365 nm) qui pourrait correspondre à un acide phénolique ou une coumarine. L'extrait de *P. guineense* (PGUF) se distingue de tous les autres par un profil singulier.

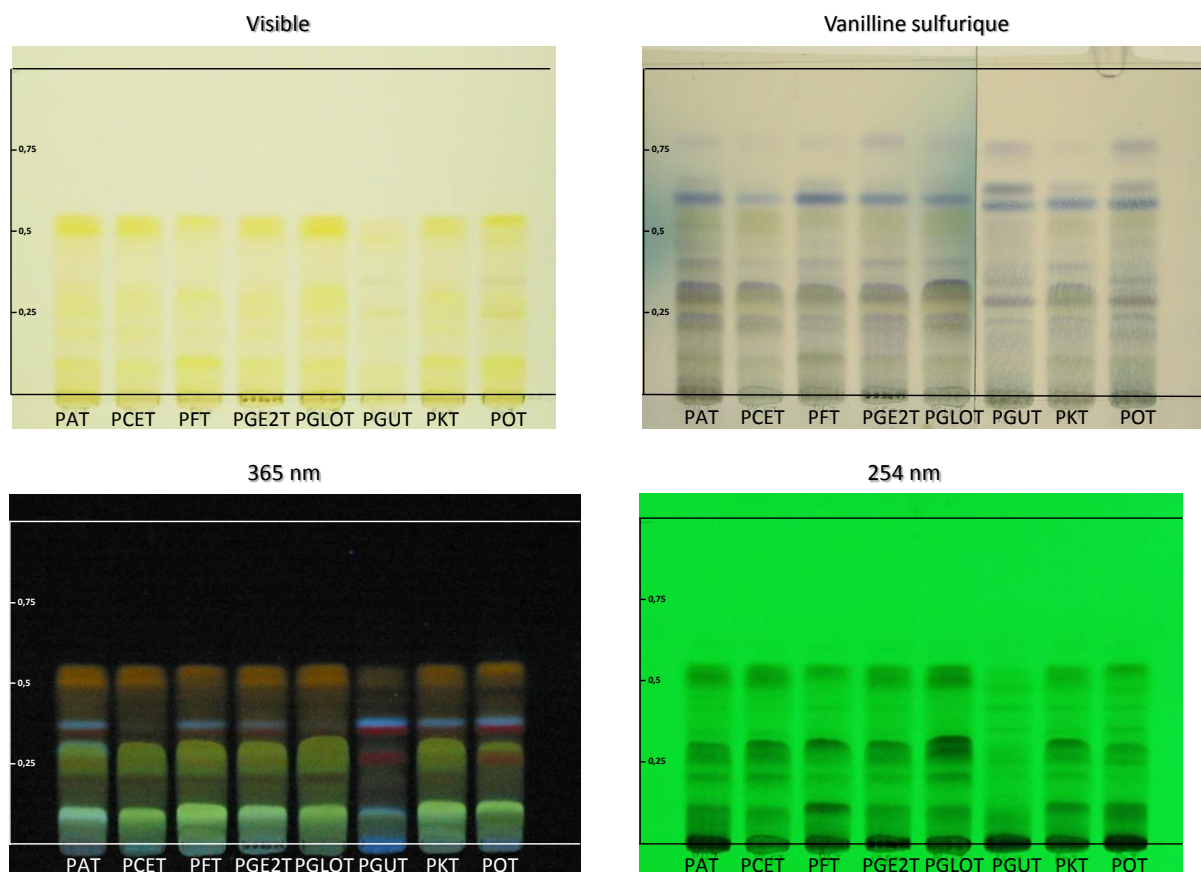


Figure 94 : Profils CCM des extraits DCM de tiges de *Psorospermum*.

Conditions CCM : Hept/AcOEt (70:30) 10 μ L à 20 mg/mL.

Parmi les extraits de tiges, correspondant aux tiges jeunes de l'année, on observe des profils très semblables d'une espèce à l'autre à l'exception de *P. guineense* (PGUT) qui présente à nouveau un profil très différent des autres espèces.

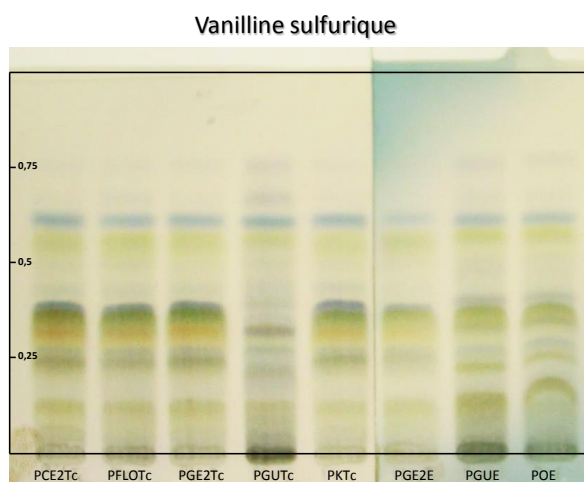


Figure 95 : Profils CCM des extraits DCM de troncs et d'écorces de *Psorospermum*.

Conditions CCM : Hept/AcOEt (70:30) 10 μ L à 20 mg/mL.

En ce qui concerne les extraits de tronc et d'écorces on observe à nouveau une bonne homogénéité des profils à l'exception de *P. guineense* (PGUTc) qui présente, comme dans le cas des tiges et des feuilles, un profil chromatographie très différent des autres espèces.

Approche phytochimique

On observe une homogénéité des profils CCM assez importante au sein du genre *Psorospermum* pour les différentes espèces étudiées pour une même partie de plante considérée. Cependant, comme nous avons pu le voir concernant l'extrait de feuilles de *P. glaberrimum* il pourrait exister une différence intraspécifique significative dans le cas de certains échantillons. Afin d'établir une véritable comparaison entre les espèces considérées, il faudrait réaliser un échantillonnage plus important d'individus collectés dans différents lieux géographiques et conditions climatiques et édaphiques. Néanmoins, ces analyses permettent de mettre en évidence que le profil phytochimique de *P. guineense* (tige, tronc et feuille) est assez éloigné de celui des autres espèces du genre *Psorospermum*.

6.2 Dosage des vismiones dans les extraits de *Psorospermum*

Afin d'étudier plus précisément le contenu en vismiones des différents extraits, un dosage HPLC-UV des différentes vismiones isolées de l'extrait d'écorces de *P. glaberrimum* PGE2E a été réalisé. Ce dosage n'a pas pour objectif d'établir une quantification absolue et précise des vismiones éventuellement présentes sous forme de trace mais d'évaluer la quantité des molécules majoritaires ainsi que leurs proportions relatives. Pour cette raison la méthode utilisée présente une limite de quantification relativement élevée de 5,0 µg/mL soit 0,5% m/m pour chacune des vismiones dans l'extrait dans les conditions de l'étude.

6.2.1 Réalisation des courbes de calibration pour la vismione H et l'acétylvismione D

Des courbes de calibration ont été réalisées pour la vismione H (**94**) et l'acétylvismione D (**8**) à partir de 7 solutions de concentrations allant de 0,4 mg/mL à 3,125 µg/mL dans l'acétonitrile (paragraphe 4.2, p 231).

Les droites de calibration obtenues présentent une bonne corrélation avec respectivement des coefficients de régression linéaire de 0,9932 pour la vismione H (**94**) et de 0,9924 pour l'acétylvismione D (**8**).

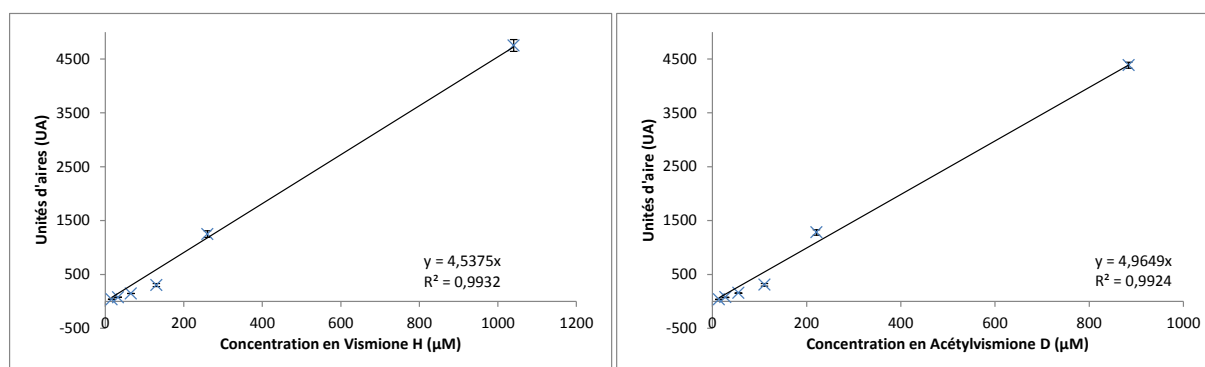


Figure 96 : Droites de calibration pour le dosage de la vismione H et de l'acétylvismione D.

La limite de quantification (LOQ) a été déterminée à 5,0 µg/mL. Elle correspond à la plus faible concentration pour chacune des molécules pour laquelle le rapport signal sur bruit est supérieur à 10.

6.2.2 Résultats

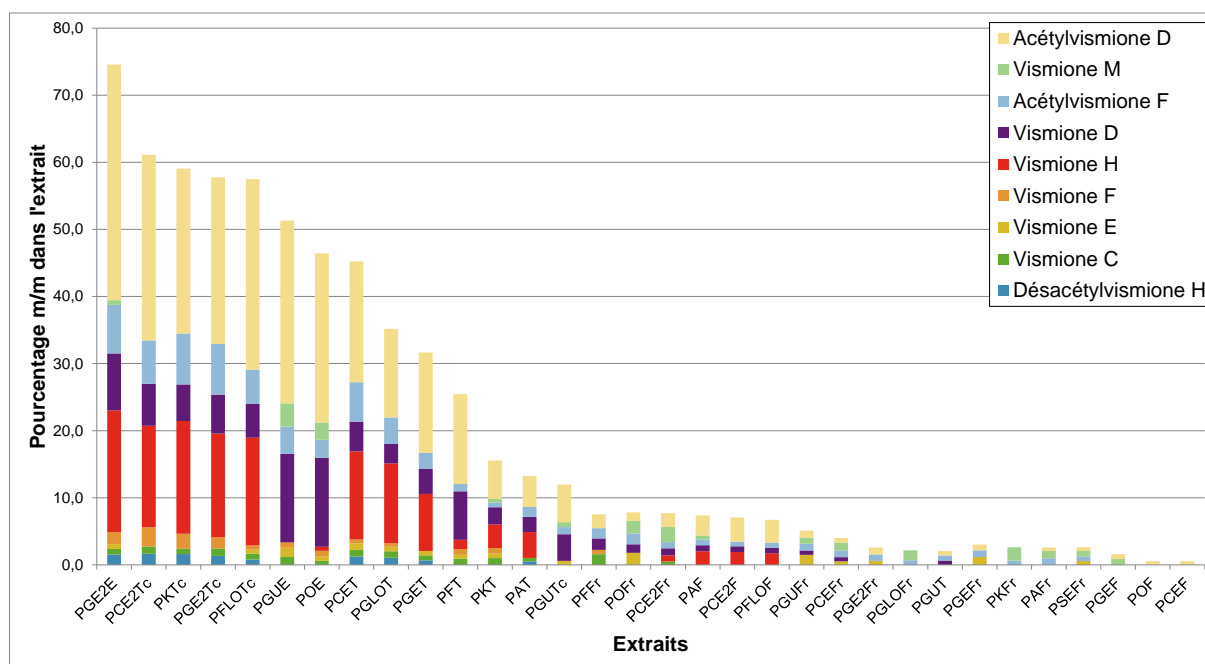


Figure 97 : Teneurs en vismiones des différents extraits de *Psorospermum*.

On observe que les vismiones sont essentiellement contenues dans les écorces, les troncs et les tiges des espèces étudiées avec une teneur en vismiones totales allant de 74 à 12 % de l'extrait. Seul l'extrait de tiges de *P. guineense* présente une faible teneur en vismiones totale avec seulement 20,8 mg/g d'extrait. La teneur contenue dans l'écorce et dans le tronc de cette espèce reste néanmoins comparable à celle des autres espèces.

Les teneurs en vismiones totales contenues dans les fruits et les feuilles sont beaucoup plus faibles et assez variables d'une espèce à l'autre. En effet, les concentrations en vismiones contenues dans les extraits de fruits vont de 84 à 26 mg/g d'extrait et de 74 à moins de 5 mg/g pour les extraits de feuilles.

6.2.2.1 Profils des extraits d'écorces, de troncs et de tiges

Concernant ces extraits, on distingue essentiellement 3 types de profils (Figure 98) :

- i) Un profil caractérisé par des teneurs en acétylvismione D (**8**) (35-47% des vismiones totales) et vismione H (**94**) (23-34 %) majoritaires suivi de la vismione D (**33**) (8-17%) et de l'acétylvismione F (**44**) (4-13%). Les autres vismiones étant minoritaires (< 6 %).
Ce profil est observé pour les espèces *P. glaberrimum*, *P. kerstingii*, *P. corymbiferum*, *P. floribundum*, *P. glaucum* et *P. adamauense*.
- ii) Un second profil est caractérisé par une teneur importante en acétylvismione D (**8**) (53-54% des vismiones totales) suivie par la vismione D (**33**) (28-33%). La vismione H (**94**) est pratiquement absente de ces extraits (< 5%). La vismione M (**42**) est présente en quantité non négligeable (6-7%) à des teneurs comparables à celle de l'acétylvismione F (**44**) (4-8%). Les autres vismiones sont minoritaires (< 5%).
Ce profil est observé pour les espèces *P. guineense* et *P. aurantiacum*.
- iii) Le troisième profil est propre à l'espèce *P. febrifugum*. Il ressemble fortement à celui de *P. guineense* et *P. aurantiacum* cependant la vismione M (**42**) est absente de l'extrait.

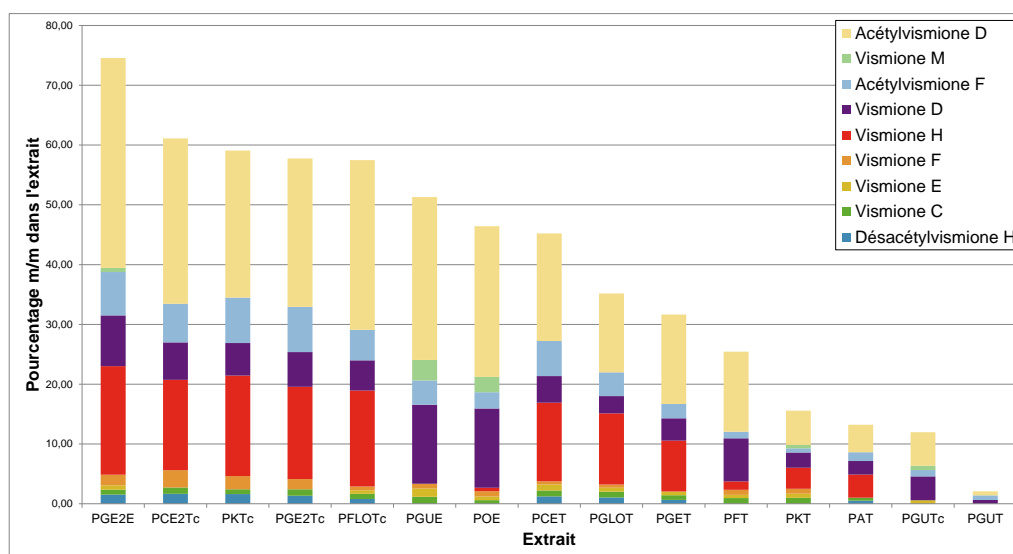


Figure 98 : Teneurs en vismiones des extraits d'écorces, de troncs et de tiges.

L'homogénéité de ces différents profils phytochimiques à l'intérieur d'un même groupe pourrait contribuer à réétudier ces espèces sur le plan taxonomique au sein d'une famille qui renferme encore de nombreux défis en termes de classification botanique. Les proportions relatives de ces différentes molécules pourraient ainsi servir de marqueurs. Bien entendu, pour cela, il faudrait réaliser un échantillonnage bien plus important afin de définir les critères de variabilité intraspécifique et liés aux caractères climatiques et édaphiques. Néanmoins, ces informations pourraient contribuer à renforcer les données de biologie moléculaire établis par Ruhfel *et al.*⁶ (paragraphe 1.1.1, p 9).

6.2.2.2 Profils des extraits de fruits

Parmi les extraits de fruits (Figure 99), on note une plus grande hétérogénéité des teneurs en vismiones à la fois en teneurs globales (84 à 26 mg/g) mais aussi en teneurs relatives.

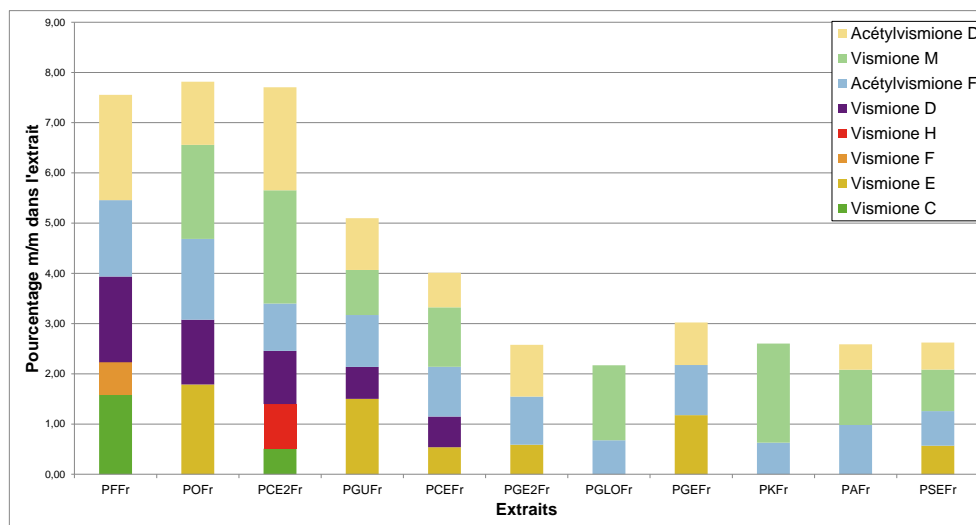


Figure 99 : Teneurs en vismiones des extraits de fruits.

On observe néanmoins la même différence des profils de *P. aurantiacum* et *P. guineense* par rapport à ceux des autres extraits, à l'exception d'un des échantillons de *P. corymbiferum*.

L'extrait de fruits de *P. febrifugum* se singularise lui aussi à nouveau par sa teneur particulièrement élevée en vismione C (**78**) (19% des vismiones totales) et vismione F (**66**) (8%).

Les autres profils sont plus hétérogènes ; il est donc plus difficile de conclure sur un intérêt taxonomique potentiel de ce type d'extraits.

6.2.2.3 Profils des extraits de feuilles

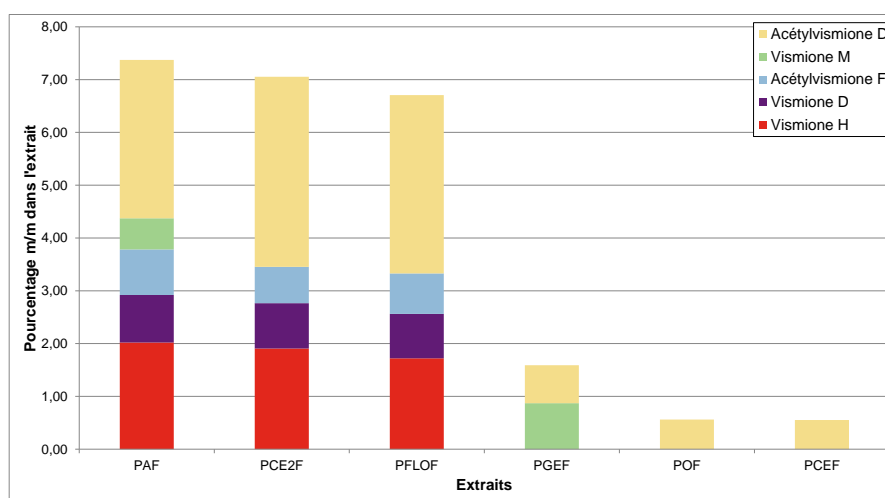


Figure 100 : Teneurs en vismiones des extraits de feuilles.

Les extraits de feuilles contiennent très peu de vismiones (Figure 100). Beaucoup d'extraits contiennent des teneurs inférieures à la limite de détection de 5 mg/g.

Parmi les extraits de feuilles les plus riches en vismiones, on retrouve un profil similaire à celui observé dans les écorces de ces mêmes espèces (*P. adamauense*, *P. corymbiferum* et *P. floribundum*).

6.2.2.4 Discussion

Ces résultats confirment que les écorces sont bien les organes de choix pour l'isolement des vismiones compte-tenu des fortes teneurs qu'elles contiennent. Les extraits de fruits présentent des concentrations inférieures mais avec des profils qualitatifs relativement différents de celui des écorces. Ceux-ci pourraient éventuellement s'avérer intéressants pour l'isolement de vismiones d'intérêts présentes en plus faible proportions dans les extraits d'écorces (Vismione C et vismione E notamment).

Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature selon lesquelles les vismiones ont essentiellement été isolées de racines, de troncs, d'écorces et de fruits. Seules quelques références font état de l'isolement de vismiones à partir de feuilles de *Vismia* ou de *Cratoxylum* (Annexe 2, p 303).

7 Etude de la stabilité des vismiones en solution

Compte-tenu de l'instabilité des vismiones en solution que nous avons par ailleurs observée empiriquement, une série d'expériences a été réalisée afin de déterminer plus précisément leur cinétique de dégradation dans des conditions et solvants usuels.

En effet, Politi *et al.* soulignent la modification du profil de l'extrait de racines de *Vismia guineensis* après un séjour de 3 semaines dans le méthanol. Ils montrent notamment l'apparition d'antraquinones et de bianthrone provenant de la dégradation des vismiones correspondantes²⁵⁰ (Figure 101).

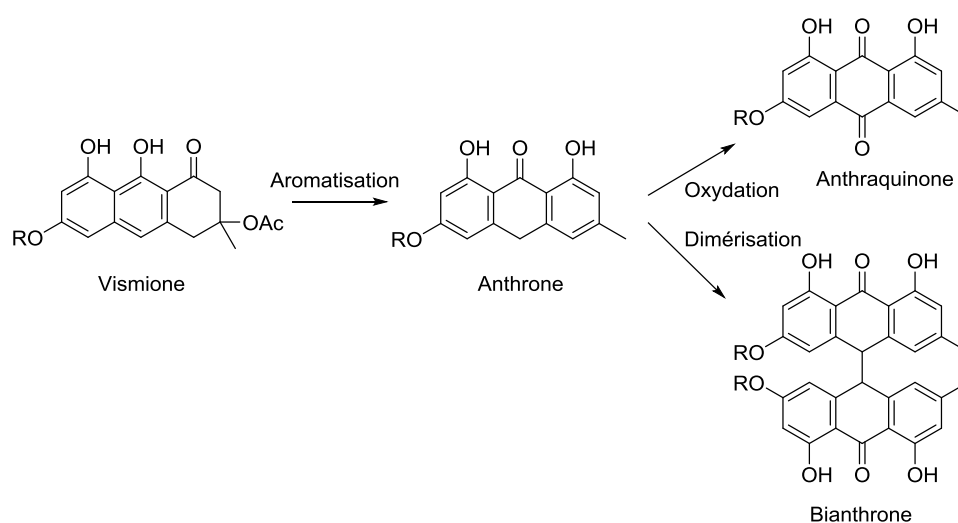


Figure 101 : Dégradation des vismiones en solution.

L'objectif de cette étude est d'une part de mieux comprendre les conditions favorables à la dégradation de ces molécules afin de prendre les précautions nécessaires dans leurs processus de purification et leur manipulation. D'autre part de connaître la stabilité de ces molécules dans les conditions des tests biologiques afin de déterminer si la molécule étudiée est véritablement la molécule active ou si l'activité est en réalité liée à ses formes de dégradation. Les expériences ont été menées avec l'acétylvismione D (**8**) et la vismione H (**94**).

7.1 Stabilité de l'acétylvismione D dans le DMSO par RMN ^1H

Le DMSO est un solvant très largement utilisé pour réaliser les solutions stocks afin d'étudier l'activité biologique de molécules sur différents modèles. C'est un bon solvant pour des composés de polarité très large allant de molécules très polaires à très apolaires. Miscible à l'eau et donc aux milieux de culture, il n'interfère que rarement avec les résultats des tests *in vitro* et même *in vivo* où il est utilisé à des concentrations finales allant de 0,1 jusqu'à 5%. C'est le solvant utilisé par l'ensemble de nos collaborateurs pour la réalisation de leurs solutions stocks. Il est largement employé pour conserver les molécules en solutions à -20 ou -80°C au sein de diverses chimiothèques. Malgré cet usage très répandu, le DMSO possède également des propriétés pro-oxydantes qui peuvent entraîner la dégradation de certaines molécules²⁶⁷.

Pour étudier la stabilité de l'acétylvismione D (**8**) dans le DMSO, la molécule a dans un premier temps été mise en solution à 10 mg/mL (concentration classique des solutions stock réalisées lors des essais biologiques) dans du DMSO- d_6 et des spectres RMN ^1H ont été enregistrés à intervalles de temps réguliers. Aucune précaution particulière (température ambiante, verre clair) n'a été mise en œuvre pour conserver l'échantillon si ce n'est la fermeture du tube RMN par un bouchon en plastique conventionnel et du parafilm.

La dégradation de l'acétylvismione D (**8**) en sa forme anthrone correspondante (**6**) a pu être observée en suivant l'évolution des pics correspondant aux hydroxyles aromatiques libres présentant des déplacements chimiques caractéristiques et bien distincts d'une forme à l'autre. Les hydroxyles de l'acétylvismione D (**8**) présentent respectivement des déplacements chimiques de 15,45 et 9,83 ppm alors que ceux de l'anthrone (**6**) présentent des déplacements chimiques de 12,41 et 12,16 ppm. On observe également des pics très minoritaires et mal résolus correspondant aux hydroxyles des formes anthraquinone (**12**) et bianthrone (**41**) (Figure 102).

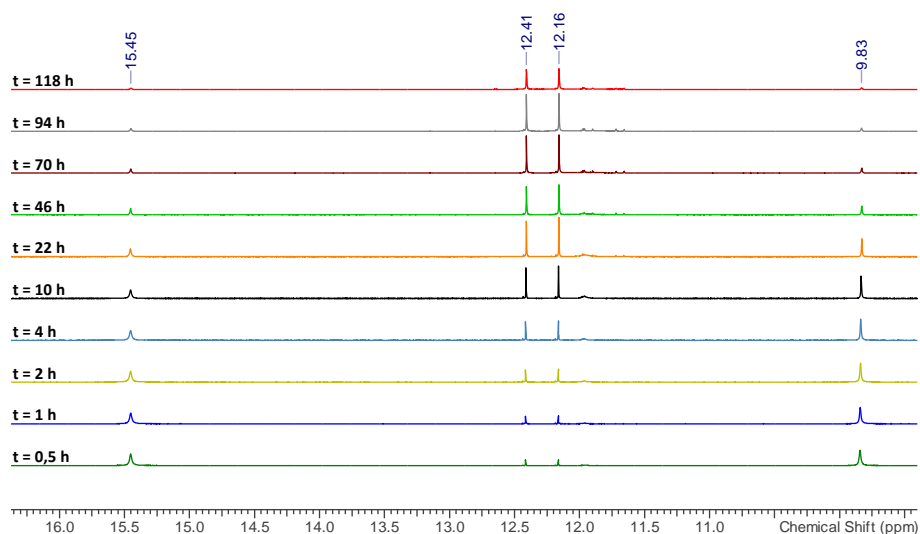


Figure 102 : Suivi RMN ^1H de la dégradation de l'acétylvismione D dans le DMSO.

En exprimant en pourcentages relatifs la proportion de la forme vismione par rapport à celle de la forme anthrone, on obtient la courbe suivante (Figure 103) à partir de laquelle on peut déterminer la demi-vie de la vismione dans le DMSO : $t_{1/2}$ (acétylvismione D, DMSO) = 17,5 h.

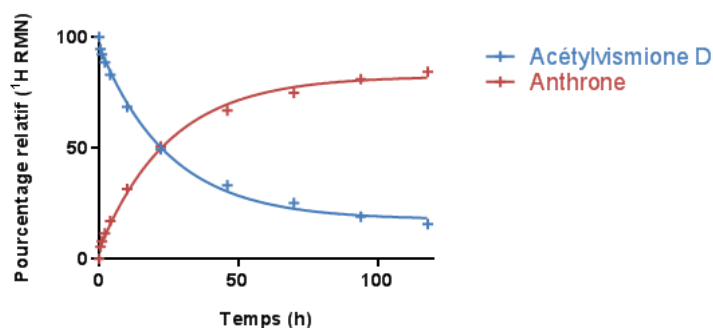


Figure 103 : Suivi RMN ^1H de la dégradation de l'acétylvismione D dans le DMSO (Graphique).

7.2 Suivi de la dégradation de l'acétylvismione D dans le DMSO par HPLC en atmosphère contrôlée

L'atmosphère n'étant pas contrôlée en tube RMN classique, des échanges ont pu être observés avec l'air ambiant, avec notamment l'apparition d'un pic d'eau à 1,56 ppm au bout de quelques jours. De plus, le DMSO deutéré utilisé pouvait contenir des traces d'oxygène qui ont pu influencer la dégradation de l'acétylvismione D (8).

Un suivi de cette dégradation a été réalisé en ballon, à température ambiante, toujours à la concentration de 10 mg/mL, par HPLC dans du DMSO dégazé. L'évolution des différentes formes de dégradation [anthrone (6), anthraquinone (12) et bianthrone (41)] notamment grâce à leurs spectres UV caractéristiques²⁵⁰ a ainsi pu être observée dans le temps (Figure 104).

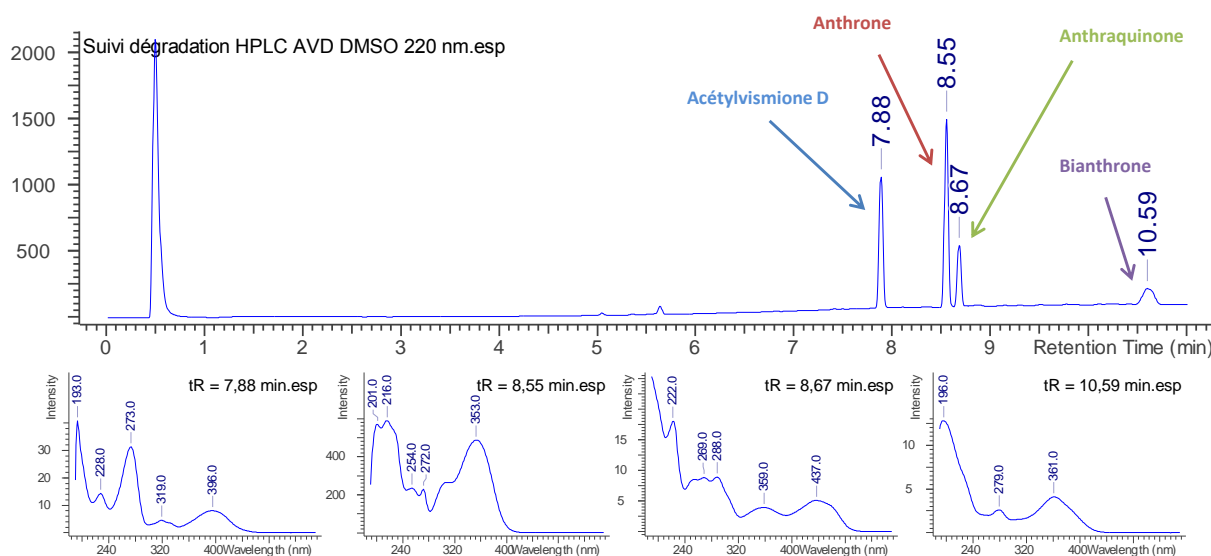


Figure 104 : Chromatogramme du suivi HPLC de la dégradation de l'acétylvismione D sous atmosphère contrôlée.

Méthode HPLC Vismione $\lambda = 220$ nm.

Deux conditions ont été étudiées pour suivre la dégradation de la vismione: sous atmosphère inerte (Argon, 1 atm Figure 105, A) et sous atmosphère d'oxygène (O_2 , 1 atm Figure 105, B).

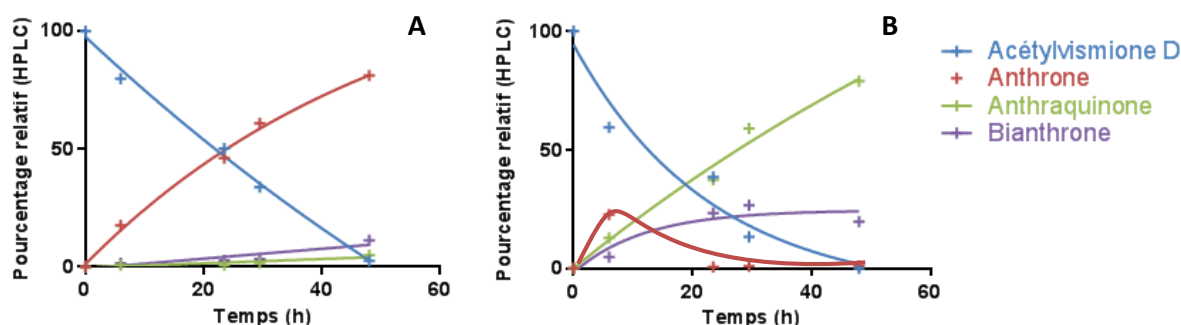


Figure 105 : Suivi de la dégradation de l'acétylvismione D dans le DMSO par HPLC à 220 nm sous atmosphère contrôlée.

A : Ar, 1 atm; B : O_2 , 1 atm.

On remarque que sous atmosphère inerte, il se forme essentiellement de l'anthrone (**6**). On observe une faible proportion de bianthronne (**41**) ainsi qu'un peu de forme anthraquinone (**12**), probablement due à l'introduction d'oxygène dans le milieu suite aux prélèvements répétés. La demi-vie de l'acétylvismione D (**8**), $t_{1/2}$ (acétylvismione D, DMSO, Ar) = 24 h est légèrement supérieure à celle observée en l'absence de précautions particulières.

Sous atmosphère d' O_2 , on observe essentiellement la formation de la forme anthraquinone (**12**) ainsi qu'une plus faible proportion de forme bianthronne (**41**). La forme anthrone (**6**) est observée transitoirement mais décroît rapidement en faveur de la forme bianthronne (**41**). Dans ces conditions, la demi-vie de l'acétylvismione D (**8**) est estimée à $t_{1/2}$ (acétylvismione D, DMSO, O_2) = 16 h.

7.3 Stabilité de l'acétylvismione D dans le méthanol par RMN 1H

Nous avons ensuite voulu étudier la stabilité de l'acétylvismione D (**8**) dans le méthanol, un autre solvant polaire doté d'un caractère protique, largement utilisé au cours du procédé de purification des vismiones, que ce soit en CPC ou lors de la purification en polarité de phase inverse.

Nous avons à nouveau effectué un suivi de la dégradation de l'acétylvismione D (**8**) en RMN 1H .

Du fait de l'échange entre les protons des hydroxyles aromatiques avec le méthanol deutéré, ceux-ci ne sont pas observables. Il a donc fallu suivre la dégradation d'une autre manière. Les signaux des protons aromatiques de la vismione et de ses formes de dégradation sont les seuls à n'opérer qu'un recouvrement partiel et qui permettent de suivre l'apparition des différentes formes de dégradation. Une solution d'acétylvismione D (**8**) à 10 mg/mL dans le MeOD- d_4 a donc été analysée à intervalles de temps répétés sur plusieurs jours en RMN 1H .

Du fait du recouvrement partiel de certains signaux, une quantification précise n'a pas pu être réalisée cette fois-ci. Le dernier point réalisé à 335 h montre qu'il reste environ 73 % de la forme vismione (**8**) ainsi qu'environ 11 % de chacune des formes anthrone (**6**) et anthraquinone (**12**) et environ 5 % de forme bianthronne (**41**) (Figure 106).

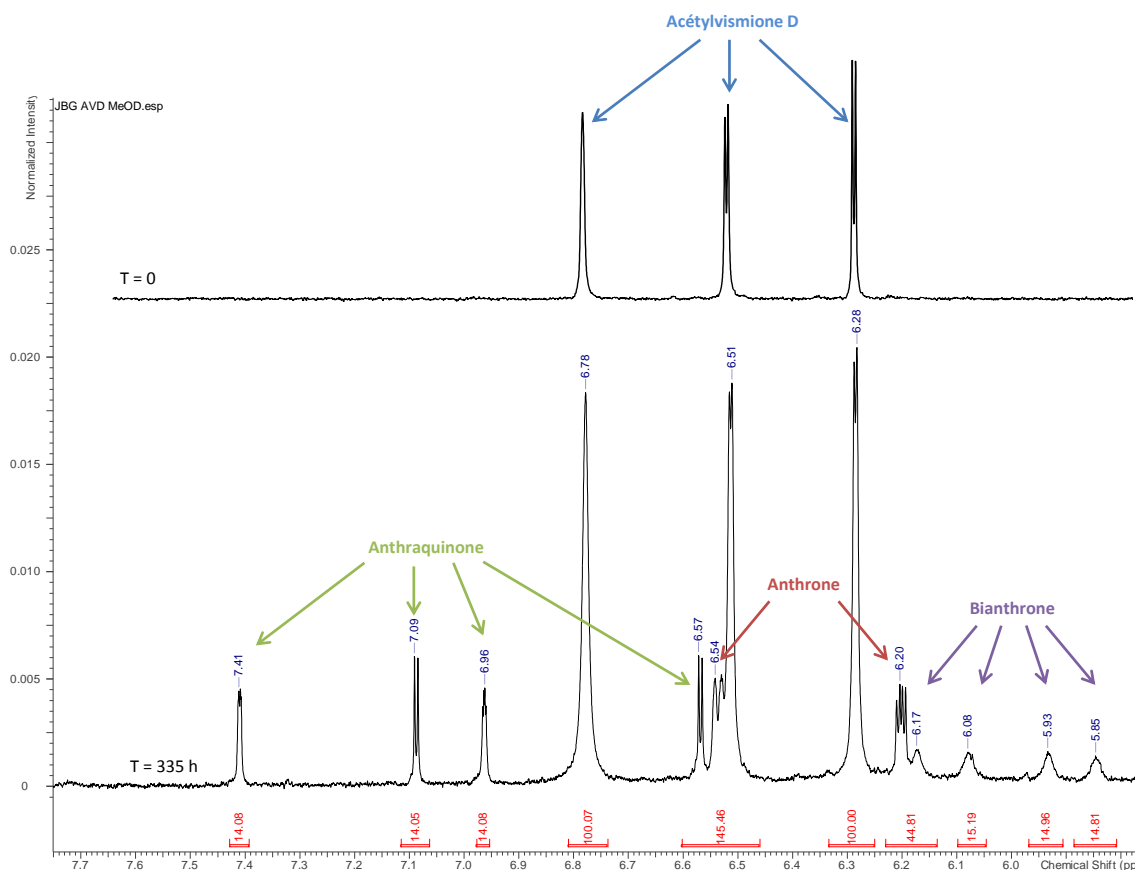


Figure 106 : Spectres RMN ^1H de l'acétylvismione D en solution dans le MeOD- d_4 à $t = 0$ et $t = 335$ h.

La forme vismione (**8**), si elle se dégrade lentement dans le méthanol apparaît donc beaucoup plus stable que dans le DMSO, probablement du fait du caractère pro-oxydant de ce dernier.

7.4 Stabilité de la vismione H dans le DMSO

La vismione H (**94**) étant apparue comme nouveau chef de file suite à l'évaluation des activités antileishmaniennes réalisées sur les différentes vismiones isolées de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* (paragraphe 3.3.2, p 210), nous avons également souhaité évaluer sa stabilité dans le DMSO. Nous avons étudié de nouveaux paramètres, à savoir l'influence de la lumière et des cycles de congélation/décongélation de solution stock, inhérents à la réalisation des tests biologiques.

Une même solution à 10 mg/mL de vismione H (**94**) dans le DMSO a donc été répartie dans différents tubes RMN fermés à l'aide d'un bouchon en plastique surmonté de parafilm :

- le premier sans prendre de précautions particulières à l'égard de la lumière ou de la température ;
- le second dans un tube RMN en verre brun qui a été stocké à température ambiante protégé par de l'aluminium entre les différentes analyses RMN, afin d'évaluer l'impact de la lumière ;
- le troisième a été stocké à -20°C entre chaque analyse RMN, afin d'évaluer l'impact des cycles de congélation/décongélation.

Les proportions relatives des différentes molécules ont été suivies par intégration des signaux de leurs protons hydroxyliques au cours du temps. Ces derniers sont bien distincts à l'exception des protons OH-1 de l'anthrone (**7**) et OH-8 de l'antraquinone (**5**) qui subissent un recouvrement à 12,16 ppm (Figure 107). On obtient alors les graphiques suivants (Figure 108).

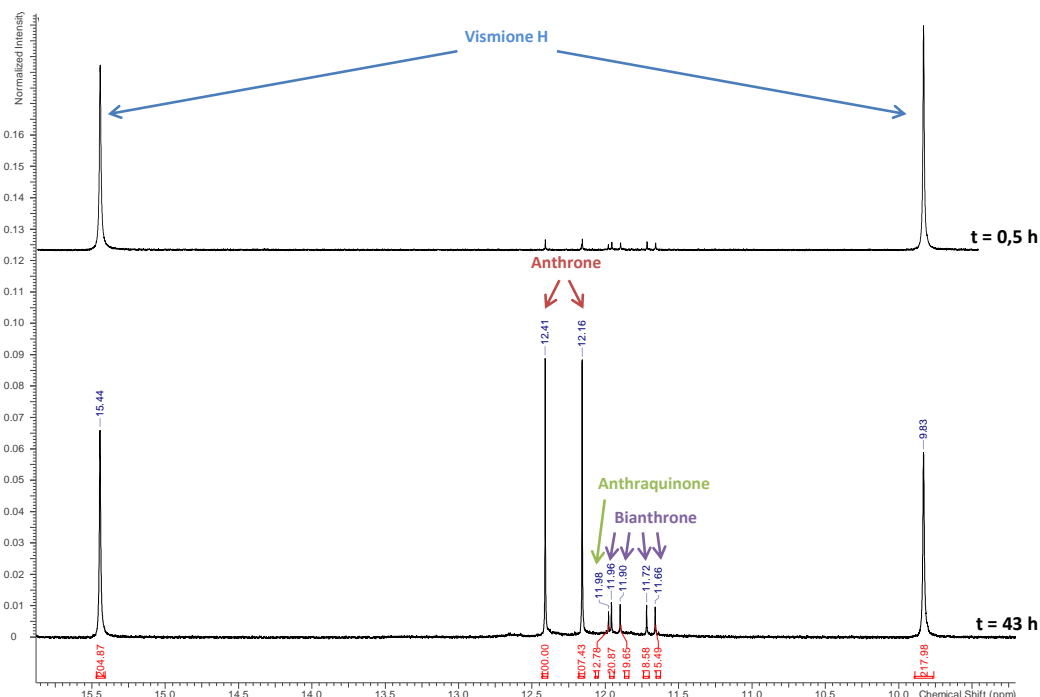


Figure 107 : Spectres RMN ^1H de la vismione H en solution dans le DMSO- d_6 à $t = 0,5$ et $t = 43$ h.

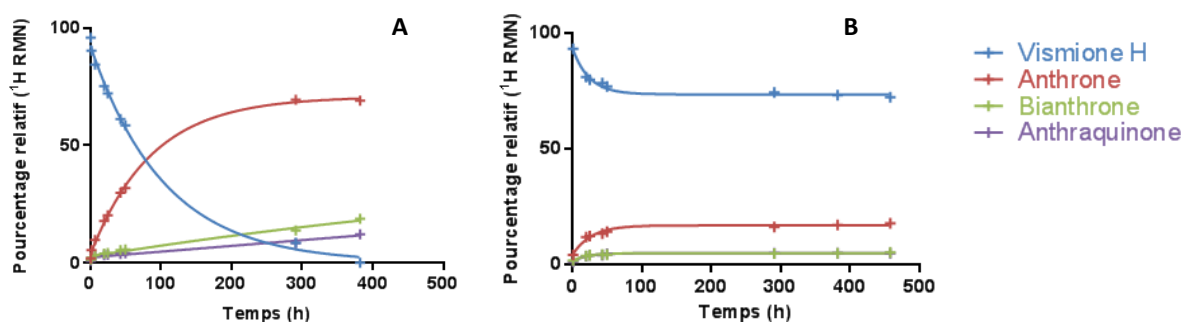


Figure 108 : Suivi de la dégradation de la vismione H dans le DMSO par RMN ^1H .

A : sans précaution particulière;

B : stockage à -20°C entre les analyses.

Sans précautions particulières, on observe que la vismione H (**94**) est dégradée majoritairement en sa forme anthrone (**7**) correspondante avec une demi-vie $t_{1/2}$ (vismione H, DMSO) = 72 h, supérieure à celle observée précédemment pour l'acétylvismione D (**8**). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence d'impuretés à l'état de traces qui pourraient catalyser la dégradation de la vismione. Pour étudier ce paramètre il faudrait augmenter le nombre d'essais sur différents lots de vismiones. L'objectif principal étant dans un premier temps d'étudier les principaux facteurs contribuant à la dégradation de la molécule, ces études pourront être envisagées dans un second temps.

La congélation par contre permet de limiter nettement la cinétique de dégradation de la molécule avec une stabilisation de la forme vismione.

On note cependant que les précautions prises par rapport à l'influence de la lumière ne semblent pas influencer sur la cinétique de dégradation, avec une vitesse comparable à celle des conditions sans précautions particulières (Figure 109).

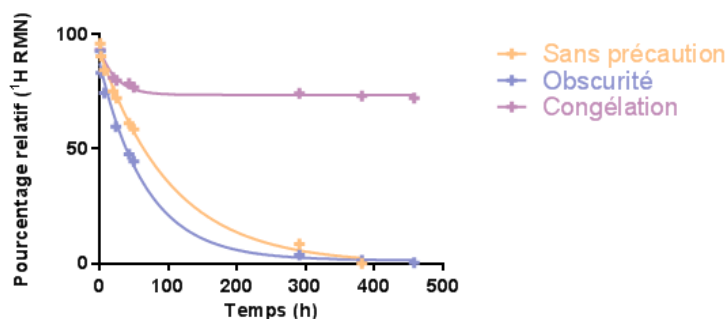


Figure 109 : Suivi de la dégradation de la vismione H dans différentes conditions.

L'ensemble de ces données indiquent qu'une part non négligeable des vismiones étudiées est dégradée par leur simple mise en solution dans le DMSO, quelles que soient les précautions de manipulation prises. Même si la congélation des solutions diminue le processus de dégradation, il est important de réaliser des solutions extemporanées pour évaluer l'activité biologique de ces molécules. A l'état solide, les vismiones sont en effet stables lorsqu'elles sont conservées à +4°C, aucun phénomène de dégradation n'ayant été observé sur des lots datant de plus d'un an.

A la suite de ces observations, nous avons demandé à nos collaborateurs biologistes de tester ces molécules en préparant systématiquement de nouvelles solutions extemporanément.

7.5 Stabilité des vismiones lors des tests biologiques

Si les vismiones sont si réactives en solution, on peut se poser la question de leur stabilité dans un milieu de culture lors de leur évaluation biologique. Les tests biologiques sont en effet réalisés avec des incubations des composés à tester avec le pathogène allant généralement de 48 à 72h, à des températures comprises entre 24 et 37°C.

La difficulté pour répondre à cette question provient du fait que les tests ne sont pas réalisés directement au laboratoire mais au travers de collaborations. Il est ainsi délicat de maîtriser l'ensemble des paramètres allant de la mise en solution à l'analyse des milieux de cultures en limitant l'introduction de biais expérimentaux.

Un premier essai a été réalisé lors de l'évaluation de la cytotoxicité de la vismione H (**94**) sur fibroblastes humains NHDF par Flore Nardella à l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg.

Dans dix puits, des cellules NHDF en culture ont été incubées avec la vismione H (**94**) (100 µg/mL) dans les mêmes conditions que pour la réalisation du test de cytotoxicité (paragraphe 10.1.2, p 240), de manière à récupérer 1 mL du milieu de culture. Ce milieu de culture a immédiatement été congelé à -80°C au terme de la période d'incubation (48 h, 37°C).

Le milieu de culture a ensuite été déposé sur une cartouche SPE C₁₈ (1 g) préalablement conditionnée qui a été rincée à l'eau milliQ afin de retenir les molécules apolaires et notamment la vismione et ses produits de dégradation. La cartouche a ensuite été éluée à l'aide de 10 mL de méthanol. Le résidu a été concentré sous pression réduite et immédiatement analysé en HPLC (Figure 110).

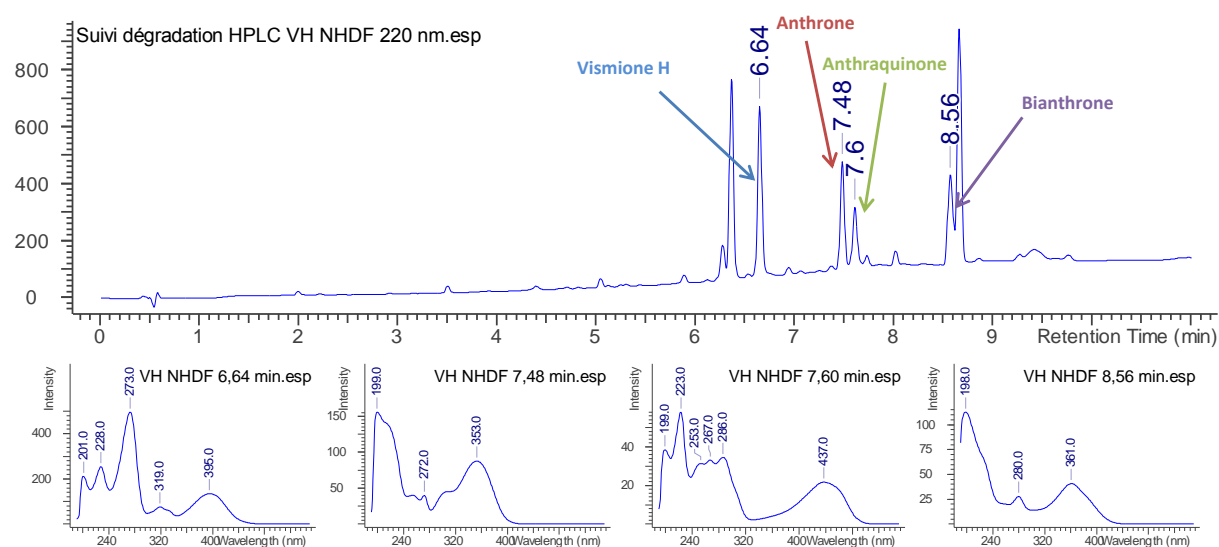


Figure 110 : Analyse HPLC du milieu de culture du test de cytotoxicité sur NHDF après incubation avec la vismione H pendant 48 h à 37°C.

Méthode HPLC Vismione $\lambda = 220$ nm.

Les spectres UV caractéristiques de chacune de formes de dégradation ont permis d'identifier les différents pics chromatographiques.

On remarque que si les différents produits de dégradation de la vismione sont bien présents, ce à quoi l'on pouvait s'attendre, il subsiste de la vismione H en proportion non négligeable au bout de 48 h.

Cette approche mériterait d'être plus aboutie afin de quantifier précisément chacune des molécules, d'évaluer le pourcentage de recouvrement de la méthode de concentration de l'échantillon par SPE pour chacune d'entre elles. Néanmoins, ces résultats préliminaires permettent de montrer qu'il subsiste de la forme vismione (**94**) après 48 h d'incubation dans un milieu de culture à 37°C au contact de cellules vivantes.

Il serait intéressant d'étudier ces paramètres de dégradation au contact de cultures de *Leishmania*. Les milieux de culture et le métabolisme de ces organismes unicellulaires étant différent (adaptation au stress oxydant intramacrophagique notamment pour la forme amastigote¹⁶⁴), il est difficile d'extrapoler ces résultats préliminaires. Ils constituent néanmoins une piste qui permettrait de caractériser avec plus de certitude la forme véritablement responsable de l'activité biologique observée pour les vismiones.

8 Etude du rendement quantique de fluorescence de l'acétylvismione D

De nombreuses molécules naturelles possèdent des propriétés de fluorescence intrinsèque. Cette fluorescence peut éventuellement être mise à profit dans le cas de molécules bioactives pour comprendre leur mécanisme d'action²⁶⁸. Les vismiones étant naturellement fluorescentes en jaune lorsqu'elles sont observées sur plaque CCM à 365 nm, nous avons cherché à caractériser cette fluorescence afin d'évaluer si ces propriétés pourraient être mises à profit pour comprendre leur mécanisme d'action. En effet, l'observation en microscopie de fluorescence de culture de leishmanies incubées avec les molécules actives pourrait éventuellement permettre d'observer une accumulation au niveau d'un compartiment subcellulaire en particulier. Ceci pourrait permettre d'orienter la réflexion sur la voie métabolique impactée par la molécule, ou tout au moins sur le site d'action de la molécule.

Nous avons dans un premier temps déterminé le rendement quantique de fluorescence de l'acétylvismione D (**8**), considérée comme la molécule de référence suite aux résultats préliminaires (paragraphe 1, p 3).

Pour déterminer le rendement quantique d'une molécule, il est d'abord nécessaire d'étudier ses paramètres d'absorbance et de fluorescence.

8.1 Détermination des paramètres d'absorbance de l'acétylvismione D

Le spectre d'absorbance de l'acétylvismione D (**8**) est caractérisé par deux maxima d'absorption à 274 et 396 nm (Figure 111). Une gamme de concentration a été réalisée dans le méthanol afin de déterminer les coefficients d'extinction molaire pour les longueurs d'onde des deux maxima d'absorption (Figure 112). Les valeurs de ces coefficients d'extinction molaire à 274 et 396 nm sont respectivement $\epsilon_{274 \text{ nm}} = 46298 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{396 \text{ nm}} = 12445 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

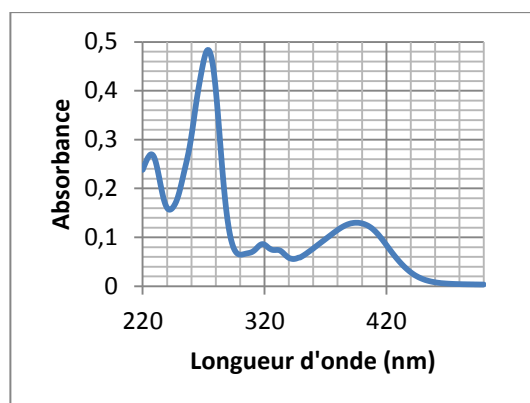


Figure 111 : Spectre d'absorption de l'acétylvismione D ($c = 1,30.10^{-6} \text{ M}$ dans le MeOH).

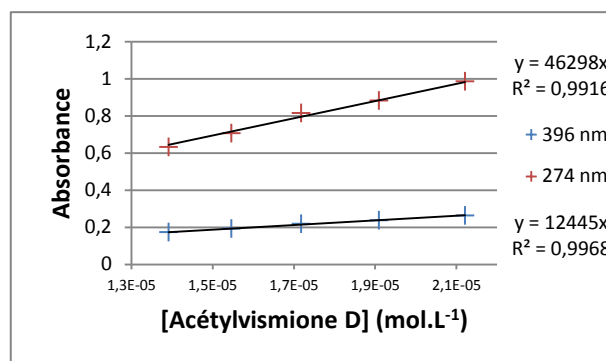


Figure 112 : Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'Acétylvismione D à 274 et 396 nm.

8.2 Détermination des paramètres de fluorescence de l'acétylvismione D

Le spectre de fluorescence de l'acétylvismione D (**8**) est lui caractérisé par un maximum à 546 nm (Figure 113).

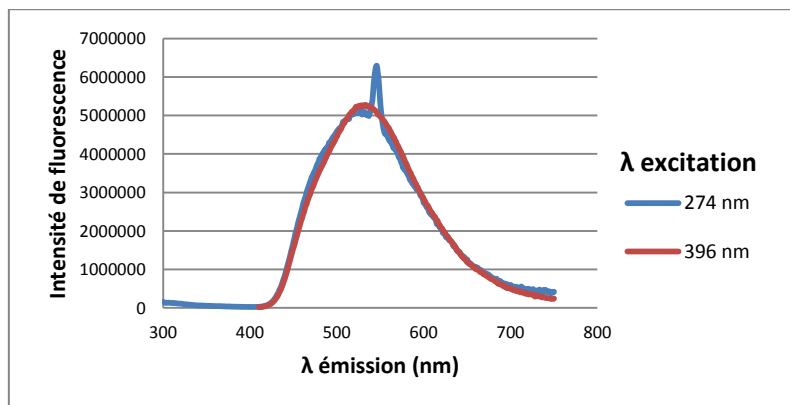


Figure 113 : Spectre de fluorescence de l'acétylvismione D.

Le pic d'émission secondaire à 534 nm lorsque la molécule est excitée à 274 nm correspond à un phénomène de diffusion de Rayleigh. Les paramètres utilisés pour les deux longueurs d'onde d'excitation sont différents.

8.3 Détermination du rendement quantique de fluorescence de l'acétylvismione D

Pour déterminer le rendement quantique de fluorescence, il est nécessaire de comparer les paramètres de fluorescence de la molécule étudiée à ceux d'un standard. Pour effectuer une caractérisation précise, il faudrait, dans l'idéal, utiliser un standard qui possède les mêmes maxima d'absorption et d'émission que la molécule à étudier. Dans un premier temps, une caractérisation grossière a été effectuée avec les réactifs disponibles au laboratoire. La molécule de référence disponible présentant les caractéristiques d'absorbance et de fluorescence les plus proches de celles de l'acétylvismione D (**8**) est le sulfate de quinine $\Phi_{f, QS} = 0,546$ en solution aqueuse à 0,05 M de H_2SO_4 et 366 nm²⁶⁹ (Figure 114).

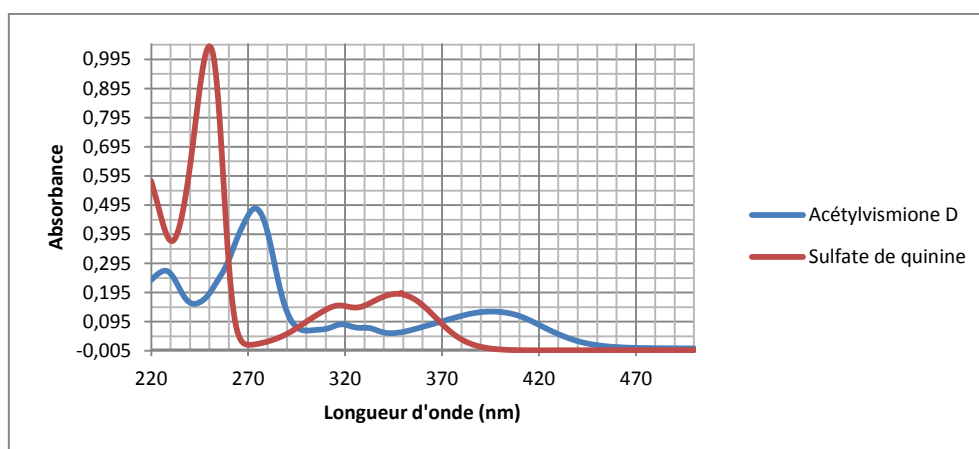


Figure 114 : Spectre d'absorption de l'acétylvismione D et du sulfate de quinine.

Nous avons choisi de déterminer la fluorescence du composé à la longueur d'onde de 366 nm correspondant à l'une des intersections des 2 courbes d'absorbance.

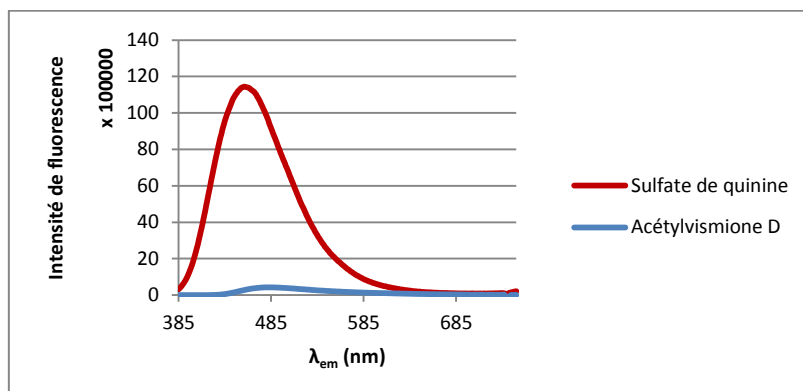


Figure 115 : Spectres de fluorescence de l'acétylvismione D et du sulfate de quinine réalisé dans les mêmes conditions. $\lambda_{ex} = 366$ nm.

Le rendement quantique de fluorescence se calcule à partir de l'équation suivante²⁷⁰ :

$$\Phi_{f,x} = \Phi_{f,st} \frac{F_x}{F_{st}} \frac{f_{st}(\lambda_{ex,st})}{f_x(\lambda_{ex,x})} \frac{n_x^2}{n_{st}^2} \frac{q_{p,st}(\lambda_{ex,st})}{q_{p,x}(\lambda_{ex,x})}$$

Où $F_x = \int_{\lambda_{em1}}^{\lambda_{em2}} q_{p,\lambda}^f(\lambda_{em}) d\lambda_{em}$ correspond à l'aire sous la courbe du spectre de fluorescence pour le composé x entre les longueurs d'onde λ_{em1} et λ_{em2} respectivement ici 385 et 685 nm.

$$\text{et } f_x(\lambda_{ex}) = 1 - 10^{-A_x(\lambda_{ex})}$$

n_x correspond à l'indice de réfraction du solvant dans lequel est réalisée la mesure pour le composé x, respectivement $n_{MeOH} = 1,3265$ $n_{H_2O} = 1,333$ à 20°C²⁷¹.

Le quotient quantifiant le flux de photons $\frac{q_{p,st}(\lambda_{ex,st})}{q_{p,x}(\lambda_{ex,x})} = 1$ car la longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} = 366$ nm et les conditions expérimentales sont identiques pour les 2 échantillons.

On obtient donc :

$$\Phi_{f,AVD} = \Phi_{f,QS} \frac{F_{AVD}}{F_{QS}} \frac{1 - 10^{-A(\lambda_{ex}, QS)}}{1 - 10^{-A(\lambda_{ex}, AVD)}} \frac{n_{MeOH}^2}{n_{H_2O}^2} = 2 \%$$

8.4 Conclusion

Le rendement quantique de fluorescence de l'acétylvismione D (**8**) dans le méthanol est de seulement 2 %. Cette valeur est approximative car le standard employé n'est pas le plus adéquat, ses maxima d'absorption et d'émission étant différents de ceux de l'acétylvismione D (**8**). Pour déterminer avec une plus grande précision la valeur de rendement quantique, il aurait fallu utiliser comme standard une molécule comme la coumarine 153 ($\lambda_{em} = 480-650$ nm, $\lambda_{ex} = 370-470$ nm $\Phi_f = 0,38$ dans EtOH) qui présente les mêmes maxima d'absorption et d'émission que l'acétylvismione D (**8**)²⁶⁹.

Toutefois cette valeur permet d'invalider l'utilisation la fluorescence intrinsèque de l'acétylvismione D (**8**) pour étudier son site d'action *in situ* en microscopie de fluorescence, sa valeur de rendement quantique de fluorescence étant trop faible.

Ces résultats sont aisément extrapolables aux autres vismiones compte-tenu de leur chromophore commun.

9 Tentatives de caractérisation de la stéréochimie des vismiones

Les vismiones, bien que comportant un centre asymétrique en position 6, n'ont jamais fait l'objet d'une caractérisation sur la stéréochimie de cette position. A notre connaissance, aucune donnée de pouvoir rotatoire n'a jamais été décrite pour cette famille de molécules.

9.1 Mesure du pouvoir rotatoire

Des quantités relativement importantes de certaines vismiones ayant pu être isolées de l'extrait dichlorométhanique d'écorces de *P. glaberrimum*, nous avons mesuré leur pouvoir rotatoire dans le méthanol :

Vismione H : $[\alpha]_D^{20} = +21,3^\circ$ (c 0.10, MeOH).

Vismione D : $[\alpha]_D^{20} = -7,4^\circ$ (c 0.09, MeOH).

Acétylvismione D : $[\alpha]_D^{20} = +16,3^\circ$ (c 0.10, MeOH).

Les valeurs de pouvoir rotatoire relativement élevées pour chacune des molécules étudiées indiquent que celles-ci ne sont pas présentes sous forme racémique sans néanmoins permettre de conclure que celles-ci sont présentes sous une forme énantiopure. Des études réalisées sur des dihydroanthracénones d'origine fongique ont notamment montré qu'en fonction des espèces considérées, l'un ou l'autre des énantiomères était présent mais aussi que dans un certain nombre de cas, les deux stéréoisomères pouvaient être présents dans des proportions variables selon les espèces considérées⁹¹.

9.2 Essais de cristallisation

Afin de déterminer les configurations absolues des vismiones, nous avons tenté d'obtenir des cristaux afin de réaliser des analyses par spectrométrie aux rayons X. Les vismiones ont tendance à cristalliser sous la forme de fines aiguilles dans l'heptane qui ne permettent pas d'envisager ce genre d'analyses.

Des tentatives de cristallisation dans un certain nombre de solvants usuels (acétone, pentane, ACN, MeOH, THF, AcOEt purs ou en mélanges) n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs cristaux, engendrant généralement la dégradation des molécules.

Des essais d'estérification de la vismione D (**33**) avec des chlorures d'acide 3,5-dinitrobenzoïques et 4-bromobenzoïque afin de faciliter l'obtention de cristaux, selon les conditions décrites pour l'estérification des dihydroanthracénones²⁷² n'ont pas permis d'obtenir les esters attendus, n'engendrant que des produits de dégradation.

La caractérisation structurale par rayons X des vismiones naturelles n'a donc pas pu être réalisée. Celle-ci aurait pu permettre d'établir si la vismione était présente sous forme énantiopure et même de déterminer la configuration de la molécule en cas d'estérification avec un dérivé porteur d'un atome lourd (Br).

9.3 Criblage de conditions HPLC chirale

La vismione H (**94**) a été analysée en HPLC chirale sur cinq types de colonnes chirales dans six conditions différentes d'élution (paragraphe 9, p 239). Cependant, dans l'ensemble de ces conditions, seul un pic chromatographique a pu être observé. Ces résultats n'ont donc pas permis de montrer la présence de deux énantiomères de la molécule naturelle mais ne permettent pas non plus d'infirmier pour autant leur présence de manière certaine.

9.4 Discussion

Contrairement à certaines dihydroanthracénones, la stéréochimie de la position 6 des vismiones n'a jamais été caractérisée. Les valeurs de pouvoir rotatoire observées pour les solutions de vismiones H (**94**), D (**33**) et d'acétylvismione D (**8**) indiquent que la molécule est soit sous forme énantiopure soit sous forme non racémique. Un criblage HPLC sur diverses colonnes chirales n'a pas permis de mettre en évidence la présence de deux énantiomères sans pour autant pouvoir affirmer totalement que la molécule est sous forme énantiopure. L'impossibilité d'obtenir jusqu'à présent des cristaux de ces molécules n'a pas permis d'établir de structure par diffraction aux rayons X qui auraient pu permettre de déterminer la configuration du carbone asymétrique. De nouvelles tentatives de cristallisation seront toutefois réalisées pour essayer d'obtenir des cristaux et ainsi caractériser les propriétés stéréochimiques de la molécule.

L'étude des propriétés de dichroïsme circulaire des vismiones pourrait également permettre de déterminer la stéréochimie du centre asymétrique par comparaison avec ceux de dihydroanthracénones d'origine fongique ou synthétique comme l'atrochryson (**131**) dont la stéréochimie a déjà été déterminée par ce moyen^{265,273}.

10 Recherche de vismiones dans d'autres genres botaniques

Les vismiones ont été jusqu'à présent presque exclusivement isolées et caractérisées à partir d'espèces appartenant à la famille des Hypericaceae. Quelques travaux indiquent également qu'elles ont été isolées au sein de la famille des Ochnaceae.

Au sein des Hypericaceae, cette famille de molécule est essentiellement présente au sein du genre *Psorospermum*. Elles ont cependant également été isolées de genres taxonomiquement proches comme les genres *Vismia* et *Cratoxylum* (paragraphe 2.2.1, p 33).

Compte-tenu de leur réactivité il est possible que les vismiones n'aient pu être isolées à partir d'autres espèces du fait de leur dégradation au cours des processus d'extraction et de fractionnement.

Ainsi, on retrouve des anthrones et anthraquinones prénylées également dans le genre botaniquement proche *Harungana* qui pourraient être des artéfacts dus à la dégradation de vismiones correspondantes (paragraphe 2.2.1, p 33).

10.1 Recherche de vismiones dans le genre *Aloe*

Récemment, Epifano *et al.* ont montré par HPLC la présence 3-géranxyloxyémidine (**12**) et de madagascine (**5**) dans le gel et la feuille d'*Aloe vera* (Xanthorrhoeaceae) ainsi que dans les feuilles et les fruits de *Senna alexandrina* (Fabaceae)²⁷⁴. La même équipe avait déjà montré la présence de ces molécules dans l'écorce de plusieurs espèces appartenant au genre *Rhamnus* (Rhamnaceae)²⁷⁵.

Des extraits dichlorométhaniques de feuilles de trois espèces d'*Aloe* (*A. ferox*, *A. marlothii* et *A. vera*) ont été réalisés afin d'y rechercher d'éventuelles vismiones qui pourraient être à l'origine des anthraquinones prénylées observées par Epifano *et al.*

L'analyse HPLC-UV de ces extraits n'a révélé aucune trace des vismiones [vismione H (**94**), désacétylvismione H (**97**), vismione D (**33**), acétylvismione D (**8**)] qui auraient pu engendrer les anthraquinones décrites par Epifano *et al.* Par ailleurs, aucun autre pic provenant du chromatogramme de l'extrait n'a indiqué de spectre caractéristique des dihydroanthracénones. De même, aucun pic caractéristique des anthrones et des anthraquinones correspondantes n'a pu être mis en évidence (*cf* Figure 104, et 131 et Figure 110, p 136).

Le genre *Aloe* est connu pour renfermer un certain nombre de dihydroanthracénones (paragraphe 2.1.1.1, p 30) pouvant suggérer la présence de vismiones dans le genre.

Cependant, celles-ci ont essentiellement été retrouvées dans les organes souterrains des *Aloe* et d'autres espèces de la famille des Xanthorrhoeaceae. La recherche de vismiones au sein des organes souterrains de différentes espèces d'*Aloe* pourrait donc être envisagée.

La présence d'anthraquinones prénylées décrite par Epifano *et al.* dans les genres *Aloe*, *Senna* et *Rhamnus* repose cependant sur une évidence scientifique relativement faible puisque ces derniers se contentent de comparer les chromatogrammes UV des extraits avec ceux de substances de référence synthétiques ne permettant ainsi pas d'affirmer de manière non ambiguë leur présence dans ces échantillons^{274,275}.

10.2 Recherche de vismiones au sein d'Hypericaceae tempérées

Des extraits de tiges d'Hypericaceae tempérées, *Hypericum perforatum* et *Hypericum hookerianum* ont également été étudiés à la recherche de vismiones.

Hypericum perforatum, le millepertuis, est une Hypericaceae herbacée commune de nos régions. Des études phytochimiques ont notamment montré qu'elle renfermait des anthranoïdes d'une part, ainsi que toute une série de composés phénoliques prénylés pouvant suggérer la présence des enzymes nécessaires à la biosynthèse des vismiones.

Les extraits de tiges réalisés et analysés selon le même protocole que pour les échantillons de *Psorospermum* n'ont cependant pas montré la présence de vismiones.

Une autre Hypericaceae semi-ligneuse cette fois, *Hypericum hookerianum*, originaire de l'Himalaya et largement utilisée à des fins ornementales a aussi été étudiée. Cependant, les extraits d'écorce n'ont pas permis de supposer la présence de vismiones ou autres dihydroanthracénones dans cette espèce.

10.3 Recherche de vismiones dans la famille des Clusiaceae

Afin de mieux cerner les contours taxonomiques de la répartition des vismiones, leur présence a été recherchée dans une famille botaniquement proche, celle des Clusiaceae. Le genre *Psorospermum* appartenait d'ailleurs à cette famille avant d'être rattachée aux Hypericaceae par la classification APGIII. Des extraits de feuilles et d'écorces de *Clusia major* et de péricarpes de fruit de *Garcinia mangostana* ont été réalisés et étudiés à cet effet.

Le péricarpe de fruit de *Garcinia mangostana* est notamment connu pour contenir une grande variété de xanthonoïdes prénylés²⁷⁶ ce qui pourrait éventuellement indiquer des voies métaboliques communes.

L'examen des chromatogrammes des trois extraits de Clusiaceae réalisés dans les mêmes conditions que pour les échantillons de *Psorospermum* n'a cependant pas permis de mettre en évidence la présence de vismiones. Il pourrait toutefois être intéressant d'examiner d'autres échantillons de Clusiaceae, cette famille paraissant phylogénétiquement plus proche des Hypericaceae que celle des Ochnaceae⁶ (Figure 5, p 10) dans laquelle des vismiones ont toutefois été isolées.

10.4 Conclusion

La recherche de vismiones au sein de trois échantillons du genre *Aloe*, décrit pour contenir de potentiels produits de dégradation que sont la madagascine (**5**) et la 3-géranxyloxyémidine (**12**), n'a pas permis de mettre en évidence de molécules de la famille des dihydroanthracénones.

La même recherche effectuée au sein de deux Hypericaceae tempérées n'a pas non plus révélé la présence de ce type de molécules.

Enfin, des dihydroanthracénones et plus particulièrement les vismiones n'ont pas pu être retrouvées dans deux espèces tropicales appartenant à la famille des Clusiaceae, pourtant phylogénétiquement proche de celle des Hypericaceae.

Le nombre restreint de genres dans lesquels des vismiones ont été isolées indique un rôle chimiotaxonomique très probable de ce type de composés qui pourrait venir en appui des données de biologie moléculaire afin de mieux circonscrire la taxonomie des Clusioideae qui reste encore à renforcer à l'heure actuelle⁶.

Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de la présence des vismiones dans des genres botaniques proches de ceux dans lesquels elles ont déjà été isolées ou dans ceux ayant été décrits comme contenant des molécules susceptibles de correspondre à leurs produits de dégradation. Ces résultats pourraient permettre de déterminer plus précisément l'intérêt chimiotaxonomique de ces molécules singulières.

Chapitre III :

Synthèse organique

1 Introduction

Une approche par synthèse organique a été employée dans le but d'accéder à de nouveaux analogues synthétiques des molécules naturelles actives afin d'essayer d'améliorer leur activité, ainsi que leur sélectivité, et de mettre en évidence les déterminants structuraux nécessaires aux propriétés antiprotozoaires des molécules de nature anthranoïde.

Au vu de la réactivité des vismiones et de leur facilité à engendrer les anthrones correspondantes, il a dans un premier temps été envisagé de synthétiser leurs analogues de nature anthrone, qui se sont montrés certes légèrement moins actifs mais également moins réactifs sur le plan chimique avec des sélectivités vis-à-vis de *Leishmania* tout à fait acceptables (Tableau 1, p 4).

Lorsque l'on observe les anthrones les plus actives ainsi que les molécules susceptibles d'être engendrées par la dégradation des vismiones, on se rend compte qu'elles présentent toutes une structure chimique commune : le noyau émodine anthrone (**139**) (Figure 116).

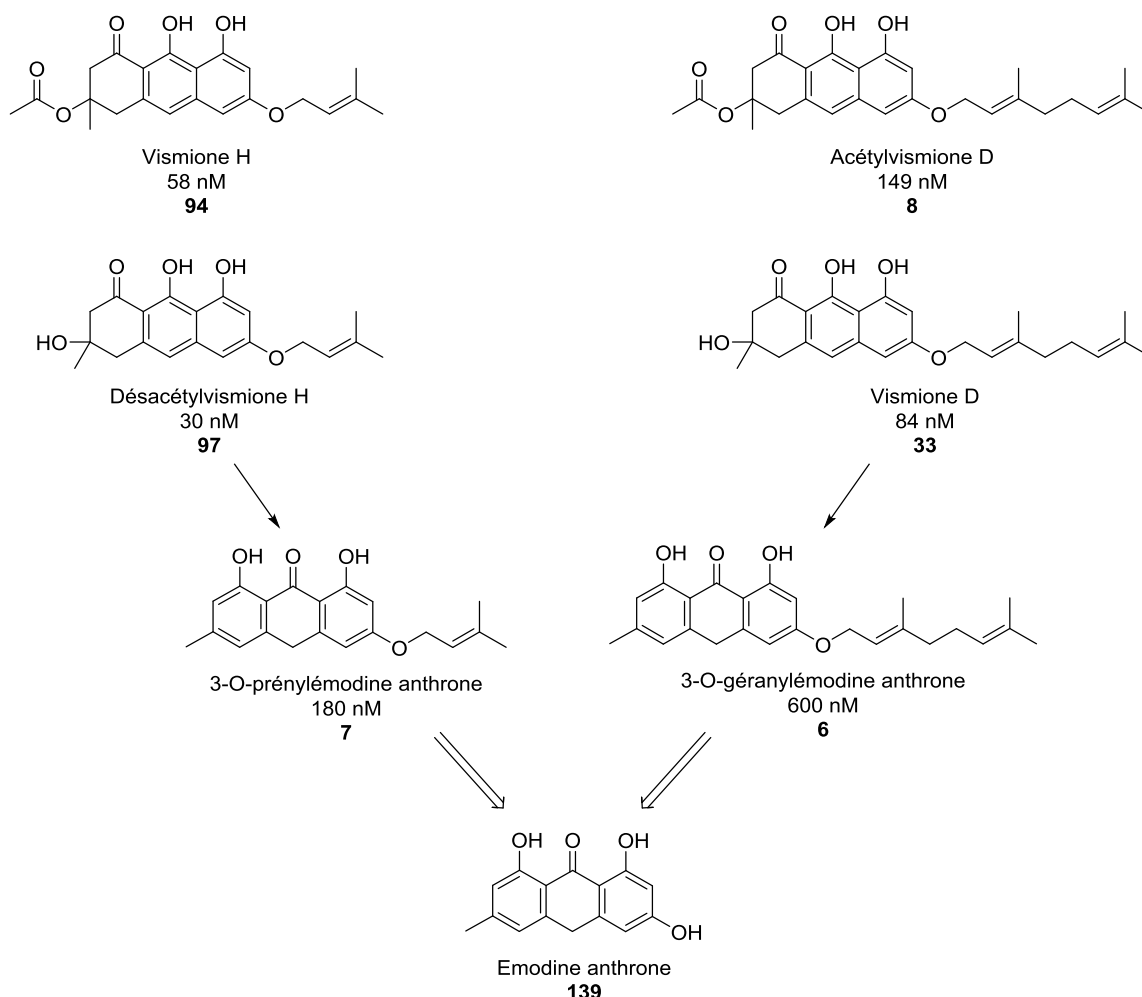


Figure 116 : Relations entre vismiones et anthrones et rétrosynthèse des anthrones alkylées à partir de l'émodine anthrone (139).

Les valeurs d'activité correspondent aux IC₅₀ de chaque molécule sur amastigotes axéniques de *L. donovani*.

La synthèse de ces anthrones dérivées de l'émodine anthrone (**139**) peut être envisagée par réduction des anthraquinones correspondantes dérivées elles-mêmes du noyau émodine (**13**) (Figure 117).

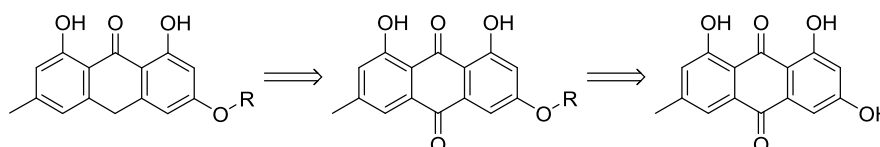


Figure 117 : Rétrosynthèse des anthrones 3-O-alkylées naturelles.

Dans la littérature, plusieurs références décrivent en effet les conditions de réduction d'anthraquinones alkylées en anthrones²⁷⁷⁻²⁸². Celles-ci seront détaillées au paragraphe 5.1 (p 173). Cette synthèse convergente d'anthrones ainsi que des anthraquinones correspondantes, permettra en outre de tester les formes oxydées qui, dans le cas des molécules naturelles isolées de *Psorospermum*, ont tout de même montré une activité de l'ordre du micromolaire. Il est ainsi possible de supposer qu'il s'agisse de métabolites des premières qui participent eux aussi, au moins en partie, à l'activité globale *in vitro* des vismions et de leurs produits de dégradation.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'analogues d'anthrones et d'anthraquinones O-substituées en position 3 puisque les données de relation structure-activité suggérées par les molécules naturelles montrent qu'une substitution sur cette position est favorable à l'activité antileishmanienne *in vitro* (paragraphe 1, p 3). Pour cela il est donc nécessaire de partir de l'émodine afin de l'alkyler sélectivement sur l'hydroxyle le plus réactif en position 3.

La possibilité d'accéder à l'émodine (**13**) ainsi qu'à d'autres dérivés de nature anthraquinone à partir de ressources végétales pour accéder aux dérivés souhaités par une démarche d'hémisynthèse a été envisagée. Cependant, les rendements décrits dans la littérature à partir des drogues à anthraquinones se sont montrés trop faibles. D'autre part, les procédés de purifications décrits se sont avérés complexes à mettre en œuvre notamment par la présence de nombreux isomères et molécules proches dans un même extrait²⁸³⁻²⁸⁵.

Une méthode préparative par HSCCC a par exemple été développée par Guo *et al.* afin de purifier les anthraquinones contenues dans un extrait de *Rheum japonicus*. La purification de 500 mg d'extrait brut correspondant à 3,4 g de racines sèches a seulement permis d'isoler 3,4 mg d'émodine (**13**), 24,1 mg de chrysophanol (**76**) et 2,0 mg de physcion (**29**)²⁸³. La quantité d'émodine (**13**) contenue dans l'écorce de *Rhamnus alpinus* quant à elle a été évaluée à seulement 1 mg/g²⁸⁴ d'écorce sèche. Le contenu en émodine (**13**) dans les racines de *Fallopia japonica*, la renouée du Japon, une plante invasive bien connue des bordures de cours d'eau alsaciens présenterait des teneurs allant de 0,65 à 2 % en masse de drogue sèche²⁸⁵. Toutefois la présence de dérivés de nature anthraquinone structurellement proches dans de tels extraits rendrait difficile l'obtention d'un recouvrement total de l'émodine (**13**) contenue dans les racines.

La molécule étant particulièrement onéreuse (Tableau 15) et dans la perspective d'accéder à des dérivés portant des modifications sur d'autres positions du noyau anthraquinone, il a donc été envisagé d'en effectuer la synthèse totale au laboratoire.

Tableau 15 : Tarifs de l'émodine chez les principaux fournisseurs de produits chimiques (prix actualisés juillet 2015).

Fournisseur	Quantité	Pureté	Prix (€)
Sigma	250 mg	≥90 %	231
Fluka	10 mg	≥97 %	160
Extrasynthèse	10 mg	≥99 %	52
Acros	500 mg	95 %	367
TCl	1000 mg	>96 %	387

2 Synthèse totale de l'émodine

2.1 Données de la littérature

Différentes voies de synthèse des anthraquinones, et plus particulièrement de l'émodine (**13**), sont décrites dans la littérature. Trois d'entre elles sont retrouvées assez fréquemment, faisant intervenir la condensation de deux diènes sur une benzoquinone, l'acylation entre un anhydride et des dérivés phénoliques ou une réaction d'ortholithiation entre un benzamide et un benzaldéhyde suivie d'une étape d'acylation.

2.1.1 Condensation de deux diènes sur une benzoquinone

Des réactions faisant intervenir deux réactions de Diels-Alder successives sur une 1,4-benzoquinone (**204**) ont initialement été décrites par Savard et Brassard en 1984²⁸⁶ (Figure 118).

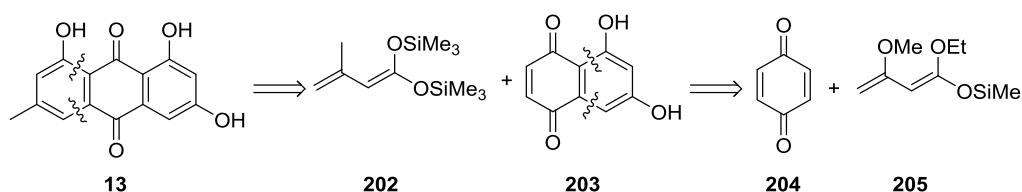


Figure 118 : Rétrosynthèse de l'émodine par double réaction de Diels-Alder sur une benzoquinone.

Cette méthodologie de synthèse a ainsi permis d'accéder à différents dérivés méthylés de l'émodine avec des rendements globaux de 55 à 63 % en partant de la 2,6-dichloro 1,4-benzoquinone (**206**). Ce dérivé chloré permet d'accéder plus facilement aux dérivés anthraquinones désirés en évitant l'apparition de produits secondaires²⁸⁶ (Schéma 1).

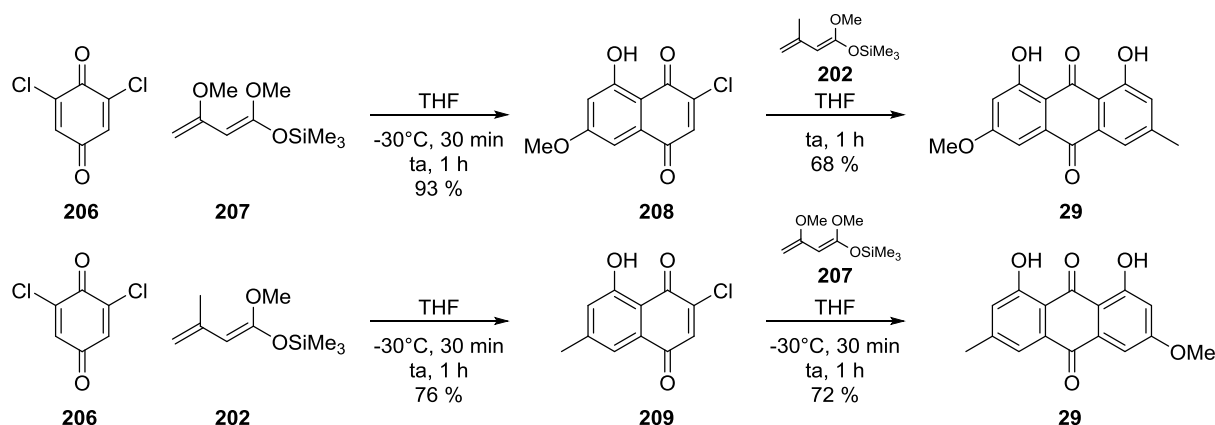
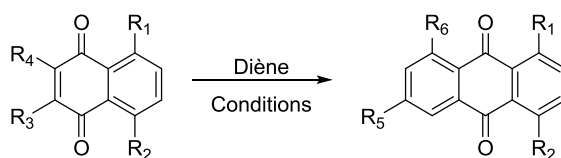


Schéma 1 : Synthèse de la 3-O-méthylémidine par la méthode de Savard et Brassard²⁸⁶.

Cette méthodologie appliquée à l'addition de ces mêmes diènes (**202**, **207**) sur des naphtoquinones chlorées a permis d'accéder à toute une série d'antraquinones diversement substituées (**210 – 217**) (Schéma 2).



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Diène	Conditions	Produit	Rdt
H	H	H	Cl	OMe	OH	207	A	210	99 %
H	H	H	Cl	Me	OH	202	B	211	92 %
OH	H	Cl	H	Me	OH	202	C	212	55 %
OH	H	H	Cl	OMe	OH	207	B	213	53 %
OH	H	H	Cl	Me	OH	202	A	214	63 %
OMe	H	H	Cl	Me	OH	202	C	215	50 %
OMe	H	H	Cl	Me	OMe	202	C	216	44 %
OH	OH	H	Cl	Me	OH	202	C	217	85 %

Schéma 2 : Synthèse d'antraquinones polysubstituées par la méthode de Savard et Brassard²⁸⁶.
Conditions : A : sans solvant, ta ; B : THF, ta ; C : benzène, ta.

Cette stratégie de synthèse permet d'accéder en seulement deux étapes à un certain nombre d'antraquinones diversement substituées (**210 – 217**) avec de relativement bons rendements selon les dérivés. Cette méthode limite cependant le nombre de groupements pouvant être introduits sur le noyau antraquinone et ne permet pas de contrôler avec précision la régiosélectivité des additions. Dans cette exemplification réalisée par Savard et Brassard, les réactions conduites sur 100 à 200 mg posent la question de leur transposition à plus grande échelle nécessaire dans notre cas.

Motoyoshiya *et al.* ont publié plus récemment une synthèse de l'émodine (**13**) à partir des conditions de Savard et Brassard sur des quantités de l'ordre du gramme²⁸⁷. Les conditions réactionnelles diffèrent toutefois quelque peu de celles développées par Savard et Brassard. L'addition du premier diène (**202**) est en effet réalisée sur une 1,4 benzoquinone non halogénée (**204**). Dans ces conditions, le milieu réactionnel a dû être chauffé à 50°C pour que la réaction puisse avoir lieu et obtenir un rendement modéré de 46%, inférieur à celui obtenu par Savard et Brassard. La deuxième réaction de Diels-Alder est conduite sur la 7-méthyljuglone (**218**) ainsi synthétisée. Cette fois-ci encore, la température du milieu réactionnel a dû être augmentée et portée à 70°C pour observer une réaction conduisant à un mélange de produits partiellement méthylés (**219** et **29**). Le rendement global du physcion (**29**) dans ces conditions de 13 % est bien inférieur à celui de 55 % obtenu par Savard et Brassard²⁸⁶. Ce résultat suggère que l'utilisation de dérivés chlorés de la 1,4-benzoquinone s'avère plus efficace que lorsque la réaction effectuée à partir d'une 1,4-benzoquinone (**204**). Le changement d'échelle de la réaction de 200 mg à 1,5 g peut aussi avoir un impact non négligeable sur le rendement, les conditions étant plus simples à contrôler avec de plus faibles quantités engagées. Une étape de déméthylation par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique à reflux du mélange de dérivés partiellement méthylés (**219** et **29**) a permis toutefois d'obtenir l'émodine (**13**) avec un rendement global de 22 % en partant de la 1,4-benzoquinone (**204**) (Schéma 3).

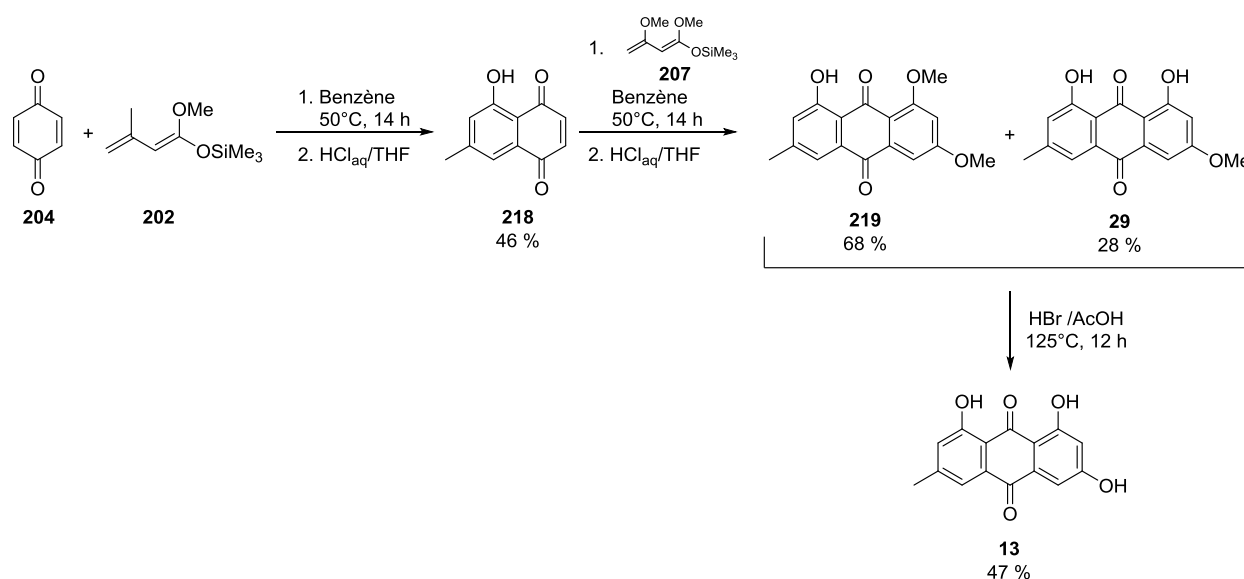


Schéma 3 : Synthèse de l'émodine d'après Motoyoshiya *et al.*²⁸⁷.

2.1.2 Acylation entre un anhydride phtalique et un dérivé phénolique

L'analyse rétrosynthétique montre que la synthèse d'hydroxyantraquinones peut être obtenue par une double réaction d'acylation de Friedel et Crafts entre un anhydride phtalique (**221**) et un dérivé phénolique (**222**) (Figure 119).

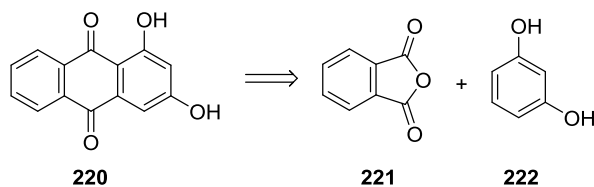
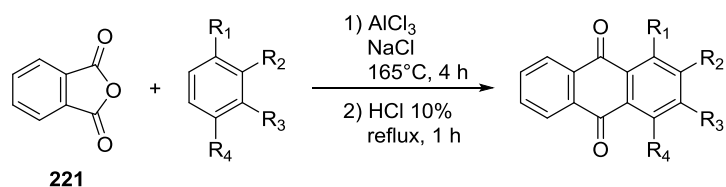


Figure 119 : Rétrosynthèse de la xanthopurpurine par acylation d'un anhydride phtalique sur un dérivé phénolique²⁸⁸.

Cette réaction, décrite dès les années 1920 pour la synthèse de la quinizarine²⁸⁹ a encore été récemment employées par Dhananjeyan *et al.* pour réaliser la synthèse d'une série d'hydroxyantraquinones (**223** – **226**) avec des rendements modérés²⁸⁸ (Schéma 4).



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Produit	Rdt
OH	OH	H	H	223	55 %
OH	H	OH	H	224	60 %
OH	H	H	OH	225	80 %
OH	OH	OH	H	226	75 %

Schéma 4 : Synthèse de dérivés hydroxyantraquinones²⁸⁸.

Cependant, cette stratégie de synthèse ne s'applique efficacement que dans le cas d'antraquinones symétriques. Dans le cas d'antraquinones asymétriques ces méthodes de synthèse s'avèrent inefficaces du fait de leur manque de régiosélectivité comme le soulevaient Snieckus *et al.*²⁹⁰ (Schéma 5).

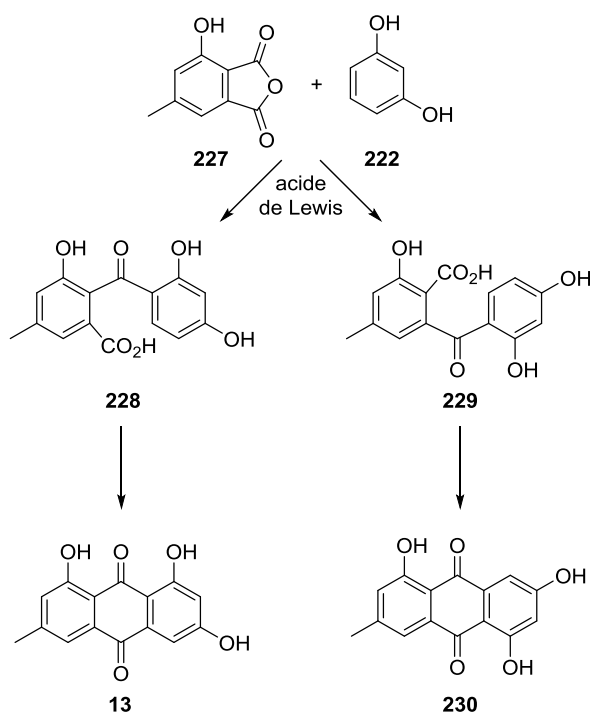


Schéma 5 : Problèmes de régiosélectivité de la double acylation posés pour la synthèse de l'émodyne (13) d'après Snieckus *et al.*²⁹⁰.

2.1.3 Réaction d'ortholithiation entre un benzamide et un benzaldéhyde suivie d'une étape d'acylation.

Pour pallier au manque de régiosélectivité de la stratégie de synthèse discutée au point précédent, une synthèse passant par un intermédiaire phthalide (**232**) permet de contrôler efficacement la régiosélectivité de la réaction. Ce dérivé phthalide (**232**) est lui-même obtenu par une réaction d'ortholithiation entre un benzamide (**233**) et un benzaldéhyde (**234**)²⁹¹ (Figure 120).

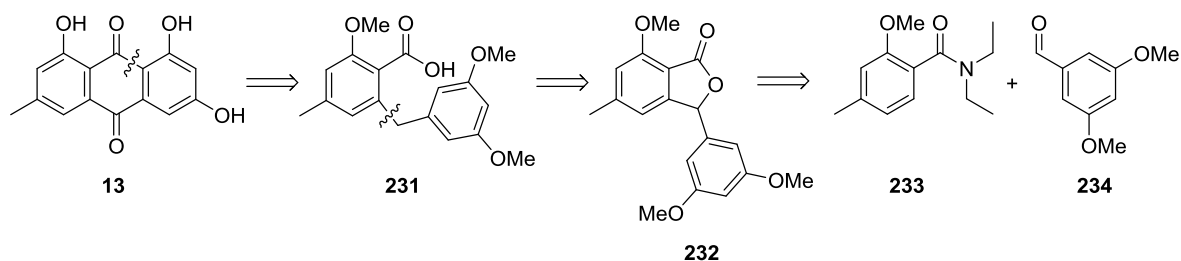
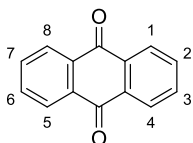


Figure 120 : Rétrosynthèse de l'émodyne par réaction d'ortholithiation.

Cette stratégie a été appliquée à la synthèse d'une grande variété d'antraquinones asymétriques naturelles (**235 - 243**, **13**, **76**) avec des rendements globaux à partir du benzamide de départ allant de 21 à 61 % pour les dérivés méthoxylés correspondant (Figure 121).



Nom	Substitution								Rdt global	Réf
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8		
Islandicine 235	OH	Me	H	OH	OH	H	H	H	41 %	²⁹⁰
Digitopurpurone 236	OH	H	Me	OH	OH	H	H	H	39 %	²⁹⁰
Erythroglaucine 237	OH	Me	H	OH	OH	H	OMe	H	22 %	²⁹⁰
Caténarine 238	OH	Me	H	OH	OH	H	OH	H	29 %	²⁹⁰
Cyanodontine 239	OH	Me	H	OH	OH	H	H	OH	23 %	²⁹⁰
Soranjidiol 240	H	H	OH	H	H	H	Me	H	21 %	²⁹⁰
Désoxyérythrolaccine 241	OH	H	OH	H	H	OH	H	Me	61 %	²⁹²
Émodine 13	OH	H	H	H	H	OH	H	OH	38 %	²⁹³
7-hydroxyémodyne 242	OH	H	H	H	H	OH	OH	OH	37 %	²⁹³
Helminthosporine 243	OH	H	H	H	H	H	H	H	23 %	²⁹³
Chrysophanol 76	OH	H	H	H	H	H	H	OH	35 %	²⁹³

Figure 121 : Synthèses d'antraquinones par réaction d'ortholithiation d'un benzamide.

Les rendements globaux sont exprimés à partir des dérivés méthoxylés des antraquinones correspondantes.

Watanabe *et al.* décrivent en 1985 les conditions d'obtention de la triméthoxyémodyne (**249**) avec cette stratégie de synthèse (Schéma 6).

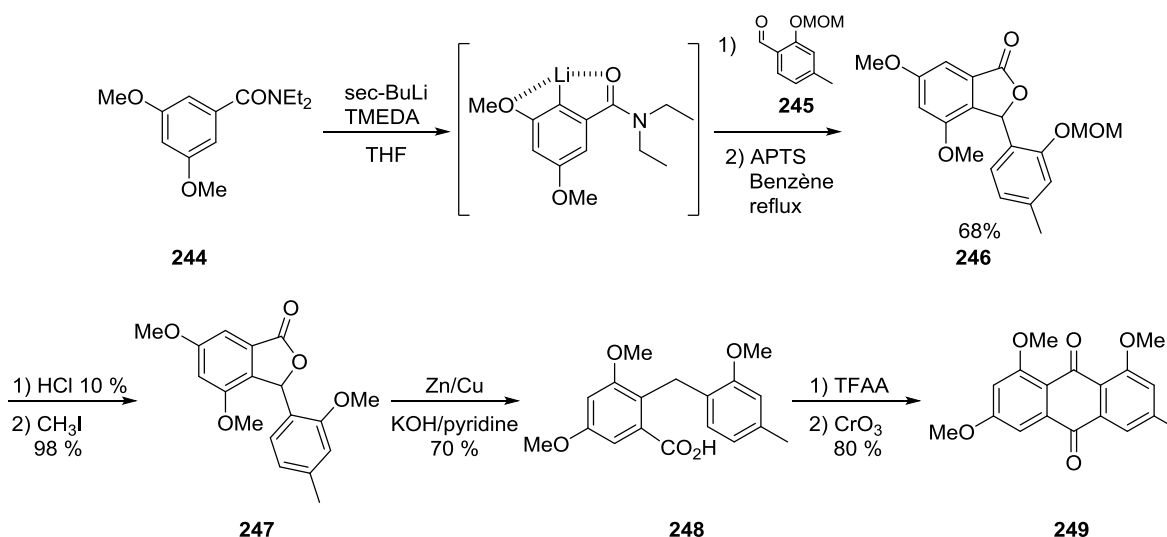


Schéma 6 : Synthèse de la triméthoxyémodyne²⁹³.

2.2 Stratégie 1 : Condensation successive de deux diènes sur une 1,4-benzoquinone

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la voie de synthèse faisant appel à la condensation successive de deux diènes (**205** et **202**) sur une 1,4-benzoquinone (**204**).

Cette voie de synthèse implique la synthèse des deux diènes (**205** et **202**).

Le premier diène peut être obtenu par réaction de l'acétoacétate d'éthyle (**250**) avec le triméthylorthoformiate afin de réaliser le méthoxybuténoate correspondant (**251**). Celui-ci est ensuite silylé afin d'obtenir le diène de Brassard souhaité (**205**)^{286,294,295} (Schéma 7).

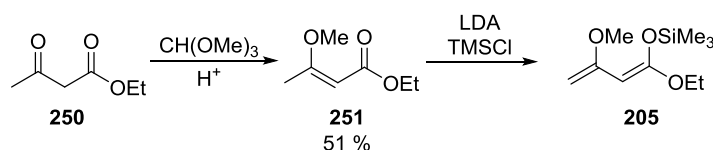


Schéma 7 : Synthèse du premier diène silylé.

Les diènes silylés obtenus se sont révélés très instables ce qui ne nous a pas permis de les isoler. Cette instabilité est également observée pour les dérivés de l'acide méthylbuténoïque (**202**)^{286,296,297} (Schéma 8).

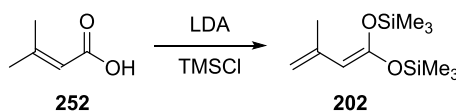


Schéma 8 : Synthèse du second diène silylé.

Nous nous sommes alors intéressés à la synthèse d'un autre diène où les deux oxygènes sont intégrés à un système cyclique de type cétal de cétène (**255**) (Schéma 9). De tels diènes ont été développés initialement par Konopelski *et al.* afin de réaliser des réactions de Diels-Alder stéréosélectives^{298,299}. Ce type de diène est également plus réactif vis-à-vis de diénophiles désactivés³⁰⁰.

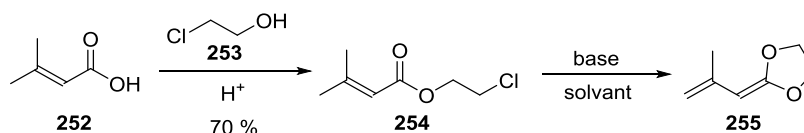


Schéma 9 : Synthèse du 2-(2-méthylallylidène)-1,3-dioxolane (**255**).

Les conditions de cyclisation de l'haloester (**254**) mise en œuvre par Konopelski *et al.*²⁹⁸ (Schéma 10) et reprises par Lau *et al.*³⁰⁰ emploient de l'hydrure de potassium dans le DME. Un essai réalisé avec de l'hydrure de sodium dans les mêmes conditions ne nous a pas permis d'obtenir le produit attendu. Nous avons alors essayé de cycliser l'haloester (**254**) en employant comme base le LDA dans le THF mais à nouveau sans succès. L'utilisation de terbutanolate de potassium dans le DME a permis d'obtenir le dioxolane (**255**) souhaité avec un rendement de 73 % comparable à celui obtenu par Lau *et al.*³⁰⁰ (Tableau 16).

Tableau 16 : Conditions de cyclisation de l'haloester (254).

Base	Solvant	Rdt
NaH	DME	0 %
LDA	THF	0 %
tBuOK	DME	73 %

Dans cette réaction de cyclisation, la base arrache le proton en alpha de la double liaison provoquant une délocalisation électronique permettant l'attaque du carbone porteur de l'halogène et la formation du cycle dioxolane²⁹⁸.

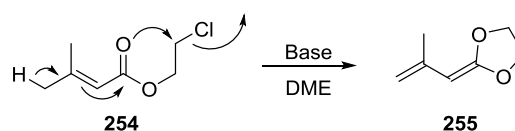


Schéma 10 : Mécanisme de la formation de l'acétal²⁹⁸.

Malheureusement, le diène obtenu (**255**), s'est également montré relativement instable, sa dégradation a pu être observée en quelques jours à -18°C.

Les tentatives de réaction après préparation extemporanée du diène (**255**) sur différentes quinones [1,4-benzoquinone (**204**) et 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone (**206**)] dans le toluène à différentes températures (0°C, ta, reflux) n'a pas permis d'obtenir le produit de condensation attendu, engendrant de nombreux produits de dégradation.

Au vu de ces premiers résultats peu encourageants nous avons entrepris de réaliser la synthèse de l'émodine (**13**) via la cyclisation par réaction de Friedel et Crafts de dérivés de l'acide 2-benzylbenzoïque. Cette synthèse, bien que comportant davantage d'étapes, a montré un rendement global équivalent sur des quantités de l'ordre du gramme à celui de l'approche par double réaction de Diels Alder. En effet, la première présente un rendement global de 38 % en partant du benzamide (**244**) pour arriver à la triméthoxyémodine (**249**)²⁹³ et la seconde un rendement global de 44% en partant de la 1,4-benzoquinone (**204**) pour obtenir un mélange de dérivés méthylés²⁸⁷.

Cette stratégie de synthèse permet en outre d'éviter une partie des problèmes de régiosélectivité qu'aurait pu poser la première voie de synthèse envisagée dans l'optique de faire varier les substitutions sur le noyau anthraquinone.

2.3 Stratégie 2 : Cyclisation de dérivés de l'acide 2-benzylbenzoïque

2.3.1 Synthèse du benzamide

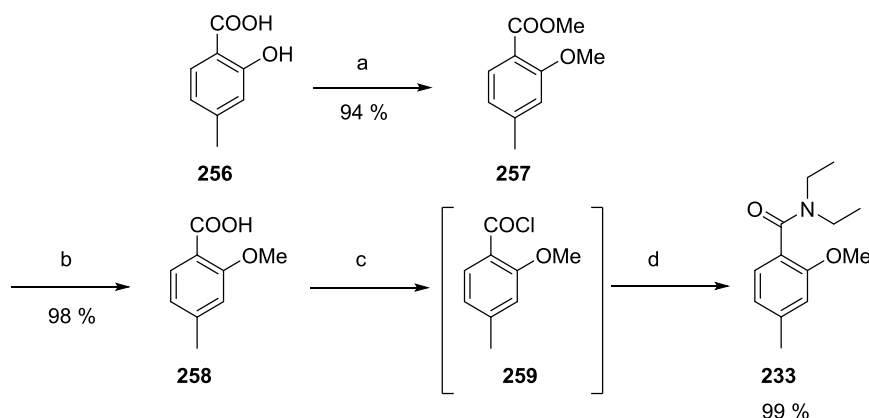
Il s'agit dans un premier temps de synthétiser le benzamide de l'acide 2-méthoxy-4-méthylbenzoïque (**233**). Le groupement benzamide ainsi obtenu constitue le groupement *ortho* directeur de la réaction de métallation par les alkylolithiens. Ceci permet de déprotoner sélectivement le cycle aromatique sur la position en *ortho* de la fonction amide²⁹¹.

Le benzamide de départ (**233**) est obtenu en 4 étapes de synthèse à partir de l'acide 2-hydroxy-4-méthylbenzoïque commercial (**256**) (Schéma 11).

Dans un premier temps, une étape de protection de la fonction hydroxyle en position 2 est réalisée par méthylation de l'acide 2-hydroxy-4-méthylbenzoïque (**256**) par ajout séquentiel d'iodométhane en large excès (9 éq au total). La fonction acide étant plus réactive que la position hydroxyle, cette réaction entraîne rapidement la formation de l'ester méthylé. La méthylation de la fonction hydroxyle est beaucoup plus lente, nécessitant un temps de réaction prolongé.

Afin de régénérer la fonction acide, il est nécessaire de réaliser une étape de saponification qui est effectuée avec de la lithine dans un mélange DME/H₂O.

L'acide (**258**) est ensuite activé en chlorure d'acide (**259**) à l'aide du chlorure d'oxalyle avant de le faire réagir avec la diéthylamine dans le dichlorométhane afin d'obtenir le N,N-diéthylbenzamide (**233**).



a) K₂CO₃, CH₃I, Acétone, 100°C, 48 h; b) LiOH, H₂O, DME, 100°C, 7 h; c) (COCl)₂, DCM, ta, 3 h; d) Diéthylamine, DCM, ta, 24 h.

Schéma 11 : Synthèse du N,N-diéthyl-2-méthoxy-4-méthylbenzamide.

L'ensemble de ces réactions est réalisé avec de très bons rendements et ne nécessite qu'une seule étape de purification suite à la réaction de protection, afin d'éliminer les traces d'ester non méthylé résiduelles.

2.3.2 Synthèse de la lactone

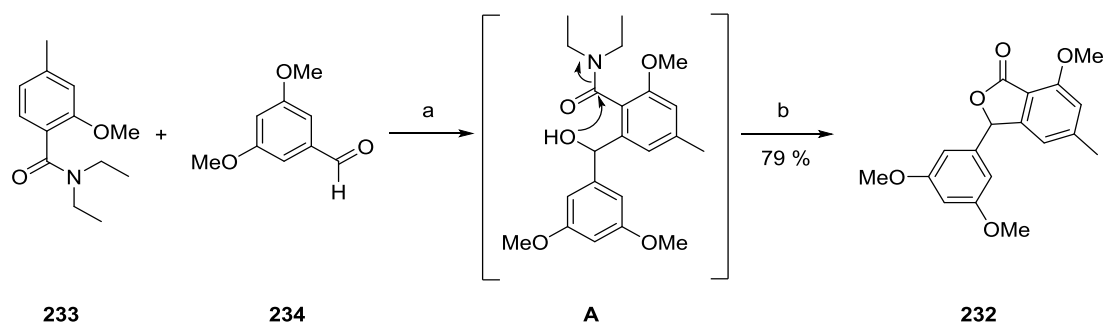
La réaction d'ortholithiation est généralement réalisée en utilisant du *sec*-BuLi en présence de TMEDA.

Les alkylolithiens sont présents en solution sous la forme d'agrégats polymériques³⁰¹. L'utilisation de ligands permet de rompre ces agrégats, augmentant ainsi la réactivité des alkylolithiens. Le TMEDA, par sa structure de ligand bidentate, est un ligand de choix pour les réactions d'ortholithiation²⁹¹.

Le recours au *sec*-BuLi est le plus fréquent pour ce type de réactions^{291,293,302,303}, cependant l'utilisation de *tert*-BuLi a également été décrite par Gonnot *et al.* pour réaliser cette étape.

Le reste des protocoles employés sont similaires : le benzamide est ajouté avec précaution sur une solution de lithien dans le THF anhydre à -78°C sous atmosphère d'argon. Après quelques minutes, l'aldéhyde est ajouté avec précaution et le milieu réactionnel est progressivement laissé remonter à température ambiante (Schéma 12).

La lactone (**232**) est ainsi obtenue en deux étapes. Tout d'abord le lithien en position 6 du benzamide est généré avec du *sec*-BuLi dans le THF en présence de TMEDA, entraînant la coloration rouge-orangée du milieu réactionnel. Puis le carbanion formé attaque le carbonyle du benzaldéhyde (**234**), entraînant une décoloration du milieu réactionnel et permettant d'obtenir l'intermédiaire (**A**). Celui-ci n'est pas purifié et subit une étape d'estérification intramoléculaire dans le toluène à reflux en présence d'APTS, permettant ainsi d'obtenir la lactone (**232**).



a) TMEDA, *s*-BuLi, THF, -78°C, puis ta, 3 h 45; b) APTS, toluène, reflux, 14 h

Schéma 12 : Synthèse de la lactone.

Cette étape d'ortholithiation s'est avérée particulièrement critique et faiblement reproductible. Les rendements obtenus dans les mêmes conditions sont très variables, pouvant aller de 33 % à 79 %.

Ceux-ci sont particulièrement influencés par les quantités de matériel engagé sans toutefois pouvoir dégager de tendance franche ainsi que par l'état du *sec*-BuLi employé. L'utilisation d'un lot de *sec*-BuLi récemment ouvert, s'est montrée particulièrement importante, ce dernier ayant tendance à se dégrader rapidement, entraînant une chute des rendements de réaction. Les mêmes réactions réalisées par plusieurs expérimentateurs différents ont conduit aux mêmes résultats aléatoires.

Des essais ont été réalisés en remplaçant le *sec*-BuLi par le *tert*-BuLi employé par Gonnot *et al.* Cependant, la très forte réactivité de ce dérivé lithien a entraîné la formation de produits de dégradation supplémentaires faisant chuter les rendements par rapport à ceux obtenus avec le *sec*-BuLi. Ce dernier présente en outre, moins de contraintes de manipulation et de risques liés à son utilisation.

Des dérivés pipéridine (**260**) et diisopropyle (**261**) du benzamide ont été synthétisés pour étudier l'influence de l'encombrement stérique sur l'étape d'ortholithiation, ceci dans le but d'essayer d'augmenter le rendement de la synthèse de la lactone (**232**). Les conditions employées sont les mêmes que pour la synthèse du N,N-diéthylbenzamide (**233**) engagé précédemment dans la réaction d'ortholithiation. Les dérivés N-pipéridyl (**260**) et N,N-diisopropylbenzamide (**261**) ont été obtenus avec des rendements de 98 et 94 % respectivement.

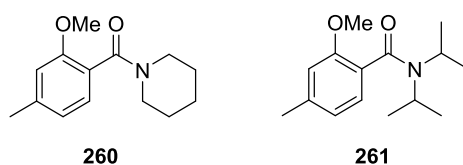


Figure 122 : Dérivés N-pipéridyl- et N,N-diisopropyl-2-méthoxy-4-méthylbenzamide.

L'étape d'ortholithiation réalisée avec les dérivés N-pipéridyl (**260**) et N,N-diisopropylbenzamide (**260**) a permis d'obtenir la lactone (**232**) avec respectivement des rendements de 45 et 32 %.

Le recours à des dérivés benzamides encombrés ne permet donc pas de favoriser de façon notable les rendements de la réaction par rapport à l'utilisation du dérivé N,N-diéthyl (**233**).

2.3.3 Réduction de la lactone en acide 2-benzylbenzoïque

Pour cette réaction, deux conditions réactionnelles de réduction sont principalement décrites dans la littérature en faisant appel soit à une réduction par le zinc métallique, soit à une étape d'hydrogénation catalytique.

2.3.3.1 Réduction par le zinc métallique

La première consiste à réduire la lactone (**232**) par le zinc métallique dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 10 % à reflux^{292,302,304} (Schéma 13).

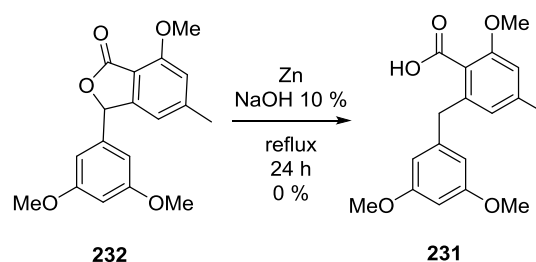


Schéma 13 : Tentative de réduction de la lactone au zinc.

Cette première stratégie de réduction a été tentée sans succès. Les réductions au zinc métallique sont assez délicates du fait du recouvrement rapide de ce métal par une couche inerte d'oxyde. Pour éliminer cette couche d'oxyde, un traitement à l'HCl concentré suivi d'étapes de lavage peut être effectué afin d'activer la surface de la poudre de zinc. Ce traitement ne s'est cependant pas montré efficace pour réduire la lactone (**232**). Aucun signe de conversion du produit de départ après 24 h de chauffage à reflux n'a pu être observé.

Une autre façon d'activer le zinc métallique est de l'amalgamer au cuivre.

Cette forme de zinc activée a été utilisée par Watanabe *et al.* pour effectuer la réduction de la lactone dans la synthèse de l'émodine²⁹³.

Ce couple cuivre-zinc, qui est parfois considéré comme un alliage, est disponible à l'achat. Cependant, il est conseillé de le préparer extemporanément pour éviter une perte de réactivité due à son oxydation. Plusieurs méthodes pour obtenir ce couple zinc-cuivre sont décrites³⁰⁵.

Celle décrite par Brandsma³⁰⁶ consiste à décaper en premier lieu la surface du zinc par une solution d'HCl concentrée. Cette étape est suivie de plusieurs lavages à l'eau distillée avant de placer la poudre de zinc en suspension dans une solution de CuSO₄. La poudre noire ainsi obtenue est rincée avec de l'eau distillée puis de l'éthanol absolu avant d'être engagée dans la réaction.

Les tentatives de réduction de la lactone (**232**) avec ce complexe de zinc-cuivre activé dans les mêmes conditions que celle utilisées précédemment ne s'est pas non plus montrée efficace, aucune trace de conversion n'ayant pu être observée après 24h de réaction.

2.3.3.2 Réduction par hydrogénation catalytique

Une méthode de réduction alternative au palladium par hydrogénation catalytique est également décrite par De Silva *et al.*³⁰⁷ puis reprise dans des publications ultérieures sur différents substrats^{303,308,309}. Elle consiste à dissoudre la lactone (**262**) dans l'acide acétique avec 10 % m/m de Pd/C et de la faire réagir pendant 6 heures à 80°C en présence de dihydrogène à pression atmosphérique (Schéma 14). Cette méthode permet d'obtenir l'acide attendu (**263**) avec de très bons rendements.

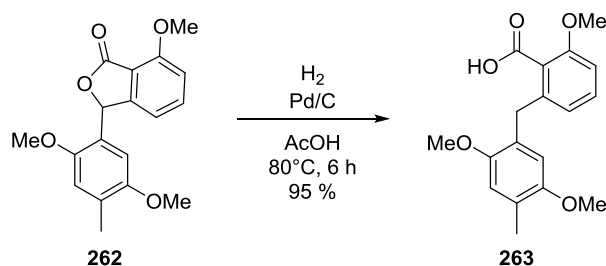


Schéma 14 : Hydrogénation catalytique de la lactone **262**³⁰⁷.

Un premier essai dans ces conditions ne s'est pas montré fructueux avec une absence totale de conversion de la lactone (**232**) en acide (**231**) (Entrée 1). D'autres conditions réactionnelles ont été testées afin de déterminer celle qui pouvait s'avérer la plus efficace (Tableau 17).

Tableau 17 : Étude des conditions de réduction de la lactone

Entrée	Solvant	Catalyseur	H ₂	Température	Durée	Conversion
1	AcOH	Pd/C 10 % m/m	14 atm	90°C	6h	0 %
2	AcOEt	Pd(OH) ₂ 20 % m/m	1 atm	ta	20 h	0 %
3	AcOEt	Pd(OH) ₂ 20 % m/m	5 atm	ta	22h	0 %
4	AcOH	Pd/C 10 % m/m	1 atm	Reflux (118°C)	22h	incomplète
5	MeOH	Pd(OH) ₂ 20 % m/m	5 atm	ta	6h	98 %

Le remplacement du palladium sur charbon par le catalyseur de Pearlman dans l'acétate d'éthyle sous une atmosphère d'hydrogène sur 20 h n'a pas non plus montré le moindre signe de conversion (Entrée 2). Ces mêmes conditions mais sous une pression de 5 atm n'ont pas donné de résultats plus satisfaisants (Entrée 3). Les conditions initialement décrites mais en utilisant du dihydrogène à pression atmosphérique et en chauffant la réaction à une température plus élevée et sur une durée plus importante a permis d'observer un début de conversion (Entrée 4).

Enfin, la réaction de réduction de la lactone (**232**) s'est montrée quasiment quantitative en présence du catalyseur de Pearlman, dans le méthanol sous 5 atmosphères d'H₂ en 6 h. Un tel rendement nécessite néanmoins une charge en catalyseur importante (20 % m/m) (Entrée 5) (Schéma 15).

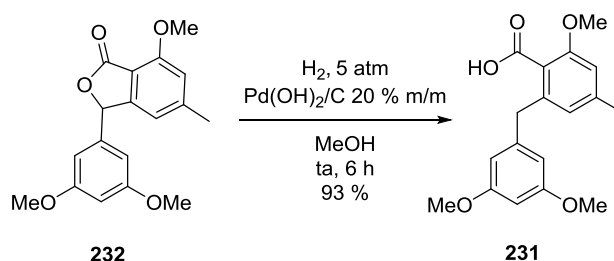


Schéma 15 : Réduction de la lactone par hydrogénation catalytique.

La lactone de départ (**232**) n'est pas soluble dans le méthanol contrairement à l'acide formé (**231**). C'est pourquoi il est nécessaire de ne pas réaliser la réaction en solution trop concentrée ($\leq 0,05$ M) au risque de voir baisser le rendement.

2.3.4 Synthèse de la triméthoxyémidine (**249**)

La cyclisation intramoléculaire de l'acide *o*-benzylbenzoïque obtenu (**231**) est réalisée par une acylation douce de Friedel et Crafts à l'aide d'anhydride trifluoroacétique. A l'issue de cette réaction, un mélange de produits caractérisés en RMN ^1H du brut comme étant l'anthrone attendue (**264**) ainsi que son adduit trifluoroacétique (**265**) déjà caractérisé par Falk³⁰³ sont obtenus (Schéma 16).

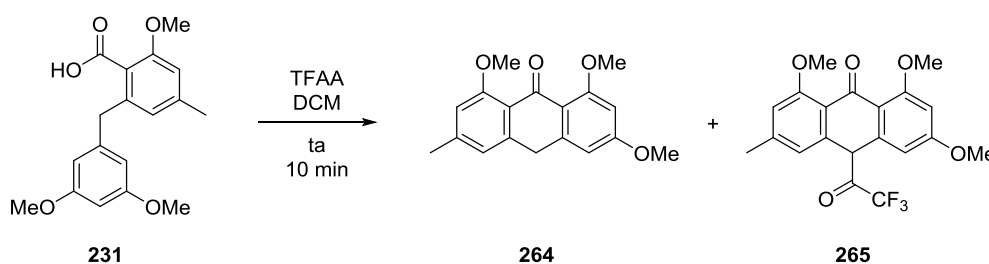


Schéma 16 : Acylation de Friedel et Crafts de l'acide benzylbenzoïque.

Le dérivé trifluoroacétique peut être obtenu majoritairement lorsque l'anhydride est utilisé en excès, néanmoins, il est toujours présent comme coproduit de réaction même lorsqu'un seul équivalent d'anhydride est employé. Ce dernier peut être aisément clivé en milieu acide³⁰³.

La formation de cet adduit peut s'expliquer selon le mécanisme réactionnel suivant (Figure 123) :

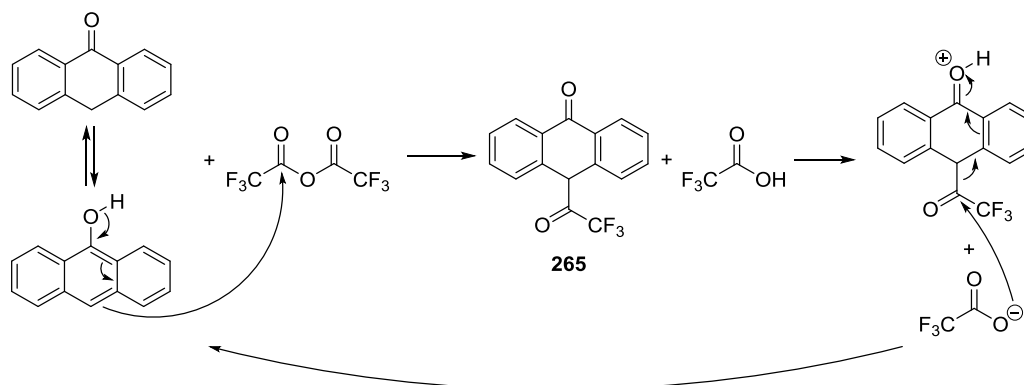


Figure 123 : Mécanisme de formation de l'adduit trifluoroacétique.

Le mélange des deux formes anthrones (**264**) et dérivé trifluoroacétique (**265**) ne nécessite pas nécessairement de purification intermédiaire et peut également être directement engagé dans la réaction d'oxydation suivante.

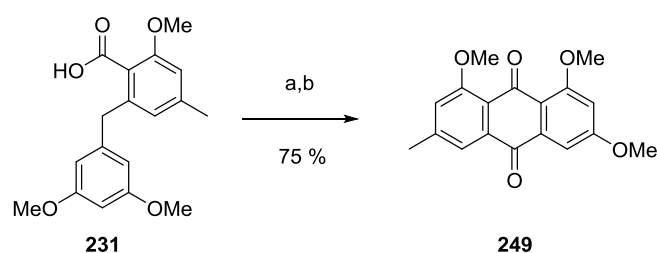
Différentes conditions d'oxydation de l'anthrone ont été décrites : Oxydation à l'air libre en solution dans le DMSO en présence d'une base (tBuOK)³⁰⁹, au CrO₃ dans l'acide acétique^{292,307} ou en solution à l'aide de CuBr₂ sous atmosphère d'O₂³¹⁰.

Lors de la purification de la réaction, la forme anthraquinone (**249**) a été formée par oxydation de l'anthrone (**264**) au contact de la silice.

Une méthode d'oxydation alternative et simple a donc été développée à partir de cette observation. Celle-ci consiste à adsorber le résidu obtenu suite à la réaction d'acylation précédente [et contenant donc un mélange des 2 formes : anthrones (**264**) et dérivé trifluoroacétique (**265**)] sur la silice et le laisser sous agitation sous une atmosphère d'O₂ pendant 24h. L'acidité de la silice permet en outre de cliver l'adduit trifluoroacétique formé lors de l'étape de cyclisation.

Il suffit ensuite de rincer le milieu réactionnel solide sur une faible épaisseur de silice, à l'aide d'un mélange DCM/MeOH 90:10 v/v. La réaction conduit en effet au seul dérivé triméthoxyémidine et ce dernier a tendance à se dégrader au contact prolongé de la silice humide (**249**).

La triméthoxyémidine est donc ainsi obtenue avec un rendement de 75 % sur les 2 étapes d'acylation et d'oxydation (Schéma 17).



a) TFAA, DCM, ta, 10 min; b) : SiO₂, O₂, ta, 12 h

Schéma 17 : Synthèse de la triméthoxyémidine (249).

2.3.5 Déprotection de l'émodine

Les différentes positions méthylées de la triméthoxyémodine présentent des réactivités distinctes qui ont été mises à profit dans des réactions de déprotection sélectives.

Ainsi, la déprotection de la triméthoxyendocrocine (**266**), un dérivé carboxylique de l'émodine (**13**) par BBr_3 dans le dichlorométhane à basse température (-5°C à 5°C en 30 min) conduit à la formation du dérivé monodéprotégé (**267**). En présence d'un large excès de BBr_3 dans le dichlorométhane à reflux pendant 10 h, on observe une déprotection de l'ensemble des groupements méthoxy conduisant ainsi à l'endocrocine (**269**). Enfin, dans un mélange HBr/AcOH à reflux pendant 30 min, on observe la déprotection des deux méthoxy adjacents au carbonyle (**268**)³¹¹ (Schéma 18).

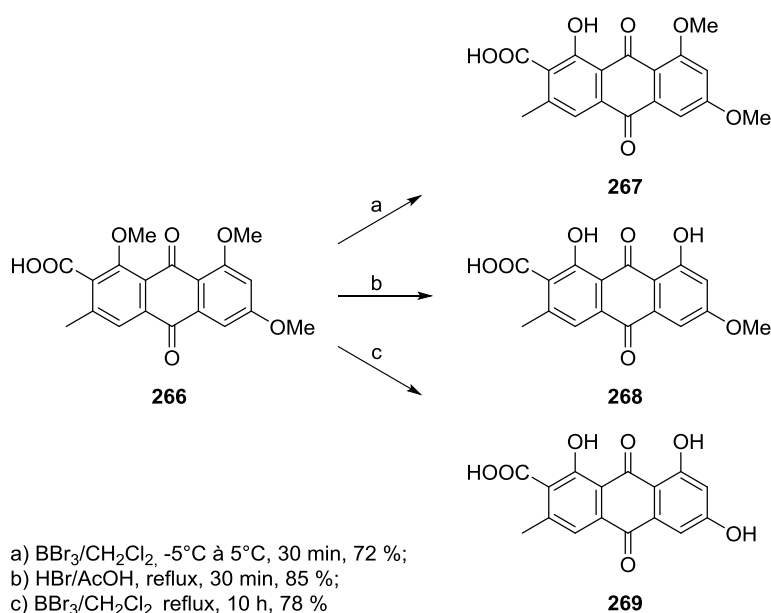


Schéma 18 : Déprotection sélective de la triméthoxyendocrocine (**266**)³¹¹.

Les tentatives de déprotection de la triméthoxyémodine (**249**) par un large excès de BBr_3 dans le DCM à reflux pendant 24 h se sont montrées inefficaces, conduisant à un mélange de produits partiellement déprotégés.

Une alternative consiste à chauffer l'antraquinone méthoxylée à reflux dans l'acide acétique en présence d'acide bromhydrique concentré³⁰² (Schéma 19).

Cette étape de déprotection a permis d'obtenir l'émodine (**13**) à partir de la triméthoxyémodine (**249**) avec un rendement de 88 %.

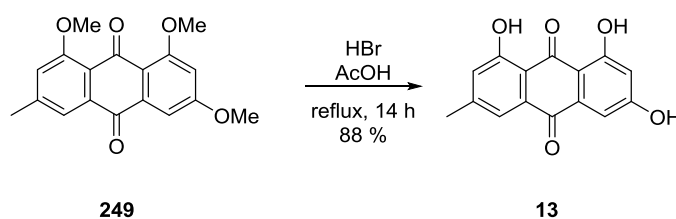


Schéma 19 : Déprotection de la triméthoxyémodine (**249**).

Des essais de déprotection faisant toujours intervenir l'acide bromhydrique mais par chauffage au micro-onde à 150°C pendant 1 h pour essayer de réduire le temps de réaction ont permis d'obtenir le produit de déprotection souhaité (**13**) mais avec des rendements plus faibles de l'ordre de 50 à 60 %, en mélange avec le produit monométhylé (**29**) présent sous forme minoritaire.

Des conditions de réactions plus douces (chauffage à 100°C sous irradiations μW pendant 30 min) ont alors été mises en œuvre de manière à obtenir exclusivement le dérivé 3-O-méthylé (**29**) afin de pouvoir tester son activité antiparasitaire (Schéma 20).

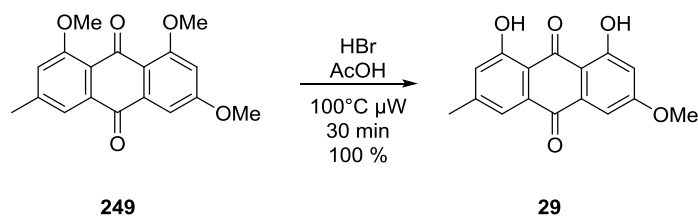


Schéma 20 : Synthèse du physcion (**29**).

L'utilisation de l'acide iodhydrique à la place de l'acide bromhydrique conduit à l'obtention de l'anthrone déprotégée (**139**) (Schéma 21). Le potentiel standard du couple I_2/I^- , $E^\circ (\text{I}_2/\text{I}^-) = 0,5 \text{ V}^{312}$ est suffisamment faible pour réduire l'anthraquinone (**13**) en anthrone (**139**). Le potentiel standard du couple Br_2/Br^- , $E^\circ (\text{Br}_2/\text{Br}^-) = 1,1 \text{ V}^{312}$ étant trop élevé, il n'est pas capable d'effectuer cette réduction. Cette propriété a été décrite par Falk *et al.* pour réaliser la déprotection de la triméthoxyémodyne anthrone (**264**) en évitant l'oxydation en anthraquinone (**13**)³⁰³.

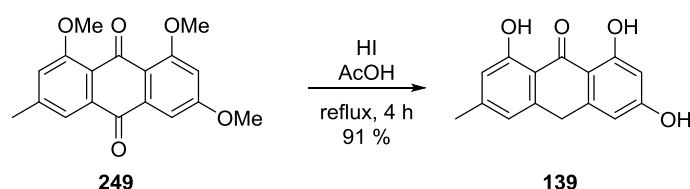


Schéma 21 : Synthèse de l'émodyne anthrone (**139**).

2.3.6 Conclusion

Cette stratégie de synthèse a permis d'accéder au noyau émodine (**13**). Huit étapes successives à partir de l'acide 2-hydroxy-4-méthylbenzoïque (**256**) ont été nécessaires afin d'obtenir l'anthraquinone souhaitée (**13**) avec un rendement global allant de 15 à 30 %. Ce rendement est inconstant, essentiellement du fait de la variabilité de l'étape d'ortholithiation conduisant à la formation de la lactone. La plupart des étapes de synthèse, bien que décrites dans la littérature pour des structures analogues, ont nécessité une optimisation des conditions réactionnelles, rendant l'accès à cette molécule plus complexe que ce qui avait été envisagé initialement.

L'émodyne (**13**) ainsi disponible à hauteur de plusieurs centaines de milligrammes, les conditions d'obtention des dérivés alkylés d'intérêt ont pu être étudiées et font l'objet du point suivant.

3 Alkylation de l'émodine

3.1 Alkylation par réaction avec un dérivé halogéné

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'obtention de dérivés alkylés sur l'hydroxyle en position 3 par différents types de substituants, afin d'évaluer leur rôle sur l'activité antiprotozoaire et la sélectivité des molécules.

L'alkylation sélective de l'émodine en position 3 a été décrite par Bruyère *et al.*³¹³ en utilisant une base encombrée comme le DBU d'après les conditions mises au point par Genovese *et al.*³¹⁴ sur différents dérivés de nature phénolique. Les conditions décrites consistent à mettre en solution le dérivé phénolique dans l'acétone, d'ajouter le DBU afin de déprotoner sélectivement la position la moins encombrée, puis de faire réagir le phénolate ainsi obtenu avec un dérivé bromé sur 24 h à température ambiante (Schéma 22). Ces conditions leur ont permis de synthétiser la madagascine (**5**) et la 3-géranxyloxyémodyne (**12**) respectivement avec des rendements de 59 et 54 %.

La position 3 est la plus réactive, d'une part car c'est la moins encombrée, mais également du fait de la présence de liaisons hydrogènes entre le carbonyle en position 9 et les deux hydroxyles adjacents. Des calculs de DFT ont montré que l'énergie de dissociation de la liaison O-H de l'hydroxyle en position 3 était d'environ 41 et 37 kJ.mol⁻¹ plus faible que celles des hydroxyles, respectivement en position 1 et 8³¹⁵.

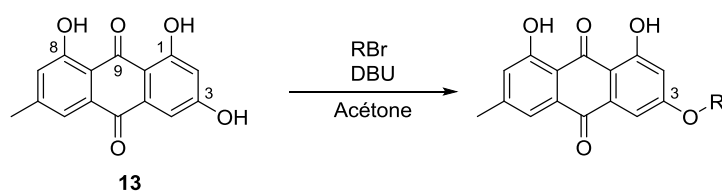


Schéma 22 : Alkylation sélective de l'émodine en position 3.

La mise en œuvre de ces conditions (Tableau 18) a permis d'obtenir la madagascine (**5**) avec 31 % de conversion après 4 h de réaction à température ambiante (Entrée 1) et 56 % après 72 h (Entrée 2).

Différents paramètres de la réaction ont été testés afin d'améliorer le rendement de la réaction.

L'essai réalisé avec d'autres alcanes bromés (2 équivalents de bromoalcane pour 1 équivalent de DBU) s'est avéré moins concluant. Après réaction prolongée à température ambiante (65 h et 94 h), le suivi par CCM de la réaction d'alkylation de l'émodine en position 3 par le 1-bromobutane et le 1-bromooctane a seulement montré de faibles traces de conversion (Entrées 3 et 5). Le chauffage du milieu réactionnel au micro-onde à 100°C pendant 30 min a permis d'augmenter le pourcentage de conversion et d'obtenir les dérivés 3-O-butylémodyne (**270**) et 3-O-octylémodyne (**271**) avec respectivement des rendements de 45 et 55 % (Entrées 4 et 6). L'augmentation du temps de chauffage de la réaction de 30 min à 1 h a permis d'améliorer le rendement passant de 45 à 71 % pour la 3-O-octylémodyne (**271**) (Entrée 7).

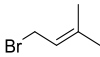
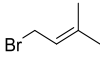
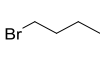
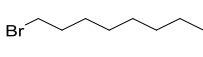
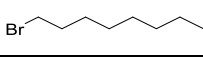

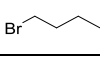
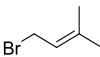
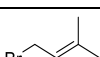
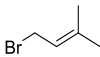
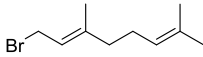
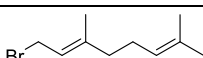
Les conditions réactionnelles ainsi optimisées ont permis d'obtenir les dérivés souhaités avec des rendements supérieurs à 70 %, qu'il s'agisse des réactifs 1-bromo-2-méthylpropane (Entrée 8) ou 1-bromobutane (Entrée 9).

Le rendement pour le dérivé 1-bromo-3-méthylbut-2-ène étant inférieur, de l'ordre de 60 % (Entrée 10), nous avons étudié la modification du nombre d'équivalents des réactifs. En passant d'un équivalent de réactif et de base à 3 équivalents de chaque (Entrée 11), le rendement de la réaction d'alkylation a chuté, ce qui s'explique par l'alkylation non sélective des autres positions, aboutissant à la formation de dérivés di et trialkylés. En utilisant 2 équivalents de dérivé bromé et de base, un rendement similaire à celui obtenu pour les différentes chaînes alkyles, de l'ordre de 75 % (Entrée 12) a pu être atteint.

Dans le cas de la synthèse du dérivé 3-géranxyloxyémidine (**12**), le rendement est néanmoins un peu moins bon avec seulement 53 % de conversion (Entrée 14). Cette baisse du rendement est probablement due à une dégradation partielle du bromure de géranyle dans les conditions employées. Le résultat obtenu reste néanmoins équivalent à celui décrit par Bruyère *et al.*³¹³.

Avec seulement un équivalent de base et de réactif, le rendement était également bien inférieur qu'avec le bromure de prényle dans les mêmes conditions, avec seulement 34 % de conversion (Entrée 13).

Tableau 18 : Conditions réactionnelles d'alkylation de l'émidine.

	Réactif	DBU	Temps de réaction	Conditions	Conversion mono alkylé	Conversion di et trialkylé	
1		1 éq	1 éq	4h	ta	5 31 %	0 %
2		1 éq	1 éq	72 h	ta	5 56 %	0 %
3		2 éq	1 éq	65 h	ta	270 traces	0 %
4				puis 30 min	μW 100°C	270 55 %	0 %
5		2 éq	1 éq	94 h	ta	271 traces	0 %
6				puis 30 min	μW 100°C	271 45 %	0 %
7		2 éq	1 éq	1 h	μW 100°C	271 71 %	0 %
8		2 éq	1 éq	1 h	μW 100°C	272 76 %	0 %
9		2 éq	2 éq	1 h	μW 100°C	270 72 %	0 %
10		1 éq	1 éq	1 h	μW 100°C	5 63 %	0 %
11		3 éq	3 éq	1 h	μW 100°C	5 43 %	12 %
12		2 éq	2 éq	1 h	μW 100°C	5 75 %	1 %
13		1 éq	1 éq	1 h	μW 100°C	12 34 %	0 %
14		2 éq	2 éq	1 h	μW 100°C	12 53 %	4 %

Ces conditions de synthèse ont permis d'obtenir cinq anthraquinones 3-O-alkylées qui permettront d'étudier l'influence de la substitution en position 3 (Figure 124):

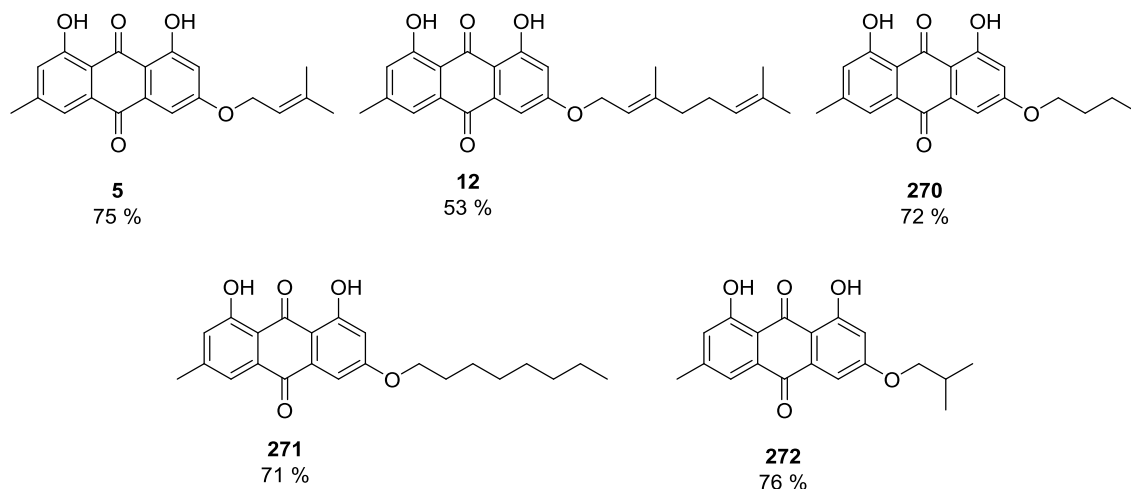


Figure 124 : Anthraquinones 3-O-alkylées synthétisées.

3.2 Alkylation par réaction avec un dérivé tosylé

Le dérivé 3-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthoxyémidine (**274**) a été synthétisé dans l'optique d'en faire un outil pharmacologique. En effet, s'il présente une activité biologique intéressante, il pourra ensuite être envisagé de le coupler par chimie click grâce à la fonction azide terminale du bras espaceur.

Le couplage à un fluorophore de type BODIPY par exemple pourra être réalisé afin d'observer, en microscopie de fluorescence, si la molécule a tendance à s'accumuler dans un compartiment subcellulaire et orienter ainsi des hypothèses concernant son mécanisme d'action.

Ce dérivé pourra également être fixé à la surface de billes d'agarose fonctionnalisées pour réaliser une chromatographie d'affinité d'un lysat parasite et ainsi envisager d'isoler la ou les potentielles cibles de la molécule.

Selon la même méthodologie, l'émodine (**13**) a pu être alkylée par un dérivé 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthyle tosylé (**273**) avec un rendement de 77 %, comparable à ceux obtenus pour les dérivés bromés (Schéma 23).

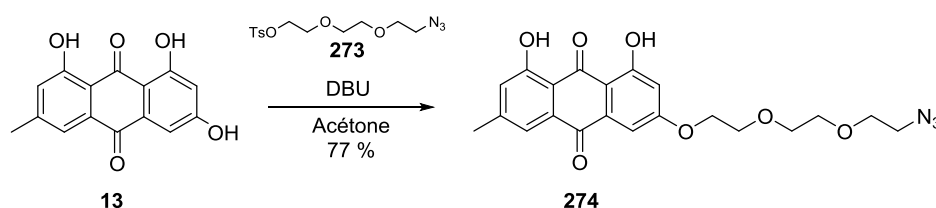


Schéma 23 : Synthèse de l'anthraquinone PEGylée **274**.

Le dérivé 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthyle tosylé (**273**) est obtenu en deux étapes à partir du 8-chloro-3,6-dioxaoctanol commercial (**275**)³¹⁶. Ce dernier réagit avec l'azoture de sodium en présence de NaI dans l'éthanol à reflux pour donner l'azide (**276**). Une étape de tosylation permet d'obtenir le dérivé 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthyle tosylé (**273**) avec un rendement global de 83 % (Schéma 24).

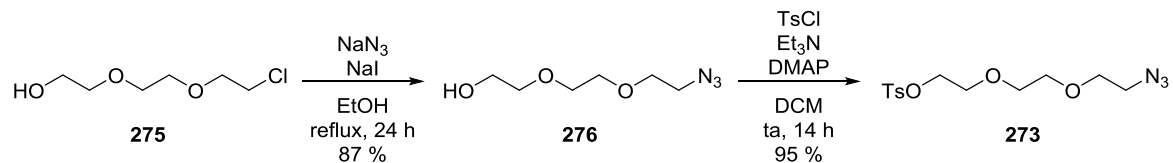


Schéma 24 : Synthèse du dérivé 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthyle tosylé **273**.

3.3 Alkylation par réaction de Mitsunobu

Des alkylations par réaction de Mitsunobu ont également été réalisées (Schéma 25) afin de voir si cette réaction pouvait se montrer sélective de l'hydroxyle en position 3 et si les rendements d'alkylation pouvaient être améliorés.

La 3-O-octylémodyne (**271**) ainsi que la 3-O-isobutylémodyne (**272**) ont ainsi pu être synthétisées par réaction de l'octan-1-ol et du 3-méthylbutan-1-ol sur l'émodine avec des rendements respectifs de 65 % et 61 %, relativement comparables à ceux obtenus par la réaction des dérivés bromés ou tosylés (Schéma 25).

Cette stratégie pourrait s'avérer intéressante par la suite s'il était nécessaire de fixer un substituant particulier doté d'une fonction alcool ou si certains halogénures d'alkyles se montraient peu réactifs.

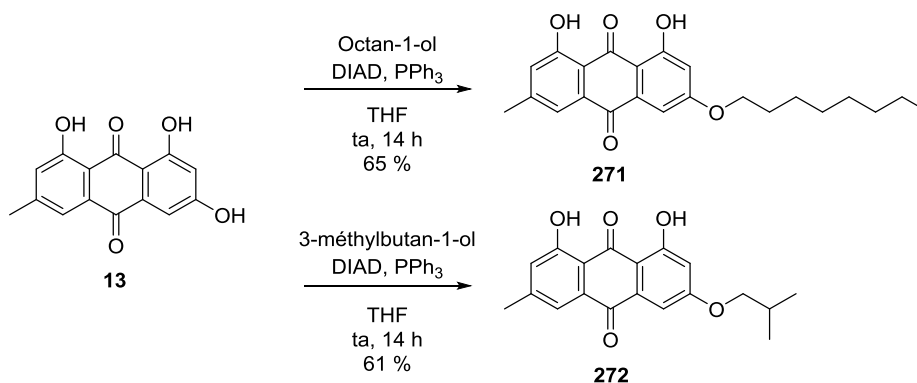


Schéma 25 : Alkylation de la position 3 par réaction de Mitsunobu.

Ces anthraquinones synthétiques, bien qu'à priori moins actives que leurs analogues anthrones et vismiones ont également été évaluées pour leurs activités antiprotozoaires (paragraphe 3.2, p 207).

4 Synthèse de la 6-desméthylémodyne

Pour déterminer l'intérêt de la fonction méthyle en position 6 sur les activités antiprotozoaires et indices de sélectivité des anthraquinones et anthrones naturelles préalablement isolées, une série non méthylée en position 6 a été synthétisée selon les conditions optimisées précédemment (Schéma 26).

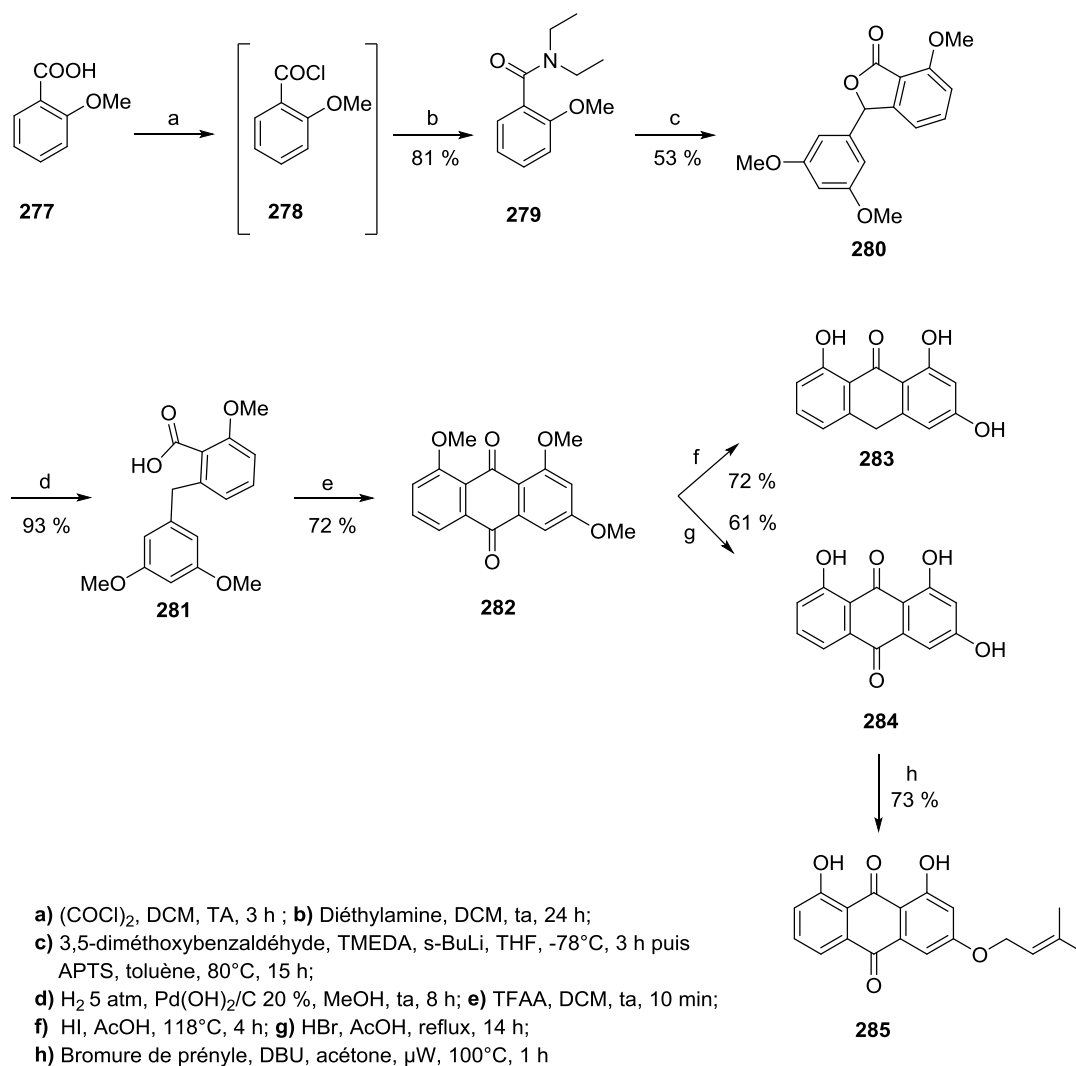


Schéma 26 : Synthèse des analogues 6-déméthylés de l'émodine.

L'absence du méthyle n'a pas d'impact important sur les rendements des différentes réactions. Le benzamide (**279**) est synthétisé à partir de l'acide commercial de départ (**277**) via le chlorure d'acide (**278**) avec un rendement de 81 %. L'acide commercial contenant des traces d'une impureté, le benzamide a dû être purifié par chromatographie sur colonne de silice engendrant un rendement légèrement inférieur à celui obtenu pour l'analogue méthylé. La lactone (**280**) est synthétisée par réaction d'ortholithiation entre le benzamide (**279**) et le 3,5-diméthoxybenzaldéhyde suivie d'une étape de cyclisation à reflux dans le toluène en présence d'APTS avec un rendement de 53 %, comparable à la moyenne de ceux obtenus pour le dérivé méthylé. L'étape d'acylation suivie de l'oxydation par adsorption sur silice sous atmosphère d'O₂ a permis d'obtenir la

6-desméthyltriméthoxyémordine (**282**) avec un rendement de 72 %. Les étapes de déprotection à l'acide iodhydrique d'une part et à l'acide bromhydrique d'autre part ont permis d'obtenir la 6-desméthylémordine anthrone (**283**) et la 6-desméthylémordine (**284**) avec des rendements de 72 et 61 %, respectivement. La 6-desméthylémordine a ensuite été alkylée en position 3 par le bromure de prényle avec un rendement de 73 %.

Les molécules (**282** à **285**) ainsi obtenues ont été testées pour évaluer leur activité antiprotozoaire et ainsi mettre en évidence l'effet de la substitution par un méthyle en position 6 sur les activités biologiques (paragraphe 3.2, p 207).

5 Synthèse d'antrones 3-O-alkylées

La synthèse d'antraquinones 3-O-substituée étant effective, le développement d'une méthodologie de réduction est nécessaire afin d'obtenir les anthrones d'intérêt correspondantes.

5.1 Tentatives de réduction des anthraquinones 3-O-alkylées en anthrones

Les anthrones s'étant révélées plus actives que les anthraquinones à la fois sur *Leishmania* et *Plasmodium* au cours des investigations préliminaires, la réduction des anthraquinones alkylées a donc été envisagée.

En se basant sur les données de la littérature, différentes réactions de réduction ont été testées :

5.1.1 Conditions de réduction décrites dans la littérature

5.1.1.1 Réduction par le dithionite de sodium

Kuttruf *et al.* décrivent la réduction d'une 1,4 anthraquinone (**286**) en utilisant le dithionite de sodium²⁷⁹. Afin de contourner les problèmes de solubilités respectives de l'antraquinone et du réducteur, le milieu réactionnel est constitué d'un mélange de chloroforme, d'acétone et d'eau et la réaction est réalisée sous sonication de manière à permettre le contact entre le substrat et le réactif.

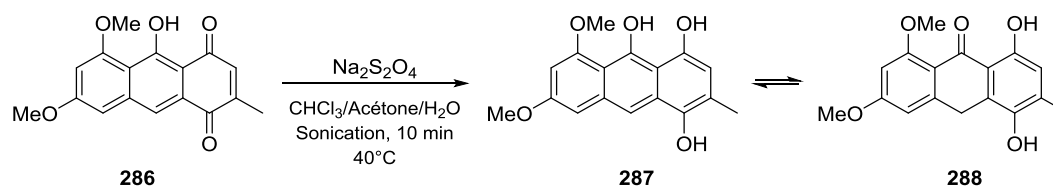


Schéma 27 : Réduction d'une 1,4 anthraquinone par le dithionite de sodium²⁷⁹.

L'anthrone désirée (**288**) est dans ce cas présente en équilibre avec sa forme tautomère (**287**). Ces deux formes en équilibre sont par ailleurs décrites comme très promptes à la réoxydation en anthraquinone. Ceci ne permet pas de les isoler et de les conserver sous atmosphère ambiante et nécessite de les engager immédiatement dans une séquence réactionnelle ultérieure. Ce paramètre

s'avère problématique dans notre cas puisque l'anthrone correspond au produit final que nous souhaitons isoler.

L'utilisation du dithionite de sodium est également décrite par Prinz *et al.* pour la réduction d'une série de 9,10-anthraquinones (Schéma 28)²⁷⁷. Cette fois-ci, le milieu réactionnel utilisé est constitué d'un mélange de DMF et d'eau pour contourner les problèmes de solubilité.

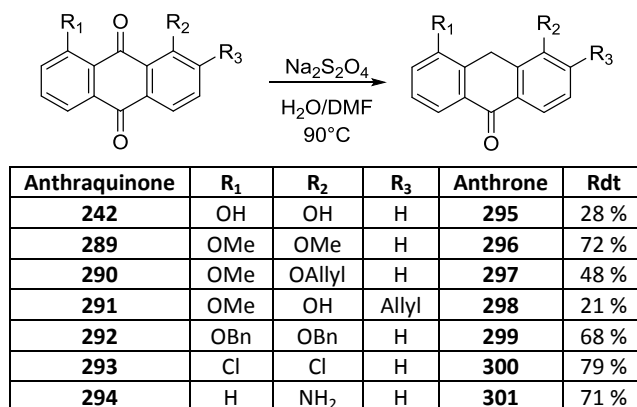


Schéma 28 : Réduction de 1,8-dihydroxyanthraquinones par le dithionite de sodium²⁷⁷.

Selon Prinz *et al.*, dans ces conditions la réduction de 1,8 dihydroxyanthraquinones par le dithionite de sodium s'effectue préférentiellement sur le carbonyle en position 9, au détriment du carbonyle en position 10²⁷⁷.

5.1.1.2 Réduction par le chlorure d'étain en conditions acides

La réduction d'antraquinones O-alkylées est également décrite en utilisant le chlorure d'étain comme agent réducteur en conditions acides (Schéma 29)^{278,279}. Ces réactions réalisées dans un mélange d'acide acétique et d'HCl avec un chauffage modéré ont permis d'obtenir les anthrones souhaitées (**303** et **305**) avec des rendements supérieurs à 80 %.

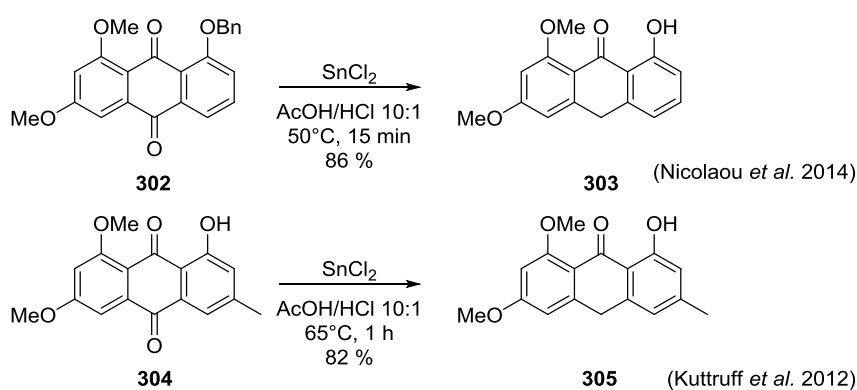


Schéma 29 : Réduction d'une 9,10-anthraquinone par SnCl₂^{278,279}.

Ces conditions semblent toutefois difficiles à maîtriser car le traitement des alkoxy anthraquinones avec des sels d'étain en milieu acide semble aussi provoquer une perte des groupements alkyles³¹⁷.

5.1.1.3 Réduction par le zinc métallique en condition acide

La réduction d'un dérivé 3-O-rhamnopyranosyl de l'émodine (**306**) a été réalisée par Song *et al.* à l'aide de poudre de zinc métallique dans l'acide acétique à 80°C avec un rendement de 73% (Schéma 30)²⁸⁰. Il s'agit de l'une des seules réductions au zinc métallique décrites sur un substrat de type anthraquinone O-alkylée.

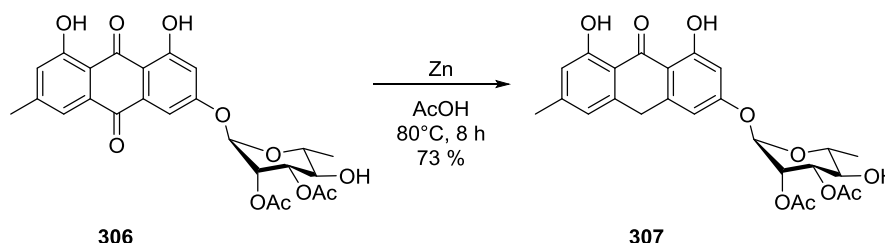


Schéma 30 : Réduction de la 3-O-rhamnopyranosyl-émodine par le zinc métallique²⁸⁰.

5.1.1.4 Réduction par hydrogénation catalytique au palladium

La réduction par hydrogénation catalytique au palladium provoque également l'hydrogénation de la double liaison de la chaîne prényle comme c'est le cas lors de la réduction de la vismiaquinone C (**11**), une molécule naturelle (Schéma 31)³¹⁸. Néanmoins, en cas d'échec des autres conditions de réduction, l'obtention de dérivés anthrones 3-O-alkylés saturés offrirait tout de même un certain nombre de molécules afin d'enrichir les informations de relation structure-activité des dérivés de nature anthrone.

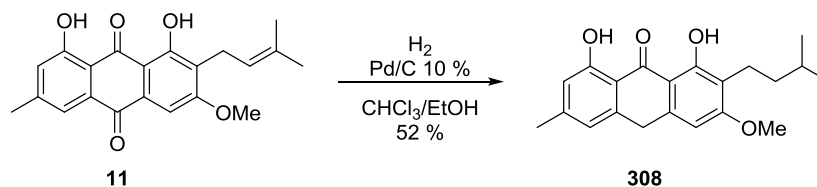
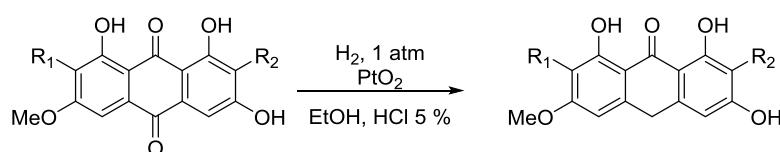


Schéma 31 : Réduction de la vismiaquinone par hydrogénation catalytique au palladium³¹⁸.

La réduction des anthraquinones (**309** et **310**) en anthrones (**311** et **312**) a également été décrite par hydrogénation catalytique à l'oxyde de platine par Cameron *et al.* dans l'objectif de réaliser la synthèse de la stentorine, une naphtodianthrone naturelle. Les anthrones ont ainsi pu être isolées avec de très bons rendements²⁸² (Schéma 32).



309 : R₁ = CH(CH₃)₂, R₂ = H
310 : R₁ = H, R₂ = CH(CH₃)₂

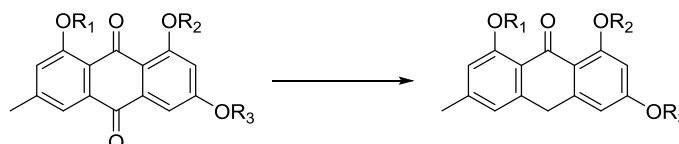
311 : R₁ = CH(CH₃)₂, R₂ = H : 98 %
312 : R₁ = H, R₂ = CH(CH₃)₂ : 94 %

Schéma 32 : Réduction de l'anthraquinone par hydrogénation catalytique à l'oxyde de platine²⁸².

5.1.2 Tentatives de réduction des anthraquinones alkylées

Les différentes conditions décrites dans la littérature ont été testées afin de réduire les anthraquinones 3-O-alkylées précédemment obtenues.

Néanmoins, l'ensemble de ces conditions ont abouti soit à l'absence de conversion, soit à la dégradation du produit de départ (Tableau 19).



Madagascine **5** : R₁ = R₂ = H; R₃ = prényl
 Triméthoxyémordine **249** : R₁ = R₂ = R₃ = CH₃

Tableau 19 : Tentatives de réduction des anthraquinones alkylées en anthrones correspondantes.

Entrée	Réactif	Conditions réactionnelles	Produits
1	Madagascine 5	Na ₂ S ₂ O ₄ , CHCl ₃ /H ₂ O/Acétone, 1 h, sonication, 40°C	Produit de départ
2	Madagascine 5	SnCl ₂ , AcOH, HCl _(conc) , TA, 1 h	Produit de départ (maj) + Réduction de la chaîne alkyle (min)
3	Madagascine 5	SnCl ₂ , AcOH, HCl _(conc) , 65°C, 3 h	Produit de départ (maj) + Émodine (min)
4	Madagascine 5	Zn, AcOH, 80°C, 24 h	Produit de départ
5	Triméthoxyémordine 249	Pd(OH) ₂ /C 20 %, H ₂ , MeOH, TA, 4 h, 1 atm	Produit de départ
6	Triméthoxyémordine 249	PtO ₂ , H ₂ , DCM, HCl _(conc) , TA, 14 h, 1 atm	Produit de départ + produits de dégradation

Le premier essai a été réalisé avec le dithionite de sodium (**Entrée 1**). A la fin de la réaction, le suivi par CCM confirme l'absence de la formation de l'anthrone. La réaction ne fonctionne pas dans ces conditions réactionnelles. Celles proposées Prinz *et al.* aboutissant à la réduction du carbonyle en position 9, engendrent des anthrones de topologie différente des molécules naturelles étudiées²⁷⁷. Ces conditions de réduction n'ont donc pas été approfondies.

Deux tentatives ont été effectuées en utilisant le chlorure d'étain. Lorsque la réaction est effectuée sur une durée d'une heure à température ambiante (**Entrée 2**), on observe par RMN ¹H un mélange de deux produits, la madagascine de départ (**5**, majoritaire) avec de la madagascine dont la chaîne alkyle est saturée, ne permettant pas ainsi d'accéder aux dérivés insaturés souhaités.

Lorsque cette réaction est réalisée par chauffage à 65°C pendant 3 h telle que décrite par Kuttruff *et al.*²⁷⁹ (**Entrée 3**), on obtient majoritairement le produit de départ ainsi qu'un produit minoritaire correspondant à l'émodine (**13**) suite à la rupture de la liaison O-alkyle.

Par ailleurs, l'utilisation de sels d'étain en dernière étape de synthèse n'est pas souhaitable car ceux-ci sont délicats à éliminer lors des étapes de purification et la présence de traces, même infimes, pourrait poser problème pour l'évaluation de l'activité biologique des molécules.

L'utilisation de zinc comme réducteur ne s'est à nouveau pas montrée efficace, les conditions décrites par Song *et al.*²⁸⁰ n'ont pas permis de réduire l'antraquinone alkylée en anthrone correspondante (**Entrée 4**).

La réduction par hydrogénation catalytique au palladium a été réalisée sur la triméthoxyémidine (**249**) (**Entrée 5**). En effet, ces conditions sont très largement susceptibles de provoquer l'hydrogénation de la double liaison de la chaîne prényle en même temps que la réduction de l'antraquinone. Ainsi, afin d'économiser la madagascine (**5**) pour l'étude des conditions de réduction, nous avons utilisé la triméthoxyémidine (**249**), un intermédiaire en amont de sa synthèse, évitant ainsi deux étapes de synthèse supplémentaires.

Les conditions réactionnelles de l'hydrogénation catalytique conduisent vraisemblablement à la formation d'un dérivé réduit qui provoque un changement de couleur du milieu réactionnel au cours de la réaction. Celui-ci passe en effet d'une coloration orangée caractéristique d'une solution d'antraquinone à une coloration jaune. L'intermédiaire formé, ayant tendance à se réoxyder spontanément en quelques minutes, n'est cependant pas suffisamment stable pour permettre d'être isolé, ni même caractérisé.

L'utilisation d'oxyde de platine comme catalyseur sous atmosphère d'hydrogène dans un solvant aprotique n'a pas non plus permis d'obtenir l'antrone correspondante (**Entrée 6**). Une décoloration transitoire du milieu réactionnel a de nouveau pu être observée mais elle a également été suivie d'une réoxydation spontanée rapide, conduisant majoritairement au produit de départ, ainsi qu'à des produits de dégradation minoritaires.

Le noyau émodine anthrone (**139**) pouvant être obtenu lors de la réaction de déprotection en utilisant l'acide iodhydrique (Schéma 21). Une stratégie d'obtention des anthrones alkylées par alkylation directe de l'émodine anthrone (**139**) a été envisagée.

5.2 Alkylation de l'émodine anthrone

5.2.1 Alkylation directe

A notre connaissance, la seule réaction mettant en œuvre l'alkylation d'une anthrone comportant une fonction hydroxyle non protégée est la réaction d'allylation de l'harungine anthrone (**2**) et de l'harunganol B (**313**) décrites par Kouam *et al.* L'allylation de ces deux anthrones par le bromure d'allyle dans l'acétone à reflux en présence de K_2CO_3 entraîne l'obtention des produits de bisallylation (**314** et **315**). En plus de l'allylation de l'hydroxyle en position 3, une C-allylation de la position 10 est également observée³¹⁹ (Schéma 33). La position 10 est en effet également susceptible de se déprotoner de par son caractère dibenzylïque.

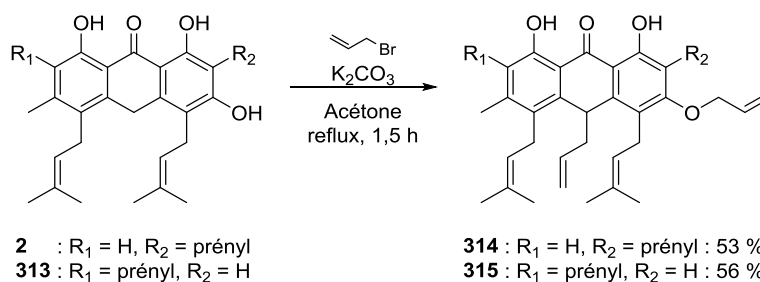


Schéma 33 : Réaction d'allylation de l'harungine anthrone (**2**) et de l'harunganol B (**313**)³¹⁹.

L'essai d'alkylation de l'émodine anthrone (**139**) dans les mêmes conditions que pour l'émodine (**13**) précédemment développées (Partie 3.1) a également mené à la formation d'un produit de bisalkylation (**316**) majoritaire (évalué à 57 % en RMN 1H du brut) mais qui n'a pas pu être isolé suite à sa dégradation lors de sa tentative de purification sur silice (Schéma 34).

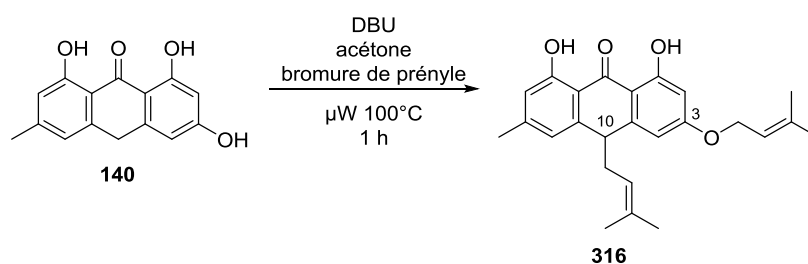


Schéma 34 : Bisalkylation de l'anthrone (**140**).

Afin d'obtenir une alkylation sélective de la position 3, une autre stratégie nécessite d'être développée.

5.2.2 Alkylation suite à la protection de la position 10

Compte-tenu de la réactivité des hydrogènes dibenzyles en position 10, une stratégie de synthèse consistant à protéger, dans un premier temps, les positions 3 et 10 par un dérivé silylé est envisagée. Une seconde étape de déprotection sélective du groupement O-silylé en position 3 en milieu acide permettrait de réaliser l'alkylation de cette position avant de déprotéger la position 10 C-silylée à l'aide d'un donneur d'ions fluorures comme le TBAF (Figure 125).

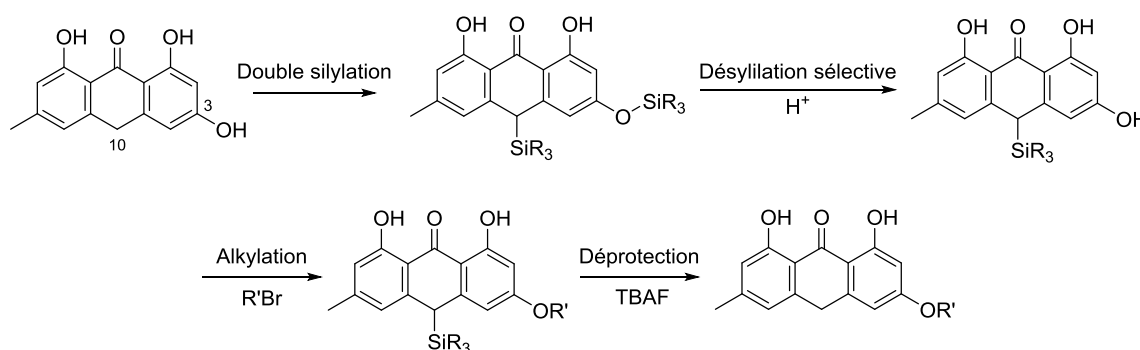


Figure 125 : Alkylation de l'anthrone par stratégie de protection/déprotection.

Tableau 20 : Essais de conditions de silylation de l'émodine anthrone.

Entrée	Réactif	Conditions réactionnelles	Produits
1	Émodine anthrone	DBU, TMSCl, acétone μ W, 100°C, 1 h	Produit de départ
2	Émodine anthrone	NaH, TMSCl, THF 0°C, sonication, 30 min	Produit de départ
3	Émodine anthrone	imidazole, TBDMSCl, THF μ W, 100°C, 1 h	Produit de départ + produit insoluble
4	Émodine anthrone	imidazole, TBDMSCl, DMF μ W, 100°C, 1 h	Produit de départ + 3-OTBDMS-Emodine anthrone

Un premier essai effectué dans les conditions d'alkylation classiques étudiées précédemment en remplaçant le bromoalkyle par un chlorure de triméthylsilane ne permet pas d'obtenir de dérivé silylé, ni sur la position 10 ni sur la position 3 (**Entrée 1**).

Un second essai réalisé dans des conditions de silylation plus classiques avec 5 équivalents de NaH dans le THF n'aboutit pas non plus à l'obtention d'un dérivé silylé. Ceci peut éventuellement s'expliquer par l'instabilité des groupements TMS, il est alors décidé d'utiliser du TBDMSCl afin d'obtenir des dérivés silylés plus stables (**Entrée 2**).

La silylation de l'émodine anthrone (**139**) par le TBDMSCl en utilisant cette fois comme base l'imidazole permet la formation d'un dérivé insoluble qui précipite (**Entrée 3**).

Afin de contourner les problèmes de solubilité des produits de réaction, celle-ci est effectuée dans le DMF. Cette dernière a permis de caractériser la formation d'un dérivé 3-O-TBDMS en RMN ^1H du brut (**Entrée 4**). La très faible solubilité du produit obtenu entraîne d'importantes difficultés au moment de sa purification. De plus, avec ces premières conditions, la silylation est uniquement réalisée sur la position 3-OH alors que l'intérêt était de protéger en priorité la position 10. Ces résultats défavorables n'ont pas incité à poursuivre davantage cette stratégie de synthèse des anthrones alkylées.

6 Synthèse de dihydroanthracénones et des anthrones correspondantes

Compte-tenu de la difficulté à synthétiser les dérivés anthrones substitués et suite à l'observation de la conversion rapide des vismiones naturelles en anthrones correspondantes, une nouvelle stratégie de synthèse a été envisagée.

Cette stratégie repose sur la synthèse des dérivés anthrones souhaités via une oxydation contrôlée des dihydroanthracénones correspondantes (Figure 126). Une telle stratégie permettrait ainsi d'accéder à la fois à de nouvelles dihydroanthracénones synthétiques ainsi qu'à leurs dérivés anthrones dans le but d'évaluer leurs activités biologiques.

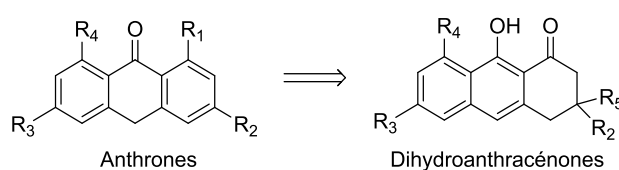


Figure 126 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse d'anthrones à partir des dihydroanthracénones.

6.1 Synthèse du noyau dihydroanthracénone - données de la littérature

Différentes stratégies de synthèse du noyau dihydroanthracénone ont été développées.

Les réactions d'annélation de Hauser et de Staunton-Weinreb sont parmi les plus utilisées.

Les deux reposent sur une réaction d'annélation entre une cyclohexénone (**319**) et un synthon aromatique dipolaire (**318**) suivie d'une étape d'aromatisation du cycle central (Schéma 35).

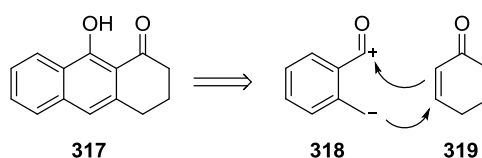


Schéma 35 : Principe des réactions d'annélation de Hauser et de Staunton-Weinreb.

6.1.1 Réaction d'annélation de Hauser

La réaction d'annélation de Hauser fait intervenir un anion stabilisé sous forme de phtalide (Schéma 36, A) qui réagit avec un accepteur de Michael (**319**) en présence d'une base en effectuant une réaction tandem d'addition de Michael suivie d'une cyclisation de Dieckmann³²⁰.

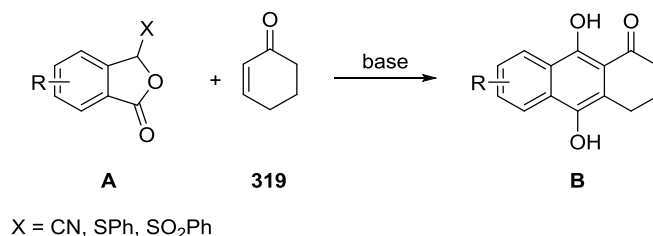


Schéma 36 : Réaction d'annélation de Hauser.

Cette réaction aboutit à la formation d'un nouveau cycle aromatique para-dihydroxylé qui doit généralement être rapidement méthylé pour ne pas engendrer l'anthraquinone correspondante³²⁰⁻³²².

6.1.1.1 Condensation entre un dérivé phtalide sulfone et une cyclohexénone

Hauser *et al.* ont décrit une réaction de condensation entre un dérivé phtalide sulfone (**320**) et une cyclohexénone (**321**) pour former la dihydroanthracénone (**322**)³²¹ (Schéma 37).

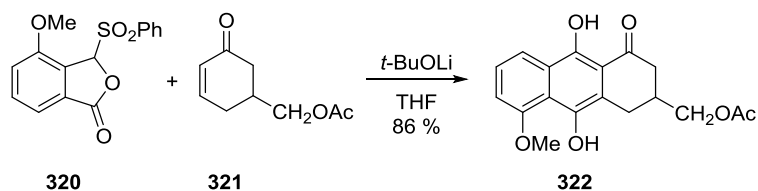


Schéma 37 : Condensation entre un dérivé phtalide sulfone et une cyclohexénone³²¹.

Les dérivés nitriles (**323**) peuvent être utilisés de la même manière³²² (Schéma 38)

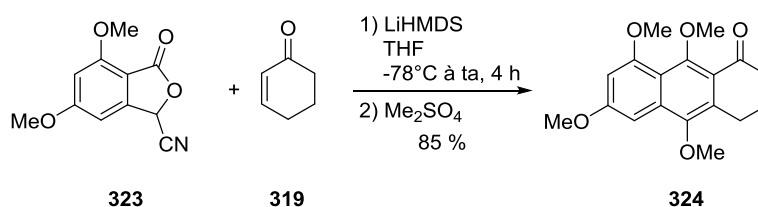


Schéma 38 : Condensation entre un dérivé phtalide nitrile et une cyclohexénone³²².

Cette voie de synthèse est régiosélective et est associée à de bons rendements mais elle conduit nécessairement aux dérivés 9,10-dihydroxydihydroanthracénone.

6.1.1.2 Condensation entre un thiophtalide et une cyclohexénone

Mal *et al.* ont développé des conditions de synthèse du noyau tétrahydroanthracénone par une réaction de cyclocondensation anionique entre des dérivés non plus phthalides mais thiophtalides (**325** et **327**) et des cyclohexénones (**321** et **319**)³²³ (Schéma 39).

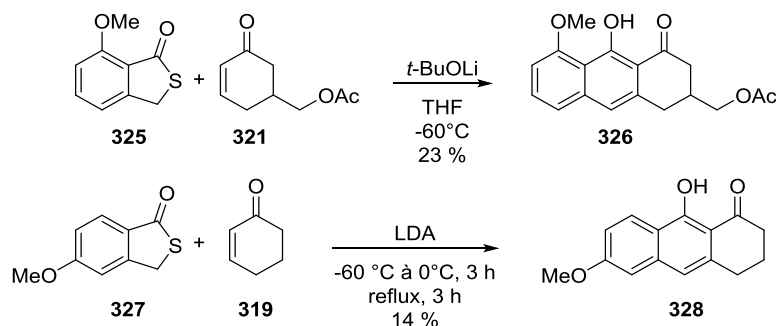


Schéma 39 : Condensation entre un thiophtalide et une cyclohexénone³²³.

Les rendements associés à ces réactions sont particulièrement bas et ne présentent pas de grand intérêt. Cette stratégie nécessite en outre la synthèse des thiophtalides (**325** et **327**) à partir des dérivés *o*-toluate par une étape de bromation benzylique suivie d'un traitement par la thiourée³²⁴.

6.1.2 Réaction d'annélation de Staunton-Weinreb

La réaction d'annélation de Staunton-Weinreb correspond à la condensation d'un ester *ortho*-toluidique (Schéma 40, A) qui joue le rôle de nucléophile sur l'accepteur de Michael (**319**). La réaction est cette fois basée sur une réaction tandem d'addition de Michael suivie d'une cyclisation de Dieckmann/Claisen³²⁰ (Schéma 40).

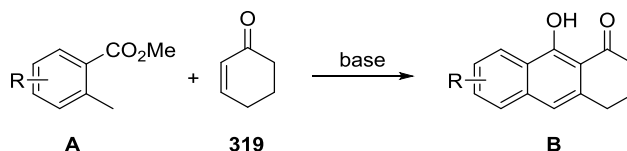


Schéma 40 : Annélation de Staunton-Weinreb.

L'état d'oxydation de l'ester toluidique étant plus faible que celui du phthalide, cette réaction d'annélation conduit à des dérivés naphhtols, contrairement à la réaction de Hauser qui aboutit aux dérivés hydroquinones.

Lorsque la cyclohexénone comporte un groupe partant en position β (**330**), la réaction conduit directement à la dihydroanthracénone (**331**). Lorsque ce n'est pas le cas, la réaction conduit à un composé de nature tétralone (**332**) qui devra être oxydé dans un second temps pour accéder à la dihydroanthracénone (**331**) (Schéma 41).

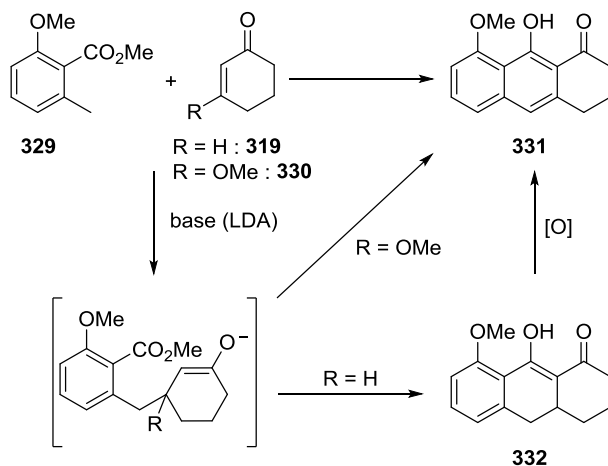


Schéma 41 : Approche de Staunton-Weinreb aboutissant à la synthèse des dihydroanthracénones (331**) et des tétralones (**332**)³²⁰.**

L'utilisation de cyclohexénones ne présentant pas de groupe partant de type β -alkoxy présente également l'inconvénient de polymériser dans les conditions classiques de la réaction d'annélation de Staunton-Weinreb au contact de la diisopropylamine (Figure 127).

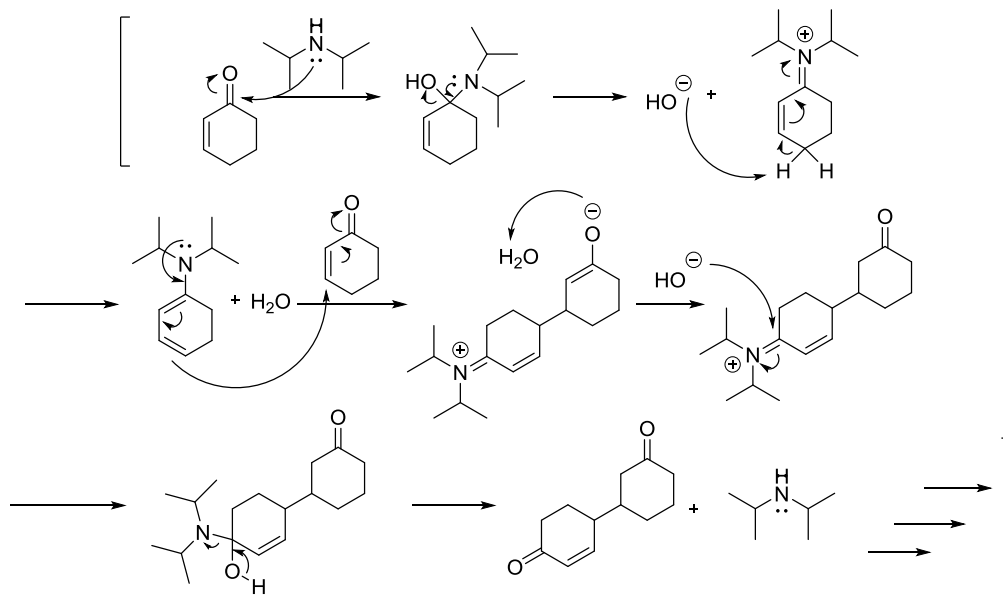


Figure 127 : Polymérisation de la cyclohexénone en présence de diisopropylamine.

Cette polymérisation entraîne une diminution importante des rendements et nécessite l'engagement de quantités plus importantes de cyclohexénone ce qui peut s'avérer problématique dans le cas de cyclohexénones chirales complexes à synthétiser.

Hill *et al.* proposent une modification de la réaction d'annélation de Staunton-Weinreb en générant l'anion *o*-toluate par une réaction de transmétallation lithium-étain à partir du dérivé tributylstannane correspondant (**333**) selon la séquence suivante³²⁵ (Schéma 42) :

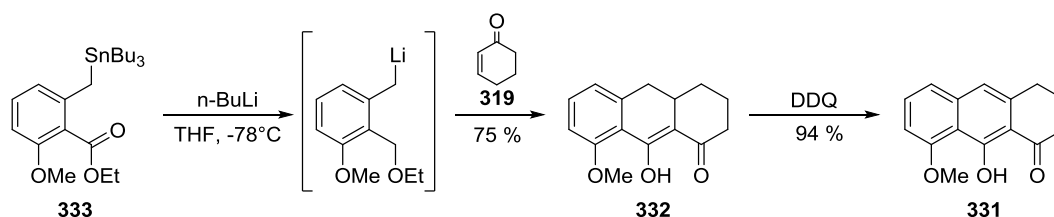


Schéma 42 : Modification de la réaction d'annélation de Staunton-Weinreb via un dérivé stannylé³²⁵.

Le passage par le dérivé stannylé (**333**) permet ainsi d'améliorer le rendement global à partir de l'*o*-toluate de 18 % à 42 %, en évitant le phénomène de polymérisation de la cyclohexénone (**319**)³²⁵.

6.1.3 Autres réactions d'annélation conduisant aux dihydroanthracénones

D'autres réactions, plus anecdotiques, conduisent à la synthèse de dihydroanthracénones. Elles sont basées sur l'annélation d'un complexe carbénique de chrome, l'annélation palladocatalysée entre un bromobenzaldéhyde et une cyclohexénone, la réaction de dérivés phosphoranes avec l'anhydride homophtalique, la réaction d'une α -sulphinyl cyclohexénone avec l'anhydride homophtalique ou une réaction de photocyclisation de dérivés 2-benzoyl-3-méthylcyclohexénones.

6.1.3.1 Benzannélation entre un complexe carbénique de chrome et un alcyne vrai

Chan *et al.* ont développé une méthodologie de synthèse du noyau cyclohexénone par une réaction monotope de benzannélation entre un complexe carbénique de chrome (**334**) et un alcyne vrai (**335**). Cette réaction fait intervenir séquentiellement une étape de benzannélation suivie d'une acylation intramoléculaire de Friedel et Crafts³²⁶ (Schéma 43).

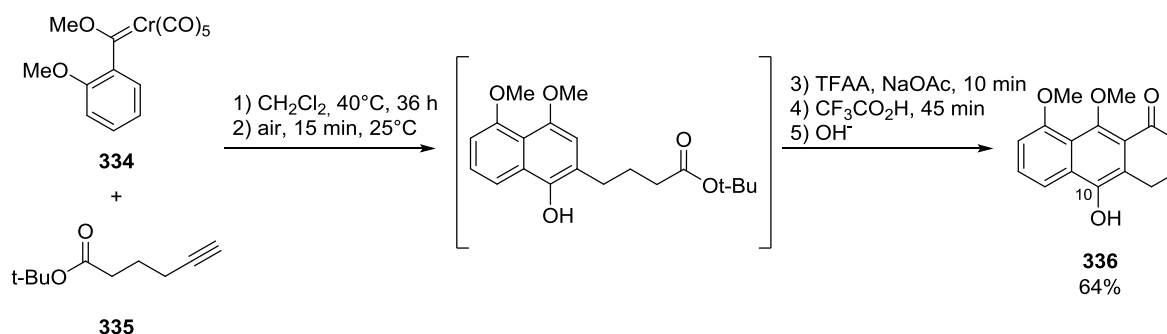


Schéma 43 : Benzannélation entre un complexe carbénique de chrome et un alcyne vrai³²⁶.

Cette réaction conduit nécessairement à la formation de dérivés comportant un hydroxyle en position 10 (**336**).

6.1.3.2 Réaction d'annélation palladocatalysée entre un *o*-bromobenzaldéhyde et une cyclohexénone

Terao *et al.* ont décrit plus récemment une réaction d'annélation palladocatalysée entre un *o*-bromobenzaldéhyde (**337**) et une cyclohexénone (**338**) permettant d'aboutir au noyau dihydroanthracénone (**339**) avec un rendement de 66% (Schéma 44)³²⁷.

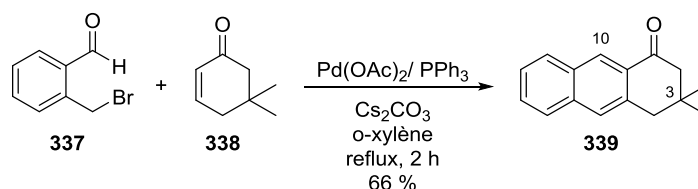


Schéma 44 : Réaction d'annélation palladocatalysée entre un *o*-bromobenzaldéhyde et une cyclohexénone³²⁷.

Cette réaction a également été réalisée à partir d'*o*-bromobenzaldéhydes substitués par des groupements méthoxy sur un certain nombre d'aldéhydes α,β -insaturés linéaires avec des rendements équivalents.

Dans ce cas précis, la double substitution de la position 3 empêche l'aromatisation en anthracène. Cette méthode ne permet pas non plus d'accéder à des composés hydroxylés en position 10.

6.1.3.3 Réaction de dérivés phosphoranes avec l'anhydride homophtalique

Ohmori *et al.* ont publié en 1988 la réaction entre un dérivé phosphorane (**340**) et un anhydride homophtalique (**342**) conduisant à la formation de la dihydroanthracénone (**343**)³²⁸ (Schéma 45).

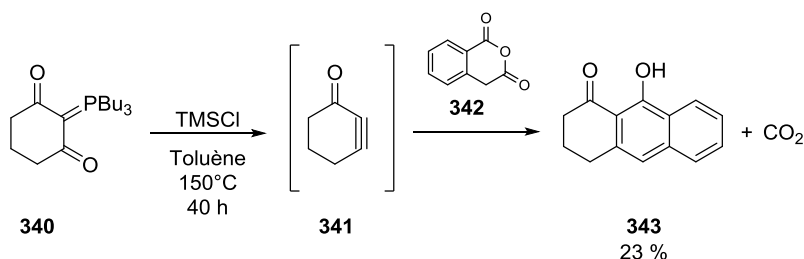


Schéma 45 : Réaction d'un dérivé phosphorane avec l'anhydride homophtalique³²⁸.

Le phosphorane (**340**), préparé par électrochimie³²⁹ donne transitoirement la cycloalcynone (**341**) par une réaction de Wittig intramoléculaire. Celle-ci réagit ensuite avec l'anhydride homophtalique (**342**) par réaction de Diels Alder pour former la dihydroanthracénone (**343**).

6.1.3.4 Réaction d'une α -sulphinyl cyclohexénone avec l'anhydride homophthalique

Imoto *et al.* décrivent en 2004 la réaction d'une α -sulphinyl cyclohexénone (**345**) avec l'anhydride homophthalique (**344**). La cycloaddition [4+2] catalysée par du tamis moléculaire conduit à la dihydroanthracénone (**346**) avec un bon rendement de 65 %³³⁰ (Schéma 46)

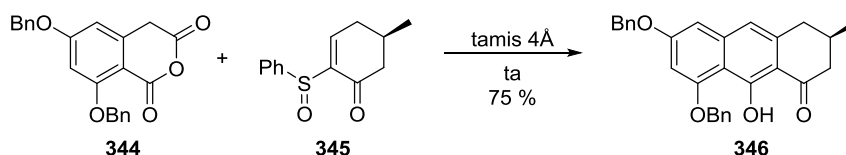
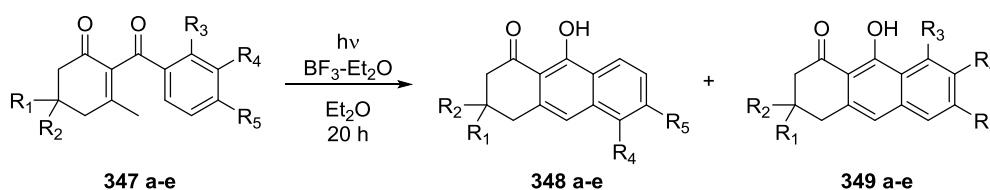


Schéma 46 : Réaction d'une α -sulphinyl cyclohexénone avec l'anhydride homophthalique³³⁰.

6.1.3.5 Photocyclisation de 2-benzoyl-3-méthylcyclohexénones

L'obtention de dihydroanthracénones **348 a-e** et **349 a-d** par réaction de photocyclisation de dérivés 2-benzoyl-3-méthylcyclohexénones (**347 a-e**) a été décrite par Tamura *et al.*³³¹ (Schéma 47).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Rendement	
						348	349
a	Me	Me	OMe	H	H	38 %	16 %
b	Me	Me	OMe	H	OMe	26 %	6 %
c	Me	H	OMe	H	H	32 %	10 %
d	H	H	OMe	H	H	36 %	8 %
e	Me	Me	H	H	H	34 %	-

Schéma 47 : Réaction de photocyclisation de dérivés 2-benzoyl-3-méthylcyclohexénones³³¹.

Cette réaction nécessite la synthèse de dérivés complexes de cyclohexénones (**347 a-e**), ne permet pas de contrôler efficacement la régiosélectivité et n'offre que de faibles rendements.

6.2 Synthèse des dihydroanthracénones

La réaction d'annélation de Staunton-Weinreb apparaît comme la plus appropriée pour réaliser la synthèse de dérivés dihydroanthracénones analogues des vismiones naturelles. En effet, celle-ci doit permettre d'atteindre des rendements de l'ordre de 60 % à partir de l'ester toluidique et, au contraire de la réaction d'annélation d'Hauser, permet d'obtenir des dérivés non hydroxylés sur la position 10.

La modification proposée par Hill et Rodrigo, en passant par un intermédiaire stannylé de l'ester toluidique permet en outre d'envisager une autre voie d'accès aux anthrones par un couplage de Stille entre ce même dérivé stannylé et un halogénure aromatique convenablement substitué.

Une étape de cyclisation par acylation de Friedel et Crafts déjà employée dans la stratégie d'accès aux anthraquinones (paragraphe 2.3.4, p 164) donnerait ainsi accès aux anthrones en offrant une alternative à la réaction d'ortholithiation précédemment employée (Figure 128).

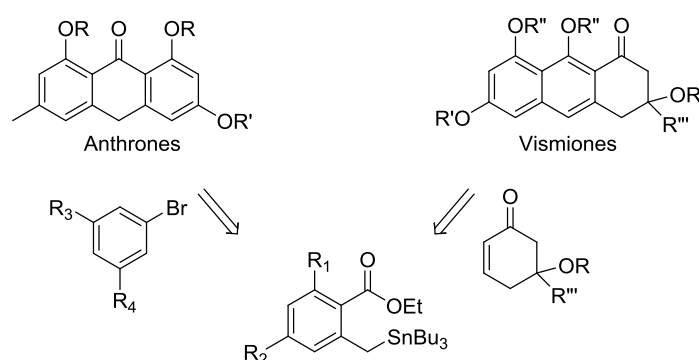


Figure 128 : Synthèse de vismiones et d'anthrones via un dérivé stannylé.

6.2.1 Synthèse du précurseur stannylé

Le 2-tributylstannyl-4,6-diméthoxybenzoate d'éthyle (**352**) est synthétisé à partir de l'acide 2-méthyl-4,6-diméthoxybenzoïque (**350**), après protection de la fonction acide par formation de l'ester éthylique correspondant (**351**) (Schéma 48).

L'ester ainsi obtenu réagit avec le chlorure de tributylétain en présence de LDA dans le THF pour former le 2-tributylstannyl-4,6-diméthoxybenzoate d'éthyle (**352**).

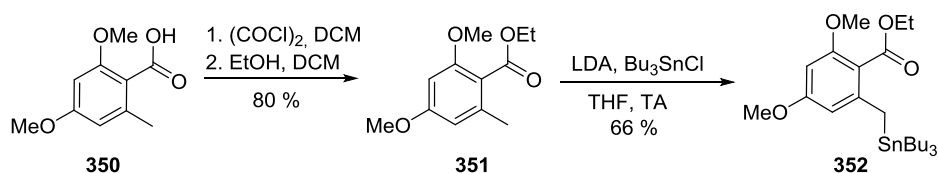


Schéma 48 : Synthèse du 2-tributylstannyl-4,6-diméthoxybenzoate d'éthyle (**352**).

La purification des dérivés stannylés n'est pas toujours évidente, le chlorure de tributylétain ajouté en excès ayant tendance à coéluer avec le dérivé stannylé d'intérêt lors des purifications sur colonnes de silice. Une purification par CCM préparative a permis de séparer efficacement le dérivé stannylé des sels d'étain résiduels, permettant d'obtenir le composé (**352**) en deux étapes avec 53 % de rendement.

Cette méthode de purification, bien qu'efficace présente cependant comme principal inconvénient de limiter les quantités pouvant être purifiées à une centaine de milligrammes par dépôt.

6.2.2 Synthèse des dihydroanthracénones

L'ester stannylé (**352**) est mis en présence de n-BuLi, afin de réaliser la réaction de transmétallation, puis de la cyclohexénone pour former la tétralone (**353**) avec un rendement de 71 %, comparable à celui obtenu par Hill *et al*³²⁵ (Schéma 49).

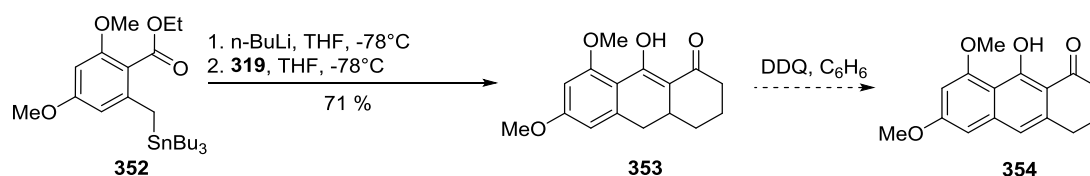


Schéma 49 : Synthèse de la dihydroanthracénone **354** à partir du composé stannylé **352**.

Une oxydation douce au DDQ de la tétralone (**352**) doit permettre d'obtenir la dihydroanthracénone souhaitée (**354**)³²⁵.

Une réaction effectuée en parallèle sur un dérivé 3-éthoxy de la cyclohexénone (**355**) a permis de s'affranchir de la réaction d'oxydation de la tétralone (**353**) (Schéma 50). Cette réaction réalisée sur le dérivé stannylé synthétisé précédemment a permis d'obtenir la dihydroanthracénone (**354**) avec un rendement de 41 %. En effet, l'élimination d'éthanol entraînée par la présence d'éthylate de lithium dans le milieu réactionnel conduit, après prototropie, à l'aromatisation du cycle central.

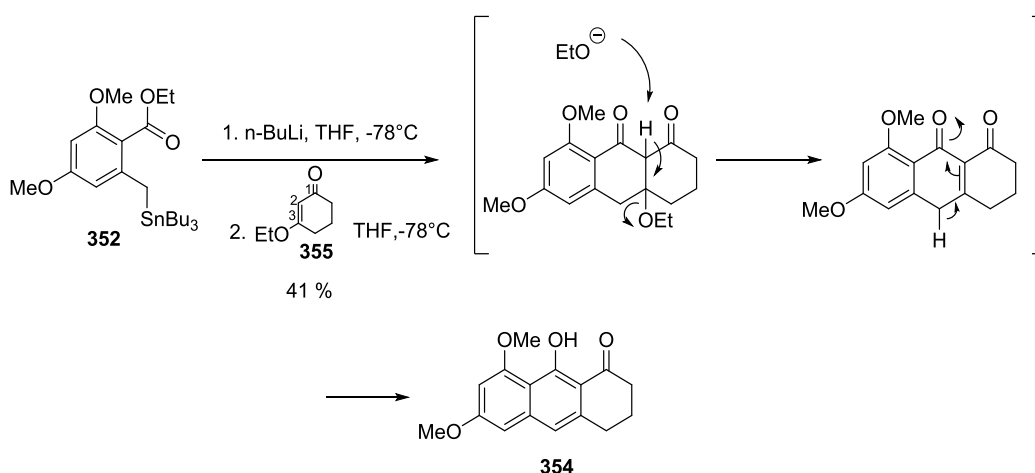


Schéma 50 : Synthèse de la dihydroanthracénone **354** via la β -alkoxycyclohexénone **355**.

6.2.3 Synthèse des dihydroanthracénones sans intermédiaire stannylé

En plus de l'aromatation spontanée, l'utilisation de β -alkoxycyclohexénone permet de s'affranchir de la synthèse du dérivé stannylé, puisque ces dernières ne sont pas susceptibles à la polymérisation³²⁰.

Les éthers de β -cétoénols (**357** et **358**) peuvent être facilement obtenus à partir des dicétones commerciales correspondantes (**355** et **356**) (Schéma 51).

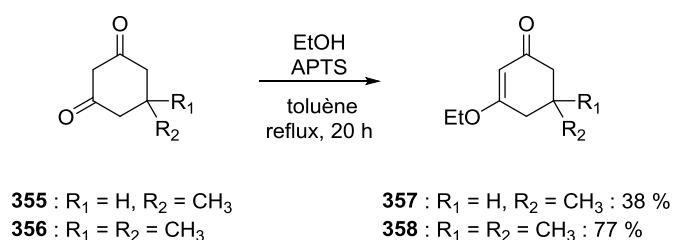


Schéma 51 : Synthèse de β -alkoxycyclohexénones.

Le 2,4-dihydroxyorthotoluate de méthyle protégé (**360**) peut, quant à lui être obtenu en une seule étape de méthylation à partir de l'acide 2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoïque (**359**) avec un rendement de 90 % (Schéma 52).

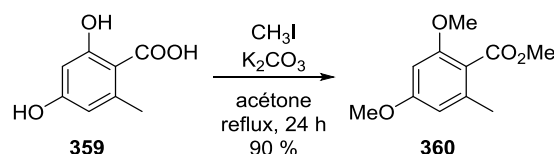


Schéma 52 : Synthèse du 2,4-diméthoxy-6-méthylbenzoate de méthyle (**360**).

Les dérivés mono et diméthyl-dihydroanthracénones (**361** et **362**) ont été synthétisés par réaction des β -alkoxycyclohexénones (**357** et **358**) correspondantes sur le 2,4-diméthoxyorthotoluate de méthyle (**360**) après déprotonation par le LDA. Les mono et diméthyl-dihydroanthracénones (**361** et **362**) sont ainsi obtenues en une étape avec des rendements respectivement de 46 % et 54 % (Schéma 53).

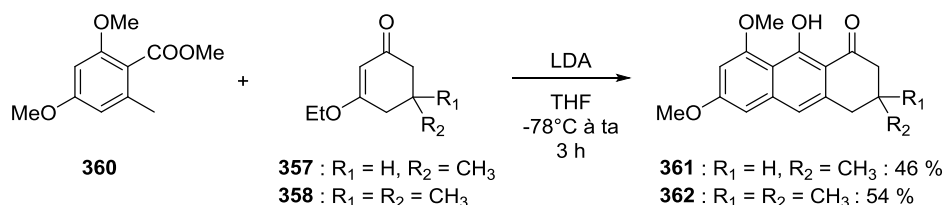


Schéma 53 : Synthèse des dérivés dihydroanthracénones mono et diméthylés.

Les conditions de synthèse de l'anthrone correspondante à partir de la dihydroanthracénone (**361**) par oxydation contrôlée restent encore à développer.

6.2.4 Déprotection du dérivé dihydroanthracénone diméthylé

La déprotection du dérivé diméthylé (**362**) a été réalisée dans les mêmes conditions que pour les anthraquinones synthétisées auparavant, à reflux pendant 14 h dans un mélange d'acide acétique et d'acide bromhydrique permettant d'obtenir presque quantitativement le dérivé trihydroxylé (**363**) (Schéma 54).

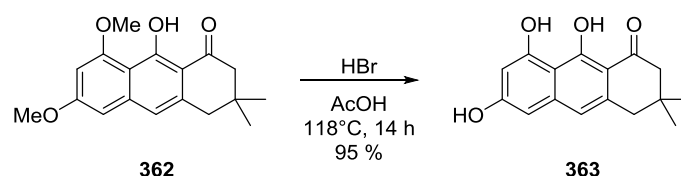


Schéma 54 : Déprotection de la diméthylidihydroanthracénone.

Les composés **361**, **362** et **363** ont été envoyés chez nos collaborateurs du Swiss Tropical and Public Health Institute afin de tester leurs activités antileishmaniennes et cytotoxiques. Ces évaluations biologiques sont encore en cours. L'absence d'hydroxyle en position 6 rend ces dérivés dihydroanthracénones bien plus stables que leurs analogues naturels vis-à-vis de l'aromatization en anthrone et impossible dans le cas des dérivés diméthylés (**362** et **363**).

6.2.5 Alkylation de 6,6-diméthylidihydroanthracénone (**363**)

Plusieurs tentatives d'alkylation de la 6,6-diméthylidihydroanthracénone (**363**) ont été réalisées. Cette dihydroanthracénone étant particulièrement stable par la présence des deux groupements méthyles en position 6, celle-ci ne peut pas s'aromatiser pour former l'anthrone correspondante.

Dans un premier temps, les conditions classiques d'alkylation de l'émodine par le bromure de prényle en présence de DBU ont été testées (Schéma 55). La réaction a été effectuée à température ambiante. Un contrôle de la réaction par HPLC a permis de suivre l'apparition de deux produits en proportions 6:4, plus apolaires et faiblement résolus présentant le spectre UV caractéristique des dihydroanthracénones. Après 22h, la conversion n'était pas totale mais l'apparition de nouveaux produits minoritaires a poussé à stopper la réaction.

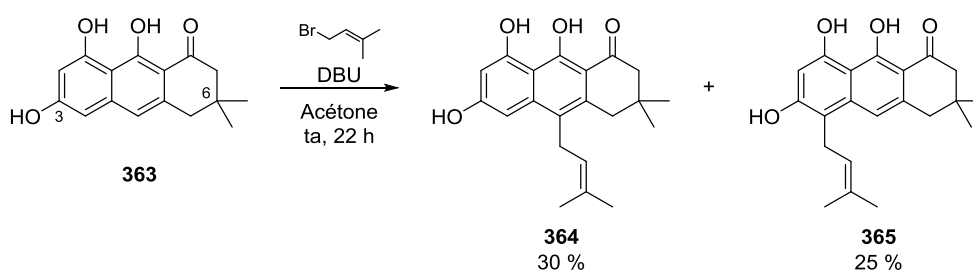


Schéma 55 : Alkylation de la 6,6 diméthylidihydroanthracénone **363**.

Ces conditions ont conduit à la formation des deux isomères C-alkylés (**364** et **365**) majoritaires ainsi qu'à d'autres produits très minoritaires qui n'ont pas été isolés. La formation de ces composés C-alkylés montre que les équilibres céto-énoliques conduisent à une délocalisation électronique sur le noyau dihydroanthracénone modifiant ainsi la réactivité des différentes positions. Les activités biologiques de ces dérivés seront également évaluées. Ils correspondent en effet à des analogues de certaines vismiones C-alkylées naturelles qui n'ont pas été isolées de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum*.

Un autre essai d'alkylation a été effectué en mettant la 6,6-diméthylanthracénone (**363**) en solution dans la pyridine en présence de bromure de prényle. Après 6 h à température ambiante, aucune conversion n'a cependant pu être observée.

Les conditions d'alkylation nécessiteront d'être développées afin d'accéder aux analogues dihydroanthracénone souhaités, c'est-à-dire en priorité aux molécules O-alkylées en position 3. Un criblage de bases, de solvants et de températures de réaction devra ainsi être réalisé. Une fois ces conditions mises au point, celles-ci pourront être appliquées aux autres dihydroanthracénones synthétisées.

6.3 Synthèse d'anthrones par couplage de Stille

Le dérivé stannylé synthétisé précédemment (paragraphe 6.2.1, p 187) peut également être engagé dans une réaction de couplage de Stille en vue d'obtenir des dérivés d'anthrones en s'affranchissant de l'étape d'ortholithiation. Ceci pourrait s'avérer utile pour l'introduction de certains groupes fonctionnels ou permettre un meilleur rendement sur cette étape limitante de la synthèse des anthraquinones (Figure 129). En effet, comme dans la stratégie déjà utilisée au laboratoire, le tricyclic peut être formé par réaction de Friedel et Crafts à partir d'un dérivé de l'acide 2-benzylbenzoïque. Ce dernier pourrait cette fois-ci être obtenu par la réaction de Stille entre un halogénure aromatique et le dérivé stannylé (**352**).

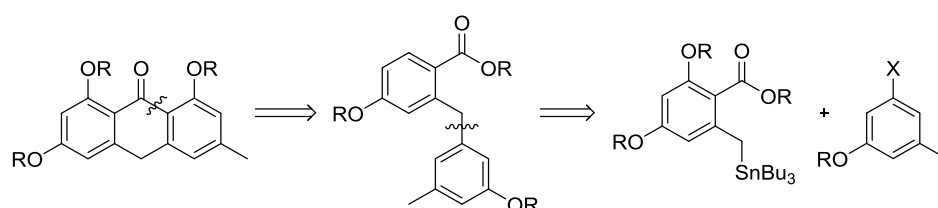


Figure 129 : Rétrosynthèse de l'anthrone par couplage de Stille.

Dans un premier temps, le dérivé stannylé (**352**) a été mis à réagir avec le 3,5-diméthoxybromobenzène (**366**) dans les conditions de Stille classiquement utilisées au laboratoire avec du palladium tetrakis ($\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph}_3)_4]$) dans le toluène (Schéma 56).

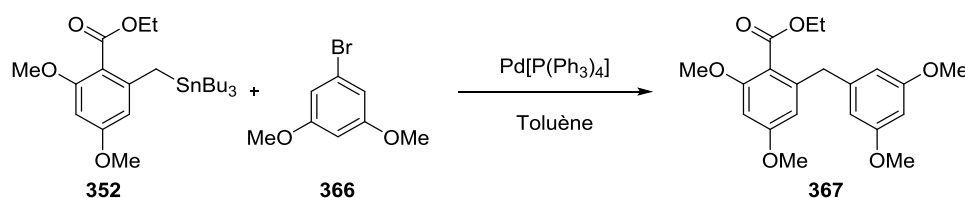


Schéma 56 : Réaction de Stille.

Quelques conditions réactionnelles ont été testées (Tableau 21). Le chauffage du milieu réactionnel à 100°C au micro-onde pendant 30 min n'a pas permis d'obtenir le produit de couplage souhaité (**367**), seuls quelques produits minoritaires ont pu être observés (**Entrée 1**). Un chauffage prolongé pendant 1 h a abouti au même résultat (**Entrée 2**). Un essai réalisé dans les mêmes conditions sur le iodobenzène par chauffage progressif au bain d'huile, en vérifiant régulièrement la composition du milieu réactionnel, n'a pas permis d'obtenir le produit de réaction souhaité (**Entrée 3**).

Tableau 21 : Conditions réactionnelles pour la réaction de Stille.

Entrée	Substrat	Chauffage	Résultats
1	3,5 diméthoxybromobenzène	100°C, μW , 30 min	Produits de départ + plusieurs produits très minoritaires
2	3,5 diméthoxybromobenzène	100°C, μW , 1 h	Produits de départ + plusieurs produits très minoritaires
3	iodobenzène	ta 48 h, 40°C 48 h, 60°C 24 h, 80°C 2 h	0 % conversion

L'optimisation de cette réaction n'étant pas prioritaire pour le projet, elle n'a pas été davantage explorée mais le sera dans un second temps comme potentielle nouvelle voie d'accès aux anthrones et anthraquinones via un dérivé de l'acide 2-benzylbenzoïque (**367**) sans nécessiter de passer par une étape d'ortholithiation.

Il n'existe cependant que peu d'exemples de couplage de Stille sur ce type de substrats, qui requièrent des conditions particulières.

Hamze *et al.* ont développé des conditions de couplage appliquées à des dérivés α -styrylbutylétain (**368**) après une étude extensive des paramètres (source de Pd, ligand, solvant, et additifs) pour arriver aux conditions optimales suivantes : dérivé α -styrylbutylétain (**368**) (1.0 éq), dérivé iodobenzène (**369 a-c**) (1.2 éq), Pd(OAc)₂ (7 mol %), Xphos (14 mol %) dans le DMF à 80°C pendant 12 h (Schéma 57)³³².

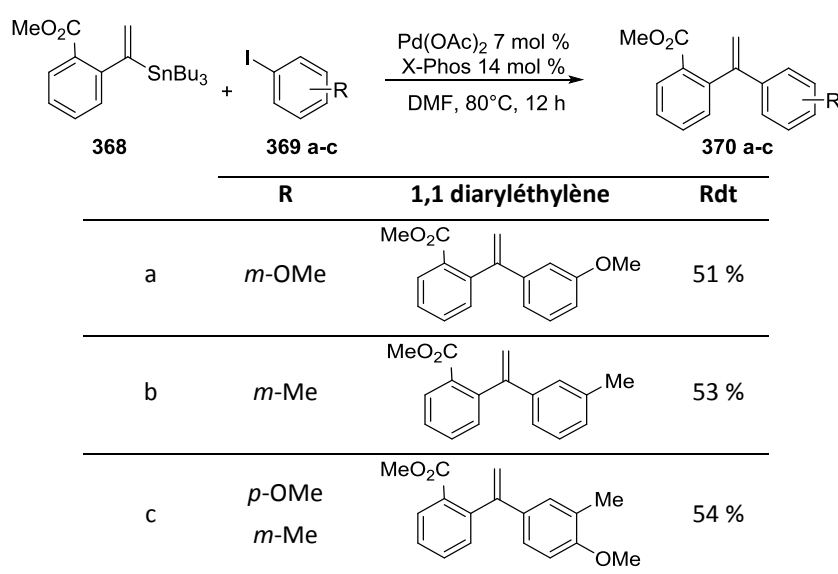


Schéma 57 : Couplage de Stille entre un dérivé α -styrylbutylétain et un dérivé iodobenzène³³².

Ocampo *et al.* ont quant à eux développé d'autres conditions de couplage permettant l'accès à toute une série de dérivés diarylméthane en utilisant les conditions Pd₂(dba)₃, AsPh₃, LiCl sous ultrasons dans le DMF à température ambiante sur des durées allant de 9 à 25 h. Les différents dérivés sont ainsi obtenus avec des rendements allant de 39 à 78 % selon les substrats utilisés (Schéma 58)³³³.

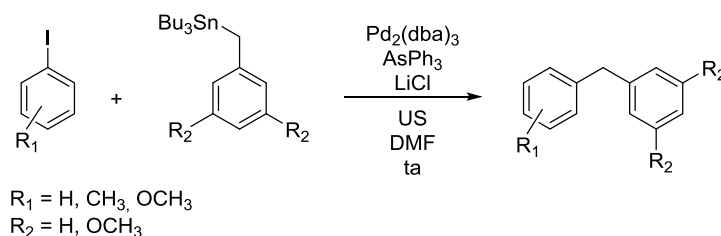


Schéma 58 : Couplage entre dérivés benzyltributylétain et dérivés iodobenzène³³³.

Un criblage plus complet des conditions optimales devra donc être réalisé ultérieurement afin de développer cette nouvelle voie d'accès potentielle aux noyaux anthrones et anthraquinones.

7 Conclusion

La synthèse d'analogues des anthranoïdes isolés du genre *Psorospermum* ne s'est pas montrée aussi aisée que ce qui avait été envisagé au départ.

Nous souhaitons dans un premier temps faire varier la substitution en position 3 de ces molécules afin d'en évaluer l'intérêt vis-à-vis de leur activité antiprotozoaire, et notamment antileishmanienne.

Une première stratégie a été envisagée afin d'obtenir des dérivés d'anthrones 3-O-alkylées, celles-ci ayant montré une bonne activité antileishmanienne.

La synthèse totale du noyau anthraquinone commun à ces molécules, l'émodine (**13**) a ainsi été mise en œuvre.

Une première approche par réaction successive de deux diènes sur un dérivé 1,4-benzoquinone (**204**) a tout d'abord été envisagée. L'instabilité des diènes et la difficulté de réaliser la condensation de Diels-Alder de ces derniers sur la benzoquinone nous a conduits à recourir à une seconde stratégie de synthèse basée sur une réaction d'ortholithiation entre un benzamide (**233**) et un benzaldéhyde (**234**), suivie d'une étape de cyclisation intramoléculaire de Friedel et Crafts.

L'étape d'ortholithiation s'est avérée particulièrement critique avec des problèmes de reproductibilité impactant de manière non négligeable le rendement global de la synthèse. L'émodine (**13**) a ainsi pu être obtenue en huit étapes à partir de l'acide 2-hydroxy-4-méthylbenzoïque (**256**) avec des rendements globaux allant de 15 à 30 %.

Une étape d'alkylation sélective de l'hydroxyle en position 3 de l'émodine (**13**) a ensuite été réalisée permettant d'accéder à sept dérivés diversement substitués qui ont été testés pour leurs activités antiprotozoaires.

Une stratégie de synthèse analogue a été réalisée pour obtenir des dérivés de la 6-desméthylémodine (**284**) afin d'évaluer l'intérêt de la substitution de la position 6 par un groupement méthyle (paragraphe 3.2, p 207).

Différentes conditions de réduction des anthraquinones alkylées en anthrones correspondantes décrites dans la littérature ont alors été testées. Malheureusement, aucune de ces approches n'a pu permettre d'obtenir les produits souhaités.

Une autre stratégie d'alkylation, directe cette fois-ci, des anthrones a été réalisée. Celle-ci a cependant conduit à des produits de polyalkylation non souhaités du fait de la réactivité importante de la position dibenzyle de ces molécules.

Compte-tenu de la réactivité des dihydroanthracénones et de leur capacité à engendrer des anthrones, une nouvelle stratégie de synthèse a alors été envisagée afin d'obtenir de manière convergente les anthrones *via* les dihydroanthracénones correspondantes.

Trois dihydroanthracénones (**354**, **361** et **362**) ont ainsi été synthétisées par la réaction d'annélation de Staunton-Weinreb entre un ester *ortho*-toluidique et une cyclohexénone. Une première tentative d'O-alkylation de ce type de dérivé a conduit à l'obtention d'un mélange de produits C-alkylés (**364** et **365**). L'étude des conditions réactionnelles permettant d'obtenir les produits d'O-alkylation souhaités reste encore à effectuer.

Les conditions d'oxydation sélectives des dihydroanthracénones afin d'obtenir les anthrones correspondantes d'intérêt devront également encore faire l'objet d'une étude approfondie.

Le recours à cette stratégie a conduit à la synthèse d'un dérivé stannylé de l'ester *ortho*-toluidique (**352**) qui a ouvert la perspective d'une alternative à la réaction d'ortholithiation pour l'obtention du noyau tricyclique des anthrones. Celles-ci pourraient en effet être synthétisées par couplage de Stille entre le dérivé stannylé (**352**) et un halogénure aromatique. Un nombre réduit d'essais avec les conditions classiquement utilisées au laboratoire n'a pas permis d'obtenir le produit de couplage souhaité. Un criblage plus complet des conditions de couplage devra être envisagé pour ainsi développer une voie d'accès alternative aux anthrones et anthraquinones.

La synthèse des anthranoïdes analogues des molécules naturelles isolées de *Psorospermum*, nécessite de nombreuses précautions et l'acquisition d'un certain savoir-faire afin de contrôler les conditions susceptibles de conduire à leur dégradation. La plupart des étapes de synthèse de ces dérivés, bien que déjà publiées pour des molécules analogues ont demandé un travail d'optimisation presque systématique afin d'obtenir les composés souhaités.

Chapitre IV :

Activités Biologiques

1 Réalisation des tests

Les tests d'activités biologiques *in vitro* ont été réalisés à travers diverses collaborations :

- les activités antileishmaniennes sur amastigotes de *L. donovani*, antiplasmodiales sur les stades sanguins de la souche chloroquino-résistante K1 de *P. falciparum* et cytotoxiques sur myoblastes de muscles squelettiques de rat L6 ont été déterminées par l'équipe de Marcel Kaiser au *Swiss Tropical and Public Health Institute* de Bâle au sein de la plateforme de criblage de référence mondiale sur les maladies parasitaires;
- les activités antiplasmodiales sur souche chloroquino-sensible de *P. falciparum* 3D7 et cytotoxiques sur fibroblastes humain NHDF ont été déterminées par Flore Nardella à l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (Collaboration avec le Pr E. Candolfi);
- les activités antileishmaniennes sur amastigotes axéniques et promastigotes de *L. infantum* et cytotoxiques sur macrophages murins J774A.1 ont été déterminées par Yenny Lozano, Lucie Paloque et Sandra Bourgeade-Delmas au sein de l'UMR 152 IRD-UPS PHARMA-DEV dans l'équipe BIOCID à Toulouse (Collaboration avec le Dr Éric Deharo).

Le recours à l'évaluation biologique des échantillons sur plusieurs souches d'un même parasite et à l'aide de techniques différentes permet de confirmer le fait que l'activité observée n'est pas dépendante de la souche ou du test employé.

Pour les échantillons testés sur *Plasmodium*, l'intérêt de combiner l'évaluation de l'activité par les tests à l'hypoxanthine tritiée (réalisé à Bâle) et à la pLDH (réalisé à Strasbourg) provient de la différence des paramètres mesurés.

En effet, le test à l'hypoxanthine permet de mesurer l'impact du composé sur la division parasitaire tandis que le test ELISA pLDH permet de déterminer l'impact sur la survie du parasite. La combinaison des deux tests permet d'évaluer si le composé présente une activité parasitostatique en empêchant la division du parasite sans induire sa mort (entraînant des CI_{50} discordantes) ou si l'activité est parasiticide (entraînant des CI_{50} concordantes).

De la même manière, les molécules évaluées dans un premier temps sur amastigotes axéniques de *L. donovani* présentant le meilleur potentiel d'activité antileishmanienne, ont été testées sur amastigotes axéniques de *L. infantum*, une autre espèce à tropisme viscéral.

Tout comme pour *Plasmodium*, l'évaluation de l'activité antileishmanienne sur chacune des souches fait appel à des techniques différentes. La survie cellulaire est évaluée dans le premier cas par un test de viabilité cellulaire à la résazurine alors que dans le second cas la survie parasitaire est évaluée avec une souche exprimant la luciférase. L'utilisation de ces deux modes d'évaluation différents sur deux souches différentes permet ainsi de confirmer l'activité observée indépendamment de la souche ou du test employé.

2 Extraits de *Psorospermum*

A partir des différents échantillons de *Psorospermum* récoltés au Cameroun, des extraits dichlorométhaniques et aqueux ont été réalisés (paragraphe 3, p 229) et leurs activités antiplasmodiales et antileishmaniennes ont été évaluées *in vitro* (paragraphe 10.1.1, p 240, paragraphe 10.2.2, p 241 et 10.3.2, p 243).

2.1 Activités antiplasmodiales

2.1.1 Activités des extraits dichlorométhaniques

Les activités antiplasmodiales des extraits dichlorométhaniques de *Psorospermum* ont été évaluées sur la souche *P. falciparum* 3D7 aux concentrations de 10 et 100 µg/mL.

Les activités d'inhibition de la croissance plasmodiale sont reportées ci-dessous par ordre décroissant d'activité, pour les extraits présentant un pourcentage d'inhibition supérieur à 5% à la concentration de 10 µg/mL (Figure 130).

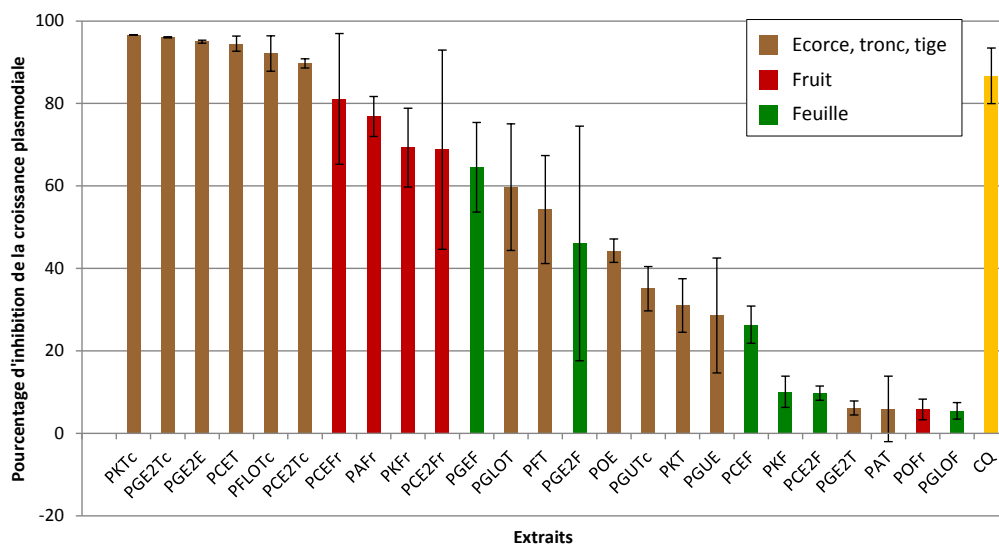


Figure 130 : Activité antiplasmodiale (*P. falciparum* 3D7) des extraits dichlorométhaniques à 10 µg/mL.

Les pourcentages d'inhibition ont été déterminés sur la souche *P. falciparum* 3D7 (n = 2) dans les conditions décrites au paragraphe 10.1.1, p 240. CQ : chloroquine (molécules de référence) à 10 µg/mL.

On remarque que ce sont essentiellement les extraits d'écorces qui sont les plus actifs (inhibition de croissance > 80 % à 10 µg/mL). Cette activité est relativement bien corrélée avec la teneur en vismiones totales contenues dans les extraits (paragraphe 6.2.2, p 125).

On observe néanmoins une activité particulièrement importante pour certains extraits de fruits [*P. corymbiferum* (PCEFR et PCE2Fr), *P. adamauense* (PAFR), *P. kerstingii* (PKFR)] et pour l'extrait de feuilles de *P. glaberrimum* (PGEF) avec des inhibitions de la croissance plasmodiale comprises entre 60 et 80 % à 10 µg/mL. Ces extraits contenant moins de 10 % en masse de vismiones (paragraphe 6.2.2.2 et 6.2.2.3 pp 127-128), cette activité pourrait s'expliquer par la présence de dérivés particulièrement actifs ou par celle d'autres molécules participant également à l'activité observée.

Dans le second cas, il serait intéressant d'identifier quels pourraient être les autres métabolites responsables des activités de ces extraits par une approche phytochimique complémentaire.

Pour les extraits présentant un pourcentage d'inhibition de la croissance plasmodiale supérieur à 65% à 10µg/mL, les CI_{50} des extraits ont été déterminées (Tableau 22) :

Tableau 22 : Valeurs de CI_{50} des extraits dichlorométhaniques de *Psorospermum*.

Extrait	CI_{50} µg/ml
PGE2E	1,1
PFL0Tc	1,5
PCET	1,7
PCEFr	2,1
PCE2Tc	2,1
PKTc	2,2
PCE2Fr	3,3
PKFr	3,5
PGE2Tc	5,3
PAFr	5,8

Les CI_{50} ont été déterminés sur la souche *P. falciparum* 3D7 (n = 2) pour les extraits présentant un pourcentage d'inhibition de la croissance plasmodiale supérieur à 65% à 10µg/mL selon les conditions décrites au paragraphe 10.2.2, p 241.

Référence : chloroquine CI_{50} = 12,6 ng/mL.

Les extraits d'écorces, de tiges, de troncs et de fruits testés présentent de bonnes activités antiplasmodiales avec des CI_{50} de l'ordre du µg/mL.

Ces valeurs sont cohérentes avec celles décrites par Ndjakou Lenta *et al.* pour les extraits organiques d'écorce de *P. glaberrimum* sur souche chloroquino-résistante *P. falciparum* W2⁸³.

2.1.2 Activités des extraits aqueux

La préparation traditionnelle utilisée pour soigner les cas graves de paludisme en médecine camerounaise consiste en une décoction d'écorces de *Psorospermum glaberrimum*⁴. Les extraits organiques étudiés jusqu'à présent pour leurs activités antiplasmodiales *in vitro* s'éloignent très largement de cette préparation traditionnelle. Pour cette raison, il a été choisi d'étudier les activités antiplasmodiales d'extraits aqueux de différentes parties d'espèces appartenant au genre *Psorospermum*.

A la concentration de 10 µg/mL, aucun extrait aqueux n'a montré d'inhibition de la croissance plasmodiale supérieure à 10 %. Les activités d'inhibition de la croissance plasmodiale sont reportées ci-dessous pour les extraits présentant un pourcentage d'inhibition supérieur à 10 % à la concentration de 100 µg/mL (Figure 131).

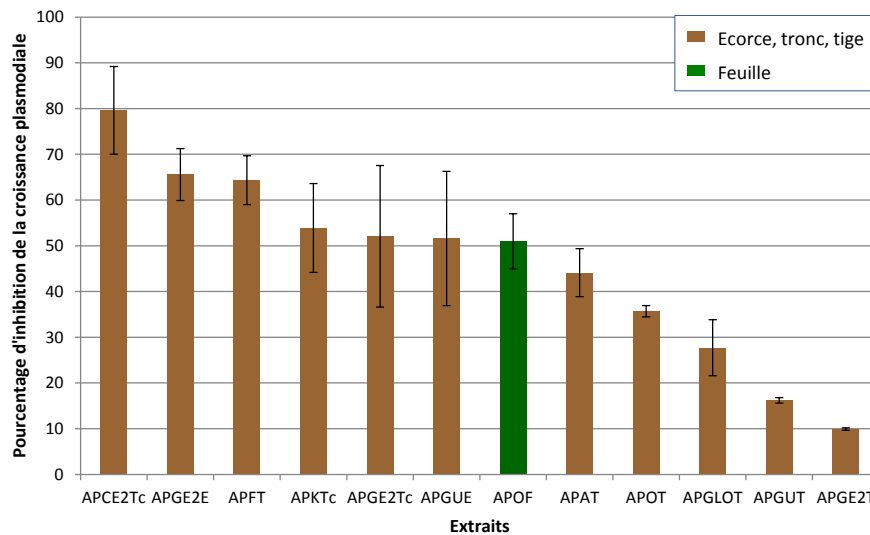


Figure 131 : Activité antiplasmodiale (*P. falciparum* 3D7) des extraits aqueux à 100 µg/mL.

Les pourcentages d'inhibition ont été déterminés sur la souche *P. falciparum* 3D7 (n = 2) selon les conditions décrites au paragraphe 10.1.1, p 240.

On remarque que ce sont essentiellement des extraits d'écorces, de troncs et de tiges qui sont à nouveau porteurs de l'activité antiplasmodiale, même si elle reste modérée.

Ces résultats valident partiellement l'utilisation traditionnelle qui est faite de l'écorce bien que la faible activité antiplasmodiale *in vitro* ne puisse à elle seule expliquer l'efficacité d'un tel remède. La guérison de l'infection palustre ne se limite cependant pas seulement à un effet parasicide. D'autres aspects physiologiques peuvent être pris en compte dans les critères de guérison comme l'abaissement de la fièvre ou la stimulation du système immunitaire³³⁴.

Le recours à des remèdes à base de plantes est bien plus complexe qu'un simple modèle pharmacologique *in vitro*, il doit prendre en compte d'une part l'organisme à soigner dans sa globalité et d'autre part le remède, composé d'un mélange complexe de molécules qui peuvent agir de façon synergique à différents niveaux et sur différentes cibles d'un mécanisme physiopathologique. Une faible activité *in vitro* sur une cible isolée ne saurait de ce fait invalider l'usage traditionnel d'une plante.

Par ailleurs, les extraits aqueux bien qu'ils ne correspondent pas à une préparation utilisée traditionnellement pour la prise en charge de symptômes pouvant correspondre à la leishmaniose, ont toutefois été testés pour leur activité antileishmanienne sur amastigotes de *L. infantum* selon les conditions décrites au paragraphe 10.3.2, p 243. Aucun extrait aqueux n'a cependant montré de CI_{50} inférieure à 100 µg/mL.

2.2 Activités antileishmaniennes

2.2.1 Activités des extraits dichlorométhaniques

Les activités de certains extraits dichlorométhaniques disponibles en quantités allant de la dizaine à la centaine de grammes et permettant d'envisager un fractionnement ultérieur ont été testées sur amastigotes axéniques de *L. donovani*. Les indices de sélectivité de ces mêmes extraits ont été évalués vis-à-vis de cultures de cellules musculaires squelettiques de rat L6 (paragraphe 10.2, p 240).

Tableau 23. Activités antileishmaniennes de certains extraits dichlorométhaniques sur amastigotes de *L. donovani*

Echantillon	Cl ₅₀ sur amastigotes axéniques de <i>L. donovani</i> (µg/mL)	IS amastigotes <i>L. donovani</i> /L6 cells
PKTc	0,15	14
PGE2Tc	0,14	20
PCE2Tc	0,17	13
PFFr	0,17	45
PCET	0,18	15
POE	0,26	22
PGE2E	0,69	13

Les Cl₅₀ sur amastigotes de *L. donovani* et les indices de sélectivité par rapport aux cellules L6 ont été déterminées selon les conditions décrites au paragraphe 10.2.2, p 241.

Références : activité antileishmanienne : miltéfosine Cl₅₀ = 144 nM ; cytotoxicité : podophylotoxine Cl₅₀ = 19 nM.

Parmi les extraits évalués sur ces amastigotes, essentiellement des extraits de tiges, de troncs et d'écorces mais aussi un extrait de fruits de *P. febrifugum* (PFFr), tous présentent une très bonne activité antileishmanienne avec des valeurs de Cl₅₀ inférieures au µg/mL et de bons indices de sélectivité vis-à-vis de cellules musculaires squelettiques de rat L6, supérieurs à 10.

3 Molécules de type anthranoïde

3.1 Criblage d'anthrones et d'anthraquinones

3.1.1 Molécules issues de chimiothèques

Dans le cadre de l'étude de RSA entreprise, nous cherchions à orienter la synthèse de nouveaux analogues structuraux des molécules d'intérêt. L'objectif de ce criblage était d'amorcer, à partir de composés déjà disponibles, la mise en évidence du rôle des substituants présents sur les noyaux anthraquinone et anthrone dans les activités antileishmaniennes et antiplasmodiales de ce type de molécules.

3.1.1.1 Chimiothèque nationale

La Chimiothèque Nationale est un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) entre le CNRS et 29 établissements d'enseignement supérieur et de recherche qui a pour mission principale de regrouper les collections de produits de synthèse, de composés naturels et d'extraits naturels existants dans les laboratoires publics français et d'en promouvoir la valorisation scientifique et industrielle.

Les informations concernant les molécules et extraits disponibles sont regroupées dans deux bases de données nationales (produits de synthèse, composés naturels et extraits naturels), accessibles aux membres du réseau à travers un portail web (<http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr/?-Acces-utilisateurs->). Les produits sont conditionnés soit en vrac, soit en microplaques à 96 puits, afin de permettre leur évaluation biologique³³⁵.

3.1.1.2 Sélection des molécules

Parmi les 59782 composés chimiques répertoriés à la Chimiothèque Nationale, 8 anthrones et 18 anthraquinones ont été sélectionnées afin d'être testées pour leurs activités antileishmaniennes et antiplasmodiales. En plus de ces molécules, 6 anthraquinones commerciales ont également été testées. Aucune dihydroanthracénone n'a été sélectionnée car ces structures ne figurent pas dans la chimiothèque.

Ces molécules ont été testées au Swiss Tropical and Public Health Institute de Bâle à la fois sur stades sanguins de *Plasmodium falciparum* K1, amastigotes de *Leishmania donovani* et cellules de muscle squelettique de rat (L6) afin d'évaluer leurs activités antiprotozoaires mais également leurs indices de sélectivité (Tableau 24).

3.1.1.3 Résultats – discussion

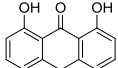
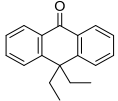
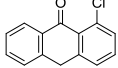
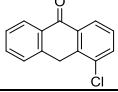
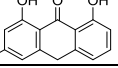
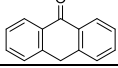
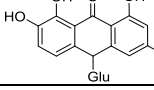
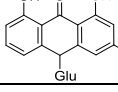
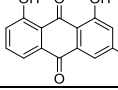
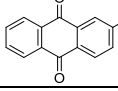
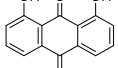
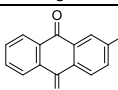
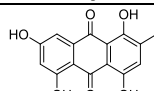
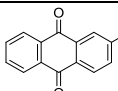
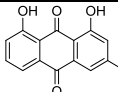
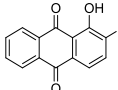
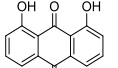
Les résultats obtenus pour les différentes molécules sont indiqués dans le Tableau 24.

Parmi les 32 molécules testées, aucune ne présente d'activité submicromolaire sur *Leishmania* et la sélectivité vis-à-vis des cellules musculaires squelettiques L6 de la plupart des molécules s'avère défavorable (< 10). Ces résultats montrent par ailleurs que malgré des activités moyennes, il est difficile d'établir une relation structure-activité, aucune position ni nature de groupement ne s'avère franchement favorable à une activité antileishmanienne. Ceci à l'exception des groupements carboxyliques présents sur le noyau anthraquinone qui semblent légèrement favorables à une activité antileishmanienne (Entrée 1b et 2b).

Concernant l'activité antiplasmodiale, toutes les anthrones libres testées ont montré des activités submicromolaires ou tout juste micromolaires (Entrées 1a-6a), avec une sélectivité relativement intéressante pour certaines d'entre elles vis-à-vis des cellules mammifères avec des indices de sélectivité de l'ordre de 20 ou plus (Entrées 2a-6a). Les anthraquinones ont montré des activités plus modestes et des indices de sélectivité défavorables.

Ces résultats, au vu de leur intérêt limité, ne permettent malheureusement pas d'orienter la synthèse d'analogues structuraux pour une étude de relation structure-activité comme cela avait pu être espéré.

Tableau 24 : Criblage de molécules commerciales et issues des chimiothèques UMR 7200 et Nationale classées par ordre décroissant d'activité antileishmanienne.

Entrée	Structure	Activité amastigotes <i>L. donovani</i> (CI ₅₀ en µM)	IS amastigotes <i>L. donovani</i> /L6 cells	Activité <i>P. falciparum</i> K1 (CI ₅₀ en µM)	IS <i>P. falciparum</i> K1/L6 cells
ANTHRONES					
1a		9,1	0,1	0,5	1,7
2a		10,7	33,1	16,3	21,8
3a		16,8	4,7	3,0	26,4
4a		20,6	4,6	3,6	26,3
5a		31,3	0,1	0,1	23,1
6a		112,8	0,7	1,2	66,6
7a		123,1	0,6	5,1	13,7
8a		239,0	0,8	95,3	2,0
ANTHRAQUINONES					
1b		2,6	8,7	57,4	0,4
2b		2,8	57,9	39,9	4
3b		4,3	5,4	18,8	1,2
4b		7	7,5	26,1	2
5b		7,1	3,2	24,1	1,0
6b		8,1	10,5	30,8	2,8
7b		9,6	1,3	23,4	0,5
8b		10,3	7,1	100,9	0,7
9b		11,2	1,7	26,4	0,7

Entrée	Structure	Activité amastigotes <i>L. donovani</i> (CI ₅₀ en µM)	IS amastigotes <i>L. donovani</i> /L6 cells	Activité <i>P. falciparum</i> K1 (CI ₅₀ en µM)	IS <i>P. falciparum</i> K1/L6 cells
10b		12,6	14,5	26,9	6,8
11b		16,3	4,3	15,1	4,7
12b		21,6	3,0	23,8	2,7
13b		28,5	6,8	27,5	7,0
14b		28,6	0,1	6,6	0,5
15b		29,8	1,8	76,1	0,7
16b		30,2	7,1	82,2	2,6
17b		31,7	1,8	23,1	2,4
18b		32,2	3,5	41,1	2,8
19b		42,3	0,5	4,2	4,8
20b		50,7	0,1	0,5	6,1
21b		75,9	0,2	4,8	3,6
22b		147,9	1,1	54,2	3,0
23b		210,6	1,4	81,1	3,7
24b		419,7	0,5	73,6	2,6

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. donovani* (n = 1) et des cultures sanguines asynchrones de *P. falciparum* K1 (n = 2) selon les conditions décrites au paragraphe 10.2, p 240. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat (L6) par un test à la résazurine. * molécules présentant un problème de solubilité. Références : activité antileishmanienne : miltéfosine CI₅₀ = 0,38 µM ; activité antiplasmodiale : chloroquine CI₅₀ = 0,13 µM ; cytotoxicité : podophyllotoxine CI₅₀(L6) = 19 nM.

3.2 Criblage d'analogues synthétiques

Les analogues d'anthrones et d'antraquinones naturelles obtenus par synthèse au chapitre 3 ont été criblés de la même façon que les analogues issus de la Chimiothèque Nationale, sur amastigotes de *L. donovani*, stades sanguins de *P. falciparum* K1 et cellules musculaires squelettiques L6, afin d'évaluer leurs activités antiprotozoaires et leurs indices de sélectivité (Tableau 25).

Tableau 25 : Activités des dérivés synthétisés classés par ordre décroissant d'activité antileishmanienne.

Entrée	Code	Structure	Activité amastigotes <i>L. donovani</i> (Cl ₅₀ en µM)	IS amastigotes <i>L. donovani</i> /L6 cells	Activité <i>P. falciparum</i> K1 (Cl ₅₀ en µM)	IS <i>P. falciparum</i> K1/L6 cells
ANTHRONES						
1a	283		43,3	4,6	45,8	4,4
2a	264		3,8	7,5	8	3,5
ANTHRAQUINONES						
1b	274		2,4	>96	13,1	>17,8
2b	284		3,9	17,9	16	4,4
3b	272		4,8	8,6	12,8	3,2
4b	12		10	12,1	7,8	15,6
5b	282		15,6	2,5	3	13,1
6b	5		24,3	8,9	16,6	13
7b	285		24,3	3,7	36	2,5
8b	249		28,5	0,7	37	0,5
9b	270		28,8	7	143,4	1,4
10b	29		39,7	7	58,6	4,7
11b	271		51,6	>5,1	114,1	>2,3

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *Leishmania donovani* (n = 2) et de cultures sanguines de *Plasmodium falciparum* K1 (n = 2) selon les conditions décrites au paragraphe 10.2, p 240. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat par test à la résazurine. Références : miltéfosine Cl₅₀=0,14 µM ; chloroquine Cl₅₀=0,13 µM ; cytotoxicité : podophyllotoxine Cl₅₀ = 19 nM.

On observe que les activités antileishmaniennes des molécules sont toutes au minimum micromolaires, il n'y a donc pas eu de gain d'activité par rapport aux molécules naturelles isolées précédemment. Il est difficile d'établir une relation claire entre les différents déterminants structuraux et l'activité biologique des molécules. L'antraquinone PEGylée, synthétisée comme outil pharmacologique s'est néanmoins montrée la plus active avec un CI_{50} de 2,4 μM et un bon indice de sélectivité supérieur à 96 (entrée 1b).

Les activités antiplasmodiales de ces molécules se sont révélées quant à elles plutôt moyennes avec des CI_{50} allant de 3 à 114 μM . La molécule la plus active s'avère être la 6-desméthyltriméthoxyémidine (Entrée 5b) avec une CI_{50} de 3 μM et un indice de sélectivité de 13. Les autres dérivés de la 6-desméthylémidine ont montré des activités inférieures, ne permettant pas de conclure quant à l'intérêt de la substitution de cette position.

Les 2 anthrones testées ici (Entrées 1a et 2a) se sont avérées moins actives que les anthrones de la chimiothèque nationale que nous avons testées (paragraphe 3.1.1.3, p 204), avec des activités de 8 et 46 μM et des indices de sélectivité inférieurs.

3.3 Evaluation biologique des vismiones isolées de *P. glaberrimum*

Les différentes vismiones isolées de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* ont été testées, comme précédemment au Swiss Tropical and Public Health Institute de Bâle à la fois sur stades sanguins de *P. falciparum* K1, amastigotes axéniques de *L. donovani*, mais également sur cellules de muscle squelettique de rat (L6) afin d'évaluer leurs activités et indices de sélectivité.

3.3.1 Activités antiplasmodiales

Tableau 26 : Activité antiplasmodiale des vismiones isolées de *P. glaberrimum* présentées par ordre décroissant d'activité.

Molécule	Structure	Activité <i>P. falciparum</i> K1 (µM)	IS <i>P. falciparum</i> K1/ L6 cells
Vismione C		0,71	7,59
Acétylvismione D		0,72	1,26
Acétylvismione F		0,97	1,62
Vismione D		1,03	0,83
Vismione H		1,78	0,48
Vismione M		1,82	1,24
Vismione F		2,61	3,19
Désacétylvismione H		2,65	1,29

Les molécules ont été testées sur des cultures sanguines de *P. falciparum* K1 (n = 2) par incorporation de l'hypoxanthine tritiée. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat L6 et macrophages murins (PMM) par test à la résazurine (paragraphe 10.2, p 240). Les valeurs de $CI_{50} < 10 \mu M$ sont surlignées en vert.

Références : activité antiplasmodiale : chloroquine $CI_{50} = 0,15 \mu M$ cytotoxicité : podophyllotoxine $CI_{50}(L6) = 19 nM$.

L'activité antiplasmodiale des vismiones isolées de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* est globalement la même quelle que soit la structure considérée avec des CI_{50} comprises entre 0,7 et 2,6 µM. Les activités antiplasmodiales de l'acétylvismione D et de la vismione H ont également été déterminées sur la souche chloroquino-sensible 3D7 de *P. falciparum* par test ELISA pLDH. Les activités mesurées sont respectivement de 3,2 et 18,4 µM.

Ces valeurs sont cohérentes avec celles déjà publiées dans la littérature (paragraphe 2.2.2, p 35). Par ailleurs celles-ci sont équivalentes à la toxicité évaluée sur cellules musculaires squelettiques de rat (L6) engendrant des indices de sélectivité proches de 1 ce qui indique que cette activité antiplasmodiale est en fait due à un phénomène de cytotoxicité non sélective.

3.3.2 Activités antileishmaniennes

3.3.2.1 Activités sur amastigotes axéniques de *Leishmania donovani*

L'activité cytotoxique des vismiones isolées vis-à-vis de macrophages murins sains (PMM) a également été mesurée afin de nuancer leurs indices de sélectivité, avant d'envisager d'évaluer leur activité antileishmanienne vis-à-vis de formes amastigotes intramacrophagiques de *Leishmania*.

Tableau 27 : Activités antileishmaniennes *in vitro* des vismiones isolées de *P. glaberrimum*.

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> Cl ₅₀ (μM)	IS <i>L. donovani</i> / L6	IS <i>L. donovani</i> / PMM
Désacétylvismione H		0,031	112	598
Vismione H		0,057	15	268
Vismione D		0,084	10	65
Vismione C		0,098	55	266
Acétylvismione D		0,149	6	478
Acétylvismione F		0,320	5	59
Vismione M		0,552	4	39
Vismione F		0,827	10	31

Les molécules ont été testées sur des cultures axéniques d'amastigotes de *L. donovani* (n = 2) par estimation de la viabilité cellulaire par test à la résazurine. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur cellules de muscle squelettique de rat L6 et macrophages murins (PMM) par test à la résazurine (paragraphe 10.2, p 240).

Références : activité antileishmanienne : miltéfosine Cl₅₀ = 114 nM ; cytotoxicité : podophylotoxine Cl₅₀(L6) = 19 nM ; Cl₅₀(macrophage) = 75 nM.

Les résultats confirment l'activité de l'acétylvismione D avec une valeur de Cl₅₀ cohérente par rapport aux résultats préliminaires obtenus antérieurement et à l'origine de ce travail (paragraphe 1, p 3), avec une activité de 149 nM contre 90 nM évaluée précédemment. L'indice de sélectivité vis-à-vis des cellules L6 diminue cependant fortement en passant de 136 à 6. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par une dégradation de la molécule en sa forme anthraquinone entre la réalisation des tests anti-*Leishmania* et de cytotoxicité, lors de l'évaluation initiale. L'un des produits de dégradation de l'acétylvismione D, la 3-géranyloxyémidine présente en effet une cytotoxicité supérieure à celle de la vismione.

De plus, l'ensemble des vismiones isolées de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* montrent de bonnes activités antileishmaniennes vis-à-vis des amastigotes axéniques de *L. donovani* avec des valeurs de Cl₅₀ inférieures au micromolaire et comparables, voire supérieures, à l'activité de la miltéfosine (Cl₅₀ = 114 nM).

Les molécules les plus actives s'avèrent être la désacétylvismione H et la vismione H avec des valeurs de CI_{50} respectivement de 31 et 57 nM. Les indices de sélectivité de ces molécules sont particulièrement encourageants. Ceux-ci sont en effet de 112 et 15 vis-à-vis des cellules musculaires squelettiques de rat (L6) et de 598 et 268 vis-à-vis des macrophages murins sains.

En termes de relation structure-activité, les analogues isolés se différencient par trois positions de substitutions : les positions 2 et 3 qui sont soit O-prénylées soit O-géranylées et la position 6 qui peut être O-acétylée. Comme le suggéraient les résultats préliminaires à ce travail, on observe qu'au niveau des substitutions du noyau vismione, la substitution en position 3 semble davantage favorable à l'activité. De plus, la substitution par une chaîne prényle par rapport à une chaîne de nature géranyle, en particulier lorsqu'elle intervient en position 3 mais également en position 2, semble également favorable à l'activité. Aucune règle ne se dégage en revanche pour le groupement acétyle en position 6.

Il sera intéressant d'évaluer l'activité antileishmanienne de la dihydroanthracénone (**201**) nouvellement isolée ainsi que les analogues synthétisés (**354** et **361-365**), non substituées sur les positions 2 et 3, pour confirmer l'intérêt de la position 3 sur l'activité antileishmanienne.

3.3.2.2 Activités sur promastigotes et amastigotes axéniques de *L. infantum*

Compte-tenu des très bonnes activités de la désacétylvismione H et de la vismione H, ces deux molécules ont également été testées à Toulouse sur une autre souche de *Leishmania* à tropisme viscéral, *L. infantum*, afin de confirmer les résultats observés. L'activité des molécules a aussi été évaluée sur les formes promastigotes disponibles à Toulouse. La cytotoxicité sur une autre souche de macrophages murins J774A.1 a également été estimée afin de confirmer les résultats précédents.

Tableau 28 : Activités antileishmaniennes et cytotoxiques de la désacétylvismione H (97) et de la vismione H (94) sur *L. infantum*.

Molécule	Promastigotes <i>L. infantum</i> CI_{50} (μ M)	Amastigotes axéniques <i>L. infantum</i> CI_{50} (μ M)	Macrophages J774A.1 CI_{50} (μ M)
Désacétylvismione H 97	> 0,3	0,077	> 0,3
Vismione H 94	> 0,3	0,03	> 0,3

Les molécules ont été testées sur des cultures de promastigotes et d'amastigotes axéniques de *L. infantum* (n = 3) par estimation de la viabilité cellulaire par test à la luciférase. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur macrophages sains J774A.1 par test MTT (n=3)
Références : activité antileishmanienne : Amphotéricine B CI_{50} (promastigotes) = 60 nM ; CI_{50} (amastigotes) = 240 nM ; cytotoxicité : doxorubicine CI_{50} = 30 nM.

Sur amastigotes de *L. infantum*, les CI_{50} de la désacétylvismione H (**97**) et de la vismione H (**94**) ont respectivement été évaluées à 76,9 et 30 nM. Ces valeurs sont comparables à celles mesurées sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, respectivement de 57 et 31 nM (Tableau 27) et convergent donc vers une bonne activité antileishmanienne de ces deux vismiones.

En revanche, sur les formes promastigotes du même parasite, les deux molécules ont montré des valeurs CI_{50} supérieures à 300 nM, indiquant une sélectivité d'activité en faveur des formes amastigotes qui font cliniquement sens.

En effet, les formes promastigotes sont les formes présentes chez le vecteur. Elles sont relativement éloignées à la fois sur le plan morphologique mais également sur le plan métabolique des formes amastigotes retrouvées chez l'hôte mammifère^{188,189}.

Les formes amastigotes axéniques, s'approchent davantage des formes présentes chez l'hôte mammifère mais ne sont qu'un modèle expérimental dont les résultats nécessitent d'être validés dans un contexte physiopathologique plus proche de celui de l'hôte. Ces formes sont induites suite à la pression d'un stress exogène réalisées par le changement des conditions de cultures des formes promastigotes. Ces cellules sont de ce fait généralement plus sensibles. Des expériences de protéomique ont par ailleurs montré que si elles partageaient davantage de similitudes avec les amastigotes intracellulaires que les promastigotes, le protéome des amastigotes axéniques différerait tout de même de manière non négligeable de celui des amastigotes intracellulaires¹⁹¹.

Les résultats d'activité de la désacétylvismione H et de la vismione H nécessitent donc d'être validés sur amastigotes intramacrophagiques.

Par ailleurs, la cytotoxicité de la vismione H a également été évaluée sur fibroblastes humain (NHDF) en culture primaire (paragraphe 10.1.2, p 240). Elle a montré une cytotoxicité de 2,7 μM équivalente à celles observées sur les autres souches de cellules mammifères testées, confirmant ainsi la sélectivité de la molécule vis-à-vis des formes amastigotes axéniques.

3.3.2.3 Activités sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*

Afin de valider les résultats obtenus sur amastigotes axéniques, les vismiones isolées de *P. glaberrimum* ont été testées sur un modèle d'amastigotes de *L. donovani* intramacrophagiques, correspondants au stade de développement rencontré chez l'individu infecté (Tableau 29).

Les vismiones montrent une faible activité sur les parasites intramacrophagiques avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre de la dizaine de micromolaire soit une perte d'activité de 3 logs par rapport au modèle amastigote axénique. La substance de référence, la miltéfosine, maintient quant à elle une activité du même ordre entre les deux modèles (0,114 μM et 3 μM respectivement). Les vismiones montrent donc une cytotoxicité équivalente entre les macrophages sains et les formes amastigotes intracellulaires, suggérant une absence de sélectivité. Il est tout de même observé que si à une même concentration, moins de macrophages survivent en présence des vismiones le pourcentage de survie des macrophages infectés est plus faible que celui des macrophages sains, indiquant une plus grande susceptibilité des cellules parasitées.

Tableau 29 : Activités antileishmaniennes des vismiones sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*.

Molécule	Structure	Activité <i>L. donovani</i> intraç (µM)	Cytotoxicité PMM (µM)	IS <i>L. donovani</i> / PMM
Désacétylvismione H		32	18	0,6
Vismione H		44	15	0,4
Vismione D		> 2	6	< 0,2
Vismione C		35	26	0,7
Acétylvismione D		> 66	71	< 1
Acétylvismione F		> 66	19	< 0,2
Vismione M		13	21	1,7
Vismione F		> 24	26	< 1

Les molécules ont été testées sur des cultures d'amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* (n = 1) par examen microscopique (paragraphe 10.2.3, p 241). Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur macrophages murins par test à la résazurine.

Références : activité antileishmanienne intracellulaire : miltéfosine Cl_{50} = 3 µM ; cytotoxicité : Cl_{50} (macrophage) = 75 nM.

Les tests de cytotoxicité sur macrophages sains et sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* ont cependant été réalisés à partir des mêmes solutions stock à plusieurs mois d'intervalle.

Compte-tenu de l'instabilité des vismiones dans le DMSO (paragraphe 7, p 129), il est possible que la solution testée sur amastigotes intramacrophagiques se soit dégradée, au moins en partie (bien que conservée à -80°C) expliquant en partie la faible activité des vismiones sur ce modèle.

Il est également possible que de par leur caractère physico-chimique, les vismiones ne soient pas capables d'atteindre les parasites au sein des macrophages. En effet, avant d'atteindre le parasite contenu dans la vacuole parasitophore à l'intérieur du macrophage, les molécules doivent traverser un certain nombre de membranes cellulaires.

Les valeurs indiquées ici sont en outre le résultat d'un seul essai (n=1) qui nécessitera d'être reconfirmé.

4 Conclusion

L'évaluation de l'activité biologique des extraits dichlorométhaniques de *Psorospermum* montrent que l'activité antiplasmodiale est essentiellement portée par les extraits d'écorces, de troncs et de tiges qui sont aussi ceux qui contiennent les proportions de vismiones les plus importantes. Certains extraits de fruits et de feuilles sont également porteurs d'une activité antiplasmodiale suggérant la présence d'autres molécules porteuses d'activité au sein de ces extraits.

Les extraits aqueux, plus proches en terme de composition des préparations utilisées traditionnellement dans le traitement du paludisme, se montrent nettement moins actifs. Ce sont néanmoins là-aussi essentiellement les extraits d'écorces correspondant à la partie utilisée traditionnellement qui montrent les activités les plus marquées.

L'activité antileishmanienne des extraits dichlorométhaniques d'écorces, de tiges, et de troncs de diverses espèces de *Psorospermum* est aussi la plus marquée avec des activités de l'ordre de la centaine de ng/mL et des indices de sélectivité supérieurs à 10.

Les vismiones naturelles isolées de l'écorce de *P. glaberrimum* ont montré des activités micromolaires vis-à-vis de *P. falciparum*. Cette activité étant équivalente à celle observée sur cellules mammifères, l'activité antiplasmodiale observée pour ces molécules correspond en réalité à une cytotoxicité non sélective.

Des résultats bien plus encourageants concernent l'activité antileishmanienne des vismiones sur amastigotes axéniques des deux espèces de *Leishmania* à tropisme viscéral, *L. donovani* et *L. infantum*. L'ensemble de ces molécules a ainsi montré des activités submicromolaires.

C'est notamment le cas de la vismione H (**94**), présente en forte concentration dans l'extrait d'écorces de *P. glaberrimum*, qui a révélé une activité de l'ordre de la dizaine de nanomolaires, assortie d'une sélectivité intéressante vis-à-vis de différents types de cellules mammifères en culture. L'activité des vismiones sur amastigotes intramacrophagiques est toutefois moins probante dans une approche préliminaire, avec une activité équivalente à la toxicité exercée sur macrophages sains. Ces résultats découlant toutefois d'un essai isolé avec une solution contenant des molécules potentiellement dégradées, des confirmations devront être réalisées dans un second temps.

Enfin, les différentes anthrones et anthraquinones synthétiques testées, qu'elles soient issues de chimiothèques ou de la synthèse de dérivés de l'émodine, n'ont pas montré d'activités antiplasmodiales ou antileishmaniennes majeures avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre du micromolaire dans le meilleur des cas et des indices de sélectivité plutôt défavorables. Ces résultats d'activité n'ont par ailleurs pas permis de définir de relation structure-activité, aucune tendance particulière ne se dégageant par rapport à l'importance d'une substitution vis-à-vis de l'activité ou de la sélectivité des molécules. En revanche, ces criblages ont permis de confirmer l'intérêt du noyau vismione au regard de l'activité antileishmanienne, au détriment des formes anthraquinones et anthrones, bien moins actives et moins sélectives.

L'approche synthétique a en outre permis d'obtenir un premier outil pharmacologique que nous emploierons par la suite dans une étude protéomique comparative (paragraphe 5.2, p 215).

5 Perspectives

5.1 Nouveaux tests sur amastigotes intramacrophagiques

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité *in vitro* des vismiones sur amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani* se sont avérés plutôt défavorables montrant une absence de sélectivité des molécules entre les macrophages sains et les macrophages infectés (paragraphe 3.3.2.3, p 212). Néanmoins, à la suite de problèmes de culture, les molécules ont été testées à plusieurs mois d'écart entre les 2 modèles. Compte-tenu de la dégradation rapide des vismiones en solution dans le DMSO (paragraphe 7, p 129), ces résultats n'invalident pas complètement l'activité des molécules sur le modèle intramacrophagique, ces dernières ayant pu se dégrader, au moins partiellement, dans l'intervalle de temps entre les deux expériences. Une nouvelle évaluation de l'activité de la vismione H (**94**) sera prochainement réalisée en parallèle sur macrophages sains et sur macrophages infectés respectivement par *L. donovani* et *L. infantum* avec une préparation extemporanée des solutions à tester.

5.2 Approche protéomique

Le dérivé PEGylé de l'émodine (**274**) obtenu par une approche synthétique (paragraphe 3.2, p 170) a montré une activité modérée de 2,4 μM sur amastigotes axéniques de *L. donovani*, associée à un bon indice de sélectivité, supérieur à 96 vis-à-vis des cellules musculaires squelettiques de rat (L6) (paragraphe 3.2, p 207).

L'évaluation *in vitro* de cette molécule sur *L. infantum* a montré des activités équivalente à celles observées pour *L. donovani* sur les formes promastigotes ($\text{CI}_{50} = 7,8 \mu\text{M}$) et amastigotes axéniques ($\text{CI}_{50} = 11,2 \mu\text{M}$). Cette activité est également associée à une sélectivité intéressante sur macrophages sains (J774A.1, $\text{CI}_{50} > 50 \mu\text{M}$).

Ce dérivé a été synthétisé afin d'envisager de le coupler à un fluorophore pour faire de la microscopie de fluorescence ou de le fixer à la surface de billes d'agarose fonctionnalisées afin de réaliser une chromatographie d'affinité d'un lysat parasite et isoler une cible potentielle de la molécule.

L'outil pharmacologique ainsi synthétisé présente toutefois une activité près de 100 fois inférieure à celle de la vismione H, notre molécule chef de file ($\text{CI}_{50} = 30 \text{ nM}$ sur amastigotes axénique de *L. infantum*, $\text{IS} > 10$ / macrophages sains J774A.1, paragraphe 3.3.2.2, p 211).

Compte-tenu de cette différence d'activité, nous avons souhaité savoir si les deux molécules, vismione H et émodine PEGylée (**274**) pouvaient présenter un mécanisme d'action commun sur amastigotes de *L. infantum*.

Dans ce but, nous avons développé une collaboration avec d'une part l'équipe PharmaDEV (UMR 152 IRD-UPS) à Toulouse et le Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (UMR 7178 CNRS-Unistra), afin d'évaluer l'impact de ces deux molécules sur le protéome de *L. infantum*.

Des cultures d'amastigote axénique de *L. infantum* ont été incubées au contact de l'une ou l'autre des deux molécules à leurs valeurs respectives de CI_{50} et les protéines parasitaires ont ensuite été extraites.

Une première analyse différentielle des profils protéomiques des parasites traités par chacune des molécules et des parasites non traités est en cours (Figure 132).

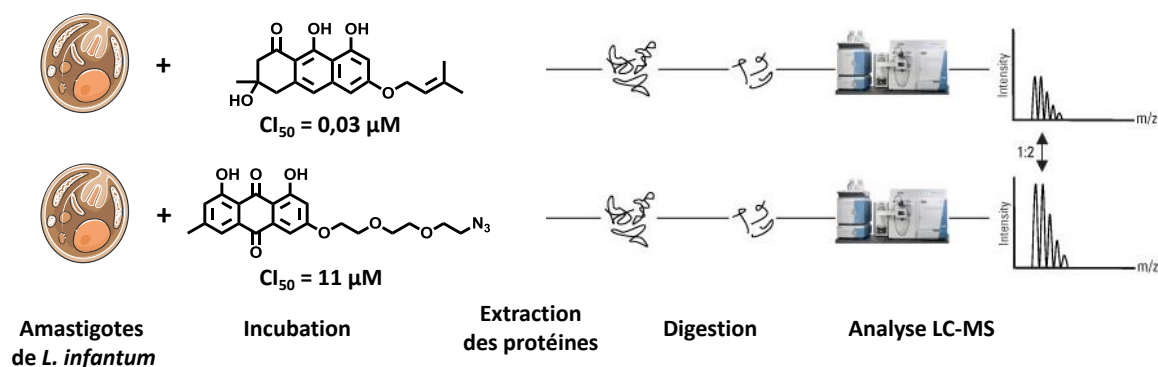


Figure 132 : Analyse protéomique comparative d'amastigotes axéniques de *L. infantum* en culture incubés en présence de la vismione H (94) ou de l'émodine PEGylée (274).

Après lyse de la culture parasitaire, les protéines parasitaires sont extraites. Une digestion trypsique est réalisée *in-gel* SDS-PAGE sur les protéines parasitaires. Les peptides obtenus sont analysés par SM après extraction. Les spectres de fragmentation expérimentaux des peptides générés sont comparés aux profils protéomiques théoriques attendus pour le protéome connu de *L. infantum* (banque de données Uniprot contenant 8081 protéines de *L. infantum* identifiées), à l'aide d'un algorithme. L'expérience est réalisée parallèlement sur des cultures de *L. infantum* non traitées, traitées par la vismione H et par l'émodine PEGylée. Quatre réplicats biologiques par condition sont analysés.

Les profils ainsi obtenus devraient nous permettre de constater si les deux molécules impactent de la même manière le profil protéique des parasites, ce qui pourrait indiquer un mécanisme d'action commun. La comparaison de ces profils avec ceux des parasites non traités pourraient en outre nous permettre de poser des hypothèses sur le mécanisme d'action des molécules par la mise en évidence d'un impact sur des voies métaboliques bien particulières.

Dans le cas où les deux molécules provoqueraient les mêmes modifications du protéome parasitaire, une chromatographie d'affinité réalisée avec un lysat de parasite sur des billes d'agarose fonctionnalisées avec l'anthraquinone PEGylée (274) pourrait nous permettre d'isoler une éventuelle cible protéique. Celle-ci serait dans un second temps analysée par une nouvelle approche protéomique.

5.3 Tests *in vivo* sur modèle murin de leishmaniose viscérale

Une collaboration est actuellement en cours avec le Pr Philippe Loiseau (UMR 8076 CNRS BioCIS) afin de tester l'efficacité de la vismione H sur un modèle murin de leishmaniose viscérale. Au cours de ce test, la toxicité de la molécule chez l'animal sera également évaluée.

5.4 Tests sur espèces à tropisme cutané

Des enquêtes ethnobotaniques au Pérou ont montré le recours à l'exsudat du tronc de *Vismia tomentosa* dans la prise en charge de symptômes apparentés à la leishmaniose cutanée¹⁹⁹. Ce genre botanique étant très proche du genre *Psorospermum* (paragraphe 1.1.1, p 9) et l'écorce de certaines espèce du genre *Vismia* ayant également permis d'isoler certaines vismiones (Annexe 2, p 303), il est probable que ces molécules participent à l'activité du remède traditionnel.

Les principales vismiones isolées et certains extraits d'écorces vont donc également être prochainement testées sur des espèces de *Leishmania* à tropisme cutané (*L. amazonensis*, *L. guyanensis* et *L. brasiliensis*) dans le cadre d'une collaboration récemment initiée avec le Dr Michel Sauvain au sein du laboratoire mixte international LAVI (UMR 152 IRD-UPS, Université Cateyano Heredia, Lima).

Des modèles de macrophages axéniques, intramacrophagiques et des tests cutanés *in vivo* chez la souris sont notamment envisagés.

5.5 Hypothèses concernant le mécanisme d'action

Les investigations en cours concernant le mécanisme d'action des vismiones reposent sur l'hypothèse d'une interaction avec une éventuelle cible protéique au sein de la cellule. Celle-ci sera investiguée au travers d'une étude protéomique déjà entamée.

Néanmoins, les propriétés physico-chimiques de ces molécules laissent également envisager d'autres mécanismes d'action potentiels. Les vismiones sont susceptibles de donner naissance à une multitude de métabolites : anthrones, anthraquinones, bianthrones (paragraphe 7, p 129). Elles pourraient donc agir au moins en partie comme prodrogues permettant la génération *in situ* de quinones. Cette hypothèse d'effet « prodrogue » s'appuie sur la différence d'activités observées sur amastigotes axéniques de *Leishmania* entre les vismiones et leurs métabolites (activité de l'ordre de 100 fois supérieure pour les vismiones par rapport aux anthraquinones correspondantes). Dans cette hypothèse, la forme vismione pourrait notamment permettre l'accès au site d'action de nos composés.

Les quinones sont connues pour participer à un certain nombre de phénomènes oxydatifs au niveau biologique (Figure 133). La principale caractéristique des quinones vient de leurs propriétés rédox qui sont liées à la formation de systèmes aromatiques. Le mécanisme de la cytotoxicité des quinones fait intervenir une augmentation du stress oxydant en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent réagir directement avec les acides nucléiques, les lipides et les protéines conduisant à des dommages cellulaires³³⁶ qui provoquent la mort du parasite. Des composés quinoniques ayant montré des activités antileishmaniennes comme la mitomycine C, la doxorubicine³³⁷, la plumbagine et la 2-méthoxy-1,4-naphtoquinone³³⁸ exercent leur activité en inhibant la trypanothione réductase, une enzyme responsable du maintien de l'équilibre rédox intracellulaire chez les trypanostidés. Le maintien de cet équilibre rédox chez les parasites est très important pour leur survie car ils ne doivent pas uniquement éliminer les métabolites toxiques qu'ils produisent mais aussi lutter contre le stress oxydant exercé sur eux par le système immunitaire de l'hôte³³⁹.

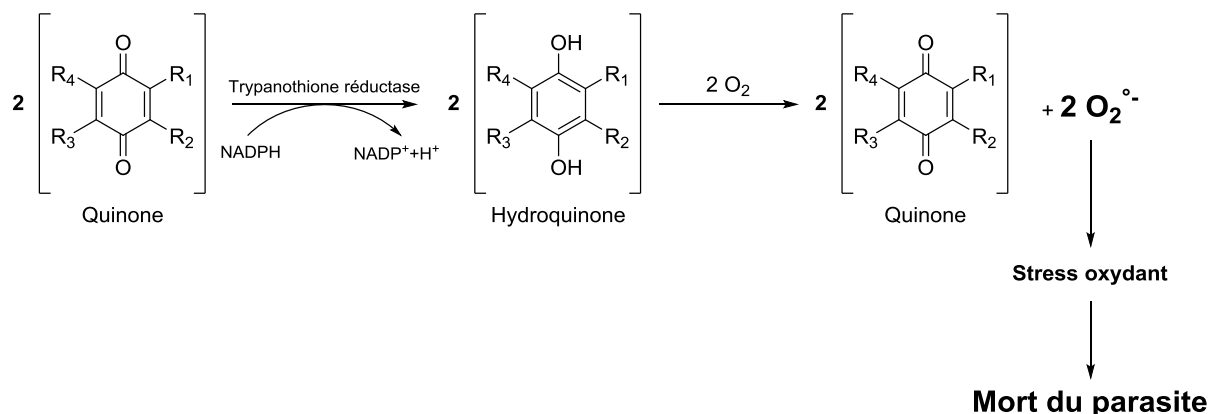


Figure 133 : Cycle rédox des quinones et génération de métabolites actifs. D'après Pal *et al.*³⁴⁰.

De par leur structure plane, les anthraquinones dérivées des vismiones pourraient également exercer un effet intercalant au niveau de l'ADN conduisant à l'inhibition de l'activité des topoisomérases II³⁴¹.

5.6 Possibilités de valorisation des vismiones

Les extraits dichlorométhaniques d'écorce de *Psorospermum* et les vismiones qui en ont été isolées présentent des activités antileishmaniennes intéressantes. C'est notamment le cas de la vismione H (94) dont l'activité est de l'ordre de la dizaine de nanomolaires sur des modèles *in vitro* d'amastigotes axéniques de 2 espèces de *Leishmania* à tropisme viscéral, *L. donovani* et *L. infantum*. Cette molécule présente par ailleurs des indices de sélectivité relativement bons (> 10) vis-à-vis de plusieurs souches de cellules mammifères en culture.

Ces résultats nécessitent d'être reconfirmés dans un modèle intramacrophagique *in vitro* plus proche de la physiopathologie associée à la maladie ainsi que sur des modèles animaux.

L'instabilité de ces molécules en solution et leur toxicité tout de même non négligeable compromettent leur développement éventuel pour une utilisation thérapeutique systémique.

Une approche de chimie médicinale sera poursuivie dans le but de développer des analogues éventuellement plus stables et pouvant présenter des améliorations sur le plan de l'activité et de la sélectivité des molécules.

L'étude du mécanisme d'action par lequel s'exerce l'activité de ces molécules sera également approfondie afin de guider l'approche de chimie médicinale de manière rationnelle.

Il est cependant également probable que l'activité de ces molécules soit elle-même directement liée à leur réactivité, empêchant ainsi l'amélioration de ces différents paramètres.

La valorisation de ces molécules ou d'extraits végétaux enrichis pourrait toutefois être envisagée à travers une utilisation exclusivement topique au sein d'un véhicule empêchant leur dégradation.

Ce mode d'administration, proche de l'utilisation traditionnelle de la plante pour toutes sortes de problèmes cutanés (paragraphe 1.2.2, p 13), permettrait également d'éviter une partie des effets indésirables qui pourraient être associés à leur utilisation.

Conclusion générale

Les travaux menés antérieurement au laboratoire à travers une approche ethnopharmacologique ont conduit à mettre en évidence les propriétés antiprotozoaires d'espèces végétales appartenant au genre *Psorospermum* (Hypericaceae).

Une étude phytochimique de ces espèces antérieure au travail présenté ici a conduit à isoler une série de molécules de nature anthranoïde qui se sont montrées être le support de cette activité. Parmi les molécules isolées, les anthrones prénylées dérivées de l'émodyne et une dihydroanthracénone prénylée appartenant à la famille des vismiones ont notamment montré des activités submicromolaires sur des formes amastigotes axéniques de *Leishmania donovani* en culture. D'autres dérivés de nature anthranoïde ont également montré des activités antiplasmodiales intéressantes, de l'ordre du micromolaire ou inférieures. Ces activités se sont en outre avérées assorties d'une sélectivité acceptable, supérieure au moins d'un facteur dix en comparaison avec la cytotoxicité observée sur cellules mammifères.

Ces résultats préliminaires ont conduit à définir les objectifs du travail présenté ici.

L'objectif principal a consisté à confirmer les activités antiprotozoaires observées de ces anthranoïdes, avant d'en explorer les déterminants structuraux.

La démarche mise en œuvre a fait appel à une stratégie convergente reposant d'une part sur une approche phytochimique, afin d'isoler d'autres analogues naturels des molécules ayant montré une bonne activité biologique et d'autre part sur une approche synthétique, afin de réaliser une étude de relation structure-activité. Les molécules ainsi obtenues ont été évaluées sur différents modèles et différentes espèces de parasites *in vitro*, à travers la mise en place de plusieurs collaborations, afin de déterminer leurs activités antileishmaniennes et antiplasmodiales.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de collecter de nouveaux échantillons de *Psorospermum*. J'ai pour cela réalisé un séjour de deux mois au Cameroun afin de collecter des échantillons et réaliser des extraits bruts permettant d'envisager l'isolement des molécules d'intérêt en quantité suffisante. Ce travail a été réalisé au travers d'une collaboration avec le Dr Bruno Ndjakou-Lenta à l'École Normale Supérieure de Yaoundé. En plus de l'espèce d'intérêt, *Psorospermum glaberrimum*, neuf autres espèces du genre *Psorospermum* ont été collectées afin d'envisager l'isolement de possibles analogues infragénériques et d'étudier la répartition des anthranoïdes dans les différentes parties et les différentes espèces du genre *Psorospermum*.

Un premier fractionnement de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* selon les techniques conventionnelles décrites dans la littérature et appliquées à ce type d'extraits ont conduit à l'isolement de deux vismiones [vismione H (**94**) et acétylvismione D (**8**)] accompagnées de deux anthraquinones. Ce premier fractionnement a également permis d'appréhender l'instabilité des molécules que sont les vismiones. En effet, les anthraquinones alors isolées se sont avérées être des artéfacts liés à la dégradation des vismiones lors du processus de purification.

Pour pallier à ces phénomènes de dégradation, une autre stratégie de purification a été développée. Ceci nous a conduits à initier une collaboration avec le Pr Jean-Hugues Renault de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (UMR CNRS 7312), afin de développer un protocole de purification par Chromatographie de Partage Centrifuge.

L'étude des systèmes de solvants nécessaires au développement de cette méthode de séparation nous a conduit à mettre en évidence un système quadriphasique permettant de préconcentrer l'extrait brut, en obtenant respectivement deux fractions enrichies, tout en le préservant des dégradations. L'une contenant les vismiones les plus apolaires qui sont aussi majoritaires dans l'extrait [vismione H (**94**) et acétylvismione D (**8**)] et l'autre correspondant à moins de 20 % en masse de l'extrait de départ et contenant des vismiones minoritaires plus polaires.

Un fractionnement par techniques chromatographiques répétées en polarité de phase inverse de la fraction enrichie en vismiones polaires a permis l'isolement de 7 vismiones supplémentaires.

Le fractionnement de la fraction apolaire contenant la vismiones H (**94**) et l'acétylvismione D (**8**) par Extraction de Partage Centrifuge (EPC) suivie d'une étape de purification en chromatographie flash en polarité de phase inverse a permis d'isoler plusieurs centaines de milligrammes de ces molécules avec un pourcentage de recouvrement de l'ordre de 80 % à partir de l'extrait brut et une pureté supérieure à 98 % estimée en RMN ¹H.

Les quantités ainsi obtenues ont notamment permis d'évaluer certains paramètres d'instabilité de ces molécules en solution et leurs propriétés de fluorescence intrinsèque.

Des tentatives de caractérisation de la configuration du carbone asymétrique, jusqu'alors non étudiée pour cette famille de molécules, ont également été explorées. Les propriétés physico-chimiques des vismiones n'ont cependant pas permis cette caractérisation qui fera l'objet de travaux ultérieurs au laboratoire tout comme l'étude des conditions permettant l'obtention de dérivés hémisynthétiques de ces molécules naturelles.

Le fractionnement par EPC appliqué à la fraction polaire a conduit à isoler une nouvelle dihydroanthracénone, très largement minoritaire dans l'extrait, la 6-acétylatrochrysonne (**201**) qui s'avère probablement être un intermédiaire biosynthétique des vismiones acétylées.

Par ailleurs, l'étude de la répartition des vismiones dans les différents organes des différentes espèces du genre *Psorospermum* a permis de dégager certaines tendances suggérant l'intérêt chimiotaxonomique de certaines de ces molécules, qui pourraient contribuer à la classification de cette famille botanique encore relativement mal résolue sur le plan taxonomique.

L'activité antileishmanienne et antiplasmodiale de ces vismiones a été évaluée au travers de différentes collaborations parmi lesquelles une nouvelle collaboration avec le Dr Éric Deharo de l'Unité ParmaDev (UMR 152 IRD-UPS) à Toulouse a été initiée.

Les résultats montrent une activité submicromolaire pour l'ensemble des vismiones sur les modèles amastigotes axéniques de deux espèces de *Leishmania* à tropisme viscéral.

Ces activités sont assorties d'une sélectivité supérieure d'au moins un facteur 10 pour les molécules les plus actives par rapport à l'activité antiplasmodiale et à la cytotoxicité évaluée sur différentes souches de cellules mammifères.

C'est notamment le cas de la vismione H (**94**) qui a montré une activité de l'ordre de la dizaine de nanomolaires, devenant ainsi notre nouveau chef de file.

L'activité des vismiones sur amastigotes intramacrophagiques s'est cependant avérée moins probante dans une approche préliminaire, avec une valeur d'activité équivalente à la toxicité exercée sur macrophages sains. Ces résultats découlent toutefois d'un essai isolé avec un échantillon potentiellement dégradé. Des confirmations devront donc être réalisées ultérieurement.

L'activité antiplasmodiale de ces molécules, quant à elle, ne s'est pas montrée sélective avec des valeurs équivalentes à la cytotoxicité évaluée sur cellules mammifères.

L'approche synthétique qui initialement devait compter pour une part moins importante dans ce travail de thèse, a conduit à la mise au point de plusieurs stratégies de synthèse de molécules antranoïdes qui se sont avérées moins aisées à synthétiser que prévu.

Dans un premier temps la synthèse totale de l'émodine (**13**) a été effectuée, permettant d'accéder à une série d'antraquinones 3-O-alkylées diversement substituées.

Différentes voies d'accès aux anthrones correspondantes ont été envisagées sans néanmoins permettre d'obtenir les dérivés souhaités.

Une seconde stratégie a alors été développée afin d'obtenir de manière convergente des dihydroanthracénones et les anthrones correspondantes. Celle-ci a pour le moment permis l'obtention de quelques dérivés dihydroanthracénones dont les activités antiprotozoaires sont actuellement en cours d'évaluation.

Un criblage de 32 anthrones et antraquinones provenant de diverses chimiothèques et des 13 dérivés anthrones et antraquinones synthétisés au laboratoire n'a pas permis de mettre en évidence d'activités antileishmaniennes ou antiplasmodiales particulières pour ces molécules avec, dans la plupart des cas, des sélectivités médiocres.

Ces résultats n'ont pas non plus permis de dégager d'informations de relation structure-activité permettant de mettre en évidence l'intérêt d'un type de substitution pour l'activité antiprotozoaire de ces molécules synthétiques.

Les résultats obtenus à travers ces différentes approches ouvrent des perspectives qui pourront être étudiées par le doctorant qui prendra la suite de ce travail dès cette année.

L'intérêt antileishmanien des vismiones et les déterminants de leur mécanisme d'action nécessitent notamment d'être approfondis.

Les activités sur modèle d'amastigotes intramacrophagiques dont les résultats ne se sont pas montrés satisfaisants devront être confirmées.

Par ailleurs de nouvelles collaborations ont été mises en place pour mieux caractériser l'activité de ces molécules.

L'évaluation de l'activité *in vivo* de la vismione H (**94**) sur modèle murin de leishmaniose viscérale est actuellement en cours au travers d'une collaboration avec le Pr Philippe Loiseau (UMR 8076 CNRS BioCIS).

L'activité de la vismione H sera également évaluée sur différents modèles *in vitro* et *in vivo* de leishmaniose cutanée en collaboration avec le Dr Michel Sauvain au sein du laboratoire mixte international LAVI (UMR 152 IRD-UPS, Université Cateyano Heredia, Lima).

Par ailleurs, une étude protéomique comparative est actuellement en cours, en collaboration avec d'une part l'équipe du Dr Éric Deharo pour la réalisation des cultures de *Leishmania* et d'autre part le Dr Christine Schaeffer du Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (UMR 7178 CNRS/Unistra) pour l'analyse protéomique.

Les résultats attendus au travers de cette approche devraient nous permettre de mieux cerner le mécanisme d'action de ces molécules.

Le croisement des données ainsi obtenues avec une approche de chémoinformatique est actuellement réalisé en collaboration interne avec le Dr Didier Rognan de l'équipe de Chémogénomique Structurale (UMR 7200 CNRS/Unistra).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse m'ont permis de me confronter à une multitude d'approches, de techniques et de collaborations qui ont été particulièrement enrichissantes.

Ces travaux seront valorisés sous la forme de deux publications, actuellement en cours de rédaction, reprenant d'une part la caractérisation phytochimique des vismiones isolées de *P. glaberrimum* associée aux activités antiparasitaires mises en évidence et d'autre part les résultats concernant les dérivés antranoïdes synthétiques. Par ailleurs une revue sur les dihydroanthracénones isolées de sources végétales est également en préparation.

La recherche de nouvelles molécules antiprotozoaires et notamment antileishmaniennes est particulièrement importante afin de limiter l'impact humain dramatique qu'exercent ces parasitoses à travers le monde.

Si les vismiones, de par leur réactivité latente, ne permet pas d'envisager en l'état leur utilisation en thérapeutique, j'espère que l'étude menée ici pourra contribuer, très modestement, à la compréhension de certains mécanismes pouvant aboutir un jour à une application.

Chapitre V :

Experimental section

1 General experimental procedure

Microwave irradiations were performed using a BIOTAGE Smith Creator apparatus. Flash chromatography was performed on silica gel (30 μm , Interchim) or RP-18 (30 μm , Interchim) prepacked columns using a Spot Liquid chromatography apparatus from Armen Instrument. Semipreparative HPLC was performed using Sunfire C18OBD 5 μm 19x 150 mm column on a PLC 2020 apparatus from Gilson or using Waters XBridge prepshield RP18 OBD 5 μm 19x250 mm column on a Gilson semipreparative system equipped with 331/332 pumps, 156 UV/Vis detector and GX271 liquid handler.

Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out on Fluka aluminum sheets silica gel 60 F254. UV-visible HPLC analysis were performed using Ascentis express C18 2.7 μm 4.6x75 mm column on an Agilent 1200 series apparatus

NMR spectra were recorded on a Bruker 500 MHz, Ultrashield+, Avance III BBFO+ probe spectrometer, a Bruker Avance III 400 MHz BBFO+ probe spectrometer for ^1H and 100 MHz for ^{13}C , and a Bruker Avance 300 MHz dual probe spectrometer for ^1H . Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual solvent and coupling constants (J) are reported in hertz (Hz). Signals are described as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quin (quintuplet), sxt (sextuplet), spt (septuplet), m (multiplet), dd (doublet of doublets), dt (doublet of triplets), dq (doublet of quadruplets), td (triplet of doublets), tq (triplets of quadruplets), tsxt (triplet of sextuplets), tspt (triplet of septuplets), qspt (quadruplet of septuplets), br s (broad singlet), br d (broad doublet), br t (broad triplet) and br spt (broad septuplet). Deuterated solvents were purchased from Sigma Aldrich or Euriso-top®. HRMS were obtained on an Agilent Technologies 6520 Accurate-Mass Q.Tof LC/MS apparatus using electrospray ionization mode and time-of-flight analyzer (ESI-TOF). BRMS were obtained on an Agilent Technologies 1200RRLC with 5973B quadrupole analyzer apparatus using electrospray or APCI ionization mode. Specific rotations were measured with a Jasco 2000 apparatus using a 10 cm cell with a Na 589 nm filter.

2 Collection of plant material

2.1 Collection of *Psorospermum* species

Psorospermum species have been collected in May 2015 in Cameroon according to the data in Table 1. The plants have been identified by Mr. Victor Nana, botanist at the National Herbarium of Cameroon where voucher specimens have been deposited.

Table 1 : Botanical identification and voucher specimens of collected *Psorospermum* species.

Specie	Voucher number	Date of collection	Locality
<i>P. adamauense</i> Engl.	41149HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. corymbiferum</i> Hochr.	49966HNC	05/05/2013	Ekombitie
<i>P. corymbiferum</i> Hochr.	4149HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. febrifugum</i> Spach	26345SRFcam	12/05/2013	Bangoua
<i>P. floribundum</i> Hutch. & Dalziel	B41150HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. glaberrimum</i> Hochr.	-	05/05/2013	Ekombitie
<i>P. glaberrimum</i> Hochr.	38061HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. glaucum</i> Engl.	41148HNC	05/05/2013	Ekombitie
<i>P. guineense</i> (L) Hochr.	-	11/05/2013	Balatchi
<i>P. kerstingii</i> Engl.	41147HNC	11/05/2013	Boneck
<i>P. aurantiacum</i> Engl.	52651HNC	11/05/2013	Balatchi
<i>P. senegalense</i> Spach	39946HNC	05/05/2013	Ekombitie

The plants have been separated into different parts (bark, trunk, stems, leaves and fruits) depending on the available collected material, cut in small pieces and air dried. About 100 g of each dried sample has been reserved for further extractions in France. The remaining samples have been ground with properly cleaned gristmill on the market (Biyem Assi, Yaounde).

2.2 Collection of plant material for vismiones investigation

Whole plant of *Hypericum perforatum* L. (end of flowering) was collected in Cosswiller (67310, France 23/08/2014). Stems of *Hypericum hookerianum* Wight & Arn were collected in Reims (51100, France 12/09/2014). Both have been botanically identified by myself. Leaves of *Aloe ferox* Mill., *Aloe marlothii* Alwin Berger, *Aloe vera* (L.) Burm.f. and bark and leaves of *Clusia major* L. were collected in Strasbourg botanical garden (Strasbourg, France) with Frederic Tournay, collection manager. Fruits of *Garcinia mangostana* L. were purchased at Auchan Baggersee (Illkirch, France). *Hypericum* samples were air dried and the others have been lyophilized.

3 Extraction

3.1 Methylene chloride extractions

The *Psorospermum* plant samples have been extracted twice with methylene chloride by 24 h maceration at room temperature ($30 \pm 5^\circ\text{C}$, Yaoundé) with a solvent ratio of 1/10 (m:v) and filtrated over cellulose filter. The filtrates were evaporated under atmospheric pressure without exceeding 40°C . The extraction parameters and codification for each sample are reported in Table 8, p 83.

Effort was made on bark, trunk and stem extracts with large quantities of raw material engaged in order to use extracts for a large scale production of vismione. Other extracts were made in small quantities to investigate the occurrence and repartition of vismiones among different plant parts and species.

Other plant samples have been extracted twice with methylene chloride by 24h maceration at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, Strasbourg) with a solvent ratio of 1/10 (m:v) and filtrated over cellulose filter. The filtrates were evaporated under vacuum. The extraction parameters and codification for each sample are reported in Table 2.

Table 2 : Methylene chloride extractions for vismione investigation.

Species	Plant part	Dry mass (g)	Extract mass (g)	Extraction yield (%)
<i>Hypericum perforatum</i>	Whole plant	5.02	0.357	7.1
<i>Hypericum hookerianum</i>	Stems	7.72	0.158	2.1
<i>Aloe ferox</i>	Leaf	5.01	0.105	2.1
<i>Aloe marlothii</i>	Leaf	5.02	0.112	2.2
<i>Aloe vera</i>	Leaf	5.07	0.111	2.2
<i>Clusia major</i>	Leaf	4.43	0.425	9.6
	Bark	5.00	0.294	6.0
<i>Garcinia mangostana</i>	Pericarp	4.93	0.750	15.0

3.2 Water extractions

In order to investigate the activities of extracts closer to traditional remedies, decoctions in desionized water have been made. Dry powder of the different plant samples were soaked in water with a solvent ratio of 1/10 (m:v) and boiled during 20 min after ebullition begun. Extracts were then filtrated over cellulose and a fraction of the filtrate was immediately lyophilized for further bioactivity and analytical studies. The extraction parameters and codification for each sample are reported in Table 3.

Table 3 : Water extractions of *Psorospermum* samples.

Species	Locality	Plant part	Code	Dry mass (g)	Portion lyophilized	Extract mass (g)	Extraction yield (%)
<i>P. adamauense</i>	Boneck	Leaf	APAF	2.108	0.35	0.1735	23.5
		Fruit	APAT	2.262	0.32	0.0488	6.8
		Stem	APAFr	2.232	0.33	0.2351	31.6
<i>P. corymbiferum</i>	Ekombitie	Fruit	APCE2Fr	2.143	0.26	0.1778	31.4
		Trunk	APCE2Tc	2.111	0.33	0.0621	8.8
	Boneck	Leaf	APCEF	2.13	0.33	0.1448	20.9
		Fruit	APCEFr	2.051	0.33	0.2175	32.6
<i>P. febrifugum</i>	Bangoua	Leaf	APFEF	2.336	0.35	0.1848	22.6
		Fruit	APFFr	2.073	0.33	0.1867	27.7
		Stem	APFT	2.012	0.45	0.0644	7.1
<i>P. floribundum</i>	Boneck	Leaf	APFLOF	2.221	0.45	0.2242	22.4
		Fruit	APFLOFr	2.385	0.22	0.1548	29.4
		Trunk	APFLOTc	2.358	0.34	0.052	6.5
<i>P. glaberrimum</i>	Ekombitie	Fruit	APGEFr	2.602	0.42	0.3402	30.8
	Boneck	Bark	APGE2E	2.17	0.36	0.0984	12.6
		Leaf	APGE2F	2.179	0.31	0.1451	21.4
		Fruit	APGE2Fr	2.239	0.42	0.2849	30.0
		Stem	APGE2T	2.304	0.29	0.0432	6.5
Trunk	APGE2Tc	2.096	0.3	0.0432	6.9		
<i>P. glaucum</i>	Ekombitie	Leaf	APGLOF	2.139	0.39	0.1473	17.6
		Fruit	APGLOFr	2.521	0.29	0.2229	30.9
		Stem	APGLOT	2.353	0.34	0.0521	6.5
<i>P. guineense</i>	Balatchi	Bark	APGUE	2.231	0.35	0.1486	19.0
		Leaf	APGUF	2.128	0.27	0.1301	22.9
		Fruit	APGUFr	2.181	0.42	0.2651	28.7
		Stem	APGUT	2.295	0.29	0.0556	8.2
		Trunk	APGUTc	2.404	0.39	0.0426	4.6
<i>P. kerstingii</i>	Boneck	Leaf	APKF	2.04	0.4	0.1678	20.6
		Fruit	APKFr	2.087	0.31	0.1736	26.7
		Stem	APKT	2.336	0.33	0.0587	7.5
		Trunk	APKTc	2.204	0.34	0.0621	8.3
<i>P. aurantiacum</i>	Balatchi	Bark	APOT	2.385	0.37	0.0776	8.8
		Leaf	APOF	2.121	0.32	0.1209	17.9
		Fruit	APOFr	2.076	0.38	0.1572	20.0
<i>P. senegalense</i>	Ekombitie	Leaf	APSEF	2.081	0.44	0.2403	26.4
		Fruit	APSEFr	2.09	0.39	0.1704	21.0

4 HPLC analysis of the extracts and vismiones quantification

4.1 HPLC method "Vismione"

Apparatus	HPLC Agilent 1200 series				
Method name	Vismione				
Time (min)	0	7.30	10	10.30	13.30
Solvent A: H₂O 0.1 % TFA	95	0	0	95	95
Solvent B: ACN 0.1 % TFA	5	100	100	5	5
Column	Ascentis Express C18 (7.5cm x 4.6mm x 2.7 µm)				
Temperature	25 °C				
Injection volume	5 µl				
Flow rate	1.600 ml/min				
Detection	190 to 550 nm				

4.2 Calibration curves

Calibration curves were made for vismione H (**94**) and acetylvismione D (**8**) with standard solutions with concentrations ranging from 0.4 g/mL to 3.125 µg/mL in acetonitrile. These solutions were made in triplicate by cascade dilution from three independent weight determinations of about five milligrams. Samples were analyzed with "Vismione" HPLC method and chromatograms were integrated at 280 nm.

4.3 Vismiones quantification

About 5 mg of the methylene chloride extracts were dissolved in acetonitrile to a concentration of 1.00 mg/mL and 5 µL of the solution thus obtained were analyzed with the HPLC method "Vismione". Two separate analyses were made for each sample and the chromatograms at 280 nm were integrated. The mean area of each identified peak (the variation is max 10 %) was compared with calibration curves respectively made with vismione H and acetylvismione D. The mass concentrations of the other vismiones were estimated from vismione H calibration curve expressed in molarity and converted according to the molecular mass of each molecule.

5 Partition chromatography general procedure

5.1 Preparation of the two-phase solvent systems

The biphasic systems were prepared by mixing the solvents in the suitable proportions in a separatory funnel. They were vigorously shaken at room temperature and then allowed to settle until the phases became limpid.

5.2 Rapid Estimation of the Partition Coefficients and suitable biphasic system by TLC

Bark extract of *P. glaberrimum*, PGE2E (20 mg \pm 1 mg) was dissolved in 2 mL of the biphasic solvent system (1 mL of each phase). After agitation and decantation, 15 μ L of both the organic and the aqueous phase were separately spotted on silica gel TLC. Estimation of the partition coefficient was achieved by comparing the respective intensities of the spots on the developed TLC (eluent: Hept/EtOAc 70:30 v/v).

5.3 Estimation of the Partition Coefficients and suitable biphasic system by HPLC

The polar vismione enriched fraction PGPAF (10 mg \pm 1 mg) was dissolved in 2 mL of the biphasic solvent system (1 mL of each phase). After decantation, 250 μ L of each phase were diluted with 250 μ L of the fresh conjugate phase and 500 μ L of methanol (to mix the two phases and obtain a single phase) for HPLC analysis. The KD value was expressed as the ratio of the peak area of the target compound in the upper phase divided by the one obtained for the lower phase.

5.4 Instrumentation

The laboratory scale Fast Centrifugal Partition Extractor FCPE300[®] (Kromaton Technology, Angers, France) was equipped with a rotor made of 7 circular partition disks containing a total of 231 partition twin cells. The distance from the center of the rotor to the center of twin cells is 98.8 mm, and the total diameter of the rotor is 250 mm. The volume of the column is 300 mL. The twin cells are connected together by ducts of 0.8 mm internal width. Rotation speed can be adjusted from 200 to 2000 rpm, producing a relative centrifugal acceleration in the partition cell up to 437 \times g. The mobile phase was pumped either in the ascending or in the descending mode with low residual pulsation through a KNAUER Preparative Pump 1800[®] V7115 (Berlin, Germany). This pump can deliver constant flow up to 1000 mL/min at a maximum pressure of 400 bar. Fractions were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden). All experiments were conducted at room temperature (20 \pm 2 $^{\circ}$ C).

5.5 TLC monitoring

The separation process was assessed by TLC. Each collected fraction was spotted on Fluka aluminum sheets silica gel 60 F254 and developed with an appropriate solvent system. After detection at 254 nm and 365 nm, the plates were sprayed with vanillin–sulfuric acid and heated to 100°C for 5 min.

6 Vismiones isolation

6.1 PGE2E fractionation

10.2 g of extract PGE2E were fractionated by vacuum liquid chromatography on silica gel (40-63 µm 230-400 mesh) eluting with pentane/EtOAc mixture of increasing polarity (100:0 to 0:100) then EtOAc/MeOH (100:0 to 85:15) to yield 5 fractions (F1-F5) regrouped according to their TLC profiles.

Fraction 2 (1.712 g) was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (35 g, 30 µm, Interchim) in 4 injections eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (50:50 to 100:0) to yield 7 fractions (2A-G) regrouped according to their TLC profiles.

Sub-fraction F2B (63 mg) was subjected to column chromatography over silica gel (40-63 µm 230-400 mesh) eluting with pentane/EtOAc mixture of increasing polarity (80:20 to 0:100) to yield vismione H (**94**) (20 mg).

Sub-fraction F2D (507 mg) was subjected to column chromatography over silica gel (40-63 µm 230-400 mesh) eluting with methylene chloride/diethylether mixture of increasing polarity (90:10 to 80:20) to yield 7 fractions (F2D1-7) regrouped according to their TLC profiles.

Sub-fraction F2D4 (96 mg) was recrystallized in cold MeOH to afford acetylvismione D (**8**) (62 mg).

Sub-fraction F2F (200 g) was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (35 g, 30 µm, Interchim) eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (80:20 to 100:0) to yield 5 fractions (F2F1-5) regrouped according to their TLC profiles.

Sub-fraction F2F3 (32 mg) was subjected to column chromatography over silica gel (40-63 µm 230-400 mesh) eluting with methylene chloride/diethylether mixture of increasing polarity (70:30 to 50:50) to yield madagascine (**5**) (5 mg).

Sub-fraction F2F4 (16 mg) was recrystallized in cold MeOH to afford 3-geranyloxyemodine (**12**) (9 mg).

6.2 Obtention of the polar vismione enriched fraction PGPAF and the nonpolar vismione enriched fraction PGPOF

Twenty-six grams of *Psorospermum glaberrimum* bark methylene chloride extract PGE2E were fractionated by liquid-liquid partition. PGE2E was dissolved in 210 mL of each phase of the biphasic system Hept/EtOAc/MeOH/H₂O (19:1:19:1 v/v/v/v) previously studied for CPC purpose. The lower phase was washed 4 times with the upper phase and gave the two fractions PGPO (upper phase, 20.4 g) and PGPA (lower phase, 5.4 g) after concentration under vacuum. PGPA was dissolved in cold methylene chloride to precipitate a part of the triterpenes and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure and 4.3 g of the fraction PGPAF were obtained. PGPO was deterpenated in the same way yielding 19.3 g of the fraction PGPOF.

6.3 RP18-Flash fractionation of PGPAF

2.4 g of fraction PGPAF were fractionated by flash chromatography on RP-18 prepacked column (50 g 40-60 µm, AIT) in 4 injections eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (50:50 to 100:0) to yield 9 fractions (F1-F9) regrouped according to their TLC profiles.

Fraction 4 (467 mg) was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (50 g 40-60 µm, AIT) eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (30:70 to 100:0) to yield 6 fractions (4A-F) regrouped according to their HPLC profiles.

Sub-fraction F4A (43 mg) was subjected to semi-preparative HPLC on Sunfire C18OBD 5 µm 19x 150 mm column eluting with H₂O/ACN mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield vismione C (**78**) (12 mg) and vismione E (**79**) (13 mg).

Sub-fraction F4C (137 mg) was subjected to semi-preparative HPLC on Sunfire C18OBD 5 µm 19x 150 mm column eluting with H₂O/ACN mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield desacetylvismione H (**97**) (22 mg).

Fraction 5 (723 mg) was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (50 g 40-60 µm, AIT) eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (75:25 to 100:0) to yield 5 fractions (5A-E) regrouped according to the flash chromatogram.

Sub-fraction F5B (70 mg) was subjected to semi-preparative HPLC on Sunfire C18OBD 5 µm 19x 150 mm column eluting with H₂O/ACN mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield vismione F (**66**) (16 mg).

Sub-fraction F5D (172 mg) was subjected to semi-preparative HPLC on Sunfire C18OBD 5 µm 19x 150 mm column eluting with H₂O/ACN mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield vismione H (**94**) (125 mg).

Fraction 6 (632 mg) was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (50 g 40-60 µm, AIT) eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield 7 fractions (5A-G) regrouped according to the flash chromatogram.

Sub-fraction F6B (134 mg) was subjected to semi-preparative HPLC on Sunfire C18OBD 5 μ m 19 x 150 mm column eluting with H₂O/ACN mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield vismione D (**33**) (34 mg).

Sub-fraction F6D (63 mg) was subjected to semi-preparative HPLC on Sunfire C18OBD 5 μ m 19 x 150 mm column eluting with H₂O/ACN mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield acetylvismione F (**44**) (13 mg).

Sub-fraction F6F (36mg) was subjected to semi-preparative HPLC on Sunfire C18OBD 5 μ m 19x 150 mm column eluting with H₂O/ACN mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield vismione M (**42**) (8 mg).

Fraction 7 (172 mg) was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (50 g 40-60 μ m, AIT) eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (20:80 to 100:0) to yield acetylvismione D (**8**) (83 mg).

6.4 FCPE fractionation of PGPO

6.4.1 Simple elution mode

6.4.1.1 Conditions

Biphasic solvent system : Hept/MeOH/H₂O 99.5:99.5:1 (v/v/v; ascending mode)

Mobile phase (MP): upper heptanic phase

Stationary phase (SP): lower methanolic phase

Applied sample : 3.2 g of PGPO in 14 mL SP + 14 mL MP

Flow rate : 20 mL/min

Rotation speed : 1200 rpm

Stationary phase retention : 59 %

6.4.1.2 Isolation

The FCPE fractionation of PGPO 1 yielded 4 fractions regrouped according to their TLC profiles.

Fraction 3 (735 mg) containing essentially vismione H was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (50 g 40-60 μ m, AIT) in 2 injections eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (20:80 to 0:100) to yield vismione H (**94**, 453 mg) with purity \geq 98 % (NMR).

Fraction 2 (1152 mg) containing essentially acetylvismione D was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (50 g 40-60 μ m, AIT) in 4 injections eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (20:80 to 0:100) to yield acetylvismione D (**8**, 852 mg) with purity \geq 98 % (NMR).

6.4.2 Co-current mode

6.4.2.1 Conditions

Biphasic solvent system : Hept/MeOH/H₂O 99.5:99.5:1 (v/v/v; ascending mode)

Mobile phase (MP): 90 % upper heptanic phase +10 % lower methanolic phase

Stationary phase (SP): lower methanolic phase

Applied sample : 5.1 g of PGPO in 14 mL SP + 14 mL MP

Flow rate : 20 mL/min

Rotation speed : 1200 rpm

Stationary phase retention : 49 %

6.4.3 Multiple Dual Mode

6.4.3.1 Conditions

Ascendant mode

Biphasic solvent system: Hept/MeOH/H₂O 99.5:99.5:1 (v/v/v; ascending mode)

Mobile phase (MP): upper heptanic phase

Stationary phase (SP): lower methanolic phase

Descendant mode

Biphasic solvent system: Hept/MeOH/H₂O 99.5:99.5:1 (v/v/v/v; descending mode)

Mobile phase (MP): lower methanolic phase

Stationary phase (SP): upper heptanic phase

Changes of mode were performed according to TLC monitoring after : 23 min, 28.5 min, 37.5 min,
42 min, 59 min.

Applied sample

1st injection (t = 0 min) 2.1 g of PGPO in 14 mL SP + 14 mL MP

2nd injection (t = 28.5 min) 1.1 g of PGPO in 14 mL SP + 14 mL MP

3rd injection (t = 42 min) 1.0 g of PGPO in 14 mL SP + 14 mL MP

Flow rate : 20 mL/min

Rotation speed : 1200 rpm

Stationary phase retention : 57 %

6.5 FCPE fractionation of PGPAF

6.5.1 Dual mode

6.5.1.1 Conditions

Biphasic solvent system: Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 8:1:8:1 (v/v/v/v; ascending mode)

Mobile phase (MP): upper heptanic phase

Stationary phase (SP): lower methanolic phase

Dual-mode was performed after 80 min

Biphasic solvent system: Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 8:1:8:1 (v/v/v/v; descending mode)

Mobile phase (MP): lower methanolic phase

Stationary phase (SP): upper heptanic phase

Applied sample : 1.0 g of PGPAF in 4 mL SP + 4 mL MP

Flow rate : 20 mL/min

Rotation speed : 1200 rpm

Stationary phase retention : 52 %

6.5.1.2 Isolation

The FCPE fractionation of PGPAF yielded 14 fractions (F1-F13) regrouped according to their TLC profiles.

Fraction 11 (120 mg) was subjected to flash chromatography on RP-18 prepacked column (35 g, 30 µm, Interchim) eluting with H₂O/MeOH mixture of increasing polarity (45:55 to 100:0) to yield 6-acetylrochryson (201, 2.6 mg)

6.5.2 Gradient mode

6.5.2.1 Conditions

Stationary phase (SP): lower methanolic phase from system Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 6:1:6:1 (v/v/v/v)

Mobile phase (MP): gradient : upper heptanic phase Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 8:1:8:1 (v/v/v/v) for 20 min, then gradient from Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 8:1:8:1 (v/v/v/v) to Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 4:1:4:1 (v/v/v/v) over 90 min then Hept/EtOAc/MeOH/H₂O 4:1:4:1 (v/v/v/v) for 20 min before extrusion of the stationary phase

Applied sample : 2.1 g of PGPAF in 18 mL SP + 13 mL MP

Flow rate : 20 mL/min

Rotation speed : 1200 rpm

Stationary phase retention : 69 %

The FCPE fractionation of PGPAF yielded 15 fractions (F1-F15) regrouped according to their TLC profiles.

7 Vismione stability test in organic solvents

Four milligrams of acetylvismione D were dissolved in 400 μL of DMSO-d_6 and analyzed by ^1H NMR regularly for 5 days. Each degradation product was identified by its spectrum and quantified by the mean of its hydroxyl signals.

The same experiment was conducted in MeOD-d_4 in the same conditions. Each degradation product was identified by its spectrum and quantified by the mean of its aromatic protons signals.

Twelve milligrams of vismione H were dissolved in 1200 μL of DMSO-d_6 and disposed in 3 different 5 mm NMR tube and capped :

- 1 without any precaution;
- 1 with amber glass and protected from light with aluminium foil between the analyses;
- 1 stored at -20°C between the analyses.

Several ^1H NMR analyses were performed over 16 days and each degradation product was identified by its spectrum and quantified by the mean of its hydroxyl signals.

8 Quantum yield measurement

Absorbance spectra for quantum yield determination were recorded with a UV-Vis Cary 400 spectrophotometer (Varian) equipped with a thermostated multicell holder maintained at 20.0°C . Fluorescence spectra were measured with a Fluoromax spectrofluorometer (HoribaJobin-Yvon) equipped with a thermostated cell compartment at 20.0°C . Spectra were corrected for the emission of the solvent, the lamp fluctuations, and the wavelength dependence of the optics and detectors in the emission pathway. The methanol and H_2SO_4 used were of spectroscopic grade. Fluorescence intensities were recorded in dilute solutions (ca. $1\ \mu\text{M}$), and quantum yields were calculated using quinine sulfate in $0.05\ \text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ as a reference (0.546^{269}) with an excitation wavelength of 366 nm. The refractive indice of methanol (1.326) and the aqueous solvent for the standard (1.333) were taken into account for quantum yield calculations²⁷¹.

9 Chiral HPLC Screening

A chiral HPLC screening has been carried on through the Phenologix HPLC chiral screening service.

Four microliters of 1.0 mg/mL solution of vismione H (**94**) in ethanol have been injected on various chiral HPLC columns :

- Lux 5 µm Cellulose-1 100 x 4.6 mm [Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)]
- Lux 5 µm Cellulose-2 100 x 4.6 mm [Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)]
- Lux 5 µm Cellulose-3 100 x 4.6 mm [Cellulose tris(4-methylbenzoate)]
- Lux 5 µm Cellulose-4 100 x 4.6 mm [Cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)]
- Lux 5 µm Amylose-2 100 x 4.6 mm [Amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate)]

with, for each stationary phase, different isocratic mobile phase conditions at 1 mL/min flow rate :

- Hexane/EtOH/TFA (80:20:0.1)
- Hexane/IPA/TFA (80:20:0.1)
- 5mM AmBic (pH 8.5)/ACN (40:60)
- Water/ACN/TFA (30:70:0.1)
- Methanol/IPA/TFA (90:10:0.1)
- ACN/IPA/TFA (95:5:0.1)

10 Biological assays

10.1 *In vitro* antiplasmodial and cytotoxicity assays conducted in Strasbourg

These assays were conducted by Flore Nardella at the Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg. The samples were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to obtain a concentration of 10 mg/mL and screened for antiplasmodial activity against *P. falciparum* 3D7 and cytotoxicity against human fibroblasts (NHDF).

10.1.1 Activity against *P. falciparum*

Antiplasmodial activities were performed by the pLDH immunodetection assay against *P. falciparum* 3D7 strain, with a commercially available sandwich enzyme immunosorbent assay (ApDia). Parasite culture (1 % parasitaemia, 2 % hematocrit) was incubated either with two dilutions (100 and 10 mg/mL final concentration) of the extract or with increasing concentrations of the sample solutions (8 concentrations) for 96 h at 37 °C under reduced oxygen conditions (candle jar). This relatively long incubation time was chosen to prevent any activity to be hidden by the presence of residual pLDH, this enzyme having a half-life time of around 1.5 day³⁴². After incubation time the sandwich enzyme immunosorbent assay was performed according to manufacturer recommendations. Each experiment was performed 3 times in duplicate, and chloroquine was used as a positive control. The IC₅₀ values were calculated from the sigmoidal inhibition curves with Graphpad Prism 6 software.

10.1.2 Cytotoxicity assay

Assays were performed in 96-well microtiter plates each well containing 100 µL of culture medium and 500 NHDF cells (Primary Normal Human Dermal Fibroblasts). Serial sample dilutions were prepared. After 48 h of incubation, the plates were inspected under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. Then, 10 µL of WST-8 (Cell counting kit 8, Sigma Aldrich) was added to each well and the plates incubated for another 3 or 4 hours at 37 °C and 5 % CO₂. They were then read with a Spectramax Gemini XS microplate fluorometer at 450/590 nm. Each experiment was performed 2 times in triplicate, and Podophyllotoxin (Sigma Aldrich) was used as a positive reference. The IC₅₀ values were calculated from the sigmoidal inhibition curves with Graphpad Prism 6 software.

10.2 *In vitro* antiprotozoal assays conducted in Basel

These assays were conducted by Marcel Kaiser's team at the Swiss Tropical and Public Health Institute in Basel. The samples were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to obtain a concentration of 10 mg/mL and screened for antiprotozoal activity against *P. falciparum* K1 and *Leishmania donovani* and cytotoxicity against rat skeletal muscle myoblasts (L6 cells). The *in vitro* assays were conducted as described before³⁴³.

10.2.1 Activity against *P. falciparum*

In vitro activity against erythrocytic stages of *P. falciparum* was determined by a modified [³H]-hypoxanthine incorporation assay with the chloroquine- and pyrimethamine-resistant K1 strain. Briefly, parasite cultures incubated in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with 5 % Albumax (without hypoxanthine) were exposed to serial sample dilutions in microtiter plates. After 48 h of incubation at 37 °C in a reduced oxygen atmosphere, 0.5 µCi [³H]-hypoxanthine was added to each well. Cultures were incubated for a further 24 h before they were harvested onto glass-fiber filters and washed with distilled water. The radioactivity was counted with a Betaplate™ liquid scintillation counter (Wallac, Zurich, Switzerland). The results were recorded as counts per minute (CPM) per well at each sample concentration and expressed as the percentage of untreated controls. IC₅₀ values were calculated from graphically plotted dose-response curves by linear interpolation. Chloroquine (Sigma C6628) and artemisinin (Sigma 36,159-3) were used as positive references.

10.2.2 Activity against *Leishmania donovani* axenic amastigotes

Amastigotes of *L. donovani* strain MHOM/ET/67/L82 were grown in axenic culture at 37°C in SM medium at pH 5.4 supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum under an atmosphere of 5 % CO₂ in air. One hundred µL of culture medium with 105 amastigotes from axenic culture with or without a serial sample dilution were seeded in 96-well microtiter plates. Serial sample dilutions were prepared. After 72 h of incubation the plates were inspected under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. 10 µL of a resazurin solution (12.5 mg resazurin dissolved in 100 mL double-distilled water) was then added to each well and the plates incubated for another 2 h. Then the plates were read in a Spectramax Gemini XS microplate fluorometer using an excitation wavelength of 536 nm and an emission wavelength of 588 nm. Data were analyzed using the software Softmax Pro. Decrease of fluorescence (=inhibition) was expressed as percentage of the fluorescence of control cultures and plotted against the sample concentrations. From the sigmoidal inhibition curves the IC₅₀ values were calculated. Each IC₅₀ value obtained is the mean of at least two separate experiments performed in duplicate (the variation is max. 20 %). Miltefosine was used as a reference drug.

10.2.3 Activity against *Leishmania donovani* intracellular amastigotes assay

Mouse peritoneal macrophages (4×10^4 in 100 µl RPMI 1640 medium containing 10 % heat-inactivated FBS) were seeded into wells of Lab-tek 16-chamber slides.

After 24 h 1.2×10^5 amastigote *L. donovani* in 100 µl were added. The amastigotes were taken from an axenic culture grown at pH 5.4. Four hours later, the medium containing free amastigote forms was removed and replaced by fresh medium. The next day the medium was replaced by medium with or without a serial sample dilution of seven 3-fold dilution steps covering a range from 30 to 0.04 µg/ml. Parasite growth in the presence of the sample was compared to control wells. After 96 h of incubation, the medium was removed and the slides fixed with methanol for 10 min followed by staining with a 10 % Giemsa solution. Infected and non-infected macrophages were counted for the

Experimental section

control cultures and those exposed to the serial sample dilutions. The infection rates were determined. The results were expressed as a percentage reduction in parasite burden compared to control wells, and the IC₅₀ was calculated by linear regression analysis. The collection of mouse peritoneal macrophages was done at the Swiss Tropical and Public Health Institute (Basel) according to the rules and regulations for the protection of animal rights ("Tierschutzverordnung") of the Swiss "Bundesamt für Veterinärwesen". The animal work was approved by the veterinary office of Canton Basel-Stadt, Switzerland (permission number 2374).

10.2.4 Cytotoxicity against L6 Cells

Assays were performed in 96-well microtiter plates, each well containing 100 µL of RPMI 1640 medium supplemented with 1 % L-glutamine (200 mM) and 10 % fetal bovine serum and 4×10^4 L6 cells (rat skeletal myoblasts). Serial sample dilutions were prepared. After 72 h of incubation, the plates were inspected under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. Then, 10 µL of a resazurin solution (12.5 mg resazurin dissolved in 100 mL distilled water)³⁴⁴ was added to each well and the plates incubated for another 2 h. They were then read with a Spectramax Gemini XS microplate fluorometer at an excitation wavelength of 536 nm and an emission wavelength of 588 nm. The IC₅₀ values were calculated from the sigmoidal inhibition curves with SoftMax Pro software. Podophyllotoxin (P4405, Sigma, Saint Louis, MO, USA) was used as a positive reference.

10.3 *In vitro* antiprotozoal assays conducted in Toulouse

These assays were conducted by Yenny Lozano, Lucie Paloque and Sandra Bourgeade-Delmas from UMR 152 IRD-UPS PHARMA-DEV, BIOCID team. The samples were extemporaneously dissolved in DMSO and screened for antiprotozoal activity against promastigote and axenic and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and cytotoxicity against mouse macrophage cell line. The *in vitro* assays were conducted as described before³⁴⁵.

10.3.1 Activity against *Leishmania infantum* promastigotes

The effects of the various samples on the growth of promastigotes of *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR *Leishmania*, Montpellier, France) were assessed using promastigotes expressing luciferase activity. Briefly, promastigotes in log-phase in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 50 µg/mL geneticin), were incubated at an average density of 10⁶ parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5 % v/v), in triplicate. Appropriate controls treated by DMSO and amphotericin B, reference drugs purchased from Sigma Aldrich, were added to each set of experiments. After a 72 h incubation period at 24 °C, each plate well was microscope-examined to detect the possible formation of precipitate. To estimate the luciferase activity of promastigotes, 80 µL of each well were transferred to white 96-well plates, Steady Glow reagent (Promega) was

added according to the manufacturer's instructions, and the plates were incubated for 2 min. The luminescence was then measured in a Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50 % (IC₅₀) was defined as the concentration of sample required to inhibit by 50 % of the metabolic activity of *L. infantum* promastigotes compared to the control. IC₅₀ were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC₅₀ values represent the mean value calculated from three independent experiments.

10.3.2 Activity against *Leishmania infantum* axenic amastigotes

L. infantum promastigotes in log phase were centrifuged at 900 *g* for 10 min; cell medium was then replaced by MAA-20 medium and maintained at 37 °C, 5 % CO₂ to induce transformation into axenic amastigote forms¹⁹⁰. Axenic amastigotes were incubated at an average density of 4.10⁶ cells/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of samples dissolved in DMSO (final concentration 1 % v/v), in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO and amphotericin B, miltefosine and pentamidine were added to each set of experiments. After a 72 h incubation period at 37°C and 5 % CO₂, the effects of the tested compounds were evaluated by estimation of the luciferase activity of the axenic amastigotes. Eighty microliters of each well were transferred to white 96-well plates, Steady Glow reagent (Promega) was added according to the manufacturer's instructions, and the plates incubated for 2 min. The luminescence was measured in a Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50 % (IC₅₀) was defined as the concentration of drug required to inhibit 50 % of the metabolic activity of *L. infantum* amastigotes compared to the control.

10.3.3 Activity against *Leishmania infantum* intracellular amastigotes

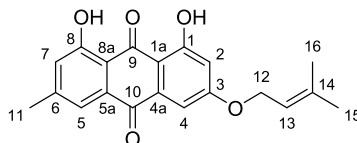
The effects of the tested compounds on the growth of *L. infantum* intracellular amastigotes were assessed in the following way. 200 µL of J774A.1 cells were seeded into 96-well plates at an average density of 1.10⁵ cells/mL and incubated for 24 h at 37 °C and 6 % CO₂. *L. Infantum* promastigotes were centrifuged at 900 *g* for 10 min and the supernatant replaced by the same volume of RPMI 1640, 10 % FCS, pH 5.4 and incubated for 24 h at 27 °C. Then, half of the macrophage medium was removed, J774A.1 cells were then infected by 100 µL of acidified promastigotes at an average density of 2.10⁶ cells/mL (10:1 ratio) and plates incubated for 24 h at 37 °C. Half of the infected macrophage medium was removed and medium containing various concentrations of tested-samples was added (final DMSO concentration being inferior to 0.25 % v/v) in duplicate. Appropriate controls treated with or without solvent (DMSO), and various concentrations of miltefosine and amphotericin B were added to each set of experiments. After 120 h incubation at 37 °C and 6 % CO₂, 100 µL of well supernatant was removed and Steady Glow reagent (Promega) was added according to manufacturer's instructions. Plates were incubated for 3 min. 100 µL of each well were transferred in white 96-well plates and the luminescence was measured in Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50 % (IC₅₀) was defined as the concentration of sample required to inhibit by 50 % the metabolic activity of *L. Infantum* intracellular amastigotes compared to the control. IC₅₀ were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC₅₀ values represent the mean value calculated from three independent experiments.

10.3.4 Cytotoxicity evaluation

The evaluation of the tested molecules cytotoxicity by MTT assay on the J774A.1 cell line (mouse macrophage cell line, Sigma-Aldrich) was done according to Mosmann³⁴⁶ with slight modifications. Briefly, cells ($5 \cdot 10^4$ cells/mL) in 100 μ L of complete medium, [RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in a humidified 6 % CO₂ with 95 % air atmosphere. After a 24 h incubation, 100 μ L of medium with various sample concentrations and appropriate controls were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 μ L of MTT solution (0.5 mg/mL in RPMI) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μ L) was added to dissolve the resulting formazan crystals. The plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer. DMSO or MeOH was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. IC₅₀ were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC₅₀ values represent the mean value calculated from three independent experiments.

11 Synthesis

(5) 1,8-dihydroxy-3-methyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)anthracene-9,10-dione



To a solution of **(13)** (48 mg, 0.186 mmol) in 3 mL of acetone were added DBU (547 μ L, 0.36 mmol, 2 eq) and 1-bromo-3-methylbut-2-ene (42 μ L, 0.36 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 100°C under microwave irradiations. Acetone was removed under vacuum and aqueous HCl solution (1 M) was added on the crude product. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/DCM 60:40) to yield **(5)** (45 mg, 75 %) as an orange solid.

TLC (DCM/EtOAc 95:5): R_f 0.88.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.21 (1H, s, OH-8), 12.05 (1H, s, OH-1), 7.54 (1H, d, J = 1.1 Hz, H-5), 7.29 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-4), 7.00 (1H, s, H-7), 6.60 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 5.41 (1H, tspt, J = 7.0 Hz, J = 1.3 Hz, H-13), 4.57 (2H, d, J = 6.7 Hz, H-12), 2.37 (3H, s, H-11), 1.75 (3H, s, H-15), 1.72 (3H, s, H-16).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 189.6 (C-9), 180.8 (C-10), 164.8 (C-3), 164.0 (C-1), 161.4 (C-8), 147.3 (C-6), 138.7 (C-14), 134.1 (C-4a), 132.1 (C-5a), 123.4 (C-7), 120.1 (C-13), 117.2 (C-5), 112.6 (C-8a), 109.0 (C-1a), 107.7 (C-2), 106.4 (C-4), 64.7 (C-12), 24.8 (C-15), 21.1 (C-11), 17.3 (C-16).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 337.1, found: 337.0.

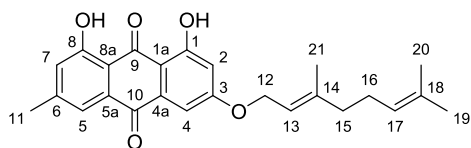
UV λ_{\max} : 223, 253, 267, 286, 437 nm.

TLC (C₅/DCM 60:40) : R_f 0.65.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.19 (1H, s, OH-8), 12.03 (1H, s, OH-1), 7.52 (1H, d, J = 1.1 Hz, H-5), 7.25 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-4), 6.98 (1H, d, J = 0.6 Hz, H-7), 6.56 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2), 4.00 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-12), 2.36 (3H, s, H-11), 1.75 (2H, br spt, J = 7.1 Hz, H-13), 1.40 (2H, quin, J = 7.5 Hz, H-14), 1.20 - 1.32 (8H, m, H-18, 17, 16, 15), 0.82 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-19).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 190.7 (C-9), 182.0 (C-10), 166.2 (C-3), 165.2 (C-1), 162.5 (C-8), 148.3 (C-6), 135.2 (C-4a), 133.2 (C-5a), 124.4 (C-7), 121.2 (C-5), 113.7 (C-8a), 110.0 (C-1a), 108.7 (C-2), 107.1 (C-4), 69.0 (C-12), 31.8 (C-17), 29.3 (C-13), 29.2 (C-16), 28.9 (C-15), 25.9 (C-14), 22.6 (C-18), 22.1 (C-11), 14.1 (C-19).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 383.18530, found: 383.18507.

(12) (E)-3-((3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)oxy)-1,8-dihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione

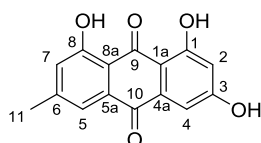
To a solution of **(13)** (49 mg, 0.18 mmol) in 3 mL of acetone was added DBU (54 μ L, 0.36 mmol, 2 eq) and (E)-1-bromo-3,7-dimethylocta-2,6-diene (72 μ L, 0.36 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 100°C under microwave irradiations. Acetone was removed under vacuum and aqueous HCl solution (1 M) was added on the crude product. The aqueous phase was extracted EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/DCM 70:30) to yield **(12)** (39 mg, 53 %) as an orange solid.

TLC (C₅/DCM 60:40) : R_f 0.62.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.28 (1H, s, OH-8), 12.12 (1H, s, OH-1), 7.61 (1H, d, *J* = 1.1 Hz, H-5), 7.36 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-4), 7.07 (1H, q, *J* = 0.9 Hz, H-7), 6.68 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2), 5.48 (1H, tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-13), 5.09 (1H, tspt, *J* = 6.9 Hz, *J* = 1.4 Hz, H-16), 4.68 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, H-12), 2.45 (3H, s, H-11), 2.06 - 2.20 (4H, m, H-16, 15), 1.79 (3H, s, H-21), 1.68 (3H, s, H-19), 1.61 (3H, s, H-20).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 190.7 (C-9), 182.0 (C-10), 165.9 (C-3), 165.1 (C-1), 162.5 (C-8), 148.3 (C-6), 142.8 (C-14), 135.2 (C-4a), 133.3 (C-5a), 132.0 (C-18), 124.4 (C-7), 123.6 (C-17), 121.2 (C-13), 118.0 (C-5), 113.7 (C-8a), 110.1 (C-1a), 108.8 (C-2), 107.5 (C-4), 65.8 (C-12), 39.5 (C-15), 26.2 (C-16), 25.6 (C-19), 22.1 (C-11), 17.7 (C-20), 16.8 (C-21).

LRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 407.2, found: 407.2.

(13) 1,3,8-trihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione

To a solution of **(249)** (328 mg, 1.05 mmol) in acetic acid (5 mL) were added 15 mL of an aqueous solution of HBr (47 %). The reaction mixture was refluxed for 14 hours under stirring. Water was added, then the aqueous solution was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/EtOAc 80:20) to yield **(13)** (252 mg, 88 %) as an orange solid.

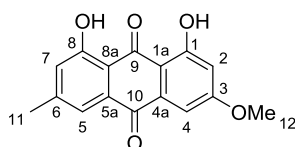
TLC (DCM/EtOAc 90:10): R_f 0.51.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.07 (1H, s, OH-1), 12.00 (1H, s, OH-8), 11.36 (1H, s, OH-3), 7.45 - 7.50 (1H, m, H-5), 7.14 - 7.17 (1H, m, H-7), 7.11 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 6.59 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 2.41 (3H, s, H-11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 190.2 (C-9), 181.8 (C-10), 166.0 (C-3), 164.9 (C-1), 161.9 (C-8), 148.7 (C-6), 135.6 (C-4a), 133.3 (C-5a), 124.6 (C-7), 120.9 (C-5), 113.8 (C-8a), 109.4 (C-1a), 109.2 (C-2), 108.4 (C-4), 22.0 (C-11).

LRMS-ESI (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd: 271.1, found: 271.0.

(29) 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methylantracene-9,10-dione



To a solution of **(249)** (59 mg, 0.189 mmol) in acetic acid (1 mL) were added dropwise 2 mL of an aqueous solution of bromhydric acid (47 %). The mixture was heated under microwave irradiations at 100°C for 30 minutes. Water was added, then the aqueous solution was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum to yield **(29)** (54 mg, 100 %) as an orange solid.

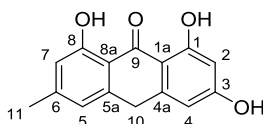
TLC (DCM/EtOAc : 90:10) : R_f 0,83.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 12.30 (1H, s, OH-8), 12.10 (1H, s, OH-1), 7.62 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-5), 7.36 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-4), 7.08 (1H, q, J = 0.8 Hz, H-7), 6.68 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2), 3.94 (3H, s, H-12), 2.45 (3H, s, H-11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 190.8 (C-9), 182.0 (C-10), 166.6 (C-3), 165.2 (C-1), 162.5 (C-8), 148.4 (C-6), 135.3 (C-4a), 133.2 (C-5a), 124.5 (C-7), 121.3 (C-5), 113.7 (C-8a), 110.3 (C-1a), 108.2 (C-2), 106.8 (C-4), 56.1 (C-12), 22.1 (C-11).

LRMS-ESI (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd: 285.1, found: 285.0.

(139) 1,3,8-trihydroxy-6-methylantracene-9(10H)-one



To a solution of **(249)** (172 mg, 0.55 mmol) in acetic acid (9 mL) were added dropwise 4.5 mL of an aqueous solution of iodhydric acid (57 %). The mixture was refluxed for 4 h. Water was added, then the aqueous solution was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (10 % m/v) solution to remove iodine traces, dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (C_5/EtOAc 70:30) to yield **(139)** (128 mg, 91 %) as a pale yellow solid.

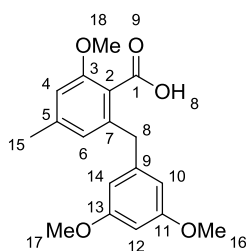
TLC (DCM/EtOAc 90:10): R_f 0.57.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.32 (1H, s, OH-1), 12.16 (1H, s, OH-8), 10.76 (1H, br s, OH-3), 6.71 (1H, s, H-5), 6.61 (1H, s, H-7), 6.37 (1H, s, H-4), 6.18 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2), 4.23 (2H, s, H-10), 2.27 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 191.5 (C-9), 165.4 (C-3), 165.0 (C-1), 162.1 (C-8), 147.4 (C-6), 145.3 (C-4a), 142.4 (C-5a), 120.3 (C-5), 115.5 (C-7), 113.3 (C-8a), 108.8 (C-1a), 107.8 (C-4), 101.4 (C-2), 32.7 (C-10), 22.0 (C-11).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 257.1, found: 257.0.

(231) 2-(3,5-dimethoxybenzyl)-6-methoxy-4-methylbenzoic acid



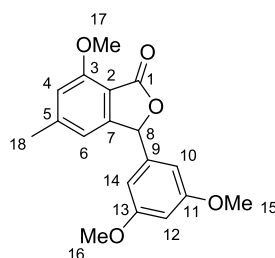
A methanolic solution (80 mL) of **(232)** (1.236 g, 3.93 mmol) was stirred at room temperature under 75 psi pressure of hydrogen in the presence of Pearlman's catalyst (0.24 g, 20 % m/m) for 7 hours. The mixture was filtrated on Celite and the solvent removed under vacuum. The residue was then extracted with EtOAc after addition of saturated aqueous NaHCO₃ solution. The aqueous layer was acidified with concentrated HCl and extracted with EtOAc. The solution was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give a white solid **(231)** (1,160 g, 93 %).

TLC (DCM/MeOH 80:20): R_f 0.58.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.65 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-10, 14), 6.40 (2H, d, J = 1.9 Hz, H-4, 6), 6.31 (1H, t, J = 2.3 Hz, H-12), 4.07 (2H, s, H-8), 3.89 (3H, s, H-18), 3.74 (6H, s, H-17, 16), 2.31 (3H, s, H-15).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171.8 (C-1), 161.0 (C-13, 11), 157.6 (C-3), 143.0 (C-7), 142.9 (C-9), 142.6 (C-5), 142.5 (C-2), 124.8(C-6), 110.6 (C-4), 107.3 (C-14, 10), 98.4 (C-12), 56.7 (C-16, 17), 55.5 (C-18), 39.8 (C-8), 22.1 (C-15).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 316.1, found: 316.0.

(232) 3-(3,5-dimethoxyphenyl)-7-methoxy-5-methylisobenzofuran-1(3H)-one

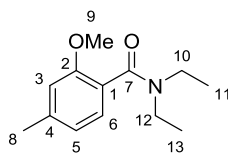
80 mL of dry THF were introduced in a flame dried flask under argon and cooled at -78°C . TMEDA (2.02 mL, 13.41 mmol, 1.1 eq) was then added, followed by *sec*-BuLi solution in hexane (9.58 mL, 13.41 mmol, 1.1 eq, $C = 1.4\text{ M}$), leading to yellow coloration. The reaction mixture was stirred 10 min at -78°C . Then **(233)** (2.698 g, 12.19 mmol) dissolved in 5 mL of dry THF, was added dropwise to the solution, and the color switched to orange. The reaction mixture was stirred 20 min at -78°C before the addition of a solution of 3,5-dimethoxybenzaldehyde (2.228 g, 13.41 mmol, 1.1 eq) dissolved in 5 mL of dry THF. The solution switched to pale yellow. The reaction mixture was stirred 20 min at -78°C then allowed to warm to room temperature for 3 hours. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc after addition of HCl 1M solution. The residue was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum to give an orange-yellow oil. The oil thus obtained was dissolved in toluene (100 mL) and PTSA (2.099 g, 12.19 mmol, 1 eq) was added. The solution mixture was stirred under reflux for 14 hours. The solution became brown and was then extracted with EtOAc after addition of saturated aqueous NaHCO_3 solution. The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The compound **(232)** thus obtained was recrystallized from Et_2O to give a white powder (3.024 mg, 79 %).

TLC (C_5/EtOAc 50:50): R_f 0.42.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 6.74$ (1H, s, H-6), 6.69 (1H, s, H-4), 6.44 (3H, s, H14,12,10), 6.16 (1H, s, H-8), 4.00 (3H, s, H-17), 3.77 (6H, s, H-15, 16), 2.41 (3H, s, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 168.7$ (C-1), 161.3 (C-13, 11), 158.4 (C-3), 152.8 (C-7), 148.4 (C-9), 139.4 (C-5), 115.1 (C-2), 112.0 (C-6), 110.5 (C-4), 104.7 (C-14, 10), 101.0 (C-12), 81.4 (C-8), 56.1 (C-17), 55.6 (C-15,16), 22.6 (C-18).

LRMS-ESI (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd: 314.12, found: 314.0.

(233) N,N-diethyl-2-methoxy-4-methylbenzamide

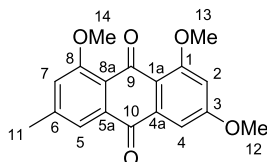
To a solution of 2-methoxy-4-methylbenzoyl chloride (**259**) in 45 mL of DCM was added dropwise 9.39 mL of diethylamine (91.16 mmol, 3 eq), at 0°C, under argon (white smoke produced instantly). The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for 24 hours. The solution was then extracted with DCM after acidification with HCl 1M solution. After extraction, the solution was washed by saturated NaHCO₃ solution, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to yield (**233**) (7.68 g, 99 %) as a pale yellow oil which became solid at room temperature.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.44.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.07 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-6), 6.78 (1H, dq, *J* = 7.7 Hz, *J* = 0.6 Hz, H-5), 6.71 (1H, s, H-3), 3.81 (3H, s, H-9), 3.56 (2H, br s, H-12, 10), 3.15 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-12, 10), 2.36 (3H, s, H-8), 1.24 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-13), 1.03 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 169.0 (C-7), 155.2 (C-2), 140.1 (C-4), 127.3 (C-6), 124.3 (C-1), 121.3 (C-5), 111.8 (C-3), 55.5 (C-9), 42.8 (C-12), 38.8 (C-10), 21.7 (C-8), 14.0 (C-13), 12.9 (C-11).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 222.1, found: 222.1.

(249) 1,3,8-trimethoxy-6-methylantracene-9,10-dione

To a solution of (**231**) (231 mg, 0.730 mmol) in DCM (8 mL) stirred at 0°C under argon was added dropwise trifluoroacetic anhydride (0.23 mL, 1.63 mmol, 2.2 eq). The coloration of the solution switched from yellow to green then brown. The reaction mixture was stirred for 10 min, at room temperature, then the reaction was quenched with H₂O. The reaction mixture was extracted with DCM after addition of a saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was adsorbed on silica gel and stirred under O₂ atmosphere for 24 h then filtrated over silica gel with 150 mL of DCM/MeOH 90:10. The residue was not further purified and yielded (**249**) (172 mg, 75 %) as an orange solid.

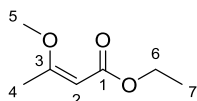
TLC (DCM/EtOAc 80:20): R_f 0.44.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.56 (1H, d, *J* = 0.8 Hz, H-5), 7.25 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-4), 7.02 (1H, s, H-7), 6.69 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2), 3.91 (3H, s, H-14), 3.89 (3H, s, H-13), 3.87 (3H, s, H-12), 2.39 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 184.4 (C-10), 181.7 (C-9), 163.7 (C-3), 161.7 (C-1), 159.8 (C-8), 144.6 (C-6), 136.4 (C-4a), 134.5 (C-5a), 121.6 (C-5), 119.6 (C-7), 119.0 (C-8a), 118.4 (C-1a), 105.3 (C-4), 101.9 (C-2), 56.5 (C-13), 56.5 (C-14), 55.9 (C-12), 22.1 (C-11).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 313.1, found: 313.0.

(251) ethyl (Z)-3-methoxybut-2-enoate

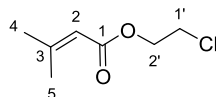


To a solution of ethylacetoacetate (13.0 g, 100 mmol, 1 eq) and trimethylorthoformate (10.6 g, 100 mmol, 1 eq) in MeOH (10 mL) was added catalytic concentrated HCl (0.05 mL). The reaction mixture was immediately distilled under vacuum to give ethyl (Z)-3-methoxybut-2-enoate (**251**) (7.348 g, 51 %) as a colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 90:10) : R_f 0.44.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 5.03 (1H, s, H-2), 4.15 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-6), 3.64 (3H, s, H-5), 2.30 (3H, s, H-4), 1.28 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-7).

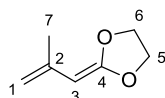
(254) 2-chloroethyl 3-methylbut-2-enoate



3-methyl-2-butenic acid (**252**) (20.236 g, 200 mmol, 1 eq) was dissolved in 2-chloroethanol (440 mmol, 30 mL, 2.2 eq). Catalytic concentrated H₂SO₄ (1 mL) was added and the mixture was refluxed for 50 hours. The mixture was then cooled to room temperature and quenched with a saturated sodium carbonate solution and extracted with n-pentane. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum and the resulting oil was purified by distillation under vacuum to yield (**254**) (22.70 g, 70 %) as a colorless oil.

TLC (C₅/Et₂O 95:5): R_f 0.65.

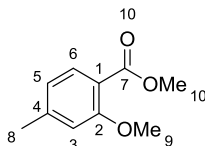
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 5.73 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-2), 4.35 (2H, t, *J* = 5.8 Hz, H-2'), 3.71 (2H, t, *J* = 5.8 Hz, H-1'), 2.19 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, H-5), 1.92 (3H, d, *J* = 0.9 Hz, H-4).

(255) 2-(2-methylallylidene)-1,3-dioxolane

To a solution of 2-chloroethyl 3-methylbut-2-enoate (**254**) (1.672 g, 10.3 mmol) in DME (54 mL) at 0°C, potassium tertbutoxide (2.311 g, 20.6 mmol, 2 eq) was added under argon. The reaction was stirred for 1 hour at room temperature. The DME was removed under vacuum and the residue was extracted with Et₂O, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to yield (**255**) (0.949 g, 73 %) as a yellow oil.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.43.

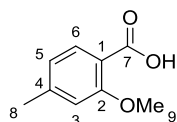
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 4.51 - 4.58 (2H, m, H-3, 1), 4.34 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-6, 5), 4.19 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-6, 5), 1.94 (3H, s, H-7).

(257) methyl 2-methoxy-4-methylbenzoate

To a solution of 2-hydroxy-4-methylbenzoic acid (5 g, 32.9 mmol, 1 eq) in acetone (100 mL) were added 1.14 g of K₂CO₃ and sequentially 18 mL of CH₃I (296 mmol, 9 eq). The reaction mixture was refluxed for 48 h. Acetone was evaporated and water was added to the crude product. The aqueous phase was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The oil thus obtained was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10) to yield (**257**) (5.56 g, 94 %) as yellow oil.

TLC (C₅/EtOAc 85:15): R_f 0.44.

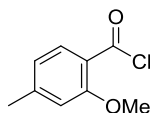
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.73 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6), 6.76 - 6.82 (2H, m, H-5, 3), 3.90 (3H, s, H-10), 3.88 (3H, s, H-9), 2.39 (3H, s, H-8).

(258) 2-methoxy-4-methylbenzoic acid

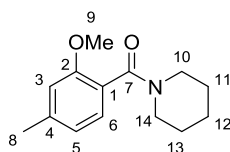
To a solution of **(257)** (5.5 g, 30.88 mmol) in 80 mL of DME was added a solution of LiOH (2.2 g, 92.63 mmol, 3 eq) in 30 mL of H₂O. The mixture was refluxed for 7 hours. The solvent was evaporated and the residue was extracted with EtOAc after addition of a saturated aqueous NaHCO₃ solution. The aqueous layer was acidified by HCl 1M until precipitation of a white solid. New extraction with EtOAc/H₂O was performed. The organic phase was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give **(258)** (5.035 g, 98 %) as a white powder.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.70 (1H, br s, OH-7), 8.08 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-6), 6.96 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-5), 6.86 (1H, s, H-3), 4.07 (3H, s, H-9), 2.44 (3H, s, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 165.5 (C-7), 158.0 (C-2), 146.4 (C-4), 133.6 (C-6), 123.1 (C-5), 114.9 (C-1), 112.3 (C-3), 56.6 (C-9), 22.0 (C-8).

(259) 2-methoxy-4-methylbenzoyl chloride

The acid **(258)** (5.05 g, 30.39 mmol) was dissolved in 45 mL of DCM, under argon. Oxalyl chloride (60.78 mmol, 5.22 mL, 2 eq) was added dropwise to the solution. The reaction was stirred for 4 hours, at room temperature. The solution was concentrated under vacuum to give **(259)** (quant.) as a yellow oil which was directly engaged in the following step.

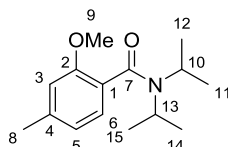
(260) (2-methoxy-4-methylphenyl)(piperidin-1-yl)methanone

To a solution of 2-methoxy-4-methylbenzoyl chloride **(259)** (650 mg, 3.30 mmol) in 5 mL of DCM was added dropwise 0.98 mL of piperidine (9.92 mmol, 3 eq), at 0°C, under argon. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 hours. The solution was then extracted with EtOAc after acidification with HCl 1M solution. After extraction, the solution was washed by saturated NaHCO₃ solution, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to yield **(260)** (753 mg, 98 %) as a pale yellow solid.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.29.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.11 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H- 6), 6.79 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H- 5), 6.72 (1H, s, H- 3), 3.82 (3H, s, H- 9), 3.62 - 3.80 (2H, m, H- 14), 3.19 (2H, t, *J* = 5.3 Hz, H- 10), 2.37 (3H, s, H-8), 2.18 (6H, s, H- 11, 12, 13).

(261) N,N-diisopropyl-2-methoxy-4-methylbenzamide

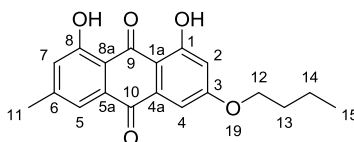


To a solution of 2-methoxy-4-methylbenzoyl chloride (**259**) (545 mg, 2.82 mmol) in 5 mL of DCM was added dropwise 1.2 mL of diisopropylamine (8.49 mmol, 3 eq), at 0°C, under argon. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 hours. The solution was then extracted with EtOAc after acidification with HCl 1M solution. After extraction, the solution was washed by saturated NaHCO₃ solution, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to yield (**261**) (658 mg, 94 %) as a white solid.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.59.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.05 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H- 6), 6.78 (1H, br d, *J* = 7.7 Hz, H- 5), 6.71 (1H, s, H- 3), 3.82 (3H, s, H- 9, 17), 3.71 (1H, spt, *J* = 6.9 Hz, H- 13), 3.50 (1H, spt, *J* = 6.8 Hz, H- 10), 2.38 (3H, s, H-8), 1.54 - 1.58 (6H, m, H- 15, 14), 1.16 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-11), 1.05 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-12).

(270) 3-butoxy-1,8-dihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione



To a solution of (**13**) (45 mg, 0.17 mmol) in 3 mL of acetone were added DBU (50 μL, 0.34 mmol, 2 eq) and 1-bromobutane (37 μL, 0.34 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 100°C under microwave irradiations. Acetone was removed under vacuum and aqueous HCl solution (1 M) was added on the crude product. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/DCM 60:40) to yield (**270**) (39 mg, 72 %) as an orange solid.

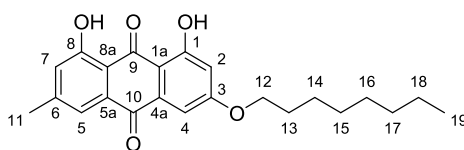
TLC (DCM/EtOAc 95:5): R_f 0.85.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.30 (1H, s, OH-8), 12.13 (1H, s, OH-1), 7.62 (1H, d, *J* = 1.1 Hz, H-5), 7.35 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-4), 7.08 (1H, q, *J* = 0.8 Hz, H-7), 6.67 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2), 4.10 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-12), 2.45 (3H, s, H-11), 1.83 (2H, quin, *J* = 7.8 Hz, H-13), 1.52 (2H, sxt, *J* = 7.5 Hz, H-14), 1.01 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-15).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 190.7 (C-9), 182.1 (C-10), 166.2 (C-3), 165.2 (C-1), 162.5 (C-8), 148.3 (C-6), 135.2 (C-4a), 133.3 (C-5a), 124.5 (C-7), 121.2 (C-5), 113.7 (C-8a), 110.1 (C-1a), 108.7 (C-2), 107.1 (C-4), 68.7 (C-12), 30.9 (C-13), 22.1 (C-11), 19.1 (C-14), 13.7 (C-15).

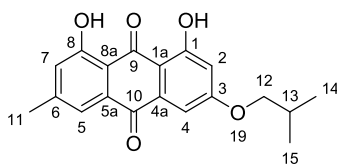
LRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 327.1, found: 327.0.

(271) 1,8-dihydroxy-3-methyl-6-(octyloxy)anthracene-9,10-dione



Procedure A : To a solution of (**13**) (50 mg, 0.19 mmol) in 2 mL of acetone were added DBU (28 μL, 0.19 mmol, 1 eq) and 1-bromooctane (64 μL, 0.38 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 100°C under microwave irradiations. Acetone was removed under vacuum and aqueous HCl solution (1 M) was added on the crude product. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/DCM 70:30) to yield (**271**) (50 mg, 71 %) as an orange solid.

Procedure B : Emodin (**13**) (0.071 mmol, 19.3 mg, 1 eq) and PPh₃ (0.107 mmol, 28.1 mg, 1.5 eq) were dissolved in 15 mL of dry THF in a flame dried flask under argon. Then 1-octanol (23 μL, 0.143 mmol, 2 eq) and DIAD (30 μL, 0.143 mmol, 2 eq) were added. The orange solution became red following the addition of DIAD then dark red after a few minutes. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/DCM 70:30) to yield (**271**) (17 mg, 65 %) as an orange solid.

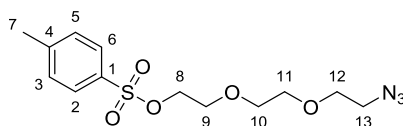
(272) 1,8-dihydroxy-3-isobutoxy-6-methylanthracene-9,10-dione

Procedure A : To a solution of **(13)** (25 mg, 0.093 mmol) in 1.2 mL of acetone were added DBU (0.094 mmol, 14 μ L, 1 eq) and 1-bromo-2-methylpropane (0.18 mmol, 20 μ L, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 100°C under microwave irradiations. Acetone was removed under vacuum and aqueous HCl solution (1 M) was added on the crude product. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C_5/DCM 60:40) to yield **(272)** (23 mg, 76 %) as an orange solid.

Procedure B : Emodin **(13)** (50 mg, 0.185 mmol, 1 eq) and PPh_3 (73 mg, 0.278 mmol, 1.5 eq) were dissolved in 30 mL of dry THF in a flame dried flask under argon. Then 3-methyl-1-butanol (77 μ L, 0.37 mmol, 2 eq) and DIAD (40 μ L, 0.37 mmol, 2 eq) were added. The orange solution became red following the addition of DIAD then dark red after a few minutes. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography (C_5/DCM 60:40) to yield **(272)** (37 mg, 61 %) as an orange solid.

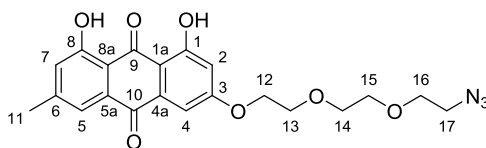
TLC (C_5/DCM 70:30): R_f 0.82.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 12.31 (1H, s, OH-8), 12.15 (1H, s, OH-1), 7.64 (1H, s, H-5), 7.37 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-4), 7.09 (1H, s, H-7), 6.67 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2), 3.87 (2H, d, J = 6.5 Hz, H-12), 2.46 (3H, s, H-11), 2.15 (1H, spt, J = 6.8 Hz, H-13), 1.06 (6H, d, J = 6.8 Hz, H-15, 14).

(273) 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate

To a solution of **(276)** (3.14 g, 17.92 mmol) in DCM (50 mL) were added 4-toluenesulfonyl chloride (4.09 g, 21.50 mmol, 1.2 eq), triethylamine (2.99 mL, 21.50 mmol, 1.2 eq) and DMAP (1.31 g, 10.75 mmol, 0.5 eq). The reaction mixture was stirred for 15 h at room temperature. Aqueous HCl solution (1 M) was added, then the mixture was extracted with DCM. The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum to yield **(273)** (5.63 g, 95 %) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.81 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-6, 2), 7.35 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-5, 3), 4.17 (2H, t, J = 5.0 Hz, H-8), 3.71 (2H, t, J = 4.4 Hz, H-9), 3.65 (2H, t, J = 5.0 Hz, H-12), 3.60 (4H, s, H-10, 11), 3.37 (2H, t, J = 5.0 Hz, H-13), 2.45 (3H, s, H-7).

(274) 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-1,8-dihydroxy-6-methylantracene-9,10-dione

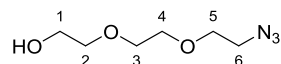
To a solution of **(13)** (43 mg, 0.159 mmol) in 1 mL of acetone were added DBU (24 μ L, 0.159 mmol, 1 eq) and **(273)** (105 mg, 0.3182 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 100°C under microwave irradiations. Acetone was removed under vacuum and aqueous HCl solution (1 M) was added on the crude product. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 70:30) to yield **(274)** (53 mg, 77 %) as an orange solid.

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f 0.39.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.25 (1H, s, OH-8), 12.07 (1H, s, OH-1), 7.59 (1H, s, H-5), 7.35 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-4), 7.05 (1H, s, H-7), 6.68 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2), 4.26 (2H, t, *J* = 4.5 Hz, H-12), 3.92 (2H, t, *J* = 4.7 Hz, H-13), 3.66 - 3.81 (6H, m, H-16, 15, 14), 3.41 (2H, br t, *J* = 4.9 Hz, H-17), 2.44 (3H, s, H-11).

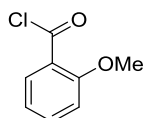
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 190.7 (C-9), 181.8 (C-10), 165.7 (C-3), 165.1 (C-1), 162.5 (C-8), 148.4 (C-6), 135.2 (C-4a), 133.1 (C-5a), 124.4 (C-7), 121.2 (C-5), 113.6 (C-8a), 110.3 (C-1a), 108.5 (C-2), 107.4 (C-4), 71.0 (C-16), 70.8 (C-14), 70.2 (C-15), 69.4 (C-13), 68.3 (C-12), 50.7 (C-17), 22.1 (C-11).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 427.1, found: 428.0.

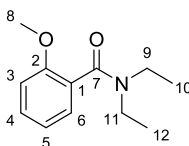
(276) 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol

To a solution of 8-chloro-3,6-dioxaoctanol (3 mL, 20.64 mmol) in 30 mL of ethanol were added NaN₃ (6.71 g, 103.2 mmol, 5 eq) and NaI (9.28 g, 61.92 mmol, 3 eq). The reaction mixture was refluxed for 24 h under stirring, filtered and ethanol was removed under vacuum. Water was added on the crude product and the aqueous phase was extracted with DCM. The combined organic layers were dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to yield **(276)** (3.15 g, 87 %) as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 3.66 - 3.80 (8H, m, H-1, 5, 4, 3), 3.63 (2H, t, *J* = 4.4 Hz, H-2), 3.41 (2H, t, *J* = 5.0 Hz, H-6), 2.22 - 2.39 (1H, m, M04).

(278) 2-methoxybenzoyl chloride

To a solution of 2-methoxybenzoic acid (5.0 g, 32.9 mmol) in DCM (50 mL), oxalyl chloride (61.3 mmol, 5.3 mL, 1.9 eq) was added dropwise under argon. The reaction was stirred for 3 hours at room temperature. The solution was concentrated under vacuum to give yellow oil (**278**) (quant.) which was directly engaged in the following step.

(279) N, N-diethyl-2-methoxybenzamide

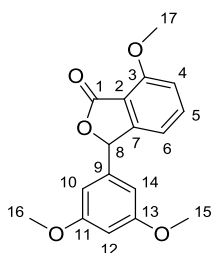
2-methoxybenzoyl chloride (**278**) was dissolved in DCM (50 mL) under argon. Diethylamine (8.6 mL, 84.2 mmol, 2.6 eq) was added dropwise at 0°C, under argon (white smoke produced instantly). The reaction was stirred for 24 hours. The solution was then extracted with EtOAc after addition of aqueous HCl solution (1M). The organic layer was then washed by saturated NaHCO₃ solution, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The yellow oil obtained was purified by silica gel chromatography (C₅/EtOAc 70:30) to yield (**279**) (5.51 g, 81 %) as yellow oil which became a white solid when stored at +4°C.

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f 0.15.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.33 (1H, td, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.8 Hz, H-4), 7.20 (1H, dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.7 Hz, H-6), 6.97 (1H, td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 0.8 Hz, H-5), 6.89 - 6.93 (1H, m, H-3), 3.83 (3H, s, H-8), 3.49 - 3.67 (2H, m, H-11), 3.15 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-9), 1.25 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-12), 1.04 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-10).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 168.8 (C-7), 155.2 (C-2), 129.9 (C-4), 127.5 (C-6), 127.1 (C-1), 120.8 (C-5), 111.0 (C-3), 55.5 (C-8), 42.8 (C-11), 38.8 (C-9), 14.0 (C-12), 12.9 (C-10).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 207.3, found: 207.0.

(280) 3-(3,5-dimethoxyphenyl)-7-methoxyisobenzofuran-1(3H)-one

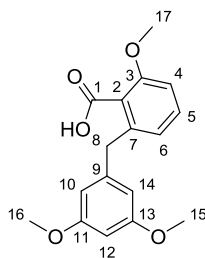
80 mL of dry THF were introduced in a flame dried flask under argon and cooled at -78°C . TMEDA (2.0 mL, 13.7 mmol, 1.2 eq) was then added, followed by *sec*-BuLi solution in hexane (9.8 mL, 13.7 mmol, 1.2 eq), leading to yellow coloration. The reaction mixture was stirred 10 min at -78°C . Then **(279)** (2.333 g, 11.3 mmol) dissolved in 5 mL of dry THF, was added dropwise, to the solution, and the color switched to orange. The reaction mixture was stirred 15 more minutes at -78°C before the addition of a solution of 3,5-dimethoxybenzaldehyde (2.300 g, 13.84 mmol, 1.2 eq) dissolved in 5 mL of dry THF. The solution switched to yellow. The reaction mixture was stirred 20 min at -78°C then allowed to warm to room temperature for 3 hours. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc after addition of aqueous HCl solution (1M). The organic layer was concentrated under vacuum to give an orange-yellow oil. The oil thus obtained was dissolved in toluene (90 mL) and PTSA (1.8 g, 10.5 mmol, 0.9 eq) was added. The solution mixture was stirred at 80°C for 15 hours. The solution became brown and was then extracted with EtOAc after addition of saturated NaHCO_3 solution. The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The compound thus obtained was recrystallized from Et_2O to give a white powder **(280)** (1.781 mg, 53 %)

TLC (C_5/EtOAc 50:50): R_f 0.39.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.58 (1H, dd, J = 8.2 Hz, J = 7.6 Hz, H-5), 6.94 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-6), 6.90 (1H, dt, J = 7.5 Hz, J = 0.8 Hz, H-4), 6.44 (3H, s, H-12, 10, 14), 6.23 (1H, s, H-8), 4.03 (3H, s, H-17), 3.76 (6H, s, H-16, 15).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 168.5 (C-1), 161.2 (C-13, 11), 158.5 (C-3), 152.3 (C-7), 139.0 (C-9), 136.5 (C-5), 114.5 (C-2), 112.8 (C-6), 110.9 (C-4), 104.6 (C-14, 10), 100.9 (C-12), 81.4 (C-8), 56.1 (C-16, 15), 55.4 (C-17).

LRMS-ESI (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd: 300.3, found: 300.0.

(281) 2-(3,5-dimethoxybenzyl)-6-methoxybenzoic acid

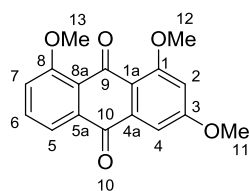
A methanolic solution (100 mL) of **(280)** (1.756 g, 5.84 mmol) was stirred at room temperature under 75 psi pressure of hydrogen in the presence of Pearlman's catalyst (0.352 g, 20 % m/m) for 22 hours. The mixture was filtrated on Celite and the solvent was removed under vacuum. The residue was then extracted with EtOAc after addition of a saturated aqueous NaHCO₃ solution. The aqueous layer was acidified with concentrated HCl and extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to yield **(281)** (1,640 g, 93 %) as a white solid.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.22.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.32 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.86 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 6.83 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-4), 6.38 (2H, d, *J* = 2.0 Hz, H-14, 10), 6.31 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, H-12), 4.11 (2H, s, H-8), 3.92 (3H, s, H-17), 3.75 (6H, s, H-15, 16).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171.8 (C-1), 160.8 (C-13, 11), 156.8 (C-3), 142.4 (C-9), 140.7 (C-7), 131.3 (C-2), 122.8 (C-5), 121.8 (C-6), 109.2 (C-14, 10), 107.3 (C-4), 98.4 (C-12), 56.2 (C-15, 16), 55.2 (C-17), 39.4 (C-8).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 302.1, found: 302.0.

(282) 1,3,8-trimethoxyanthracene-9,10-dione

To a solution of **(281)** (1.202 g, 3.976 mmol) in DCM (38 mL) stirred at 0°C under argon was added dropwise trifluoroacetic anhydride (0.55 mL, 3.976 mmol). The coloration of the solution switched from yellow to green then brown. The reaction mixture was stirred for 10 min at room temperature then the reaction was quenched with H₂O. The reaction mixture was extracted with DCM after addition of a saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was adsorbed on silica gel and stirred under O₂ atmosphere for 24 h then filtrated over silica gel with 400 mL of DCM/MeOH 90:10. The residue was not further purified and yielded **(282)** (853 mg, 72 %) as an orange solid.

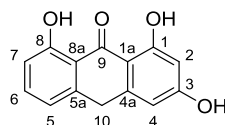
TLC (C₅/EtOAc 20:80): R_f 0.26.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.84 (1H, dd, *J* = 7.8 Hz, 0.9 Hz, H-5), 7.62 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-6), 7.34 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-4), 7.31 (1H, dd, *J* = 7.8 Hz, 0.9 Hz, H-7), 6.78 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2), 4.01 (3H, s, H-13), 3.98 (3H, s, H-12), 3.96 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 184.1 (C-10), 181.9 (C-9), 163.9 (C-3), 161.7 (C-1), 159.6 (C-8), 136.4 (C-5a), 134.7 (C-4a), 133.5 (C-6), 123.9 (C-5), 119.0 (C-7), 118.5 (C-8a), 118.4 (C-1a), 105.3 (C-4), 101.9 (C-2), 56.6 (C-12), 56.5 (C-13), 55.9 (C-11).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 299.1, found: 299.1.

(283) 1,3,8-trihydroxyanthracen-9(10H)-one



To a solution of **(282)** (95 mg, 0.356 mmol) in concentrated acetic acid (4 mL) was added dropwise 3.6 mL of aqueous solution of iodhydric acid (57 %). The mixture was refluxed for 4 h. Water was added, then the aqueous solution was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with aqueous Na₂S₂O₄ (10 % m/v) solution to remove iodine traces, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (C₅/EtOAc 70:30) to yield **(283)** (62 mg, 72 %) as a pale yellow solid.

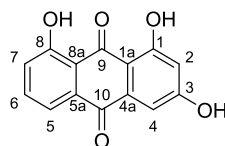
TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f 0.33.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.33 (1H, s, OH-1), 12.28 (1H, s, OH-8), 10.87 (1H, s, OH-3), 7.53 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-6), 6.95 (1H, br d, *J* = 7.4 Hz, H-7), 6.84 (1H, br d, *J* = 8.3 Hz, H-5), 6.44 (1H, s, H-4), 6.25 (1H, br d, *J* = 1.4 Hz, H-2), 4.36 (2H, s, H-10).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 191.9 (C-9), 165.6 (C-3), 165.1 (C-1), 162.1 (C-8), 145.6 (C-4a), 142.6 (C-5a), 136.3 (C-6), 119.4 (C-5), 115.5 (C-7), 115.2 (C-8a), 109.0 (C-1a), 107.9 (C-4), 101.5 (C-2), 32.8 (C-10).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 243.1, found: 243.0.

(284) 1,3,8-trihydroxyanthracene-9,10-dione



To a solution of **(282)** (300 mg, 1.006 mmol) in concentrated acetic acid (18 mL) was added 9.0 mL of an aqueous solution of HBr (47 %) dropwise. The mixture was stirred 1 hour at 150°C under microwave irradiations. Water was added, then the aqueous solution was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 90:10) to yield **(284)** (157 mg, 61 %) as an orange solid.

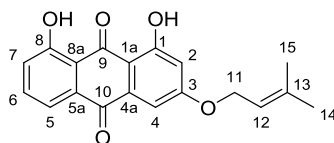
TLC (DCM/EtOAc 90:10): R_f 0.47.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ=12.12 (1H, s, OH-1), 12.09 (1H, s, OH-8), 11.45 (1H, s, OH-3), 7.77 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-6), 7.69 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 7.37 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.16 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-4), 6.63 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm: 190.6 (C-9), 182.0 (C-10), 166.2 (C-3), 165.0 (C-1), 161.7 (C-8), 137.3 (C-4a), 135.7 (C-5a), 133.7 (C-6), 125.0 (C-5), 116.2 (C-7), 109.6 (C-1a), 109.4 (C-8a), 109.3 (C-4), 108.5 (C-2).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 257.0, found: 257.0.

(285) 1,8-dihydroxy-3-methyl-6-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)anthracene-9,10-dione



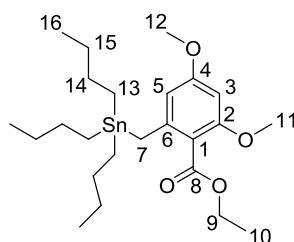
To a solution of **(284)** (50 mg, 0.20 mmol) in 2 mL of acetone were added DBU (60 μL, 0.40 mmol, 2 eq) and 1-bromo-3-methylbut-2-ene (46 μL, 0.40 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 100°C under μW irradiations. Acetone was removed under vacuum and aqueous HCl solution (1 M) was added on the crude product. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography (C₅/DCM 60:40) to yield **(285)** (46 mg, 73 %) of as an orange solid.

TLC (DCM/EtOAc 95:5): R_f 0.80.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.28 (1H, s, OH-8), 12.22 (1H, s, OH-1), 7.82 (1H, dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, H-5), 7.65 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-6), 7.40 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-4), 7.29 (1H, dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-7), 6.71 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2), 5.50 (1H, tspt, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.4 Hz, H-12), 4.67 (2H, d, *J* = 6.9 Hz, H-11), 1.83 (3H, s, H-14), 1.80 (3H, s, H-15).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 191.1 (C-9), 181.8 (C-10), 166.2 (C-3), 165.3 (C-1), 162.3 (C-8), 139.8 (C-13), 136.4 (C-6), 135.2 (C-4a), 133.6 (C-5a), 124.7 (C-7), 119.9 (C-12), 118.2 (C-5), 115.9 (C-8a), 110.2 (C-1a), 109.0 (C-2), 107.5 (C-4), 65.8 (C-11), 25.8 (C-14), 18.3 (C-15).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₁₉H₁₇O₅ [M+H]⁺ : 325.10705, found: 325.10743.

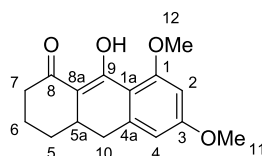
(352) ethyl 2,4-dimethoxy-6-((tributylstannyl)methyl)benzoate

To a solution of *i*-Pr₂NH (0.22 mL, 1.52 mmol, 2.2 eq) and THF (1.5 mL) was added *n*-BuLi (0.70 mL, 1.38 mmol, 1.97 M) at -78°C under argon atmosphere. The solution was stirred for 20 min, then a solution of ethyl 2,4-dimethoxy-6-methylbenzoate (155 mg, 0.69 mmol, 1 eq) in THF (1.5 mL) was added dropwise. The resulting red solution was stirred for 30 min at -78°C before Bu₃SnCl (0.38 mL, 1.38 mmol, 2 eq) was added. The resulting yellow solution was warmed to room temperature and quenched with aqueous NH₄Cl solution. The product was extracted with Et₂O, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by preparative CCM (C₇/EtOAc 9:1) yielded **(352)** (384 mg, 100 %) as a clear colorless oil.

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f 0.71.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.13 (2H, t, *J* = 3.8 Hz, H-3, 5), 4.34 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-9), 3.77 (6H, d, *J* = 1.5 Hz, H-11, 12), 2.29 (2H, s, H-7), 1.43 (6H, quin, *J* = 7.8 Hz, H-14), 1.36 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10), 1.26 (6H, sxt, *J* = 7.5 Hz, H-15), 0.86 (9H, t, *J* = 7.5 Hz, H-16), 0.75 - 0.94 (6H, m, H-13).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 168.5 (C-8), 161.1 (C-4), 158.6 (C-2), 145.0 (C-6), 114.3 (C-1), 104.2 (C-5), 94.0 (C-3), 60.7 (C-9), 55.9 (C-11), 55.2 (C-12), 29.0 (C-14), 27.3 (C-15), 17.3 (C-7), 14.4 (C-16), 13.7 (C-10), 10.0 (C-13).

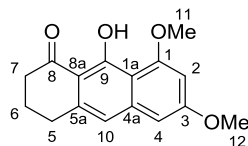
(353) 9-hydroxy-6,8-dimethoxy-3,4,4a,10-tetrahydroanthracen-1(2H)-one

To a solution of ethyl 2,4-dimethoxy-6-[(tributylstannyl) methyl]benzoate **(352)** (0.27 mmol, 136 mg) in THF was added *n*-BuLi solution in hexane (0.27 mmol, 0.14 mL, 1.97 M) at -78°C under argon atmosphere. A deep orange coloration was observed. The solution was stirred for 30 min then cyclohexenone (0.19 mmol, 18.75 mg, 0.02 mL) was added (the orange colour disappeared resulting in a yellow solution), then the solution was stirred for 30 min at -78°C , warmed to room temperature Over 2 h under stirring, then quenched with aqueous NH₄Cl solution. The product was extracted with EtOAc. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 80:20 to 70:30), yielded **(353)** (37 mg, 71 %) as a pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.37 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 6.30 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-4), 3.89 (3H, s, H-12), 3.83 (3H, s, H-11), 2.68 (1H, dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 3.3 Hz, H-7), 2.55 - 2.65 (2H, m, H-10), 2.52 (1H, d, *J* = 13.4 Hz, H-7), 2.37 - 2.41 (1H, m, H-5a), 1.94 - 2.02 (1H, m, H-5), 1.85 - 1.94 (1H, m, H-6), 1.53 - 1.67 (1H, m, H-6), 1.23 - 1.32 (1H, m, H-5).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 187.2 (C-8), 180.7 (C-13), 163.8 (C-1), 162.1 (C-3), 146.8 (C-4a), 114.7 (C-8a), 108.7 (C-1a), 104.7 (C-4), 97.5 (C-2), 56.0 (C-12), 55.4 (C-11), 38.3 (C-7), 33.0 (C-10), 31.0 (C-5a), 30.1 (C-5), 20.9 (C-6).

(354) 9-hydroxy-6,8-dimethoxy-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one

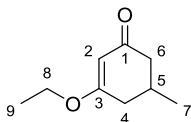


To a solution of ethyl 2,4-dimethoxy-6-[(tributylstannyl)methyl]benzoate (**352**) (65 mg, 0.13 mmol) in 1.5 mL of THF was added *n*-BuLi solution in hexane (0.064 mL, 0.13 mmol, 1.97 M) at -78°C under argon atmosphere. A deep orange coloration was observed. The solution was stirred for 30 min then 3-ethoxy-2-cyclohexenone (**355**) (12.68 mg, 0.09 mmol, 0.012 mL) was added (the orange colour disappeared resulting in a yellow solution). The solution was stirred for 30 more min at -78°C, warmed to room temperature over 2 hours, then quenched with aqueous NH₄Cl solution. The solution was then extracted with EtOAc. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 80:20 to 70:30) yielded (**354**) (10 mg, 41 %) as a yellow solid.

TLC (C₅/EtOAc 70:30): R_f 0.36.

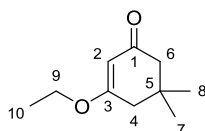
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.25 (1H, s, OH-9), 6.85 (1H, s, H-10), 6.55 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-4), 6.43 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2), 3.99 (3H, s, H-11), 3.91 (3H, s, H-12), 2.95 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H-5), 2.73 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H-7), 2.10 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H-6).

(357) 3-ethoxy-5-methylcyclohex-2-en-1-one



To a solution of 5-methylcyclohexane-1,3-dione (15.85 mmol, 2.00 g) in toluene (22 mL) were added PTSA (270 mg, 1.57 mmol, 0.1 eq) and ethanol (4.6 mL, 79.27 mmol, 5 eq). The solution mixture was stirred under reflux for 20 h. The solution was then extracted with EtOAc after addition of saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 50:50), yielded (**357**) (932 mg, 38 %) as light brown oil.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.37.

(358) 3-ethoxy-5,5-dimethylcyclohex-2-en-1-one

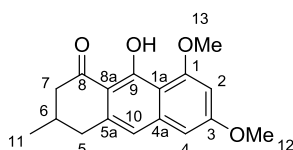
To a solution of 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione (2.023 g, 14.43 mmol) in toluene (20 mL) were added PTSA (246 mg, 1.43 mmol, 0.1 eq) and ethanol (4,2 mL, 72.16 mmol, 5 eq). The solution mixture was stirred under reflux for 20 h. The solution was then extracted with EtOAc after addition of saturated aqueous NaHCO₃ solution. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₅/EtOAc 50:50), yielded **(358)** (1.868 g, 77 %) as light brown oil.

TLC (C₅/EtOAc 50:50): R_f 0.42.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.22 (1H, s, H-2), 3.79 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H-9), 2.16 (2H, s, H-4), 2.08 (2H, s, H-6), 1.25 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10), 0.95 (6H, s, H-8, 7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 199.4 (C-1), 176.1 (C-3), 101.3 (C-2), 64.1 (C-9), 50.6 (C-6), 42.9 (C-4), 32.3 (C-5), 28.2 (C-7, 8), 14.0 (C-10).

LRMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 169.1, found: 169.3.

(361) 9-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one

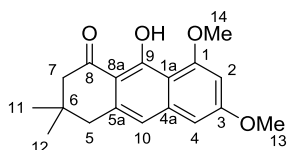
15 mL of dry THF was introduced in a flame dried flask under argon and cooled at -20°C. DIPA (0.63 mL, 4.45 mmol, 3.6 eq) was then added, followed by *n*-BuLi solution in hexane (2.7 mL, 4.33 mmol, 3.5 eq, 1.6 M). The reaction mixture was stirred 10 min at -20°C then cooled to -78°C prior to addition of **(360)** (260 mg, 1.24 mmol) in 2 mL of dry THF. A deep red coloration was observed and the solution was stirred for 10 more min at -78°C. Then **(357)** (381 mg, 2.47 mmol, 2 eq) dissolved in 2 mL of dry THF, was added dropwise over 5 min to the solution, and the color switched to brown then orange. The reaction mixture was stirred 15 more min at -78°C then allowed to warm to room temperature for 3 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc after addition of an aqueous solution of HCl (1M). The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₇/EtOAc 80:20) yielded **(361)** (163.4 mg, 46 %) as a yellow solid.

TLC (C₇/EtOAc 80:20): R_f 0.41.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.20 (1H, s, OH-9), 6.82 (1H, s, H-10), 6.54 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-4), 6.41 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 3.98 (3H, s, H-13), 3.90 (3H, s, H-12), 2.95 (1H, br d, *J* = 15.6 Hz, H-5), 2.75 (1H, br d, *J* = 16.7 Hz, H-5), 2.63 (1H, dd, *J* = 15.8 Hz, *J* = 10.7 Hz, H-7), 2.40 (1H, dd, *J* = 16.9 Hz, *J* = 11.3 Hz, H-7), 2.23 - 2.35 (1H, m, H-6), 1.13 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.8 (C-8), 165.8 (C-9), 162.0 (C-1), 161.3 (C-3), 141.9 (C-5a), 139.4 (C-4a), 115.9 (C-10), 110.4 (C-8a, 1a), 98.9 (C-4), 97.8 (C-2), 56.1 (C-13), 55.4 (C-12), 46.6 (C-7), 38.3 (C-5), 29.7 (C-6), 21.1 (C-11).

(362) 9-hydroxy-6,8-dimethoxy-3,3-dimethyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one

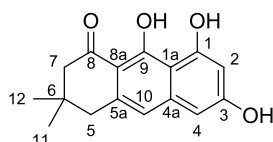


19 mL of dry THF were introduced in a flame dried flask under argon and cooled at -20°C. DIPA (0.7 mL, 5.137 mmol, 3.6 eq) was then added, followed by *n*-BuLi solution in hexane (3.1 mL, 5.0 mmol, 3.5 eq, 1.6 M). The reaction mixture was stirred 10 min at -20°C then cooled to -78°C prior to addition of **(360)** (300 mg, 1.42 mmol) in 2 mL of dry THF. A deep red coloration was observed and the solution was stirred for 10 more min at -78°C. Then **(358)** (480 mg, 2.85 mmol, 2 eq) dissolved in 2 mL of dry THF, was added dropwise over 5 min to the solution, and the color switched to brown then orange. The reaction mixture was stirred 15 more min at -78°C and allowed to warm to room temperature for 3 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc after addition of aqueous solution of HCl (1 M). The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. Purification by silica gel column chromatography (C₇/EtOAc 80:20) yielded **(362)** (230.8 mg, 54 %) as a yellow solid.

TLC (C₇/EtOAc 80:20): R_f 0.41.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.18 (1H, s, OH-9), 6.84 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-4), 6.43 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2), 4.00 (3H, s, H-14), 3.91 (3H, s, H-13), 2.79 (2H, s, H-5), 2.55 (2H, s, H-7), 1.08 (6H, s, H-11, 12).

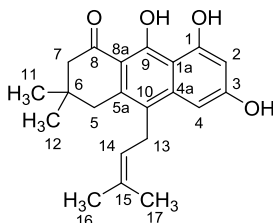
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.6 (C-8), 165.7 (C-9), 162.0 (C-1), 161.3 (C-3), 142.0 (C-5a), 138.6 (C-4a), 116.6 (C-10), 109.8 (C-8a, 1a), 98.9 (C-4), 97.8 (C-2), 56.1 (C-14), 55.4 (C-13), 52.0 (C-7), 43.8 (C-5), 32.8 (C-6), 28.0 (C-12, 11).

(363) 6,8,9-trihydroxy-3,3-dimethyl-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one

To a solution of **(362)** (151.5 mg, 0.504 mmol) in acetic acid (10 mL) was added 5.0 mL of an aqueous solution of HBr (47 %). The reaction mixture was refluxed overnight and quenched with H₂O. The aqueous solution was then extracted with EtOAc, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by RP18 flash chromatography (H₂O/MeOH 50:50 to 0:100 over 20 min, 20 mL/min) to yield **(363)** (130.4 mg, 95 %) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.33 (1H, s, OH-9), 9.96 (1H, s, OH-1), 6.76 (1H, s, H-10), 6.51 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, H-4), 6.41 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, H-2), 5.67 (1H, br s, H-18), 2.75 (1H, s, H-5), 2.55 (2H, s, H-7), 1.09 (6H, s, H-11, 12).

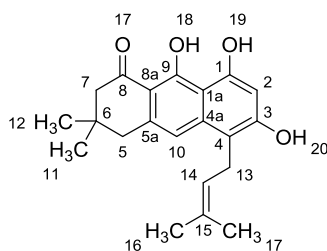
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.3 (C-8), 166.6 (C-9), 160.4 (C-1), 159.8 (C-3), 141.2 (C-4a), 137.5 (C-5a), 116.5 (C-10), 115.8 (C-8a), 108.2 (C-1a), 102.2 (C-2), 101.1 (C-4), 50.9 (C-7), 43.3 (C-5), 33.0 (C-6), 28.1 (C-12, 11).

(364) 6,8,9-trihydroxy-3,3-dimethyl-10-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one

To a solution of **(363)** (32 mg, 0.12 mmol) in 1.5 mL of acetone were added DBU (18 μL, 0.12 mmol, 1 eq) and 1-bromo-3-methylbut-2-ene (28 μL, 0.24 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 22 h at room temperature. Acetone was removed under vacuum. Water was added and the aqueous solution was extracted with EtOAc after addition of an aqueous solution of HCl (1 M). The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by semipreparative HPLC (H₂O/MeOH 20:80 to 0:100 in 30 min, 20 mL/min) to yield **(364)** (12 mg, 30 %) and **(365)** (10 mg, 25 %) as yellow solids.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.42 (1H, d, *J* = 0.8 Hz, H-19), 6.70 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4), 6.45 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 5.72 (1H, br s, H-20), 4.98 (1H, tspt, *J* = 6.0 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-14), 3.46 (2H, br d, *J* = 6.0 Hz, H-13), 2.76 (2H, s, H-5), 2.55 (2H, s, H-7), 1.85 (3H, s, H-16), 1.71 (3H, s, H-17), 1.09 (6H, s, H-11, 12).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.4 (C-8), 166.2 (C-9), 161.3 (C-1), 159.9 (C-3), 140.7 (C-4a), 133.9 (C-5a), 132.2 (C-15), 124.3 (C-10), 122.4 (C-14), 108.0 (C-8a), 107.9 (C-1a), 100.9 (C-2), 100.1 (C-4), 50.3 (C-7), 40.6 (C-5), 32.3 (C-6), 28.4 (C-12, 11), 27.3 (C-13), 25.6 (C-16), 18.2 (C-17).

(365) 6,8,9-trihydroxy-3,3-dimethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one

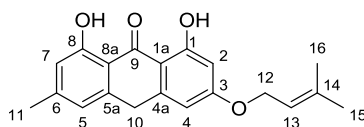
This product was obtained with **(364)** as described above.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.32 (1H, d, J = 0.9 Hz, H-OH-9), 10.01 (1H, d, J = 0.9 Hz, H-OH-1), 6.99 (1H, t, J = 1.4 Hz, H-10), 6.43 (1H, s, H-2), 5.79 (1H, br s, H-OH-3), 5.18 (1H, tspt, J = 6.7 Hz, J = 1.3 Hz, H-14), 3.56 (2H, br d, J = 6.8 Hz, H-13), 2.80 (2H, s, H-5), 2.56 (2H, s, H-7), 1.88 (3H, s, H-16), 1.74 (3H, d, J = 1.5 Hz, H-17), 1.10 (6H, s, H-11, 12).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 203.1 (C-8), 166.4 (C-9), 158.3 (C-1), 157.5 (C-3), 138.8 (C-4a), 136.8 (C-5a), 133.4 (C-15), 122.1 (C-14), 113.2 (C-10), 111.0 (C-4), 107.9 (C-8a), 107.6 (C-1a), 101.1 (C-2), 50.8 (C-7), 43.6 (C-5), 32.8 (C-6), 27.9 (C-11, 12), 25.5 (C-16), 23.8 (C-13), 17.8 (C-17).

12 Natural products

(7) Madagascine anthrone



UV λ_{\max} : 216, 254, 272, 308, 353 nm.

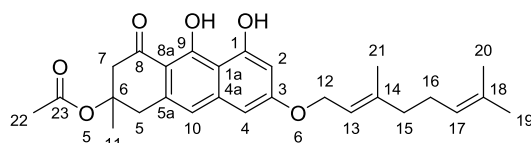
HPLC (method Vismione) : t_R = 7.48 min.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.41 (1H, s, OH-8), 12.16 (1H, s, OH-1), 6.82 (1H, s, H-5), 6.71 (1H, s, H-7), 6.60 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-4), 6.45 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 5.45 (1H, tspt, J = 6.9 Hz, J = 1.5 Hz, H-13), 4.65 (2H, d, J = 6.8 Hz, H-12), 4.35 (2H, s, H-10), 2.34 (3H, s, H-11), 1.76 (3H, s, H-15), 1.73 (3H, s, H-16).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 191.8 (C-9), 165.4 (C-3), 164.8 (C-1), 162.2 (C-8), 147.8 (C-6), 145.0 (C-4a), 142.5 (C-5a), 138.7 (C-14), 120.4 (C-13), 119.5 (C-5), 115.7 (C-7), 113.3 (C-1a, 8a), 107.3 (C-4), 100.5 (C-2), 65.5 (C-12), 32.8 (C-10), 25.9 (C-15), 22.0, 21.5 (C-11), 18.5 (C-16).

This product was not isolated.

(8) Acetylvismione D



Acetylvismione D
C₂₇H₃₂O₆
452,55 g/mol

Aspect : yellow powder

TLC (C₇/EtOAc 50:50): R_f 0.85.

UV λ_{\max} : 203, 228, 273, 319, 332, 394 nm.

HPLC (method Vismione) : t_R = 7.92 min.

$[\alpha]_D^{20}$ = +16,3° (c 0.10, MeOH).

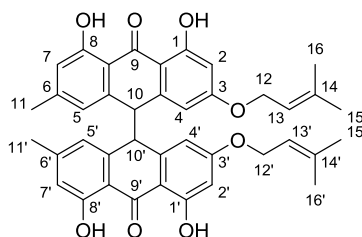
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 15.93 (1H, s, OH-9), 9.73 (1H, s, OH-1), 6.84 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 6.51 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2), 5.51 (1H, tsxt, J = 6.6 Hz, J = 1.1 Hz, H-13), 5.11 (1H, tspt, J = 6.7 Hz, J = 1.3 Hz, H-17), 4.63 (2H, d, J = 6.5 Hz, H-12), 3.72 (1H, dd, J = 16.1 Hz, J = 1.1 Hz, H-5), 3.20 (1H, dd, J = 17.6 Hz, J = 2.0 Hz, H-7), 3.07 (1H, dd, J = 16.0 Hz, J = 1.0 Hz, H-5), 2.85 (1H, d, J = 17.6 Hz, H-7), 2.07 - 2.17 (4H, m, H-15, 16), 1.87 (3H, s, H-22), 1.77 (3H, s, H-21), 1.70 (3H, s, H-11), 1.68 (3H, s, H-19), 1.62 (3H, s, H-20).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 200.8 (C-8), 170.6 (C-23), 165.9 (C-9), 163.2 (C-3), 159.9 (C-1), 142.1 (C-14), 141.2 (C-4a), 134.7 (C-5a), 132.1 (C-18), 123.9 (C-17), 119.1 (C-13), 117.7 (C-10), 108.3 (C-8a), 108.1 (C-1a), 101.8 (C-4), 101.0 (C-2), 80.8 (C-6), 65.3 (C-12), 49.4 (C-7), 39.8 (C-15), 39.8 (C-5), 26.5 (C-16), 25.9 (C-19), 24.7 (C-11), 22.3 (C-22), 17.9 (C-20), 16.9 (C-21).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₇H₃₂NaO₆⁺ [M+Na]⁺ : 475,20911, found: 475.21016.

Experimental section

Natural products

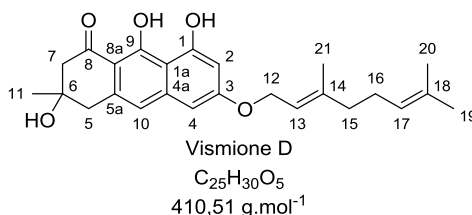
(17) Bianthrone A_{2b}

Chemical Formula: C₄₀H₃₈O₈
 Exact Mass: 646,25667
 Molecular Weight: 646,73600

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.13 (1H, s, OH-8), 12.05 (1H, s, OH-8'), 11.84 (1H, s, OH-1), 11.75 (1H, s, OH-1'), 6.62 (1H, q, *J* = 0.6 Hz, H-7), 6.59 (1H, q, *J* = 0.6 Hz, H-7'), 6.33 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2), 6.28 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 6.05 (2H, t, *J* = 2.3 Hz, H-4', 4), 5.94 (2H, t, *J* = 3.1 Hz, H-5', 5), 5.42 (2H, qspt, *J* = 6.4 Hz, *J* = 1.5 Hz, H-13', 13), 4.47 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, 12), 4.43 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, 12'), 4.27 (2H, d, *J* = 3.0 Hz, H-10', 10), 2.24 (3H, s, H-11), 2.20 (3H, s, H-11'), 1.77 (6H, s, H-15', 15), 1.72 (6H, s, H-16', 16).

UV λ_{max} : 197, 281, 362 nm.

This product was not isolated.

(33) Vismione D

Aspect : yellow powder

TLC (C₇/EtOAc 50:50): R_f 0.57.

UV λ_{max} : 201, 228, 273, 319, 332, 395 nm.

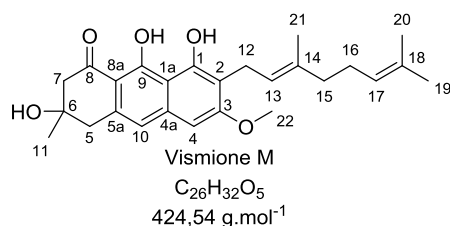
HPLC (method Vismione) : t_R = 7.18 min.

[α]_D²⁰ = -7,4° (c 0.09, MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 16.14 (1H, s, OH-9), 9.80 (1H, s, OH-1), 6.86 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-4), 6.51 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2), 5.51 (1H, br tsxt, *J* = 6.6 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-13), 5.11 (1H, tspt, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.3 Hz, H-17), 4.63 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, H-12), 3.05 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.023, *J*_{AB} = 16.2 Hz, H-5), 2.85 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.031, *J*_{AB} = 17.9 Hz, H-7), 2.08 - 2.19 (4H, m, H-15, 16), 1.77 (3H, s, H-21), 1.68 (3H, s, H-19), 1.62 (3H, s, H-20), 1.46 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 201.5 (C-8), 166.3 (C-9), 163.0 (C-3), 159.8 (C-1), 141.8 (C-14), 141.0 (C-4a), 135.1 (C-5a), 131.9 (C-18), 123.7 (C-17), 118.9 (C-13), 117.7 (C-10), 108.0 (C-8a), 108.0 (C-1a), 101.5 (C-4), 100.8 (C-2), 71.0 (C-6), 65.1 (C-12), 51.0 (C-7), 43.4 (C-5), 39.6 (C-15), 29.0 (C-11), 26.3 (C-16), 25.7 (C-19), 17.7 (C-20), 16.8 (C-21).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₅H₃₁O₅⁺ [M+H]⁺ : 411.21660, found: 411.21673.

(42) Vismione M

Aspect : yellow powder

TLC (C₇/EtOAc 50:50): R_f 0.50.

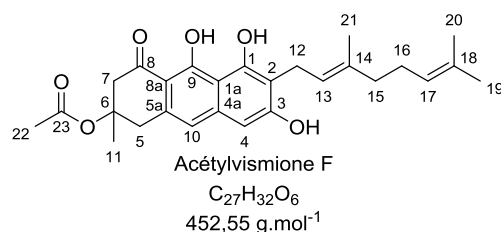
UV λ_{max} : 230, 277, 319, 333, 403 nm.

HPLC (method Vismione) : t_R = 7.61 min.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 16.18 (1H, s, OH-9), 9.98 (1H, s, OH-1), 6.89 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, s, H-4), 5.26 (1H, tsxt, *J* = 7.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-13), 5.09 (1H, tspt, *J* = 7.0 Hz, *J* = 1.4 Hz, H-17), 3.95 (3H, s, H-22), 3.47 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-12), 3.07 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.026, *J*_{AB} = 16.0 Hz, H-5), 2.87 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.031, *J*_{AB} = 17.8 Hz, H-7), 2.05 - 2.11 (2H, m, H-16), 1.96 - 2.02 (2H, m, H-15), 1.83 (3H, s, H-21), 1.66 (3H, s, H-19), 1.59 (3H, s, H-20), 1.47 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 201.5 (C-8), 165.9 (C-9), 162.0 (C-3), 156.1 (C-1), 138.9 (C-4a), 135.2 (C-14), 134.1 (C-5a), 131.1 (C-18), 124.5 (C-17), 122.1 (C-13), 117.6 (C-10), 114.9 (C-2), 108.1 (C-8a), 108.0 (C-1a), 97.8 (C-4), 71.1 (C-6), 55.6 (C-22), 51.1 (C-7), 43.4 (C-5), 39.8 (C-15), 28.8 (C-11), 26.8 (C-16), 25.7 (C-19), 21.9 (C-12), 17.6 (C-20), 16.1 (C-21).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₆H₃₃O₅⁺ [M+H]⁺ : 425.23225, found: 425.23366.

(44) Acétylvismione F

Aspect : yellow powder

UV λ_{max} : 201, 231, 277, 323, 335, 406 nm.

HPLC (method Vismione) : t_R = 7.37 min.

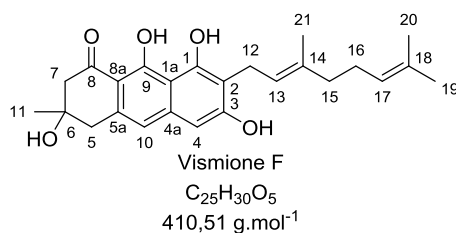
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.20 (1H, s, OH-9), 10.15 (1H, s, OH-1), 6.77 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, s, H-4), 6.16 (1H, br s, OH-3), 5.30 (1H, t, *J* = 7.3 Hz, H-13), 5.07 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, H-17), 3.71 (1H, d, *J* = 16.1 Hz, H-5), 3.54 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-12), 3.19 (1H, d, *J* = 17.6 Hz, H-7), 3.05 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-5), 2.85 (1H, d, *J* = 17.4 Hz, H-7), 2.03 - 2.15 (4H, m, H-16, 15), 1.87 (3H, s, H-21), 1.85 (3H, s, H-22), 1.70 (4H, s, H-19), 1.67 (3H, s, H-20), 1.59 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 200.1 (C-8), 170.6 (C-23), 166.4 (C-9), 159.8 (C-3), 156.8 (C-1), 138.9 (C-4a), 138.7 (C-14), 133.5 (C-5a), 131.9 (C-18), 123.9 (C-17), 121.4 (C-13), 116.9 (C-10), 112.3 (C-2), 107.9 (C-8a), 107.6 (C-1a), 102.9 (C-4), 80.8 (C-6), 49.1 (C-7), 39.7 (C-15), 39.6 (C-5), 26.5 (C-16), 25.6 (C-19), 24.5 (C-11), 22.1 (C-22), 22.0 (C-12), 17.7 (C-20), 16.3 (C-21).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₇H₃₂NaO₆⁺ [M+Na]⁺ : 475.20911, found: 475.20981.

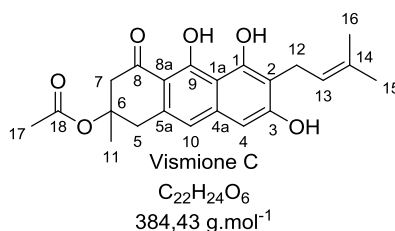
Experimental section

Natural products

(66) Vismione F**Aspect :** yellow powder**TLC** (C₇/EtOAc 50:50): R_f 0.35.**HPLC** (method Vismione) : t_R = 6.54 min.**UV λ_{max}** : 200, 229, 277, 321, 334, 387 nm.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 16.42 (1H, s, OH-9), 10.23 (1H, s, OH-1), 6.77 (1H, s, H-10), 6.54 (1H, s, H-4), 5.95 (1H, br s, OH-3), 5.30 (1H, tsxt, J = 7.0 Hz, J = 1.0 Hz, H-13), 5.07 (1H, tspt, J = 6.8 Hz, J = 1.3 Hz, H-17), 3.55 (2H, d, J = 7.1 Hz, H-12), 3.03 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.026, J_{AB} = 16.0 Hz, H-5), 2.84 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.032, J_{AB} = 17.4 Hz, H-7), 2.04 - 2.15 (4H, m, H-16, 15), 1.85 (3H, s, H-21), 1.68 (3H, d, J = 0.9 Hz, H-19), 1.60 (3H, s, H-20), 1.45 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 201.0 (C-8), 166.9 (C-9), 159.8 (C-3), 156.8 (C-1), 139.0 (C-14), 139.0 (C-4a), 134.1 (C-5a), 132.0 (C-18), 123.8 (C-17), 121.4 (C-13), 117.1 (C-10), 112.1 (C-2), 107.8 (C-8a), 107.7 (C-1a), 102.9 (C-4), 71.0 (C-6), 50.8 (C-7), 43.3 (C-5), 39.7 (C-15), 28.9 (C-11), 26.4 (C-16), 25.7 (C-19), 22.0 (C-12), 17.7 (C-20), 16.3 (C-21).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₅H₃₁O₅⁺ [M+H]⁺ : 411.21660, found: 411.21746.**(78) Vismione C****Aspect :** yellow powder**TLC** (C₇/EtOAc 50:50): R_f 0.58.**UV λ_{max}** : 231, 278, 323, 336, 411 nm.**HPLC** (method Vismione) : t_R = 6.23 min.

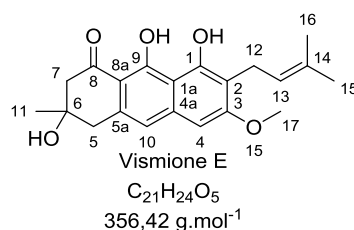
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 16.15 (1H, s, OH-9), 10.12 (1H, s, OH-1), 6.75 (1H, s, H-10), 6.55 (1H, br s, H-4), 5.30 (1H, t, J = 7.0 Hz, H-13), 3.71 (1H, br d, J = 16.0 Hz, H-5), 3.52 (2H, br d, J = 6.7 Hz, H-12), 3.18 (1H, br d, J = 17.4 Hz, H-7), 3.05 (1H, br d, J = 16.0 Hz, H-5), 2.85 (1H, br d, J = 17.5 Hz, H-7), 1.87 (3H, s, H-17), 1.85 (3H, s, H-15), 1.75 (3H, s, H-16), 1.70 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 200.2 (C-8), 170.9 (C-18), 166.3 (9), 159.6 (C-3), 156.8 (C-1), 138.9 (C-4a), 134.6 (C-14), 133.5 (C-5a), 121.5 (C-13), 116.9 (C-10), 112.5 (C-2), 107.9 (C-8a), 107.6 (C-1a), 102.8 (C-4), 80.9 (C-6), 49.1 (C-7), 39.5 (C-5), 25.9 (C-15), 24.5 (C-11), 22.1 (C-12, C-17), 17.9 (C-16).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₂H₂₄NaO₆⁺ [M+Na]⁺ : 407,14651, found: 407.14591.

Experimental section

Natural products

(79) Vismione E

Aspect : yellow powder

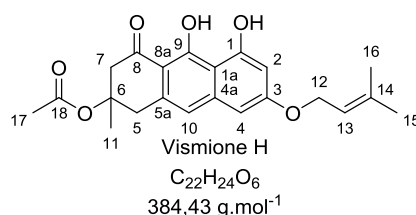
UV λ_{max} : 230, 277, 319, 331, 403 nm.

HPLC (method Vismione) : t_R = 6.34 min.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.17 (1H, s, OH-9), 9.98 (1H, s, OH-1), 6.89 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, s, H-4), 5.26 (1H, tspt, J = 7.2 Hz, J = 1.4 Hz, H-13), 3.95 (3H, s, H-17), 3.47 (2H, d, J = 7.0 Hz, H-12), 3.07 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.025, J_{AB} = 16.2 Hz, H-5), 2.86 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.032, J_{AB} = 17.4 Hz, H-7), 1.84 (4H, s, H-15), 1.71 (3H, s, H-16), 1.47 (1H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 201.6 (C-8), 165.9 (C-9), 162.0 (C-3), 156.0 (C-1), 139.0 (C-4a), 134.1 (C-5a), 131.7 (C-14), 122.3 (C-13), 117.6 (C-10), 114.8 (C-2), 108.1 (C-1a), 108.1 (C-8a), 97.8 (C-4), 71.1 (C-6), 55.6 (C-17), 51.1 (C-7), 43.4 (C-5), 28.8 (C-11), 25.8 (C-15), 22.0 (C-12), 17.8 (C-16).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₁H₂₅O₅⁺ [M+H]⁺ : 357.16965, found: 357.16972.

(94) Vismione H

Aspect : yellow powder

TLC (C₇/EtOAc 50:50): R_f 0.82.

UV λ_{max} : 200, 228, 273, 319, 332, 395 nm.

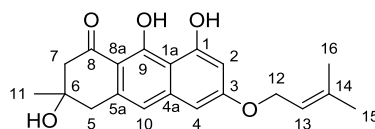
HPLC (method Vismione) : t_R = 6.78 min.

[α]_D²⁰ = +21,3° (c 0.10, MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 15.92 (1H, s, OH-9), 9.73 (1H, s, OH-1), 6.83 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-4), 6.50 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2), 5.52 (1H, tspt, J = 6.7 Hz, J = 1.3 Hz, H-13), 4.60 (2H, d, J = 6.8 Hz, H-12), 3.72 (1H, dd, J = 16.0 Hz, J = 1.3 Hz, H-5), 3.20 (1H, dd, J = 17.7 Hz, J = 2.0 Hz, H-7), 3.06 (1H, dd, J = 16.0 Hz, J = 0.7 Hz, H-5), 2.85 (1H, d, J = 17.7 Hz, H-7), 1.86 (3H, s, H-17), 1.83 (3H, s, H-15), 1.78 (3H, s, H-16), 1.70 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 200.6 (C-8), 170.4 (C-18), 165.7 (C-9), 163.0 (C-3), 159.7 (C-1), 141.0 (C-4a), 138.8 (C-14), 134.5 (C-5a), 119.1 (C-13), 117.5 (C-10), 108.1 (C-8a), 107.9 (C-1a), 101.6 (C-2), 100.7 (C-4), 80.6 (C-6), 65.1 (C-12), 49.2 (C-7), 39.6 (C-5), 25.9 (C-15), 24.5 (C-11), 22.1 (C-17), 18.3 (C-16).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₂H₂₄NaO₆⁺ [M+Na]⁺ : 407,14651, found: 407.14788.

(97) Desacetylvismione H

Désacétylvismione H

C₂₀H₂₂O₅

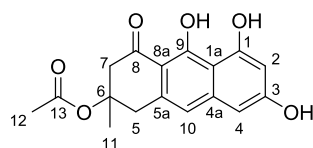
342,39 g/mol

Aspect : yellow powder**UV λ_{max}** : 202, 226, 271, 318, 330, 389 nm.**HPLC** (method Vismione) : t_R = 5.76 min.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.15 (1H, s, OH-9), 9.82 (1H, s, OH-1), 6.88 (1H, s, H-10), 6.59 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 6.53 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2), 5.54 (1H, tspt, J = 6.7 Hz, J = 1.3 Hz, H-13), 4.62 (2H, d, J = 6.7 Hz, H-12), 3.07 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.016, J_{AB} = 16.6 Hz, H-5), 2.86 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0.026, J_{AB} = 17.6 Hz, H-7), 1.84 (3H, s, H-15), 1.72 (3H, s, H-16), 1.48 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 201.4 (C-8), 166.3 (C-9), 163.0 (C-3), 159.8 (C-1), 141.0 (C-4a), 138.7 (C-14), 135.1 (C-5a), 119.1 (C-13), 117.6 (C-10), 108.0 (C-1a), 108.0 (C-8a), 101.5 (C-2), 100.8 (C-4), 71.0 (C-6), 65.1 (C-12), 51.0 (C-7), 43.3 (C-5), 28.9 (C-11), 25.8 (C-15), 18.2 (C-16).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₂₀H₂₃O₅⁺ [M+H]⁺ : 343.15400, found: 343.15343.

(201) 6-acetylantrochryson

6-acétylantrochryson

C₁₇H₁₆O₆

316,31 g/mol

Aspect : yellow powder**UV λ_{max}** : 200, 231, 275, 324, 338, 405 nm.**HPLC** (method Vismione) : t_R = 4.56 min.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 16.01 (1H, s, OH-9), 9.84 (1H, s, OH-1), 6.82 (1H, s, H-10), 6.55 (1H, s, H-4), 6.45 (1H, s, H-2), 5.86 (1H, br s, OH-3), 3.74 (1H, dd, J = 16.4 Hz, J = 1.6 Hz, H-5), 3.22 (1H, dd, J = 17.8 Hz, J = 1.9 Hz, H-7), 3.09 (1H, d, J = 16.3 Hz, H-5), 2.87 (1H, d, J = 17.7 Hz, H-7), 1.89 (3H, s, H-12), 1.72 (3H, s, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 200.5 (C-8), 170.6 (C-13), 166.0 (C-9), 160.3 (C-1), 160.3 (C-3), 141.1 (C-4a), 134.6 (C-5a), 117.1 (C-10), 108.0 (C-8a), 107.8 (C-1a), 102.5 (C-2), 101.5 (C-4), 80.7 (C-6), 49.2 (C-7), 39.6 (C-5), 24.5 (C-11), 22.1 (C-12).

HRMS (ESI-TOF) : calcd. for C₁₇H₁₆NaO₆⁺ [M+Na]⁺ : 339.08391, found: 339.08396.

Bibliographie générale

1. Vanaerschot, M., Huijben, S., Van den Broeck, F. & Dujardin, J.-C. Drug resistance in vectorborne parasites: multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race. (2014). *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 41–55.
2. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. (2012). *J. Nat. Prod.* **75**, 311–335.
3. Wells, T. N. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? (2011). *Malar. J.* **10**, S3.
4. Adjanohoun, J. *Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon*. (1996).
5. Stevens, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. (2012). *Version 12, July 2012* Page last updated: 12/05/2015 at <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Accessed in June 2015.
6. Ruhfel, B. R., Stevens, P. F. & Davis, C. C. Combined Morphological and Molecular Phylogeny of the Clusioid Clade (Malpighiales) and the Placement of the Ancient Rosid Macrofossil Paleoclusia. (2013). *Int. J. Plant Sci.* **174**, 910–936.
7. Robson, N. Guttiferae. (1961). *Flora of Zimbabwe* **1**, 378.
8. The plant list V1.1. (2013). at <http://www.theplantlist.org/>. Accessed in June 2015.
9. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève and South African National Biodiversity Institute, P. Base de données des plantes d'Afrique (version 3.4.0). at <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/>. Accessed in June 2015.
10. Poumale, H. M. P. et al. Flavonoid glycosides and other constituents of *Psorospermum androsaemifolium* Baker (Clusiaceae). (2008). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **56**, 1428–1430.
11. Kerharo, J. & Bouquet, A. *Plantes médicinales et toxiques de la Côte-d'Ivoire - Haute-Volta. Mission d'étude de la pharmacopée indigène en A.O.F.* (Editions Vigot Frères, 1950).
12. Malgras, D. *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*. (Karthala, 1992).
13. Koumare, F. *Quelques données sur les conceptions et la pratique de la médecine et pharmacopée vétérinaires indigènes*. (1933).
14. Saikhou, B. L'élevage au Fouta-Djallon (régions de Timbo et Labé). (1939). *Bull. Inst. français d'Afrique Noire* **2-3**, 630–644.
15. Adjanohoun, E. et al. *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Bénin*. (Agence de coopération culturelle et technique, (A.C.C.T.), 1989).
16. Arkinstall, W. in (Presses de l'Institut de Recherche Scientifique, 1979). *Revue de recherche scientifique. Spécial Médecine traditionnelle au Zaïre* 135–158.
17. Disengomoka, I. & Delaveau, P. Medicinal plants used for child's respiratory diseases in Zaire. (1983). *J. Ethnopharmacol.* **8**, 257–277.
18. Kibungu Kembelo, A. O. Quelques plantes médicinales du Bas-Congo et leurs usages. (2003).
19. Bouquet, A. *Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville)*. (Mém. O.R.S.T.O.M., 36, 1969).
20. Bitsindou, M. & Lejoly, J. Les plantes antidiarrhéiques chez les Sundi de la sous-préfecture de Kindamba (Congo). in (Kluwer Academic Publishers, 1996). *The Biodiversity of African Plants. Proceedings 14th AETFAT Congress* (eds. van der Maesen, J. G., van der Burgt, X. M. & van Medenbach de Rooy, J. M.) 722–726.
21. Lubini, A. *Les plantes utilisées en médecine traditionnelle par les Yansi de l'entre Kwilu-Kamtsha (Zaïre)*. (Mitt. Inst. Allg. Bot., 1990).
22. Rodrigues Areia, M. L. Note pour l'étude de l'ethnobotanique dans la culture Tshokwe. (1977). *Contrib. para o Estud. da Antropol. Port.* **10**, 94.
23. Byavu, N., Henrard, C., Dubois, M. & Malaisse, F. Phytothérapie traditionnelle des bovins dans les élevages de la plaine de la Rusizi. (2000). *Agron. Soc. Environ.* **4**, 135–156.

24. Kasonia, K. *et al.* Note d'ethnopharmacologie vétérinaire en cas de verminoses, diarrhée, coprostase et météorisme au Kivu et Kibali-Ituri (Zaïre). (1991). *Tropicultura* **9**, 169–172.
25. Baerts, M. & Lehmann, J. Guérisseurs et plantes médicinales de la région des crêtes Zaïre-Nil au Burundi. (1989). *Ann. Sc. Eco.* **18**, 214.
26. Lewalle, J. & Rodegem, F. M. Plantes médicinales du Burundi. (1968). *Quart. Journ. Crude Drug Res.* **8**, 1257–1270.
27. Polygenis- Bigendako, M.-J. Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle au Burundi occidental. (Université libre de Bruxelles, 1990).
28. Bossard, E. *La médecine traditionnelle au centre et à l'ouest de l'Angola*. (Ministério da ciência e da tecnologia. Instituto de investigação científica tropical, 1996).
29. Chhabra, S. C., Mahunnah, R. L. A. & Mshiu, E. N. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania.III. Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae). (1990). *J. Ethnopharmacol.* **28**, 255–283.
30. Haerdi, F. Afrikanische Heilpflanzen. Die Eingeborenen-Heilpflanzen des Ulanga- Distriktes Tanganjikas (Ostafrika). (1964). *Acta Trop. Suppl.* **8**, 1–278.
31. Kokwaro, J. O. *Medicinal plants of East Africa*. (East african literature bureau, 1976).
32. Kisangau, D. P., Lyaruu, H. V. M., Hosea, K. M. & Joseph, C. C. Use of traditional medicines in the management of HIV/AIDS opportunistic infections in Tanzania: a case in the Bukoba rural district. (2007). *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **3**.
33. Kakeya, M. Curing ritual of the Tongwe traditional doctor: its progress and logic. (1982). *Afr. Study Monogr.* 105–139.
34. Minja, M. M. J. in (Presses universitaires de Namur, 1994). *Métissages en santé animale de Madagascar à Haïti* 335–364.
35. Durand, J. M. *Les plantes bienfaisantes du Ruanda et de l'Urundi*. (Astrida, 1960).
36. Ssegawa, P. & Kasenene, J. M. Medicinal plant diversity and uses in Sango bay area, Southern Uganda. (2007). *J. Ethnopharmacol.* **113**, 521–540.
37. Tabuti, J. R. S., Lye, K. A. & Dhillion, S. S. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. (2003). *J. Ethnopharmacol.* **88**, 19–44.
38. Gradé, J. T., Tabuti, J. R. S. & Van Damme, P. Ethnoveterinary knowledge in pastoral Karamoja, Uganda. (2009). *J. Ethnopharmacol.* **122**, 273–293.
39. Wanzala, W., Takken, W., Mukabana, W. R., Pala, A. O. & Hassanali, A. Ethnoknowledge of Bukusu community on livestock tick prevention and control in Bungoma district, western Kenya. (2012). *J. Ethnopharmacol.* **140**, 298–324.
40. Maliwichi-Nyirenda, C. P. & Maliwichi, L. L. Medicinal plants used for contraception and pregnancy-related cases in Malawi: A case study of Mulanje. (2010). *J. Med. Plants Res.* **4**, 2121–2127.
41. Verger, P. F. *Ewé: The use of plants in Yoruba society*. (Editoria Schwarcz, 1995).
42. Kerharo, J. & Adam, J. G. Plantes médicinales et toxiques des Peuls et des Toucouleurs du Sénégal. (1964). *J. Agric. Trop. Bot. Appl.* **11**, 384–444.
43. Kerharo, J. & Adam, J. G. Les plantes médicinales, toxiques et magiques des Niominka et des Socé des Iles du Saloum (Sénégal). (1964). *Acta Trop. Suppl* **8**, 279–334.
44. Lely, H. V. *The useful trees of Northern Nigeria*. (Crown Agents for the Colonies, 1925).
45. Carrière, M. *Plantes de Guinée à l'usage des éleveurs et des vétérinaires*. (CIRAD-EMVT, République Française, Ministère de la coopération: Dép. d'élevage et de médecine vétérinaire, 1994).
46. Bouquet, A. & Debray, M. *Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire*. (Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M., 1974).
47. Bonnefoux, B. M. in (Congrégation do Espirito Santo, 1937). *Manuscrits n° 1 et n°2*.

48. Dhetchuvi, M.-M. & Lejoly, J. *Contribution à la connaissance des plantes médicinales du Nord-Est du Zaïre*. (Mitt. Inst. Allg. Bot., 1990).
49. Diafouka, A. J. P. *Analyse des usages des plantes médicinales dans 4 régions de Congo-Brazzaville*. (Université libre de Bruxelles, 1997).
50. Hamill, F. A. *et al.* Traditional herbal drugs of Southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays. (2003). *J. ethno* **84**, 57–78.
51. Haxaire, C. *Phytothérapie et Médecine Familiale chez les Gbaya-Kara (République Centrafricaine)*. (Université de Paris, 1979).
52. Palayer, P. *Lexique de plantes du pays Sar. Plantes spontanées et cultivées*. (Collège Charles Lwanga.C.E.L., 1977).
53. Van Puyvelde, L., Ngaboyisonga, M., Rwangabo, P. C., Mukarugambwa, S. & Kayonga, A. *Enquêtes ethnobotaniques sur la médecine traditionnelle rwandaise. Tome 1: Préfecture de Kibuye*. (Univ. Nat. Inst. Nat. Rech. Sc., 1977).
54. Ahua, K. M., Ioset, J.-R., Diallo, D., Mauël, J. & Hostettmann, K. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. (2007). *J. Ethnopharmacol.* **110**, 99–104.
55. Kerharo, J. & Adam, J. G. *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques*. (Editions Vigot Frères, 1974).
56. Raponda-Walker, A. & Sillans, R. *Les Plantes utiles du Gabon. Encyclopédie biologique*. (Paul Lechevalier, 1961).
57. Jansen, O. *et al.* Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. (2010). *J. Ethnopharmacol.* **130**, 143–150.
58. Gelfand, M., Mavi, S., Ndemera, R. B. & Drummond, B. *The traditional medicinal practitioner in Zimbabwe*. (Mambo Press, 1985).
59. Watt, J. M. & Breyer-Brandwijk, M. G. *The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa*. (E. & S. Livingstone Ltd, 1962).
60. Willcox, M. *et al.* Improved Traditional Medicines in Mali. (2012). *J. Altern. Complement. Med.* **18**, 212–220.
61. Epifano, F., Fiorito, S. & Genovese, S. Phytochemistry and pharmacognosy of the genus *Psorospermum*. (2013). *Phytochem. Rev.* **12**, 673–684.
62. Tsaffack, M. *et al.* Two new antimicrobial dimeric compounds: febrifuquinone, a vismione-anthraquinone coupled pigment and adamabianthrone, from two *Psorospermum* species. (2009). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **57**, 1113–1118.
63. Tsaffack, M. *et al.* Antimicrobial prenylated xanthenes and anthraquinones from barks and fruits of *Psorospermum adamaense* (Engl). (2013). *Nat. Prod. J.* **3**, 60–65.
64. Poumale, P. H. M. *et al.* Flavonol glycoside from *Psorospermum androsaemifolium*. (2011). *Chinese J. Chem.* **29**, 85–88.
65. Kouam, S. F. *et al.* Psorantin, a unique methylene linked dimer of vismin and kenganthranol E, two anthranoid derivatives from the fruits of *Psorospermum aurantiacum* (Hypericaceae). (2010). *Phytochem. Lett.* **3**, 185–189.
66. Tchakam, P. D. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum* Engl. and *Hypericum lanceolatum* Lam. (2012). *BMC Complement. Altern. Med.* **12**, 136.
67. Tiani, G. M., Ishtiaq, A., Krohn, K., Green, I. R. & Nkengfack, A. E. Kenganthranol F, a new anthranol from *Psorospermum aurantiacum*. (2013). *Nat. Prod. Commun.* **8**, 103–104.
68. Delle Monache, F., Botta, B., Delle Monache, G. & Marini Bettolo, G. B. Chemistry of the *Psorospermum* genus. Part 3. Prenylated anthranoids from *Psorospermum* species. (1985). *Phytochemistry* **24**, 1855–1856.

69. Zubair, M. F. *et al.* Bioactive steroid from the root bark of *Psorospermum corymbiferum*. (2011). *Zhongguo Tianran Yaowu* **9**, 264–266.
70. Zubair, M. F., Oladosu, I. A. & Olawore, N. O. Chemical composition of the leaf oil of *Psorospermum corymbiferum* Hochr. Growing in Africa. (2010). *J. Essent. Oil Res.* **22**, 529–530.
71. Abou-Shoer, M., Suwanborirux, K., Chang, C. & Cassady, J. M. Novel tetrahydrofurobenzofuranoxanthones from *Psorospermum febrifugum*. (1989). *Tetrahedron Lett.* **30**, 3385–3388.
72. Habib, A. M., Reddy, K. S., McCloud, T. G., Chang, C. J. & Cassady, J. M. New xanthones from *Psorospermum febrifugum*. (1987). *J. Nat. Prod.* **50**, 141–145.
73. Kupchan, S. M., Strelman, D. R. & Sneden, A. T. Psorospermin, a new antileukemic xanthone from *Psorospermum febrifugum*. (1980). *J. Nat. Prod.* **43**, 296–301.
74. Habib, A. M. *et al.* Structure and stereochemistry of psorospermin and related cytotoxic dihydrofuranoxanthones from *Psorospermum febrifugum*. (1987). *J. Org. Chem.* **52**, 412–418.
75. Abou-Shoer, M., Boettner, F. E., Chang, C. J. & Cassady, J. M. Antitumor and cytotoxic xanthones of *Psorospermum febrifugum*. (1988). *Phytochemistry* **27**, 2795–2800.
76. Amonkar, A., Chang, C. J. & Cassady, J. M. 6-Geranyloxy-3-methyl-1,8-dihydroxyanthrone, a novel antileukemic agent from *Psorospermum febrifugum* Spach var. *ferrugineum* (Hook. fil.). (1981). *Experientia* **37**, 1138–1139.
77. Marston, a, Potterat, O. & Hostettmann, K. Isolation of biologically active plant constituents by liquid chromatography. (1988). *J. Chromatogr.* **450**, 3–11.
78. Botta, B., Delle Monache, F., Delle Monache, G., Marini Bettolo, G. B. & Msonthi, J. D. Chemistry of *Psorospermum* genus. Part 2. Prenylated bianthrone and vismione F from *Psorospermum febrifugum*. (1985). *Phytochem.* **24**, 827–830.
79. Botta, B., Delle Monache, F., Delle Monache, G. & Kabangu, K. Chemistry of *Psorospermum* genus. Part 4. Acetylvismione D from *Psorospermum febrifugum*. (1986). *Phytochemistry* **25**, 766.
80. Abou-Shoer, M., Habib, A. A., Chang, C. J. & Cassady, J. M. Seven xanthonolignoids from *Psorospermum febrifugum*. (1989). *Phytochemistry* **28**, 2483–2487.
81. Botta, B., Delle Monache, F., Delle Monache, G., Marini Bettolo, G. B. & Oguakwa, J. U. 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxyanthraquinone and vismiones C, D, and E, from *Psorospermum febrifugum*. (1983). *Phytochem.* **22**, 539–542.
82. Pouli, N. & Marakos, P. Fused xanthone derivatives as antiproliferative agents. (2009). *Anticancer. Agents Med. Chem.* **9**, 77–98.
83. Ndjakou Lenta, B. *et al.* Anti-plasmodial and cholinesterase inhibiting activities of some constituents of *Psorospermum glaberrimum*. (2008). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **56**, 222–226.
84. Botta, B., Delle Monache, F., Delle Monache, G. & Menichini, F. Chemistry of *Psorospermum* genus. Part 7. Psorolactones and other metabolites from *Psorospermum glaberrimum*. (1988). *Tetrahedron* **44**, 7193–7198.
85. Botta, B., Delle Monache, F. & Delle Monache, G. A novel type of prenylated anthranoid from *Psorospermum glaberrimum*. (1987). *Tetrahedron Lett.* **28**, 567–570.
86. Leet, J. E. *et al.* Cytotoxic Xanthones from *Psorospermum molluscum* from the Madagascar Rain Forest. (2008). *J. Nat. Prod.* **71**, 460–463.
87. Pedersen, M. E. *et al.* Pharmacological screening of Malian medicinal plants used against epilepsy and convulsions. (2009). *J. Ethnopharmacol.* **121**, 472–475.
88. Delle Monache, G., Botta, B., Oguakwa, J. U. & Delle Monache, F. Chemistry of the *Psorospermum* genus. 6. New vismiones from *Psorospermum tenuifolium*. (1987). *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **1**, 42–46.

89. Delle Monache, G., Delle Monache, F., Di Benedetto, R. & Oguakwa, J. U. Chemistry of the *Psorospermum* genus. Part 5. New metabolites from *Psorospermum tenuifolium*. (1987). *Phytochemistry* **26**, 2611–2613.
90. Zubair, M. F., Oladosu, I. A., Olawore, N. O. & Fakunle, C. O. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of Nigerian *Psorospermum tenuifolium* (Hook. F.). (2009). *Int. J. Essent. Oil Ther.* **3**, 22–24.
91. Gill, M. Pigments of *fungi* (Macromycetes). (1996). *Nat. Prod. Rep.* **13**, 513–528.
92. Gill, M. Pigments of *fungi* (Macromycetes). (2003). *Nat. Prod. Rep.* **11**, 301–317.
93. Gill, M. Pigments of *fungi* (Macromycetes). (1999). *Nat. Prod. Rep.* **16**, 301–317.
94. Gill, M. & Steglich, W. in (Springer-Verlag, 1987). *Progress in the Chemistry of organic natural products Vol.51* (eds. Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. & Tamm, C.) 125–170.
95. Billen, G., Karl, U., Scholl, T., Stroech, K. D. & Steglich, W. in (Springer-Verlag, 1988). *Natural products chemistry III* (eds. Atta-ur-Rhman & Le Quesne, P. W.) 305–315.
96. Endo, M. & Naoki, H. Antimicrobial and Antispasmodic tetrahydroanthracenes from *Cassia singueana*. (1980). *Tetrahedron* **36**, 2449–2452.
97. Takahashi, S., Takido, M., Sankawa, U. & Shibata, S. Studies on the constituents of purgative crude drugs. Part 9. Germichryson, a hydroanthracene derivative from seedlings of *Cassia torosa*. (1976). *Phytochem.* **15**, 1295–1296.
98. Takido, M., Takahashi, S., Masuda, K. & Yasukawa, K. Torosachryson, a new tetrahydroanthracene derivative from the seeds of *Cassia torosa*. (1977). *Lloydia* **40**, 191–194.
99. Kitanaka, S. & Takido, M. Studies of the constituents of purgative crude drugs. Part 11. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia*: the structures of two new lactones, isotoralactone and cassialactone. (1981). *Phytochem.* **20**, 1951–1953.
100. Alemayehu, G. & Abegaz, B. M. Bianthraquinones from the seeds of *Senna multiglandulosa*. (1996). *Phytochemistry* **41**, 919–921.
101. Alemayehu, G., Woldeyesus, B. & Abegaz, B. M. (+)-Floribundone 3 from the pods of *Senna septentrionalis*. (1997). *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **11**, 25–29.
102. Alemayehu, G., Abegaz, B., Snatzke, G. & Duddeck, H. Quinones of *Senna didymobotrya*. (1989). *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **3**, 37–40.
103. Delle Monache, G. *et al.* Studies in cell suspension cultures of *Cassia didymobotrya*. Part 4. Metabolites from *in vitro* cultures of *Cassia didymobotrya*. (1991). *Phytochemistry* **30**, 1849–1854.
104. Mammo, W., Dagne, E. & Steglich, W. Quinone pigments from *Araliorhamnus vaginata*. (1992). *Phytochemistry* **31**, 3577–3581.
105. Yenesew, A., Ogur, J. A. & Duddeck, H. (R)-Prechrysophanol from *Aloe graminicola*. (1993). *Phytochemistry* **34**, 1442–1444.
106. Dagne, E. & Alemu, M. Constituents of the leaves of four *Aloe* species from Ethiopia. (1991). *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **5**, 87–91.
107. Saleen, R., Faizi, S., Deeba, F., Siddiqui, B. S. & Qazi, M. H. Anthrones from *Aloe barbadensis*. (1997). *Phytochemistry* **45**, 1279–1282.
108. Van Wyk, B.-E., Yenesew, A. & Dagne, E. Chemotaxonomic survey of anthraquinones and pre-anthraquinones in roots of *Aloe* species. (1995). *Biochem. Syst. Ecol.* **23**, 267–275.
109. Van Wyk, B. E., Yenesew, A. & Dagne, E. The chemotaxonomic significance of root anthraquinones and pre-anthraquinones in the genus *Lomatophyllum* (Asphodelaceae). (1995). *Biochem. Syst. Ecol.* **23**, 805–808.
110. Yagi, A., Makino, K. & Nishioka, I. Constituents of *Aloe saponaria*. I. Structures of tetrahydroanthracene derivatives and the related anthraquinones. (1974). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **22**, 1159–1166.

111. Dagne, E., Casser, I. & Steglich, W. Aloechryson, a dihydroanthracenone from *Aloe berhana*. (1992). *Phytochemistry* **31**, 1791–1793.
112. Sigler, A. & Rauwald, H. W. *Aloe* plants accumulate anthrone-type anthranoids in inflorescence and leaves, and tetrahydroanthracenes in roots. (1994). *Zeitschrift fuer Naturforschung, C J. Biosci.* **49**, 286–292.
113. Sigler, A. & Rauwald, H. W. Tetrahydroanthracenes as markers for subterranean anthranoid metabolism in *Aloe* species. (1994). *J. Plant Physiol.* **143**, 596–600.
114. Abdissa, N. *et al.* Cytotoxic Quinones from the Roots of *Aloe dawei*. (2014). *Molecules* **19**, 3264–3273.
115. Dagne, E., van Wyk, B.-E., Mueller, M. & Steglich, W. Three dihydroanthracenones from *Gasteria bicolor*. (1996). *Phytochemistry* **41**, 795–799.
116. Yagi, A., Makino, K. & Nishioka, I. Studies on the constituents of *Aloe saponaria* Haw. III. The structures of phenol glucosides. (1977). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **25**, 1771–1776.
117. Yagi, A., Makino, K. & Nishioka, I. Studies on the constituents of *Aloe saponaria* Haw. II. The structures of tetrahydroanthracene derivatives, aloesaponol III and -IV. (1977). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **25**, 1764–1770.
118. Yagi, A., Shoyama, Y. & Nishioka, I. Formation of tetrahydroanthracene glucosides by callus tissue of *Aloe saponaria*. (1983). *Phytochem.* **22**, 1483–1484.
119. Van Wyk, B.-E., Yenesew, A. & Dagne, E. The chemotaxonomic significance of root anthraquinones and pre-anthraquinones in the genus *Lomatophyllum* (asphodelaceae). (1995). *Biochem. Syst. Ecol.* **23**, 805–808.
120. Yenesew, A., Ogur, J. A. & Duddeck, H. (R)-Prechrysophanol from *Aloe graminicola*. (1993). *Phytochemistry* **34**, 1442–1444.
121. Yagi, A., Makino, K. & Nishioka, I. Studies on the Constituents of *Aloe saponaria* Haw. I. The Structures of Tetrahydroanthracene Derivatives and the Related Anthraquinones. (1974). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **22**, 1159–1166.
122. Induli, M. *et al.* Naphthoquinones from the roots of *Aloe secundiflora*. (2012). *Phytochem. Lett.* **5**, 506–509.
123. Lucini, L., Pellizzoni, M., Pellegrino, R., Molinari, G. Pietro & Colla, G. Phytochemical constituents and *in vitro* radical scavenging activity of different *Aloe* species. (2015). *Food Chem.* **170**, 501–507.
124. Yenesew, A., Dagne, E., Müller, M. & Steglich, W. An anthrone, an anthraquinone and two oxanthrones from *Kniphofia foliosa*. (1994). *Phytochemistry* **37**, 525–528.
125. Li, C., Shi, J.-G., Zhang, Y. P. & Zhang, C. Z. Constituents of *Eremurus chinensis*. (2000). *J. Nat. Prod.* **63**, 653–656.
126. Hatano, T. *et al.* Phenolic constituents of *Cassia* seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (1999). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **47**, 1121–1127.
127. Kitanaka, S. & Takido, M. Studies on the constituents of purgative crude drugs. Part XV. Torosachryson and physcion gentiobiosides from the seeds of *Cassia torosa*. (1984). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **32**, 3436–3440.
128. Kanno, M., Shibano, T., Takido, M. & Kitanaka, S. Antiallergic agent from natural sources. 2. Structures and leukotriene release-inhibitory effect of torososide B and torosachryson 8-O-6"-malonyl- β -gentiobioside from *Cassia torosa* CAV. (1999). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **47**, 915–918.
129. Kitanaka, S., Igarashi, H. & Takido, M. Studies on the constituents of purgative crude drugs. Part XVI. Formation of pigments by the tissue culture of *Cassia occidentalis*. (1985). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **33**, 971–974.
130. Kitanaka, S. & Takido, M. Studies on the constituents of the roots of *Cassia torosa*. II. The structures of two dimeric tetrahydroanthracenes. (1990). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **38**, 1292–1294.

131. Takido, M., Kitanaka, S., Takahashi, S. & Tanaka, T. Studies of the constituents of purgative crude drugs. Part 11. Germitorosone and methylgermitorosone, two hydroanthracene derivatives from seedlings of *Cassia torosa*. (1982). *Phytochem.* **21**, 425–427.
132. Djemgou, P. C. *et al.* An antisalmonellal agent and a new dihydroanthracenone from *Cassia petersiana*. (2007). *Res. J. Med. Plant* **1**, 65–71.
133. Takahashi, S., Takido, M., Sankawa, U. & Shibata, S. Germichryson, a hydroanthracene derivative from seedlings of *Cassia torosa*. (1976). *Phytochemistry* **15**, 1295–1296.
134. Takahashi, S. *et al.* Formation of anthraquinones, hydroanthracene and flavonoid by the callus culture of *Cassia torosa*. (1981). *Shoyakugaku Zasshi* **35**, 22–25.
135. Ko, K. S., Ebizuka, Y., Noguchi, H. & Sankawa, U. Production of secondary metabolites by hairy roots and regenerated plants transformed with Ri plasmids. (1988). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **36**, 4217–4220.
136. Endo, M. & Naoki, H. Antimicrobial and Antispasmodic tetrahydroanthracenes from *Cassia singueana*. (1980). *Tetrahedron* **36**, 2449–2452.
137. Kitanaka, S. & Takido, M. Studies on the constituents of purgative crude drugs. XXII. Two new bitetrahydroanthracenes from roots of *Cassia occidentalis* L. (1989). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **37**, 511–512.
138. Ko, K. S., Ebizuka, Y., Noguchi, H. & Sankawa, U. Production of polyketide pigments in hairy root cultures of *Cassia* plants. (1995). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **43**, 274–278.
139. Fraga, B. M., Quintana, N. & Díaz, C. E. Dihydroanthracenones and hydronaphthalenones from the roots of *Plocama pendula*. (2012). *Phytochem. Lett.* **5**, 211–213.
140. Hu, J., Zhao, Y., Miao, Z. & Zhou, J. Chemical components of *Dendrobium polyanthum*. (2009). *Bull. Korean Chem. Soc.* **30**, 2098–2100.
141. Hu, J., Fan, W., Dong, F., Miao, Z. & Zhou, J. Chemical Components of *Dendrobium chrysotoxum*. (2012). *Chinese J. Chem.* **30**, 1327–1330.
142. Ritchie, E. & Taylor, W. G. Constituents of *Harungana* [Haronga] *madagascariensis*. (1964). *Tetrahedron Lett.* 1431–1436.
143. Kouam, S. F. *et al.* α -Glucosidase Inhibitory Anthranols, Kenganthranols A-C, from the Stem Bark of *Harungana madagascariensis*. (2006). *J. Nat. Prod.* **69**, 229–233.
144. Iinuma, M., Tosa, H., Ito, T., Tanaka, T. & Aqil, M. Two prenylated anthrones in *Harungana madagascariensis*. (1995). *Phytochemistry* **40**, 267–270.
145. Tih, A. E., Ghogomu, R. T., Sondengam, B. L., Caux, C. & Bodo, B. Minor constituents of *Harungana madagascariensis* stem bark. (2006). *Biochem. Syst. Ecol.* **34**, 267–269.
146. Hussein, A. a *et al.* Bioactive constituents from three *Vismia* species. (2003). *J. Nat. Prod.* **66**, 858–60.
147. Cassinelli, G., Geroni, C., Botta, B., Delle Monache, G. & Delle Monache, F. Cytotoxic and antitumor activity of vismiones isolated from *Vismieae*. (1986). *J. Nat. Prod.* **49**, 929–931.
148. Laphookhieo, S., Maneerat, W. & Koysomboon, S. Antimalarial and cytotoxic phenolic compounds from *Cratoxylum maingayi* and *Cratoxylum cochinchinense*. (2009). *Molecules* **14**, 1389–95.
149. Mbwambo, Z. H. *et al.* Anthranoid compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*. (2004). *Planta Med.* **70**, 706–10.
150. François, G. *et al.* Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure-activity relationships. (1999). *Parasitol. Res.* **85**, 582–8.
151. Abdel-Rahman, I. A. M. *et al.* *In vitro* formation of the anthranoid scaffold by cell-free extracts from yeast-extract-treated *Cassia bicapsularis* cell cultures. (2013). *Phytochemistry* **88**, 15–24.
152. Austin, M. B. & Noel, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. (2003). *Nat. Prod. Rep.* **20**, 79–110.

153. Dewick, P. M. in (John Wiley & Sons, Ltd, 2009). *Medicinal Natural Products* 39–135.
154. Yazaki, K., Sasaki, K. & Tsurumaru, Y. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. (2009). *Phytochemistry* **70**, 1739–1745.
155. Tsaffack, M. *et al.* Two new antimicrobial dimeric compounds: febrifuquinone, a vismione-anthraquinone coupled pigment and adamabianthrone, from two *Psorospermum* species. (2009). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **57**, 1113–1118.
156. Pinneyro-Lopez, A., Martinez de Villarreal, L. & Gonzalez-Alanis, R. *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. (1994). *Toxicology* **92**, 217–227.
157. Martínez, H. R., Bermudez, M. V., Rangel-Guerra, R. A. & De Leon Flores, L. Clinical diagnosis in *Karwinskia humboldtiana* polyneuropathy. (1998). *J. Neurol. Sci.* **154**, 49–54.
158. Lansiaux, A. *et al.* DNA Topoisomerase II Inhibition by Peroxisomicine A1 and Its Radical Metabolite Induces Apoptotic Cell Death of HL-60 and HL-60/MX2 Human Leukemia Cells. (2001). *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 16–24.
159. Sundar, S. & Chakravarty, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. (2014). *Expert Opin. Pharmacother.* **16**, 1–16.
160. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. (2012). *PLoS One* **7**, 1-12.
161. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. (2010). *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 22–26.
162. World Health Organization. Leishmaniasis. (2015). at <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Accessed in August 2015.
163. Kumar, A. *Leishmania and leishmaniasis*. (Springer, 2013).
164. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. (2015). *Curr. Opin. Microbiol.* **26**, 32–40.
165. Matheoud, D. *et al.* *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. (2013). *Cell Host Microbe* **14**, 15–25.
166. Arango Duque, G., Fukuda, M., Turco, S. J., Stager, S. & Descoteaux, a. *Leishmania* Promastigotes Induce Cytokine Secretion in Macrophages through the Degradation of Synaptotagmin XI. (2014). *J. Immunol.* **193**, 2363–2372.
167. Moiz, B., A, Beg, M. & Ali, N. Cutaneous leishmaniasis in a soldier. (2010). *Indian J Pathol Microbiol* **53**, 903–4.
168. Bañuls, a. L. *et al.* Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. (2011). *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1451–1461.
169. Ganguly, S., Das, N. K., Barbhuiya, J. N. & Chatterjee, M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis - an overview. (2010). *Int. J. Dermatol.* **49**, 921–931.
170. Kumar, R. & Engwerda, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. (2014). *Clin. Transl. Immunol.* **3**, e13.
171. Jain, K. & Jain, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. (2015). *Journal of immunological methods*.
172. Den Boer, M., Argaw, D., Jannin, J. & Alvar, J. Leishmaniasis impact and treatment access. (2011). *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1471–1477.
173. Hussain, H., Al-harrasi, A., Al-rawahi, A., Green, I. R. & Gibbons, S. Fruitful Decade for Antileishmanial Compounds from 2002 to Late 2011. (2013).
174. Seifert, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. (2011). *Open Med. Chem. J.* **5**, 31–39.
175. Wyllie, S., Cunningham, M. L. & Fairlamb, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 39925–39932.

176. Brajtburg, J. & Bolard, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. (1996). *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 512–531.
177. Davidson, R. N., den Boer, M. & Ritmeijer, K. Paromomycin. (2009). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**, 653–660.
178. Tracy, G. & Simon, C. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. (2002). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**, 1472–4472.
179. Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C. & Bréard, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. (2004). *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 852–859.
180. Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D. & Opperdoes, F. R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. (2000). *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**, 1–14.
181. Chakravarty, J. & Sundar, S. Drug resistance in leishmaniasis. (2010). *J. Glob. Infect. Dis.* **2**, 167–176.
182. Lira, R. *et al.* Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. (1999). *J. Infect. Dis.* **180**, 564–567.
183. Mbongo, N., Loiseau, P. M., Billion, M. A. & Robert-Gero, M. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. (1998). *Antimicrob. Agents Chemother.* **1942**, 352–357.
184. Hendrickx, S. *et al.* Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. (2014). *Parasitol. Res.* **113**, 1875–1881.
185. García-Hernández, R., Manzano, J. I., Castanys, S. & Gamarro, F. *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. (2012). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, 1-9.
186. Loiseau, P. M. & Bories, C. Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. (2006). *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 539–550.
187. Sangshetti, J. N., Kalam Khan, F. a., Kulkarni, A. a., Arote, R. & Patil, R. H. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. (2015). *RSC Adv.* **5**, 32376–32415.
188. Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A. & Siqueira-Neto, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? (2012). *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2**, 11–19.
189. Gupta, S. & Nishi. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. (2011). *Indian J. Med. Res.* **133**, 27–39.
190. Sereno, D. & Lemesre, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. (1997). *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 972–976.
191. Pescher, P., Blisnick, T., Bastin, P. & Späth, G. F. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. (2011). *Cell. Microbiol.* **13**, 978–91.
192. Neal, R. a & Croft, S. L. An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. (1984). *J. Antimicrob. Chemother.* **14**, 463–475.
193. Sundar, S. & Chakravarty, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. (2015). *Expert opin. investig. Drugs* **24**, 43–59.
194. DNDi. DNDi Portfolio June 2015. (2015). at <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>. Accessed in August 2015.
195. Weniger, B. *et al.* Antiprotozoal activities of Colombian plants. (2001). *J. Ethnopharmacol.* **78**, 193–200.
196. Osorio, E. *et al.* Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. (2007). *J. Ethnopharmacol.* **111**, 630–635.
197. Passero, L. F. D. *et al.* Plants Used in Traditional Medicine: Extracts and Secondary Metabolites Exhibiting Antileishmanial Activity. (2012). *Curr. Clin. Pharmacol.* at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173968>. Accessed in August 2015.

198. Odone, G. *et al.* Ta'ta', Huayani: Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. (2009). *J. Ethnopharmacol.* **126**, 149–158.
199. Estevez, Y. *et al.* Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. (2007). *J. Ethnopharmacol.* **114**, 254–259.
200. Peraza-Sánchez, S. R. *et al.* Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. (2007). *Fitoterapia* **78**, 315–318.
201. Ferreira, M. E. *et al.* Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. (2010). *Phytomedicine* **17**, 375–378.
202. Chen, M., Christensen, S. B., Theander, T. G. & Kharazmi, a. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. (1994). *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1339–1344.
203. Flores, N. *et al.* Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. (2007). *Planta Med.* **73**, 206–211.
204. Tasdemir, D. *et al.* Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. (2006). **50**, 1352–1364.
205. Arruda, D. C., Alexandri, F. L. D., Alejandro, M., Uliana, S. R. B. & Katzin, A. M. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. (2005). **49**, 1679–1687.
206. Monzote, L., García, M., Montalvo, A. M., Scull, R. & Miranda, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. (2010). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **105**, 168–173.
207. Misra, P. *et al.* 16-Hydroxycyclohexa-3,13 (14)Z-dien-15,16-olide from *Polyalthia longifolia*: A safe and orally active antileishmanial agent. (2010). *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1143–1150.
208. Da Luz, R. A. I. *et al.* *In vitro* and *in vivo* prophylactic and curative activity of the triterpene saponin PX-6518 against cutaneous *Leishmania* species. (2011). *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 350–353.
209. Malaria Parasites. (2015). *Centers for Disease Control and Prevention* at <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>. Accessed in June 2015.
210. Sinka, M. E. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. (2012). *Parasit. Vectors* **5**, 69.
211. World Health Organisation. World malaria report 2014. (2014). at http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/. Accessed in July 2015.
212. Malaria Atlas Project. The spatial limits of *Plasmodium falciparum* malaria transmission map in 2010 globally. (2010). at http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/transmission-limits/Pf_limits/world/. Accessed in July 2015.
213. Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F. & McGinniss, M. H. The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. (1976). *N. Engl. J. Med.* **295**, 302–304.
214. Mueller, I., Zimmerman, P. a. & Reeder, J. C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* - the 'bashful' malaria parasites. (2007). *Trends Parasitol.* **23**, 278–283.
215. Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L. & Corbellino, M. *Plasmodium knowlesi*: The emerging zoonotic malaria parasite. (2013). *Acta Trop.* **125**, 191–201.
216. Division of Parasitic diseases and Malaria. Centers for Disease Control and Prevention. (2015). at <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Accessed in August 2015.
217. Haldar, K. & Mohandas, N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. (2009). *Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr.* 87–93.
218. Bonnin, A., Ruiz, F. & Mechaï, F. Paludisme à *Plasmodium falciparum*: place des dérivés de l'artémisinine. (2014). *Doss. du CNHIM* **35**, 1–96.

219. Buffet, P. A. *et al.* The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. (2011). *Blood* **117**, 381–392.
220. Beeson, J. G. & Brown, G. V. Cellular and Molecular Life Sciences Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria : the roles of parasite adhesion and antigenic variation. (2002). *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 258–271.
221. World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria - Third edition.* (2015).
222. Schwartz, L., Brown, G. V, Genton, B. & Moorthy, V. S. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. (2012). *Malar. J.* **11**, 11.
223. European Medicines Agency. First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA. in (2015). *EMA/CHMP/488348/2015*.
224. WHO. Malaria Vaccine Rainbow Tables. (2015). at http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/. Accessed in August 2015
225. World Health Organization. Classification des médicaments antipaludiques en fonction de leur action sur les diverses formes évolutives du parasite. (1961).
226. Gamo, F. Antimalarial drug resistance: new treatments options for *Plasmodium*. (2014). *Drug Discov. Today. Technol.* **11**, 1–116.
227. Wells, T. N. C., Van Huijsduijnen, R. H. & Van Voorhis, W. C. Malaria medicines : a glass half full ? (2015). *Nat. Publ. Gr.* **14**, 424–442.
228. White, N. J. *et al.* Spiroindolone KAE609 for *Falciparum* and *Vivax* Malaria. (2014). *N. Engl. J. Med.* **371**, 403–410.
229. Rottmann, M. *et al.* Spiroindolones, a new and potent chemotype for the treatment of malaria. (2011). *Science (80-.)*. **329**, 1175–1180.
230. Anthony, M. P., Burrows, J. N., Duparc, S., JMoehrle, J. & Wells, T. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. (2012). *Malar. J.* **11**, 1.
231. Fernandes, J. F. *et al.* Fosmidomycin as an antimalarial drug : a meta-analysis of clinical trials. (2015). *Future Microbiol.* **10**, 1375–1390.
232. Guttman, P. & Ehrlich, P. Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. (1891). *Berliner Klin. Wochenschrift* **28**, 953–956.
233. Schirmer, R. H. *et al.* Methylene blue as an antimalarial agent. (2003). *Redox Rep.* **8**, 272–275.
234. Meissner, P. E. *et al.* Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. (2006). *Malar. J.* **5**, 84.
235. Wani, W. a., Jameel, E., Baig, U., Mumtazuddin, S. & Hun, L. T. Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents. (2015). *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 534–551.
236. Flannery, E. L., Chatterjee, A. K. & Winzeler, E. a. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. (2013). *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 849–62.
237. Challand, S. & Willcox, M. A clinical trial of the traditional medicine *Vernonia amygdalina* in the treatment of uncomplicated malaria. (2009). *J. Altern. Complement. Med.* **15**, 1231–1237.
238. Pedersen, M. M. *et al.* Antimalarial sesquiterpene lactones from *Distephanus angulifolius*. (2009). *Phytochemistry* **70**, 601–607.
239. Willcox, M. L. *et al.* *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. (2007). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**, 1190–1198.
240. Graz, B. *et al.* *Argemone mexicana* decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in Mali: policy and public-health implications. (2010). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **104**, 33–41.
241. Simoes-Pires, C. *et al.* Reverse pharmacology for developing an anti-malarial phytomedicine. The example of *Argemone mexicana*. (2014). *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **4**, 338–346.

242. Botta, B., Delle Monache, G., Delle Monache, F., Marini Bettolo, G. B. & Menichini, F. Chemistry of *Vismia* genus. Part 16. Vismione H and prenylated xanthenes from *Vismia guineensis*. (1986). *Phytochemistry* **25**, 1217–1219.
243. Pinheiro, R. M., Mac-Quhae, M. M., Marini Bettolo, G. B. & Delle Monache, F. Chemistry of *Vismia* genus. Part 10. Prenylated anthranoids from *Vismia* species. (1984). *Phytochem.* **23**, 1737–1740.
244. Pasqua, G. *et al.* Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis*. (1995). *Protoplasma* **189**, 9–16.
245. Hussein, A. A. *et al.* Bioactive constituents from three *Vismia* species. (2003). *J. Nat. Prod.* **66**, 858–60.
246. Xiong, J. *et al.* Phenolic constituents from the leaves of *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*. (2014). *Fitoterapia* **94**, 114–9.
247. Marston, A., Borel, C. & Hostettmann, K. Separation of natural products by centrifugal partition chromatography. (1988). *J. Chromatogr. A* **450**, 91–99.
248. Sibanda, S., Nyanyira, C., Nicoletti, M. & Galeffi, C. Research on African Medicinal Plants. Part 30. Vismiones L and M from *Ochna pulchra*. (1993). *Phytochemistry* **34**, 1650–1652
249. Marston, A., Chapuis, J. C., Sordat, B., Msonthi, J. D. & Hostettmann, K. Anthracenic derivatives from *Psorospermum febrifugum* and their *in vitro* cytotoxicities to a human colon carcinoma cell line. (1986). *Planta Med.* 207–210.
250. Politi, M. *et al.* HPLC-UV/PAD and HPLC-MSn analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new bianthrone. (2004). *Phytochem. Anal.* **15**, 355–364.
251. Camele, G., Delle Monache, F., Delle Monache, G. & Marini-Bettolo, G. B. 2-isoprenylemodin and 5,5'-mimethoxyseamin from *vismia guarangae*. (1982). **21**, 417–419.
252. The Oesper Collections in the History of Chemistry. (2010). at <http://digitalprojects.libraries.uc.edu/oesper/museum-notes/museum-notes-2010.html>. Accessed in August 2015
253. Murayama, W. *et al.* A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. (1982). *J. Chromatogr. A* **239**, 643–649.
254. Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Chen, S.-N. & Pauli, G. F. Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. (2015). *J. Nat. Prod.* **78** epub ahead of print <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np501065h>
255. Renault, J. H. *et al.* Purification of Xanthohumol from *Humulus lupulus* by Centrifugal Partition Chromatography Using an Original Acetone Based Solvent Scale. (2006). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **29**, 761–771.
256. Amarouche, N. *et al.* Two novel solvent system compositions for protected synthetic peptide purification by centrifugal partition chromatography. (2014). *J. Chromatogr. A* **1337**, 155–61.
257. Foucault, A. & Chevlot, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. (1998). *J. Chromatogr. A* **808**, 3–22.
258. Kouam, S. F. *et al.* Psorantin, a unique methylene linked dimer of vismin and kenganthranol E, two anthranoid derivatives from the fruits of *Psorospermum aurantiacum* (Hypericaceae). (2010). *Phytochem. Lett.* **3**, 185–189.
259. Xiong, J. *et al.* Phenolic constituents from the leaves of *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*. (2014). *Fitoterapia* **94**, 114–119.
260. Marston, A., Chapuis, J. C. & Hostettmann, K. Isolation and identification of cytotoxic anthraquinones and vismiones from *Psorospermum febrifugum* Spach. (1986). *Bull. Liaison - Groupe Polyphenols* **13**, 321–328.
261. Sibanda, S., Nyanyira, C., Nicoletti, M. & Galeffi, C. Vismiones L and M from *Ochna pulchra*. (1993). *Phytochemistry* **34**, 1650–1652.

262. Hamzaoui, M. *et al.* Strong ion exchange in centrifugal partition extraction (SIX-CPE): Effect of partition cell design and dimensions on purification process efficiency. (2012). *J. Chromatogr. A* **1247**, 18–25.
263. Berthod, A. & Hassoun, M. Using the liquid nature of the stationary phase in countercurrent chromatography. IV. The cocurrent CCC method. (2006). *J. Chromatogr. A* **1116**, 143–148.
264. Delannay, E. *et al.* Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications. (2006). *J. Chromatogr. A* **1127**, 45–51.
265. Gill, M., Gimenez, A., Jhingran, A. G. & Smrdel, A. F. Dihydroanthracenones from *Dermocybe splendida* and related fungi. (1989). *Phytochemistry* **28**, 2647–2650.
266. Oettl, S. K. *et al.* Dereplication of depsides from the lichen *Pseudevernia furfuracea* by centrifugal partition chromatography combined to ¹³C nuclear magnetic resonance pattern recognition. (2014). *Anal. Chim. Acta* **846**, 60–67.
267. Epstein, W. W. & Sweat, F. W. Dimethyl sulfoxide oxidations. (1967). *Chem Rev* **67**, 247–260.
268. Duval, R. Utilisation de la fluorescence dans l'identification des cibles et mécanismes d'action de substances naturelles bioactives. (2014). *Ecole thématique CNRS SubNat 2014*.
269. Brouwer, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). (2011). *Pure Appl. Chem.* **83**, 2213–2228.
270. Resch-Genger, U. & Rurack, K. Determination of the photoluminescence quantum yield of dilute dye solutions (IUPAC Technical Report). (2013). *Pure Appl. Chem.* **85**, 2005–2026.
271. *Handbook of Chemistry and Physics*. (CRC Press, 1975).
272. Gill, M., Saubern, S. & Yu, J. Pigments of fungi. LXVI the gentiobiosides of (R)- and (S)-torosachryson from Australian toadstools and methods for assaying the enantiomeric purity of natural torosachryson. (2000). *Aust. J. Chem.* **53**, 213–220.
273. Müller, M., Lamottke, K., Löw, E., Magor-Veenstra, E. & Steglich, W. Stereoselective total syntheses of atrochryson, torosachryson and related 3,4-dihydroanthracen-1(2H)-ones. (2000). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1**, 2483–2489.
274. Epifano, F., Fiorito, S., Locatelli, M., Taddeo, V. A. & Genovese, S. Screening for novel plant sources of prenyloxanthraquinones: *Senna alexandrina* Mill. and *Aloe vera* (L.) Burm. F. (2015). *Nat. Prod. Res.* **29**, 180–184.
275. Genovese, S. *et al.* Screening for oxyprenylated anthraquinones in Mediterranean *Rhamnus* species. (2012). *Biochem. Syst. Ecol.* **43**, 125–127.
276. Obolskiy, D., Pischel, I., Siriwatanametanon, N. & Heinrich, M. *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. (2009). *Phyther. Res.* **23**, 1047–1065.
277. Prinz, H., Wiegrebe, W. & Müller, K. Syntheses of Anthracenones. 1. Sodium Dithionite Reduction of peri-Substituted Anthracenediones. (1996). *J. Org. Chem.* **61**, 2853–2856.
278. Nicolaou, K. C. *et al.* Total Synthesis of Viridicatumtoxin B and Analogues Thereof: Strategy Evolution, Structural Revision, and Biological Evaluation. (2014). *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12137–12160.
279. Kuttruff, C. a., Mayer, P. & Trauner, D. Evolution of a synthetic strategy for the varicolorinides. (2012). *European J. Org. Chem.* 5151–5161.
280. Song, G.-P., Wang, P., Zhang, Z.-H., Shi, D.-K. & Li, Y.-X. Synthesis of 2', 3'-Di-O-acetylfrangulin A and Prinoidin, Two Novel Anthracene L-Rhamnopyranosides Isolated from *Rhamnus nepalensis*. (2008). *Chinese J. Chem.* **26**, 1715–1720.
281. Ohta, A. *et al.* Effects of Alkoxy Substitution on the Optical Properties of 9,10-Anthraquinone and Anthracene: 2,3,6,7-Tetrapropoxy-substituted vs. 2,6-Dipropoxy-substituted Derivatives. (2012). *Chem. Lett.* **41**, 674–676.
282. Cameron, D. W. & Riches, A. G. Synthesis of stentorin. (1995). *Tetrahedron Lett.* **36**, 2331–2334.
283. Guo, S., Feng, B., Zhu, R., Ma, J. & Wang, W. Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography. (2011). *Molecules* **16**, 1201–1210.

284. Genovese, S. *et al.* Comparison of three different extraction methods and HPLC determination of the anthraquinones aloë-emodine, emodine, rheine, chrysophanol and physcione in the bark of *Rhamnus alpinus* L. (Rhamnaceae). (2010). *Phytochem. Anal.* **21**, 261–267.
285. Lu, H. M., Ni, W. D., Liang, Y. Z. & Man, R. L. Supercritical CO₂ extraction of emodin and physcion from *Polygonum cuspidatum* and subsequent isolation by semipreparative chromatography. (2006). *J. Sep. Sci.* **29**, 2136–2142.
286. Savard, J. & Brassard, P. Reactions of ketene acetals - The use of simple mixed vinylketenes acetals in the annulation of quinones. (1984). *Tetrahedron* **40**, 3455–3464.
287. Motoyoshiya, J., Masue, Y., Nishi, Y. & Aoyama, H. Synthesis of hypericin via emodin anthrone derived from a two-fold Diels-Alder reaction of 1,4-benzoquinone. (2006). *Nat. Prod. Commun.* **2**, 67–70.
288. Dhananjeyan, M. R., Milev, Y. P., Kron, M. a. & Nair, M. G. Synthesis and activity of substituted anthraquinones against a human filarial parasite, *Brugia malayi*. (2005). *J. Med. Chem.* **48**, 2822–2830.
289. Reynolds, H. H. & Bigelow, L. A. Preparation of quinizarin. (1926). *J. Am. Chem. Soc.* **48**, 420–422.
290. De Silva, S. O., Watanabe, M. & Snieckus, V. General route to anthraquinone natural products via directed metalation of N,N-diethylbenzamides. (1979). *J. Org. Chem.* **44**, 4802–4808.
291. Snieckus, V. Directed *ortho* metalation. Tertiary amide and O-carbamate directors in synthetic strategies for polysubstituted aromatics. (1990). *Chem Rev* **90**, 879–933.
292. Mills, R. J. & Snieckus, V. Directed metalation of N,N-diethylbenzamides. Silylated benzamides for the synthesis of naturally occurring peri-methylantraquinones and peri-methyl polycyclic aromatic hydrocarbons. (1989). *J. Org. Chem.* **54**, 4386–4390.
293. Watanabe, M., Toshikazu, F., Takashi, M. & Furukawa, S. Synthethis of anthraquinones using directed lithition reaction. (1985). *Yakugaku Zasshi* **105**, 11–18.
294. Hatab, A. S. A., Ayoub, M. T. & Mubarak, M. S. Synthesis of New 4-Substituted-3-alkoxy-2-butenic Acid Esters and Pyrazole-3-one Derivatives. (2008). **3**, 211–221.
295. Du, H., Zhao, D. & Ding, K. Enantioselective catalysis of the hetero-diels-alder reaction between Brassard's diene and aldehydes by hydrogen-bonding activation: A one-step synthesis of (S)-(+)-dihydrokawain. (2004). *Chem. - A Eur. J.* **10**, 5964–5970.
296. Matsuda, F., Kawasaki, M., Ohsaki, M., Yamada, K. & Terashima, S. Synthetic studies on nogalamycin congeners. Syntheses and antitumor activity of various nogalamycin congeners. (1988). *Tetrahedron* **44**, 5745–5759.
297. Bellassoued, M., Ennigrou, R. & Gaudemar, M. Preparation and reaction of 3-methyl-1,1-bis(trimethylsiloxy)-1,3-butadiene and trimethylsilyl 4-(trimethylsilyl)-3-methyl-2-butenate with benzaldehyde. (1990). *J. Organomet. Chem.* **393**, 19–25.
298. Konopelski, J. P. & Boehler, M. A. Enantiomerically pure vinyl ketene acetals as dienes in the Diels-Alder reaction. (1989). *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4515–4517.
299. Boehler, M. a. & Konopelski, J. P. Enantiomerically pure vinylketene acetals in the Diels-Alder reaction. Catalysis and facial selectivity. (1991). *Tetrahedron* **47**, 4519–4538.
300. Lau, S. Y. W. Concise and protective group-free syntheses of (±)-hamigeran B and (±)-4-bromohamigeran B. (2011). *Org. Lett.* **13**, 347–349.
301. Fraenkel, G., Henrichs, M., Hewitt, M. & Su, B. M. Structure and dynamic behavior of a chiral alkyllithium compound: carbon-13 and lithium-6 NMR of sec-butyllithium. (1984). *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 255–256.
302. Obermüller, R. a., Etlstorfer, C. & Falk, H. On the chemistry of a dibenzohypericin derivative. (2002). *Monatshefte für Chemie Mon.* **133**, 89–96.
303. Falk, H. & Schoppel, G. A synthesis of emodin anthrone. (1991). *Monatshefte für Chemie Mon.* **122**, 739–744.

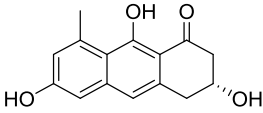
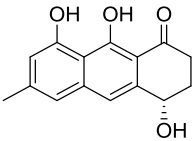
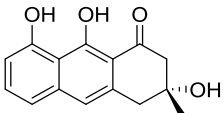
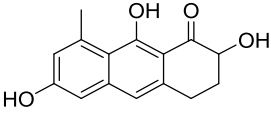
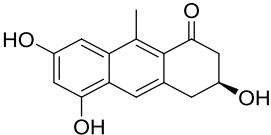
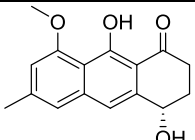
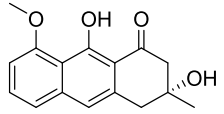
304. Katsuura, K. & Snieckus, V. metalation reactions. Convergent synthesis of 'angular' anthracyclines ochromycinone and X-14881 C. (1987). *Can. J. Chem.* **65**, 124–130.
305. Rychnovsky, S. D. & Powers, J. P. in (John Wiley & Sons, Ltd, 2001). *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* at <http://dx.doi.org/10.1002/047084289X.rz011>. Accessed in August 2015.
306. Brandsma, L. *Synthesis of acetylenes, allenes and cumulenes Methods and techniques*. (Elsevier Ltd, 2004).
307. De Silva, S. O. & Snieckus, V. Directed lithiation of N,N-dihethylbenzamides. Regiospecific routes to unsymmetrical anthraquinone natural products. (1978). *Tetrahedron Lett.* **19**, 5103–5106.
308. Kelly, T. R. & Parekh, N. D. Regiochemical Control in the Diels-Alder Reaction of Substituted Naphthoquinones. The Directing Effects of C-6 substituents. (1982). *J. Org. Chem.* **47**, 5009–5013.
309. Gonnot, V., Tisserand, S., Nicolas, M., Baati, R. & Mioskowski, C. Total synthesis of rhein and diacerhein via a directed *ortho* metalation of an aromatic substrate. (2007). *Tetrahedron Lett.* **48**, 7117–7119.
310. Krohn, K. & Vitz, J. Total Synthesis of Premithramycinone H and Related Anthrapyran Antibiotics. (2004). *European J. Org. Chem.* **2004**, 209–219.
311. Waser, M., Lackner, B., Zuschrader, J., Müller, N. & Falk, H. An efficient regioselective synthesis of endocrocin and structural related natural anthraquinones starting from emodin. (2005). *Tetrahedron Lett.* **46**, 2377–2380.
312. Vanýsek, P. in (Taylor and Francis, 2015). *Handbook of Chemistry and physics* 5–80 5–89.
313. Bruyere, C. *et al.* Growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines. (2011). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 4174–4179.
314. Genovese, S., Epifano, F., Curini, M., Dudra-Jastrzebska, M. & Luszczki, J. J. Prenyloxyphenylpropanoids as a novel class of anticonvulsive agents. (2009). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 5419–5422.
315. Marković, Z. S. & Manojlović, N. T. DFT study on the reactivity of OH groups in emodin: Structural and electronic features of emodin radicals. (2009). *Monatshefte für Chemie* **140**, 1311–1318.
316. Legeay, J. C., Vanden Eynde, J. J. & Bazureau, J. P. Sequential synthesis of a new analogue of amlodipine bearing a short amino polyethyleneglycol chain. (2007). *Tetrahedron* **63**, 12081–12086.
317. Prinz, H., Burgemeister, T., Wiegrebe, W. & Müller, K. Syntheses of Anthracenones. 2. Preparation of 1,8-Dimethoxy- (Dimethylanthralin) and 4,5-Dihydroxy-9(10H)-anthracenone (Isoanthralin): A Revision. (1996). *J. Org. Chem.* **61**, 2857–2860.
318. Nagem, T. J. & Faria, T. de J. Quinonoid and other constituents of *Vismia martiana*. (1990). *Phytochemistry* **29**, 3362–3364.
319. Kouam, S. F., Ngadjui, B. T., Krohn, K. & Choudhary, M. I. Thermal rearrangement of harunganin and allylations of some compounds from *Harungana madagascariensis*. (2007). *Arkivoc* **9**, 64–70.
320. Donner, C. D. Tandem Michael-Dieckmann/Claisen reaction of *ortho*-toluates - The Staunton-Weinreb annulation. (2013). *Tetrahedron* **69**, 3747–3773.
321. Hauser, F. M. & Hewawasam, P. Regio- and Stereospecific Syntheses of 4-Deoxyadriamycinone and 4,6-Dideoxyadriamycinone from a Common Intermediate. (1988). *J. Org. Chem.* **53**, 4515–4519.
322. Nicolaou, K. C., Yee, H. L., Piper, J. L. & Papageorgiou, C. D. Total syntheses of 2,2'-epi-cytoskyrin A, rugulosin, and the alleged structure of rugulin. (2007). *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4001–4013.
323. Mal, D., Pal, R. & Murty, K. V. S. N. Thiophthalides, a novel class of arene-annulating agents: synthesis of polynuclear hydroaromatic compounds. (1992). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 821.
324. Majumdar, G., Pal, R., Murty, K. V. S. N. & Mal, D. Anionic [4 + 2] cycloaddition with thiophthalides: an integrated approach to the synthesis of olivin and pillaromycinone. (1994). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 309–316.
325. Hill, B. & Rodrigo, R. Cyclohexenones as Michael acceptors in the Staunton-Weinreb annulation: A simple stannane modification for the synthesis of polycyclic systems. (2005). *Org. Lett.* **7**, 5223–5225.

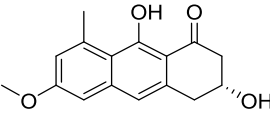
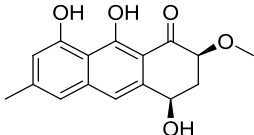
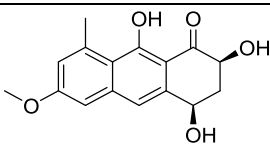
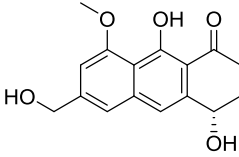
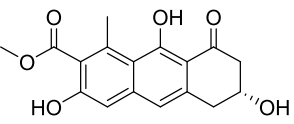
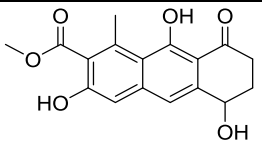
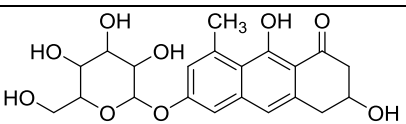
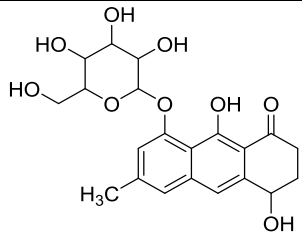
326. Chan, K. S. *et al.* Solvent, chelation and concentration effects on the benzannulation reaction of chromium carbene complexes and acetylenes. (1987). *J. Organomet. Chem.* **334**, 9–56.
327. Terao, Y., Satoh, T., Miura, M. & Nomura, M. Palladium-catalyzed annulation reaction of o-bromobenzaldehydes with carbonyl compounds to produce naphthol and/or naphthalene derivatives. (2000). *Tetrahedron* **56**, 1315–1320.
328. Ohmori, H., Maeda, H., Ueda, C. & Masui, M. Intramolecular Wittig reaction of dioxocycloalkylidene-tributylphosphoranes: formation and trapping of cycloalkyn-2-ones with five- and six-membered rings. (1988). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 874–875.
329. Ohmori, H., Maeda, H., Tamaoka, M. & Masui, M. Reaction of triphenylphosphine radical cation with 1,3-dicarbonyl compounds: electrochemical one-step preparation of dioxomethylenetriphenylphosphoranes. (1988). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **36**, 613–620.
330. Imoto, S., Haruta, Y., Watanabe, K. & Sasaki, S. New DNA binding ligands as a model of chromomycin A 3. (2004). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **14**, 4855–4859.
331. Tamura, Y. *et al.* Synthesis and photocyclization of 2-aryl-3-methylcyclohex-2-enones. (1981). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **29**, 1312–1320.
332. Hamze, A., Veau, D., Provot, O., Brion, J. D. & Alami, M. Palladium-catalyzed markovnikov terminal arylalkynes hydrostannation: Application to the synthesis of 1,1-diarylethylenes. (2009). *J. Org. Chem.* **74**, 1337–1340.
333. Ocampo, R. a., Koll, L. C. & Mandolesi, S. D. Ultrasound promoted Barbier reactions and Csp3-Csp2 Stille coupling for the synthesis of diarylmethanes and substituted benzophenones. (2013). *Ultrason. Sonochem.* **20**, 40–46.
334. Houël, E. *et al.* Antiplasmodial and anti-inflammatory effects of an antimalarial remedy from the Wayana Amerindians, French Guiana: Takamalaimè (*Psidium acutangulum* Mart. ex DC., Myrtaceae). (2015). *J. Ethnopharmacol.* **166**, 279–285.
335. Chimiothèque Nationale. Chimiothèque Nationale. (2015). at <http://chimiotheque-nationale.cn.cnr.fr/index.php>. Accessed in July 2015.
336. Bolton, J. L., Trush, M. a., Penning, T. M., Dryhurst, G. & Monks, T. J. Role of quinones in toxicology. (2000). *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 135–160.
337. Shukla, A. K., Patra, S. & Dubey, V. K. Evaluation of selected antitumor agents as subversive substrate and potential inhibitor of trypanothione reductase: An alternative approach for chemotherapy of Leishmaniasis. (2011). *Mol. Cell. Biochem.* **352**, 261–270.
338. Sharma, N., Shukla, A. K., Das, M. & Dubey, V. K. Evaluation of plumbagin and its derivative as potential modulators of redox thiol metabolism of *Leishmania* parasite. (2012). *Parasitol. Res.* **110**, 341–348.
339. Turrens, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: A target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. (2004). *Mol. Aspects Med.* **25**, 211–220.
340. Pal, C. & Bandyopadhyay, U. Redox-Active Antiparasitic Drugs. (2012). *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 555–582.
341. Srinivas, G., Babykutty, S., Sathiadevan, P. P. & Srinivas, P. Molecular mechanism of emodin action: Transition from laxative ingredient to an antitumor agent. (2007). *Med. Res. Rev.* **27**, 591–608.
342. Wein, S. *et al.* Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. (2010). *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1651–1660.
343. Scala, F. *et al.* Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. (2010). *Mar. Drugs* **8**, 2162–2174.
344. Mikus, J. & Steverding, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue (2000). *Parasitol. Int.* **48**, 265–269.
345. Girardi, C. *et al.* Evaluation of antiplasmodial and antileishmanial activities of herbal medicine *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist and isolated hirsutinolide-type sesquiterpenoids. (2015). *J. Ethnopharmacol.* **170**, 167–174.

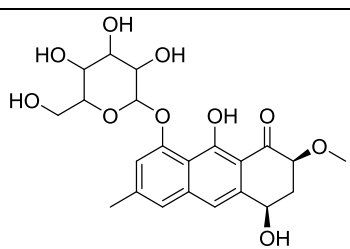
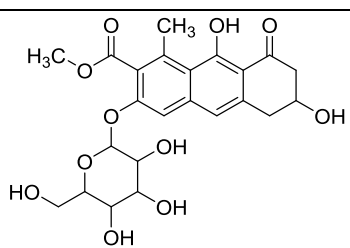
346. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. (1983). *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63.
347. Ghoneim, M. M. *et al.* Biologically active secondary metabolites from *Asphodelus microcarpus*. (2013). *Nat. Prod. Commun.* **8**, 1117–1119.
348. Seo, E.-K. *et al.* Cytotoxic prenylated xanthenes and the unusual compounds anthraquinobenzophenones from *Cratoxylum sumatranum*. (2002). *J. Nat. Prod.* **65**, 299–305.
349. Gonzales Gonzales, J., Delle Monache, F., Delle Monache, G. & Marini Bettolo, G. B. Chemistry of the genus *Vismia*. VII. Vismione A from the leaves of *Vismia guianensis*. (1980). *Planta Med.* **40**, 347–350.
350. Delle Monache, F. *et al.* Vismiones from *Vismia baccifera* var. *dealdata* (H. B. K.): chemistry and x-ray structure determination. (1979). *Gazz. Chim. Ital.* **109**, 301–310.
351. Dreyer, D. L. *et al.* Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4985–4990.
352. Waksman, N. & Ramírez-Durón, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. (1992). *Rev. Latinoam. Quim.* **23**, 25–27.
353. Galindo, V. R. & Waksman, N. Cytotoxic hydroxyanthracenones from fruits of *Karwinskia parvifolia*. (2001). *Nat. Prod. Lett.* **15**, 243–251.
354. De Torres, N. W. & Ramirez Duron, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. (1992). *Rev. Latinoam. Quim.* **23**, 25–27.
355. Rivas, V., Cuevas, G., Garza, L. & Waksman, N. Isolation and evaluation of the cytotoxic properties of peroxisomicine isomers from *Karwinskia parvifolia*. (2005). *Arkivoc* 224–233.
356. Yussim, L. F. *et al.* Anthracenones and anthraquinones from roots of five species of the genus *Karwinskia*. (1995). *Phytochemistry* **40**, 1429–1431.
357. Kim, H. L. & Stipanovic, R. D. Isolation of karwinol A from coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) fruits. in (CAB International, 1998). *Toxic Plants Other Nat. Toxicants, [Proc. Int. Symp. Poisonous Plants]*, 5th 440–446.
358. Waksman, N., Benavides-Cortez, G. & Rivas-Galindo, V. Biologically active anthracenones from roots of *Karwinskia parvifolia*. (1999). *Phytochemistry* **50**, 1041–1046.
359. Kitanaka, S. & Takido, M. Studies of the constituents of purgative crude drugs. Part 13. Dimeric hydroanthracenes from the unripe seeds of *Cassia torosa*. (1982). *Phytochem.* **21**, 2103–2106.
360. Takahashi, S., Kitanaka, S., Takido, M., Sankawa, U. & Shibata, S. Phlegmacins and anhydrophlegmacinquinones: Dimeric hydroanthracenes from seedlings of *Cassia torosa*. (1977). *Phytochemistry* **16**, 999–1002.
361. Alemayehu, G., Abegaz, B. & Kraus, W. A 1,4-anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophera*. (1998). *Phytochemistry* **48**, 699–702.
362. Abegaz, B. M., Bezabeh, M., Alemayehu, G. & Duddeck, H. Anthraquinones from *Senna multiglandulosa*. (1994). *Phytochemistry* **35**, 465–468.
363. Kitanaka, S. & Takido, M. Bitetrahydroanthracenes from flowers of *Cassia torosa* Cav. (1994). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **42**, 2588–2590.

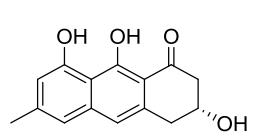
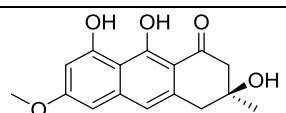
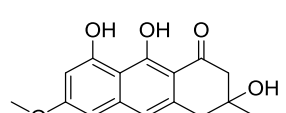
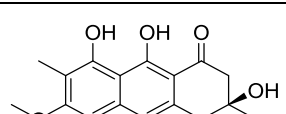
Annexes

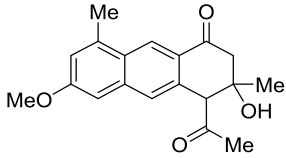
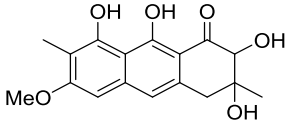
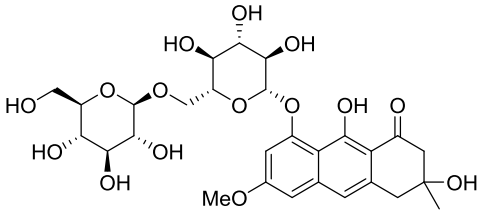
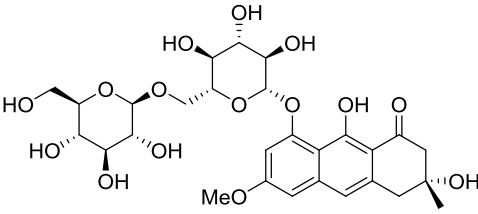
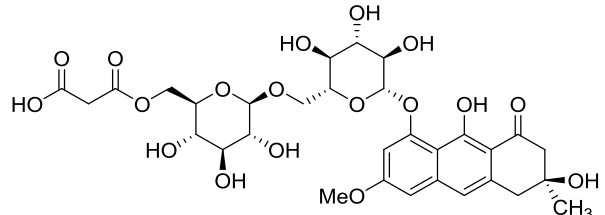
Annexe 1 : Dihydroanthracénones monomériques

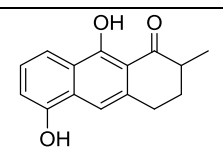
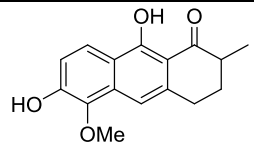
Xanthorrhoeaceae			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Aloésaponol II (113)</p>	<i>Lomatophyllum aldabrense</i> , <i>L. lomatophylloides</i> , <i>L. macrum</i> , <i>L. occidentale</i> , <i>L. purpureum</i>	Racine	119
	172 espèces d' <i>Aloe</i>	Racine	105,108, 120–122
 <p>Aloésaponol III (117)</p>	<i>Aloe saponaria</i> , <i>A. berhana</i>	Racine	111,117
	<i>Kniphofia foliosa</i>	Tige	124
 <p>(R) Préchrysophanol (104)</p>	<i>Aloe graminicola</i>	Racine	105
 <p>Gastériacénone A (111)</p>	<i>Gasteria bicolor</i>	Tige et feuille	115
 <p>Aloébarbendol (114)</p>	<i>Aloe barbadensis</i>	Racine	107
	<i>Aloe barbadensis</i> , <i>A. arborescens</i>	Feuille	123
 <p>Aloésaponol III 8-méthyléther (118)</p>	<i>Kniphofia foliosa</i>	Tige	124
	<i>Eremurus chinensis</i>	Plante entière	125
	<i>Asphodelus microcarpus</i>	Plante entière	347
 <p>Aloéchryson (105)</p>	<i>Aloe berhana</i> , <i>A. rivaie</i> , <i>A. megalacantha</i> , <i>A. barbadensis</i>	Feuille	106,107
	172 espèces d' <i>Aloe</i>	Racine	108
	<i>Lomatophyllum aldabrense</i> <i>L. lomatophylloides</i> , <i>L. macrum</i> , <i>L. occidentale</i> , <i>L. purpureum</i>	Racine	109

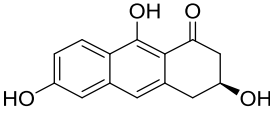
Xanthorrhoeaceae			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Aloésaponol II-6-O-méthyl éther (115)</p>	<i>Aloe dawei</i>	Racine	114
 <p>Aloésaponol IV (109)</p>	<i>Aloe saponaria</i>	Tige souterraine	117
 <p>Gastériacénone B (112)</p>	<i>Gasteria bicolor</i>	Tige et feuille	115
 <p>(119)</p>	<i>Eremurus chinensis</i>	Plante entière	125
 <p>Aloésaponol I (106)</p>	172 espèces d' <i>Aloe</i>	Racine	105,108, 110–114
	<i>Lomatophyllum aldabrense</i> , <i>L. antsingyense</i> , <i>L. lomatophylloides</i> , <i>L. macrum</i> , <i>L. occidentale</i> , <i>L. purpureum</i>	Racine	109
 <p>Gastériacénone C (107)</p>	<i>Gasteria bicolor</i>	Tige et feuille	115
 <p>Aloésaponol II 8-O-β-D-glucopyranoside (116)</p>	<i>Aloe saponaria</i>	Tige souterraine	116
 <p>Aloésaponol III 6-O-D-glucopyranoside (120)</p>	<i>Aloe saponaria</i>	Tige souterraine	116

Xanthorrhoeaceae			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Aloésaponol IV 8-O-β-D-glucoside (110)</p>	<i>Aloe saponaria</i>	Cals	118
 <p>Aloésaponol I 6-O-β-D-glucopyranoside (108)</p>	<i>Aloe saponaria</i>	Tige souterraine	116

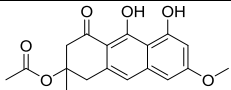
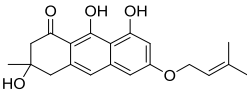
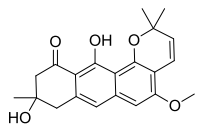
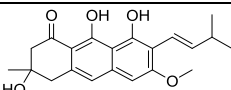
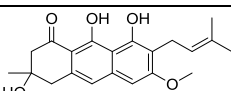
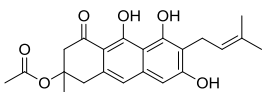
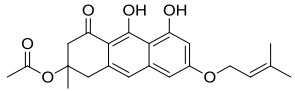
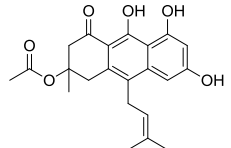
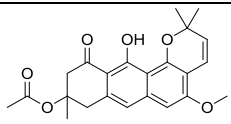
Fabaceae – Genre <i>Senna</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Germichryson (127)</p>	<i>S. torosa</i>	Plantules, cals, hairy roots, racine	130 133–135
	<i>S. singueana</i>	Racine	136
	<i>S. occidentalis</i>	Cals, racine, hairy roots	129,137, 138
	<i>S. didymobotrya</i>	Cultures cellulaires	103
 <p>(S)-Torosachryson (121)</p>	<i>S. singueana</i>	Racine	96
 <p>Torosachryson (121)</p>	<i>S. torosa</i>	Plantules, graine	97,98
	<i>S. obtusifolia</i> , <i>S. multiglandulosa</i> , <i>S. septemtrionalis</i>	Graine	99–101
	<i>S. didymobotrya</i>	Feuille Culture cellulaire	102 103
 <p>7-méthyltorosachryson (124)</p>	<i>S. occidentalis</i>	Cals, racine	129,137
	<i>S. torosa</i>	Racine, plantules, racine	130,131

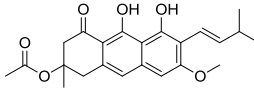
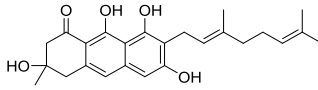
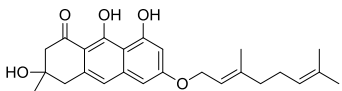
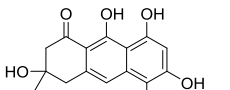
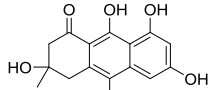
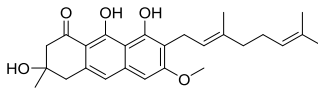
Fabaceae – Genre <i>Senna</i> (suite)			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>(126)</p>	<i>S. petersiana</i>	Feuille	132
 <p>Germitorosone (125)</p>	<i>S. torosa</i>	Plantules, racine	130,131
 <p>Torosachryson 8-O-β-D-gentibioside (122)</p>	<i>S. tora</i>	Graine	126
 <p>(R)-torosachryson 8-O-β-D-gentibioside (122)</p>	<i>S. torosa</i>	Graine	127
 <p>torosachryson 8-O-6''-malonyl β-gentibioside (123)</p>	<i>S. torosa</i>	Graine	128

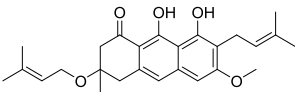
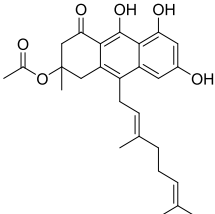
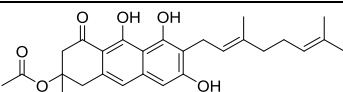
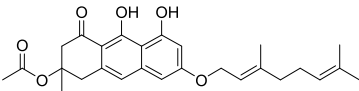
Rubiaceae			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Ménamésone A (128)</p>	<i>Plocama pendula</i>	Racine	139
 <p>Ménamésone B (129)</p>	<i>Plocama pendula</i>	Racine	139

Orchidaceae – Genre <i>Dendrobium</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>(130)</p>	<i>D.polyanthum</i> , <i>D.chrysotoxum</i>	Tige	140,141

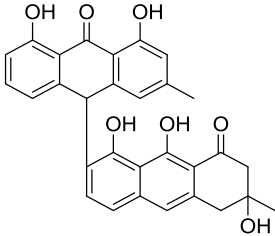
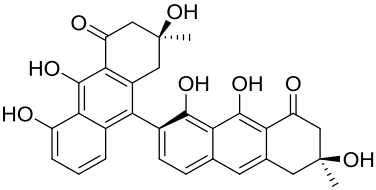
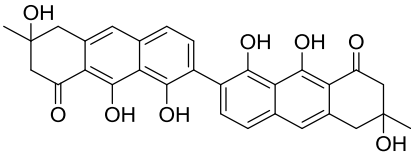
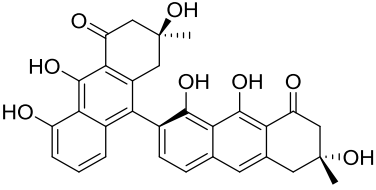
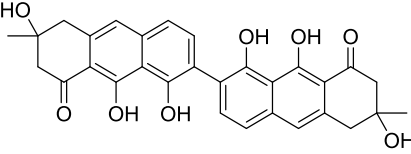
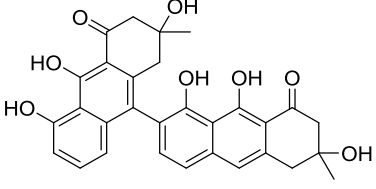
Annexe 2 : Vismiones

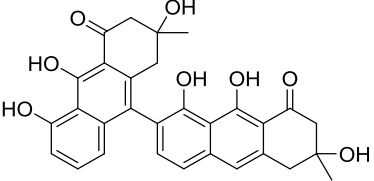
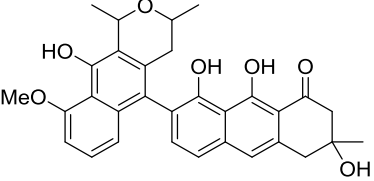
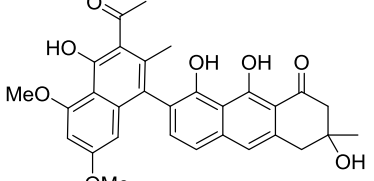
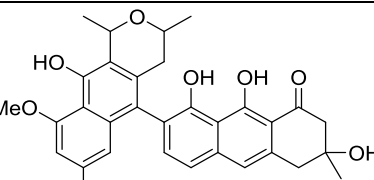
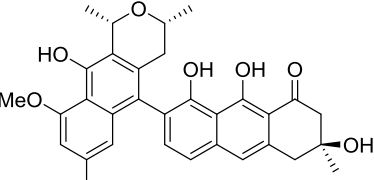
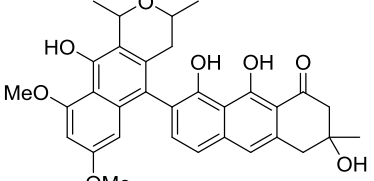
Structure	Famille	Espèce	Organe	Ref
 6-O-acétyltorosachryson (88)	Hypericaceae	<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Fruit	84
 Désacétylvismione H (97)	Hypericaceae	<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Ecorce de racine	88
		<i>Vismia jefensis</i>	Feuille	146
		<i>Vismia baccifera</i>	Feuille	146
 Vismione B (135)	Hypericaceae	<i>Vismia baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	Fruit	147
		<i>Vismia mexicana</i>	Fruit	243
		<i>Vismia guianensis</i>	Tige et Feuille	244
		<i>Vismia baccifera</i>	Feuille	146
		<i>Cratoxylum sumatranum</i>	Ecorce de tige	348
		<i>Cratoxylum cochinchinense</i>	Fruit	148
		<i>Cratoxylum formosum</i>	Feuille	259
 Désacétylvismione A (132)	Hypericaceae	<i>Vismia baccifera</i>	Feuille	146
		<i>Vismia baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	Fruit	147
		<i>Vismia jefensis</i>	Feuille	146
 Vismione E (79)	Hypericaceae	<i>Psorospermum febrifugum</i>	Fruit	81
		<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Fruit	84
		<i>Cratoxylum cochinchinense</i>	Fruit	148
 Vismione C (78)	Hypericaceae	<i>Psorospermum febrifugum</i>	Fruit	81, 147
		<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Ecorce de racine	68
		<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Fruit	84
 Vismione H (94)	Hypericaceae	<i>Vismia guineensis</i>	Ecorce de racine	242
		<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Racine	147
 Acétylvismione K (95)	Hypericaceae	<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Ecorce de racine	88
 Acétylvismione B (136)	Hypericaceae	<i>Vismia japurensis</i>	Fruit	147, 243
		<i>Vismia reichardtiana</i>	Fruit	243

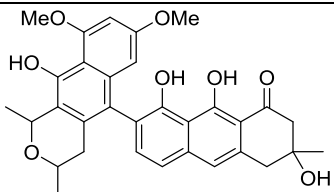
Structure	Famille	Espèce	Organe	Ref
 <p>Vismione A (133)</p>	Hypericaceae	<i>Vismia guianensis</i>	Feuille	349
		<i>Vismia japurensis</i>	Fruit	243
		<i>Vismia mexicana</i>	Fruit	243
		<i>Vismia baccifera</i>	Fruit	147,350
 <p>Vismione F (66)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum febrifugum</i>	Racine	78
		<i>Psorospermum corymbiferum</i>	Ecorce de racine	68,147
		<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Ecorce de racine	68,147
			Fruit	84
		<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Ecorce de racine	88
		<i>Vismia guineensis</i>	Racine	250
		<i>Cratoxylum cochinchinense</i>	Fruit	148
 <p>Vismione D (33)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum febrifugum</i>	Fruit	81,147
			Racine	78,249
		<i>Psorospermum corymbiferum</i>	Ecorce de racine	68
		<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Ecorce de racine	68
			Fruit	84
		<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Ecorce de racine	88
		<i>Psorospermum aurantiacum</i>	Fruit	67,258
		<i>Vismia guineensis</i>	Racine	250
		<i>Vismia orientalis</i>	Ecorce de tige	149
		<i>Cratoxylum formosum ssp. pruniflorum</i>	Feuille	259
Ochnaceae	<i>Ochna pulchra</i>	Ecorce de racine	248	
 <p>Vismione L (134)</p>	Hypericaceae	<i>Vismia guineensis</i>	Racine	250
	Ochnaceae	<i>Ochna pulchra</i>	Ecorce de racine	248
 <p>Désacétylvismione G (96)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Ecorce de racine	88
 <p>Vismione M (42)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum febrifugum</i>	Ecorce de racine	260
		<i>Psorospermum aurantiacum</i>	Fruit	67
		<i>Vismia guineensis</i>	Racine	250
	Ochnaceae	<i>Ochna pulchra</i>	Ecorce de racine	248

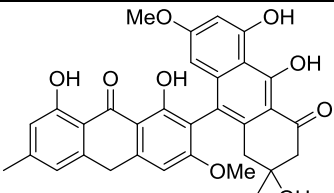
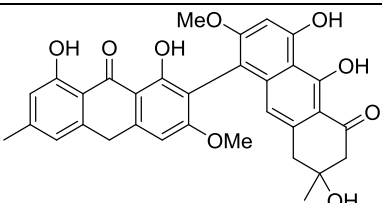
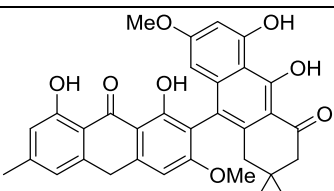
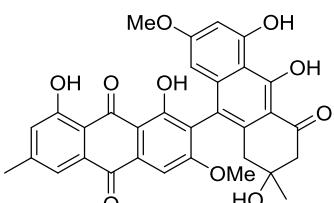
Structure	Famille	Espèce	Organe	Ref
 <p>6-O- prénylvismione E (87)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Fruit	84
 <p>Vismione G (80)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Ecorce de racine	68
		<i>Psorospermum corymbiferum</i>	Racine	147
		<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Ecorce de racine	88
		<i>Vismia guineensis</i>	Racine	250
 <p>Acétylvismione F (44)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum corymbiferum</i>	Ecorce de racine	68
		<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Racine	147
			Fruit	84
<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Ecorce de racine	88		
 <p>Acétylvismione D (8)</p>	Hypericaceae	<i>Psorospermum febrifugum</i>	Ecorce de racine	249
		<i>Psorospermum tenuifolium</i>	Racine	147
		<i>Psorospermum glaberrimum</i>	Ecorce de tige	83
		<i>Vismia guineensis</i>	Racine	250
	Ochnaceae	<i>Ochna pulchra</i>	Ecorce de racine	248

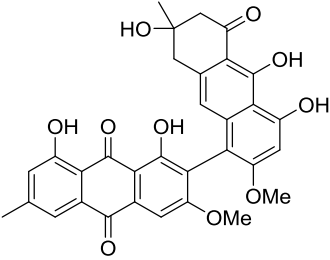
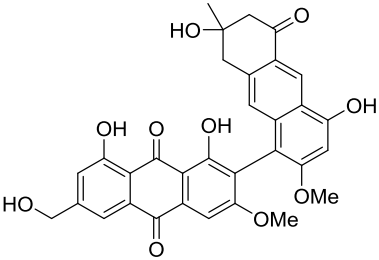
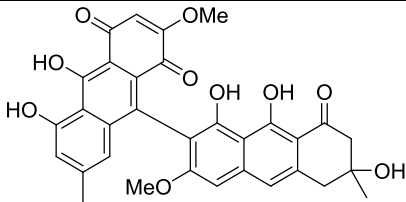
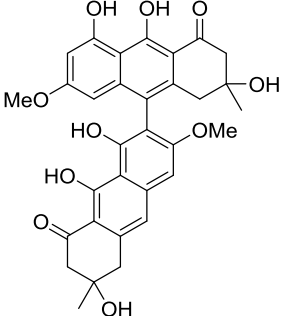
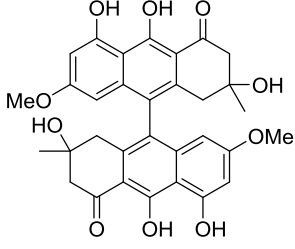
Annexe 3 : Dihydroanthracénones dimériques

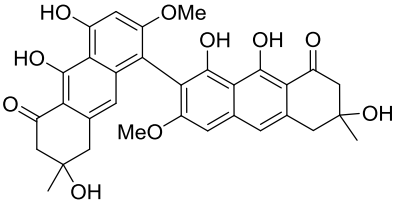
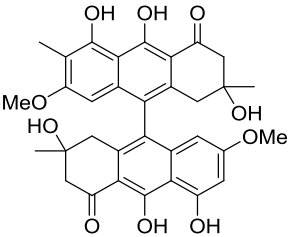
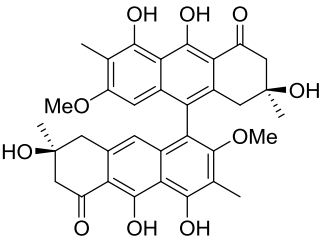
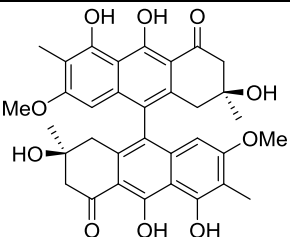
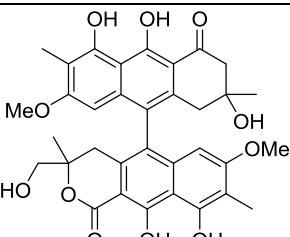
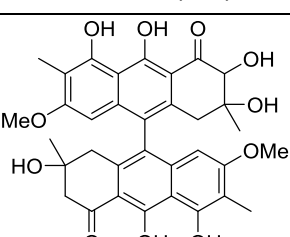
Rhamnaceae – Genre <i>Karwinskia</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>T496 (371)</p>	<i>K. humboldtiana</i>	Fruit	351
	<i>K. parvifolia</i>	Fruit	352
 <p>T514, Peroxisomicine A1 (140) (2S,2'S,6S)</p>	<i>K. humboldtiana</i>	Fruit	351
	<i>K. parvifolia</i>	Fruit	352
 <p>Isoperoxisomicine A1 (146)</p>	<i>K. parvifolia</i>	Fruit	353
 <p>Peroxisomicine A2 (147) (2S,2'S,6R)</p>	<i>K. parvifolia</i>	Fruit	354
 <p>Isoperoxisomicine A2 (372)</p>	<i>K. parvifolia</i>	Fruit	353
 <p>Peroxisomicine A3 (373)</p>	<i>K. parvifolia</i>	Fruit	353

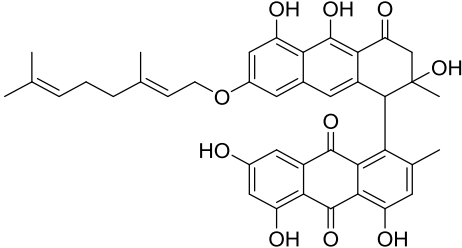
Rhamnaceae – Genre <i>Karwinskia</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Peroxisomicine A4 (374)</p>	<i>K. parvifolia</i>	Fruit	355
 <p>(375)</p>	<i>K. humboldtiana</i> , <i>K. umbellata</i> , <i>K. subcordata</i> , <i>K. mollis</i> , <i>K. johnstoni</i>	Racine	356
 <p>T 516, Eleuterogonzalone (145)</p>	<i>K. humboldtiana</i>	Fruit	351
 <p>T 544, Tullidinol (144)</p>	<i>K. humboldtiana</i>	Fruit	351
	<i>K. humboldtiana</i> , <i>K. umbellata</i> , <i>K. subcordata</i> , <i>K. mollis</i> , <i>K. johnstoni</i>	Racine	356
 <p>Karwinol A (376)</p>	<i>K. humboldtiana</i>	Fruit	357
 <p>Tullidinol B1 (377)</p>	<i>K. parvifolia</i>	Racine	358

Rhamnaceae – Genre <i>Karwinskia</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Tullidinol B2 (378)</p>	<i>K. parvifolia</i>	Racine	358

Fabaceae – Genre <i>Senna</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Anhydrophlegmacine (142)</p>	<i>S. multiglandulosa</i>	Graine	100
 <p>Torosanine (379)</p>	<i>S. torosa</i>	Graine	359
 <p>Anhydrophlegmacine B2 (380)</p>	<i>S. torosa</i>	Graine	359
 <p>Anhydrophlegmacine-9,10-quinone (143)</p>	<i>S. torosa</i>	Plantule	360
	<i>S. sophera</i>	Graine	361
	<i>S. multiglandulosa</i>	Feuille	362

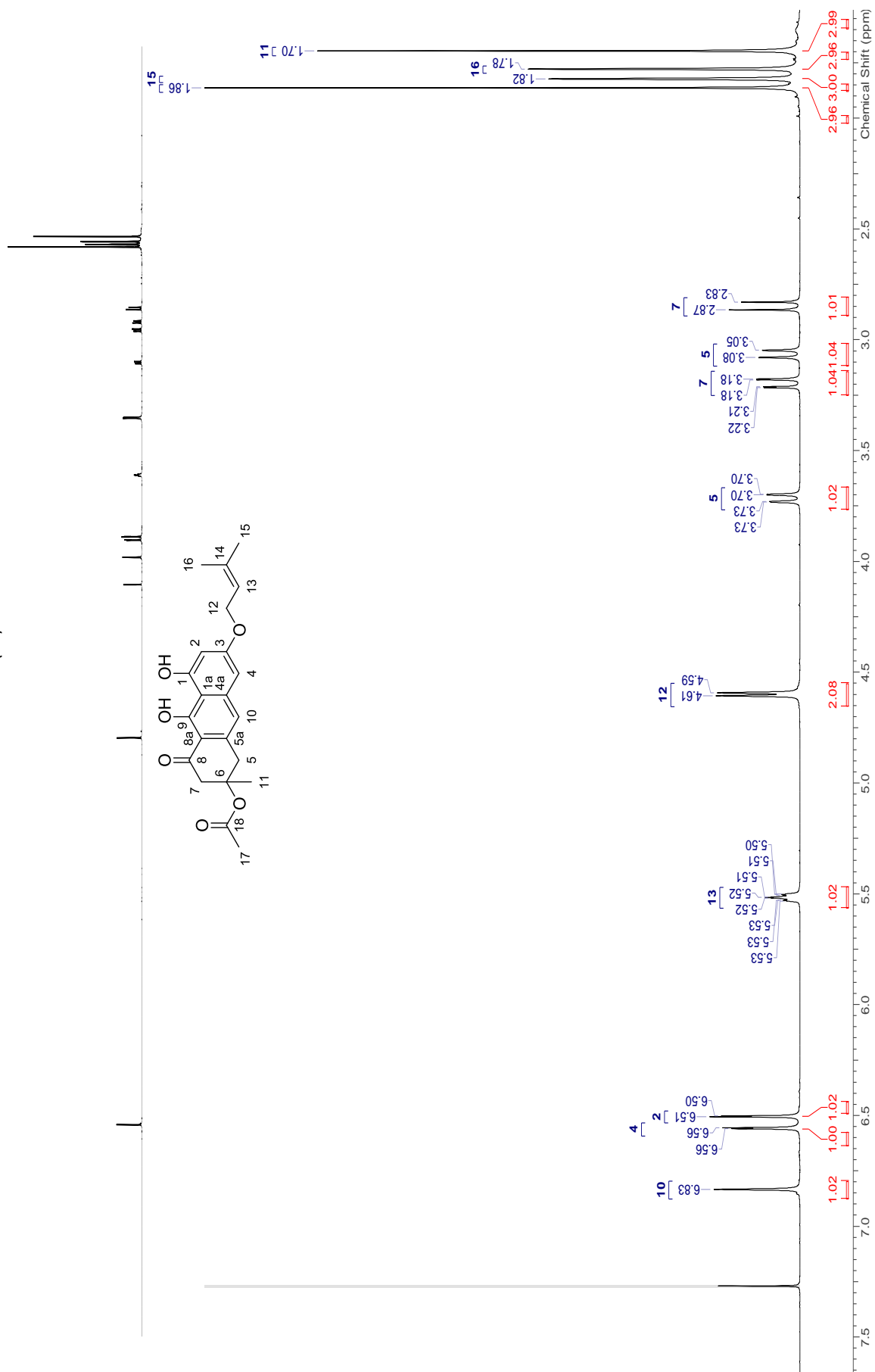
Fabaceae – Genre <i>Senna</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>(381)</p>	<i>S. torosa</i>	Fleur	363
 <p>Torosanine-9',10'-quinone (382)</p>	<i>S. multiglandulosa</i>	Feuille	362
	<i>S. septemtrionalis</i>	Gousse	101
 <p>Présengulone (383)</p>	<i>S. sophora</i>	Graine	361
 <p>Phlegmacine A2 et B2 (384)</p>	<i>S. torosa</i>	Plantule	360
	<i>S. torosa</i>	Graine	359
	<i>S. torosa</i>	Racine	130
 <p>Occidentalol II (385)</p>	<i>S. occidentalis</i>	Racine	137

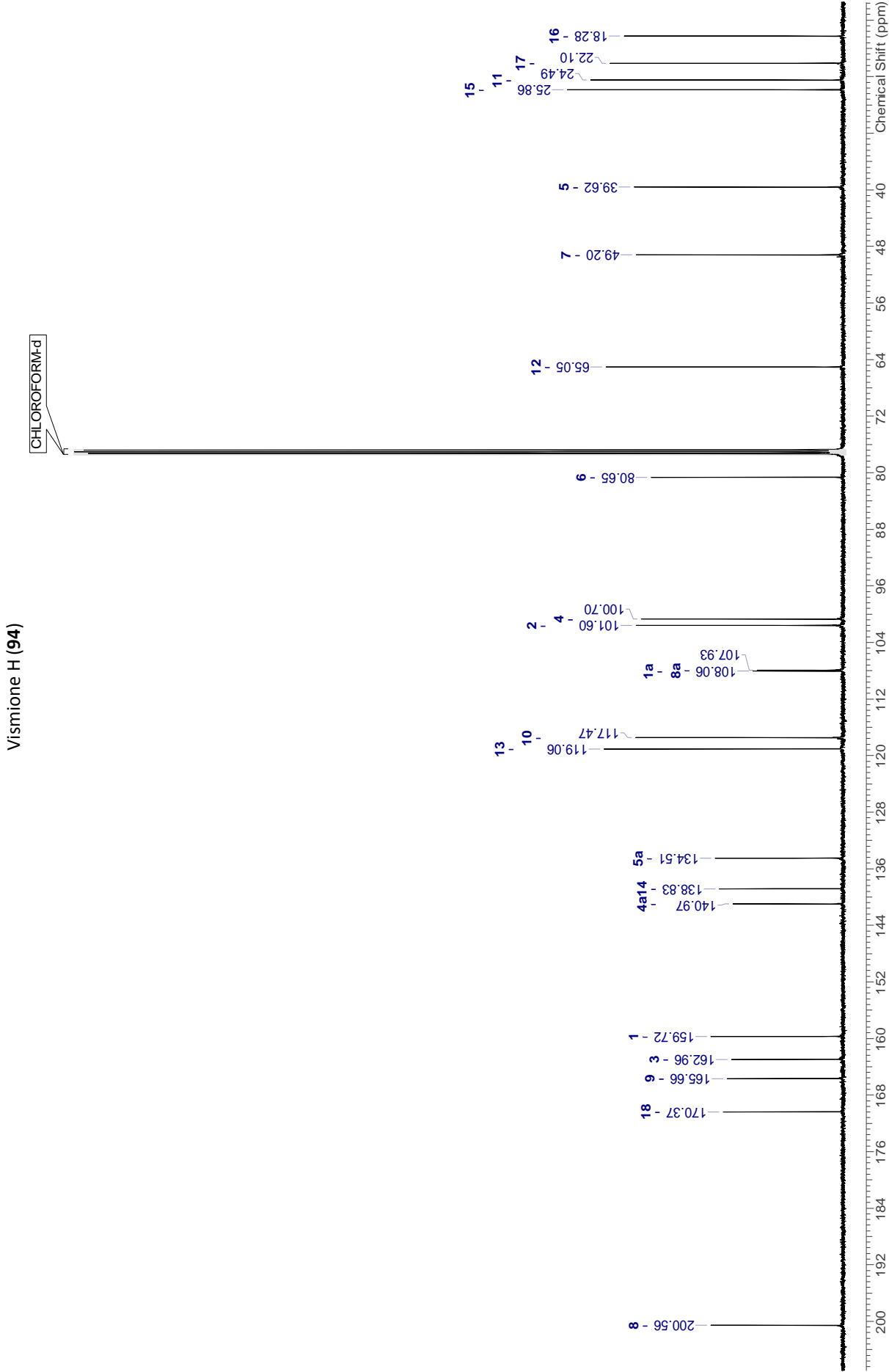
Fabaceae – Genre <i>Senna</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Torosaol III (386)</p>	<i>S. torosa</i>	Fleur	363
 <p>Occidentalol I (141)</p>	<i>S. occidentalis</i>	Racine	137
 <p>Singueanol II (387)</p>	<i>S. singueana</i>	Racine	96
 <p>Singueanol I (388)</p>	<i>S. singueana</i>	Racine	96
	<i>S. occidentalis</i>	Racine	137
	<i>S. torosa</i>	Racine	130
 <p>Torosaol II (389)</p>	<i>S. torosa</i>	Racine	130
 <p>Torosaol I (390)</p>	<i>S. torosa</i>	Racine	130

Hypericaceae – Genre <i>Psorospermum</i>			
Structure	Espèce	Organe	Ref
 <p>Fébruquinone (68)</p>	<i>P.febrifugum</i>	Racine	155

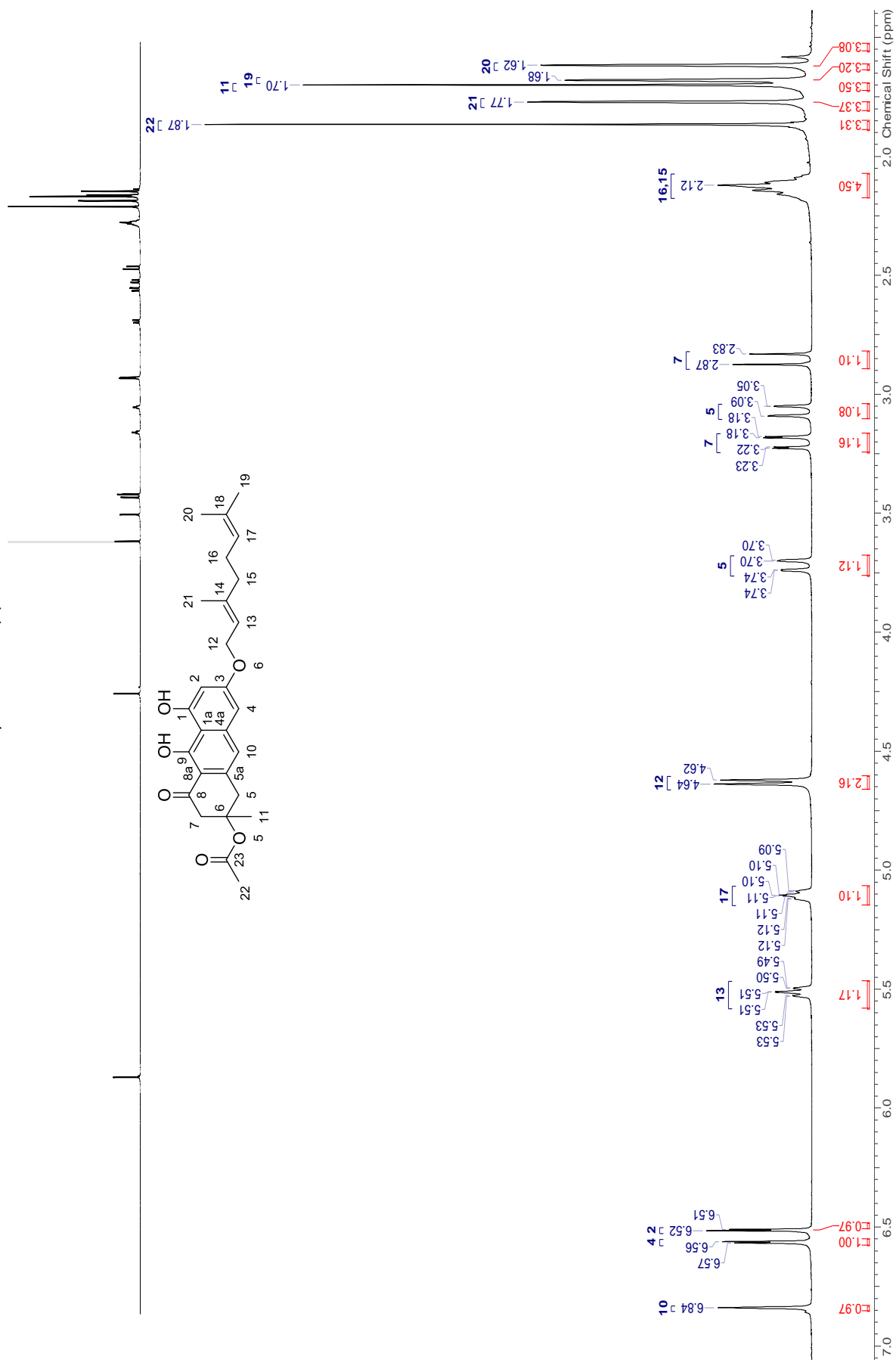
Annexe 4 :
Spectres RMN ^1H et ^{13}C des vismiones
isolées de *P. glaberrimum*

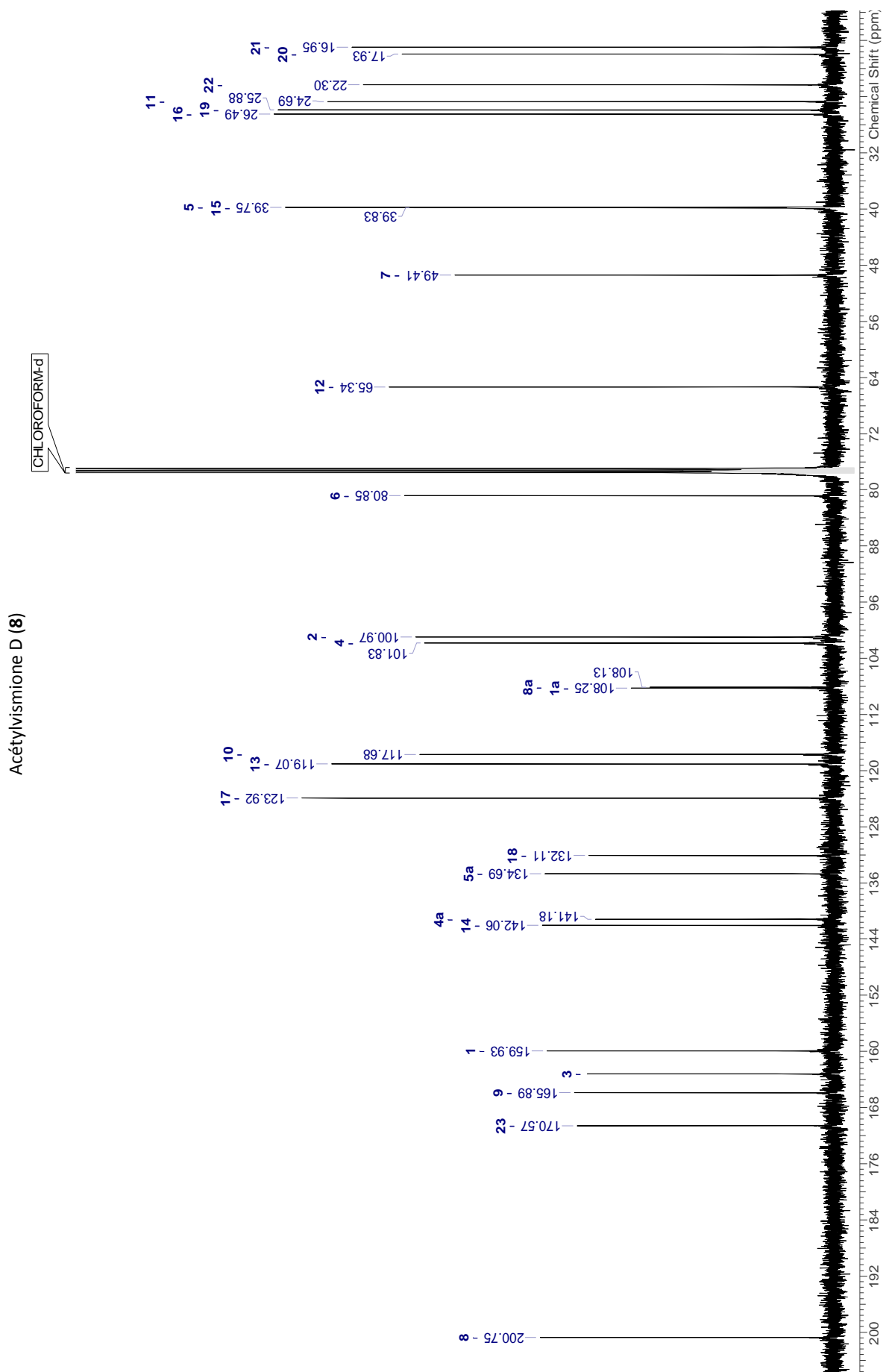
Vismione H (94)



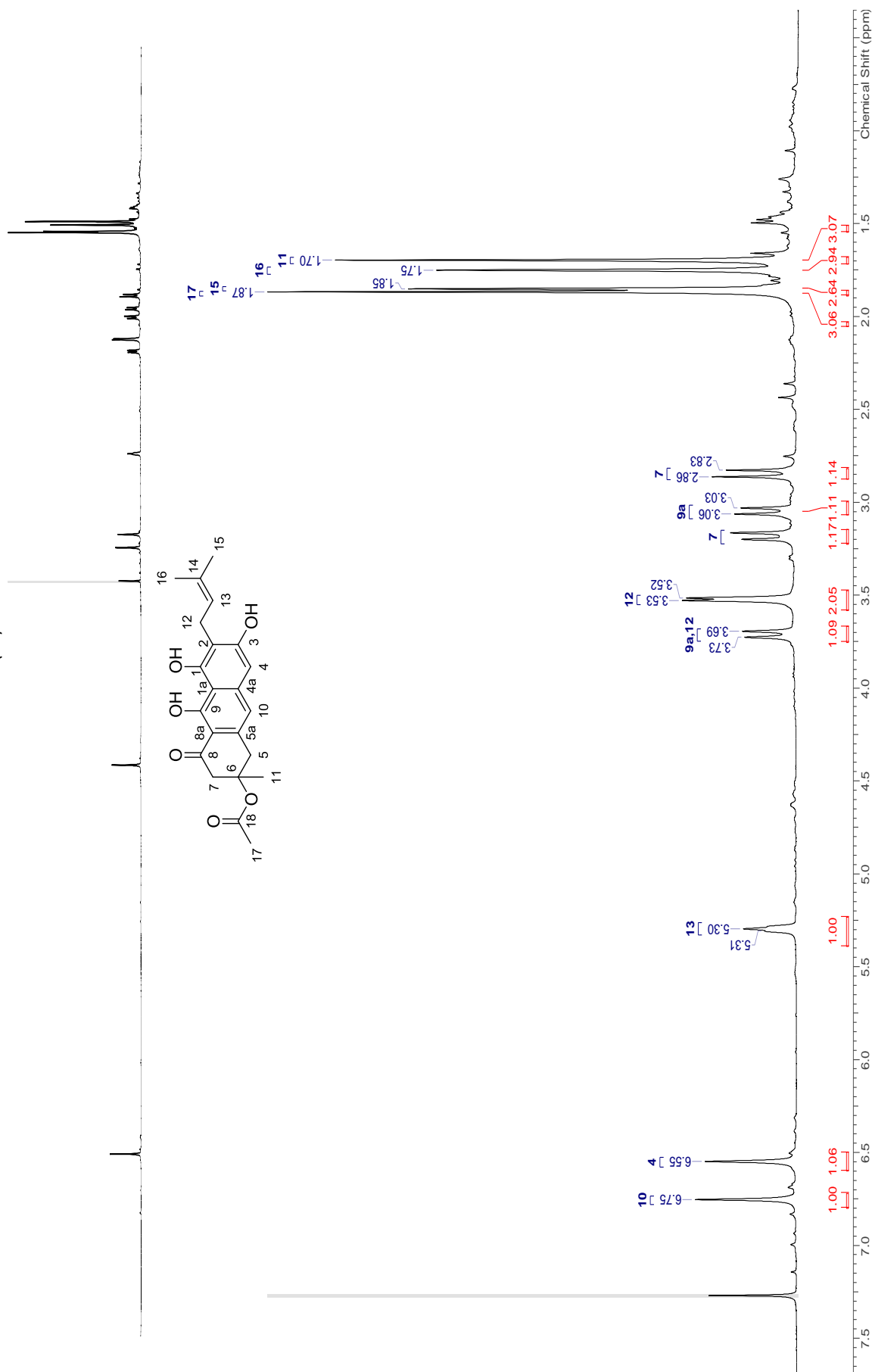


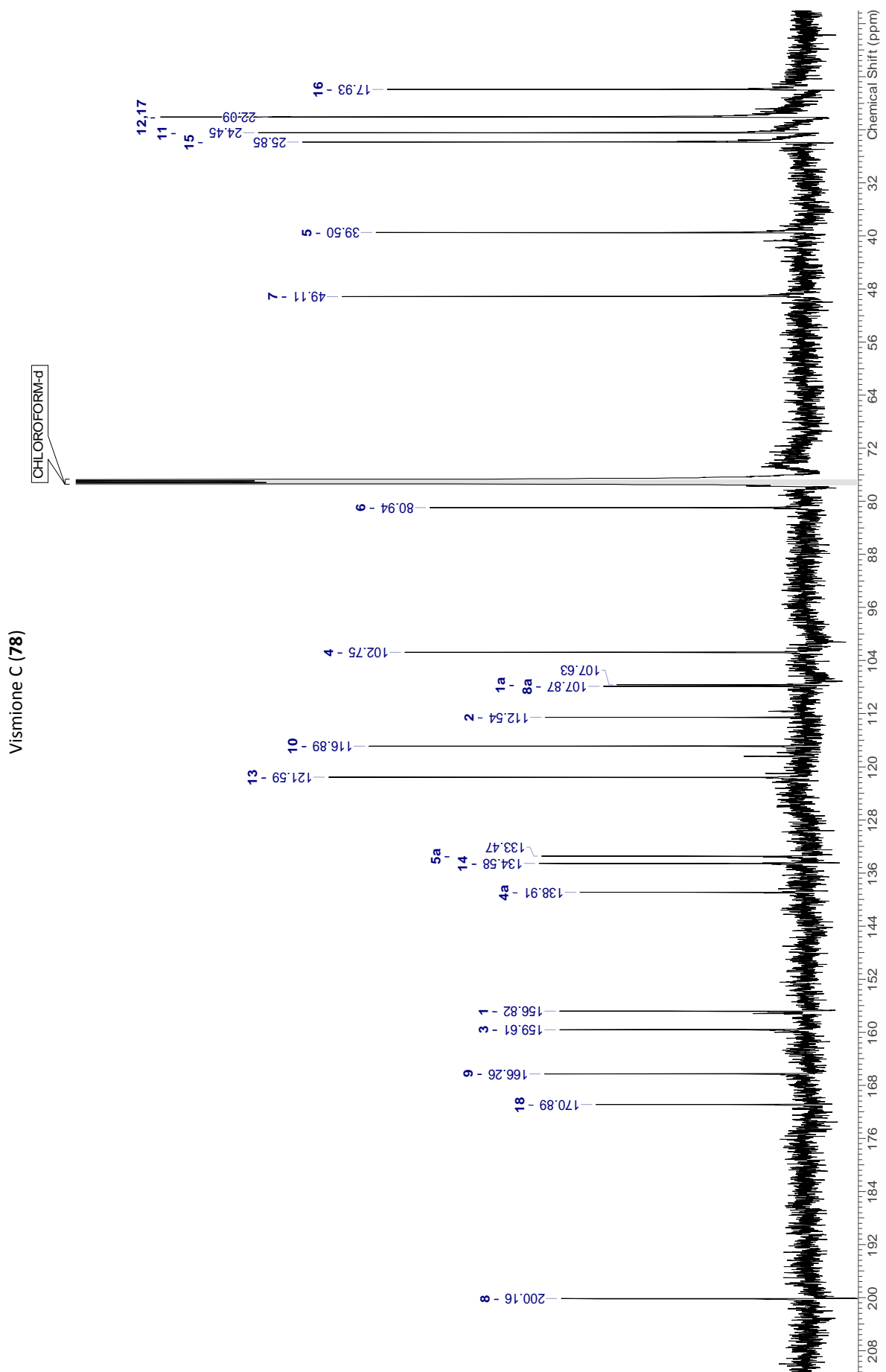
Acétylvismione D (8)

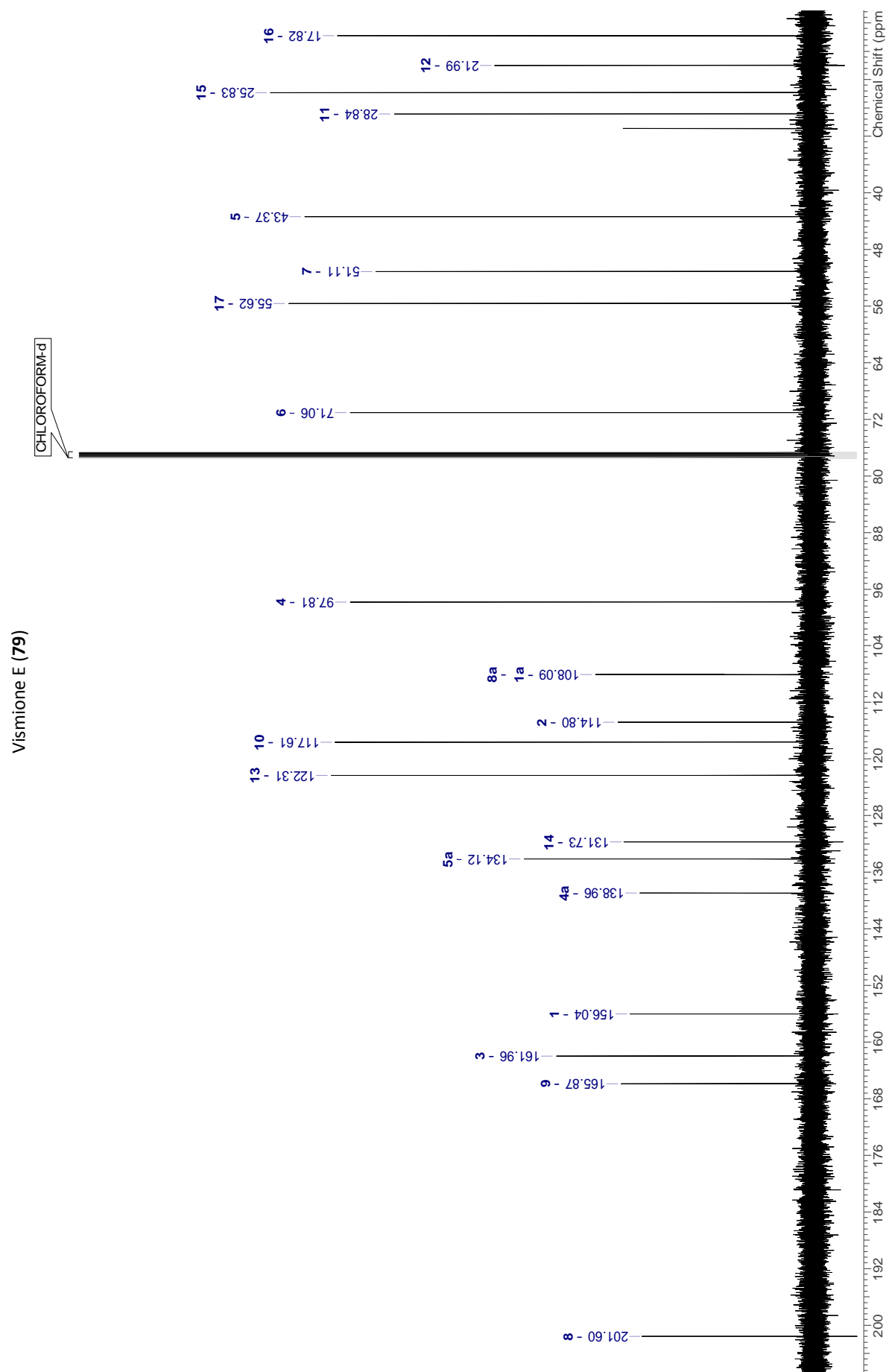


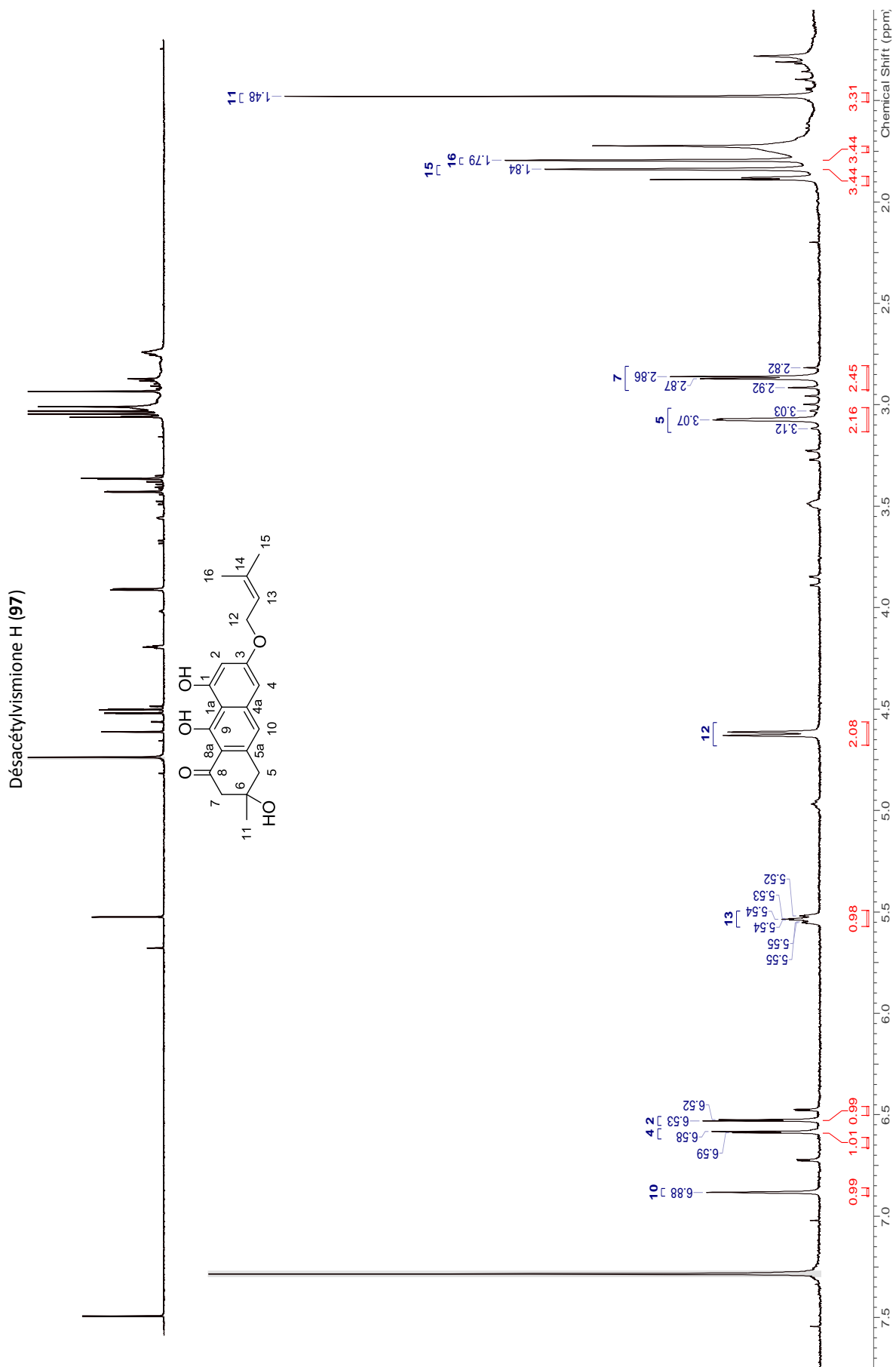


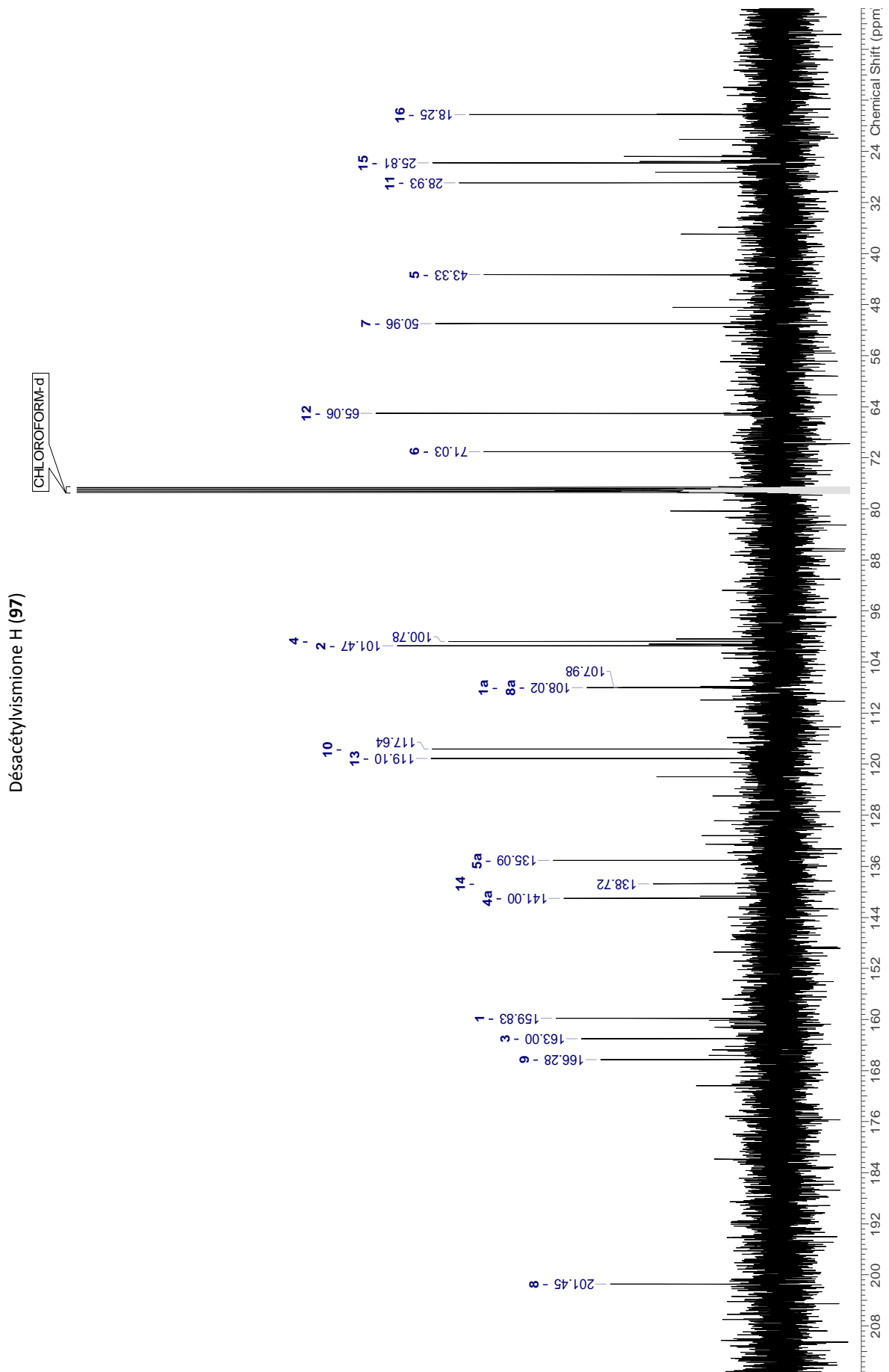
Vismione C (78)



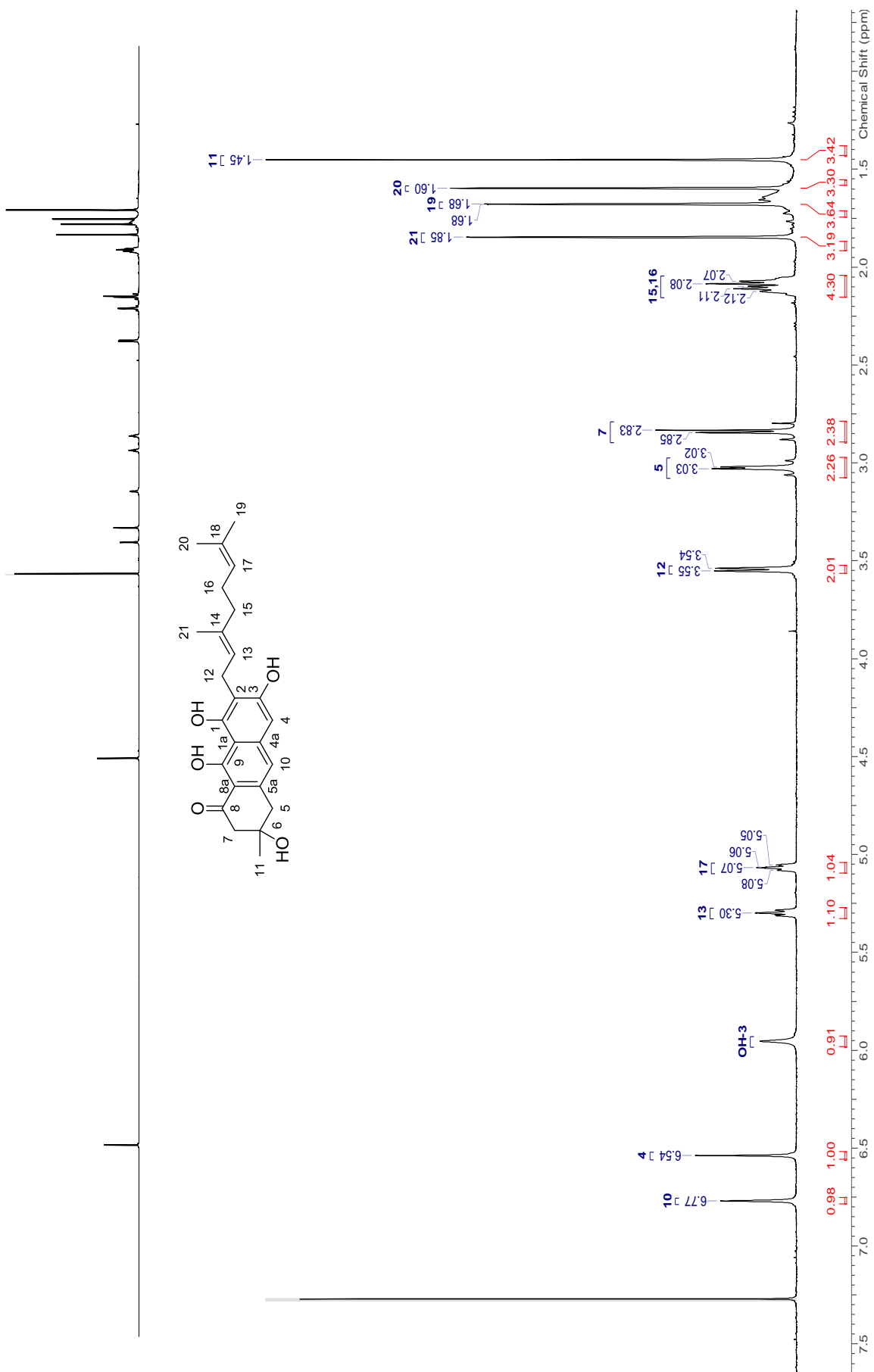


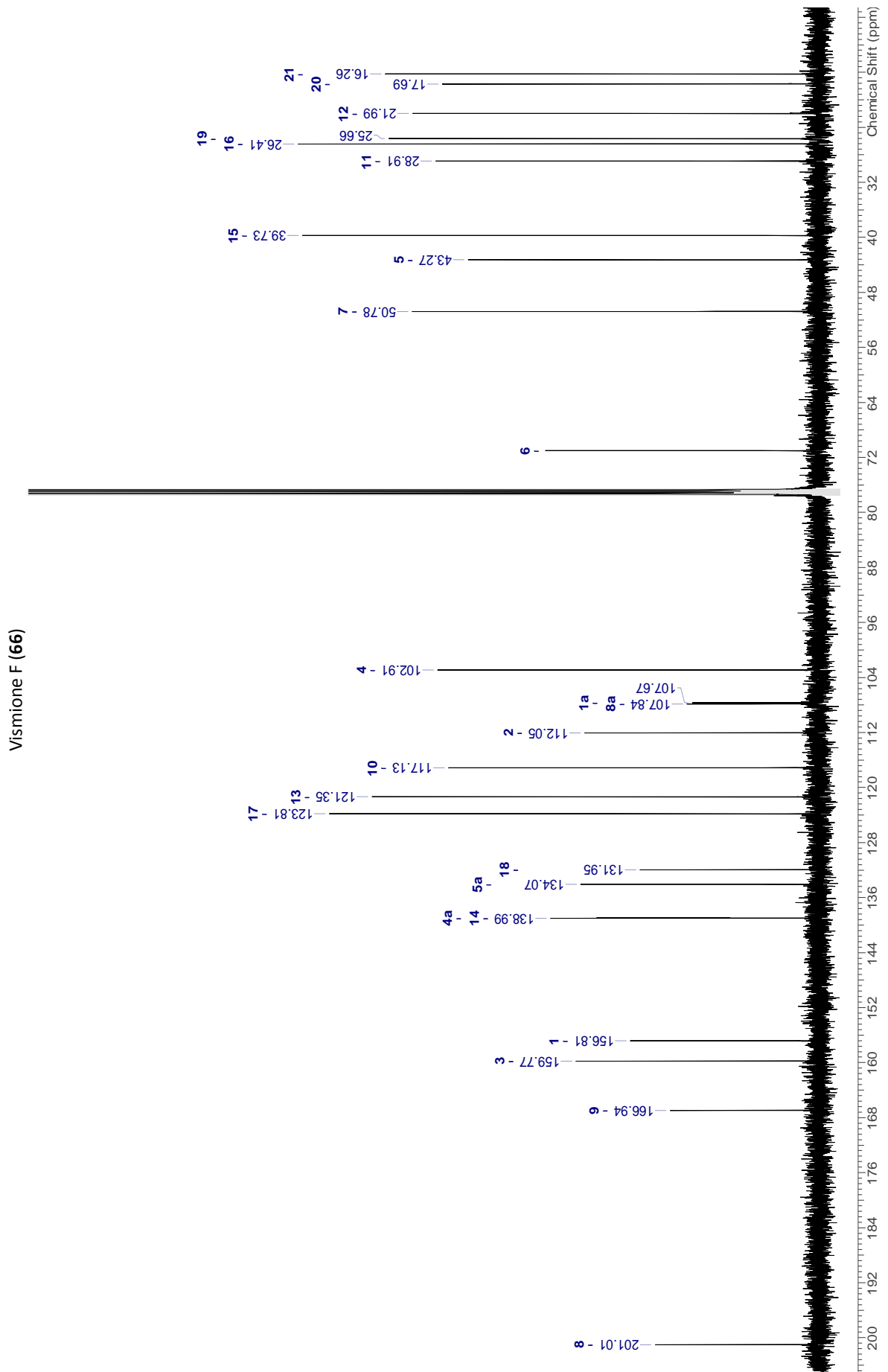


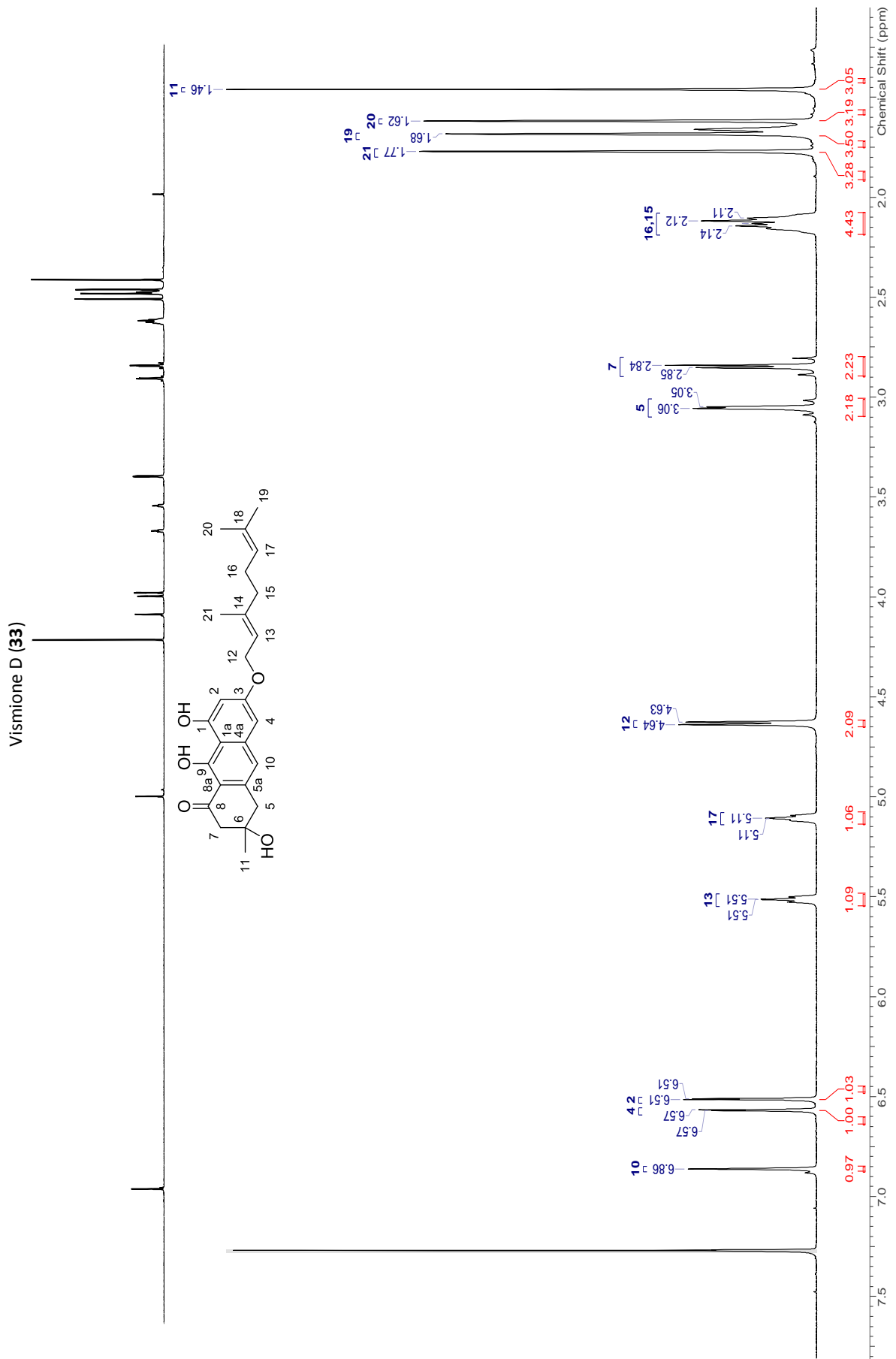


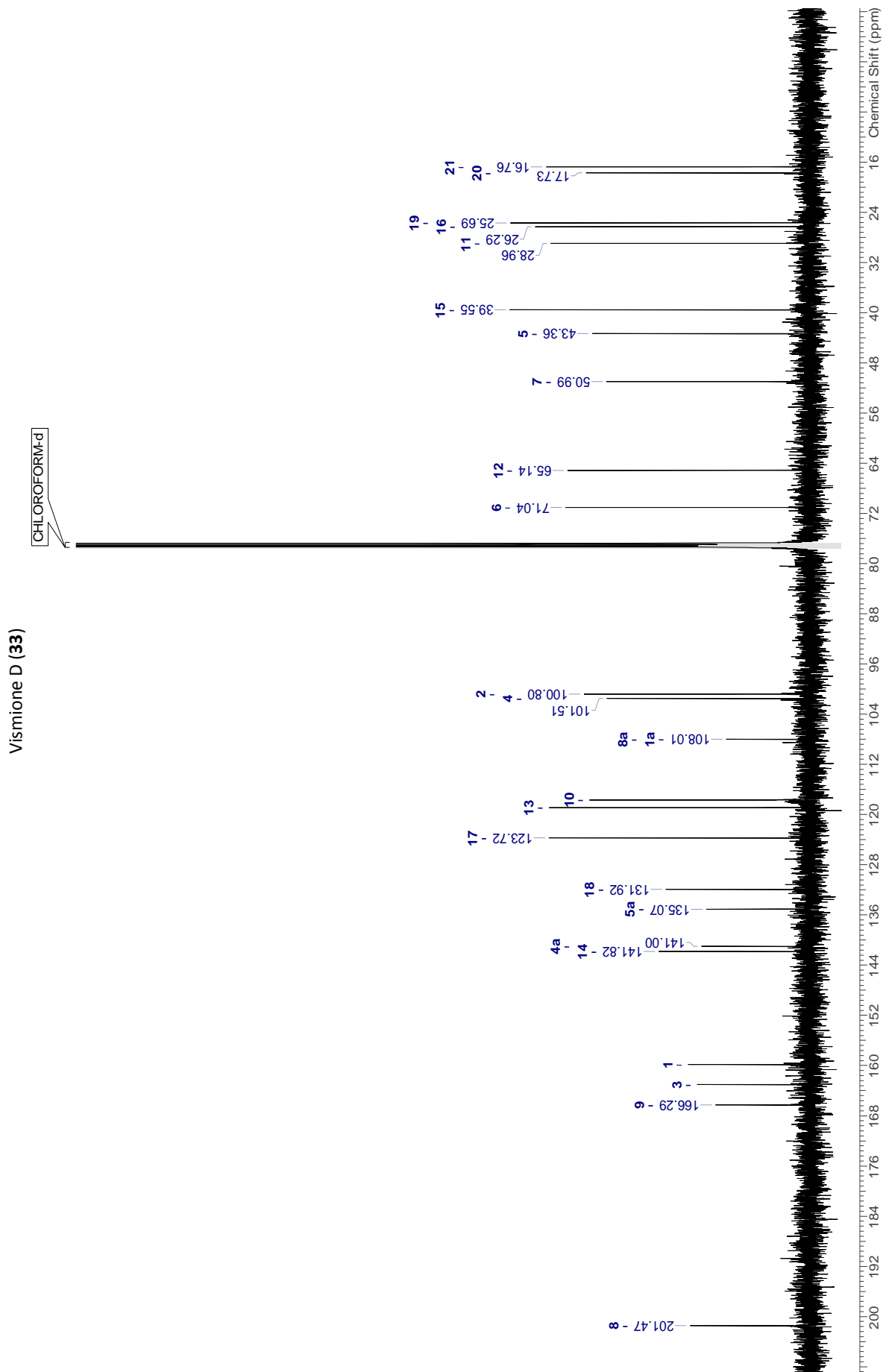


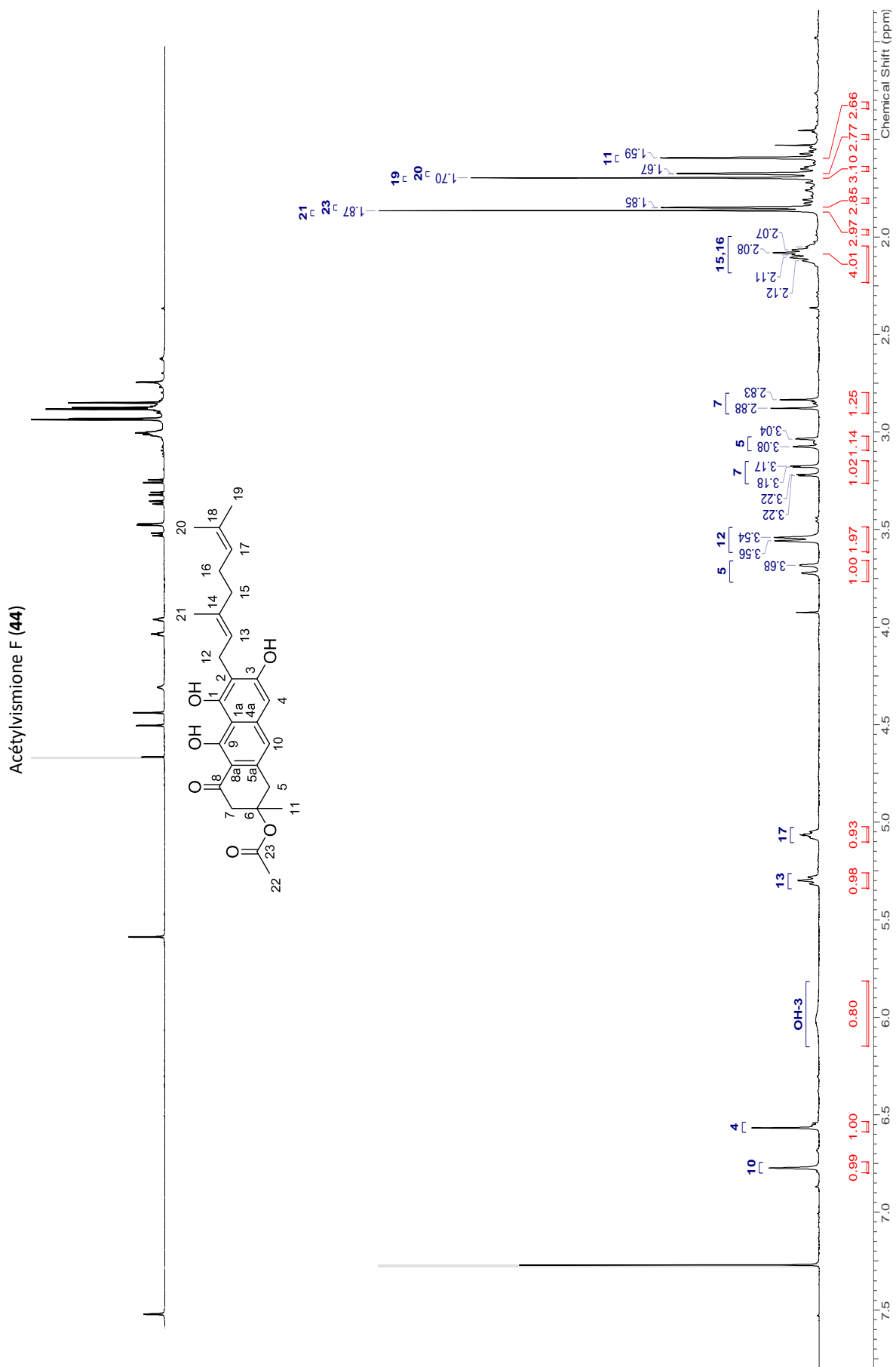
Vismione F (66)

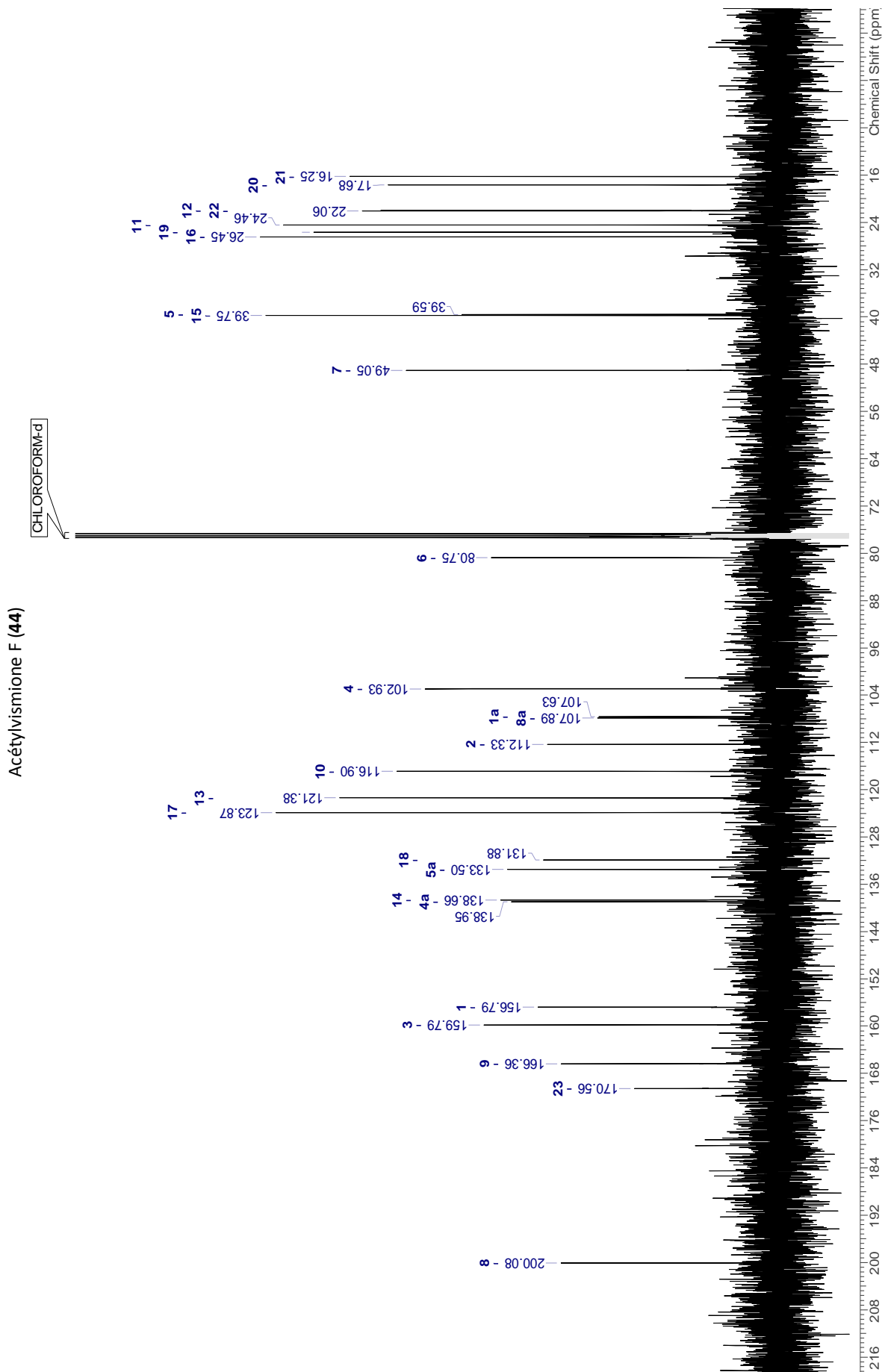




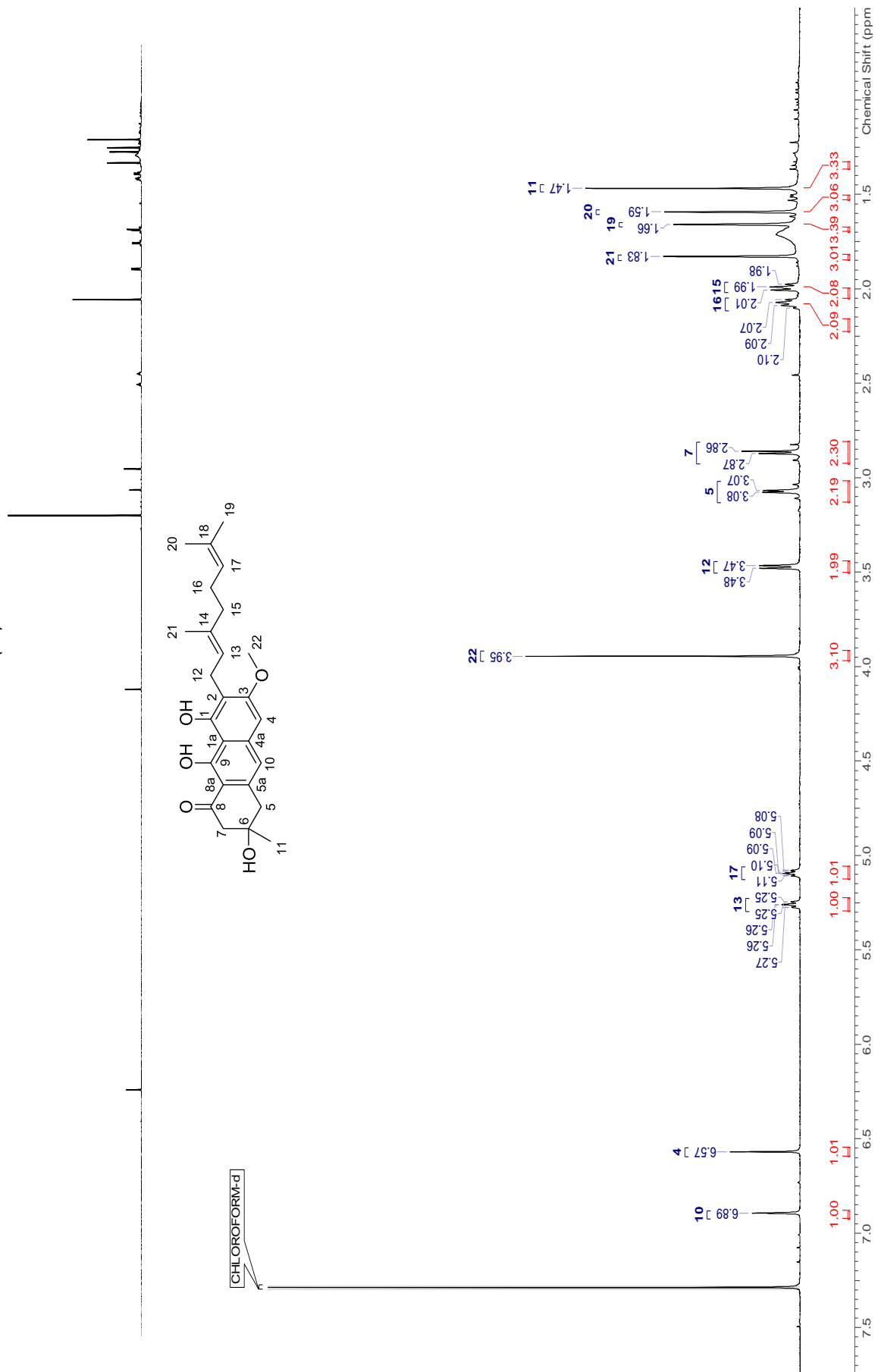


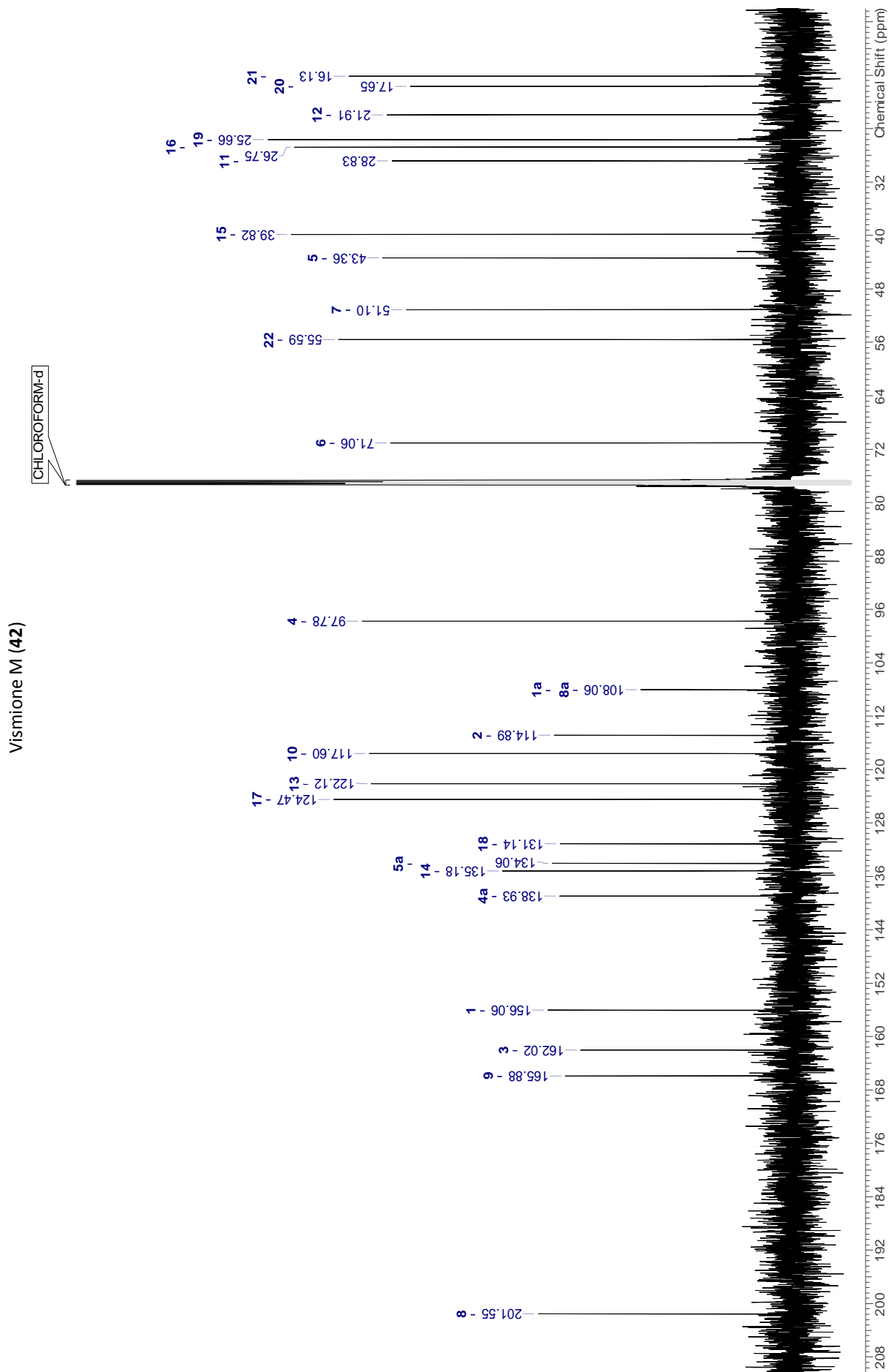


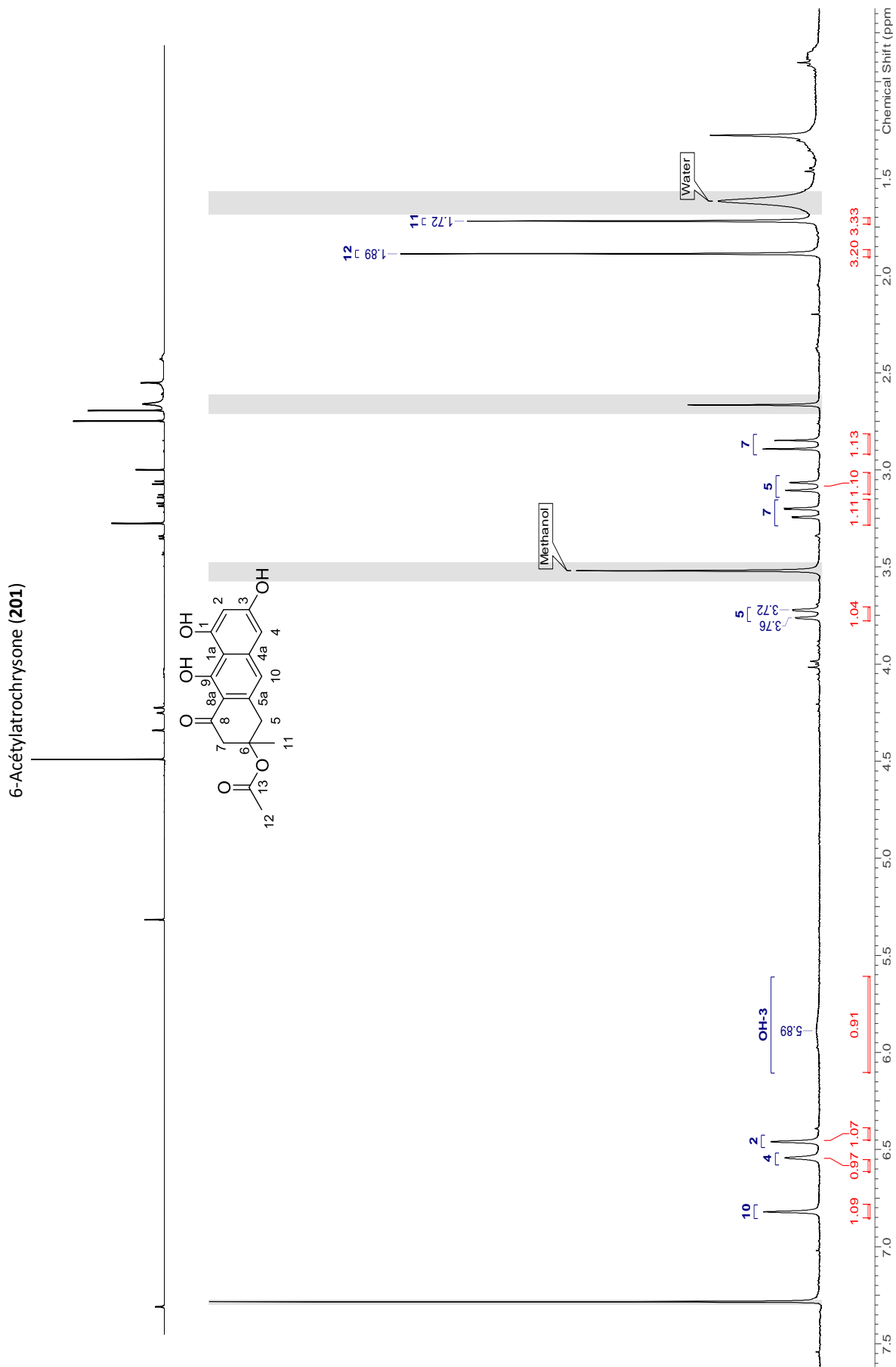


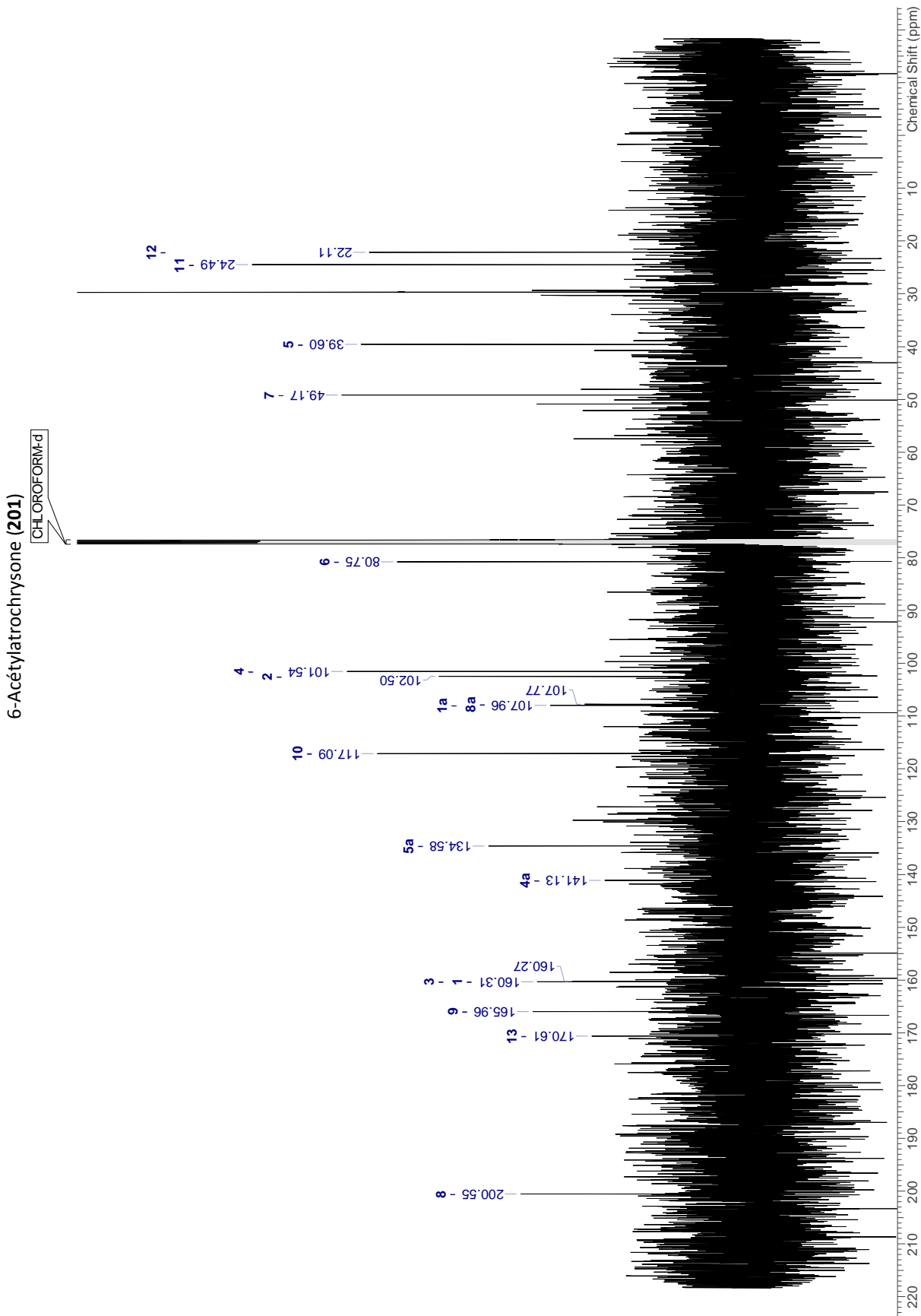


Vismione M (42)







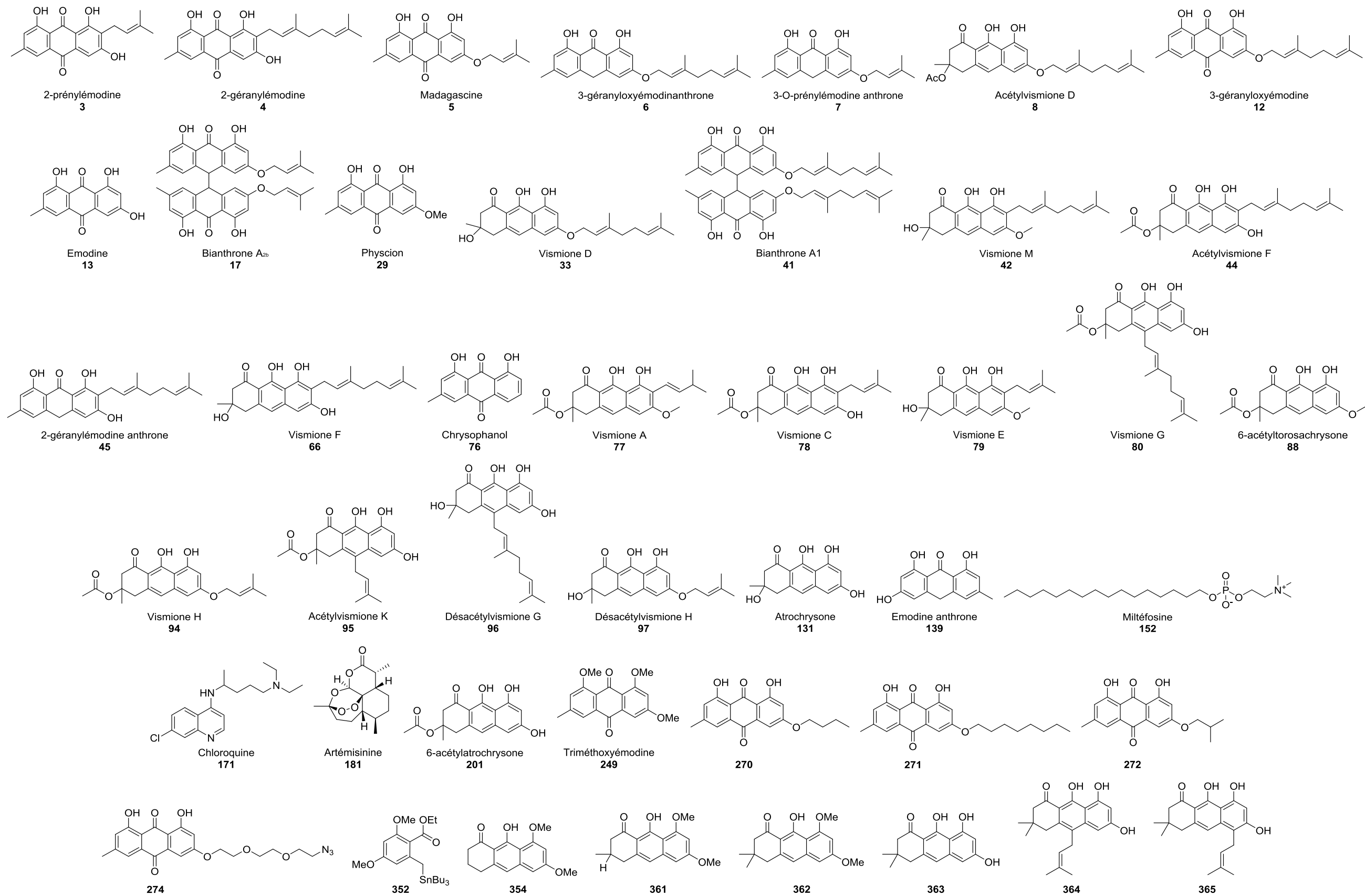


Annexe 5: Codification des extraits

Espèce	Lieu de récolte	Organe	Code
<i>P. adamauense</i>	Boneck	Feuille	PAF
		Fruit	PAFr
		Tige	PAT
<i>P. corymbiferum</i>	Boneck	Feuille	PCEF
		Fruit	PCEFr
		Tige	PCET
	Ekombitie	Feuille	PCE2F
		Fruit	PCE2Fr
		Tronc	PCE2Tc
<i>P. febrifugum</i>	Bangoua	Feuille	PFEF
		Fruit	PFFr
		Tige	PFT
<i>P. floribundum</i>	Boneck	Feuille	PFLOF
		Fruit	PFLOFr
		Tronc	PFLOTc
<i>P. glaberrimum</i>	Ekombitie	Feuille	PGEF
		Fruit	PGEFr
	Boneck	Ecorce	PGE2E
		Feuille	PGE2F
		Fruit	PGE2Fr
		Tige	PGE2T
		Tronc	PGE2Tc
<i>P. glaucum</i>	Ekombitie	Feuille	PGLOF
		Fruit	PGLOFr
		Tige	PGLOT
<i>P. guineense</i>	Balatchi	Ecorce	PGUE
		Feuille	PGUF
		Fruit	PGUFr
		Tige	PGUT
		Tronc	PGUTc
<i>P. kerstingii</i>	Boneck	Feuille	PKF
		Fruit	PKFr
		Tige	PKT
		Tronc	PKTc
<i>P. aurantiacum</i>	Balatchi	Ecorce	POE
		Feuille	POF
		Fruit	POFr
<i>P. senegalense</i>	Ekombitie	Feuille	PSEF
		Fruit	PSEFr

Concernant la codification, le préfixe se rapporte à l'espèce : **PA-** : *P. adamauense*, **PC-** : *P. corymbiferum*, **PFE-** : *P. febrifugum*, **PFLO-** : *P. floribundum*, **PGE-** : *P. glaberrimum*, **PGLO-** : *P. glaucum*, **PGU-** : *P. guineense*, **PK-** : *P. kerstingii*, **PO-** : *P. aurantiacum*, **PSE-** : *P. senegalense*. Le chiffre intermédiaire se rapporte à la localité pour les échantillons récoltés dans deux localités différentes le cas échéant. Le suffixe se rapporte à la partie de plante concernée : **-E** : écorce, **-Tc** : tronc, **-T** : Tige, **-F** : feuille, **-Fr** : fruit.

Annexe 6 : Molécules fréquemment citées dans le manuscrit



Isolement, activités antiparasitaires et synthèse d'analogues structuraux

Résumé

L'étude de plantes utilisées en médecine traditionnelle camerounaise contre le paludisme a révélé des activités antiplasmodiales et antileishmaniennes intéressantes pour des espèces appartenant au genre *Psorospermum* conduisant à l'isolement d'un certain nombre d'anthranoïdes prénylés.

De nouveaux fractionnements basés sur des techniques chromatographiques en polarité de phase inverse et de partage centrifuge ont permis d'isoler 9 vismiones de l'extrait d'écorce de *P. glaberrimum* qui ont montré de fortes activités antileishmaniennes ($30 \text{ nM} < \text{CI}_{50} < 827 \text{ nM}$).

Un protocole d'isolement à l'échelle du gramme pour ces molécules, sensibles aux conditions classiques de purification, a été développé pour fournir les quantités nécessaires à une démarche d'hémisynthèse ultérieure et de compréhension de leur mécanisme d'action.

La répartition de ces molécules dans différents organes de 10 espèces de *Psorospermum* a été étudiée pour évaluer leur intérêt chimiotaxonomique.

Une approche de synthèse organique a également été développée afin d'obtenir des analogues des anthranoïdes naturels pour déterminer leurs activités antiprotozoaires et explorer les relations de structure-activité.

Mots-clés : Hypericaceae, *Psorospermum*, *Plasmodium*, *Leishmania*, CPC, anthrone, anthraquinone, dihydroanthracénone, vismione, chimiotaxonomie.

Pharmacochemistry of anthranoids from *Psorospermum* genus (Hypericaceae)

Isolation, antiprotozoal activities and structural analogues synthesis

Abstract

The screening of plants used in Cameroonian traditional medicine against malaria revealed significant antiplasmodial and antileishmanial activities for species belonging to the *Psorospermum* genus and led to the isolation of several prenylated anthranoids.

Further fractionations based on reversed-phase and centrifugal partition chromatography allowed us to isolate 9 vismiones from the bark extract of *P. glaberrimum*. All these compounds exhibited strong antileishmanial activities ($30 \text{ nM} < \text{IC}_{50} < 827 \text{ nM}$).

A gram-scale isolation protocol of these highly unstable compounds, when traditional ill-suited purification processes are used, has been developed to provide enough starting material for further hemisynthesis steps and to allow the investigation of their mechanism of action.

The repartition of these metabolites in different parts of 10 *Psorospermum* species has been studied to evaluate their chemotaxonomic significance.

A synthetic approach has also been developed to obtain natural anthranoid analogues to investigate their antiprotozoal activities and explore structure-activity relationships.

Keywords : Hypericaceae, *Psorospermum*, *Plasmodium*, *Leishmania*, CPC, anthrone, anthraquinone, dihydroanthracenone, vismione, chemotaxonomy.